

**Immunhistochemische Untersuchungen zur Differenzierung unterschiedlicher
Knochenreaktionen auf Bisphosphonate in Humanpräparaten**

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

Stephanie Theresa Stürmer

aus Essen

2013

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Univ. - Prof. Dr. med dent. G. Wahl
2. Gutachter: Univ. - Prof. Dr. med. B. Pöttsch

Tag der Mündlichen Prüfung: 27. Mai. 2013

Aus der Poliklinik für Chirurgische Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde
des Zentrums für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde
Direktor: Univ. - Professor Dr. G. Wahl

Meinen geliebten Eltern,
Walburga und Michael Stürmer
gewidmet.
Sie gaben mir die Freiheit,
wählen zu dürfen.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	11
1.	Einleitung	13
1.1	Historischer Überblick.....	13
1.2	Pharmakodynamik und Phamakokinetik.....	14
1.3	Wirkung auf Osteoklasten.....	17
1.4	Effekte auf andere Zellpopulationen.....	21
1.5	Indikationen.....	22
1.6	Antitumoröse Eigenschaften.....	24
1.7	Nebenwirkungen – Symptome und Ursachen.....	25
1.8	Weitere Nebenwirkungen.....	28
1.9	Prophylaxe und Therapie der BRONJ.....	28
1.10	Enzyme/Zytokine des Knochenstoffwechsels.....	30
1.11	Fragestellung.....	35
2.	Material und Methoden	37
2.1	Untersuchungsmaterial.....	37
2.1.1	Patientengruppe.....	37
2.2	Methoden.....	38
2.2.1	Fixierung.....	38
2.2.2	Entkalkung.....	38

2.2.3	Dehydrierung und Einbettung.....	38
2.2.4	Schnittanfertigung.....	39
2.2.5	Entparaffinierung.....	39
2.2.6	Übersichtsfärbungen.....	40
2.2.6.1	Hämatoxilin-Eosin-(HE-)Färbung.....	40
2.2.6.2	Trichrom nach Masson-Goldner.....	41
2.2.7	Histochemische Färbung.....	42
2.2.8.1	Pas-Reaktion.....	42
2.2.8.2	TRAP-Färbung.....	43
2.2.8	Immunhistochemie.....	43
2.2.8.1	Alkalische Phosphatase.....	44
2.2.8.2	Osteokalzin.....	45
2.2.8.3	Bone morphogenic protein 2 (BMP2).....	46
2.2.8.4	Runx2.....	47
2.2.8.5	RankL.....	48
2.2.8.6	OPG.....	49
2.2.8.7	Rank.....	50
2.2.8.8	CD 68/ ED1.....	51
2.2.8.9	Cathepsin K.....	51
2.2.8.10	Interleukin 1 β	52
2.2.8.11	TNF α	53
2.2.8.12	MMP8.....	54

2.2.8.13	Von Willebrand Faktor.....	55
2.2.8.14	Vascular endothelial growth factor.....	56
2.2.9	Kontrolle der Färbungen.....	57
2.2.9.1	Negativkontrolle.....	57
2.2.9.2	Positivkontrolle.....	57
2.2.10	Semiquantitative, photographische Dokumentation und Auswertung.....	57
3.	Ergebnisse.....	59
3.1	Anamnese.....	59
3.2	Histologische Übersichtsfärbungen.....	62
3.2.1	Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung.....	62
3.2.2	Trichrom nach Masson-Goldner.....	66
3.3	Histochemische Färbung.....	67
3.3.1	PAS-Reaktion.....	67
3.3.2	TRAP-Reaktion.....	68
3.4	Immunhistochemische Färbungen.....	72
3.4.1	Alkalische Phosphatase.....	72
3.4.2	Osteokalzin.....	74
3.4.3	BMP2.....	76
3.4.4	Runx2.....	77
3.4.5	RankL.....	79
3.4.6	OPG.....	81

3.4.7	Rank.....	82
3.4.8	ED1.....	84
3.4.9	Cathepsin K.....	86
3.4.10	Interleukin 1 β	87
3.4.11	TNF α	89
3.4.12	MMP8.....	90
3.4.13	VEGF.....	92
2.4.14	vWF.....	93
4.	Diskussion.....	96
4.1	Anamnese.....	99
4.1.1	Geschlecht.....	99
4.1.2	Alter.....	100
4.1.3	Kiefer.....	100
4.1.4	Extraktion.....	100
4.1.5	Wirkstoffgruppe und Administration.....	101
4.1.6	Metastasierende Tumorerkrankung.....	102
4.1.7	Chemotherapie.....	104
4.1.8	Nikotinabusus.....	104
4.1.9	Diabetes.....	105
4.2	Histologische Übersichtsfärbungen.....	106
4.2.1	Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung.....	106

4.2.2	Trichrom nach Masson-Goldner.....	108
4.3	Histochemische Färbung.....	108
4.3.1	PAS- Färbung.....	108
4.3.2	TRAP-Färbung.....	109
4.4	Immunhistochemische Färbungen.....	110
4.4.1	Osteoblastenspezifische Marker.....	110
4.4.1.1	Alkalische Phosphatase.....	111
4.4.1.2	Osteokalzin.....	112
4.4.1.3	BMP-2.....	113
4.4.1.4	Runx2.....	114
4.4.1.5	RankL.....	116
4.4.1.6	OPG.....	116
4.4.2	Osteoklastenspezifische Marker	117
4.4.2.1	Rank.....	117
4.4.2.2	TRAP.....	117
4.4.2.3	Rank/RankL/OPG- System.....	119
4.4.3.4	ED1.....	121
4.4.3.5	Cathepsin K.....	123
4.4.4	Entzündungsspezifische Marker.....	124
4.4.4.1	IL1 β	124
4.4.4.2	TNF α	124
4.4.4.3	MMP8.....	126

4.4.5	Gefäßsystemspezifische Marker	127
4.4.5.1	VEGF und vWF.....	127
5.	Zusammenfassung.....	132
6.	Anhang.....	134
6.1	Verwendete Reagenzien.....	134
6.2	Verwendete Chemikalien.....	134
6.3	Verwendete Geräte und Materialien.....	136
6.4	Verwendete Primärantikörper.....	136
6.5	Verwendete Sekundärantikörper.....	138
7.	Literaturverzeichnis.....	139
8.	Danksagung.....	161
9.	Lebenslauf.....	162

Abkürzungsverzeichnis

BMP-2	=	Bone morphogenic protein 2
BMD	=	Bone marrow density
BP	=	Bisphosphonat
BRONJ	=	Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw
Dtl.	=	Deutschland
FB	=	Fibroblasten
FPPS	=	Farnesyl-Pyrophosphat-Synthetase
GPSS	=	Geranyl-Pyrophosphat-Synthetase
i. v.	=	intravenös
IL1 β	=	Interleukin 1 beta
IPPS	=	Isopentenyl-Pyrophosphat-Synthetase
Lsg.	=	Lösung
Min.	=	Minuten
OPG	=	Osteoprotegerin
RabGGTase	=	Rab-Geranylgeranylsynthetase
Rank	=	Receptor activator of NF kappa B
RankL	=	Receptor activator of NF kappa B ligand
RL	=	Resorptionslakunen
RT	=	Raumtemperatur
RunX2	=	Runt related Gen 2

Sek.	=	Sekunden
TNF α	=	Tumornekrosefaktor alpha
TRAP	=	Tartratresistente saure Phosphatase
VEGF	=	Vascular endothelial growth factor
vWF	=	von Willebrand Faktor

1. Einleitung

1.1 Historischer Überblick

Im Jahr 1895 gelang es dem deutschen Chemiker Menschutkin als erstem, Bisphosphonate (BP) zu synthetisieren, welche Analoga der Pyrophosphate sind. Diese wurden in der chemischen Industrie schon lange als Antikorrosionsmittel und Antiverkalkungsmittel verwendet, da sie die Eigenschaft besitzen, die Kalzium-Karbonat-Bildung auf verschiedensten Oberflächen zu verhindern (Ruggiero et al., 2009). Daher waren sie in Waschmitteln, im Wasser zur Enthärtung und in Öllösungen enthalten (Siddiqi et al., 2009).

Heute sind die BP in zahlreichen Produkten zu finden, wie z.B. in Waschmitteln, in Zahnpasta gegen Zahnstein, als Oberflächenanwendung zur Imprägnation gegen Kalkanlagerungen, im Korrosionsschutz von Metallen, oder sie werden auch verwendet zur Pasteurisierung und Sterilisierung von Nahrungsmitteln. Deren Vorgänger in der industriellen Nutzung, die Pyrophosphate, gehören zu der Gruppe der kondensierten Polyphosphate. Das sind niedere Phosphorsäuren, die als Salze vorliegen und auf der Formel $\text{Na}_n\text{H}_2\text{P}_n\text{O}_{3n+1}$ basieren (Wiberg et al., 1995). Diese binden Kationen mit höherer Ladung als Natrium so fest, dass sich keine Salze bilden können.

Pyrophosphate selbst sind Kondensate von zwei Phosphaten, welche über eine Säureanhydridbindung verknüpft sind. Sie haben die Formel $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Da diese Verbindung hydrolytisch und thermisch leicht gespalten werden kann, ist das Pyrophosphat im Gegensatz zu den BP nur begrenzt anwendbar. Letzteres enthält statt des zentralen Sauerstoffatoms ein Kohlenstoffatom (vgl. Abb. 1), diese Verbindung ist deutlich stabiler und nicht hydrolysierbar.

Dieses fanden Fleisch und Mitarbeiter (1969) heraus, wodurch sich ein neuer Anwendungsbereich für diese Substanzklasse eröffnete. Pyrophosphate waren in vitro erfolgreich gegen Verkalkungen eingesetzt worden. In vivo wirkten sie allerdings auf Grund ihrer Halbwertszeit von 16 Min. bis zur hydrolytischen Spaltung nur, wenn sie parenteral verabreicht wurden, wobei aber kein Effekt auf den Knochenstoffwechsel beobachtet werden konnte (Bartl et al., 2006). BP hingegen können oral und parenteral wirksam angewendet werden, da sie wegen ihrer hohen

Affinität zu Kalzium-Phosphat über je zwei Sauerstoffbrückenbindungen stark an das Kalzium im Knochen binden.

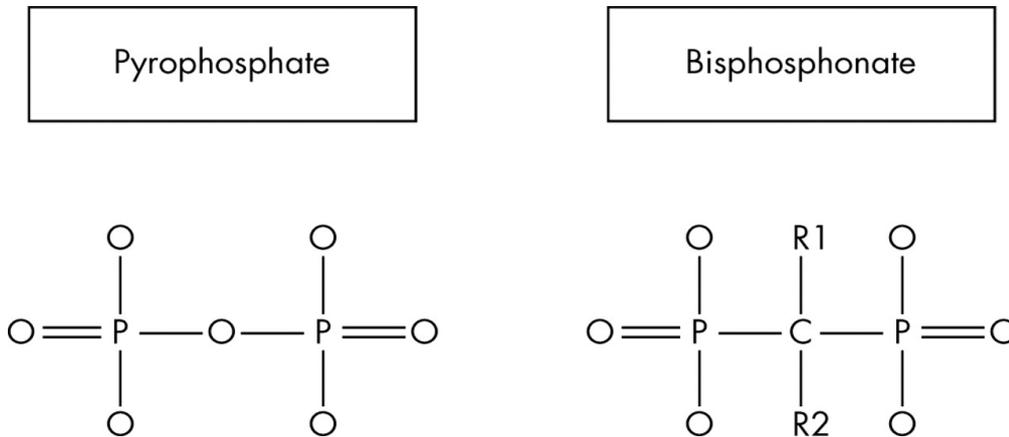


Abb. 1: Strukturformel von Pyrophosphat und Bisphosphonat gegenübergestellt (Shaw und Bishop, 2005)

1.2 Pharmakodynamik und Pharmakokinetik

BP werden seit nun mehr 40 Jahren (Carlson und Basile, 2009) u.a. zur Therapie von malignen Knochenerkrankungen eingesetzt, da sie die Eigenschaft besitzen, die Resorption des Knochens zu verhindern. Sie binden bevorzugt an Orten mit hoher Umbaugeschwindigkeit und werden sehr langsam vom Knochen wieder freigesetzt (Cremers und Papapoulos, 2011). Am zentralen vierbindigen Kohlenstoffatom der BP befinden sich zwei Seitenketten R1 und R2, die maßgeblich die resorptionshemmende Kraft und die Eigenschaften der BP bestimmen. R1 ist zumeist eine Hydroxylgruppe, welche die Knochenbindung vermittelt, während R2 variabel ist und die antiresorptiven und antiproliferativen Eigenschaften bestimmt. Die älteren BP wie Etidronat, Clodronat oder Tiludronat haben keinen Stickstoffsubstituenten, sondern lediglich einen Methyl-, oder Chlorrest.

BP der zweiten und dritten Generation wie Pamidronat, Alendronat und Neridronat haben an dieser Stelle eine Aminogruppe, wodurch sie mehr als hundertfach wirksamer sind. Olpadronat und Ibandronat enthalten einen substituierten Stickstoffrest, was ihre Wirksamkeit weiter steigert.

Risedronat und Zoledronat haben basische Heterozyklen als Substituenten und sind damit die wirksamsten BP (vgl. Abb. 2). Nur kleine Veränderungen in den Seitenketten können bereits eine beeindruckende Wirkungssteigerung bewirken. So erzielt z.B. die Verlängerung einer Aminoalkylseitenkette um eine Methylgruppe eine zehnfache Wirkungssteigerung von Alendronat gegenüber Pamidronat (Boanini et al., 2012; Ralte et al., 2011; Rogers et al., 1997; Russel et al., 2008).

Doch nicht unbedingt das potenteste BP ist in jedem Fall das beste Mittel. Sie besitzen verschiedene Eigenschaften, z. B. Eliminationshalbwertszeiten, Affinität zum Knochen, gleich zu setzen mit dem Wirkungseintritt, sowie Verbleib im Knochen, Wirkungsdauer und antitumoröse Eigenschaften. Je nach zu therapierender Krankheit kann ein passendes BP gewählt werden.

Die Eliminationshalbwertszeit hängt von der jeweiligen Albuminbindung ab, welche wiederum von Polarität und Lipophilie bestimmt wird, diese kann zwischen 0,8 bis 16 Stunden betragen. Je länger ein BP im Blut verbleibt, desto stärker flutet das Medikament die inneren Organe an, besonders die Nieren, über die sie ausgeschieden werden. Extraossäre Speicherung erfolgt jedoch nur nach zu hoher Dosis oder zu schneller Infusion. Makrophagen nehmen das Medikament auf, woraufhin es ausgeschieden wird. Je geringer die Albuminbindung, desto mehr BP gelangen in den Knochen, statt ausgeschieden zu werden.

Je höher die Affinität zum Knochen, desto geringere Mengen BP werden von den resorbierenden Zellen (Osteoklasten) aufgenommen und desto langsamer erfolgt die antiresorptive Wirkung. Zusätzlich ist der Verbleib am Knochen länger und damit die Wirkungsdauer. Die Knochenhalbwertszeit kann zwischen 150 und 200 Stunden betragen. Die früheste pharmakologische Wirkung wird nach 24 Stunden beobachtet, sie hält nach einer Einzeldosis 2 bis 3 Wochen an und kann bei kontinuierlicher Gabe 3 bis 4 Monate andauern (Bartl et al., 2006).

Pamidronat und Zoledronat werden ausschließlich i.v., Clodronat, Risedronat und Ibandronat können auch in Tablettenform verabreicht werden. Etidronat, Tiludronat und Alendronat werden nur auf letzterem Wege eingenommen. Die Absorption oraler BP im Darm liegt je nach Medikament zwischen 0,7 und 2,5 %. Die transzelluläre Resorption wird durch Polarität und negative Ladung der BP erschwert. Dieser Effekt wird durch Nahrungsaufnahme verstärkt, da die BP unlösliche Chelate mit Kalzium bilden (Cremers und Papapoulos, 2011; Lin, 1996).

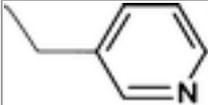
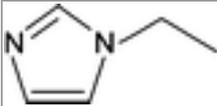
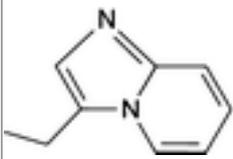
Stickstoffhaltig	R ² -Seitenkette, Rest	Wirkstoff	Relative Wirkpotenz	Inhibition der FPPS (%)	R ¹ -Seitenkette, Rest	R ² Seitenkette, Rest
Nicht-Stickstoffhaltige BPs	Halogen	Etidronat	1×	10	-OH	-CH ₃
	Alkyl	Clodronat	10×	17	-Cl	-Cl
		Tiludronat	10×		-H	
Stickstoffhaltige BPs	Alkyl-aminoaliphatisch	Pamidronat	100×	40	-OH	-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂
		Neridronat			-OH	-(CH ₂) ₅ -NH ₂
		Olpadronat			-OH	-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂
		Alendronat	>100 < 1000×	61	-OH	-(CH ₂) ₃ -N ₂
		Ibandronat	>1000 < 10000×	80	-OH	-CH ₂ -CH ₂ N(CH ₃)(CH ₂) ₄ -CH ₃
	Heterozyklisch	Risedronat	>1000 < 10000×	94	-OH	
		Zoledronat	>10000x	99	-OH	
		Minodronat			-OH	

Abb. 2: Einteilung der BP nach Stickstoffgehalt, Seitenketten, relative Wirkpotenz und Inhibition der FPPS (Farnesyl-Pyrophosphat Synthetase) in % (Nancolas et al., 2006; Dunford et al., 2001).

Pamidronat und Zoledronat werden ausschließlich i. v., Clodronat, Risedronat und Ibandronat können auch in Tablettenform verabreicht werden. Etidronat, Tiludronat und Alendronat werden nur auf letzterem Wege eingenommen. Die Absorption oraler BP im Darm liegt je nach Medikament zwischen 0,7 und 2,5 %. Die transzelluläre Resorption wird durch Polarität und negative Ladung der BP erschwert. Wie viel Prozent des Medikaments nach oraler oder i. v. -gabe im Knochen verbleibt, variiert sehr stark zwischen den Medikamenten und ist von Patient zu Patient unterschiedlich. Es werden Werte zwischen 25 und 98 % angegeben (Cremers und Papapoulos, 2011). Die Ausscheidung erfolgt in mehreren Phasen: Zunächst wird eine große Menge des

Medikaments direkt aus dem Blut renal eliminiert, nach einem Tag wird auf diesem Wege ungefähr die Hälfte der Dosis ausgeschieden. In der lang andauernden terminalen Eliminationsphase werden die BP aus dem Knochengewebe rückresorbiert und innerhalb mehrerer Tage aus dem Körper entfernt (Russell, 2011). King und Mitarbeiter (1997) untersuchten Hunde, die ein Jahr BP erhielten und danach ein Jahr abstinent waren. Nach einem Jahr enthielt ihr Knochen noch immer 45 % der ursprünglich absorbierten Dosis im Knochen.

1.3 Wirkung auf Osteoklasten

Die BP, die in großer Menge am Knochen angeschwemmt werden, binden bevorzugt an die freiliegenden Kalzium-Phosphat-Kristalle der Umbauzonen, wo sie von den therapeutischen Zielzellen, den Osteoklasten resorbiert werden. Osteoblasten stimulieren die Differenzierung von Osteoklasten aus Zellen des mononukleären Phagozytensystems. Osteoblasten sezernieren den Liganden RankL, der auf den Rank-Rezeptoren der Osteoklastenvorläuferzellen binden (vgl. Abb. 3)(Kikuta und Ishii, 2012). Über diesen Mechanismus, aber auch nach dem Untergang eines Osteozyten nach jeweils 150 Tagen, werden Osteoklasten gebildet und beginnen mit der Resorption. Es handelt sich dabei um hochgradig polarisierte Zellen. Ein aktivierter Osteoklast haftet sich mit Hilfe von Integrinen und einem Aktinring zirkulär an Knochentrabekel an. Dadurch entsteht ein hermetisch abgeschlossener Raum unter der basolateralen Membran des Osteoklasten. Die proximale Kontaktfläche wird durch einen dichten Faltenbesatz aus der Membran des Endosomen-Lysosomen-Komplexes, dem sog. „ruffled border“ stark vergrößert. Dort wird zunächst das Hydroxylapatit mit Hilfe einer Protonen-ATPase bei stark verringertem pH-Wert von 4,5 herausgelöst und als Kalzium und Phosphat ins Blut abgegeben. Die entmineralisierte Knochenmatrix wird nun von lysosomalen Proteasen, v. a. Cathepsin K und Matrixmetalloproteasen abgebaut (Kikuta und Ishii, 2012).

Die extrazellulären Matrixfragmente werden endozytotisch aufgenommen und nach Transytose an der glatten Rückseite wieder abgegeben (vgl. Abb. 4). Die Aktivität des Osteoklasten ist erkennbar an den vielen Lysosomenvakuolen, Mitochondrien und starkem endoplasmatischen Retikulum (Teitelbaum, 2011).

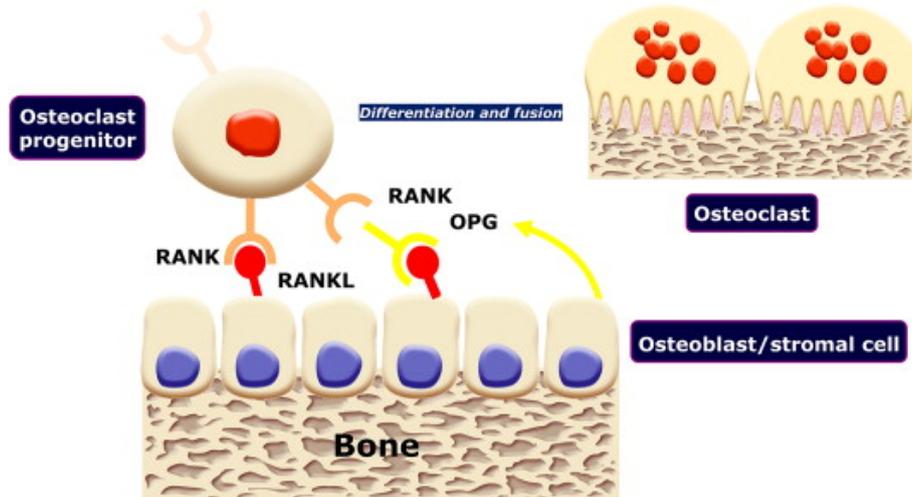


Abb. 3: Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, indem aktivierte Osteoblasten RankL sezernieren, welches wiederum an den Rank-Rezeptoren der Osteoklasten bindet und sie aktiviert. OPG kann RankL binden und unwirksam machen (Khosla et al., 2001)

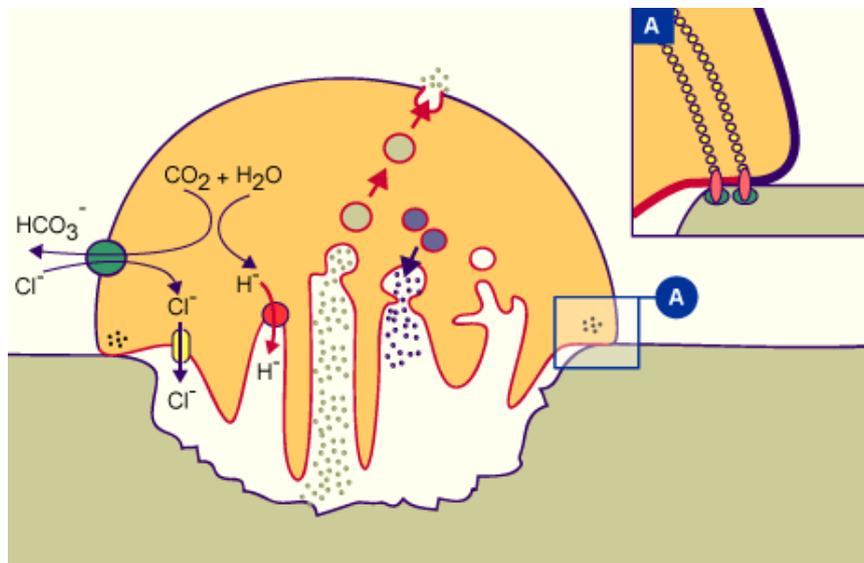


Abb. 4: Osteoklasten binden durch Integrine (s. Vergrößerung A) an die Knochenoberfläche, bilden eine „ruffled border“ aus und sezernieren mit Hilfe einer Protonen-ATPase Wasserstoffmoleküle in die Resorptionslücke. Bei stark verringertem pH-Wert resorbiert die Zelle organische (blau dargestellt) und anorganische (grün dargestellt) Matrix. Nach Transzytose werden diese Bestandteile an der Rückseite der Zelle wieder abgegeben (Universität Fribourg, Frankreich 2010)

In diesem Zustand schüttet der Osteoklast verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren aus, wodurch die Differenzierung von Stammzellen in Osteoblasten induziert wird (Sidiqqi et al.,

2009). Nach zweiwöchiger Aktivität geht ein Osteoklast durch Apoptose, also programmierten Zelltot, unter oder in den Ruhezustand über .

Die BP werden durch den starken pH-Abfall unter den Osteoklasten von der Knochenoberfläche gelöst und durch diese resorbiert. Der Eingriff in den Osteoklastenstoffwechsel erfolgt über zwei verschiedene Mechanismen. Nicht-stickstoffhaltige BP wie Clodronat oder Etidronat induzieren die Bildung eines nicht hydrolysierbaren ATP-Analogons. Das toxische ATP-Analogon akkumuliert in der Zelle und stört alle Stoffwechselfvorgänge, in denen Energie in Form von ATP benötigt wird (Russell, 2011). Durch Behinderung dieser lebenswichtigen Prozesse für die Zelle, wird die Apoptose eingeleitet (Roelofs et al., 2010). Stickstoffhaltige BP stören den Mevalonatstoffwechsel. Der Mevalonatzyklus verwandelt Acetyl-CoA in Farnesyl-Disphosphat. Zwischenstufen sind z. B.: Isopentenyl Adenosin, wichtig für die Bildung von tRNA; Coenzym Q, ein wichtiges Antioxidans der Atmungskette in Mitochondrien; Farnesyl-Diphosphat und Geranylgeranyl-Diphosphat, Lipidreste für die Membranverankerung von Zuckern oder Proteinen und Cholesterol, Ausgangssubstanz für Steroidhormone und Gallensäure (Rauthan und Pilon, 2011). BP der zweiten Generation hemmen kompetitiv die Umsetzung von Isopentenyl-pyrophosphat in Dimethylallyl-Diphosphat, BP der dritten Generation den Reaktionsschritt von Dimethylallyl-Diphosphat zu Geranylpyrophosphat. Durch Hemmung dieser Reaktionsschritte kann der absolut lebenswichtige Vorgang der Proteingeranylierung und -farnesylierung, nicht mehr durchgeführt werden (Holzer, 2009; Itzstein et al., 2011; Rogers, 2011; Ralte et al., 2011).

Die biologische Aktivität von Amino-BP richtet sich direkt gegen die Proteingeranylgeranylation. Die wichtigste davon betroffene Gruppe sind die Ras-ähnlichen G-Proteine wie Rho, Ras, Rab, und Rac (Rauthan und Pilon, 2011). Sie sind essentiell für Zellfunktionen wie Regulation des Zellwachstums und des Zytoskeletts, Ausbildung der „ruffled border“, Funktion der spannungsgesteuerten Kalzium-Kanäle, Kontrolle von Sekretion, Endozytose und des vesikulären Transportes. Sie sind ebenso für die Steuerung des Transportes von RNA und Proteinen zwischen Zellkern und Plasma verantwortlich (Itzstein et al., 2011; Russell, 2011; Shannon et al., 2011). Statine greifen ebenfalls in den Mevalonatstoffwechsel ein und hemmen die Umsetzung von Coenzym A zu Mevalonat. Diese Medikamente werden zur Senkung des Cholesterinstoffwechsels eingesetzt, haben aber auf den Knochen keinen Einfluss. Dies zeigt die große Gewebselektivität von Medikamentengruppen, ja sogar Zellspezifität (Russell, 2011).

BP bewirken den Zellaufschluss von Osteoklasten und deren Zytoskelett, sowie den Verlust des Aktinrings, und des „ruffled border“. Die gesamte basolaterale Membran wird geschädigt, die Säureproduktion wird verringert, Zellorganellen schrumpfen und es bilden sich große intrazelluläre Vakuolen. Außerdem wird das Andocken an den Knochen behindert, da dessen Oberfläche mit BP beschichtet ist (Rogers et al., 1997; Zhang et al., 2011).

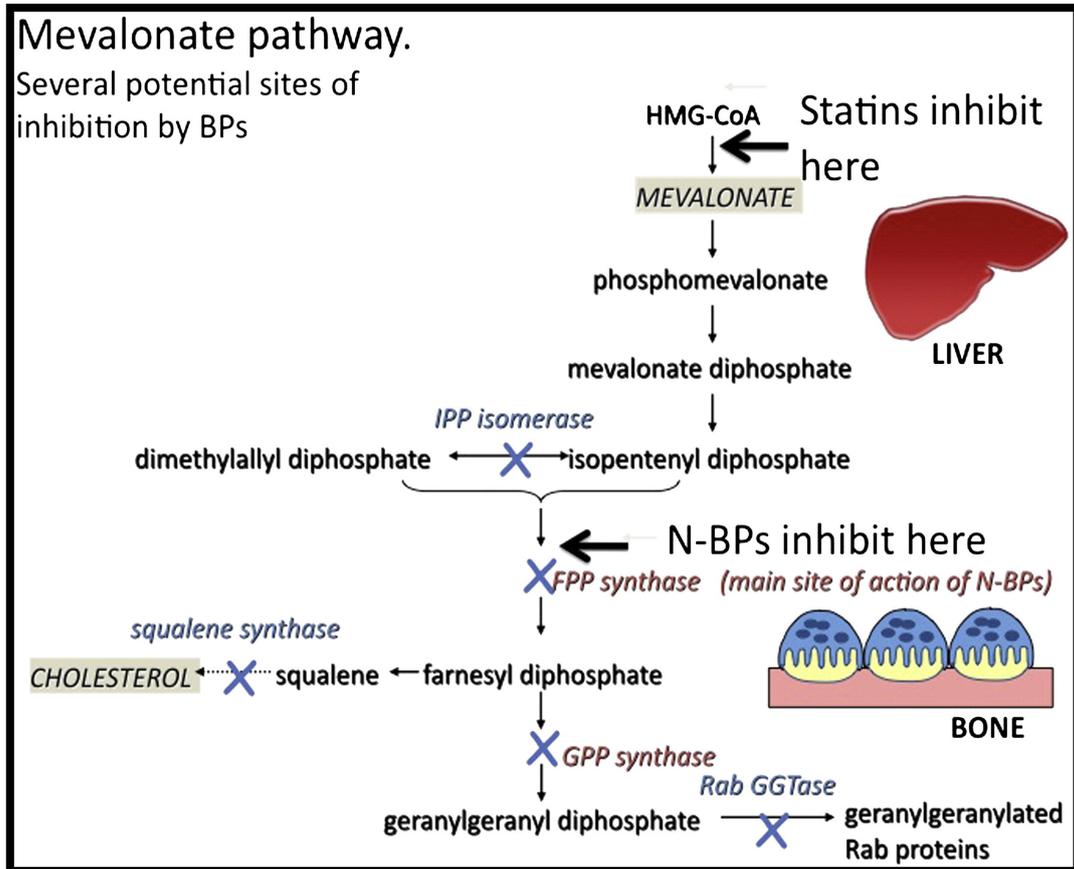


Abb. 5: Darstellung der wichtigen Stationen des Mevalonatzyklus. Statine hemmen die Bildung von Mevalonat. BP können 5 verschiedene Enzyme hemmen: Hauptangriffspunkte sind die Farnesyl-Pyrophosphat-Synthetase (FPPS) und die Geranyl-Pyrophosphat-Synthetase (GPPS) (braun). Sie können auch die Isopentenyl-Pyrophosphat-Synthetase (IPPS), Squalene-Synthetase und Rab-Geranylgeranylsynthetase (Rab GGTase) (blau) hemmen (Russell, 2011)

Daraus folgt, dass der Osteoklast seine Fähigkeit zur Resorption verliert, in Apoptose verfällt und seine Signalwege zum Osteoblasten gestört werden (Carlson und Basile, 2009). Diese Effekte könnten auch in allen anderen Zellen erfolgen, in denen BP akkumulieren, auch in Tumorzellen. Jedoch sollte bei exakter Dosierung, ausreichender Infusionszeit und genügenden Abständen

zwischen den Gaben solche Effekte, die z. B. als Nebenwirkungen in den Tubuluszellen der Niere auftreten können, nur in den Zielzellen, den Osteoklasten auftreten. Diese nehmen hohe Mengen BP an der Knochenoberfläche auf (Allen und Burr, 2008).

1.4 Effekte auf andere Zellpopulationen

Osteoblasten kontrollieren den turn-over im Knochen. Sie bilden Knochen und stimulieren Osteoklasten zur Differenzierung, wenn ein Knochenareal abgebaut werden soll. Nach einem Aktivitätszyklus gehen sie entweder durch Apoptose unter, verwandeln sich in Osteozyten oder verweilen als Lining cells am Knochensaum. Osteozyten gewährleisten über ihre Dendriten den Informationsaustausch im Knochen und die Antwort des Knochens auf mechanische Stimuli. Außerdem sind sie für die Vitalität ihres Osteons verantwortlich (Bellido und Plotkin, 2011). Früher dachte man, dass Osteoblasten am wenigsten von BP beeinträchtigt werden. Es gab Studien, die feststellten, dass die Knochendichte unter BP-Therapie verringert war. Das soll durch die fehlenden Stimuli von Seiten der Osteoklasten begründet sein (Boyce et al., 1996; Eriksen et al., 2002). Aus größeren Tierstudien geht hervor, dass keine direkte Inhibition der Knochenbildung auf solchen Knochenoberflächen stattfindet, die nicht zuvor resorbiert wurden (Iwata et al., 2006). Naidu und Mitarbeiter (2008) zeigten, dass die Lebensfähigkeit von Osteoblasten in vitro unter Alendronat- und Zoledronatexposition deutlich gesenkt wird.

Demgegenüber hatten Plotkin und Mitarbeiter (1999) herausgefunden, dass Alendronat Osteoblasten und Osteozyten vor Apoptose schützt. Neuere Studien konnten belegen, dass BP in niedriger Dosierung die Osteoblastenaktivität stimulieren. Es wird weniger die Proliferation, sondern die Differenzierung, Aktivität und Mineralisation angeregt, diese werden bei höherer BP-Dosierung jedoch gehemmt (Boanini et al., 2012; Koch et al., 2010; Reinholz et al., 2000; Viereck et al., 2002). Dadurch wird die Knochendichte durch BP erhöht, bei gleichzeitiger Hemmung der Osteoklasten. Mittlerweile sind sich viele Autoren einig, dass die Knochendichte so bei BP-Patienten gesteigert wird (Bellido und Plotkin, 2011; Shannon et al., 2011).

Osteozyten spielen ebenfalls eine große Rolle hinsichtlich der Knochenstärke. Bei Osteoporose, oder bei geschwächtem Knochen nach verringerter mechanischer Belastung, kann man vermehrt untergegangene Osteozyten und leere Osteozytenlakunen beobachten. Frakturen sind bei diesen

Patientengruppen sehr häufig. BP verhindern die Apoptose dieser Zellen (Brennan et al., 2011; Roelofs et al., 2010). Die Steigerung der Knochenstärke durch BP liegt dadurch nicht nur in ihren antiresorptiven Eigenschaften, sondern auch in der Steigerung der Knochenstärke durch antiapoptotische Wirkung auf Osteozyten und Osteoblasten (Bellido und Plotkin, 2011).

Auch die Wirkung auf Mukosaepithelzellen wird zunehmend diskutiert. Diese Zellen könnten nach Aufnahme von BP ihre Funktion verlieren, oder einen kürzeren Lebenszyklus aufweisen. Die Wundheilung würde damit stark beeinträchtigt. Das würde eine hohe BP-Konzentration in der Schleimhaut voraussetzen, was jedoch weniger wahrscheinlich erscheint, da sich das Medikament bevorzugt im Knochen akkumuliert. Andererseits könnten höhere Konzentrationen im Speichel oder der Sulkusflüssigkeit zu finden sein. Das wäre ein interessanter Ansatz (Allen und Burr, 2008). Diesem folgten Landesberg und Mitarbeiter (2008), nachdem lange bekannt war, dass einige Autoren (Suri et al., 2001; Twiss et al., 1994; Twiss et al., 1999; Wallace et al., 1999) zeigen konnten, dass BP toxisch für Darmepithelzellen sind. Gleiches könnte auch für Mukosaepithelzellen gelten. Im *in vitro* Versuch fand die Forschergruppe heraus, dass BP keine Apoptose in Mukosaepithelzellen auslösen, jedoch in Konzentrationen, wie man sie im maxillofazialen System eines Patienten unter *i. v.* -BP-Therapie erwartet, hemmen sie die Proliferation und Migration der Mukosaepithelzellen. Scheper und Mitarbeiter (2009) fanden in *in vitro*-Untersuchungen heraus, dass BP aber doch Apoptose in Fibroblasten und Epithelzellen auslösen können und dass zum Ausdünnen der Mukosadecke im Mund führt. Ungeklärt bleibt, wie hoch die Konzentration der BP im Knochen ist, welche BP-Konzentration in der oralen Mukosa erreicht werden und warum Patienten, die BP oral einnehmen und deutlich geringere Konzentrationen an BP im Gewebe aufweisen, trotzdem eine Bisphosphonat induzierte Osteonekrose erleiden.

1.5 Indikationen

BP repräsentieren die meistverwendete Medikamentengruppe zur Therapie von Störungen des Knochenstoffwechsels durch gesteigerte Resorption (Boanini et al., 2012). Der Morbus Paget war die erste Krankheit, die mit BP erfolgreich behandelt wurde. Die heute gebräuchlichen BP-Typen werden in aufsteigender Reihenfolge ihrer Wirksamkeit bei Morbus Paget genannt: Etidronat <

Clodronat < Pamidronat < Alendronat < Risedronat < Zoledronat. Diese Reihenfolge entspricht auch der antiresorptiven Wirkung der BP im Tiermodell. Wenn Zoledronat ein Mal im Monat mit 5 mg i. v. verabreicht wird, brauchen viele Patienten keine weiteren Medikamente mehr (Russell et al., 2008).

Tumorerkrankungen des Knochens, verbunden mit Hyperkalzämien durch überbordende Knochenresorption der Osteoklasten werden in erster Linie mit BP behandelt. Es handelt sich dabei um das Multiple Myelom, Plasmozytom, Knochenmetastasen von Mamma-, Prostata-, Lungen- und Nierenzell-Karzinom oder andere solide Tumore. Für die Behandlung sind Zoledronat, Clodronat, Ibandronat und Pamidronat zugelassen. Osteoporose wird sehr erfolgreich besonders mit Alendronat behandelt, aber auch Etidronat, Risedronat, Ibandronat, in manchen Ländern auch Clodronat und Pamidronat sind hierfür zugelassen. BP steigern die Knochenmasse und senken die Frakturrate bei Osteoporosepatienten (Russell et al., 2008).

Außerdem werden sie bei verschiedenen Osteopathien wie bei komplexem regionalem Schmerzsyndrom, heterotoper Kalzifikation und Ossifikation, sowie Hyperkalzämie-Syndrom oder Knochenschmerz angewandt. Weitere Indikationen sind Osteopenie, Osteopetrose, Osteodystrophie, Osteogenesis imperfecta bei Kindern oder Hyperkalzämie (Abediazar und Nakhjavani, 2011; Chapurlat et al., 2012; Heino et al., 2011; McLeod et al., 2012).

Neuerdings wird untersucht, ob BP auch in der Orthopädie dazu genutzt werden können, um z.B. eine bessere Osseointegration von Implantaten und Biomaterialien zu erreichen, die Heilung nach Distraktionsosteogenese oder Frakturen zu verbessern und den Verlust von Endoprothesen zu verhindern (Russell, 2011). Es gibt neuere Studien, die bestätigen, dass Zahnimplantate unter BP-Einwirkung besser im Knochen integriert werden (z.B. Huja et al., 2011; Yildiz et al., 2010; Qi et al., 2012; Zhang et al., 2011).

Präparat	Relative Wirkpotenz	Verabreichung	Indikationen
Etidronat (Diphos [®] , Didronel [®])	1	oral	Morbus Paget, Osteoporose, Knochenmetastasen, (Plasmozytom)
Clodronat (Ostac [®] , Bonefos [®])	10	oral, intravenös	tumorbedingte Hyperkalzämie, Knochenmetastasen, Plasmozytom, Osteoporose
Tiludronat (Skelid [®])	10	oral	Morbus Paget
Pamidronat (Pamidronat [®] , Aredia [®])	100	intravenös	tumorbedingte Hyperkalzämie, Knochenmetastasen, Plasmozytom
Alendronat (Fosamax [®])	1000	oral, intravenös	Morbus Paget, Osteoporose, tumorbedingte Hyperkalzämie, (Plasmozytom)
Risedronat (Actonel [®])	5000	oral	Osteoporose, Morbus Paget
Ibandronat (Bondronat [®])	10.000	oral, intravenös	Knochenmetastasen, tumorbedingte Hyperkalzämie, (Plasmozytom, Osteoporose)
Zoledronat (Zometa [®])	20.000-100.000	intravenös	Knochenmetastasen, tumorbedingte Hyperkalzämie, Plasmozytom, (Osteoporose)

Tab. 1: Klinisch eingesetzte BP und deren relative Wirkpotenz, Verabreichungsform und Indikationen. Quelle: Mögliche unerwünschte Wirkungen von Bisphosphonaten im Kieferbereich (Hoefert und Eufinger, 2004)

1.6 Antitumoröse Eigenschaften

Hauptindikation der BP sind neben der Osteoporose die metastasierenden Tumorerkrankungen. Zusätzlich zur Resorptionshemmung des Knochens haben BP abhängig von ihrer chemischen Struktur, verschiedene antitumoröse Eigenschaften (Heymann et al., 2004). Man geht davon aus, dass die hemmenden Effekte auf das Tumorzellwachstum durch die Hemmung der Osteoklasten erfolgen. Diese setzen normalerweise Wachstumsfaktoren frei, die wiederum die Tumorzellen ernähren können (Dominguez et al., 2011). Folgende Effekte durch BP sind bekannt: Hemmung der Tumorzellinvasion, Tumorzelladhäsion und -ausbreitung, sowie Hemmung der Vaskulo- und Angiogenese (Aft, 2011; Berenson, 2011, McLeod et al., 2012), Induktion von Tumorzellapoptose durch Hemmung der intrazellulären Signaltransduktion (Sietsema et al., 1989) und Hemmung des Zellwachstums (Lee et al., 2001). Einige in-vitro-Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass BP in verschiedenen humanen Tumorzelllinien von Mamma, Prostata, Lunge,

Niere, Pankreas, aber auch Osteosarkom, Neuroblastom und multiplum Myelom eine Apoptose auslösen können. Die caspaseabhängige Apoptose scheint der Hauptmechanismus der Tumorzellapoptose zu sein (Senaratne et al., 2000).

Carlson und Basile (2009) sagen jedoch, dass die zerstörerische Wirkung von BP gegenüber Tumorzellen zwar in vitro nachgewiesen werden konnte, jedoch in vivo nicht evident ist. Interessant ist, dass im Tierversuch unter BP-Medikation vermehrt inflammatorische Zytokine durch Antigen-präsentierende Zellen produziert werden, wodurch die Toleranz gegenüber Tumorantigenen gesenkt wird. Auch konnte in vitro festgestellt werden, dass spezifische tumorzytotoxische T-Zellen produziert werden (Kunzmann et al., 2000).

