

# **Histologische und immunhistochemische Untersuchungen an Kieferosteonekrosen unter Denosumab-Therapie**

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

**Sophie Undine Krumholz**

aus Gießen

2019

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Werner Götz
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Albert Becker

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.10.2019

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie  
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Andreas Jäger

*Meinen Eltern  
in  
ewiger Dankbarkeit*



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1	Kieferosteonekrosen	11
1.2	Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrosen	12
1.3	Denosumab-Wirkung und Eigenschaften	18
1.4	Denosumab-Antitumoröse Eigenschaften	20
1.5	Denosumab-Indikationen	20
1.6	Denosumab- Nebenwirkungen	21
1.7	Denosumab- Nebenwirkung: Kieferostenekrosen	21
1.8	Prävention und Therapie von Kieferosteonekrosen	23
1.9	Histologische Untersuchungen von Bisphosphonat-Nekrosen	24
1.10	Fragestellung	27
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1	Untersuchungsmaterial	28
2.1.1	Patientengruppe	28
2.1.2	Operativer Ablauf	30
2.1.3	Kontrollgruppe	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Verwendete Reagenzien	34
2.2.2	Verwendete Chemikalien	34
2.2.3	Verwendete Geräte und Materialien	35
2.2.4	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	36
2.2.5	Fixierung	38
2.2.6	Entkalkung	38
2.2.7	Dehydrierung und Einbettung	38
2.2.8	Schnittanfertigung	39
2.2.9	Entparaffinierung	39
2.2.10	Übersichtsfärbungen	40

2.2.10.1	Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung	40
2.2.10.2	Trichrom nach Masson-Goldner	40
2.2.11	Histochemische Färbungen	42
2.2.11.1	PAS-Färbung	42
2.2.11.2	TRAP-Färbung	42
2.2.12	Immunhistochemie	43
2.2.12.1	Alkalische Phosphatase	43
2.2.12.2	Osteokalzin	44
2.2.12.3	Bone morphogenetic protein 2 (BMP2)	45
2.2.12.4	RUNX2	46
2.2.12.5	RANK	47
2.2.12.6	OPG	48
2.2.12.7	RANKL	49
2.2.12.8	Cathepsin K	50
2.2.12.9	MMP8	51
2.2.12.10	Von-Willebrand-Faktor	52
2.2.12.11	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	53
2.2.13	Kontrolle der Färbungen	54
2.2.13.1	Negativkontrolle	54
2.2.13.2	Positivkontrolle	54
2.2.13.3	Semiquantitative Dokumentation und Auswertung	54
2.2.14	Statistische Auswertung	55
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
3.1	Anamnese	56
3.2	Histologische Übersichtsfärbungen	56
3.2.1	Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung	56
3.2.1.1	Gesunder Knochen	56
3.2.1.2	Denosumab-Nekrosen	57
3.2.1.2.1	E2517/17	57
3.2.1.2.2	E12139/16	60
3.2.1.2.3	E15632/14	62
3.2.1.2.4	E19942/14	62

3.2.1.2.5	E21376/14	65
3.2.1.2.6	E14168/16	66
3.2.1.2.7	E8299/16	68
3.2.1.2.8	E4613/15	71
3.2.1.2.9	E12955/16	72
3.2.1.2.10	E7014/16	73
3.2.1.2.11	E3781/16	74
3.2.1.2.12	E7104/16	76
3.2.1.2.13	E11572/16	78
3.2.1.2.14	E15526/15	79
3.2.1.2.15	E20605/15	80
3.2.1.2.16	E3803/16	82
3.2.1.2.17	E7636/16	83
3.2.1.2.18	E765/17	85
3.2.1.2.19	E2282/16	87
3.3.2	Trichrom nach Masson-Goldner	87
3.3	Histochemische Färbungen	88
3.3.1	PAS-Färbung	90
3.3.2	TRAP-Färbung	93
3.4	Immunhistochemische Färbungen	96
3.4.1	Alkalische Phosphatase	96
3.4.2	Osteokalzin	98
3.4.3	BMP2	99
3.4.4	RUNX2	101
3.4.5	RANKL	102
3.4.6	OPG	104
3.4.7	RANK	106
3.4.8	Cathepsin K	108
3.4.9	MMP8	110
3.4.10	vWF	113
3.4.11	VEGF	115
3.5	Negativ-Kontrollen	117

3.6	Positiv-Kontrollen	117
3.7	Statistische Auswertung der Befunde	118
3.7.1	Vergleich Geschlecht (Wilcoxon-Rangsummentest)	119
3.7.2	Vergleich Alter (Regressionsmodell)	120
3.7.3	Vergleich Grunderkrankungen (Einfaktorielle Varianzanalyse)	121
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>122</b>
4.1	Histopathologie und Histochemie	122
4.1.1	TRAP-Färbung	125
4.2	Immunhistochemie	126
4.2.1	Gefäße	134
4.3	Bewertung der Statistik	136
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>138</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>140</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>151</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>157</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>158</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>178</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AAOMS	American Association of Oral and Maxillofacial Surgeon
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
ARONJ	antiresorptive drug-related osteonecrosis of the jaw
BG	Bindegewebe
BMD	Bone Mineral Density
BMP2	bone morphogenetic protein 2
BP	Bisphosphonat
BR	Bakterienrasen
BRONJ	bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw
CHX	Chlorhexidin
CT	Computertomographie
DRONJ	denosumab-related osteonecrosis of the jaw
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DVT	Digitale Volumetomographie
Gy	Gray
IHC	Immunhistochemie
LC	lining cells
Lsg.	Lösung
Min.	Minuten
MMP8	Matrix-Metallo-Proteinase 8
MRONJ	medication-related osteonecrosis of the jaw
Nr.	Nummer
OBL	Osteoblasten
OC	Osteokalzin
OKL	Osteoklasten
OL	Osteozytenlakunen
ONJ	osteonecrosis of the jaw
OPG	Osteoprotegerin
ORN	Osteoradionekrose
IORN	Infizierte Osteoradionekrose
RANK	receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B

RANKL	receptor activator nuclear factor- $\kappa$ B ligand
RL	Resorptionslakunen
RT	Raumtemperatur
RUNX2	Run related Gen 2
Sek.	Sekunden
Tab.	Tabelle
TRAP	Tartratresistente saure Phosphatase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	von Willebrand Faktor
WG	Weichgewebe
ZL	Zementlinien

## 1. Einleitung

### 1.1 Kieferosteonekrosen

Bereits im 19. Jahrhundert existierte das Krankheitsbild der Kieferosteonekrose unter den Namen „phossy jaw“ oder „Phosphor Nekrose“ und war unter Arbeitern in Zündholzfabriken, aber auch in Feuerwerksfabriken, Messingfabriken und Munitionsfabriken in den USA und Großbritannien verbreitet (Hellstein und Marek, 2005).

Seit 1833 wurde weißer Phosphor zur Herstellung von Streichhölzern verwendet. Die Arbeiter, die engen Kontakt zu erhitzten Phosphordämpfen hatten, entwickelten nicht heilende Areale exponierten Knochens im Bereich des Mundes in enger Korrelation zur Zeitspanne, die sie in der Fabrik bereits gearbeitet hatten (Dearden, 1901).

Im Jahre 1845 wurde in Wien erstmals über 22 Fälle von betroffenen Fabrikarbeitern mit Kiefernekrosen berichtet. Die Inzidenz unter den Fabrikarbeitern betrug circa elf Prozent, wobei die Mortalität durch Meningitiden und Septikämien in dieser präantibiotischen Zeit bei ungefähr 20 Prozent lag. Die mittlere Expositionszeit zwischen dem ersten Kontakt mit weißem Phosphor und dem erstmaligen Auftreten von Symptomen betrug fünf Jahre (Donoghue, 2005). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass die chronische Exposition gegenüber phosphorhaltiger Luft zu einer Akkumulation von Bisphosphonatverbindungen im Knochen führte und in derselben Erkrankung resultierte, die heute durch den medikamentösen Einsatz von Bisphosphonaten, die im Nachfolgenden genauer erklärt werden, hervorgerufen wird (Marx, 2008).

Von medikamenten-assoziierten Osteonekrosen müssen unter anderem Osteoradionekrosen (ORN) und Osteomyelitiden abgegrenzt werden.

Als Osteoradionekrose wird ein Krankheitsbild bezeichnet, bei dem es durch die Behandlung mit hochenergetischer Strahlung (>60 Gy) im Rahmen einer Tumorthherapie des Kopf-/Halsbereichs zur Ausbildung einer Nekrose des Kieferknochens kommt. Diese Definition beinhaltet das Fehlen von Antiresorptiva in der Anamnese. Diese Substanzen, wie auch Bisphosphonate und Denosumab, bewirken durch Hemmung der Osteoklasten eine Reduktion des systemischen und lokalen Knochenabbaus. (Al-Nawas, 2018).

Ursächlich für die Devaskularisation und Devitalisierung des Knochens ist zum einen eine Gefäßthrombosierung, die in einer verminderten Wundheilung resultiert und eine Endothelzellschädigung, die zu einer Fibrosierung der Gefäße führt (Chrcanovic et al, 2010). Dies hat eine Zellarmut und Gefäßarmut des Knochens sowie ein Absterben des Periosts zur Folge. Typische klinische Merkmale sind enorale Schleimhautulzerationen mit chronisch freiliegendem Kieferknochen (Al-Nawas, 2018).

Kommt es, begünstigt durch die veränderte Knochenphysiologie während oder nach der Strahlentherapie zu einer Superinfektion durch ortsständige Keime der Mundhöhle, wird von einer infizierten Osteoradionekrose (IORN) gesprochen, die klinisch mit Schleimhautulzerationen, Expositionen des devitalisierten Knochens, pathogenbedingten Frakturen und Abszedierungen einhergehen kann. Radiologisch imponiert eine mottenfraßähnliche Osteolyse der betroffenen Knochenabschnitte (Freyschmidt, 2016).

Die Osteomyelitis ist entgegen ihrer Etymologie eine Entzündung des gesamten Knochens, inklusive der Kortikalis und des Periosts. Eine gebräuchliche Einteilung der Kieferosteomyelitiden, die sowohl die klinische Symptomatik als auch den Verlauf der Erkrankung berücksichtigt, stellt die Zürich-Klassifikation dar. Hier werden drei Haupttypen unterschieden: die akute, die sekundär-chronische und die primär-chronische Osteomyelitis (Freudlsperger, 2014). Ausgelöst wird die Infektion durch eine erhöhte Anzahl pyogener Mikroorganismen, die durch Ausbildung eines Biofilms sowohl einen direkten apoptotischen Effekt als auch einen indirekten durch die Sezernierung von Lipopolysacchariden und freien Radikalen, die wiederum eine Wirkung auf Immunzellen und Osteoklasten ausüben, haben (Chrcanovic et al., 2010). Die daraus resultierende Beeinträchtigung der lokalen Blutzirkulation führt zu einer Nekrose des Knochens mit anschließender Sequestrierung (Baltensperger, 2008).

## **1.2 Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrosen**

Eine erste Publikation über Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrosen der Kiefer, die auch als Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the jaw (BRONJ) bezeichnet wird, erschien im Jahre 2003 (Marx, 2003). Im Deutschen Ärzteblatt wurde hierauf erstmalig 2004 aufmerksam gemacht (Ruggiero et al., 2004).

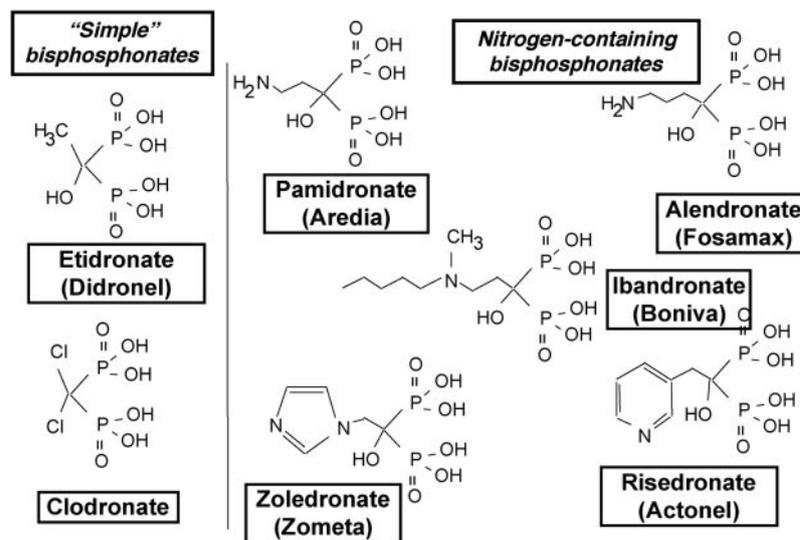
Als Bisphosphonate werden eine Gruppe von knochenwirksamen Medikamenten bezeichnet, die zur Diagnostik und Therapie von Erkrankungen des Knochen- und Kalziumstoffwechsels entwickelt und zunehmend eingesetzt wurden.

Bisphosphonate (BP) sind PyrophosphatanaLOGa, die sich in der chemischen Struktur vom anorganischen Pyrophosphat durch eine Phosphor-Kohlenstoff-Bindung (P-C-P) anstelle einer Phosphor-Sauerstoff-Bindung (P-O-P) unterscheiden (Baron et al., 2011). Durch die hohe Beständigkeit der P-C-P Bindungen gegenüber dem hydrolytischen Abbau besitzen Bisphosphonate eine lange Halbwertszeit (Coxon et al., 2006). Am zentralen vierbindigen Kohlenstoffatom der BP befinden sich zwei Seitenketten R1 und R2, die maßgeblich die resorptionshemmende Eigenschaft der Bisphosphonate bestimmen. R1 ist zumeist eine Hydroxylgruppe, die die Knochenbindung vermittelt, während R2 variabel ist und die antiresorptiven und antiproliferativen Eigenschaften bestimmt. Ältere BP wie Etidronat, Clodronat und Tiludronat haben keinen Stickstoffsubstituenten, sondern einen Methyl- oder Chlorrest (Cremers und Papapoulos, 2011; Cremers et al., 2019).

Bisphosphonate der zweiten und dritten Generation wie Pamidronat, Alendronat und Neridronat haben an dieser Stelle eine Aminogruppe, wodurch sie mehr als hundertfach wirksamer sind als die erste Generation. Olpadronat und Ibandronat enthalten einen substituierten Stickstoffrest, was zu einer zusätzlichen Steigerung ihrer Wirksamkeit führt. Risedronat und Zoledronat haben basische Heterozyklen als Substituenten und sind die effektivsten Bisphosphonate (Boanini et al., 2012).

Anwendung im klinischen Alltag finden sie vor allem bei Knochenmetastasierung, wie sie beim multiplen Myelom in 100 %, beim Mammakarzinom ebenso wie beim Prostatakarzinom in 65-75 % und beim Bronchialkarzinom in 30-35 % vorkommt (Coleman, 2006).

Die klinische Wirksamkeit von Bisphosphonaten ist auf zwei Mechanismen zurückzuführen: Durch die hohe Bindungsaffinität gegenüber Hydroxylapatit wird die Ausfällung von Calciumphosphat gehemmt, die Umwandlung von amorphen in kristallines Calciumphosphat verzögert und die Aggregation und Auflösung von Hydroxylapatitkristallen gehemmt. Außerdem wird die Aktivität von Osteoklasten inhibiert (Baron et al., 2010). Bisphosphonate sind auf Grund ihrer Osteoklasten-hemmenden Eigenschaften unter anderem indiziert bei Osteoporose, Osteoporose-Prophylaxe und zur Vermeidung von Knochenmetastasen (Saccardin et al., 2015).



**Abb. 1:** Strukturformeln verschiedener Bisphosphonate, die nach ihrer Wirkungsweise klassifiziert sind (nach Russell et al. 2007).

Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrosen des Kiefers gehören zu den schwerwiegendsten Nebenwirkungen dieser Medikamente. Da jedoch andere Medikamentenklassen ebenfalls zu Osteonekrosen der Kiefer führten, wurde im Jahre 2014 der Begriff BRONJ durch die Abkürzung MRONJ (medication-related osteonecrosis of the jaws/medikamenten-assoziierte Osteonekrose) ersetzt (George et al., 2018). Dabei handelt es sich um Medikamente wie Denosumab, Romosozumab, Corticosteroide, Chemotherapeutika und Angiogeneseinhibitoren. Die Kombination von Bevacizumab mit Bisphosphonaten führte zu einem häufigen Auftreten von Osteonekrosen (Siovella et al., 2013). Daraufhin wurde zusätzlich der Begriff der antiresorptiva-assoziierte Osteonekrose des Kiefers (ARONJ) eingeführt (Kagami et al., 2018).

Medikamenten-assoziierte Osteonekrosen werden als über mindestens acht Wochen freiliegender nekrotischer Knochen bei vorausgegangener oder stattgehabter medikamentöser Therapie definiert, wobei keine Strahlentherapie in der Kopf-, Halsregion stattgefunden haben darf (Walter, 2015; Wolff et al., 2019).

Der pathophysiologische Hintergrund der Kiefernekrosen ist noch nicht vollständig bekannt. Ansätze, dieses Krankheitsbild zu erklären, wären beispielsweise die übermäßige Unterdrückung des Kieferknochenumsatzes, eine veränderte Immunabwehr bei Infektionen, eine Ischämie bedingt durch antiangiogene Effekte, eine direkte Gewebstoxizität sowie eine spezifische Infektion mit Aktinomyzeten (Ristow et al., 2018).

Nach der Einteilung der American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) werden folgende Stadien einer Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose, die auch für alle anderen medikamenten-assoziierten Osteonekrose gelten, unterschieden:

Stadium 0:

1) Symptome:

- Odontalgie mit fehlender odontogener Ätiologie
- Dumpfe Schmerzen im Bereich der Kieferhöhlen, die in Zusammenhang mit einer Wanddickenzunahme der Kieferhöhle stehen
- Veränderungen der Neurosensorik

2) Klinischer Befund:

- Kein freiliegender Knochen
- Zahnverlust, nicht erklärbar durch chronische Parodontitis
- Periapikale oder parodontale Fistel, die nicht in Zusammenhang mit einer kariesassoziierten Pulpanekrose, einem Trauma oder einer bestehenden Restauration steht

3) Radiologische Befund:

- Verlust oder Resorption des Alveolarknochens, nicht in Zusammenhang mit einer chronischen Parodontitis stehend
- Veränderungen der Knochenstruktur und ausbleibende Neubildung von Knochen in der Extraktionsalveole
- Radiologische Bilder einer Osteonekrose des Alveolarknochens oder eines umliegenden Knochens
- Verdickung der Lamina Dura
- Erweiterung des Parodontalspaltes

Diese eher unspezifischen Symptome können auch bei Patienten auftreten, die vormals im Stadium 1, 2 oder 3 waren und vorübergehend geheilt waren.

### Stadium 1:

Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch exponierten, nekrotischen Knochen, mögliche Fistelbildungen, jedoch keine weiteren Symptome wie Schmerzen oder andere Infektionszeichen. Radiologisch präsentiert sich das Stadium 1 wie 0.

### Stadium 2:

Patienten zeigen exponierten, nekrotischen Knochen, gegebenenfalls Fistelbildungen, die beim Sondieren schmerzen. Außerdem liegen Infektionsanzeichen vor wie Rötungen um den freiliegenden Knochen mit oder ohne Eiteraustritt. Die radiologischen Befunde ähneln Stadium 0.

### Stadium 3:

Wiederum zeigen sich freiliegende und nekrotische Knochenareale, teilweise Fistelbildungen, die beim Sondieren schmerzen, und mindestens eines der folgenden Kriterien muss erfüllt sein:

- Freiliegender, nekrotischer Knochen, über den Processus alveolaris des betroffenen Kiefers hinausreichend
- Pathologische Frakturen
- Extraorale Fisteln
- Mund-Antrum- oder Mund-Nasen-Verbindung
- Osteolyse, die sich bis zum Rand des Unterkiefers oder zum Sinusboden ausbreitet

(Aghaloo et al., 2014; Ruggiero et al., 2014)

Die Höhe der Medikamentendosen und die Dauer der Exposition spielen neben individuellen Faktoren wie Nikotinabusus und Mundhygiene eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer Kieferosteonekrose (Kuroshima et al., 2019). Patienten mit malignen Grunderkrankungen haben zudem ein höheres Risiko, eine Medikamenten-assziierte Osteonekrose zu entwickeln (Qi et al., 2014).

Typische weitere Faktoren, die eine Medikamenten-assoziierte Osteonekrose begünstigen, sind vorbestehende entzündliche Zahnerkrankungen, wie periapikale oder parodontale Pathologien und Druckstellen, die durch insuffizienten Zahnersatz verursacht wurden (Otto et al., 2018).

Weitherin scheint ein Zusammenhang zwischen Zahnextraktionen und dem darauffolgenden Auftreten einer Medikamenten-assoziierten Osteonekrose vorzuliegen (Aljohani et al., 2018).

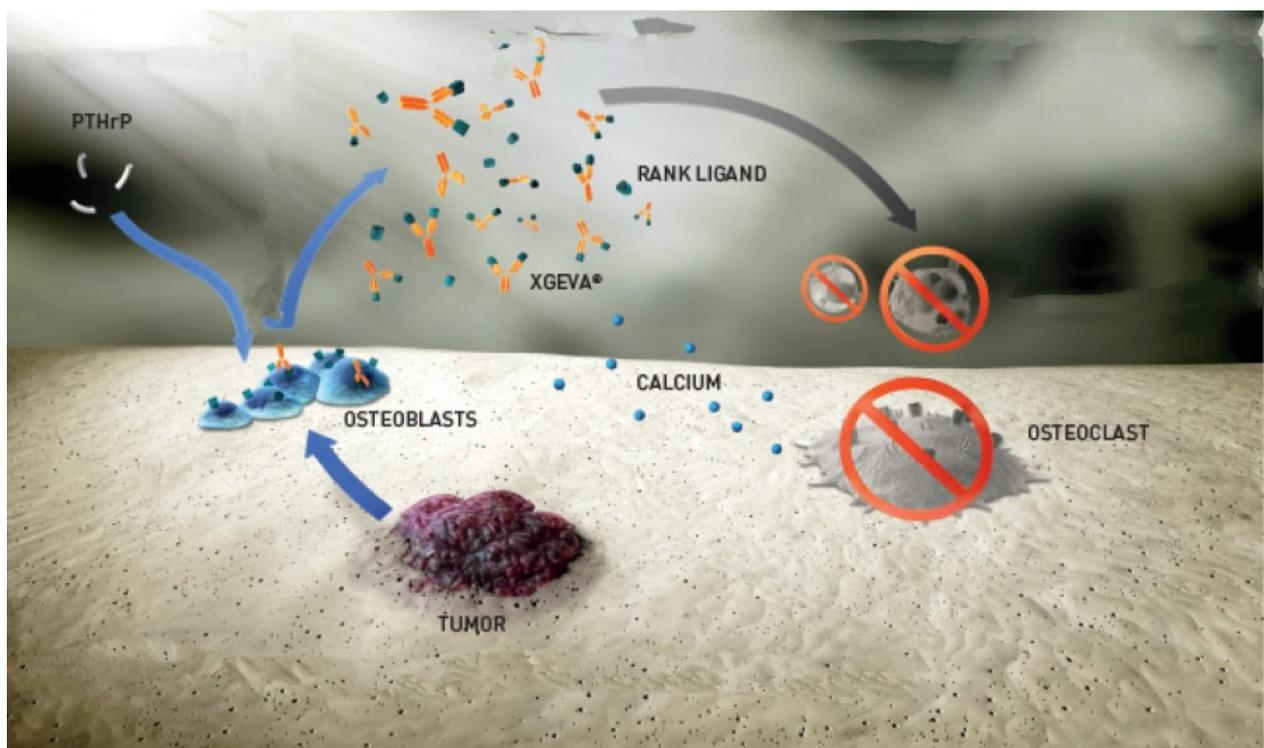
In einer aktuellen Studie von Soutome et al entwickelten von 135 Patienten, die hochdosiert mit Bisphosphonaten behandelt und denen Zähne extrahiert wurden, 18 Patienten eine Osteonekrose. Das Auftreten der Kiefernekrose stand in direkter Korrelation mit der Dauer der Medikation vor dem Eingriff und der klinischen Symptomatik der zu entfernenden Zähne (Soutome et al., 2018).

Ende der neunziger Jahre stellte das amerikanische Biotechnologieunternehmen AMGen einen humanen monoklonaler IgG2-anti-RANKL-Antikörper her, welcher seit Mai 2010 unter dem Namen Denosumab in Deutschland zugelassen ist. Von diesem Präparat wurden neben einer besseren Wirksamkeit auch geringere Nebenwirkungen erwartet. Jedoch traten hier ebenfalls, wie bei Patienten unter Bisphosphonattherapie, Kieferosteonekrosen auf, die als Denosumab-assoziierte Osteonekrosen (DRONJ) bezeichnet wurden (Agaloo et al., 2010; Groetz et al., 2012).

### 1.3 Denosumab- Wirkung und Eigenschaften

Monoklonale Antikörper sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht bis zu 150 kDa und gehören zur Familie der Immunglobuline. Therapeutische Antikörper sind in der Regel Gamma-Immunglobuline, welche Homodimere sind. Sie bestehen aus zwei Heterodimeren mit einer leichten und einer schweren Kette, verbunden durch Disulfidbrücken. Diese bestehen aus einem Fab-Fragment (fragment antigen binding), welches an die Zielstruktur bindet, und einem Fc-Fragment (fragment constant) (Ochsenbein, 2008).

Denosumab ist ein humaner monoklonaler IgG2-Antikörper, der mit hoher Spezifität an den Liganden RANKL bindet. Dadurch wird der Rezeptor RANK nicht mehr aktiviert und die RANKL/RANK-Interaktion ist unterbrochen. Dies resultiert in einer Inhibition der Bildung und Funktion der Osteoklasten ( Sutjandra et al., 2011).



**Abb. 2:** Modifizierte Darstellung von Denosumab, welcher präzise an RANKL bindet und verhindert, dass sein Rezeptor RANK auf der Oberfläche von Osteoklasten und deren Vorläufern aktiviert wird (modifiziert nach XGEVA® (denosumab) Produktmonographie, AMGEN Europe B.V. 2012)

RANKL (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand) ist ein Protein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren und wird von verschiedenen Zellen gebildet, beispielweise von Stromazellen, mesenchymalen Periostzellen, Chondrozyten, Endothelzellen sowie Osteoblasten und -klasten, verschiedenen Tumorzellen und Brustdrüsengewebe (Boyce & Xing, 2007). RANK (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B) ist ein Transmembranprotein, welches am stärksten im Knochengewebe und lymphatischen System exprimiert wird. Es befindet sich an der Oberfläche von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen, dendritischen Zellen, B- und T-Lymphozyten sowie Endothelzellen, Muskelzellen und malignen Zellen (Boyce & Xing, 2007). Wenn RANK durch RANKL direkt aktiviert wird, erfolgt eine Steigerung der Anzahl und der Aktivität der Osteoklasten, welche die einzigen knochenresorbierenden Zellen sind, und eine Förderung der Osteoklastogenese wird induziert. Dieser Prozess kann durch Osteoprotegerin (OPG) gehemmt werden. OPG wird sowohl im Knochen-, Immunsystem, im Gewebe des Zahnhalteapparates und im Schilddrüsengewebe exprimiert. Es bindet kompetitiv an zwei RANKL-Moleküle, was zur Bildung eines stabilen Dimer-Timer-Komplexes führt (Hofbauer, 2010; Weil und Zhang, 2015). Da eine vermehrte Ausschüttung von RANKL in stimulierten T-Zelle beobachtet wurde, wird RANKL auch eine Funktion im Immunsystem zugeprochen (Boyce et al., 2015).

Das RANKL/RANK/OPG-System ist sowohl für den physiologischen als auch pathologischen Knochenumbau verantwortlich. Störungen in diesem Metabolismus stehen in direktem Zusammenhang bei Patienten, die an Knochenerkrankungen leiden (Sigl et al., 2014). Beispielweise liegt bei den meisten Frauen mit einer postmenopausalen Osteoporose eine Hyperaktivierung von RANK und RANKL vor. Ursächlich dafür scheint die verminderte Östrogenproduktion zu sein, die für die OPG-Ausschüttung notwendig ist (Hofbauer et al., 2010). Das RANKL-OPG-Verhältnis kann auch bei onkologischen Erkrankungen gestört sein. Mammakarzinomzellen induzieren die Expression von RANKL, während sie die OPG-Ausschüttung hemmen. Dies führt zu einem vermehrten Knochenabbau (Sigl et al., 2012).

## 1.4 Denosumab- Antitumoröse Eigenschaften

Im Jahr 2010 wurde das erste Mal gezeigt, dass RANK und RANKL einen Einfluss auf die Entwicklung von hormonell bedingtem Brustkrebs haben (Schramek et al., 2010). Seit her werden Testungen im Rahmen klinischer Studien durchgeführt, die die Wirksamkeit des Antikörpers für die Prävention von Brustkrebs beweisen sollen.

Außerdem existieren Ergebnisse, dass RANK und RANKL Einfluss auf die Entwicklung von familiären BRCA1- mutiertem Brustkrebs haben. In einer Studie, die ursprünglich den Effekt von Denosumab auf die Knochengesundheit von Brustkrebspatientinnen mit endokriner Therapie untersuchen sollte, konnte gezeigt werden, dass das Wiederauftreten von Brustkrebs in der mit dem Antikörper behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert wurde (Gnant et al., 2015). Ob die RANKL-Blockade als präventive Strategie zur Verringerung der Brustkrebsinzidenz geeignet ist, müssen weitere Studien beweisen (Sigl et al., 2016).

## 1.5 Denosumab- Indikationen

Es werden zwei Präparate des Antikörpers angeboten: Prolia® und XGEVA®.

Denosumab ist in einer niedrigen Dosierung (Prolia®, 60 mg) zur Behandlung der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen mit erhöhtem Frakturrisiko zugelassen sowie zur Behandlung von Knochenschwund im Zusammenhang mit Hormonablation bei Männern mit Prostatakarzinom und erhöhtem Frakturrisiko. Eine höhere Dosierung (XGEVA®, 120 mg) ist indiziert zur Prävention von skelettbezogenen Komplikationen bei Patienten mit Knochenmetastasen bedingt durch solide Tumoren (Henry et al., 2011). Bezüglich der Indikation Osteoporose wurde kein zusätzlicher Nutzen gegenüber Bisphosphonaten gesehen und der Einsatz von Denosumab nur in Einzelfällen bei Unverträglichkeit von Zoledronsäure empfohlen. Seit April 2018 hat die europäische Kommission XGEVA® auch für die Behandlung von multiplen Myelomen zugelassen.

## 1.6 Denosumab- Nebenwirkungen

In den Fach- und Gebrauchsinformationen sind verschiedene weitere Nebenwirkungen des Medikamentes aufgeführt. Patienten entwickelten in den ersten Wochen nach Therapiebeginn Hypocalzämien, weswegen vor jeder Anwendung eine klinische Kontrolle des Calciumspiegels empfohlen wird und gegebenenfalls Calcium und Vitamin D substituiert werden sollten. Patienten, die an einer schweren Nierenfunktionsstörung leiden, haben ein erhöhtes Risiko, eine Hypocalzämie zu entwickeln. Deshalb ist in diesen Fällen eine Überwachung des Calciums besonders wichtig und eine Ergänzung mit Calcium und Vitamin D unter Umständen indiziert. Des Weiteren wurden Hautinfektionen in Form bakteriellen Entzündungen des Unterhautgewebes sowie Osteonekrosen des äußeren Gehörgangs, muskuloskelettale Schmerzen und atypische Femurfrakturen beobachtet (Fizazi et al., 2011).

