

Aus der Abteilung für Kieferorthopädie, Orthodontie
und Kinderzahnmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Therapeutische Wirkungen des TNF- α -Antagonisten
Etanercept und Methotrexat auf die Antigen-induzierte
Arthritis des Kiefergelenks

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Smbat Rafayelyan

aus

Spitak (Armenien)

Datum der Promotion: 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung.....	17
Publikation 1.....	23
Publikation 2.....	32
Publikation 3.....	41
Lebenslauf.....	66
Publikationsliste.....	67
Danksagung	69

Zusammenfassung

Titel: Therapeutische Wirkungen des TNF- α -Antagonisten Etanercept und Methotrexat auf die Antigen-induzierte Arthritis des Kiefergelenks

Autor: Smbat Rafayelyan

Abstract in Deutsch

Einleitung: Juvenile idiopathische Arthritis (JIA) des Kiefergelenks kann schwere Wachstumsstörungen des kranio-mandibulären Systems verursachen. Die Antigen-induzierte Arthritis (AIA) des Kaninchen-Kiefergelenks simuliert den Entzündungsprozess des Kiefergelenks bei JIA. In den beiden ersten Studien der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung des systemisch verabreichten Tumornekrosefaktor-alpha-Antagonisten (TNF- α -Antagonist) Etanercept und von Methotrexat (MTX) auf die AIA bei jungen Kaninchen histomorphometrisch untersucht werden. Das Ziel der dritten Studie war es, die Volumenentwicklung des Unterkiefers beim wachsenden Kaninchen mit bilateraler Kiefergelenkarthritis zu untersuchen. Ferner sollte der therapeutische Effekt des TNF- α -Antagonisten Etanercept beurteilt werden.

Material und Methode: In allen drei Studien wurden jeweils 18 Kaninchen (weibliche New Zealand White Rabbits, 10 Wochen alt) eingesetzt. In allen Studien wurde bei 12 Kaninchen eine Sensibilisierung auf Ovalbumin (OA) und anschließend die Induktion einer beidseitigen Kiefergelenkarthritis durch intraartikuläre OA-Injektionen durchgeführt. In der ersten und der dritten Studie wurden diese Injektionen bis zum Ende des Versuchs in dreiwöchigen Abständen wiederholt.

In der ersten und der dritten Studie erhielten 6 der 12 Kaninchen wöchentlich eine subkutane Injektion mit Etanercept, in der zweiten Studie eine intramuskuläre Injektion mit MTX. In allen drei Studien blieben 6 Tiere ohne Therapie. Die restlichen 6 Tiere dienten als Kontrolle, ohne intraartikuläre Injektionen oder Behandlung. In den ersten beiden Studien wurden nach Euthanasie im Alter von 22 Wochen alle Kiefergelenke en bloc entfernt. Es wurden sagittale Schnitte angefertigt und diese mit Hämatoxylin-Eosin (H-E) und Safranin-O, für die Bestimmung des Mankin-Scores, sowie mit tartrat-resistenter saurer Phosphatase (TRAP) gefärbt. In der dritten Studie wurden von allen Tieren beginnend mit der 10. Woche alle drei Wochen, bis zum Versuchsende im Alter von 22 Wochen, Computertomographien (CT) des Gesichtsschädels durchgeführt. Die Entwicklung des Unterkiefers wurde nach Segmentierung auf Basis der CT-Daten mittels Volumetrie dreidimensional untersucht.

Ergebnisse: In den Arthritis-Gruppen beider Studien zeigte sich eine chronische Entzündung mit Degeneration des Gelenkknorpels, welche in der ersten Studie ausgeprägter, als in der zweiten Studie war.

In beiden Studien waren die Zeichen der Knorpeldegeneration in den Therapiegruppen (Etanercept und MTX) signifikant reduziert, aber vorhanden. Im Gegensatz dazu erschienen die Gelenke in den Kontrollgruppen unauffällig. Die Korrelation zwischen dem Mankin-Score und der Häufigkeit TRAP-positiver Zellen war in der ersten Studie ausgeprägter als in der zweiten Studie. Die Unterkieferentwicklung war nicht stetig, das Wachstum nahm von der 10. bis zur 22. Woche in allen Gruppen ab. Die höchste Wachstumsgeschwindigkeit wurde zwischen der 10. und der 13. Woche beobachtet. Die Arthritis verursachte schwere Wachstumsstörungen, vor allem bei den Gelenkfortsätzen. Die Etanercept-Gruppe zeigte eine bessere, jedoch nicht vollkommen normale Unterkieferentwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Schlussfolgerung: AIA verursacht bei jungen Kaninchen schwere Schäden im Kiefergelenk sowie Wachstumsstörungen. Eine Verbesserung des pathologischen Bildes erscheint durch eine systemische Verabreichung von Etanercept oder MTX erreichbar zu sein. Unter der Therapie mit Etanercept kommt es zu einer Besserung, aber nicht zu einer vollständigen Normalisierung des Wachstums.

Abstract in English

Background: Juvenile idiopathic arthritis (JIA) of the temporomandibular joint (TMJ) can cause severe growth disturbances of the craniomandibular system. Antigen-induced arthritis (AIA) of the rabbit TMJ is simulating the inflammatory process of the TMJ in JIA. In the first two studies of the present thesis the effect of a systemic administration of the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) antagonist etanercept and methotrexate (MTX) on AIA in young rabbits should be investigated by means of three different histological staining methods. The aim of the third study was to investigate the development of the mandible in growing rabbits which were suffering from bilateral arthritis of the TMJ. In addition, the therapeutic effect of the TNF- α antagonist etanercept should be investigated.

Material and Methods: In all three studies, 18 female New Zealand white rabbits aged 10 weeks were used. In all studies, a sensitization on ovalbumin (OA) was performed in 12 animals and followed by the induction of a bilateral arthritis of the TMJ by intra-articular injections of OA. In the first and the third study the intra-articular injections were repeated every three weeks with the purpose to maintain the inflammation. In the first and the third study 6 of the 12 rabbits received weekly subcutaneous injections of etanercept, in the second study, an intramuscular injection of MTX. In all studies the other 6 animals remained without therapy. Another 6 animals served as controls, receiving no treatment or intra-articular injection at all. In the first two studies after euthanasia at the age of 22 weeks, all TMJs were retrieved en bloc. Sagittal sections were cut and stained with Hematoxylin-Eosin (H-E) and Safranin-O for the evaluation of the Mankin score, and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). In the third study all animals received computed tomographies (CT) of the maxillofacial region every three weeks, beginning from week 10 through week 22 until the end of the study. Following segmentation, the development of the mandible was analyzed by volumetry.

Results: In the arthritis groups of both studies, a chronic inflammation with degeneration of the articular cartilage, which was more pronounced in the first study than in the second study, could be observed. In both studies, the signs of cartilage degeneration were significantly reduced in both treatment groups (etanercept and MTX) but still present. In contrast, the joints in the control groups were inconspicuous. The correlation between the Mankin score and the number of TRAP-positive cells was more pronounced in the first study than in the second. The mandibular development was not

continuous but growth decreased from week 10 to week 22. In all groups the highest rate of growth was seen between the weeks 10 and 13. Arthritis caused severe disturbances of growth, especially in the condylar process. In the etanercept group a better, but not a totally normal mandibular development compared to the control group could be observed.

Conclusions: AIA causes severe damage in the TMJ of young rabbits and disturbances of growth. An improvement seems to be achievable by a systemic administration of etanercept or MTX. Under therapy with etanercept an improved but not completely normal growth could be achieved.

Einleitung und Zielstellung

Entzündliche Erkrankungen des Kiefergelenks führen bei Kindern und Heranwachsenden häufig zu Wachstumsstörungen [1]. Besonders charakteristisch sind diese im Zusammenhang mit der Juvenilen Idiopathischen Arthritis (JIA) [2]. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vollständig aufgeklärt, insbesondere über die Auswirkungen medikamentöser Therapien werden weitere Kenntnisse benötigt [3].

Das Kaninchen wurde bereits von mehreren Autoren als Tiermodell für die Untersuchung des Schädel- und Gesichtswachstums und für die Anatomie und Pathologie des Kiefergelenks eingesetzt [4]. Die Antigen Induzierte Arthritis (AIA) des Kiefergelenks diente in diesem Tiermodell als Modell für die Rheumatoide Arthritis (RA) [4]. Ein Ansatz zur Therapie entzündlicher Kiefergelenkerkrankungen besteht in der Verabreichung antirheumatischer Medikamente, die in der Lage sein sollen, die intraartikuläre Entzündung zu kontrollieren und im Idealfall sogar zu stoppen [5].

Neben funktioneller Behandlung, die einen Bereich der Kieferorthopädie [6] darstellt, ist die medizinische Therapie der JIA auf nicht-steroidale entzündungshemmende Medikamente, intraartikuläre Glukokortikoid-Injektionen und krankheitsmodifizierende Antirheumatika (DMARDs) wie Methotrexat (MTX) basiert [7]. In den vergangenen Jahren wurde die Therapie rheumatischer Erkrankungen noch durch die Einführung der „Biologica“ verbessert. Diese können spezifisch Teile der Immunantwort des Körpers hemmen [8]. Ein vor kurzem eingeführtes Medikament aus der Gruppe der Biologica ist der Tumornekrosefaktor-alpha-Antagonisten (TNF- α -Antagonist) Etanercept, welcher dem natürlichen Rezeptor für Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) sehr ähnlich ist und mit diesem konkurriert. Durch Bindung an das Medikament kann TNF- α nicht mehr seine natürliche Wirkung entfalten und der TNF- α -Pfad wird gehemmt. Dieser Wirkstoff wurde bereits erfolgreich bei der Behandlung der RA und der JIA verabreicht.

In den letzten Jahren sind verstärkt dreidimensionale bildgebende Verfahren in die kieferorthopädische Diagnostik eingeführt worden und haben einen wichtigen Beitrag zur Beurteilung der Schädel- und Gesichtsentwicklung geleistet [9]. Ein relativ neues Verfahren zur Untersuchung der Ausdehnung eines Körpers stellt die Volumetrie dar, bei der das Volumen eines Körpers durch die Addition aller zu seinem Bild gehörenden Voxel bestimmt wird [10].

Die histomorphometrische Beurteilung der Gelenke scheint geeignet zu sein, die für die Krankheit charakteristischen Läsionen im Knorpel und Knochen zu bewerten. Das Verfahren basiert auf der quantitativen Auswertung histologischer Eigenschaften. Dadurch steigen Objektivität, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit [11].

In den beiden ersten Studien dieser Arbeit sollte die Wirkung des systemisch verabreichten TNF- α -Antagonist Etanercept und von MTX auf die AIA bei jungen Kaninchen histomorphometrisch untersucht werden. Das Ziel der dritten Studie war es, die Volumenentwicklung des Unterkiefers beim wachsenden Kaninchen mit bilateraler Kiefergelenkarthritis zu quantifizieren. Ferner sollte der therapeutische Effekt des TNF- α -Antagonisten Etanercept beurteilt werden.

Material und Methode

In allen drei Studien wurden jeweils 18 Kaninchen (weibliche New Zealand White Rabbits, 10 Wochen alt) eingesetzt. Sie wurden in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité – Universitätsmedizin Berlin gehalten. Alle Tiere hatten Zugang zu Futter und Wasser ad libitum und ihr Wohlbefinden wurde insbesondere durch die tägliche Aufzeichnung des Futter- und Wasserkonsums bei der Visite sowie durch wöchentliche Gewichtskontrollen erfasst.

