

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Effekte von Zoledronat auf die Genexpression von RANKL
sowie auf die histomorphometrische Knochenstruktur des
Göttinger Minischweins**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Daniel Lander

aus
Karlsruhe

Göttingen 2017

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in:	Prof. Dr. med. Dr. med. dent. F.-J. Kramer
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. N. Miosge
Drittreferent/in:	Prof. Dr. med dent. R. Mausberg
Datum der mündlichen Prüfung:	15. Januar 2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen	2
1.2	Knochenstoffwechsel	3
1.2.1	Anatomie und Physiologie des Knochens	3
1.2.2	Zellen des Knochens.....	4
1.2.3	Regulation des Knochenstoffwechsels.....	5
1.3	Bisphosphonate.....	8
1.3.1	Pharmakokinetik.....	10
1.3.2	Wirkmechanismus.....	11
1.4	Tiermodelle.....	13
1.4.1	Definition eines Tiermodells	13
1.4.2	Tiermodelle in der Bisphosphonatforschung	13
1.4.3	Kleintiermodelle.....	14
1.4.4	Großtiermodelle	14
1.5	Fragestellung.....	16
2	Material und Methode.....	17
2.1	Methodik.....	17
2.2	Herkunft und Haltung	18
2.3	Gruppeneinteilung	19
2.4	Behandlung mit Zoledronat (Zometa®)	19
2.5	Operationen.....	19
2.6	Versuchsabschluss	22
2.7	Molekularbiologie	22
2.7.1	Geräte und Reagenzien	22
2.7.2	RNA-Isolierung und cDNA-Gewinnung	24
2.7.3	PCR	26
2.8	Histomorphometrie	29
2.8.1	Geräte und Reagenzien	29
2.8.2	Aufarbeitung des Knochenmaterials für die Histomorphometrie	30
2.8.3	Mikroskopie	31
2.8.4	Histomorphometrie.....	31
2.9	Statistik.....	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Molekularbiologische Analyse zur RANKL-Expression	33
3.1.1	RANKL-Expression im Alveolarknochen des Oberkiefers.....	33
3.1.2	RANKL-Expression im Alveolarknochen des Unterkiefers.....	34
3.1.3	RANKL-Expression im Unterkieferknochen.....	36

Inhaltsverzeichnis

3.1.4	RANKL-Expression im Beckenkammknochen	38
3.2	Histomorphometrie	40
3.2.1	Knochenfläche im Oberkiefer	40
3.2.2	Knochenfläche im Unterkiefer	42
4	Diskussion	45
4.1	Diskussion der Methode	45
4.1.1	Molekularbiologische Verfahren	45
4.1.2	Histomorphometrische Verfahren.....	47
4.2	Diskussion des Tiermodells.....	50
4.3	Diskussion der statistischen Auswertung	51
4.4	Diskussion der Ergebnisse.....	52
4.4.1	Diskussion der molekularbiologischen Untersuchung der RANKL- Expression.....	52
4.4.2	Histomorphometrische Ergebnisse	54
4.5	Ausblick.....	55
4.6	Schlussfolgerung.....	56
5	Zusammenfassung.....	58
6	Literaturverzeichnis	60
7	Anhang.....	68
7.1	Statistische Auswertung der RANKL- Expression	68
7.2	Statistische Auswertung der histomorphometrischen Analyse	70

1 Einleitung

Bei der Anwendung von Bisphosphonaten über einen längeren Zeitraum werden gehäuft Krankheitsbilder beobachtet, die sich in Form einer Osteonekrose des Kieferknochens darstellen. Beschrieben werden diese als Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose (BRONJ) (Sharma et al. 2013).

Bisphosphonate werden seit Jahrzehnten zur Therapie bei Knochenstoffwechselstörungen wie z. B. Osteoporose oder Morbus Paget, bei malignen Erkrankungen wie dem Plasmozytom oder Knochenmetastasen bei Prostata-, Mamma-, Nierenzell- oder Lungenkarzinomen, erfolgreich eingesetzt. Zur Anwendung kommen häufig neben oral verabreichten Bisphosphonaten wie Alendronat, Risedronat und Ibandronat auch intravenös verabreichte Bisphosphonate wie Pamidronat und Zoledronat (Hoff et al. 2008; Tosi et al. 2006; Pastor-Zuazaga et al. 2006; Weitzman et al. 2007; Thakkar et al. 2006; Killion und Wickersham 2006; Body 2003; Olson et al. 2005; Saad 2006).

Der biologische Haupteffekt der Bisphosphonate liegt in der Beeinflussung der Knochenresorptionsfähigkeit durch Hemmung der Osteoklastenrekrutierung, so dass eine Umstrukturierung des Knochens (bone remodeling) nur in beschränktem Maße stattfinden kann. Die Pathogenese der BRONJ steht im möglichen Zusammenhang mit der Akkumulation von Mikrofrakturen, die als Folge eines eingeschränkten Knochenumbaus bei gleichzeitig hoher funktioneller Belastung des Kieferknochens auftreten (Krauth et al. 2008). Auch werden antiangiogenetische Eigenschaften der Bisphosphonate und Einflüsse auf die lokale Durchblutung diskutiert (Fournier et al. 2002; Santini et al. 2002). Der Kiefer scheint deswegen betroffen zu sein, da er eine hohe Rate an Knochenumbauvorgängen aufweist (Baron et al. 1977).

Die Inzidenz der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose variiert erheblich je nach Art der Grunderkrankung. Die meisten Fälle von BRONJ treten 2 - 3 Jahre nach der Therapie mit intravenös verabreichten Bisphosphonaten und nach über 5 Jahren mit oral verabreichten Bisphosphonaten auf (Wimalawansa 2008). Die höchste Inzidenz für eine BRONJ ist bei Zoledronsäure festzustellen. In der Literatur wird für dieses intravenös bei Myelom-, Brust- und Prostata-Karzinom-Patienten verabreichte Bisphosphonat die höchste Wirksamkeit beschrieben (Santini et al. 2003; Roelofs et al. 2006; Pogrel 2004; Schwartz 2004; Pozzi et al. 2007; Vannucchi et al. 2005). Die durch die Datenbank der Firma Merck Pharma angegebene Inzidenz von BRONJ

nach oraler Bisphosphonatexposition beträgt 0,7/100.000 Patienten pro Jahr (Ruggiero et al. 2009).

Im Gegensatz zu Osteoporose-Patienten ist das kumulative Risiko, eine BRONJ zu entwickeln, bei Karzinompatienten, die mit intravenös verabreichten Bisphosphonaten behandelt werden, laut Studien 900 - fach erhöht (Wimalawansa 2008). Bamias et al. bezifferten die Inzidenz nach dreijähriger Behandlung mit intravenös verabreichten Bisphosphonaten zwischen 6 und 21% (Bamias et al. 2005). Wimalawansa et al. fassten in einem Review zur BRONJ sämtliche Studien zur Inzidenz der BRONJ nach intravenöser Bisphosphonattherapie zusammen und formulierten die Annahme, dass die Dauer der Therapie, die Höhe der Dosis und die Frequenz des Verabreichungsintervalls wahrscheinliche Parameter für die Entwicklung einer BRONJ darstellen (Wimalawansa 2008).

Seit 2003 häufen sich Fallberichte über das Auftreten von Bisphosphonat-assoziierten Kieferknochennekrosen, so dass 2004 die Arzneimittelkommission der deutschen Ärztesgesellschaft auf den Zusammenhang von Kiefernekrosen unter Bisphosphonattherapie hinwies, hier also ein Zusammenhang gesehen werden muss (Marx 2003). Die ausführliche Pathophysiologie der Entstehung einer Bisphosphonatnekrose ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt. Aktuelle Studien zeigen, dass Entzündungs- und Infektionsmechanismen eine bedeutende Rolle spielen (Schlittenbauer 2012).

1.1 Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen

Eine Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose ist definiert als eine Erkrankung, bei der die Trias aus mehr als 8 Wochen freiliegendem Kieferknochen, Bisphosphonatmedikation in der Anamnese und keine Kopf-Hals-Radiatio in der Anamnese vorliegt (Marx 2003; Ruggiero et al. 2004; Ruggiero et al. 2009).

Diese Charakterisierung des Krankheitsbildes deckt sich mit denen anderer Fachgesellschaften wie der American Association of oral and maxillofacial surgeons (AAOMS) (Ruggiero et al. 2009).

Klinisch ist eine Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose nur schwer von einer infizierten Osteoradionekrose zu unterscheiden. Symptomatisch macht sich eine BRONJ neben freiliegendem Knochen in der Mundhöhle auch gelegentlich durch Begleitsymptomen wie Schmerzen, spontane Sensibilitätsstörungen, Foetor ex ore, Kieferkammfisteln, Zahnlockerungen sowie durch exudative und ödematöse Schwellungen des Weichgewebes bemerkbar (Ruggiero et al. 2009).

Das klinische Erscheinungsbild der manifesten Erkrankung kann sich von einer schlecht heilenden Extraktionsalveole über ein kleines Areal freiliegenden Knochens bis hin zu einer massiven Nekrose des kompletten Kiefers oder einem ausgeprägten Weichteilinfekt erstrecken (Dannemann et al. 2006) (Abbildung 1).

Die Ausbildung einer BRONJ kann zusätzlich durch sogenannte Kofaktoren wie dentalchirurgische Eingriffe oder chronische Druckstellen bei Prothesenträgern begünstigt werden (Grötz 2009).

Diagnostisch ist eine BRONJ durch orale Inspektion, dreidimensionale bildgebende Verfahren sowie durch eine histologische Untersuchung zum Ausschluss anderer Pathologien oder tumoröser Geschehen festzustellen.



Abbildung 1: Klinisches Bild einer Bisphosphonatnekrose.

1.2 Knochenstoffwechsel

1.2.1 Anatomie und Physiologie des Knochens

Als elementarer Bestandteil des menschlichen Bewegungsapparates und Skelettsystems nimmt der Knochen wichtige Funktionen bezüglich Stütz- und Haltefunktion ein. Er fungiert gewissermaßen als Gerüst für Ansatz und Ursprung der Muskulatur, um Bewegung und Funktion zu ermöglichen. Bedingt durch seinen Stoffwechsel kann er auf dauerhafte mechanische Belastungen reagieren und sich durch Umbauvorgänge an diese anpassen. Darüber hinaus übernimmt er für Organe des ZNS, der Blutbildung und der inneren Organe eine wichtige Schutzfunktion. Auch bei der Regulation des Kalzium- und Phosphathaushaltes spielt der Knochen eine zentrale Rolle (Schiebler und Arnold 1997).

1.2.2 Zellen des Knochens

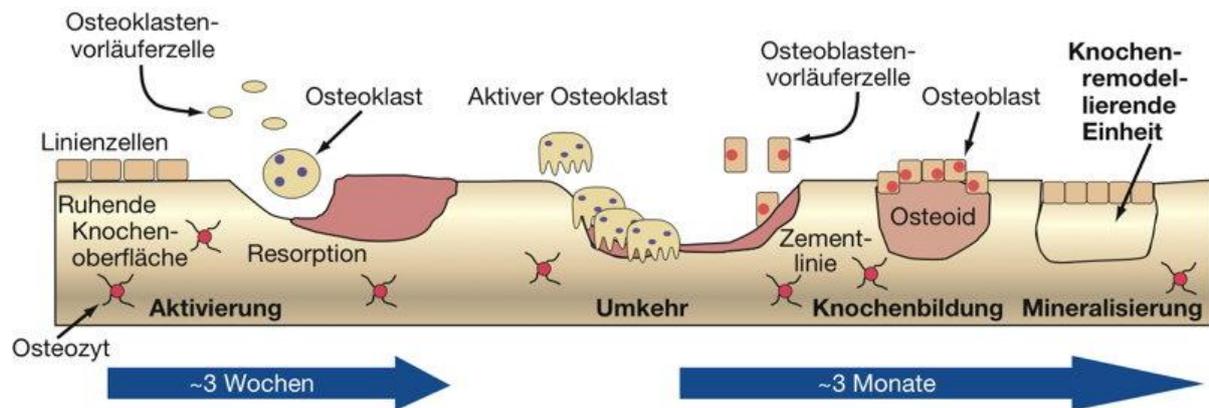
Knochengewebe besteht aus verschiedenen Zelltypen (Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten) und mineralisierter Extrazellulärmatrix, deren Hauptkomponenten Kollagenfibrillen und Hydroxylapatit-Kristalle sind. Hydroxylapatit besteht vorwiegend aus Calcium-, Phosphat- und Hydroxyl-Ionen und macht im Knochengewebe ca. 45% des Feuchtgewichtes aus (Lüllmann-Rauch 2003).

Die charakteristischen Zellen des Knochens sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Osteoblasten stammen von mesenchymalen Stammzellen ab und entwickeln sich entsprechend ihrer genetischen Festlegung zu Osteoprogenitorzellen. Aus diesem Vorrat spezialisierter Stammzellen werden ein Leben lang Osteoblasten generiert. Aufgabe der Osteoblasten ist die Synthese bzw. Sezernierung von Kollagen Typ I, Proteoglykanen und Glycoproteinen sowie die Regulierung der Mineralisation und des Osteoklastenhaushaltes (Abb.2). Neue Knochenmatrix wird im reifen Knochen stets auf schon vorhandener mineralisierter Matrix abgelagert. Daher liegen Osteoblasten immer einer freien knöchernen Oberfläche an, entweder im Inneren des Knochens oder außen unter dem Periost (Lüllmann-Rauch 2003). Diese einschichtige Lage kubischer Zellen ist durch eine noch nicht mineralisierte Schicht aus Kollagenfibrillen, auch Osteoidschicht genannt, von der mineralisierten Matrixschicht getrennt. Diese Osteoidschicht stellt das organisch-chemische Grundgerüst der im Bau befindlichen neuen Knochenlamelle dar. Ein Teil der Osteoblasten differenziert sich zu Osteozyten, indem sie von der nachfolgenden Osteoblastengeneration nach Mineralisation des Osteoids eingemauert werden (Lüllmann-Rauch 2003).

Osteozyten sind komplett von mineralisierter Knochenmatrix umschlossen und befinden sich in sogenannten Lakunen, von welchen Kanalikuli abgehen, in denen sich die Fortsätze der Osteozyten befinden. Benachbarte Osteozyten sind an den Enden der Fortsätze über Gap-Junctions gekoppelt. Dadurch wird ein Stoffaustausch (von Metaboliten und Signalstoffen) zwischen den Zellen ermöglicht (Junqueira et al. 2002). Osteoklasten sind für den Knochenabbau und seine Resorption zuständige mehrkernige Zellen, die sich aus dem mononukleären Phagozytensystem entwickeln. Die einkernigen Osteoklastenvorläuferzellen zirkulieren im Blut und lagern sich endostalen Knochenoberflächen an. Dort proliferieren sie, fusionieren zu mehrkernigen Zellen und bilden einen Bürstensaum, ruffled border genannt (siehe

Abbildung 2) (Mundy 2002). Osteoklastenvorläufer werden durch osteoblastäre Sezernierung von Zytokinen wie dem macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) zur Proliferation angeregt. Osteoklastenvorläufer und Osteoblasten interagieren direkt miteinander über membranständige RANK-Rezeptoren (Receptor Activator of NF- κ B), wodurch die Reifung der Osteoklasten induziert oder inhibiert werden kann.



Aus: Harrisons Innere Medizin, 18. Auflage (Copyright: ABW Wissenschaftsverlag GmbH)

Abbildung 2: Darstellung des Knochenremodellings durch das Osteoblasten-Osteoklastensystem (Dietel et al. 2012).

1.2.3 Regulation des Knochenstoffwechsels

1.2.3.1 Receptor Activator of NF- κ B (RANK)

Nakagawa et al. beschrieben 1998 als erste RANK im Zusammenhang mit Prozessen des Knochenstoffwechsels. RANK ist ein aus 616 Aminosäuren aufgebautes Transmembranprotein. Es besteht aus einer 184 Aminosäuren großen N-terminalen extrazellulären, einer 21 Aminosäuren zählenden transmembranen und einer 383 Aminosäuren umfassenden c-terminalen zytoplasmatischen Domäne sowie aus einem 28 Aminosäuren starken Signalpeptid (Anderson et al. 1997). Dieses Protein wird von Monozyten/Makrophagen (präosteoklastische Zellen), T- und B-Zellen, dendritischen Zellen und Fibroblasten sowie reifen Osteoklasten exprimiert (Anderson et al. 1997; Hsu et al. 1999; Nakagawa et al. 1998).

1.2.3.2 Osteoprotegerin (OPG)

Simonet et al. identifizierten 1997 im Rahmen eines DNA- Sequenzierungs-Projektes ein mögliches neues Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNRF). Sie benannten es seiner Funktion im Osteoklastenstoffwechsel folgend Osteoprotegerin (OPG) (Simonet et al. 1997). OPG ist ein aus 401 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, welches nach Abspaltung eines Signalpeptids, bestehend

aus 21 Aminosäuren, in seiner aktiven, 40 kDa schweren und 380 Aminosäuren langen Form vorliegt (Simonet et al. 1997). Im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der TNRF-Rezeptor-Superfamilie fehlt ihm die transmembrane und die zytoplasmatische Domäne, so dass es als lösliches Protein abgegeben wird (Lesky 2005). OPG-mRNA wird in einer Reihe von Geweben wie zum Beispiel Lunge, Herz, Niere, Leber, Magen, Darm, dem zentralen Nervensystem, Schilddrüse und Knochen gebildet (Simonet et al. 1997; Yasuda et al. 1998). Bucay et al. beobachteten einen Einfluss von OPG auf die Zellen des arteriellen Gefäßsystems (Bucay et al. 1998). So konnten sie bei Mäusen mit OPG-Mangel im Alter von 4 Monaten neben einer Osteoporose auch Verkalkungen der großen Gefäße sowie eine Intima- und Mediaproliferation und Aortendissektion feststellen (Bucay et al. 1998). Auch Malyankar et al. beschrieben OPG als einen möglichen Überlebensfaktor für Endothelzellen (Malyankar et al. 2000).

1.2.3.3 Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)

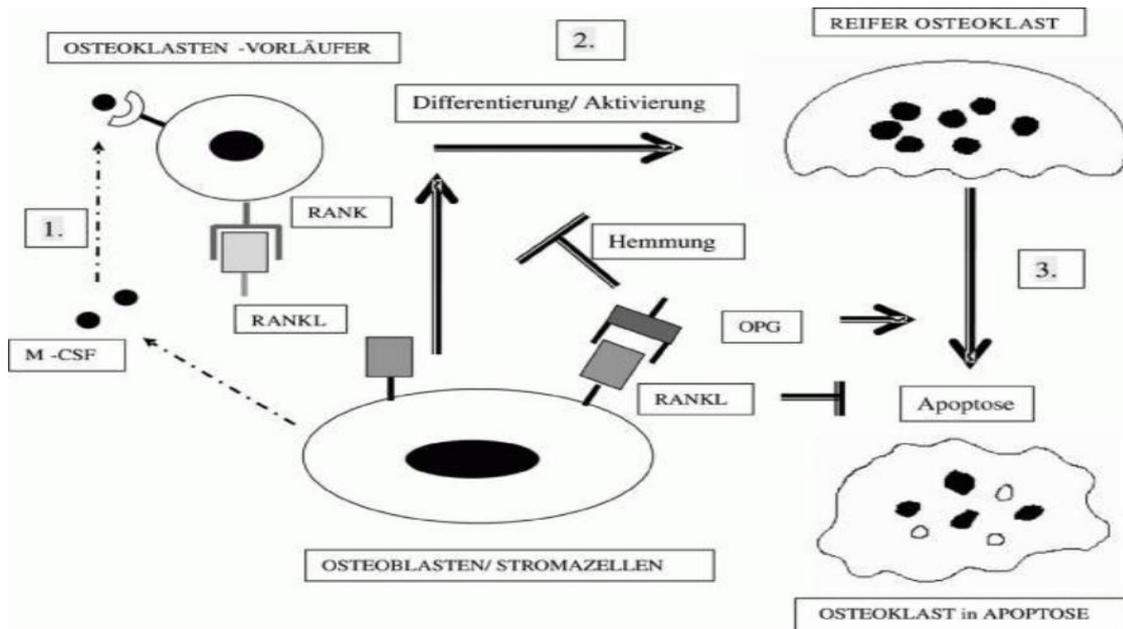
Unter Verwendung von Expressionsklonen identifizierten Lacey et al. ein Polypeptid, das als Ligand für OPG (OPGL) zu fungieren schien und in einer transmembranen und löslichen (gespaltenen) Formen existiert (Lacey et al. 1998). RANKL, Receptor-Activator of NF κ B-Ligand, ist ein Protein aus 317 Aminosäuren, das sowohl als membrangebundene Form mit 40 bis 45 Kilodalton als auch als lösliche Form mit 31 Kilodalton nach der Abspaltung an Position 140 bzw. 145 im menschlichen Organismus vorliegt (Lacey et al. 1998). Es gehört zur TNF-Superfamilie. Die signifikantesten Vorkommen von RANKL- mRNA wurden in lymphatischen Geweben, Knochen und Knochenmarkzellen festgestellt (Anderson et al. 1997; Wong et al. 1997; Lacey et al. 1998). RANKL fördert die Osteoklastenaktivierung und die Osteoklastendifferenzierung (Lacey et al. 1998). Daneben wirkt RANKL auch im Immunsystem als Aktivator von T-Zellen und Überlebensfaktor für dendritische Zellen sowie in der Organogenese (Anderson et al. 1997; Wong et al. 1997). 1999 konnten Kong et al. in einem Experiment mit RANKL-Knockout-Mäusen nachweisen, dass es zur Ausbildung einer Osteoporose und zum vollständigen Fehlen der Osteoklasten bei den Versuchstieren kam. Die Tiere zeigten Differenzierungsdefekte von T- und B-Zellen, Brustdrüsenentwicklung sowie Nichtanlagen bestimmter Lymphknoten (Kong et al. 1999).

1.2.3.4 RANK, OPG, RANKL-System

Knochen unterliegt, bedingt durch ständige funktionelle Belastungen, einem steten Auf- und Abbau seiner Zellen. Reguliert wird dieses Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten durch RANKL, RANK und OPG aus der Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie.

Das auf der Oberfläche von Osteoklastenvorläuferzellen exprimierte RANK fungiert als Rezeptor für den auf der Osteoblastenoberfläche produzierten RANK-Ligand (Abb.3). RANK ist der einzige Rezeptor für RANKL (Anderson et al. 1997; Li et al. 2000). Simonet et al. fanden im Rahmen ihrer Arbeit über die Zusammenhänge des Tumor-Nekrose-Systems heraus, dass das RANK, RANKL-System durch einen weiteren Vertreter der Tumor-Nekrose-Superfamilie antagonisiert wird, den sie als Osteoprotegerin (OPG) beschrieben (Simonet et al. 1997). Der von den Osteoblasten produzierte lösliche Faktor OPG ist in der Lage, im Sinne einer kompetitiven Hemmung als Antagonist von RANKL auch den Rezeptor RANK zu binden und damit die Wirkung von RANKL zu inhibieren (Abbildung 3) (Sievers 2012). Membrangebunden liegt der Faktor M-CSF auf der Oberfläche der Osteoblasten vor und bindet an den c-Fms-Faktor auf den Osteoklastenvorläuferzellen. Zusammen mit RANKL induzieren sie die Reifung von Osteoklasten. Mittels dieser Mechanismen ist eine Regulation der Osteoklastenreifung und Osteoklastenaktivierung sowie letztendlich eine Steuerung der Knochenstoffwechselprozesse möglich.

Andere osteotrope Faktoren wie Parathormon (PTH), aber auch PTH-related Peptide (PTHrP), Östrogene, Glukokortikoide und 1,25(OH)₂-Vitamin-D₃ können die Synthese von OPG oder RANKL beeinflussen. So sinkt bei Östrogenmangel die osteoblastäre OPG-Produktion und damit der "Schutz" vor Knochenverlust (Böcker 2012).



Keck A-V, Pecherstorfer M Journal für Mineralstoffwechsel 2003; 10 (2): 6-11 ©

Abbildung 3: Regulationssysteme des Knochenstoffwechsels (Keck und Pecherstorfer 2003).

1.3 Bisphosphonate

Bisphosphonate (BP) gehören zu den Pyrophosphat-Analoga. Charakteristisch ist, dass in ihrer Struktur anstelle des zentralen Sauerstoffatoms ein Kohlenstoffatom substituiert ist (P-C-P), was sie von den Pyrophosphaten unterscheidet (Abb.4). An diesen Kohlenstoffatomen können sich unterschiedlichste Seitengruppen befinden, die für die Wirkung eines solchen Präparates verantwortlich sind. Die Pharmakokinetik der verschiedenen BP wird bestimmt durch freie Valenzen am C-Atom, den Liganden R1 und R2, um an entsprechende Rezeptoren binden zu können. Während die eine Seitenkette an die Mineralsubstanz der Knochenoberfläche bindet, bestimmt die andere Seitenkette Klasse und Potenz (Bartl 2006).