## 1.7 Denosumab- Nebenwirkung: Kieferosteonekrosen

Die Osteonekrose des Kiefers unter Denosumabtherapie (DRONJ) ist die schwerwiegendste Nebenwirkung des Medikaments.

2010 wurde der erste Fall einer Kiefernekrose im Zusammenhang mit der Gabe von Denosumab dokumentiert (Taylor et al., 2010). Die Inzidenz liegt in Studien zwischen 0,001 % und 0,15 % pro Patient und Behandlungsjahr. Bei Tumorpatienten muss bei bis zu 10 % der Behandelten mit einer Denosumab-assoziierten Osteonekrose gerechnet werden (Stopeck et al., 2010). In einer Studie von 2017 entwickelten von 141 Patienten, die über einen Zeitraum von fünf Jahren beobachtet wurden, 10 Patienten eine Denosumab-assoziierte Osteonekrose, wobei die Häufigkeit im Laufe der Zeit zunahm. Im ersten Jahr lag die Inzidenz bei 3 %, im zweiten Jahr bei 7 % und nach 30 weiteren Monaten bei 8 % (Egolff-Juras et al., 2017).

Die Tatsache, dass hauptsächlich der Kieferknochen von den Nekrosen betroffen ist, erklären Berenson et al. durch eine erhöhte Remodelling-Rate in den Alveolarfortsätzen der Maxilla und Mandibula. (Berenson et al., 2018). Ristow et al. hingegen vermuten, eine

andere Theorie: Dem Kieferknochen liegt lediglich das Periost und eine dünne Schleimhautschicht auf, was dazu führt, dass kleinste schleimhäutige Verletzungen den Kieferknochen einer mikrobiellen Flora aussetzen. Dies könnte einen klinischen Hinweis auf die Rolle von vorausgegangenen Entzündungen für die Pathogenesetheorie von Kieferosteonekrosen darstellen (Ristow et al., 2018; Chang et al., 2018).

Eine weitere Ursache für die Entstehung von Kieferosteonekrosen scheint die anhaltende Hemmung der Knochenresorption unter Denosumabtherapie zu sein. Die Behinderung der Osteoklastendifferenzierung und -funktion sowie die Förderung der Osteoklastenapoptose führen zu einer Hemmung der Knochenresorption, einer Abnahme des bone remodeling und einer Verringerung der Osteogenese (Allen und Burr, 2009).

Scheinbar spielen diese sowie alle bereits zuvor erwähnten Mechanismen eine Rolle im Rahmen der Pathogenese und es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein multifaktorielles Ereignis (Ruggiero et al., 2014; Ristow et al., 2018).

Nach Baron et al unterscheidet sich eine Behandlung mit Denosumab in den folgenden drei Punkten von einer Behandlung mit Bisphosphonaten (Baron et al., 2011):

- 1) Denosumab scheint bei nicht medikamentös vorbehandelten Patientinnen zu einer größeren Reduzierung der Knochenumsatzmarker zu führen. Das kann in einer Hemmung der für den Knochenumbau verantwortlichen Zellen begründet sein oder auf einem Unterschied in der inhibitorischen Wirkung im Skelettsystem beruhen.
- 2) Nach Betrachtung der Behandlungsdauer über ein Jahr hat sich herausgestellt, dass Denosumab tiefer in das Netzwerk des Knochens eindringen kann und somit einen größeren Gewinn an Knochendichte erzielt.
- 3) Nach Absetzen von Denosumab kommt es zu einer schnelleren Reversibilität des Knochenumsatzes.

## 1.8 Prävention und Therapie von Kieferosteonekrosen

Da eine vollständige Ausheilung einer Osteonekrose des Kiefers selten ist und sie in den meisten Fällen zu einer chronischen Erkrankung führt, liegt die höchste Priorität in der Prophylaxe. Vor, während und nach einer Therapie mit antiresorptiven Medikamenten müssen Untersuchungen erfolgen, die eine bestmögliche Zahngesundheit gewährleisten und die Inzidenz von Kiefernekrosen verringern (Ruggiero et al., 2014).

Wichtig ist die interdisziplinäre Zusammenarbeit der behandelnden Ärzte, Zahnärzte und der Patienten. Die Aufgaben des Zahnarztes bestehen darin, den Patienten über das Risiko von Kieferosteonekrosen aufzuklären und zu beraten, ihn zu sensibilisieren und die Mundhygiene zu intensivieren. Es muss eine Überprüfung des vorhandenen Zahnersatzes auf Druckstellen erfolgen sowie das Sanieren potenzieller Entzündungsherde und das Glätten scharfer Knochenkanten. Erhaltungswürdige Zähne werden konservativ behandelt und parodontal geschädigte sowie stark zerstörte Zähne entfernt. Zwischen der Zahn-sanierung und der Einleitung der antiresorptiven Therapie sollten 14 Tage liegen (Grötz et al., 2016). Die Therapie ist abhängig von dem Ausprägungsgrad der Erkrankung. Im Stadium 0 wird neben der Aufklärung über Anzeichen und Symptome zu einer konservativen Behandlung geraten, die nach Bedarf durch eine antiphlogistische Medikation und/oder eine antibiotische Therapie ergänzt wird. Außerdem sind engmaschige Kontrolluntersuchungen erforderlich. Patienten im Stadium 1 wird bei Fisteln und freiliegendem Knochen zusätzlich die Anwendung von antimikrobiellen Mundspülungen empfohlen. Der Verlauf wird durch wöchentliche Nachuntersuchungen beobachtet. Kommt es in einem Zeitraum von acht Wochen nicht zu einer Heilungstendenz, ist eine chirurgische Therapie mit einer zusätzlichen antibiotischen Behandlung indiziert. Die Nahtentfernung erfolgt am zehnten Tag nach der Operation, und bei Schmerzen können Antiphlogistika verabreicht werden. Um die Heilung postoperativ nicht zu beeinträchtigen, ist eine Prothesenkarenz von einigen Wochen einzuhalten (Ruggiero et al., 2014). Im Stadium 2 wird wie im Stadium 1 therapiert. Ein chirurgisches Debridement ist hier obligatorisch. Neben einer atraumatischen Operation, erfolgt eine antibiotische Prophylaxe bis zum Abschluss der primären Wundheilung. Im Stadium 3 erfolgt nach dem Debridement der knöchernen Läsion und des Weichgewebes eine Rekonstruktion des Knochens mit Knochentransplantaten

(Otto et al., 2018). In der aktuellsten S3-Leitlinie für Antiresorptiva-assoziierte Osteonekrosen erachten die Autoren eine frühzeitige und konsequente chirurgische Therapie als medizinische Notwendigkeit. Da die Behandlungserfolgsrate der chirurgischen Therapie signifikant höher wäre und zur Vermeidung größerer knöcherner Defekte beitrage. Trotzdem wird eine konservative Therapie zur symptomlindernden Behandlung bei Patienten mit beispielsweise reduziertem Allgemeinzustand als sinnvoll erachtet (Schiegnitz et al., 2018).

### **1.9 Histologische Untersuchungen von Denosumab-assoziierten Osteonekrosen**

Bisher existiert wenig Literatur, die sich kaum mit den histopathologischen Aspekten von Kiefernekrosen unter Denosumabtherapie auseinandersetzt (Reid et al., 2010; Aghaloo et al., 2014; Yoshimura et al. 2017). Zu erwähnen ist hier beispielsweise die Studie von Matshushita und Kollegen von 2015, die die Histopathologie zweier Patientenfälle untersuchten. Jedoch wurden hier nur Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und Cathepsin K-Immunhistochemie geprüft. Eine Vielzahl von immunhistochemischen Studien, die sich mit der Thematik der BRONJ auseinandersetzen, existieren hingegen bereits (Favia et al., 2009; Ralte et al., 2011; Stockmann et al. 2011; Cho et al., 2012; Koerdt et al. 2014). Eine umfangreiche immunhistochemische Untersuchung zur eventuellen Differenzierung unterschiedlicher Knochenreaktionen von Humanpräparaten unter Bisphosphonattherapie führte Stürmer 2012 durch. Sie verglich das Auftreten verschiedener immunhistochemische Marker von Patienten unter Bisphosphonattherapie mit und ohne Osteonekrose und Patienten ohne medikamentöse Behandlung.

Nachfolgend werden die für den Knochenstoffwechsel wichtigen anabolen, katabolen Faktoren sowie Gefäßmarker aufgeführt, die für die Ätiologie und Pathogenese von Kieferosteonekrosen eine entscheidende Rolle spielen und die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Die alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das von Osteoblasten während der Knochenbildung produziert wird (Wang et al., 2018). Sie dient der Darstellung der Osteoblastenaktivität und ist ein Indikator für Veränderungen des Knochenstoffwechsels. Ein pathologisch erhöhter Wert würde beispielsweise bei Knochenmetastasen auftreten.

Osteokalzin ist ein Serummarker der Knochenneubildung, ist Teil der extrazellulären nicht-kollagenen Knochenmatrix und wird durch aktive Osteoblasten synthetisiert (Ikegame et al., 2019). Die Osteokalzinbildung wird durch 1,25-Dihydroxyx-Vitamin-D3 reguliert und ist Vitamin-K-abhängig. Wichtige Wirkungen sind die Bindung von Kalzium und Hydroxylapatit sowie das Anlocken von Osteoklasten.

„Bone morphogenetic proteins“ (BMP 2) sind Wachstumsfaktoren und gehören zur Familie der Tumornekrosefaktoren. BMP2 wird unter anderem von Chondrozyten gebildet und ist an der Knochenbildung und -regeneration sowie der Entwicklung des Herzens beteiligt (Bragdon et al., 2011). BMP2 reguliert außerdem die Differenzierung, Chemotaxis und Apoptose von Chondroblasten und Osteoblasten (Liu et al., 2007) und die Knochenneubildung während der enchondralen Ossifikationsphase, u.a. durch Stimulierung der Bildung von RUNX2 (Diomedea et al., 2018). Zusätzlich induziert BMP2 eine vermehrte Bildung von RANKL (Usui et al., 2008).

Der Transkriptionsfaktor „Run related Gen 2“ (RUNX2) wird von mesenchymalen Osteoblastenvorläuferzellen exprimiert und ist essentiell für die Osteoblastendifferenzierung und skelettale Morphogenese (Komori, 2010).

RANKL (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand) gehört zu den Tumornekrosefaktoren (TNF) und wird von mesenchymalen Stammzellen exprimiert und von B- und T-Zellen aktiviert (Guerrini et al., 2014). Er ist essentiell für die Umwandlung von Monozyten zu Osteoklasten (Fujiwara et al., 2016) und ermöglicht die Genexpression lytischer Enzyme (Boyle et al., 2003), wie TRAP und Cathepsin K (Matsuo et al., 2004).

Osteoprotegerin gehört ebenfalls zu den Tumornekrosefaktoren und wird von Stromazellen und Osteoblasten sezerniert. OPG hemmt die Osteoklastogenese, indem es die Wechselwirkung zwischen RANKL und RANK verhindert (Kang et al., 2014).

Das Gleichgewicht zwischen OPG und RANKL bestimmt den Grad der Proliferation und Aktivität der Osteoklasten (Theolyre et al., 2004).

RANK (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B) ist ein Transmembranrezeptor, der sich auf der Oberfläche von Prä-Osteoklasten befindet und als Ligand für RANKL dient (Boyce and Xing, 2008). Diese Interaktion führt zu Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten und folglich zur Knochenresorption (Geusens, 2012).

Cathepsin K ist eine Zysteinprotease, die von Osteoklasten exprimiert wird und im Rahmen der Knochenresorption Kollagen Typ I proteolytisch abbaut (Drake et al., 2017).

In der Resorptionslakune zwischen Osteoklast und Knochenoberfläche herrscht ein niedriger pH-Wert, welcher essentiell für die Wirkung dieser Kollagenase ist.

Die Matrix-Metallo-Protease 8 ist eine zink-abhängige Kollagenase, die Proteine hydrolytisch spaltet. Diese Proteine sind am Abbau von Geweben wie den Kollagenfasern des Parodonts sowie Krankheitsprozessen wie Arthritis und Metastasen beteiligt. Durch die Modulation der Immunantwort und das Anlocken von neutrophilen Granulozyten ist sie ein Marker für akute und chronische Entzündungen (Van Lint et al., 2006).

Die Bestimmung der Enzymaktivität von MMP8 dient zur frühen Diagnosestellung bei Parodontitis und Periimplantitis (Kasuma et al., 2018).

Der Von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein Protein, das von Endothelzellen und Megakaryozyten gebildet wird und den Gerinnungsfaktor VIII trägt und somit maßgeblich an der Blutstillung beteiligt ist. Zusätzlich vermittelt er die Aggregation der Thrombozyten an sub-endothelialen Fasern. Er wird in der Immunhistochemie für die selektive Anfärbung von Gefäßen und ihre Quantifizierung genutzt (Matos et al., 2011).

Der „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF) wird während der Embryogenese von Chondrozyten produziert, danach von Osteoblasten, mehrkernigen Riesenzellen, Fibroblasten und Lymphozyten (Matos et al., 2011). VEGF ist verantwortlich für die Gefäßneubildung während Wachstumsphasen, nach ischämischer Schädigung des Endothels und für die Vitalität der Kapillaren. Eine weitere Rolle spielt der Faktor bei der ausreichenden Blutversorgung von Tumoren (Emon et al., 2018).

### **1.10 Fragestellung**

Obwohl es eine Vielzahl von Studien gibt, die sich mit Prävention, Diagnostik, Risiken und Therapiemöglichkeiten von Denosumab-assoziierten Osteonekrosen befassen (Pittman et al., 2016; Aljohani et al., 2018; Soutome et al., 2018), wurden wenige histologische und immunhistochemische Untersuchungen vorgenommen (Aghaloo et al., 2014; Matsushita et al., 2015; Yoshimura et al., 2017). Die vorhandene Literatur zu histopathologischen Untersuchungen an Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen ist hingegen zahlreich (zum Beispiel Bedogni et al., 2008; Favia et al., 2009; Weinstein et al., 2009; Cho et al., 2012; Sharma et al., 2013; Franco-Pretto et al., 2014; Koerdt et al., 2014; Pabst et al., 2014; Cardemil et al., 2014; Wehrhan et al., 2017).

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, mögliche histologische und immunhistochemische Besonderheiten von Denosumab-assoziierten Osteonekrosen aufzuzeigen und diese Ergebnisse mit Befunden von Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen aus der Literatur zu vergleichen. Weiteres Ziel war die Prüfung eines statistischen Zusammenhangs zwischen Patientendaten und immunhistochemischen Befunden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungsmaterial

#### 2.1.1 Patientengruppe

Das untersuchte Knochenmaterial stammt von 19 Patienten, die alle mit Denosumab therapiert wurden. Ihnen wurde während eines operativen Eingriffs Knochen aus dem Ober- und Unterkiefer entnommen, der nachfolgend genauer erläutert wird.

Die Patientenauswahl unterlag folgenden Kriterien:

- Medikation mit Denosumab auf Grund von Osteoporose oder malignen Knochenerkrankungen.
- Keine vorausgegangene Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich.
- Keine klinisch oder radiologisch bestätigten Metastasen im Kieferbereich.

**Tab. 1:** Angaben zur Anamnese der Patienten mit Denosumab-assoziiertes Osteonekrose: Nummerierung, Patientennummer, Alter, Geschlecht, maligne Grunderkrankungen, verabreichtes Medikament, entnommene Region, Metastasen bei malignem Primärkarzinom

Nr.	Patientennummer	Alter, Geschlecht	Maligne Grunderkrankungen	Medikament	Regio	Metastasen
1	E2282/16	82, männlich	Prostata-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	033-042	Ja
2	E765/17	56, weiblich	Mamma-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	035	Ja
3	E15632/14	45, weiblich	Mamma-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	035-038	Ja
4	E11572/16	70, männlich	Bronchial-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	046-047	Ja
5	E3803/16	70, männlich	Osteoporose	Prolia® / 2 x Jahr	033-031	Nein

6	E20605/15	40, weiblich	Mamma-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	046-048	Ja
7	E19442/14	46, weiblich	Mamma-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	025-028	Ja
8	E12139/16	68, männlich	Prostata-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	035-038,042-044	Ja
9	E7636/16	80, männlich	Prostata-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	013+023-026	Ja
10	E15526/15	71, männlich	Prostata-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	043	Ja
11	E3781/16	50, weiblich	Mamma-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	047-048	Ja
12	E7014/16	84, männlich	Prostata-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	046-048	Ja
13	E7104/16	87, männlich	Prostata-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	034	Ja
14	E12955/16	74, männlich	Prostata-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	041	Ja
15	E8299/16	80, weiblich	Osteoporose	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	043	Nein
16	E4613/15	75, weiblich	Mamma-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	043	Ja
17	E2517/17	70, männlich	Prostata-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	046+016	Ja
18	E14168/16	78, weiblich	Osteoporose	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	034-044 (Os liber)	Nein
19	E21376/14	63, weiblich	Mamma-Karzinom	XGEVA® 120 / alle 4 Wochen	016	Ja

Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt unter der Nummer 298/18. Ausgeschlossen wurden alle Patienten bei denen eine Bestrahlung des Kopf- oder Halsbereichs erfolgt ist oder eine Osteonekrose des Kiefers anderer Genese vorlag.

### 2.1.2 Operativer Ablauf

#### Präoperatives Vorgehen:

Der Patient wurde bei der gesicherten Diagnose der Denosumab-assoziierten Osteonekrose, in der Regel, vier bis fünf Tage vor dem geplanten operativen Eingriff stationär aufgenommen. In dieser Zeit wurde eine intravenöse Antibiotikatherapie eingeleitet. Zusätzlich wurde kurz vor der Operation eine Schnittbilddiagnostik (CT oder DVT) der nekrotischen Region angefertigt, um die lokale Ausdehnung der Nekrose zu evaluieren.

#### Intraoperatives Vorgehen:

Der Eingriff wurde in nasaler Intubationsnarkose durchgeführt. Nach Einbringen einer Rachenabstopfung erfolgte die intraorale Desinfektion mittels CHX und die manuelle Reinigung der Zähne und des Operationsgebietes. Es wurde eine Adrenalinmischung unter die Schleimhaut appliziert. Die Schleimhaut um den nekrotischen Defekt wurde mit einem 15er Skalpell zirkulär abgetragen. Es wurde sicher gestellt, dass die spätere Naht der plastischen Deckung allseits gesunde und gut durchblutete Mundschleimhaut adaptierte. Die Bildung eines geeigneten Mukoperiostlappens wurde je nach Größe und Art der Entlastung so gestaltet, dass eine spätere plastische Deckung des Defektes möglichst spannungsfrei gewährleistet wurde. Nach vorsichtiger Präparation dieses Lappens wurden die jeweiligen Lappenanteile geschützt. Daraufhin erfolgte eine Knochenbiopsie des nekrotischen Knochens und dem Grenzgebietes mit der Zange nach Luer. Insbesondere im Falle einer malignen Grunderkrankung mit potentieller ossärer Metastasierung, ist die Differentialdiagnose einer ossären Metastase auszuschließen. Daraufhin erfolgte die Dekortikation, in aller Regel mit Rosenbohrern absteigender Größe. Wenn nicht mit fluoreszierenden Techniken gearbeitet wird, wird der Knochen so lange abgetragen, bis frische Blutungen aus dem Knochengewebe sichtbar werden. Alle scharfen Knochenkanten wurden daraufhin abgerundet. Nach mehrmaligem Spülen zur Entfernung des Knochendetritus wird das Operationsgebiet erneut mit CHX desinfiziert. Die plastische Deckung des Befundes sollte zweischichtig erfolgen. Eine tiefe, resorbierbare Naht (Vicryl) adaptierte die Wunde in ausreichender Weise, so dass die Schleimhautnaht die Mundschleimhaut spannungsfrei adaptierte. Hierfür wurde entweder wieder Vicryl oder nicht resorbierbares Sup-

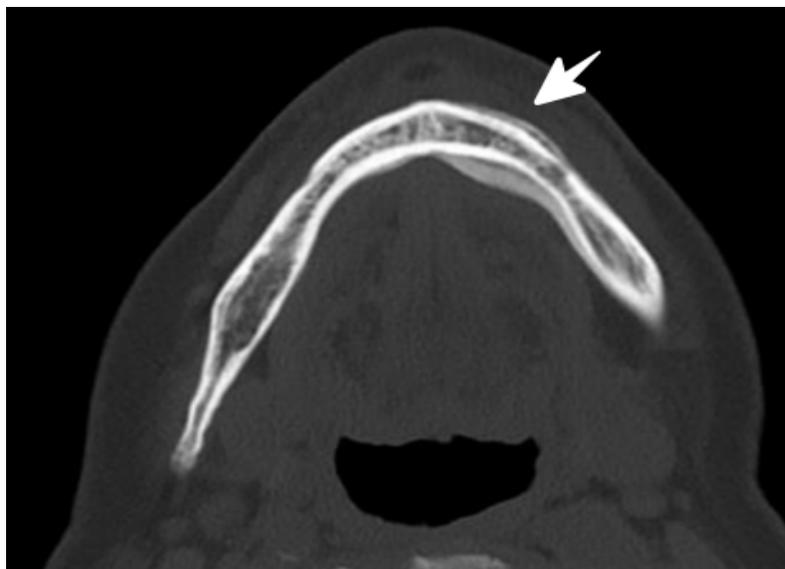
ramid verwendet. Dehiszenzen jeder Größe waren hierbei dringend zu vermeiden. Anschließend wurde für die weitere Dauer des Aufenthaltes (4-5 Tage) eine nasogastrale Sonde gelegt. Die intravenöse Antibiotikagabe erfolgte ebenfalls bis zu Entlassung des Patienten. Die Nähte wurden, nach täglicher Kontrolle, Pflege und Desinfektion, 12-14 Tage postoperativ entfernt.



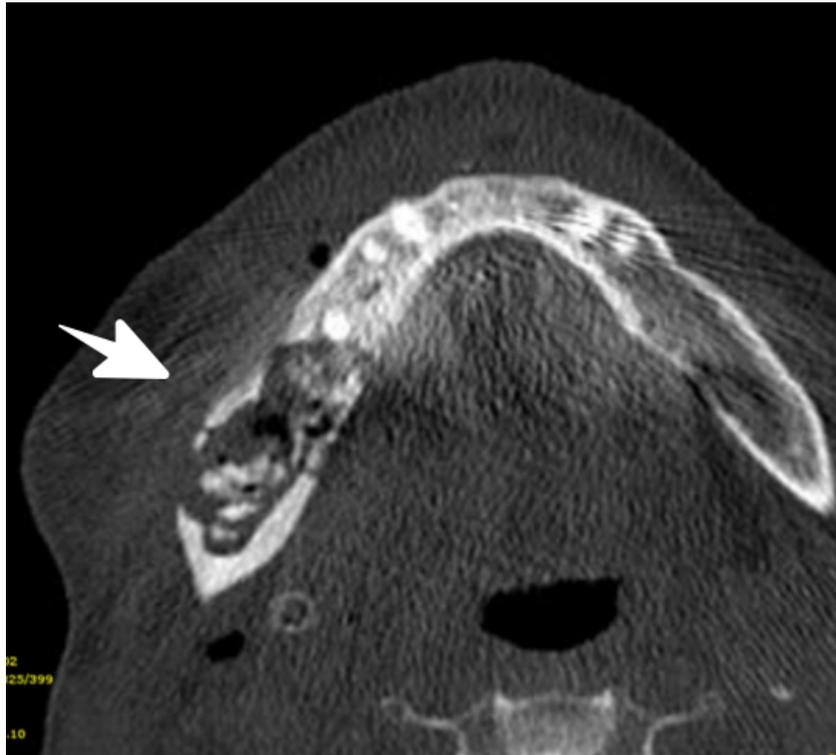
**Abb. 3:** Klinisches Beispiel einer Denosumab-assoziierten Osteonekrose der regio 23 (weißer Pfeil) eines Patienten aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Bonn (Computertomographie, CT).



**Abb. 4:** Klinisches Beispiel einer Denosumab-assoziierten Osteonekrose der regio 33 (weißer Pfeil) eines Patienten aus der Klinik Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Bonn (Computertomographie, CT).



**Abb. 5:** Klinisches Beispiel einer Schwellung des Periosts (weißer Pfeil) des linken Unterkiefers von dem gleichen Patienten wie in Abbildung 3. Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Bonn (Computertomographie, CT).



**Abb. 6:** Klinisches Beispiel einer ausgeprägten Denosumab-assoziierten Osteonekrose ausgehend von regio 44 bis zum Kieferwinkel (weißer Pfeil). Patienten aus der Klinik und Poliklinik der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Bonn (Computertomographie, CT).

### 2.1.3 Kontrollgruppe

Bei den Kontrollpräparaten handelt es sich um Gewebeproben aus unveränderten Kieferknochen, die im Rahmen von Studien des Teilprojektes 7 der Klinischen Forschungsgruppe 208 entnommen wurden und stammen aus dem Fundus des Labors für Oralbiologische Grundlagenforschung der Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Bonn (Ethikvotum der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn 086/11).

Es handelt sich um zwei Maxillabiospien jeweils von einer weiblichen Patientin (67 Jahre) und einem männlichen Patienten (50 Jahre).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Verwendete Reagenzien

Pepsin 0,4 %	0,02 g Pepsin 5 mL 0,01 N HCL
TBS-Puffer	9 g NaCl 6,0 g Tris in 1000 mL Aqua dest. gelöst
TBS/BSA-Puffer	10 mL TBS-Puffer
(1 %- bzw. 4 %-ig)	0,1 bzw. 0,4 g Serumalbumin Rind

### 2.2.2 Verwendete Chemikalien

3,3 Diaminobenzidin (DAB)	Pierce, Rockford, Irland
Alkohole (70 %-100 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aquatex	Merck, Darmstadt, Deutschland
Azophloxin	Waldeck, Münster, Deutschland
DePex	Serra, Heidelberg, Deutschland
Diäthylbarbitursäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
EDTA	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Eosinlösung, 1%-ig, wässrig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung 4%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin n Meyer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisen-III-chlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin gelblich	Merck, Darmstadt, Deutschland

Formaldehydls., 4%-ig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formol, 40 %-ig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lichtgrün	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mayer's saures Hämalan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumazetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrit-Lsg. 4 %-ig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Orange G	Waldeck, Münster, Deutschland
Paraffin Histo-Comp	Vogel, Gießen, Deutschland
Pararosanilin-HCL-Lsg., 4 %-ig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pepsin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Perjodsäure 0,5 %-ig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphormolybdänsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 2 mol/L	Merck, Darmstadt, Deutschland
Säurefuchsin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schiff's Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
TrisHCL Puffer	
Weinsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %-ig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylolersatz XEM 2000	Vogel, Gießen, Deutschland

### 2.2.3 Verwendete Geräte und Materialien

Analysewaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Deckgläser	Engelbrecht, Edermunde, Deutschland
Einbettautomat	Vogel, Gießen, Deutschland
Glasküvetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lichtmikroskop Axioskop 2	Zeiss, Jena, Deutschland

Mikroskopkamera Axioplan 1	Zeiss, Jena, Deutschland
Paraffinausgussstation	Sakura, Heppenheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotationsmikrotom HM 355S	Microm International GmbH, Walldorf Deutschland
D Superfrost Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Wärmeplatte	Medax Nagel, Kiel, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland

## 2.2.4 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

**Tab. 2:** Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Art	Spezies	Verdünnung	Inkubation	Firma
Alkalische Phosphatase	polyklonal	Kaninchen	gebrauchsfertig	24 h bei 4°C	Abcam, Cambridge, UK
BMP-2	polyklonal	Ziege	1:25	24 h bei 4°C	Santa Cruz, Biotechnology, Inc. Heidelberg, DE
Cathepsin K	polyklonal	Kaninchen	1:200	24 h bei 4°C	Zyted
MMP8	monoklonal	Maus	1:50	24 h bei 4°C	Abcam, Cambridge, UK
OPG	polyklonal	Ziege	1:200	24 h bei 4°C	Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg, DE
Osteokalzinzin	monoklonal	Maus	1:1000	1h bei RT	TaKaRa Bio Inc., Otsu Shiga, Japan

Antikörper:	Art:	Spezies:	Verdünnung:	Inkubation:	Firma:
RANK	polyklonal	Ziege	1:25	24h bei 4°C	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Heidelberg, DE
RANKL	polyklonal	Ziege	1:25	24h bei 4°C	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Heidelberg, DE
RUNX2	polyklonal	Ziege	1:30	24h bei 4°C	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Heidelberg, DE
VEGF	polyklonal	Kaninchen	1:25	1h bei RT	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Heidelberg, DE
vWF	polyklonal	Kaninchen	1:200	1h bei RT	Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen, DE

**Tab. 3:** Verwendete Sekundärantikörper

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

### 2.2.5 Fixierung

Die Präparate wurden nach der Entnahme in 4 % phosphatgepuffertem Formaldehyd für 48 Stunden fixiert.

### 2.2.6 Entkalkung

Das Gewebe wurde in 10 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für 12 Wochen entkalkt, wobei die Entkalkungslösung wöchentlich gewechselt wurde, bis eine Trübung der Flüssigkeit ausblieb. Im Anschluss erfolgte die Wässerung der Präparate für sechs Stunden.

### 2.2.7 Dehydrierung und Einbettung

Im Gewebeentwässerungs- und Einbettautomaten Tissue-Tek V.I.P. 2000/3000 der Marke Vogel (Gießen) erfolgte die Dehydrierung und Einbettung in aufeinander folgenden Schritten. Nach einer zweistündigen Wässerung wurden die Präparate unter Verwendung der unten aufgeführten aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und schließlich paraffiniert:

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 Min.

11. Paraffin	60°C	1 Std.
12. Paraffin	60°C	1 Std.
13. Paraffin	60°C	1 Std.
14. Paraffin	60°C	1 Std.

Nach der Platzierung der Präparate mit der Sagittalschnittfläche nach oben in spezielle Kunststoffküvetten erfolgte die Einbettung mit Hilfe der Paraffinausgießstation Tissue-Tek TEC der Firma Sakura, Heppenheim.

### 2.2.8 Schnitthanfertigung

Am Rotationsmikrotom HM 355 S Microm International der Firma Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland) wurden die zuvor gekühlten Präparate in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf einzelne Objektträger in der Ausführung Superfrost Plus der Firma Merzel, Braunschweig platziert. Nach Trocknung auf einer 42°C warmen Wärmeplatte für 10 Minuten wurden die Schnitte im Anschluss für weitere 24 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank gelagert.

### 2.2.9 Entparaffinierung

Im Zuge der Vorbereitung für die Übersichts- und immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnittpräparate manuell anhand der unten aufgeführten Beschreibung entparaffiniert:

1. Xylol (Xylolersatz)	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.

## 2.2.10 Übersichtsfärbungen

### 2.2.10.1 Hämatoxylin – Eosin – (HE-) Färbung

#### Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Jeder zehnte Schnitt wurde in folgender Anleitung mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt:

- |        |   |         |
|--------|---|---------|
| 1.-7.- | siehe 2.2.9                                       |         |
| 8.     | Mayer's Häkalaunlösung                            | 30 Sek. |
| 9.     | Spülen unter lauwarmen, fließendem Leitungswasser | 4 Min.  |
| 10.    | Eosinlösung                                       | 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 in DePex                                |         |

### 2.2.10.2 Trichrom nach Masson-Goldner

#### Trichrom

Stammlösungen:

Eisenhämatoxylin nach Weigert:

10 mL Eisenhämatoxylin A und 5 mL Eisenhämatoxylin B

Massonlösung:

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

Ponceau-Säurefuchsinlösung:

0,5 Azophloxin mit 100 mL Aqua dest. und 0,2 mL Eisessig mischen und filtrieren.