In allen Studien waren alle Tiere bereits vor ihrer Ankunft randomisiert auf drei Gruppen zu je sechs Tieren verteilt worden. Bei den Tieren der Arthritis- und Therapie-Gruppen wurde nach vorheriger Sensibilisierung auf Ovalbumin (OA) in Anlehnung an die Vorgehensweise von Kapila et al. [12] eine beidseitige Kiefergelenkarthritis durch Gelenkinjektionen mit OA erzeugt. Die Tiere in Kontroll-Gruppe dienten in allen Studien als Kontrolle, sie erhielten weder intraartikuläre Injektionen, noch irgendwelche anderen Behandlungen. In der ersten und der dritten Studie erhielten die Tiere in Therapie-Gruppe wöchentlich subkutane Injektionen mit Etanercept, in der zweiten Studie eine intramuskuläre Injektion mit MTX (Publikation 3, Abbildung 1).

Die Genehmigung zur Durchführung dieser Studien durch die zuständige Landesbehörde lag vor (erste und dritte Studie: LAGeSo N G 0195/09; zweite Studie: LAGetSiNo G0049/05).

Arthritis-Induktion: Von der zehnten bis zur dreizehnten Alterswoche wurden die Tiere in den Arthritis- und Therapie-Gruppen systematisch mit OA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und inkomplettem und komplettem Freund's Adjuvans (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wie bei Kapila et al. [12] beschrieben sensibilisiert. Nachdem die erfolgreiche Sensibilisierung durch eine intradermale OA-Injektion getestet und bestätigt worden war, erfolgte in der dreizehnten Woche in intraperitonealer Anästhesie mit Ketaminchlorid (25 mg/kg Körpergewicht(KG)) und Xylazin (4 mg/kg KG) die Induktion einer Arthritis in beiden Kiefergelenken durch intraartikuläre Injektion von 0,1 ml OA-Lösung (5mg/ml).

In der ersten und der dritten Studie wurde diese Maßnahme alle drei Wochen wiederholt und erfolgte in Anlehnung an die Vorgehensweise von Stoustrup et al. [4]. Ziel war es, die intraartikuläre Entzündung während des gesamten Experiments aufrecht zu erhalten und dem klinischen Bild der JIA, welche durch wiederholte Perioden akuter Entzündung charakterisiert sein kann, näher zu kommen.

Arthritis-Therapie mit Etanercept und MTX: In der ersten und der dritten Studie nach Arthritisinduktion erhielten die Tiere in Therapie-Gruppe ab Woche 13 wöchentliche subkutane Injektionen mit Etanercept in einer Dosierung von 0,8 mg/kg bis zum Ende der Studie.

In der zweiten Studie wurden den Tieren in Therapie-Gruppe ab Woche 13 bis zum Ende der Studie wöchentliche intramuskuläre MTX-Injektionen in einer Dosierung von 0,4 mg/kg verabreicht.

Proben für die Histologie: Am Ende der Studie wurden alle Tiere durch eine Überdosierung von Narkosemitteln euthanasiert. Alle Kiefergelenke wurden en bloc entfernt und für 24 Stunden in 4%iger Phosphat-gepufferter Paraformaldehydlösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelagert. Anschließend wurden sie in 15% Dikalium-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für 12 Wochen dekalzifiziert.

Danach wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und in Paraffin eingebettet. Dabei erfolgte die Orientierung der Präparate so dass sie für eine Schnittführung parallel zur sagittalen Gelenkebene geeignet war. Mit einem herkömmlichen Mikrotom wurden 7-µm-Schnitte angefertigt und anschließend mit

Hämatoxylin-Eosin (H-E) Safranin-O und tartrat-resistenter saurer Phosphatase (TRAP) gefärbt.

Histomorphometrie: Die Schnitte mit H-E und Safranin-O gefärbten Schnitte wurden nach dem Mankin- Bewertungssystem [13] ausgewertet, das durch Bobinac et al. [14] modifiziert und dann in der Studie von Kleemann et al. [15] verwendet wurde.

Die Intensität der Safranin-O-Färbung wird in Abhängigkeit vom Gehalt der Glykosaminoglykane (GAG) in der extrazellulären Matrix abgeschwächt. Somit wurde sie zur Quantifizierung des GAG-Gehalts herangezogen, durch den Knorpel- und subchondrale Knochenveränderungen beurteilt werden können [14, 15].

Die TRAP-gefärbten Präparate wurden in Anlehnung an die von Kuroda et al. beschriebene Methode bewertet [16]. TRAP ist ein Enzym, das durch differenzierte Osteoklasten abgesondert wird [17]. Es ist repräsentativ für den durch Osteoklastenvermittelten Knochenumsatz und zeichnet sich durch seine violette Farbe und Beständigkeit gegen eine Hemmung durch Tartrat aus [18]. Somit wurde diese Methode verwendet, um Osteoklasten zu identifizieren.

CT-Volumetrie der Unterkiefer: Um das Wachstum der Kaninchenunterkiefer zu analysieren, wurden unter Sedierung alle drei Wochen über einen Zeitraum von 5 Monaten Volumendatensätze der Unterkiefer an einem 64-Zeilen-CT (Light Cyler, GE Medical Systems, Milwaukee, IL, USA) mit einer Schichtdicke von 0,625 mm generiert (140 kV, 100 mA). Bei der anschließenden Bildauswertung wurden nach manueller und schwellenwertbasierter Segmentation die Volumina der Unterkiefer mittels Volumenrekonstruktionstechnik (VRT) ermittelt (Software Volume Viewer 2 AW Suite 2.0, GE Medical Systems, Milwaukee, IL, USA). Anschließend wurden die Kieferköpfchen vom Unterkiefer manuell separiert, und ihre Volumina seitengenrennt mittels VRT bestimmt.

Ergebnisse

In der ersten und der zweiten Studie waren fast alle Gelenke in der Kontroll-Gruppe unauffällig. Nur in wenigen Gelenken wurde Oberflächenunebenheit mit einem leichten

Rückgang der Safranin-O-Färbung des Gelenkknorpels gefunden. In keinem Gelenk der Kontrollgruppe war eine vollständige Desorganisation der Struktur des Kondylus nachweisbar. Es waren nur sporadische Anzeichen für Pathologie erkennbar.

Alle Tiere der Arthritis-Gruppe zeigten das histologische Bild chronischer Entzündung mit Gelenkknorpeldegeneration. In den meisten Gelenken waren Klonierung und Hypozellularität im Gelenkknorpel nachweisbar, begleitet von Pannus und Oberflächenunregelmäßigkeit des Gelenkknorpels. Eine moderate Senkung der Safranin-O-Färbung war in den meisten Gelenken nachweisbar.

Unter MTX- und Etanercept-Therapie waren die histologischen Zeichen der Gelenkknorpeldegeneration im Vergleich zu den jeweiligen Arthritis-Gruppen abgeschwächt

In allen Gruppen wurden TRAP-positive Zellen im subchondralen Knochen des Kondylus gefunden. Die Anzahl der TRAP-positiven Zellen im Untersuchungsbereich des Kondylus war in der Arthritis-Gruppe signifikant erhöht. In der Kontroll-Gruppe zeigten sich nur spärliche Mengen TRAP-positiver Zellen, während in den MTX- und Etanercept-Gruppen mehr TRAP-positive Zellen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe gefunden wurden. Unsere histomorphometrischen Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede der histopathologischen Messungen zwischen allen drei Gruppen.

In der dritten Studie zeigte sich, dass die Volumenzunahme des Unterkiefers nicht stetig war und in allen drei Gruppen eine Abnahme der relativen Volumenzunahme des Unterkieferkörpers von der 10. zur 22. Woche auftrat. Die größte Volumenzunahme war zwischen der 10. und der 13. Woche feststellbar. Schwere Wachstumsstörungen zeigten sich bei Arthritis, insbesondere bei Betrachtung der Kiefergelenkköpfchen. Demgegenüber wurde die Entwicklung des Unterkieferkörpers geringer von der Gelenkentzündung beeinflusst. Bei den Tieren mit Etanercept-Therapie konnte eine größere relative Volumenzunahme als bei den Tieren ohne Therapie beobachtet werden, allerdings war diese nicht so groß wie in der Kontroll-Gruppe.

Eine Volumenzunahme des Unterkieferkörpers konnte bei allen Tieren von der 10. bis zur 22. Woche beobachtet werden.

Die relative prozentuale Volumenzunahme der Kiefergelenkköpfchen war bei allen Gruppen geringer, als die des Unterkieferkörpers. Auch waren die Unterschiede zwischen den Gruppen hier größer.

Die relative Volumenzunahme des Unterkieferkörpers war in den vier dreiwöchigen Intervallen nicht gleichmäßig. Wir beobachteten die größte prozentuale Volumenzunahme im ersten Intervall, also von der 10. bis zur 13. Woche. Hier bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Volumenentwicklung der Kiefergelenkköpfchen in den Intervallen folgte in etwa der Entwicklung der Volumina des gesamten Unterkiefers. Von der 10. bis zur 13. Woche beobachteten wir in der Arthritis- und der Etanercept-Gruppe die stärkste Volumenzunahme ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen festzustellen.

Diskussion

Die histologische Untersuchung ermöglicht es, die Wirksamkeit von Arzneimitteln zu bewerten. Dabei bietet die Histomorphometrie die Möglichkeit, den Effekt zu quantifizieren und Unterschiede zwischen Kontroll- und Arthritistieren zu zahlenmäßig zu beurteilen. In dieser Studie kombinierten wir zwei etablierte Methoden, nämlich den Mankin-Score, der auf den H-E- und Safranin-O-Färbungen beruht und die Bestimmung der TRAP-positiven Zellen [11]. Dabei ist die H-E-Färbung das am häufigsten durchgeführte Verfahren welches eine die histomorphometrische Auswertung der allgemeinen Gewebestrukturen, intra- und extrazellulären Substanzen ermöglicht [11]. Es erlaubt auch die Diagnose von Krankheitszuständen wie Gelenkknorpel- und Knochenresorption.

Um die Verbindung zwischen histomorphologischen Veränderungen des Knorpels und dem subchondralen Knochenabbau im Kondylus herzustellen, haben wir beide pathologischen Methoden kombiniert.

In den ersten und zweiten Studien konnte auf Basis der Histomorphometrie ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Arthritis Gruppe gefunden werden. Dieses bestätigte die erfolgreiche Induktion der Arthritis.

Unsere Befunde zeigen auch signifikante Unterschiede zwischen den histopathologischen Messungen zwischen allen drei Gruppen. Eine signifikante Korrelation zwischen der Mankin-Score und der TRAP-positiven Zellen konnte gefunden werden. Allerdings legen die Ergebnisse nahe, dass Etanercept und MTX nicht in der Lage sind, die Entzündungsprozesse im Gelenk vollständig zu

unterdrücken. Der Mankin-Score und die reduzierte Anzahl der TRAP-positiven Zellen in Tieren, die mit Etanercept und MTX in behandelt wurden, zeigen eine moderate therapeutische Wirksamkeit dieser Arzneimittel.