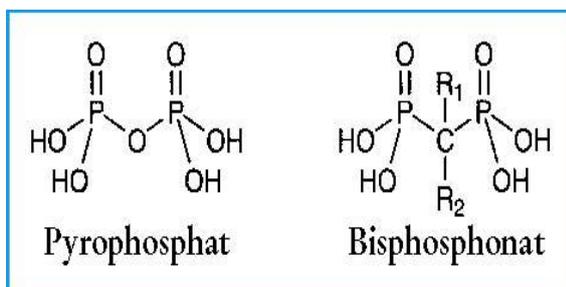


Abbildung 4: Strukturformeln von Pyrophosphat und Bisphosphonat (Scriba 2000).

Enthalten die Kohlenstoffsubstituenten Stickstoff spricht man von stickstoffhaltigen (Alendronat, Pamidronat, Ibandronat, Risedronat, Zoledronat), fehlt dieser, spricht man von stickstofffreien (Clodronat und Etidronat) Bisphosphonaten (Abb. 5) (Graefe et al. 2011). Die Bisphosphonate der ersten Generation sind die sogenannten Nicht-Amino-Bisphosphonate oder Alkylbisphosphonate. Diese enthalten eine aliphatische R₂-Seitenkette wie z.B. Etidronat oder sind mit Halogenen substituiert wie z.B. Clodronat.

Bisphosphonate der zweiten Generation sind Aminobisphosphonate. Sie enthalten Aminogruppen in der R₂-Seitenkette wie z.B. Alendronat, Pamidronat oder Ibandronat. Die Bisphosphonate der dritten Generation sind ebenfalls Aminobisphosphonate. Sie sind am Stickstoff substituiert und besitzen basische stickstoffhaltige Heterozyklen in der R₂-Seitenkette wie z.B. Zoledronat (Bähr et al. 2013). Aminobisphosphonate, also Bisphosphonate der 2. und 3. Generation, weisen eine höhere Aktivität aufgrund ihrer längeren R₂-Seitenketten auf als die Nicht-Aminobisphosphonate der 1. Generation. So sind die neuen Bisphosphonate ca. 20.000 mal potenter als Etidronat, das Bisphosphonat der ersten Generation (Bartl und Bartl 2004).

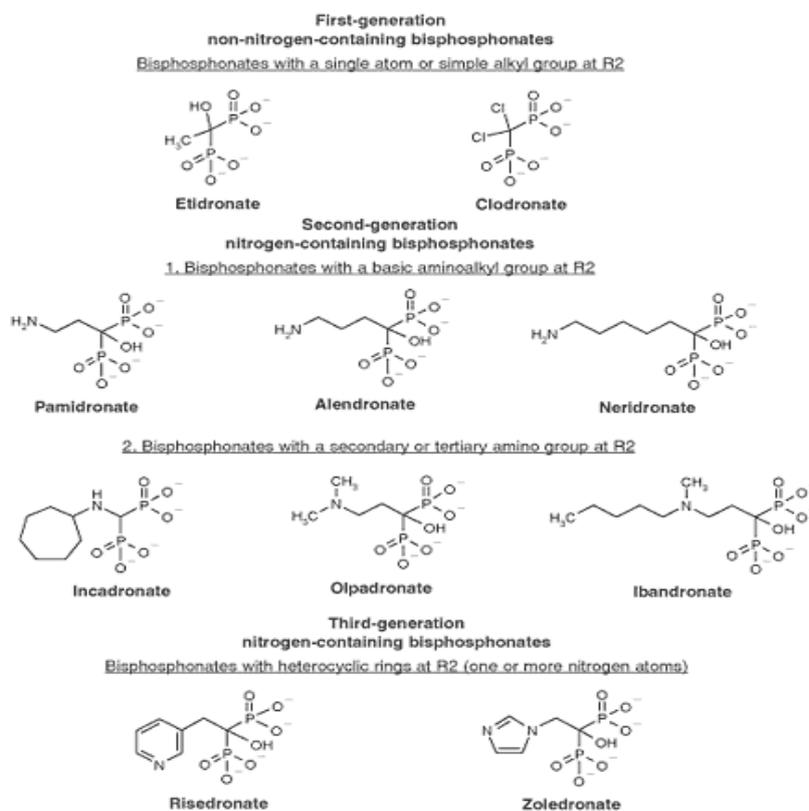


Abbildung 5: Darstellung der verschiedenen Bisphosphonatgenerationen (Soltau und Drevs 2004).

Tabelle 1: Auflistung der verbreitetsten Bisphosphonate, ihrer Handelsnamen, ihrer relativen Wirkungspotenz, der Applikationsform und des Auftretens einer BRONJ.

Substanz	Handelsname	Rel. Potenz	Applikation	BRONJ
Etidronat	Didrone-Kit®	1	Oral	-
Clodronat	Ostac®, Bonefos®	10	oral, i.V.	-
Tiludronat	Skelid®	10	oral, i.V.	-
Pamidronat	Aredia®	100	i.V.	++
Aledronat	Fosamax®	1000	Oral	+
Risedronat	Actonel®	5000	Oral	(+)
Ibandronat	Bondronat®	10000	oral, i.V.	(+)
Zoledronat	Zometa®	20000	i.V.	++

1.3.1 Pharmakokinetik

Ähnlich wie gewöhnliche Pyrophosphate greifen Bisphosphonate in den Calciumstoffwechsel ein, ohne allerdings wie diese durch Gewebe-Phosphatasen zu Phosphat hydrolysiert zu werden und somit therapeutisch nicht mehr nutzbar zu sein. Bisphosphonate entfalten ihre Wirkung aufgrund ihrer Pharmakokinetik in den osteoklastären Resorptionslakunen, in die sie, an Hydroxylapatit gebunden, im Verlauf der Osteolyse gelangen und von Osteoklasten aufgenommen werden. Aufgrund ihrer unlöslichen und festen Komplexbildung mit Kalzium werden die Bisphosphonate im Darm schlecht resorbiert. Studien konnten belegen, dass nur ca. 1-10% der oral eingenommenen Bisphosphonate intestinal aufgenommen werden. Die Speicherung im Knochen beträgt hingegen ca. 20-50% der resorbierten Menge (Ripperger 2010). Der Rest wird innerhalb eines Tages im Urin oder Stuhl ausgeschieden (Bartl und Bartl 2004). Die neueren Aminobisphosphonate werden zu weniger als 1% resorbiert (Bartl und Bartl 2004). Für die Resorption und damit die Wirkung der Bisphosphonate ist die Einnahme im nüchternen Zustand wichtig, da sie ansonsten mit dem Kalzium der Nahrung eine unlösliche Verbindung eingehen würden (Bartl und Bartl 2004).

Die Plasmaeiweißbindung schwankt je nach Substanz zwischen 50 und 99% (Lin 1996). Wegen ihrer großen Affinität zu Hydroxylapatit haben intravenös verabreichte Bisphosphonate wie Zoledronat eine geringe Plasmahalbwertszeit von 1-2 Stunden. In der Literatur sind Ausscheidungsraten von 70 % nach intravenöser

Gabe beschrieben worden, wobei der knochenungebundene Teil über die Nieren ausgeschieden wird (Ripperger 2010).

Die Halbwertszeit von Bisphosphonaten im skelettalen Knochen beträgt über 10 Jahre (Bähr et al. 2013).

1.3.2 Wirkmechanismus

Die Wirkmechanismen der Bisphosphonate sind komplex und bis heute noch nicht in Gänze erforscht (Mutschler et al. 2001).

Das Wirkungsprinzip der Bisphosphonate besteht im Wesentlichen darin, die Osteoklastentätigkeit hemmend zu beeinflussen, um osteolytische Prozesse im Knochen zu verlangsamen und ggf. aufzuhalten.

Stickstofffreie Bisphosphonate werden in den Osteoklasten zu zytotoxischen, nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga umgewandelt, die infolge der Hemmung der Protonenpumpe die Zellfunktion beeinträchtigen und letztendlich zum Zelluntergang führen (Graefe et al. 2011).

Nach Aufnahme in die Osteoklasten in die osteoklastären Resorptionslakunen hemmen die stickstoffhaltigen Bisphosphonate die Farnesyldiphosphat-Synthase und stören so die Syntheseleistungen der Zelle von Farnesylpyrophosphat und Geranylpyrophosphat. Diese Stoffe dienen zur Prenylierung kleiner G-Proteine, die dann mittels der langgestreckten, hydrophoben Prenyl-Reste an zellulären Membranen befestigt werden (Lüllmann et al. 2003). Die Ausschaltung dieser Signaltransduktionsmechanismen führt zum Verlust der Mobilität und Knochenanhaftfähigkeit der Osteoklasten und langfristig zu ihrem apoptotischen Ende (Lüllmann-Rauch 2003).

Sowohl bei den stickstofffreien als auch bei den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten kommt es zu einer Hemmung der osteoklastären Knochenresorption und in der Folge auch zu einer Hemmung der osteoblastischen Knochenneubildung.

Die Hemmung der osteoklastischen Aktivität erklärt auch die analgetischen Wirkungen, die Bisphosphonate bei Knochenerkrankungen wie Osteoporose, osteolytischen Knochenmetastasen und Morbus Paget haben (Graefe et al. 2011).

Allgemein lässt sich sagen, dass die antiresorptive Potenz der stickstoffhaltigen Bisphosphonate wesentlich höher ist als die der stickstofffreien Bisphosphonate. Unerwünschte Nebenwirkungen treten bei der Einnahme von Bisphosphonaten, bedingt durch ihren sauren Charakter, in Form von Schleimhautschädigungen oft im Bereich der Oesophagus- und Magenschleimhaut auf. Auch ist über das Auftreten

von Kiefernekrosen vor allem in Verbindung mit der intravenösen Gabe bei Tumorpatienten berichtet worden (Freissmuth et al. 2012).

Bisphosphonate werden vor allem in der Therapie manifester Osteoporose, Morbus Paget und tumorinduzierten Osteolysen eingesetzt (Mutschler et al. 2001).

1.3.2.1 Zoledronat

Unter den heute klinisch häufig angewendeten Bisphosphonaten hat sich das Zoledronat, ein Bisphosphonat der dritten Generation mit einem heterozyklischen Ring und zwei N-Atomen, als potentester Inhibitor der Farnesyl-Diphosphat-Synthetase erwiesen (Kavanagh et al. 2006). Zoledronat, intravenös (i.v.) verabreicht, ist für die Behandlung tumorinduzierter Hyperkalzämie und Skelettmetastasen zugelassen. Außerdem findet es neben anderen Bisphosphonaten im Off-Label-Use zur Behandlung postmenopausaler Osteoporose und Morbus Paget Anwendung (Kavanagh et al. 2006).

Als Therapieempfehlung gilt laut Hersteller (Novartis) 4 mg Zoledronat i.v. in Abständen von 3-4 Wochen zur Prävention skelettbezogener Ereignisse bei Patienten mit fortgeschrittenen, auf das Skelett ausgedehnten Tumorerkrankungen sowie tumorinduzierter Hyperkalzämie (Novartis Pharmaceuticals Corporation 2016).

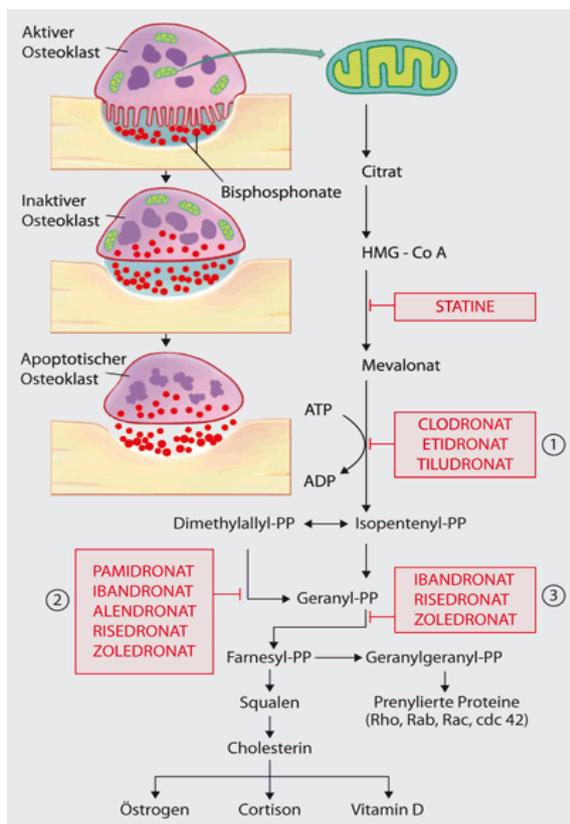


Abbildung 6: Wirkungsweise der Bisphosphonate (Bartl und Frisch 2001).

1.4 Tiermodelle

1.4.1 Definition eines Tiermodells

Für bestimmte Fragestellungen der medizinischen Forschung bedient man sich sogenannter Tiermodelle. Hierbei handelt es sich um bestimmte Tierarten bzw. Zuchtlinien, die entweder genetisch, spontan oder durch Behandlung Defekte oder Krankheitsbilder entwickeln. Grund für die Anwendung von Tiermodellen sind die anatomischen oder physiologischen Ähnlichkeiten des Tierorganismus zum menschlichen Organismus. Bei der Auswahl eines geeigneten Tiermodells ist eine vorherige genaue Festlegung auf die Fragestellung wichtig, um einen möglichst hohen Erkenntnisgewinn ableiten zu können. Genetische Einheitlichkeit, biologische Eigenschaften, Kosten und Verfügbarkeit, die Möglichkeit einer Verallgemeinerung der Ergebnisse, die Anpassungsfähigkeit an experimentelle Manipulationen sowie ökologische und ethische Implikationen sollten immer bei der Auswahl eines Tiermodells mit in Betracht gezogen werden (Davidson et al. 1987). Man unterscheidet experimentelle, spontane, negative und orphanen Tiermodelle. Das am häufigsten verwendete Modell ist das experimentelle Tiermodell (Hughes und Lang 1978). Anders als bei einer klinischen Studie können in einem Tiermodell individuelle Einflussfaktoren, wie Ernährung und Lebensverhaltensweisen (Nikotin, Alkohol, Ernährung), die einen Einfluss auf den Verlauf oder Therapie einer Erkrankung haben könnten, durch möglichst einheitliche und standardisierte Bedingungen minimiert werden (Heaney 1996).

1.4.2 Tiermodelle in der Bisphosphonatforschung

Tiermodelle erweisen sich auch in der Untersuchung muskuloskelettaler, onkologischer und knochenmetabolischer Sachverhalte als sehr aufschlussreich (Neyt et al. 1998). Die Food and Drug Administration (FDA) verlangt seit 1994 für die Zulassung neuer Medikamente in der Osteoporosetherapie die Überprüfung sowohl an Ratten als auch an einem Großtiermodell (Thompson et al. 1995). Bisher wurden sowohl Kleintiermodelle (Mäuse, Wistar-Ratten und Sprague-Dawley Ratten) als auch Großtiermodelle (Beagle und Minipigs) in kurz- und langfristigen Studien mit oralen und intravenösen Bisphosphonaten entwickelt, um die BRONJ zu studieren (Sharma et al. 2013). Allerdings stößt die Aussagekraft solcher Studien an Grenzen, da sich subjektive Symptome wie Schmerzen nicht präzise abbilden lassen. Die

Diagnose einer BRONJ muss daher klinisch evaluiert und histologisch beurteilt werden (Sharma et al. 2013).

1.4.3 Kleintiermodelle

1.4.3.1 Ratten

Das wohl am häufigsten in der Bisphosphonatforschung genutzte Kleintiermodell ist das Rattenmodell. Hierbei bedient man sich speziell für Tiermodelle geeigneter Zuchtlinien wie der Sprague-Dawley- oder der Wistar-Ratte.

Die allgemeine Lebenserwartung einer Ratte beträgt zwei bis drei Jahre. Je nach Lebensalter der verwendeten Tiere wird zwischen einem aged rat model und einem mature rat model unterschieden. Während bei ersterem ca. 12 Monate alte Ratten eingesetzt werden, finden beim "mature aged model" ca. drei Monate alte Tiere Verwendung (Kalu 1991).

Die Verwendung von Ratten als Versuchstier bietet zahlreiche Vorteile. So sind Ratten im Erwerb und im Unterhalt kostengünstig und einfach zu halten (Turner 2001). Auch die Auswirkungen bestimmter Substanzen- wie beispielsweise Bisphosphonate- auf den Rattenknochen ähneln denen des Menschen sehr (Wronski et al. 1989).

Die Wistar- und Sprague-Dawley-Ratte ist wegen ihrer Größe ein beliebtes Versuchstier in der Untersuchung von Krankheiten des Gesichtsschädels, da sie es ermöglicht, auch zahnbezogene Behandlungen wie Zahnextraktionen durchzuführen (Sharma et al. 2013).

Gegen die Ratte als Tiermodell sprechen im Zusammenhang mit der Bisphosphonatforschung die geringe Körpergröße und das damit verbundene geringe Blutvolumen, was Blutentnahmen und Knochenbiopsien erschwert. Außerdem sind die großen Proportionen gängiger dentaler Menschenimplantate bei Implantatinsertionen in den Rattenorganismus nicht möglich (Reif 2007).

1.4.4 Großtiermodelle

1.4.4.1 Schweine

Schweine werden aufgrund der physiologischen, anatomischen und metabolischen Ähnlichkeiten zum Mensch immer häufiger in der präklinischen Forschung und Entwicklung von pharmazeutischen Substanzen verwendet (Kuwahara et al. 1999; Mahl et al. 2006). Daher bietet sich das Schwein als Tiermodell zur Untersuchung

von Wirkstoffen oder Implantaten an (Schliephake et al. 1991). So gibt es große Übereinstimmungen bei Organsystemen wie dem Kreislaufsystem, dem Pankreas, der Leber, dem Verdauungssystem sowie der Haut und dem Knochen (Schliephake et al. 1991; Turner 2001; Reif 2007). Vorteilhaft erscheint beim Versuchstier Schwein auch der dem Menschen ähnliche Knochenremodellierungsmechanismus (Mosekilde et al. 1993).

1.4.4.1.1 Minischwein

Da bei einer Arzneimittelzulassung sowohl an einem Kleintier- als auch an einem Großtiermodell Untersuchungen durchgeführt werden müssen, bietet das Minischwein im Vergleich zu anderen Schweinerassen Vorteile in Bezug auf Platz- und Futterbedarf (Reif 2007; Svendsen 2006). Im Gegensatz zum Kleintiermodell Ratte kann beim Großtiermodell Minischwein Blut häufiger gewonnen, Knochenbiopsien wiederholt entnommen und orthopädische Implantate getestet werden (Reif 2007). Das Minischwein ist besonders durch seine geringe Größe und die einfache Handhabung als Großtiermodell für Langzeitstudien geeignet (Larsen und Rolin 2004).

Beim Göttinger Minischwein handelt es sich um eine 1960 von F. Haring an der Universität Göttingen entwickelte Kreuzung aus deutscher Landrasse, Minnesota Minipig und vietnamesischem Hängebauchschwein. Ursprünglich gab es eine bunte und eine weiße Linie, doch seit 1992 wird als Standardversuchstier nur noch das weiße Minischwein gezüchtet. Mittlerweile ist die Zucht auf Lizenzbasis der Fa. Ellegard Göttingen Minipigs in Dänemark übertragen worden (Reif 2007)

Das Göttinger Minischwein zeichnet sich außerdem durch kontrollierten genetischen Hintergrund und einheitlichen Phänotyp aus. Die Haltung unter SPF-7 Bedingungen (spezifiziert-pathogen-freie-Bedingungen) bedingt eine sehr gute hygienische Qualität der kommerziell erhältlichen Göttinger Minischweine (Mahl et al. 2006). Neben dem Göttinger Minischwein gibt es auch noch andere Miniaturschweinkreuzungen, die sich in der Forschung als Großtiermodell bewährt haben. Beispiele wären hier das Yucatan-Minipig, das Dresdner Minipig, das Münchner Miniaturschwein, das vietnamesische Hängebauchschwein sowie das Sinclair-Miniaturschwein (Reif 2007).

1.5 Fragestellung

Als schwerwiegende Nebenwirkung einer Therapie mit Bisphosphonaten wird seit 2003 die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose beschrieben. Wichtige Fragen zu Entstehung und Verlauf dieser Erkrankung sind bis zum heutigen Tage nicht hinreichend geklärt.

Unter Anwendung des Göttinger Minischweins sollen somit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Kann molekularbiologisch mittels quantitativer Real-Time PCR eine Auswirkung von Zoledronat auf die RANKL-Expression im Knochen der Versuchstiere nachgewiesen werden?
2. Hat die Dauer der Zoledronatgabe Auswirkungen auf die RANKL-Expression im Knochen der Versuchstiere?
3. Kommt es unter der Therapie mit Zoledronat zu Veränderungen des Knochenvolumens der Versuchstiere?

2 Material und Methode

2.1 Methodik

Für den Versuch wurden 15 Göttinger Minischweine randomisiert in 2 Versuchsgruppen (VG I und VG II) sowie eine Kontrollgruppe (KG) mit je 5 Tieren (n=5) eingeteilt.

VG I bekam über die Dauer von 5 Monaten eine monatliche Zoledronat-Infusion (Zometa®4mg i.v., 1 x pro Monat). Nach dem 8. Versuchsmonat erfolgte die Euthanasie.

VG II wurde über die Dauer von 6 Monaten mit einer Zoledronat-Infusion behandelt (Zometa®4mg i.v., 1 x pro Monat) Die Euthanasie erfolgte nach dem 9. Versuchsmonat.

Die KG bekam keine Zometa®-Medikation, wurde aber ansonsten in Haltungs- und Operationsbedingungen genau gleich den Versuchsgruppen behandelt (Abb.7).

Zu Versuchsbeginn zum Zeitpunkt 0 (Baseline) wurden Knochenbiopsien vom Beckenkamm (BK) und Mandibularknochen (UK) gewonnen. Aus dem submentalen Bereich des Corpus mandibulae wurde ein ca. 1 cm großes, sowie vom Ober- und Unterkieferalveolarkamm (AOK und AUK) ein ca. 0,5 cm großes Knochenstück entnommen.

Nach 5 Monaten wurden in einem zweiten OP-Zyklus weitere Knochenbiopsien vom BK, UK, AOK und AUK entnommen

Der dritte OP-Zyklus wurde nach 8 Monaten für die VG I und nach 9 Monaten für die VG II und die KG durchgeführt. Es wurden erneut Knochenbiopsien vom BK und UK genommen und intraoperativ die Euthanasie angestrebt.

Weiterhin wurde nach der Euthanasie der Versuchstiere der Mandibularknochen abgesetzt und für eine histomorphometrische Untersuchung aufbereitet (Abbildung 7).

Die Knochenbiopsien wurden direkt nach der Entnahme in Stickstoff für den Transport gekühlt und bei -80°C bis zur molekularbiologischen Verarbeitung eingefroren. Molekularbiologisch wurde mittels Real-Time PCR die Genexpression von RANKL untersucht und ein statistischer Vergleich der Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe durchgeführt.

Schließlich wurden für eine histomorphometrische Untersuchung bezüglich des Knochenvolumens Dünnschliffpräparate aus dem in OP III abgesetzten

Mandibularknochen angefertigt. Auch hier fand anschließend ein statistischer Vergleich der Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe statt.