Phosphormolybdänsäure-Orange G:

3 g Phosphormolybdänsäure, 2 g Orange G und 100 mL Aqua dest.

1.-7. 2.2.9

- |     |   |        |
|-----|---|--------|
| 8.  | Eisenhämatoxylin nach Weigert             | 2 Min. |
| 9.  | Bläuen in Leitungswasser                  | 5 Min. |
| 10. | Ponceau-Säurefuchsinlösung                | 5 Min. |
| 11. | Differenzierung in 1%-iger Essigsäure     |        |
| 12. | Beizen in Phosphormolybdänsäure-Orange G  |        |
| 13. | Spülen in 1%-iger Essigsäure              |        |
| 14. | Lichtgrün                                 | 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. |
| 17. | Eindecken mit Depex                       |        |

## 2.2.11 Histochemische Färbungen

### 2.2.11.1 PAS-Reaktion

#### PAS

Farblösungen:

0,5 %-ige Periodsäure, Schiff's Reagenz

- |       |  |            |
|-------|--|------------|
| 1.-7. | siehe 2.2.9                                |            |
| 8.    | 0,5 %-ige Periodsäure                      | 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 lauwarmen Leitungswasser         |            |
| 14.   | Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: |            |
|       | Absoluter Alkohol                          | 2 Min.     |
|       | Absoluter Alkohol                          | 2 Min.     |
|       | Xylolersatz                                | 2 Min.     |
|       | Xylolersatz                                | 2 Min.     |
| 15.   | Eindecken in DePex                         |            |

### 2.2.11.2 TRAP

- |       |  |         |
|-------|--|---------|
| 1.-7. | S. 2.2.9   |         |
| 8.    | Aktivierung mit tartratresistenter saurer Phosphatse | 60 Min. |

- in Tris.HCL-Puffer bei 37°C
9. Verfahren nach Barka und Anderson bei 37°C 60 Min.  
 Lösung 1: 24 Tropfen 4 %-ige Pararosanilin-HCL-Lsg.  
 und 25 Tropfen 4 %-ige Natriumnitrit-Lsg.  
 werden nach 60 Sek, mit 120mL Veronalazetatpuffer  
 verdünnt und anschließend 1g Weinsäure hinzugefügt.  
 Einstellung der Lsg. mit 1n NaOH und pH 5,05

Lösung 2: 40 mg Naphtol-AS-Bisphosphat und 4 mL Dimethylformamid  
 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 Mayer's saurem Hämalun 5 Sek.  
 12. Spülen unter fließendem Leitungswasser 5 Min.  
 13. Eindecken in Aquatex

## 2.2.12 Immunhistochemie

### 2.2.12.1 Alkalische Phosphatase

1.-7. S. 2.2.9

8. Spülen in TBS 10 Min.  
 9. Blockieren in endogener Peroxidase 10 Min.  
 in 70 mL Methanol und 700 µL 30 %-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 10. Spülen in TBS 10 Min.  
 11. Inkubation mit Zitratpuffer 30 Min. bei 80°C  
 12. Mit 1%-igem BSA blocken 20 Min.  
 13. Inkubation mit Primärantikörper 24 h bei 4°C  
 14. Spülen in TBS 10 Min.

15.	Inkubation mit Sekundärantikörper (Envision Anti rabbit, HRP-konjugiert)	30 Min.
16.	Spülen in TBS	10 Min.
17.	Färbung in DAB	10 Min.
18.	Spülen in TBS	10 Min.
19.	Gegenfärbung mit Mayer's saurem Hämalan	1 Sek.
20.	Bläuen unter fließendem Leitungswasser	
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 in DePex	

### 2.2.12.2 Osteokalzin

1.-7.	Siehe 2.2.9	
8.	Spülen in TBS	10 Min.
9.	Blockieren in endogener Peroxidase in 70 mL Methanol und 700 µL 30 %igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	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	
13.	Inkubation mit Sekundärantikörper (Dako Envision anti-mouse)	30 Min.
14.	Spülen in TBS	10 Min.

- |     |  |         |
|-----|--|---------|
| 15. | Färbung in DAB                             | 10 Min. |
| 16. | Spülen in TBS                              | 10 Min. |
| 17. | Gegenfärbung mit Mayer's 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 in Depex                         |         |

### 2.2.12.3 Bone morphogenetic protein 2 (BMP2)

- |       |  |                  |
|-------|--|------------------|
| 1.-7. | s. 2.2.9   |                  |
| 8.    | Spülen in TBS  | 10 Min.          |
| 9.    | Blockieren in endogener Peroxidase<br>in 70 mL Methanol und 700 µL 30 %-igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 10 Min.          |
| 10.   | Spülen in TBS  | 10 Min.          |
| 11.   | Vorverdau mit 0,4 %igem Pepsin   | 20 Min. bei 24°C |
| 12.   | Spülen in TBS  | 10 Min.          |
| 13.   | Blockieren mit Kaninchenserum 1:5 mit TBS/BSA  | 20 Min.          |
| 14.   | Inkubation mit Primärantikörper<br>(Verdünnung 1:25 in 1 %-igen TBS/BSA)                                   | 24 h bei 4°C     |
| 15.   | Spülen in TBS  | 10 Min.          |
| 16.   | Inkubation mit Sekundärantikörper<br>(Dako, anti goat, HRP-konjugiert 1:50)                                | 30 Min.          |

- |     |  |         |
|-----|--|---------|
| 17. | Spülen TBS                                 | 10 Min. |
| 18. | Färbung in DAB                             | 10 Min. |
| 19. | Spülen in TBS                              | 10 Min. |
| 20. | Gegenfärbung in Mayer's 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 in DePex                         |         |

#### 2.2.12.4 RUNX2

- |       |  |                  |
|-------|--|------------------|
| 1.-7. | s. 2.2.9   |                  |
| 8.    | Spülen in TBS  | 10 Min           |
| 9.    | Blockieren in endogener Peroxidase<br>in 70 mL Methanol und 700 µL 30 %-igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 10 Min.          |
| 10.   | Spülen in TBS  | 10 Min.          |
| 11.   | Vorverdauen mit 0,4 %-igem Pepsin  | 20 Min. bei 37°C |
| 12.   | Spülen in TBS  | 10 Min.          |
| 13.   | Vorblockung mit 4 %-igem TBA/BSA   | 20 Min.          |
| 14.   | Inkubation mit Primärantikörper<br>(Verdünnung 1:30 in 1 %-igem TBS/BSA)                                   | 24 h bei 4°C     |
| 15.   | Spülen in TBS  | 10 Min.          |
| 16.   | Inkubation mit Sekundärantikörper<br>(anti goat, HRP-konjugiert,   | 30 Min.          |

Verdünnung 1:30 in 1 %-igem TBS/BSA)		
17.	Spülen in TBS	10 Min.
18.	Färbung in DAB	10 Min.
19.	Spülen in TBS	10 Min.
20.	Gegenfärbung in Mayer's 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	

### 2.2.12.5 RANK

1.-7.	s. 2.2.9	
8.	Spülen in TBS	10 Min.
9.	Blockieren in endogener Peroxidase in 70 mL Methanol und 700 µL 30 %-igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 Min.
10.	Spülen in TBS	10 Min.
11.	Vorverdauung mit 0,4 % Pepsin	5 Min.
12.	Spülen in TBS	10 Min.
13.	Vorblockung mit 4 % TBS/BSA	20 Min.
14.	Inkubation mit Primärantikörper (Verdünnung 1:25 in 1 %-igem TBS/BSA)	20 h bei 4°C
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                             | 10 Min. |
| 19. | Spülen in TBS                              | 10 Min. |
| 20. | Gegenfärbung mit Mayer's saurem Hämalan    | 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 in DePex                         |         |

### 2.2.12.6 OPG

- |       |   |              |
|-------|---|--------------|
| 1.-7. | s. 2.2.9  |              |
| 8.    | Spülen in TBS   | 10 Min.      |
| 9.    | Blockieren in endogener Peroxidase<br>in 70 mL Methanol und 700 µL in 30 %-igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 10 Min.      |
| 10.   | Spülen in TBS   | 10 Min.      |
| 11.   | Verblockung mit TBS/BSA 4 %   | 20 Min.      |
| 12.   | Inkubation mit Primärantikörper<br>(Verdünnung 1:200 in 1 %-igem TBS/BSA)                                     | 20 h bei 4°C |
| 13.   | Spülen in TBS   | 10 Min.      |
| 14.   | Inkubation mit Sekundärantikörper<br>(anti goat HRP-konjugiert, Verdünnung 1:50 in                            | 30 Min.      |

	1 %-igen TBS/BSA)	
15.	Spülen in TBS	10 Min.
16.	Färbung in DAB	10 Min.
17.	Spülen in TBS	10 Min.
18.	Gegenfärbung in Mayer's 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	

### 2.2.12.7 RANKL

1.-7.	s. 2.2.9	
8.	Spülen in TBS	10 Min.
9.	Blockieren in endogener Peroxidase in 70 mL Methanol und 700 µL 30 %-igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 Min.
10.	Spülen in TBS	10 Min.
11.	Inkubation mit Primärantikörper (Verdünnung 1:50 mit 1 %-igem TBS/BSA)	30 Min.
12.	Spülen in TBS	10 Min.
13.	Inkubation mit Sekundärantikörper (Dako Envision, antigoat, HRP-konjugiert, Verdünnung 1:50 in TBS/BSA)	30 Min.
14.	Spülen in TBS	10 Min.

15.	Färbung in DAB	10 Min.
16.	Spülen in TBS	10 Min.
17.	Gegenfärbung in Mayer's 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 in DePex	

### 2.2.12.8 Cathepsin K

1.-7.	s. 2.2.9	
8.	Spülen in TBS	10 Min.
9.	Blockieren in endogener Peroxidase in 70 mL Methanol und 700 uL 30 %-igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 Min.
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)	24 h bei 4°C
13.	Spülen mit TBS	10 Min.
14.	Inkubation mit Sekundärantikörper (Dako Envision, anti rabbit)	30 Min.
15.	Spülen in TBS	10 Min.
16.	Färbung in DAB	10 Min.
17.	Spülen in TBS	10 Min.
18.	Gegenfärbung mit Mayer's 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                        |        |

### 2.2.12.9 MMP8

- |       |  |              |
|-------|--|--------------|
| 1.-7. | s. 2.2.9   |              |
| 8.    | Spülen in TBS  | 10 Min.      |
| 9.    | Blockieren in endogener Peroxidase<br>in 70 mL Methanol und 700 µL 30 %-igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 10 Min.      |
| 10.   | Spülen in TBS  | 10 Min.      |
| 11.   | Inkubation mit Primärantikörper<br>(in einer Verdünnung 1:50 in 1 %-iger TBS/BSA Lösung)                   | 24 h bei 4°C |
| 12.   | Spülen in TBS  | 10 Min.      |
| 13.   | Inkubation mit Sekundärantikörper<br>(Dako Envision, anti mouse)   | 30 Min.      |
| 14.   | Spülen in TBS  | 10 Min.      |
| 15.   | Färbung in DAB   | 10 Min.      |
| 16.   | Spülen in TBS  | 10 Min.      |
| 17.   | Gegenfärbung mit Mayer's saurem Hämalan  | 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 in DePex

### 2.2.12.10 Von-Willebrand-Faktor (vWF)

1.-7. s. 2.2.9

8. Spülen in TBS	10 Min.
9. Blockieren in endogener Peroxidase in 70 mL Methanol und 700 µL 30 %-igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 Min.
10. Spülen in TBS	10 Min.
11. Inkubation mit Primärantikörper (Verdünnung 1:200 mit 1 %-igem TBS/BSA)	1 h
12. Spülen in TBS	10 Min.
13. Inkubation mit Sekundärantikörper (Dako Envision, anti rabbit, HRP-konfiguriert)	30 Min.
14. Spülen in TBS	10 Min.
15. Färbung in DAB	10 Min.
16. Spülen in TBS	10 Min.
17. Gegenfärbung in Mayer's 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	

### 2.2.12.11 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

1.-7.	s. 2.2.9	
8.	Spülen in TBS	10 Min.
9.	Blockieren in endogener Peroxidase in 70 mL Methanol und 700 µL 30 %-igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 Min
10.	Spülen in TBS	10 Min.
11.	Inkubation mit Primärantikörper (Verdünnung 1:25 mit 1 %-igen TBS/BSA)	30 Min.
12.	Spülen in TBS	10 Min.
13.	Inkubation mit Sekundärantikörper (Dako Envision, anti rabbit, HRP-konfiguriert)	30 Min.
14.	Spülen in TBS	10 Min.
15.	Färbung in DAB	10 Min.
16.	Spülen in TBS	10 Min.
17.	Gegenfärbung mit Mayer's saurem Hämlaun	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 in DePex	

## **2.2.13 Kontrolle der Färbungen**

### **2.2.13.1 Negativkontrolle**

In jeder Färbereihe wurden zwei Negativkontrollen durchgeführt, um unspezifische Reaktionen ausschließen zu können.

Die erste Negativkontrolle wurde statt mit dem Primärantikörper mit 1 %-igem TBS/BSA inkubiert, ansonsten vollkommen identisch behandelt. Fehlt hier die Färbung durch DAB, ist die Färbung proteinspezifisch und somit erfolgreich verlaufen.

Bei der zweiten Negativkontrolle wurde zudem auch der Sekundärantikörper durch 1%-iges TBS/BSA ersetzt. Fehlt auch hier die Färbung durch DAB, ist auch diese Färbung als erfolgreich zu erachten.

### **2.2.13.2 Positivkontrolle**

Für die Positivkontrollen wurden Paraffinschnitte von Gewebeproben verwendet, die bereits immunhistochemische Reaktionen bei der Verwendung der Primärantikörper gezeigt hatten.

### **2.2.13.3 Semiquantitative und photographische Dokumentation und Auswertung**

Unter zur Hilfenahme eines Durchlichtmikroskops Axioskop 2 der Firma Zeiss (Jena) wurden die Färbungen untersucht.

Für die semiquantitative Auswertung wurden repräsentative regions of interest (ROI) festgelegt und in 40-facher Vergrößerung beurteilt. ROI wurden nach erfolgter histologischer Befundung für folgende Bereiche ausgewählt: Nekrotische Areale, Weichgewebe und vitaler Knochen (6. Anhang).

Die Analysen der Immunreaktionen erfolgten nach folgender Einteilung:

0	= keine Immunreaktion
1	= schwache Immunreaktion
2	= mittelstarke Immunreaktion
3	= starke Immunreaktion
4	= sehr starke Immunreaktion

Die fotografische Dokumentation erfolgte mit der AxioCam MRc, sowie der AxioVision Rel. 4.5“Software, jeweils von der Firma Zeiss (Jena), in 5-, 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung.

#### **2.2.14 Statistische Auswertung**

Für eine statistische Betrachtung wurden Summenwerte aller Immunreaktionen gemittelt, die getrennt nach Geschlechtern als Boxplots dargestellt und mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentests verglichen wurden.

Für eine Assoziation der mittleren Summenwerte zum Alter wurde ein Scatterplot erstellt und ein unvariates, lineares Modell berechnet.

Die mittleren Summenwerte wurden außerdem getrennt nach Grunderkrankungen über Boxplots dargestellt und mittels einfaktorieller Varianzanalyse verglichen.

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad PRISM 8 (GraphPad Software, La Jolla California USA) durchgeführt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Anamnese**

Alle mit Denosumab behandelten Patienten dieser Studie entwickelten eine Osteonekrose. Insgesamt liegen 19 Präparate vor bestehend aus einer Gruppe von 10 Männern und 9 Frauen. 8 Patienten litten an einem Prostata- Karzinom, 8 an einem Mamma-Karzinom, 2 an Osteoporose und einer an einem Bronchial-Karzinom. Alle Tumorpatienten hatten Metastasen. 18 Patienten erhielten XGEVA<sup>®</sup> 120 alle 4 Wochen und ein Patient zweimal jährlich Prolia<sup>®</sup>.

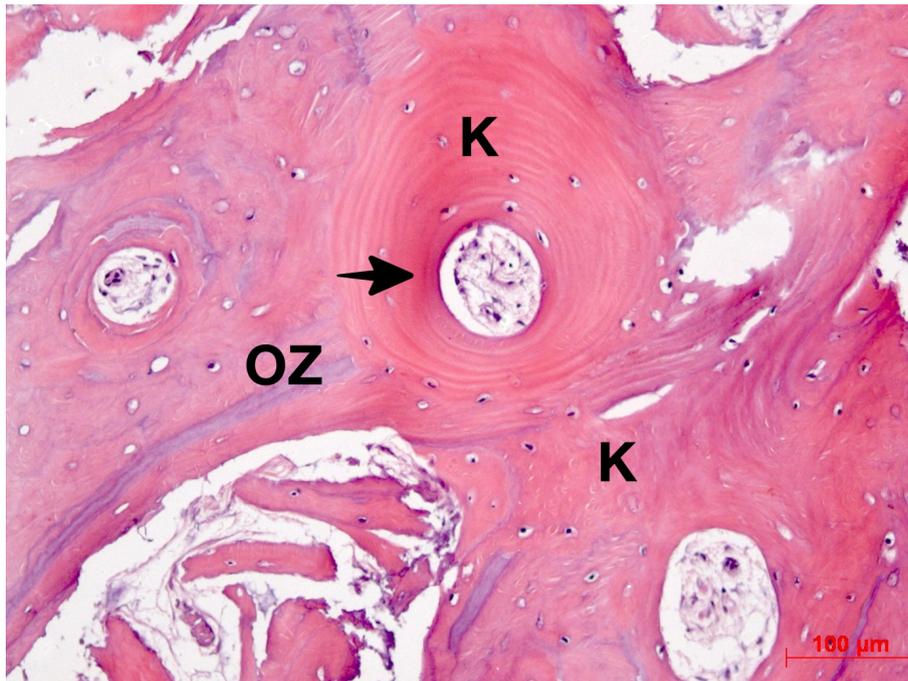
#### **3.2 Histologische Übersichtsfärbungen**

Zuerst erfolgt die beispielhafte Darstellung der Histologien der gesunden Patienten und danach die der Präparate der Patienten, die eine DRONJ entwickelten.

##### **3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung**

###### **3.2.1.1 Gesunder Knochen**

Die Knochenpräparate zeigten kompakte und spongiöse Anteile, die stark eosinophil angefärbt wurden. Neben Osteonen und konzentrischen Knochenlamellen waren Spongiosatrabekel und Bündelknochen erkennbar. An einigen Resorptionslakunen befanden sich Stellen frisch angelagertem Osteoids, viele basophile lining cells (abgeflachte Osteoblasten im inaktiven Zustand), Osteoblasten, deren Vorläuferzellen und Osteoklasten. Außerdem waren Haver'sche Kanäle und gleichmäßig verstreute Osteozytenlakunen erkennbar, die basophile Osteozyten enthielten (Abb. 7).

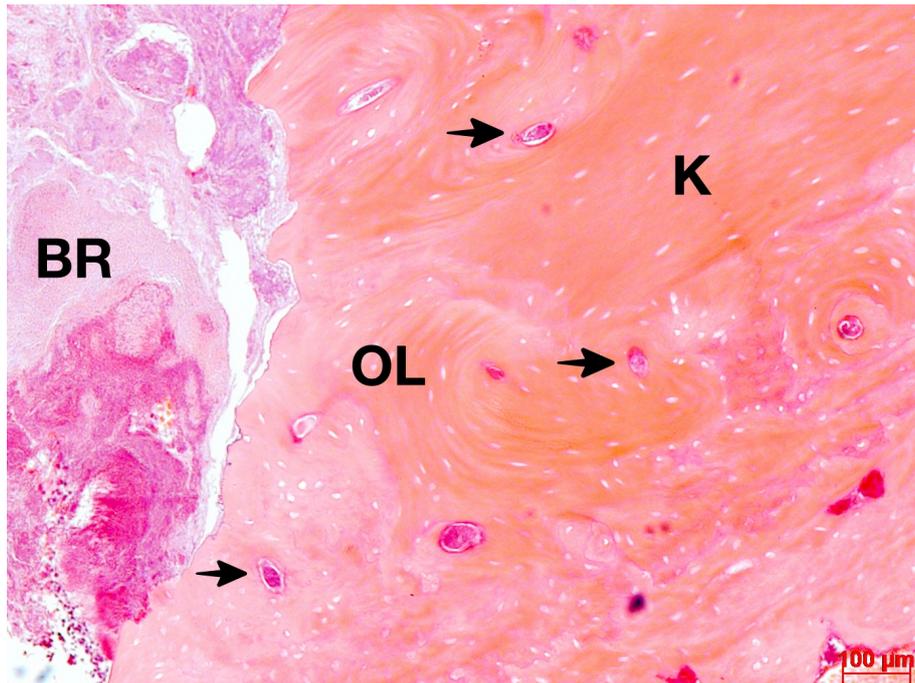


**Abb. 7:** Gesunder Knochen, Osteozytenlakunen mit Osteozyten (OZ), Haver's Kanal (Pfeil) (Originalvergrößerung x20). H&E, Präparat 2100

### 3.2.1.2 Denosumab-Nekrosen

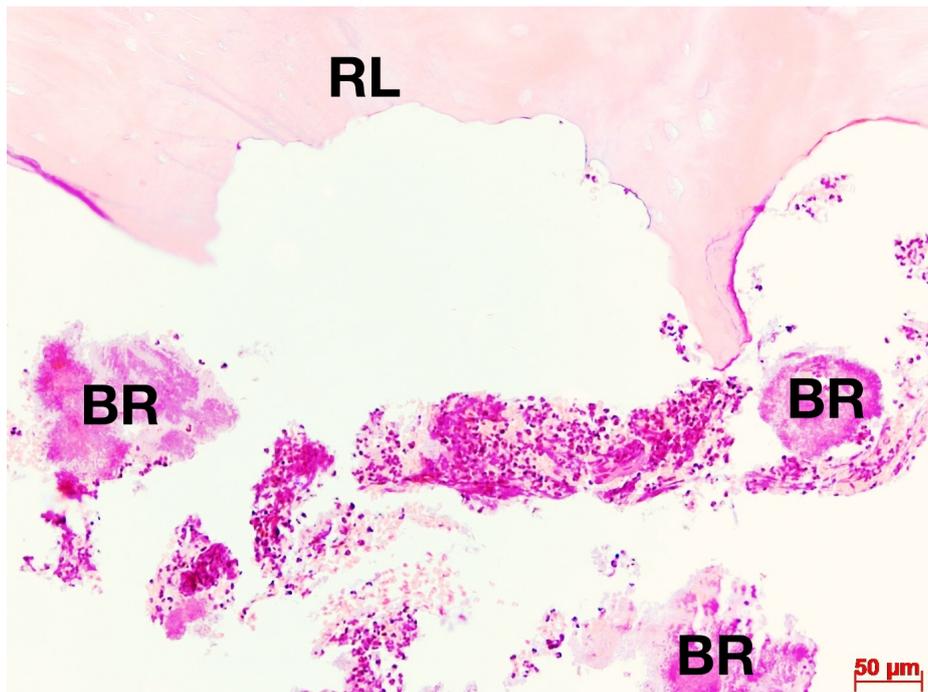
#### 3.2.1.2.1 E2517/17

In der Übersicht war ein zusammenhängendes, längliches Biopsat zu erkennen. An beiden Enden lag kompakter Knochen vor, in der Mitte ist eine Zone aus wahrscheinlich artifiziell zertrümmerten spongiösen Anteilen mit dazwischenliegendem Detritus und Bakterienrasen (Abb. 8), der sich bis auf eine Oberfläche des kompakten Anteils erstreckte. Die Knochenkanäle waren angefüllt mit zellreichem Bindegewebe, und an den Knochenoberflächen befanden sich stellenweise Resorptionslakunen (Abb. 9).

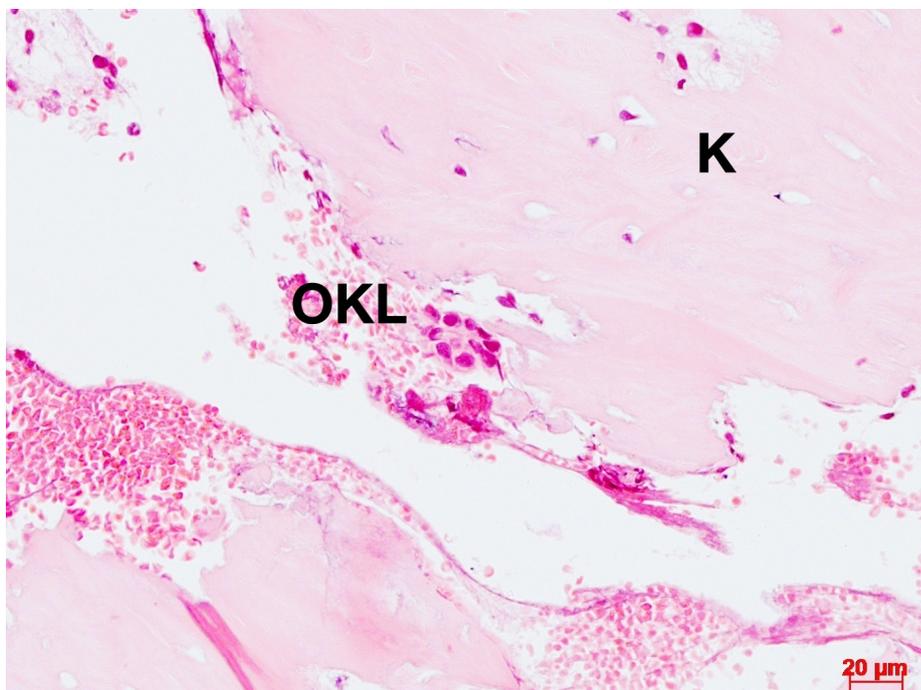


**Abb. 8:** Teilweise nekrotischer, kompakter Lamellenknochen (K) mit stellenweise anliegendem Bakterienrasen (BR), leeren Osteozytenlakunen (OL) und Osteonen (Pfeile) (Originalvergrößerung x10). H&E, Patient E2517/17

In höheren Vergrößerungen waren Strukturen reifen, lamellären Knochens erkennbar, der teilweise vital erschien, da hier einige Osteoblasten und Osteozyten vorlagen. Die restlichen Knochenanteile waren nekrotisch, die Haver'schen Kanäle und Osteozytenlakunen waren leer. Vereinzelt waren kleinere Osteoklasten in Lakunen erkennbar (Abb. 10).



**Abb. 9:** Nekrotische Knochenoberfläche mit Resorptionslakunen (RL), umliegenden Bakterienrasen (BR) und Detritus (Originalvergrößerung x20). H&E, Patient 2517/17



**Abb. 10:** Größerer Osteoklasten (OKL) an nekrotischer Knochenoberfläche (K) (Originalvergrößerung x40). H&E, Patient E2517/17

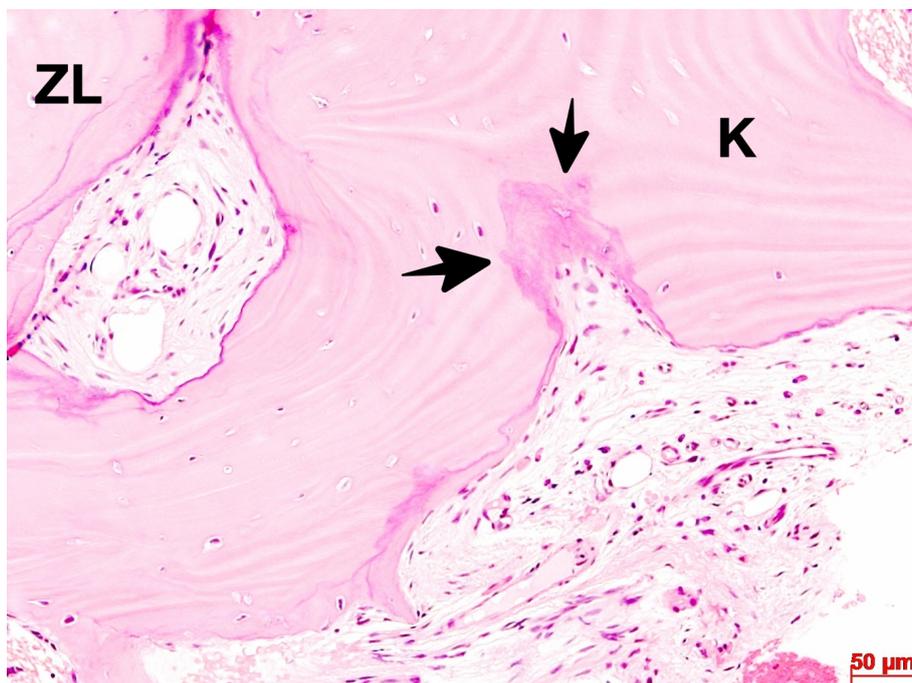
### 3.2.1.2.2 E12139/16

In der Übersicht waren mehrere einzelne, kortikale, sowohl nekrotische als auch vitale Knochenfragmente mit basophilen Zementlinien erkennbar, mit Resorptionslakunen an der Knochenoberfläche und Knochenkanälen, die mit Weichgewebe angefüllt waren. Intertrabekulär lag faseriges Bindegewebe mit versprengten, proliferierten Epithelresten und Infiltraten vor.

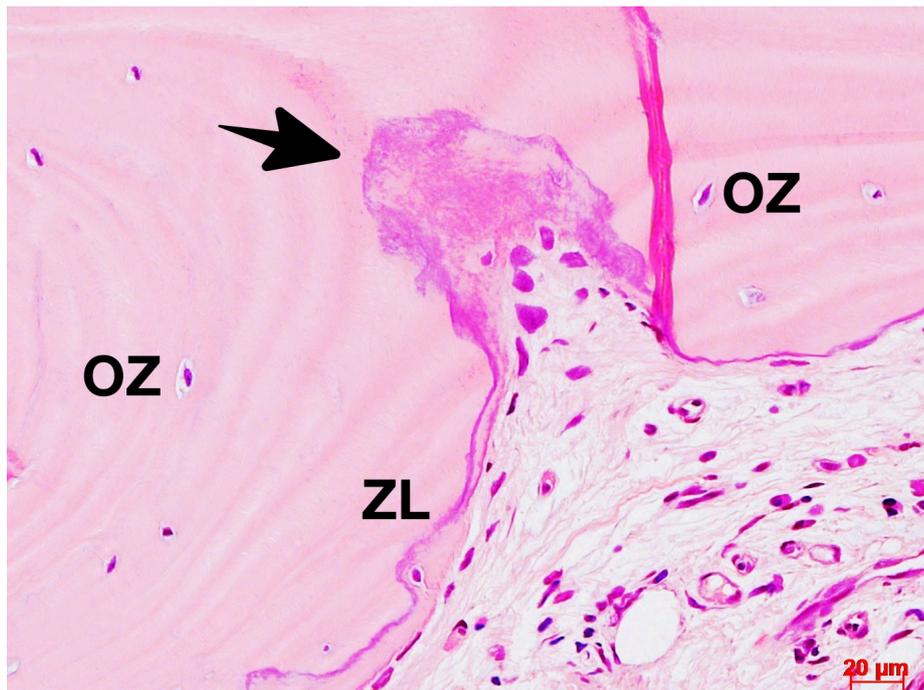
In einer höheren Vergrößerung waren vereinzelte, kleine Osteoblasten am Knochenrand sichtbar, sowie wenige, kleinere, zwei- bis dreikernige Osteoklasten in Resorptionslakunen.