Die Volumetrie untersucht das Volumen eines Körpers und basiert auf einem dreidimensionalen bildgebenden Verfahren. Ebenso wie wir verwendeten bereits Steinbacher et al. [9] diese Methodik, um Volumenunterschiede zwischen den beiden Gesichtshälften bei hemifazialer Mikrosomie festzustellen.

Ausdruck der erfolgreichen Therapie mit Etanercept war die größere Volumenzunahme des Kondylus und des Unterkiefers im Vergleich zu den Tieren ohne Therapie. Ebenso wie bei der Entwicklung des gesamten Unterkiefers führte die Therapie zu einer Besserung der Volumenentwicklung des Kondylus, jedoch war auch hier keine vollständige Normalisierung zu finden.

Das hier verwendete Kaninchenmodell wurde bereits andernorts eingesetzt, um die Auswirkungen einer Kiefergelenkentzündung auf das Wachstum des Unterkiefers zu untersuchen. Ebenso wie Tavakkoli-Jou et al. [19] und Stoustrup et al. [4] beobachteten auch wir eine Wachstumshemmung des Unterkiefers bei den Tieren, bei denen eine Arthritis induziert worden war. Im Gegensatz allerdings zu Tavakkoli-Jou et al. [19], die eine Arthritis allein durch eine einmalige OA-injektion in das Kiefergelenk erzeugten, wiederholten wir die intraartikuläre Gabe von OA in dreiwöchigen Abständen. Wir lehnten uns dabei an die Vorgehensweise von Stoustrup et al. [4] an, die die Injektionen in dreiwöchigen Abständen wiederholten, da sie zuvor in einer Pilotstudie beobachtet hatten, dass bei Kaninchen mit einmaliger OA-Gabe die Entzündung nach 12-wöchiger Beobachtung nicht mehr nachweisbar war. Neben dem Aufrechterhalten der intraartikulären Entzündung ist auch der klinische Verlauf der JIA ein Argument für die wiederholte Induktion der Entzündung, da dieser nicht gleichmäßig verläuft, sondern das Krankheitsbild durch akute Entzündungsschübe mit nachfolgenden Remissionen charakterisiert sein kann [20].

In den ersten und dritten Studien wiederholten wir die intraartikuläre Injektionen von OA alle 3 Wochen, um die intraartikuläre Arthritis bis zu 10 Wochen aufrecht zu erhalten. So waren der Mankin-Score und die Anzahl der TRAP-positiven Zellen in der zweiten Studie signifikant höher, welches eine stärkere Entzündungsreaktion im Kiefergelenkbereich als in der ersten Studie zeigt.

Dies scheint zu bestätigen, dass wiederholte Injektionen gegenüber einer einzelnen Injektion in Bezug auf das Auslösen einer intraartikulären Entzündung überlegen sind.

Ein weiteres Argument für die Wiederholung der Injektion ist die Tatsache, dass JIA als nicht-kontinuierlicher Prozess mit Perioden von Exazerbationen gefolgt von Remissionen gekennzeichnet ist [21]. Daher könnten wiederholte Injektionen das vorliegende Tiermodell noch mehr an den klinischen Verlauf der JIA beim Menschen annähern.

Etanercept ist ein gentechnologisch hergestellter Wirkstoff, der an humanes TNF- α bindet und diese durch Bindung inaktiviert. Da humane TNF- α -Blocker für Kaninchen Antigene darstellen, ist eine Neutralisierung des Pharmakons durch Antikörper wahrscheinlich. Neben einer möglichen Unterdosierung ist auch an eine reduzierte Wirksamkeit dieses humanen Medikaments beim Kaninchen zu denken. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass der mit TNF- α verbundene Weg nur ein möglicher Mechanismus für eine Gelenkschädigung durch Entzündung ist. Andere Mechanismen können durch Etanercept eventuell nicht beeinflusst werden.

Auch MTX scheint eine schützende Wirkung vor allem auf den Knorpel zu haben. Es scheint ebenso in der Lage zu sein, Osteoklasten zu hemmen. Dies ist wichtig, weil Gelenkdegeneration, vor allem in den späteren Stadien, von einem Abbau der Knochenstrukturen begleitet wird.

Schlussfolgerung

Im vorliegenden Kaninchenmodell kann sowohl mit mehrfacher, als auch mit einfacher OA-Injektion eine Arthritis induziert werden, dabei sind die Entzündungsparameter bei wiederholter Injektion stärker.

Die systemische Verabreichung von MTX und Etanercept in einer Dosierung wie beim Menschen scheint eine positive Wirkung auf die Entzündungsprozesse im Kaninchenkiefergelenk zu haben, aber die Zeichen der Arthritis nicht vollständig zu beseitigen. Eine Korrelation zwischen der Anzahl von Osteoklasten (TRAP-positive Zellen) und die Mankin Score wurde gefunden.

AIA des Kiefergelenks führt beim heranwachsenden Kaninchen zu Wachstumsstörungen des Unterkiefers, insbesondere des Kondylus. Durch die

Therapie mit Etanercept in der hier gewählten Dosierung und Applikationsart konnte eine Besserung, jedoch keine vollständige Normalisierung des Wachstums erreicht werden. Die Beurteilung der Volumenzunahme erscheint geeignet, das Wachstum des Unterkiefers darzustellen.

Literaturverzeichnis

1. Pirttiniemi P, Peltomäki T, Müller L, et al. Abnormal mandibular growth and the condylar cartilage. *Eur J Orthod* 2009;31:1-11.
2. von Bremen J, Ruf S. Juvenile idiopathic arthritis-and now?: a systematic literature review of changes in craniofacial morphology. *J Orofac Orthop* 2012;73:265-276.
3. Tzaribachev N, Schafer J, Ernemann U, et al. Juvenile Idiopathische Arthritis - die heimliche Entzündung kindlicher Kiefergelenke. *Rofo* 2009;181:303-305.
4. Stoustrup P, Kristensen KD, Kuseler A, et al. Reduced mandibular growth in experimental arthritis in the temporomandibular joint treated with intra-articular corticosteroid. *Eur J Orthod* 2008;30:111-119.
5. Dannecker GE, Quartier P. Juvenile idiopathic arthritis: classification, clinical presentation and current treatments. *Horm Res* 2009;72:4-12.
6. Stoustrup P, Kuseler A, Kristensen KD et al. Orthopaedic splint treatment can reduce mandibular asymmetry caused by unilateral temporomandibular involvement in juvenile idiopathic arthritis. *Eur J Orthod* 2013;35:191-198.
7. Harris JG, Kessler EA, Verbsky JW Update on the treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2013;13 337-346.
8. Gartlehner G, Hansen RA, Jonas BL, et al. Biologics for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: a systematic review and critical analysis of the evidence. *Clin Rheumatol* 2008;27:67-76.
9. Steinbacher DM, Gougoutas A, Bartlett SP. An analysis of mandibular volume in hemifacialmicrosomia. *Plast Reconstr Surg* 2011;127:2407-2412.
10. Rothe JH, Steffen IG, Lehmkuhl L, et al. Volume measurement of liver metastases using multidetector computed tomography: comparison of lesion diameter and volume segmentation - a phantom study. *Rofo* 2010;182:1082-1090.

11. Pastoureau PC, Hunziker EB, Pelletier JP. Cartilage, bone and synovial histomorphometry in animal models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18:106-112.
12. Kapila S, Lee C, Tavakkoli-Jou MR, et al. Development and histologic characterizations of an animal model of antigen-induced arthritis of the juvenile rabbit temporomandibular joint. *J Dent Res* 1995;74:1870-1879.
13. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971;53:523-537.
14. Bobinac D, Spanjol J, Zoricic S et al. Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans. *Bone* 2003;32:284-290.
15. Kleemann RU, Krockner D, Cedraro A et al. Altered cartilage mechanics and histology in knee osteoarthritis: relation to clinical assessment (ICRS Grade). *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:958-963.
16. Kuroda Y, Yonemitsu I, Hosomichi J et al. Intermittent posterior displacement of the rat mandible in the growth period affects the condylar cancellous bone. *Angle Orthod* 2011;8:975-982.
17. van Meel E, Boonen M, Zhao H et al. Disruption of the Man-6-P targeting pathway in mice impairs osteoclast secretory lysosome biogenesis. *Traffic* 2011;12:912-924.
18. Nanjundaiah SM, Astry B, Moudgil KD. Mediators of inflammation-induced bone damage in arthritis and their control by herbal products. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:518094.
19. Tavakkoli-Jou M, Miller AJ, Kapila S. Mandibulofacial adaptations in a juvenile animal model of temporomandibular joint arthritis. *J Dent Res* 1999;78:1426-1435.
20. Lurati A, Salmaso A, Gerloni V, et al. Accuracy of Wallace criteria for clinical remission in juvenile idiopathic arthritis: a cohort study of 761 consecutive cases. *J Rheumatol* 2009;36:1532-1535.
21. Shenoi S, Wallace CA. Remission in juvenile idiopathic arthritis: current facts. *Curr Rheumatol Rep* 2010;12:80-86.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Smbat Rafayelyan, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Therapeutische Wirkungen des TNF- α -Antagonisten Etanercept und Methotrexat auf die Antigen-induzierte Arthritis des Kiefergelenks“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Smbat Rafayelyan hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Rafayelyan S, Radlanski RJ, Minden K, Pischon N, Jost-Brinkmann P-G, Präger TM, Histomorphometry in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint, Journal of Oral Pathology and Medicine, 2014

Beitrag im Einzelnen:

Start und Entwicklung des Projektes: (Projektleiter: Dr. Dr. Thomas Michael Präger)

eigener Anteil: 30 %

Erstellung und Einreichung des Tierversuchsantrags:

eigener Anteil: 30 %

Durchführung des Tierversuchs:

eigener Anteil: 50 %

Anfertigung (Exzision, Färbung etc.) der histologischen Präparate:

eigener Anteil: 70 %

Histopathologische Auswertung der Präparate:

eigener Anteil: 80 %

Entwicklung der Fragestellung und des Studiendesign:

eigener Anteil: 80 %

Idee, die Auswertung mittels Mankin Score zum ersten Mal für das Kaninchen-Modell anzuwenden:

eigener Anteil: 100 %

Auswertung der Untersuchungsergebnisse:

eigener Anteil: 80 %

Erstellung und Einreichung des Manuskriptes für Veröffentlichung:

eigener Anteil: 80 %

Bearbeitung der Gutachter-Kommentare der Zeitschrift:

eigener Anteil: 90 %

Publikation 2:

Rafayelyan S, Meyer P, Radlanski RJ, Minden K, Jost-Brinkmann P-G, Präger TM, Effect of methotrexate upon antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint, Journal of Oral Pathology and Medicine, 2014

Beitrag im Einzelnen:

Start und Entwicklung des Projektes: (Projektleiter: Dr. Dr. Thomas Michael Präger)

eigener Anteil: 0 %

Erstellung und Einreichung des Tierversuchsantrags:

eigener Anteil: 0 %

Durchführung des Tierversuchs:

eigener Anteil: 0 %

Anfertigung (Exzision, Färbung etc.) der histologischen Präparate:

eigener Anteil: 50 %

Histopathologische Auswertung der Präparate:

eigener Anteil: 80 %

Entwicklung der Fragestellung und des Studiendesigns:

eigener Anteil: 80 %

Idee, die Auswertung mittels Mankin Score zum ersten Mal für das Kaninchen-Modell anzuwenden:

eigener Anteil: 100 %

Auswertung der Untersuchungsergebnisse:

eigener Anteil: 80 %

Erstellung und Einreichung des Manuskriptes für Veröffentlichung:

eigener Anteil: 50 %

Bearbeitung der Gutachter-Kommentare der Zeitschrift:

eigener Anteil: 80 %

Publikation 3:

Präger TM, Rafayelyan S, Landau H, Pischon N, Minden K, Jost-Brinkmann P-G, Müller-Hartwich R, Mußler A, Influence of arthritis of the TMJ and its therapy on the development of the mandibular volume: An in-vivo-study, Journal of Orofacial Orthopedics, 2014

Beitrag im Einzelnen:

Start und Entwicklung des Projektes: (Projektleiter: Dr. Dr. Thomas Michael Präger)

eigener Anteil: 30 %

Erstellung und Einreichung des Tierversuchsantrags:

eigener Anteil: 30 %

Durchführung des Tierversuchs:

eigener Anteil: 50 %

Durchführung der Computertomographie:

eigener Anteil: 30 %

Dreidimensional Auswertung der Daten mittels Volumetrie:

eigener Anteil: 20 %

Entwicklung der Fragestellung und des Studiendesigns:

eigener Anteil: 30 %

Auswertung der Untersuchungsergebnisse:

eigener Anteil: 20 %

Erstellung und Einreichung des Manuskriptes für Veröffentlichung:

eigener Anteil: 20 %

Bearbeitung der Gutachter-Kommentare der Zeitschrift:

eigener Anteil: 20 %

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Publikation 1.

