

**Anaboler Effekt einer intermittierenden Parathormon(1-34)-
Stimulation auf das lokale Mikromilieu während der Spätphase der
parodontalen Reparatur in einem Rattenmodell der
Zahnwurzelresorption**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Fatma Yildiz geb. Öztürk
aus Bad Oeynhausen
2010

Anfertigung mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Stefan Lossdörfer
2. Gutachter: Prof. Dr. James Deschner

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.04.2010

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie im Zentrum für Zahn-, Mund- Kieferheilkunde
des Universitätsklinikums Bonn

Direktor: Professor Dr. med. dent. A. Jäger

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1 Zahnbewegung in der Kieferorthopädie	8
1.1.1 Ätiologie und Pathogenese der Wurzelresorption	9
1.1.2 Physiologischer Reparaturvorgang von Wurzelresorptionen	10
1.2 Mögliche Beteiligung von PDL-Zellen an Reparaturvorgängen	11
1.2.1 Hormonelle Stimulierung der Parodontalligament-Zellen (PDL)	12
1.3 Biologische Wirkung von Parathormon (PTH)	13
1.3.1 Mediatoren des PTH-Effektes	14
1.3.2 Intrazelluläre Signaltransduktion	14
1.3.3 PTH und PDL	15
1.4 Das RANK/RANKL/OPG-System	16
1.5 Das RANK/RANKL/OPG im Immunsystem	18
1.6 RANK/RANKL/OPG-System im dentalen Bereich	18
1.7 Klinische Relevanz der durchgeführten Untersuchung	18
1.8 Zielsetzungen und Hypothesen der vorliegenden Studie	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Tiere	20
2.2 Methoden	20
2.2.1 Fixierung	21
2.2.2 Entkalkung	21
2.2.3 Einbettung	22
2.2.4 Schnittanfertigung	22
2.2.5 Entparaffinierung	22
2.2.6 Histologische Färbungen	22
2.2.6.1 Hämatoxylin-Eosin - (HE) Färbung	22
2.2.6.2 Enzymhistochemischer Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP)	23
2.2.7 Immunhistochemische Nachweise	23
2.2.7.1 Immunhistochemischer Nachweis von OPG	23
2.2.7.2 Immunhistochemischer Nachweis von RANKL	24
2.2.8 Spezifitätsnachweise	24
2.2.8.1 Antikörper	24
2.2.8.2 Positivkontrollen	24
2.2.8.4 Prä-Adsorptionskontrolle	25
2.2.9 Photographische Dokumentation und Auswertung der Befunde	25
2.2.10 Statistische Analyse	26
2.2.11 Liste der verwendeten Reagenzien	26
2.2.12 Liste der verwendeten Chemikalien	27
2.2.13 Liste der verwendeten Geräte und Materialien	27
3. Ergebnisse	28

3.1 Morphologie	28
3.2 Histomorphometrie	30
3.2.1 OPG	31
3.2.1.1 Ehemalige Druckzone (Zahndrittel)	31
3.2.1.2 Ehemalige Zugzone (Zahndrittel)	32
3.2.2 RANKL	33
3.2.2.1 Ehemalige Druckzone (Zahndrittel)	33
3.2.2.2 Ehemalige Zugzone / Zahndrittel	34
3.2.3 OPG/RANKL-Verhältnis	35
3.2.3.1 Ehemalige Druckzone (Zahndrittel)	35
3.2.3.2 Ehemalige Zugzone (Zahndrittel)	36
4. Diskussion	39
4.1 Allgemein	39
4.2 Überlegungen zur Methodik	39
4.3 Ergebnisdiskussion	40
4.3.1 Morphologie	41
4.3.2 Histomorphometrie	43
5. Zusammenfassung	46
6. Literaturverzeichnis	47
7. Danksagung	61
8. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
D	Dentin
DZ	Druckzone
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Äthylen-Diamin-Tetraessigsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-10	Interleukin-10
IK	interradikulärer Knochen
M-CSF	Makrophage-Colony Stimulating Factor
MMP	Matrix-Metalloproteinase
OPG	Osteoprotegerin
PDL	Parodontalligament
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathyroid Hormone related Protein
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor-kappaB
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Faktor-kappaB Ligand
TBS/BSA	Tris-hydroxy methyl aminomethane Buffered Saline solution/ Bovine Serum Albumine
TGF- β	Transforming Growth Factor-b
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-a
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
Z	Zement
ZZ	Zugzone

1. Einleitung

1.1 Zahnbewegung in der Kieferorthopädie

Durch Kraftapplikation auf einen Zahn kommt es zu einer initialen Auslenkung des Zahnes innerhalb seiner Alveole. Dies führt dazu, dass einige Teile der Wurzeln sich zum Alveolarknochen bewegen und der Desmodontalspalt sich verschmälert („Druckzone“). Die gegenüber liegenden Teile wiederum entfernen sich von der Alveolenwand und der Desmodontalspalt verbreitert sich („Zugzone“) (Thilander et al., 2000; Weiland, 2001).

Während dieser kieferorthopädisch induzierten Bewegung durchläuft ein Zahn drei Phasen: Die erste Phase beginnt mit der Kraftapplikation und endet, wenn in den Druckzonen eine maximal mögliche Kompression entsteht. In der zweiten Phase kommt die Zahnbewegung zum Stillstand und kann diese beim Menschen bis zu zwei Wochen anhalten. Aufgrund seines lichtmikroskopisch glasigen Aussehens wird diese Druckzone als hyaline Zone bezeichnet (Göz, 2000; Thilander et al., 2000).

Für die weitere Zahnbewegung ist nun eine Knochenresorption auf der Druckseite Voraussetzung. Um diese unterterminierende Resorption zu aktivieren, müssen erst knochenabbauende Zellen (Osteoklasten) aus den benachbarten Markräumen migrieren und eine weitere Zahnbewegung ermöglichen (Thilander et al., 2000; Weiland, 2001). In der dritten, posthyalinen Phase wird das hyaline Gewebe von klastischen Zellen resorbiert und die Zahnbewegung setzt erneut ein.

Parallel zur Knochenresorption treten bei kieferorthopädischen Behandlungen auch Zahn- und Wurzelresorptionen auf, welche von zahnhartsubstanzabbauenden Zellen (Odontoklasten) erzeugt werden. Odontoklasten sind sehr eng mit knochenresorbierenden Osteoklasten verwandt und differenzieren sich möglicherweise auf einer späteren Entwicklungsstufe aus diesen (Götz, 2003b). Sie besiedeln Wurzeloberflächen, deren Schutzmechanismus (Desmodont, Parodontalligament (PDL), Zement) durch zahnärztliche Maßnahmen wie z.B. kieferorthopädische Behandlung zusammengebrochen ist. Folglich führen die Odontoklasten zu entzündlichen Wurzelresorptionen (Brezniak und Wasserstein, 2002a) und gelten inzwischen als häufigste Ursache für Resorptionen in den Industrieländern (Weiland, 2001).

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese der Wurzelresorption

Die Einteilung der Wurzelresorption erfolgt entsprechend der Lokalisation, der Ätiologie sowie der Pathogenese (Benenati, 1997).

Es gibt eine interne (Graunloma internum) und eine externe Resorption. Externe Resorptionen lassen sich wiederum in drei Kategorien klassifizieren: externe Oberflächenresorption, extern entzündliche Wurzelresorption und Ersatzresorption. Nach einer extern entzündlichen Wurzelresorption kann eine Ankylose auftreten (Ne et al., 1999).

Aufgrund ihrer Ätiologie werden Wurzelresorptionen in solche pathologischen oder physiologischen Ursprungs unterteilt. Die physiologische Wurzelresorption tritt an den Milchzähnen im Rahmen des Zahnwechsels vor der Exfoliation (Hoffmann-Axthelm, 2000), die Pathologische wiederum in Folge entzündlicher parodontaler Prozesse, nach Trauma, Reimplantation von Zähnen, durch Druck impakterter Zähne bzw. Tumoren oder als unerwünschte Nebenwirkung kieferorthopädischer Behandlungsmaßnahmen auf. Außerdem ist die pathologische Wurzelresorption von der Knochendichte, chronologischem Alter, immunologischen und hormonellen Faktoren abhängig (Krishnan und Davidovitch, 2006).

Studien an Ratten und Mäusen haben bestätigt, dass die orthodontisch eingeleitete entzündliche Wurzelresorption Teil des Eliminierungsprozesses der hyalinen Zone ist (Brudvik und Rygh, 1993a, b). Als erstes besiedeln einkernige Makrophagen und fibroblastenähnliche Zellen das nekrotische Gewebe und beginnen mit der initialen Wurzelresorption mit Zellaktivierung in der Peripherie von hyalinen Zonen. Die abbauenden Zellen entfernen u.a. das Präzement von der Wurzeloberfläche, so dass das mineralisierte Zement freiliegt, und locken somit klastische Zellen oder deren Vorläufer an. Die Wurzeloberfläche direkt unter der zentralen hyalinen Zone wird später resorbiert. Zu diesem Zeitpunkt findet in der Peripherie der Reparaturvorgang bereits statt (Brudvik und Rygh, 1995a, b).

Odontoklasten hinterlassen durch den Resorptionsprozess charakteristische Spuren an der Zahnwurzel in Form unterschiedlich großer Resorptionslakunen (Götz, 2003a).

1.1.2 Physiologischer Reparaturvorgang von Wurzelresorptionen

Der Resorptionsprozess hält so lange an, bis das hyaline Gewebe vollständig abgebaut wird und/oder die Kraftapplikation abnimmt. Die Resorptionslakunen dehnen sich entlang der Wurzeloberflächen aus und schwächen indirekt den Druck, der durch die Kraftanwendung entsteht. Folglich erlaubt die Dekompression die Umkehr des Resorptionsprozesses und die Einleitung der Reparatur des Zementes (Brudvik und Rygh, 1995a, b).

Es wird vermutet, dass in der Aktivität der Odontoklasten eine Ruhephase eintritt (Väänänen und Zhao, 2002), welche sogar der Beginn eines Zelluntergangs mit Ablösung (detachment) von resorbierten Oberflächen sein kann (Sahara et al., 1996). Nach Ausübung ihrer Funktion unterliegen viele Zellen dem programmierten Zelltod, wobei die Apoptose, die durch externe Stimuli wie z.B. Zytokineinfluss, intrazelluläre Kalziumkonzentrationen, Hormonänderungen hervorgerufen werden kann oder der genetischen Kontrolle unterliegt (Formigli et al., 2004), den Hauptmechanismus der Zellentfernung darstellt.

Nachdem sich die Odontoklasten von der Wurzeloberfläche gelöst haben, besiedeln zementoblastenartige und osteoblastenartige Zellen die Howship'schen Lakunen und binden die initiale Reparaturmatrix an eine dünne dekalzifizierte Schicht, die aus zurückgelassenen und freigelegten kollagenen Fibrillen besteht (Bosshardt und Selvig, 1997). Zementoblasten synthetisieren die Matrix des Zementes, während Osteoblasten für die Knochenneubildung verantwortlich sind (Schroeder, 2000). Die Herkunft der Zementoblasten im adulten Organismus ist bis heute noch nicht bekannt. Es wird diskutiert, dass sie sich aus Fibroblasten des PDL oder aus Osteoblasten differenzieren können (Saygin et al., 2000) und dass das Reparaturzement demnach aus zwei unterschiedlichen Zellen entstehen kann (Blomlöf und Lindskog, 1994). Zementoblastenartige oder osteoblastenartige Zellen beginnen nach Beendigung der Kraftapplikation mit dem Anbau von Ersatz- oder Reparaturzement, bei dem es sich beim Menschen zunächst um azelluläres Zement handelt. Später kann es mit zellulärem Zement überdeckt werden, in welche sich neue desmodontale Fasern verankern können (Bosshardt und Schroeder, 1994; Sismanidou et al., 1996).

Eine Beteiligung der zementblastenartigen Reparaturzellen wird hauptsächlich in Fällen von Wurzelresorptionen, diejenige der osteoblastenartigen Zellen nach mechanischer Bearbeitung der Wurzeloberfläche z.B. nach Kürettage oder Scaling und Root Planing beobachtet (Weiland, 2001).

Parallel zu diesem Prozess erfolgt ein Wiederaufbau des PDL durch Bildung neuer kollagener-, desmodontaler- und Sharpey'scher Fasern, wobei der Umfang und die Geschwindigkeit der Reparatur vielen klinischen und biologischen Faktoren unterliegt (Weiland, 2001).

Reparaturerscheinungen sind aber nicht nur an der Zahnwurzel, sondern auch in anliegenden Geweben, wie z.B. dem PDL und Alveolarknochen zu beobachten. Im Knochen sind Resorption und Apposition gekoppelt. Es ist bekannt, dass ohne die Anwesenheit von Osteoblasten oder Bindegewebszellen des Knochenmarks keine Osteoklastenentwicklung möglich ist (Katagiri und Takahashi, 2002). Durch den Differenzierungsfaktor Receptor Activator of Nuclear Factor KappaB Ligand (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) wird die Funktion von Osteoklasten reguliert (siehe 1.4). Beide Faktoren werden von Osteoblasten (Katagiri und Takahashi, 2002) und nach neueren Untersuchungen auch von PDL-Zellen exprimiert (Sakata et al., 1999; Quinn et al., 2000).

1.2 Mögliche Beteiligung von PDL-Zellen an Reparaturvorgängen

Das PDL besteht aus PDL-Zellen, Kollagen- und elastischen Fasern und verbindet die Zahnoberfläche mit dem Alveolarknochen. PDL-Zellen zeigen in *in vitro* Versuchen einen osteoblastären Charakter (Chou et al., 2002; Lossdörfer et al., 2005, 2006) und könnten sich möglicherweise auch zu Osteoblasten differenzieren (Basdra und Komposch, 1997).

In wie weit die PDL-Zellen *in vivo* an dentalen und alveolären Remodeling- und Reparaturprozessen nach biomechanischer Belastung beteiligt sind, ist noch nicht geklärt und sollte in der vorliegenden Arbeit näher beleuchtet werden.

1.2.1 Hormonelle Stimulierung der Parodontalligament-Zellen (PDL)

PDL-Zellen verhalten sich bei hormoneller Stimulation analog den Osteoblasten (Zhang et al., 2004; Lossdörfer et al., 2005, 2006) und können die OPG/RANKL-Ratio in Osteoblasten verändern (Kanzaki et al., 2002).

Parathormon ist hierbei von besonderem Interesse, da es bei intermittierender Applikation potentiell anabole Effekte, die mit Hartgewebsformation einhergehen, induzieren kann und sowohl PDL-Zellen als auch Osteoblasten auf eine solche PTH-Stimulation reagieren (Nohutcu et al., 1995; Quyang et al., 2000).

In früheren Untersuchungen wurde bei intermittierender PTH-Stimulation gezeigt, dass sowohl die Apoptose in Osteoblasten, als auch die Produktion von RANKL gehemmt, wohingegen die OPG-Produktion gesteigert wird (Jilka et al., 1999; Stanislaus, 2000).