Auch wenn für BP keine lebensverlängernden Effekte nachgewiesen werden konnten, so verbessern sie doch die Lebensqualität der Patienten erheblich, die unter Knochenmetastasen leiden (Aft, 2011).

1.7 Nebenwirkungen - Symptome und Ursachen

Die bisphosphonatinduzierte Osteonekrose des Kieferknochens, in der englischen Literatur bekanntermaßen als BRONJ (Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw) abgekürzt, ist eine der schwerwiegendsten Nebenwirkungen der BP. Diese Symptomatik ist in ihrer Ursache in weiten Teilen ungeklärt. Jedoch gibt es eine große Anzahl von Studien und Übersichtsarbeiten, die sich mit diesem Thema beschäftigen. 2001 wurden die ersten Fälle einer Kiefernekrose dokumentiert und man vermutete, dass ein Zusammenhang zu der BP-Therapie bestehen könnte. 2004 wurden dann von Marx (2003) und Ruggiero und Mitarbeitern (2004) die ersten Fallstudien veröffentlicht.

Die typischen klinischen Kennzeichen der BRONJ sind eine nicht heilende Extraktionsalveole oder ein spontan offen liegender Knochen mit fortschreitender Sequestration über 8 Wochen. Dies kann einhergehen mit einer lokalisierten Schwellung oder Ulzeration, purulentem Exsudat, Fistelbildung und Beeinträchtigung der Nervenfunktion. Es müssen BP eingenommen worden sein und es darf keine Bestrahlung im Kopf-, Halsbereich zusätzlich stattgefunden haben (Otto et

al., 2011; Ruggiero et al., 2009). Es kann sich jedoch auch um ein freiliegendes gräuliches Knochenareal handeln, welches völlig blande erscheint. Die Nekrose persistiert meist trotz Resektion, Anfrischung und begleitender Antibiotikumtherapie. Im Röntgenbild ist erst nach fortschreitender Sequestration ein Mottenfraß ähnliches Bild zu erkennen, ähnlich der Osteomyelitis.

Die Symptome weisen eine große Ähnlichkeit auf zu einer im 18. Jahrhundert erstmals beschriebenen Erkrankung von Arbeitern in der Streichholzindustrie, die Phosphordämpfen ausgesetzt waren. Sie nannte sich „phossy jaw“. Zwar ist die chemische Zusammensetzung der beiden Substanzen sehr unterschiedlich, aber dennoch war ein ähnlicher Zusammenhang nicht auszuschließen. Es dauerte einige Zeit, bis die Fachwelt und die Industrie die Existenz einer BRONJ anerkennen wollten (Marx, 2008). Als 2005 auf einem Kongress der Hämatologengesellschaft in den USA internationale Berichte über BRONJ vorgetragen wurden, war offensichtlich, dass es sich um ein globales Problem handelt (Ruggiero, 2009).

Die Entstehung einer spontanen BRONJ wird meist bei Patienten beobachtet, die zwischen 1,5 bis 3 Jahre lang BP in großen Mengen erhalten haben. Als Baseline gilt die Anzahl der Patienten, die ohne Vorerkrankungen eine Osteonekrose im Knochen entwickeln, dabei handelt es sich ca. um 0,026 % (Black et al., 2007). In 60 % der Fälle erfolgt die Osteonekrose nach zahnärztlichen Eingriffen (Glicklich und Wilson, 2009). 95 % der Erkrankungen traten nach intravenöser Verabreichung von Pamidronat oder Zoledronat zur Behandlung maligner Knochenkrankungen auf. Die Inzidenz liegt zwischen 0,8-12 % der mit BP i. v. behandelten Patienten (Ruggiero et al., 2009), in der Gruppe der mit Zoledronat allein behandelten Patienten wurde eine Inzidenz von bis zu 21 % gefunden (Bamias et al., 2005). Nur ca. 5% aller Knochennekrosen traten bei Patienten unter oraler BP-Therapie auf (Woo et al., 2006), wenngleich sie die viel größere Patientengruppe stellen. Es gibt keine genauen Angaben bezüglich aller mit oralen BP behandelten Patienten, jedoch übersteigen die Angaben selten 0,6 % aller mit BP behandelten Patienten (Ruggiero et al., 2009). Dies mag daran liegen, dass die Medikamentendosis für Krebspatienten zehn bis zwölf Mal höher ist, als die in der Osteoporosetherapie angewendete Dosis (Bilezikian, 2006). Neuerdings steigt jedoch die Anzahl der gemeldeten BRONJ-Fälle unter oraler BP-Therapie (Otto et al., 2011). In zwei Dritteln der Fälle ist die Mandibula befallen, nur zu einem Drittel die Maxilla (Robertson et al., 2007). Obwohl der genaue Mechanismus der BRONJ noch nicht erkannt wurde, sind verschiedene Hypothesen aufgestellt worden. Die vorherrschende Theorie bezieht

sich auf das verminderte Remodeling oder die verringerte Wundheilung des Kieferknochens unter BP-Therapie. Der Knochenumbau wird durch die Hemmung der Osteoklasten so stark verringert, dass die Reparatur von Mikrofrakturen und Wunden nicht mehr gewährleistet werden kann. Letztendlich soll daraus die Nekrose erfolgen. Aktuelle Fallstudien haben gezeigt, dass nach Therapie mit Denosumab[®] ebenfalls Kiefernekrosen auftreten. Dieser monoklonale Antikörper hemmt Osteoklasten auf gänzlich andere Weise als BP. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Hemmung der Osteoklasten wahrscheinlich der Hauptgrund bei der Entstehung der Nekrose ist.

Desweiteren werden die antiangiogenen Eigenschaften den BP in Betracht gezogen. Für Zoledronat wurden ein reduzierender Effekt auf den „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) nachgewiesen, der stark die Gefäßprossung stimuliert. Dadurch könnte die Durchblutung des Knochens beeinträchtigt werden, was zusammen mit den metabolischen Veränderungen im Knochenumbau zum Absterben von Knochenbereichen führen kann. Andere Studien haben entdeckt, dass BP direkt toxisch auf die orale Mukosa wirken können, diese dann fenestriert und den Knochen freilegt. Da jedoch nur eine geringe Anzahl der Patienten unter dieser Nebenwirkung leiden, müssen Risikofaktoren und Gendefekte als weitere Ursachen in Betracht gezogen werden (Ruggiero, 2011).

BP-Typ, Länge der Therapie, Art der Tumorerkrankung, begleitende Therapien wie systemische Chemotherapie, Bestrahlung von Kopf und Hals, sowie Steroidbehandlungen scheinen eine große Rolle in der Entwicklung der BRONJ zu spielen. Auch Komorbiditäten wie Anämie, Diabetes, Übergewicht, Hyperkalzämie und Gerinnungsstörungen werden häufig erwähnt, ebenso lifestyle-Faktoren wie Alkoholabusus, Rauchen und ein fortgeschrittenes Alter. Neuerdings werden auch Gendefekte untersucht, wie Nukleotidpolymorphismen von Cytochrome P450-2C und COLIA 1-, Rank-, MMP2-, OPG-, OPN-, FDPS- und VEGF-Genen.

Bei oraler BP-Therapie der Osteopenie, Osteoporose oder des Morbus Paget liegt ein geringeres Risiko vor als bei i. v.-Therapie bei Multiplem Myelom oder Metastasen. Das Risiko einer BRONJ steigt mit zunehmender Therapiedauer, ab 12 Monaten und mehr ist das Risiko beträchtlich vergrößert. Mehr als 60 % aller BRONJ-Fälle erfolgen nach invasiver chirurgischer Therapie, wie z.B. Zahnextraktionen (Vescovi et al., 2012).

BP werden besonders in Knochen mit hohem turn-over angereichert, daher rührt wohl das bislang bekannte ausschließliche Vorkommen der BRONJ im Kiefer. Allerdings ist hier die Hemmung des turn-over auf grund der Dauerbeanspruchung besonders schwerwiegend (Ruggiero, 2011).

1.8 Weitere Nebenwirkungen

Bei intravenös applizierten Bisphosphonaten, insbesondere während der ersten Behandlungszyklen, treten bei ungefähr 10 % Nausea und bei etwa 10–15 % der Patienten grippeartige Symptome im Sinne einer Akutphasereaktion mit Fieber und Abgeschlagenheit auf (Lim et al., 2010, Rossini et al. 2011). Außerdem werden Anämie, Obstipation, Atemnot, Knochenschmerz, Myalgien und Arthralgien beobachtet. Bisphosphonatinduzierte Uveitiden sind selten und meist innerhalb von einer bis zwei Wochen reversibel (Aft, 2011; Robertson, 2007). Akute Tubulusnekrosen im Rahmen einer Therapie in höherer Dosierung (v. a. mit Pamidronat und Zoledronat) sind selten und können durch eine langsame Infusionstechnik verhindert werden. Für orale BP in geringer Dosierung wurden bislang keine nierenschädigende Eigenschaften beim Menschen nachgewiesen (Miller, 2011).

1.9 Prophylaxe und Therapie der BRONJ

Offensichtlich erleiden die Patienten unter i. v.-Therapie meist nach einem zahnärztlich-chirurgischen Eingriff eine BRONJ. Daher muss es obligat werden, dass all diese Patienten vor einer BP-Behandlung eingehend zahnärztlich untersucht und saniert werden. Infektionsherde müssen ausgeräumt, extraktionswürdige Zähne entfernt, parodontal stark geschwächte Zähne, sowie Zähne mit fokalem Geschehen extrahiert werden. Implantologie oder korrektive Chirurgie, wie die Vorbereitung des Prothesenlagers, Entfernung von Tori oder Schlotterkämmen, sowie die Extraktion impaktierter Weisheitszähne sollten vor der BP-Therapie durchgeführt werden, die dann erst nach vollständiger Epithelisierung der Wundflächen begonnen werden sollte. Eine begleitende Antibiotikumtherapie wird empfohlen. Der Patient muss eine sehr gute Mundhygiene aufrechterhalten und dahingehend regelmäßig (in 6- bis 12-monatigen Abständen) kontrolliert und motiviert werden. Ein solch striktes präventives Protokoll ist bei Patienten mit oraler BP-Medikation nicht erforderlich. Hier sollten Kontrolltermine ein Mal im Jahr bei gesunder

Gebissituation genügen. Sollte trotz allem ein invasiver Eingriff während der BP-Therapie notwendig werden, so muss bereits vorher und bis zum Abschluss der Epithelisierung antibiotisch abgeschirmt und die Wunde mit einem Mukosalappen plastisch gedeckt werden.

Bei der Therapie einer manifesten Nekrose wird weitestgehend die konservative Therapie empfohlen. Viele Autoren haben berichtet, dass aggressive Nekrotomien zu gegenteiligen Ergebnissen führen, also zu sich vergrößernden nekrotischen Arealen mit schlimmeren Symptomen (Marx et al., 2005). Ziel ist immer eine Wunddeckung mit Mukosa, die von CHX-Spülungen und einer Antibiotikaabschirmung begleitet wird. Liegt eine purulente Sequestration im Sinne einer sich ausbreitenden Osteomyelitis vor, sollte mit einem Antibiotogramm das Keimspektrum identifiziert und eine speziell abgestimmte Antibiose vorgenommen werden. Eine immer steigende Anzahl an Studien beschreibt die erfolgreiche Resektion von nekrotischen Arealen (Carlson und Basile, 2009). Meistens wird hierbei eine Entfernung der Sequester empfohlen unter minimaler Weichgewebsirritation und dichter Wunddeckung. Eine ausgedehntere Knochenentnahme bis zur Teilresektion ist nur bei großen nekrotischen Arealen oder nach pathologischen Frakturen nötig (McLeod et al., 2012; Ruggiero, 2004). Alternative Maßnahmen werden beschrieben, wie Sauerstofftherapie oder Laserbehandlung, die Gabe von plättchenreichem Plasma oder Parathormon (Carlson und Basile, 2009; McLeod et al., 2012).

Ob eine Therapieunterbrechung sinnvoll ist, wird sehr kontrovers diskutiert. Dagegen spricht, dass die BP eine lange Halbwertszeit im Knochen besitzen und damit ein Aussetzen der Medikation keine starke Reduktion ihrer Konzentration im Körper bewirkt. Es muss kritisch abgewogen werden, ob der Nutzen das einzugehende Risiko tatsächlich überwiegt. Eine einzige Dosis von 5 mg Zoledronat im Jahr reduziert bei Osteoporosepatienten das Frakturrisiko von Wirbelkörpern um 71 % und das von Hüftknochen um 41 % (Black et al., 2007; Ruggiero, 2009). Geschätzte 2 Millionen osteoporotische Frakturen pro Jahr werden in den USA durch BP verhindert (Bone et al., 2004). Während eine solche Fraktur lebensbedrohlich sein kann, ist eine Nekrose im Kiefer leichter zu therapieren. Ebenso steigern BP die Lebensqualität von Tumorpatienten signifikant, indem sie Schmerzen, Tumorwachstum und Knochenmetastasierung eindämmen. Auch hier ist in vielen Fällen ein Aussetzen des Medikaments nicht zu vertreten. Es sollte also immer genau abgewogen werden, ob der gesundheitliche Zustand des Patienten eine derart strittige Therapieunterbrechung (drug-holiday) verträgt.

1.10 Enzyme/Zytokine des Knochenstoffwechsels

Nach Darstellung des aktuellen Standes der Wissenschaft zum Thema Bisphosphonate folgt nun eine Übersicht der in dieser Studie verwendeten Enzyme und Zytokine des Knochenstoffwechsels, die durch BP unterschiedlich beeinflusst werden können.

Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase wird von Osteoblasten produziert und dient somit als Aktivitätsmarker. Sie ist ein Ektoenzym, sitzt also der Zelloberfläche der Osteoblasten auf. Sie ist wichtig für die Initiationsphase der Knochenbildung, zu einem späteren Zeitpunkt des Prozesses jedoch nicht mehr (Bellows et al., 1991). Sie wird maßgeblich von Osteoblasten am Knochensaum ausgeschüttet, später tritt sie in die Blutzirkulation ein (Seibel, 2000). Ihre genaue Funktion im Knochen ist jedoch noch nicht bekannt. Es existieren verschiedene Isoformen des Knochens, der Leber und des Darms. Im Blut werden sie oft als Knochenumbau-marker verwendet und zeigen eine gesteigerte Osteoblastenaktivität an.

Osteokalzin

Osteokalzin ist ein Vitamin K abhängiges, hochgradig Kalzium und Hydroxylapatit bindendes und nicht-kollagenes Knochenprotein und ein weiterer Marker der Osteoblastenaktivität. Es wird nach Osteoblastendifferenzierung oder bei der Mineralisation ausgeschüttet und in die Knochen-substanz eingebaut. Es geht bei Knochenresorption in die Blutbahn über. Es ist eines der 10 häufigsten Proteine im menschlichen Körper und hemmt die Präzipitation von Hydroxylapatit, lockt jedoch auch Knochen resorbierende Zelltypen an. Es konnte gezeigt werden, dass osteokalzinarmer Knochen weniger stark resorbiert wurde. Da Osteokalzin fast ausschließlich im Knochengewebe vorkommt, kann eine erhöhte Blutkonzentration als Hinweis auf eine vermehrte Knochenresorption dienen, jedoch muss man beachten, dass bis zu einem Drittel der produzierten Osteokalzinmenge direkt in die Blutbahn übergeht (Hauschka et al., 1989).

BMP2

„Bone Morphogenic Proteins“ (BMP) sind Wachstumsfaktoren und gehören zu der Superfamilie der „Transforming Growth Factors β “ (TGF β), von der bereits 20 identifiziert wurden. Die bislang entdeckten BMPs sind durchnummeriert und wirken bei der Entwicklung verschiedenster Strukturen des Körpers mit. BMP2 ist ein Disulfid gebundener Homodimer und ist speziell für die Bildung und Regeneration von Knochen, sowie die Entwicklung des Herzens zuständig (Bragdon et al., 2011). BMP2 reguliert die Differenzierung, Chemotaxe und Apoptose von Chondroblasten und Osteoblasten (Kawabata et al., 1998) und die Knochenbildung während der endochondralen Ossifikationsphase, u. a. durch Stimulierung der Bildung von Runx2 (Matsubara et al., 2008). Mit anderen BMPs gehört er zu den stärksten Wachstumsfaktoren für Knochenbildung und Reparatur (Schilephake, 2002). Es wird von prähypertrophischen Chondrozyten, sowie von Zellen der Milz, Niere, Lunge und des Pankreas gebildet und induziert eine vermehrte Bildung von RANKL (Usui et al., 2008).

Runx2

„Runx related Gen 2“ (Runx2) ist der maßgebliche Transkriptionsfaktor für die Knochenbildung (Karsenty, 2000; Lian und Stein, 2003), verantwortlich für die Osteoblastendifferenzierung und Chondrozytenreifung. Außerdem wird seine Bildung durch BMP2 aus Osteoblasten induziert (Hassan et al., 2006). Er wird von mesenchymalen Osteoblastenvorläuferzellen gebildet. Ohne diesen Faktor, werden keine Blutgefäße angezogen und die Knochenbildung kann nicht stattfinden (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997). Außerdem ist er für die Bildung von Osteokalzin und alkalischer Phosphatase verantwortlich (Ducy et al., 1997).

RankL

Dieses Protein wird durch Osteoblasten zur Steuerung der Osteoklastenformation und -aktivität gebildet. Es gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) und die Abkürzung RankL steht für: „Receptor activator of NF kappa B ligand“. Es lockt Blutmonozyten aus der Peripherie an (Boyce und Xing, 2008), die sich dann in Osteoklasten umwandeln. Ebenfalls bewirkt es, dass die Osteoklasten am Leben erhalten werden und die Genexpression lytischer Enzyme stattfinden kann (Boyle et al., 2003), z.B. von TRAP und Cathepsin K (Matsuo et al.,

2004). Auch Chondroblasten und Chondrozyten können während der Knochenbildung RankL bilden (Boyce und Xing, 2008) und auch aktivierte T-Zellen. Aber auch in Lymphknoten, Thymus, Brustdrüsen und Lungen wird RankL synthetisiert. Es wird vermutet, dass Osteozyten bei mechanischer Belastung des Knochens, Osteoblasten dazu aktivieren, RankL auszuschütten (Tatsumi et al., 2007). Die Hemmung dieses Proteins führt zu Osteopetrose, die übersteigerte Bildung zu Osteoporose. Im entzündeten Knochen wird RankL durch verschiedene Verstärkermechanismen vermehrt gebildet und der Knochen verstärkt resorbiert.

OPG

Osteoprotegerin (OPG) ist ebenfalls Mitglied der TNF-Familie. Es schützt den Knochen vor exzessivem Knochenabbau durch ein aktives Rank-RankL-System, indem es RankL hemmen und somit die Osteoklastenaktivität senken kann. Also korreliert ein hoher OPG-Spiegel mit steigender Knochenbildung und Massenzunahme desselben (Boyce und Xing, 2008). Es kann von hypertrophen oder prähypertrophen Chondrozyten, Osteoblasten, in Zellen des Herzens, der Leber, Nieren und Milz sowie von B-Zellen gebildet werden. Es ist bekannt, dass die meisten Faktoren, die die Bildung von RankL aus Osteoblasten steuern, auch die Bildung von OPG kontrollieren (Hofbauer und Schoppet, 2004). Die Ausschüttung der beiden Proteine erfolgt gegenläufig, so fällt die OPG-Konzentration, wenn die RankL-Konzentration ansteigt und umgekehrt (Kearns et al., 2007; Theolyre et al., 2004).

Rank

„Receptor activator of NF kappa B“, ebenfalls Mitglied der TNF-Familie, ist ein Rezeptor auf den Osteoklasten, für welchen RankL der Ligand ist (Boyce und Xing, 2008). Er liegt als homotrimeres Transmembranprotein vor. Er kann von hypertrophen oder prähypertrophen Chondrozyten, osteoklastischen Progenitorzellen, Osteoklasten, dendritischen Zellen und in Brustdrüsen gebildet werden (Fata et al., 2000). Die Bindung von RankL am Rezeptor bewirkt die Differenzierung von Zellen des phagozytären Monozytensystems zur Differenzierung in Osteoklasten.

TRAP

Die „tartratresistente saure Phosphatase“ gilt als Markerenzym der Osteoklasten. Hierbei handelt es sich um eine Histochemische Färbung. Dieses Enzym wird als Typ-5 saure Phosphatase beschrieben und zeigt die Isoformen 5a und 5b, wobei 5a von Osteoklasten und die inaktive Form 5b auch von Makrophagen gebildet wird (medac, 1991). Er wird im Blut als Knochenabbaumarker gewertet. Osteoklasten nutzen dieses Enzym zur Spaltung von Phosphatesterbindungen.

ED1

ED1 ist ein Oberflächenantigen, welches auf Zelloberflächen und zytoplasmatischen Granula von Phago lysosomen erscheint und mit der phagozytotischen Aktivität der jeweiligen Zelle korreliert. Man findet es auf der Oberfläche von den meisten Makrophagenpopulationen, Monozyten und deren Vorläuferzellen im Knochenmark, sowie auf dendritischen Zellen und T-Zellen (Damoiseaux et al., 1994).

Cathepsin K

Cathepsin K eine Zysteinprotease der Papainfamilie. Bei der Knochenresorption ist Cathepsin K die von Osteoklasten maßgeblich gebildete Kollagenase zum proteolytischen Abbau der organischen Masse, also von Kollagen 1, des Knochens. Sie entfaltet ihre Funktion ausschließlich bei niedrigem pH-Wert, also optimal in der Resorptionslakune zwischen Osteoklast und Knochenoberfläche. Basal enthält sie ein Zysteinreservoir und bildet einen kovalenten Imediatkomplex mit seinem Substrat (Boonen et al., 2012).

Interleukin 1 β und TNF α

Interleukin 1 β und Tumornekrosefaktor α sind stark proinflammatorische Zytokine, die starke Entzündung, Fieber und Gewebszerstörung auslösen, bis hin zu Schock und Tod (Dinarello, 2000). Sie werden von beinahe allen kernhaltigen Zellen gebildet und können diese aktivieren. Sie werden meistens dann ausgeschüttet, wenn ein Stressor auf die Zelle einwirkt, dabei werden sie auf die gleichen Reize hin ausgeschüttet. Außerdem nutzen sie die gleichen intrazellulären

Aktivierungspfade und führen zur Expression sehr ähnlicher Gensequenzen. Sie verstärken selbst ihre eigene Vermehrung und die des jeweils anderen (Baluk et al., 2009). Sie wirken als endotheliale Adhäsionsmoleküle für Leukozyten und stimulieren synergistisch die Genexpression verschiedener Moleküle, die an der Entzündungskaskade beteiligt sind (Dinarello, 2000). Andere antiinflammatorische Zytokine steuern dagegen, wodurch die Länge einer Krankheit definiert wird. IL1 β stimuliert die Prostaglandine und Leukotrienbildung. Beide Zytokine haben sehr ähnliche Rezeptoren und Wirkungen, jedoch kann TNF α Apoptose auslösen, wohingegen IL1 β das bei seinen Zielzellen nie bewirkt. TNF α ist zusätzlich ein wichtiger Faktor für die Bildung von VEGF.

MMP8

Die „Matrixmetalloprotease 8“ (MMP8) ist eine interstitielle Kollagenase die in den Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert wird. MMP8 wird bei Bedarf ebenso von Chondrozyten synthetisiert, jedoch nicht gespeichert. Weitere Zelltypen sind in der Lage MMP8 zu bilden: Makrophagen, T-Zellen, orale Epithelzellen oder auch Fibroblasten (Lint und Libert, 2006). Sie wird als Proenzym sezerniert und extrazellulär aktiviert. Sie arbeitet zinkabhängig und ist in der Lage, die Triplehelix des Kollagens bei neutralem pH-Wert zu resorbieren. Dabei bevorzugt sie Kollagen I vor Kollagen III und II. Als einzige Protease, kann sie Agrecan abbauen, ein Glycosaminoglycan des Knorpels (Parks und Mecham, 1998). Auch andere nicht kollagene Substrate können gespalten werden, wie Fibrinogen, Angiotensin, oder Chemokine. Außerdem spielt MMP8 eine entscheidende Rolle in chronischen und akuten Entzündungen, sowie der Krebsentwicklung (Lint und Libert, 2006). Da in chronischen Wunden höhere Konzentrationen von neutrophilen Granulozyten angetroffen werden, ist auch die Konzentration der MMP8 dort höher (Nwomeh et al., 1999). MMP8 kann die Immunantwort modulieren und neutrophile Granulozyten anlocken, im Verlauf der Entzündung diese jedoch auch abschwächen.

VEGF

„Vascular endothelial growth factor“ ist ein angiogenetischer Wachstumsfaktor, der in Wachstumsphasen und nach ischämischer Schädigung die Gefäßneubildung steuert. Sinkender Sauerstoffpartialdruck ist der Trigger für die VEGF-Ausschüttung. Die VEGF-Familie wird

unterteilt in VEGFA und PLGF (placental growth factor) die maßgeblich die Blutgefäßbildung steuern, sowie VEGFB, VEGFC und VEGFD. Die letzten beiden steuern die Bildung von Lymphgefäßen. VEGF-Rezeptoren finden sich auf Endothelzellen und Zellen des Knochenmarks (Ferrara und Alitalo, 1999). In der Embryogenese wird er von Chondroblasten produziert, später von Osteoblasten, aktivierten mehrkernigen Riesenzellen, Fibroblasten und Lymphozyten (Matos et al., 2011). Zunächst ist er für die Chemotaxe der endothelialen Vorläuferzellen verantwortlich, dann für Bildung, Teilung, Migration und das Überleben von Endothelzellen und steuert die Gefäß- sprossung. Weiterhin ist VEGF wichtig für die Vitalität der kapillären Geflechte im ganzen Körper (Moore et al., 2001; Zisa et al., 2009). VEGF spielt eine große Rolle in der Tumor-entwicklung. Neoplasien sind in der Lage große Mengen dieses Proteins zu bilden, um sich somit eine ausreichende Blutversorgung zu sichern, wodurch die hämatogene Metastasierung erleichtert wird. Im Knochen kann VEGF Monozytenvorläuferzellen anlocken (Clauss, et. al., 1990). Verschiedene Entzündungsmediatoren, unter ihnen auch $\text{TNF}\alpha$, erwirken die Genexpression von VEGF, der somit auch eine Rolle zu spielen scheint in dem entzündlichen Geschehen von Gefäßerweiterung und Permeabilitätssteigerung (Neufeld et al., 1999).

von Willebrand Faktor

Der von Willebrand Faktor (vWF) ist ein Glykoprotein, das als Trägerprotein für Faktor VIII gilt, diesen für die Gerinnungskaskade bereitstellt und die Thrombozytenadhäsion an subepitheliale Fasern und untereinander vermittelt. Er wird in Endothelzellen und in Megakaryozyten gebildet, kann von diesen Zellen in Weibel-Palade-Körpern und α -Granula gespeichert und sezerniert werden. Man findet ihn außerdem im Plasma und in α -Granula der Thrombozyten (Ruggeri, 1999). Gemeinhin wird er in der Immunhistochemie für die selektive Anfärbung von Gefäßen zur Quantifizierung benutzt (Matos et al., 2011).

1.11 Fragestellung

Bisphosphonate sind äußerst wirksame Medikamente zur Bekämpfung von Knochenschmerz und fortschreitendem Knochenabbau bei destruierenden Knochenerkrankungen. Ein Medikament mit vergleichbarer Wirksamkeit und ähnlich breitem Wirkspektrum bei geringeren Nebenwirkungen

ist nicht in Sicht. Somit ist es von großer Wichtigkeit, die Ursachen der den Patienten schwer belastenden BP-induzierten Kiefernekrose zu ergründen. Da die Ursache sicherlich multifaktoriell bedingt ist, können und werden viele verschiedene Ansätze verfolgt, um Hinweise auf Auslöser für ein solches Geschehen zu erforschen, um hier evtl. Therapie- und Präventionsansätze zu finden.

Es wurden bereits immunhistochemische Studien am Knochen zum Thema der BRONJ durchgeführt. Eine davon verglich die Menge der Defensine bei Osteoradionekrosen, gesundem Knochen und Knochen mit BRONJ. Man fand heraus, dass die Menge der Defensine bei der BRONJ erhöht war. Daraus ergibt sich für die Autoren die Frage, ob eine Entzündung vor der Nekrose stattfindet (Stockmann et al. 2011). Andere Studien untersuchen jeweils ein ausgewähltes Protein des Knochens mit einer immunhistochemischen Färbung (Bigi et al., 2010; Shiota et al., 2009; Wehrhan et al., 2011a; Wehrhan et al., 2011b). Eine andere histologische Studie verwendete nur Übersichtsfärbungen wie Hämatoxylin-Eosin oder Trichrom (Schwartz et al., 2011). Unter den Suchbegriffen „bisphosphonate“ und „immunohistochemistry“, „immunohistologic“, „histology“ oder „histologic“ konnten keine weiteren relevanten Veröffentlichungen gefunden werden.

In dieser Studie wurden immunhistochemische Untersuchungen zur eventuellen Differenzierung unterschiedlicher Knochenreaktionen auf Bisphosphonate in Humanpräparaten durchgeführt. Das Auftreten der immunhistochemischen Marker sollte bei Patienten unter BP-Therapie verglichen werden, bei denen keine, oder doch eine BRONJ entstanden war. Außerdem sollte ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Ergebnissen der Enzyme und Marker geprüft und dies mit der Literatur verglichen werden. Ein besonderes Augenmerk war auf die Anzahl, Größe und Verteilung der Osteoklasten gerichtet, sowie auf die Vaskularisation der Präparate. Es sollte dabei der Fragestellung nachgegangen werden, ob eine Ursache der BRONJ histologisch festgestellt werden kann und inwieweit grundlegende Mechanismen des Knochenstoffwechsel gestört werden.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

2.1.1 Patientengruppe

Das untersuchte Knochenmaterial stammt von 17 Patienten unter BP-Therapie, denen nach genauer Erläuterung und schriftlicher Zustimmung während eines operativen Eingriffs im Kieferbereich Knochenmaterial aus dem Ober- oder Unterkiefer entnommen wurde (vgl. Tab. 1 und 2, S.61, f.). Dies geschah bei den Patienten ohne BRONJ im Rahmen einer Zahnextraktion meist aus dem interradikulären Septum. Bei den Patienten mit manifester BRONJ war es der resizierte nekrotische Knochen. Zum Vergleich wurden Knochenpräparate aus Mandibula oder Maxilla gesunder Patienten herangezogen, die aus dem Laborfundus von Professor Doktor Werner Götz, Zentrum für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde Bonn stammen. Die Patientenauswahl unterlag folgenden Kriterien:

- Medikation mit Bisphosphonaten auf Grund einer malignen Knochenerkrankung oder Osteoporose
- Keine vorausgegangene Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich
- Keine klinisch oder radiologisch bestätigten Metastasen im Kieferbereich
- Osteonekrose des Kieferbereichs anderer Genese

Diese Studie wurde am 08.02.2007 von der Ethikkommission in Bonn genehmigt wird unter der Laufenden Nummer 189/06 geführt.

Nach ausführlicher Literaturrecherche ist diese Studie die erste, die humanen Knochen von Patienten unter BP-Behandlung so umfangreich immunhistochemisch untersucht. Die eine Gruppe wies eine BP-induzierte Nekrose auf, die andere nicht. Die Knochenproben wurden mit den folgenden histologischen und immunhistochemischen Färbungen untersucht: Zwei histologische Übersichts-färbungen (HE, Trichrom), zwei histochemische Färbungen (PAS, TRAP) und 14 immun-histochemische Färbungen (alkalische Phosphatase, BMP2, Cathepsin K, ED1, MMP8, OPG, Osteokalzin, Rank, RankL, Runx2, TNF α , IL1 β , VEGF, vWF) wurden an allen Präparaten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in semiquantitativem Verfahren.

2.2 Methoden

2.2.1 Fixierung

Die insgesamt angefallenen 20 Präparate wurden nach der Entnahme in 4 %-igem, gepufferten Formalin bei Raumtemperatur fixiert. Die Präparate waren 48 Stunden in der Formalinlösung (s. Anhang) eingelegt.

2.2.2 Entkalkung

Nachdem die Fixierung abgeschlossen war, erfolgte die Entkalkung der Knochenpräparate in der Entkalkerlösung Ethylendiamintetratessigsäure (EDTA, s. Anhang) über mindestens 3 Wochen. Bis keine Trübung mehr eintritt, musste diese einmal in der Woche ausgetauscht werden, danach wurden die Präparate 6 Stunden lang gewässert.

2.2.3 Dehydrierung und Einbettung

Der Vorgang der Dehydrierung und Vorbereitung der Einbettung wurde im Gewebeeentwässerungs- und Einbettautomaten (Tissue-Tek V.I.P 2000/3000, Fa. Vogel, Gießen) (s. Anhang) durchgeführt. Zuvor werden Temperatur und Einwirkzeiten programmiert, mit denen die aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung und Klärung durchlaufen wird:

1. 70%-iger Alkohol	40°C	1 Std.
2. 70%-iger Alkohol	40°C	1 Std.
3. 80%-iger Alkohol	40°C	1 Std.
4. 96%-iger Alkohol	40°C	1 Std.
5. 96%-iger Alkohol	40°C	1 Std.
6. absoluter Alkohol	40°C	75 Min.
7. absoluter Alkohol	40°C	75 Min.

8. absoluter Alkohol	40°C	75 Min.
9. Xylol	40°C	1 Std.
10. Xylol	40°C	75 Std.
11. Paraffin	60°C	1 Std.
12. Paraffin	60°C	1 Std.
13. Paraffin	60°C	1 Std.
14. Paraffin	60°C	1 Std.

Dann wurden die Präparate mit Hilfe eines Paraffinierungsgerät (Tissue-Tek TEC, Fa. Sakura, Heppenheim) (s. Anhang) eingebettet. Hierfür wurden die Präparate in kleine Kunststoffküvetten gelegt und diese mit flüssigem Paraffin ausgegossen, welches daraufhin zu einem kleinen Blöckchen erhärtete.

2.2.4 Schnittanfertigung

Pro Präparat wurden Serienschnitte hergestellt. Mit dem Rotationsmikrotom (HM 335 S, Fa. Microm International GmbH) (s. Anhang) wurden die 5 Mikrometer dünnen Schnitte angefertigt. Vorbereitend mussten die Paraffinblöckchen auf einer Kühlplatte (Tissue-Tek, Fa. Sakura) (s. Anhang) auf -4°C gekühlt werden, um dann Serienschnitte anzufertigen. Diese wurden aus dem auf 42°C geheizten Streckbad des Mikrotoms auf Objektträger (Objektträger Superfrost Plus, Fa. Melzel, Braunschweig) (s. Anhang) übertragen. Diese wiederum trockneten dann 15 Minuten auf einer 42°C warmen Heizplatte (s. Anhang) und gelangen zum Schluss für 24 h in einen Wärmeschrank (s. Anhang) bei 37°C.

2.2.5 Entparaffinierung

Um die histologischen und immunhistochemischen Färbungen durchführen zu können, müssen die Präparate von dem umgebenden Paraffin befreit werden. Das geschieht mit der absteigenden Alkoholreihe (Reagenzien s. Anhang):

1. Xylol (Xylolseratz)	10 Min.
2. Xylol (Xylolersatz)	10 Min.
3. absoluter Alkohol	5 Min.
4. absoluter Alkohol	5 Min.
5. 96%-iger Alkohol	5 Min.
6. 70%-iger Alkohol	5 Min.
7. Aqua dest.	5-10 Min.

2.2.6 Übersichtsfärbungen

2.2.6.1 Hämatoxylin - Eosin - (HE-)Färbung

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Saure Moleküle werden durch das Hämatoxylin blau gefärbt: Schleim, Kalk, Zellkerne und Bakterien. Alle basischen Moleküle, wie Zellplasmaproteine oder Kollagen werden durch das Eosin rosa angefärbt. Jeder 10. Schnitt wurde in folgendem Verfahren mit HE manuell gefärbt:

1.-7. siehe 2.2.5	
8. Mayers Hämalaulösung (s. Anhang)	30 Sek.
9. Spülen unter lauwarmen, fließendem Leitungswasser	4 Min.
10. Eosinlösung (s. Anhang)	2 Min.
11. Schwenken in Aqua dest	5 Min.
12. 70%-iger Alkohol	1 Min.
13. 96%-iger Alkohol	1 Min.
14. absoluter Alkohol	2 Min.
15. absoluter Alkohol	2 Min.
16. Xylolersatz	2 Min.
17. Xylolersatz	2 Min.
18. Eindecken mit DePex (s. Anhang)	

2.2.6.2 Trichrom nach Masson-Goldner

Trichrom

Die Trichrom-Färbung dient zur selektiven Darstellung von Kollagen und allgemein von Bindegewebe. Zellkerne erscheinen blau-schwarz, Kollagen, Retikulin, Osteoid, Basalmembranen blau, Zytoplasma, Fibrin, Muskulatur und Erythrozyten rot, Elastin hellrot.

Stammlösungen:

Eisenhämatoxylin nach Weigert:

10 ml Eisenhämatoxylin A (s. Anhang) und 5 ml Eisenhämatoxylin B (s. Anhang)

Massonlösung:

5 ml Masson-Goldner-Lsg. 1 (Ponceau Säurefuchsin) (s. Anhang) und 10 ml Masson-Goldner-Lsg. 2 (Orange G Phosphorwolframsäure) (s. Anhang)

Ponceau-Säurefuchsinlösung:

0,5 Azophloxin (s. Anhang) mit 100 ml Aqua dest. und 0,2 ml Eisessig mischen und filtrieren.

Phosphormolybdänsäure- Orange G:

3g Phosphormolybdänsäure (s. Anhang), 2 g Orange G (s. Anhang) und 100ml Aqua dest..

1. – 7. siehe 2.2.5
8. Eisenhämatoxylin nach Weigert 2 Min.
9. Bläuen in Leitungswasser 5 Min.
10. Ponceau – Säurefuchsinlsg. 5 Min
11. Differenzieren in 1%-iger Essigsäure bis keine Farbwolken mehr abgehen
12. Beizen in Phosphormolybdän- Orange G
13. Spülen in 1%-iger Essigsäure
14. Lichtgrün (s. Anhang) 5 Min.
15. Spülen in 1%-iger Essigsäure

16. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe:

absoluter Alkohol	2 Min.
absoluter Alkohol	2 Min.
Xylolersatz	2 Min.
Xylolersatz	2 Min.

18. Eindecken mit DePex

2.2.7 Histochemische Färbung

2.2.7.1 PAS- Reaktion

PAS

Bei der Perjodsäure-Schiff Reaktion, handelt es sich um die histochemische Anfärbung von kohlenhydrathaltigen Komponenten, wie Glykogen, Glykolipide, Glykoprotein, sowie Zellulose oder Mukopolysaccharide, diese erscheinen im histologischen Bild magentarot bis violett. Auch Pilze oder die Drüsen von wahrscheinlich Aktinomyceten können so sichtbar gemacht werden.

Farblösungen:

0,5%-iger Perjodsäure, Schiff's Reagenz (s. Anhang)

1.-7. siehe (s. 2.2.5)	
8. 0,5%-ige Perjodsäure	10-12 Min.
9. Wässern in Leitungswasser	10 Min.
10. Schiff's Reagenz	20 Min.
11. Leitungswasser	10 Min.
12. Mayer's Hämalaun	30 Sek.
13. Bläuen in warmem Leitungswasser	
14. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe:	
absoluter Alkohol	2 Min.
absoluter Alkohol	2 Min.
Xylolersatz	2 Min.

Xylolersatz	2 Min.
15. Eindecken mit DePex	

2.2.7.2 TRAP

1.-7. s. 2.2.5

8. Aktivierung mit tartratresistenter saurer Phosphatase
in Tris.HCL-Puffer bei 37°C 60 Min.

9. Verfahren nach Barka und Anderson (1962) bei 37°C 60 Min.

Lösung 1: 24 Tropfen 4%-ige Pararosanilin-HCl-Lsg.
(s. Anhang) und 24 Tropfen 4%-ige Natriumnitrit-Lsg.
(s. Anhang) werden nach 60 sec. mit 120ml Veronalacetatpuffer
(s. Anhang) verdünnt und anschließend 1g Weinsäure hinzugefügt,
Einstellung der Lsg. mit 1n NaOH auf pH 5,05

Lösung 2: 40 mg Naphtol-AS-Biphosphat und 4 ml Dimethylformamid (s. Anhang)
durch Mischen, starkes Rütteln und Filtrieren von 50 ml Lsg. 1 und 100 ml Lsg. 2 auf
250 ml aqua dest. wird die Lsg. auf pH 4,6 eingestellt.

10. Spülen unter fließendem Leitungswasser 1 Min.

11. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalauin 5 Sek.

12. Spülen unter fließendem Leitungswasser 5 Min.

13. Eindecken mit Aquatex (s. Anhang)

2.2.8 Immunhistochemie

Zur Darstellung spezifischer Proteine in den verwendeten Knochenpräparaten wurden immunhistochemische Färbungen verwendet. Zum Nachweis der Spezifität wurde bei jedem Proteinachweis eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Verfahren zum Nachweis der untersuchten Marker sind im folgenden aufgeführt. Die Raumtemperatur (RT) lag bei durchschnittlich 21°C

und alle Inkubationen mit dem Primärantikörper wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Spezifität der Antikörper wurde mit Bezug auf die Herstellerangaben und zahlreichen Literaturangaben vorrausgesetzt.