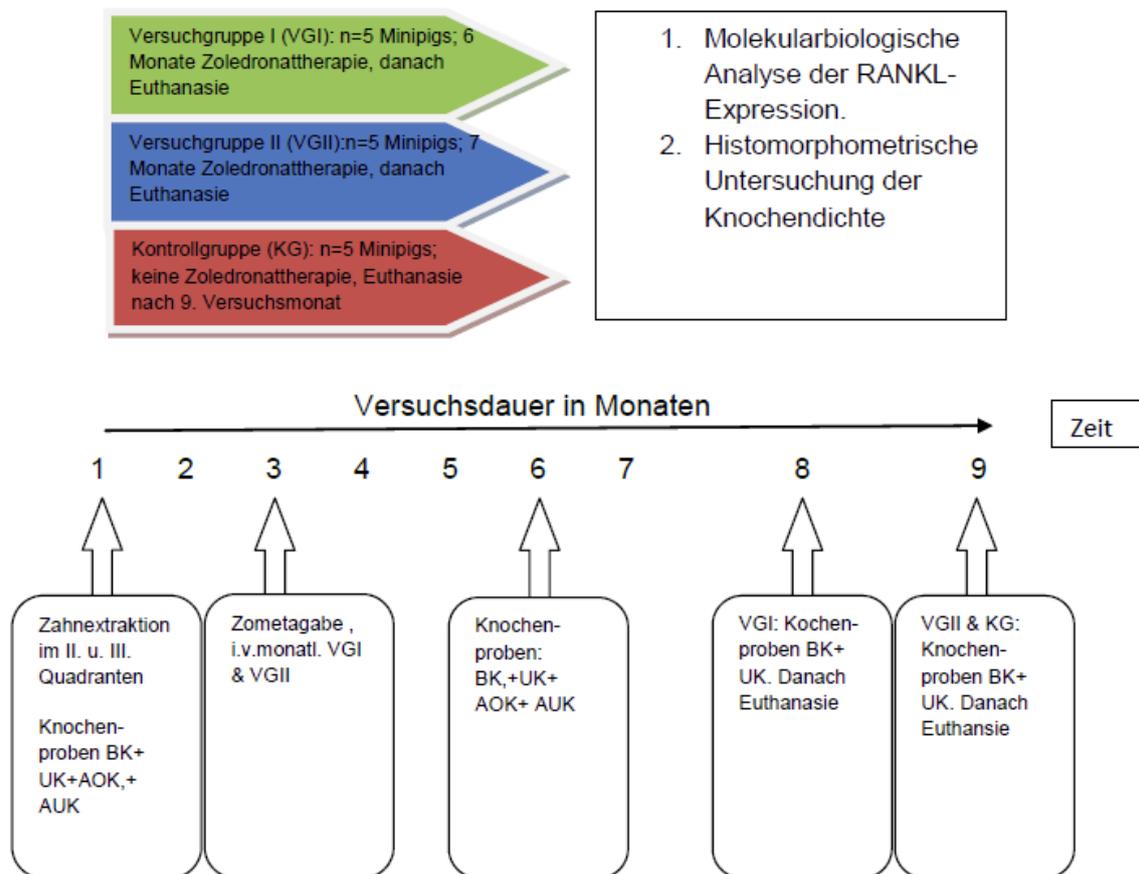


Abbildung 7: Ablauf des Tierversuchs (BK= Beckenkamm, UK= Unterkiefer, AOK Alveolarknochen Oberkiefer, AUK= Alveolarknochen Unterkiefer).

2.2 Herkunft und Haltung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 15 weibliche Göttinger Minischweine, die auf dem Versuchsgut Relliehausen in Dassel aufgezogen und später im Versuchsgut Holtensen untergebracht wurden. Beide Einrichtungen sind der Universität Göttingen angegliedert

Die Tiere wurden in Kleingruppen zu je 3 Tieren in Laufställen (Fläche: 3 x 2,5m) mit Stroheinstreuung gehalten. Das Gewicht wurde in regelmäßigen Abständen überprüft. Die Versuchsgruppen und die Kontrollgruppe wurden unter identischen Bedingungen gehalten. Die Tiere wurden 1 x täglich mit 450-500 g Ssniff®MPig-H Ered Alleinfuttermittel für Minipigs (Haltung, energiereduziert) (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert. Wasser war für die Tiere jederzeit zugänglich. Eine

Genehmigung für die vorgenommenen Tierversuche wurde durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Oldenburg, unter dem Aktenzeichen AZ 339-42502-04-10/0096 erteilt.

2.3 Gruppeneinteilung

Die Tiere wurden randomisiert und in zwei Versuchsgruppen (VG I und VG II) und eine Kontrollgruppe (KG) zu je fünf Schweinen eingeteilt. Die Versuchsgruppen VG I und VG II bekamen ab dem 3. Versuchmonat monatlich eine Zoledronatinfusion (Zometa®4mg i.v., 1 mal pro Monat) bis zum Versuchsabschluss nach 8 bzw. 9 Monaten. Ein Versuchstier aus der VG II verstarb vor Abschluss des Versuches. Das Durchschnittsalter betrug 5 Jahre, das Durchschnittsgewicht der Versuchstiere lag bei 68,64 +/- 13,59 kg.

2.4 Behandlung mit Zoledronat (Zometa®)

Die Behandlung mit Zoledronat (Zometa®, Novartis Pharma AG Basel) fand über einen Zeitraum von 5 bzw. 6 Monaten mit monatlich einer Infusion (5,9 mg Zoledronic acid in 5 ml sterilisiertem Wasser gelöst und mit 100 ml 0,9 NaOCl verdünnt) auf dem Versuchsgut Holtensen der Georg-August-Universität Göttingen in Relliehausen statt. Zur Behandlung der Versuchstiere mit Zoledronat (Zometa®, Novartis Pharma AG Basel) wurden die Tiere mit 300-320 mg Azeperon i.m. (Stresnil, Janssen, Beerse/Belgien) sediert und mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Lachgas/Isofluran im Verhältnis von 1:4 beatmet. Ein venöser Zugang wurde über die Ohrvenen gelegt. Die Zoledronat-Infusion wurde i.v. mit einer Mindestinfusionszeit von 15 Minuten verabreicht.

2.5 Operationen

Die Operationen (OP) fanden im Tier-Operationssaal (Tier-OP) des Universitätsklinikums Göttingen statt. Die Tiere wurden eine Woche vor der OP in das Universitätsklinikum gebracht, um eine Eingewöhnungszeit und damit verbundene Stressfreiheit zu gewährleisten. Die Narkotisierung der Versuchstiere vor den Eingriffen und die intraoperative Überwachung wurden durch einen Veterinärmediziner der tierärztlichen Versuchsanstalt der Universität Göttingen durchgeführt. Die Narkose wurde durch eine präoperative Sedierung mit 300-320 mg Azeperon i. m. (Stresnil®, Janssen, Beerse/Belgien) bereits im Stall vorbereitet. Weiterhin bekamen die Tiere einen Ohrvenenkatheter gelegt. Im OP wurde den Tieren via Ohrvenenkatheter 230-375 mg Thiopental-Natrium (Trapanal®, Altana

Pharma, Konstanz) verabreicht. Anschließend konnten die Tiere intubiert und mit einem Gemisch im Verhältnis von 1:4 aus Sauerstoff und Lachgas/Isofluran beatmet werden. Durch konstante intravenöse Zufuhr von Ketamin (2,5-5 mg/kg/KG/h, Ketamin® 10% verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung ad 50 ml Serumwerk Bernburg AG, Bernburg) und Piritramid (75-100µg/kg/KG/h, Dipidolor®, Janssen-Cilag, Wien/Österreich) verdünnt ad 50 ml mit Sterofundin B/G5 (B. Braun, Melsungen) wurde die Narkose aufrechterhalten. Zur intra- und postoperativen Schmerzausschaltung wurde einen Tag prä- und zwei Tage post-OP Carprofen verabreicht, ein in der Veterinärmedizin häufig eingesetztes, nicht steroidales Antirheumatikum.

Am rechten Beckenkamm konnten in allen drei Operationszyklen über einen 10 cm langen Hautschnitt Knochenbiopsien gewonnen werden. Nach stumpfer Abpräparation der Muskelansätze und des Periostes sowie Darstellung der posterioren Beckenkammkante wurde im Schaufelbereich ein Defekt von max. 2 cm Durchmesser mit einem genormten Trepanbohrer unter manueller Kühlung mit Kochsalzlösung angelegt (Abbildung 8). Auf den Erhalt der lasttragenden kortikalen Beckenstrukturen wurde geachtet. Anschließend erfolgte der mehrschichtige Verschluss des Defektes. Diese OP wurde zu den OP-Zeitpunkten 0,1 und 2 bei allen Tieren von VG I, VG II und KG wiederholt vorgenommen.

Nach Setzen eines ca. 5 cm langen submentalen Hautschnittes am Unterkiefer und schonungsvoller Präparation des Weichgewebes und muskulärer Strukturen konnte mittels eines genormten Trepanbohrers ein ca. 1 cm großer Knochendefekt gesetzt und Knochenmaterial gewonnen werden (Abbildung 9). Auch dieser Defekt wurde mehrschichtig verschlossen.

Zum OP-Zeitpunkt 0 (OP I) wurden zusätzlich in der linken Kieferhälfte im II. und III. Quadranten jeweils drei Prämolaren extrahiert und mittels Trepanbohrer Knochenbiopsien vom Alveolarknochen in AOK und AUK genommen (Abbildung 10). Die gesetzten Defekte wurden mit einem Mukoperiastlappen verschlossen.

Zum OP-Zeitpunkt 1 (OP II) wurden in der rechten Kieferhälfte im I. und IV. Quadranten jeweils drei Prämolaren entfernt und wiederum Knochenbiopsien vom AOK und AUK mittels Trepanbohrer entnommen (Abbildung 10). Der distale und mediane Defekt wurde mit einem Mukoperiostlappen verschlossen, der mesiale Defekt wurde unversorgt belassen.

Material und Methode

Im Anschluss an OP III (OP-Zeitpunkt 2) wurde nach erfolgter Euthanasie der komplette Unterkieferknochen abgesetzt.

Tabelle 2: OP-Verlauf der einzelnen Versuchgruppen.

OP-Zeitpunkt	OP	BK	UK	Zahnextraktion II. und III. Quadrant	Zahnextraktion I. und IV. Quadrant	AOK	AUK
0	OP I	VG I, VG II, KG	VG I, VG II, KG	VG I, VG II, KG		VG I, VG II, KG	VG I, VG II, KG
1	OP II	VG I, VG II, KG	VG I, VG II, KG		VG I, VG II, KG	VG I, VG II, KG	VG I, VG II, KG
2 (nach 8 Monaten Versuchsdauer mit anschließender Euthanasie)	OP III (nach 8 Monaten Versuchsdauer mit anschließender Euthanasie)	VG I nach VG II, KG	VG I, VG II, KG				
2 (nach 9 Monaten Versuchsdauer mit anschließender Euthanasie)	OP III (nach 9 Monaten Versuchsdauer mit anschließender Euthanasie)	VG II, KG	VG II, KG				

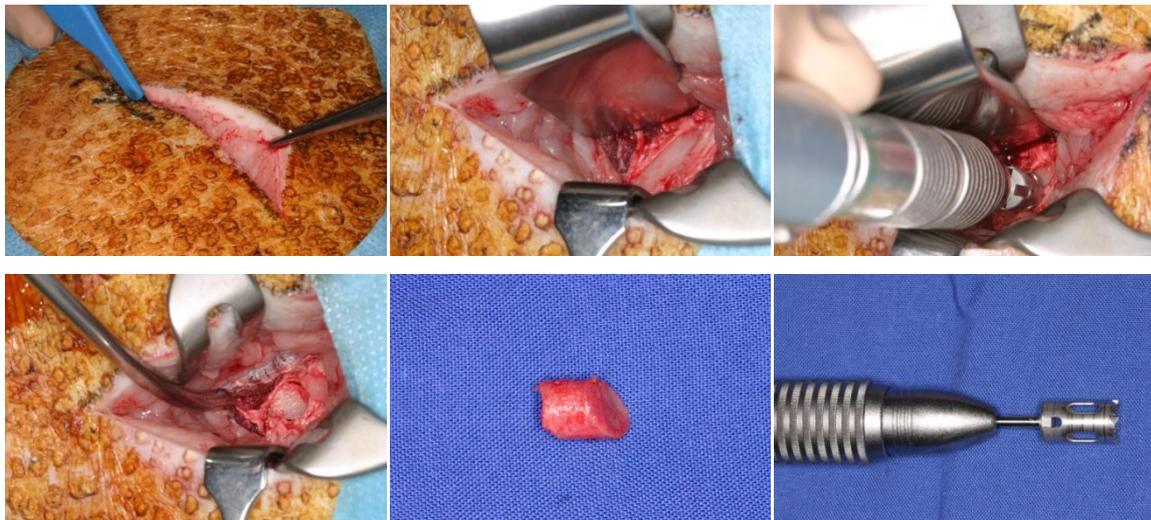


Abbildung 8: Entnahme einer Knochenbiopsie aus dem Beckenkamm

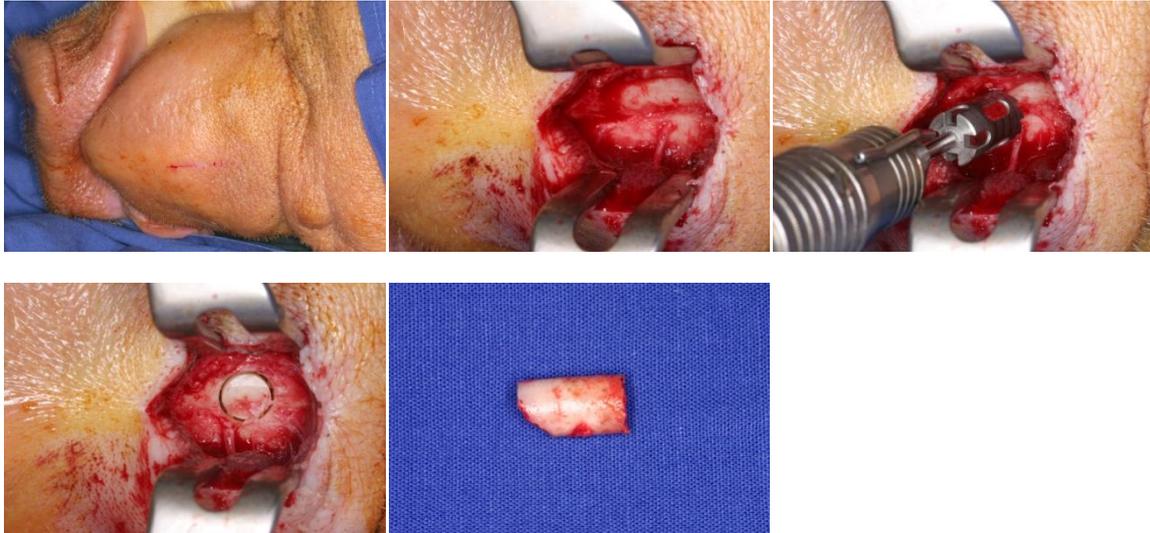


Abbildung 9: Entnahme einer Knochenbiopsie aus dem Mandibularknochen in der Submentalregion



Abbildung 10: Entnahme einer Knochenbiopsie vom Alveolarknochen nach Zahnextraktion

2.6 Versuchsabschluss

Nach 8 bzw. 9 Monaten Studiendauer wurden die Tiere durch eine Überdosis Narkosemittel/Azeperon (Stresnil, Janssen, Beerse/Belgien) euthanasiert. Den Tieren wurde der komplette Mandibularknochen entnommen und sorgfältig von Weichgewebe einschließlich des Periosts freipräpariert. Während der Präparation wurden die Knochen mit physiologischer Kochsalzlösung (Braun, Melsungen) feucht gehalten.

2.7 Molekularbiologie

2.7.1 Geräte und Reagenzien

2.7.1.1 Geräte

- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn)
- Elektrophoreseapparatur Elite 300 Plus (Wealtec, NV, USA)
- Gel-Dokumentation BioDocAnalyse (Biometra, Jena)

- Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg)
- Nano-Drop-Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
- Homogenisator Precellys ® 24 (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
- Cryolys Kühlmodul (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
- Sterile Werkbank (Biohazard Clean Air, Woerden, NL)
- Thermocycler iCycler (Bio Rad, München)
- Tischkühlzentrifuge (Sigma, Osterode)
- Eismaschine (Sanyo, Bad Nenndorf)
- Pipetten (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)

2.7.1.2 Feinchemikalien

- 70 %-Ethanol (Merck, Darmstadt)
- Agarose (Bio Rad, München)
- Blue Juice Gel Loading Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Ethidiumbromid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- iQ Supermix (Bio Rad, München)
- iQ SYBR Green Supermix (Bio Rad, München)
- iScript Reaction Mix (Bio Rad, München)
- β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Paraformaldehyd 37 % (Biochrom AG, Berlin)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Zoledronat (Zometa R) (Novartis Pharma, Nürnberg)
- DMEM High Glucose 4,5 g/l D-Glucose (Gibco Invitrogen, Karlsruhe)
- Qiagen Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherland)

2.7.1.3 Verbrauchsmaterialien

- Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Waldbronn)
- Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, Waldbronn)
- Alkalische Phosphatase Kit (Sigma-Aldrich, München)
- Einmalpipetten (Starlab, Ahrensburg)
- Eppendorf-Cups 1500 μ l (Sarstedt, Nümbrecht)
- Kulturflaschen 75cm² (Greiner bio-one, Frickenhausen Cellstar)
- Pipettenspitzen und Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)

- Precellys® Stahl-Kit 2,8 mm 'reinforced', 50 x 2 ml Tubes (verstärkt), befüllt mit Stahlkügelchen (PepLab Biotechnologie, Erlangen)

2.7.1.4 Enzyme

- iScript Reverse Transkriptase (Bio Rad, München)
- iTaq DNA Polymerase (Bio Rad, München)

2.7.1.5 Primer

Die Primer für die molekularbiologische Analyse von RANKL wurden in Vorversuchen etabliert und von der Firma Metabion Deutschland (Martinsried) bezogen.

- RANKL [sus] fwd 5`-ACCTGTATGCCAACATCTGCTTTTCG-3`
- RANKL [sus] rev 5`-TGCTGATTTCTCGCCAGATCGT-3`

2.7.2 RNA-Isolierung und cDNA-Gewinnung

2.7.2.1 Homogenisierung des Knochenmaterials

Um die RNA aus dem Knochen extrahieren zu können, musste das Gewebe zunächst mechanisch aufgebrochen werden. Dazu erfolgte die Entnahme kleiner Gewebestücke von ca. 100 mg unter sterilen Bedingungen unter Stickstoffkühlung aus den Knochenbiopsien mittels einer Hohlmeißelzange nach Luehr, einer chirurgischen Pinzette, einem Einmalskalpell und einer chirurgischen Schale.

Die Homogenisierung erfolgte streng nach Herstellerprotokoll. Die Knochenstücke wurden in mit sechs Stahlkügelchen bestückte Tubes der Firma PepLab Biotechnologie, Erlangen und QIAzol Lysis Reagenz der Firma Qiagen gegeben. Anschließend wurden die Knochenproben im Homogenisator Precellys® 24 der Firma PepLab für 40 Sekunden bei Höchstgeschwindigkeit unter Stickstoffkühlung homogenisiert. Nach 5-minütigem Ruhen bei 15-20°C wurden die Tubes mit 200 µl Chloroform bestückt und nach erneuter Einwirkzeit von 3 Minuten bei 4°C und 12.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben langsam wieder auf eine Temperatur von 15-25°C gebracht.



Abbildung 11: Chirurgisches Instrumentarium zur Zerkleinerung der Knochenbiopsien.

2.7.2.2 RNA-Isolierung mit Qiagen Lipid Tissue Mini Kit®

Die RNA wurde mit Hilfe des Qiagen Lipid Tissue Mini Kit® mit DNase-Verdau der Firma Qiagen (Qiagen®, Venlo, Niederlande) aus den Knochenbiopsien isoliert. Die Anwendung verlief streng nach Herstellerangaben. Die Versuche selber wurden aufgrund der temperaturbedingten Instabilität der RNA unter Trockeneiskühlung durchgeführt. Von den nach dem Zentrifugationsvorgang in den Tubes entstandenen zwei Phasen, wurde die obere vorsichtig abpipettiert, mit 600 µl 70 % Ethanol verdünnt und auf eine RNeasy Spin Column® (eine RNA-bindende Silica-Membran) der Firma Qiagen überführt. Nach 15-sekündigem Zentrifugieren bei 10.000 rpm wurde der Zentrifugationsschritt mit dem erhaltenen Eluat wiederholt. Der DNase-I-Verdau erfolgte nach dem Qiagen-Protokoll auf der RNeasy Spin Column®. Der folgende Wascharbeitsschritt mit RPE-Buffer wurde zwei Mal mit unterschiedlich langer Zentrifugationsdauer (15 Sekunden und 2 Minuten) bei jeweils 10.000 rpm durchgeführt. Um die letzten Reste an Flüssigkeit aus der Silikamembran auszutreiben, musste abschließend die Säule nochmals bei 13.200 rpm für 1 Minute zentrifugiert werden. Die RNA wurde in einem letzten Schritt mit 30 µl DNase-freiem Wasser eluiert.

Anschließend wurden 2 µm der eluierten Proben mittels Nano-Drop-Spectrophotometer auf ihren RNA-Gehalt untersucht. Die qualitative Kontrolle der RNA konnte mittels Pico Chip (Messbereich 0,5-25ng/µl) bzw. Nano Chip (Messbereich 25–500 ng/µl) der Firma Agiland (RNA 6000 Nano/ Pico Chip Kit, Agilent Technologies, Waldbronn) kontrolliert werden.

2.7.2.3 c-DNA

Die isolierte RNA musste zur weiteren Untersuchung nach dem Prinzip der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Die dabei entstehende DNA ist

komplementär zu dem als Template verwendeten RNA-Molekül, daher nennt man sie auch cDNA (complementary DNA) (Buschmann und Knoll 2011). Dazu wurde das iScript cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., München) nach Herstellerangaben angewendet.

Pipettierschema:

4 µl 5x iScript Reaction Mix
1 µl iScript Reverse Transkriptase
200 ng RNA-Probe
20 µl H₂O nukleasefrei

20 µl Gesamtvolumen

2.7.3 PCR

Durch die Entdeckung und Etablierung der Polymerasekettenreaktion (PCR) durch Mullis 1983 ist es gelungen, komplizierte mikrobiologische Prozesse wie die Entschlüsselung des menschlichen Genoms, verschiedene Marker und Determinanten von Erkrankungen sowie die Entwicklung hochsensibler Verfahren zur Detektion von Nukleinsäuren zu erklären (Mullis et al. 1994). Das anfänglich noch sehr komplizierte und aufwendige PCR-Verfahren ist mittlerweile standardisierten und automatischen Verfahren, wie der Real-Time PCR, DNA-Microarray-/Chip-Technologie, DNA-Sequenzierung oder amplifizierenden Detektionsverfahren gewichen (Bruhn et al. 2011). Die konventionelle PCR beruht auf dem Einsatz thermostabiler DNA-Polymerasen meist bakteriellen Ursprungs, die in der Lage sind, mehrfachen Denaturierungs- und Elongationsverfahren standzuhalten. Die für die Durchführung einer PCR benötigten Voraussetzungen und Bestandteile umfassen die Proben-DNA, Primer, thermostabile Polymerasen und die Möglichkeit, die Temperatur der Reaktion regulieren zu können (Bruhn et al. 2011). Der Prozess der PCR unterteilt sich in die Arbeitsschritte:

- Denaturierung
- Annealing
- Elongation

Der Start der PCR-Reaktion wird durch die Denaturierung eingeleitet. Die Denaturierung der zu trennenden DNA erfolgt durch Erhöhung der Temperatur auf 95°C, so dass sich hier die Doppelstränge trennen. Die relativ hohe Temperatur erklärt auch die Verwendung thermostabiler Polymerasen (Taq Polymerase), da andere Enzyme bei dieser Behandlung bereits zerstört werden würden. Entscheidend für die Anwendung einer PCR ist die Spezifikation der von der Polymerase verwendeten Matrize/Template, von der wiederum beliebig viele Kopien angefertigt werden sollen. Dies wird durch die Verwendung von Primern (18-30 Nukleotide) erreicht, die sich über Komplementärbasenpaarung an die Zielsequenz der einsträngigen Matrize/Template anlagern (Bruhn et al. 2011). Hierbei unterscheidet man sogenannte Forward-Primer, die sich am 3'-Ende und Reverse-Primer, die sich am 5'-Ende anlagern. Dieses Annealing erfolgt allerdings erst beim Abkühlen der Lösung von 95°C auf etwa 50-70°C. Durch dieses Anlagern der Primer an die Templates ist gleichzeitig der Startpunkt der PCR definiert, an dem nun die DNA-Polymerase in 5'---->3' Syntheserichtung eine Komplementärkopie der Ausgangseinzelstrangmatrize (Tochterstrang) anfertigt. Die Arbeitstemperatur der Polymerase liegt bei der Elongation bei 72°C. Durch erneute Denaturierung der neuen Doppelstränge (Matrize und neuer Komplementärstrang) kann dieses Verfahren beliebig häufig durchgeführt werden, um zahlreiche Kopien (Amplikons) der von den Primern charakterisierten und zu vervielfachenden DNA-Sequenz zu erhalten (Bruhn et al. 2011).