In einigen *in vitro* Studien zeigte eine intermittierende PTH-Exposition in weniger differenzierten PDL-Zellen eine Reduktion der Zellzahl und eine vermehrte Expression von OPG. In reifen PDL-Zellen jedoch kam es zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahlen und einer Reduktion der Produktion von OPG. RANKL war auf Proteinebene kaum nachweisbar und erfuhr durch die PTH-Stimulation keine Änderung (Locklin et al., 2003; Lossdörfer et al., 2005).

Diese *in vitro* Untersuchungen gaben Hinweise, dass die PDL-Zellen auf intermittierende PTH-Stimulation analog den Osteoblasten mit Änderungen der Proliferation, Differenzierung und OPG-Produktion reagieren (Lossdörfer et al., 2006).

Somit stellt sich die Frage, ob diese *in vitro* Ergebnisse sich auch auf *in vivo* Untersuchungen übertragen lassen und ob PDL-Zellen unter Einfluss einer intermittierenden PTH-Stimulation bei parodontalen Regenerationsvorgängen, wie z.B. kieferorthopädisch-induzierte Wurzelresorptionen, regulatorisch beteiligt sein könnten (Jäger et al., 2008).

1.3 Biologische Wirkung von Parathormon (PTH)

Parathormon ist ein Peptidhormon, das in den Nebenschilddrüsen (Epithelkörperchen) gebildet wird und aus 84 Aminosäuren besteht. Es wird sowohl in den Epithelkörperchen selbst, als auch in der Leber und in der Niere proteolytisch abgebaut (Genuth, 1998).

PTH reguliert die Kalzium- und Phosphathomöostase, in dem es den Kalziumgehalt des Blutes erhöht und den Phosphatgehalt vermindert (Strewler et al., 1987). Die PTH-Sekretionsrate wird wiederum in Abhängigkeit von der Plasma-Kalzium-Konzentration reziprok reguliert (Brent et al., 1988). Das heißt, ein Anstieg über den Normalwert hemmt die PTH-Sekretion (negative Rückkopplung).

Die Einflüsse von PTH und Parathyroid Hormone related Protein (PTHrP) führen direkt zur Differenzierung der Osteoprogenitorzelle zum Prä-Osteoblasten, die wiederum die direkte Vorstufe des Osteoblasten sind. Indirekt stimulieren sie Osteoklasten und den Knochenabbau (Teitelbaum, 2000), wodurch Kalzium aus dem Knochen mobilisiert wird und die Kalzium-Ionen-Konzentration im Blut wieder ansteigt.

Für die Kommunikation von Osteoblasten und Osteoklasten ist zum einen das RANK/RANKL-System zum anderen das Enzym Kollagenase 3, das nach PTH Stimulation von Osteoblasten synthetisiert und sezerniert wird, von Nöten (Patridge et al., 1996).

In verschiedenen Tiermodellen bei Mäusen und Ratten, aber auch bei an Osteoporose erkrankten Menschen (Morley et al., 2001; Rosen and Bilezikian, 2001), wurden in Abhängigkeit der kontinuierlichen PTH-Applikation katabole Wirkungen beobachtet (Ishizuya et al., 1997). Die katabole Wirkung zeigt sich im Sinne einer Knochenresorption (Lee and Lorenzo, 1999; Fu et al., 2002), wohingegen nach intermittierender PTH-Verabreichung eine anabole Wirkung im Sinne einer Erhöhung der Knochenmasse gezeigt wurde (Yang et al., 1997; Schiller et al., 1999; Iida-Klein et al., 2002).

Eine Studie von Kawane et al. (2002) zeigte, dass die intermittierende Gabe von PTH bei ovariectomierten Ratten nach Extraktion von Molaren zu einer Knochenregeneration am Alveolarfortsatz führt.

1.3.1 Mediatoren des PTH-Effektes

Obwohl die genauen molekularen Mechanismen, die für die Auslösung der PTH-Wirkungen verantwortlich sind, bisher nicht abschließend aufgeklärt sind, wurden für die beschriebenen zellulären Effekte u.a. eine gesteigerte Proliferation von Vorläuferzellen der Osteoblasten und eine veränderte Funktion reifer Osteoblasten verantwortlich gemacht (Canalis et al., 1989). Des Weiteren wurde eine Aktivierung verschiedener anaboler Wachstumsfaktoren, wie z.B. Komponenten des Insulin-like Growth Factor Systems (IGF-I, IGF-II sowie IGF-Bindungsproteine und Rezeptoren) (Rosen and Bilezikian, 2001) und ebenso Änderungen in der Expression und dem Auftreten lokaler Faktoren, die als zentrale regulatorische Moleküle des Remodellings des Knochens identifiziert wurden, wie z.B. Osteoprotegerin (OPG) und Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL), beschrieben (Ma et al., 2001; Fu et al., 2002; Huang et al., 2004). Schließlich scheint auch eine Hemmung der Apoptose von Osteoblasten als Folge einer intermittierenden PTH-Stimulation regulatorisch beteiligt zu sein (Jilka et al., 1999; Stanislaus et al., 2000). Des Weiteren sind an der intrazellulären Signaltransduktion sowohl des anabolen als auch des katabolen PTH-Effektes Kinasen und Lipasen beteiligt, wobei in der Folge u.a. die zytokinähnlichen Proteine OPG und RANKL ausgeschüttet werden (siehe 1.4) (Civitelli et al., 1988; Babich et al., 1991).

1.3.2 Intrazelluläre Signaltransduktion

Nach einer Liganden-induzierten Aktivierung der PTH/PTHrP-Rezeptoren auf den Osteoblasten schließen sich zwei mögliche intrazelluläre Signalwege an. Die erste Kopplung führt zu einer Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase mit folgender Akkumulation des intrazellulären zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), wodurch es im Weiteren zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) kommt (Juppner, 1994). cAMP führt zur Phosphorylierung von Ca^{2+} -Kanälen, was wiederum die Öffnung derselben bewirkt.

Über den zweiten Signalweg wird durch die Ankopplung Phospholipase C aktiviert. Als Produkte entstehen Diacylglycerol und 1,4,5-Inositol-triphosphat, welche im weiteren Schritt die Proteinkinase C aktivieren (Civitelli et al., 1988) und es zur Freisetzung von intrazellulärem Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum kommt (Reid et al., 1987).

Der PKA-Signalweg, welcher durch PTH und PTHrP angesprochen wird, wird zum größten Teil für die Regulation des Serumkalziumspiegels und dessen Wirkung am Knochen verantwortlich gemacht (Goltzman, 1999).

Zusätzlich kann PTH den extrazellulären Kalziumzufluss sowohl durch cAMP-abhängige oder -unabhängige Regulation (Yamaguchi et al., 1987b) als auch durch PKC-abhängige Regulation an den Kalziumkanälen stimulieren (Yamaguchi et al., 1987a).

1.3.3 PTH und PDL

Ähnlich wie die Osteoblasten reagieren auch die Fibroblasten des parodontalen Ligamentes (PDL) auf Stimulation durch PTH, so z.B. mit einer Erhöhung oder Reduktion des cAMP (Nohutcu et al., 1995). Des Weiteren wurde berichtet, dass PDL-Zellen auf hormonale Stimulation (Zhang et al., 2004) und auch auf mechanische Beanspruchung mit Veränderungen der OPG/RANKL-Relation in Druck- und Zugzonen reagieren (Kanzaki et al., 2002; Garlet et al., 2008). Zahlreiche Hinweise deuten also darauf hin, dass PTH neben Knochen auch die Aktivität parodontaler Gewebe beeinflussen kann. So wurde beobachtet, dass PTH den Zahndurchbruch und die kieferorthopädische Zahnbewegung fördern kann (Davidovitch et al., 1972). In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass Gewebe innerhalb des sich entwickelnden PDL PTH-Rezeptoren exprimieren (Tenorio and Hughes, 1996). Schließlich wurde beobachtet, dass Mäuse, die das PTH-related Protein nicht aufweisen, auch ein Ausbleiben des Zahndurchbruches sowie eine Ankylose des Wurzelzementes mit dem umgebenden Alveolarknochen zeigen (Philbrick et al., 1998).

1.4 Das RANK/RANKL/OPG-System

Receptor Activator of Nuclear Factor-kappaB (RANK), Receptor Activator of Nuclear Faktor-kappaB Ligand (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) sind die drei entdeckten Mitglieder der Tumor Necrosis Factor (TNF) Superfamilie. Mit diesem System konnte ein essentielles Zytokinnetzwerk charakterisiert werden, dass die Fähigkeit besitzt, alle Aspekte der Osteoklastenfunktion, einschließlich Proliferation, Differenzierung, Fusion, Aktivierung und Apoptose zu regulieren (Yasuda et al., 1998a, b). Somit hat dieses System eine zentrale Rolle bei der Regulation der Osteoklastogenese (Fuller et al., 1998; Lacey et al., 1998).

1.4.1. RANK stellt den physiologischen Rezeptor von RANKL dar und befindet sich sowohl auf der Oberfläche von hämatopoetischen Osteoklastenvorläuferzellen als auch auf dendritischen Zellen. Makrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) bindet sich an spezifische Rezeptoren der hämatopoetischen Osteoklastenvorläuferzellen und induziert die Bildung von RANK (Arai et al., 1999) (Abb.1).

1.4.2. RANKL, das auf der Zellmembran von Osteoblasten, Osteoblastenvorläuferzellen und Stromazellen lokalisiert ist (Kartsogiannis et al., 1999), interagiert mit seinem physiologischen Rezeptor RANK, der als transmembraner Rezeptor vom Typ I auf Osteoklasten und deren hämatopoetischen Vorläuferzellen der Monozyten-/Makrophagenlinie exprimiert wird.

Eine Bindung von RANKL an seinen Rezeptor führt zu einer gesteigerten Differenzierung von Vorläuferzellen sowie zu einer Aktivierung reifer Osteoklasten (Fuller et al., 1998; Lacey et al., 1998) (Abb.1).

1.4.3. OPG ist ein von den Osteoblasten sezernierter Decoy-Rezeptor und fungiert als ein „knochenschützendes“ Molekül in diesem System. Es bindet an RANKL, neutralisiert so seine biologische Aktivität (Takahashi et al., 2002), hemmt die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklastenvorläuferzellen in Osteoklasten (Simonet et al., 1997; Yasuda et al., 1998a) und führt zur Steigerung der Apoptose reifer Osteoklasten (Abb.1).

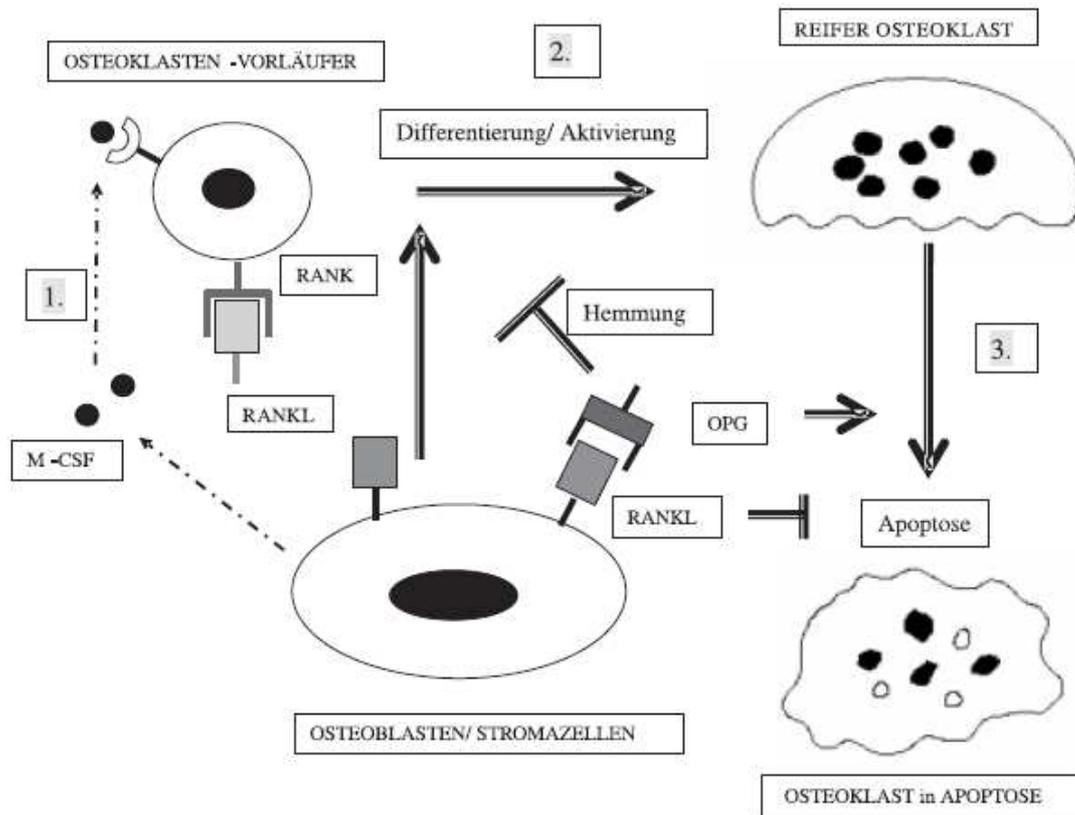


Abb. 1: Regulation der Knochenresorption (modifiziert nach Aubin et al., 2000)

RANK: Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB; RANKKL: Receptor Activator of Nuclear Faktor-KappaB Ligand; OPG: Osteoprotegerin; M-CSF: Makrophage-Colony Stimulating Factor

Zahlreiche Tiermodelle bestätigen, dass OPG-Knock-out-Mäuse durch verstärkte Osteoklastogenese eine frühe Osteoporose (Bucay et al., 1998) und durch eine Überexpression von OPG spröde Knochen (Osteopetrose) entwickeln (Simonet et al., 1997). Auch das Fehlen von RANKL oder RANK bei Mäusen führt zu einer schweren Osteopetrose (Kong et al., 1999).

In vivo ist das Verhältnis von OPG zu RANKL ausschlaggebend dafür, ob eher die Hartgewebsformation oder -resorption begünstigt wird (Aubin, 2000). Durch die Steuerung der Osteoklastendifferenzierung und -aktivität durch einen Faktor, der von Osteoblasten exprimiert wird, werden somit die Knochenresorption und Knochenneubildung miteinander verknüpft, und es wird ein lokaler regulatorischer Mechanismus für das Remodelling des Knochens ausgebildet.

1.5 Das RANK/RANKL/OPG im Immunsystem

RANK/RANKL/OPG-System kommt auch im menschlichem Immunsystem vor (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1997a, b). Osteoklasten und dendritische Zellen sind untereinander eng verwandt und entstehen aus denselben Vorläuferzellen (Monozyten). Im Immunsystem befindet sich RANK auf dendritischen Zellen, RANKL nach T-Zell-Rezeptor-Aktivierung auf T-Zellen. Untersuchungen von Kong et al. (1999) zeigen, dass RANKL auch an der Lymphozytenreifung und der Organogenese von Lymphknoten beteiligt ist.

1.6 RANK/RANKL/OPG-System im dentalen Bereich

RANKL wurde in Fibroblasten des PDL, Odontoblasten, Pulpazellen, Odontoklasten und RANK auf alveolären Osteoklasten, Odontoklasten und auf Dentinoberfläche in Resorptionslakunen lokalisiert. Auch der hemmende Faktor OPG wurde nachgewiesen (Lossdörfer et al., 2002).