Journal of Oral Pathology and Medicine

**Histomorphometry in antigen-induced arthritis of the rabbit
temporomandibular joint**

Rafayelyan S, Radlanski RJ, Minden K, Pischon N, Jost-Brinkmann P-G, Präger TM

<http://dx.doi.org/10.1111/jop.12201>

Publikation 2.

Journal of Oral Pathology and Medicine

**Effect of methotrexate upon antigen-induced arthritis of the rabbit
temporomandibular joint**

Rafayelyan S, Meyer P, Radlanski RJ, Minden K, Jost-Brinkmann P-G, Präger TM

<http://dx.doi.org/10.1111/jop.12265>

Publikation 3.

Journal of Orofacial Orthopedics

**Influence of arthritis of the TMJ and its therapy on the development of
the mandibular volume: An in-vivo-study**

**Präger TM, Rafayelyan S, Landau H, Pischon N, Minden K, Jost- Brinkmann P-G, Müller-
Hartwich R, Mußler A**

Journal of Orofacial Orthopedics/ Fortschritte der Kieferorthopädie
Influence of arthritis of the TMJ and its therapy on the development of the mandibular volume An in-vivo-study short title: Arthritis and mandibular development
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JOOF-D-13-00041R3
Full Title:	Influence of arthritis of the TMJ and its therapy on the development of the mandibular volume An in-vivo-study short title: Arthritis and mandibular development
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	Thomas Michael Präger School of Dentistry, Charité – Universitätsmedizin Berlin Berlin, Berlin GERMANY
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	School of Dentistry, Charité – Universitätsmedizin Berlin
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Thomas Michael Präger
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Thomas Michael Präger Smbat Rafayelyan, Dentist Helga Landau, Dr. med. dent. Nicole Pischon, PD Dr. med. dent. Kirsten Minden, PD Dr. med. Paul-Georg Jost-Brinkmann, Prof. Dr. Ralf Müller-Hartwich, Dr. med. dent. Axel Mußler, Dr. med.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Influence of arthritis of the TMJ and its therapy on the development of the mandibular volume An in-vivo-study</p> <p>Aim The aim of this study was to investigate the development of the mandible in growing rabbits which were suffering from bilateral arthritis of the temporomandibular joint (TMJ). In addition, the therapeutic effect of the TNF-α antagonist etanercept should be investigated.</p> <p>Methods 18 New Zealand White Rabbits (8 weeks old) were randomized and distributed to three groups with six animals in each group. In 12 animals a sensitization on Ovalbumin (OA) was performed at the age of 10 weeks and followed by the induction of a bilateral arthritis of the TMJ by intra articular injections of OA. The intra articular injections were repeated every three weeks with the purpose to maintain the inflammation. In 6 out of the 12 animals weekly subcutaneous injections of etanercept were given. The remaining 6 animals served as control without any intervention. All animals received computed tomographies (CT) of the maxillofacial region every three weeks, beginning from week 10 through week 22, the end of the study. Following segmentation, the development of the mandible was analyzed by volumetry.</p> <p>Results The mandibular development was not continuous but, growth decreased from week 10 to week 22. In all groups the highest rate of growth was seen between the weeks 10</p>

	<p>and 13. Arthritis caused severe disturbances of growth, especially in the condylar process. In the etanercept group a better but not a totally normal mandibular development compared to the control group could be observed.</p> <p>Conclusion Antigen-induced arthritis of the TMJ is causing severe disturbances of growth, which resemble those in juvenile idiopathic arthritis. Under therapy with etanercept an improved but not completely normal growth could be achieved.</p> <p>Keywords: Arthritis, mandibular growth, computed tomography, volumetry</p>
Response to Reviewers:	<p>Sehr geehrter Herr Reviewer,</p> <p>wir haben die Legende zu Abbildung 2 präzisiert und Abbildung 2 so verändert, dass die Abgrenzung des Kondylus besser nachvollziehbar ist.</p>

1 **Influence of arthritis of the TMJ and its therapy on the development**
2
3 **of the mandibular volume**

4
5 **An in-vivo-study**
6

7
8
9 **Aim**

10 The aim of this study was to investigate the development of the
11 mandible in growing rabbits which were suffering from bilateral arthritis
12 of the temporomandibular joint (TMJ). In addition, the therapeutic effect
13 of the TNF- α antagonist etanercept should be investigated.
14
15

16
17
18 **Methods**

19 18 New Zealand White Rabbits (8 weeks old) were randomized and
20 distributed to three groups with six animals in each group. In 12 animals
21 a sensitization on Ovalbumin (OA) was performed at the age of 10
22 weeks and followed by the induction of a bilateral arthritis of the TMJ by
23 intra articular injections of OA. The intra articular injections were
24 repeated every three weeks with the purpose to maintain the
25 inflammation. In 6 out of the 12 animals weekly subcutaneous injections of
26 etanercept were given. The remaining 6 animals served as control
27 without any intervention. All animals received computed tomographies
28 (CT) of the maxillofacial region every three weeks, beginning from week
29 10 through week 22, the end of the study. Following segmentation, the
30 development of the mandible was analyzed by volumetry.
31
32

33
34
35 **Results**

36 The mandibular development was not continuous but, growth decreased
37 from week 10 to week 22. In all groups the highest rate of growth was
38 seen between the weeks 10 and 13. Arthritis caused severe
39 disturbances of growth, especially in the condylar process. In the
40 etanercept group a better but not a totally normal mandibular
41 development compared to the control group could be observed.
42
43

44
45
46 **Conclusion**

47 Antigen-induced arthritis of the TMJ is causing severe disturbances of
48 growth, which resemble those in juvenile idiopathic arthritis. Under
49
50
51
52
53
54
55

therapy with etanercept an improved but not completely normal growth
could be achieved.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Einfluss einer Kiefergelenkarthritis und ihrer Therapie auf die Volumenentwicklung des Unterkiefers

Eine Studie am wachsenden Kaninchen

Ziel

Ziel dieser Studie war es, die Volumenentwicklung des Unterkiefers beim wachsenden Kaninchen mit bilateraler Kiefergelenkarthritis zu untersuchen. Ferner sollte der therapeutische Effekt des TNF- α Antagonisten Etanercept beurteilt werden.

Methodik

18 New Zealand White Rabbits (Alter 8 Wochen) wurden randomisiert auf drei Gruppen zu je sechs Tieren verteilt. Bei 12 Tieren erfolgte im Alter von 10 Wochen eine Sensibilisierung auf Ovalbumin (OA) und anschließend die Induktion einer beidseitigen Kiefergelenkarthritis durch intraartikuläre OA-Injektionen. Zur Aufrechterhaltung der Entzündung wurden die intraartikulären Injektionen alle 3 Wochen wiederholt. Bei 6 der 12 Tiere erfolgte eine Therapie mit wöchentlichen subkutanen Etanercept-Injektionen. 6 weitere Tiere dienten als Kontrollgruppe ohne jeglichen Eingriff. Von allen Tieren wurden beginnend mit der 10. Woche alle drei Wochen bis zum Versuchsende im Alter von 22 Wochen Computertomographien (CT) des Gesichtsschädels durchgeführt. Die Entwicklung des Unterkiefers wurde nach Segmentierung auf Basis der CT-Daten mittels Volumetrie dreidimensional untersucht.

Ergebnisse

Die Unterkieferentwicklung war nicht stetig, das Wachstum nahm von der 10. bis zur 22. Woche in allen Gruppen ab. Die höchste Wachstumsgeschwindigkeit wurde zwischen der 10. und der 13. Woche beobachtet. Die Arthritis verursachte schwere Wachstumsstörungen, vor allem bei den Gelenkfortsätzen. Die Etanercept-Gruppe zeigte eine bessere, jedoch nicht vollkommen normale Unterkieferentwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe

Schlussfolgerung

Die Antigen-induzierte Arthritis des Kiefergelenks erzeugt schwere Wachstumsstörungen, die denen bei der juvenilen idiopathischen

Arthritis ähneln. Unter Therapie mit Etanercept kommt es zu einer
Besserung, aber nicht zu einer vollständigen Normalisierung des
Wachstums.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Einleitung

Entzündliche Erkrankungen des Kiefergelenks führen bei Kindern und Heranwachsenden häufig zu Wachstumsstörungen [16,19].

Besonders charakteristisch sind diese in Zusammenhang mit der Juvenilen Idiopathischen Arthritis (JIA)[30,31]. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vollständig aufgeklärt, insbesondere über die Auswirkungen medikamentöser Therapien werden weitere Kenntnisse benötigt [28].

Das Kaninchen wurde bereits von mehreren Autoren als Tiermodell für die Untersuchung des Schädel- und Gesichtswachstums und für die Anatomie und Pathologie des Kiefergelenks eingesetzt [2,23,24]. Die Antigen Induzierte Arthritis (AIA) des Kiefergelenks diente in diesem Tiermodell zur Untersuchung entzündlicher Kiefergelenkprozesse und als Modell für die Rheumatoide Arthritis [10,9,8,23,25,24].

Ein Ansatz zur Therapie entzündlicher Kiefergelenkerkrankungen besteht in der Verabreichung antirheumatischer Medikamente, die in der Lage sein sollen, die intraartikuläre Entzündung zu kontrollieren und im Idealfall sogar zu stoppen [5].

In den vergangenen Jahren wurde die Therapie rheumatischer Erkrankungen durch die Einführung der „Biologica“ verbessert. Diese können spezifisch Teile der Immunantwort des Körpers hemmen [6].

Ein vor kurzem eingeführtes Medikament aus der Gruppe der Biologica ist Etanercept, welches dem natürlichen Rezeptor für Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) sehr ähnlich ist und mit diesem konkurriert. Durch Bindung an das Medikament kann TNF- α nicht mehr seine natürliche Wirkung entfalten und der TNF- α -Pfad wird gehemmt. Dieser Wirkstoff wurde bereits erfolgreich bei der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis und der JIA verabreicht.