2.2.8.1 Alkalische Phosphatase

1.- 7. s. 2.2.5

- | | | |
|-----|---|---------------|
| 8. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 9. | Blockieren in endogener Peroxidase
in 70 ml Methanol und 700 µl 30%-igen H ₂ O ₂ | 10 Min. |
| 10. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 11. | Inkubation mit Zitratpuffer (s. Anhang) | 30 Min., 80°C |
| 12. | Mit 1%-igem BSA blocken | 20 Min. |
| 13. | Inkubation mit Primärantikörper | 24h, 4°C |
| 14. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 15. | Inkubation mit Sekundärantikörper
(Envision Anti rabbit, HRP-konjugiert, s.2.2.13) | 30 Min. |
| 16. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 17. | Färbung in DAB (s. Anhang) | 10 Min. |
| 18. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 19. | Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun | 1 Sek. |
| 20. | Bläuen unter fließendem Leitungswasser | 5 Min |
| 21. | Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: | |
| | 70%-iger Alkohol | 2 Min. |
| | 96%-iger Alkohol | 2 Min |
| | absoluter Alkohol | 2 Min. |
| | absoluter Alkohol | 2 Min. |
| | Xylolersatz | 2 Min. |
| | Xylolersatz | 2 Min. |
| 22. | Eindecken mit DePex | |

2.2.8.2 Osteokalzin

- | | |
|--|---------|
| 1.-7. siehe 2.2.5 | |
| 8. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 9. Blockieren in endogener Peroxidase
in 70 ml Methanol und 700 µl 30%-igen H ₂ O ₂ | 10 Min. |
| 10. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 11. Inkubation mit Primärantikörper
(Verdünnung 1:1000 in 1%-iger TBS/BSA) | 1 h |
| 12. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 13. Inkubation mit Sekundärantikörper
(Dako Envision anti-mouse) | 30 Min. |
| 14. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 15. Färbung in DAB (s. Anhang) | 10 Min. |
| 16. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 17. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun | 1 Sek. |
| 18. Bläuen unter fließendem Leitungswasser | 5 Min |
| 19. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: | |
| 70%-iger Alkohol | 2 Min. |
| 96%-iger Alkohol | 2 Min. |
| absoluter Alkohol | 2 Min. |
| absoluter Alkohol | 2 Min. |
| Xylolersatz | 2 Min. |
| Xylolersatz | 2 Min. |
| 20. Eindecken mit DePex | |

2.2.8.3 Bone morphogenic protein 2 (BMP2)

- 1.-7. s. 2.2.5
- | | |
|--|---------------|
| 8. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 9. Blockieren in endogener Peroxidase
in 70 ml Methanol und 700 µl 30%-igen H ₂ O ₂ | 10 Min. |
| 10. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 11. Vorverdau mit 0,4%-igem Pepsin | 20 Min., 24°C |
| 12. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 13. Blocken mit Kaninchenserum 1:5 mit TBS/BSA | 20 Min. |
| 14. Inkubation mit Primärantikörper
(Verdünnung 1: 25 in 1%-igem TBS/BSA) | 24h, 4°C |
| 15. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 16. Inkubation mit Sekundärantikörper
(Dako, anti goat, HRP-konjugiert 1:50) | 30 Min. |
| 17. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 18. Färbung in DAB (s. Anhang) | 10 Min. |
| 19. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 20. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalauen | 1 Sek. |
| 21. Bläuen unter fließendem Leitungswasser | 5 Min. |
| 22. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: | |
| 70%-iger Alkohol | 2 Min. |
| 96%-iger Alkohol | 2 Min. |
| absoluter Alkohol | 2 Min. |
| absoluter Alkohol | 2 Min. |
| Xylolersatz | 2 Min. |
| Xylolersatz | 2 Min. |
| 23. Eindecken mit DePex | |

2.2.8.4 Runx2

- 1.-7. s. 2.2.5
- | | | |
|-----|---|---------------|
| 8. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 9. | Blockieren in endogener Peroxidase
in 70 ml Methanol und 700 µl 30%-igen H ₂ O ₂ | 10 Min. |
| 10. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 11. | Vorverdauen mit 0,4%-igem Pepsin | 20 Min., 37°C |
| 12. | Spülen mit TBS | 10 Min. |
| 13. | Vorblockung mit 4%-igem TBS/BSA | 20 Min. |
| 14. | Inkubation mit Primärantikörper
(Verdünnung 1:30 in 1%-igem TBS/BSA) | 24h, 4°C |
| 15. | Spülen in TBS | |
| 16. | Inkubation mit Sekundärantikörper
(anti goat, HRP-konjugiert,
Verdünnung 1:50 in 1%-igem TBS/BSA) | 30 Min. |
| 17. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 18. | Färbung in DAB (s. Anhang) | 10 Min. |
| 19. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 20. | Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun | 1 Sek. |
| 21. | Bläuen unter fließendem Leitungswasser | 5 Min. |
| 22. | Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: | |
| | 70%-iger Alkohol | 2 Min. |
| | 96%-iger Alkohol | 2 Min. |
| | absoluter Alkohol | 2 Min. |
| | absoluter Alkohol | 2 Min. |
| | Xylolersatz | 2 Min. |
| | Xylolersatz | 2 Min. |
| 23. | Eindecken mit DePex | |

2.2.8.5 RankL

- 1.-7. s. 2.2.5
8. Spülen in TBS 10 Min.
9. Blockieren in endogener Peroxidase 10 Min.
in 70 ml Methanol und 700 µl 30%-igen H₂O₂
10. Spülen in TBS 10 Min.
11. Inkubation mit Primärantikörper 20h, 4°C
(Verdünnung 1:50 mit 1%-igem TBS/BSA)
12. Spülen in TBS 10 Min.
13. Inkubation mit Sekundärantikörper 30 Min.
(Dako Envision, anti goat, HRP-konjugiert,
Verdünnung 1:50 in TBS/BSA)
14. Spülen in TBS 10 Min.
15. Färbung in DAB (s. Anhang) 10 Min.
16. Spülen in TBS 10 Min.
17. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun 1 Sek.
18. Bläuen unter fließendem Leitungswasser 5 Min.
19. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe:
 - 70%-iger Alkohol 2 Min.
 - 96%-iger Alkohol 2 Min.
 - absoluter Alkohol 2 Min.
 - absoluter Alkohol 2 Min.
 - Xylolersatz 2 Min.
 - Xylolersatz 2 Min.
20. Eindecken mit DePex

2.2.8.6 OPG

1. -7. s. 2.2.5
8. Spülen in TBS 10 Min.
9. Blockieren in endogener Peroxidase 10 Min.
in 70 ml Methanol und 700 µl 30%-igen H₂O₂
10. Spülen in TBS 10 Min.
11. Vorblockung mit TBS/BSA 4% 20 Min.
12. Inkubation mit Primärantikörper 20h, 4°C
(Verdünnung 1:200 in 1%-iger TBS/BSA)
13. Spülen in TBS 10 Min.
14. Inkubation mit Sekundärantikörper 30 Min.
(anto goat, HRP-konjugiert, Verdünnung 1:50 in
1%-igem TBS/BSA)
15. Spülen in TBS 10 Min.
16. Färbung in DAB (s. Anhang) 10 Min.
17. Spülen in TBS 10 Min.
18. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun 1 Sek.
19. Bläuen unter fließendem Leitungswasser 5 Min.
20. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe:

70%-iger Alkohol	2 Min.
96%-iger Alkohol	2 Min.
absoluter Alkohol	2 Min.
absoluter Alkohol	2 Min.
 Xylolersatz	 2 Min.
Xylolersatz	2 Min.
21. Eindecken mit DePex

2.2.8.7 Rank

- 1.-7. s. 2.2.5
8. Spülen in TBS 10 Min.
9. Blockieren in endogener Peroxidase 10 Min.
in 70 ml Methanol und 700 µl 30%-igen H₂O₂
10. Spülen in TBS 10 Min.
11. Vorverdauung mit 0,4% Pepsin (s. 2.2.10) 5 Min.
12. Spülen in TBS 10 Min.
13. Vorblockung mit 4% TBS/BSA 20 Min.
14. Inkubation mit Primärantikörper 20h, 4°C
(Verdünnung 1:25 in 1%-igem TBS/BSA)
15. Spülen in TBS 10 Min.
16. Inkubation mit Sekundärantikörper 30 Min.
(Anti goat, HRP-konjugiert, Verdünnung 1:50
in 1%igem TBS/BSA)
17. Spülen in TBS 10 Min.
18. Färbung in DAB (s. Anhang) 10 Min.
19. Spülen in TBS 10 Min.
20. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalauen 1 Sek.
21. Bläuen unter fließendem Leitungswasser 5 Min.
22. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe:
 - 70%-iger Alkohol 2 Min.
 - 96%-iger Alkohol 2 Min.
 - absoluter Alkohol 2 Min.
 - absoluter Alkohol 2 Min.
 - Xylolersatz 2 Min.
 - Xylolersatz 2 Min.
23. Eindecken mit DePex

2.2.8.8 CD 68/ ED1

1.-7. s. 2.2.5

- | | | |
|-----|---|---------|
| 8. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 9. | Blockieren in endogener Peroxidase
in 70 ml Methanol und 700 µl 30%-igen H ₂ O ₂ | 10 Min. |
| 10. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 11. | Inkubation mit Primärantikörper
(Verdünnung 1:100 in 1%igem TBS/BSA) | 1h |
| 12. | Spülen in TBS | |
| 13. | Inkubation mit Sekundärantikörper
(Dako Envision, anti mouse, HRP-konjugiert) | 30 Min. |
| 14. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 15. | Färbung in DAB (s. Anhang) | 10 Min. |
| 16. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 17. | Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun | 1 Sek. |
| 18. | Bläuen unter fließendem Leitungswasser | 5 Min. |
| 19. | Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: | |
| | 70%-iger Alkohol | 2 Min. |
| | 96%-iger Alkohol | 2 Min. |
| | absoluter Alkohol | 2 Min. |
| | absoluter Alkohol | 2 Min. |
| | Xylolersatz | 2 Min. |
| | Xylolersatz | 2 Min. |
| 20. | Eindecken mit DePex | |

2.2.8.9 Cathepsin K

1.-7. s. 2.2.5

- | | | |
|----|------------------------------------|---------|
| 8. | Spülen in TBS | 10 Min. |
| 9. | Blockieren in endogener Peroxidase | 10 Min. |

- in 70 ml Methanol und 700 µl 30%-igen H₂O₂
10. Spülen in TBS 10 Min.
 11. Blockierung mit 4%-igem TBS/BSA 40 Min.
 12. Inkubation mit Primärantikörper
(Verdünnung in 1:200 mit 1%igem TBS/BSA) 24h, 4°C
 13. Spülen in TBS 10 Min.
 14. Inkubation mit Sekundärantikörper
(Dako Envision, anti rabbit) 30 Min.
 15. Spülen in TBS 10 Min.
 16. Färbung in DAB (s. Anhang) 10 Min.
 17. Spülen in TBS 10 Min.
 18. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun 1 Sek.
 19. Bläuen unter fließendem Leitungswasser 5 Min.
 20. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe:
 - 70%-iger Alkohol 2 Min.
 - 96%-iger Alkohol 2 Min.
 - absoluter Alkohol 2 Min.
 - absoluter Alkohol 2 Min.
 - Xylolersatz 2 Min.
 - Xylolersatz 2 Min.
 21. Eindecken mit DePex

2.2.8.10 Interleukin 1β

- 1.-7. s. 2.2.5
8. Spülen in TBS 10 Min.
 9. Blockieren in endogener Peroxidase 10 Min.
in 70 ml Methanol und 700 µl 30%-igen H₂O₂
 10. Spülen in TBS 10 Min.
 11. Inkubation mit Primärantikörper 24h, 4°C
(Verdünnung 1:100 in 1%-igem TBS/BSA)

12. Spülen in TBS	10 Min.
13. Inkubation mit Sekundärantikörper (Dako Envision, anti rabbit)	30 Min.
14. Spülen in TBS	10 Min.
15. Färbung in DAB (s. Anhang)	10 Min.
16. Spülen in TBS	10 Min.
17. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalauen	1 Sek.
18. Bläuen unter fließendem Leitungswasser	5 Min.
19. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe:	
70%-iger Alkohol	2 Min.
96%-iger Alkohol	2 Min.
absoluter Alkohol	2 Min.
absoluter Alkohol	2 Min.
Xylolersatz	2 Min.
Xylolersatz	2 Min.
20. Eindecken mit DePex	

2.2.8.11 TNF α

1.-7. S. 2.2.5

8. Spülen in TBS	10 Min.
9. Blockieren in endogener Peroxidase in 70 ml Methanol und 700 μ l 30%-igen H ₂ O ₂	10 Min.
10. Spülen in TBS	10 Min.
11. Inkubation mit Primärantikörper (Verdünnung 1:50 in 1%igem TBS/BSA)	24h, 4°C
12. Spülen in TBS	
13. Inkubation mit Sekundärantikörper (Dako Cytomation, anti rabbit)	45 Min
14. Spülen in TBS	10 Min.

15. Färbung in DAB (s. Anhang)	10 Min.
16. Spülen in TBS	10 Min.
17. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun	1 Sek.
18. Bläuen unter fließendem Leitungswasser	5 Min.
19. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe:	
70%-iger Alkohol	2 Min.
96%-iger Alkohol	2 Min.
absoluter Alkohol	2 Min.
absoluter Alkohol	2 Min.
Xylolersatz	2 Min.
Xylolersatz	2 Min.
20. Eindecken mit DePex	

2.2.8.12 MMP8

1. -7. s. 2.2.5	
8. Spülen in TBS	10 Min.
9. Blockieren in endogener Peroxidase in 70 ml methanol und 700 µl 30%-igen H ₂ O ₂	10 Min.
10. Spülen in TBS	10 Min.
11. Inkubation mit Primärantikörper (in einer Verdünnung 1:50 in 1%-iger TBS/BSA Lösung)	24h, 4°C
12. Spülen in TBS	10 Min.
13. Inkubation mit Sekundärantikörper (Dako Envision Anti mouse)	30 Min
14. Spülen in TBS	10 Min.
15. Färbung in DAB (s. Anhang)	10 Min.
16. Spülen in TBS	10 Min.
17. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun	1 Sek.
18. Bläuen unter fließendem Leitungswasser	5 Min.

19. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe:
- | | |
|-------------------|--------|
| 70%-iger Alkohol | 2 Min. |
| 96%-iger Alkohol | 2 Min. |
| absoluter Alkohol | 2 Min. |
| absoluter Alkohol | 2 Min. |
| Xylolersatz | 2 Min. |
| Xylolersatz | 2 Min. |
20. Eindecken mit DePex

2.2.8.13 Von Willebrand Faktor

1.-7. s. 2.2.5

- | | |
|--|---------|
| 8. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 9. Blockieren in endogener Peroxidase
in 70 ml Methanol und 700 µl 30%-igen H ₂ O ₂ | 10 Min. |
| 10. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 11. Inkubation mit Primärantikörper
(Verdünnung 1:200 mit 1%-igem TBS/BSA) | 1h |
| 12. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 13. Inkubation mit Sekundärantikörper
(Dako Envision, anti rabbit, HRP-konjugiert) | 30 Min. |
| 14. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 15. Färbung in DAB (s. Anhang) | 10 Min. |
| 16. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 17. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun | 1 Sek. |
| 18. Bläuen unter fließendem Leitungswasser | 5 Min. |
| 19. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: | |
| 70%-iger Alkohol | 2 Min. |

96%-iger Alkohol	2 Min.
absoluter Alkohol	2 Min.
absoluter Alkohol	2 Min.
Xylolersatz	2 Min.
Xylolersatz	2 Min.
20. Eindecken mit DePex	

2.2.8.14 Vascular endothelial growth factor

1.-7. s. 2.2.5

8. Spülen in TBS	10 Min.
9. Blockieren in endogener Peroxidase in 70 ml Methanol und 700 µl 30%-igen H ₂ O ₂	10 Min.
10. Spülen in TBS	10 Min.
11. Inkubation mit Primärantikörper (Verdünnung 1:25 mit 1%-igem TBS/BSA)	1h
12. Spülen in TBS	10 Min.
13. Inkubation mit Sekundärantikörper (Dako Envision, anti rabbit, HRP-konjugiert)	30 Min.
14. Spülen in TBS	10 Min.
15. Färbung in DAB (s. Anhang)	10 Min.
16. Spülen in TBS	10 Min.
17. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalauen	1 Sek.
18. Bläuen unter fließendem Leitungswasser	5 Min.
19. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe:	
70%-iger Alkohol	2 Min.
96%-iger Alkohol	2 Min.
absoluter Alkohol	2 Min.
absoluter Alkohol	2 Min.

Xylolersatz	2 Min.
Xylolersatz	2 Min.
20. Eindecken mit DePex	

2.2.9 Kontrolle der Färbungen

2.2.9.1 Negativkontrolle

Zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen des Sekundärantikörpers wurden in jeder Färbereihe Negativkontrollen mitgeführt. Zur Überprüfung der Spezifität des Primärantikörpers wurde statt mit dem Primärantikörper mit 1 %-igem TBS/BSA inkubiert, im weiteren Verlauf aber völlig identisch behandelt. Zur Überprüfung der Spezifität des Sekundärantikörpers wurden sowohl der 1. als auch der 2. Antikörper durch 1 %-iges TBS/BSA ersetzt.

2.2.9.2 Positivkontrolle

Als Positivkontrollen wurden Schnitte von Präparaten des gesunden Alveolar- und Kieferknochens genommen von denen aus früheren Untersuchungen die Lokalisation der nachzuweisenden Faktoren bekannt war.

2.2.10 Semiquantitative und photographische Dokumentation und Auswertung

Die Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Jena, Deutschland) (s. Anhang) begutachtet und semiquantitativ ausgewertet. Auf Grund der Ergebnisse versprach eine statistische Auswertung, z.B. im Sinne eines Vierfeldertestes keinen wissenschaftlichen Mehrwert. Die Proben waren nicht standardisiert, es handelte sich um unterschiedliche Kieferregionen und unterschiedlich große Knochenproben, desweiteren liegt eine unübersichtliche Zusammensetzung von Geweben und Zellen mit intra- und extrazellulärer Anfärbung vor, die eine einheitliche Festlegung auf eine spezifische Region für eine exakte quantitative

histomorphometrische Auswertung schwierig machen. Die Entscheidung zur rein semi-quantitativen Auswertung wurde nach Rücksprache mit dem betreuenden Statistiker getroffen. Durch die semiquantitative Beschreibung konnten die Ergebnisse detailliert dargestellt und aufgearbeitet werden.

Die Knochenproben wurden in 5- und 10-facher, aber auch 20- und 40-facher Vergrößerung fotografiert (Mikroskopkamera Axioplan 1, Zeiss, Jena, Deutschland) (s. Anhang). Die Intensität der Immunreaktion wurde eingeteilt in: - = keine Immunreaktion, (+) = schwache Immunreaktion, + = mittelstarke Immunreaktion, ++ = starke Immunreaktion. Die verschiedenen Reagenzien, Chemikalien, Primär- und Sekundär-antikörper und Geräte finden sich im Anhang auf den Seiten 135-139.

3. Ergebnisse

3.1 Anamnese

Die Proben der mit BP behandelten Patienten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: 8 Patienten die unter BP-Behandlung keine Nekrose entwickelt hatten und 9 Patienten, die eine BRONJ erlitten. Insgesamt lagen 10 Präparate mit, und 10 Präparate ohne Nekrose vor. Dabei handelte es sich um geschlechtlich gemischte Gruppen (s. Tab. 1 und 2). 7 Patientinnen litten an einem Mamma-Karzinom, 2 Patienten an Plasmozytom, 2 weitere an einem Prostata-Karzinom, 3 an Osteoporose, 2 an multiplm Myelom und 1 an einem Rektum-Karzinom. Die Patienten nahmen verschiedene BP ein, 12 von ihnen Zometa[®] (Zoledronat), 2 Patienten Bondronat[®] (Ibandronat), 2 Patienten Fosamax[®] (Alendronat), einer Aredia[®] (Pamidronat).

Die nekrosefreie Gruppe umfasste 8 Patienten unter BP (im Folgenden Gruppe 1 genannt - siehe auch Tab.1). Die Präparate 1894 und 1896 dieser Gruppe stammten von 2 Patienten die auch in der zweiten Gruppe aufgeführt werden mit den Präparatennummern 1895 und 2029. Diesen 2 Patienten wurden jeweils 2 Zähne gezogen. Sie blieben bei einer der beiden Zahnextraktionen nekrosefrei, im weiteren Verlauf entwickelten sie eine BRONJ. Diese beiden Patienten werden mit der zweiten Gruppe besprochen.

Bei Gruppe 1 handelte es sich um 6 Männer und 2 Frauen. Die Patienten von denen die Präparate 1894 und 1896 stammen, werden mit Gruppe 2 ausgewertet. Deren zweite Präparate mit BRONJ in Gruppe 2 haben die Labornummern 1895 und 2029. Allen Patienten dieser Gruppe wurde ein Zahn unter BP-Therapie entfernt. Die Knochenbiopsie wurde bei diesen Patienten ohne BRONJ im Zuge einer Zahnextraktion meist aus dem Septum entnommen (Regionen s. Tab. 1). 2 Patientinnen litten unter einem Mama-Karzinom, 2 Patienten unter Osteoporose, 2 unter einem multiplen Myelom, 1 unter einem Prostata-Karzinom und 1 unter einem Plasmozytom. 3 Patienten erhielten Zometa[®] i. v., 2 Patienten Fosamax[®] oral, 2 Patienten Bondronat[®] i.v. und 1 Patient Aredia[®] i. v.. In dieser Gruppe hatten 3 von den 5 Tumorpatienten Metastasen, alle Tumorpatienten erhielten zusätzlich eine Chemotherapie. Nur 1 von diesen 8 Patienten litt auch unter einem Diabetes mellitus. Von 8 Patienten rauchte 1.

3 Präparate stammen aus dem Oberkiefer, 5 Mal aus dem Unterkiefer.

Nr.	Labornummer	Geburtsdatum, Geschlecht	Maligne Grunderkrankung	Medikament	Nekrose in Regio	vorrausgegangene Extraktionen	Metastasen	Chemo- therapie	Diabetes mellitus	Raucher
1	1894*	03.02.52 (+), m	Rektum-CA	Zometa [®] i.v.	-	27	Ja	Ja	Ja	Ja
2	1896*	02.03.49 (+), w	Mamma-CA	Zometa [®] i.v.	-	41	Ja	Ja	-	-
3	1964	17.10.39, m (+)	Prostata-CA	Zometa [®] i.v.	-	32-42	Ja	-	Ja	-
4	1965	23.09.40, w	Mamma-CA	Bondronat [®] i.v.	-	18	Ja	Ja	-	-
5	2061	20.04.30, m	Osteoporose	Fosamax [®] o.	-	26	-	-	-	-
6	2103	28.04.60, m	Multipl. Myelom	Bondronat [®] i.v.	-	75	-	Ja	-	Ja
7	2305	27.05.63, m	Multipl. Myelom	Zometa [®] i.v.	-	46	-	Ja	-	-
8	2317	27.05.63, m	Mamma-CA	Zometa [®] i.v.	-	44	Ja	Ja	-	-
9	2341	01.12.35, w	Osteoporose	Fosamax [®] o.	-	11	-	Nein	-	-

Tab. 1: Angaben zur Anamnese der Patienten unter BP-Therapie ohne Nekrose, Gruppe 1: Labornummer der Präparate, maligne Grunderkrankung, verabreichtes Medikament, extrahierter Zahn, Metastasen bei malignem Primärkarzinom, Chemotherapie, Diabetes und Nikotinabusus

* Diese Patienten entwickelten im Verlauf der Studie nach einer zweiten notwendigen Extraktion eine Nekrose.

Nr.	Labornummer	Geburtsdatum, Geschlecht	Maligne Grunderkrankung	Medikament	Nekrose in Regio	vorrausgegangene Extraktionen	Knochen	Chemotherapie	Diabetes mellitus	Raucher
11	1895*	03.02.52, m	Rektum-CA	Zometa® i.v.	14	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
12	2029 *	02.03.49, w	Mamma-CA	Zometa® i.v.	33	Ja	Ja	Ja	-	-
13, 14	1900,1901	27.10.44, w	Mamma-CA	Zometa® i.v.	13-17	Ja	Ja	Ja	Ja	-
15	2062	29.11.61, w	Mamma-CA	Zometa® i.v.	24	Ja	Ja	Ja	-	Ja
16	2345	17.06.37, m	Osteoporose	Zometa® i.v.	37, 38	-	-	-	Ja	Ja
17	2350	04.07.36, m	Prostata-CA	Zometa® i.v.	35	Ja	Ja	Ja	Ja	-
18	2352	20.10.45, w	Mamma-CA	Zometa® i.v.	36	Ja	Ja	Ja	-	-
19	2360	01.01.38, m	Plasmozytom	Zometa® i.v.	36	Ja	-	Ja	-	-
20	2363	27.01.33, w	Mamma-CA	Zometa® i.v.	37	Ja	Ja	Ja	Ja	-

Tab. 2: Angaben zur Anamnese der Patienten unter BP-Therapie mit Nekrose, Gruppe 2: Labornummer der Präparate, maligne Grunderkrankung, verabreichtes Medikament, Ort der Nekrose, extrahierter Zahn, Metastasen bei malignem Primärkarzinom, Chemotherapie, Diabetes und Nikotinabusus

* Diese Patienten wiesen nach der ersten Extraktion keine Nekrose auf, nach der zweiten Extraktion entwickelten sie jedoch eine BRONJ.

Bei der zweiten Gruppe handelte es sich um 9 Patienten (im Folgenden Gruppe 2 genannt), die unter der BP-Medikation eine BRONJ erlitten. Es ging bis auf einen Fall immer eine Extraktion voraus. Die Knochenbiopsie erfolgte bei den Patienten, die unter einer BRONJ litten aus dem Übergang der nekrotischen Region zum gesunden Knochen (Regionen, siehe Tab. 2). Ein Patient nahm die BP auf Grund einer Osteoporoseerkrankung ein, alle anderen auf Grund einer metastasierenden Krebserkrankung. Es handelte sich hierbei um 4 Männer und 5 Frauen. 5 Patienten litten an einem Mama-Karzinom, die anderen jeweils an Prostata-Karzinom, Rektum-Karzinom und Plasmozytom. Alle Patienten erhielten Zometa[®] i. v. in hoher Dosierung. Zusätzlich erhielten alle Patienten, mit Ausnahme des Osteoporosepatienten, eine Chemotherapie. 5 von 9 Patienten litten auch an Diabetes mellitus. Nur 3 Patienten dieser Gruppe gaben an, regelmäßig zu rauchen. 3 Mal lag die BRONJ im Oberkiefer vor, 6 Mal im Unterkiefer (vgl. Tab. 2). Die gewonnenen Präparate aus den BP-Gruppen 1 und 2 wurden mit jeweils 2 Knochenpräparaten mehrerer gesunder Patienten aus dem Laborfundus von Professor Doktor Werner Götz, Zentrum für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde Bonn verglichen, die keine BP einnahmen, im Folgenden Gruppe 3 genannt.

3.2 Histologische Übersichtsfärbungen

Bei den nachfolgenden Histologien mit den verschiedenen Anfärbungen erfolgt die Darstellung immer in der Reihenfolge von Präparaten der Patienten die unter BP-Therapie nekrosefrei blieben (Gruppe 1) und danach die Präparate von Patienten, die nach BP-Therapie eine BRONJ entwickelten (Gruppe 2) und zuletzt Präparate gesunder Patienten ohne BP-Medikation (Gruppe 3).

3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Der Lamellenknochen in dieser Gruppe bot teilweise ein unruhiges Bild durch die zahlreichen Kittlinien im Bündelknochen (Abb. 1). Bündelknochen ist der dem Zahn am nächsten gelegene

Knochen, hier inseriert der desmodontale Faserapparat. Durch Zahnbewegungen ist dieser Knochen einem gesteigerten Umbau unterworfen. Die Umbaulinien waren oft arkadenförmig geschwungen, teilweise auch basophil gefärbt. Es gab hin und wieder Resorptionslakunen mit vielen Lining cells, sowie Osteoblasten, die frisches Osteoid anlagern und in manchen Präparaten Osteoklasten. Die Resorptionslakunen waren in den meisten Präparaten sehr zahlreich, aber flach und schmal. Man erkannte viele Riesenzellen, Monozyten und Makrophagen im umgebenden Bindegewebe.

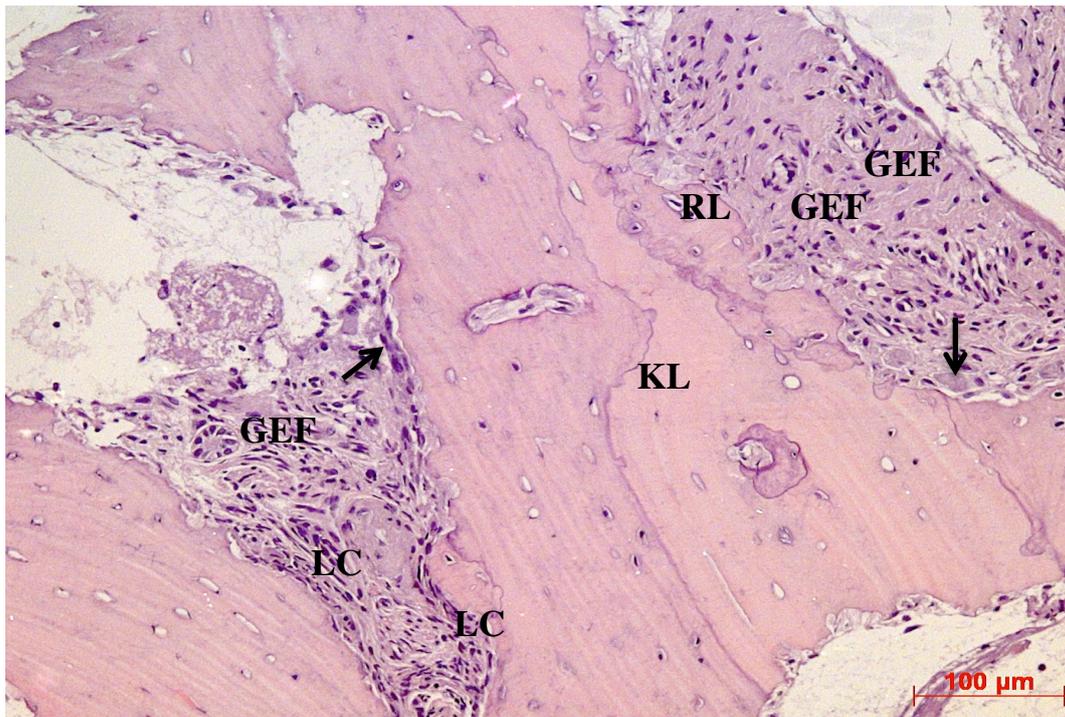


Abb. 1: Knochen von Patienten unter BP-Medikation ohne Kieferknochennekrose. Kittlinien (KL), Resorptionslakunen (RL), Lining cells (LC) und Osteoblasten, Gefäße (GEF), Osteoklasten mit Pfeilen markiert, (Originalvergrößerung x 20) Färbung: HE, Präparatnr.: 1896

Einige Knochenfragmente enthielten zahlreiche Havers'sche Kanäle und waren somit gut vaskularisiert, andere hingegen weniger. Das umgebende Bindegewebe aus Kollagenfasern und Fibroblasten war meist mit vielen Lymphozyten, Granulozyten und Blutgefäßen durchsetzt. Das Präparat eines Patienten aus Gruppe 1 mit der Nummer 2305 musste aus der Auswertung herausgenommen werden, da das Knochenfragment so klein war, dass nicht für alle Anfärbungen ein Knochenstück erhalten werden konnte.

Knochenproben von Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Diese Präparate waren jeweils teilweise nekrotisch, teilweise vital (Abb. 2). Im Bindegewebe fanden sich viele Entzündungszellen und in 7 von 9 Fällen ein Bakterienrasen. Manche Präparate waren sehr zellarm, viele Zellen befanden sich in Apoptose oder waren bereits abgestorben. Fast alle Osteozytenlakunen waren leer und man fand wenige Osteoblasten oder Lining cells. Zahlreiche Resorptionslakunen, erschienen ebenfalls sehr flach und schmal, außerdem waren fast nie Osteoklasten in der Nähe des Knochensaumes zu sehen. In 4 Präparaten erkannte man Osteoklasten am Knochensaum oder in Resorptionslakunen.

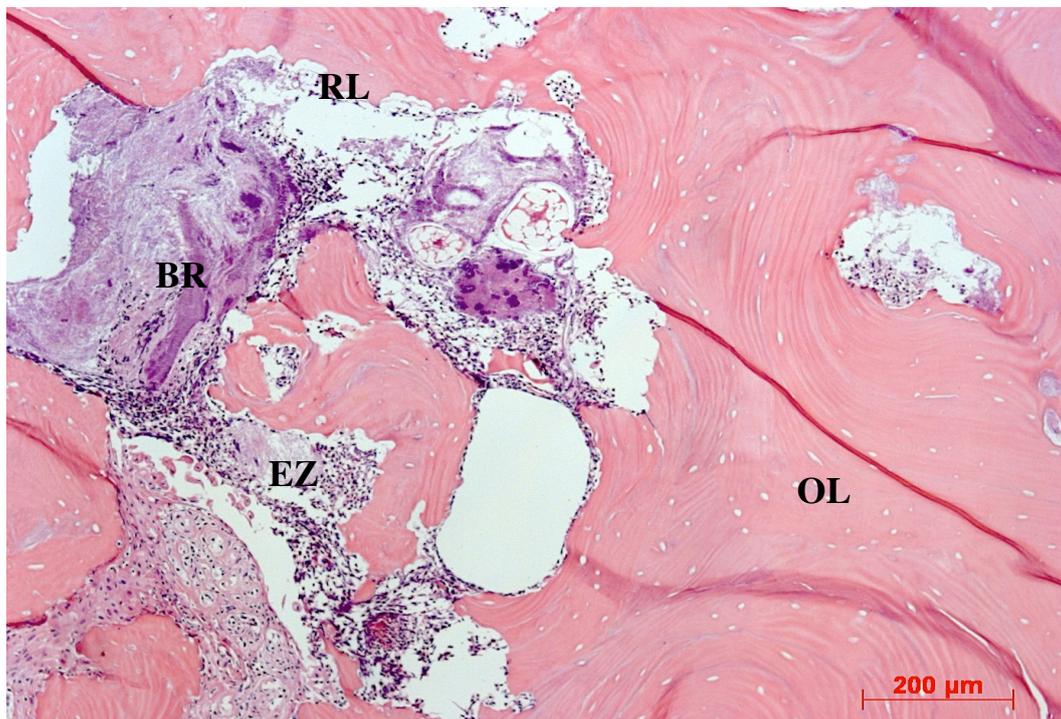


Abb. 2: Knochen von Patienten unter BP-Therapie mit Kieferknochennekrose. Nekrotischer Knochen. Bakterienrasen (BR), Entzündungszellen (EZ), Resorptionslakunen (RL), leere Osteozytenlakunen (OL), (Originalvergrößerung x10) Färbung HE, Präparatnr.: 2345

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Die Knochenpräparate zeigten kompakte und spongiöse Anteile (Abb. 3). Sie waren stark eosinophil gefärbt. Man erkannte viele Osteone. Osteone sind die Grundeinheit des kortikalen Knochens, in deren Mitte sich zwei Havers'sche Gefäße befinden. Um die Gefäße lagen konzentrische Knochenlamellen. Außerdem sah man Spongiosatrabekel und Bündelknochen. An einigen Stellen fanden sich Resorptionslakunen mit bereits frisch angelagertem Osteoid und vielen stark basophilen Lining cells (flache Osteoblasten im inaktiven Zustand), sowie Osteoklasten, aktive Osteoblasten und deren Vorläuferzellen. Des Weiteren waren Havers'sche Kanäle mit den zentralen Gefäßen zu finden und regelmäßig verstreute Osteozytenlakunen, die basophile Osteozyten enthielten.

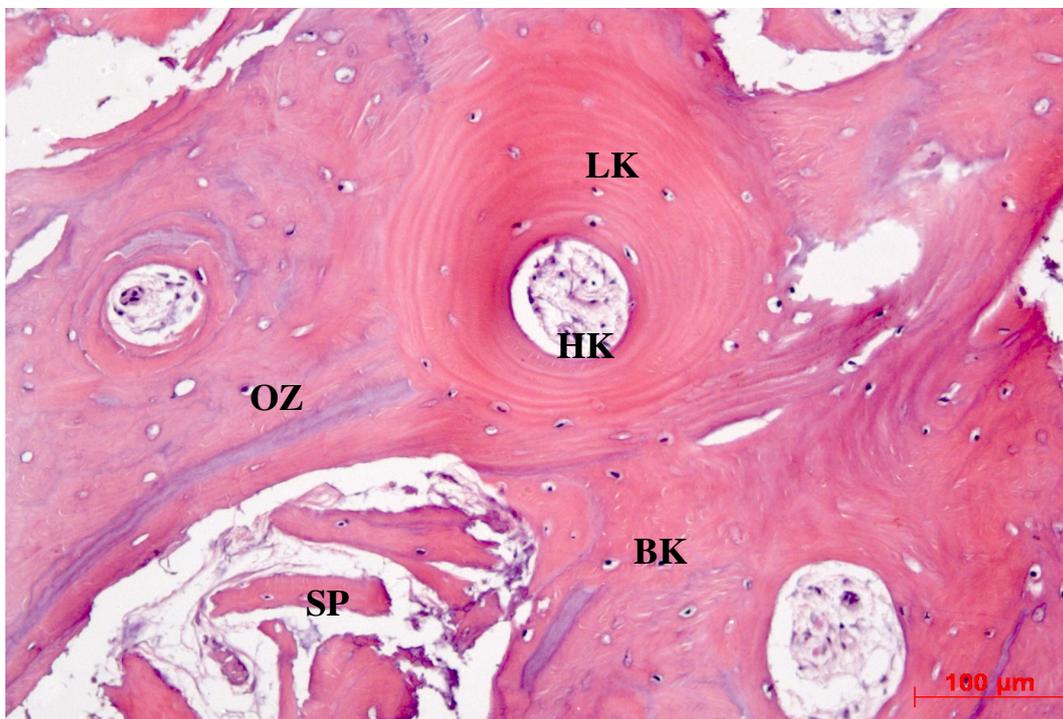


Abb. 3: gesunder Lamellen (LK)- und Bündelknochen (BK), Osteozytenlakunen mit Osteozyten (OZ), Havers-Kanal(HK), Spongiosatrabekel (SP). (Originalvergrößerung x20) Färbung: HE, Präparat 2100

3.2.2 Trichrom nach Masson-Goldner

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Hier konnten nur 8 Präparate ausgewertet werden, da das Knochenfragment von Nr. 2317 so klein war, dass es nicht genügend Schnitte ergab. Alle Präparate zeigten viele frische Osteoidareale. 3 der Präparate (1894, 1965, 2343) hatten noch viele mineralisierte Areale im Knochen, 4 Präparate (1896, 1964, 2103, 2341) wiesen weniger Mineralisation auf, 1 Präparat (2061) gar keine (Abb. 4).

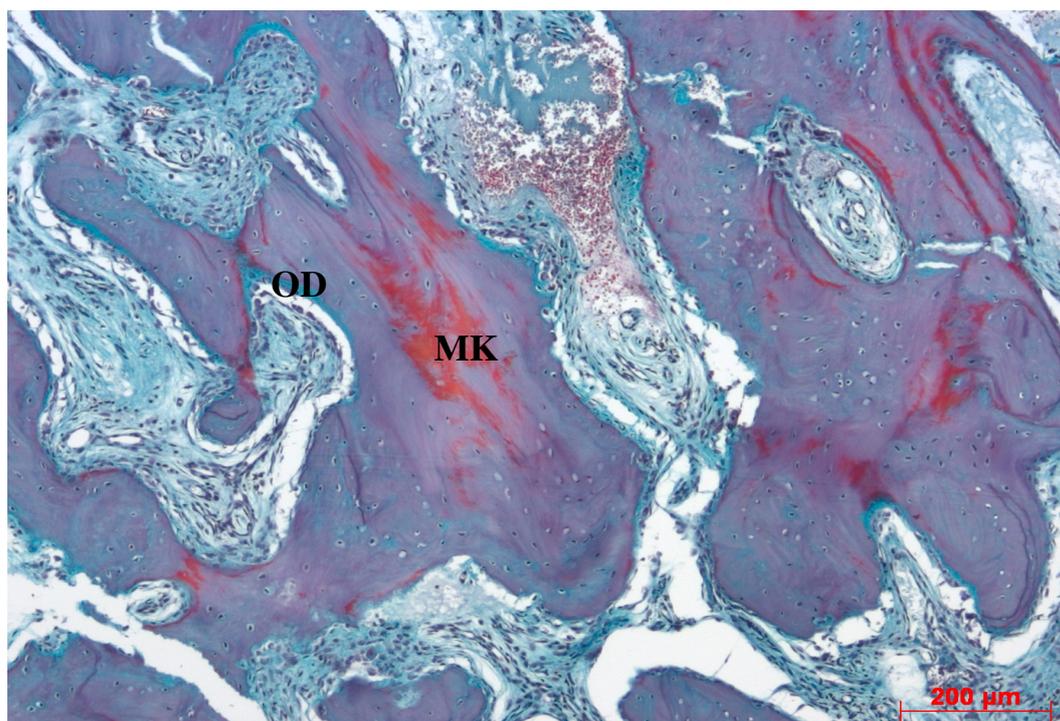


Abb.4: Knochentrabekel von Patienten unter BP-Medikation ohne Kieferknochennekrose. Mineralisierter Knochen (MK), viel frisches Osteoid(Originalvergrößerung x10) Färbung: Trichrom, Präparatnr.: 1964

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Viele noch mineralisierte Areale sah man bei 3 von 9 Präparaten (1900, 1901, 2360). Die Präparate 2345 und 1895 zeigten nur wenige mineralisierte Bereiche und die restlichen Präparate

(15, 17, 18, 20) fast gar keine. Man fand weniger Osteoidbildung vor als bei Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1).

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Der gesunde Knochen war zu zwei Dritteln demineralisiert, ein Drittel des Knochens war noch mineralisiert. Man erkannte mäßige Osteoidproduktion.

3.3 Histochemische Färbung

3.3.1 PAS-Reaktion

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Die Kittlinien wurden dunkel angefärbt, ebenso das frische Osteoid erschien dunkel. Die Zellkörper der Osteoklasten waren zart basophil im Kontrast zu den schwarzen Zellkernen.

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Wie bereits bei der HE-Färbung beschrieben, erschienen die Knochenfragmente sehr unruhig mit vielen Resorptionslakunen und Osteoklasten, sowie zahlreichen Havers'schen Kanälen und Umbaulinien. 7 von 9 Präparaten zeigten im Bakterienrasen violett angefärbte Konglomerate aus feinen, fadenförmigen Strukturen (Abb. 5).

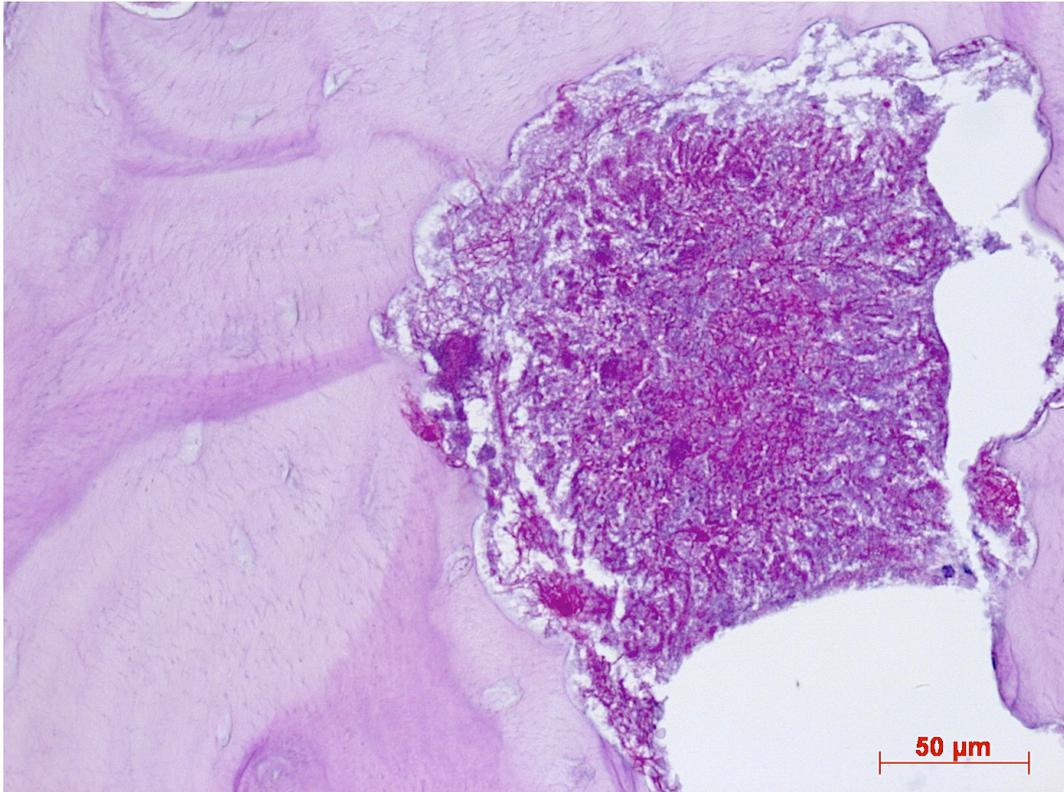


Abb. 5: Spongiöser Knochen von Patienten unter BP-Therapie mit Kieferknochennekrose. Pink angefärbte, fadenförmige Strukturen. (Originalvergrößerung x40) Färbung: PAS, Präparatnr. : 1901

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

In dieser Übersichtsfärbung erschien der gesunde Knochen recht gleichmäßig basophil gefärbt, die Zellkerne wurden dunkel violett dargestellt, ebenso die Endothelzellen der Gefäße und die Knochenränder. Kollagenfasern waren zart basophil gefärbt. Kittlinien und Osteoid wurden zarter angefärbt, als in Gruppe 1. Strukturell zeigen diese Schnitte keine Unterschiede zu denen in der oben beschriebenen HE-Färbung.