Im Rahmen einer kieferorthopädischen Zahnbewegung wird eine biomechanisch induzierte Hochregulation des RANK/RANKL-Systems ebenfalls angenommen (Götz, 2003b), da gedehnte Zellen des PDL mehr RANKL exprimieren (Kanzaki et al., 2002).

1.7 Klinische Relevanz der durchgeführten Untersuchung

Die bisher verfügbaren *in vitro* Arbeiten legen einen Grundstein für ein besseres Verständnis der Mechanismen, die den Wurzelresorptionen und deren physiologischer Reparatur zugrunde liegen und eröffnen Perspektiven, zukünftig möglicherweise diese Reparaturvorgänge pharmakologisch beeinflussen zu können. Dies könnte bedeuten, dass regenerative Therapien mit PTH möglicherweise zur Behandlungen von Wurzelresorptionen in Frage kämen.

Darüber hinaus ließen sich eventuell auch die Osteointegration von Implantaten unterstützen und die Reparaturvorgänge nach entzündlichen Parodontalerkrankungen positiv beeinflussen.

1.8 Zielsetzungen und Hypothesen der vorliegenden Studie

Einige Untersuchungsergebnisse (Lossdörfer et al., 2002, 2005, 2006) gaben Hinweise auf eine wichtige Rolle in Bezug auf das die Osteoklasten regulierende RANK/RANKL/OPG-System, sowohl bei den Reparaturvorgängen im PDL als auch bei orthodontisch induzierten Zahnbewegungen (Low et al., 2005; Kawasaki et al., 2006). Das Verhältnis zwischen Osteoklasten stimulierenden RANKL und dem Osteoklasten hemmenden OPG (Hofbauer et al., 1999) in der Umgebung der Reparaturvorgänge könnte eine Bedeutung für die Einleitung und Kontrolle von Reparaturvorgängen haben.

In der vorliegenden Untersuchung sollte überprüft werden, ob sich die *in vitro* beobachteten PTH-induzierten Veränderungen der OPG- und RANKL-Expression durch PDL-Zellen auch in einem *in vivo*-Modell zeigen würden und dort eine physiologische Relevanz im Sinne einer Beeinflussung der physiologischen Reparaturvorgänge nach kieferorthopädisch - induzierten Wurzelresorptionen haben könnten (Jäger et al., 2008). Im Einzelnen bestanden die Arbeitsziele in der Beantwortung der Fragen,

- ob und in wie weit die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen über die Rolle der PDL-Zellen bei dentalen und alveolären Reparatur- und Remodellingprozessen nach biomechanischer Belastung auf eine *in vivo* Situation übertragen lassen
- ob OPG und RANKL an der Regulation der Reparaturvorgänge beteiligt sind
- ob es ein differenziertes Expressionsmuster von OPG und RANKL in ehemaligen Druck- vs. Zugzonen nach Absetzen der Kraft in der Früh- bzw. Spätphase der Reparatur gibt und
- ob sich die parodontalen Reparaturvorgänge durch eine intermittierende PTH-Stimulation positiv beeinflussen lassen.

Es wurde vermutet, dass eine intermittierende PTH-Applikation in der Frühphase der Reparatur zu einer Reduktion des OPG/RANKL-Ratio durch die PDL-Zellen und in der Spätphase zu einer Zunahme führt.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere

70 männliche Wistar-Ratten im Alter von ca. 3 Monaten mit einem Gewicht von 300 g wurden nach Erhalt einer Tierversuchsgenehmigung (Az.50.203.2-BN35,4/04) unter Standardbedingungen und mit Kontrolle der Gewichtsentwicklung in den tierexperimentellen Einrichtungen des Universitätsklinikums Bonn-Venusberg gehalten. Als Nahrung wurden Wasser und Trockenfutter ad libitum zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

70 männliche Wistar-Ratten wurden nach der Methode von Waldo and Rothblatt (1954) mit einem Separierring zwischen dem ersten und zweiten Molaren in beiden Quadranten versehen. Mittels diesen Rings erfolgte eine Bewegung des ersten Oberkiefermolaren nach mesial. Die initial zu erwartende Kraft des Ringes auf den Molaren betrug ca. 0,05 N. 70 Ratten wurden in sieben Gruppen zu jeweils 10 Tieren eingeteilt. Bei allen Versuchstieren erfolgte zunächst eine Zahnbewegung des ersten Oberkiefermolaren für 5 Tage, ehe dann die aktive Kraft abgesetzt und die folgenden Remodeling- und Reparaturprozesse für 8, 10, 14, 17, 21, 56 und 70 Tage beobachtet wurden. Mit der Beobachtungsdauer bis zum Tag 17 wird die Frühphase der Reparatur abgebildet. Die Intervalle vom Tag 21 bis 70 spiegeln die Spätphase der Reparatur wieder. Während dieser Zeit erhielt jeweils die Hälfte der Tiere einer jeden Gruppe eine intermittierende PTH-Applikation, welche durch subkutane Injektion von 5 µg/kg KG im Abstand von zwei Tagen bis zum jeweiligen Ende des Versuchszeitraumes realisiert wurde (Sato et al., 2002). Bei der anderen Hälfte der Tiere jeder Gruppe erfolgte eine Sham-Injektion von einer äquivalenten Dosis Puffer.

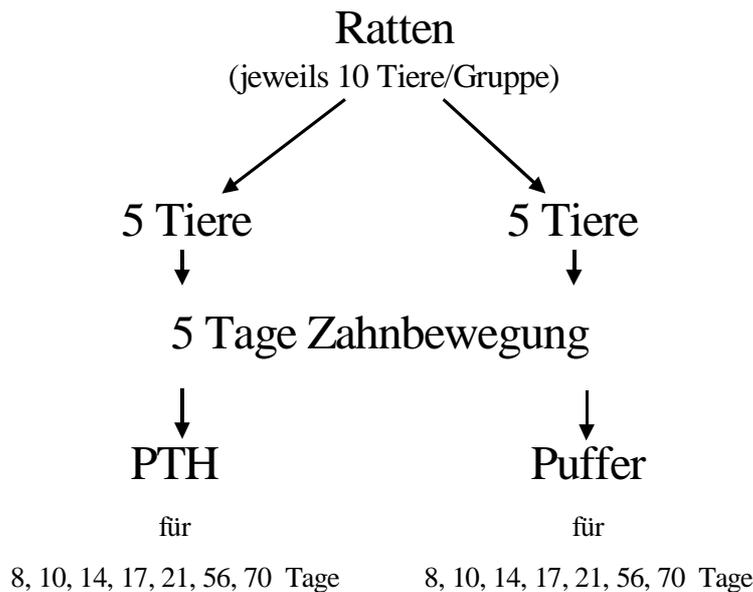


Abb.2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Einteilung der 70 Ratten in sieben Gruppen zu jeweils 10 Tieren, von denen 5 mit intermittierender PTH(1-34)-Applikation und die anderen 5 mit einer Sham-Injektion behandelt wurden. Nach einer Zahnbewegung des ersten Oberkiefermolaren für 5 Tage wurde die aktive Kraft abgesetzt und die folgenden Remodeling- und Reparaturprozesse für 8, 10, 14, 17, 21, 56 und 70 Tage beobachtet.

Am Ende des Versuchszeitraumes erfolgte die Tötung der Ratten durch eine Überdosierung mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran. Anschließend dienten 400 ml PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, und 4% Paraformaldehyd in PBS über die Arteria carotica bei geöffneter Vena jugularis appliziert) als Perfusionsfixierung. Danach wurde der gesamte Oberkiefer präpariert und in zwei Hälften geteilt (Jäger et al. (2005), Götz et al. (2006)).

2.2.1 Fixierung

Die Fixierung der Kieferhälften erfolgte bei Raumtemperatur für einen Zeitraum zwischen 7 bis 10 Tagen in 4% gepufferter Formalinlösung.

2.2.2 Entkalkung

Mittels 10% -iger Äthylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA-Lösung), wurde über einen Zeitraum von ca. 6 Wochen entkalkt, wobei die Lösung einmal pro Woche gewechselt wurde. Mit Hilfe eines mechanischen Tests (durch vorsichtiges

Einschneiden oder Einstechen) wurde das Ende der Entkalkung bestimmt. Danach folgte eine Wässerung der Präparate für ca. 6 - 8 Stunden.

2.2.3 Einbettung

Im Gewebeentwässerungs- und Einbettautomaten erfolgte nach der Wässerung eine Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe mit 70, 80, 96, 100%-igem Alkohol und Xylol.

Die Einbettung der Präparate in mit Paraffin gefüllten kleinen Kunststoffküvetten erfolgte in einer Paraffinausgießstation. Die Kieferhälften wurden dabei so ausgerichtet, dass sich später Schnitte in sagittaler Richtung anfertigen ließen.

2.2.4 Schnitthanfertigung

Die Anfertigung von Schnittserien in einer Dicke von 5 µm erfolgte mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms. Die Schnitte wurden ca. 10 Sekunden in einem 42 °C heißem Streckbad gelagert, dann auf Superfrostobjektträger aufgezogen und anschließend auf einer Heizplatte bei 40°C gestreckt. Die so behandelten Objektträger wurden zuletzt für ca. 12 Stunden in einen Wärmeofen bei 37°C zum Trocknen gestellt.

2.2.5 Entparaffinierung

Die Entparaffinierung der Paraffinschnitte war für die weiteren immunhistochemischen Untersuchungen notwendig und erfolgte manuell in einer absteigenden Alkoholreihe bis Aqua dest.

2.2.6 Histologische Färbungen

2.2.6.1 Hämatoxylin-Eosin - (HE) Färbung

Ausgewählte Schnitte wurden zur mikroskopischen Kontrolle der Morphologie und zur Übersicht mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Nachdem die Schnitte entparaffiniert (siehe 2.2.5) wurden, fand zunächst die Mayers Hämalaun-Färbung mit anschließendem Abspülen unter Leitungswasser und erneutem Färben mit Eosin statt. Nach dem erneuten Ausspülen mit Aqua dest., erfolgte die Dehydrierung nach aufsteigender Alkoholreihe bis Xylol und das Eindeckeln mit DePex.

2.2.6.2 Enzymhistochemischer Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP)

Zur Darstellung klastischer, d.h. abbauender Zellen wie z.B. Osteoklasten, Odontoklasten und deren Vorläufern wurde der enzymhistochemische Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase nach Barka und Anderson (1962) durchgeführt. Die Färbung wurde an selektiven Schnitten nach folgendem Verfahren angefertigt, wodurch die erfassten Zellen mit einer roten Färbung imponierten: im ersten Schritt erfolgte auch hier die Entparaffinierung der Schnitte mit anschließender Aktivierung der TRAP in Tris-HCl-Puffer bei 37°C für eine Stunde. Im nächsten Schritt wurde das Verfahren nach Barka und Anderson für eine weitere Stunde angewandt. Am Ende fand zunächst das Abspülen unter fließendem Wasser, Gegenfärben mit Mayers saurem Hämalaun, ein nochmaliges Spülen und Eindeckeln mit Aquatex statt.

2.2.7 Immunhistochemische Nachweise

Pro Versuchstier wurden jeweils 3 Schnitte zum Nachweis von OPG und jeweils 3 zur Darstellung der RANKL- Proteinexpression verwendet. Die Visualisierung der Antigene erfolgte jeweils nach der indirekten Immunperoxidase-Methode.

2.2.7.1 Immunhistochemischer Nachweis von OPG

Nach der Entparaffinierung (siehe 2.2.5) erfolgte zunächst die Blockierung der endogenen Peroxidase in Methanol und Wasserstoffperoxid im Dunkeln für 45 Minuten mit anschließender 10 minütiger Spülung in TBS-Puffer und Verblockung für 20 Minuten mit 4%-igem TBS/BSA. Danach wurden die Objektträger zuerst mit dem Primärantikörper OPG (Spezies: polyklonal, Ziege, Herkunft Santa Cruz / Biotechnology USA) 1:200 bei 4°C für 20 Stunden, dann mit Horse Reddish Peroxidase (HRP)-konjugiertem Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Ziege, Herkunft: DAKO, Hamburg / Deutschland) 1:50 in 1%-igem TBS/BSA verdünnt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Spülen, Färben mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Gegenfärben mit Mayers saurem Hämalaun, wurden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser gebläut. Mit Hilfe der DAB-Färbung erfolgte die Visualisierung der immunhistochemischen Reaktion

zwischen dem Enzym (HRP) und DAB durch einen braunen Farbstoff. Die Hämalaunfärbung dagegen wurde für die kontrastreiche Darstellung der Zellkerne in blauem oder violetterem Farbton dieser positiv reagierenden Zellen durchgeführt.

Im letzten Schritt erfolgte die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe und das Eindeckeln mit DePex.

2.2.7.2 Immunhistochemischer Nachweis von RANKL

Zum Nachweis von RANKL (Spezies: polyklonal, Ziege, Herkunft: Santa Cruz / Biot. USA) wurde ein ähnliches Protokoll wie zur Detektion von OPG verwendet, das sich nur in der Verdünnung des Primärantikörpers unterschied. Die Verdünnung betrug hierbei 1:25 in 1%-igem TBS/BSA.

2.2.8 Spezifitätsnachweise

2.2.8.1 Antikörper

Die Spezifität der verwendeten Antikörper war durch Literatur und Angaben der Handelsfirmen anhand ihrer Beipackzettel zu entnehmen.

2.2.8.2 Positivkontrollen

Um nachzuweisen, dass es sich bei den erzielten Reaktionen um spezifische Färbungen handelt, wurden Gewebe verwendet, die bekannterweise das Antigen von Interesse exprimieren. Bei diesen Geweben handelte es sich um Paraffinschnitte der Skelettmuskulatur und von Fötusknochen der Ratte.

2.2.8.3 Negativkontrollen

Um unspezifische Immunreaktionen auszuschließen, wurden Negativkontrollen mitgeführt, bei denen entweder der Primärantikörper oder sowohl Primärantikörper als auch Sekundärantikörper weggelassen wurden und stattdessen TBS/BSA verwendet wurde.

2.2.8.4 Prä-Adsorptionskontrolle

Mit dieser Kontrollmöglichkeit wurde die Bindung des Antikörpers an unspezifische Antigene ausgeschlossen. Diese Methode diente somit als zusätzliche Negativkontrolle.

Zunächst erfolgte eine Sättigung der Bindungsstellen des Antikörpers, indem diesem das Antigen im Überschuss im Verhältnis von 2:1 zugegeben wurde. Anschließend wurde der präinkubierte Antikörper entsprechend dem immunhistochemischen Protokoll für OPG und für RANKL verdünnt und anschließend für 20 Stunden bei 4°C auf dem Präparat inkubiert. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper und Zugabe des Substrats DAB sollte hier keine Farbreaktion auf dem Präparat nachweisbar sein.

2.2.9 Photographische Dokumentation und Auswertung der Befunde

Die Schnitte wurden mit dem Lichtmikroskop an der Bifurkation des ersten Oberkiefermolaren unter 40-facher Vergrößerung in Druck- und Zugzonen mit jeweils 24,6 cm Breite und 45,6 cm Länge eingescannt. Somit ergaben sich pro Schnitt zwei Bilder, und zwar eins aus dem Bereich der Druckzone und eins aus dem Bereich der Zugzone.