Auffallend waren Stellen reaktiver Knochenneubildung (Abb. 11 und 12) sowie eine mehrkernige Riesenzelle (Abb. 13).

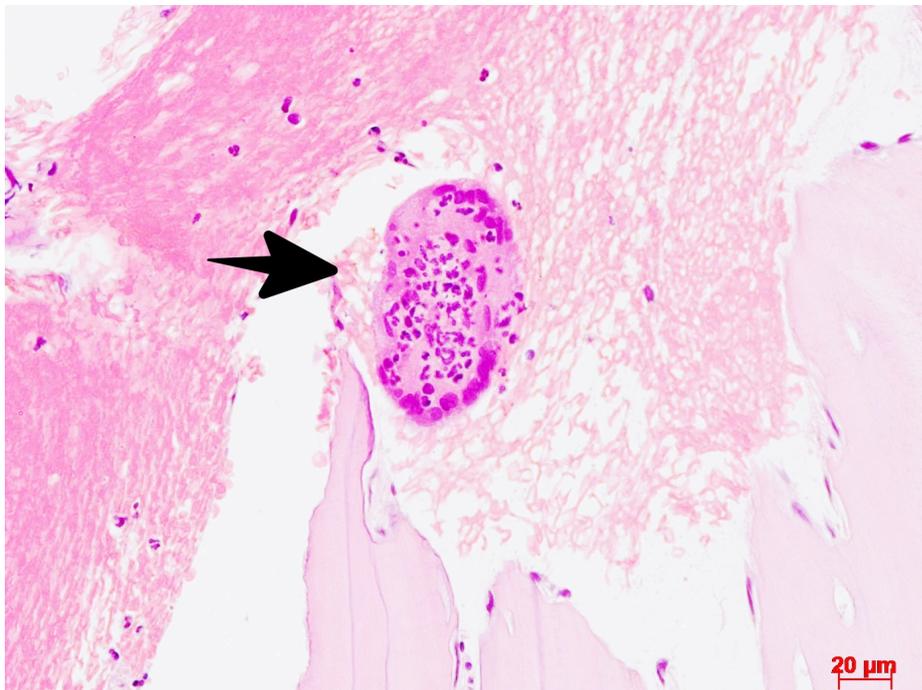
Im lockerem Bindegewebe befanden sich Rundzellinfiltrate und vereinzelte Epithelreste.



**Abb. 11:** Spongiöses Knochen trabekel (K) mit basophilen Zementlinien (ZL) und degeneriertem Bindegewebe im Knochenmarkraum sowie intertrabekulär. Pfeile markieren Bereich reaktiver Knochenneubildung (Originalvergrößerung x20). H&E, Patient E12139/16



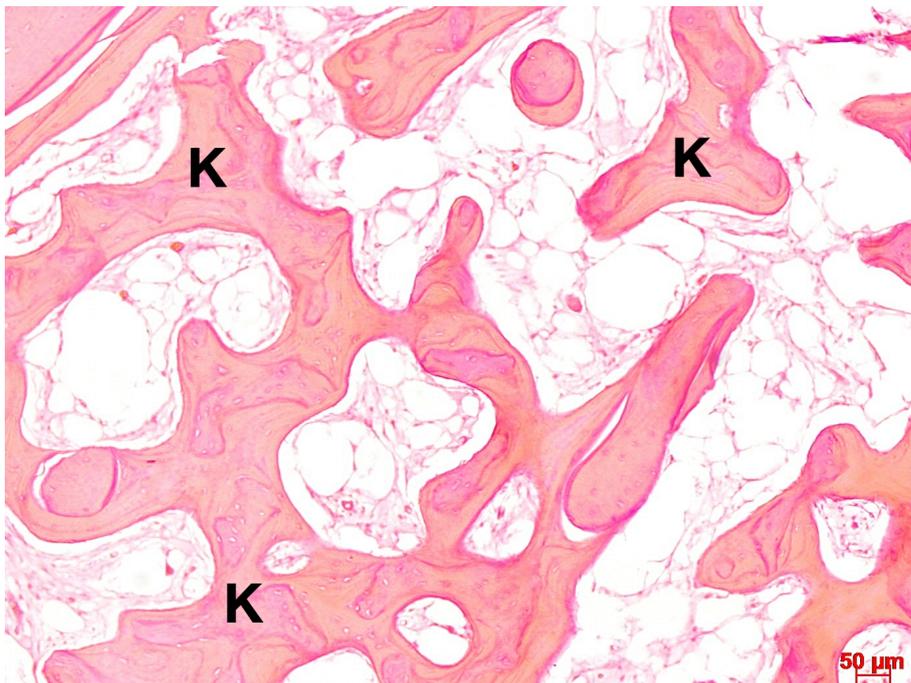
**Abb. 12:** Vergrößerte Darstellung der reaktiven Knochenneubildung (Pfeil). Gekennzeichnet wurden eine basophile Zementlinien (ZL) und Osteozyten (OZ) (Originalvergrößerung x40). H&E, Patient E12139/16



**Abb. 13:** Darstellung einer Riesenzelle (Pfeil) (Originalvergrößerung x40). H&E, Patient E12139/16

### 3.2.1.2.3 E15632/14

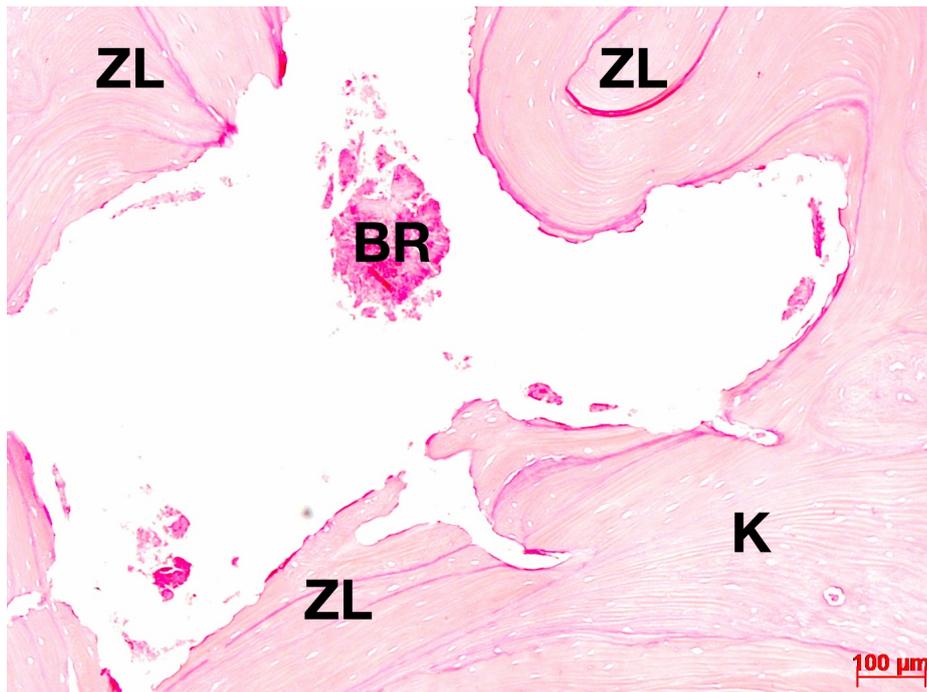
In der Übersicht waren sowohl kompakte als auch trabekuläre, nekrotische Knochenfragmente erkennbar. Die Knochenoberflächen waren glatt, es waren viele Zementlinien und leere Osteozytenlakunen vorhanden. Weiterhin war intertrabekuläres Weich- und Fettgewebe zu erkennen (Abb. 14).



**Abb. 14:** Nekrotische Knochetrabekel mit intertrabekulären Weich- und Fettgewebe (Originalvergrößerung x20). H&E, Patient E15526/15

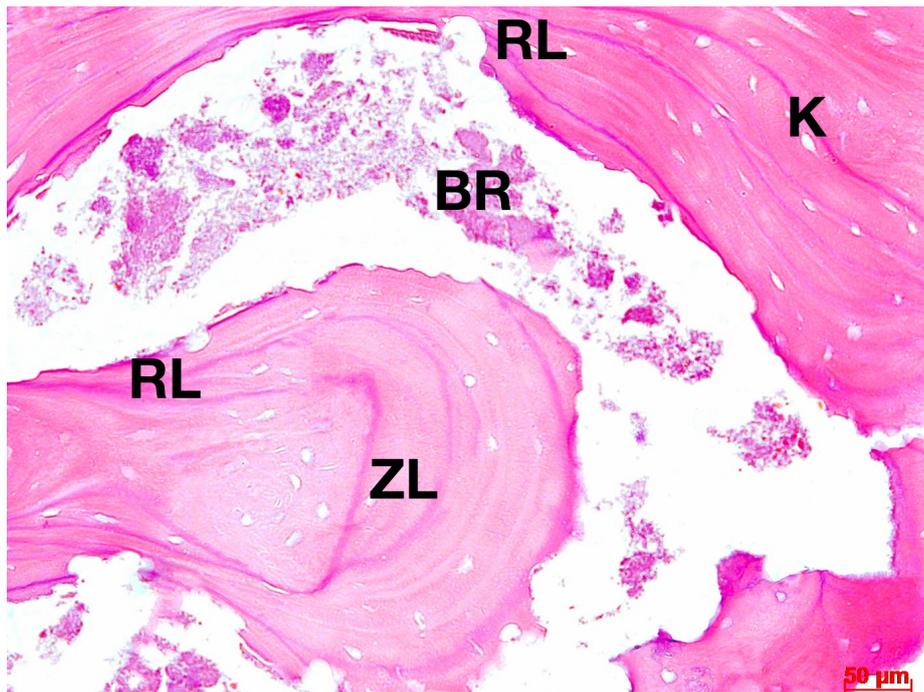
### 3.2.1.3.4 E19442/14

In der Übersicht war ein zusammenhängendes, nekrotisches, spongiöses Knochenfragment mit dazwischen liegenden Einblutungen, Bakterienrasen und vereinzelt Bindegewebe erkennbar. Während der Knochen schwach eosinophil angefärbt wurde, erschienen zahlreiche Zementlinien stark basophil. Auf der Oberfläche der Knochenbälkchen befanden sich viele mottenfraßähnliche Resorptionslakunen (Abb. 15).



**Abb. 15:** Nekrotisches Knochenfragment mit Zementlinien (ZL) und einem Bakterienrasens (BR) (Originalvergrößerung x10). H&E, Patient E19442/14

In einer höheren Vergrößerung war die Struktur des Lamellenknochens gut erkennbar. Das Bindegewebe war locker, gefäßreich, in ihm befanden sich Rundzellinfiltrate (Abb. 17). Es lagen ausgedehnte Bakterienrasen mit und ohne Knochenkontakt vor (Abb. 16).



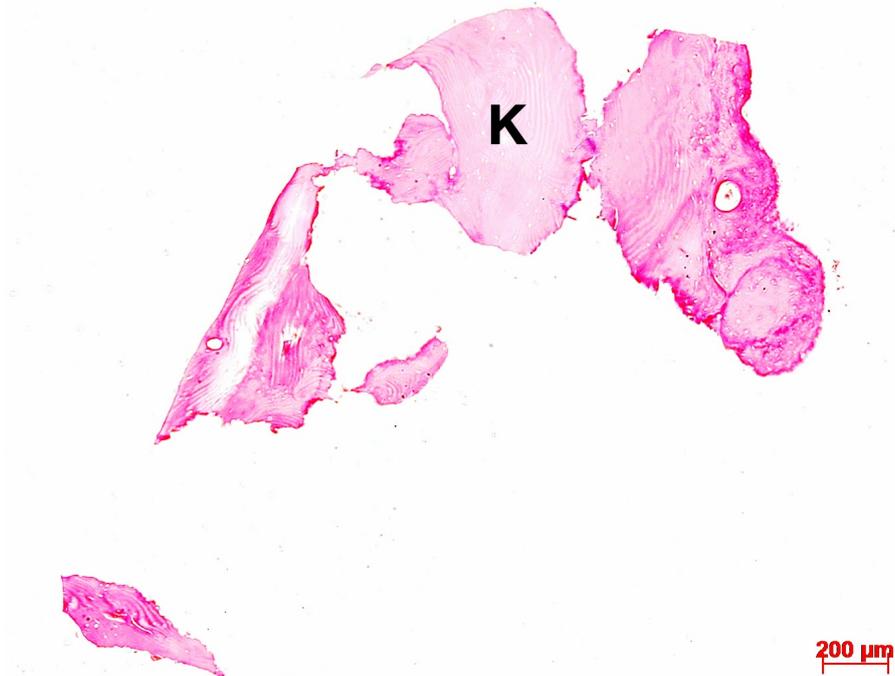
**Abb. 16:** Nekrotisches Knochenfragment (K) mit Zementlinien (ZL) und zahlreichen Resorptionslakunen (RL) an der Knochenoberfläche. Intertrabekulär sind Bakterienrasen (BR) erkennbar (20x). Färbung: H&E, Patient E19422/14



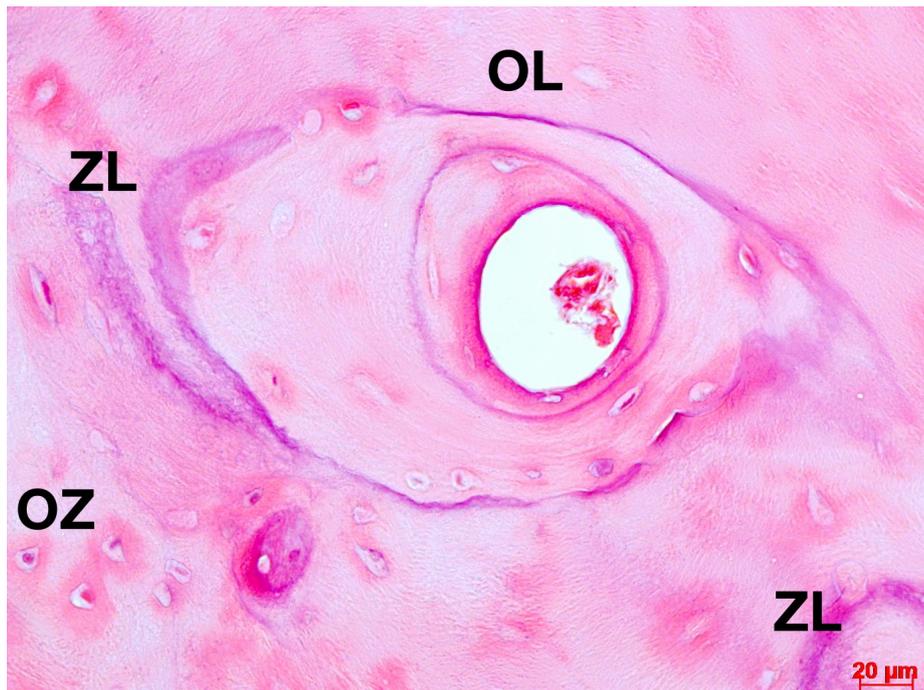
**Abb. 17:** Infiltriertes Bindegewebe (BG), Epithel (Pfeil) und angrenzendem Knochen (K) (Originalvergrößerung x20). H&E, Patient E19422/14

### 3.2.1.2.5 E21376/14

In der Übersicht waren vier kleinere, sichelförmige, gut angefarbte Knochenfragmente erkennbar, die artifizielle Risse aufwiesen (Abb. 18). Stellenweise befanden viele Resorptionslakunen.



**Abb. 18:** Übersichtaufnahme des Knochenfragmentes (K) (Originalvergrößerung x5). H&E, Patient E21376/14

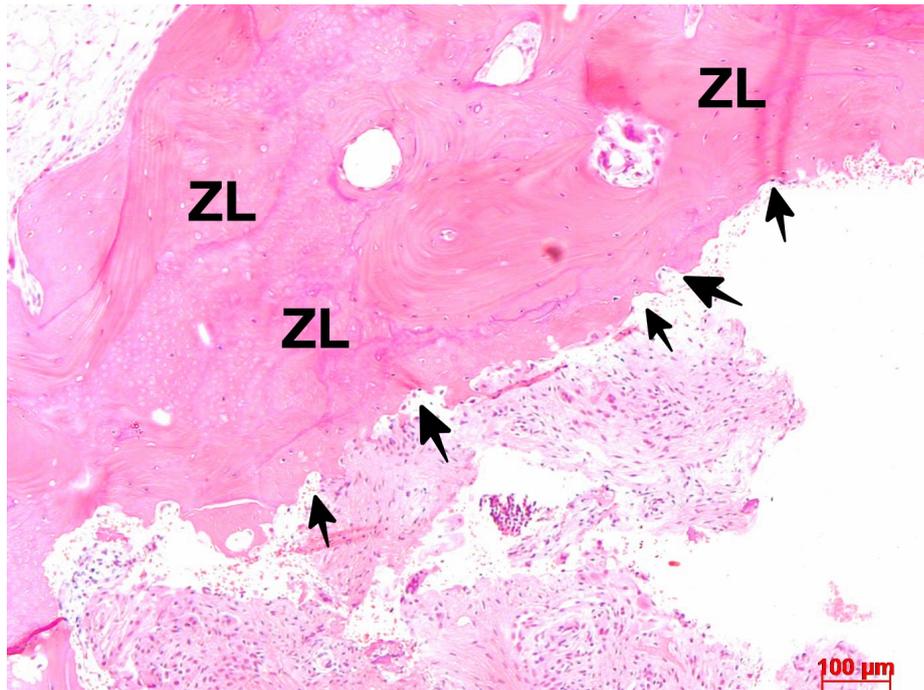


**Abb. 19:** Osteon mit basophilen Zementlinien (ZL), leeren Osteozytenlakunen (OL) und geschrumpften Osteozyten (OZ) (Originalvergrößerung x40). H&E, Patient E21376/14

In einer höheren Vergrößerung war nekrotischer Lamellenknochen mit teilweise leeren Osteozytenhöhlen (Abb. 19) und Haver'schen Kanälen sichtbar. Es lagen keine Osteoblasten und Osteoklasten vor, vereinzelt waren Osteozyten vorhanden, die jedoch geschrumpft schienen.

### 3.2.1.2.6 E14168/16

In der Übersicht waren über zwanzig sowohl kleinere als auch größere Faserknochenfragmente erkennbar, die artifiziell zerissen waren. Weiterhin bestand das Biopsat aus Epithel mit Retezapfen, Bindegewebe mit zahlreichen Arteriolen und Venolen, Bakterienrasen, Einblutungen und Detritus. Die Knochenoberfläche war übersät von Resorptionslakunen, die Osteone waren mit Infiltraten angefüllt und von basophilen Zementlinien umrandet (Abb. 20).



**Abb. 20:** Nekrotisches Knochenfragmentes mit Zementlinien (ZL) und destruiertes mörttenfraßähnlicher Knochenoberfläche (Pfeile). Umliegend befindet sich Fett- und Weichgewebe (Originalvergrößerung x10). H&E, Patient E14168/16

Während der Knochen im oberen Teil des Biopsates nekrotisch war, nahm die Vitalität zum unteren Anteil hin scheinbar zu (Abb. 21). Hier waren in Säumen angeordnete Osteoblasten erkennbar sowie kleine, im Schnitt zwei- bis dreikernige Osteoklasten, die sich in Knochennähe befanden und Osteozyten, die jedoch verkleinert schienen.

Das Epithel war zwei- und mehrschichtig mit ausgeprägten Retezapfen, im subgingivalen, ödematösen Bindegewebe befanden sich Rundzellinfiltrate. Die Bakterienrasen lagen unter anderem intertrabekulär vor, sowohl mit als auch ohne Knochenkontakt.



**Abb. 21:** Osteon mit umliegenden Osteozyten (OZ) und vereinzelt, leeren Osteozytenlakunen (OL) (Originalvergrößerung x40). H&E, Patient E14168/16

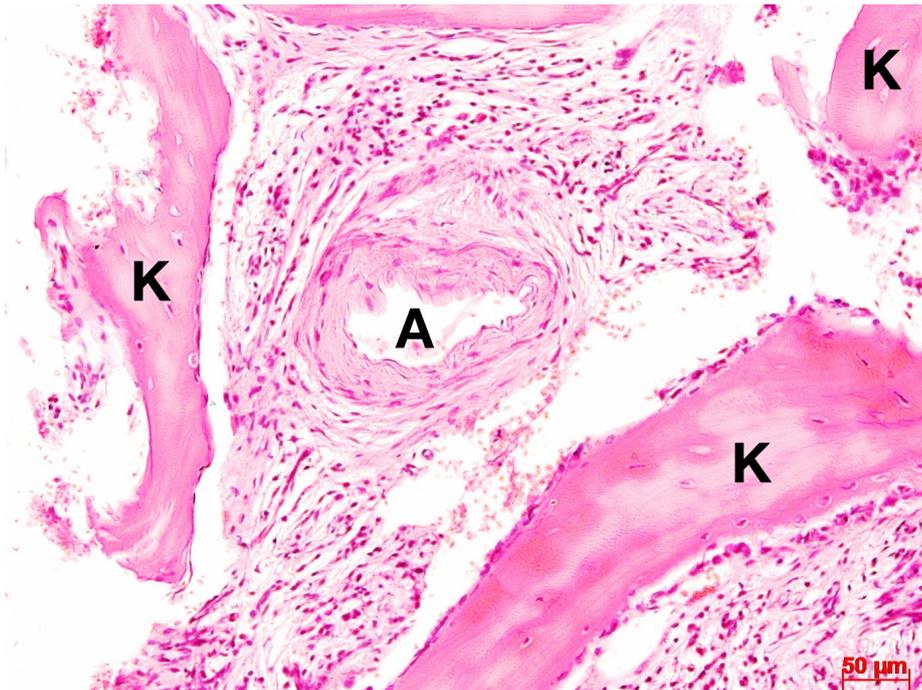
### 3.2.1.2.7 E8299/16

Das Biopsat bestand aus drei größeren und zwei kleineren Knochenfragmenten, die sowohl kompakt als auch spongios waren, und Weichgewebe. Der Knochen war intensiv angefärbt, es waren zahlreiche Resorptionslakunen und basophile Zementlinien erkennbar (Abb. 22). Intertrabekulär befanden sich neben aufgelockertem Bindegewebe Infiltrate und Debris.

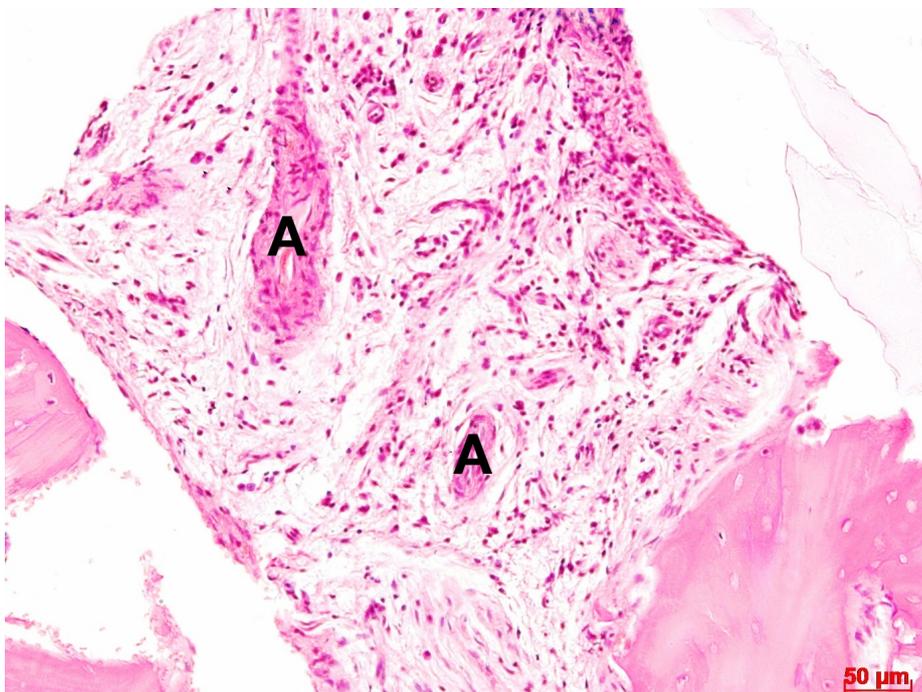


**Abb. 22:** Knochen trabekel mit umliegenden Weichgewebe. Gekennzeichnet sind basophile Zementlinien (ZL) und Osteozyten (OZ) (Originalvergrößerung x20). H&E, Patient E8299/16

Die Knochenfragmente im oberen Anteil des Präparates waren nekrotisch, bis auf wenige Osteoklasten am Knochenrand existierten in diesem Bereich keine Zellen und die Haver'schen Kanäle waren leer. Die unteren, knöchernen Fragmente erschienen vitaler, da hier Osteoblasten angeordnet in Säumen, Osteoklasten in Lakunen und Osteozyten vorlagen. Im ödematösen Weichgewebe waren Arterien und Arteriolen (Abb. 23 und 24) erkennbar.



**Abb. 23:** Knochenfragmente (K), Weichgewebe und einer größeren Arterie (A) (Originalvergrößerung x20). H&E, Patient E8299/16

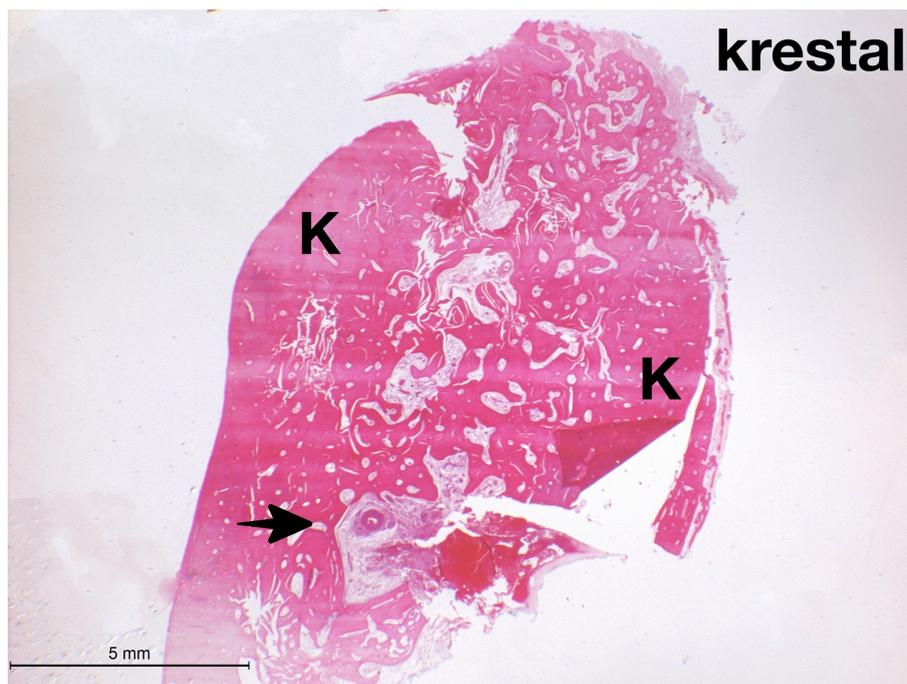


**Abb. 24:** Weichgewebe mit gut erkennbaren, kleineren Arterien (A) (Originalvergrößerung x20). H&E, Patient E8299/16

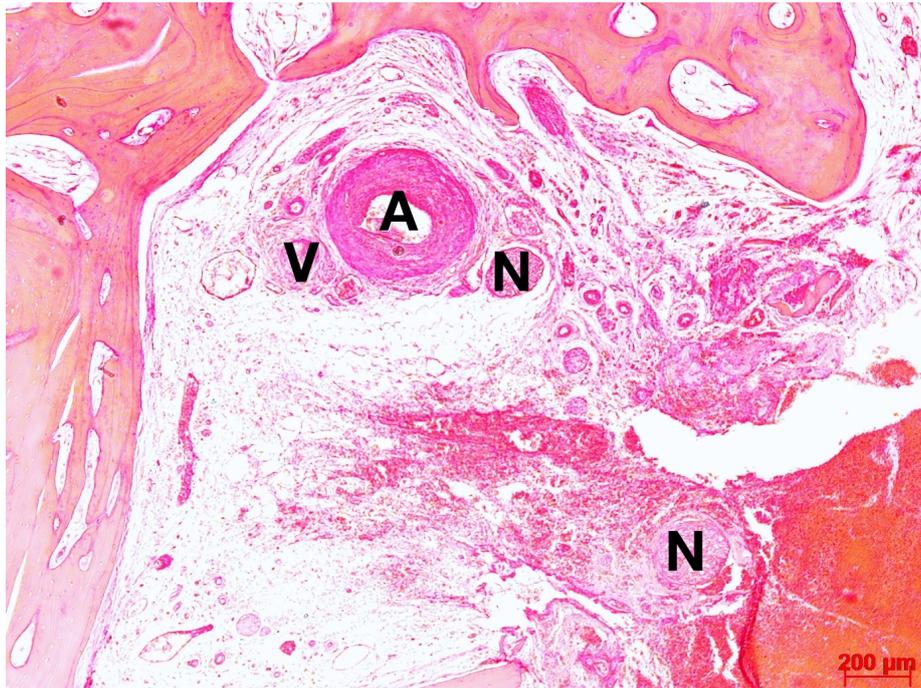
### 3.2.1.2.8 E4613/15

In der Übersicht war ein zusammenhängendes Fragment erkennbar bei dem es sich um einen Sagittalschnitt des Unterkiefers mit Anschnitt des Mandibularkanals handelt. Erkennbar waren unter anderem die Arteria alveolaris inferior sowie der Nervus alveolaris inferior (Abb. 25).

Es waren zahlreiche sowohl kleinere als auch größere Gefäße sowie Nerven sichtbar. Neben dicken, spongiösen, nekrotischen Knochenbälkchen, Weichgewebe und großflächigen Einblutungen lagen intertrabekuläres Fett- und Bindegewebe vor. Der Knochen war stark eosinophil gefärbt und von basophilen Zementlinien durchzogen (Abb. 26).



**Abb. 25:** Übersichtsdarstellung eines Unterkiefer-Sagittalschnittes. Gekennzeichnet ist Knochen (K) und das Areal, das in Abbildung 25 vergrößert dargestellt ist (Pfeil). H&E, Patient E4613/15

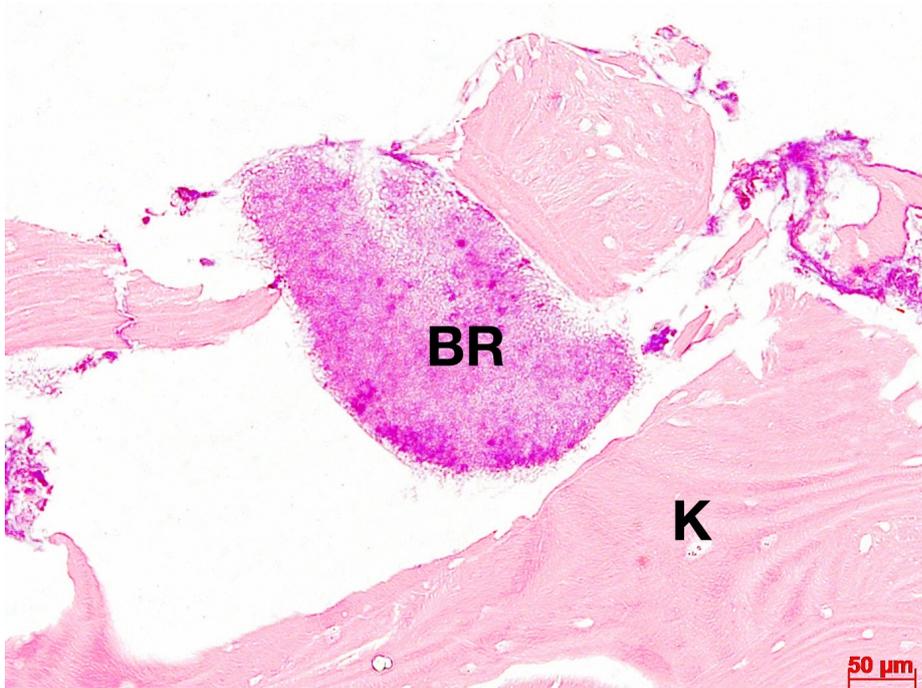


**Abb. 26:** Vergrößerte Darstellung eines Unterkiefer-Sagittalschnittes mit angeschnittener Arteria alveolaris inferior (A), Vena alveolaris inferior (V) und Nervus alveolaris inferior (N) (Originalvergrößerung x5) H&E, Patient E4613/15

### 3.2.1.3.9 E12955/16

Das Biopsat bestand aus einem größeren, länglichen und mehreren kleinen, schwach angefärbten, kompakten, nekrotischen Knochenfragmenten mit wenig ödematösen Weichgewebe und Keimrasen. Die Osteone waren leer und an der Knochenoberfläche befanden sich viele Resorptionslakunen.