3.3.2 TRAP

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Die Reaktion erzielte eine recht unterschiedliche Verteilung: 3 Präparate zeigten keine Reaktion. Zwar liessen sich Osteoklasten erkennen, diese wurden jedoch nicht angefärbt (Nr.: 1894, 1964, 1965) (vgl. Abb. 6). 3 Präparate zeigten wenige Osteoklasten, die kaum angefärbt wurden. Diese Osteoklasten erschienen sehr klein (Nr.: 2317, 2341, 2343). In 2 Präparaten reagierten die Osteoklasten sehr stark, sie zeigten eine kräftig karmesinrote Färbung. Im Präparat 1896 waren es sehr viele kleine Zellen, die weit weg vom Knochen lagen (vgl. Abb. 7), nur ein Osteoklast liegt in seiner Resorptionslakune. Im Präparat 2061 fanden sich an einer Stelle mehrere Osteoklasten, die weit weg vom Knochen lagen, an einer anderen Stelle lag ein Osteoklast in seiner Lakune am Knochen.

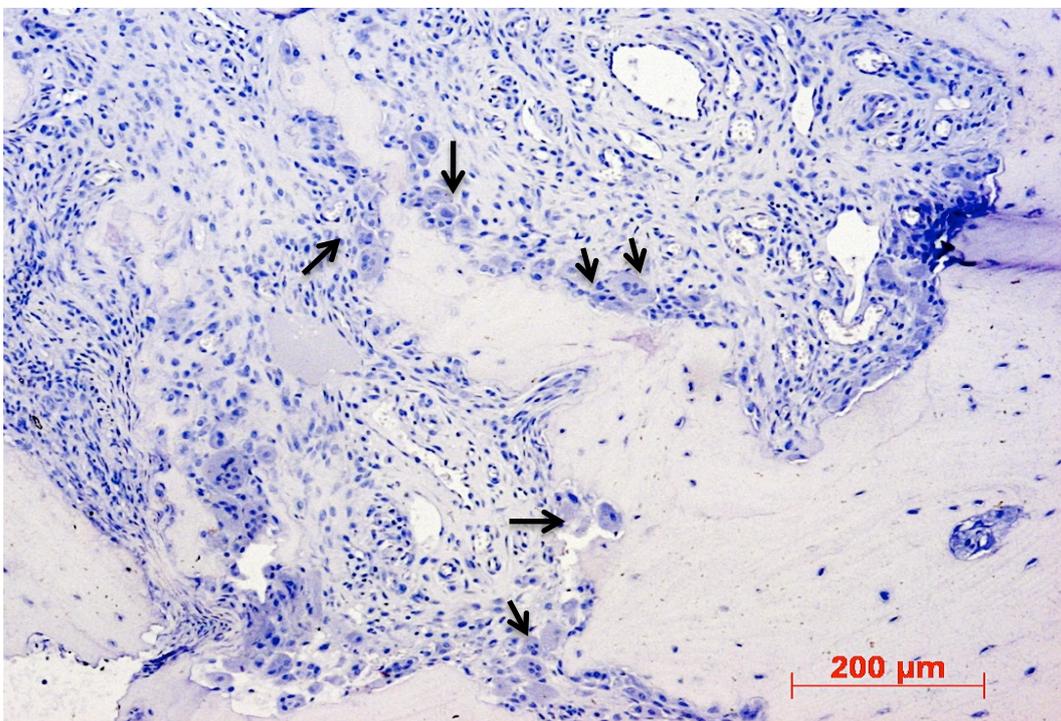


Abb. 6: Spongiöser Knochen von Patienten unter BP-Medikation ohne Kieferknochennekrose. Mit Pfeilen markierte, zahlreiche Osteoklasten, die TRAP-negativ sind. (Originalvergrößerung x10) Färbung: TRAP, Präparatnr.: 1964

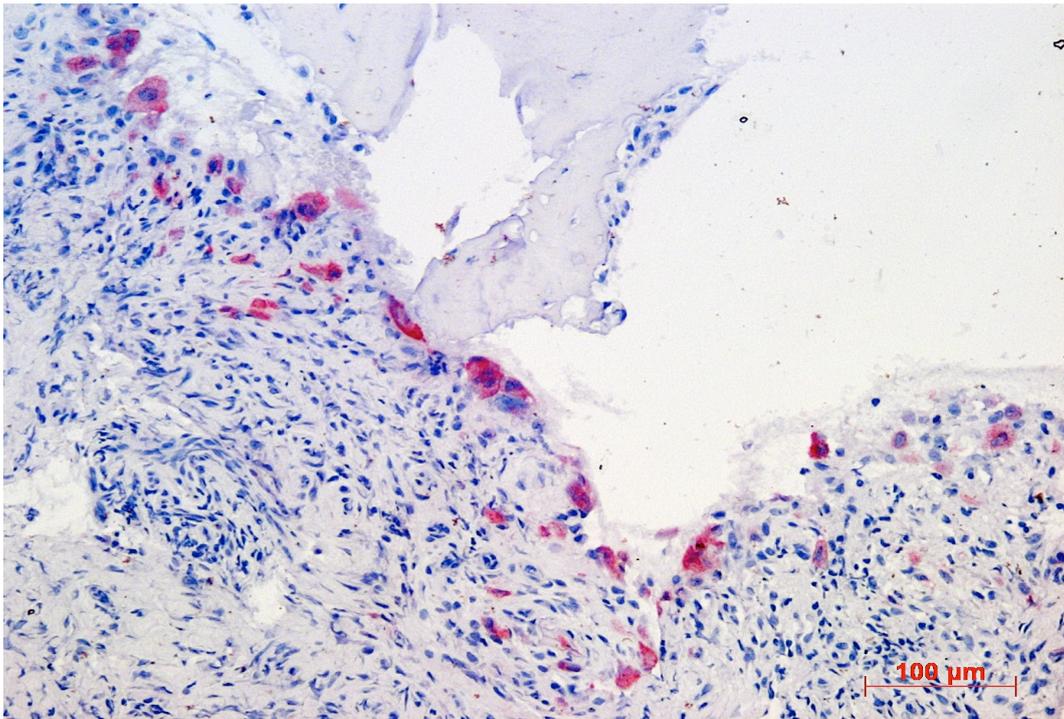


Abb. 7: Spongiöser Knochen von Patienten unter BP-Medikation ohne Kieferknochennekrose. Ein Präparat aus Gruppe 1 mit sehr zahlreichen, kleinen Osteoklasten, die auf TRAP positiv reagiert haben. Sie liegen alle nicht nah am Knochen sondern im Bindegewebe verstreut. (Originalvergrößerung x20) Färbung: TRAP, Präparatnr.: 1896

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Die Präparate 2350, 2360 und 2363 zeigten keine Anfärbung, jedoch waren im Präparat 2350 mehrere Osteoklasten sichtbar. Die Präparate 1900 und 1901 stammen von einem Patienten und beide zeigten viele Osteoklasten, sie waren alle sehr klein und nur ein Osteoklast saß dem Knochen direkt auf. Präparat 2029 zeigte ebenfalls ein paar verstreute kleine Osteoklasten, von denen keiner dem Knochen aufsaß. Präparat 2345 enthielt zwei kaum angefärbte Osteoklasten. Nur in den Präparaten 2352 und 2363 fand man viele kleine, kräftig gefärbte Osteoklasten, von denen jedoch nur vereinzelte nah am Knochen lagen (Abb. 8).

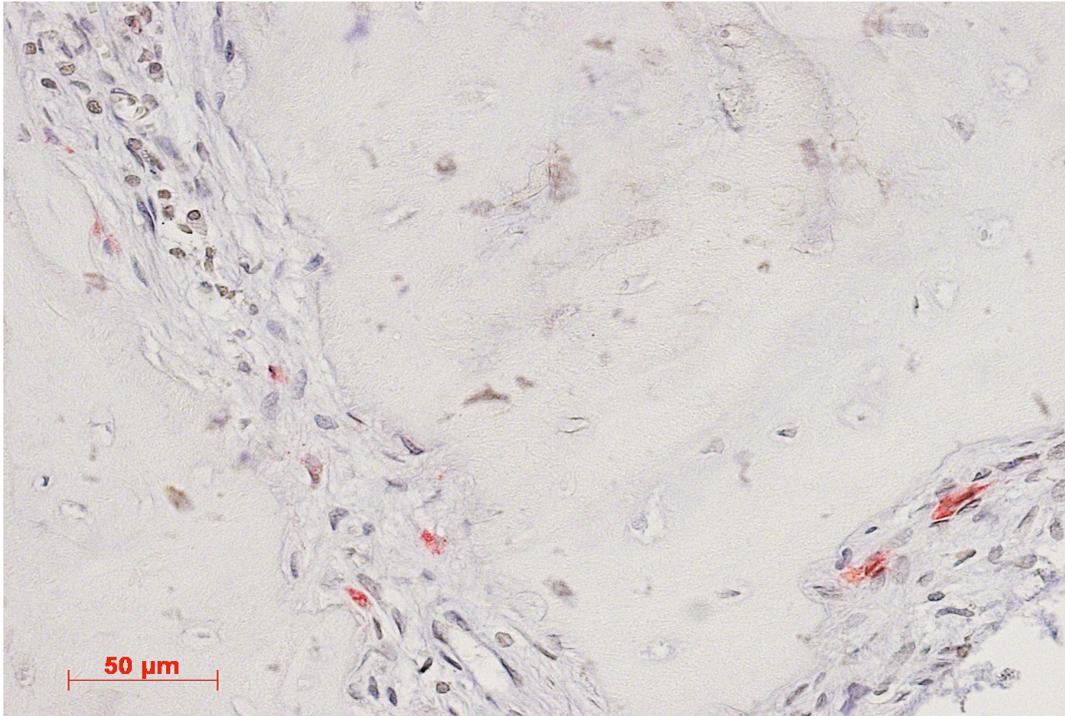


Abb. 8: Knochen von Patienten unter BP-Therapie mit Kieferknochennekrose. Man erkennt einige kleine rot gefärbte Osteoklasten mit einigem Abstand zum Knochen. (Originalvergrößerung x40) Färbung: TRAP, Präparatnr.: 2363

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Diese Präparate zeigten sehr wenige TRAP produzierende Osteoklasten. Es lagen meistens mehrere nebeneinander vor, eng an der Knochenoberfläche (Abb. 9).

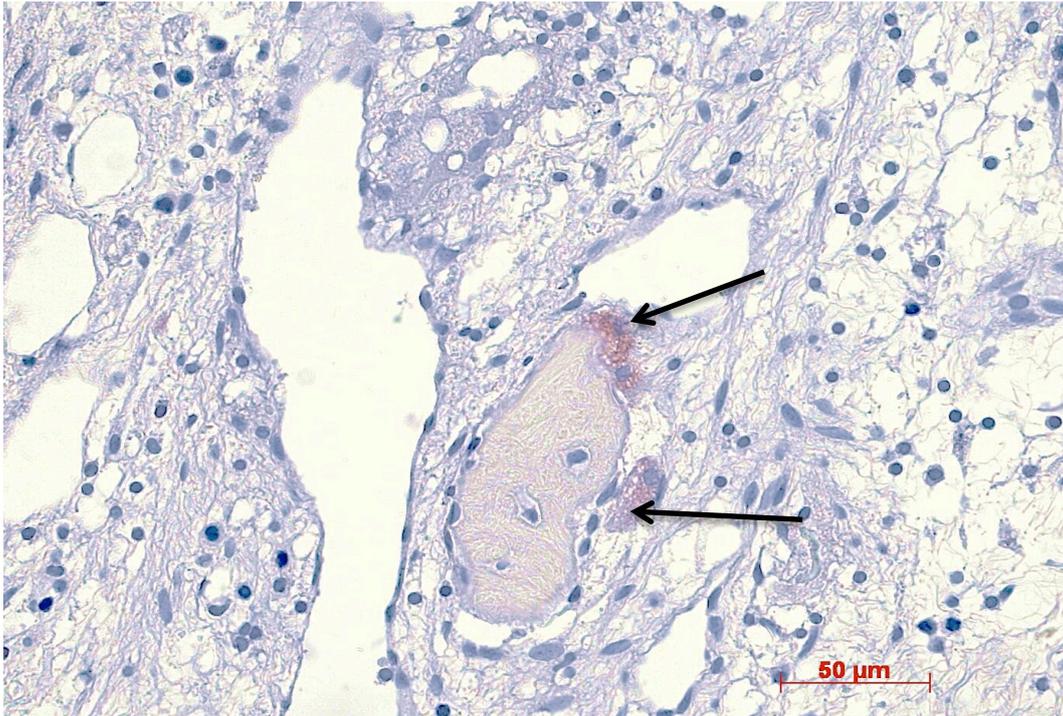


Abb. 9: Gesunder, spongiöser Knochen umgeben von viel Bindegewebe. Trap-positive Osteoklasten (Pfeile) wurden rot angefärbt. Sie liegen nah am Knochenbälkchen. (Originalvergrößerung x40) Färbung: TRAP, Präparatnr.: 2076

3.4 Immunhistochemische Färbungen

3.4.1 Alkalische Phosphatase

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

In der Übersicht war die Reaktion auf den Antikörper der alkalischen Phosphatase einheitlich stark (Abb. 10). In allen Präparaten aus dieser Gruppe wurden die Endothelzellen besonders stark angefärbt, in der nächst kräftigen Intensität präsentierten sich die Lining cells, Osteoblasten und Osteoklasten und deren Vorläuferzellen. Die Fibroblasten sind bei allen Präparaten ebenfalls stark angefärbt. Bei den Präparaten 1894 und 1896 blieben die Fibroblasten und Kollagenfasern ungefärbt. Bei diesen Präparaten fehlte bei den Osteozyten jegliche Reaktion, wohingegen bei allen anderen Präparaten Osteozyten eine schwache Anfärbung aufwiesen.

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Die Reaktion bei dieser Patientengruppe fiel genauso aus, wie bei Gruppe 1. Besonders fielen die vielen stark gefärbten Osteoklasten auf (Abb. 10). Zusätzlich waren jeweils noch der Bakterienrasen und die Granulozyten kräftig angefärbt.

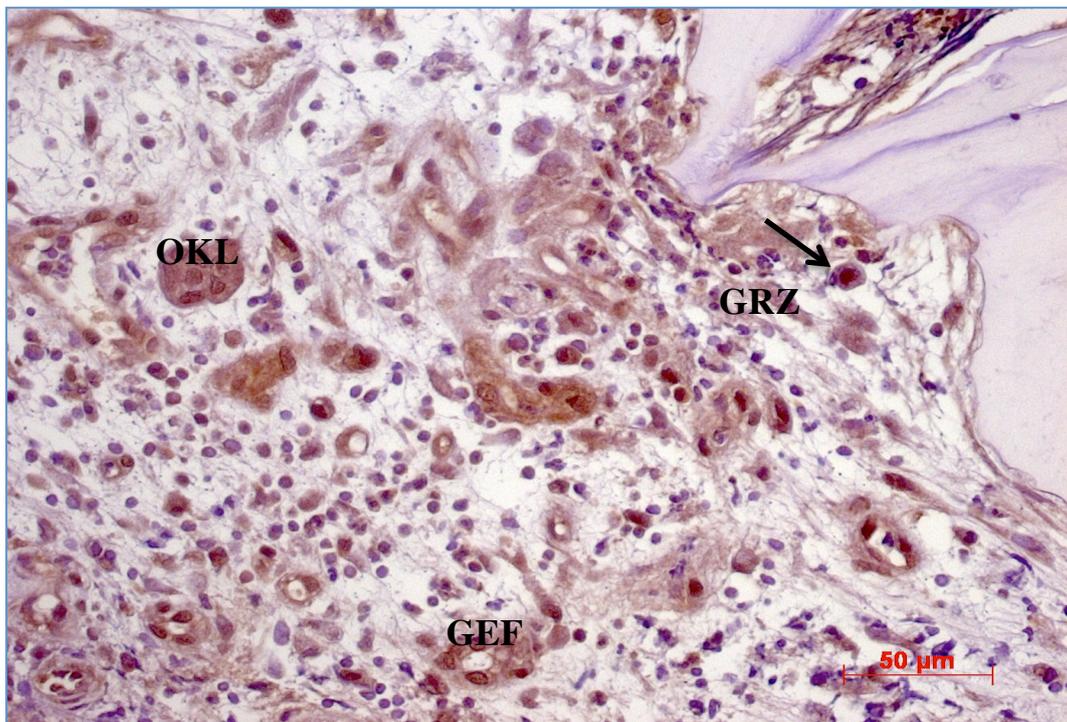


Abb. 10: Spongioser Knochen von Patienten unter BP-Therapie mit Kieferknochennekrose. Stark angefärbt ist hier ein Osteoklast (OKL), sowie die Gefäße (GEF), auch einige stark gefärbte Granulozyten (GRZ) sind sichtbar. (Originalvergrößerung x40) Färbung: Alkalische Phosphatase, Präparatnr.: 1900

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Alle Gefäßwände und Lining cells und Osteoblasten, aber auch Osteozyten, Fibroblasten und Osteoklasten waren kräftig gefärbt (Abb. 11).

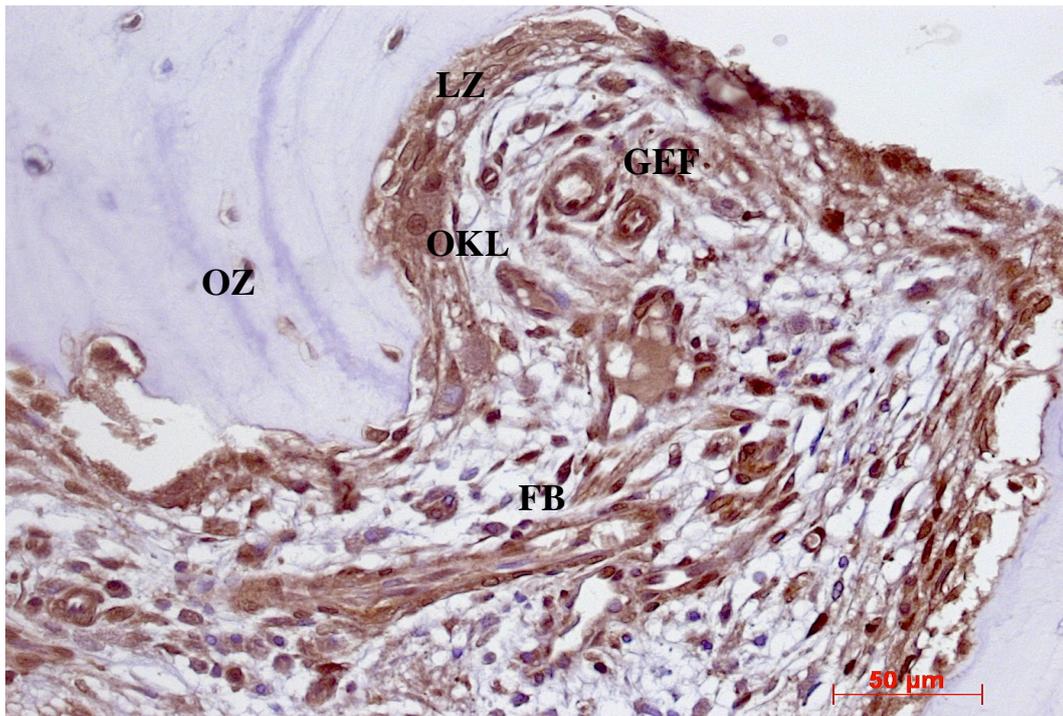


Abb. 11: Spongiöser Knochen von Patienten unter BP-Medikation ohne Kieferknochennekrose. Osteozyten (OZ), Fibroblasten (FB), flache Lining cells (LZ), Osteoklasten (OKL) und Gefäße (GEF) stark gefärbt. (Originalvergrößerung x40) Färbung: alkalische Phosphatase, Präparatnr.: 1964

3.4.2 Osteokalzin

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Die Hartschubstanz des Knochens wurde durchgängig schwach braun gefärbt. Einige Lamellen waren stärker gefärbt als andere. Zusätzlich waren einige Osteoblasten stark gefärbt. Osteoid erschien schwach blau. Auch in Endothelzellen erkannte man eine schwach braune Reaktion (Abb. 12). Das Präparat 1896 aus dieser Gruppe zeigte viele, teilweise unruhig geschwungene Kittlinien. Die Präparate 1964 und 1965 präsentierten viele positiv angefarbte Osteoklasten. In den Präparaten 2317, 2341 und 2343 fand man keine Reaktion in den Osteoblasten. Auch hier sah man schmale Streifen frischen Knochens, die weniger angefarbt worden sind.

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

In dieser Gruppe fiel auf, dass die meisten Präparate kaum angefärbte Osteoblasten vorwiesen, sondern pro Präparat nur eine Stelle zu finden war, an der Osteoblasten Osteokalzin-positiv waren. Keine Osteokalzin-positiven Osteoblasten wiesen die Präparate 2345, 2352 und 2360 auf. Osteoklasten waren hingegen meistens angefärbt.

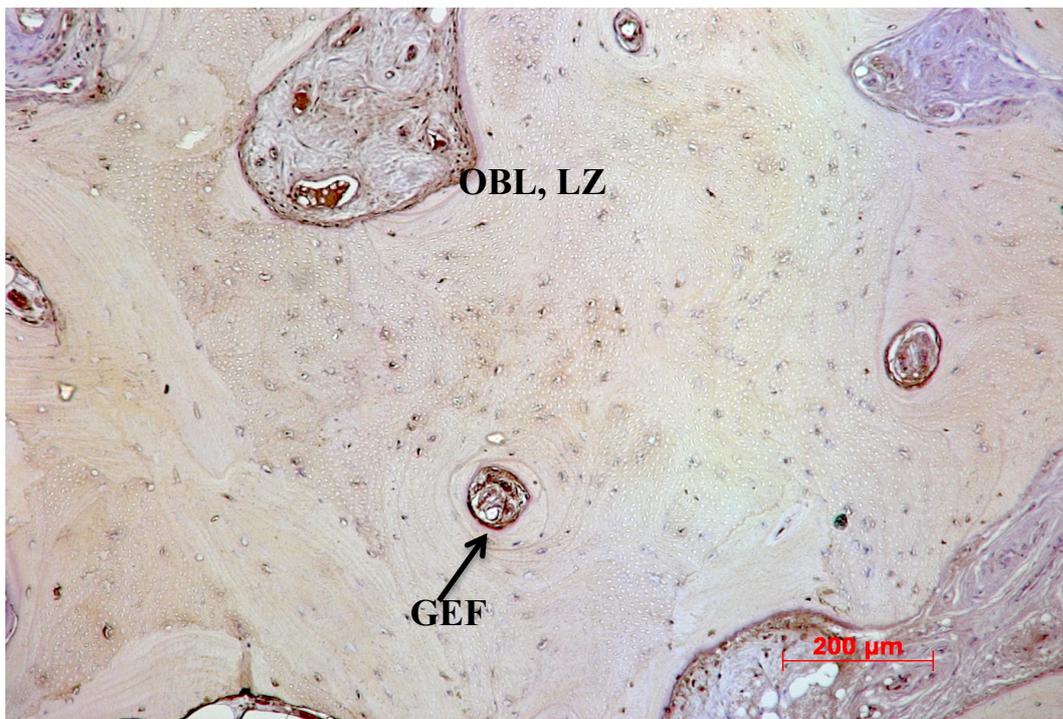


Abb. 12: Spongiöser Knochen von Patienten unter BP-Medikation ohne Kieferknochennekrose. In diesem Präparatausschnitt ist eine Region abgebildet, in der sich einige osteokalzinpositive Osteoblasten (OBL), Lining cells (LZ) und überall Osteozyten finden. Auch die Endothelzellen der Gefäßwand (GEF) reagierten Osteokalzin-positiv. (Originalvergrößerung x10) Färbung: Osteokalzin, Präparatnr.: 2061

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Die Färbung fiel so aus, wie bei Gruppe 1, jedoch sah man sehr wenige Kittlinien. Helle Streifen am Knochensaum markierten frisch abgelagerten neuen Knochen.

3.4.3 BMP2

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Bis auf ein Präparat (2061) zeigten alle Präparate die gleiche Reaktion. Vereinzelt waren kleine runde Zellen angefärbt, die nicht direkt dem Knochensaum anlagen. Es könnte sich dabei um Lymphozyten oder Mastzellen handeln, außerdem reagierten einige Lymphozyten und Fibroblasten sehr schwach positiv. Weitere Strukturen wurden nicht angefärbt. Die Ergebnisse unterschieden sich nicht von gesundem Knochen (Abb. 13).

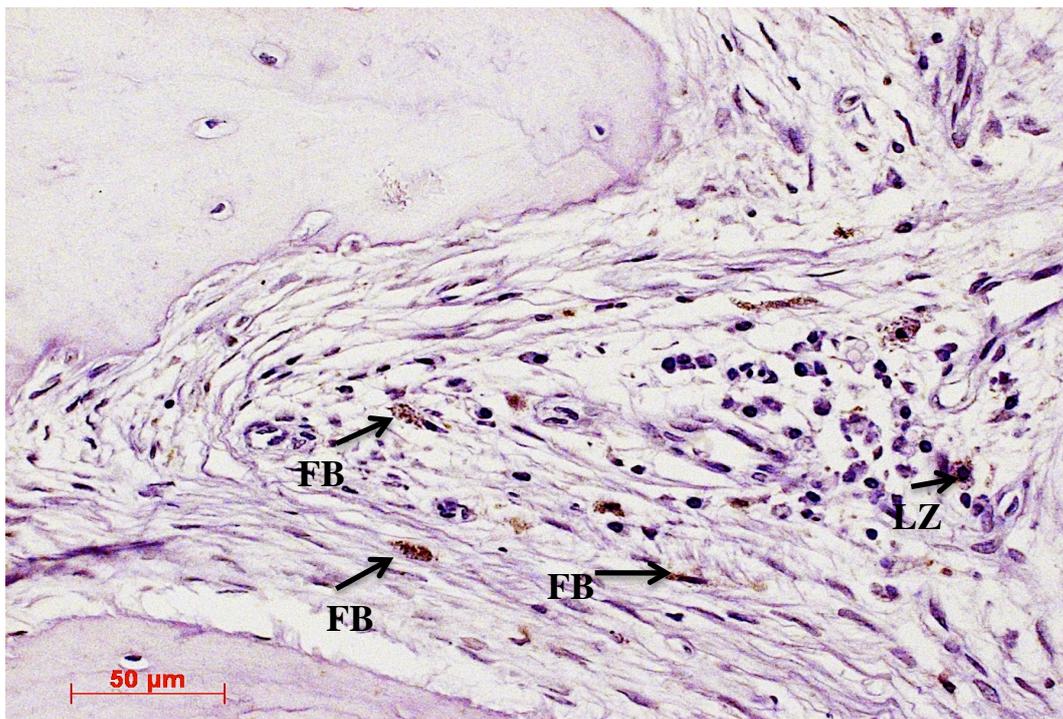


Abb. 13: Spongioser Knochen von Patienten unter BP-Medikation ohne Kieferknochennekrose. Die Reaktion auf die BMP-2-Färbung erfolgte sehr schwach. Man erkennt in einigen Fibroblasten (FB) und Lymphozyten (LZ) einige braune Granula. (Originalvergrößerung x40) Färbung: BMP-2, Präparatnr.: 1965

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Die Ergebnisse sind gleich zu denen aus Gruppe 1.

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Die Immunreaktion auf BMP2 war im gesunden Knochen schwach. Manche Osteoblasten und Lining cells wurden angefärbt, außerdem einige runde Zellen im Spongiosaraum, bei denen es sich um Osteoblastenvorläuferzellen handeln könnte.

3.4.4 Runx2

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Die Immunreaktion war im Wesentlichen in den Zellkernen von Osteoblasten und deren Vorläuferzellen sichtbar, sowie in einigen Osteozyten. Bei starker Reaktion wurden auch Gefäßwände angefärbt. Keine Reaktion fand in den Präparaten 2061, 2103 und 2341 statt. Eine schwache Runx2-positive Reaktion erfolgte in den Präparaten 1896, 1964 und 2343. Starke Reaktion ist in den Osteoblasten, deren Vorläuferzellen und Osteozyten und Osteoklasten der Präparate 1894, 1965 und 2317 zu erkennen.

Die Reaktion fiel intensiver aus, als in den gesunden Vergleichspräparaten von Gruppe 3.

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Zwei Präparate (2352, 2360) zeigten keine Reaktion. In den anderen Präparaten waren Osteoblasten und deren Vorläuferzellen angefärbt. Im Präparat 2352 lagen öfter Runx2-positive neben Runx2-negativen Osteoklasten vor. In den anderen Präparaten konnte man kräftig angefärbte Osteoklasten erkennen. Gefäßwände zeigten immer eine positive Immunreaktion. Einige Granulozyten wurden ebenfalls angefärbt. Die Reaktion fiel intensiver aus als in Gruppe 3 (Abb. 14).

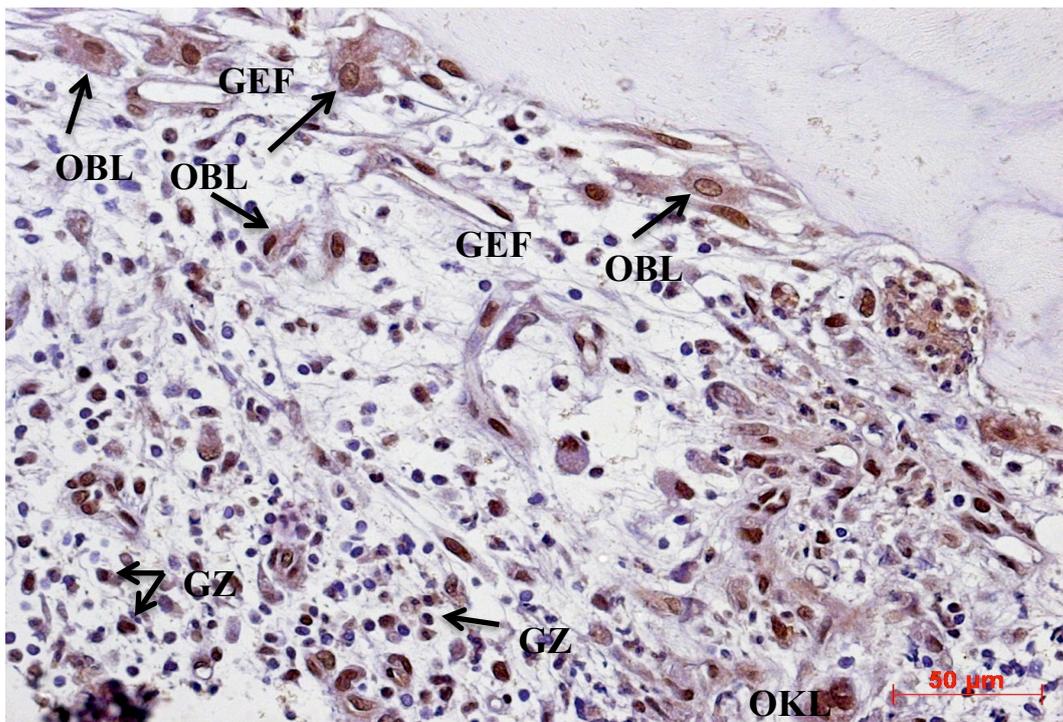


Abb. 14: Spongöser Knochen von Patienten unter BP-Therapie mit Kieferknochennekrose. In diesem Präparat sind außerordentlich viele Zellen angefärbt: zahlreiche Osteoblasten (OBL), sowie ein Osteoklast (OKL) und Granulozyten (GZ). Kapilläre Gefäße (GEF) zeigen Reaktion in den Endothelzellen (Originalvergrößerung x40) Färbung: Runx2, Präparatnr.: 1900

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Das Zytoplasma einiger Osteoklasten am Knochensaum zeigte schwache Reaktion, außerdem wurden Lining cells mittelstark angefärbt. Andere Zellen und Areale wurden nicht angefärbt (Abb. 15).

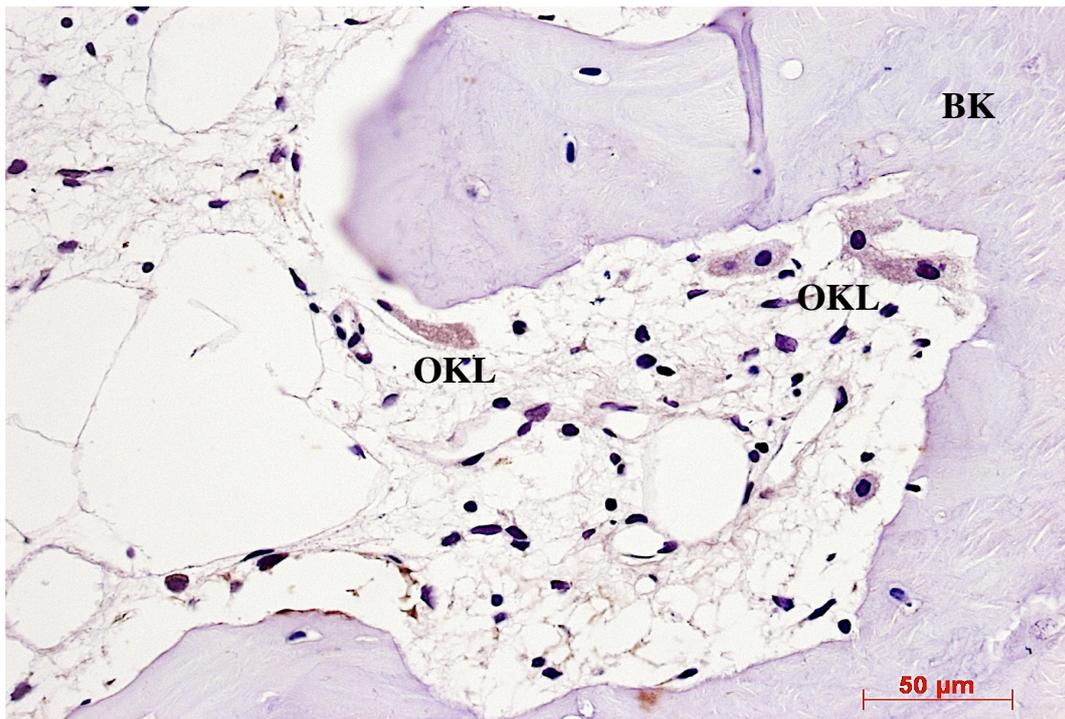


Abb. 15: Gesunder, spongiöser Knochen mit großen Runx2-positiven Osteoklasten (OKL) am Knochensaum. Im Knochenstrahl ist ein Bereich Bündelknochens (BK) zu erkennen. (Originalvergrößerung x40) Färbung: Runx2, Präparatnr.: 2100

3.4.5 RankL

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Alle Präparate der Gruppe 1 waren einheitlich stark gefärbt. Alle Präparate zeigten eine starke Reaktion in allen Lining cells und Osteoblasten. Weniger intensiv angefärbt waren Osteoklasten. Fibroblasten im umgebenden Weichgewebe waren auch stets RankL-positiv. Gefäßwände reagierten nur in 3 von 9 Fällen (1964, 2061, 2317), die Endothelzellen gar nicht. In 6 von 9 Präparaten (1894, 1964, 1965, 2103, 2317, 2341) waren etwa 1/3 die Osteozyten angefärbt (Abb. 16). Insgesamt fiel die Reaktion stärker aus, als bei Gruppe 2.

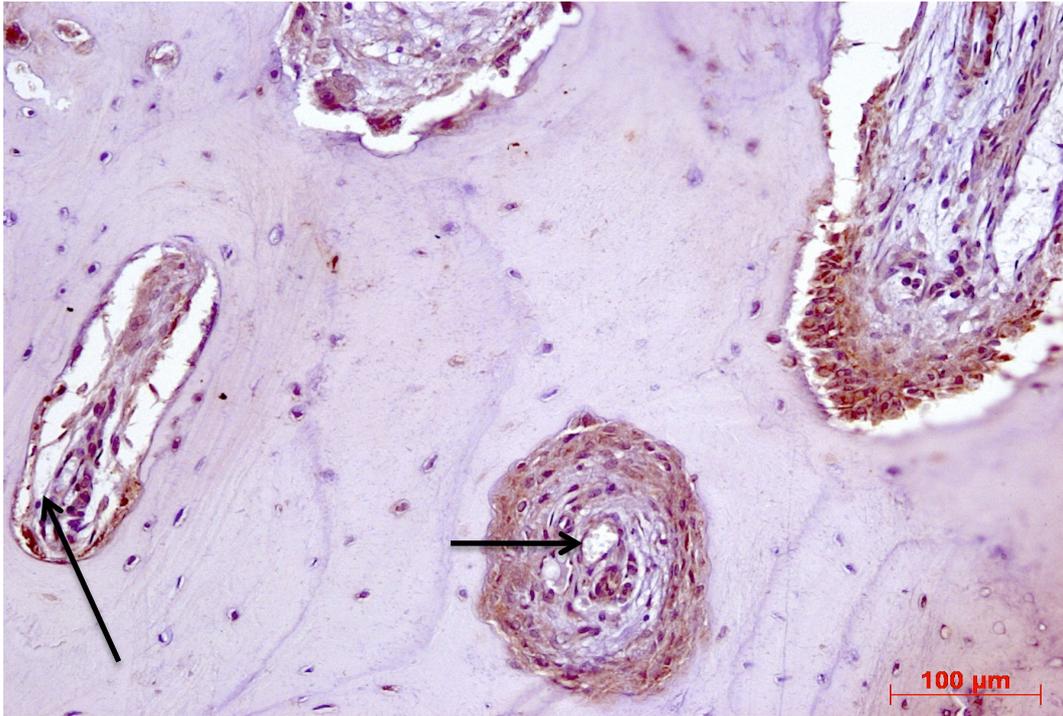


Abb. 16: Spongiöser Knochen von Patienten unter BP-Medikation ohne Kieferknochennekrose. Lining cells und Osteoblasten am Kochensaum wurden stark angefärbt. Auch die Gefäßwände (Pfeile) in diesem Präparat zeigten mittelstarke Reaktion. (Originalvergrößerung x20) Färbung: RankL, Präparatnr.: 1964

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Es wurden die gleichen Strukturen angefärbt wie bei Gruppe 1 ohne aufgetretene Nekrosen, jedoch waren hier in allen Präparaten ca. 1/3 der Osteozyten und in den Gefäßwänden positive Reaktionen zu sehen. Zusätzlich waren die Lymphozyten angefärbt. Etwas geringer als in den anderen Präparaten fiel die Reaktion bei 1901, 2062 und 2350 aus.

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Die Reaktion fiel insgesamt sehr schwach aus. In den Präparaten 2100 und 2159 waren Reaktionen in allen Lining cells und Osteoblasten zu beobachten, jedoch nicht so intensiv wie bei den Patienten unter BP-Behandlung.

3.4.6 OPG

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

In den Präparaten waren die Lining cells und Osteoblasten einiger Areale stark gefärbt. Im Zytoplasma der Osteoblasten fanden sich stark gefärbte Granula. Einige Osteoklasten waren im selben Präparat schwach gefärbt, andere waren OPG-negativ. Das Gleiche galt für Gefäßwände. Fibroblasten wurden nur manchmal angefärbt, Kollagenfasern nie (Abb. 17). Insgesamt schwach gefärbt waren die Präparate: 1896, 2061, 2341, 2343; hier wurden einige Lining cells, Osteoblasten und Zellnester aus Fibroblasten angefärbt. In allen Präparaten waren einige Osteozyten mittelstark angefärbt. Es fanden sich in jedem Präparat Knochenareale, wo gar keine Zellen angefärbt worden sind.

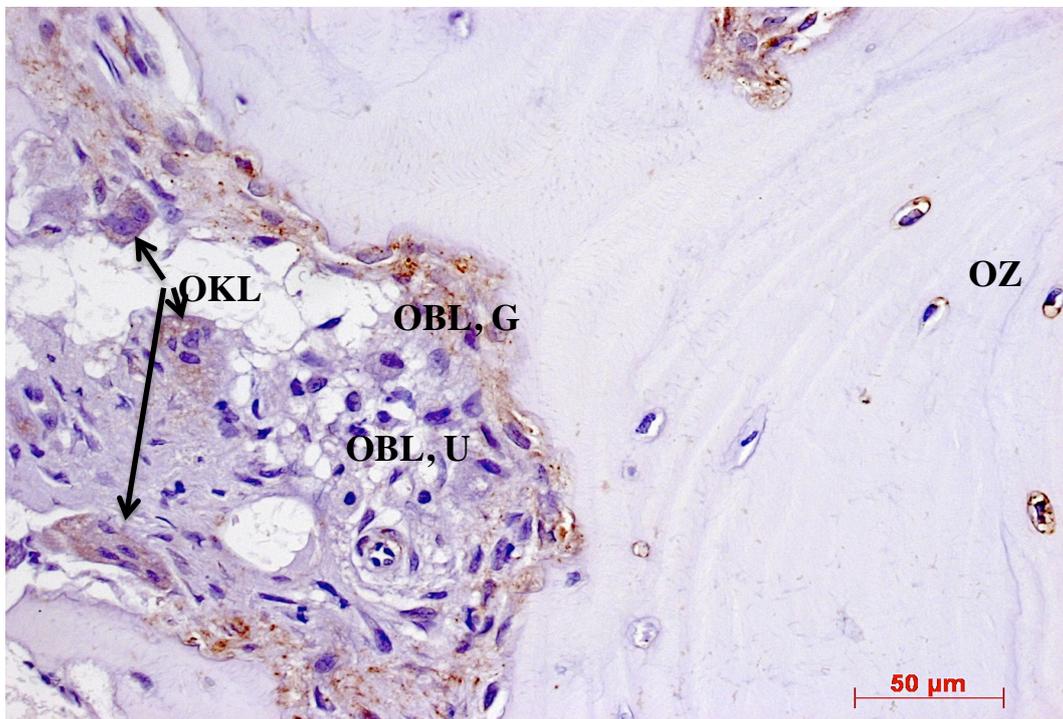


Abb. 17: Spongiöser Knochen von Patienten unter BP-Medikation ohne Kieferknochennekrose. Nur die Osteoblasten (OBL, gefärbt) und Lining cells unmittelbar am Knochenrand wurden gefärbt. Osteoblasten (OBL, ungefärbt) im Spongiosarum und Fibroblasten bleiben ungefärbt. Osteoklasten (OKL) mittelstark gefärbt. Die Osteozyten (OZ) am rechten Bildrand wurden mittelstark gefärbt. (Originalvergrößerung x40) Färbung: OPG, Präparatnr.: 1964

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Auch hier wurden Osteoblasten, Lining cells, Osteozyten und Osteoklasten schwach angefärbt, die Reaktion war insgesamt schwächer als in Gruppe 1. Besonders schwach war die Reaktion in den Präparaten 1895, 1900, 1901, 2350. Am stärksten fiel die Reaktion in den Präparaten 2345 und 2352 aus.

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Das Präparat (2097) zeigte keine Reaktion, ein anderes nur eine mittelstarke Reaktion (2100). Alle Osteoblasten und Fibroblasten zeigten eine Färbung des Zytoplasmas und der Kollagenfasern. Osteozyten, Endothelzellen und Osteoklasten reagierten negativ.