Jede Zone wurde in drei Längsabschnitte (Zahn-, PDL- und Knochendrittel) eingeteilt um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, woher sich die immunreaktiven Zellen rekrutieren (siehe Abb. 3). Die immunreaktiven Zellen wurden im Verhältnis zur Gesamtzellzahl in jeweiligem Drittel ausgezählt. Extrazelluläre Immunreaktionen blieben aufgrund der Schwierigkeiten der Quantifizierung unberücksichtigt.



Abb. 3: Übersichtsbild des ersten maxillären Molaren der Ratte an der Bifurkationsstelle
 DZ: Druckzone; D: Dentin; Z: Zement, ZZ: Zugzone; PDL: Parodontalligament; IK: interrädikulärer Knochen; HE; Vergrößerung: x10.

2.2.10 Statistische Analyse

Die Reproduzierbarkeit der histomorphometrischen Auswertung wurde durch dreifache Auszählung von 30 ausgewählten Präparaten sichergestellt. Dabei ergab sich ein Untersucher-bezogener Fehler von weniger als 4%.

Für jedes Experiment repräsentiert ein jeder Datenpunkt den Mittelwert \pm SEM für 5 Tiere pro Gruppe und dabei jeweils 5 ausgewerteten Präparate pro Tier, was einer Gesamtsumme von 15 Einzelwerten pro Gruppe entspricht. Die Varianz und statistische Signifikanz der erhobenen Daten wurde mittels Bonferronis Modifikation des Student-t-Test ermittelt. P-Werte <0.05 wurden als signifikant erachtet.

2.2.11 Liste der verwendeten Reagenzien

10%-iges Äthylendiamintetraacetat (EDTA), 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), gepuffertes Formalin (4%), Mayers saures Hämalaun, PBS-Puffer, Tris-hydroxy methyl aminomethane Buffered Saline solution (TBS)-Puffer, Tris-hydroxy methyl aminomethane Buffered Saline solution/ Bovine Serum Albumine (TBS/BSA)-Puffer, Tris-HCl-Puffer, Veronalacetat-Puffer.

2.2.12 Liste der verwendeten Chemikalien

Alkohole (70-100%-ige), DePex, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), Dimethylformamid, Dinatriumhydrogenophosphat, EDTA, Formol 40%-ig, Formaldehyd, Kaliumdihydrogenphosphat, Methanol, Naphtol-AS-BI-Phosphat, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumnitrit, Natronlauge, Pararosanilin, Serumalbumin vom Rind, Stabile Peroxid-Substrat-Buffer, Tris, Wasserstoffperoxid 30%-ig, Xylol (echt), Xylolersatz.

2.2.13 Liste der verwendeten Geräte und Materialien

Analysenwaage, Brutschrank, Deckgläser, Digital-pH-Meter 197, Einbettautomat V.I.P.2000/3000, Eppendorfpipetten, Lichtmikroskop Axioskop 2, Paraffinausgießstation Tissue-Tek, Petrischalen, Pipettenspitzen, Rotationsmikrotom HM 355S, Superfrost Plus Objektträger, Wärmeplatte.

3. Ergebnisse

3.1 Morphologie

Am Tag der Kraftabsetzung (Tag 0) wurden Resorptionsstellen auf der mesialen Oberfläche des Alveolarknochens beobachtet. Durch den Druck im Desmodont kam es zur Entwicklung einer akuten Entzündungsreaktion mit massiven Zellschädigungen und nachfolgender umschriebener aseptischer Nekrose unter Ausbildung der hyalinen Zone (Abb. 4A). TRAP-positive klastische Zellen besiedelten diese hyaline Zone, die Wurzeloberfläche und füllten die Resorptionslakunen aus (Abb.4B). Auch Fibroblasten und Entzündungszellen waren in diesen Resorptionslakunen vorzufinden. Zementoblastenähnliche, jedoch kleinere und runde-kubische Zellen, wurden ebenfalls auf dem Boden der Lakunen beobachtet (Abb. 4D). Im Laufe der Zeit bildeten sich die hyaline Zone und die Größe der Resorptionslakunen zurück. Während der Frühphase der Reparatur kam es nicht zu einer Bildung von Reparaturzement, jedoch nahm die Zahl der resorbierenden Zellen ab, wohingegen die Anzahl der reparativen Zellen deutlich zunahm.

In der Spätphase der Reparatur wurde eine vermehrte parallele Anordnung der PDL-Zellen zwischen den Lakunen der Wurzeloberfläche sowohl mit dem Alveolarknochen als auch mit den perivaskulären Bereichen deutlich (Abb. 4C, H). In den Lakunen kam es zu Wiedervereinigung der PDL-Faserbündeln mit den PDL-Zellen (Abb. 4E, G).

Das azelluläre Reparaturzement kam zum ersten Mal am Tag 14 zum Vorschein (Abb. 4F) und besiedelte bis zum 21. Tag gleichmäßig den Boden der Lakune (Abb. 4I). Von diesem Zeitpunkt aus befanden sich keine TRAP-positiven Odontoklasten auf der Wurzeloberfläche (Abb. 4J). Zum Ende des Beobachtungszeitraums (Tag 70) sah man eine deutliche Ablagerung des Reparaturzementes (Abb. 4K).

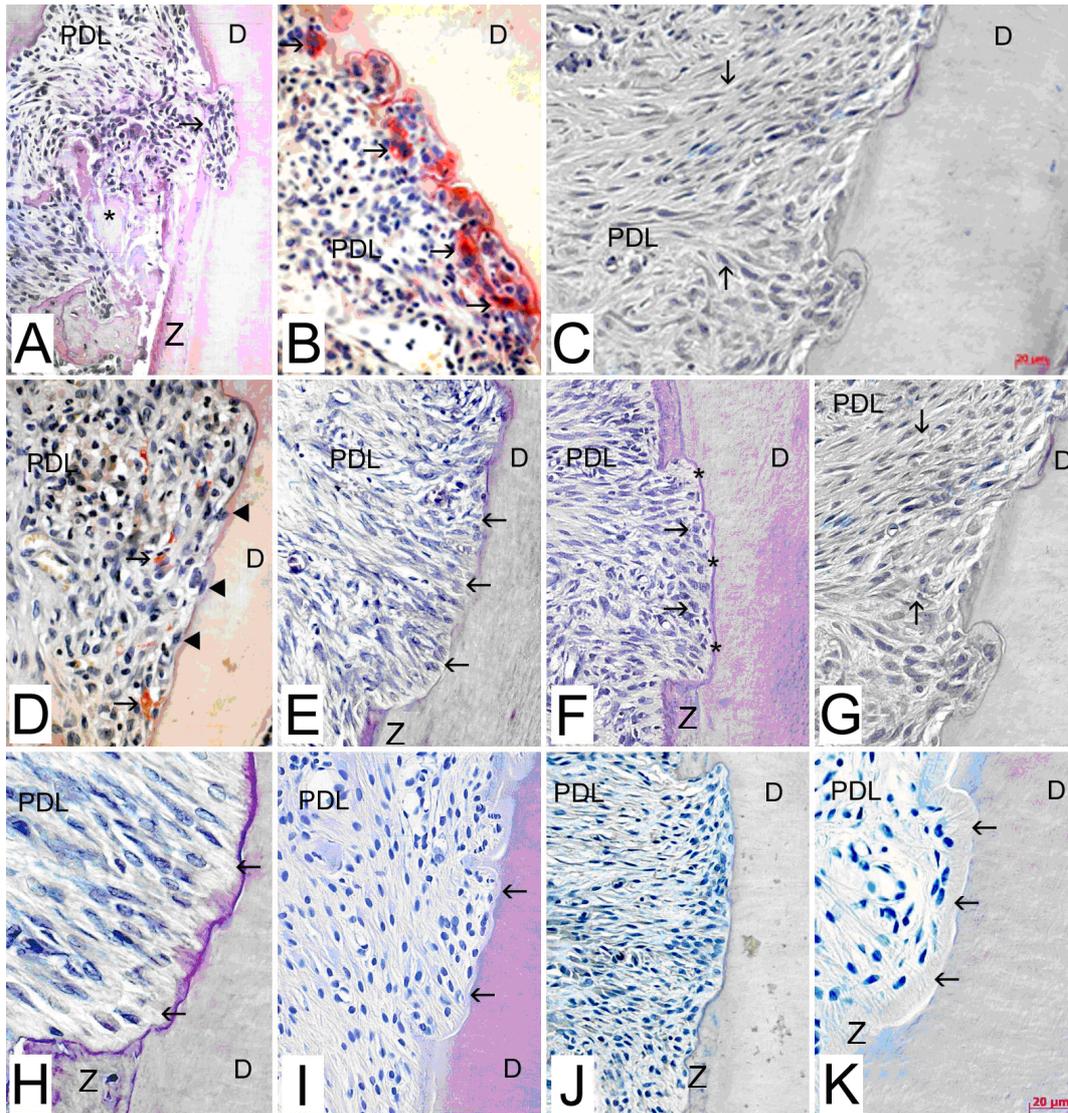


Abb. 4: Histologische Veränderungen nach Absetzen der kieferorthopädischen Kraft im Verlauf der Zeit

- A:** Tag 0; Hyaline Zone (Sternchen), Resorptionslakune (Pfeil); HE- Färbung; 200-fache Vergrößerung
- B:** Tag 0; Odontoklasten in den Resorptionslakunen (Pfeile); TRAP-Färbung; 400-fache Vergrößerung
- C:** Tag 8; einströmende Zellen (Pfeile); HE-Färbung; 200-fache Vergrößerung
- D:** Tag 10; Zementoblasten-ähnliche Reparaturzellen auf dem Boden der Lakune (dicke Pfeile), nur einige TRAP-positive Zellen (Pfeile); TRAP-Färbung; 400-fache Vergrößerung
- E:** Tag 14; Wiedervereinigung der PDL-Fasern in der Lakune (Pfeile); HE-Färbung; 200-fache Vergrößerung
- F:** Tag 14; Reparaturzellen auf dem Boden der Resorptionslakune mit erster Ablagerung von Reparaturzement (Sternchen); HE-Färbung; 200-fache Vergrößerung
- G:** Tag 17; Einstrom von Zellen in die Lakune (Pfeile); HE-Färbung; 400-fache Vergrößerung
- H:** Tag 17; Wiedervereinigung der PDL-Faserbündeln mit den PDL-Zellen (Pfeile); HE-Färbung; 200-fache Vergrößerung
- I:** Tag 21; eine dünne Schicht des Reparaturzementes auf dem Boden der Lakune (Pfeile); HE-Färbung; 400-fache Vergrößerung
- J:** Tag 21; vollständige Abwesenheit der TRAP-positiven Zellen in der Resorptionslakune; 200-fache Vergrößerung
- K:** Tag 70; Ablagerung des Reparaturzementes (Pfeile); HE-Färbung; 400-fache Vergrößerung

PDL: Parodontalligament; D: Dentin; Z: Zement

3.2 Histomorphometrie

Der prozentuale Anteil der immunreaktiven Zellen an der Gesamtzellzahl innerhalb eines jeden Drittels wurde für jeden der definierten Abschnitte separat für die Druck- und die Zugzone ermittelt und analysiert. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Dritteln innerhalb der Druck- bzw. Zugzone, sodass sich die folgende Präsentation der Ergebnisse auf die Darstellung der Befunde im Zahndrittel beschränken wird, da hier besonders häufig reparative Veränderungen beschrieben sind (Bosshardt und Selvig, 1997). Tag „0“ kennzeichnet das Ende der Kraftapplikation. Ausgewählte immunreaktive Zellen für OPG und RANKL zu unterschiedlichen Zeiten und an verschiedenen Lokalisationsstellen wurden in Abbildung 11 dargestellt.

3.2.1 OPG

3.2.1.1 Ehemalige Druckzone (Zahndrittel)

In der Frühphase der Reparatur (Tag 0-17) nach Absetzen der Kraft waren sowohl ohne als auch nach intermittierender PTH(1-34)-Applikation keine signifikanten Veränderungen der OPG-Expression zu verzeichnen. Mit Beginn der Spätphase am 21. Tag zeigte sich ein signifikanter Anstieg der OPG-Expression, der durch PTH (1-34)-Applikation noch deutlich verstärkt wurde.

Dieser stimulatorische PTH(1-34)-Effekt blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes am Tag 70 erhalten (Abb. 5).

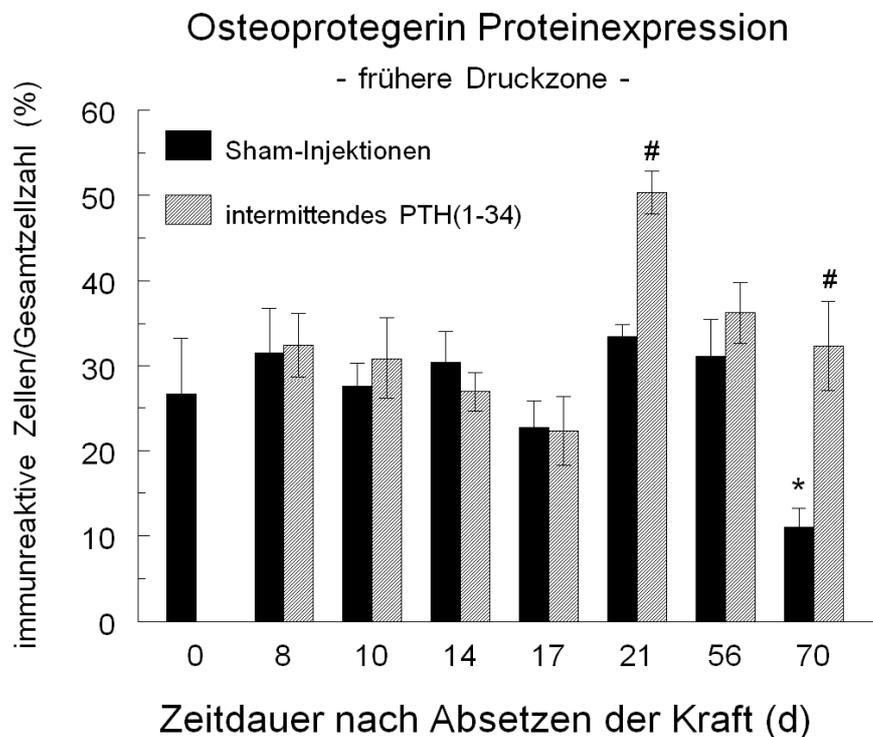


Abb. 5: OPG Proteinexpression in der ehemaligen Druckzone (Zahndrittel)

Zeitlicher Verlauf der OPG Proteinexpression in der früheren Druckzone nach Absetzen der kieferorthopädischen Kraft und Einfluss von PTH auf diesen Parameter. Ein jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM für 5 Tiere pro Gruppe und dabei jeweils für 5 ausgewertete Präparate pro Tier, was einer Gesamtsumme von 15 Einzelwerten pro Gruppe entspricht. * $P < 0.05$, experimentelle Gruppe vs. Kontrolle (Tag 0); # $P < 0.05$, PTH-stimulierte Gruppe vs. Sham-injizierte Gruppe nach demselben Beobachtungszeitraum.