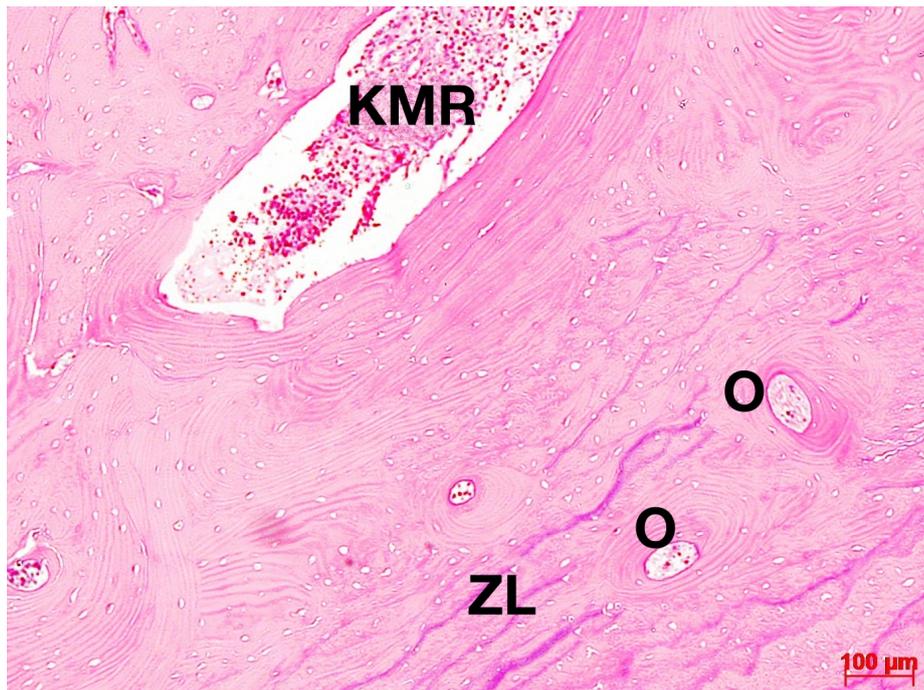
Die meisten Osteozytenlakunen waren leer, es existierten keine Osteoblasten und Osteoklasten, und die Haver'schen Kanäle waren mit Bindegewebe angefüllt. Neben einem großflächigen Bakterienrasen waren mehrere kleinflächigerer, locker strukturierte Bakterienrasen (Abb. 27) mit und ohne Knochenkontakt vorhanden.



**Abb. 27:** Bakterienrasen (BR) umgeben von nekrotischen Knochenfragmenten (K) (Originalvergrößerung x20). H&E, E12955/16

### 3.2.1.2.10 E7014/16

Einzelnes, kleines, kompaktes Knochenfragment mit artifiziellen Rissen. Der Knochen war nekrotisch, schwach eosinophil gefärbt mit vielen stark basophilen Zementlinien und leeren Osteozytenlakunen (Abb. 28). In den Knochenmarksräumen befanden sich Infiltrate, die Osteone sind mit Bindegewebe angefüllt gewesen.

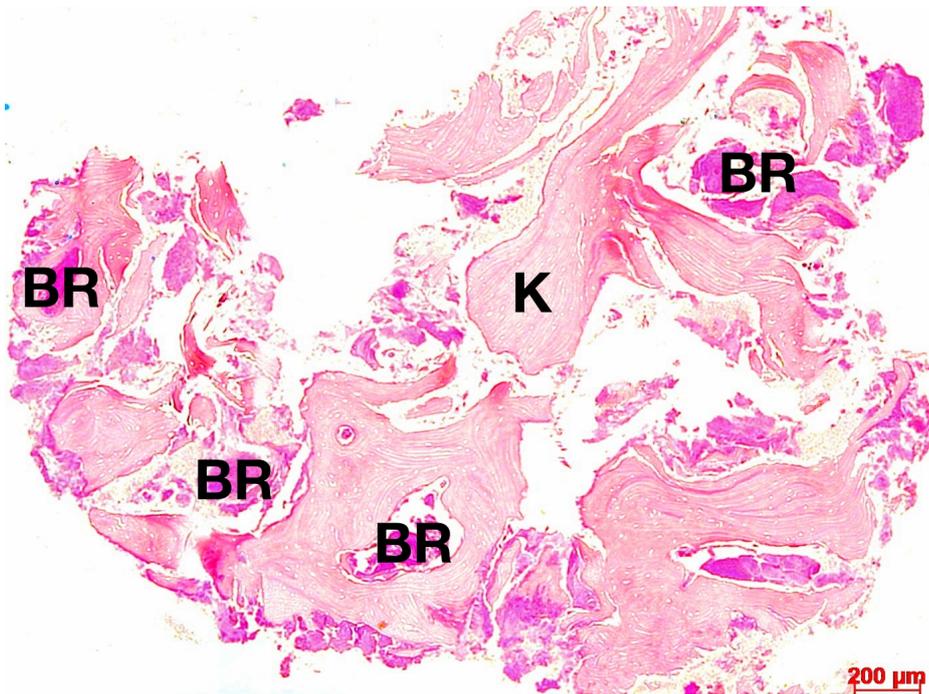


**Abb. 28:** Nekrotischer Lamellenknochen mit Osteonen (O), Zementlinien (ZL), leeren Osteozytelakunen und angeschnittenem Knochenmarksraum (KMR) (Originalvergrößerung x10). H&E, Patient E7014/16

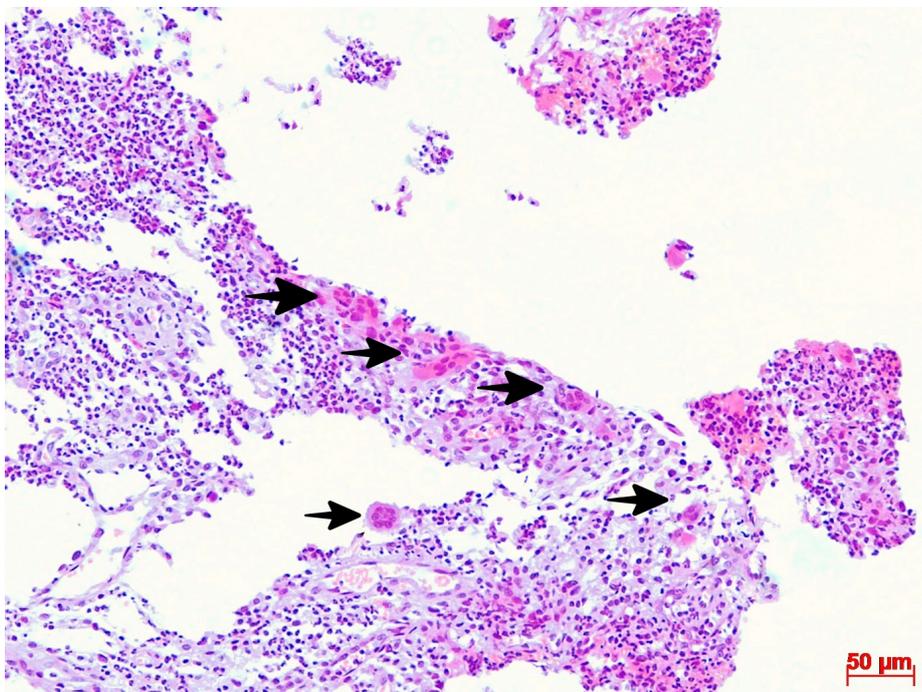
### 3.2.1.2.11 E3781/16

In der Übersicht waren acht mittelgroße Fragmente zu erkennen, bestehend aus schwach gefärbten, nekrotischen, spongiösen und kompakten Knochenanteilen, Bakterienrasen, Infiltraten und wenig Bindegewebe (Abb. 29). In den Osteonen befanden sich Bakterienrasen, an der Knochenoberfläche waren zahlreiche Resorptionslakunen und stellenweise Epithelreste erkennbar.

In einer höheren Vergrößerung waren vereinzelte, degenerierte Osteozyten sichtbar sowie vereinzelte lining cells. Die Knochenmarksräume waren mit Keimrasen angefüllt. Im Infiltrat befanden sich versprengte, mehrkernige Zellen (Abb. 30).



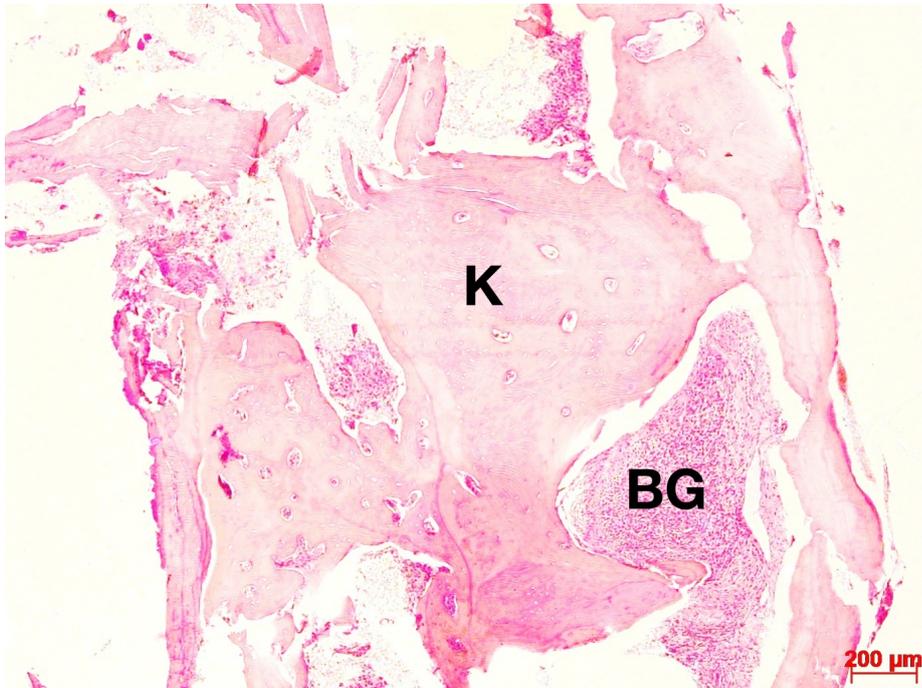
**Abb. 29:** Artifiziiell zertrümmerte Knochenfragmente (K) und zahlreichen Bakterienrasen (BR) (Originalvergrößerung x5). H&E, Patient E3781/16



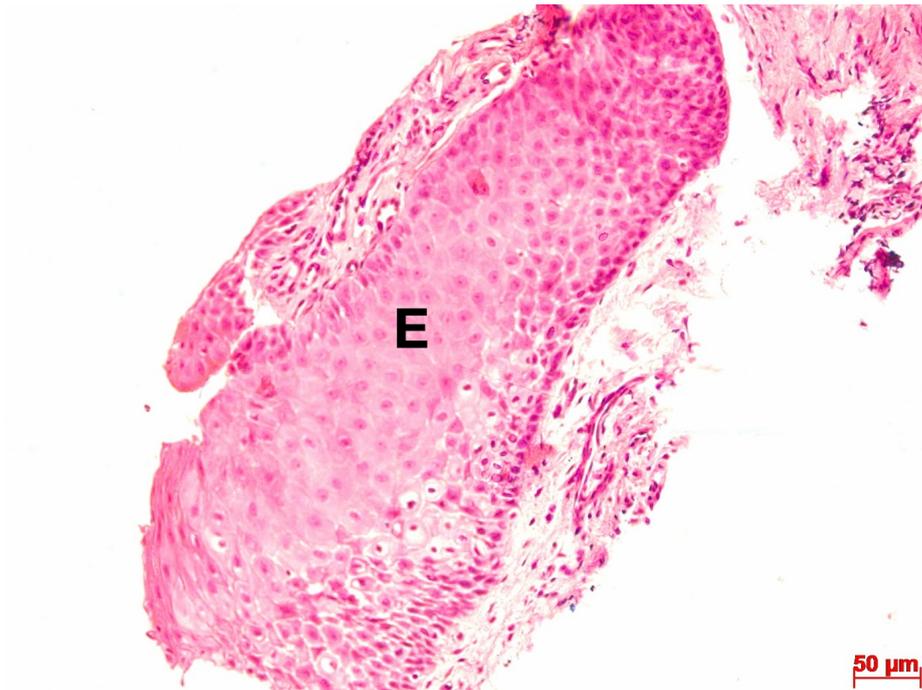
**Abb. 30:** Rundzellinfiltrat mit mehrkernigen Zellen (Pfeile) (Originalvergrößerung x20). H&E, Patient E3781/16

### 3.2.1.2.12 E7104/16

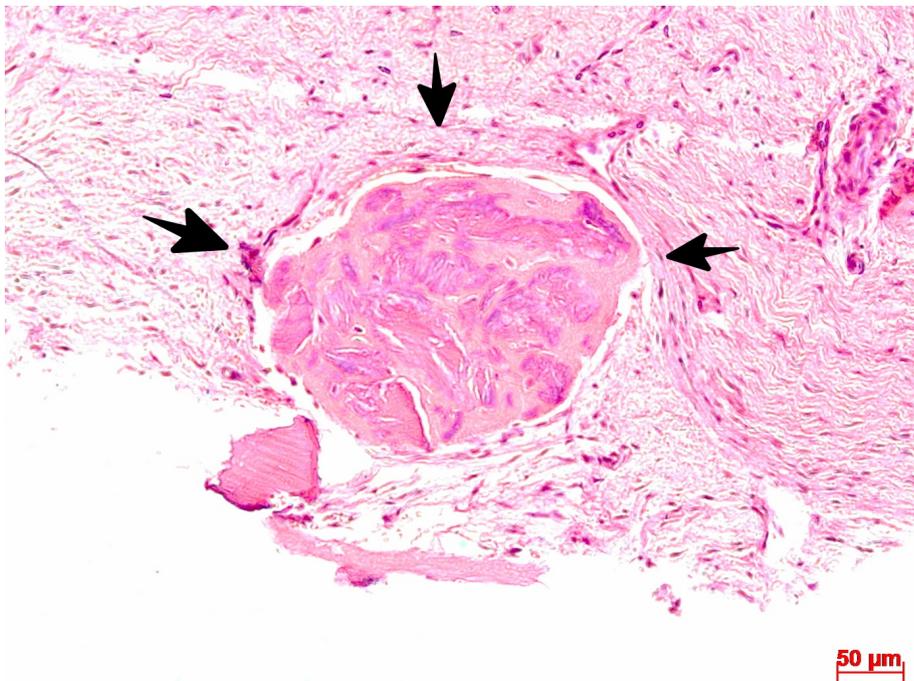
In der Übersicht waren drei artifiziell zerrissene Fragmente erkennbar (Abb. 31). Ein größeres aus überwiegend subgingivalem Bindegewebe, ein kleineres aus Epithel (Abb. 32) und ein mittelgroßes mit knöchernen und weichgewebigen Anteilen. Zwischen den gut gefärbten, spongiösen, fokal vitalen Knochen trabekeln befand sich Weichgewebe mit viele Einblutungen. Die Osteone waren mit Weichgewebe angefüllt und auf der Knochenoberfläche befanden sich viele Resorptionslakunen. Das Epithel war mehrschichtig und aufgelockert, im Bindegewebe war eine ektope Kalzifizierung angeschnitten (Abb. 33).



**Abb. 31:** Knochenfragment (K) mit bindegewebigem Anteil (BG) (Originalvergrößerung x5). H&E, Patient E7104/16



**Abb. 32:** Mehrschichtiges, stellenweise aufgelockertes Epithel (Originalvergrößerung x20). H&E, Patient E7104/16

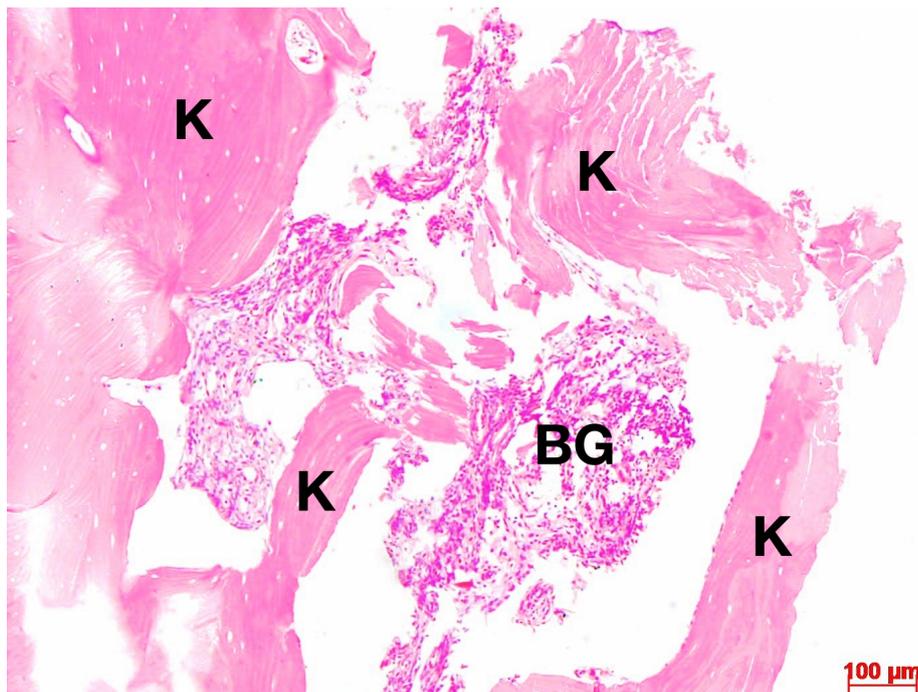


**Abb. 33:** Ektope Kalzifizierung (Pfeile) umgeben von Bindegewebe (Originalvergrößerung x20). H&E, Patient E7104/16

### 3.2.1.2.13 E11572/16

In der Übersicht war ein kleineres, längliches Fragment erkennbar, mit kleinen artifiziiellen Rissen. Es bestand aus kortikalen und spongiosen Knochenanteilen, Weichgewebe und Keimrasen. Der Knochen war schwach angefärbt und erschien stellenweise aufgelöst. Intertrabekulär lag Weichgewebe vor (Abb. 34), die Osteone waren mit Detritus angefüllt oder leer.

In höheren Vergrößerungen waren im nekrotischen Lamellenknochen vereinzelte, geschrumpfte Osteozyten und lining cells sichtbar. Der Bakterienrasen am oberen Rand des Präparates war dicht, stark angefärbt und lag dem Knochen auf (Abb. 35).



**Abb. 34:** Nekrotisches Knochenfragmente (K) mit Bindegewebe (BG) (Originalvergrößerung x10). H&E, Patient E11572/16

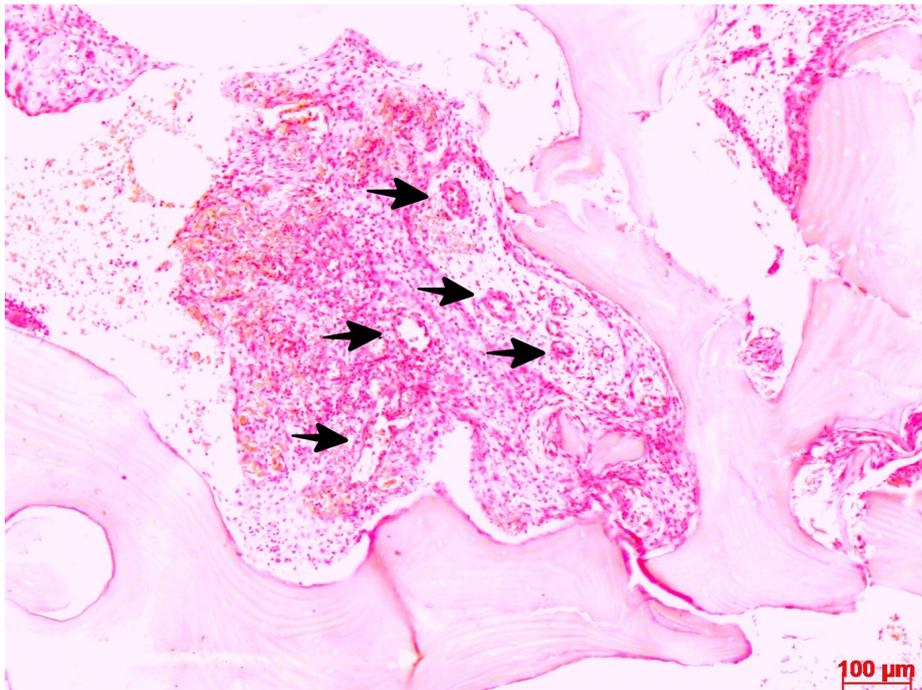


**Abb. 35:** Dichter Bakterienrasen (BR), der nekrotischem Knochen (K) aufliegt (Originalvergrößerung x40). H&E, Patient E11572/16

#### 3.2.1.2.14 E15526/15

In der Übersicht war ein Biopsat bestehend aus zwei größeren Fragmenten erkennbar, die artifizielle Risse aufwiesen. Neben den kompakten und spongiösen Knochenanteilen, lagen Bakterienrasen und Debris vor, intertrabekulär befand sich Fett- und Bindegewebe mit Sinusoiden und kleineren Arterien (Abb. 36).

In einer höheren Vergrößerung waren viele Resorptionslakunen erkennbar. Großflächige Bakterienrasen waren über das gesamte Präparat verstreut, sowohl mit als auch ohne Knochenkontakt. Weiterhin lagen entzündliche Infiltrate sowie leere oder mit Bakterienrasen gefüllte Haver'sche Kanäle vor.

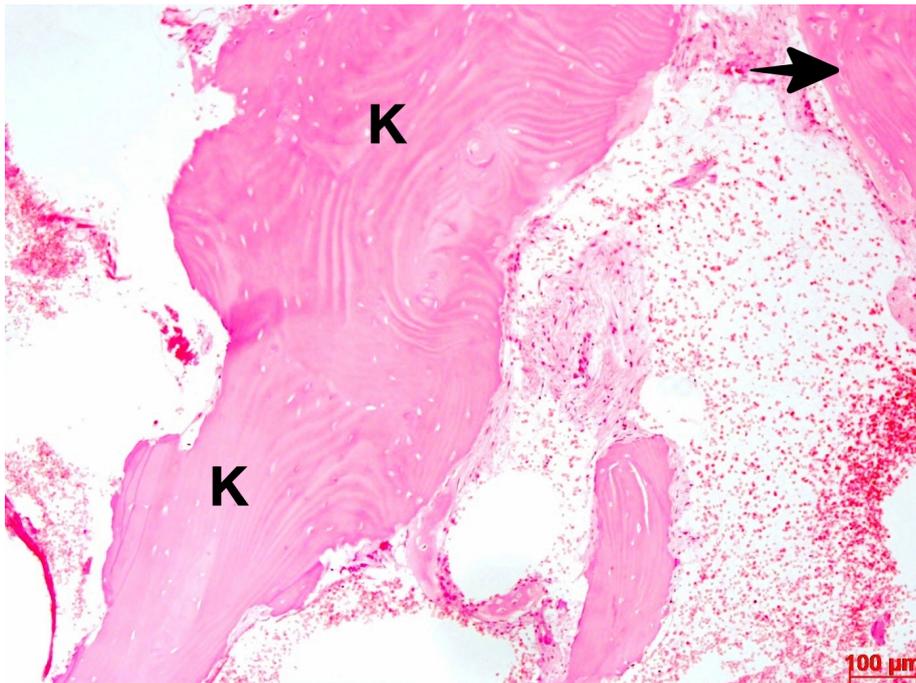


**Abb. 36:** Histologische Darstellung nekrotischer, spongöser Knochenfragmente mit entzündlichen Infiltraten im intertrabekulären Bindegewebe. Mit Pfeilen gekennzeichnet Arterien und Sinusoide (10x). Färbung: H&E, Patient E15526/15

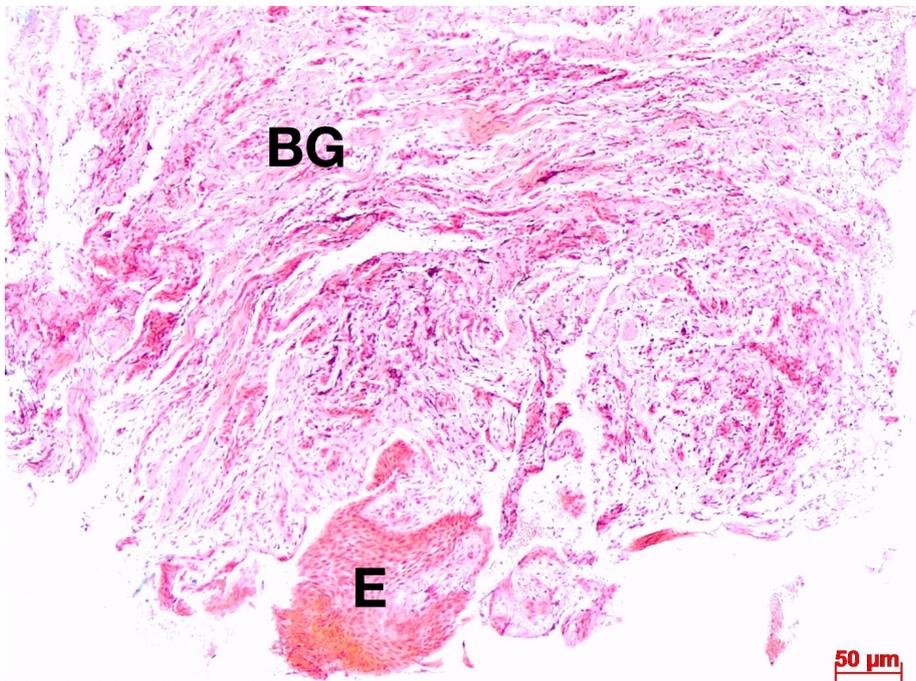
### 3.2.1.2.15 E20605/15

In der Übersicht waren sechs Fragmente erkennbar, von denen drei aus spongösem Knochen und drei aus Weichgewebe bestanden. Der Knochen war gut angefärbt, die Knochenränder waren unregelmäßig strukturiert. Das Weichgewebe enthielt zahlreiche Kapillaren, proliferiertes Epithel und viele Einblutungen und eine mögliche Stelle reaktiver Knochenneubildung (Abb. 37)

Während in der Mitte der knöchernen Fragmente keine Zellen existierten, waren an den Knochenrändern vereinzelt Osteozyten und lining cells erkennbar. Im lockeren, ödematösen Weichgewebe befanden sich versprengte, mehrschichtige Epithelreste (Abb. 38).



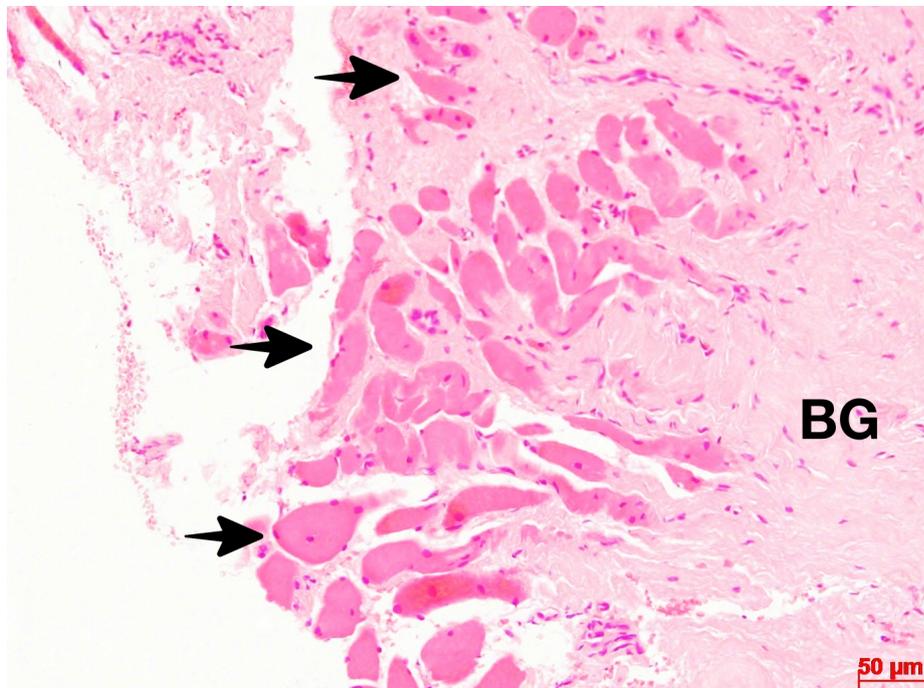
**Abb. 37:** Nekrotisches Knochenstrahl (K), degeneriertes Weichgewebe und Einblutungen. Mögliche reaktive Knochenneubildung (Pfeil) (Originalvergrößerung x10). H&E, Patient E20605/15



**Abb. 38:** Mehrschichtiger Epithelrest (E) umgeben von aufgelockertem Bindegewebe (BG) (Originalvergrößerung x20). H&E, Patient E20605/15

**3.2.1.2.16 E3803/16**

In der Übersicht erkennbar war ein rundliches und ein längliches Fragment, bestehend aus subgingivalem Bindegewebe mit Epithel und subgingivalem Bindegewebe mit angeschnittenen Skelettmuskelfasern (Abb. 39). Das Epithel war mehrschichtig, parakeratotisch, mit ausgeprägten Retezapfen durchsetzt mit inselförmigen Rundzellinfiltraten (Abb.40). Das Weichgewebe war ödematös und in ihm waren ebenfalls Infiltrate erkennbar.