3.4.7 Rank

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Die Reaktion erfolgte in allen Präparaten stark, noch stärker als bei RankL und war nicht auf die Zellen am Knochensaum begrenzt. Endothelzellen und Gefäßwände wurden schwach angefärbt, das Zytoplasma der Lining cells und Osteoblasten hingegen stark, wobei das Zytoplasma einiger Osteoklasten nicht reagierte. Osteozyten und Osteoid waren nicht angefärbt, der Knochen wurde jedoch leicht angefärbt.

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Lining cells wurden stark angefärbt, bei diesen fanden sich stark gefärbte Granula im Zytoplasma oder um die Zellen herum. Osteoklasten waren stark angefärbt, einige Osteoklasten haben jedoch nicht auf Rank reagiert. In den Resorptionslakunen lag eine starke Färbung vor. Endothelzellen wurden stark angefärbt. Osteozyten zeigten keine Reaktion (Abb. 18).

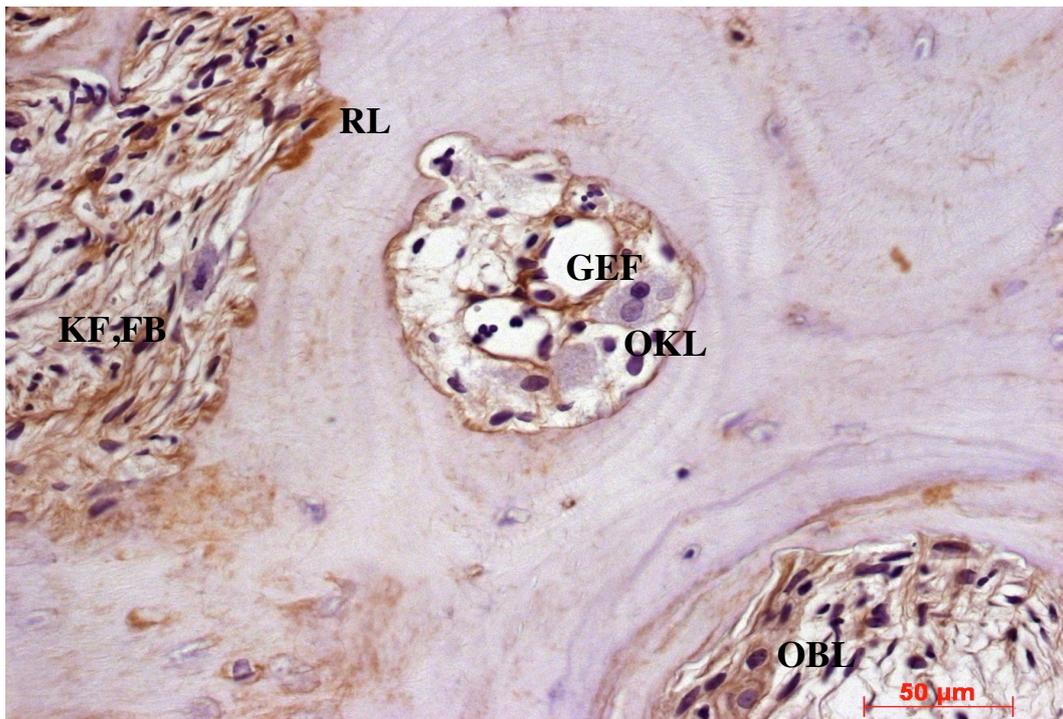


Abb. 18: Knochen von Patienten unter BP-Therapie mit Kieferknochennekrose. Kollagenfasern (KF) und Fibroblasten (FB) wurden stark angefärbt. In der flachen Resorptionslakune (RL) erkannte man eine besonders starke Reaktion. Gefäßwände (GEF) und Osteoblasten (OBL) haben stark reagiert; ungefärbte Osteoklasten (OKL). (Originalvergrößerung x40) Färbung: Rank, Präparatnr.: 2345

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Die Färbung erfolgte gleichmäßig stark, Kollagenfasern und Fibroblasten reagierten leicht positiv. Die Knochensubstanz reagierte fokal schwach bis stark positiv. Lining cells und Osteoblasten wurden stark angefärbt, Osteoklasten jedoch nicht.

3.4.8 ED1

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Auch hier wurden ausschließlich resorbierende Zellen wie Osteoklasten und Makrophagen angefärbt. Ihre Anzahl war sehr viel größer, als bei den Präparaten des gesunden Knochens. Das Präparat 2103 zeigte keine Reaktion. Die angefärbten Zellen zeigten innerhalb des Zelleibs unterschiedlich dicht gepackte Granula. In Knochennähe waren die Zellen dunkler gefärbt.

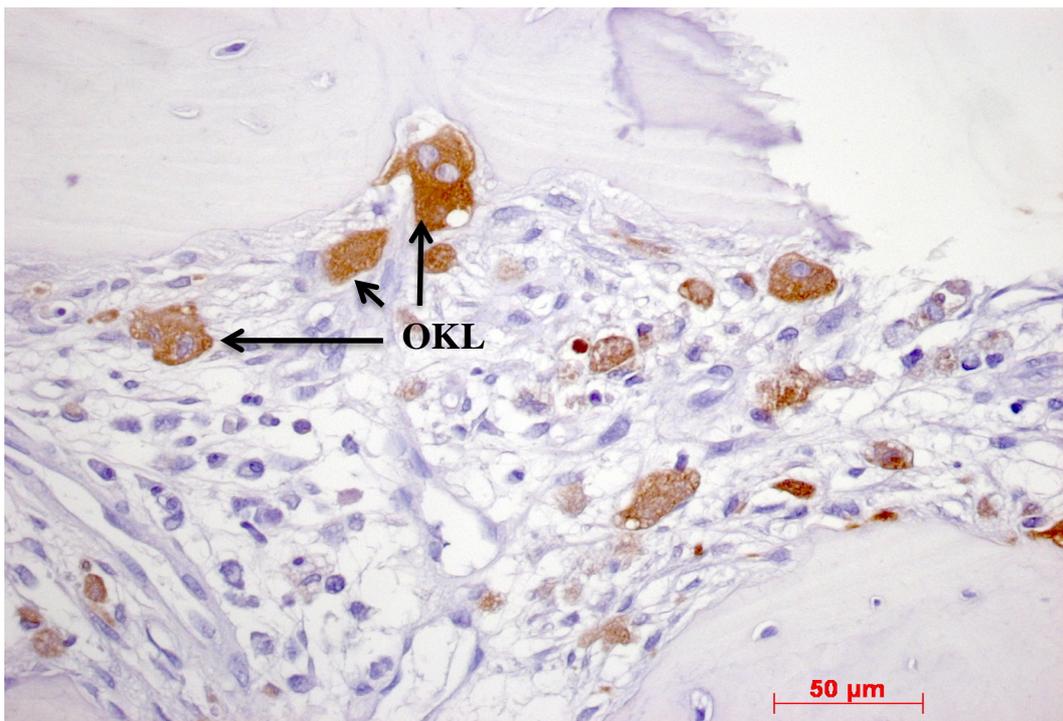


Abb. 19: Knochen von Patienten unter BP-Therapie mit Kieferknochennekrose. Die resorbierenden Zellen liegen zum größten Teil im Bindegewebe fernab vom Knochen. (Originalvergrößerung x40) Färbung: ED1, Präparatnr.: 1901

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Auch hier wurden ausschließlich resorbierende Zellen wie Osteoklasten und Makrophagen angefärbt. Die jeweiligen Zellen waren genauso stark angefärbt, wie in den anderen Gruppen. In

den Präparaten 1901 und 2352 fanden sich sehr viele Zellen mit granulärer Färbung im Zelleib. Evtl. könnte es sich dabei um Phagolysosomen handeln; das sind Zellen, die resorbierte Substanzen zerlegen und speichern können. Jedoch zeigten die Präparate 2062 und 2360 keine Färbung, da keine resorbierenden Zellen vorhanden waren. Im Präparat 2350 fanden sich einige Osteoklasten, die eine kaum merkliche Anfärbung vorwiesen. Die 4 restlichen Präparate zeigten eine der Gruppe 1 vergleichbare Anzahl von resorbierenden Zellen (Abb. 19).

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Es reagieren ausschließlich und sehr intensiv Osteoklasten und Makrophagen auf ED1. Pro Präparat lagen jedoch nicht viele gefärbte Zellen vor. Es waren keine ungefärbten Osteoklasten zu finden (Abb. 20).

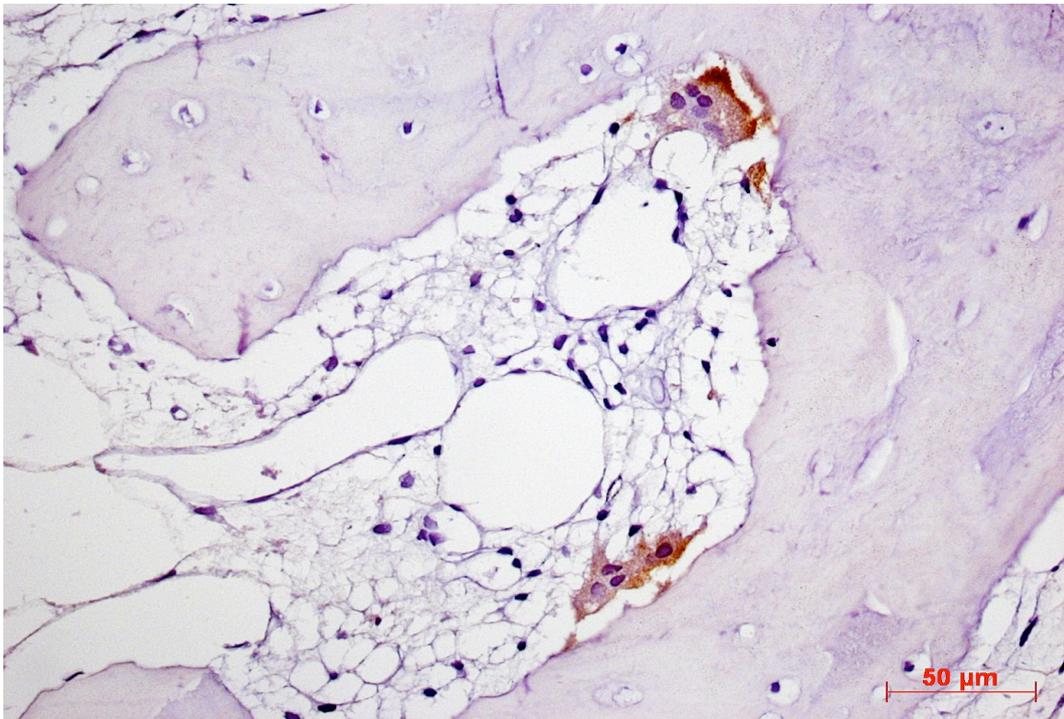


Abb. 20: Gesunder, spongiöser Knochen mit zwei braun gefärbten Osteoklasten. Der Spalt zwischen Knochen und Osteoklasten ist artifiziell. (Originalvergrößerung x40) Färbung: ED1, Präparatnr.: 2100

3.4.9 Cathepsin K

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Cathepsin K reagierte stark in den Osteoklasten aller Präparate aus dieser Gruppe. Auch Osteoblasten, Osteozyten und Lining cells am Knochensaum waren schwach gefärbt, jedoch wurden die Osteoklasten viel stärker angefärbt (Abb. 21).

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Die Zelleiber der Osteoklasten zeigten eine gleichmäßige Färbung, aber auch die Kollagenfasern waren generell angefärbt und zwar deutlich stärker, als bei Gruppe 1. Auch Granulozyten und Lymphozyten zeigten Reaktion auf Cathepsin K.

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Man erkannte eine schwache Reaktion in den Osteoklasten, hier lagen feine Granula in der Resorptionslakune auf der dem Knochen zugewandten Seite der Osteoklasten. Manche Gewäßwände haben ebenfalls positiv auf Cathepsin K reagiert. Lining cells, Osteoblasten und Fibroblasten im Spongiosaraum waren unterschiedlich stark angefärbt.

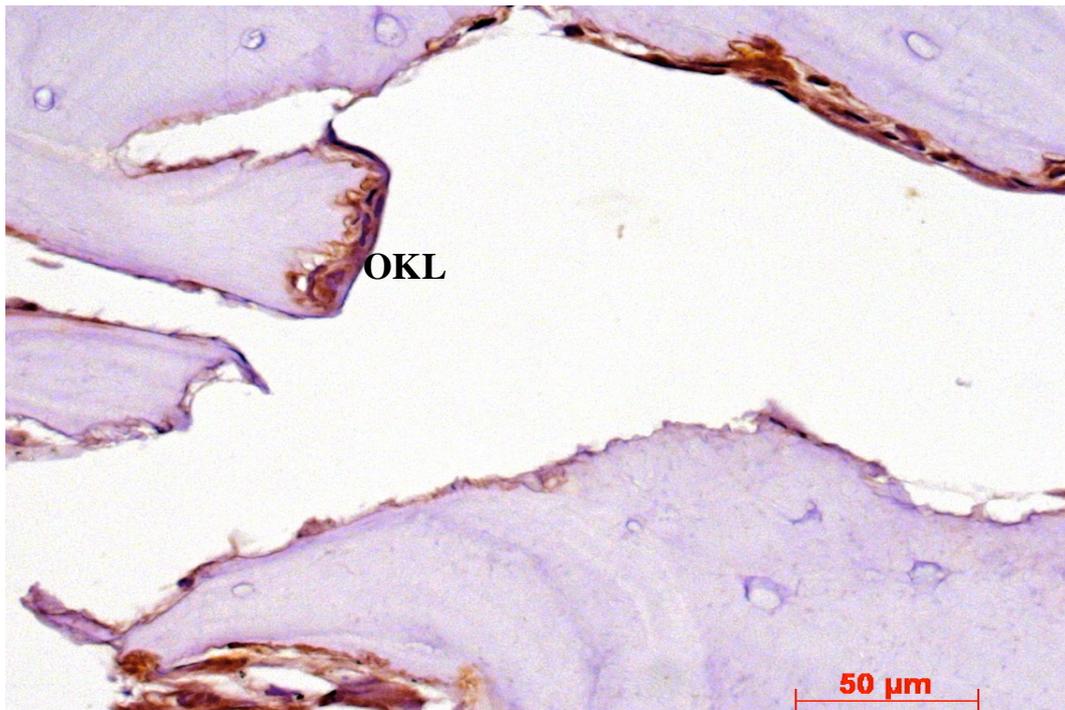


Abb. 21: Spongiöser Knochen von Patienten unter BP-Medikation ohne Kieferknochennekrose. Osteoklasten (OKL) sezernierten Cathepsin K in ihre Resorptionslakunen. (Originalvergrößerung x40) Färbung: Cathepsin K, Präparatnr.: 2343

3.4.10 Interleukin 1 β

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Hier haben die Lining cells, Osteoblasten und Gefäßwände mittelstark positiv reagiert. Osteoklasten wurden stärker angefärbt als Osteoblasten. Fibroblasten reagierten selten positiv. Osteozyten waren IL1 β -negativ auf den IL1 β -Antikörper (Abb. 22).

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Die Reaktion fiel genauso aus wie bei der Gruppe der Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose.

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Manche Präparate zeigten nur sehr wenig und schwache Reaktionen in Fibroblasten und Kollagenfasern. Andere Präparate zeigten in diesen Zellen jedoch eine sehr starke Reaktion, ebenso in den Lining cells, Osteoblasten, Gefäßwänden sowie Endothelzellen.

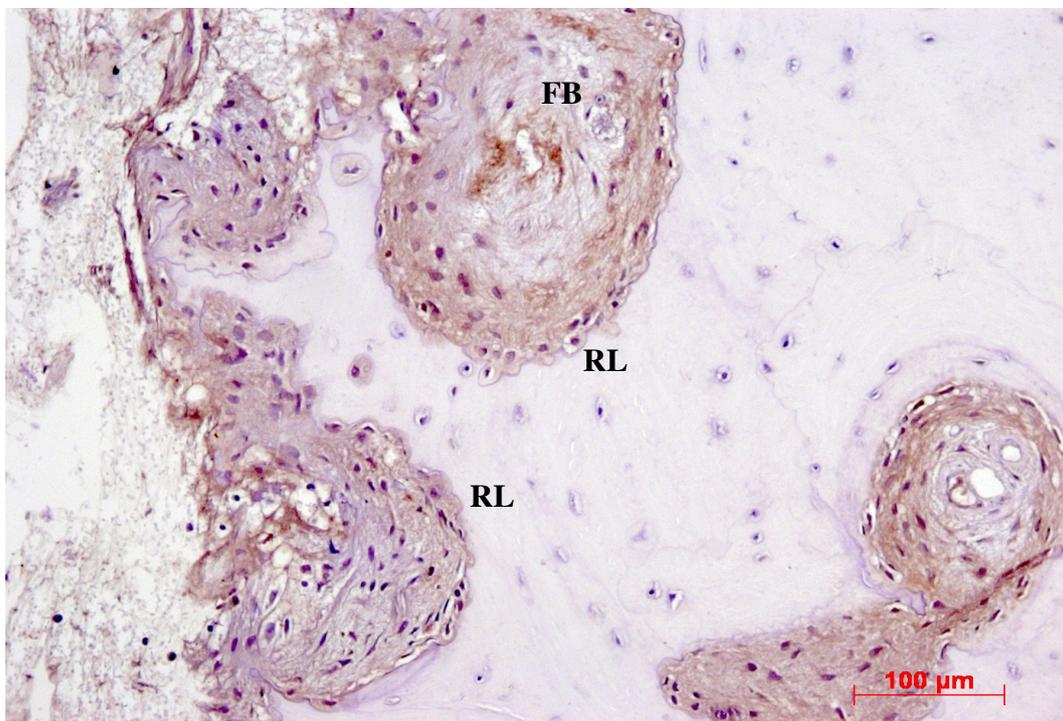


Abb. 22: Spongioser Knochen von Patienten unter BP-Medikation ohne Kieferknochennekrose. IL1 β -positive Zellen wurden braun gefärbt. Viele flache Resorptionslakunen (RL), mit stärker gefärbten Zellen. Fibroblasten (FB) wurden schwach gefärbt. (Originalvergrößerung x20) Färbung: IL1 β , Präparatnr.: 1894

3.4.11 TNF α

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Lining cells und Osteoblasten sowie die Gefäßwände reagierten im Zelleib positiv, die Osteoklasten jedoch nicht. Der stärker gefärbte Saumzellrand erschien recht breit. Weiter vom Knochenrand entfernte Osteoblasten, erschienen stark positiv. Einige Osteozyten zeigten ebenfalls Reaktionen. Die Reaktion auf TNF α fiel hier viel stärker aus, als in Gruppe 3, die einzelnen Zellen waren deutlich kräftiger angefärbt und der stark gefärbte Saum am Knochenrand aus Osteoblasten und lining cells war viel breiter. Fibroblasten reagierten positiv, jedoch zarter als die Lining cells und Osteoblasten (Abb. 23).

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Die Verteilung der Färbung erschien in den Zellpopulationen wie oben beschrieben. Lymphozyten und Granulozyten zeigten keine Reaktion. Die Reaktion war ebenfalls sehr stark, jedoch nicht so ubiquitär wie in der Gruppe der Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1). In dieser Gruppe fanden sich viele ungefärbte Areale neben stark gefärbten Arealen.

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Insgesamt erfolgte die Reaktion deutlich schwächer als bei den Gruppen 1 und 2. Einige Lining-cell-Nester und Osteoblasten sowie die Gefäßwände reagierten im Zytoplasma positiv, die Osteoklasten jedoch nicht. Der stärker gefärbte Saumzellrand erschien sehr schmal. Weiter vom Knochenrand entfernte Osteoblasten, Chondroblasten und deren Vorläuferzellen reagierten nur sehr schwach positiv. Einige Osteozyten zeigten ebenfalls Reaktionen. Entzündungszellen waren nicht zu entdecken. Insgesamt kann die Reaktion als mittelstark eingeordnet werden.

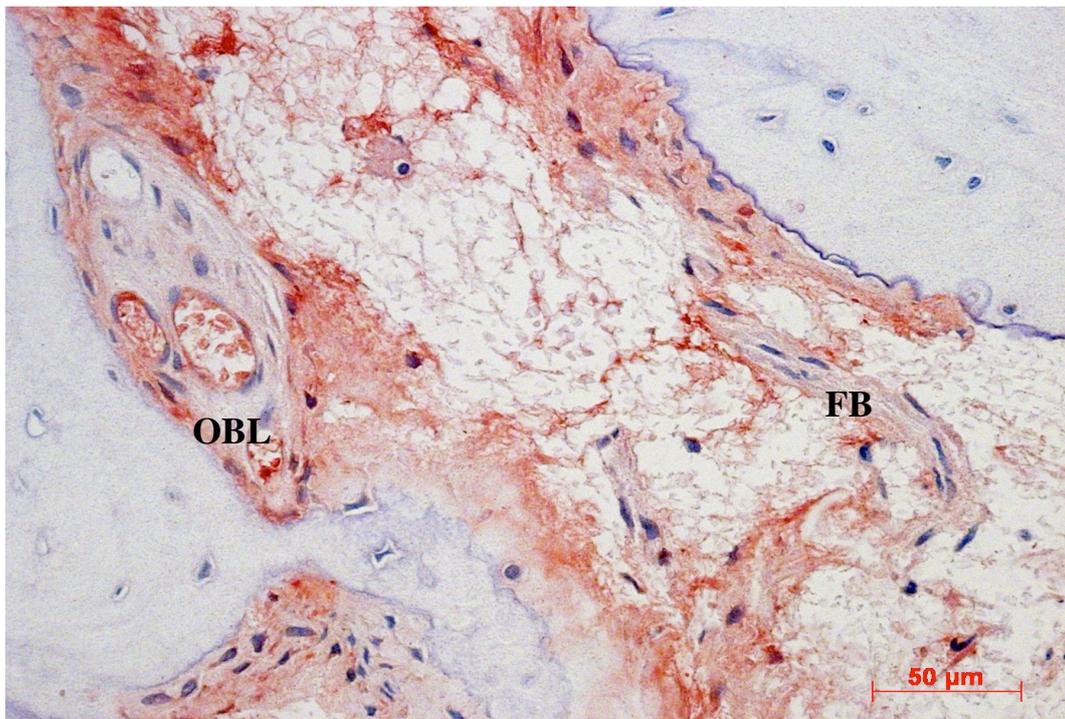


Abb. 23: Knochen eines Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose. Osteoblasten (OBL) am Knochensaum wurden im Zelleib besonders intensiv angefärbt, Fibroblasten (FB) hingegen weniger. (Originalvergrößerung: x40) Färbung: $\text{TNF}\alpha$, Präparatnr. :1896

3.4.12 MMP8

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Die Osteoklasten zeigten durchgehend eine schwache Färbung im Zytoplasma, auch vorhandene Granulozyten wurden leicht angefärbt. Endothelzellen und einige Lining cells reagierten mittelstark und auch einige Kollagenfasern. Es lagen ungefärbte Areale im Knochen vor.

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Die Ergebnisse waren mit denen der Gruppe der Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1) identisch, außer dass die Gefäßwände immer mitreagierten (Abb. 24). Das Präparat 1895 wies keine Reaktion auf.

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Besonders stark reagierten die Gefäßwände. Ebenfalls angefärbt waren Osteozyten, Lining cells, Osteoblasten, Fibroblasten und Kollagenfasern. Die Färbung war mittelstark.

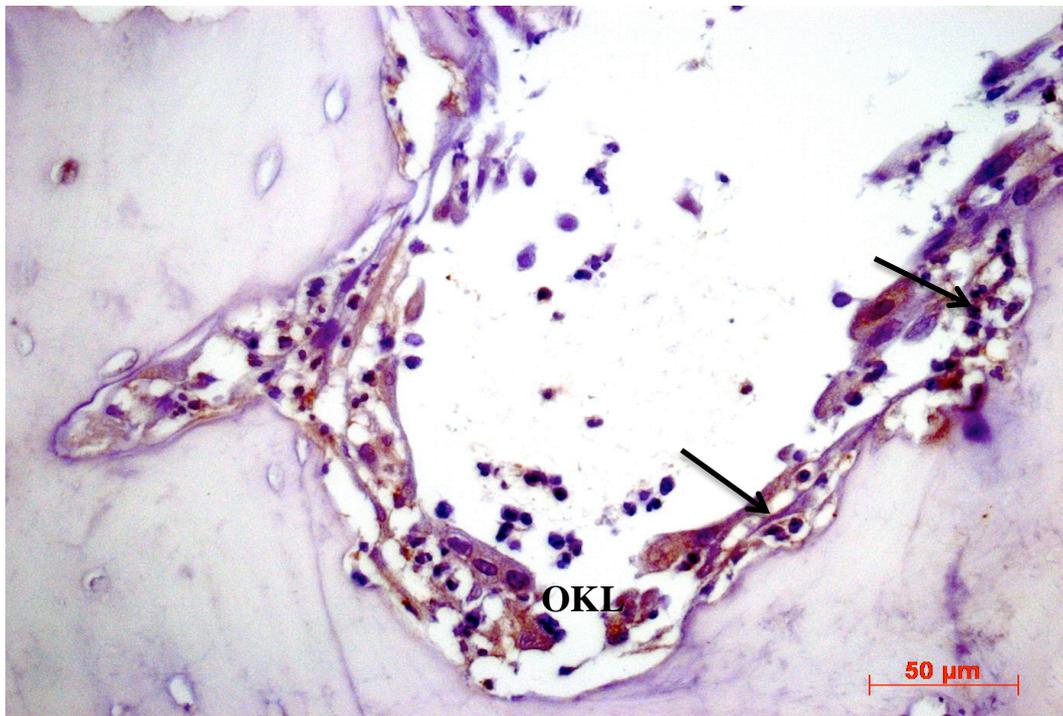


Abb. 24: Spongioser Knochen von Patienten unter BP-Medikation mit Kieferknochennekrose. Immunreaktion gegen MMP8 in Osteoklasten (OKL), einigen Lining cells und Granulozyten (Pfeile) (Originalvergrößerung: x40) Färbung: MMP8, Präparatnr.: 1900

3.4.13 VEGF

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

VEGF tauchte hauptsächlich in Osteoblasten und Gefäßwänden auf, Osteoklasten wurden vereinzelt angefärbt. In den meisten Präparaten fiel die Reaktion sehr schwach aus, so reagierten in den meisten Proben nur die dem Knochen unmittelbar aufgelagerten Osteoblasten und Lining cells und nicht immer alle Endothelzellen. Lymphozyten und Granulozyten zeigten stets eine positive Reaktion. Die Anfärbung ist insgesamt als schwach bis mittelstark zu bewerten (Abb. 25).



Abb. 25: Knochen ohne Kieferknochennekrose von Patienten unter BP-Therapie, VEGF-positive Zellen wurden braun gefärbt. Man sieht den sehr dünnen, gefärbten Lining-cell-Rand und Gefäße; Osteoklasten wurden nicht angefärbt (OKL). (Originalvergrößerung x20) Färbung: VEGF, Präparatnr.: 1964

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Die Reaktion in dieser Gruppe fiel zwischen den Präparaten recht unterschiedlich aus: Die ersten 4 Präparate reagierten sehr schwach (1895, 1900, 1901, 2062). Es waren jeweils nur vereinzelte Zellen pro Präparat folgender Zellpopulationen angefärbt: Osteoblasten nah zum Knochenaum, Osteoklasten, Granulozyten sowie Lymphozyten und Endothelzellen. Die Präparate 2345, 2350, 2352, 2360 und 2363 zeigten eine starke Reaktion in diesen Zellen.

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Dieses Protein tritt im gesunden Knochen in Osteoblasten, Lining cells, Fibroblasten, Endothelzellen und Gefäßwänden auf. Man konnte eine mittelstarke Anfärbung beobachten.

2.4.14 vWF

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie ohne Kieferknochennekrose (Gruppe 1)

Alle Endothelzellen und Gefäßwände wurden besonders stark angefärbt. Lining cells und Osteoblasten zeigten eine starke Anfärbung. Im Spongiosaraum wurden zahlreiche Blutgefäße angeschnitten, die meisten von ihnen recht kleinlumig, kleinlumiger als in den Präparaten gesunden Knochens (Abb. 26).

Knochenproben von Patienten unter BP-Therapie mit aufgetretener Kieferknochennekrose (Gruppe 2)

Die Ergebnisse dieser Knochenproben entsprachen denen der vorangegangenen Gruppe (Abb. 26).

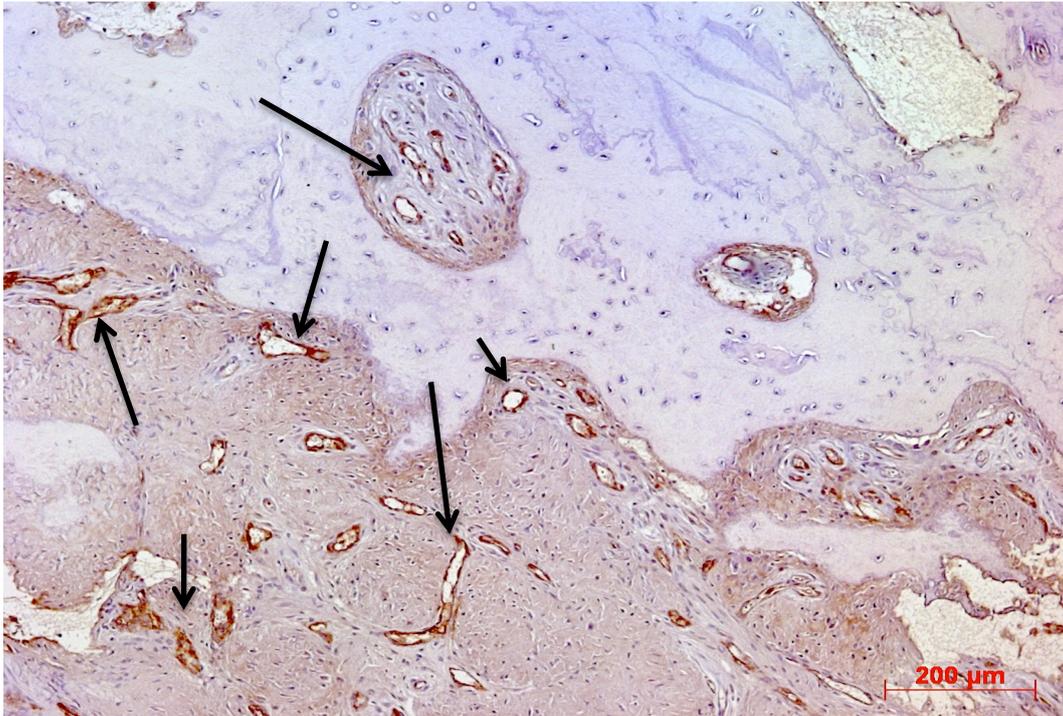


Abb. 26: Spongiöser Knochen von Patienten unter BP-Medikation ohne Kieferknochennekrose. Die Gefäßwände haben auf vWF stark positiv reagiert. Es wird deutlich, dass die Gefäßdurchmesser sehr viel geringer waren, als in den Präparaten gesunden Knochens (Pfeile). (Originalvergrößerung x10) Färbung: vWF, Präparatnr.: 1896

Knochenproben von gesunden Patienten ohne Medikation (Gruppe 3)

Alle Endothelzellen und Gefäßwände waren besonders stark angefärbt. Lining cells und Osteoblasten zeigten eine starke Anfärbung. Im Spongiosaraum waren zahlreiche Blutgefäße angeschnitten (Abb. 27), diese erschienen weitlumiger als in den Präparaten der Gruppen 1 und 2.

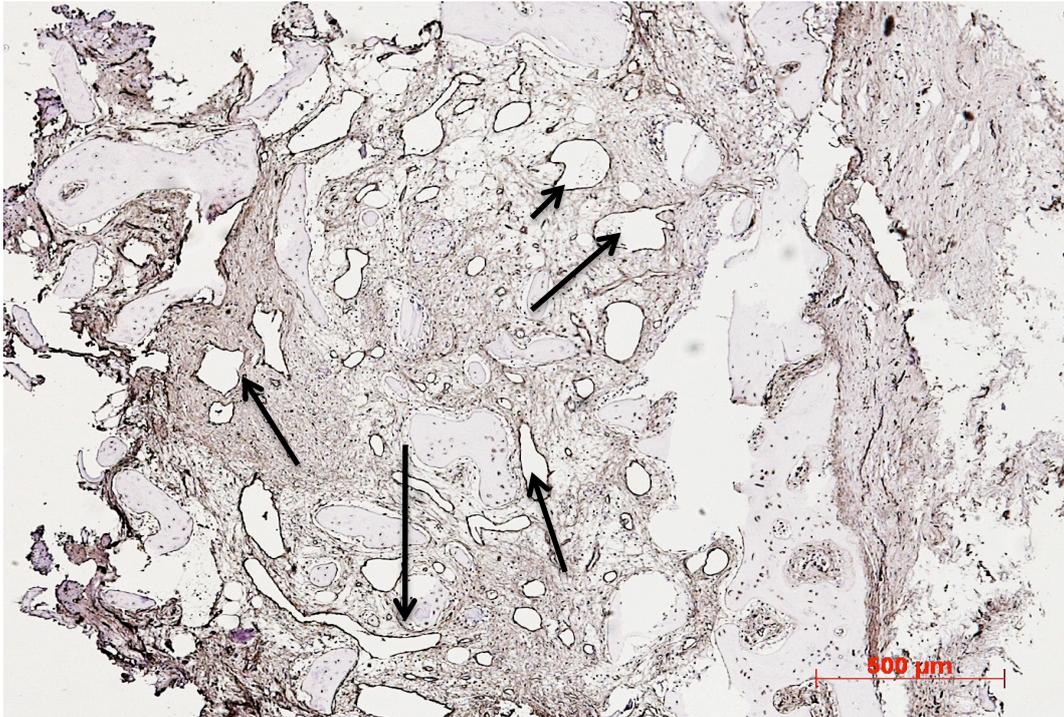


Abb. 27: Gesunder, spongiöser Knochen mit zahlreichen großen Gefäßen (Pfeile). Gefäßwände wurden dunkel braun gefärbt. (Originalvergrößerung x5) Färbung: vWF, Präparatnr.: 2076

4. Diskussion

Zum Thema der BRONJ finden sich viele Studien, Zusammenfassungen und zahllose Fallbeschreibungen. Verlauf, Folgen und verschiedene Therapiekonzepte wurden ausgiebig beschrieben und erforscht. Trotzdem konnte noch keine sichere Erklärung für die Ursache und die Auslöser der BP-bedingten Osteonekrose des Kiefers gefunden werden. Als mögliche Ursachen wurden die Genetik, der Knochenstoffwechsel, Medikamentenkinetik und Risikofaktoren, die sich aus der Anamnese der Patienten ergeben, in Betracht gezogen, ohne jedoch bislang eine eindeutige Antwort auf die Frage zu finden. In dieser Studie wurden Knochenproben zweier Patientengruppen unter BP-Therapie miteinander verglichen. Die eine entwickelte bis zum Studienzeitpunkt keine BRONJ unter BP-Therapie (Gruppe 1), die andere schon (Gruppe 2). Es wurde mit den Markern alkalische Phosphatase, Osteokalzin, Runx2, BMP-2, RankL und OPG die Osteogenese durch die Osteoblasten untersucht. Die Marker Rank, TRAP, ED1 und Cathepsin K zeigten die Menge, Lokalisation und Aktivität der Osteoklasten an, mit Hilfe der Marker IL1 β , TNF α und MMP8 wurde ein evtl. Entzündungsgrad ausgewertet und mit den Markern vWF und VEGF die Vaskularisierung der Knochenpräparate untersucht. Diese Untersuchung bietet einen Überblick über die beiden großen Gegenspieler Osteoblasten und Osteoklasten, die über multiple wechselseitige Mechanismen den Knochenumbau steuern. Gleichzeitig können Veränderungen in der Vaskularisation und dem Entzündungsgrad in Zusammenhang gesetzt und verglichen werden.

Ohe und Mitarbeiter (2011) fassen die heute maßgeblich gültigen Theorien zusammen: Die BP-Konzentration im Kiefer ist wegen seiner reichlichen Vaskularisierung und des intensiven turn-overs im Knochen besonders hoch. Andere Knochen sind neben dem Kieferknochen nicht von BRONJ betroffen. In ihrer Studie an Beagle Hunden zeigten Allen und Burr (2008), dass die Umbaurate im Kieferknochen auf ca. ein Drittel reduziert wird. Im restlichen Skelett wird sie jedoch nur um die Hälfte reduziert, womit dort noch ausreichend Potential zum Remodeling gegeben ist. Die Umbaurate des Kieferknochens ist, verglichen mit der des Beckenkamms, physiologisch bis zu 10 bis 20 mal höher (Allen und Burr, 2008; Garetto und Tricker, 1998). Also erfährt der Kieferknochen, bei höherem Umbaubedarf, eine stärkere Hemmung seines Umbaus als alle anderen Knochen. Bei einer Reduktion auf ein Drittel und weniger ist die

Aufrechterhaltung der Funktion jedoch erfahrungsgemäß schlechter. Dies ist ein Erklärungsansatz, warum sich die BRONJ auf den Kieferknochen konzentriert.

Ein weiterer Grund können Mikrofrakturen durch Kaukräfte sein, die wegen der reduzierten Knochenumbaurate nicht mehr repariert werden. Diese werden in der Mundhöhle schneller von Bakterien besiedelt und führen somit zur Nekrose. Die dünne, dem Periost direkt anliegende Barriere der Mukosa gewährt der oralen Bakterienflora durch kleine Verletzungen leichter Eintritt in solche avaskulären und zellfreien Areale, als in irgendeinem anderen Bereich des Körpers.

Es gibt zahlreiche Untersuchungen, dass BP in vitro und in vivo die Funktion ihrer Zielzellen, der Osteoklasten teilweise oder vollständig hemmen sollen. Das könnte den Abbau verletzter oder infizierter Knochenareale verhindern. Betrachtet man histologische Aufnahmen von Patienten unter BP-Therapie, so fallen verstreute Areale mit leeren Osteozytenlakunen auf, also Anzeichen einer Nekrose. Dies könnte auch auf einen negativen Einfluss der BP auf Osteozyten hinweisen, welcher in sofern gravierend ist, als dass diese Zellen für die Vitalität und Regeneration, sowie die hormonelle Steuerung von Osteoklasten und Osteoblasten eine entscheidende Rolle spielen. Somit könnten auch andere Zellpopulationen ihren Beitrag zu einer BRONJ leisten. Unklar ist jedoch, wie diese toten Areale zu einer klinisch auffälligen BRONJ führen. Allen und Burr (2008) wenden zu recht ein, dass das Absterben eines Knochenareals ein natürlicher Vorgang ist, welcher womöglich lediglich wegen der antiresorptiven Therapie von den Osteoklasten nicht abgeräumt werden kann.

Untersuchungen an Patienten mit autosomal dominanter Osteopetrose (ADO) und dadurch stark eingeschränkter Osteoklastenaktivität zeigten, dass sie in 13 % der Fälle dem Erscheinungsbild der BRONJ ähnliche Symptome entwickelten (Barry et al., 2007; Johnston et al., 1968). Gleichermaßen beobachteten Bathi und Masur (2000) und Dimitrakopoulos und Mitarbeiter (2007) diese Symptome bei Patienten mit Pyknodysostosis. Bei dieser Krankheit ist die Funktion der Osteoklasten ebenfalls stark reduziert. Weiterhin belegen verschiedene Studien, dass bei Patienten die unter BRONJ leiden, nach einer Behandlung mit osteoklastenstimulierenden Medikamenten eine Ausheilung verzeichnet werden konnte (Harper und Fung, 2007; Lau et al.,

2009; Wang et al., 2007). Am ehesten also ist die Entstehung der BRONJ mit der Osteoklastenhemmung verbunden.

Als weitere Ursache für die nicht stattfindende Ausheilung von Knochenläsionen, bzw. für das spontane Auftreten von nekrotischen Arealen, wird die Hemmung der Angiogenese angesehen. In *in vitro* Versuchen zeigten BP bei systemischer Gabe im Mausmodell antiangiogene Wirkung. Dies kann evtl. durch die Herunterregulierung von 67kD-Laminin-Rezeptoren und $\alpha\beta 3$ - und $\alpha\beta 5$ -Integrinen hervorgerufen werden, die die Anhaftung der einwandernden Endothelzellen an den Bindegewebszellen vermitteln. Dies wird bereits in der Tumorthherapie genutzt, wodurch die bei Tumoren gesteigerte Integrinproduktion gehemmt wird (Soltau et al., 2003). Weiter konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass bei Tieren mit Knochentumoren, die systemisch mit Zoledronat behandelt wurden, eine antiangiogene Wirkung einsetzte (Croucher et al., 2002) und durch Pamidronat eine beachtliche Verringerung von VEGF im Serum beobachtet werden konnte (Santini et al., 2002). 2003 fanden Santini und Mitarbeiter heraus, dass nach einer einzigen Dosis Zoledronat der VEGF Spiegel im Serum von Tumorpatienten bereits stark absank und damit die Angiogenese deutlich reduziert wurde. Dies untermauerten sie mit einer Studie vom Jahr 2006 (Santini et al., 2006) mit gleichem Versuchsaufbau, in der sie feststellten, dass der VEGF-Spiegel vom 2. bis zum 21. Tag der Studie absank. Die Ursache hierfür ist jedoch nicht geklärt. Dies kann im ansonsten stark durchbluteten Kieferknochen zu ischämischen Nekrosen führen. Landesberg und Mitarbeiter (2008) wenden jedoch ein, dass die meisten Versuche zu dieser Hypothese *in vitro* oder im Tierversuch durchgeführt wurden. Die Studie von Santini und Mitarbeitern (2002) ist eine Ausnahme. Evtl. liegt ein Zusammenhang zwischen Vakularisierung und dem Knochenumbau vor, der noch untersucht werden muss.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde versucht, an Hand der Untersuchungsergebnisse und der aktuellen Literatur Argumente für oder wider diese Theorien zu finden, sowie Zusammenhänge zwischen morphologischen und immunhistochemischen Erkenntnissen herzustellen.

4.1 Anamnese

Risikofaktoren scheinen eine wichtige Rolle zu spielen, jedoch finden sich zu diesem Thema sehr widersprüchliche Studien. Gliklich (2009) listet systematisch die am häufigsten aufgeführten Risikofaktoren auf: Soziodemographische Charakteristika wie Alter, Geschlecht, Ethnie, oder sozialer Status, desweiteren Komorbiditäten wie Krebs, Osteoporose und Diabetes, Comediaktion mit Kortikosteroiden oder Immuntherapie und schließlich der Umgang mit der Gesundheit: Nikotin-, oder Alkoholabusus, schlechte Ernährung und schlechte Mundhygiene, sowie andere Vorkommnisse wie Zahnbehandlungen und Traumata. Allen und Burr (2008) sind der Meinung, dass all diese keine bedeutende Rolle spielen, sondern nur durch Interaktion mit den BP zu einer Nekrose führen, also allein, ohne Bisphosphonatmedikation, keine Nekrosen im Kiefer hervorrufen können. Wie nachfolgend aufgeführt zeigen viele Studien, dass eine Häufung von Risikofaktoren in einem Patienten mit höherer Wahrscheinlichkeit zu einer BRONJ führen kann. Hinzu kommt das natürliche Risiko einer Spontannekrose. Black und Mitarbeiter (2009) belegten, dass sich bei ca. 0,026 % der Patienten eine spontane Osteonekrose ohne BP-Medikation im Kiefer entwickelt.