3.2.1.2 Ehemalige Zugzone (Zahndrittel)

In der Frühphase der Reparatur war bis zum Tag 10 zunächst eine verminderte OPG-Proteinexpression nachzuweisen, die durch PTH(1-34)-Administration wieder auf Kontrollniveau angehoben wurde. In der Spätphase der Reparatur ähnelten die Befunde den in der ehemaligen Druckzone erhobenen Daten. Auch hier kam es zu einem signifikanten Anstieg der OPG-Expression, der durch PTH(1-34) weiter verstärkt wurde (Abb. 6).

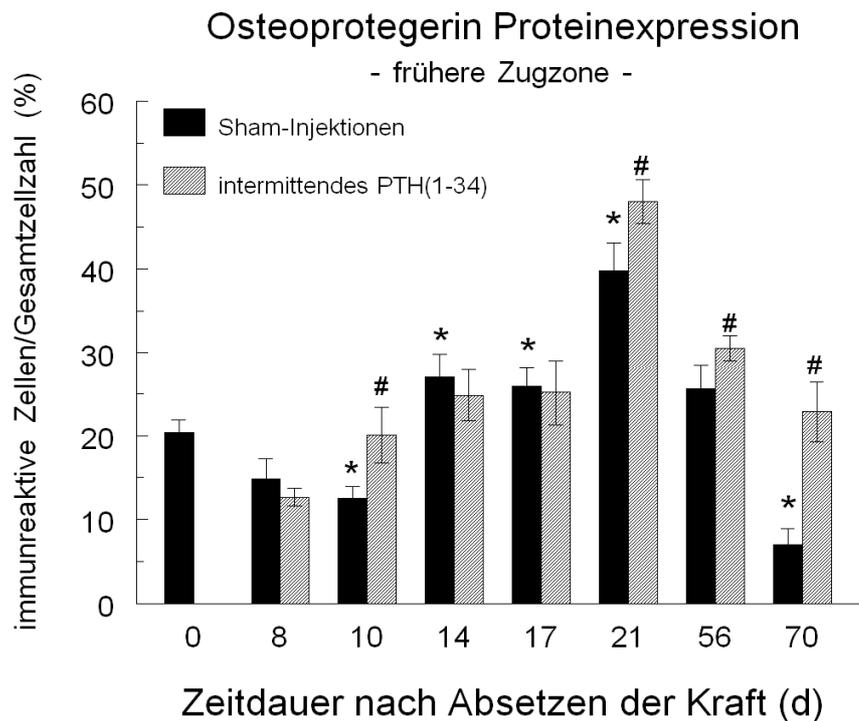


Abb. 6: OPG Proteinexpression in der ehemaligen Zugzone (Zahndrittel)

Zeitlicher Verlauf der OPG Proteinexpression in der früheren Zugzone nach Absetzen der kieferorthopädischen Kraft und Einfluss von PTH auf diesen Parameter. Ein jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM für 5 Tiere pro Gruppe und dabei jeweils für 5 ausgewertete Präparate pro Tier, was einer Gesamtsumme von 15 Einzelwerten pro Gruppe entspricht. * $P < 0.05$, experimentelle Gruppe vs. Kontrolle (Tag 0); # $P < 0.05$, PTH-stimulierte Gruppe vs. Sham-injizierte Gruppe nach demselben Beobachtungszeitraum.

3.2.2 RANKL

3.2.2.1 Ehemalige Druckzone (Zahndrittel)

Im Gegensatz zu den Befunden für OPG kam es bereits zu Beginn der Frühphase der Reparatur zu einem kontinuierlichen Anstieg der RANKL-Expression, die am 10. Tag nach Absetzen der Kraft ihr Maximum erreichte. In diesem Zeitraum stimulierte PTH(1-34) den RANKL-Anstieg signifikant. In der sich anschließenden Spätphase war ein leichter Rückgang der RANKL Expression zu beobachten, die jedoch signifikant oberhalb des Levels von Tag 0 blieb. Nach einem experimentellen Zeitraum von 21 und 56 Tagen resultierte eine intermittierende PTH(1-34) in einem signifikanten Abfall der RANKL-Expression gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 7).

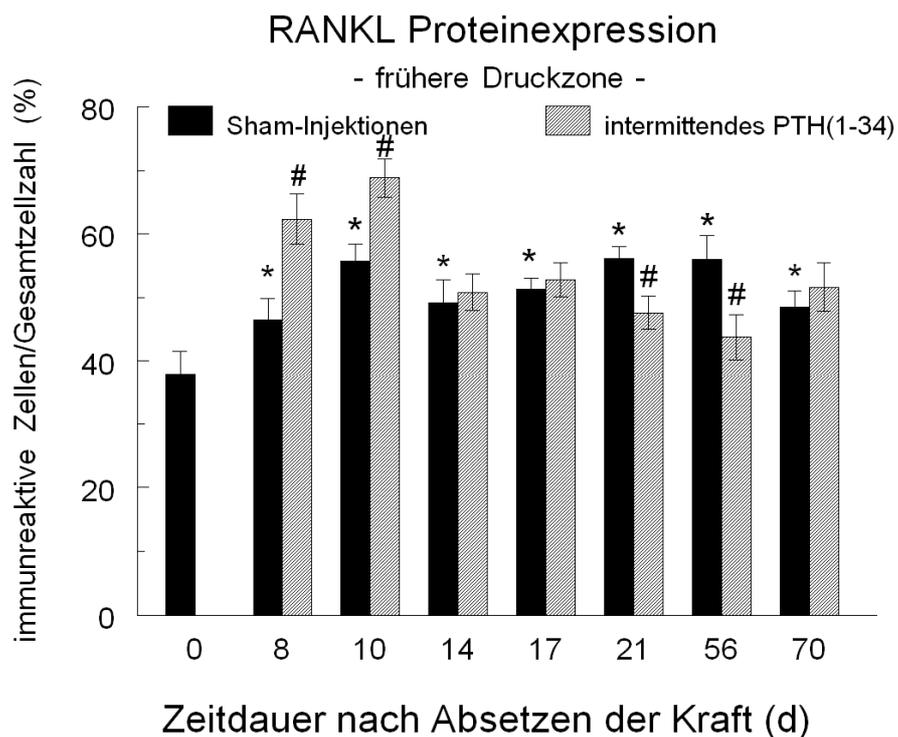


Abb. 7: RANKL Proteinexpression in der ehemaligen Druckzone (Zahndrittel)

Zeitlicher Verlauf der RANKL Proteinexpression in der früheren Druckzone nach Absetzen der kieferorthopädischen Kraft und Einfluss von PTH auf diesen Parameter. Ein jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM für 5 Tiere pro Gruppe und dabei jeweils für 5 ausgewertete Präparate pro Tier, was einer Gesamtsumme von 15 Einzelwerten pro Gruppe entspricht. * $P < 0.05$, experimentelle Gruppe vs. Kontrolle (Tag 0); # $P < 0.05$, PTH-stimulierte Gruppe vs. Sham-injizierte Gruppe nach demselben Beobachtungszeitraum.

3.2.2.2 Ehemalige Zugzone / Zahndrittel

In der ehemaligen Zugzone wurde schon am Tag der Kraftabsetzung eine hohe RANKL-Expression ohne intermittierende PTH-Applikation beobachtet. Bis zum Ende der Frühphase der Reparatur (Tag 17) kam es zu einem signifikanten Rückgang der RANKL-Immunreaktivität, welche durch PTH(1-34) zusätzlich reduziert wurde. Anschließend wurde ein tendenzieller Wiederanstieg der RANKL-Expression bis zum Ende der Spätphase der Reparatur ohne zusätzliche Beeinflussung durch PTH verzeichnet (Abb. 8).

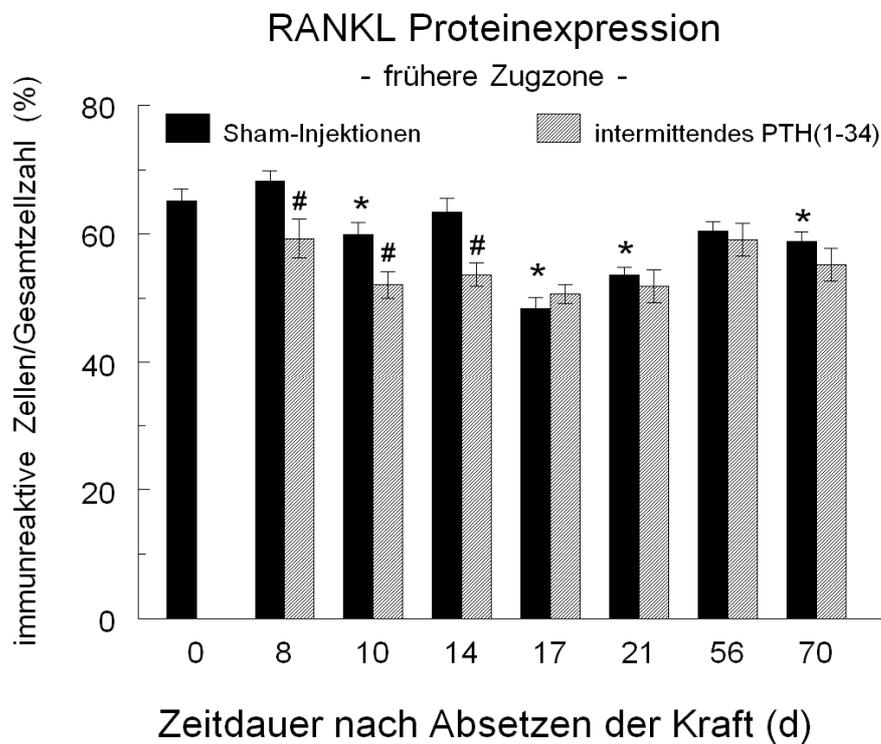


Abb. 8: RANKL Proteinexpression in der ehemaligen Zugzone (Zahndrittel)

Zeitlicher Verlauf der RANKL Proteinexpression in der früheren Zugzone nach Absetzen der kieferorthopädischen Kraft und Einfluss von PTH auf diesen Parameter. Ein jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM für 5 Tiere pro Gruppe und dabei jeweils für 5 ausgewertete Präparate pro Tier, was einer Gesamtsumme von 15 Einzelwerten pro Gruppe entspricht. * $P < 0.05$, experimentelle Gruppe vs. Kontrolle (Tag 0); # $P < 0.05$, PTH-stimulierte Gruppe vs. Sham-injizierte Gruppe nach demselben Beobachtungszeitraum.

3.2.3 OPG/RANKL-Verhältnis

3.2.3.1 Ehemalige Druckzone (Zahndrittel)

Das OPG/RANKL-Verhältnis in der ehemaligen Druckzone fiel zunächst tendenziell bis zum Ende der Frühphase der Reparatur ab. Dieser Rückgang wurde durch PTH (1-34) weiter verstärkt. Mit Beginn der Spätphase am 21. Tag stieg dieses Verhältnis in der unbehandelten Kontrollgruppe zunächst geringfügig wieder an, ehe dann eine kontinuierliche Reduktion dieser Ratio bis zum Ende der Spätphase zu verzeichnen war. Durch intermittierende PTH(1-34)-Applikation stieg das OPG/RANKL-Verhältnis in der Spätphase signifikant an (Abb. 9).

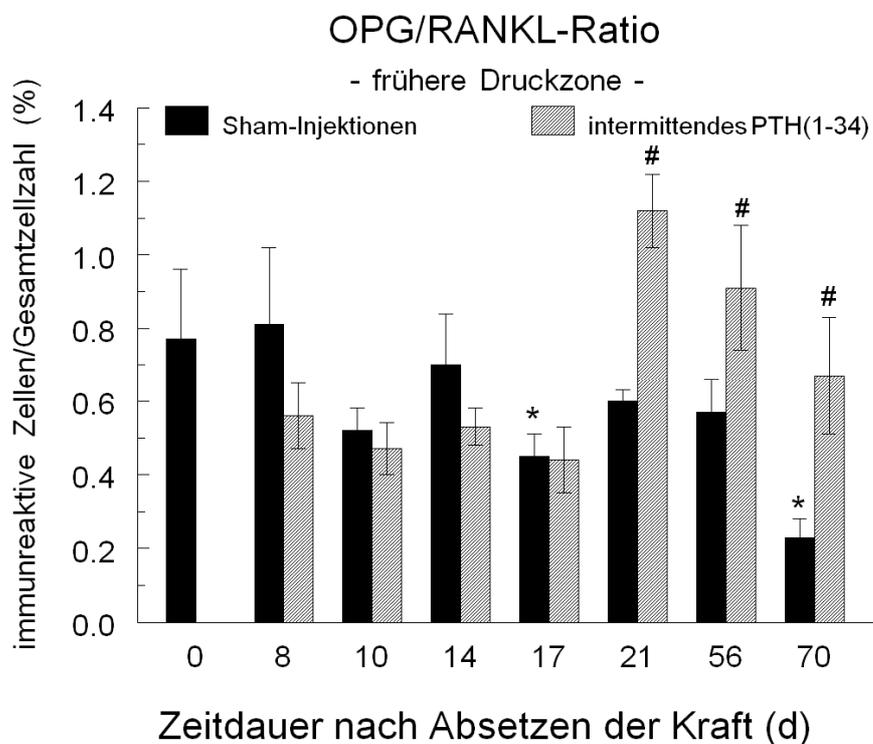


Abb. 9: OPG/RANKL-Verhältnis in der ehemaligen Druckzone (Zahndrittel)

Zeitlicher Verlauf der Entwicklung des Verhältnisses OPG/RANKL in der ehemaligen Druckzone nach Absetzen der kieferorthopädischen Kraft und Einfluss von PTH auf diesen Parameter. Ein jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM für 5 Tiere pro Gruppe und dabei jeweils für 5 ausgewertete Präparate pro Tier, was einer Gesamtsumme von 15 Einzelwerten pro Gruppe entspricht. * $P < 0.05$, experimentelle Gruppe vs. Kontrolle (Tag 0); # $P < 0.05$, PTH-stimulierte Gruppe vs. Sham-injizierte Gruppe nach demselben Beobachtungszeitraum.

3.2.3.2 Ehemalige Zugzone (Zahndrittel)

In der ehemaligen Zugzone war ein Anstieg des OPG/RANKL-Verhältnisses zu verzeichnen, der am Tag 21 der Reparaturphase sein Maximum erreichte und danach bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes unter die Kontrollwerte am Tag 0 abfiel. In der Spätphase der Reparatur induzierte PTH(1-34)-Applikation einen signifikanten Anstieg des OPG/RANKL-Ratio (Abb. 10).