2.7.3.1 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR lassen sich minimale Unterschiede in der Genexpression detektieren. Diese Methode basiert auf der Verwendung von SYBR-Green, einer Chemikalie, die sich in doppelsträngige DNA einlagern kann. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht kommt es zu einer Fluoreszenzemission nur dann, wenn SYBR-Green in die DNA eingelagert ist (Buschmann und Knoll 2011). Auch bei der quantitativen Real-time PCR laufen die entsprechenden Prozesse von Denaturierung, Annealing und Elongation in einem Zyklus ab. Nach jedem Zyklus verdoppelt sich also die Menge der zu amplifizierende cDNA-Information. Ist SYBR Green in ausreichendem Überschuss vorhanden, wird der Fluoreszenzfarbstoff auch in die neuen DNA-Moleküle interkaliert und verstärkt somit das Fluoreszenzsignal. Die Fluoreszenz-Intensität korreliert also direkt mit der Menge an doppelsträngiger DNA (Buschmann und Knoll 2011). Die Messung der Fluoreszenz geschieht am

Ende der Elongationsphase, wenn die Synthese der neuen DNA-Moleküle abgeschlossen ist. Mittels entsprechender Software können die Fluoreszenzintensitäten in Echtzeit als Funktionsableitung des entsprechenden Zyklus dargestellt werden. Als Houskeeping-Gene wurde das TATA-Box-Binding-Protein (TBP) auf Grund seiner Unabhängigkeit von molekularbiologischen Regulationsprozessen gewählt, um die Genexpression des Zielgens normieren und relativ quantifizieren zu können.

Die jeweiligen Reaktionsansätze der Real-time PCR wurden wie folgt hergestellt:

Pipettierschema:

20 µl	<u>Mastermix:</u>
	12,5 µl iQ-SYBR-Green-Supermix
	6,7 µl H ₂ O dest.
	0,4 µl Primer (fwd)
	0,4 µl Primer (rev)
5 µl	<u>Template (cDNA)</u>

25 µl Gesamtvolumen

Die PCR-Platten mit 96 Wells der Firma Bio-Rad wurden entsprechend dem Plattendesign bestückt und anschließend mit einer Folie verschlossen.

PCR-Protokoll

- **PCR-Programm:**
 - 1 x 98°C 0'30"
 - 45 x 94°C 0'01"
 - 60°C 0'15"
 - 72°C 0'10" Echtzeitanalyse
 - 1 x 94°C 0'15"
 - 1 x 60°C 0'30"
 - 75 x 55°-92°C 0,5°C/0'10" Fluoreszenzmessung

2.8 Histomorphometrie

2.8.1 Geräte und Reagenzien

2.8.1.1 Geräte

- Plexiglas-Objektträger 45 x 55 x 2mm (Patho-Service GmbH, Hamburg)
- Bandsäge „Exakt-Trennsystem“ (Exakt-Apparatebau, Norderstedt)
- Tellerschleifgerät „Exakt-Schleifsystem“ (Exakt-Apparatebau, Norderstedt)
- Kleingefrierschrank „GS801“ mit NTC-Temperaturregler (Elektronik-Bau, Groß Lüdershagen)
- Schleif- und Poliermaschine „Struers RotoPol-35“ (Struers GmbH, Willich)
- Schleifscheiben bis P1200 (Struers GmbH, Willich)
- Siliziumcarbid-Schleifscheibe „WS Flex 18C“, Körnungen zwischen P80 und P1200 (Hermes Abrasives LTD, Virginia Beach, USA)
- Siliziumcarbid-Schleifscheibe P4000 (Struers GmbH, Willich)
- Wärmeschrank (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach)

2.8.1.2 Feinchemikalien

- Alizarinrot S (Merck, Darmstadt)
- Ethanol (Merck, Darmstadt)
- Aqua dest. (Centramed, Koblenz)
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- Formaldehyd 37 % (CMV Chemie-Vertrieb, Hannover)
- Löfflers Methylenblaulösung (Merck, Darmstadt)
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, Darmstadt)
- Salzsäure (Merck, Darmstadt)
- Sofortklebstoff „Loctit 420“ (Henkel Loctite, München)
- Kunststoff „Technovit 9100 NEU“ (Heraeus Kulzer, Wehrheim)

2.8.1.3 Geräte für die Histomorphometrie

- Dotslide-Systems 2.0, (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg)
- Histomorphometrie-Software „Axiovision Release 4.6.3 Sp1“ (Carl Zeiss AG, Göttingen)

2.8.2 Aufarbeitung des Knochenmaterials für die Histomorphometrie

2.8.2.1 Fixierung und Einbettung

Nach Entnahme der zu untersuchenden Knochenfragmente wurden diese zur Gewebefixierung ca. 10 Wochen in phosphatgepufferter neutraler 4%-iger Formalinlösung eingelegt. Nach Wässerung mit destilliertem Wasser zur Entfernung überschüssigen Formalins wurden die Knochenstücke durch Behandlung mit Alkoholbädern in verschiedenen Konzentrationen (50 %-, 70 %-, 90 %-, 96 %- und 2 x 100 %-iger Alkohol für jeweils 26 Tage) dehydriert. Die Knochenfragmente wurden in entsprechende Gießformen gelegt und mit selbsthärtendem Kunststoff "Technovit 9100 NEU" (Heraeus Kulzer, Wehrheim) übergossen. Der Kunststoff polymerisierte wie durch den Hersteller empfohlen sieben Tage bei -8,5°C aus.

2.8.2.2 Herstellung der Dünnschliffpräparate

Das in Kunststoff einpolymerisierte Knochenpräparat wurde von Überständen befreit und anschließend in der Mitte zersägt. Anschließend erfolgte der Planschliff der Schnittflächen in mehreren Stufen bis zur Korngröße 1200. Auf die nun planen Knochenflächen wurden Objektträger mit Sekundenkleber Loctit 420 (Henkel, Düsseldorf) aufgeklebt und das Knochenfragment im Abstand von ca. 300 µm zum Objektträger mit einer Diamantbandsäge (Exact, Norderstedt) abgetrennt. Die auf dem Objektträger verbliebene ca. 300 µm dicke Schicht einpolymerisierten Knochens wurde mit Hilfe einer Schleif- und Poliermaschine („Struers RotoPol-35“, Struers GmbH, Willich) in mehreren Schritten auf eine Dicke von 20 µm reduziert. Die Politur wurde mit einer 4000er Körnung abgeschlossen.

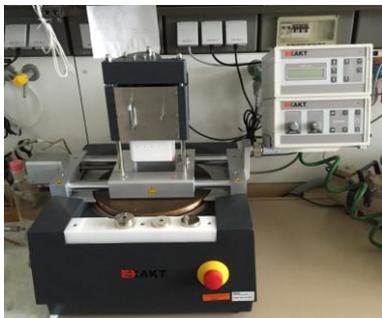


Abbildung 12: Schleif- und Poliermaschine, Struers RotoPol-35.

2.8.2.3 Alizarinrot-Methylenblau-Färbung nach Smith und Karagianes (Smith und Karagianes)

Die Färbung der Präparate erfolgte nach der Methode von Smith und Karagianes mit Methylenblau und Alizarinrot S (Smith and Karagianes 1974). Die Präparate wurden für 30 Sekunden in ein auf 80°C erwärmtes Methylenblaubad getaucht, anschließend mit destilliertem Wasser abgespült und für mindestens 3-4 Stunden getrocknet. Die Weiterbearbeitung der Präparate erfolgte durch 40-sekündiges Einlegen in ein Alizarinrot S-Bad. Nach erneutem Waschen mit aqua dest. wurden die Präparate 24 Std. bei Raumtemperatur getrocknet.

2.8.3 Mikroskopie

Bei der histomorphometrischen Analyse handelt es sich um ein quantitatives Verfahren zur Auswertung histologischer Dünnschliffpräparate. Mittels Lichtbildmikroskopie und Verwendung des Dotslide-Systems 2.0 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) wurde der zu untersuchende Präparatausschnitt bei 10-facher Vergrößerung digital fotografiert. Die Weiterverarbeitung des digitalen Bildes erfolgte am PC durch die Histomorphometrie-Software Axiovision Release 4.6.3 Sp1 (Carl Zeiss AG, Göttingen).

2.8.4 Histomorphometrie

Mittels des Histomorphometrie-Software Axiovision Release 4.6.3 Sp1 (Carl Zeiss AG, Göttingen) wurden die digitalen Bilder bearbeitet. Mit Hilfe verschiedener Softwarefunktionen des Programmes konnte eine Tangente an den äußersten knöchernen Strukturen der Alveole angelegt und in das Bild "ingebrannt" werden. An dieser Tangente wurde ein Rechteck mit den Maßen 3,75 mm x 11,5 mm, entsprechend 1188,58954 Pixel x 3654,00792 Pixel, im digitalen Bild ausgerichtet und in die Extraktionsalveole projiziert und schließlich ebenfalls in das Bild "ingebrannt". Somit war das zu untersuchende Areal festgelegt. Anschließend erfolgte die digitale Festlegung der "Region of Interest" (ROI) mit einer entsprechenden Softwarefunktion des Programms (Abbildung 13).

Um die Auswertung zu standardisieren, erfolgte unter Verwendung der Software Axio Vision Rel. 4.5 die Messung der Knochenmenge. Hierzu wurde das digitale Bild halbautomatisiert mittels eines individuell mit der Axio Vision-Software erstellten Skriptes vermessen. Durch das unterschiedliche Färbeverhalten der einzelnen Gewebe konnte die Histomorphometrie-Software Axiovision Release 4.6.3 Sp1 (Carl

Zeiss AG, Göttingen) diese selektiv differenzieren und im digitalen Bild markieren. So stellte sich kalzifiziertes Knochengewebe rot, kollagenes Bindegewebe blau und Weichgewebe hellblau in den nach Smith und Karagianes angefärbten Präparaten dar (Smith and Karagianes 1974).

Aus dem registrierten Farbbild konnte die Software so ein Binärbild erstellen, in dem die knöchernen Anteile des Bildes weiß und die nichtknöchernen Anteile schwarz dargestellt wurden. Auf diese Weise konnte die Gesamtfläche bzw. die knöchernen und nichtknöchernen Anteile des Bildes errechnet werden.

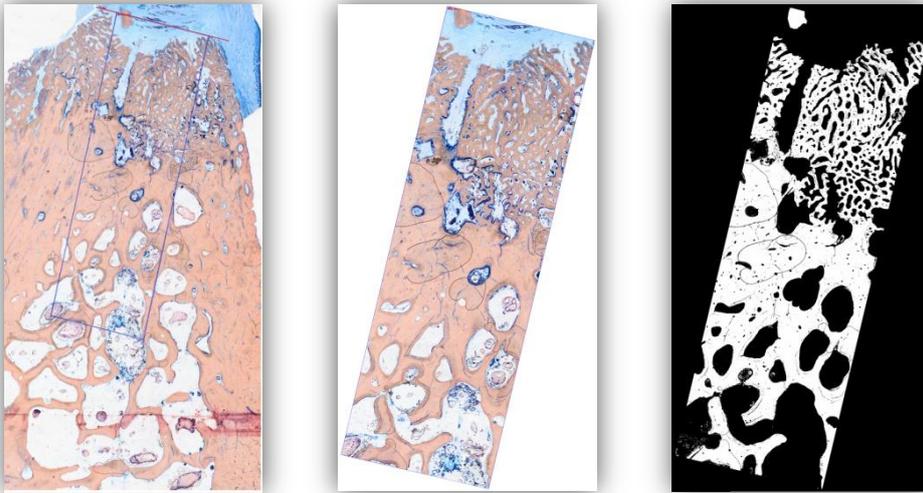


Abbildung 13: Histomorphometrische Arbeitsschritte zur Bearbeitung und Ausmessung der mikroskopischen Bilder (Ausrichtung der Prüffläche im Präparat, Isolierung der ROI, Generierung eines Binärbildes).

2.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit freundlicher Beratung durch das Institut für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen (Leiter: Prof. Dr. Tim Friede) in Person von PD. Dr. rer. nat. Klaus Jung und Frau Xenia Schulz.

Aufgrund einer nicht normalverteilten Datenlage der Versuchsergebnisse wurde die statistische Aufbereitung der Versuchsergebnisse mittels Mann-Whitney-U-Test (M-W-U-Test) durchgeführt.

Die Statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm Statistica der Firma StatSoft GmbH, Hamburg.

3 Ergebnisse

3.1 Molekularbiologische Analyse zur RANKL-Expression

Die erste Operation (OP I) fand zum Zeitpunkt 0 (Baseline), Operation II (OP II) nach 6 Monaten und Operation III (OP III) nach 8 bzw. 9 Monaten statt. Zum Zeitpunkt der Operation II war die Zoledronatgabe bereits erfolgt, Operation III (OP III) endete mit der finalen Euthanasie der Versuchstiere. Da ein Tier aus VG II bereits vor Abschluss der Versuchsreihe verstarb, konnte nur eine Anzahl von n=14 Versuchstieren in die Auswertung einbezogen werden.

3.1.1 RANKL-Expression im Alveolarknochen des Oberkiefers

Für die Analyse der RANKL-Expression im Alveolarknochen des Oberkiefers konnte beim Vergleich der VG I mit der KG in den Proben aus OP I kein signifikanter Unterschied ($P = 0,676104$) ermittelt werden. Auch im Vergleich von VG II und der KG war keine ausreichende Signifikanz ($p = 1,000000$) erkennbar. Der Medianwert betrug in der KG 0,23981, in der VG I -0,04891 und in der VG II 0,35019. In den Versuchsgruppen VG I und VG II waren die Maximal- und Minimalwerte für die VG I = 0,820709 bzw. 0,35840 und für die VG II = 1,10635 bzw. -11,5998. In der KG betrug der Maximalwert 1,15490, der Minimalwert -0,31008.

Auch bei der Gegenüberstellung der Knochenproben aus OP II konnte im Vergleich zwischen der KG und den Versuchsgruppen VG I ($p = 0,14367$) und VG II ($p = 0,540292$) kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die Medianwerte lagen in der KG bei -0,80626, in der VG I bei 0,49495 und in der VG II bei 0,610615. Die Maximal- und Minimalwerte waren in der KG 0,36528 bzw. -2,02087, in der VG I 2,289742 bzw. -0,35840 und in der VG II 1,10635 und -11,5998 (Abbildung 14 und 15).

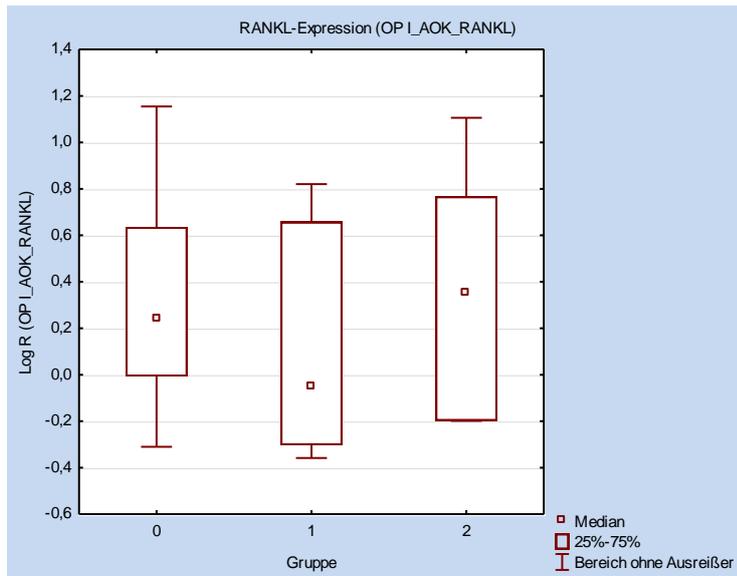


Abbildung 14: Vergleich der RANKL-Expression in den Knochenproben des AOK aus OP I (0=KG, 1=VG I, 2=VG II).

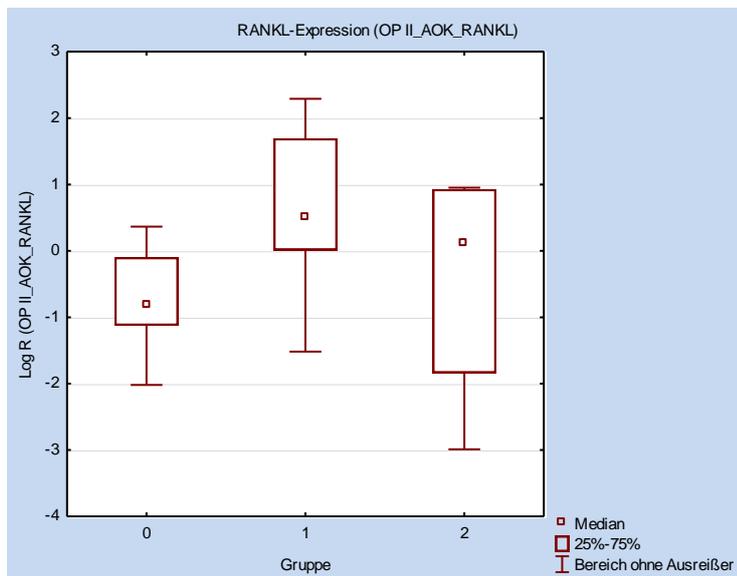


Abbildung 15: Vergleich der RANKL-Expression in den Knochenproben des AOK aus OP II (0=KG, 1=VG I, 2=VG II).

3.1.2 RANKL-Expression im Alveolarknochen des Unterkiefers

Der Vergleich der Proben der ersten OP (OP I) zwischen der KG und der VG I bzw. der VG II konnte mit $p=0,143673$ bzw. $p=0,094694$ keinen signifikanten Unterschied zeigen.

In der KG betragen die Maximal- und die Minimalwerte $0,06999$ bzw. $-1,42647$. Die Maximal- und Minimalwerte in der VG I lagen bei $1,278734$ bzw. $-0,32361$ und in VG II bei $1,03857$ und $-1,0067$.

Die Auswertung der Knochenproben aus OP II ergab im Vergleich von KG und VG I keinen signifikanten Unterschied ($p=0,296271$). Gegensätzlich dazu zeigte der

Ergebnisse

Vergleich der KG mit der VG II einen signifikanten Unterschied ($p=0,019965$) im Hinblick auf die Expression von RANKL aus dem Unterkieferalveolarknochen. Der Medianwert in der KG betrug 0,46393, in der VG I -0,15472 und in der VG II -0,88043. Maximal- und Minimalwerte wurden in der KG mit 1,87175 bzw. -0,44960, in VG I mit 1,967845 bzw. -1,29547 und in VG II mit -0,64318 bzw. -1,1550 ermittelt (Abbildung 16 und 17).

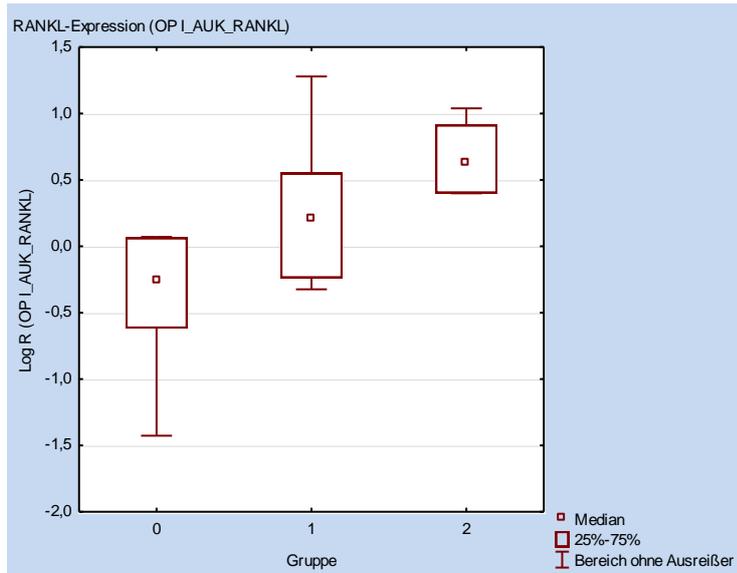


Abbildung 16: Vergleich der RANKL-Expression in den Knochenproben des AUK aus OP I (0=KG, 1=VG I, 2=VG II).

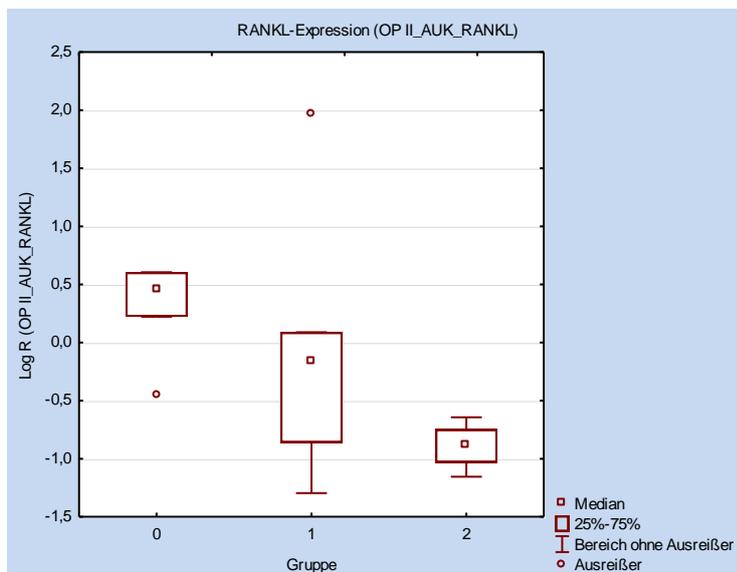


Abbildung 17: Vergleich der RANKL-Expression in den Knochenproben des AUK aus OP II (0=KG, 1=VG I, 2=VG II).

3.1.3 RANKL-Expression im Unterkieferknochen

Bei der Auswertung der Knochenproben des Unterkiefers aus OP I konnte weder im Vergleich der Proben aus der KG mit VG I ($p=0,296271$) noch beim Vergleich von KG mit VG II ($p=0,713303$) ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die deskriptive Analyse der Versuchsdaten ergab für die KG einen Medianwert von 0,13823, sowie einen Maximal- bzw. Minimalwert von 1,18495 und -0,62581. In VG I lag der Median bei 0,96465, das Minimum bei -0,04229 und das Maximum bei 1,271562. Der Median in VG II lag bei 0,31003, der Maximal- bzw. Minimalwert bei 1,30103 bzw. -0,5935.

In der OP II waren die Unterschiede der Ergebnisse beim Vergleich von der KG mit der VG I sowie von der KG mit der VG II nicht signifikant ($p=0,834532$ bzw. $p=0,540292$). Der Medianwert betrug in der KG 0,77572, das Maximum 2,25761, das Minimum hingegen -1,82767. In der VG I wurde der Median mit 0,76262, der Maximalwert mit 2,369719 und der Minimalwert mit -0,17079 ermittelt. Höher fiel der Medianwert in VG II mit 1,25689 aus. Minimum und Maximum lagen bei 0,6444 bzw. 1,83724.

Die Analyse der RANKL-Expression bei den Unterkieferknochenproben aus OP III lieferte ebenfalls beim jeweiligen Vergleich der Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied ($p=0,403396$ bzw. $p=0,713303$). Der Medianwert der KG belief sich auf 0,02239, Maximum und Minimum auf 0,22503 bzw. -1,18133. Der Medianwert in VG I fiel dagegen geringer mit -0,91956 aus. Maximum und Minimum lagen hier bei 0,659841 und -2,00243. Die Werte der deskriptiven Statistik in VG II wurden mit einem Medianwert von -0,60868 sowie Minimal- und Maximalwerten von -1,0886 und 1,19685 errechnet (Abbildung 18, 19 und 20).

Ergebnisse

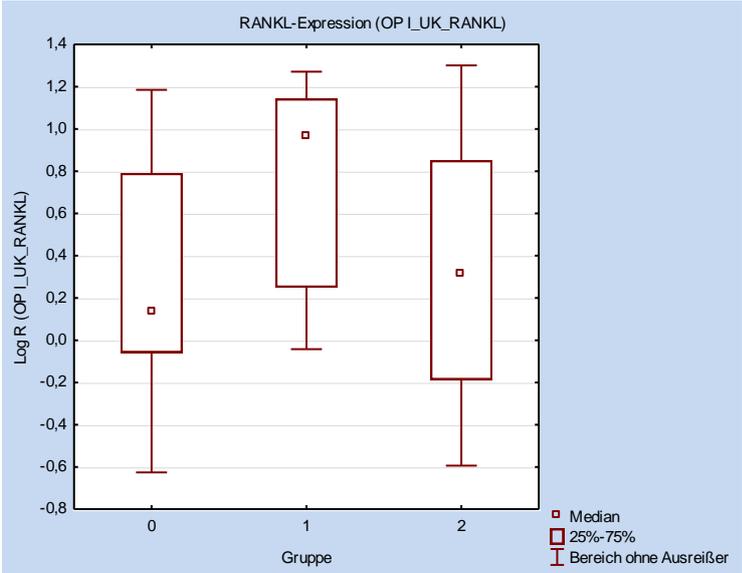


Abbildung 18: Vergleich der RANKL-Expression in den Knochenproben des UK aus OP I (0=KG, 1=VG I, 2=VG II).