4.1.1 Geschlecht

In der Gruppe der Patienten unter BP-Behandlung ohne Nekrose (Gruppe 1) waren 2 von 8 Patienten (12,5 %) Frauen, in der Gruppe der BRONJ waren es 5 von 9 (55 %). Diese Zahlen stimmen mit den bei der Literaturrecherche gefundenen Zahlen überein. Frauen sind immer stärker betroffen als Männer. In einer Studie aus Belgien waren von 34 Patienten 68 % weiblich und 32 % männlich (Saussez et al., 2009). Eine Studie aus den USA (Thumbigere-Math et al., 2009) untersuchte 26 Patienten die unter BRONJ litten, wovon 65 % weibliche und 35 % männliche Teilnehmer waren. In der Studie von Stanton und Balasarian (2009) waren von 33 Patienten 72 % weiblich. Die Gruppen der hier vorliegenden eigenen Studie waren sehr klein, daher ist die Aussagekraft von Prozentangaben wenig hilfreich. Man kann jedoch von einer Tendenz sprechen, dass Frauen häufiger von einer BRONJ betroffen sind in Übereinstimmung mit der Literatur.

4.1.2 Alter

Das Durchschnittsalter der Patienten der ersten Gruppe betrug 66 Jahre, in der zweiten Gruppe 68 Jahre. In den oben aufgeführten Studien (Saussez et al., 2009; Stanton und Balasanian, 2009; Thumbigere-Math et al., 2009) liegt das Durchschnittsalter der unter einer BRONJ leidenden Patienten zwischen 62 und 66 Jahren. Die meisten Patienten, die an Krebs oder metabolischen Knochenerkrankungen leiden, befinden sich in dieser Altersgruppe, siehe auch Boonyapakorn und Mitarbeiter (2007), Kahamaisi und Mitarbeiter (2007), oder Stanton und Balasanian (2009). Die Durchblutung, Zellregeneration und Abwehr ist in diesem Alter reduziert. Daher sind diese Zahlen keineswegs überraschend.

4.1.3 Kiefer

Der Unterkiefer war mit 67 % in dieser Studie häufiger betroffen als der Oberkiefer (33 %). Dies korreliert ebenfalls mit den Angaben in der Literatur, Schubert und Mitarbeiter (2011) untersuchten 100 Patienten, von denen 70 % eine Nekrose im Unterkiefer vorwiesen. In der Studie von Thumbigere-Math und Mitarbeiter (2009) lagen 84 % aller Nekrosen in der Mandibula vor. In der Studie von Stanton und Balasanian (2009) hatten 75 % der Patienten die Nekrose im Unterkiefer, siehe auch Badros und Mitarbeiter (2004), Boonyapakorn und Mitarbeiter (2007), oder Kahamaisi und Mitarbeiter (2007). Der Unterkiefer enthält einen größeren Anteil an Kompakta und ist weniger vaskularisiert. Wenn die Vaskularisation durch BP auch noch kompromittiert wird, so ist der Unterkiefer stärker davon betroffen als der Oberkiefer.

4.1.4 Extraktionen

Der Zusammenhang zwischen Zahnextraktionen unter BP-Therapie und der Entwicklung einer BRONJ ist unbestritten (Ruggiero, 2011; Vescovi et al., 2012). 60-80 % aller BRONJs erfolgen nach Zahnextraktion, der Rest jedoch spontan (Otto et al., 2011; Vescovi et al., 2012). Bei einer spontanen Nekrose spielen wahrscheinlich die anderen Risikofaktoren eine Rolle. Es sollten nur im extremen Ausnahmefall Extraktionen während der Therapie vorgenommen werden. Kleinere

Operationen, z.B. an der Schleimhaut scheinen jedoch unproblematisch zu sein, ebenso jede Art konservativer Zahnbehandlungen (Assael, 2009). Andere Autoren plädieren für eine strenge Unterlassung von Extraktionen oder kleineren Operationen wie z.B. auch Implantatinsertionen (Abathi et al., 2012; Otto et al., 2011). Bei der vorliegenden Untersuchung fällt auf, dass allen in der Gruppe der Patienten unter BP ohne BRONJ ein Zahn extrahiert wurde, ohne dass sich eine Nekrose entwickelte. Also führt bei weitem nicht jede Zahnextraktion zu einer Nekrose. Die Schwere des Eingriffs, eine dichte spannungsfreie Wunddeckung und engmaschige Nachsorge spielen sicher eine Rolle. Außerdem sind natürlich die persönlichen Risikofaktoren der einzelnen Patienten zu berücksichtigen.

4.1.5 Wirkstoffgruppe und Administration

Eine besonders große Rolle spielt auch die Art des Medikaments. Alle Patienten der 2. Gruppe erhielten i.v. Zometa[®] (Zoledronat), in der 1. Gruppe nur 3 (37 %) von 8 Patienten. Zoledronat ist das wirksamste Amino-BP mit der höchsten Knochenaffinität (Schubert et al., 2011) und den meisten registrierten Fällen von BRONJ. Thumbigere-Math und Mitarbeiter (2009) untersuchten 26 Patienten die eine BRONJ erlitten hatten, von denen 20 mit Zoledronat allein oder in Kombination behandelt wurden. Von 94 Patienten mit nachgewiesener BRONJ in der Studie von Ferlitoa und Mitarbeiter (2011) wurden 72 mit Zoledronat behandelt. Stanton und Balasanian (2009) behandelten 33 Patienten mit BRONJ, von denen 26 Zoledronat i. v. und 3 Zoledronat und Pamidronat in Kombination erhielten. Viele andere Studien kommen zum gleichen Ergebnis (u.a. Boonyapakorn et al., 2007; Urade et al., 2011).

Je höher die Knochenaffinität und Wirksamkeit eines BP ist, desto höher ist die Gefahr einer BRONJ. Deswegen tritt eine BRONJ eher bei Tumorpatienten auf, die hochdosiert i.v. mit hochwirksamen BP wie Pamidronat und Zoledronat behandelt werden (Mavrokokki et al., 2007). Die Einnahme von Zoledronat birgt also ein erhöhtes Risiko, eine BRONJ zu entwickeln. Orale BP führen sehr viel seltener zu Nebenwirkungen. Sie werden in viel geringeren Dosen verabreicht. Bei oraler Einnahme des Medikaments gelangt nur 1 % der Wirkstoffmenge letztendlich ins Blut, sodass sich nur sehr geringe Mengen im Kieferknochen akkumulieren. Die Patienten, die orale BP erhalten, sind für gewöhnlich abgesehen von einer Osteoporoseerkrankung

weitestgehend gesund. Sie erhalten die BP präventiv, ohne unter Tumoren, Metastasen, Nebenerkrankungen und schweren Komedikationen zu leiden (Assael, 2009). Die BRONJ bei diesen Patienten entsteht häufiger spontan, ohne eine Extraktion und oft am lingualen Alveolarfortsatz der Mandibula. Die Fälle verlaufen weniger dramatisch, ohne Fistelbildung, pathologische Frakturen, oder durchgehende Osteolysen (Marx et al., 2007).

Zunehmend wird jedoch von steigenden Fallzahlen einer BRONJ auch unter oraler Medikation berichtet. Bis zu 30 % der untersuchten Patienten in den einzelnen zitierten Studien, die an BRONJ litten, nahmen aus verschiedenen Gründen - meistens jedoch wegen einer Osteoporoseerkrankung - orale BP ein (Lazarovici et al., 2009; Otto et al., 2011; Sedghizadeh et al., 2009; Urade et al., 2011). Im Schnitt erhalten diese Patienten jedoch ca. 10 Monate länger eine BP-Therapie, als die Patienten unter i.v. -Therapie, die eine BRONJ erleiden, also länger als 3 Jahre. Offizielle Zahlen über die Menge der Fälle, die eine BRONJ unter oralen BP entwickeln, sind sehr schwer zu erheben. Das liegt vermutlich daran, dass diese Patienten selten in einer engmaschigen Kontrolle sind, und die Dunkelziffer bei dieser sehr großen Patientengruppe hoch ist (McLeod et al., 2012). Da die Patienten über viele Jahre orale BP einnehmen, ist es auch wahrscheinlich, dass sie in diesem Zeitraum kleine chirurgische Eingriffe in der Mundhöhle brauchen. Schon eine Zahnextraktion aber stellt ein hohes Risiko für die Entwicklung einer BRONJ dar.

4.1.6 Metastasierende Tumorerkrankung

Eine metastasierende Tumorerkrankung ist ein sicherer Risikofaktor eine BRONJ zu erleiden. In der Gruppe der Patienten, die eine BRONJ erlitten hatten, war nur ein Patient von 9 an Osteoporose erkrankt, die anderen an einer Tumorerkrankung. Durie und Mitarbeiter (2004) wiesen nach, dass 2,6 % der Tumorpatienten ihrer Studie auch spontan eine Osteonekrose entwickeln. Damit wird deutlich, dass eine solche Erkrankung auch ohne BP die gleichen Symptome hervorrufen kann. Gebara und Moubayed (2009) zeigten nach, dass Krebspatienten unter BP-Therapie mit bis zu 10 %iger Wahrscheinlichkeit eine BRONJ entwickelten, wenn sie mehr als einen Risikofaktor aufwiesen. In der Patientengruppe der hier vorgelegten Studie sind

diese Risikofaktoren laut Definition von Gebara und Moubayed (2009): Diabetes, Rauchen und i. v. -Verabreichung von Zometa[®], als besonders nebenwirkungsreiches BP.

Viele weitere Studien belegen dieses erhöhte Risiko für Tumorpatienten, eine BRONJ zu entwickeln (Bamias et al., 2005; Dunstan et al., 2007; Hoff et al., 2008; Vescovi et al., 2012; Woo et al., 2006). Thumbigere-Math und Mitarbeiter (2009) sprechen von höherer Inzidenz bei Vorliegen eines Multiplen Myeloms und Mamma-Karzinoms, in ihrer Studie gab es jedoch mehr Patienten mit Mamma-Karzinom (42 %) als mit Multiplem Myelom (27 %). Eine andere Studie ergab, dass 54 % der BRONJ-positiven Patienten Mamma-Karzinome vorwiesen und 15 % Multiple Myelome (Vescovi et al., 2012). In der hier vorgelegten Studie litten 55 % aller BRONJ-Patienten an Mamma-Karzinomen, die anderen hatten jeweils andere Erkrankungen. Die meisten Studien belegen diese Aufteilung (Boonyapakorn et al., 2007; Kahmaisi et al., 2007; Stanton und Balasarian, 2009). Das mag auch damit zusammenhängen, dass Brustkrebs eine der häufigsten metastasierenden Tumorerkrankungen ist. Da das Multiple Myelom sich ausschließlich im Knochen manifestiert, werden diese beiden Patientengruppen einen großen Anteil der mit BP behandelten Patienten stellen. Hinzu kommt, dass die Produktion der roten und weißen Blutkörperchen bei Myelompatienten eingeschränkt ist und somit Sauerstofftransport und Abwehrkräfte reduziert sind.

In der Gruppe der mit BP behandelten Patienten ohne Nekrose (Gruppe 1), waren 25 % der Patienten an einem metastasierenden Mamma-Karzinom und 25 % an einem multiplen Myelom erkrankt. Warum erlitten sie nach Extraktion keine Nekrose? Die Tumorpatienten litten alle an einem metastasierenden Karzinom oder einem Tumor, der sich im Knochen manifestiert, wie dem Multiplen Myelom oder Plasmozytom. Also hatten sie bereits fortgeschrittene, gesundheitlich stark kompromittierende Erkrankungen und somit in dieser Hinsicht gleiche Voraussetzungen. Wahrscheinlich liegt es an der jeweiligen individuellen immunologischen Situation des Patienten und an der Anzahl von Risikofaktoren pro Patient, ob er eine BRONJ entwickelt.

4.1.7 Chemotherapie

Aus Gruppe 1 hatten alle Tumorpatienten eine Chemotherapie erhalten - mit Ausnahme eines Patienten mit Prostata-Karzinom, genauso wie in Gruppe 2. Chemotherapeutika werden immer wieder als möglicher Risikofaktor für die Entwicklung einer BRONJ erwähnt, jedoch wurde bisher zu diesem Thema recht wenig geforscht. Es gibt einen Fallbericht über Osteonekrosen des Kiefers nach Chemotherapie bei Tumorerkrankungen (Wang et al., 2003). In einer Untersuchung von Myelompatienten, die alle dem gleichen Therapieregime unterlagen, konnten Jadu und Mitarbeiter (2007) feststellen, dass die Therapie mit einem Chemotherapeutikum das Risiko einer BRONJ gering erhöht ($p < 0,014$). Wessel und Mitarbeiter (2008) beschreiben ebenfalls ein erhöhtes Risiko. Fleisher und Glickman (2011) untersuchten 16 Tumorpatienten mit BRONJ, die keine andere Medikation außer BP erhalten hatten. Sie vermuten, dass Chemotherapie zu Thrombose und Infarkt von versorgenden Kiefergefäßen führen kann und gewisse Therapeutika offensichtlich eine BRONJ verschlimmern.

BP werden ausschließlich Patienten mit degenerativen Knochenerkrankungen verschrieben. Bei den Tumorpatienten handelt es sich dabei um Metastasen im Knochen oder eine Krebserkrankung, die vom Knochen ausgeht. Bei diesen Erkrankungsformen wird in den wenigsten Fällen auf eine Chemotherapie verzichtet, sodass man nur schwer eine Aussage treffen kann, ob die Tumorerkrankung allein, oder die Chemotherapie allein, oder beide in Kombination als Risikofaktor für eine BRONJ angesehen werden müssen.

4.1.8 Nikotinabusus

Nur ein Patient aus Gruppe 1 (12 %) rauchte. In Gruppe 2 gaben 3 (33 %) von 9 Patienten an, regelmäßig zu rauchen. In der Studie von Thumbigere-Math und Mitarbeiter (2009) gaben 27 % der BRONJ-Patienten an, zu rauchen. Wessel und Mitarbeiter (2008) und Quisepe und Mitarbeiter (2011) beschrieben Nikotinabusus als Risikofaktor. Nikotin verlangsamt die Wundheilung, führt zu Veränderungen der Mundschleimhaut und reduziert die Gewebsdurchblutung (auch im Knochen), was in der Pathogenese einer Nekrose eine bedeutende Rolle spielt. Zum Thema Nikotinabusus und BRONJ findet sich keine Literatur.

4.1.9 Diabetes

Nur ein Patient aus Gruppe 1 (12 %) litt an Diabetes, in der 2. Gruppe jedoch 5 (55 %) von 9. Thumbigere-Math und Mitarbeiter (2009) berichteten, dass 19 % der Patientengruppe, die eine BRONJ entwickelt hatte, an Diabetes erkrankt war.

Über Jahre bestehender Diabetes kann, auch wenn er gut eingestellt ist, zu Gefäßverengungen, bzw. -verschlüssen führen, indem sich an der Basalmembran der Gefäße Zucker anlagern und das Lumen zunehmend einengen. Trahilkill und Mitarbeiter (2005) fanden heraus, dass Diabetes zu einer Veränderung im Knochenaufbau führt und seine Stabilität verringert, sowie das Frakturrisiko erhöht und die Regeneration von Defekten beeinträchtigt. Insulin jedoch stärkt die Knochenarchitektur. Khamaisi und Mitarbeiter (2007) zitieren einen Versuch an Ratten mit verringertem Glutathionspiegel, der zu vermehrter Anzahl von Osteonekrosen führte. Ein verringerter Glutathionspiegel führt zu oxidativem Stress und wird recht häufig bei Diabetikern beobachtet. Also könnte nach Meinung der Autoren oxidativer Stress als Auslöser für eine Nekrose angesehen werden.

Es ist schon lange bekannt, dass Diabetes mellitus Typ 1 zu einer verringerten Knochendichte führt, Typ 2 zu einer erhöhten Knochendichte. Es kommt jedoch bei beiden Typen paradoxer Weise zu größerer Fragilität und oft zu diabetesassoziierter Osteoporose. Dieser Einfluss auf die Knochenstruktur im Zusammenhang mit BP sollte untersucht werden.

Eine ernst zu nehmende Studie an der gesamten dänischen Population (Vestergaard et al., 2012) kommt zu dem Ergebnis, dass Diabetes ein starker Risikofaktor für BRONJ ist. Verglichen dazu stellen oral verabreichte BP allein ohne Diabetes einen geringeren Risikofaktor dar. Sie fanden heraus, dass die untersuchte Gruppe der Osteoporosepatienten zu einem viel höheren Anteil von Diabetes betroffen war, als die Vergleichsgruppe. Die meisten Patienten, besonders die Tumorpatienten (Fleisher und Glickman, 2011), haben mehr als nur einen Risikofaktor aufzuweisen. Zusätzlich erhalten Tumorpatienten meist eine Menge anderer Medikamente wie Kortikosteroide oder Statine, die laut Literatur ebenfalls einen bedeutenden Einfluss auf die Entstehung einer BRONJ haben (Stanton und Balasarian, 2009). Der einzige Osteoporosepatient, der in unserer Studie spontan eine BRONJ entwickelte, bekam Zometa[®] i. v., rauchte und litt an

Diabetes. Damit wird deutlich, dass stets kritisch hinterfragt werden muss, ob die BP selbst ebenso starke Risikofaktoren für eine Kiefernekrose sind, wie auch nur einer oder gar die Summe der anderen vielen Risikofaktoren, die multimorbide, ältere Patienten aufweisen können.

4.2 Histologische Übersichtsfärbungen

4.2.1 Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung

Die Präparate der gesunden Vergleichsgruppe 3 zeigen gesunden Knochen, der stark eosinophil angefärbt wurde. Zahlreiche Havers'sche Kanäle und das Vorhandensein aller Zellpopulationen zeugten von einem gesunden Knochenstoffwechsel. Im Bündelknochen der krestalen Alveolenwand fanden sich viele Kittlinien, die auf Grund der Zahnbewegungen entstanden sind. Abwehrzellen waren nicht erkennbar, vereinzelt sah man Osteoklasten am Knochensaum. Im Gegensatz dazu erschien der Knochen der mit BP behandelten Patienten ohne Nekrose (Gruppe 1) unruhiger. Die zahlreichen Kittlinien im Bündelknochen sind Zeichen einer Entzündung oder Zahnbewegung, evtl. im Rahmen eine Parodontitis. Da die Biopsien dieser Patienten im Rahmen einer trotz BP-Therapie unaufschiebbaren Zahnextraktion stattfanden, war der Knochen um den extraktionswürdigen Zahn sicher schon längere Zeit im Umbau. Manche Umbaulinien zeigten sich basophil, also schlecht mineralisiert. Der Knochensaum ist häufig anresorbiert, jedoch fand man selten Osteoklasten in diesen Lakunen. Dies ist ein Zeichen inaktiver Osteoklasten. Inaktive Osteoklasten runden ab und ziehen sich von der Knochenoberfläche zurück (Vasconcelos et al., 2012). Diese Lakunen waren sehr flach und klein, es erweckte den Anschein, dass hier nur kurze und wenig effektive Resorptionen stattfanden. Dafür fanden sich viele Areale mit frischem Osteoid, ein Zeichen dafür, dass die vielen Osteoblasten normale Aktivität zeigten. Auffallend war, dass bei Gruppe 2 kaum Osteoid erschien. Es fand also kein ausreichendes Remodeling statt, um die BRONJ zu regenerieren.

Die Osteozyten lagen basophil in ihren Lakunen und gewährleisteten die Vitalität des Knochens und die Weiterleitung von Reizen auf die Knochensubstanz an die Osteoklasten. Einige Präparate wiesen viele Havers'sche Kanäle auf, andere weniger. Das kann aber an der Entnahmestelle des

Resektats liegen, oder auch daran, dass manche Fragmente sehr klein waren, sodass keine oder nur wenige Osteone angeschnitten waren.

Es fielen zahlreiche Entzündungszellen auf, besonders Granulozyten waren an ihrem nierenförmigen Zellkern zu erkennen. Der Organismus schien also eine gesteigerte Immunreaktion aufrecht zu erhalten, die entweder lokal auf den Knochen beschränkt ist, oder aber wegen der Tumorerkrankung im gesamten Körper stattfindet.

Die Präparate, die aus der Gruppe der Patienten mit einer BRONJ stammten (Gruppe 2), zeigten ebenfalls eine sehr unruhige Knochenstruktur, da auch hier viel Bündelknochen mit Kittlinien vorlag. Fast alle Osteozytenlakunen waren leer, die Fragmente waren also devital. Man würde erwarten, dass große Gruppen von Osteoklasten für den Abbau an der Oberfläche des devitalen Knochens sitzen, jedoch finden sich insgesamt wenige Osteoklasten. Man erkannte viele flache, leere Resorptionslakunen, wie oben beschrieben. Es lag keine neue Osteoidanlagerung an den Rändern nekrotischen Knochens vor, der Defekt schien also nicht durch gesundes Gewebe ersetzt worden zu sein. Es waren auch sehr wenig Osteoblasten sichtbar, die die Regeneration übernehmen könnten. Dies mag mit der Lokalisation der Biopsieentnahme zusammenhängen, manchmal waren nur kleine Areale gesunden Knochens angeschnitten.

Man kann einen Zusammenhang zwischen der Menge der bakteriellen Besiedlung und der Zelldichte herstellen. Je dichter und ausgedehnter der Bakterienrasen erschien, desto weniger Lining cells waren vorhanden. Diese sind entweder bereits vor der bakteriellen Invasion zu Grunde gegangen und konnten somit keine Abwehrreaktion mehr induzieren, oder wurden durch die Bakterientoxine abgetötet. Davon abgesehen erkannte man zahlreiche Entzündungszellen, besonders Granulozyten an ihrem nierenförmigen Kern, aber auch einige Lymphozyten. Aus dieser Zellverteilung lässt sich auf ein akutes Entzündungsgeschehen schließen. In dieser Färbung sah man nur mäßig viele Gefäße und Havers'sche Kanäle.

4.2.2 Trichrom nach Masson-Goldner

Die Rotfärbung des Knochens korrelierte mit dem Mineralisierungsgrad. So erkannte man in der gesunden Vergleichsgruppe ein Drittel kräftig rot gefärbten, gut mineralisierten Knochens, in der 1. Gruppe etwas weniger Rotfärbung (vgl. Abb. 4) und in Gruppe 2 noch weniger. Drei Präparate aus Gruppe 2 wiesen sehr wenige rote Areale vor. Diese Ergebnisse sind nicht überraschend, denn mit zunehmender Nekrotisierung werden die anorganischen Anteile durch sinkenden pH-Wert und Bakterientoxine aus dem Knochen herausgelöst und die Knochenzellen gehen unter. Daher fand man weniger Zellen, je weniger vitaler, mineralisierter Knochen vorlag. Hervorzuheben ist der hohe Osteoidanteil in Gruppe 1. Trotz der BP-Therapie schien das Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und Osteoidbildung nicht beeinträchtigt zu sein. BP steigern bekannter Maßen die Knochendichte durch Verminderung der Osteoklastenaktivität und Steigerung oder Gleichbleiben der Knochenproduktion. Recker und Mitarbeiter (2008) untersuchten den Knochenstoffwechsel bei 7736 Osteoporosepatientinnen und stellten fest, dass nach 3-jähriger i. v. -Behandlung mit 5 mg Zoledronat eine Reduktion des turn-overs von mittelwertig 71 % erfolgte, ohne dass der Knochen porös oder adynamisch wurde. Sie berichten, dass die Apposition mineralisierten Osteoids und die Osteoblastenaktivität anstieg. Gleichzeitig beobachteten sie, dass die Anzahl der Oberflächen an denen resorbiert wurde, abnahm. Diese Ergebnisse stimmen mit den hier gefundenen Resultaten überein.

4.3 Histochemische Färbung

4.3.1 PAS- Färbung

Die PAS-Färbung brachte gegenüber der HE-Färbung einige neue im Hinblick auf die bakterielle Besiedlung. 7 von 9 der nekrotischen Präparate waren bakteriell besiedelt. In den Bakterienkonglomeraten sah man pink angefärbte, fadenförmige Bakterien (vgl. Abb. 5), bei denen es sich wahrscheinlich um Aktinomyzeten handelte. Diese anaeroben Keime kommen als Standortflora in der Mundhöhle vor und können nur über Verletzungen oder mit Hilfe anderer gewebseretzender Keime in Gewebe eindringen. Diese Keime sind sehr aggressiv, können lange persistieren und lösen langwierige und rezidivierende Entzündungen der Weichgewebe aus.

Es handelt sich dabei normalerweise um chronische Entzündungen. Aktinomyzeten werden sehr häufig in Knochenbiopsien einer BRONJ entdeckt (Jadu et al., 2007). Stanton und Balasanian (2009) beobachteten in ihrer Studie, dass der nekrotische Knochen ihrer Patienten einen signifikanten Bakterienwuchs aufwies, darunter auch einige Aktinomyzeten, obwohl alle Patienten eine Antibiotikabehandlung erhielten. Sie stellten fest, dass es fast unmöglich ist, zu sagen, welche Rolle das Eindringen von Bakterien in der Entwicklung einer BRONJ spielen, ob die Bakterien die Entwicklung einer BRONJ bahnen, oder ob diese erst nach Schleimhautdehiszenz den nekrotischen Knochen besiedeln. Die gleiche Frage stellen Allen und Burr (2009).

Naik und Russo (2009) schreiben, dass es eine nicht zu missachtende Tatsache sei, dass die meisten - wenn nicht alle - BRONJs im Zusammenhang mit einer Aktinomykose stehen. Sie kommen jedoch auch zu dem Schluss, dass erst eine reduzierte Abwehr und eine Schleimhautläsion zu einer Aktinomykose führen. Trotzdem lassen vitale Osteozyten in den Knochenbiopsien an Aktinomykose erkrankter Patienten die Vermutung zu, dass Aktinomyzeten auch gesunden Knochen befallen. Liegt eine Schleimhautläsion vor, so kann eine Aktinomykose entstehen, die eine BRONJ auslösen könnte, oder es entsteht eine Nekrose, die superinfiziert wird. Aus ihrer Sicht führt eine Therapie der BRONJ ohne Behandlung der Aktinomykose kaum zu einer Ausheilung der BRONJ.

Bakterien können Knochen resorbieren. Bei dieser Art der Resorption werden Osteoblasten nicht zur Knochenbildung angeregt, was bei der osteoklastenabhängigen Resorption der Fall ist. Das könnte die Ursache für die stärkere Resorption an der Oberfläche nekrotischen Knochens sein und gleichzeitig die fehlenden Zellen, bzw. die ausbleibende Knochenregeneration erklären. Außerdem würde das die starke Resorption an den nekrotischen Knochenfragmenten aus Gruppe 2 ohne Osteoklasten in nächster Nähe erklären (Allen und Burr, 2009).

4.3.2 TRAP - Färbung

Die TRAP-Färbung wird im Zusammenhang mit den Osteoklastenspezifischen Markern unter 4.4.2 abgehandelt.

4.4 Immunhistochemische Färbungen

4.4.1 Osteoblastenspezifische Marker

Der Einfluss von BP auf Osteoblasten wird in der Literatur gegensätzlich diskutiert. Einige Autoren stellen fest, dass BP in niedriger Dosierung die Osteoblastenaktivität zu stimulieren scheinen, weniger die Proliferation, sondern die Differenzierung, Aktivität und Mineralisation. In höheren Dosen hemmen sie diese jedoch. Andere berichten, dass BP auf Osteoblasten eine Wachstumshemmung auslösen können (Cornish et al., 2011).

Es konnte eine Zunahme der Mineraleichte im Knochen (BMD) festgestellt werden, was nur durch verstärkte Osteoblastenaktivität entstehen kann. Würden ausschliesslich Osteoklasten gehemmt, würde die BMD gleichbleiben (Ho, 2011). Die gesteigerte Osteoblastenaktivität wird immer an Hand der alkalischen Phosphatase oder des Osteokalzins gemessen. Boanini und Mitarbeiter (2012) kommen in ihrer in-vitro-Studie zu Osteoblasten zum selben Ergebnis, dass Osteoblasten von niedrigen BP-Dosen zu Wachstum und Aktivität angeregt werden. Eine 2010 erschienene Studie (Koch et al., 2010) belegt ebenso, dass die Stoffwechselaktivität, nicht aber die Proliferationsfähigkeit der Osteoblasten von stickstoffhaltigen BP positiv beeinflusst wird. Sie konnten beobachten, dass nach dem 14. Tag dieser Einfluss nachließ. Sie vermuten, dass die Zellen in einen ruhenden, ausgereiften Zustand übergehen. In ihren Augen könnte das zu einer verminderten Regenerationsfreudigkeit führen und der Entwicklung einer BRONJ Vorschub leisten. Das wird durch die Tatsache bestärkt, dass die OPG-Expression unter BP anzusteigen scheint. Boanini und Mitarbeiter (2012) untersuchten auch die RankL-OPG-Produktion der Zellen, was zu dem Ergebnis führte, dass OPG in höherem Maße produziert wird, RankL aber unverändert bleibt. Dies ist ein Zeichen eines ausgereiften Osteoblastenstadiums (Viereck et al., 2002), in welchem eine verringerte Osteoidproduktion stattfindet.

Im Gegensatz dazu stellten Koch und Mitarbeiter (2010) fest, dass das Wachstum der Osteoblastenzellkulturen besonders nach dem 14. Tag zunahm und das besonders unter Zoledronatzugabe. Sie behaupten auch, dass die Proliferation der Osteoblasten zugenommen habe. Diese Behauptung findet sich insgesamt häufiger bei älteren Studien (Im et al., 2004). Es finden

sich durchaus gegensätzliche Meinungen zu diesem Thema. Weitestgehende Einigkeit herrscht darüber, dass BP Osteoblasten zu einem gewissen Zeitpunkt in ihrer Aktivität stimulieren.

Eine aus der verstärkten Knochenbildung gefolgerte Theorie ist, dass der Durchmesser der Gefäße durch Hartschubstanzbildung verringert wird. Ein geringerer Gefäßdurchmesser konnte auch in dieser Studie beobachtet werden (s. 4.5.4).

Stickstofffreie BP scheinen ausschließlich die Osteoklasten zu beeinflussen, was die Erklärung dafür wäre, dass diese nie zu Nekrosen führen (Koch et. al., 2010). Andererseits findet man auch bei mit niedrig dosierten stickstoffhaltigen BP therapierten Osteoporosepatienten sehr selten eine BRONJ, obwohl sie über viele Jahre BP erhalten und somit eine hohe Dosis des Medikaments im Knochen akkumulieren. Folglich müsste mit den Jahren eine deutliche Stimulation der Osteoblasten und der Hartschubstanzbildung erfolgen und auch eine Osteoklastenhemmung und somit die Entstehung einer BRONJ gebahnt werden. Dies zeigt erneut, wie vielschichtig die Entstehung einer BRONJ sein muss.

Die Osteoblasten stimulierende Dosis ist theoretisch die Dosis, mit der Osteoporosepatienten behandelt werden. Bei zu hoher Dosis kann es zur Apoptose der Osteoblasten kommen (Corrado et al., 2010). Bei Behandlung von Tumorpatienten werden sehr viel höhere BP-Dosen verwendet. Da das Medikament jedoch im Knochen akkumuliert, wird es nur in geringer Dosis durch Resorption freigesetzt. Diese Dosis ist wahrscheinlich die Optimaldosis für Osteoblasten, um deren Lebensdauer zu verlängern (Bellido und Plotkin, 2011). Bellido und Plotkin (2011) konnten zeigen, dass der lebensverlängernde Effekt auf Osteoblasten von einem Connexin (Cx43) abhängt und von der Phosphorylierung einer extrazellulären Kinase (ERK), deren intrazellulärer Signalweg antiapoptotische Wirkung hat.

4.4.1.1 Alkalische Phosphatase

Die Antikörperreaktion auf alkalische Phosphatase war in allen drei Präparategruppen einheitlich stark (vgl. Abb. 10 und 11). Besonders kräftig waren Lining cells, Osteoblasten und Endothelzellen angefärbt. Sogar einige Osteoklasten reagierten positiv, was wohl darauf

zurückzuführen ist, dass Osteoklasten alkalische Phosphatase resorbiert haben, die sich dem Knochen angelagert hatte. In den Präparaten der Gruppe 2 fanden sich dunkel gefärbte Osteoklasten, evtl. weist das auf eine erhöhte Resorptionsaktivität dieser Zellen hin, die besonders viel Knochen mit alkalischer Phosphatase resorbiert haben. Jedoch gemäß der Literatur würde man erwarten, dass BP die Aktivität der Osteoklasten hemmen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Forschungsergebnissen überein, dass Osteoblasten durch BP stimuliert werden (Koch et al., 2010). Die Reaktion in den Präparaten der BP-behandelten Patienten ist nicht von der Reaktion in gesunden Präparaten zu unterscheiden. Da es sich bei der alkalischen Phosphatase um ein Protein handelt, das die Osteoblasten in der Initialphase der Osteoidsynthese ausschütten, wird deutlich, dass in den Präparaten beider Patientengruppen unter BP-Einfluss viel frischer Knochen gebildet wurde. Die Osteoblasten bilden dieses Protein und da es auch im Blut zirkuliert (Seibel, 2000), ist es auch verstärkt in den Gefäßwänden nachweisbar und spricht für eine bereits länger andauernde und hohe Knochenneubildungsrate.

4.4.1.2 Osteokalzin

Osteokalzin dient wie die alkalische Phosphatase als Osteoblastenaktivitätsmarker. Es wird in der Mineralisationsphase von bereits ausgereiften Osteoblasten ausgeschieden und in den Knochen eingebaut, deswegen findet sich dieser Marker ubiquitär im Knochen (vgl. Abb. 12). BP können die Osteokalzinproduktion steigern (Giner et al., 2011).

Alle Präparate zeigten eine mittelstarke Anfärbung des Knochens für Osteokalzin. In Gruppe 1 zeigten 3 der 9 Präparate keine Färbung der Osteoblasten, in Gruppe 2 waren es ebenfalls 3. Also befanden sich in diesen Präparaten keine Osteoblasten in diesem Entwicklungsstadium. Diese Tatsache ist verwunderlich, denn in der Literatur finden sich viele Hinweise, dass BP die Lebensdauer von Osteoblasten verlängern und sie vor Apoptose schützen. Wäre dies ausnahmslos der Fall, müssten alle Präparate durch Osteokalzin positiv angefarbte Osteoblasten aufweisen, da ausdifferenzierte Osteoblasten Osteokalzin bis zum Untergang in ihren Zellleibern gespeichert halten. Weil alle Zellen durch die alkalische Phosphatase angefarbt waren, muss eine grundsätzliche Vitalität und Aktivität der Zellen angenommen werden.

Osteoklasten waren in allen Präparaten beider Gruppen angefärbt. Dies mag daran liegen, dass Osteoklasten osteokalzinhaltigen Knochen besser resorbieren können, als ohne Osteokalzin (Hauschka et al., 1989; Ishida und Amano, 2004). Erst ab dem 14. Tag enthält neugebildeter Knochen Osteokalzin. In den Präparaten der Gruppe 1 sieht man dünne Streifen ungefärbten Osteoids, während in Gruppe 2 keine Neubildung am Rand des nekrotischen Knochens erkennbar ist.

4.4.1.3 BMP-2

BMP-2 ist einer der stärksten Wachstumsfaktoren im Knochen, der von Vorläuferzellen der Osteoblasten und Chondroblasten gebildet wird. In den Präparaten der gesunden Vergleichsgruppe erschien eine recht schwache Reaktion in wenigen Osteoblasten, Lining cells und runden Zellen im Bindegewebe. Mundy und Mitarbeiter (1999), Im und Mitarbeiter (2004) und Wehrhan und Mitarbeiter (2011c) stellten fest, dass BP die BMP-2-Expression steigern und somit u.a. die Proliferation und Differenzierung von pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark zu Osteoblasten verstärken. Präparate der Gruppe 1 und 2 zeigten vereinzelte positiv gefärbte Zellen, die nicht direkt am Knochensaum lagen (vgl. Abb. 13). Dies spricht dafür, dass einige der Vorläuferzellen im Spongiosaraum BMP-2 produzieren und Knochenbildung und Regeneration anregen. Die Reaktion war sehr schwach. Wie bereits erwähnt, stimmen die meisten Autoren darin überein, dass die Proliferation von Osteoblasten unter BP-Einwirkung zwar initial angeregt, grundsätzlich aber nicht gesteigert wird. Die Ergebnisse bestätigen, dass die Osteoblastendifferenzierung nicht durch BMP-2 gesteigert wird, denn in den Präparaten konnte keine relative Vermehrung der Osteoblasten gegenüber den gesunden Präparaten beobachtet werden.

BMP-2 fördert ebenso die Resorption, indem es die Bildung von RankL anregt (Okamoto et al., 2006). Deshalb führte eine Tierstudie zum Erfolg, bei der während der Kallusbildung BMP-2 und Zoledronat zugeführt wurden. Die Kallusbildung wurde synergistisch deutlich verstärkt. BMP-2 verstärkte die Osteoblastendifferenzierung. Die Resorptionsförderung des BMP-2 wurde durch Zoledronat gebremst (Yuji et al., 2010). Vandermeer und Mitarbeiter (2011) kamen auch zu dem Ergebnis, dass die Kombination aus Ibandronat und BMP-2 zu verstärkter Knochenneubildung

führt. Die BMP-2-Färbung in unseren Proben war schwach, eine regenerationsfördernde Wirkung wird evtl. nicht erreicht. Es fanden sich auch keine Unterschiede zwischen Gruppe 1 und 2.

4.4.1.4 Runx2

Bei den gesunden Patienten trat Runx2 geringer auf (vgl. Abb. 15), als bei den meisten Patienten unter BP-Therapie, jedoch gab es in der 1. Gruppe (ohne Nekrose) 3 und in der 2. Gruppe (mit BRONJ) 2 Patienten ohne jegliche Reaktion. Wie erwartet, trat die Reaktion im Zellkern der Osteoblasten und deren Vorläuferzellen auf (vgl. Abb. 14). Nach Eintritt des Transkriptionsfaktors ins Blut, kann dieser in Blutgefäßen auftreten, wie es in den untersuchten Präparaten auch der Fall war.

Runx2 ist der maßgebliche Transkriptionsfaktor der Osteoblasten, verantwortlich für die Knochenbildung. Seine Bildung wird durch BMP-2 reguliert (Hassan et al., 2006; Jang et al., 2012; Sugawara et al., 2011). Weiterhin scheint die Osteokalzinproduktion ebenfalls von Runx2 abzuhängen. Runx2 reguliert die Expression verschiedener osteoblastärer Produkte: Kollagen I, Osteokalzin, Osteopontin oder Bone Sialoprotein (Jang et al., 2012). Kim und Mitarbeiter (2011) fanden heraus, dass die Kombination aus BMP-2 und Runx2 in vitro zu Proliferation und Umwandlung von Fibroblasten in Osteoblasten führen kann. Dies zeigt, dass eine erhöhte Konzentration der beiden Marker ebenfalls zu einer erhöhten Knochenneubildung durch vermehrte Osteoblastenneubildung führen kann. Diese Kombination fand man bei den untersuchten Präparaten weniger, denn BMP-2 wurde in den Gruppen 1 und 2 schwach angefärbt, während Runx2 mal schwach und mal mittelstark angefärbt wurde. Gruppe 2 zeigte jedoch in den meisten Präparaten eine mittelstarke Reaktion.

Die Runx2-Produktion wird durch $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL}1\beta$ vermindert, indem Runx2 aktiv abgebaut wird (Ding et al., 2009). Die $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL}1\beta$ - Reaktion fiel etwas stärker aus als bei den Vergleichspräparaten aus Gruppe 3. Evtl. könnte eine verminderte Runx2-Menge in einigen Präparaten damit im Zusammenhang stehen.

In 7 von 9 Präparaten aus Gruppe 2 erschien eine stärkere Immunreaktion auf Runx2 als in den gesunden Präparaten. Grundsätzlich sollte eine Stimulation der Knochenbildung bei diesen Patienten erfolgen. Auf der anderen Seite kann Runx2 in größeren Mengen auch zur Stimulation von Osteoklasten beitragen (Geoffroy et al., 2011). Doch diesem Effekt steuern BP wieder entgegen. Ein Zusammenhang zwischen der BRONJ und einer erhöhten Runx2-Konzentration ist nach heutigem Wissensstand nicht herzustellen. Es gibt auch keinerlei Literatur, die Runx2 und BP im Zusammenhang behandelt. Die Proliferation der Osteoblasten wird durch mehr Runx2 verstärkt. Zusätzlich stärken die BP die Aktivität der Osteoblasten. Eine positive Knochenbilanz sollte bei den hier untersuchten Patienten also gewährleistet sein.

Zusammenfassend kann eine erhöhte Osteoidproduktion in den Präparaten der Gruppe 1 und 2 gegenüber den gesunden Vergleichspräparaten im Rahmen dieser semiquantitativen Auswertung beobachtet werden. Alkalische Phosphatase, Osteokalzin und BMP-2 liegen in normaler Konzentration vor. Runx2 wird etwas verstärkt gebildet. Wie in der Trichromfärbung zu erkennen war, wurde in den Präparaten der Gruppe 1 viel neues Osteoid gebildet. Diese Ergebnisse stimmen mit der themenspezifischen Literatur weitestgehend überein (s. 4.4.1). Es sollte bedacht werden, dass die meisten Studien über Osteoblasten unter Einfluss von BP in vitro durchgeführt werden, wo Osteoblasten in Medien kultiviert werden, zu denen BP hinzugefügt wurden. Da BP in vivo fast ausschließlich fest am Knochen gebunden vorliegen und Osteoblasten keine resorbierenden Fähigkeiten haben, dürfte die BP-Exposition dieser Zellen in vivo geringer sein und die Übertragbarkeit der in-vitro-Modelle begrenzt.

Es ist wichtig, festzustellen, dass die Osteoblastenaktivität offensichtlich nicht beeinträchtigt, sondern eher leicht verstärkt wurde, denn man konnte bei den Gruppen unter Bisphosphonattherapie mehr Osteoid als beim gesunden Patienten beobachten. Die Nekrose kann also nicht auf eine mangelnde Knochenneubildung zurückgeführt werden. Offen bleibt die Frage, ob eine verstärkte Knochenbildung zur Lumeneinengung der Gefäße führt und somit zu einem Nutritionsengpass für den normalerweise gut durchbluteten Kieferknochen (s. 4.5.4). Dieser Frage sollte in zukünftigen Studien nachgegangen werden.

4.4.1.5 RankL

RankL wird von Osteoblasten produziert und stimuliert die Differenzierung von Zellen des mononukleären Phagozytensystems zu Osteoklasten. Die Präparate der gesunden Vergleichsgruppe zeigten eine sehr schwache Reaktion in allen Lining cells und Osteoblasten. Gruppe 1 zeigte eine intensive Reaktion der Lining cells und Osteoblasten, wobei Osteoklasten geringer gefärbt waren. Osteoklasten binden RankL, oder resorbieren es. Es war zu beobachten, dass RankL auch in Osteozyten und Gefäßwänden auftreten kann. Evtl. sind Osteozyten noch in der Lage, diese Proteine zu produzieren, oder es hängt mit der Vermutung zusammen, dass Osteozyten Osteoblasten bei mechanischer Belastung zur RankL-Bildung stimulieren (Tatsumi et al., 2007). Alternativ könnten auch Rezeptoren vorliegen. Die Reaktion erfolgte in den BP-Gruppen stärker als in der gesunden Gruppe 3.

Die Ergebnisse der Gruppe 2 gleichen denen der Gruppe 1, wobei die Präparate 1901, 2062 und 2350 weniger positive Reaktion aufweisen. Beim Vergleich mit der TRAP-Reaktion zeigte sich, dass die Präparate 2062 und 2350 keine TRAP-positiven Osteoklasten besitzen und Präparat 1901 viele nur schwach gefärbte Osteoklasten. Also scheint sich eine geringere RankL-Konzentration direkt auf die Anzahl aktiver Osteoklasten auszuwirken.