**Abb. 39:** Subgingivales Bindegewebe mit angeschnittenen Skelettmuskelfasern (Pfeile) (Originalvergrößerung x20). H&E, Patient E3803/16



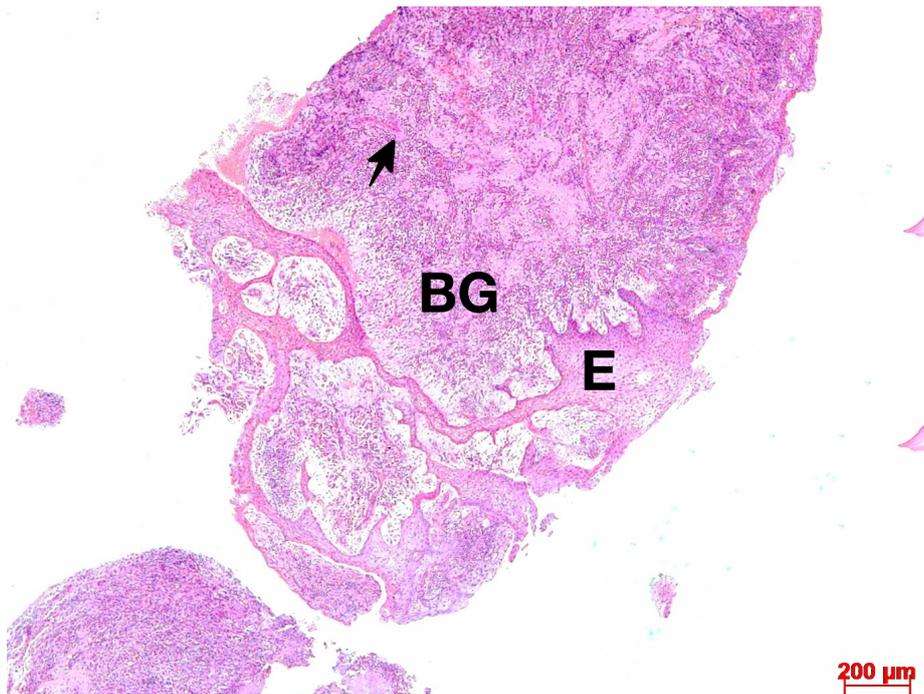
**Abb. 40:** Mehrschichtiges, proliferiertes, parakeratotisches Epithel (E) mit Retezapfen und Rundzellinfiltraten (Pfeil) (Originalvergrößerung x20).H&E, Patient E3803/16

### 3.2.1.2.17 E7636/16

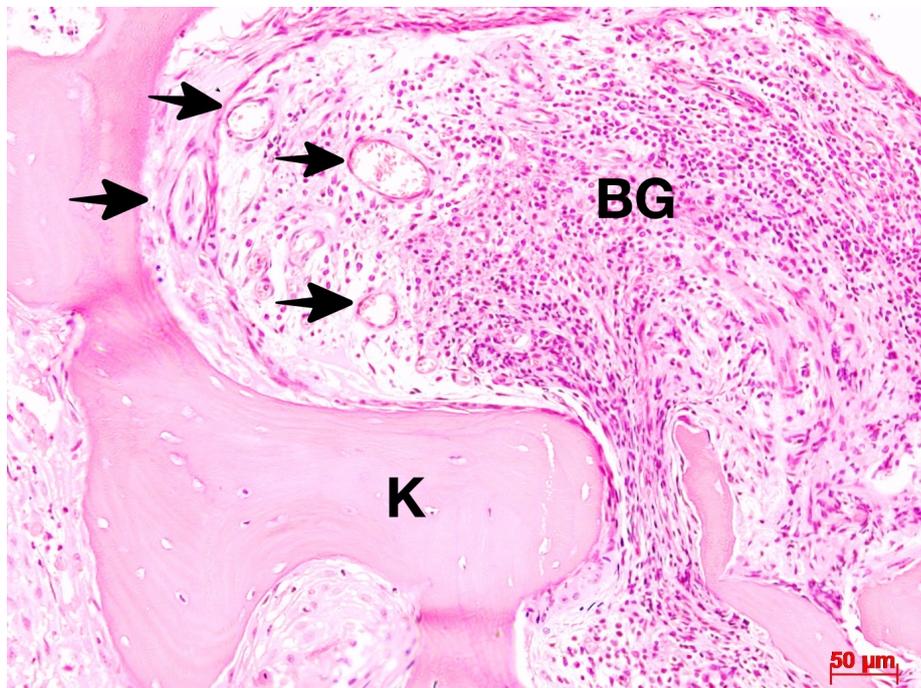
In der Übersicht waren über zwanzig kleinere Fragmente erkennbar, die artifizielle Risse aufweisen. Sie bestanden aus eher schwach angefärbten, spongiösen und kortikalen Knochenfragmenten, Weichgewebe, Epithel, Infiltraten und kleineren Bakterienrasen. In den Knochenmarksäumen befanden sich Fett- und Bindegewebe. Die Osteone waren mit Weichgewebe angefüllt, es existierten viele basophile Zementlinien und Resorptionslaken.

Im Bindegewebe befanden sich viele kleinere Gefäße und Entzündungszellen. Das Epithel war durch Zapfen verlängert und in ihm waren ebenfalls Rundzellinfiltrate (Abb. 41).

In einer höheren Vergrößerung waren einige lining cells am nekrotischen Lamellenknochen sichtbar. Die Haver'schen Kanäle waren mit Bindegewebe, Keimrasen und Detritus angefüllt. Das subgingivale Weichgewebe war gut vaskularisiert (Abb. 42).



**Abb. 41:** Weichgewebe bestehend aus Epithel (E), subgingivalem Bindegewebe (BG) und herdförmigen Infiltraten (Pfeil) (Originalvergrößerung x5).H&E, Patient E7636/16

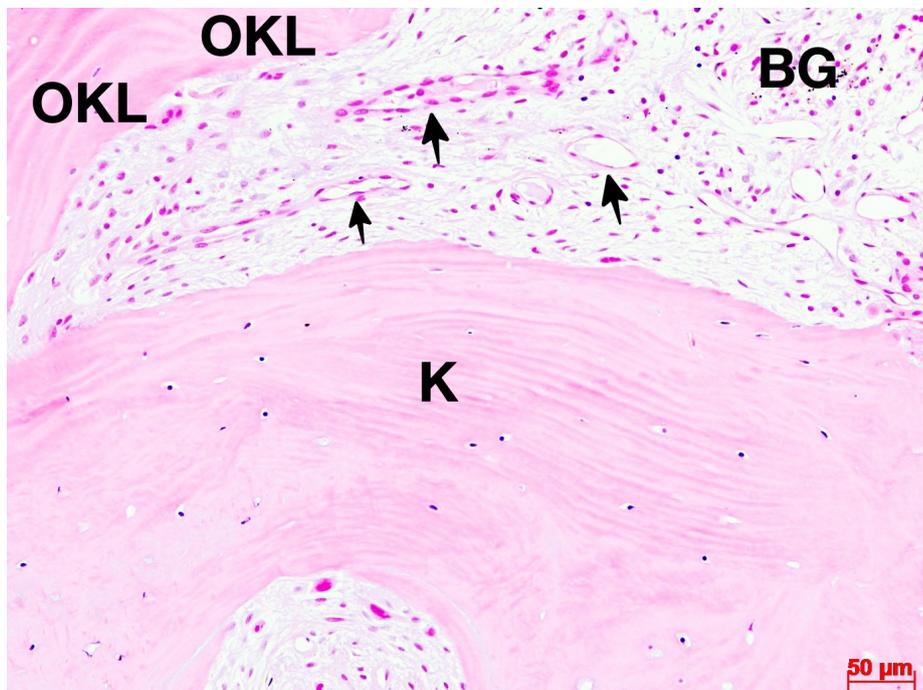


**Abb. 42:** Nekrotisch-vitale Knochen trabekel (K) mit intertrabekulärem, entzündlichem Bindegewebe (BG) mit zahlreichen Gefäßen (Pfeile) (Originalvergrößerung x20).H&E, Patient E7636/16

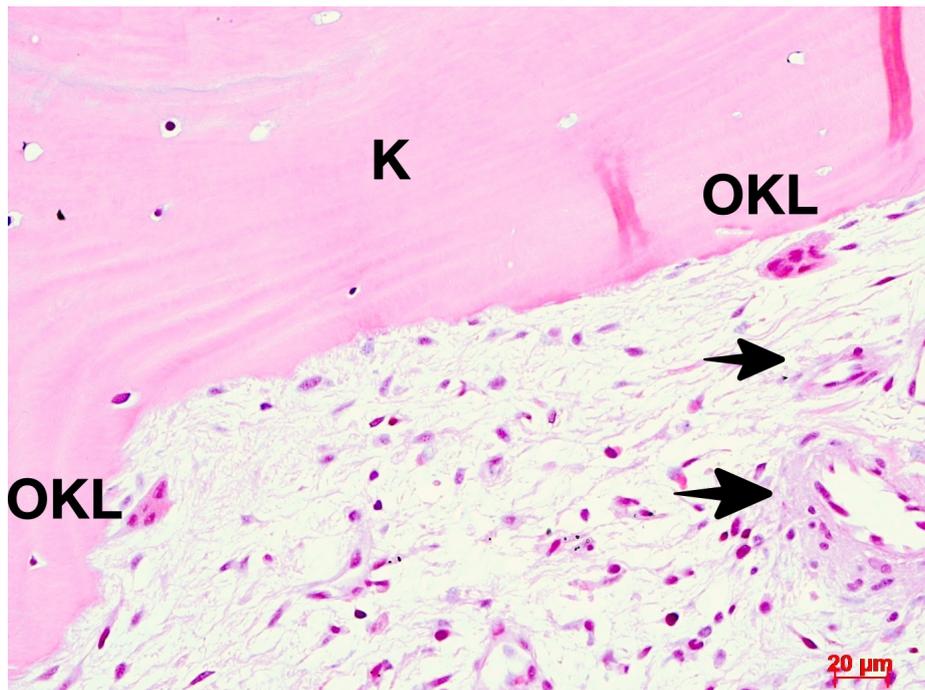
### 3.2.1.2.18 E765/17

In der Übersicht waren acht kleinere Fragmente erkennbar, bestehend aus schwach angefärbten, kortikalem und spongiösem Knochen sowie Weichgewebe. Die Osteone waren mit Weichgewebe angefüllt, die Knochenoberfläche zeigte viele Resorptionslakunen.

In einer höheren Vergrößerung waren Osteozyten und lining cells am lamellären Knochen sichtbar. Kleine Osteoklasten waren abgerückt vom Knochen oder im umliegenden Bindegewebe versprengt. Im lockeren Bindegewebe waren zahlreiche Gefäße angeschnitten (Abb. 43 und Abb. 44).



**Abb. 43:** Knochenfragment (K) mit intertrabekulären Bindegewebe (BG), in welchem sich viele Gefäße (Pfeile) befinden. Zwei Osteoklasten (OKL) sind erkennbar (Originalvergrößerung x20).H&E, Patient E765/17

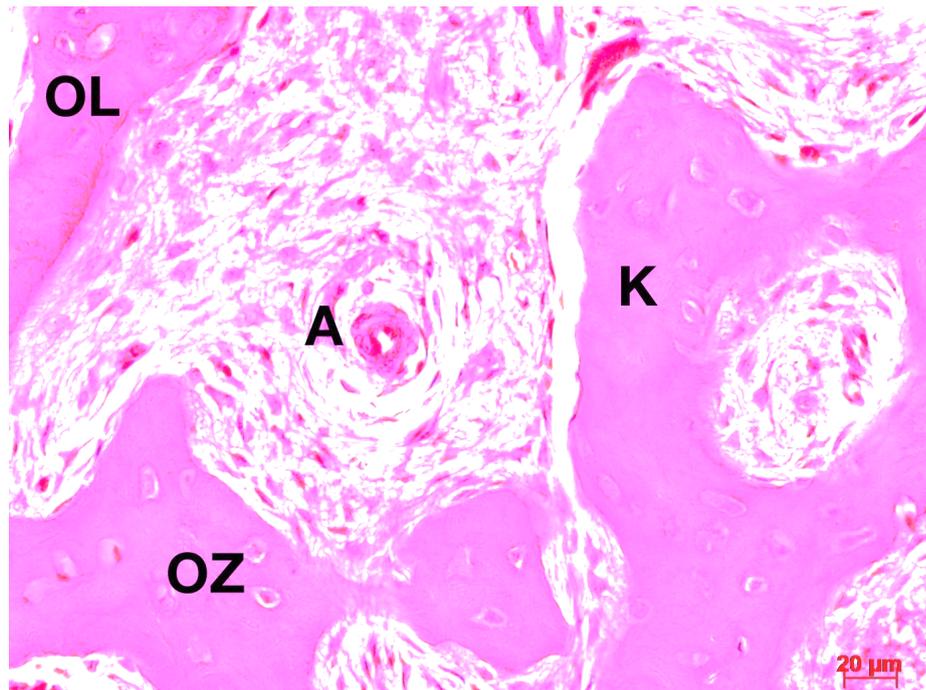


**Abb. 44:** Zwei Osteoklasten (OKL) an teilweise nekrotischem Knochen (K)  
Pfeile zeigen auf Gefäße im umliegenden Weichgewebe (Originalvergrößerung x40).  
H&E, Patient E765/17

### 3.2.1.2.19 E2282/16

In der Übersicht waren vier rundliche Fragmente, mit sehr stark gefärbten knöchernen und weichgewebigen Anteilen erkennbar. Das Präparat wies artifizielle Risse auf, die Osteone waren leer oder mit nekrotischem Gewebe angefüllt. Neben Resorptionslakunen am Knochenrand waren basophile Zementlinien erkennbar.

Der Lamellenknochen bestand aus spongiösen und kortikalen Anteilen. Die Osteozytenlakunen waren entweder leer oder die noch vorhandenen Osteozyten waren geschrumpft. In den Knochenmarksäumen befand sich Bindegewebe zahlreichen, kleineren Arterien (Abb 45).



**Abb. 45:** Spongöser Knochen (K) mit intertrabekulärem Bindegewebe. Weiterhin erkennbar sind leere Osteozytenhöhlen (OL), Osteozyten (OZ) und eine Arterie (A) (Originalvergrößerung x40). H&E, Patient E2282/16

### 3.2.2 Trichrom nach Masson-Goldner

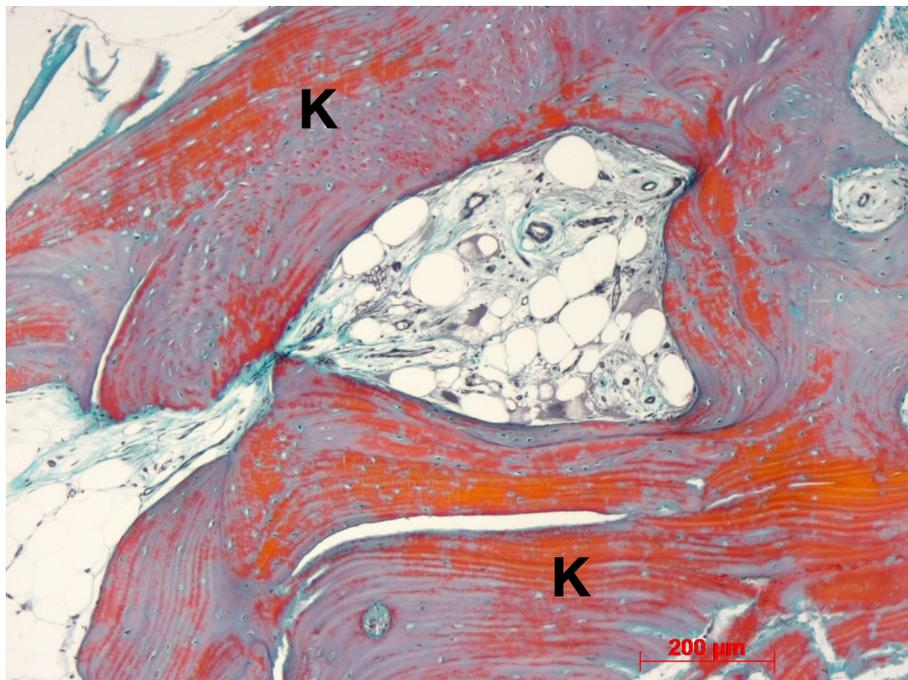
Bei dieser Übersichtsfärbung kommt es zu einer deutlichen Grünfärbung neugebildeten Osteoids sowie zu einer Rotfärbung mineralisierter Areale der Knochenmatrix und erlaubt somit einen groben Überblick über Appositionsvorgänge sowie Mineralisierung.

#### Gesunder Knochen

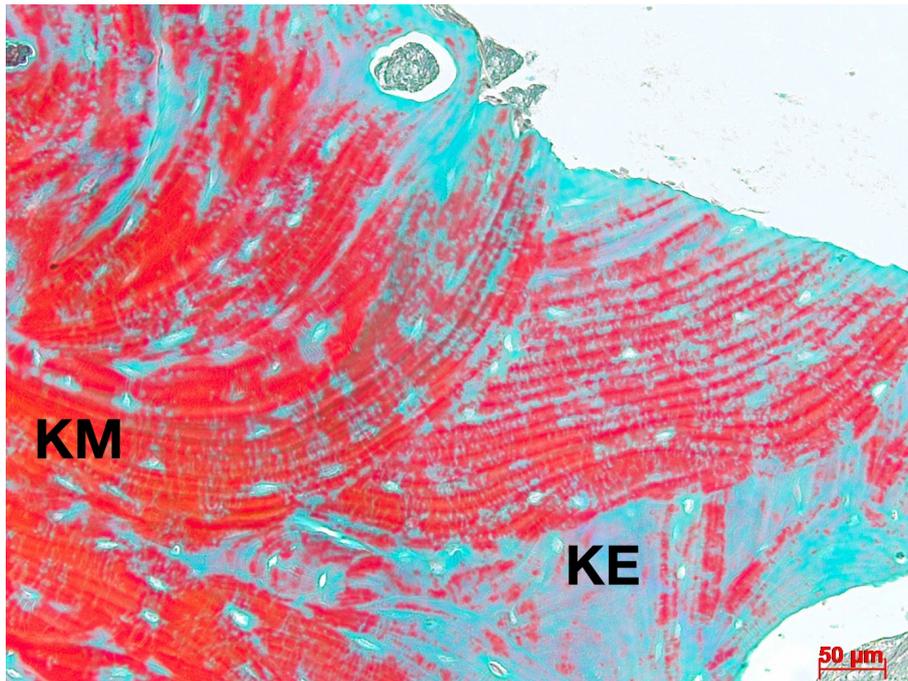
Insbesondere die inneren Knochenareale (K) waren intensiv rot angefärbt, gebildetes Osteoid an der Knochenoberfläche hingegen grünlich (Abb. 46).

## Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

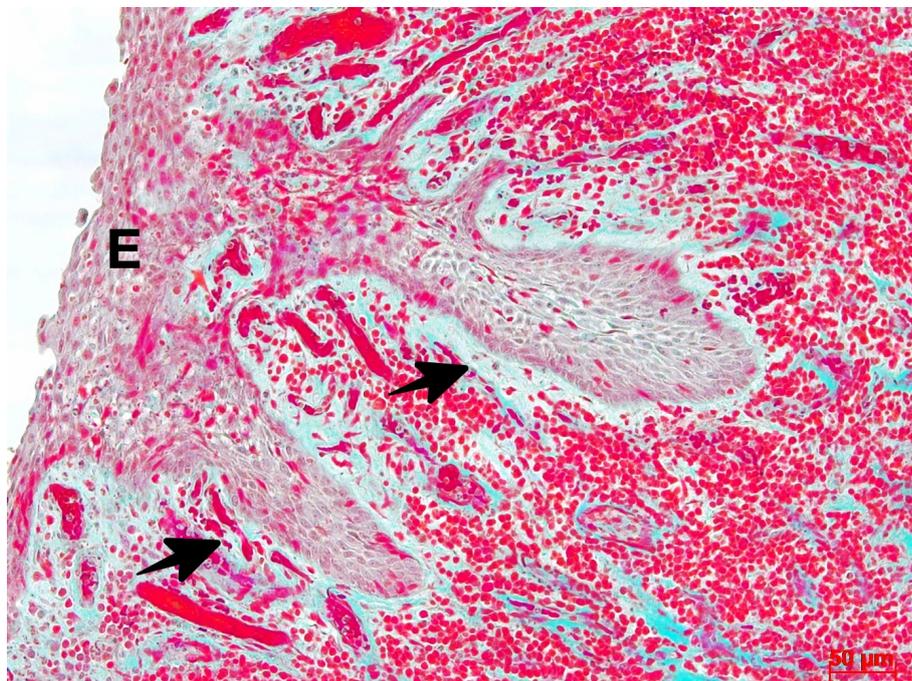
Die inneren Knochenareale zeigten eine intensivrote Färbung, die äußere Knochenmatrix erschien leuchtend grün (Abb. 47). Die Zellen des mehrschichtigen Epithels waren rötlich gefärbt, die kollagenen Fasern des subgingivalen Bindegewebes waren ebenfalls grün (Abb. 48).



**Abb. 46:** Darstellung gesunden Knochens (Originalvergrößerung x5). MG, Kontrollpräparat



**Abb. 47:** Darstellung kompakten, nekrotischen Lamellenknochens. Erkennbar sind innere, mineralisierte Knochenareale (KM) und äußere, entmineralisierte (KE) (Originalvergrößerung x20). MG, Patient 19422/14



**Abb. 48:** Darstellung eines mehrschichtigen Epithels (E) mit verlängerten Retezapfen (Pfeile) und darunter liegendem subgingivalem Bindegewebe (Originalvergrößerung x20). MG, Patient E7636/16

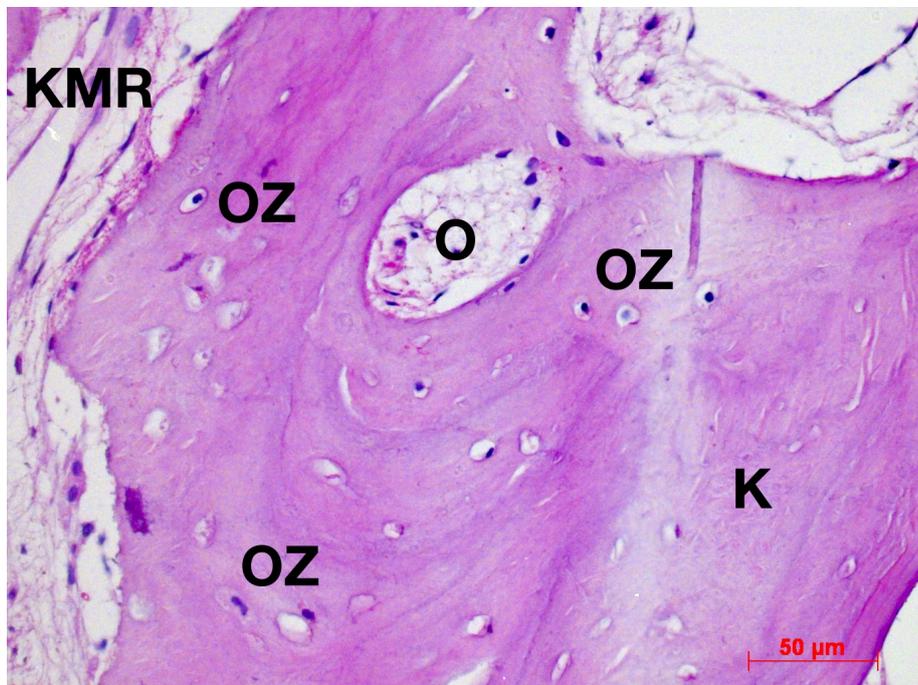
### 3.3 Histochemische Färbung

#### 3.3.1 PAS-Färbung

Im Rahmen der PAS-Färbung kommt es zu einer Anfärbung von kohlenhydrathaltigen Substanzen wie zum Beispiel Glykogen, Proteoglykanen oder Glykoproteinen.

Gesunder Knochen

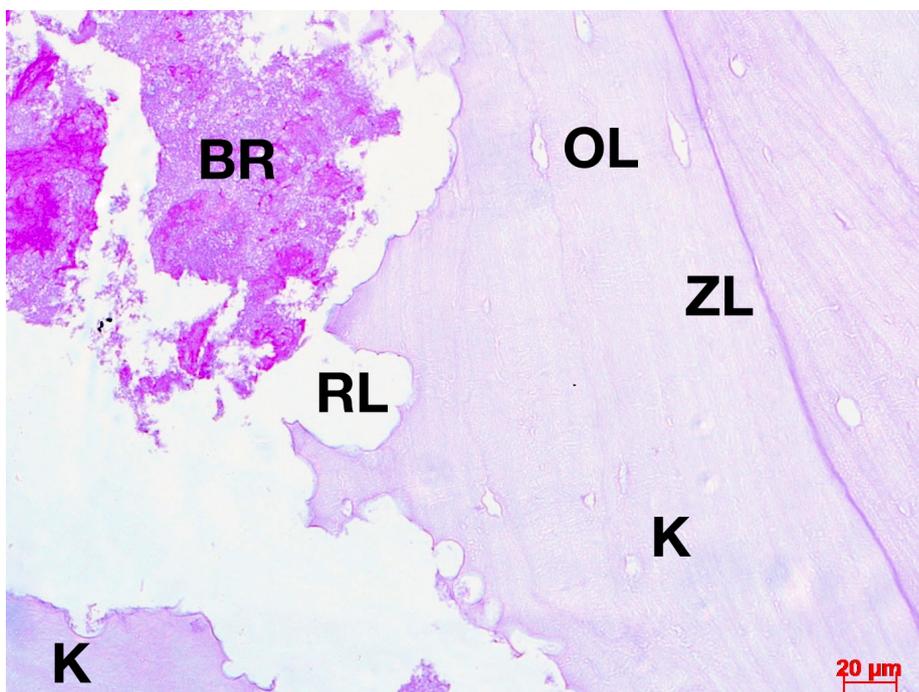
In dieser Übersichtsfärbung wurde der Knochen gleichmäßig PAS-positiv angefärbt. Zellkerne wurden dunkelviolett dargestellt, ebenso Endothelzellen der Gefäße und Knochenränder. Extrazelluläre Matrix wurde zart basophil gefärbt (Abb. 49). Es ergeben sich keine strukturellen Unterschiede zu den zuvor beschriebenen Färbungen.



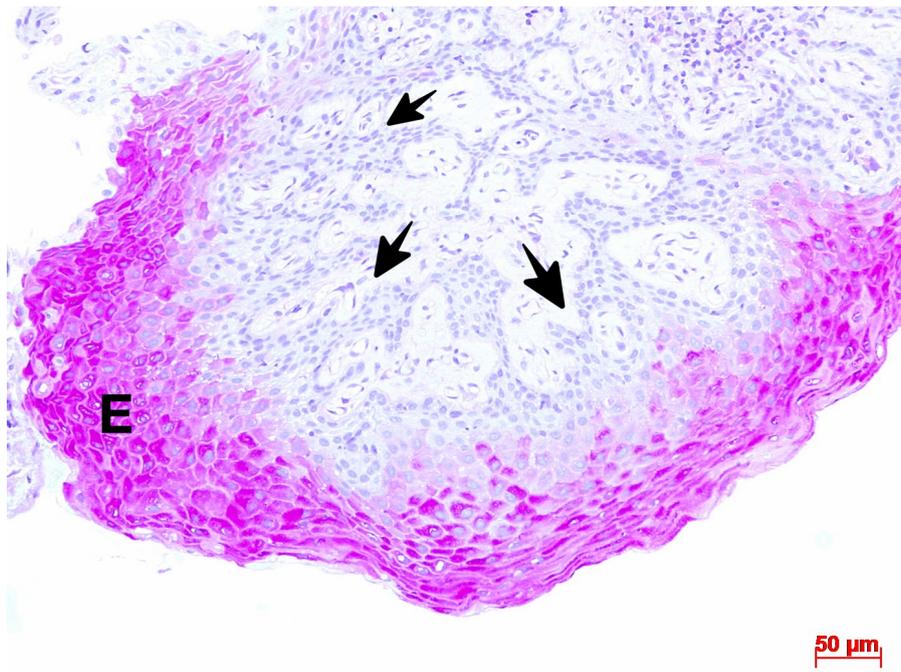
**Abb. 49:** Darstellung eines Knochenfragmentes (K) mit Osteozyten (OZ), Osteon (O) und umliegenden Knochenmarkraum (KMR) (Originalvergrößerung x20). PAS, Kontrollpräparat

## Nekrotischer Knochen unter Denosumab-Therapie

Der nekrotische Knochen wurde ungleichmäßig und schwach PAS-positiv angefärbt. Zellkerne, Knochenränder und Zementlinien erschienen PAS-positiv (Abb. 50). Das Stratum superficiale und intermedium des Epithels im Präparat der Patientenbiopsie 3803/16 reagierten stark PAS-positiv (Abb. 51).



**Abb. 50:** Darstellung eines nekrotischen Knochens (K) mit leeren Osteozytenlakunen (OL), eine Zementlinie (ZL), Resorptionslakunen (RL) und Bakterienrasen (BR) (Originalvergrößerung x40). PAS, Patient E19442/14

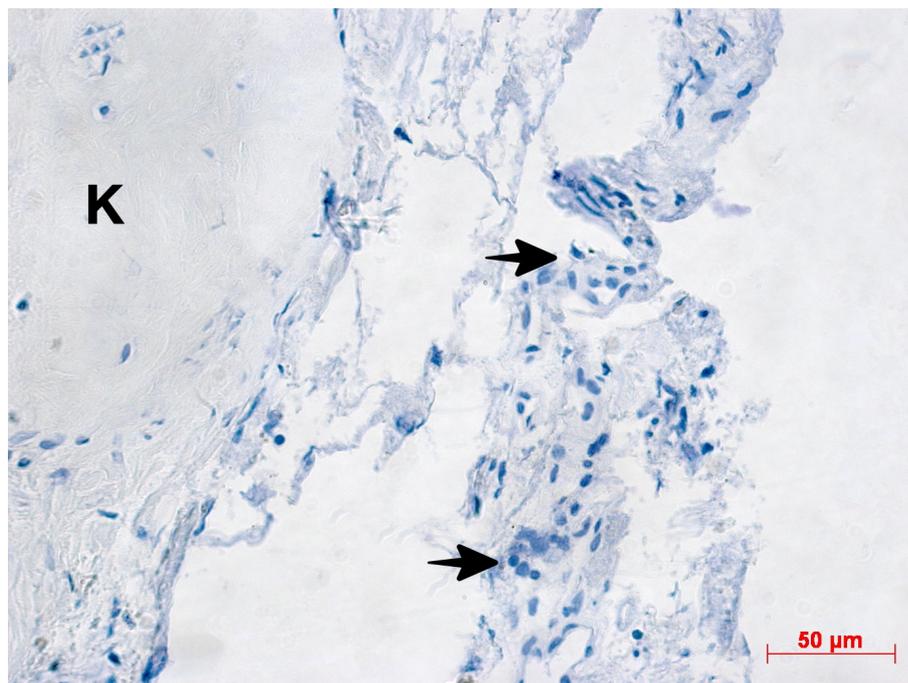


**Abb. 51:** Darstellung mehrschichtigen Plattenepithels (E) mit Retezapfen (Pfeile). Das Stratum superficiale und intermedium wurden stark angefärbt (Originalvergrößerung x20). PAS, Patient E3803/16

### 3.3.2 TRAP-Färbung

#### Gesunder Knochen

Die Präparate zeigten keine TRAP-positiven Osteoklasten auf den Knochenoberflächen (Abb. 52).