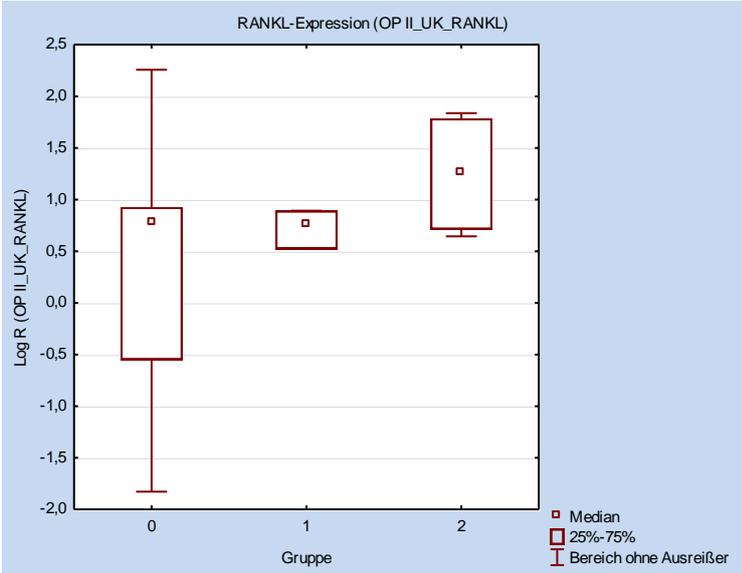


Abbildung 19: Vergleich der RANKL-Expression in den Knochenproben des UK aus OP II (0=KG, 1=VG I, 2=VG II).

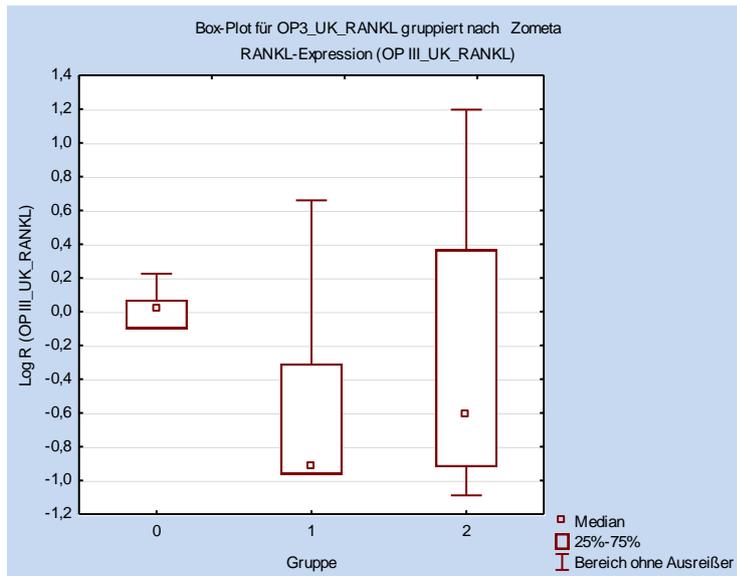


Abbildung 20: Vergleich der RANKL-Expression in den Knochenproben des UK aus OP III (0=KG, 1=VG I, 2=VG II).

3.1.4 RANKL-Expression im Beckenkammknochen

Der M-W-U-Test zeigte für die Analyse der RANKL-Expression in den Knochenproben des Beckenkamms aus OP I beim Vergleich von der KG mit der VG I und mit der VG II keinen signifikanten Unterschied ($p=0,665006$ bzw. $p=0,066193$). Die Medianwerte wurden durch die deskriptive statistische Analyse für die KG mit $-1,05255$, für die VG I mit $-1,11705$ und für die VG II mit $0,32760$ errechnet. Maximal- und Minimalwerte konnten mit $0,12970$ bzw. mit $-3,16505$ für die KG, mit $0,169174$ bzw. $-3,30390$ für VG I und mit $1,29053$ bzw. $-0,1877$ für die VG II festgehalten werden.

Auch bei den Proben aus OP II konnte kein signifikanter Unterschied beim Vergleich von der KG mit der VG I sowie mit der VG II nachgewiesen werden ($p=0,834532$ bzw. $p=0,540292$). Hier konnten die Medianwerte für die KG mit $-3,03717$, für die VG I mit $-2,88245$ und für die VG II mit $-2,08287$ ermittelt werden. Minimum und Maximum betragen in der KG $-4,43753$ und $-1,02896$, in der VG I $-4,31095$ und $-0,664111$ und in der VG II $-3,5250$ bzw. $-1,49004$.

Der Unterschied in der Auswertung der Beckenkammknochenproben aus OP III erwies sich ebenfalls sowohl beim Vergleich von der KG mit der VG I als auch im Vergleich mit der VG II als nicht signifikant ($p=0,676104$ bzw. $p=0,713303$). Der Median betrug für die KG $-1,76945$, für die VG I $-1,86832$ und für die VG II $-1,64617$. Die Maximal- und Minimalwerte für die KG lagen bei $-0,94873$ bzw. $-3,72313$. Für die VG I lagen die Werte bei $1,016701$ und $-2,95733$. Maximum und Minimum für die VG II wurden mit $1,19858$ und $-2,6168$ errechnet (Abbildung 21, 22 und 23).

Ergebnisse

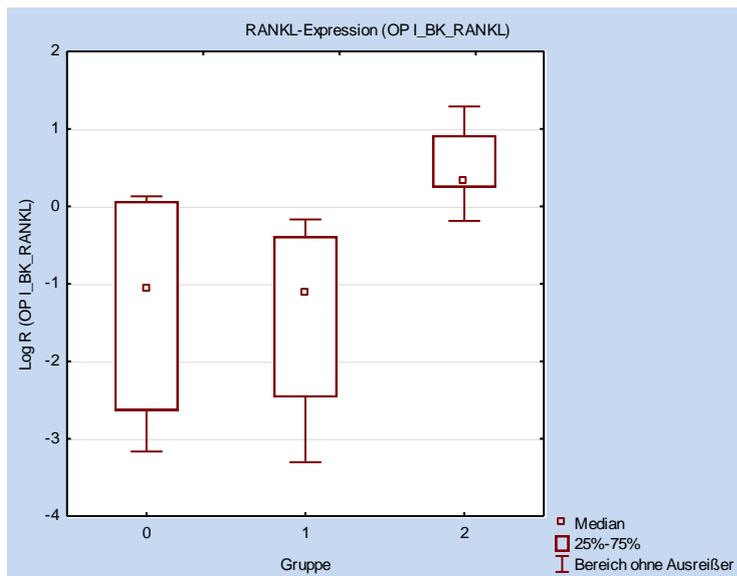


Abbildung 21: Vergleich der RANKL-Expression in den Knochenproben des BK aus OP I (0=KG, 1=VG I, 2=VG II).

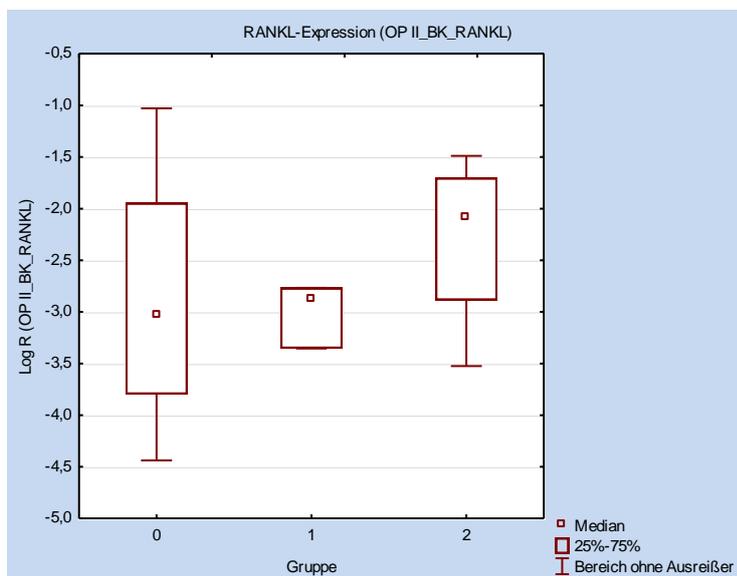


Abbildung 22: Vergleich der RANKL-Expression in den Knochenproben des BK aus OP II (0=KG, 1=VG I, 2=VG II).

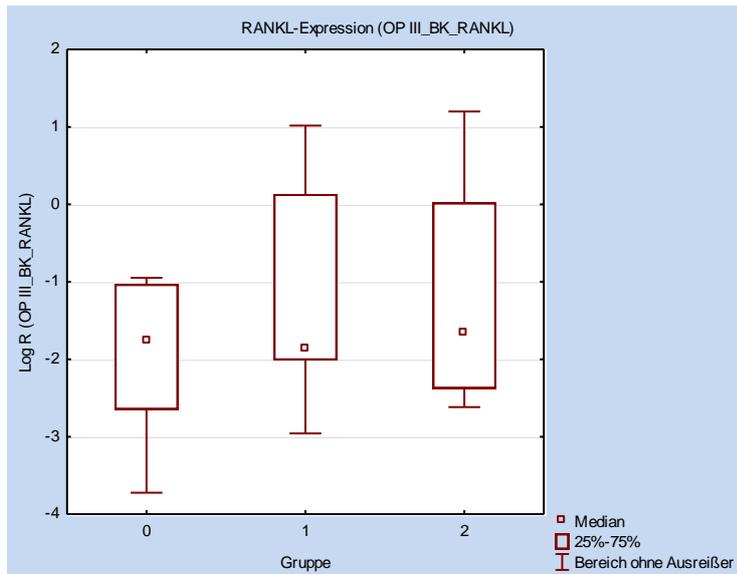


Abbildung 23: Vergleich der RANKL-Expression in den Knochenproben des BK aus OP III (0=KG, 1=VG I, 2=VG II).

3.2 Histomorphometrie

Zur histomorphometrischen Auswertung wurden 56 Präparate herangezogen und mittelwertig pro Organ zusammengefasst, so dass die statistische Auswertung 28 Mittelwerte umfasste. Die statistische Auswertung verglich jeweils Versuchsgruppe I (VG I) und Versuchsgruppe II (VGII) mit der Kontrollgruppe (KG), sowie VG I mit VG II bezüglich der gemessenen Knochenfläche.

3.2.1 Knochenfläche im Oberkiefer

Der statistische Vergleich bezüglich der Knochenfläche ergab beim Vergleich der KG mit der VG I keinen signifikanten Unterschied ($p=0,296271$). Auch die Vergleiche zwischen der KG und der VG II ($p=0,540292$) sowie zwischen der VG I und der VG II ($p=0,902523$) ergaben keinen signifikanten Unterschied. Der Median betrug in der KG 42,78 % und lag damit über den Medianen der VG I mit 36,75 % und der VG II mit 42,86 %. Maximum und Minimum wurden in der KG bei 63,40 % bzw. 42,78 % bestimmt und lagen somit leicht über den Maxima und Minima der VG I mit 59,59 % und 31,45 % und der VG II mit 50,52 % (Abbildung 24).

Ergebnisse

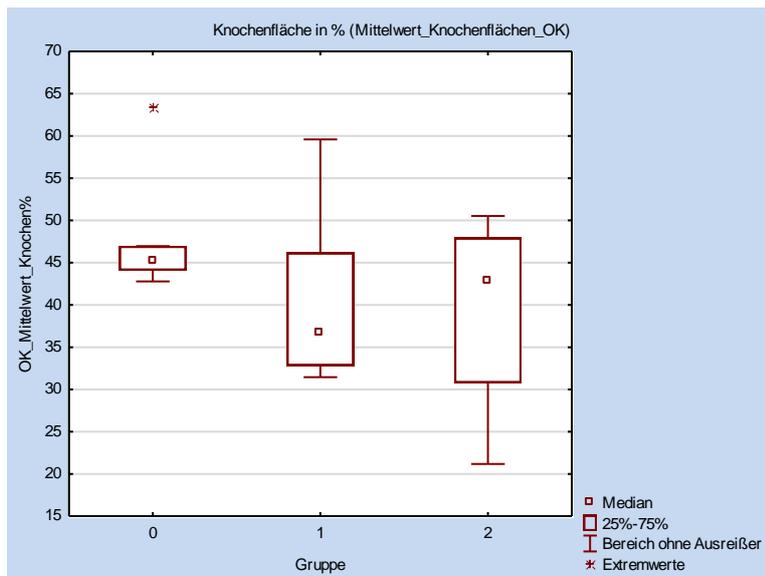


Abbildung 24: Vergleich der Knochenflächen in den Histologischen Schnitten des OK (0=KG, 1=VG I, 2=VG II).



a.

b.

c.

Abbildung 25: Vermessung der Knochenfläche eines OK-Präparates aus der KG; a.: Übersichtsaufnahme; b.: Isolierung der ROI; c.: Generierung eines binären Bildes.



a.

b.

c.

Abbildung 26: Vermessung der Knochenfläche eines OK-Präparates aus der VG I; a.: Übersichtsaufnahme; b.: Isolierung der ROI; c.: Generierung eines binären Bildes.



a.

b.

c.

Abbildung 27: Vermessung der Knochenfläche eines OK-Präparates aus der VG II; a.: Übersichtsaufnahme; b.: Isolierung der ROI; c.: Generierung eines binären Bildes.

3.2.2 Knochenfläche im Unterkiefer

Der Vergleich bezüglich der gemessenen Knochenfläche zwischen der KG und der VG I ergab in der statistischen Auswertung einen signifikanten Unterschied ($p=0,036715$). Im Vergleich der KG mit der VG II ($p=0,902523$) und der VG I mit der VG II ($p=0,270345$) konnte wiederum kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Median lag in der KG mit 65,17% ($27930,59 \mu\text{m}^2$) höher als in der VG I mit 52,47% ($22677,24 \mu\text{m}^2$) und in der VG II mit 60,78% ($26623,34 \mu\text{m}^2$). Das Maximum in der KG betrug 73,95% ($31940,37 \mu\text{m}^2$) und das Minimum 54,82%.

Ergebnisse

Maximal- bzw. Minimalwerte betragen in der VG I 57,88% bzw. 41,34% sowie in der VG II 70,61% und 49,85% (Abbildung 28).

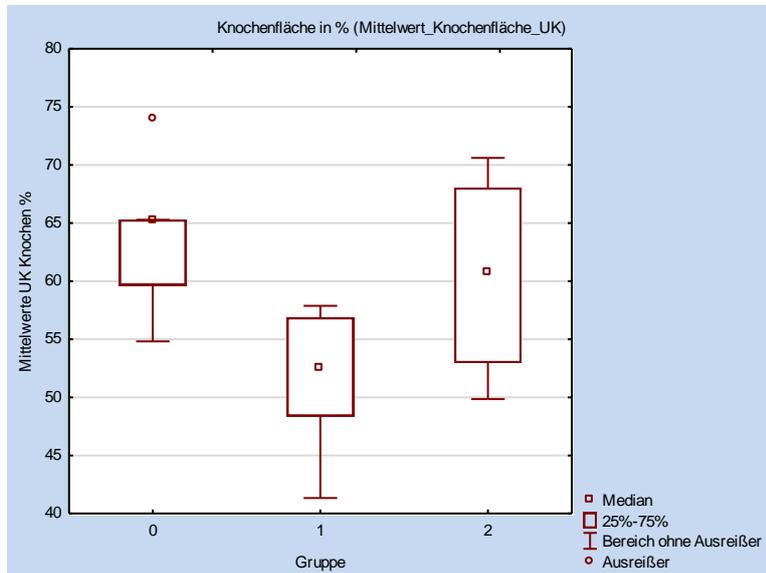


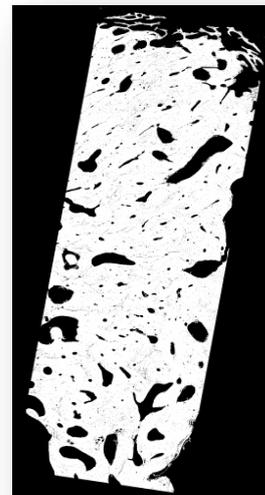
Abbildung 28: Vergleich der Knochenflächen in den histologischen Schnitten des UK (0=KG, 1=VG I, 2=VG II).



a.



b.



c.

Abbildung 29: Vermessung der Knochenfläche eines UK-Präparates aus der KG; a.: Übersichtsaufnahme; b.: Isolierung der ROI; c.: Generierung eines binären Bildes.



a.

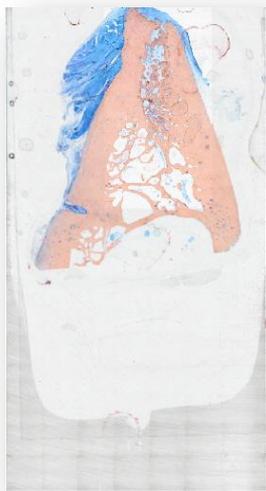


b.

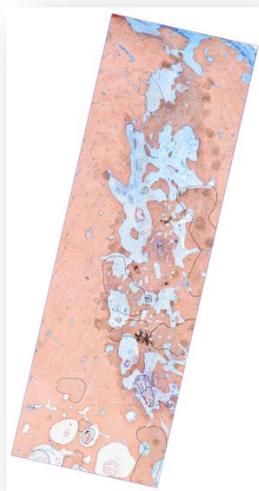


c.

Abbildung 30: Vermessung der Knochenfläche eines UK-Präparates aus der VG I; a.: Übersichtsaufnahme; b.: Isolierung der ROI; c.: Generierung eines binären Bildes.



a.



b.



c.

Abbildung 31: Vermessung der Knochenfläche eines UK-Präparates aus der VG II; a.: Übersichtsaufnahme; b.: Isolierung der ROI; c.: Generierung eines binären Bildes.

4 Diskussion

Bei der Anwendung von Bisphosphonaten über einen längeren Zeitraum werden gehäuft Krankheitsbilder beobachtet, die sich in Form einer Osteonekrose des Kieferknochens darstellen. Beschrieben werden diese als Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen (BRONJ) (Sharma et al. 2013; Senel et al. 2010).

Die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose ist eine schwerwiegende Erkrankung, da sie mit relevanten funktionellen Beeinträchtigungen (Kompromittierung der Kaufunktion und der oralen Anteile der Schluck und Sprechfunktion) und insgesamt mit einer Minderung der mundbezogenen Lebensqualität einhergehen kann (Ruggiero et al. 2009; Grötz 2009). Seit geraumer Zeit werden Bisphosphonate zur Therapie von Knochenwechselstörungen wie Osteoporose und Morbus Paget herangezogen (Russell und Rogers 1999). Sie finden allerdings auch bei malignen Erkrankungen wie dem Plasmozytom oder Knochenmetastasen bei Prostata-, Mamma-, Nierenzell- oder Lungenkarzinomen erfolgreich Anwendung. Die meisten Fälle von BRONJ treten erst mit einer Verzögerung von mehreren Jahren nach der Therapie auf. So wurde das Auftreten einer BRONJ nach 2-3 Jahren nach der Therapie mit intravenös verabreichten Bisphosphonaten und nach über 5 Jahren mit oral verabreichten Bisphosphonaten beschrieben (Wimalawansa 2008).

Eine genaue Erklärung der Ursache und des Mechanismus einer BRONJ ist bis heute nicht abschließend und befriedigend geklärt. Allgemein wird angenommen, dass es sich um einen multifaktoriellen Prozess handelt, der noch weiterer Untersuchungen bedarf (Bayram et al. 2013).

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 Molekularbiologische Verfahren

4.1.1.1 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR ist eine bewährte Technologie zur zuverlässigen Quantifizierung von Genexpressionsmustern (Wang et al. 2014). Durch Extraktion von mRNA aus dem Untersuchungsgewebe und anschließender Umschreibung mittels reverser Transkriptase in cDNA ist es unter Zuhilfenahme bekannter DNA-Sequenzen, sogenannter Primer, möglich, Expressionsmuster zu analysieren. Verschiedene Verfahren zur Echtzeitmessung der Amplifikation wurden in den vergangenen Jahren entwickelt (Bruhn et al. 2011). Gemeinsames Prinzip dabei ist der Nachweis der Amplikonbildung in jedem Amplifikationszyklus mittels Messung

der Fluoreszenzaktivität DNA-bindender Fluorophore (Bruhn und Armstrong 2008; Hillebrand 2013). Die DNA-Konzentration und Startkopienzahl wird dabei nicht absolut gemessen, sondern die Kinetik der zur Menge der DNA proportionalen Fluoreszenzaktivität bestimmt (Hillebrand 2013; Pfaffl 2004). Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres, nicht reguliertes Housekeeping-Gen, und eine Probe mit standardisierter, verdünnter Genexpression bezogen. Man nennt diesen Vorgang auch Normalisierung der Expressionsergebnisse (Meuer et al. 2001; Pfaffl 2004). Anders als bei der konventionellen semiquantitativen Endpunktanalyse kommt es bei der quantitativen Real-Time PCR nicht zu einer Verschiebung des stöchiometrischen Verhältnisses von Primer zu Template/Amplikon und somit zu einer Verfälschung der Messergebnisse (Bruhn et al. 2011). Bei der semiquantitativen Anfärbung von Gelelektrophorese-Banden im Rahmen der Endpunkt-PCR kann es zu Verfälschungen der Messergebnisse kommen. Die quantitative Real-Time PCR ist eine gute Alternative, da hierbei aus den Effizienzen der Schwellenwerte, dem sogenannten Cycle Threshold die DNA-Menge in Relation zum Referenzgen und zur Standardprobe quantifiziert werden kann. Mit einer Normalisierung auf Referenzgene wird eine Eingrenzung der Ergebnisvarianz, verursacht durch Matrix-Transkriptions- oder mRNA-Extraktionseffekte, erreicht (Schmittgen et al. 2000; Pfaffl 2001, 2004; Bruhn et al. 2011; Hillebrand 2013).

Das SYBR-Green-Assay basiert auf der unspezifischen Inkorporation des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green in die doppelsträngige DNA während der Annealing- und Elongationsphase (Bruhn et al. 2011). SYBR-Green absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 494$ nm und emittiert nach Eingliederung in den DNA-Strang grünes Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 521$ nm. Dies ermöglicht die einfache Detektion, ausgehend von einer Basalfluoreszenz aufgrund von doppelsträngiger Template-DNA, einer mit jedem Zyklus steigenden Fluoreszenz (Bruhn et al. 2011). Vorteilhaft ist die beinahe universelle Einsetzbarkeit und einfache Handhabung, dem stehen allerdings Nachteile im Bezug auf das relativ unspezifische Bindungsverhalten an doppelsträngiger DNA von SYBR-Green gegenüber. Dieser Nachteil kann durch die Verwendung eines spezifischen Sondensystems, den sogenannten TaqMan-Assays umgangen werden. Hierbei bedient man sich applikonspezifischer Oligonukleotide, sogenannter Sonden, mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Reporterfarbstoff) am 5'-Ende

und einem nahe positionierten Quencher am 3'-Ende (Bruhn et al. 2011; Heid et al. 1996). Während der PCR bindet die TaqMan-Sonde an die spezifische Zielsequenz, die von den Primern flankiert wird (Ganten et al. 2003). Bei intakter TaqMan-Sonde kann, bedingt durch den unterdrückenden Einfluss des Quencher kein Fluoreszenzsignal emittiert werden. (Heid et al. 1996). Die für die Real-Time PCR verwendete Taq-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, die die eingesetzte TaqMan-Sonde im Rahmen der Synthese eines neuen DNA-Stranges spaltet (Holland et al. 1991). Durch die Spaltung der Sonde in kleinere Nukleotide wird der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher getrennt, wodurch das Fluoreszenzsignal nicht länger unterdrückt wird. Mit jedem neuen DNA-Synthesezyklus und der damit verbundenen steigenden Emission eines Fluoreszenzsignals kann so auf die Anzahl neugebildeter DNA-Moleküle rückgeschlossen werden (Holland et al. 1991; Heid et al. 1996; Ganten et al. 2003). Gemeinhin gilt das SYBR-Green-Assay gegenüber dem TaqMan-Analyseverfahren allerdings als geeigneter hinsichtlich seiner Spezifität (Schmittgen et al. 2000).

Zur Vermeidung fehlerhafter, d.h. unspezifischer PCR-Produkte, und um eine ausreichende Spezifität des SYBR-Green-Assays zu gewährleisten, sollte immer eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden (Schneeberger et al. 1995; Ririe et al. 1997; Schmittgen et al. 2000). Zum Ausschluss unspezifischer PCR-Produkte kann bei Verdacht und zur Verifizierung eine Basenpaarlängenanalyse mittels klassischer Gelelektrophorese durchgeführt werden.