In den letzten Jahren sind verstärkt dreidimensionale bildgebende Verfahren in die kieferorthopädische Diagnostik eingeführt worden und haben einen wichtigen Beitrag zur Beurteilung der Schädel- und Gesichtsentwicklung geleistet [11,17,22,29].

1 Ein relativ neues Verfahren zur Untersuchung der Ausdehnung eines
2 Körpers stellt die Volumetrie dar, bei der das Volumen eines Körpers
3 durch die Addition aller zu seinem Bild gehörenden Voxel bestimmt wird
4 [20].
5

6
7 Da es zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur unzureichende Kenntnisse über
8 den Effekt einer Kiefergelenkarthritis auf das Unterkieferwachstum und
9 insbesondere die Auswirkung einer Biologica-Therapie mit TNF- α -
10 Antagonisten gibt, war das Ziel dieser in-vivo-Studie, das
11 Unterkieferwachstum bei Kaninchen mit beidseitiger Kiefergelenkarthritis
12 zu bestimmen und die Auswirkung einer Therapie mit Etanercept auf die
13 Größenentwicklung des Unterkiefers durch Volumetrie zu untersuchen.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Material and Methode

Versuchstiere

18 weibliche "New Zealand White Rabbit"-Kaninchen (Alter: 8 Wochen, Durchschnittsgewicht: $1,8 \pm 0,2$ kg) wurden in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité – Universitätsmedizin Berlin gehalten. Alle Tiere hatten Zugang zu Futter und Wasser ad libitum und ihr Wohlbefinden wurde insbesondere durch die tägliche Aufzeichnung des Futter und Wasserkonsums bei der Visite sowie durch wöchentliche Gewichtskontrollen erfasst.

Bereits vor ihrer Ankunft waren alle Tiere randomisiert auf drei Gruppen zu je sechs Tieren verteilt worden. Bei den Tieren in Gruppe B und C wurde nach vorheriger Sensibilisierung auf Ovalbumin (OA) in Anlehnung an die Vorgehensweise von Kapila et al. [7] beidseitige Kiefergelenkarthritiden durch Gelenkinjektionen mit OA erzeugt. Die Tiere in Gruppe A dienten als Kontrolle, sie erhielten weder intraartikuläre Injektionen, noch irgendwelche anderen Behandlungen. Die Tiere in Gruppe C erhielten wöchentlich subkutane Injektionen mit Etanercept (Abbildung 1).

Die Genehmigung zur Durchführung dieser Studie durch die zuständige Landesbehörde lag vor (LAGeSo N G 0195/09).

Arthritis-Induktion

Von der zehnten bis zur dreizehnten Alterswoche wurden die Tiere in den Gruppen B und C systematisch mit Ovalbumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und inkomplettem und komplettem Freund's Adjuvans (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) wie bei Kapila et al. [7] beschrieben sensibilisiert.

Nachdem die erfolgreiche Sensibilisierung bei allen Tieren aus Gruppe B und C durch eine intradermale OA-Injektion getestet und bestätigt worden war, erfolgte in der dreizehnten Woche in Intraperitonealanästhesie mit Ketaminchlorid (25 mg/kg Körpergewicht(KG)) und Xylazin (4 mg/kg KG) die Induktion einer Arthritis in beiden Kiefergelenken durch intraartikuläre Injektion von 0,1

1 ml OA-Lösung (5mg/ml). Die Maßnahme wurde alle drei Wochen
2 wiederholt und erfolgte in Anlehnung an die Vorgehensweise von
3 Stoustrup et al. [23]. Ziel war es, die intraartikuläre Entzündung während
4 des gesamten Experiments aufrecht zu erhalten und das klinische Bild
5 der JIA, welche durch wiederholte Perioden akuter Entzündung
6 charakterisiert sein kann, zu simulieren.
7
8
9

10 11 12 **Arthritistherapie mit Etanercept**

13 Nach Arthritisinduktion erhielten die Tiere in Gruppe C ab Woche 13
14 wöchentliche subkutane Injektionen mit Etanercept (Enbrel, Wyeth,
15 Münster, Germany) in einer Dosierung von 0,8 mg/kg KG bis zum Ende
16 der Studie.
17
18
19
20
21
22

23 **CT-Volumetrie der Unterkiefer**

24 Um das Wachstumsverhalten der Kaninchenunterkiefer zu analysieren,
25 wurden unter Sedierung alle drei Wochen über einen Zeitraum von 5
26 Monaten Volumendatensätze der Unterkiefer an einem 64-Zeilen-CT
27 (Light Cyclor, GE Medical Systems, Milwaukee, IL, USA) mit einer
28 Schichtdicke von 0,625 mm generiert (140 kV, 100 mA). Bei der
29 anschließenden Bildauswertung wurden nach manueller und
30 schwellenwertbasierter Segmentation die Volumina der Unterkiefer
31 mittels Volumenrekonstruktionstechnik (VRT) ermittelt (Software Volume
32 Viewer 2 AW Suite 2.0, GE Medical Systems, Milwaukee, IL, USA).
33 (Abbildung 2). Anschließend wurden die Kieferköpfchen vom Unterkiefer
34 manuell separiert, und ihre Volumina seitengetreunt mittels VRT
35 bestimmt.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 **Messfehler und Zuverlässigkeit**

50 Zur Bestimmung des Methodenfehlers wurden an 20 zufällig
51 ausgewählten CTs die Segmentierung und die Bestimmung des
52 Volumens des Unterkiefer und der Kondylen nach einer Zeit von mehr
53 als vier Wochen wiederholt. Der Methodenfehler wurde dann nach
54 Dahlberg [4] bestimmt:
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

$$\text{Methodenfehler} = \sqrt{\sum d^2/2n}$$

Dabei ist d die Differenz zwischen 2 Bestimmungen und n die Stichprobengröße.

Ferner wurde mit dem t-Test nach Student untersucht, ob der Unterschied zwischen der ersten und der zweiten Bestimmung signifikant war.

Statistik

Die Entwicklung des Gesamtunterkieferervolumens und des Volumens der Kiefergelenkköpfchen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz überprüft. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt. Bei Signifikanz erfolgte nach Bonferroni-Korrektur die Anwendung des Mann-Whitney-Tests zum paarweisen Gruppenvergleich.

Ebenso wurden bei jedem der 4 Intervalle zunächst die Ergebnisse der drei Gruppen miteinander mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen und im Falle von Signifikanz ($p < 0,05$) im Anschluss paarweise Mann-Whitney-Tests durchgeführt. Dabei erfolgte zuvor die Bonferroni-Adjustierung wie bei der Gesamtentwicklung.

Ergebnisse

Bei der Narkose vor der ersten Computertomographie im Alter von 10 Wochen erwachten zwei Tiere aus der Kontrollgruppe nicht aus der Narkose. Gemäß dem von der Landesbehörde genehmigten Versuchsprotokoll wurden die beiden verstorbenen Tiere durch zwei Reservetiere ersetzt und wurden bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Volumenzunahme des Unterkiefers war nicht stetig sondern es konnte eine Abnahme der relativen Volumenzunahme des Unterkieferkörpers von der 10. zur 22. Woche in allen drei Gruppen beobachtet werden. Die größte Volumenzunahme war zwischen der 10. und der 13. Woche feststellbar (Abbildung 3). Schwere Wachstumsstörungen zeigten sich bei Arthritis, insbesondere bei Betrachtung der Kiefergelenkköpfchen (Abbildung 4). Demgegenüber wurde die Entwicklung des Unterkieferkörpers geringer von der Gelenkentzündung beeinflusst. Bei den Tieren mit Etanercept-Therapie konnte eine größere relative Volumenzunahme als bei den Tieren ohne Therapie beobachtet werden, allerdings war diese nicht so groß wie in der Kontrollgruppe (Abbildungen 3 und 4).

Volumenentwicklung des Unterkieferkörpers über den Gesamtzeitraum

Eine Volumenzunahme des Unterkieferkörpers konnte bei allen Tieren von der 10. bis zur 22. Woche beobachtet werden.

In der Kontrollgruppe betrug die durchschnittliche Volumenzunahme 56 ± 6 %. Demgegenüber waren es nur 45 ± 5 % bei den Tieren mit Arthritis aber ohne Therapie. In der Gruppe mit Etanercepttherapie konnte eine Volumenzunahme von 51 ± 5 % festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren signifikant (Abbildung 3).

Volumenentwicklung der Kiefergelenkköpfchen über den Gesamtzeitraum

1 Die relative prozentuale Volumenzunahme der Kiefergelenkköpfchen
2 war bei allen Gruppen geringer, als die des Unterkieferkörpers. Auch
3 waren die Unterschiede zwischen den Gruppen hier größer. Sie betrug
4 bei den Kontrolltieren $38 \pm 7 \%$, gegenüber $19 \pm 5 \%$ bei den
5 Arthritistieren. Unter Etanercepttherapie konnten wir eine
6 Volumenzunahme von $29 \pm 5 \%$ feststellen (Abbildung 4).
7
8
9

10 **Volumenentwicklung des Unterkieferkörpers in den Intervallen**

11 Die relative Volumenzunahme des Unterkieferkörpers in den vier
12 dreiwöchigen Intervallen von der 10. bis zur 22. Woche war nicht
13 gleichmäßig. Wir beobachteten die größte prozentuale
14 Volumenzunahme im ersten Intervall, also von der 10. bis zur 13.
15 Woche. Hier bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den
16 Gruppen. Im 2. und 3. Intervall bestand ein signifikanter Unterschied
17 zwischen der Kontrollgruppe und den beiden anderen Gruppen, im
18 dritten Intervall auch zwischen der Therapiegruppe und der
19 Arthritisgruppe. Die Volumenzunahme war in der Kontrollgruppe jeweils
20 am ausgeprägtesten, die Etanerceptgruppe verzeichnete eine stärkere
21 Zunahme als die Arthritisgruppe im 3. Intervall. Von der 19. bis zur 22.
22 Woche war die Volumenzunahme in allen drei Gruppen nur noch gering
23 und es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den
24 Gruppen. Bemerkenswert war aber, dass die prozentuale
25 Volumenzunahme sowohl in der Arthritis-, als auch der
26 Etanerceptgruppe stärker war, als in der Kontrollgruppe (Abbildung 3).
27 In der Arthritisgruppe verlief die Wachstumsverlangsamung flacher, als
28 in der Kontrollgruppe, bei der es beim Übergang vom dritten zum vierten
29 Intervall einen scharfen Abfall gab (Abbildung 3).
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 **Volumenentwicklung der Kiefergelenkköpfchen in den Intervallen**

50 Die Volumenentwicklung der Kiefergelenkköpfchen in den Intervallen
51 folgte in etwa der Entwicklung der Volumina des gesamten Unterkiefers.
52 Von der 10. bis zur 13. Woche beobachteten wir in der Arthritis- und der
53 Etanerceptgruppe die stärkste Volumenzunahme ohne einen
54 signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen festzustellen. Von
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

der 13. bis zur 16. Woche erreichte die Volumenzunahme in der Kontrollgruppe ihren Peak. Die Unterschiede waren in diesem Intervall zwischen allen Gruppen signifikant. Im weiteren Verlauf reduzierte sich das Wachstum in allen Gruppen.