4.4.1.6 OPG

Die gesunden Patientenpräparate zeigten eine starke Reaktion in allen Osteoblasten, Fibroblasten und Kollagenfasern. Diese Zellen sind zur Bildung von OPG befähigt. Gruppe 1 zeigte eine sehr selektive Reaktion auf OPG, innerhalb der Präparate gab es intensiv gefärbte Bereiche von Lining cells und Osteoblasten, während andere Lining cells und Osteoblasten ungefärbt blieben. Einige Osteoklasten, Fibroblasten und Gefäßwände hatten reagiert, andere nicht. In Gruppe 2 war die Reaktion geringer, es waren noch weniger Lining cells und Osteoblasten positiv gefärbt. Die Tatsache, dass auch hier einige Osteoklasten angefärbt waren, lässt auf die Resorption von OPG durch Osteoklasten schließen. Insgesamt war die OPG-Reaktion in Gruppe 1 und 2 gegenüber der Vergleichsgruppe leicht reduziert ausgefallen. Zwar wurden die Zellen der BP-behandelten

Patienten farblich gleich intensiv angefärbt, aber es sind nur etwa die Hälfte der Zellareale gefärbt.

Die kritische Betrachtung der Marker RankL und OPG erfolgt zusammen mit Rank im nachfolgenden Kapitel (4.5.2).

4.4.2 Osteoklastenspezifische Marker

4.4.2.1 Rank

Die Reaktion auf Rank erzielte eine intensive Färbung, in den Gruppen 1 und 2 intensiver als in der gesunden Vergleichsgruppe. Es wurden, anders als bei RankL, alle knochennahen Zellen angefärbt (vgl. Abb. 18). Die Vorläuferzellen der Osteoklasten lagen sowohl am Knochenrand, als auch in den Spongiosaräumen im Kollagengeflecht. Jedoch reagierten die Lining cells und Osteoblasten am stärksten. Einige Osteoklasten sind in den Gruppen 1 und 2 nicht angefärbt worden, diese hatten sehr große Zellvolumina. Hierbei handelt es sich um bereits ausdifferenzierte Osteoklasten (Vasconcelos et al., 2012), welche im Gegensatz zu kleineren - also noch nicht oder nicht mehr resorbierenden Zellen - offensichtlich keine Rank-Rezeptoren mehr exponieren. Dies ist verwunderlich denn andererseits tragen auch reife Osteoklasten für gewöhnlich diesen Rezeptor (Trouvin und Goeb, 2010). Evtl. könnte es sich dabei um Osteoklasten handeln, die nach der Resorption von Bisphosphonaten nicht mehr funktionsfähig sind. In den Resorptionslakunen der Präparate aus Gruppe 2 erschien die Antikörperreaktion verstärkt. Vermutlich hängt das mit Stimuli zusammen die zu einer erhöhten Knochenresorption führen sollen. Die Reaktion auf Rank war leicht stärker, als auf RankL.

4.4.2.2 TRAP

Die Präparate der Patienten unter BP-Therapie enthielten mehr Osteoklasten als die gesunden Vergleichspräparate, jedoch sind diese sehr klein und kaum ein Osteoklast liegt dem Knochen direkt auf. Nur die größeren Exemplare finden sich unmittelbar am Knochensaum. 3 von 9

Präparaten in beiden Gruppen zeigten gar keine gefärbten Osteoklasten, jedoch erkannte man in dieser und auch in der HE-Färbung, dass viele ungefärbte Osteoklasten vorlagen. In Gruppe 1 enthalten 3 von 9, in der 2. Gruppe 2 von 9 Präparaten nur sehr wenige Osteoklasten (vgl. Abb. 8). In den restlichen Präparaten, die mehrere gefärbte Osteoklasten aufweisen, sah man nur jeweils maximal 2 Osteoklasten pro Präparat, die dem Knochen direkt aufsitzen. Alle anderen Osteoklasten lagen in größerem Abstand im Spongiosaraum (vgl. Abb. 7 und 8). In Gruppe 1 enthielt das Präparat 1894 sehr viele Osteoklasten, dies mag daran liegen, dass dieses Präparat sehr viel Bündelknochen vom Alveolarrand enthielt, der einen massiven Umbau hinter sich hat. Dieses Knochenfragment wurde mit einem zerstörten Zahn entfernt, sodass eine Entzündungsreaktion im Knochen um diesen Zahn herum stattgefunden haben muss. Der andere Patient aus Gruppe 1, der viele Osteoklasten aufwies (2061), nahm auf Grund seiner Osteoporoseerkrankung Fosamax® ein. Evtl. werden Osteoklasten durch dieses Medikament weniger stark gehemmt.

BP blockieren nachgewiesener Maßen den Mevalonatstoffwechsel, aus diesem Grunde werden Osteoklasten deaktiviert (Rauthan und Pilon, 2011). Wie an den gesunden Vergleichspräparaten zu sehen ist, lagen in gesundem Knochen nur wenige Osteoklasten vor, die für einen ausgewogenen Knochenstoffwechsel sorgen. Ihre Proliferation wird u.a. über das Rank/RankL/OPG-System durch die Osteoblasten gesteuert. Eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten bei den BP-Patienten vorzufinden war unerwartet, denn BP sollten eigentlich diese Zellgruppe hemmen und in die Apoptose führen (Carlson und Basile, 2009). Es ist davon auszugehen, dass durch die Hemmung des Mevalonatzyklus die Mehrzahl dieser Osteoklasten aber nicht funktionsfähig ist, also weder einen Aktinring für die Okklusionszone, noch eine „ruffled border“ ausbilden kann. Dafür spricht auch, dass kaum ein Osteoklast dem Knochenraum unmittelbar aufsitzt und dass einige mehrkernige Riesenzellen erkennbar waren, die nicht auf TRAP reagiert haben, während im selben Präparat andere Osteoklasten positiv reagierten. Selbst wenn die Osteoklasten dazu in der Lage sein sollten, TRAP auszubilden, so ist es nicht sicher, ob sie jemals eine Resorption betreiben werden können. Wenn nun von der normalen Anzahl an Osteoklasten eine gewisse Zellzahl untergeht, bzw funktionslos ist, werden kompensatorisch mehr Osteoklasten gebildet (Trouvin und Goeb, 2010). In unseren Präparaten erkennt man dies an der leicht reduzierten OPG-Menge und den erhöhten Reaktionen auf Rank und RankL. Die optischen Unterschiede zwischen den immunhistochemischen Färbungen sind nicht

sehr groß, jedoch müssen Konzentrationsunterschiede bereits groß sein, wenn sie optisch sichtbar werden.

4.4.2.3 Rank/RankL/OPG- System

OPG bindet RankL den Ligand von Rank. OPG und RankL werden gegenläufig ausgeschüttet, so erkennt man auch in diesen Proben, dass mehr RankL- als OPG-positive Zellen vorlagen. Die Reaktion auf Rank korrespondierte mit der Reaktion auf RankL, beide lagen in ähnlicher Stärke vor. OPG lag leicht vermindert vor, also wird die Osteoklasten-Proliferation durch Osteoblasten nicht gehemmt. Rank und RankL hingegen waren leicht erhöht gegenüber den Vergleichspräparaten, demnach wurde die Osteoklastendifferenzierung gefördert. Die Möglichkeit, über die Immunhistochemie Konzentrationsveränderungen optisch sichtbar zu machen, ist wie gesagt gering.

Hieraus lässt sich schließen, dass in den vorliegenden Präparaten der BP-behandelten Patienten die durch Osteoblasten stimulierte Resorption gefördert wird. Die Anzahl der TRAP-positiven Osteoklasten war jedoch nicht entsprechend hoch. Es lagen in manchen Präparaten zwar viele Osteoklasten vor, jedoch wurden sie nicht angefärbt, andere sehr schwach. Andere Präparate zeigen gar keine angefärbten Osteoklasten. Die wenigen angefärbten Osteoklasten lagen dem Knochen nicht an. Es stellt sich die Frage, warum eine Verstärkung des Rank/RankL-Mechanismus nicht zu mehr resorptionsfähigen Osteoklasten führte und warum er verstärkt wird, wenn doch mehr Osteoklasten vorlagen als beim gesunden Patienten. Es könnte sein, dass die Osteoklasten durch BP direkt so stark gehemmt werden, dass Osteoblasten einen normalen bis leicht gesteigerten Reiz erhalten, die Osteoklastenaktivität zu stimulieren. Die Hauptfunktion von OPG besteht darin, eine übermäßige, zerstörerische Resorption zu verhindern (Hsu et al., 1999). Da diese durch Hemmung der Osteoklasten nicht vorliegt, muss die OPG-Produktion nicht gesteigert werden, wie die vorliegenden histologischen Ergebnisse belegen. Demgegenüber werden die Rank- und RankL-Expression leicht erhöht, weil die Osteoklastenaktivität durch BP-Wirkung gemindert ist. Das entspricht auch den beschriebenen Ergebnissen. Leider sind auch zu diesem Thema die Literatursagen gegensätzlich. Zum Einen wird beschrieben, dass Osteoblasten unter BP-Einfluss *in vitro* durch erhöhte OPG-Expression die Osteoklasten-

differenzierung hemmen (Koch et al., 2012; Ohe et al., 2011), ebenso in vivo (García et al., 2010). Zum Anderen liest man, dass kein (signifikanter) Unterschied in vivo zwischen der OPG-Sekretion bei gesunden und BP-behandelten Patienten zu finden ist (Gulseren et al., 2011; Karadag-Saygi et al., 2011) auch nicht in vitro (Lin et al., 2007; Mackie et al., 2001). Kim und Mitarbeiter (2002) fassen zusammen, dass die Diskussionen über das Rank/RankL/OPG-System sehr kontrovers verlaufen. Verschiedene Autoren haben in ihren Studien eine gleichbleibende RankL-Konzentration und eine erhöhte OPG-Expression festgestellt (Viereck et al., 2002). Koch und Mitarbeiter (2012) beobachteten eine verstärkte RankL-Expression in vitro. Andere erkannten, dass beide Konzentrationen unverändert blieben. Kim und Mitarbeiter (2002) stellten fest, dass RankL- und OPG-Expression 5 Tage nach Therapiebeginn nicht erhöht war. Die Beobachtungen der hier vorgelegten Studie sprechen eher für eine leicht erhöhte Rank/RankL-Konzentration.

Es ist also sehr schwierig, eine generelle Aussage zu treffen. Das ist wenig überraschend, denn die Ergebniss der jeweiligen Studien können von vielen Variablen abhängen: Handelt es sich um eine in-vivo- oder in-vitro-Studie? Welche Krankheit liegt zu Grunde? Welche Zelllinien wurden verwendet? Welches BP in welcher Konzentration wurde zugeführt?

Die meisten Autoren schreiben, dass das Remodeling des Knochens unter BP reduziert ist und die Osteoklasten sowohl in ihrer Funktion gehemmt werden, als auch deren Differenzierung aus Vorläuferzellen unterbunden und ihre Apoptose direkt oder indirekt durch BP herbeigeführt wird (Benford et al., 2001; Ohe et al., 2011; Piesold et al., 2006; Rogers et al., 2011; Shannon et al., 2011). Die Frage ist, ob eine Verstärkung der Proliferationsreize überhaupt etwas ausrichten kann, oder ob es Mechanismen gibt, die viel stärker sind als diese Stimuli und auch in den zuvor demonstrierten Präparaten eine Hemmung der Osteoklasten bewirkt haben.

Yuji und Mitarbeiter (2011) formulieren, dass Osteoklasten, die BP zusammen mit dem Knochen resorbieren, direkt zur Apoptose übergehen. Eine sehr aktuelle in-vitro-Studie von Boanini und Mitarbeiter (2012) beschreibt, dass Osteoklasten auch dann in Apoptose übergehen und in ihrer Funktion gehemmt werden, wenn sie auf einem mit BP angereichertem Hydroxylapatit-Block kultiviert werden. Es wurden erhöhte Caspase-3-Werte gemessen, welches ein Enzym zum Abbau intrazellulärer Organellen ist.

Itzstein und Mitarbeiter (2011) untersuchten die klar bewiesene Hemmung der Proteinprenylation nach Hemmung des Mevalonat-Zyklus, der besonders die kleinen GTPasen in Osteoklasten betrifft. Außerdem akkumuliert ein toxisches Isoprenoid-enthaltendes Abbauprodukt (Green, 2004; Rogers et al., 2011). Dies führt zu gravierenden Funktionsstörungen in den Zellen. Sie zeigten auf, dass sowohl die Versiegelungszone und die „ruffled border“ und der intrazelluläre Vesikeltransport nicht durchgeführt werden. Wenn diese Mechanismen nicht funktionieren, ist es möglich, dass die in dieser Studie untersuchten Spaltenzyme zwar gebildet werden und in den Zellen nachgewiesen werden können, aber gar nicht zum Einsatz kommen. Letztendlich führt dieser Funktionsverlust in den Osteoklasten auch zur Apoptose.

Auf Grund der eigenen Ergebnisse und der aktuellen Literatur liegt die Vermutung nahe, dass das Rank/RankL/OPG-System nicht direkt durch BP beeinflusst wird und dass BP zu einem Zeitpunkt in den Osteoklastenlebenszyklus eingreifen, zu dem das Rank/RankL/OPG-System keine Rolle mehr spielt. Rank und RankL werden nur dann exprimiert, wenn zu wenig Osteoklasten vorhanden sind. Dieses System spielt nur für die Proliferation von Osteoklasten eine Rolle, jedoch nicht für ihre Funktion. Zu derselben Hypothese, dass das Rank/RankL/OPG-System keine wichtige Rolle in der Steuerung der Osteoklasten unter BP-Therapie spielt, kommen Zojer und Mitarbeiter (2005). Der Serumspiegel von Rank/RankL/OPG hatte sich bei ihren Patienten mit Hyperkalzämie und nach BP-Therapie nicht verändert. Bei 80 % der Patienten hatte sich jedoch der Kalziumspiegel normalisiert. Im Folgenden soll die Funktionsfähigkeit der Osteoklasten diskutiert werden.

4.4.3.4 ED1

ED1 wird ausschließlich von Zellen produziert, die phagozytierende Fähigkeiten besitzen, wie mononukleäre Vorläuferzellen im Knochen, Monozyten, Makrophagen und interdigitierende dendritische Zellen. Auch Fibroblasten haben in vitro nach langer Kultivierung bereits positiv reagiert. Man findet immunhistochemisch einige dunkle Granula im Zytoplasma vor (Damoiseaux et al., 1994). Untersuchungen von Damoiseaux und Mitarbeiter (1994) bestätigten die Vermutung, dass diese glykosylierten Proteine auf zytoplasmatischen Granula vorkommen, zu einem geringen Anteil jedoch auch auf der Zelloberfläche. ED1 steht in Zusammenhang mit

der phagozytotischen Aktivität. Wahrscheinlich wird der Marker mit der ersten Phagozytose exprimiert und von nicht aktiven Zellen nicht oder weniger exprimiert. Makrophagen, die aus dem Knochenmark stammen, sollen ED1 besonders stark exprimieren, weil sie wahrscheinlich viel Substanz abbauen müssen (Damoiseaux et al., 1994).

In den Färbungen wurden auch ganz selektiv Makrophagen und Osteoklasten angefärbt (vgl. Abb. 20). Da Osteoklasten stark polarisierte Zellen sind, erkennt man, dass eine Seite der Zelle immer dichter granuliert ist, als die andere. Es sind viele Makrophagen im Bindegewebe angefärbt. Die Menge der angefärbten Osteoklasten entsprach der unter TRAP beschriebenen Verteilung. Die Präparate, die dort viele positive Zellen aufwiesen, wiesen bei der ED1-Färbung noch mehr positive Makrophagen und Osteoklasten auf. Es wird auch deutlich, dass die knochenahen Osteoklasten viel dunkler angefärbt sind als die weiter entfernten (vgl. Abb. 19). Diese Reaktion ist schwierig zu bewerten, da wenig über die Funktion von ED1 bekannt ist. Sie verdeutlicht nur, dass viel mehr phagozytierende Zellen, respektive Osteoklasten, am Knochensaum vorhanden sind, als in der TRAP-Färbung deutlich wurde. Da nicht bekannt ist, ob ED1 nur bei zunehmender Phagozytose ausgeschüttet wird, oder immer vorhanden ist, kann über den Aktivitätsgrad der dargestellten Zellen keine Aussage getroffen werden.

Osteoklasten nehmen über Phagozytose die BP von der Knochenoberfläche auf. Danach werden sie, wie oben erläutert, durch BP resorptionsunfähig gemacht und die Osteoklasten lösen sich vom Knochen. Irgendwann gehen sie danach dann in die Apoptose über. Entsprechend der hier aus den vorliegenden Ergebnissen entwickelten Theorie differenzieren immer mehr Vorläuferzellen zu Osteoklasten, da die meisten Osteoklasten nach dem ersten Resorptions-versuch funktionsunfähig werden. Daher resultiert das Bild der vielen inaktiven Osteoklasten, die alle relativ klein sind und von der Knochenoberfläche entfernt im interseptalen Bindegewebe liegen. Wenn ED1 von allen Zellen des mononukleären Phagozytensystems exprimiert wird, ohne dass sie dazu bereits phagozytiert haben müssen, wurden diese Zellen angefärbt. Sie wurden aber auch angefärbt, wenn Phagozytose die Voraussetzung für die ED1-Expression ist. Um durch BP deaktiviert worden zu sein, müssen sie diese zuerst phagozytieren. Welchen Aktivitätsgrad die angefärbten Zellen in den untersuchten Präparaten nun haben, ist mit dieser Färbung nicht dazustellen.

4.4.3.5 Cathepsin K

Cathepsin K ist eine osteoklastäre Protease zum Abbau von Kollagen 1. Laut Literatur wird sie von keinem anderen Zelltypus als von Osteoklasten gebildet (Boonen et al., 2012). Umso mehr verwundert es, dass die Färbung etwas willkürlich erschien. Zwar waren die Osteoklasten alle stärker angefärbt worden, aber es waren auch noch Lining cells und Fibroblasten mit angefärbt. Deutlich wird, dass die Osteoklasten auf jeden Fall das katalytische Enzym gebildet haben (Abb. 21). Im gesunden Präparat sah man jedoch, wie ein Osteoklast ganz eng auf dem Knochen aufsitzt und an der basolateralen Seite Cathepsin-K-Granula angesammelt hat. Im Präparat 2343 aus der Gruppe 1 fanden sich zwei Osteoklasten, die dem Knochen dicht anliegen und die Protease in ihre Resorptionslakune sezernieren (vgl. Abb. 21). Ansonsten fand man keinen Hinweis darauf, dass in den Zellen das vorhandene Cathepsin von all den angefärbten Osteoklasten auch tatsächlich ausgeschüttet wird. Da die BP nicht alle Osteoklasten vollständig hemmen, sondern nur die Anzahl der aktiven Osteoklasten reduzieren und die Aktivitätsspanne des einzelnen Osteoklasten vermindern sollen, ist es durchaus möglich, dass der eine oder andere Osteoklast gerade aktiv war und Resorption betrieben hat. Außerdem muss jeder Osteoklast zunächst BP-haltigen Knochen resorbieren und dafür Cathepsin K ausschütten. Da es sich hierbei nicht um ein Signalprotein wie RankL oder OPG handelt, sondern um ein degradierendes Enzym, kann man davon ausgehen, dass es nicht frei im Gewebe vorkommt und die Anfärbung der anderen Strukturen keine Bedeutung hat.

Nach Auswertung der histologischen Präparate und Herleitung der oben beschriebenen Theorie über die große Anzahl an Osteoklasten fanden sich nach gezielter Literaturrecherche einige Autoren, die ähnliche Funde publizierten und sehr ähnliche Schlüsse daraus gezogen hatten. Eine Studie von Ralte und Mitarbeitern (2011) untersuchte die Wirkung von BP auf Osteoklasten im Tierversuch. Histologisch erkannten sie, dass die Anzahl der Osteoklasten stark vergrößert ist. Dies haben schon andere Autoren festgestellt (Rauch et al. 2002; Weinstein et al., 2007; Weinstein et al., 2009). Auch Russell (2011) bespricht diese Befunde, dass Osteoklasten in größerer Anzahl vorliegen, dass aber deren Funktionsfähigkeit höchst wahrscheinlich eingeschränkt ist. Diese Autoren beobachteten auch, dass die Osteoklasten vom Knochensaum losgelöst im intertrabekulären Bindegewebe vorlagen. Weiterhin sahen sie viele Resorptionslakunen, die jedoch sehr klein und flach waren, als ob die Resorption nur sehr schwach verlaufen

oder schnell abgebrochen worden war. Diese Ergebnisse konnten in dieser Studie bestätigt werden. Die Arbeit von Ralte und Mitarbeitern (2011) unterstützt die Ergebnisse dieser Studie und die hier dargestellte Theorie.

4.4.4 Entzündungsspezifische Marker

4.4.4.1 IL1 β

In den Präparaten gesunder Patienten stellten sich sehr unterschiedliche Mengen an IL1 β dar. Das mag an der jeweiligen Abwehrlage des Immunsystems liegen. Da dieses Zytokin beinahe von allen kernhaltigen Zellen produziert werden kann (Baluk et al., 2009), verwundert es nicht, dass alle Zellpopulationen Farbmarkierungen aufweisen. Bei Gruppe 1 und 2 fiel auf, dass die Zellen in Resorptionslakunen besonders stark angefärbt waren (vgl. Abb. 22). Dies könnte evtl. mit der Resorption von BP durch Osteoklasten zusammenhängen, die die Osteoklasten dazu bringt, IL1 β auszuschütten. IL1 β wirkt Osteoklasten aktivierend, indem Osteoblasten zur RankL-Produktion stimuliert werden (Fernández et al., 2010), daher könnten sie sich in der Nähe zu Osteoklasten anlagern.

4.4.4.2 TNF α

In der gesunden Vergleichsgruppe konnte eine mittelstarke Reaktion der Zellen nah zum Knochensaum festgestellt werden. Entzündungszellen fielen nicht auf. Die Lining cells, Osteoblasten und Fibroblasten in Gruppe 1 wurden in größerer Anzahl angefärbt als in der Vergleichsgruppe, die Farbreaktion auf den Marker war intensiver (vgl. Abb. 23). Gruppe 2 zeigte ebenfalls eine stärkere Reaktion als in der Vergleichsgruppe, jedoch lagen hier immer wieder ungefärbte Areale neben gefärbten Arealen vor.

Kunzmann und Mitarbeiter (2000) stellten fest, dass BP eine gewisse T-Zellpopulation zur Produktion inflammatorischer Zytokine anregen, entweder direkt oder durch Isopentenylpyrophosphate, welche nach der Blockade des Mevalonatstoffwechsels akkumulieren. Eine

solche gesteigerte Entzündungsreaktion könnte eine Ursache für eine BRONJ sein. T-Zellen sind jedoch nicht die einzigen Zellen, die inflammatorische Zytokine ausschütten, wie die Reaktion der Präparate zeigt, sondern auch Osteoblasten und Fibroblasten. Auch Deng und Mitarbeiter (2007) und Ferretti und Mitarbeiter (2005) fanden heraus, dass Alendronat bei Mäusen eine verstärkte IL1 β - und TNF α -Freisetzung, aus verschiedenen Zellpopulationen stimuliert. Papadaki und Mitarbeiter (2004) hingegen vermuten, dass BP die Produktion von inflammatorischen Zytokinen durch Hemmung von Zellen des monozytären Systems mindern können.

Leider muss man feststellen, dass es viele sich widersprechende Theorien auch zu diesem Thema gibt (D'amelio et al., 2008). Die Einen berichten von einer Steigerung, die Anderen von einer Senkung der Zytokinausschüttung unter BP-Therapie. Bei den hier untersuchten Humanpräparaten ließ sich eine gegenüber der Vergleichsgruppe leicht bis mittelstark erhöhte Zytokinausschüttung besonders in Knochenrandnähe feststellen.

Nach der Infusion von BP wird eine vorübergehende Temperaturerhöhung beschrieben, was eine akute Phase Reaktion zu sein scheint. Nach BP-Infusion kommt es stets zu einer erhöhten Ausschüttung von TNF α und IL1 β , dieser Anstieg ist bei einem Fieberschub noch höher. 7 Tage nach der Infusion konnte ein Wiederabfallen der TNF α -Werte im Blut auf normale Werte beobachtet werden (Dicuonzo et al., 2003, Ferretti, et al., 2005). Einige andere Autoren untersuchen ebenfalls diese akute Phase Reaktion (Lim et al., 2010; Rossini et al., 2011), jedoch scheint sie für die hier vorliegende Vergleichsstudie nicht so relevant, da sie nach einigen Stunden wieder nachlässt. Außerdem lag die letzte Infusion bei den Patienten dieser Studie länger als 7 Tage zurück. Dennoch führen BP bei systemischer Gabe zunächst zu einer Abwehrreaktion im Körper. Laut den Ergebnissen aus der Patientenuntersuchung bleibt der Spiegel der Entzündungsmarker unter BP-Therapie erhöht. Sie leiten bei vielen entzündlichen Erkrankungen auch einen Knochenverlust ein, ebenso aber auch bei degenerativen Erkrankungen wie z.B. der Osteoporose. Diese Vermutung wird durch verschiedene Studien belegt. Ursache ist u.a. eine direkte Osteoklastenaktivierung oder auch indirekt mittels Steigerung der RankL-Ausschüttung durch diese Zytokine. Weiterhin mindern sie die Knochendichte durch Störung der Osteoblastenproliferation und Knochenbildung, u. a. durch die Hemmung von Runx2 (Ding et al., 2009). TNF α soll auch für die entzündliche Implantatabstoßung im Kieferbereich verantwortlich sein (Schwarz et al., 2000).

Eine leicht gesteigerte Entzündungsreaktion könnte die Ausdehnung einer Nekrose im Knochen fördern. Zwar ist nicht von einem Knochenverlust durch gesteigerte Osteoklastenfunktion auszugehen, jedoch kann eine bakterielle Besiedlung durch eine verstärkte Abwehrreaktion beantwortet werden, was zu zunehmender Gewebsdestruktion führt und somit das nekrotische Areal vergrößert. Die akute Phase Reaktion ist eine zeitlich begrenzte Reaktion, die keine langanhaltenden Auswirkungen auf diesen Mechanismus hat. Außerdem liegt der Zeitpunkt der BP-Infusion bei den untersuchten Patienten immer mehr als eine Woche zurück.

Das Auftreten von Entzündungsmediatoren im Zusammenhang mit BP wurde abgesehen von der akute Phase Reaktion noch nicht weiter untersucht. Die hier aufgeführten Ergebnisse werfen die Frage auf, ob BP eine generalisierte Entzündungsreaktion im gesamten Körper oder nur im Knochen auslösen und ob diese einen Einfluss auf die Entwicklung einer Nekrose haben können. Dieser Fragestellung sollte in weiteren Studien nachgegangen werden.

4.4.4.3 MMP8

MMP8 ist wie Cathepsin K eine Protease zum Abbau von Kollagen I, III und II. Wie erwartet reagierte MMP8 in den Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten der Präparate (vgl. Abb. 24). Sasano und Mitarbeiter (2002) beschreiben, dass MMP8 auch von Zellen der Osteoblastenlinie gebildet wird wie Osteoblastenprogenitorzellen, Osteozyten, Chondrozyten und Muskelzellen. Fibroblasten sollen ebenfalls MMP8 produzieren können (Danielsen et al., 2011). Da sie interstitiell als Proenzym vorliegen (Mecham und Parks, 1998), können sie ubiquitär auftreten. Somit erkannte man MMP8 in einigen Lining cells, Fibroblasten, Gefäßwänden und Kollagenfasern. Die Reaktion fiel insgesamt aber mittelstark aus, manche Areale sind nicht angefärbt. Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen der BP-Patienten war nicht festzustellen. Vereinzelt fanden sich Osteoklasten, die basolateral vermehrt MMP8-positive Granula enthalten und diese gerade in Richtung Knochen sezerniert hatten. Dort zeigte sich dann eine wolkige Ansammlung gefärbter Granula.

In Wunden scheint MMP8 durch Gefäßveränderungen, Ischämie oder auch beim Diabetes besonders stark exprimiert zu werden und kann bisweilen zu einer verzögerten Wundheilung

führen, da MMP8 die neu gebildeten Kollagenfasern abbaut (Danielsen et al., 2011). Es wirkt stark chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, von denen es maßgeblich produziert wird und die die Hauptakteure einer akuten Entzündung sind (Sautter et al., 2011). Insgesamt verstärkt dieses Enzym eine akute Entzündungssituation und beeinträchtigt die Wundheilung. In den untersuchten Präparaten der mit BP behandelten Patienten war keine gesteigerte Farbreaktion dieser Protease gegenüber den gesunden Präparaten zu finden. Eine verstärkte Expression unter BP-Therapie könnte eine Nekrose des Knochens durch übermäßige Entzündung oder verhinderte Wundheilung fördern.

Auf der anderen Seite fanden García und Mitarbeiter (2010) in ihrer Studie heraus, dass Mäuse mit MMP8-Mangel stärkere Entzündungen aufwiesen als Wildtypmäuse. Sie zitieren andere Studien, die zu ähnlichen Ergebnissen kamen und vermuten, dass das Fehlen einer MMP von anderen MMPs überkompensiert wird. Letztendlich ist ein normaler Spiegel an MMP8 ein Schutz vor übermäßiger Entzündungsreaktion. Somit waren die Patienten beider BP-Gruppen keinem übermäßigen Entzündungsrisiko zumindest durch Veränderungen Mengen an MMP8 ausgesetzt.

4.4.5 Gefäßsystemspezifische Marker

4.4.5.1 VEGF und vWF

Die Reaktion auf den VEGF-Antikörper erfolgte in den gesunden Vergleichspräparaten minimal stärker als in den Präparaten von Gruppe 1. Im Vergleich zu anderen Markern reagierten die Präparate recht schwach. In der Vergleichsgruppe waren alle Zellen schwach angefärbt, in beiden BP-Gruppen (1 und 2) waren jedoch die Gefäßwände, Endothelzellen und Osteoblasten mittelstark angefärbt. Auch manche Osteoklasten waren angefärbt, nachdem sie wahrscheinlich VEGF-haltige Strukturen resorbiert hatten. VEGF ist für den Erhalt der Endothelzellen verantwortlich und diese tragen einen entsprechenden Rezeptor, ebenso wie die Osteoblasten (Ferrara und Alitalo, 1999; Matos et al., 2011). Osteoblasten induzieren die Angiogenese bei Knochenneubildung. Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen für einen gesunden Knochenstoffwechsel.

Dieses Ergebnis ist überraschend, denn gemeinhin wird die Theorie vertreten, dass die VEGF-Produktion unter der Einwirkung von Zoledronat oder Pamidronat deutlich reduziert wird (Santini et al., 2003; Santini et al., 2006). Diese Feststellungen können nicht bestätigt werden. Eine andere Studie bestätigt dies jedoch wiederum. Dort wurde bei 24 Patienten vor und während 12-wöchiger BP-Therapie regelmäßig der VEGF-Spiegel im Blut bestimmt, der sich über den gesamten Zeitraum nicht veränderte. Eine andere Studie von Ferretti und Mitarbeiter (2005) bestimmte die VEGF-Konzentration im Blut vor der Infusion von BP, am 2. und am 7. Tag danach. Sie nahm zunächst ab, am 7. Tag lag sie jedoch höher, als vor der Infusion.

Wichtig ist es auch hier die Verbindung zum Entzündungsmediator $\text{TNF}\alpha$ herzustellen. Entzündungen sind verbunden mit starker Blut- und Lymphgefäßproliferation. Es ist sehr wahrscheinlich, dass $\text{TNF}\alpha$ die Gefäßausprossung in entzündeten Geweben vorantreibt (Baluk et al., 2009). Die 5 Proben, die eine starke Reaktion auf VEGF gezeigt haben, zeigten auch eine starke Entzündungsreaktion mit vielen Granulozyten und Lymphozyten in der Übersichtsfärbung und eine kräftige $\text{TNF}\alpha$ -Färbung. Daraus könnte man schließen, dass auf Grund des erhöhten $\text{TNF}\alpha$ vermehrt VEGF ausgeschüttet wird. Andere Autoren konnten feststellen, dass die Gefäßprossung abnimmt, wenn $\text{TNF}\alpha$ medikamentös gehemmt wird (DeBusk et al., 2003). Auch Ohba und Mitarbeiter (2009) fanden heraus, dass $\text{TNF}\alpha$ *in vitro* zu einer verstärkten VEGF-Expression führen kann. Es ist kaum festzustellen, ob die BRONJ aus einer Entzündung entsteht oder die Entzündung erst nach der Nekrose erfolgt. Wäre erst die Entzündung da, so würde ein erhöhter Spiegel an Entzündungsmediatoren ein Absinken des VEGF-Spiegels verhindern. Entsteht die Entzündung jedoch sekundär, so könnte eine erhöhte Vaskularisierung nicht mehr zur Ausheilung der Entzündung führen. In beiden Fällen aber scheint der Zusammenhang zwischen $\text{TNF}\alpha$ und VEGF keine Rolle für die Verhinderung einer BRONJ zu spielen.

Die Schnitte, die auf vWF untersucht wurden, zeigten eine ausgesprochen kräftige Färbung der Gefäßwände und Endothelzellen in allen 3 Gruppen. Alle Präparate waren reichlich vaskularisiert mit dem einzigen Unterschied, dass Gruppe 1 und 2 mehr kleinlumige Gefäße aufwiesen (vgl. Abb. 26), in der gesunden Gruppe 3 erschien die Menge der Gefäße gleich, jedoch waren die Lumina der meisten Gefäße größer (vgl. Abb. 27). Dieser Umstand findet interessanter Weise Erwähnung in einer Studie von Allan und Burr (2009). Sie sagen, dass das Blutvolumen pro Knochenmasse erheblich variieren kann in Abhängigkeit von der metabolischen Aktivität.

Vorrausgesetzt, dass das Remodeling, also die metabolische Aktivität, unter BP-Therapie tatsächlich herabgesetzt ist, würde der Knochen geringer durchblutet, was speziell beim Kiefer, der habituell ein stark durchbluteter Knochen ist, Folgen haben könnte. Weiter besagt ihre Hypothese, dass auf Grund des geringeren Blutvolumens die Gefäßarchitektur verändert wird und der Durchmesser der Gefäße verringert wird. Damit kann das Knochengewebe nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Aber nicht nur Nährstoffe werden über Gefäße transportiert, es sitzen auch Osteoblastenvorläuferzellen in Knochengefäßwänden (Schipani et al., 2009). Deren Anzahl würde damit gleichzeitig reduziert und somit die Regenerationsfähigkeit des Knochens herabgesetzt. Insgesamt scheint die Gefäßreichtum in den hier untersuchten Proben nicht verringert, jedoch erscheinen die Gefäße - wie bereits erwähnt - kleiner. Damit unterstützen die immunhistologischen Befunde diese These.

Eine andere Studie den Erfolg chirurgischer BRONJ Therapie an 33 Patienten und es wurde beobachtet, dass trotz aller negativen Vermutungen die die Nekrose umgebenden Weichewebe eine ausreichende Blutzufuhr zeigten und normal bluteten (Stanton und Balasanian, 2009). Diese Beobachtung spricht wiederum dafür, dass das zugeführte Blutvolumen gegenüber gesunden Patienten zumindest augenscheinlich nicht verringert war.

Yin und Mitarbeiter (2011) führten eine neue Hypothese ein. Neueste Forschungsergebnisse besagen, dass Osteoklasten über einen MMP9-abhängigen Mechanismus für die Angiogenese von entscheidender Bedeutung sind. Diese Rolle übernehmen sie besonders im Kieferknochen. In langen Röhrenknochen spielen Osteoblasten in angiogenetischer Hinsicht eine größere Rolle. Somit ist der Kieferknochen in dieser Hinsicht mehr gefährdet als der Rest des Skeletts. Dies erklärt in ihren Augen auch die Tatsache, dass bei anderen antiangiogenetisch wirkenden Medikamenten keine Osteonekrose des Kiefers eintritt, da bei BP die Wirkung auf das Gefäßsystem über die Hemmung der Osteoklasten vermittelt werden könnte. Baud'huin und Mitarbeiter (2009) fanden in ihrer Arbeit heraus, dass der vWF an RANKL und OPG bindet, und somit die durch RANKL induzierte Osteoklastogenese hemmt, und mit OPG zusammen synergistische Effekte entwickelt. Endothelzellen speichern in ihren Weibel-Palade-Körpern den OPG-vWF-Komplex, der bei Entzündung verstärkt ausgeschüttet wird. Das bedeutet, dass im entzündeten Knochen weniger Osteoklastogenese stattfinden sollte. Das könnte einer Nekrose Vorschub leisten, da erkranktes Knochenareal generell schlechter abgebaut wird. In dieser Studie

zeigen die nekrotischen Präparate aber keine höhere vWF-Expression, als die anderen. Diese Arbeiten zeigen, wie viele wechselseitige Verknüpfungen zwischen Gefäßsystem und Knochenmetabolismus bestehen, die als hoch komplexe Mechanismen für die Entwicklung einer BRONJ anfällig und ursächlich sein könnten.

Die Argumente und Forschungsergebnisse für die Theorie der gestörten Angiogenese und Vaskularisation sind überzeugend und vielfältig. Bekannt ist die Fibrosierung der Gefäße nach Bestrahlung des Knochens als Ursache für die Osteoradionekrose. Auch eine zunehmende Anzahl von Fällen einer Osteonekrose des Kiefers nach Gabe von Bevacizumab[®] (Guarneri et al., 2010; Hopp et al., 2012), welches VEGF bindet und die Angiogenese unterdrückt, weisen darauf hin, dass mangelnde Durchblutung durchaus eine Osteonekrose auslösen kann. Ob die Übertragung dieser Mechanismen auf die Fälle der BRONJ möglich ist, sollte weiterhin durch in-vivo-Studien kritisch geprüft werden. Eine Studie (Bagan et al., 2009) an 2 Patientengruppen, eine mit Osteoradionekrose (20 Patienten) und eine mit BRONJ, fand keinen großen Unterschied zwischen den klinischen Erscheinungsbildern der nekrotischen Läsionen. Jedoch fiel auf, dass in der Gruppe der Kieferknochennekrose durch BP 66 % der Patienten eine Nekrose nach Zahnextraktion entwickelten. In der Studie von Hopp und Mitarbeiter (2012) erlitten die Patienten mit Bevacizumab[®]-Medikation nur 40 % Osteonekrosen nach Zahnextraktion, die restlichen Patienten entwickelten eine spontane Nekrose, also ohne Zahnextraktion. Die Prozentzahlen zeigen, dass bei der BRONJ sicher ein andere Wirkungsmechanismen neben der mangelnden Durchblutung zur Nekrose führen müssen. Allen und Burr (2009) fassen zusammen, dass es viele sich widersprechende Aussagen zum Thema der antiangiogenetischen Eigenschaften der BP gibt. In-vitro-Studien belegen öfter die antiangiogenetischen Eigenschaften, in-vivo-Studien belegen diese weitaus seltener.

Die hier vorgelegte Studie konnte bestätigen, dass der Gefäßreichtum nicht verringert wurde, jedoch der Gefäßdurchmesser unter BP-Behandlung abnahm. Außerdem blieb in den Präparaten der VEGF-Gehalt gleich dem in gesunden Präparaten. Es fiel auf, dass mehr Patienten eine BRONJ in der Mandibula aufwiesen, die weniger durchblutet ist als der Oberkiefer und damit durch eine Durchblutungshemmung stärker beeinträchtigt wird. Diese Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass das Blutvolumen im Kieferknochen bei den untersuchten Patienten verringert zu sein schien, indem der Gefäßdurchmesser bei gleichem Gefäßreichtum unter BP-Behandlung

abgenommen hatte. Zur weiteren Klärung dieser Beobachtung sind systematische in-vivo-Studien zu diesem Thema notwendig.

5. Zusammenfassung

Die bisphosphonatinduzierte Osteonekrose des Kiefers ist ein multifaktorielles Geschehen, deren Ursache noch nicht genau geklärt ist. Neben allgemeinen Risikofaktoren die sich aus Lifestylefaktoren, Nebenerkrankungen, Alter und Geschlecht ergeben, gibt es zwei Theorien, die in der Forschung maßgeblich vertreten und untersucht werden. Bisphosphonate hemmen die Osteoklasten und bewirken ihren Zelluntergang, wodurch das Remodeling reduziert wird. Die zweite Theorie beruht auf der Beeinträchtigung der Durchblutung durch BP. Dies wirkt sich besonders im Kieferknochen aus, da dieser eine stärkere Durchblutung erfordert, als andere Knochen des Skeletts.

In dieser Studie wurde mit Hilfe der Immunhistochemie die Reaktion und Verteilung von 15 verschiedenen Enzymen und Zytokinen des Knochenstoffwechsels nach Bisphosphonatbehandlung an chirurgisch entnommenen Humanpräparaten untersucht; 10 Präparate wiesen eine bisphosphonatinduzierte Nekrose auf, 10 Präparate nicht. Diese Ergebnisse wurden denen von Knochenproben gesunder Patienten gegenüber gestellt und mit der aktuellen Literatur verglichen. Ein besonderes Augenmerk war auf die Anzahl, Größe und Verteilung der Osteoklasten gerichtet, sowie auf die Vaskularisation der Präparate. Es sollte dabei der Fragestellung nachgegangen werden, ob eine Ursache der bisphosphonatinduzierten Knochennekrose histologisch feststellbar ist und inwieweit grundlegende Mechanismen des Knochenstoffwechsel gestört werden.

Einige Ergebnisse waren überraschend anders, als gemeinhin in der Literatur beschrieben. Osteoblasten schienen durch die Bisphosphonattherapie kaum beeinflusst zu werden: Alkalische Phosphatase und Osteokalzin blieben unverändert, Bone morphogenic protein-2 lag leicht vermindert und Runx2 etwas erhöht gegenüber den gesunden Vergleichspräparaten vor. Die Produktion von Receptor activator of NF kappa B ligand zeigte sich leicht erhöht, die von Osteoprotegerin vermindert. Die Osteoidbildung ist bei Patienten mit einer BRONJ vermindert. Es fanden sich sehr viele Osteoklasten, die jedoch nicht alle auf die Tartratresistente saure Phosphatase-Färbung reagierten oder nur schwach. Die anderen Färbungen, Receptor activator of NF kappa B, ED1 und Cathepsin K, manifestierten sich in allen Osteoklasten. Anzeichen einer starken Resorption waren jedoch in keiner der beiden Gruppen zu erkennen, nur flache, schmale Resorptionslakunen ohne Osteoklasten konnten nachgewiesen werden. Die Osteoklasten lagen

weit vom Knochen entfernt. Daraus entstand die Theorie, dass Osteoklasten in den untersuchten Präparaten durch Resorption Bisphosphonate aufgenommen haben könnten, danach funktionsunfähig wurden und weit vom Knochen entfernt liegen blieben. Da insgesamt zu wenig Resorption stattfand, stimulierten die Osteoblasten durch erhöhte RankL-Produktion die Osteoklastenproliferation. Dadurch entstanden immer mehr neue Osteoklasten, von denen die allermeisten nach dem ersten Resorptionsversuch jedoch funktionslos wurden.