4.1.2 Histomorphometrische Verfahren

Für die quantitative Untersuchung von Gewebehistologien können histomorphometrische Verfahren genutzt werden. Auf dem Gebiet der In-Vitro-Diagnostik ist die Histomorphometrie von Dünnschnitten eine seit Jahrzehnten etablierte Methode zur quantitativen Bestimmung von Strukturparametern (Engelke et al. 1999). Da damit eine Ortsauflösung von 1 µm problemlos erreicht werden kann, eignen sich histomorphometrische Verfahren auch zur Quantifizierung der Modeling- und Remodelingprozesse des Knochens (Engelke et al. 1999). Üblicherweise werden dazu angefärbte Dünnschnitte untersucht (Engelke et al. 1999). Verschiedene histologische Färb- und Fixierungsverfahren ermöglichen die Herstellung sogenannter Dünnschliffpräparate, in denen Gewebestrukturen aufbereitet und mikroskopisch ausgewertet werden können. Neben dem hier verwendeten Färbungsverfahren nach Smith und Karagianes lassen sich auch andere

Färbungsverfahren je nach Gewebeart und Fragestellung verwenden (Smith und Karagianes 1974).

Das Prinzip der Histomorphometrie liegt darin, dass ein vom Mikroskop vergrößertes Bild von einer Digitalkamera erfasst und an einen Personalcomputer weitergegeben wird. Mit einer Histomorphometrie-Software können anschließend quantitative Messungen an den Bildern vorgenommen werden (Bartels 2011). Die Histomorphometrie beruht auf dem Prinzip der Stereologie. Die Nachteile dieses Verfahrens liegen neben der aufwendigen Probenpräparation vor allem darin, daß zur Extrapolation der in zweidimensionalen Schnitten gewonnenen Ergebnisse in die dritte Dimension Modellannahmen über die zugrundeliegende Architektur gemacht werden, die im Allgemeinen nicht erfüllt sind (Engelke et al. 1999). Bei der Herstellung von Dünnschliffpräparaten, die für die histomorphologische Untersuchung notwendig sind, sind auftretende Risse oder Falten in der zu beurteilenden Region eine nicht auszuschließende Quelle für Messfehler (Stöhrer 2009). So können bereits bei der Einbettung des Untersuchungsmaterials in den Kunststoff Technovit 9100 NEU Fehler entstehen. Auch durch unvorsichtiges Sägen oder zu grobes Beschleifen der Präparate kann es im Untersuchungsmaterial zu Ausrissen kommen, die sich bei der histomorphometrischen Untersuchung in Form von Artefakten niederschlagen.

Als neue Methode und potentielle Alternative zur Histomorphometrie hat sich allerdings im letzten Jahrzehnt die Technologie der Mikro-Computer-Tomographie (μ CT) etabliert (Engelke et al. 1999). Bei der Technologie des μ CT handelt es sich um ein röntgenbasiertes, hochauflösendes Schnittbildverfahren. Grundlage für diese Verfahren ist die Technik der herkömmlichen Computer-Tomographie. Mit Hilfe der μ CT-Technologie ist es zum ersten Mal möglich, die dreidimensionale Knochenstruktur von kleinen Proben oder auch von Versuchstieren ohne aufwendige Probenpräparation zu untersuchen (Engelke et al. 1999).

In verschiedenen Studien wurde die Korrelation zwischen Histomorphometrie und μ CT untersucht (Thomsen et al. 2005). So verglichen Uchiyama et al. in einer Arbeit über trabekuläre Strukturen des menschlichen Os iliaceale das μ CT-Verfahren mit der konventionellen Histomorphometrie (Uchiyama et al. 1997). Es wurden transiliakale Knochenbiopsien von 15 Patienten mit verschiedenen metabolischen Knochenerkrankungen genommen und zweidimensionale μ CT-Bilder erstellt. Anhand der μ CT-Bilder wurden Gesamtfläche, Knochenfläche und Knochenumfang

bestimmt. Hieraus konnten sofort halbautomatisiert die Parameter Knochenvolumen (BV/TV), Trabekeldicke (Tb.Th), Trabekelanzahl (Tb.N) und Trabekeltrennung (Tb.Sp) errechnet werden. Um die Qualität dieses Verfahrens beurteilen zu können, wurden die Ergebnisse mit den Ergebnissen des herkömmlichen Histomorphometrieverfahrens verglichen (Uchiyama et al. 1997). Signifikante Korrelationen zwischen diesen beiden Techniken konnten für alle Parameter mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,759 (Tb.N<0,005) bis hin zu 0,949 (BVTV,p<0,0001) festgestellt werden (Uchiyama et al. 1997).

Auch in der BIOMED-I-Studie "Bewertung der Knochenqualität bei Osteoporose" wurde das μ CT-Verfahren mit der konventionellen Histomorphometrie verglichen. Auch hier zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen Histomorphometrie und μ CT für die Parameter Knochenvolumen (BV/TV) (r=0,93), Trabekeltrennung (BS/TV) (r=0,91), Trabekeldicke (Tb.Th) (r=0,84) und Trabekelabstand (Tb.Sp) (r=0,91). Die mittleren prozentualen Unterschiede zwischen μ CT und Histomorphometrie reichten von 2,5 % (BV/TV) bis 6,1 % (Tb.Th) (Müller et al. 1998). Die Ergebnisse zeigen, dass die μ CT auf Basis von 2D-Bildern ein nützliches Werkzeug für die Bildgebung und zerstörungsfrei die Quantifizierung der Mikroarchitektur des trabekulären Knochens in unverarbeiteten chirurgischen Knochenproben sein kann (Uchiyama et al. 1997). Ein Nachteil der μ CT-Technologie ist die Begrenzung des Messfeldes auf relativ kleine Volumina von, je nach Auflösung, einigen mm³ bis zu wenigen cm³ (Engelke et al. 1999). Auch ist die Bedeutung des μ CT bei der Diagnose anderer Erkrankungen wie beispielsweise hämatologischer Systemerkrankungen, die eindeutig in zwei-dimensionalen Schnittpräparaten beurteilt werden können noch unklar (Delling et al. 1995). Daher muss die Relevanz des kleinen Volumens für die jeweilige Fragestellung immer bedacht werden. Verglichen mit der Histomorphometrie ist der apparative Aufwand für einen μ CT-Scanner relativ hoch, die Probenpräparation dagegen sehr einfach. Bevor die Histomorphometrie an Dünnschliffen durch μ CT-Verfahren ersetzt werden kann, muss aber insbesondere zur Visualisierung und Quantifizierung von Modeling- und Remodelingprozessen die Ortsauflösung von μ CT-Systemen weiter gesteigert werden (Engelke et al. 1999). Vergleicht man beide Techniken, so gelangt man zu dem Schluss, dass weder die eine noch die andere Methode allein für alle Fragestellungen befriedigende Ergebnisse hervorbringt. Vielmehr sollten die beiden Techniken als sich ergänzende Verfahren betrachtet werden. So bietet die Histomorphometrie mit ihrer breiten

Anwendbarkeit auf verschiedenen Gewebe ein großes Anwendungsspektrum, bleibt aber im Gegensatz zur μ CT immer auf nur zwei Dimensionen beschränkt. Das μ CT hingegen bietet zwar die dreidimensionale und zerstörungsfreie Darstellung von Gewebeproben und ist im kleinen Rahmen sogar auch in vivo anwendbar, bleibt aber nach wie vor auf bestimmte Gewebearten beschränkt und bedarf noch weiterer technischer Entwicklung.

4.2 Diskussion des Tiermodells

Das Göttinger Minischwein scheint aufgrund seiner großen Ähnlichkeiten zum humanen Organismus bezüglich seiner Organsystemen sowie der Schleimhaut und dem Knochen als Großtiermodell für die Untersuchung bisphosphonat-induzierter Knochenstrukturveränderungen besonders geeignet zu sein. Für diese Untersuchung wurden 15 weibliche Göttinger Minischweine vom Versuchsgut Relliehausen der Georg-August-Universität Göttingen in Dassel verwendet. Die Tiere wurden zur Vermeidung einer Selektionsbias randomisiert und in zwei Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe zu je 5 Schweinen eingeteilt. Bei den Minischweinen handelte es sich um 15 Sauen mit einem Durchschnittsalter von 5 Jahren. Somit war zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns davon auszugehen, dass das Knochenwachstum der Tiere abgeschlossen war. Ein abgeschlossenes Knochenwachstum sollte bei Tiermodellen in der Untersuchung von Bisphosphonat induzierten Knochennekrosen vorausgesetzt werden, um etwaige Interaktionen mit osteogenen Wachstumsprozessen zu vermeiden. Das Durchschnittsgewicht der Versuchstiere lag bei 68,64 +/- 13,59 kg.

Um Effekte durch Störfaktoren (Bias durch Confounder) zu verhindern, wurden die Tiere aller drei Versuchsgruppen exakt gleich behandelt. Die Schweine stammten alle vom gleichen Zuchtbetrieb, so dass der Einfluss, den eine unterschiedliche Herkunft auf die Versuchsergebnisse bewirken kann, gering gehalten wurde (Bartels 2011). Die von Turner et al. beschriebene Ausschaltung von Einflüssen von genetischen Variablen auf Versuchsergebnisse durch Verwendung einheitlicher Zuchtlinien, beispielsweise in Tiermodellen mit Mäusen oder Ratten, ist derzeit bei der Verwendung von Göttinger Minischweinen nicht realisierbar (Turner 2001). Um den Einfluss des Operationsablaufs auf die Versuchsergebnisse auszuschließen, wurden die Tiere der Kontrollgruppe der gleichen OP unterzogen wie die Tiere der Versuchsgruppen I und II. Die Operationen wurden stets vom gleichen OP-Team vorgenommen.

Die Versuchsdauer betrug ab der ersten Operation der Tiere 9 Monate. Eine thematisch vergleichbare Studie durch Pautke et al. wurde mit 10 Göttinger Minischweinen durchgeführt und lief über einen Zeitraum von 7 Wochen (Pautke et al. 2012).

4.3 Diskussion der statistischen Auswertung

Hinsichtlich der wenigen statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen sowohl in der molekularen Expressionsanalyse als auch in der histomorphometrischen Untersuchung muss eine vorsichtige Interpretation der Ergebnisse vorgenommen werden. Die erhaltenen Daten können entweder zu Recht nicht signifikant sein oder es ist ein β -Fehler aufgetreten (Gaus und Muche 2014). Nur bei sehr großen Fallzahlen und damit verbundener sehr großer Power kann man aus einer nicht signifikanten Testentscheidung schließen, dass der möglicherweise übersehene Unterschied so gering ist, dass er praktisch unbedeutend ist (Gaus und Muche 2014). Die in diesem Versuch herangezogene Anzahl von 15 Versuchstieren ist unter dem Gesichtspunkt einer Poweranalyse als zu gering zu bewerten, um klare Signifikanzunterschiede verlässlich zu generieren. Da es sich in diesem Fall allerdings um eine Pilotstudie an einem Großtiermodell mit dem entsprechenden Aufwand handelt, kann die Anzahl von 15 Göttinger Minischweinen akzeptiert werden.

Auch die Auswahl des Mann-Whitney-U-Testes (M-W-U-Test) birgt gewisse Schwierigkeiten bezüglich der Feststellung signifikanter Ergebnisse. Der M-W-U-Test vergleicht zwei unverbundene Stichproben, dabei werden die Mediane miteinander verglichen. Eine Normalverteilung der Daten wird nicht vorausgesetzt. Insofern basiert dieser Test auf wesentlich schwächeren Voraussetzungen als beispielsweise der t-Test, bei dem eine Normalverteilung der Daten vorausgesetzt sein sollte (Weiß und Rzany 2008). Da bei den Daten aus den hier beschriebenen Versuchen keine Normalverteilung vorliegt, kam hier der M-W-U-Test zur Anwendung. Problematisch hierbei ist lediglich die Tatsache, dass die geringe Anzahl der Versuchstiere eine gewisse Ungenauigkeit mit sich bringt, da bei der Anwendung des M-W-U-Testes eine Mindestanzahl von 7 Untersuchungsindividuen nicht unterschritten werden sollte.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

4.4.1 Diskussion der molekularbiologischen Untersuchung der RANKL-Expression

Die Ergebnisse der Untersuchung bezüglich der Genexpression von RANKL sowohl im Alveolarknochen des OK und UK, sowie im Mandibularknochen und dem Beckenkammknochen konnten im Vergleich der Versuchsgruppen (VG I und VG II) mit der Kontrollgruppe (KG) nur teilweise einen signifikanten Unterschied zeigen.

So zeigt die Analyse der Knochenproben des Oberkieferalveolarknochens (AOK), die in OP I, also vor dem Beginn der Zoledronattherapie entnommen wurden, ein über die Kontrollgruppe und die Versuchsgruppen gleichmäßiges Ausgangsniveau bezüglich der RANKL-Expression. Nach dreimonatiger Zoledronattherapie kam es in den Versuchsgruppen zu einem Anstieg der RANKL-Expression.

Anders verhielt es sich bei der Analyse der Knochenproben des Unterkieferalveolarknochens (AUK). Hier kam es nach dreimonatiger Zoledronattherapie zu einem Abfall der RANKL-Expression. Auch konnte hier ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

Die Untersuchung der Knochenproben des Mandibularknochens (UK) erbrachte ein ähnliches Ergebnis zur Auswertung des AUK. Hier kam es zwar nach dreimonatiger Zoledronattherapie in VG I und VG II zu einem leichten Anstieg der RANKL-Expression. Sechs Monate nach der ersten Zoledronatinfusion konnte in beiden Versuchsgruppen allerdings ein Abfall der RANKL-Expression festgestellt werden.

Die Untersuchung der Beckenkammproben in den verschiedenen Versuchsgruppen zeigte nach dreimonatiger Zoledronattherapie einen leichten Abfall der RANKL-Expression in VG II. Mit fortschreitender Zoledronattherapie konnte allerdings in beiden Versuchsgruppen ein Anstieg der RANKL-Expression beobachtet werden.

Diese Ergebnisse stehen zum Teil im Einklang mit immunhistochemischen Untersuchungen durch Cankaya et al. und Yang et al. Sie untersuchten die RANKL-Expression an Sprague-Dawley-Ratten mittels eines ELISA-Verfahrens im Mandibulaknochen und an der Tibia (Cankaya et al. 2013; Yang et al. 2015). Auch wurde hier wurde eine Verringerung der RANKL-Expression im Mandibularknochen beschrieben, was in unserer Untersuchung im Unterkieferalveolarknochen und nach längerer Zoledronattherapie auch im Mandibularknochen ebenfalls gezeigt werden konnte. Gleichzeitig konnte in der Untersuchung des Tibiaknochens, der als

Vergleichsgewebe fungierte, ein Anstieg der RANKL-Expression nachgewiesen werden (Cankaya et al. 2013). In der hier vorliegenden Studie dienten die Knochenproben aus dem BK als Vergleichsgewebe und auch hier konnte ein Anstieg der RANKL-Expression gezeigt werden.

Yang et al. beschreiben in ihrem Bericht über ihren Versuch zur Etablierung eines neuen Tiermodells zur Untersuchung der BRONJ an weiblichen Sprague-Dawley-Ratten ebenfalls eine Verringerung der RANKL-Expression nach Bisphosphonatgabe im untersuchten Knochengewebe des Kiefers (Yang et al. 2015). Auch Kaibuchi et al. konnten in ihrer Untersuchung der Wirkung von multipotenten mesenchymalen Stromazellen auf Sprague-Dawley-Ratten mit einer BRONJ die Abnahme der RANKL-Expression im Kleintiermodell zeigen (Kaibuchi et al. 2016)

Fernandez et al. berichteten ebenfalls in einer Studie mit Knochenmark-Stromazellen von Patienten mit multiblem Myelom, die mit dem Bisphosphonat Ibandronat behandelt wurden, dass es zu einem Rückgang der RANKL-Expression kam (Fernández et al. 2010). Zwar wurde in der erwähnten Untersuchung ein anderes Bisphosphonat angewendet und keine speziellen Knochenregionen untersucht, jedoch konnten wir diesen Effekt nur in den Knochenproben des Unterkiefers beobachten.

Nishida et al. kamen diesbezüglich zu ähnlichen Ergebnissen (Nishida et al. 2005). Sie zeigten in ihrer Untersuchung an Knochenmarkzellen in einer Zellkultur, die mit einem stickstoffhaltigen Bisphosphonat behandelt wurde, dass die Expression von RANKL gehemmt wurde (Nishida et al. 2005).

Auch Koch et al. kamen zu gegensätzlichen Ergebnissen (Koch et al. 2010). Sie untersuchten die Wirkungsweisen verschiedener Bisphosphonate mittels RT-PCR an Osteoblasten-Zellkulturen. Sie wiesen in ihrer in-vitro-Studie zur RANKL-Expression in Osteoblasten unter Bisphosphonateinfluss einen Anstieg der RANKL-Expression nach (Koch et al. 2010).

In einer klinischen Studie mit Morbus-Paget-Patienten untersuchten Martini et al. unter anderem den RANKL-Serumspiegel vor und nach einer Bisphosphonatinfusionstherapie (Martini et al. 2007). Sie stellten ein langsames Absinken des RANKL-Spiegels nach 30 Tagen und ein Verbleiben auf diesem Niveau über die Dauer der Studie fest (Martini et al. 2007).

Es zeigt sich also, dass auch die Studienlage bezüglich der Untersuchung der RANKL-Expression allgemein recht gegensätzlich ist und somit noch weiterer

Untersuchungen zur genauen Klärung des Sachverhaltes bedarf. Hier bietet sich das Göttinger Minischwein als Großtiermodell gut an.

4.4.2 Histomorphometrische Ergebnisse

Bei den Ergebnissen der histomorphometrischen Analyse bezüglich der Knochenfläche vor bzw. nach Zoledronattherapie konnte nur bedingt ein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Im Vergleich der KG mit der VG I konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe ermittelt werden.

Trotzdem lassen sich anhand der aufgezeichneten Daten bezüglich histomorphometrisch gemessener Knochenfläche einige Aussagen diskutieren.

So konnte gezeigt werden, dass der Medianwert bezüglich der Knochenfläche im OK in VG I und VG II abnahm.

Die histomorphometrische Auswertung der UK-Schnitte zeigte in der VG I eine leichte Abnahme der Knochenfläche, die allerdings in der VG II wieder anstieg.

Die histomorphometrische Untersuchung durch Helm et al. in ihrer Studie an Beagle-Hunden über die Wirkung von Zoledronat zeigte bezüglich der Knochendichte ähnliche Ergebnisse (Helm et al. 2010). Sie verglichen eine Kontrollgruppe mit einer Versuchsgruppe, die über 4 Monate 4 mal monatlich eine Zoledronatinfusion erhielt. Histomorphometrisch ausgewertet wurden histologische Schnitte des Condylus mandibulae und eines Lendenwirbels. Bezüglich der Knochendichte konnte bei keinem der Organe ein signifikanter Unterschied zwischen der VG und der KG festgestellt werden. Die Knochendichte betrug bezogen auf den Condylus mandibulae in der KG 38,2 % und in der VG 35,9 % (Helm et al. 2010). In diese Richtung weisen auch die in dieser Untersuchung erhaltenen Ergebnisse. Helm et al. beschrieben weiterhin einen signifikanten Unterschied bezüglich trabekulärer Knochenneubildung (Trabecular Bone Remodeling = TBR). So war die TBR in der VG im Lendwirbelkörper 94 % niedriger als in der KG und stellte sich beim Condylus mandibulae bezüglich der TBR als statistisch äquivalent dar (Helm et al. 2010).

Widersprüchliche Ergebnisse wurden durch Tatli et al. beschrieben (Tatli et al. 2014). Sie untersuchten an New Zealand-Kaninchen die Wirkung von Zoledronat auf den physiologischen Knochenumbau und die Mikroarchitektur des kondylären Teils des Kiefergelenks und konnten eine Zunahme des Knochenvolumens und anderer histomorphometrischer Parameter nach Zoledronatbehandlung nachweisen (Tatli et

al. 2014). Anders als in der hier vorliegenden Untersuchung bekamen die Versuchstiere allerdings nur eine Einzeldosis von 0,1mg/KG infundiert.

Auch die recht inhomogene Studienlage lässt noch viel Raum für Studien am Tiermodell.

4.5 Ausblick

In der Erforschung Bisphosphonat-assoziiertes Knochennekrosen hat sich eine Erprobung im Tiermodell als unumgänglich erwiesen. Als besonders geeignetes Versuchstier hat sich das Göttinger Minischwein herausgestellt. Es handelt sich um Großtiermodell, welches in Knochenstruktur und Metabolismusfunktionen entsprechender Organe große Ähnlichkeiten zum menschlichen Organismus aufweist. Da nach wie vor die Problematik von auftretenden Knochennekrosen bei mit Bisphosphonaten der dritten Generation behandelten Patienten auftritt, bietet sich das Großtiermodell "Göttinger Minischwein" auf Grund der genannten positiven Eigenschaften auch weiterhin an.

Als schwierig bei der Anwendung von Großtiermodellen erweist es sich oft, eine ausreichende bzw. wünschenswerte Signifikanz der Daten zu erreichen. Dies liegt im Wesentlichen an der oft begrenzten Anzahl der Versuchstiere bzw. der Möglichkeit, diese adäquat zu halten und zu betreuen. So handelt es sich bei der vorliegenden Untersuchung um eine Pilotstudie, bei der eine geringe Zahl an Tieren untersucht wurde. Daher wäre bei der Untersuchung ähnlicher Fragestellungen ein größeres Untersuchungskollektiv wünschenswert. Die Evidenz zur Eignung des Göttinger Minischweins bezüglich der Erforschung Bisphosphonat-induzierter Knochennekrosen sollte auch weiterhin durch ähnliche Versuchs- und Studienreihen untermauert werden.

In der Zukunft wird die neuere Technologie der μ CT eine größere Rolle bei Untersuchungen von Gewebeproben spielen. Da es sich hierbei im Gegensatz zur Histomorphometrie um ein dreidimensionales und nicht destruktives Verfahren handelt, wird sich bei technischer Ausreifung ein großes Untersuchungsspektrum ergeben.

Die fluoreszenzbasierende Real-Time-PCR ist ein wichtiges Werkzeug in Wissenschaft und Medizin. Die Verfahren sind, einmal etabliert, einfach durchzuführen und alle Formate erlauben einen hohen Probendurchsatz. Die real-time-PCR kombiniert hohe Sensitivität mit einer verlässlichen Spezifität. Standardisierte Assays und verbesserte Auswertungsalgorithmen werden in Zukunft

die Probleme der Referenzgene und Standardkurven überwinden und die Real-Time-PCR zu einer der empfindlichsten Nachweismethoden für Nukleinsäuren machen (Holzapfel und Wickert 2007).

Als Parameter zur Risikoeinschätzung bezüglich der Ausbildung einer BRONJ, als Nebenwirkung einer Bisphosphonattherapie bei Osteoporosepatienten wurde das C-terminale Telopeptid (CTX) identifiziert. Im Vergleich zu anderen Markern gilt es als zuverlässig bei der Abschätzung der Suppression des Knochenstoffwechsels und ist von besonderem Interesse bei der Abschätzung des Risikos, an einer BRONJ zu erkranken (Rosen et al. 2000; Alexandersen et al. 2005). CTX entsteht während der osteoklastären Knochenresorption von Kollagen Typ I und ist als solches in Serum und Urin nachweisbar. In verschiedenen Untersuchungen von Bagan et al. 2008, Lehrer et al. 2008 und Kunchur et al. konnten durch die Messung des Serum CTX-Spiegels keine zuverlässigen Prognosen für die Entstehung einer BRONJ erstellt werden (Bagan et al. 2008; Lehrer et al. 2008; Kunchur et al. 2009). Allerdings könnte die CTX-Bestimmung eine Risikoabschätzung vor oralchirurgischen Eingriffen eine Bedeutung erlangen (Kunchur et al. 2009).

In den letzten Jahren häufen sich Berichte und Fallstudien, dass es durch die Gabe von Teriparatid möglich ist, die Entwicklung einer BRONJ zu beeinflussen (Harper und Fung 2007; Lau und Adachi 2009; Lee et al. 2011; Chan und McCauley 2013). So scheint die Gabe von Teriparatid zu einem Abbau des nekrotischen Gewebes zu führen und zur Knochenneubildung beizutragen (Subramanian et al. 2011). Allerdings sind die genauen Prozesse nach wie vor nicht in Gänze geklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen.

4.6 Schlussfolgerung

Ziel dieser Studie sollte die tierexperimentielle Untersuchung von Knochenstrukturveränderungen im Kieferknochen nach Zoledronatbehandlung mittels molekularbiologischer und histomorphometrischer Methoden sein.