Im Intervall zwischen der 13. und der 16. Woche war der Unterschied zwischen den Arthritistieren und der Kontrollgruppe am ausgeprägtesten.

Im vierten Intervall beobachteten wir nur noch eine geringe Volumenzunahme. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nur und nicht signifikant (Abbildung 4).

Methodenfehler

Bei der Bestimmung des Unterkiefervolumens lag der Methodenfehler nach Dahlberg bei 146 mm^3 , bei den Gelenkfortsätzen belief er sich auf 2 mm^3 . Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der ersten und der zweiten Messung.

Diskussion

Das hier verwendete Kaninchenmodell wurde bereits andernorts eingesetzt, um die Auswirkungen einer Kiefergelenkentzündung auf das Wachstum des Unterkiefers zu untersuchen. Ebenso wie Tavakkoli-Jou et al. [26] und Stoustrup et al. [23] beobachteten auch wir eine Wachstumshemmung des Unterkiefers bei den Tieren, bei denen eine Arthritis induziert worden war. Im Gegensatz allerdings zu Tavakkoli-Jou et al., die eine Arthritis allein durch eine einmalige Ovalbumininjektion in das Kiefergelenk erzeugten, wiederholten wir die intraartikuläre Gabe von Ovalbumin in dreiwöchigen Abständen. Wir lehnten uns dabei an die Vorgehensweise von Stoustrup et al. an, die die Injektionen in dreiwöchigen Abständen wiederholten, da sie zuvor in einer Pilotstudie beobachtet hatten, dass bei Kaninchen mit einmaliger Ovalbumingabe die Entzündung nach 12-wöchiger Beobachtung nicht mehr nachweisbar war. Neben dem Aufrechterhalten der intraartikulären Entzündung ist auch der klinische Verlauf der JIA ein Argument für die wiederholte Induktion der Entzündung, da dieser nicht gleichmäßig verläuft, sondern das Krankheitsbild durch akute Entzündungsschübe mit nachfolgenden Remissionen charakterisiert sein kann [13]. Die in dieser Studie angewandte Volumetrie untersucht das Volumen eines Körpers und basiert auf einem dreidimensionalen bildgebenden Verfahren. Ebenso wie wir verwendeten bereits Steinbacher et al. die Methodik, um Volumenunterschiede zwischen den beiden Gesichtshälften bei hemifazialer Mikrosomie festzustellen [22]. Yavuz et al. konnten die Zuverlässigkeit der Volumenbestimmung auf Basis von Spiralcomputertomographien bei Knochentransplantaten aus der Unterkiefersymphysenregion aufzeigen, indem sie die Transplantate zusätzlich direkt vermaßen [32]. Auch Yitschaky et al. bestätigten die Genauigkeit der CT-basierten Volumenbestimmung anhand von Schädelmodellen [33]. In den letzten Jahren konnte sich neben der Computertomographie die Digitale Volumetomographie zur Darstellung der knöchernen Verhältnisse im Kiefer- und Gesichtsbereich etablieren und wurde

1 andernorts auch benutzt, um das Volumen des Condylus und des
2 Unterkiefers zu bestimmen [27]. Es konnte gezeigt werden, dass beide
3 Verfahren zuverlässig die knöchernen Verhältnisse im Kiefer und
4 Gesichtsbereich darstellen, allerdings ist die Strahlenbelastung bei der
5 Computertomographie höher.
6

7
8 Die relative Volumenzunahme des Unterkieferkörpers betrug während
9 des Beobachtungszeitraums bei den Kontrolltieren 56 %, bei den
10 Kondylen hingegen nur 38 %. Somit war das Wachstum des gesamten
11 Unterkiefers relativ größer, als das der Gelenkfortsätze.
12

13 Bei den Tieren mit Arthritis betrug die Volumenzunahme des
14 Unterkieferkörpers etwa ein Fünftel weniger. Bei der Volumenzunahme
15 des Kondylus beobachteten wir eine noch ausgeprägtere Differenz
16 zwischen Kontrolltieren und Arthritisgruppe, die relative
17 Volumenzunahme war nur etwa halb so groß wie in der Kontrollgruppe.
18 Die Wachstumshemmung durch die Entzündung im Gelenk machte sich
19 also besonders deutlich im Bereich des Processus condylaris
20 bemerkbar, viel weniger ausgeprägt bei der Entwicklung des
21 Gesamtunterkiefer Volumens. Eine Entwicklung, die plausibel erscheint,
22 weil sich die Entzündung im Gelenkspalt abspielte, also in unmittelbarer
23 Nähe zu den Wachstumszonen des Processus condylaris.
24

25 Klinisch entspricht diese Beobachtung dem Bild des wachsenden
26 Patienten, der unter einer Kiefergelenkarthritis leidet und in dessen
27 Folge sich eine Verkürzung des aufsteigenden Astes mit einem offenen
28 Biss entwickelt [18]. Der offene Biss ließ sich aber von uns vermutlich
29 deshalb nicht beobachten, da die Kaninchenzähne permanent wachsen
30 und ein vertikales Defizit durch Zahnwachstum oder
31 Alveolarfortsatzwachstum ausgeglichen wird.
32

33 Ausdruck der erfolgreichen Therapie mit Etanercept war die größere
34 Volumenzunahme des Kondylus und des Unterkiefers im Vergleich zu
35 den Tieren ohne Therapie. Ebenso wie bei der Entwicklung des
36 gesamten Unterkiefers führte die Therapie zu einer Besserung der
37 Volumenentwicklung des Kondylus, jedoch war auch hier keine
38 vollständige Normalisierung zu finden.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Das Ausbleiben einer vollständigen Wachstumsnormalisierung infolge
2 unserer Therapie kann durch mehrere Effekte begründet sein. Zum
3 einen ist die hier gewählte Dosierung von 0,8 mg/ Woche zwar für den
4 Menschen optimal, jedoch sind bei der „renalen Clearance“
5 Unterschiede zwischen Mensch und Kaninchen anzunehmen. Somit
6 wäre eine schnellere Entfernung des Pharmakons denkbar, wodurch
7 seine Wirksamkeit sänke.
8 Neben einer möglichen Unterdosierung ist auch an eine reduzierte
9 Wirksamkeit dieses humanen Medikaments beim Kaninchen zu denken.
10 Etanercept ist ein gentechnologisch hergestellter Wirkstoff, der an
11 humanes TNF- α und - β bindet und diese durch Bindung inaktiviert. Da
12 humane TNF- α -Blocker für Kaninchen Antigene darstellen, ist eine
13 Neutralisierung des Pharmakons durch Antikörper wahrscheinlich.
14 Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass der mit TNF- α -
15 verbundene Weg nur ein möglicher Mechanismus für eine
16 Gelenkschädigung durch Entzündung ist. Andere Mechanismen können
17 durch Etanercept eventuell nicht beeinflusst werden.
18 In unserer Studie verwendeten wir 10 Wochen alte Kaninchen. Nach
19 Studien von Mills et al. [15] und von Masoud et al. [14] handelt es sich
20 um ein Alter, in dem der pubertäre Wachstumsschub noch bevorsteht,
21 also um einen Zeitraum, in denen beim Menschen häufig
22 funktionskieferorthopädische Apparaturen eingesetzt werden und
23 welches auch für die Kieferorthopädie von besonderem Interesse ist, da
24 Kinder, die an JIA leiden eben in diesem Zeitraum
25 Wachstumshemmungen zeigen.
26 Aus diesem Grund wählten auch andere Autoren, die das
27 Wachstumsverhalten an Hand von Kaninchen beurteilten Tiere in
28 diesem Alter [1,3,12,21].
29 In unserer Studie führten wir dreiwöchentlich ein CT durch, um das
30 Wachstum in diesen Intervallen zu beurteilen, eine Vorgehensweise, die
31 von Tavakkouli-Jou et al. mit konventionellen Fernröntgenseitenbildern
32 durchgeführt wurde [26]. Dabei konnten diese das Wachstum aber nur
33 zweidimensional beurteilen, eine Beurteilung der Transversalebene oder
34 der Volumenentwicklung konnte dort nicht durchgeführt werden. Wie
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 diese konnten wir aber auch feststellen, dass die
2 Wachstumsgeschwindigkeit nicht stetig, sondern am Anfang der
3 dreimonatigen Beobachtungszeit am höchsten war und danach
4 abnahm. Dieses traf für alle drei Gruppen zu.
5

6
7 Im Gegensatz zu anderen Spezies und dem Menschen ist das
8 Wachstum der Kaninchen in dem untersuchten Zeitraum
9 verhältnismäßig gering, Masoud et al. führten aufgrund ihrer
10 Beobachtungen mit Fernröntgenseitenbildern aus, dass in der 16.
11 Woche bereits 90 % der Unterkieferlängenentwicklung stattgefunden
12 haben [14]. Diese Beobachtungen konnten wir hier tendenziell
13 bestätigen, wenngleich die Volumenzunahme auch nach der 16. Woche
14 noch etwas mehr als 10 Prozent beträgt. Sie stehen aber auch deshalb
15 nicht in Widerspruch zu unseren Ergebnissen, da Massoud et al. die
16 Längenentwicklung, wir hingegen das Volumen beurteilt haben, unsere
17 Ergebnisse also auf der dritten Potenz beruhen.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 **Schlussfolgerung**

29 Die Antigeninduzierte Arthritis des Kiefergelenks führt beim
30 heranwachsenden Kaninchen zu Wachstumsstörungen des
31 Unterkiefers, insbesondere des Kondylus.
32

33 Durch die Therapie mit Etanercept in der hier gewählten Dosierung und
34 Applikationsart konnte eine Besserung, jedoch keine vollständige
35 Normalisierung des Wachstums erreicht werden.
36