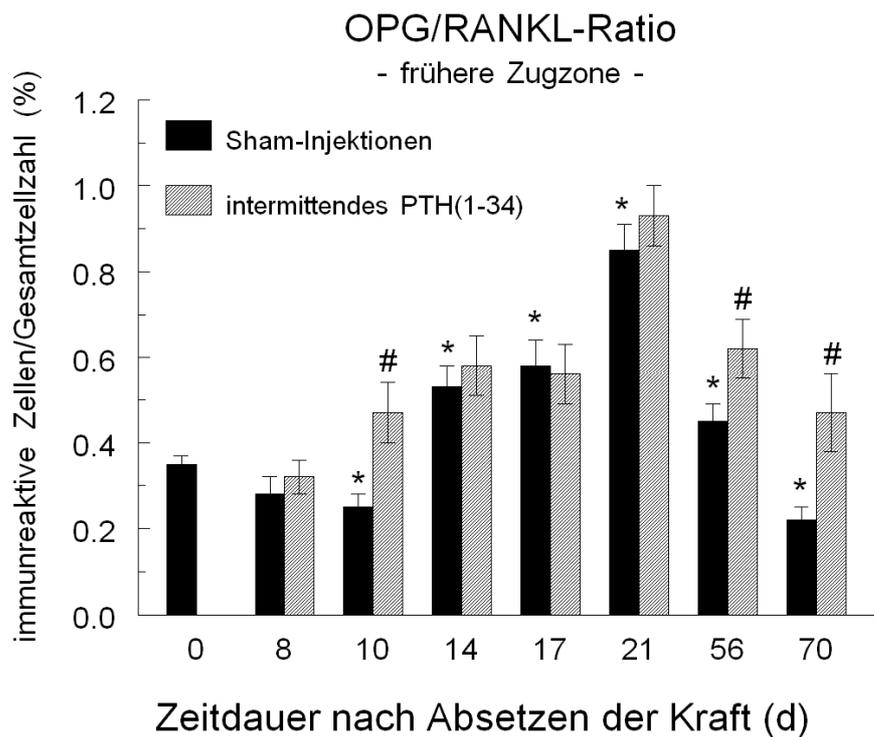


Abb. 10: OPG/RANKL-Verhältnis in der ehemaligen Zugzone (Zahndrittel)

Zeitlicher Verlauf der Entwicklung des Verhältnisses OPG/RANKL in der ehemaligen Zugzone nach Absetzen der kieferorthopädischen Kraft und Einfluss von PTH auf diesen Parameter. Ein jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM für 5 Tiere pro Gruppe und dabei jeweils für 5 ausgewertete Präparate pro Tier, was einer Gesamtsumme von 15 Einzelwerten pro Gruppe entspricht. * $P < 0.05$, experimentelle Gruppe vs. Kontrolle (Tag 0); # $P < 0.05$, PTH-stimulierte Gruppe vs. Sham-injizierte Gruppe nach demselben Beobachtungszeitraum.

Die Prä-Adsorptions- und Negativkontrollen zeigten keine Immunreaktivität für OPG und RANKL.

Auch die Positivkontrollen reagierten wie erwartet.

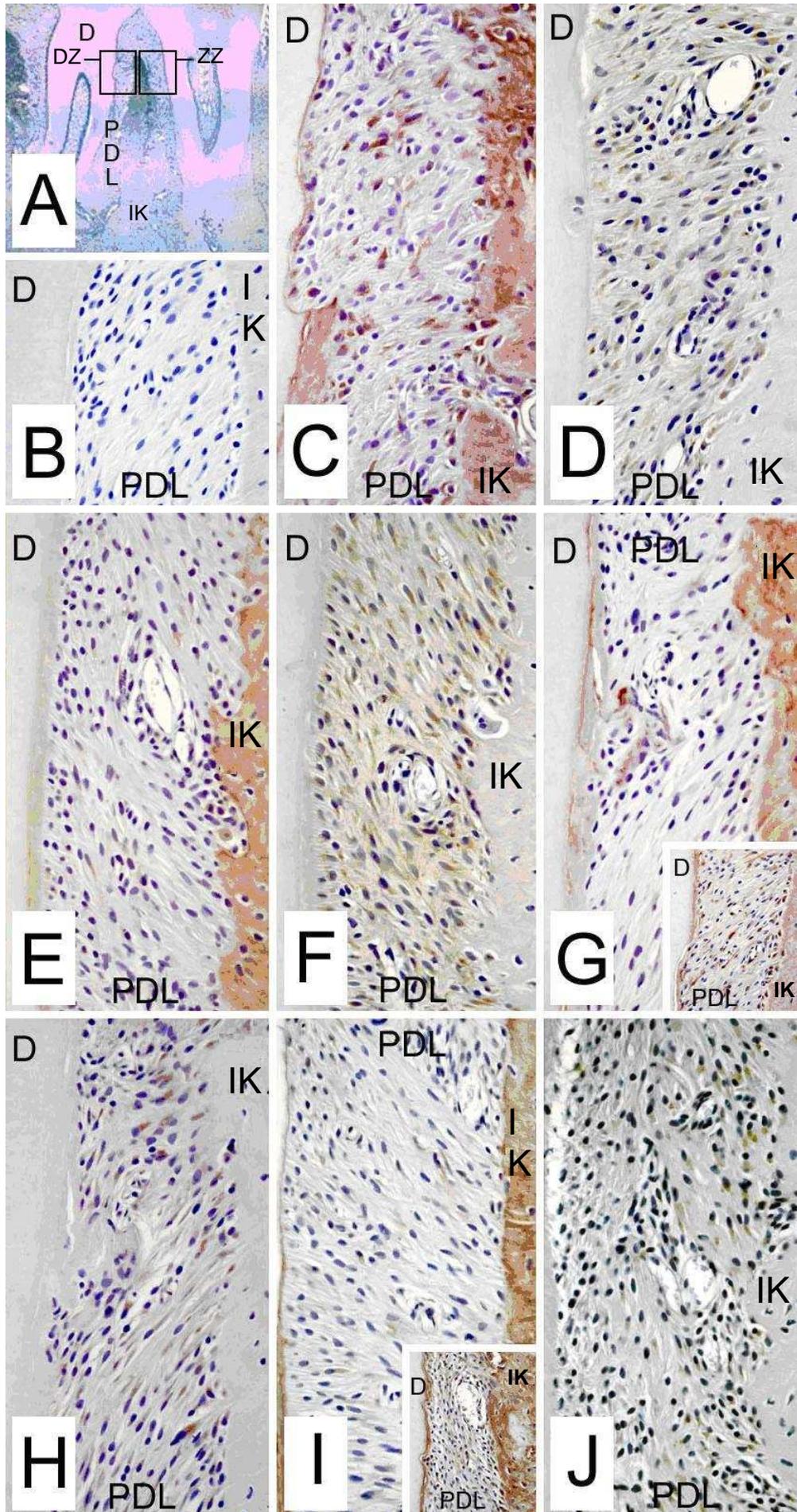


Abb. 11: *Ausgewählte immunreaktive Zellen für OPG und RANKL zu unterschiedlichen Zeiten und an verschiedenen Lokalisationsstellen*

- A:** Wurzeloberfläche der Ratte mit ehemaliger Druck -und Zugzone bei einer orthodontisch induzierten Zahnbewegung; HE-Färbung; 100-fache Vergrößerung
- B:** Negativkontrolle mit Weglassen des Primärantikörpers und der Verwendung von TBS/ BSA; 200-fache Vergrößerung
- C:** Tag 14; OPG-Immunfärbung nach Absetzen der Kraftapplikation; DAB-Färbung; 400-fache Vergrößerung
- D:** Tag 14; Immunhistochemische Färbung für RANKL in der ehemaligen Druckzone; DAB-Färbung; 200-fache Vergrößerung
- E:** Tag 10; immun-reaktive Zellen für OPG in der ehemaligen Zugzone; DAB- Färbung; 200-fache Vergrößerung
- F:** Tag 10; Entdeckung von RANKL in der ehemaligen Zugzone; DAB- Färbung; 200-fache Vergrößerung
- G:** Tag 70; immunhistochemische Färbung für OPG (innen: PTH-behandelte Probe) und für
- H:** RANKL in der Spätphase der Reparatur der ehemaligen Druckzone; DAB-Färbung; 200-fache Vergrößerung
- I:** Tag 21; OPG-Färbung in der ehemaligen Zugzone (innen: PTH-behandelte Probe); DAB-Färbung; 200-fache Vergrößerung
- J:** Tag 21; positive immunreaktive Zellen für RANKL in der ehemaligen Zugzone; DAB- Färbung; 200-fache Vergrößerung

D: Dentin; DZ: Druckzone; ZZ: Zugzone; PDL: Parodontalligament; IK: interradikulärer Knochen

4. Diskussion

4.1 Allgemein

In der vorliegenden Studie wurde die Rolle der Parodontalligament (PDL)-Zellen bei dentalen und alveolären Remodeling- und Reparaturprozessen nach biomechanischer Belastung im Rattenmodell untersucht. Zusätzlich sollte überprüft werden, in wieweit OPG und RANKL an der Regulation der Reparaturvorgänge beteiligt sind und ob sich die parodontalen Reparaturvorgänge durch eine intermittierende PTH-Stimulation positiv beeinflussen lassen.

4.2 Überlegungen zur Methodik

In dieser Studie wurden die histologischen Veränderungen während der Früh- und Spätphase der parodontalen Reparatur nach orthodontisch induzierter Wurzelresorption in einem Rattenmodell untersucht. Diese histologischen Charakteristika korrelierten mit der zeitabhängigen Verteilung der OPG- und RANKL-Expression durch die PDL-Zellen überein. Das Verhältnis dieser beiden Proteine während des Remodelings des Knochens verschiebt sich durch eine intermittierende PTH(1-34)-Applikation zu Gunsten der Hartgewebsformation.

Der Grund für die Verwendung von Ratten als Versuchstiere ist, dass sie sich in Gefangenschaft gut vermehren und einfach zu halten sind. Zudem ähneln die parodontalen Umbauvorgänge der Ratte denen des Menschen, und so werden diese Tiere oft für die Untersuchung zahnmedizinischer Fragestellungen eingesetzt (Hoyer et al., 1989; Stosser et al., 1990).

Der immunhistochemische Nachweis von OPG und RANKL mittels der indirekten Immunperoxidase-Methode diente der besseren Darstellung der Proteine und ihrer Lokalisation im Gewebe. Diesem Vorteil steht jedoch eine schlechtere Quantifizierbarkeit gegenüber. Andere Verfahren geben zwar Information über die Menge der Proteine, jedoch nicht über ihre Lokalisation.

Die DAB-Färbung, welche für die Visualisierung des Antigens und die Hämalaunfärbung, die als Gegenfärbung diente, zeichnen sich insbesondere durch ihre Einfachheit und gute Standardisierbarkeit aus und bieten darüber hinaus gute Differenzierungsmöglichkeiten durch bräunliche- und bläuliche Färbeprodukte.

Mit Hilfe der Positivkontrollen konnte die Spezifität der Immunreaktionen dargestellt und mit den Negativkontrollen wiederum unspezifische Immunreaktionen ausgeschlossen werden.

Extrazelluläre Reaktionen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da sich zum einen zelluläre Reaktionen durch die immunhistochemischen Nachweise besser darstellen lassen und zum anderen die extrazelluläre Reaktion schwieriger zu quantifizieren ist.

Zum Einscannen der Präparate war das Lichtmikroskop mit dem Silverfast-Programm sehr gut geeignet, da die Bearbeitung der eingescannten Bilder unkompliziert und schnell durchzuführen war. Die Quantifizierung der immunreaktiven Zellen erfolgte nach Einteilung in Zahn-, PDL- und Knochendrittel manuell, da bei computergestütztem Verfahren auch extrazelluläre Reaktionen im Knochen und Zement als positiv identifiziert wurden, die wiederum manuell ausgeschlossen werden mussten.

4.3 Ergebnisdiskussion

Vor der Diskussion der Ergebnisse soll zunächst eine technische Überlegung angesprochen werden. Das Beenden der Kraftapplikation am 5.Tag könnte zu einer Umkehr der Kraft geführt haben. Dadurch würden Zellen, die anfänglich einer Druckkraft ausgesetzt waren, nun leichten Zugkräften exponiert und umgekehrt. Nach 5 Tagen kontinuierlicher Kraftapplikation hat sich jedoch in der Druckzone eine hyaline Zone ausgebildet. Diese ist durch eine Nekrose und das Fehlen von Zellen, die auf eine solche Umkehrung der Krafrichtung reagieren könnten, charakterisiert. Deshalb sollte diese Überlegung der oben genannten Kraftumkehr eigentlich nur für die ehemalige Zugzone von Bedeutung sein. In diesem Fall könnte sich die Umkehr der Krafrichtung tatsächlich störend auf die Reparaturprozesse in der Frühphase auswirken. Dennoch ist diese Störung nur ausschlaggebend für die ersten Tage

nach Beenden der Kraftapplikation und nicht für langfristige Remodeling -und Reparaturprozesse, welche im Fokus dieser Studie lagen.

4.3.1 Morphologie

Nach Absetzen der Kraft (Tag 0) nahm die Anzahl der Odontoklasten kontinuierlich ab und es wurden am Tag 14 nur noch vereinzelte resorptive Zellen in den Resorptionslakunen beobachtet. Auch die Tartrat-resistenten saure Phosphatase-positiven (TRAP) Zellen wurden in den Lakunen nur bis zum 21. Tag beobachtet.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe 1.1.2), tritt bei den Odontoklasten nach der Aktivitätsphase eine Ruhephase ein (Väänänen und Zhao, 2002), die durch einen Beginn des Zellunterganges und Ablösung (Detachment) von resorbierten Oberflächen (Sahara et al., 1996) charakterisiert ist. Nach Ausübung ihrer Funktion unterliegen die Osteoklasten nach Noxon et al. (2001) der Apoptose. Dieselbe Beobachtung haben wir in dieser Studie auch gemacht. Parallel zu der Resorption wurden am 10. Tag runde-kubische Zementoblasten-ähnliche Reparaturzellen auf dem Boden der Resorptionslakunen detektiert, die sich im Laufe des Reparaturprozesses vermehrten. Diese Beobachtungen deuten, wie auch nach Sismanidou et al. (1996), auf eine aktive Resorption und Regeneration in den Lakunen zur gleichen Zeit mit fließendem Übergang von der Wurzelresorption zur frühen Zementreparatur. Eine Dekompression des PDL führt demnach zum Beginn der Reparatur des Zementes. 17 Tage nach der Kraftabsetzung kam es zu einer vermehrten parallelen Anordnung der PDL-Zellen zwischen den Lakunen der Wurzeloberfläche sowohl mit dem Alveolarknochen als auch mit den perivaskulären Bereichen. Dies könnte wiederum bedeuten, dass dieser Zufluss an Zellen in Richtung der Lakunen eine Einwanderung der PDL- oder deren Vorläuferzellen darstellt und diese sich später auf dem Boden der Resorptionslakunen zu Zementoblasten differenzieren (Bosshardt, 2005; Foster et al., 2007). Anhand einer S100-positiven Immunreaktion (Jäger et al., 2008) konnten diese einströmenden Zellpopulationen als reparative Zellen und als Vorläuferzellen mit fibroblastischen Eigenschaften klassifiziert werden (Ryan et al., 2003).