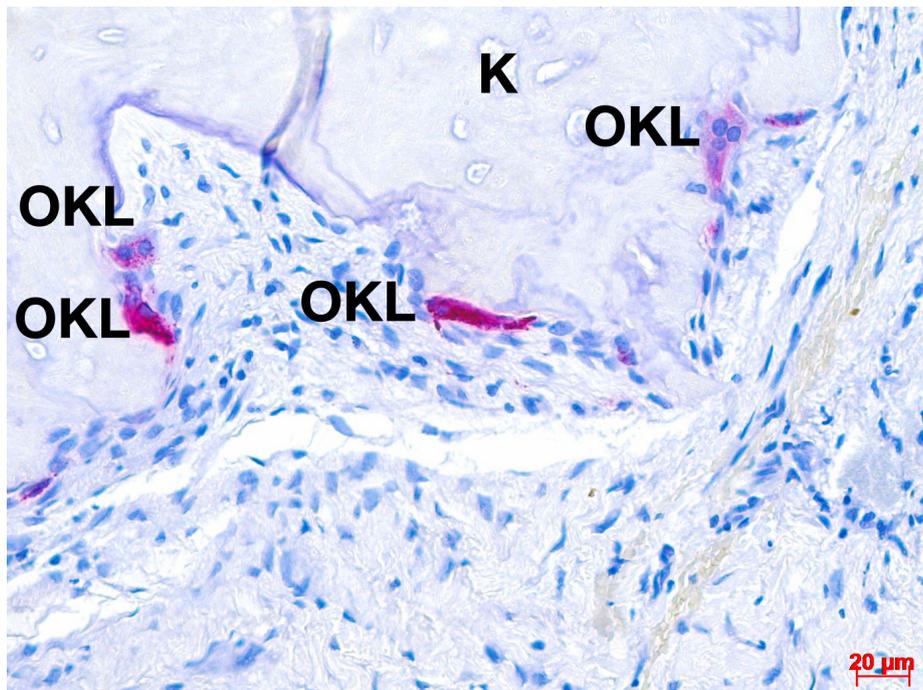


**Abb. 52:** Darstellung gesunder Knochenmatrix (K) mit umliegenden, TRAP-neaktiven Osteoklasten (Pfeile) (Originalvergrößerung x20). TRAP, Kontrollpräparat

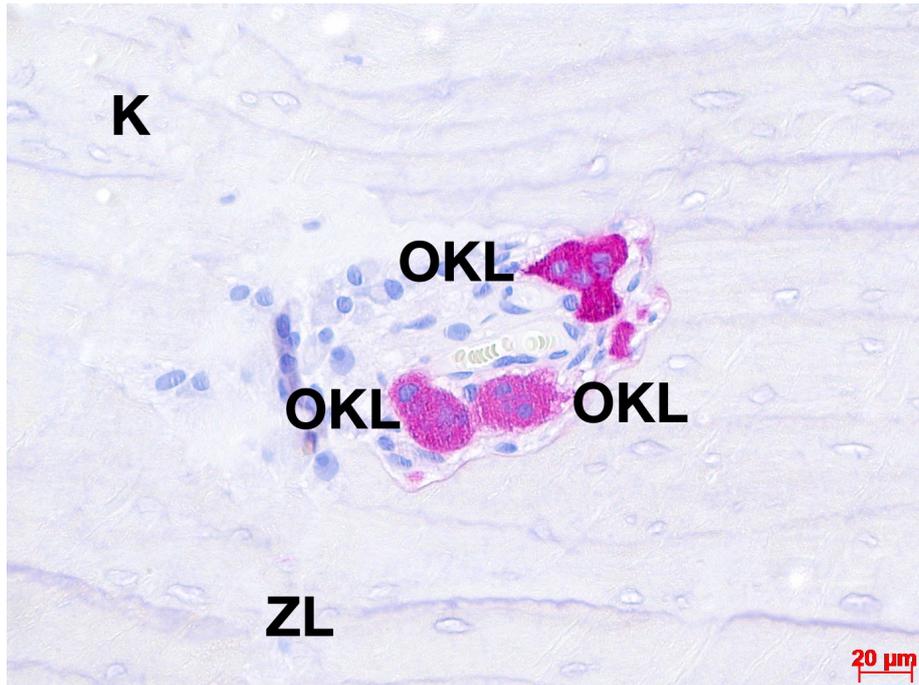
#### Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

Die Reaktionen der TRAP-Färbung fielen sehr unterschiedlich aus: Die Präparate der Patientenbiopsien E2282/16, E19942/14, E11526/15, E4613/15 und E7014/16 zeigten keine Reaktion. Im Präparat der Patientenbiopsie E15632/14 waren zwar Osteoklasten erkennbar, jedoch reagierten sie nicht TRAP-positiv. Die stärksten Reaktionen konnten an den Präparaten der Patientenbiopsien E7636/16, E765/17, E2517/17, E3781/18, E14168/16, E3803/16 (Abb. 55) und E8299/16 beobachtet werden, deren Osteoklasten oft keinen Kontakt zur Knochenoberfläche hatten. In den Präparaten Patientenbiopsien E8299/16

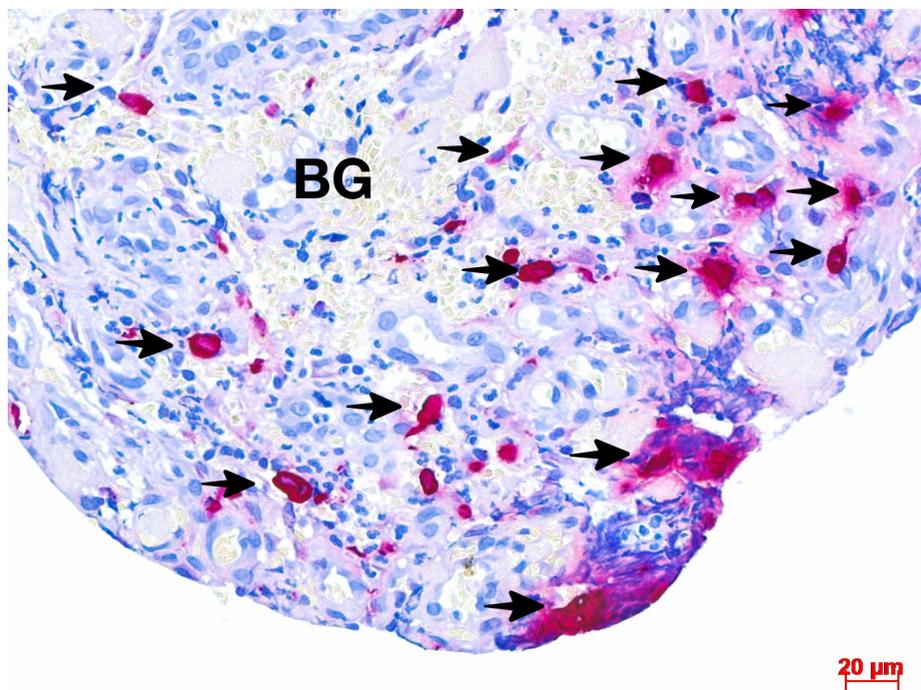
(Abb. 53) und E14168/16 reagierten die Osteoklasten mit einer intensiven, karmesinroten Färbung am stärksten. Das Präparat der Patientenbiopsie E3803/16 zeigte viele kleine TRAP-positive Zellen, die fokal im Bindegewebe lagen (Abb. 54).



**Abb. 53:** Darstellung von TRAP-positiven Osteoklasten (OKL), die dem Knochen(K) direkt anliegen (Originalvergrößerung x40). TRAP, Patient E8299/16



**Abb. 54:** Darstellung Knochens (K) mit Trap-positiven Osteoklasten (OKL) und Zementlinien (ZL) (Originalvergrößerung x40). TRAP, Patient E14168/16



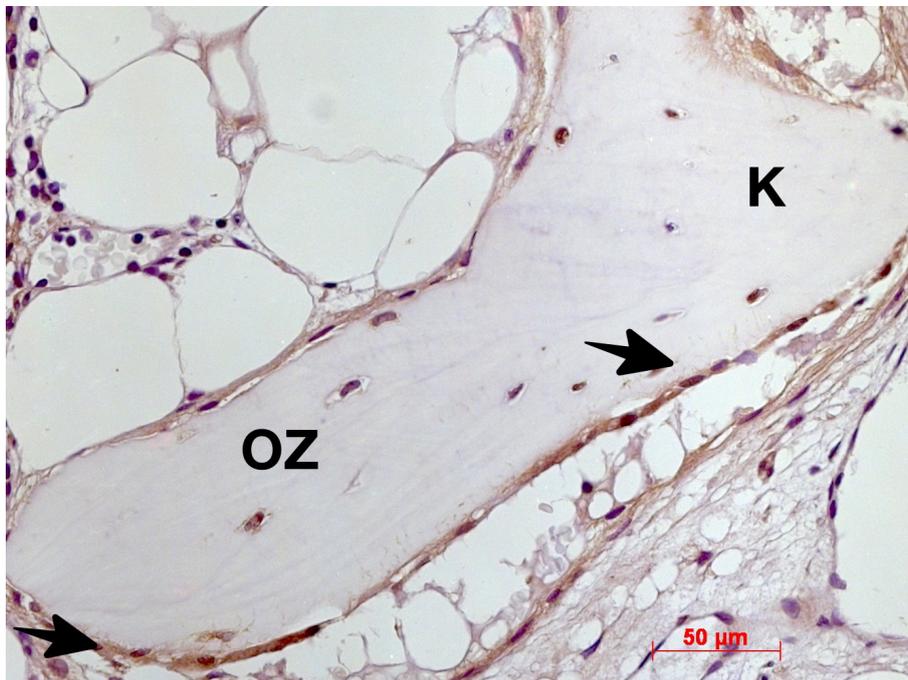
**Abb. 55:** Darstellung von Bindegewebe (BG) mit vielen TRAP-positiven Zellen (Pfeile). (Originalvergrößerung x40) Färbung: TRAP, Patient E3803/16

### 3.4 Immunhistochemische Färbungen

#### 3.4.1 Alkalische Phosphatase

Gesunder Knochen von Patienten ohne Medikation

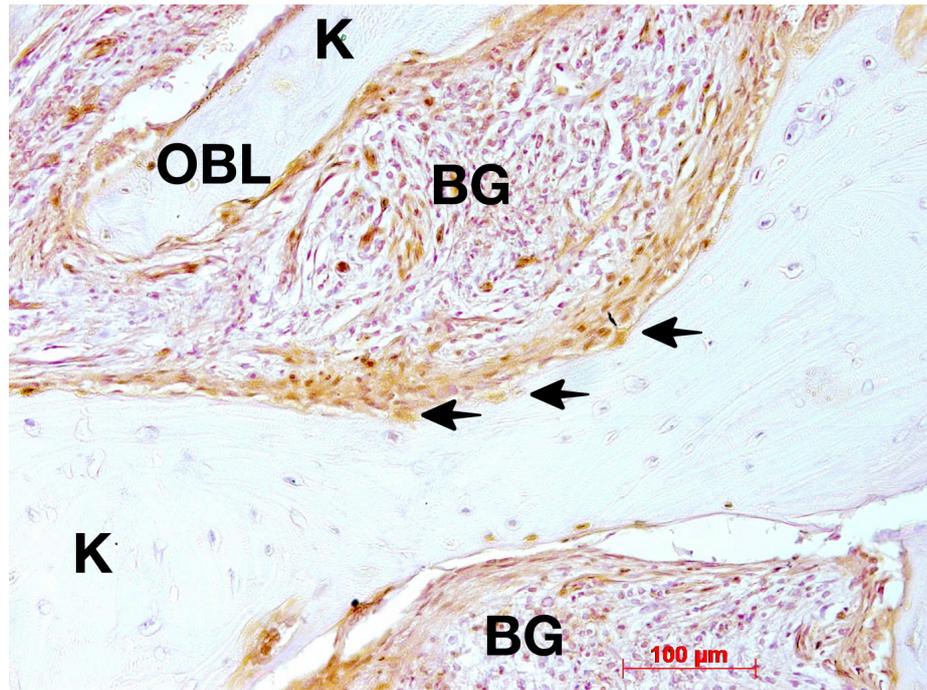
Osteoblasten, lining cells und Osteozyten reagierten mit einer positiven Immunreaktion (Abb. 56).



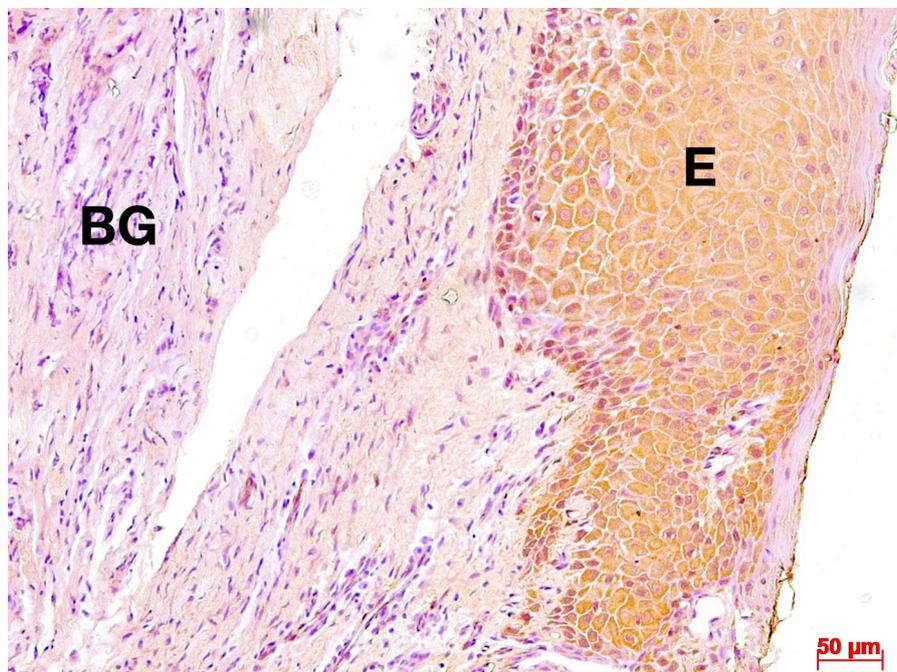
**Abb. 56:** Darstellung gesunden Knochens (K) mit immunreaktiven Osteozyten (OZ) und lining cells (Pfeile) (Originalvergrößerung x20). AP-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Kontrollpräparat

Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

Außer bei den Biopsien E7104/16, E7014/16, E3781/16 und E8299/16 fiel die Immunreaktion schwach aus. Bei den oben genannten Präparaten wurden Osteo- und Fibroblasten, vereinzelte Osteozyten sowie Endothelzellen der Gefäßwände und Epithelzellen angefärbt (Abb. 57 und Abb. 58).



**Abb. 57:** Darstellung eines nekrotischen Knochenstrabekels (K) mit interstitiellem Bindegewebe (BG). Positiv reagierten lining cells (Pfeile), Osteoblasten (OBL), Fibroblasten und Endothelzellen (Originalvergrößerung x10). AP-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E8299/16

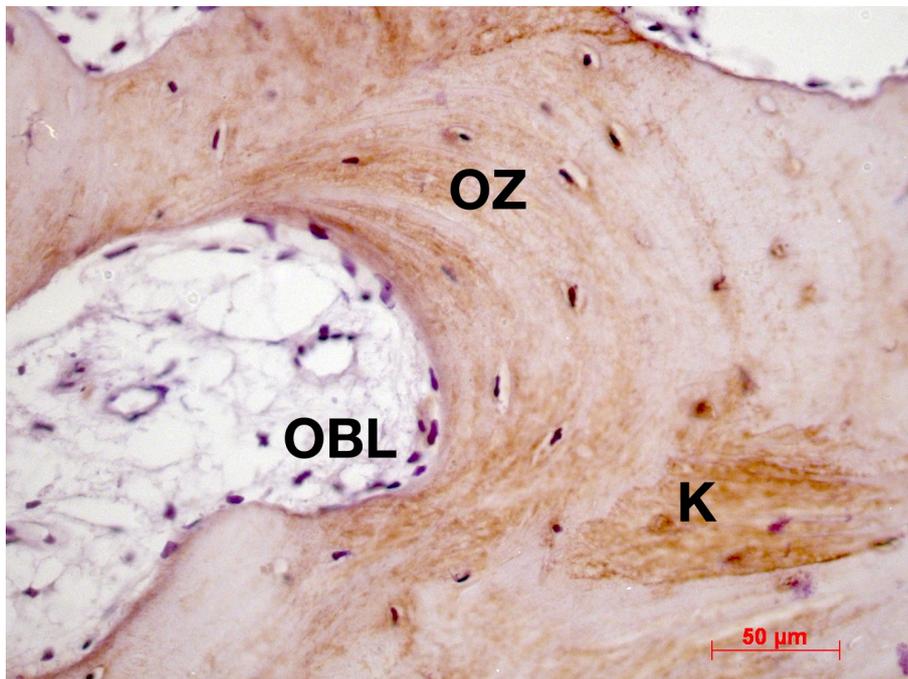


**Abb. 58:** Darstellung subgingivalen Bindegewebes (BG) und mehrschichtigen Epithels (E), dessen Epithelzellen AP-positiv reagierten (Originalvergrößerung x20). AP-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E7104/16

### 3.4.2 Osteokalzin

#### Gesunder Knochen

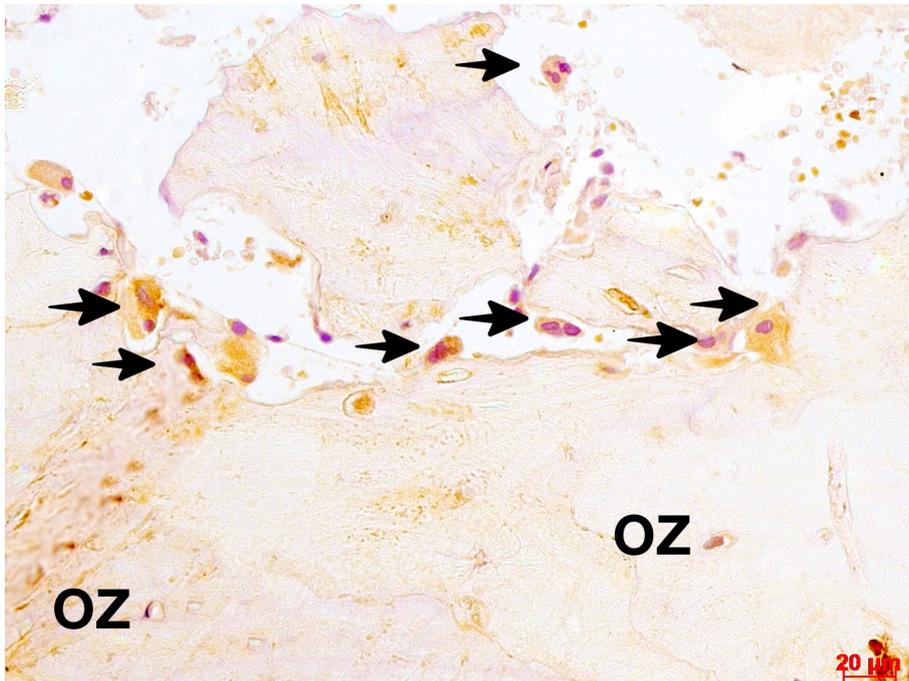
Der Knochen zeigte eine unregelmäßige Immunreaktion der Knochenmatrix. Osteozyten, lining cells und Osteoblasten reagierten Osteokalzin-positiv (Abb. 59).



**Abb. 59:** Darstellung gesunden, Osteokalzin-positiven Knochens (K). Erkennbar sind Osteokalzin-positive Osteoblasten (OBL) und Osteozyten (OZ) (Originalvergrößerung x20). Osteokalzin-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Kontrollpräparat

#### Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

Der Knochen zeigte eine moderate Immunreaktion. Osteoblasten, Osteozyten und lining cells reagierten meistens positiv. Die stärkste Immunreaktion zeigten die Präparate der Patientenbiopsien E4613/15, E765/17 und E14168/16. In den Präparaten der Patientenbiopsien E765/17 und E14168/16 reagierten Osteoklasten Osteokalzin-positiv (Abb. 60).



**Abb. 60:** Darstellung mehrerer Osteokalzin-positiver Osteoklasten (Pfeile) sowie Osteokalzin-positiver Osteozyten (OZ) (Originalvergrößerung x40). Osteokalzin-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E14168/16

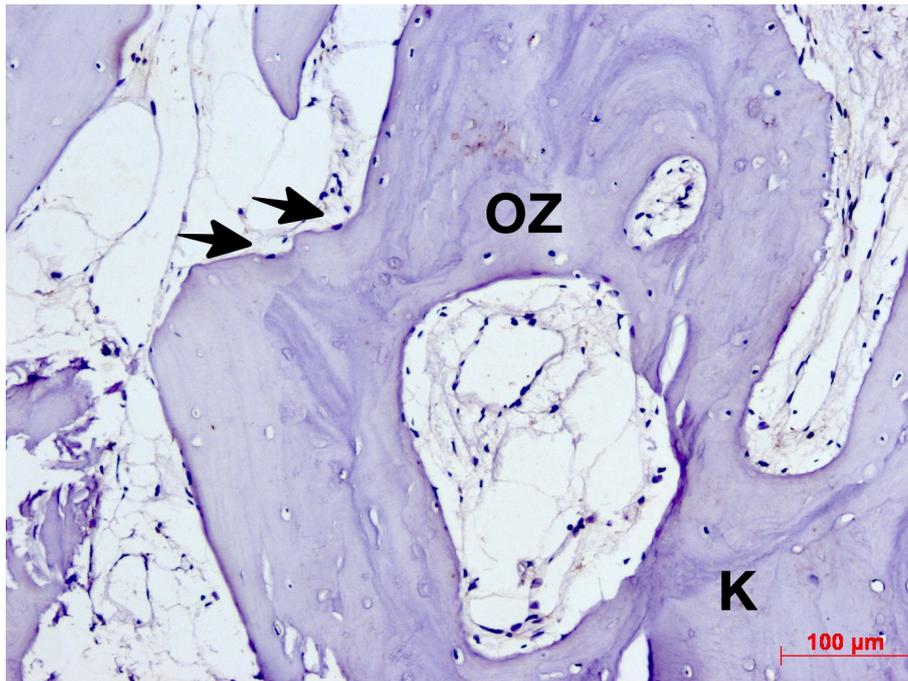
### 3.4.3 BMP2

Gesunder Knochen

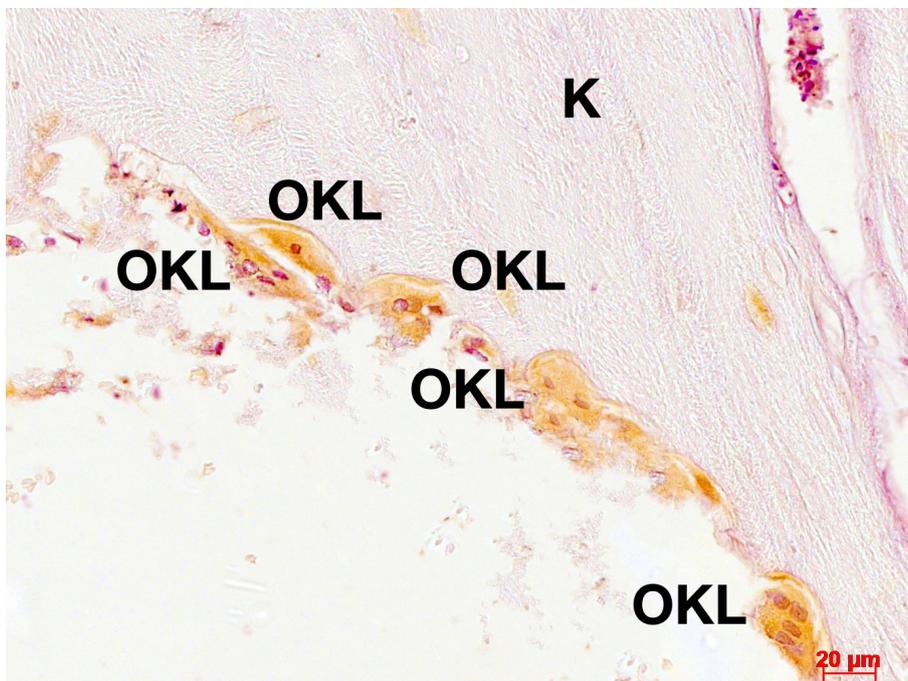
Eine schwache Immunreaktion zeigten Osteoblasten und Fibroblasten. Weiterhin angefärbt wurden lining cells und Osteozyten (Abb. 61).

Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

Osteozyten, lining cells und Osteoblasten zeigten eine positive Immunreaktion. Im Präparat der Patientenbiopsie E8299/16 reagierten mehrere Osteoklasten BMP2-positiv (Abb. 62).



**Abb. 61:** Darstellung gesunden Knochens (K) mit BMP2-positiven Osteozyten (OZ) und lining cells (Pfeile) (Originalvergrößerung x10). BMP2-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Kontrollpräparat

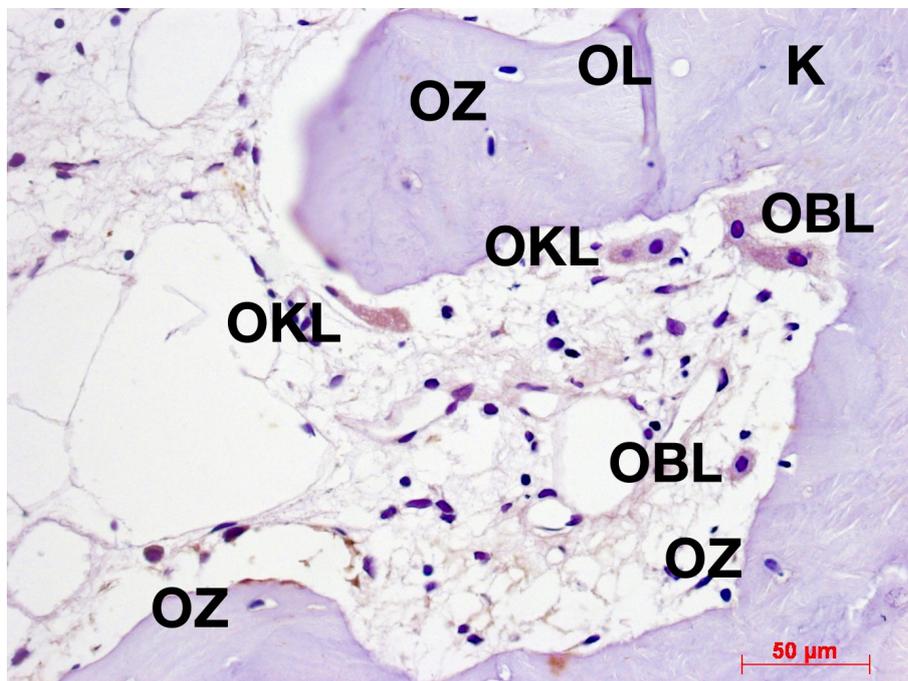


**Abb. 62:** Darstellung mehrerer BMP2-positiven Osteoklasten (OKL), die sich in Resorptionslakunen am Knochen (K) befanden (Originalvergrößerung x40). BMP2-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E8299/16

### 3.4.4 RUNX2

#### Gesunder Knochen

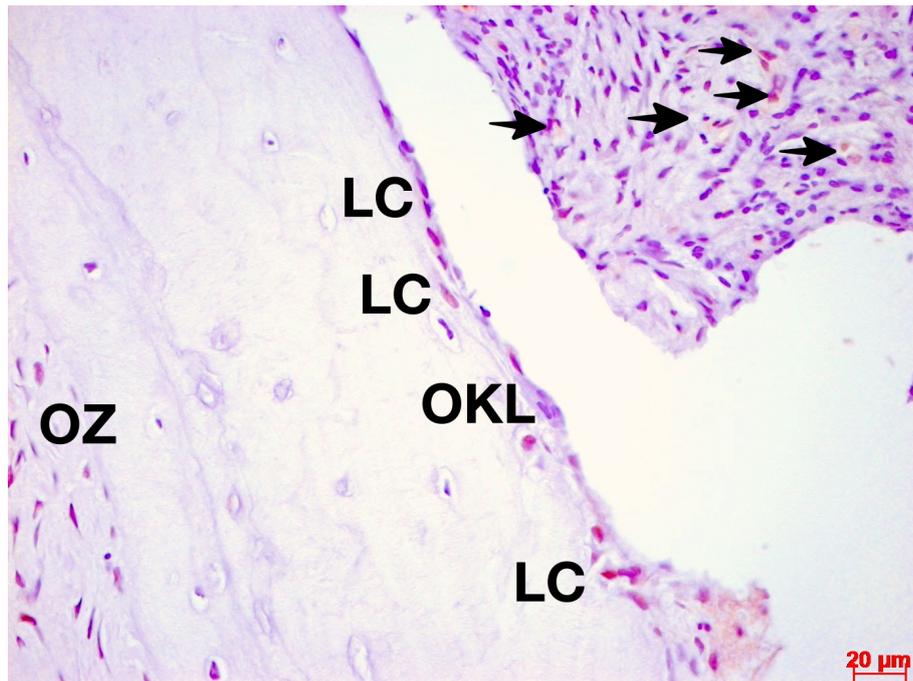
Eine schwache Immunreaktion zeigten Osteoblasten, Osteozyten, lining cells und Osteoklasten (Abb. 63).



**Abb. 63:** Gesunder Knochens (K). Erkennbar sind schwach RUNX2-positive Osteozyten (OZ), Osteoblasten (OBL) und Osteoklasten (OKL) (Originalvergrößerung x20). RUNX2-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Kontrollpräparat

#### Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

Die Immunreaktion fiel schwach aus. RUNX2-positiv reagierten einzelne lining cells, Osteozyten und Osteoblasten sowie wahrscheinlich deren Vorläuferzellen (Abb. 64).

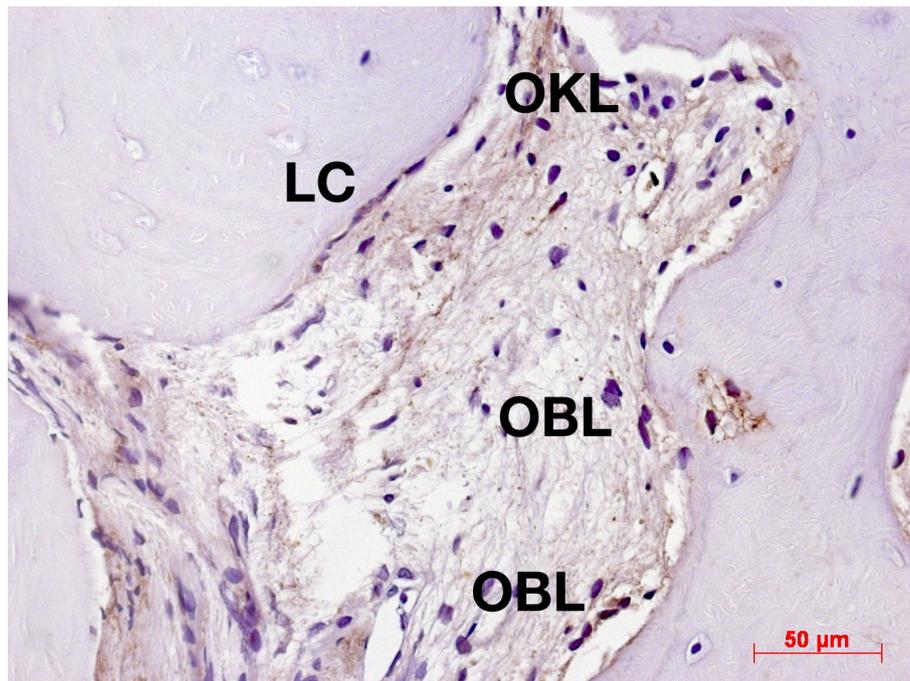


**Abb. 64:** Darstellung von schwach RUNX2-positiven lining cells (LC), Osteozyten (OZ), eines Osteoklasten (OKL) und vermutlich Osteoblastenvorläuferzellen (Pfeile) (Originalvergrößerung x40). RUNX2-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E7636/16

### 3.4.5 RANKL

Gesunder Knochen

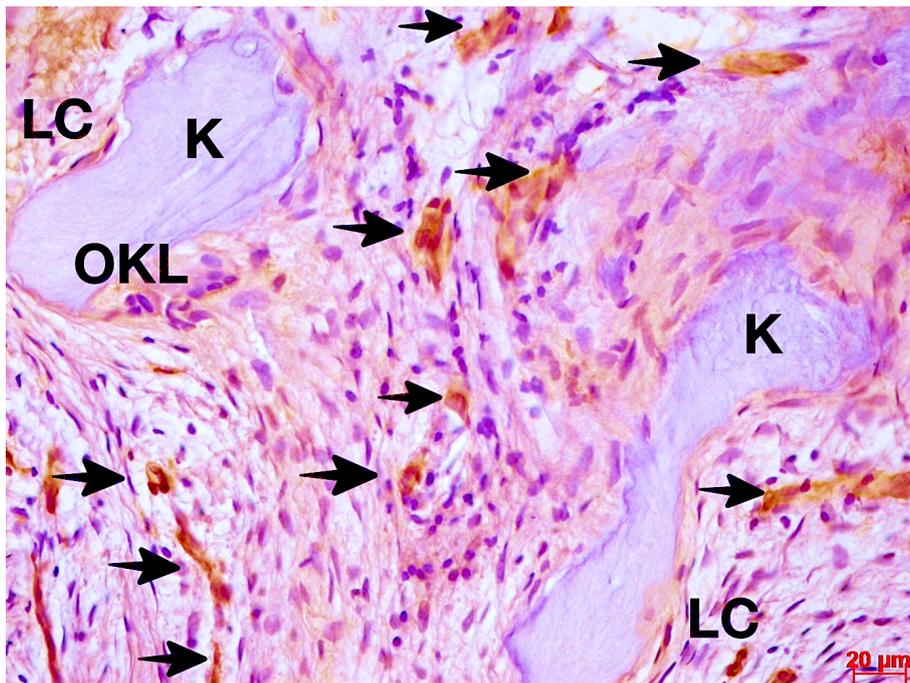
Die Immunreaktion fiel moderat aus. RANKL-positiv reagierten einige lining cells, Osteoblasten und Osteoklasten (Abb. 65).