Folgende Schlussfolgerungen können unter den genannten Studienbedingungen abgeleitet werden:

1. Die Ergebnisse der qualitativen Real-Time-PCR zeigen ein ähnliches Bild der RANKL-Expression in den verschiedenen Entnahmeregionen.

- a. In den aus dem Unterkiefer entnommenen Knochenproben konnte eine zumindest temporäre Zunahme der RANKL-Expression nach Zoledronattherapie festgestellt werden.
- b. In den Knochenproben des Oberkiefers und des Beckenkamms hingegen kam es generell zu einem Anstieg der RANKL-Expression in den Versuchsgruppen.

Da RANKL ein TNF-Faktor im Metabolismus des Knochenabbaus ist, kann hier mittelbar auf einen tendenziellen Knochenabbau rückgeschlossen werden.

2. Bei den Versuchstieren, die mit Zoledronat behandelt wurden, zeigten sich in der histomorphometrischen Untersuchung Veränderungen bezüglich der Knochenfläche im Vergleich der Versuchsgruppen VG I und VG II zueinander und im Vergleich zur nicht mit Zoledronat behandelten Kontrollgruppe KG.
 - a. In VG I ist das Knochenvolumen innerhalb der definierten Auswertungsfläche nach Bisphosphonattherapie geringer als im Vergleich zur VG II und zur KG.
 - b. In VG II ist das Knochenvolumen ähnlich dem der Kontrollgruppe KG.
 - c. In VG II kam es bei den gemessenen Parametern zur Erholung gegenüber VG I.

5 Zusammenfassung

Bisphosphonate stellen heute bei der Behandlung verschiedener Erkrankungen des Knochenstoffwechsels wie Osteoporose oder Morbus Paget, aber auch bei malignen Karzinomentitäten wie Lungen-, Mamma- oder Prostatakarzinomen das therapeutische Mittel der Wahl dar.

In den letzten Jahren häufen sich Berichte über das Auftreten von Knochennekrosen ausschließlich im Kieferbereich bei Patienten, die 2-3 Jahre zuvor mit einer Zoledronattherapie behandelt wurden.

Bis heute sind Fragen bezüglich der genauen Pathogenese bzw. deren molekulare Grundlagen nicht befriedigend erklärt.

Bisherige Studien haben bereits Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen, vor allem an Kleintiermodellen, beschrieben.

Das Göttinger Minischwein eignet sich auf Grund seiner dem menschlichen Organismus sehr ähnlichen physiologischen Eigenschaften gut als Großtiermodell zur Untersuchung bisphosphonat-induzierter Kiefernekrosen.

In der hier vorliegenden Studie wurden 15 Göttinger Minischweine randomisiert in zwei Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Zu Beginn wurden bei allen Tieren in einer ersten Operation Knochenbiopsien des Unterkiefers und des Beckenkamms genommen. Weiterhin wurden jeweils 3 Prämolaren im II. und III. Quadranten gezogen und ebenfalls Knochenbiopsien vom Alveolarknochen des Ober- und Unterkiefers entnommen. Ab dem 3. Versuchsmonat bekamen die Tiere der Versuchsgruppen 6 bzw. 7 Monate lang 1 mal monatlich bis zum Versuchsabschluss eine Zoledronatinfusion (5,9 mg Zolendronic acid in 5 ml sterilisiertem Wasser gelöst und mit 100 ml 0,9 NaOCl verdünnt) via Ohrvenenzugang infundiert.

Im 6. Versuchsmonat wurden in einer zweiten Operation erneut Knochenbiopsien aus Mandibularknochen und Beckenkammknochen entnommen. Diesmal wurden Prämolaren im I. und IV. Quadranten extrahiert und Knochenbiopsien aus den entsprechenden Regionen genommen.

Nach dem 8. bzw. 9. Versuchsmonat erfolgte die letzte Operation, auch hier wurden Knochenbiopsien des Mandibularknochens und des Beckenkamms genommen. Die Knochenbiopsien aus den verschiedenen Regionen wurden molekularbiologisch aufbereitet und mittels qrt-PCR auf die RANKL-Expression untersucht.

Weiterhin wurden aus dem direkt nach der Euthanasie entnommenen Mandibularknochen Dünnschliffpräparate mit einer Färbung nach Smith und Karagianes angefertigt und histomorphometrisch bezüglich der Knochenfläche in einer festgelegten Untersuchungsfläche untersucht.

Ein statistischer Vergleich der Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe mittels Mann-Whitney-U-Test wurde in beiden Versuchsteilen durchgeführt.

Die rt-PCR zeigt eine tendenzielle, zumindest vorübergehende Zunahme der Expression von RANKL in allen untersuchten Entnahmeregionen außer im Unterkieferalveolarknochen der Versuchstiere. So sank die RANKL-Expression im Mandibularknochen und im Unterkieferalveolarknochen am Ende des jeweiligen Untersuchungszeitraumes wieder auf das Ausgangsniveau.

Ein signifikanter Unterschied bezüglich der RANKL-Expression konnte lediglich im Unterkieferalveolarknochen beim Vergleich der KG mit der VG II nachgewiesen werden.

Die histomorphometrische Untersuchung zeigte eine leichte Abnahme der Knochenfläche in VG I im Vergleich mit der KG. Der Vergleich der KG mit der VG II hingegen zeigte mehr Knochenfläche in der VG II. Bezüglich der histomorphometrischen Auswertung des UK konnte ein ähnliches, wenn auch weniger deutliches Ergebnis gezeigt werden.

Ein signifikanter Unterschied konnte nur beim Vergleich der KG mit der VG I festgestellt werden.

6 Literaturverzeichnis

Alexandersen P, Peris P, Guañabens N, Byrjalsen I, Alvarez L, Solberg H, Cloos PA (2005): Non-isomerized C-telopeptide fragments are highly sensitive markers for monitoring disease activity and treatment efficacy in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 20, 588–595

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L (1997): A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175–179

Bagan JV, Jiménez Y, Gómez D, Sirera R, Poveda R, Scully C (2008): Collagen telopeptide (serum CTX) and its relationship with the size and number of lesions in osteonecrosis of the jaws in cancer patients on intravenous bisphosphonates. *Oral Oncol* 44, 1088–1089

Bähr J, Stoll P, Bach G (2013): Bisphosphonattherapie und Osteonekrose des Kiefers. *Implantologie Journal* 17, 30–36

Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, Koutsoukou V, Gika D, Anagnostopoulos A, Papadimitriou C et al. (2005): Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 23, 8580–8587

Baron R, Saffar JL, Duflet-Vignery A (1977): Alveolar bone remodelling in the rat: normal status and effects of PTX and PTH on the remodelling sequence and the osteoclastic pool. *Calcif Tissue Res* 22, 502–504

Bartels F: Histomorphometrische Untersuchungen der Knochenstruktur am ovariectomierten Göttinger Minischwein zur Etablierung eines Großtiermodells zur Simulation der postmenopausalen Osteoporose. *Med. Diss. Göttingen* 2011

Bartl R: Anti-Osteoporotika: Osteologische Grundlagen, Pharmakologie und klinische Anwendung. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart* 2006

Bartl R, Bartl C: Osteoporose-Manual Diagnostik, Prävention und Therapie. *Springer, Berlin* 2004

Bartl R, Frisch B: Das Bisphosphonat-Manual: Wirkungen - Indikationen - Strategien - Trends. *Blackwell-Wissenschaftsverlag, Berlin* 2001

Bayram H, Kenar H, Taşar F, Hasırcı V (2013): Effect of low level laser therapy and zoledronate on the viability and ALP activity of Saos-2 cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 42, 140–146

Böcker W: Pathologie. 5. Auflage; Urban & Fischer in Elsevier, München 2012

Body J-J (2003): Effectiveness and cost of bisphosphonate therapy in tumor bone disease. *Cancer* 97, 859–865

Bruhn HD, Armstrong V (Hrsg.) (2008): Labormedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte, Pathophysiologie und Klinik. 2. Auflage; Schattauer, Stuttgart 2008

Bruhn HD, Junker R, Schäfer H, Schreiber S: Labormedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte, Pathophysiologie und Klinik (Onkologie). 3. Auflage; Schattauer, Stuttgart 2011

- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL et al. (1998): osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12, 1260–1268
- Buschmann C, Knoll A: Quantitative Real-time PCR: Modul 0004B, SS 2011; o. Verl., o. O. 2011
- Cankaya M, Cizmeci Şenel F, Kadioglu Duman M, Muci E, Dayisoylu EH, Balaban F (2013): The effects of chronic zoledronate usage on the jaw and long bones evaluated using RANKL and osteoprotegerin levels in an animal model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 42, 1134–1139
- Chan HL, McCauley LK (2013): Parathyroid hormone applications in the craniofacial skeleton. *J Dent Res* 92, 18–25
- Dannemann C, Zwahlen R, Grätz KW (2006): Clinical experiences with bisphosphonate induced osteochemonecrosis of the jaws. *Swiss Med Wkly* 136, 504–509
- Davidson MK, Lindsey JR, Davis JK (1987): Requirements and selection of an animal model. *Isr J Med Sci* 23, 551–555
- Delling G, Hahn M, Bonse U, Busch F, Günnewig O, Beckmann F, Uebbing H, Graeff W (1995): Neue Möglichkeiten der Strukturanalyse von Knochenbiopsien bei Anwendung der Mikrocomputertomographie (μ CT). *Pathologie* 16, 342–347
- Dietel M, Suttrop N, Zeitz† M (Hrsg.) (2012): *Harrisons innere Medizin*. 18. Auflage; ABW-Wissenschaftsverlag, Berlin 2012
- Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W (1999): Mikro-CT. Technologie und Applikationen zur Erfassung von Knochenarchitektur. *Radiologe* 39, 203–212
- Fernández M, Pino AM, Figueroa P, Rodríguez JP (2010): The increased expression of receptor activator of nuclear-kappaB ligand (RANKL) of multiple myeloma bone marrow stromal cells is inhibited by the bisphosphonate ibandronate. *J Cell Biochem* 111, 130–137
- Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, Clezardin P (2002): Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 62, 6538–6544
- Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S: *Pharmakologie & Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Springer, Berlin 2012
- Ganten D, Ruckpaul K, Gay S, Kalden JR: *Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen (Molekulare Medizin)*. Springer, Berlin 2003
- Gaus W, Muche R: *Medizinische Statistik: Angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe*. Schattauer, Stuttgart 2014
- Graefe K-H, Lutz W, Bönisch H: *Pharmakologie und Toxikologie (Duale Reihe)*. 1. Auflage; Thieme, Stuttgart 2011
- Grötz KA: Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose (BP-ONJ): Risikoeinschätzung und therapeutische Relevanz (CME 2009). Thieme, Stuttgart 2009

- Harper RP, Fung E (2007): Resolution of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the mandible: possible application for intermittent low-dose parathyroid hormone [rhPTH(1-34)]. *J Oral Maxillofac Surg* 65, 573–580
- Heaney RP (1996): Bone mass, nutrition, and other lifestyle factors. *Nutr Rev* 54, 10
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986–994
- Helm NB, Padala S, Beck FM, D'Atri AM, Huja SS (2010): Short-term zoledronic acid reduces trabecular bone remodeling in dogs. *Eur J Oral Sci* 118, 460–465
- Hillebrand RS: Regulation von Connexinen als Gap-Junction-Strukturprotein in der sequenziellen Karzinogenese des DMBA-induzierten Wangentaschenkarzinoms des Hamsters. Med. Diss. Göttingen 2013
- Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, Nooka A, Sayegh G, Guarneri V, Desrouleaux K et al. (2008): Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 23, 826–836
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7276–7280
- Holzapfel B, Wickert L (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol unserer Zeit* 37, 120–126
- Hughes HC, Lang CM (1978): Basic principles in selecting animal species for research projects. *Clin Toxicol* 13, 611–621
- Junqueira LCU, Carneiro J, Kelley RO, Gratzl M: Histologie (Springer-Lehrbuch). 5. Auflage; Springer, Berlin 2002
- Kaibuchi N, Iwata T, Yamato M, Okano T, Ando T (2016): Multipotent mesenchymal stromal cell sheet therapy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a rat model. *Acta Biomater* 42, 400–410
- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner Res* 15, 175–191
- Kavanagh KL, Guo K, Dunford JE, Wu X, Knapp S, Ebetino FH, Rogers MJ, Russell R, Graham G, Oppermann U (2006): The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 7829–7834
- Keck A-V, Pecherstorfer M (2003): Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen. *J Miner Stoffwechs* 10, 6–11
- Killion KH, Wickersham RM: Drug facts and comparisons. Ohio State University, New York 2006
- Koch FP, Merkel C, Ziebart T, Smeets R, Walter C, Al-Nawas B (2010): Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. *Clin Oral Investig* 16, 79–86
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveiras-Santos AJ, Van G, Itie A et al. (1999): OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315–323

- Krauth M-T, Fügl A, Gruber R (2008): Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrosen des Kieferknochens. *Wien Klin Wochenschr* 120, 467–476
- Kunchur R, Need A, Hughes T, Goss A (2009): Clinical investigation of C-terminal cross-linking telopeptide test in prevention and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 67, 1167–1173
- Kuwahara M, Suzuki A, Tsutsumi H, Tanigawa M, Tsubone H, Sugano S (1999): Power spectral analysis of heart rate variability for assessment of diurnal variation of autonomic nervous activity in miniature swine. *Lab Anim Sci* 49, 202–208
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S et al. (1998): Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165–176
- Larsen MO, Rolin B (2004): Use of the Göttingen minipig as a model of diabetes, with special focus on type 1 diabetes research. *ILAR J* 45, 303–313
- Lau AN, Adachi JD (2009): Resolution of osteonecrosis of the jaw after teriparatide [recombinant human PTH-(1-34)] therapy. *J Rheumatol Suppl* 36, 1835–1837
- Lee J-J, Cheng S-J, Jeng J-H, Chiang C-P, Lau H-P, Kok S-H (2011): Successful treatment of advanced bisphosphonate-related osteonecrosis of the mandible with adjunctive teriparatide therapy. *Head Neck* 33, 1366–1371
- Lehrer S, Montazem A, Ramanathan L, Pessin-Minsley M, Pfail J, Stock RG, Kogan R (2008): Normal serum bone markers in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106, 389–391
- Lesky T: In vitro Differenzierung von Monozyten der Zelllinie RAW 264.7 zu Osteoklasten, deren Charakterisierung und Wechselwirkung mit Osteoblasten. Med. Diss. Dresden 2005
- Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G et al. (2000): RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1566–1571
- Lin JH (1996): Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 18, 75–85
- Lüllmann H, Mohr K, Wehling M: *Pharmakologie und Toxikologie*. 15. komplett überarbeitete Auflage; Thieme, Stuttgart [u.a.] 2003
- Lüllmann-Rauch R: *Histologie*. Thieme, Stuttgart 2003
- Mahl JA, Vogel BE, Court M, Kolopp M, Roman D, Nogués V (2006): The minipig in dermatotoxicology: methods and challenges. *Exp Toxicol Pathol* 57, 341–345
- Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM (2000): Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 275, 20959–20962
- Martini G, Gennari L, Merlotti D, Salvadori S, Franci MB, Campagna S, Avanzati A, Paola V de, Valleggi F, Nuti R (2007): Serum OPG and RANKL levels before and after intravenous bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. *Bone* 40, 457–463
- Marx RE (2003): Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61, 1115–1117

Meuer SC, Wittwer C, Nakagawara K: Rapid cycle real-time PCR: Methods and applications. Springer, Berlin, New York 2001

Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, Stills HF, Jankowsky ML, Ebert DC, Danielsen CC, Søgaard CH, Franks AF, Stevens ML (1993): Evaluation of the skeletal effects of combined mild dietary calcium restriction and ovariectomy in Sinclair S-1 minipigs: a pilot study. *Bone Miner Res* 8, 1311–1321

Mullis KB, Ferré F, Gibbs R: The Polymerase chain reaction. Birkhäuser, Boston 1994

Mundy GR (2002): Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2, 584–593

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M: Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2001

Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC (1998): Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J* 18, 118–123

Nishida S, Tsubaki M, Hoshino M, Namimatsu A, Uji H, Yoshioka S, Tanimori Y, Yanae M, Iwaki M, Irimajiri K (2005): Nitrogen-containing bisphosphonate, YM529/ONO-5920 (a novel minodronic acid), inhibits RANKL expression in a cultured bone marrow stromal cell line ST2. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 91–97

Novartis Pharmaceuticals Corporation (2016): Zometa (Produktinformation). <https://www.novartis oncology.com/news/product-portfolio/zometa>

Olson KB, Hellie CM, Pienta KJ (2005): Osteonecrosis of jaw in patient with hormone-refractory prostate cancer treated with zoledronic acid. *Urology* 66, 658

Pastor-Zuazaga D, Garatea-Crelgo J, Martino-Gorbea R, Etayo-Pérez A, Sebastián-López C (2006): Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonates. Report of three cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11, 9

Pautke C, Kreutzer K, Weitz J, Knodler M, Munzel D, Wexel G, Otto S, Hapfelmeier A, Sturzenbaum S, Tischer T (2012): Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: A minipig large animal model. *Bone* 51, 592–599

Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45

Pfaffl MW (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 01, 92–95

Pogrel MA (2004): Bisphosphonates and bone necrosis. *J Oral Maxillofac Surg* 62, 391–392

Pozzi S, Marcheselli R, Sacchi S, Baldini L, Angrilli F, Pennese E, Quarta G, Stelitano C, Caparotti G, Luminari S et al. (2007): Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review of 35 cases and an evaluation of its frequency in multiple myeloma patients. *Leuk Lymphoma* 48, 56–64

Reif K: Untersuchung des Knochenstoffwechsels anhand der Knochenmarker knochenspezifische alkalische Phosphatase und Pyridinolin am intakten und ovariohysterektomierten Osteoporosemodell Minipig. Vet. Diss. München 2007

Ripperger JM: Ursache und Verlauf der Bisphosphonat assoziierten Kiefernekrose. Med. Diss. Tübingen 2010

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997): Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245, 154–160

Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ (2006): Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res.* 12, 6222

Rosen HN, Moses AC, Garber J, Iloputaife ID, Ross DS, Lee SL, Greenspan SL (2000): Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif Tissue Int* 66, 100–103

Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B (2009): American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. *Aust Endod J* 35, 119–130

Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL (2004): Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 62, 527–534

Russell R, Rogers M (1999): Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 25, 97–106

Saad F (2006): Bone-directed treatments for prostate cancer. *Hematol. Oncol Clin North Am* 20, 947–963

Santini D, Vincenzi B, Avvisati G, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, Salerno A, Denaro V, Tonini G (2002): Pamidronate induces modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 8, 1080–1084

Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, Avvisati G, Massacesi C, Battistoni F, Gavasci M, Rocci L, Tirindelli MC, Altomare V et al. (2003): Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 9, 2893–2897

Schiebler TH, Arnold G: Anatomie: Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen (Springer-Lehrbuch). 7. Auflage; Springer, Berlin 1997

Schliephake H, van den Berghe P, Neukam FW (1991): Osseointegration of titanium fixtures in onlay grafting procedures with autogenous bone and hydroxylapatite. An experimental histometric study. *Clin Oral Implants Res* 2, 56–61

Schlittenbauer T: Identifikation genetischer Risikofaktoren bei Patienten mit bisphosphonat-assoziierten Kieferknochennekrosen am Beispiel von HLA-DRB1 und HLA-DQB1. Med. Diss. Erlangen 2012

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW (2000): Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 285, 194–204

Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R (1995): Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl* 4, 234–238

- Schwartz HC (2004): Osteonecrosis and bisphosphonates: correlation versus causation. *J Oral Maxillofac Surg* 62, 763–764
- Scriba GKE (2000): Bisphosphonate im Überblick. *Pharm Unserer Zeit* 29, 50–56
- Senel FC, Kadioglu Duman M, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S, Gunhan O (2010): Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109, 385–391
- Sharma D, Hamlet S, Petcu E, Ivanovski S (2013): Animal models for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws- an appraisal. *Oral Dis* 19, 747–754
- Sievers N: Auswirkung von Bisphosphonaten auf die Expression von Osteoprotegerin (OPG) und Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) in Osteoblastenkulturen aus Unterkiefer und Becken: Eine Pilotstudie am Hausschwein. Med. Diss. Göttingen 2012
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T et al. (1997): Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309–319
- Smith LG, Karagianes MT (1974): Histological preparation of bone to study ingrowth into implanted materials. *Calcif Tissue Res* 14, 333–337
- Soltau J, Dreves J (2004): The role of bisphosphonates in oncology. *Drugs Fut* 29, 911
- Stöhrer M: Aktuelle Aspekte der histomorphometrischen, histologischen und mikroradiographischen Beurteilung des Knochenwachstums nach Applikation des rekombinanten Proteins BMP-2 versus Nukleinsäuretransfers: Eine tierexperimentelle Studie. Med. Diss. München 2009
- Subramanian G, Cohen HV, Quek SYP (2011): A model for the pathogenesis of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw and teriparatide's potential role in its resolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 112, 744–753
- Svendsen O (2006): The minipig in toxicology. *Exp Toxicol Pathol* 57, 335–339
- Tatli U, Ustün Y, Kürkçü M, Benlidayı ME (2014): Effects of zoledronic acid on physiologic bone remodeling of condylar part of TMJ: a radiologic and histomorphometric examination in rabbits. *ScientificWorldJournal* 14, 649026
- Thakkar SG, Isada C, Smith J, Karam MA, Reed J, Tomford JW, Englund K, Richmond M, Licata A, Hatch C et al. (2006): Jaw complications associated with bisphosphonate use in patients with plasma cell dyscrasias. *Med Oncol* 23, 51–56
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17, 125
- Thomsen JS, Laib A, Koller B, Prohaska S, Mosekilde L, Gowin W (2005): Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *J Microsc* 218, 171–179
- Tosi P, Zamagni E, Cangini D, Tacchetti P, Di Raimondo F, Catalano L, D'Arco A, Ronconi S, Cellini C, Offidani M et al. (2006): Osteonecrosis of the jaws in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with zoledronic acid and thalidomide-dexamethasone. *Blood* 108, 3951–3952

Turner AS (2001): Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 1, 66–81

Uchiyama T, Tanizawa T, Muramatsu H, Endo N, Takahashi HE, Hara T (1997): A morphometric comparison of trabecular structure of human ilium between microcomputed tomography and conventional histomorphometry. *Calcif Tissue Int* 61, 493–498

Vannucchi AM, Ficarra G, Antonioli E, Bosi A (2005): Osteonecrosis of the jaw associated with zoledronate therapy in a patient with multiple myeloma. *Br J Haematol* 128, 738

Wang J, Wang Y, Wang H, Hao X, Wu Y, Guo J (2014): Selection of Reference Genes for Gene Expression Studies in Porcine Whole Blood and Peripheral Blood Mononuclear Cells under Polyinosinic:Polycytidylic Acid Stimulation. *Asian-Australas J Anim Sci* 27, 471–478

Wei C, Rzany B (Hrsg.) (2008): *Basiswissen Medizinische Statistik*. 4. Auflage; Springer, Berlin 2008

Weitzman R, Sauter N, Eriksen EF, Tarassoff PG, Lacerna LV, Dias R, Altmeyer A, Csermak-Renner K, McGrath L, Lantwicki L et al. (2007): Critical review: updated recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in cancer patients--May 2006. *Crit Rev Oncol Hematol* 62, 148–152

Wimalawansa SJ (2008): Insight into bisphosphonate-associated osteomyelitis of the jaw: pathophysiology, mechanisms and clinical management. *Expert Opin Drug Saf* 7, 491–512

Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, Choi Y (1997): TRANCE (tumor necrosis factor TNF-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 186, 2075–2080

Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Crooke LR (1989): Endocrine and pharmacological suppressors of bone turnover protect against osteopenia in ovariectomized rats. *Endocrinology* 125, 810–816

Yang H, Pan H, Yu F, Chen K, Shang G, Xu Y (2015): A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 5161–5167

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A et al. (1998): Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3597–3602