In dieser Studie wurde anhand des Rattenmodells kein Zusammenhang der mitogenen Aktivitätszunahme in den Resorptionslakunen mit den beobachteten

Reparaturprozessen festgestellt, wie in eigenen Versuchen durch die immunhistochemische Färbung für den Proliferationsmarker 'Proliferating Cell Nuclear Antibody' (PCNA) nachgewiesen wurde (nicht gezeigte Daten). Der PCNA-Antikörper zeigte in erster Linie Immunreaktivität in den PDL-Zellen der ehemaligen Zugzone. Im Vergleich dazu war die Immunreaktivität für PCNA in der ehemaligen Druckzone lediglich vereinzelt in den PDL-Zellen, in einigen Mallassez'schen Epithelresten sowie in perivaskulären Zellen im PDL gegeben. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Usuda et al. (2004) überein, die ebenfalls über eine geringe proliferative Aktivität in PDL-Zellen der Ratte nach kieferorthopädisch induzierten Wurzelresorptionen berichteten.

Unsere histologischen Befunde zeigen den Zufluss von Zellen aus einer bestimmten Entfernung in die Resorptionslakunen. Diese Beobachtung unterstützt die Schlussfolgerung, dass die Zellen, die auf eine PTH-Stimulierung im PDL proliferativ reagieren, sich später während der Migration in den Lakunen weiter differenzieren.

Mit Beginn der Spätphase der Reparatur am 21. Tag wurde eine dünne Schicht azellulären Reparaturzements auf dem Boden der Lakunen nachweisbar, welche auch in anderen Rattenmodellen zu beobachten war (Sismanidou und Lindskog, 1995; Sismanidou et al., 1996). Von diesem Zeitpunkt an waren keine TRAP-positiven Zellen mehr vorhanden, was charakteristisch für die Spätphase der Reparatur ist.

Die immunhistochemische Färbung visualisierte die Lokalisation der PTH-Rezeptoren auf den Osteoblasten und PDL-Zellen und nicht an Zementoblasten oder anderen Reparaturzellen (Jäger et al., 2008). Aus diesem Grund könnte geschlossen werden, dass PTH die Differenzierung der PDL-Zellen zu Osteoblasten fördert, aber keinen Einfluss auf deren sekretorische Aktivität während der Zement- bzw. Reparaturzementbildung hat. Da die Rate der Reparaturzementbildung geringer als die der Knochenbildung war, könnte der PTH-Effekt auf die Zementbildung innerhalb einer vernünftigen Zeitspanne schwierig zu prüfen sein. Unsere erhobenen Daten verstärken die Hypothese, dass PTH durch anabole Effekte den Remodelingprozess des Zahnhartgewebes unterstützt.

4.3.2 Histomorphometrie

Die tendenzielle Abnahme der OPG/RANKL-Ratio in der ehemaligen Druckzone (Zahndrittel) während der Frühphase der Reparatur ist auf einen Anstieg der RANKL- bei konstanter OPG-Expression zurückzuführen. Dieser Anstieg der RANKL-Expression wird für die Resorption der hyalinen Zonen verantwortlich gemacht. Kanzaki et al. (2002) und Garlet et al. (2008) berichteten ebenfalls in ihren *in vitro* Studien über den Anstieg der RANKL-Expression bei unveränderter OPG-Expression nach einer Druckbelastung.

Eine intermittierende PTH(1-34)-Administration stimulierte die Abnahme des OPG/RANKL-Verhältnisses in dieser Frühphase signifikant. Auch Buxton et al. (2004) erzielten ähnliche Ergebnisse und stellten die Hypothese auf, dass eine intermittierende PTH(1-34)-Behandlung die Reifung und Aktivität in Osteoblasten direkt und die Osteoklastenaktivität indirekt stimuliert, wodurch wiederum die Balance der Knochenresorption bzw. -formation reguliert wird.

Die Spätphase der ehemaligen Druckzone war durch die kontinuierliche aber nicht signifikante Abnahme des OPG/RANKL-Verhältnisses gekennzeichnet.

Im Gegensatz zur ehemaligen Druckzone kam es in der Zugzone bis zum 21. Tag zu einem kontinuierlichen Anstieg der OPG-Expression, wohingegen die RANKL-Expression abnahm und somit das OPG/RANKL-Ratio wieder anstieg. Der Grund für die unterschiedliche Expression an RANKL und OPG ist das Vorhandensein von unterschiedlichen Mediatoren in den jeweiligen Druck- bzw. Zugzonen des PDL während der Zahnbewegung (Yoshimatsu et al., 2006; Dudic et al., 2006).

Um ein Gewebsremodeling einzuleiten sind pro- und antiinflammatorische Zytokine erforderlich (Kobayashi et al., 2000; Conti et al., 2003). Zu den proinflammatorischen Zytokinen gehört u.a. TNF- α , welches gehäuft in der gingivalen crevikulären Flüssigkeit während orthodontischer Zahnbewegung (Lowney et al., 1995) und bei der Maus auf der Druckseite (Yoshimatsu et al., 2006) vorkommt. Nach Garlet et al. (2007) waren TNF- α vermehrt auf der Druckseite und OPG, IL-10 und Osteocalcin auf der Zugseite des menschlichen PDL nach orthodontischer Zahnbewegung lokalisiert. Vermehrtes Vorhandensein von TNF- α auf der Druckseite führte zur

erhöhten katabolen Aktivität durch Hochregulation von RANKL und Matrix-Metalloproteinase (MMP) mit anschließender Knochenresorption.

Interleukin-10 (IL-10) und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) gehören zu der Gruppe der anti-inflammatorischen Zytokine. IL-10 hemmt die Knochenresorption durch Hochregulation der OPG- und Hemmung der RANKL-Expression (Liu et al., 2006; Zhang und Teng, 2006). TGF- β wurde vor der mechanischen Belastung sowohl auf der Druck- als auch auf der Zugseite lokalisiert, die auf mechanische Belastung mit anabolen Effekten im Sinne von Erhöhung der Knochenformation und extrazellulären Matrix (ECM) reagierte. Andere Untersuchungen bestätigten ebenso das Vorhandensein von TGF- β in den Druck- und Zugzonen vor der mechanischen Belastung. Nach der Belastung nahm TGF- β in den Osteoblasten der Zugzone und in den Osteoklasten der Druckzone zu (Kobayashi et al., 2000b; Jäger et al., 2005).

Die PTH(1-34)-Administration übte in der Zugzone während der Frühphase der Reparatur keine signifikante Wirkung auf das OPG/RANKL-Verhältnis aus. Die anabolen Effekte des PTH wurden in mehreren Tierversuchen und in Zellkulturen mit Differentiation und Apoptose der Osteoblasten nachgewiesen (Bilezikian et al., 2005; Masi und Brandi, 2005). Auch andere ähnliche zelluläre Antworten in den PDL-Zellen sind aus der Literatur bekannt (Lossdörfer et al., 2005, 2006).

Bis zum Ende der Spätphase der Reparatur blieb die OPG/RANKL-Ratio erhöht. Mögliche Diskrepanzen zwischen *in vivo* und *in vitro* Studien könnten in der Zeitdauer der PTH(1-34)-Applikation und einer teilweise nicht getroffenen Unterscheidung zwischen einer Früh- und Spätphase der Reparatur begründet liegen. Sato et al. (2004) hatten z.B. stärkere Effekte des PTH erst nach drei Monaten festgestellt.

Eine intermittierende PTH(1-34)-Administration übte während der Frühphase der Reparatur in den beiden Zonen keine nennenswerten Effekte aus. Umso mehr erhöhte es das OPG/RANKL-Verhältnis in der Spätphase, als eine Reparatur im Bereich der Resorptionslakunen zu beobachten war. Der PTH(1-34)-Effekt war in der ehemaligen Druckzone ausgeprägter als in der ehemaligen Zugzone. In einigen Studien wurde ebenso über die Effekte einer intermittierenden PTH-Applikation von drei bis sechs Monaten bei an Osteoporose erkrankten Frauen und bei der Frakturheilung berichtet (Reeve et al., 1976; Sone et al., 1995; Barnes et al., 2008).

Ivanovski et al. (2007) berichtete ebenfalls in seiner Studie über die Stimulation der OPG-Expression nach einer gesteuerten Gewebsregeneration beim Menschen.

In der vorliegenden Studie wurde der anabole Effekt des PTH auf die OPG-Expression in der Spätphase der Reparatur sowohl in der Druck- als auch in der Zugzone beobachtet. Dies wiederum führte durch die vermehrte Produktion von OPG gegenüber RANKL zu einer Veränderung des OPG/RANKL-Verhältnisses. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine intermittierende PTH-Applikation in der Spätphase zu einer Unterstützung dentaler und alveolärer Reparaturprozesse führen könnte. Die Zunahme der OPG-Expression könnte die anabolen Reparaturvorgänge durch Hemmung der Osteoklasten und Odontoklasten unterstützen (Lossdörfer et al., 2002; Fukushima et al., 2003) und damit die Balance zwischen Gewebsresorption und -formation zu Gunsten der Hartgewebsformation verlagern.

Die vorliegenden Daten liefern weitere Unterstützung für die potenzielle Rolle der PDL-Zellen bei der Regulation von Zahnwurzelresorptionen und -reparatur über PTH(1-34)-induzierte Veränderungen der PDL-Zellproliferation und ihres Überlebens sowie ihrer Differenzierung zu Zementoblasten oder Osteoblasten (Lossdörfer et al., 2005, 2006). Es ist offensichtlich, dass Veränderungen im Mikromilieu bezüglich der Produktion von OPG und RANKL durch PDL-Zellen nicht nur Einfluss auf die Zellen nehmen würde, die zur Reparatur der Zahnwurzel befähigt sind, sondern gleichzeitig auch Zellen in unmittelbarer Nähe des Alveolarknochens beeinflussen können.

Ebenso bildeten sich nach einer orthodontisch ausgeübten Kraft Resorptionsslakunen nicht nur an den Wurzel-, sondern auch an den Knochenoberflächen. Folglich wird die Regulierung der Umbauprozesse im Alveolar- bzw. interradikulären Knochen durch die PTH(1-34)-induzierten Veränderungen des OPG/RANKL-Verhältnisses ebenfalls begünstigt. Eine Beteiligung von OPG und RANKL an der Regulation von Parodontitis-assoziiertem Alveolarknochenverlust wurde bereits demonstriert (Cochran, 2008).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden in einem Rattenmodell die histologischen Veränderungen und die möglichen Effekte einer intermittierenden Parathormon(1-34)-Stimulation (PTH) während der Früh- und Spätphase der parodontalen Reparatur nach orthodontisch induzierter Wurzelresorption untersucht.

Dazu wurden bei insgesamt 70 männlichen Tieren, die nach Absetzen einer kieferorthopädischen Kraft entweder eine intermittierende PTH(1-34)-Stimulation oder Sham-Injektionen erhielten, die histologischen Veränderungen mit zeitabhängigen distinkten Expressionsmustern von Osteoprotegerin (OPG) und Receptor Activator of Nuclear Faktor-kappaB Ligand (RANKL) durch Parodontalligament-Zellen (PDL) in den ehemaligen Druck- und Zugzonen der Zahnbewegung korreliert. Dabei kamen histologische, immunhistochemische und histomorphometrische Analysen zum Einsatz.

Es konnte gezeigt werden, dass die Balance zwischen den als zentral-regulatorisch identifizierten Molekülen des Hartgewebsremodelings OPG und RANKL durch eine intermittierende PTH(1-34)-Administration, die sich bereits in zahlreichen Zellkulturexperimenten als auch in Tierversuchen und Studien am Menschen als potenziell anabol erwiesen hat, in der Spätphase der Reparatur zugunsten einer Unterstützung der Reparatur von Hartgewebe modifiziert werden kann.

Die erhobenen Daten deuten auf eine regulatorische Rolle von PDL-Zellen bei parodontalen Reparaturprozessen hin, indem sie das lokale Mikromilieu modifizieren. Des Weiteren unterstützen die Ergebnisse die Hinweise bezüglich des anabolen Potenzials einer intermittierenden PTH-Administration, um diese Reparaturprozesse zu unterstützen.

6. Literaturverzeichnis

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

Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B (RANK) receptors. *J Exp Med* 1999; 190: 1741-1754

Aubin JE, Bonnellye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 2000; 11: 905-913

Babich M, Choi H, Johnson RM, King KL, Alford GE, Nissenson RA. Thrombin and parathyroid hormone mobilize intracellular calcium in rat osteosarcoma cells by distinct pathways. *Endocrinology* 1991; 129: 1463-1470

Barka T, Anderson P. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium as a coupler. *J Histochem Cytochem* 1962; 10: 741-753

Barnes GL, Kakar S, Vora S, Morgan EF, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Stimulation of fracture-healing with systemic intermittent parathyroid hormone treatment. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 2008; 1: 120-127

Basdra EK, Komposch G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. *Eur J Orthod* 1997; 19: 615-621

Benenati FW. Root resorption: Types and treatment. *Gen Dent* 1997; 1:42-45

Bilezikian JP, Rubin MR, Finkelstein JS. Parathyroid hormone as an anabolic therapy for women and men. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 41-49

Blomlöf L, Lindskog S. Quality of periodontal healing II: Dynamics of reparative cementum formation. *Swed Dent* 1994; 18: 131-138

Bosshardt DD, Schroeder HE. How repair cementum becomes attached to be resorbed roots of human permanent teeth. *Acta Anat* 1994; 150: 253-266

Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontology* 2000 1997; 13: 41-75

Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res* 2005; 84: 390-406

Brent GA, LeBoff MS, Seely EW, Conlin PR, Brown EM. Relationship between the concentration and rate of change of calcium and serum intact parathyroid hormone levels in normal humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 944-950

Brezniak N, Wasserstein A. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part I: The basic science aspects. *Angle Orthod* 2002a; 72: 175-179

Brudvik P, Rygh P. The initial phase of orthodontic root resorption incident to local compression of the periodontal ligament. *Eur J Orthod* 1993a; 15: 249-263

Brudvik P, Rygh P. Non-clast cells start orthodontic root resorption in the periphery of hyalinized zones. *Eur J Orthod* 1993b; 15: 467-480

Brudvik P, Rygh P. Transition of orthodontic root resorption-repair sequence. *Eur J Orthod* 1995a; 17: 177-188

Brudvik P, Rygh P. The repair of orthodontic root resorption: an ultrastructural study. *Eur J Orthod* 1995b; 17:189-198

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12: 1260-1268

Buxton EC, Yao W, Lane NE. Changes in serum receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, and interleukin-6 levels in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with human parathyroid hormone (1-34). *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3332-3336

Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest* 1989; 83: 60-65

Chou AM, Sae-Lim V, Lim T et al. Culturing and characterization of human periodontal ligament fibroblasts- a preliminary study. *Mater Sci Eng* 2002; 20: 77-83

Civitelli R, Reid IR, Westbrook S, Avioli LV, Hruska KA. PTH elevates inositol polyphosphates diacylglycerol in a rat osteoblast-like cell line. *Am J Physiol* 1988; 255: E660-E667

Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol* 2008; 79: 1569-1576

Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Di Giocchino M, Barbacane RC, Castellani ML, Felaco M, Boucher W, Letourneau R, Theoharides TC. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett* 2003; 86: 123-129

Davidovitch Z, Musich D, Doyle M. Hormonal effects on orthodontic movement in cats-a pilot study. *Am J Orthod* 1972; 62: 95-96

Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 416-422

Formigli L, Conti A, Lippi D. "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva Med* 2004; 95: 159-164

Foster BL, Popowics TE, Fong HK, Somerman MJ. Advances in defining regulators of cementum development and periodontal regeneration. *Curr Top Dev Biol* 2007; 78: 47-126

Fu Q, Jilka R, Manolagas C, O'Brien C. Parathyroid hormone stimulates Receptor Activator of Nuclear factor- κ B Ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 2002; 277: 48868-48875

Fukushima H, Kajima H, Takada K, Okamoto F, Okabe K. Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 346-352

Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 1998; 188: 997-1001

Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci* 2007; 115: 355-362

Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha FD, Garlet GP. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine* 2008; 42: 330-335

Genuth SM. Endocrine regulation of calcium and phosphate metabolism. In: Berne RM, Levy MN, eds. *Physiology*. St. Louis: Mosby, 1998; 848-871

Goltzmann D. Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with down-stream signaling pathways: exceptions that provide the rules. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 173-177

Götz W. Wurzelresorptionen- Grundlagen eines bedrohlichen Symptoms. Quintessenz 2003a; 7: 725-734

Götz W. Die Pathogenese der Wurzelresorptionen: Neue Ansätze für Therapien. Quintessenz 2003b; 8: 815-826

Götz W, Kunert D, Zhang D et al. Insulin-like growth factor system components in the periodontium during tooth root resorption and early repair processes in the rat. Eur J Oral Sci 2006; 114: 318-327

Göz G. Zahnbewegung. In: Diedrich P, ed. Praxis der Zahnheilkunde, Kieferorthopädie II und Therapie. München-Jena: Urban und Fischer, 2000: 27-45

Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin Ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. Endocrinology 1999; 140: 4383-4389

Hoffmann-Axthelm W. Resorption der Wurzel. In: Hoffmann-Axthelm W, ed. Lexikon der Zahnmedizin. Berlin: Quintessenz-Verlag 2000; 638

Hoyer I, Gangler P, Krehan F, Nimela S, Weinert W. Biological testing and clinical assessment of composite restorations. Dtsch Zahnarztl 1989; Z 44: 100-105

Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, Nissenson RA. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. J Bone Miner Res 2004; 19: 235-244

Iida-Klein A, Zhou H, Lu S, Levine LR, Ducayen-Knowles M, Dempster DW, Niewes J, Lindsay R. Anabolic action of parathyroid hormone is skeletal site specific at the tissue and cellular levels in mice. J Bone Miner Res 2002; 17:808-816

Ishizuya T, Yokose S, Hori M, Noda T, Suda T, Yoshiki S. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1997; 99: 2961-2970

Ivanovski S, Lichanska AM, d'Aniello E et al. Gene expression profiling of cells involved in periodontal regeneration. *Tissue Eng* 2007; 13: 393-404

Jäger A, Zhang D, Kawarizadeh A, Tolba R, Braumann B, Lossdörfer S, Götz W. Soluble cytokine receptor treatment in experimental orthodontic tooth movement in the rat. *Eur J Orthod* 2005; 27: 1-11

Jäger A, Kunert D, Friesen T, et al. Cellular and extracellular factors in early root resorption repair in the rat. *Eur J Orthod* 2008; 30: 336-345

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1999; 104: 439-446

Juppner H. Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient family of G protein coupled receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3: 371-378

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by Receptor Activator of NF- κ B Ligand up-regulation via prostaglandin E₂ synthesis. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 210-225

Katsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ et al. Localization of RANKL (Receptor Activator of NF κ B Ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 1999; 25: 525-534

Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases* 2002; 8: 147-159

Kawasaki K, Takahashi T, Yamaguchi M, Kasai K. Effects of aging on RANKL and OPG levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* 2006; 9: 137-142

Kawane T, Takahashi S, Saitoh H, Okamoto H, Kubodera N, Horiuchi N. Anabolic effects of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on the mandibles of osteopenic ovariectomized rats with maxillary molar extraction. *Horm Metab Res* 2002; 34: 293-302

Kobayashi Y, Hashimoto F, Miyamoto H, Kanaoka K, Miyazaki-Kawashita Y, Nakashima T, Shibata M, Kobayashi K, Kato Y, Sakai H. Force-induced osteoclast apoptosis in vivo is accompanied by elevation in transforming growth factor beta and osteoprotegerin expression. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 1924-1934

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timmes E, Capparelli C, Morony S, Oliviera-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397: 315-323

Lacey DL, Timms E, Tan HL et al. Osteoprotegerin (OPG) Ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 163-176

Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast like cell formation. *Endocrinology* 1999; 140: 3552-3561

Liu D, Yao S, Wise GE. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenetic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 42-49

Locklin RM, Khosla S, Turner RT, Riggs BL. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem* 2003; 89: 180-190

Lossdörfer S, Götz W, Jäger A. Immunohistochemical localization of Receptor Activator of NF- κ B (RANK) and its Ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tiss Int* 2002; 71: 45-52

Lossdörfer S, Götz W, Jäger A. PTH(1-34) affects osteoprotegerin production in human PDL cells in vitro. *J Dent Res* 2005; 84: 634-638

Lossdörfer S, Götz W, Jäger A. Parathyroid hormone modifies human periodontal ligament cell proliferation and survival in vitro. *J Periodontal Res* 2006; 41: 519-526

Lossdörfer S, Götz W, Rath-Deschner B, et al. Parathyroid hormone(1-34) mediates proliferative and apoptotic signaling in human periodontal ligament cells in vitro via protein kinase C-dependent and protein kinase A-dependent pathways. *Cell Tissue Res* 2006; 325: 469-479

Lossdörfer S, Stier S, Götz W, Jäger A. Maturation-state dependent response of human periodontal ligament cells to an intermittent parathyroid hormone exposure in vitro. *J Periodont Res* 2006; 41: 62-72

Low E, Zoellner H, Kharbanda OP, Darendeliler MA. Expression of mRNA for osteoprotegerin and Receptor Activator of NF κ B Ligand (RANKL) during root resorption induced by the application of heavy orthodontic forces on rat molars. *Am J Dentofacial Orthop* 2005; 128: 497-503

Lowney JJ, Norton LA, Schafer DM, Rossomando EF. Orthodontic forces increase tumor necrosis factor alpha in the human gingival sulcus. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995; 108: 519-524

Ma YL, Cain R, Halladay D, Yang X, Zeng Q, Miles R, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia J. Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology* 2001; 142: 4047-4054

Masi L, Brandi ML. Molecular, biochemical and cellular biology of PTH anabolic action. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 37-40

Morley P, Whitfield JF, Willick GE. Parathyroid hormone: an anabolic treatment for osteoporosis. *Curr Pharm Des* 2001; 7: 671-687

Ne RF, Witherspoon DE, Gutman JL. Tooth resorption. *Quintessenz Int* 1999; 30: 9-25

Nohutcu RM, Somerman MJ, McCauley LK. Dexamethasone enhances the effect of parathyroid hormone on human periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 1995; 56: 571-577

Noxon SJ, King GJ, Gu G et al. Osteoclast clearance from periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001; 120: 466-476

Patridge NC, Walling HW, Bloch SR, Omura TH, Chan PT, Pearman AT, Chou WY. The regulation and regulatory role of collagenase in bone. *Crit Rev Eukaryot. Gene Expr.* 1996; 6: 15-27

Philbrick WM, Dreyer BE, Nakchbandi IA, Karaplis AC. Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 11846-11851

Quinn JMW, Horwood NJ, Elliot J, Gillespie MT, Martin TJ. Fibroblastic stromal cells express Receptor Activator of NF κ B Ligand and support osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 1459-1466

Quyang H, McCauley L, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Somerman M. Response of immortalized murine cementoblasts/periodontal ligament cells to parathyroid hormone related protein in vitro. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 293-303

Reeve J, Hesp R, Williams D et al. Anabolic effect of low doses of a fragment of human parathyroid hormone on the skeleton in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1976; 1: 1035-1038

Reid IR, Civitelli R, Halstead LR, Avioli LV, Hruska KA. Parathyroid hormone acutely elevates intracellular calcium in osteoblastlike cells. *Am J Physiol* 1987; 253: E45-E51

Rosen CJ, Bilezikian JP. Anabolic therapy for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 957-964

Ryan DG, Taliana L, Sun L et al. Involvement of S100A4 in stromal fibroblasts of the regenerating cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4255-4262

Sahara N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K. Cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of human deciduous teeth: An ultrastructural and cytochemical study. *Anat Rec* 1996; 244: 33-49

Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M, Suginaka H, Kurihara H. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1486-1492

Sato M, Vahle J, Schmidt A, Westmore M, Smith S, Rowley E, Ma LJ. Abnormal bone architecture and biomechanical properties with near-lifetime treatment of rats with PTH. *Endocrinology* 2002; 143: 3230-3242

Sato M, Westmore M, Ma YL et al. Teriparatide [PTH(1-34)] strengthens the proximal femur of ovariectomized nonhuman primates despite increasing porosity. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 623-629

Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology* 2000; 24: 73-98

Schiller PC, D'ippolito G, Roos BA, Howard GA. Anabolic or catabolic responses of MC3T3E1 osteoblastic cells to parathyroid hormone depend on time and duration of treatment. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1504-1512

Schroeder HE. *Orale Strukturbiologie. Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks.* Stuttgart: Thieme-Verlag, 2000

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-319

Sismanidou C, Lindskog S. Spatial and temporal repair patterns of orthodontically induced surface resorption patches. *Eur J Oral Sci* 1995; 103: 292-298

Sismanidou C, Hilliges M, Lindskog S. Healing of the root surface-associated periodontium: an immunohistochemical study of orthodontic root resorption in man. *Eur J Orthod* 1996; 18: 435-444

Sone T, Fukunaga M, Ono S et al. A small dose of human parathyroid hormone(1-34) increased bone mass in the lumbar vertebrae in patients with senile osteoporosis. *Miner Electrolyte Metab* 1995; 21: 232-235

Stanislaus D, Yang X, Liang JD, Wolfe J, Cain RL, Onyia JE, Falla N, Marder P, Bidwell JP, Queener SW, Hock JM. In vivo regulation of apoptosis in metaphyseal trabecular bone of young rats by synthetic human parathyroid hormone (1-34) fragment. *Bone* 2000; 27: 209-218

Stosser L, Schulz L, Schulz E, Kunzel W. The plaque- and caries-inhibiting efficacy of an Amine Fluoride/Tin Fluoride combination in an animal experiment on rats. *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 1990; 78: 691-698

Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, Rosenblatt M, Nissenson RA. Parathyroid hormone like protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin. Invest* 1987; 80: 1803-1807

Takahashi N, Udagawa N, Takami M, Suda T. Cells of bone- osteoclast generation. *Principles of Bone Biology*, 2nd Edition 2002, Volume 1: 109-126

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-1508

Tenorio D, Hughes FJ. An immunohistochemical investigation of the expression of parathyroid hormone receptors in rat cementoblasts. *Archs Oral Biol* 1996; 41: 299-305

Thilander B, Rygh P, Reitan K. Tissue reactions in orthodontics. In: Graber TM, Vanarsdall RL, ed. *Orthodontics: Current Principles and Techniques*. St. Louis-Philadelphia-London-Sydney-Toronto: Mosby, 2000: 117-192

Usuda J, Hashimoto S, Enokiya Y, Inoue T, Shimono M. Proliferative activities of epithelial and connective tissue cells in the rat periodontal regeneration using argyrophilic nucleolar organizer regions staining. *J Periodontol Res* 2004; 39: 175-187

Väänänen K, Zhao H. Osteoclast function. Biology and mechanisms. In: Principles of bone biology. 2nd ed. Academic Press 2002; 127-129

Waldo CM, Rothblatt JM. Histologic response to tooth movement in the laboratory rat; procedure and preliminary observations. J Dent Res 1954; 33: 481-486

Weiland F. Die Steuerung der kieferorthopädischen Zahnbewegung. In: Weiland F, ed. Kontinuierliche vs. nicht-kontinuierliche Kräfte in der Kieferorthopädie. Die Wirkung auf initiale Zahnbewegung und Wurzelresorption. Berlin: Quintessenz-Verlag, 2001: 9-72

Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Barlett 3rd FS, Frankel WN, Lee SY, Cho Y. TRANCE is a novel Ligand of the Tumor Necrosis Factor Receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. J Biol Chem 1997a; 272: 25190-25194

Wong BR, Josien R, Young Lee S, Sauter B, Li HL, Steinmann RM, Choi Y. TRANCE, a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. J Exp Med 1997b; 186: 2075-2080

Yamaguchi DT, Hahn TJ, Iida Klein A, Kleeman CR, Muallem S. Parathyroid hormone-activated calcium channels in osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line. cAMP-dependent and cAMP-independent calcium channels. J Biol Chem 1987a; 262: 7711-7718

Yamaguchi DT, Kleeman CR, Muallem S. Protein kinase C-activated calcium channel in the osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line UMR-106. J Biol Chem 1987b; 262: 14967-14973

Yang ZJ, Cheng V, Barnes S, Cavalho L, Sindrey D. Pulsatile parathyroid hormone (PTH) treatment increases bone formation in vitro in fetal rat calvarial cell (FRCC) culture system. J Bone Miner Res 1997; 12(Suppl 1): S317

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF) and Osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998a; 139: 1329-1337

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki SI, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a Ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998b; 95: 3597-3602

Yoshimatsu M, Shibata Y, Kitaura H, Chang X, Moriishi T, Hashimoto F, Yoshida N, Yamaguchi A. Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. *J Bone Miner Metab* 2006; 24: 20-27

Zhang D, Yang JQ, Li XT, Fu MK. The expression of osteoprotegerin and the Receptor Activator of NF- κ B Ligand in human periodontal ligament cells cultured with and without $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D³. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 71-76

Zhang X, Teng YT. Interleukin-10 inhibits gram-negative-microbe-specific human receptor activator of NF- κ B ligand positive CD4⁺ -Th-cell-associated alveolar bone loss in vivo. *Infect Immun* 2006; 74: 4927-4931

7. Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. dent. Stefan Lossdörfer für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Durch seine hervorragende Betreuung und sein kontinuierliches Interesse am Fortgang dieser Arbeit fühlte ich mich stets optimal betreut.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Werner Götz. Er betreute mich insbesondere beim praktischen Teil der Arbeit und vermittelte mir viele theoretische Grundlagen.

Für die Möglichkeit, diese Dissertation in der kieferorthopädischen Abteilung der Zahnklinik in Bonn schreiben zu können, möchte ich mich beim Herrn Prof. Dr. med. dent. Andreas Jäger bedanken.

Ich danke ebenfalls Frau MTA Inca Bay-Müller und Frau MTA Katharina Reifenrath für die sorgfältige Einweisung in die immunhistochemische Laborarbeit.

Herrn Dr. med. dent. Afshar Kowarizadeh gebührt mein Dank für die Unterweisung in der Nutzung des Mikroskops.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Mutter Behice Tekkol und bei meinem Bruder Gökhan Öztürk bedanken. Ohne die liebevolle Unterstützung von ihnen wäre weder diese Arbeit, noch mein gesamtes Zahnmedizinstudium in der erlebten Art und Weise möglich gewesen.