37 Die Beurteilung der Volumenzunahme erscheint geeignet, das
38 Wachstum des Unterkiefers darzustellen.
39
40
41

42 Diese Arbeit wurde durch den Forschungsfonds der Deutschen
43 Gesellschaft für Kieferorthopädie unterstützt.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1. Bang S, Enlow DH. Postnatal growth of the rabbit mandible. *Arch Oral Biol* 1967;12:993-998
2. Bryndahl F, Legrell PE, Eriksson L, et al. Titanium screw implants in optimization of radiographic evaluation of facial growth in longitudinal animal studies. *Angle Orthod* 2004;74:610-617
3. Bryndahl F, Eriksson L, Legrell PE, et al. Bilateral TMJ disk displacement induces mandibular retrognathia. *J Dent Res* 2006;85:1118-1123
4. Dahlberg G. *Statistical methods for medical and biological students*. London: Allen and Unwin; 1940
5. Dannecker GE, Quartier P. Juvenile idiopathic arthritis: classification, clinical presentation and current treatments. *Horm Res* 2009;72 Suppl 1:4-12
6. Gartlehner G, Hansen RA, Jonas BL, et al. Biologics for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: a systematic review and critical analysis of the evidence. *Clin Rheumatol* 2008;27:67-76
7. Kapila S, Lee C, Tavakkoli Jou MR, et al. Development and histologic characterizations of an animal model of antigen-induced arthritis of the juvenile rabbit temporomandibular joint. *J Dent Res* 1995;74:1870-1879
8. Kristensen KD, Stoustrup P, Kùseler A, et al. Quantitative histological changes of repeated antigen-induced arthritis in the temporomandibular joints of rabbits treated with intra-articular corticosteroid. *J Oral Pathol Med* 2008;37:437-444
9. Kristensen KD, Stoustrup P, Kùseler A, et al. Intra-articular vs. systemic administration of etanercept in antigen-induced arthritis in the temporomandibular joint. Part I: histological effects. *Pediatr Rheumatol Online J* 2009;7:5
10. Kristensen KD, Hauge EM, Dalstra M, et al. Association between condylar morphology and changes in bony microstructure and sub-synovial inflammation in experimental temporomandibular joint arthritis. *J Oral Pathol Med* 2011;40:111-120
11. Landau H, Schroder R, Roth J. Panoramic X-rays. *Comprehensive radiodiagnostics or radiation protection at all costs?* *J Orofac Orthop* 2005;66:78-82
12. Losken A, Mooney MP, Siegel MI. A comparative study of mandibular growth patterns in seven animal models. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50:490-495
13. Lurati A, Salmaso A, Gerloni V, et al. Accuracy of Wallace criteria for clinical remission in juvenile idiopathic arthritis: a cohort study of 761 consecutive cases. *J Rheumatol* 2009;36:1532-1535
14. Masoud I, Shapiro F, Moses A. Longitudinal roentgencephalometric study of the growth of the New Zealand white rabbit: cumulative and biweekly incremental growth rates for skull and mandible. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1986;6:259-287
15. Mills DK, Daniel JC, Scapino R. Histological features and in-vitro proteoglycan synthesis in the rabbit craniomandibular joint disc. *Arch Oral Biol* 1988;33:195-202
16. Mußler A, Allozy B, Landau H, et al. Vergleich magnetresonanztomographischer und klinischer Befunde im zeitlichen Verlauf bei Kindern und Jugendlichen mit einer Arthritis des Kiefergelenks bei juveniler ideopathischer Arthritis. *Rofo* 2009;182:36-44
17. Othman AA, El-Beialy AR, Fawzy SA, et al. Methods for managing 3-dimensional volumes. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:266-273
18. Pedersen TK, Kuseler A, Gelineck J, et al. A prospective study of magnetic resonance and radiographic imaging in relation to symptoms and clinical findings of the temporomandibular joint in children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2008;35:1668-1675

19. Pirttiniemi P, Peltomäki T, Müller L, et al. Abnormal mandibular growth and the condylar cartilage. *Eur J Orthod* 2009;31:1-11
20. Rothe JH, Steffen IG, Lehmkuhl L, et al. Volume measurement of liver metastases using multidetector computed tomography: comparison of lesion diameter and volume segmentation - a phantom study. *Rofo* 2010;182:1082-1090
21. Sergl HG, Farmland M. Experiments with unilateral bite planes in rabbits. *Angle Orthod* 1975;45:108-114
22. Steinbacher DM, Gougoutas A, Bartlett SP. An analysis of mandibular volume in hemifacial microsomia. *Plast Reconstr Surg* 2011;127:2407-2412
23. Stoustrup P, Kristensen KD, Kuseler A, et al. Reduced mandibular growth in experimental arthritis in the temporomandibular joint treated with intra-articular corticosteroid. *Eur J Orthod* 2008;30:111-119
24. Stoustrup P, Kristensen KD, Kuseler A, et al. Intra-articular vs. systemic administration of etanercept in antigen-induced arthritis in the temporomandibular joint. Part II: mandibular growth. *Pediatr Rheumatol Online J* 2009;7:6
25. Stoustrup P, Kristensen KD, Kuseler A, et al. Condylar lesions in relation to mandibular growth in untreated and intra-articular corticosteroid-treated experimental temporomandibular joint arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010;28:576-583
26. Tavakkoli-Jou M, Miller AJ, Kapila S. Mandibulofacial adaptations in a juvenile animal model of temporomandibular joint arthritis. *J Dent Res* 1999;78:1426-1435
27. Tecco S, Saccucci M, Nucera R, et al. Condylar volume and surface in Caucasian young adult subjects. *BMC Med Imaging* 2011;10:28
28. Tzaribachev N, Schafer J, Ernemann U, et al. Juvenile Idiopathische Arthritis - die heimliche Entzündung kindlicher Kiefergelenke. *Rofo* 2009;181:303-305
29. Veli I, Uysal T, Ozer T, et al. Mandibular asymmetry in unilateral and bilateral posterior crossbite patients using cone-beam computed tomography. *Angle Orthod* 2011;81:966-974
30. von Bremen J, Ruf S. Juvenile idiopathic arthritis-and now?: a systematic literature review of changes in craniofacial morphology. *J Orofac Orthop* 2012;73:265-276
31. von Bremen J, Ruf S. Orthodontic and dentofacial orthopedic management of juvenile idiopathic arthritis: a systematic review of the literature. *Orthod Craniofac Res* 2011;14:107-115
32. Yavuz MS, Buyukkurt MC, Tozoglu S, et al. Evaluation of volumetry and density of mandibular symphysis bone grafts by three-dimensional computed tomography. *Dent Traumatol* 2009;25:475-479
33. Yitschaky O, Redlich M, Abed Y, et al. Comparison of common hard tissue cephalometric measurements between computed tomography 3D reconstruction and conventional 2D cephalometric images. *Angle Orthod* 2011;81:11-16

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

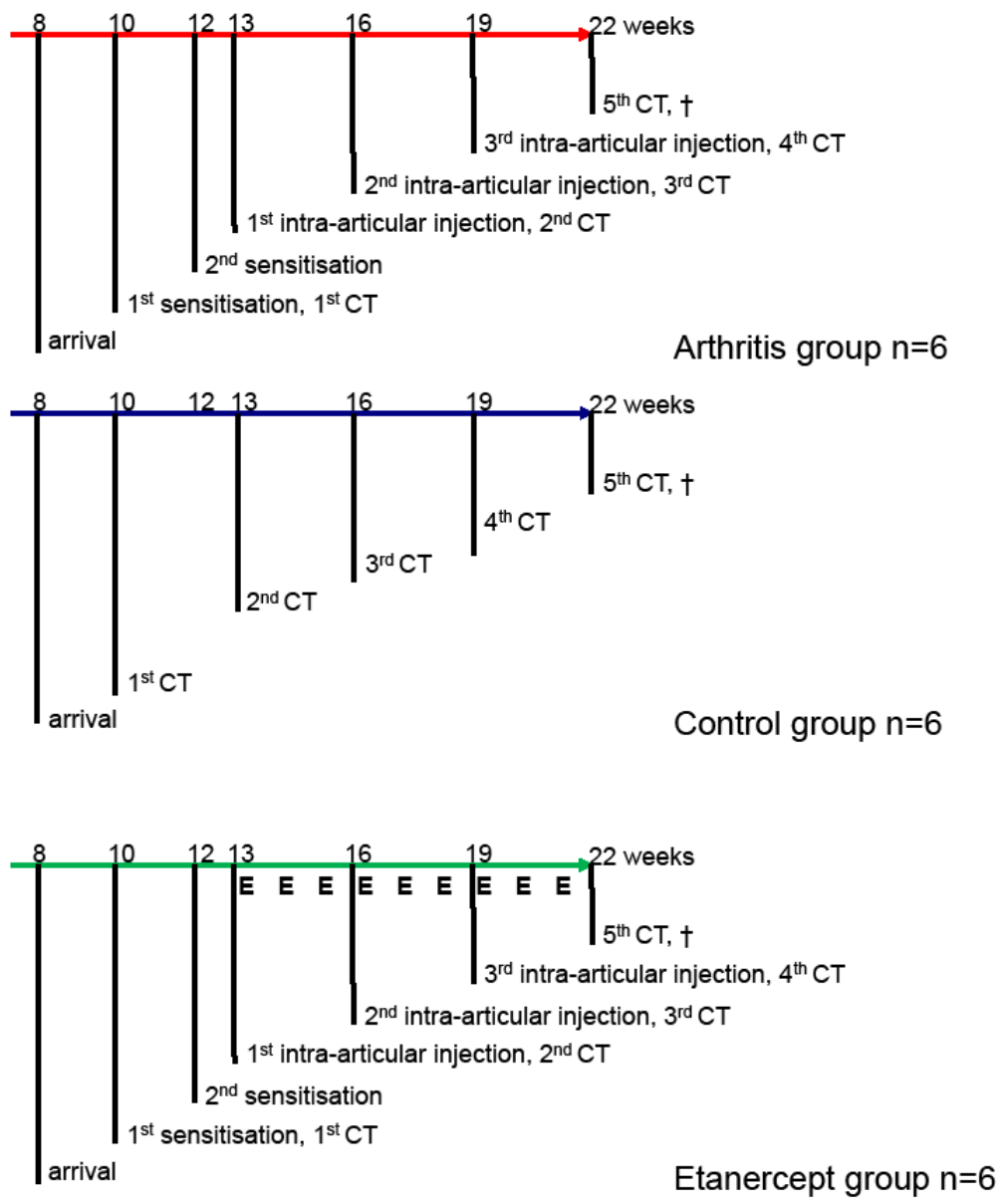


Abbildung 1

Zeitlicher Ablauf des Versuchs in der Arthritis, der Kontroll- und der Etanercept-Gruppe.

E: Etanercept-Gabe

Woche	10	13	16	19	22
Arthritis	5600 ± 458	6664 ± 605	7336 ± 562	7784 ± 835	8128 ± 772
Etanercept	4874 ± 201	5898 ± 660	6482 ± 444	7019 ± 365	7357 ± 483
Kontrolle	4900 ± 687	5929 ± 146	6762 ± 740	7399 ± 537	7651 ± 401

Tabelle 1. Mittelwerte der Unterkiefervolumina mit Standardabweichung in mm³

Woche	10	13	16	19	22
Arthritis	73 ± 18	81 ± 11	84 ± 18	86 ± 21	87 ± 24
Etanercept	64 ± 18	72 ± 9	77 ± 23	81 ± 14	83 ± 17
Kontrolle	68 ± 10	76 ± 18	85 ± 9	91 ± 13	94 ± 24

Tabelle 2. Mittelwerte der Kiefergelenkköpfchenvolumina mit Standardabweichung in mm³