Hinsichtlich der Theorie einer ursächlich verminderten Durchblutung konnte keine Abnahme des VEGF-Spiegels beobachtet werden, dafür jedoch ein verminderter Gefäßdurchmesser in der vWF-Färbung bei gleichbleibender Gefäßdichte, was zu einer geringeren Durchblutung des Knochens führen kann. Dies könnte durch eine verminderte Resorption bei gleichbleibender Knochenbildung resultieren. Dieses Ergebnis sollte in nachfolgenden Studien untersucht werden. Tumornekrosefaktor α und Interleukin 1β lagen bei beiden Patientengruppen leicht erhöht vor. Tumornekrosefaktor α fördert zwar die VEGF-Expression und somit die Angiogenese. Insgesamt könnte aber eine erhöhte Menge an Entzündungsmediatoren zu einer aggressiveren Gewebszerstörung bei gleichzeitiger bakterieller Besiedlung des Knochens führen. Es stellte sich auch die Frage, ob BP eine auf den Kiefer lokalisierte oder gar generalisierte leichte Entzündungsreaktion auslöst. Dies kann den Verlauf einer BRONJ verschlimmern. Die Marker für MMP8 zeigten keinen Unterschied gegenüber den gesunden Vergleichspräparaten, sodass keine erhöhte Entzündungsgefahr durch Konzentrationsveränderungen dieser Kollagen abbauenden Protease unter Bisphosphonattherapie zu erwarten ist.

Die Forschung an Humanpräparaten in Form der histologischen und immunhistochemischen Untersuchung erlaubt einen direkten Einblick in die Auswirkung des Medikaments auf den menschlichen Organismus. Die hier untersuchte Anzahl der Humanpräparate war limitiert und nicht sehr homogen, sie hat aber wichtige Erkenntnisse erbracht, die es weiter zu untersuchen gilt. Indem man größere Patientengruppen untersucht, könnte man zu einigen Markern gezielte Untersuchungen und Vergleiche anstellen, somit die Übertragbarkeit der in-vitro-Studien auf den Menschen überprüfen und letztlich die Theorien zur Entstehung der BRONJ weiter absichern.

6. Anhang

6.1 Verwendete Reagenzien

TBS-Puffer:	9,0g NaCl
6,06 Tris	
in 1000 ml Aqua dest.	
1 %- bzw. 4 %-iger TBS/BSA-Puffer:	10 ml TBS-Puffer
0,1 bzw. 0,4 g Serumalbumin Rind	
Pepsin, 0,4% :	0,004 g
1 ml 0,01 N Hcl	

6.2 Verwendete Chemikalien

3,3 Diaminobenzidin (DAB)	Fa. Pierce, Rockford, Irland
Alkohole (70%-100%)	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Aquatex	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Azophloxin	Fa. Waldeck, Münster, Deutschland
Depex	Fa. Serra, Heidelberg, Deutschland
Diäthylbarbitursäure	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Diäthylbarbitursäure	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylformamid	Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland
EDTA	Fa. Calbiochem, Darmstadt, Dtl.
Eosinlösung, 1%-ig, wässrig	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung 4%	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxin n. Meyer	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisen-III-Chlorid	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisen-III-Chlorid	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Eisessig	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin gelblich	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlsg., 4%-ig	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Formol, 40%-ig	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Lichtgrün	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Mayer´s saures Hämalaun	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Fa. AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Molybdatophosphorsäure	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Na-Az etat	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Naphtol-AS-Biphosphat	Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Naphtol-AS-Biphosphat	Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumazetat	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrit	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrit- Lsg., 4%- ig	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Orange G	Fa. Waldeck, Münster, Deutschland
Paraffin Histo-Comp	Fa. Vogel, Gießen, Deutschland
Pararosanilin-HCl-Lsg., 4 %-ig	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Pepsin	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Perjodsäure 0,5 %-ig	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 2 mol/l	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Säurefuchsin	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Schiff´s Reagenz	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
TrisHCl Puffer	
Veronalazetatpuffer	Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Weinsäure	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid, 30%-ig	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylolersatz XEM 2000	Fa. Vogel, Gießen, Deutschland

6.3 Verwendete Geräte und Materialien

Analysewaage	Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
Deckgläser	Fa. Engelbrecht, Edermunde, Deutschland
Einbettautomat	Fa. Vogel, Gießen, Deutschland
Glasküvetten	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lichtmikroskop Axioskop 2	Fa. Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskopkamera Axioplan 1	Fa. Zeiss, Jena, Deutschland
Paraffinausgießstation	Fa. Sakura, Heppenheim, Deutschland
Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotationsmikrotom HM 355S	Fa. Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
D Superfrost Plus Objektträger	Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig, Dtl.
Wärmeplatte	Fa. Medax Nagel, Kiel, Deutschland
Wärmeschrank	Fa. Memmert, Schwabach, Deutschland

6.4 Verwendete Primärantikörper

Antikörper:	Art:	Spezies:	Verdünnung:	Inkubation bei:	Firma:
Alkalische Phosphatase	polyklonal	Kaninchen	gebrauchsfertig	24 h, 4°C	Abcam, Cambridge, UK
BMP-2	polyklonal	Ziege	1:25	24 h, 4°C	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Heidelberg, Dtl.
Cathepsin K	polyklonal	Kaninchen	1:200	24 h, 4°C	Zytomed, Berlin, Dtl.
CD 86 Human, ED1	monoklonal	Maus	1:100	1 h, RT	Dako GmbH Heidelberg, Dtl.
IL 1β	polyklonal	Kaninchen	1:100	24 h, 4°C	Endogen, Woburn, USA

Antikörper:	Art:	Spezies:	Verdünnung:	Inkubation bei:	Firma:
MMP 8	monoklonal	Maus	1:50	24h, 4°C	Abcam, Cambridge, UK
OPG	polyklonal	Ziege	1:200	24 h, 4°C	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Heidelberg, Dtl.
Osteocalcin	monoklonal	Maus	1:1000	1 h, RT	TaKaRa Bio Inc., Otsu Shiga, Japan
Rank	polyklonal	Ziege	1:25	24 h, 4°C	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Heidelberg, Dtl.
RankL	polyklonal	Ziege	1:25	24 h, 4°C	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Heidelberg, Dtl.
Runx2	polyklonal	Ziege	1:30	24 h, 4°C	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Heidelberg, Dtl.
TNF α	polyklonal	Kaninchen	1:50	24 h, 4°C	Endogen, Woburn, USA
VEGF	polyklonal	Kaninchen	1:25	1 h, RT	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Heidelberg, Dtl.
vWF	polyklonal	Kaninchen	1:200	1 h, RT	Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen, Dtl.

6.5 Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper:	gerichtet gegen:	Verdünnung:	Inkubation bei:	Firma:
Dako Envision Anti rabbit, HRP konjugiert	Kaninchen	gebrauchsfertig	30 Min., RT	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Dako Envision Anti mouse, HRP konjugiert	Maus	gebrauchsfertig	30 Min., RT	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Dako rabbit Anti goat, HRP konjugiert	Ziege	1:50 in 1 %-igem BS/BSA	30 Min., RT	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland

7. Literaturverzeichnis

Abediazar S, Nakhjavani MR. Effect of alendronate on early bone loss of renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2011; 43: 565-567

Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, Aspenberg P. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. *J Oral Pathol Med* 2012; 41: 494-499

Aft R. Bisphosphonates in breast cancer: Antitumor effects. *Clin Adv Hematol Oncol* 2011; 9: 292-299

Allen MR, Burr DB. Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 987-994

Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: So many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 61-70

Amir E, Trinkaus M, Simmons CE, Dranitsaris G, Clemons MJ. Vascular endothelial growth factor activity after switching of bisphosphonate treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Pathol* 2009; 62: 474-476

Assael LA. Oral bisphosphonates as a cause of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: clinical findings, assessment of risks, and preventive strategies. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 35-43

Badros A, Weikel D, Salama A, Goloubeva O, Schneider A, Rapoport A, Fenton R, Gahres N, Sausville E, Ord R, Meiller T. Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: Clinical features and risk factors. *J Clin Oncol* 2006; 24: 945-952

Bagan JV, Jiménez Y, Hernández S, Murillo J, Díaz JM, Poveda R, Carbonell E, Sanchis JM, Gavaldá C, Scully C. Osteonecrosis of the jaws by intravenous bisphosphonates and osteoradionecrosis: A comparative study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; 14: 616-619

Baluk P, Yao LC, Feng J, Romano T, Jung SS, Schreiter JL, Yan L, Shealy DJ, McDonald DM.

TNF-alpha drives remodeling of blood vessels and lymphatics in sustained airway inflammation in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 2954-2964

Bamias A, Kastritis A, Bamia C, Mouloupoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, Koutsoukou V, Gika D, Anagnostopoulos A, Papadimitriou C, Terpos E, Dimopoulos MA. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: Incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8580-8587

Barry CP, Ryan CD, Stassen LF. Osteomyelitis of the maxilla secondary to osteopetrosis: A report of 2 cases in sisters. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65: 144-147

Bartl R, Tresckow E, Bartl C. Bisphosphonat Manual. Berlin - Heidelberg: Springer, 2006

Bathi RJ, Masur VN. Pyknodysostosis—A report of two cases with a brief review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000; 29: 439-442

Baud'huin M, Duplomb L, Téletchéa S, Charrier C, Maillason M, Fouassier M, Heymann D. Factor VIII-von Willebrand factor complex inhibits osteoclastogenesis and controls cell survival. *J Biol Chem* 2009; 284: 31704-31713

Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: Preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone* 2011; 49: 50-55

Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: The role of alkalinephosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* 1991; 14: 27-40

Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttall ME, Rogers MJ. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone*. 2001; 28: 465-473

Berenson JR. Antitumor effects of bisphosphonates: From the laboratory to the clinic. *Curr Opin Support Palliat Care* 2011; 5: 233-240

Bigi MM, Escudero ND, Ubios AM, Mandalunis PM. Evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in interradicular bone marrow in olpadronate treated animals. *Acta Odontol Latinoam* 2010; 23: 265-269

Bilezikian JP. Osteonecrosis of the jaw – do bisphosphonates pose a risk? *N Engl J Med* 2006; 355: 2278–2281

Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, Cosman F, Lakatos P, Leung PC, Man Z, Mautalen C, Mesenbrink P, Hu H, Caminis J, Tong K, Rosario-Jansen T, Krasnow J, Hue TF, Sellmeyer D, Eriksen EF, Cummings SR. For the HORIZON Pivotal Fracture Trial: Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 1809-1822

Boanini E, Torricelli P, Gazzano M, Fini M, Bigi A. The effect of zoledronate-hydroxyapatite nanocomposites on osteoclasts and osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 2012; 33: 722-730

Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, Rodriguez-Portales JA, Downs RW, Gupta J, Santora AC, Liberman UA. Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004; 350: 1189-1199

Boonen S, Rosenberg E, Claessens F, Vanderschueren D, Papapoulos S. Inhibition of Cathepsin K for Treatment of Osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2012; 10: 73-79

Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA, Sturm I, Massenkeil G. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: Prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. *Oral Oncol* 2008; 44: 857-869

Boyce RW, Paddock CL, Franks AF, Jankowsky ML, Eriksen EF. Effects of intermittent hPTH(1-34) alone and in combination with 1,25(OH)(2)D(3) or risedronate on endosteal bone remodeling in canine cancellous and cortical bone. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 600-613

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473: 139-146

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337–342

Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King A, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: A critical review. *Cell Signal* 2011; 23: 609-620

Brennan O, Kennedy OD, Lee TC, Rackard SM, O'Brien FJ. Effects of estrogen deficiency and bisphosphonate therapy on osteocyte viability and microdamage accumulation in an ovine model of osteoporosis. *J Orthop Res* 2011; 29: 419-424

Buttazzoni M, Rosa Diez GJ, Jager V, Crucelegui MS, Algranati SL, Plantalech L. Elimination and clearance of pamidronate by haemodialysis. *Nephrology* 2006; 11: 197-200

Byrjalsen I, Leeming DJ, Qvist P, Christiansen C, Karsdal MA. Bone turnover and bone collagen maturation in osteoporosis: Effects of antiresorptive therapies. *Osteoporos Int* 2008; 19: 339-348

Carlson ER, Basile JD. The role of surgical resection in the management of Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 85-95

Chapurlat RD, Laroche M, Thomas T, Rouanet S, Delmas PD, de Vernejoul MC. Effect of oral monthly ibandronate on bone microarchitecture in women with osteopenia - a randomized placebo-controlled trial. *Osteoporos Int* 2012; 24: 311-320

Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D. Vascular permeability factor: A tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990; 172: 1535-1545

Cornish J, Bava U, Callon KE, Bai J, Naot D, Reid IR. Bone-bound bisphosphonate inhibits growth of adjacent non-bone cells. *Bone* 2011; 49: 710-716

Cremers S, Papapoulos S. Pharmacology of bisphosphonates. *Bone* 2011; 49: 42-49

Croucher P, DeRaeve H, Perry M. Zoledronic acid prevents the development of osteolytic bone disease and increases survival time in a murine model of multiple myeloma. *Bone* 2002; 30: 39-47

Cuenca AG, Cheng FD, Wang HW. Modulation of antigen-presenting cells (APCs) function by aminobisphosphonates enhances T-cell priming and prevents tumor-induced T-cell tolerance. *Blood* 2001; 98: 235-245

D'Amelio P, Grimaldi A, Di Bella S, Tamone C, Brianza SZ, Ravazzoli MG, Berna bei P, Cristofaro MA, Pescarmona GP, Isaia G. Risedronate reduces osteoclast precursors and

cytokine production in postmenopausal osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 373-379

Damoiseaux JG, Dopp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD. Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* 1994; 83: 140-147

Danielsen PL, Holst AV, Maltesen HR, Bassi MR, Holst PJ, Heinemeier KM, Olsen J, Danielsen CC, Poulsen SS, Jorgensen LN, Agren MS. Matrix metalloproteinase-8 overexpression prevents proper tissue repair. *Surgery* 2011; 150: 897-906

DeBusk LM, Chen Y, Nishishita T, Chen J, Thomas JW, Lin PC. Tie2 receptor tyrosine kinase, a major mediator of tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2461-2471

Deng X, Yu Z, Funayama H, Yamaguchi K, Sasano T, Sugawara S, Endo Y. Histidine decarboxylase stimulating and inflammatory effects of alendronate in mice: Involvement of mevalonate pathway, TNFalpha, macrophages, and T-cells. *Int. Immunopharmacol* 2007; 7: 152-161

Dicuonzo G, Vincenzi B, Santini D, Avvisati G, Rocci L, Battistoni F, Gavasci M, Borzomati D, Coppola R, Tonini G. Fever after zoledronic acid administration is due to increase in TNF-alpha and IL-6. *J Interferon Cytokine Res* 2003; 23: 649-654

Diel IJ, Fogelman I, Al-Nawas B, et al. Pathophysiology, risk factors and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Is there a diverse relationship of amino- and nonaminobisphosphonates? *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64: 198-207

Dimitrakopoulos I, Magopoulos C, Katopodi T. Mandibular osteomyelitis in a patient with pyknodysostosis: A case report of a 50-year misdiagnosis. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65: 580-585

Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-508

Ding J, Ghali O, Lencel P, Broux O, Chauveau C, Devedjian JC, Hardouin P, Magne D. TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci* 2009; 84: 499-504

- Dodson TB. Intravenous bisphosphonate therapy and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 44-52
- Doi Y, Miyazaki M, Yoshiiwa T, Hara K, Kataoka M, Tsumura H. Manipulation of the anabolic and catabolic responses with BMP-2 and zoledronic acid in a rat femoral fracture model. *Bone* 2011; 49: 777-782
- Dominguez LJ, Di Bella G, Belvedere M, Barbagallo M. Physiology of the aging bone and mechanisms of action of bisphosphonates. *Biogerontology* 2011; 12: 397-408
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*. A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89: 747-754
- Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, Ebetino FH, Rogers MJ. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296: 235-242
- Dunstan CR, Felsenberg D, Seibel MJ. Therapy insight: The risks and benefits of bisphosphonates for the treatment of tumor-induced bone disease. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4: 42-55
- Durie BG, Katz M, McCoy J. Osteonecrosis of the jaws in myeloma: Time dependent correlation with Aridia and Zometa use. *Blood* 2004; 104: 756-768
- Eriksen EF, Melsen F, Sod E, Barton I, Chines A. Effects of long-term risedronate on bone quality and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis. *Bone* 2002; 31: 620-625
- Estilo CL, Fornier M, Farooki A, Carlson D, Bohle G 3rd, Huryn JM. Osteonecrosis of the jaw related to bevacizumab. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4037-4038
- Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000; 103: 41-50
- Ferlitoa S, Puzzoa S, Palermob F, Verzia P. Available Treatment of bisphosphonate-related

osteonecrosis of the jaws: Presentation of a protocol and an observational longitudinal study of an Italian series of cases. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2011; 50: 425-429

Fernández M, Pino AM, Figueroa P, Rodríguez JP. The increased expression of receptor activator of nuclear-kappaB ligand (RANKL) of multiple myeloma bone marrow stromal cells is inhibited by the bisphosphonate ibandronate. *J Cell Biochem* 2010; 111: 130-137

Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 1999; 5: 1359-1364

Ferretti G, Fabi A, Carlini P, Papaldo P, Cordiali Fei P, Di Cosimo S, Salesi N, Giannarelli D, Alimonti A, Di Cocco B, D'Agosto G, Bordignon V, Trento E, Cognetti F. Zoledronic-acid-induced circulating level modifications of angiogenic factors, metalloproteinases and proinflammatory cytokines in metastatic breast cancer patients. *Oncology* 2005; 69: 35-43

Fleisch H, Russell R, Francis M. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 1969; 165: 1262

Fleisch HA. Bisphosphonates: Preclinical aspects and use in osteoporosis. *Annals of Medicine* 1997; 29: 55-62

Fleisher KE, Glickman RS. Risk factors for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2011; 69: 959-960

Francis M, Russell R, Fleisch H. Diphosphonate inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcifications in vivo. *Science* 1969; 165: 1264-1266

García S, Forteza J, López-Otin C, Gómez-Reino JJ, González A, Conde C. Matrix metalloproteinase-8 deficiency increases joint inflammation and bone erosion in the K/BxN serum-transfer arthritis model. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: 224-223

Garetto LP, Tricker ND. Remodeling of bone surrounding the implant interface, in Garetto LP, Turner CH, Duncan RL. *Bridging the Gap Between Dental & Orthopaedic Implants*. 3rd Annual Indiana Conference. Indianapolis, IN, 1998; 98-100

Gebara SN, Moubayed H. Risk of osteonecrosis of the jaw in cancer patients taking bisphosphonates. *Am J Health Syst Pharm* 2009; 66: 1541-1547

Geoffroy V, Paschalis EP, Libouban H, Blouin S, Ostertag A, Chappard D, Cros M, Phipps R, de Vernejoul MC. Effects of risedronate in Runx2 overexpressing mice, an animal model for evaluation of treatment effects on bone quality and fractures. *Calcif Tissue Int* 2011; 88: 464-475

Giner M, Rios MJ, Montoya MJ, Vázquez MA, Miranda C, Pérez-Cano R. Alendronate and raloxifene affect the osteoprotegerin/RANKL system in human osteoblast primary cultures from patients with osteoporosis and osteoarthritis. *Eur J Pharmacol* 2011; 650: 682-687

Gliklich R, Wilson J. Epidemiology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: The utility of a national registry. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 71-74

Green JR. Bisphosphonates: Preclinical review. *Oncologist* 2004; 4: 3-13

Guarneri V, Miles D, Robert N, Diéras V, Glaspy J, Smith I, Thomssen C, Biganzoli L, Taran T, Conte P. Bevacizumab and osteonecrosis of the jaw: Incidence and association with bisphosphonate therapy in three large prospective trials in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 122: 181-188

Gulseren A, Peyman B, Pinar A. Evaluation of weekly risedronate treatment in postmenopausal women with osteoprotegerin. *Panminerva Med* 2011; 53: 75-80

Harper RP, Fung E. Resolution of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the mandible: Possible application for intermittent low-dose parathyroid hormone [rhPTH(1-34)]. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65: 573-580

Hassan MQ, Tare RS, Lee SH, Mandeville M, Morasso MI, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. BMP2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network. *J Biol Chem* 2006; 28: 40515-40526

Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: Vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 1989; 69: 990-1047

Heino TJ, Aström E, Laurencikas E, Sävendahl L, Söderhäll S. Intravenous pamidronate treatment improves growth in prepubertal osteogenesis imperfectapatients. *Horm Res Paediatr* 2011; 75: 354-361

Heymann D, Ory B, Gouin F, Green JR, Rédini F. Bisphosphonates: New therapeutic agents for

the treatment of bone tumors. *Trends Mol Med* 2004; 10: 337-343

Ho JW. Bisphosphonate stimulation of osteoblasts and osteoblastic metastasis as a mechanism of hypocalcaemia. *Med Hypotheses* 2011; 78: 377-379

Hoefert S, Eufinger H. Mögliche unerwünschte Nebenwirkungen von Bisphosphonaten im Kieferbereich. *Zahnärztl Mitteilungen* 2004; 19: 50-54

Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *Jama* 2004; 292: 490–495

Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, Nooka A, Sayegh G, Guarneri V, Desrouleaux K, Cui J, Adamus A, Gagel RF, Hortobagyi GN. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 826-836

Holzer G. Bisphosphonate bei malignen Knochentumoren. *Orthopäde* 2009; 38: 316–323

Hopp RN, Pucci J, Santos-Silva AR, Jorge J. Osteonecrosis after administration of intravitreal bevacizumab. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70: 632-635

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3540-3545

Huja SS, Fernandez SA, Hill KJ, Li Y. Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006; 288: 1243-1249

Huja SS, Kaya B, Mo X, D'Atri AM, Fernandez SA. Effect of zoledronic acid on bone healing subsequent to mini-implant insertion. *Angle Orthod* 2011; 81: 363-369

Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonate. *Biomaterials* 2004; 25: 4105-4115

Ishida M, Amano S. Osteocalcin fragment in bone matrix enhances osteoclast maturation at a late stage of osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab* 2004; 22: 415-429

- Itzstein C, Coxon FP, Rogers MJ. The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases. *Small Gtpases* 2011; 2: 117-130
- Iwata K, Li J, Follet H, Phipps RJ, Burr DB. Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia. *Bone* 2006; 39: 1053-1058
- Jadu F, Lee L, Pharoah M, Reece D, Wang L. A retrospective study assessing the incidence, risk factors and comorbidities of pamidronate-related necrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Ann Oncol* 2007; 18: 2015-2019
- Jang WG, Kim EJ, Kim DK, Ryoo HM, Lee KB, Kim SH, Choi HS, Koh JT. BMP2 Protein Regulates Osteocalcin Expression via Runx2-mediated Atf6 Gene Transcription. *J Biol Chem* 2012; 287: 905-915
- Johnston CC Jr, Lavy N, Lord T, Vellios F, Merritt AD, Deiss WP Jr. Osteopetrosis. A clinical, genetic, metabolic, and morphologic study of the dominantly inherited, benign form. *Medicine* 1968; 47: 149-167
- Karadag-Saygi E, Akyuz G, Bizargity P, Ay P. The effect of risedronate treatment on serum osteoprotegerin and bone marker levels in postmenopausal women with osteoporosis. *Gynecol Endocrinol* 2011; 27: 1033-1036
- Karsenty G. Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 343-3466
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine & Growth Factor Rev* 1998; 9: 49-61
- Kearns AE, Khosla S, Kostenuik P. RANKL and OPG Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocr Rev* 2007; 29: 155-192
- Khamaisi M, Regev E, Yarom N, Avni B, Leitersdorf E, Raz I, Elad S. Possible association between diabetes and bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1172-1175
- Khosla S, Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocr* 2001; 12: 5050-5055

- Kikuta J, Ishii M. Osteoclast migration, differentiation and function: Novel therapeutic targets for rheumatic diseases. *Rheumatology* 2012; 52: 226-234
- Kim HN, Min WK, Jeong JH, Kim SG, Kim JR, Kim SY, Choi JY, Park BC. Combination of Runx2 and BMP2 increases conversion of human ligamentum flavum cells into osteoblastic cells. *BMB Rep* 2011; 44: 446-451
- Kim YH, Kim GS, Jeong-Hwa B. Inhibitory action of bisphosphonates on bone resorption does not involve the regulation of RANKL and OPG expression. *Exp Mol Med* 2002; 34: 145-151
- King LE, Grynblas MD, Tomlinson G, Vieth R. Pamidronate content and turnover in sternum, vertebral body, and iliac bones of dogs. *Bone* 1997; 20: 405-411
- Koch FP, Merkel C, Ziebart T, Smeets R, Walter C, Al-Nawas B. Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. *Clin Oral Investig* 2012; 16: 79-86
- Koch FP, Yekta SS, Merkel C, Ziebart T, Smeets R. The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and Collagen gene expression in vitro. *Head Face Med* 2010; 6: 12-18
- Komori Y, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa 1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89: 755-764
- Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weissinger F, Tony HP, Wilhelm M. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 2000; 96: 384-392
- Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S, Garrett-Sinha L, Raghavan S. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 839-847
- Lau AN, Ali SH, Adachi JD. Resolution of osteonecrosis of the jaw after teriparatide [recombinant human PTH (1-34)] therapy. *J Rheumatol* 2009; 36: 1835-1837
- Lazarovici TS, Yahalom R, Taicher S, Elad S, Hardan I, Yarom N. Bisphosphonate-related

osteonecrosis of the jaws: A single-center study of 101 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 850-855

Lee MV, Fong EM, Singer FR, Guenette RS. Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 2602-2608

Leon AA. Oral Bisphosphonates as a cause of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: clinical findings, assessment of risks, and preventive strategies. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 35-43

Lian JB, Stein GS. Runx2/Cbfa1. A multifunctional regulator of bone formation. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 2677-2685

Lim MJ, Kwon SR, Park SG, Park W. Acute effects of intravenous administration of pamidronate in patients with osteoporosis. *J Korean Med Sci* 2010; 25: 1277-1283

Lin JH. Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 1996; 18: 75-85

Lin JM, Callon KE, Lin CQ, Bava U, Zheng MH, Reid IR, Cornish J. Alteration of bone cell function by RANKL and OPG in different in vitro models. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 407-415

Lint P, Libert C. Matrix metalloproteinase-8: Cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 217-223

Mackie PS, Fisher JL, Zhou H, Choong PF. Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *Br J Cancer* 2001; 84: 951-958

Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 1115-1117

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: Risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 1567-1575

Marx RE, Cillo JE, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: Risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65: 2397-2410

- Marx RE. Uncovering the cause of "phossy jaw" circa 1858 to 1906: Oral and maxillofacial surgery closed case files-case closed. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 2356-2363
- Matos FR, Nonaka CF, Miguel MC, Galvão HC, de Souza LB, Freitas Rde A. Immunoexpression of MMP-9, VEGF, and vWF in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. *J Oral Pathol Med* 2011; 40: 338-344
- Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2008; 283: 29119–29125
- Matsuo K, Galson DL, Zhao C, Peng L, Laplace C, Wang KZ, Bachler MA, Amano H, Aburatani H, Ishikawa H, Wagner EF. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. *J Biol Chem* 2004; 279: 26475–26480
- Mavrokokki T, Cheng A, Stein B, Goss A. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65: 415-423
- McLeod NM, Brennan PA, Ruggiero SL. Bisphosphonate osteonecrosis of the jaw: A historical and contemporary review. *Surgeon* 2012; 10: 36-42
- Medac, Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, 1991: Bone TRAP Assay. http://www.medac.de/medac_international/data/pdf/BONE720-d.pdf
- Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis. An American Academy of Oral Medicine position paper. *J Am Dent Assoc* 2005; 136: 1658-1668
- Miller PD. The kidney and bisphosphonates. *Bone* 2011; 49: 77-81
- Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 938: 36–45
- Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999; 286: 1946-1949
- Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of

bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106: 5-13

Naik NH, Russo TA. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: The role of actinomyces. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 1729-1732

Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RG, Ebetino FH. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 2006; 38: 617-627

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22

Nwomeh BC, Liang HX, Cohen IK, Yager DR. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *J Surg Res* 1999; 8: 189-195

Ohba T, Haro H, Ando T, Wako M, Suenaga F, Aso Y, Koyama K, Hamada Y, Nakao A. TNF-alpha-induced NF-kappaB signaling reverses age-related declines in VEGF induction and angiogenic activity in intervertebral disc tissues. *J Orthop Res* 2009; 27: 229-235

Ohe JY, Kwon YD, Lee HW. Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived osteoblasts. *Clin Oral Invest* 2011; 16: 1153-1159

Okamoto M, Murai J, Yoshikawa H, Tsumaki N. Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 1022-1033

Otto S, Abu-Id MH, Fedele S, Warnke PH, Becker ST, Kolk A, Mücke T, Mast G, Köhnke R, Volkmer E, Haasters F, Lieger O, Iizuka T, Porter S, Campisi G, Colella G, Ploder O, Neff A, Wiltfang J, Ehrenfeld M, Kreusch T, Wolff KD, Stürzenbaum SR, Schieker M, Pautke C. Osteoporosis and bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw: Not just a sporadic coincidence - a multi-centre study. *J Craniomaxillofac Surg* 2011; 39: 272-277

Papadaki HA, Tsatsanis C, Christoforidou A, Malliaraki N, Psyllaki M, Pontikoglou C, Miliaki M, Margioris AN, Eliopoulos GD. Alendronate reduces serum TNFalpha and IL-1beta, increases neutrophil counts, and improves bone mineral density and bone metabolism indices in patients with chronic idiopathic neutropenia (CIN)-associated osteopenia/osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2004; 22: 577-587

Parks WC, Mecham RP. Matrix Metalloproteinases. San-Diego - USA, 1998

Piesold JU, Al-Nawas B, Grötz KA. Osteonecrosis of the jaws by long term therapy with bisphosphonates. Mund Kiefer Gesichtschir 2006; 10: 287-300

Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. J. Clin. Invest 1999; 104: 1363–1374

Qi M, Hu J, Li J, Li J, Dong W, Feng X, Yu J. Effect of zoledronate acid treatment on osseointegration and fixation of implants in autologous iliac bone grafts in ovariectomized rabbits. Bone 2012; 50: 119-127

Quispe D, Shi R, Burton G. Osteonecrosis of the jaw in patients with metastatic breast cancer: ethnic and socio-economic aspects. Breast J 2011; 17: 510-513

Ralte S, Khatri K, Nagar M. Short-term effects of zoledronate on the histomorphology of osteoclast in young albino rats. Ann Anat 2011; 193: 509-515

Rauch F, Travers R, Plotkin H, Glorieux FH. The effects of intravenous pamidronate on the bone tissue of children and adolescents with osteogenesis imperfecta. J Clin Invest 2002; 110: 1293-1299

Rauthan M, Pilon M. The mevalonate pathway in *C Elegans*. Lipids Health Dis 2011; 10: 243-255

Recker RR, Delmas PD, Halse J, Reid IR, Boonen S, García-Hernandez PA, Supronik J, Lewiecki EM, Ochoa L, Miller P, Hu H, Mesenbrink P, Hartl F, Gasser J, Eriksen EF. Effects of intravenous zoledronic acid once yearly on bone remodeling and bone structure. J Bone Miner Res 2008; 23: 6-16

Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, Spelsberg TC. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. Cancer Res 2000; 60: 6001-6007

Robertson A, Kraenzlinb ME, Zeilhofer H-F, Meier C. Bisphosphonatassoziierte Osteonekrose des Kiefers Empfehlungen zu Abklärung und Behandlung. Schweiz Med Forum 2007; 7: 408-412

Roelofs AJ, Thompson K, Ebetino FH, Rogers MJ, Coxon FP. Bisphosphonates: Molecular mechanisms of action and effects on bone cells, monocytes and macrophages. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 2950-2960

Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 2011; 49: 34-41

Rogers MJ, Watts DJ, Russel RGG. Overview of bisphosphonates. *Cancer* 1997, 80: 1652-1660

Rossini M, Adami S, Viapiana O, Ortolani R, Vella A, Fracassi E, Gatti D. Circulating $\gamma\delta$ T cells and the risk of acute-phase response after zoledronic acid administration. *J Bone Miner Res* 2011; 28: 27: 227-230

Ruggeri ZM. Structure and Function of von Willebrand Factor. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82: 576-584

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

Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws—2009 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 2-12

Ruggiero SL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): Initial discovery and subsequent development. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 13-18

Ruggiero SL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: An overview. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1218: 38-46

Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008; 19: 733-759

Russell RG. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone* 2011; 49: 2-19

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

Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2893-2897

Santini D, Vincenzi B, Hannon RA, Brown JE, Dicuonzo G, Angeletti S, Cesa ALA, Coleman RE, Tonin G, Budillon A, Caraglia M, Holen I. Changes in bone resorption and vascular endothelial growth factor after a single zoledronic acid infusion in cancer patients with bone metastases from solid tumours. *Oncol Rep* 2006; 15: 1351-1357

Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Marin L, Alcoceba M, Chillón MC, Balanzategui A, Santamaria C, Rosiñol L, de la Rubia J, Hernandez MT, Garcia-Navarro I, Lahuerta JJ, González M, San Miguel JF. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw is associated with polymorphisms of the cytochrome P450 CYP2C8 in multiple myeloma: A genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Blood* 2008; 112: 2709-2712

Sasano Y, Zhu JX, Tsubota M, Takahashi I, Onodera K, Mizoguchi I, Kagayama M. Gene expression of MMP8 and MMP13 during embryonic development of bone and cartilage in the rat mandible and hind limb. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 325-332

Saussez S, Javadian J, Hupin C, Magremanne M, Chantrain G, Loeb I, Decaestecker C. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw and its associated risk factors: A belgian case series. *Laryngoscope* 2009; 119: 323–329

Sautter NB, Delaney KL, Trune DR. Altered expression of tissue remodeling genes in a mouse model of acute allergic rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2011; 1: 262-267

Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: A potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol* 2009; 144: 667-676

Schilephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31: 469-484

Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *J Bone Miner Res* 2009; 24: 1347-1353

Schubert M, Klatter I, Linek W, Müller B, Döring K, Eckelt U, Hemprich A, Berger U, Hendricks J. The Saxon Bisphosphonate Register – Therapy and prevention of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Oral Oncol* 2011; 48: 349-354

Schwartz Z, Hyzy SL, Moore MA, Hunter SA, Ronholdt CJ, Sunwoo M, Boyan BD. Osteoinductivity of demineralized bone matrix is independent of donor bisphosphonate use. *J Bone Joint Surg Am* 2011; 93: 2278-2286

Schwarz EM, Looney RJ, O'Keefe RJ. Anti-TNF-alpha therapy as a clinical intervention for periprosthetic osteolysis. *Arthritis Res* 2000; 2: 165-168

Sedghizadeh PP, Stanley K, Caligiuri M, Hofkes S, Lowry B, Shuler CF. Oral bisphosphonate use and the prevalence of osteonecrosis of the jaw: An institutional inquiry. *J Am Dent Assoc* 2009; 140: 61-66

Seibel MJ. Molecular markers of bone turnover: Biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int* 2000; 11: 18-29

Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *BR J Cancer* 2000; 82: 1459-1468

Shannon J, Shannon J, Modelevsky S, Grippo AA. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *J Am Geriatr Soc* 2011; 59: 2350-2355

Shaw NJ, Bishop NJ. Bisphosphonate treatment of bone disease. *Arch Dis Child* 2005; 90: 494-499

Shirota T, Nakamura A, Matsui Y, Hatori M, Nakamura M, Shintani S. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw around dental implants in the maxilla: Report of a case. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20: 1402-1408

Siddiqi A, Payne AGT, Zafar S, Dunedin, Multan. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: A medical enigma? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108: 1-8

Sietsema WK, Ebetino FH, Salvagno AM, Bevan JA. Antiresorptive dose-response relationships across three generations of bisphosphonates. *Drugs Exp Clin Res* 1989; 15: 389-396

Soltau J, Medinger M, Unger C, Dreves J. Bisphosphonate in der Onkologie. *MMP* 2003; 12: 16-20

Stanton DC, Balasanian E. Outcome of surgical management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Review of 33 surgical cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 943-950

Stockmann P, Wehrhan F, Schwarz-Furlan S, Stelzle F, Trabert S, Neukam FW, Nkenke E. Increased human defensin levels hint at an inflammatory etiology of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: An immunohistological study. *J Transl Med* 2011; 9:135-143

Sugawara M, Kato N, Tsuchiya T, Motoyama T. RUNX2 expression in developing human bones and various bone tumors. *Pathol Int* 2011; 61: 565-571

Suri S, Mönkkönen J, Taskinen M, Pesonen J, Blank MA, Phipps RJ, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates induce apoptosis of Caco-2 cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway: A model of bisphosphonate-induced gastrointestinal toxicity. *Bone* 2001; 29: 336–343

Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metabolism* 2007; 5: 464–475

Teitelbaum SL. The osteoclast and its unique cytoskeleton. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1240: 14-27

Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 457–475

Thraillkill KM, Lumpkin CK Jr, Bunn RC, Kemp SF, Fowlkes JL. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: 735-745

Thumbigere-Math V, Sabino MC, Gopalakrishnan R, Huckabay S, Dudek AZ, Basu S, Hughes PJ, Michalowicz BS, Leach JW, Swenson KK, Swift JQ, Adkinson C, Basi DL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Clinical features, risk factors, management, and treatment outcomes of 26 Patients. *J Oral and Maxillofac Surg* 2009; 67: 1904-1913

Trouvin AP, Goëb G. Receptor activator of nuclear factor - κ B ligand and osteoprotegerin:

Maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging* 2010; 5: 345–354

Twiss IM, de Water R, den Hartigh J, Sparidans R, Ramp-Koopmanschap W, Brill H, Wijdeveld M, Vermeij P. Cytotoxic effects of pamidronate on monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells and its epithelial transport. *J Pharm Sci* 1994; 83: 699–703

Twiss IM, Pas O, Ramp-Koopmanschap W, Den Hartigh J, Vermeij P. The effects of nitrogen-containing bisphosphonates on human epithelial (Caco-2) cells, an in vitro model for intestinal epithelium. *J Bone Mineral Res* 1999; 14: 784–791

Urade M, Tanaka N, Furusawa K, Shimada J, Shibata T, Kirita T, Yamamoto T, Ikebe T, Kitagawa Y, Fukuta J. Nationwide survey for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in Japan. *J Oral Maxillofac Surg* 2011; 69: 364-371

Usui M, Xing L, Drissi H, Zuscik M, O’Keefe R, Chen D, Boyce BF. Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP2. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 314-325

Vandermeer JS, Kamiya N, Aya-ay J, Garces A, Browne R, Kim HK. Local administration of ibandronate and bone morphogenetic protein-2 after ischemic osteonecrosis of the immature femoral head: A combined therapy that stimulates bone formation and decreases femoral head deformity. *J Bone Joint Surg Am* 2011; 93: 905-913

Vasconcelos AC, de Azambuja Berti-Couto S, Figueiredo MA, Salum FG, Lopes TG, Cherubini K. Laboratory methods and biomarkers in the evaluation of bisphosphonate effects on body tissues: A literature review. *J Oral Pathol Med* 2012: Druck steht noch aus

Vescovi P, Merigo E, Meleti M, Manfredi M, Guidotti R, Nammour S. Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws: A concise review of the literature and a report of a single-centre experience with 151 patients. *J Oral Pathol Med* 2012; 41: 214-221

Vestergaard P, Schwartz K, Rejnmark L, Mosekilde L, Pinholt EM. Oral bisphosphonate use increases the risk for inflammatory jaw disease: A cohort study. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70: 821-829

Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Gründker C, Hofbauer LC.

- Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 680-686
- Vlot AJ, Koppelman JS, Bouma BN, Sixma JJ. Factor VIII and von Willebrand Factor. *Thromb Haemost* 1998; 79: 456-465
- von Knoch F, Jaquiere C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, Rubash HE, Shanbhag AS. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005; 26: 6941-6949
- Wallace JL, Dickey M, McKnight W, Bastaki S, Blank MA. N-bisphosphonates cause gastric epithelial injury independent of effects on the microcirculation. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 1675-1682
- Wang HL, Weber D, McCauley LK. Effect of long-term oral bisphosphonates on implant wound healing: Literature review and a case report. *J Periodontol* 2007; 78: 584-594
- Wang J, Goodger NM, Pogrel MA. Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 1104-1107
- Wehrhan F, Hyckel P, Amann K, Ries J, Stockmann P, Schlegel K, Neukam F, Nkenke E. Msx-1 is suppressed in bisphosphonate-exposed jaw bone analysis of bone turnover-related cell signalling after bisphosphonate treatment. *Oral Dis* 2011c; 17: 433-442
- Wehrhan F, Hyckel P, Guentsch A, Nkenke E, Stockmann P, Schlegel KA, Neukam FW, Amann K. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw is linked to suppressed TGF β 1-signaling and increased Galectin-3 expression: A histological study on biopsies. *J Transl Med* 2011a; 9: 102-113
- Wehrhan F, Stockmann P, Nkenke E, Schlegel KA, Guentsch A, Wehrhan T, Neukam FW, Amann K. Differential impairment of vascularization and angiogenesis in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw-related mucoperiosteal tissue. *Oral Surg Oral med Pathol Oral Radiol Endod* 2011b; 112: 216-221

Weinstein RS, Chambers TM, Hogan EA, Webb WW, Wicker CA, Manolagas SC. Giant osteoclast formation after long-term oral aminobisphosphonate therapy for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 17-25

Weinstein RS, Roberson PK, Manolagas SC. Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy. *N Engl J Med* 2009; 360: 53-62

Wessel JH, Dodson TB, Zavras AI. Zoledronate, smoking, and obesity are strong risk factors for osteonecrosis of the jaw: A case-control study. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 625-631

Wiberg E, Hollemann AF, Wiberg N. *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. Berlin-New York: Walter de Gruyter, 1995

Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med* 2006; 144: 753-761

Yildiz A, Esen E, Kürkçü M, Damlar I, Dağlioğlu K, Akova T. Effect of zoledronic acid on osseointegration of titanium implants: an experimental study in an ovariectomized rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68: 515-523

Yin G, Bai Y, Luo E. Angiogenic suppression of osteoclasts may play a role in developing bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Med Hypotheses* 2011; 76: 347-349

Zhang X, Hu J, Li Y, Yin G, Luo E. Effects of ibandronate-hydroxyapatite on resorptive activity of osteoclasts. *Arch med Sci* 2011; 7: 53-60

Zisa D, Shabbir A, Matri M, Suzuki G, Lee T. Intramuscular VEGF repairs the failing heart: Role of host-derived growth factors and mobilization of progenitor cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297: 1503-1515

Zoer N, Brenner K, Beke D, Kudlacek S, Hawa G, Woloszczuk W, Hofbauer LC, Pecherstorfer M. Bisphosphonate treatment does not affect serum levels of osteoprotegerin and RANKL in hypercalcemic cancer patients. *Anticancer Res* 2005; 25: 3607-3612

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Gerhard Wahl, Direktor der Poliklinik für Chirurgische Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Bonn für die Bereitstellung dieses sehr interessanten und aktuellen Themas, sowie für seine Zeit und seinen Rat bei der inhaltlichen Gestaltung, Ausarbeitung und Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Werner Götz, Leiter des oralbiologischen Labors der Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für seine stetige Hilfe bei der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit, für die Bereitstellung der Präparate gesunder Probanden, sowie für seine Unterstützung bei der Auswertung und Korrektur.

Ebenso möchte ich Frau Dr. Barbara Mohr danken, die diese Studie geleitet und die Patienten betreut und operiert hat. Für ihre konstruktiven Hilfen bei der Datenerfassung und die spontanen Treffen möchte ich mich sehr bedanken.

Herzlich gedankt sei auch B. Schiermeyer (MTA), S. van Dyke (MTA) , I. Bay-Müller (MTA) und C. Schaffrath (MTA) für ihre Hilfe beim experimentellen Teil dieser Arbeit und für ihr stets offenes Ohr für die 1000 kleinen Fragen zwischendurch.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich danken, für ihr Verständnis und für ihr Interesse an meiner Arbeit. Besonders natürlich meinem Vater, der sich wie kein anderer in die Thematik hineindenken konnte.