7 Anhang

7.1 Statistische Auswertung der RANKL- Expression KG / VG I

Mann-Whitney U-Test (mit Stetigkeitskorrektur) (Mittelwert in Minis ONJ Gene)										
Nach Var.: Zometa										
Markierte Tests signifikant ab p <.05000										
Ausschlussbedingung: 1=2										
Variable	Rgsumme Gruppe1	Rgsumme Gruppe2	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Güt. N Gruppe1	Güt. N Gruppe2	2* eins. exakt p
OP1_AOK_RANKL	30,00000	25,00000	10,00000	0,41779	0,676104	0,41779	0,676104	5	5	0,690476
OP2_AOK_RANKL	20,00000	35,00000	5,00000	-1,46225	0,143673	-1,46225	0,143673	5	5	0,150794
OP2_AUK_RANKL	33,00000	22,00000	7,00000	1,04447	0,296271	1,04447	0,296271	5	5	0,309524
OP1_AUK_RANKL	20,00000	35,00000	5,00000	-1,46225	0,143673	-1,46225	0,143673	5	5	0,150794
OP1_BK_RANKL	20,00000	16,00000	6,00000	0,43301	0,665006	0,43301	0,665006	4	4	0,685714
OP2_BK_RANKL	26,00000	29,00000	11,00000	-0,20889	0,834532	-0,20889	0,834532	5	5	0,841270
OP3_BK_RANKL	25,00000	30,00000	10,00000	-0,41779	0,676104	-0,41779	0,676104	5	5	0,690476
OP1_UK_RANKL	22,00000	33,00000	7,00000	-1,04447	0,296271	-1,04447	0,296271	5	5	0,309524
OP2_UK_RANKL	26,00000	29,00000	11,00000	-0,20889	0,834532	-0,20889	0,834532	5	5	0,841270
OP3_UK_RANKL	32,00000	23,00000	8,00000	0,83557	0,403396	0,83557	0,403396	5	5	0,420635

KG / VG II

Mann-Whitney U-Test (mit Stetigkeitskorrektur) (Mittelwert in Minis ONJ Gene)										
Nach Var.: Zometa										
Markierte Tests signifikant ab p <.05000										
Ausschlussbedingung: 2=1										
Variable	Rgsumme Gruppe1	Rgsumme Gruppe2	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Güt. N Gruppe1	Güt. N Gruppe2	2* eins. exakt p
OP1_AOK_RANKL	28,00000	27,00000	12,00000	0,00000	1,000000	0,00000	1,000000	5	5	1,000000
OP2_AOK_RANKL	22,00000	23,00000	7,00000	-0,61237	0,540292	-0,61237	0,540292	5	4	0,555556
OP2_AUK_RANKL	35,00000	10,00000	0,00000	2,32702	0,019965	2,32702	0,019965	5	4	0,015873
OP1_AUK_RANKL	19,00000	36,00000	4,00000	-1,67115	0,094694	-1,67115	0,094694	5	5	0,095238
OP1_BK_RANKL	12,00000	33,00000	2,00000	-1,83712	0,066193	-1,83712	0,066193	4	5	0,063492
OP2_BK_RANKL	22,00000	23,00000	7,00000	-0,61237	0,540292	-0,61237	0,540292	5	4	0,555556
OP3_BK_RANKL	23,00000	22,00000	8,00000	-0,36742	0,713303	-0,36742	0,713303	5	4	0,730159
OP1_UK_RANKL	23,00000	22,00000	8,00000	-0,36742	0,713303	-0,36742	0,713303	5	4	0,730159
OP2_UK_RANKL	22,00000	23,00000	7,00000	-0,61237	0,540292	-0,61237	0,540292	5	4	0,555556
OP3_UK_RANKL	27,00000	18,00000	8,00000	0,36742	0,713303	0,36742	0,713303	5	4	0,730159

Deskriptive Statistik

Aggregierte Ergebnisse							
Deskriptive Statistik (Tabelle in Minis ONJ Gene_def.stw)							
Variable	Zometa	Güt. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Stdabw.
OP1_AOK_RANKL	0	5	0,342625	0,239807	-0,310076	1,154902	0,571226
OP1_AOK_RANKL	1	5	0,153797	-0,048910	-0,358400	0,820709	0,550394
OP1_AOK_RANKL	2	5	-1,91479	0,350185	-11,5998	1,106348	5,435968

Aggregierte Ergebnisse							
Deskriptive Statistik (Tabelle in Minis ONJ Gene_def.stw)							
Variable	Zometa	Güt. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Stdabw.
OP2_AOK_RANKL	0	5	-0,736736	-0,806258	-2,02087	0,365277	0,925709
OP2_AOK_RANKL	1	5	0,594341	0,494946	-1,51708	2,289742	1,491073
OP2_AOK_RANKL	2	4	-0,455872	0,106146	-2,98882	0,953038	1,853587

Aggregierte Ergebnisse							
Deskriptive Statistik (Tabelle in Minis ONJ Gene_def.stw)							
Variable	Zometa	Güt. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Stdabw.
OP1_AUK_RANKL	0	5	-0,432035	-0,250127	-1,42647	0,069990	0,623749
OP1_AUK_RANKL	1	5	0,296279	0,214884	-0,323609	1,278734	0,653738
OP1_AUK_RANKL	2	5	0,395508	0,631245	-1,00672	1,038567	0,822426

Anhang

Aggregierte Ergebnisse							
Deskriptive Statistik (Tabelle in Minis ONJ Gene_def.stw)							
Variable	Zometa	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Stdabw.
OP2_AUK_RANKL	0	5	0,542612	0,463930	-0,449602	1,871745	0,846190
OP2_AUK_RANKL	1	5	-0,050946	-0,154717	-1,29547	1,967845	1,256212
OP2_AUK_RANKL	2	4	-0,889760	-0,880431	-1,15500	-0,643182	0,210612

Aggregierte Ergebnisse							
Deskriptive Statistik (Tabelle in Minis ONJ Gene_def.stw)							
Variable	Zometa	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Stdabw.
OP1_BK_RANKL	0	4	-1,28511	-1,05255	-3,16505	0,129703	1,617984
OP1_BK_RANKL	1	4	-1,42679	-1,11705	-3,30390	-0,169174	1,392297
OP1_BK_RANKL	2	5	0,518420	0,327597	-0,187681	1,290531	0,583672

Aggregierte Ergebnisse							
Deskriptive Statistik (Tabelle in Minis ONJ Gene_def.stw)							
Variable	Zometa	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Stdabw.
OP2_BK_RANKL	0	5	-2,84925	-3,03717	-4,43753	-1,02896	1,377344
OP2_BK_RANKL	1	5	-2,79611	-2,88245	-4,31095	-0,664111	1,338056
OP2_BK_RANKL	2	4	-2,29520	-2,08287	-3,52503	-1,49004	0,876974

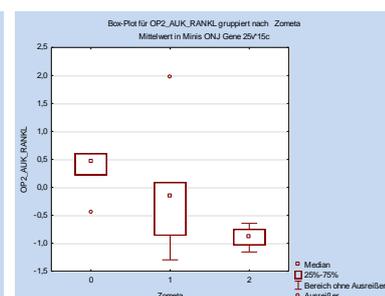
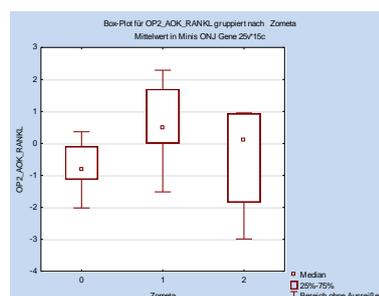
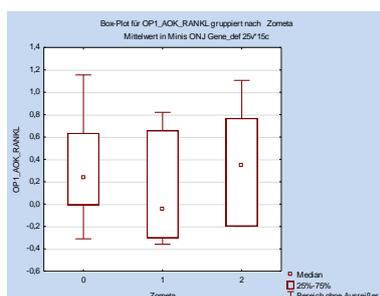
Aggregierte Ergebnisse							
Deskriptive Statistik (Tabelle in Minis ONJ Gene_def.stw)							
Variable	Zometa	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Stdabw.
OP3_BK_RANKL	0	5	-2,02414	-1,76945	-3,72313	-0,948729	1,171598
OP3_BK_RANKL	1	5	-1,13779	-1,86832	-2,95733	1,016701	1,648203
OP3_BK_RANKL	2	4	-1,17765	-1,64617	-2,61684	1,198579	1,697681

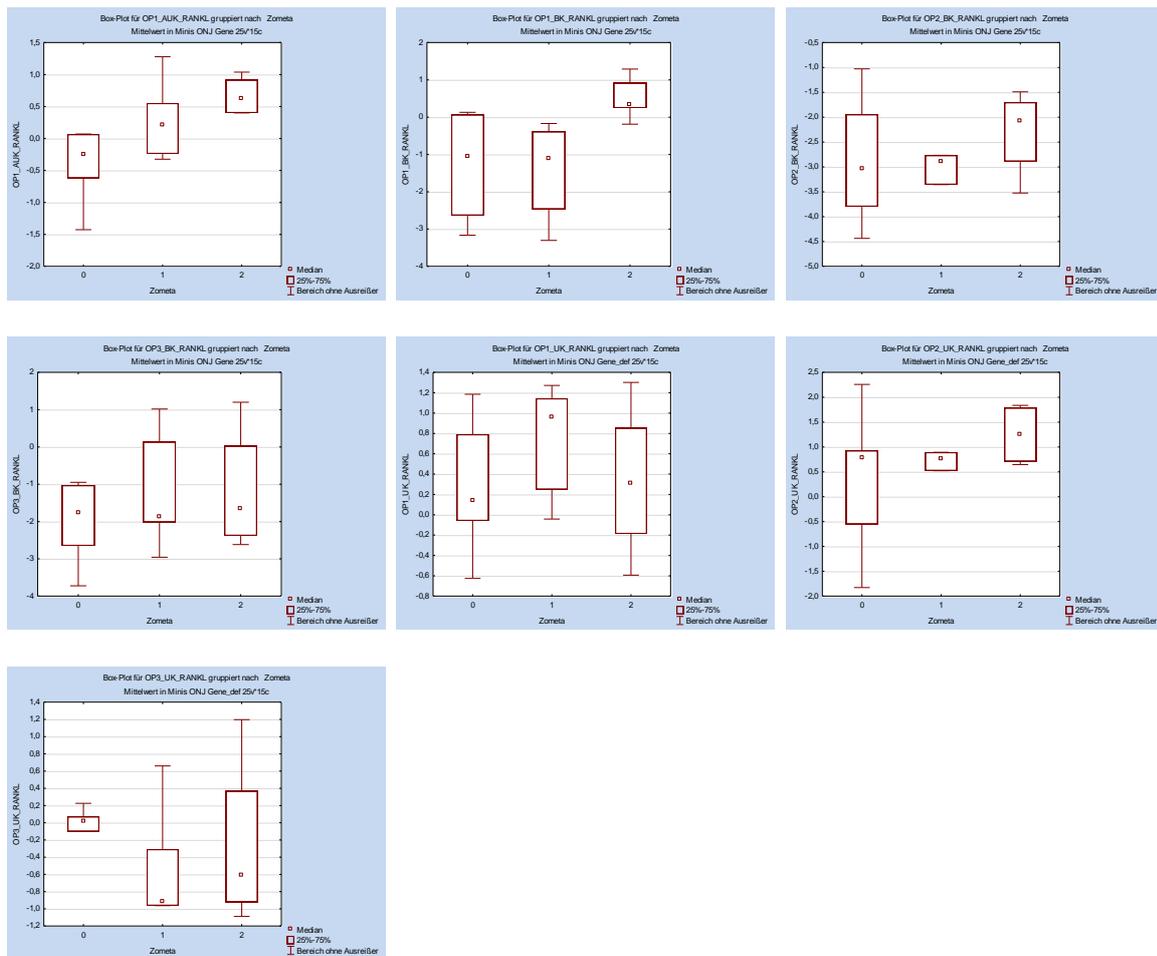
Aggregierte Ergebnisse							
Deskriptive Statistik (Tabelle in Minis ONJ Gene_def.stw)							
Variable	Zometa	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Stdabw.
OP1_UK_RANKL	0	5	0,285722	0,138225	-0,625811	1,184951	0,713253
OP1_UK_RANKL	1	5	0,717427	0,964652	-0,042291	1,271562	0,580012
OP1_UK_RANKL	2	4	0,331887	0,310028	-0,593537	1,301027	0,777494

Aggregierte Ergebnisse							
Deskriptive Statistik (Tabelle in Minis ONJ Gene_def.stw)							
Variable	Zometa	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Stdabw.
OP2_UK_RANKL	0	5	0,316205	0,775722	-1,82767	2,257609	1,557454
OP2_UK_RANKL	1	5	0,875279	0,762617	-0,170787	2,369719	0,930758
OP2_UK_RANKL	2	4	1,248855	1,256887	0,644411	1,837238	0,624340

Aggregierte Ergebnisse							
Deskriptive Statistik (Tabelle in Minis ONJ Gene_def.stw)							
Variable	Zometa	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Stdabw.
OP3_UK_RANKL	0	5	-0,192849	0,022388	-1,18133	0,225027	0,564751
OP3_UK_RANKL	1	5	-0,706695	-0,919564	-2,00243	0,659841	0,976714
OP3_UK_RANKL	2	4	-0,277270	-0,608680	-1,08857	1,196849	1,015328

Boxplots





7.2 Statistische Auswertung der histomorphometrischen Analyse

KG / VG I

Mann-Whitney U-Test (mit Steigkeitskorrektur) (Tabelle 1 in Histomorphometrie_it Mittelwerten)										
Nach Var.: Gruppe										
Markierte Tests signifikant ab p < .05000										
Variable	Rgsumme Gruppe1	Rgsumme Gruppe2	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Güt. N Gruppe1	Güt. N Gruppe2	2*eins. exakt p
UK Mittelwert knochenfreie Fläche (µm²)	19,00000	36,00000	4,00000	-1,67115	0,094694	-1,67115	0,094694	5	5	0,095238
UK Mittelwert knochenfreie Fläche %	17,00000	38,00000	2,00000	-2,08893	0,036715	-2,08893	0,036715	5	5	0,031746
Mittelwerte UK Knochen (µm²)	37,00000	18,00000	3,00000	1,88004	0,060104	1,88004	0,060104	5	5	0,055556
Mittelwerte UK Knochen %	38,00000	17,00000	2,00000	2,08893	0,036715	2,08893	0,036715	5	5	0,031746
OK Mittelwert Knochenfreie Fläche (µm²)	22,00000	33,00000	7,00000	-1,04447	0,296271	-1,04447	0,296271	5	5	0,309524
OK Mittelwert Knochenfreie Fläche %	22,00000	33,00000	7,00000	-1,04447	0,296271	-1,04447	0,296271	5	5	0,309524
OK Mittelwert Knochen (µm²)	33,00000	22,00000	7,00000	1,04447	0,296271	1,04447	0,296271	5	5	0,309524
OK Mittelwert Knochen %	33,00000	22,00000	7,00000	1,04447	0,296271	1,04447	0,296271	5	5	0,309524

KG / VG II

Mann-Whitney U-Test (mit Steigkeitskorrektur) (Tabelle 1 in Histomorphometrie_it Mittelwerten)										
Nach Var.: Gruppe										
Markierte Tests signifikant ab p < .05000										
Variable	Rgsumme Gruppe1	Rgsumme Gruppe2	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Güt. N Gruppe1	Güt. N Gruppe2	2*eins. exakt p
UK Mittelwert knochenfreie Fläche (µm²)	23,00000	22,00000	8,00000	-0,367423	0,713303	-0,367423	0,713303	5	4	0,730159
UK Mittelwert knochenfreie Fläche %	24,00000	21,00000	9,00000	-0,122474	0,902523	-0,122474	0,902523	5	4	0,904762
Mittelwerte UK Knochen (µm²)	25,00000	20,00000	10,00000	0,122474	0,902523	0,122474	0,902523	5	4	1,000000
Mittelwerte UK Knochen %	26,00000	19,00000	9,00000	0,122474	0,902523	0,122474	0,902523	5	4	0,904762
OK Mittelwert Knochenfreie Fläche (µm²)	24,00000	21,00000	9,00000	-0,122474	0,902523	-0,122474	0,902523	5	4	0,904762
OK Mittelwert Knochenfreie Fläche %	24,00000	21,00000	9,00000	-0,122474	0,902523	-0,122474	0,902523	5	4	0,904762
OK Mittelwert Knochen (µm²)	26,00000	19,00000	9,00000	0,122474	0,902523	0,122474	0,902523	5	4	0,904762
OK Mittelwert Knochen %	28,00000	17,00000	7,00000	0,612372	0,540292	0,612372	0,540292	5	4	0,555556

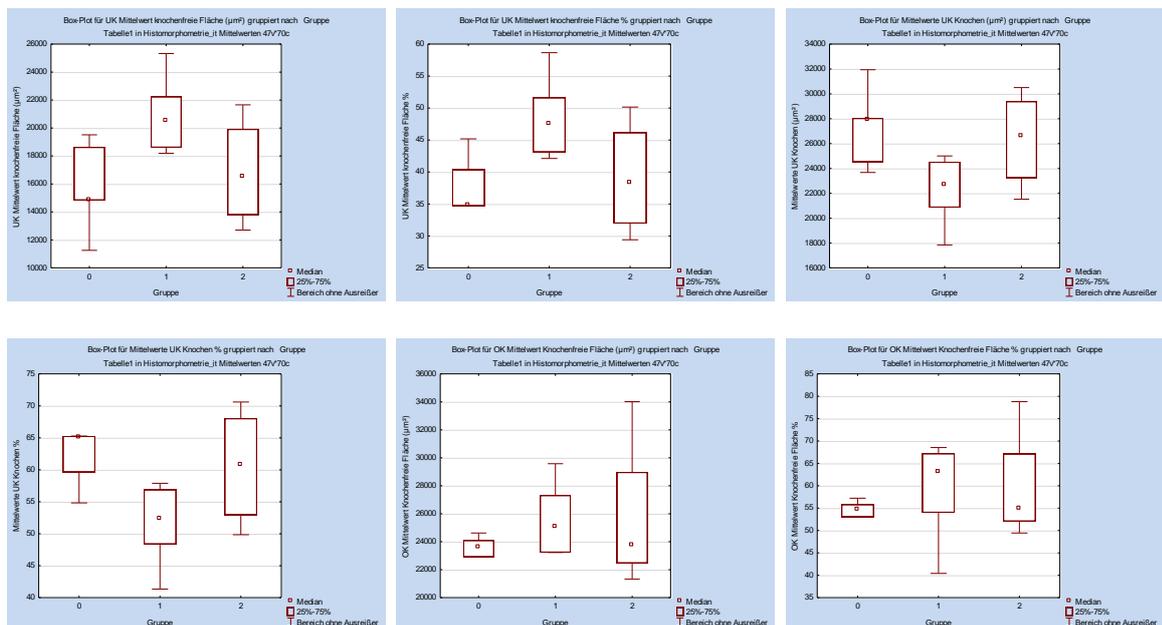
VG I / VG II

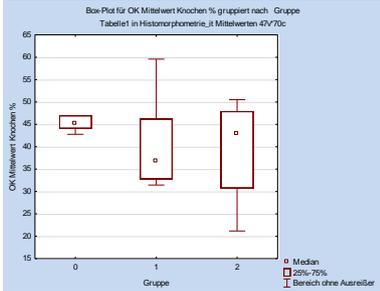
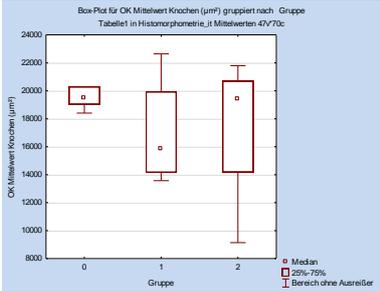
Mann-Whitney U-Test (mit Stetigkeitskorrektur) (Tabelle 1 in Histomorphometrie_it Mittelwerten)										
Nach Var.: Gruppe										
Markierte Tests signifikant ab $p < 0,05000$										
Variable	Rgsumme Gruppe1	Rgsumme Gruppe2	U	Z	p-Wert	Z kor.	p-Wert	Güt. N Gruppe1	Güt. N Gruppe2	2'eins. exakt p
UK Mittelwert knochenfreie Fläche (µm²)	31,00000	14,00000	4,00000	1,34722	0,177911	1,34722	0,177911	5	4	0,190476
UK Mittelwert knochenfreie Fläche %	31,00000	14,00000	4,00000	1,34722	0,177911	1,34722	0,177911	5	4	0,190476
Mittelwerte UK Knochen (µm²)	19,00000	26,00000	4,00000	-1,34722	0,177911	-1,34722	0,177911	5	4	0,190476
Mittelwerte UK Knochen %	20,00000	25,00000	5,00000	-1,10227	0,270345	-1,10227	0,270345	5	4	0,285714
OK Mittelwert Knochenfreie Fläche (µm²)	25,00000	20,00000	10,00000	0,12247	0,902523	0,12247	0,902523	5	4	1,000000
OK Mittelwert Knochenfreie Fläche %	25,00000	20,00000	10,00000	0,12247	0,902523	0,12247	0,902523	5	4	1,000000
OK Mittelwert Knochen (µm²)	25,00000	20,00000	10,00000	0,12247	0,902523	0,12247	0,902523	5	4	1,000000
OK Mittelwert Knochen %	25,00000	20,00000	10,00000	0,12247	0,902523	0,12247	0,902523	5	4	1,000000

Deskriptive Statistik

Variable	Aggregierte Ergebnisse						
	Deskriptive Statistik (Tabelle in Histomorphometrie_it Mittelwerten)						
	Gruppe	Güt. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Stdabw.
UK Mittelwert knochenfreie Fläche (µm²)	0	5	15828,35	14903,40	11250,97	19513,00	3326,540
UK Mittelwert knochenfreie Fläche %	0	5	36,23	34,83	26,05	45,18	7,159
Mittelwerte UK Knochen (µm²)	0	5	27224,47	27930,59	23675,33	31940,37	3288,001
Mittelwerte UK Knochen %	0	5	63,77	65,17	54,82	73,95	7,159
OK Mittelwert Knochenfreie Fläche (µm²)	0	5	22136,44	23658,04	15387,80	24622,97	3823,968
OK Mittelwert Knochenfreie Fläche %	0	5	51,37	54,80	35,98	57,22	8,740
OK Mittelwert Knochen (µm²)	0	5	20889,76	19525,22	18406,22	27191,42	3589,444
OK Mittelwert Knochen %	0	5	48,49	45,23	42,78	63,40	8,474
UK Mittelwert knochenfreie Fläche (µm²)	1	5	20980,51	20542,79	18190,08	25324,35	2918,871
UK Mittelwert knochenfreie Fläche %	1	5	48,61	47,53	42,12	58,66	6,775
Mittelwerte UK Knochen (µm²)	1	5	22182,57	22677,24	17848,42	25000,63	2926,226
Mittelwerte UK Knochen %	1	5	51,39	52,47	41,34	57,88	6,775
OK Mittelwert Knochenfreie Fläche (µm²)	1	5	24334,17	25086,44	16455,78	29580,59	5007,685
OK Mittelwert Knochenfreie Fläche %	1	5	58,68	63,25	40,41	68,53	11,687
OK Mittelwert Knochen (µm²)	1	5	17237,17	15871,99	13573,66	22641,25	3911,517
OK Mittelwert Knochen %	1	5	41,35	36,75	31,45	59,59	11,706
UK Mittelwert knochenfreie Fläche (µm²)	2	4	16865,64	16551,58	12700,87	21658,54	3912,565
UK Mittelwert knochenfreie Fläche %	2	4	39,06	38,34	29,39	50,15	9,071
Mittelwerte UK Knochen (µm²)	2	4	26319,52	26623,34	21523,92	30507,48	3925,382
Mittelwerte UK Knochen %	2	4	60,50	60,78	49,85	70,61	9,312
OK Mittelwert Knochenfreie Fläche (µm²)	2	4	25720,95	23769,52	21330,32	34014,43	5648,968
OK Mittelwert Knochenfreie Fläche %	2	4	59,59	55,05	49,45	78,80	13,080
OK Mittelwert Knochen (µm²)	2	4	17438,51	19408,42	9143,19	21793,99	5645,338
OK Mittelwert Knochen %	2	4	39,35	42,86	21,18	50,52	12,808

Boxplots





Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Franz-Josef Kramer für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die gute Betreuung.

Bei Frau Dr. med. Vera Stock bedanke ich mich herzlich für die praktische und wissenschaftliche Betreuung.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den wissenschaftlichen und technischen Mitarbeiterinnen, allen voran bei Frau Jutta Schulz, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, sowie bei Frau Sigrid Ahlborn, Frau Ute Kant, Frau Monika Hoch, Frau Antje Ahrbecker und Frau Christina Schäfer, durch deren Hilfe so manche Hürde der Laborarbeit genommen werden konnte.

Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Florian Fialka und Herrn Dr. rer. nat. Hans Joachim Rolf danke ich für die praktische Unterstützung.

Herrn PD. Dr. rer. nat. Klaus Jung und Frau Xenia Schulz aus der Abteilung für Medizinische Statistik danke ich für die kompetente Beratung.

Frau Dr. med. dent. Tilpe danke ich für die Hilfe und Unterstützung in allen Fragen rund um mein Vorhaben und unsere Freundschaft.

Einen letzten persönlichen Dank möchte ich Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Nils Lohse sagen, der mir stets echter Freund, Ratgeber, Antreiber und Vorbild war.