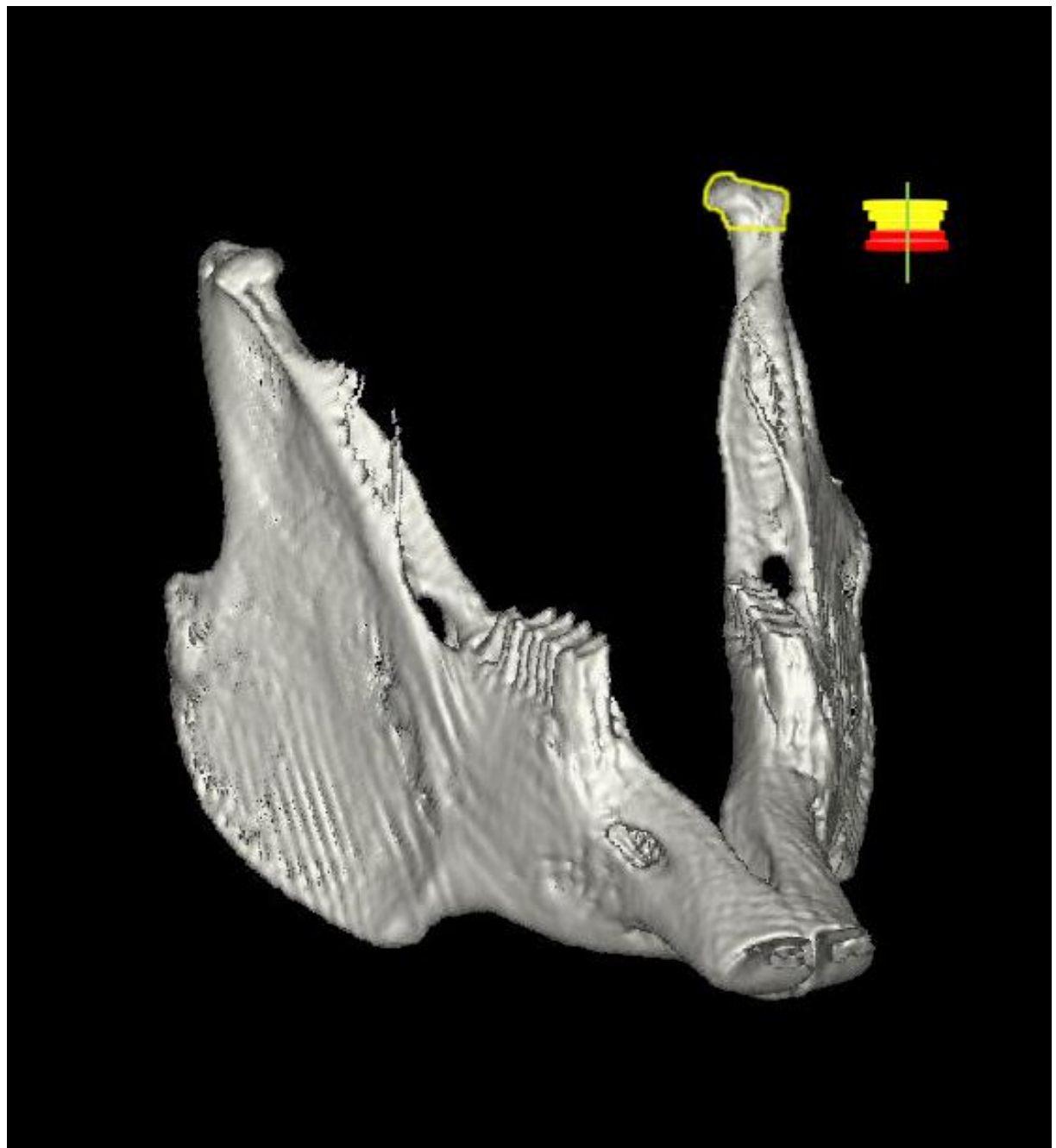


Abbildung 2: Darstellung eines segmentierten Unterkiefers. Der linke Kondylus ist gelb umrandet. Die kaudale Grenze des Kondylus definierten wir dort, wo der Processus condylaris den geringsten Durchmesser kaudal des Kondylus und senkrecht zur Längsachse des Processus hatte. Die Skizze neben dem Kondylus skizziert diesen als aus Scheiben aufgebaut. Die Scheibe mit dem kleinsten Durchmesser ist die untere Grenze des Kondylus. Die gelben Scheiben gehören folglich zum Kondylus und gehen in die Volumenberechnung ein, die roten nicht. Die grüne Linie

repräsentiert die Längsachse des Processus condylaris.

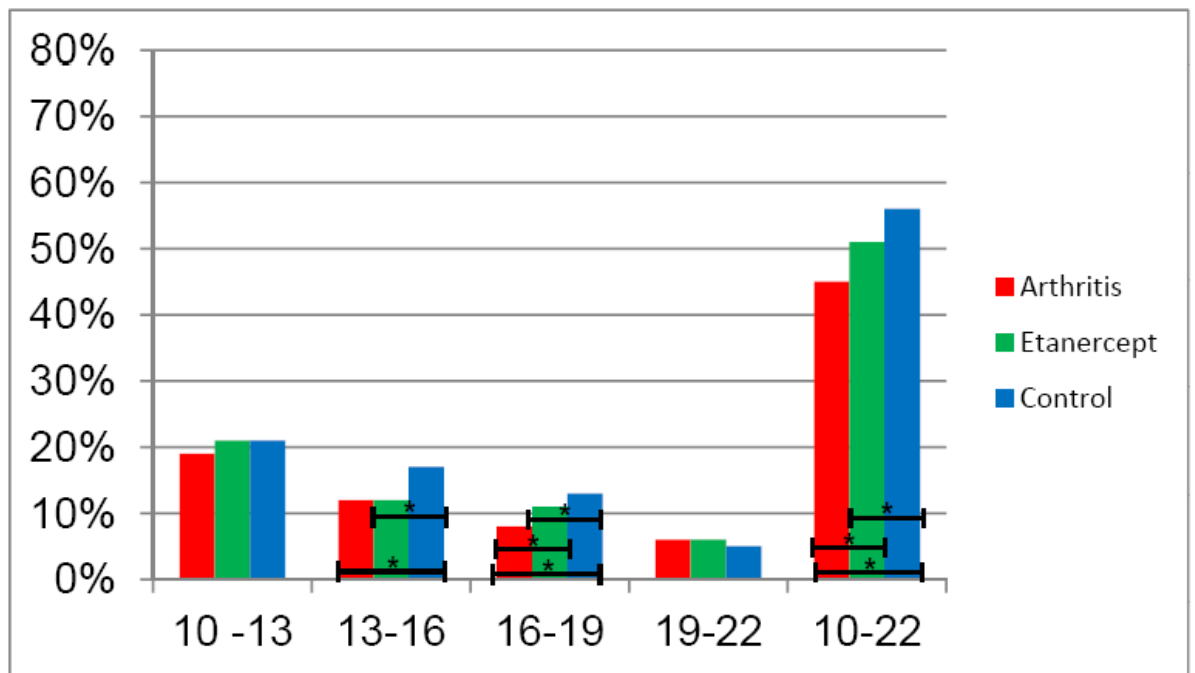


Abbildung 3: Relative Volumenzunahme des Unterkieferkörpers während der vier Intervalle und gesamt.

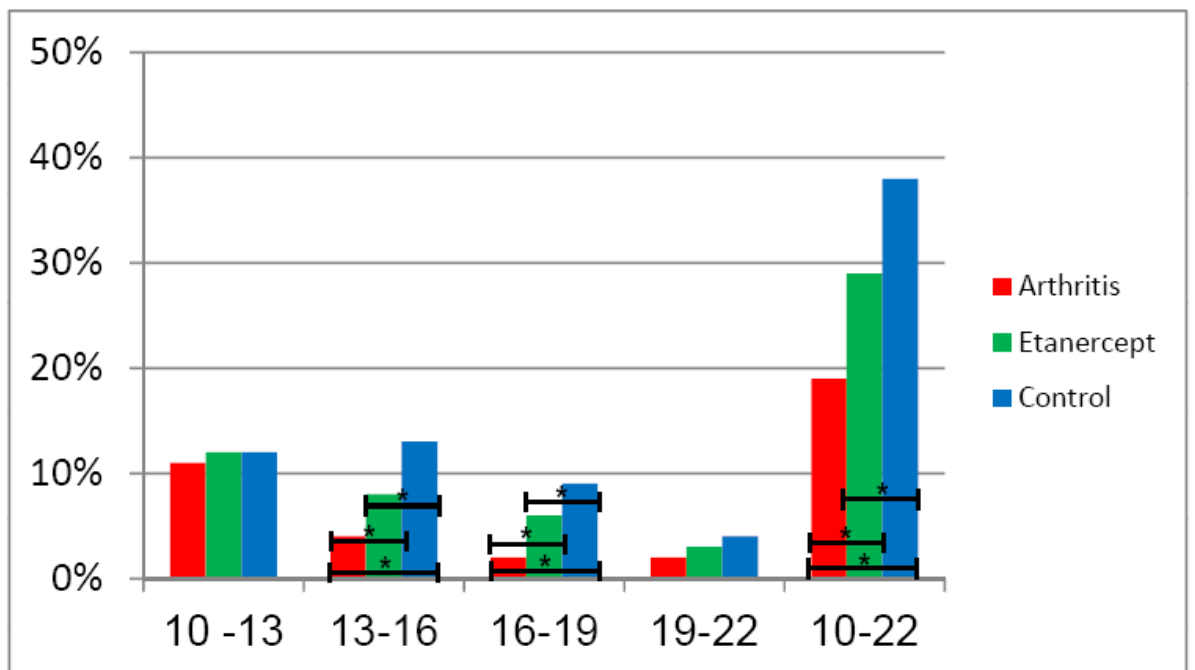


Abbildung 4: Relative Volumenzunahme der Kiefergelenkköpfchen während der vier Intervalle und gesamt.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Posterpräsentationen

- Rafayelyan S, Präger TM, Landau H, Mußler A
Untersuchung der Unterkieferentwicklung beim heranwachsenden Kaninchen mit CT-basierter Volumetrie
83. Wissenschaftliche Jahrestagung der DGKFO
Frankfurt am Main 2010
- Präger TM, Rafayelyan S, Landau H, Pischon N, Müller-Hartwich R, Mußler A
Dreidimensionale Untersuchung der Unterkieferentwicklung bei gesunden und arthritischen Kaninchen
84. Wissenschaftliche Jahrestagung der DGKFO
Dresden 2011
- Präger TM, Rafayelyan S, Landau H, Müller-Hartwich R, Mußler A
Three dimensional investigation of the mandibular development in healthy and arthritic rabbits
87th EOS-Congress
Istanbul 2011

Veröffentlichungen

- Rafayelyan S, Radlanski RJ, Minden K, Pischon N, Jost-Brinkmann P-G, Präger TM. Histomorphometry in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. Journal of Oral Pathology and Medicine 2014

Impact Factor: 1.870

- Rafayelyan S, Meyer P, Radlanski RJ, Minden K, Jost-Brinkmann P-G, Präger TM. Effect of methotrexate upon antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. Journal of Oral Pathology and Medicine 2014

Impact Factor: 1.870

- Präger TM, Rafayelyan S, Landau H, Pischon N, Minden K, Jost-Brinkmann P-G, Müller-Hartwich R, Mußler A. Influence of arthritis of the TMJ and its therapy on the development of the mandibular volume: An in-vivo-study. Journal of Orofacial Orthopedics 2014

Impact Factor: 0.819

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Paul-G. Jost-Brinkmann danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie für seine Unterstützung und seinen fachlichen Rat.

Herrn Dr. Dr. Thomas Michael Präger danke ich besonders herzlich für die Einführung in die Methodik und seine Hilfestellungen bei der Durchführung.

Sehr herzlicher Dank gebührt Frau Dr. Helga Landau für ihre guten Ratschläge und ihre freundliche Unterstützung.

Prof. Dr. Dr. Ralf J. Radlanski danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Forschungslabor.

Ich danke ferner der Studienstiftung des Abgeordnetenhauses von Berlin für das mir gewährte Forschungsstipendium.

Nicht zuletzt geht ein ganz besonderer Dank an meine Eltern für ihre unendliche Geduld und moralische Unterstützung.