**Abb. 65:** RANKL-positive Immunreaktion von lining cells (LC), Osteoblasten (OBL) und eines Osteoklasten (OKL) (Originalvergrößerung x20). RANKL-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Kontrollpräparat

#### Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

Eine stärkere RANKL-positive Immunreaktion zeigten besonders die Präparate der Patientenbiospien E12139/16, E12955/16 und E3781/16. Am intensivsten reagierten hierbei Fibroblasten im umliegenden Weichgewebe. Osteoblasten, lining cells, Osteoklasten und Osteozyten zeigten nur eine schwächeren Reaktion (Abb. 66).



**Abb. 66:** Zwei Knochenfragmente (K) und umliegendes Weichgewebe. Erkennbar sind RANKL-positive lining cells (LC), Osteoklasten (OKL) und Fibroblasten (Pfeile) (Originalvergrößerung x40). RANKL-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E12139/16

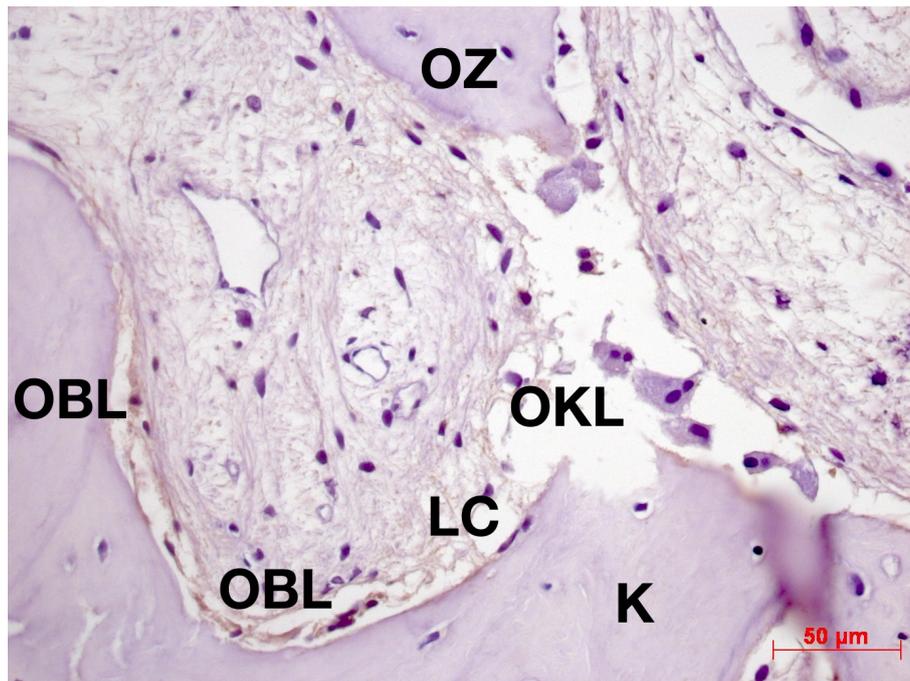
### 3.4.6 OPG

#### Gesunder Knochen

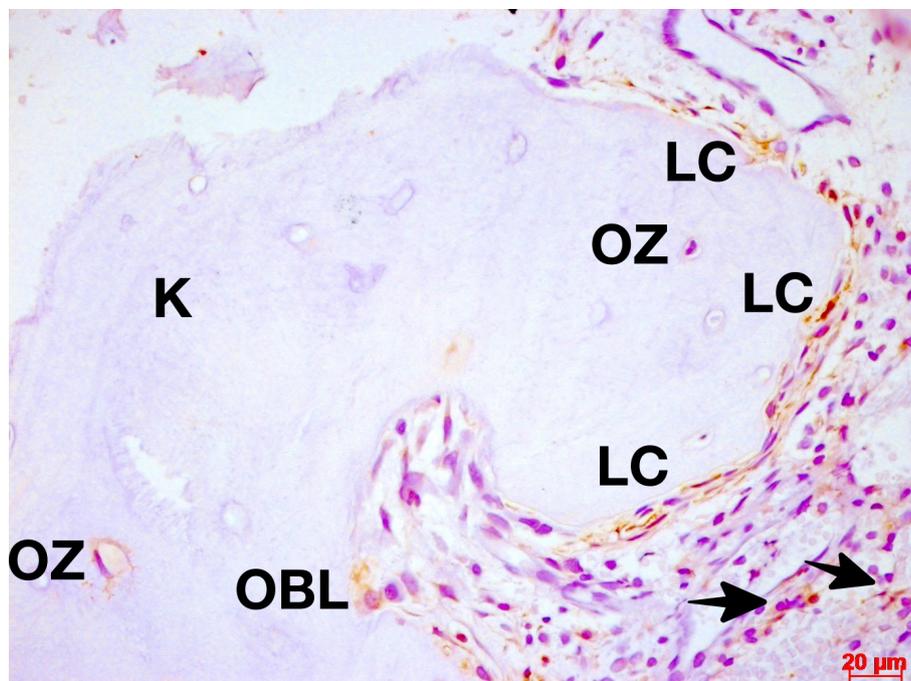
Lining cells und Osteoblasten zeigten eine schwache OPG-positive Immunreaktion, Osteoklasten und Osteozyten gar keine (Abb. 67).

#### Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

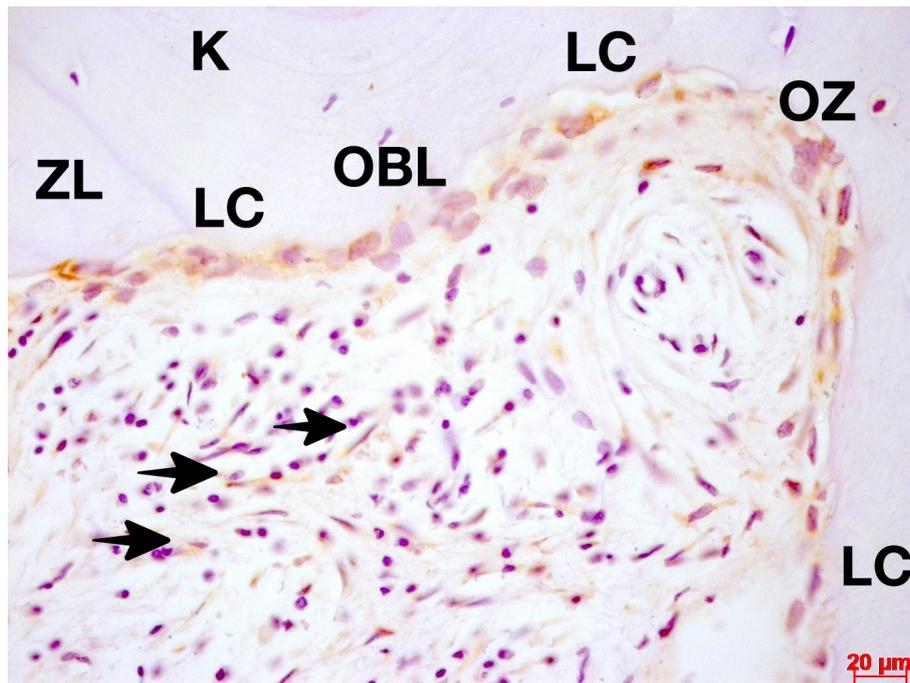
Eine Immunreaktion erfolgte nur bei den Präparaten der Patientenbiospien E8299/16, E3781/16, E12139/16, E7636/16 und E2517/17. Osteoblasten in Knochennähe, lining cells und vereinzelte Osteozyten und Fibroblasten reagierten OPG-positiv (Abb. 68 und Abb. 69).



**Abb. 67:** Knochenfragment mit OPG-positive lining cells (LC) und Osteoblasten (OBL) sowie OPG-negativen Osteozyten (OZ) und Osteoklasten (OKL) (Originalvergrößerung x20). OPG-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Kontrollpräparat



**Abb. 68:** Nekrotisches Knochenfragment (K) mit OPG-positiven lining cells (LC), Osteozyten (OZ), Osteoblasten (OBL) und Fibroblasten (Pfeile) (Originalvergrößerung x40). OPG-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E7636/16



**Abb. 69:** Knochenfragment (K) mit Zementlinie (ZL). Erkennbar sind OPG-positive lining cells (LC), Osteoblasten (OBL), Osteozyten (OZ) und Fibroblasten (Pfeile) (Originalvergrößerung x40). OPG-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E8299/16

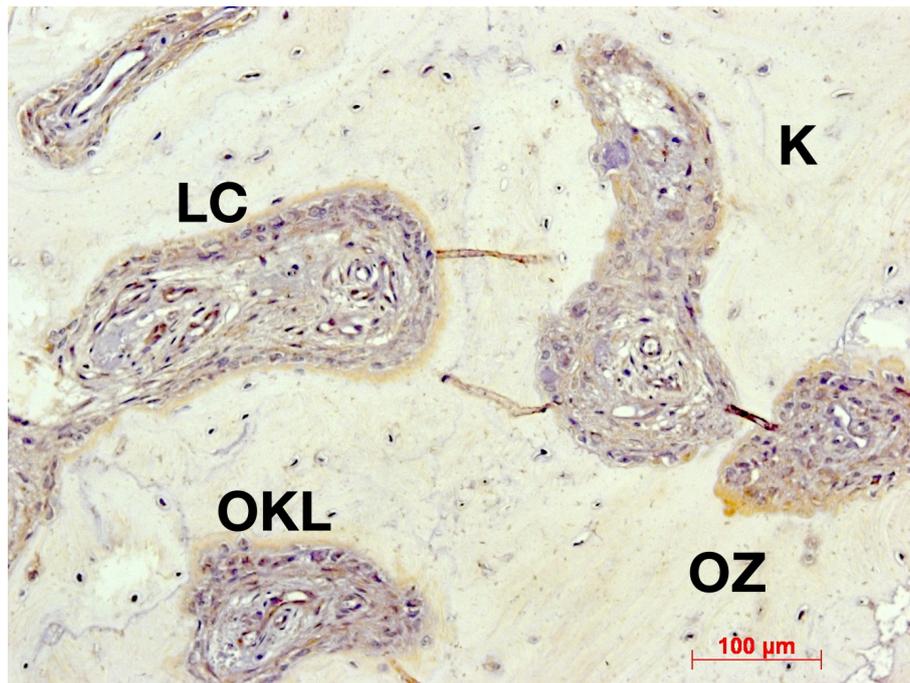
### 3.4.7 RANK

#### Gesunder Knochen

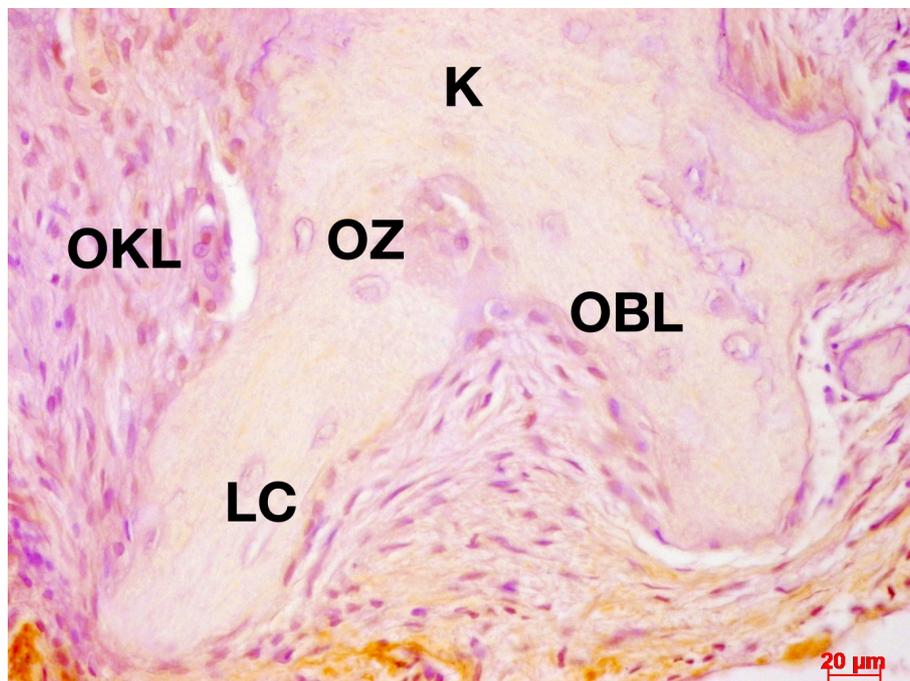
Die Färbung des Knochens erfolgte gleichmäßig. Osteoblasten, Osteozyten, lining cells und Osteoklasten zeigten eine RANK-positive Immunreaktion (Abb. 70).

#### Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

Die Präparate der Patientenbiopsien E12955/16, E7636/16, E8299/16, E12139/16, E14168/16, E765/17, E2517/17, E7194/16 zeigten eine intensive Immunreaktion. Angefärbt wurden Osteoblasten, lining cells und Osteozyten. Schwach RANK-positive Osteoklasten zeigten die Präparate der Patientenbiopsien E7636, E12139/16 (Abb. 71) und E14168/16. Fibroblasten und Gefäßwände wurden schwach angefärbt.



**Abb. 70:** Gesunder Knochen (K) mit RANK-positiven Osteoklasten (OKL), Osteozyten (OZ) und lining cells (LC) (Originalvergrößerung x10). RANK-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E7636/16

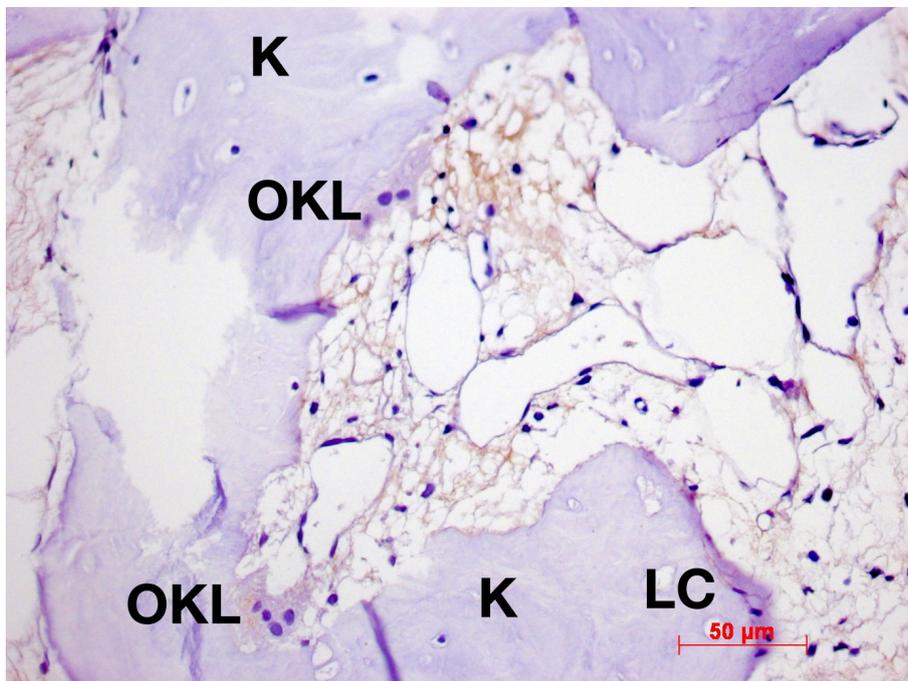


**Abb. 71:** Knochen trabekel (K) mit lining cells (LC), Osteoblasten (OBL), Osteozyten (OZ) und einem Osteoklasten (OKL) (Originalvergrößerung x40). RANK-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E12139/16

### 3.4.8 Cathepsin K

Gesunder Knochen von Patienten ohne Medikation

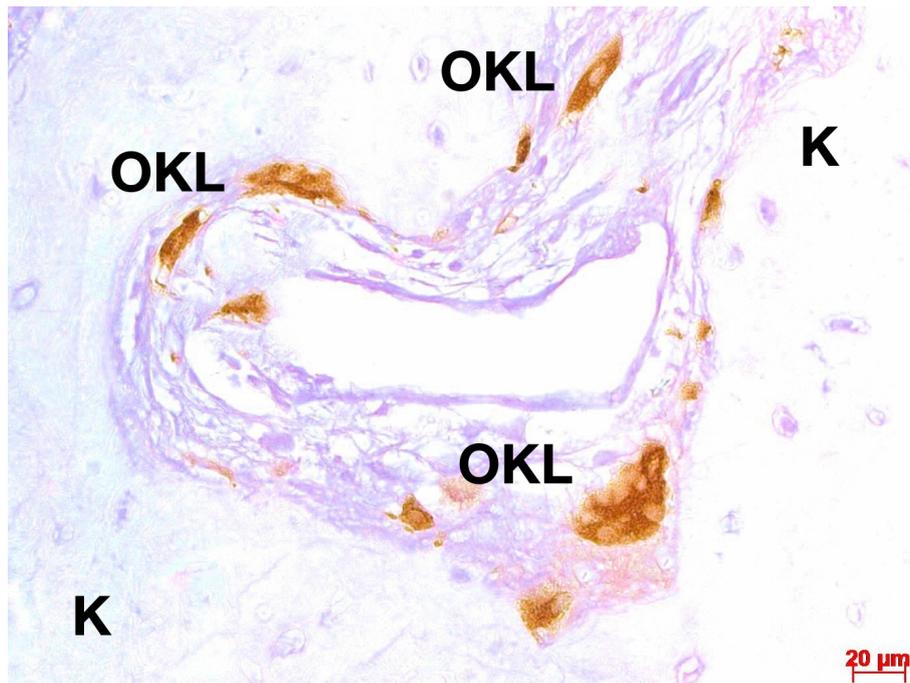
Osteoklasten und lining cells reagierten schwach Cathepsin-K positiv (Abb. 72).



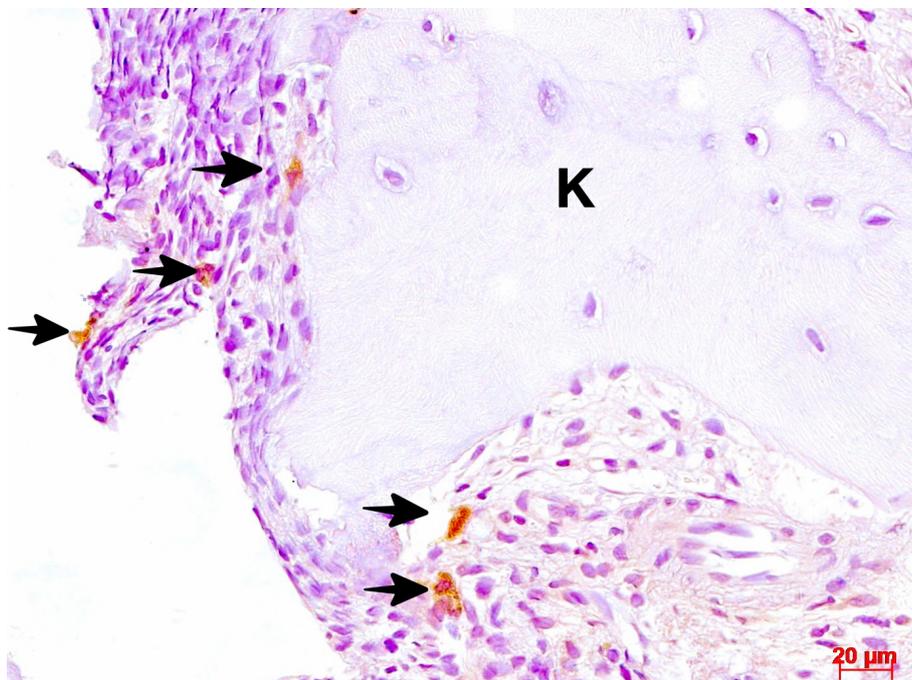
**Abb. 72:** Gesunder Knochens (K) mit Osteoklasten (OKL) und lining cells (LC), die schwach Cathepsin K-positiv reagierten (Originalvergrößerung x20). CathepsinK-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Kontrollpräparat

Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

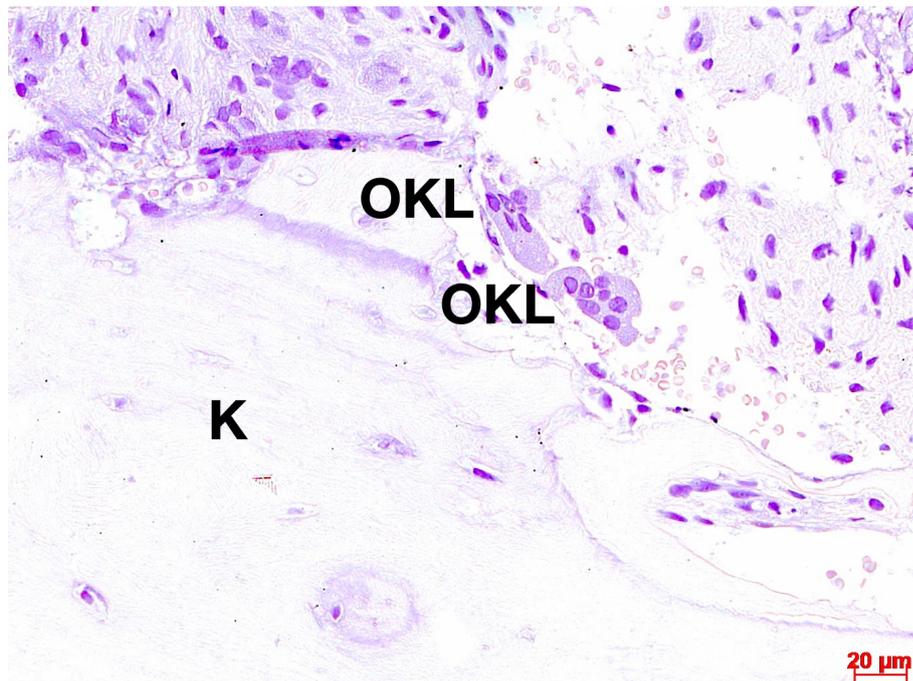
Eine starke Immunreaktion zeigten die Osteoklasten in den Präparaten der Patientenbiopsien E7636/16, E15526/15, E2282/16, E12139/16, E7014/16, E2517/17 und E15632/14 (Abb. 73). Außerdem reagierten vereinzelte Zellen im umliegenden Weichgewebe Cathepsin K-positiv (Abb. 74).



**Abb. 73:** Nekrotischer Knochen (K) mit Cathepsin K-positive Osteoklasten (OKL) (Originalvergrößerung x40). Cathepsin K-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E15632/14



**Abb. 74:** Nekrotischer Knochen (K) mit im Bindegewebe liegenden Zellen, Cathepsin K-positiv reagierten (Pfeile) (Originalvergrößerung x40). Cathepsin K-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E15526/15



**Abb. 75:** Nekrotisches Knochenfragmentes (K). Erkennbar sind unter anderem Osteoklasten (OKL), die nicht Cathepsin K-positiv reagierten(40x). Cathepsin K- Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E14168/16

In den Präparaten der Präparaten der Patienten E8299/16 und E14168/16 waren zwar Osteoklasten erkennbar, jedoch wiesen sie keine Immunreaktion auf (Abb. 75).

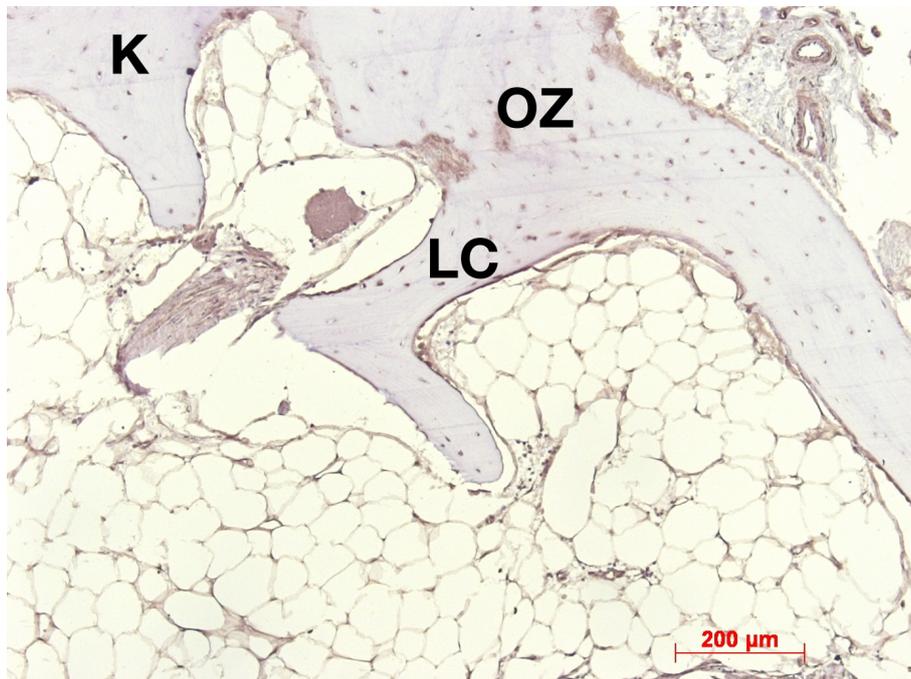
### 3.4.9 MMP8

Gesunder Knochen

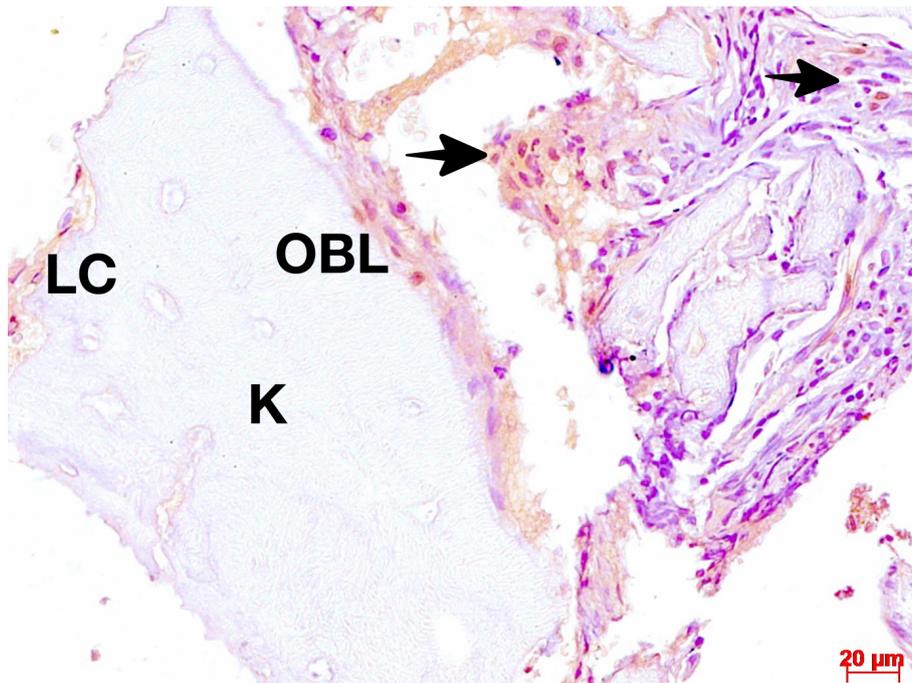
Die Immunreaktion fiel relativ unspezifisch aus. Mit einer mittleren Intensität reagierten lining cells, Osteoblasten, Osteozyten, Fibroblasten, und Gefäßwände (Abb. 76).

## Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

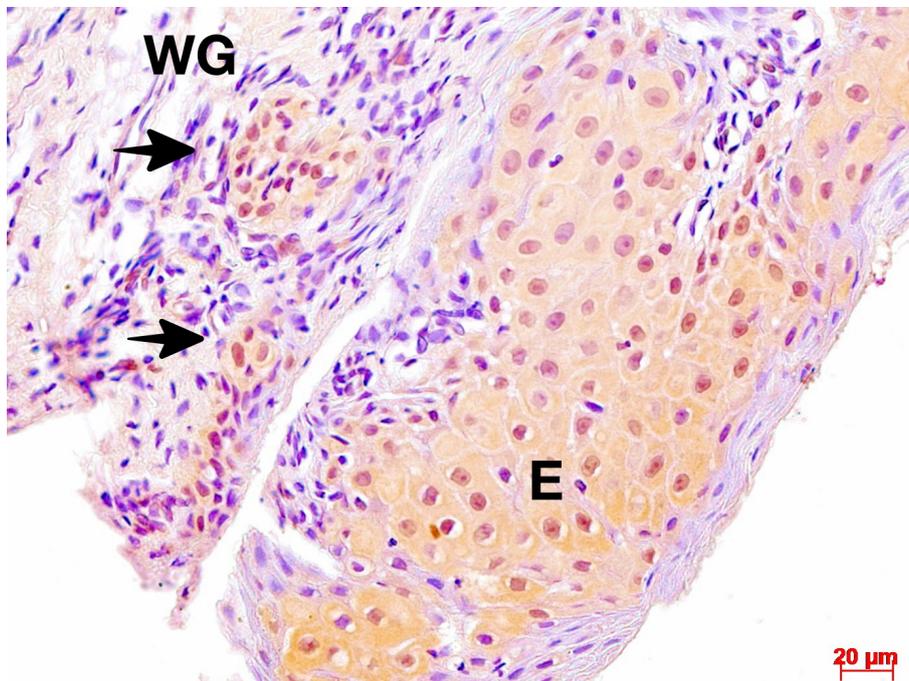
Die Immunreaktion der Fibroblasten war in allen Präparaten stark positiv ausgefallen. Osteoblasten, lining cells, Osteozyten und Epithelzellen zeigten eine positive Immunreaktion sowie Endothelzellen und neutrophile Granulozyten. (Abb. 77 und Abb. 78)



**Abb. 76:** Gesunder Knochen (K) mit Osteozyten (OZ) und lining cells (LC), die MMP8-positiv reagierten (Originalvergrößerung x5). MMP8-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Kontrollpräparat



**Abb. 77:** Nekrotischer Knochen (K) mit MMP8-positiven lining cells (LC), Osteoblasten (OBL) und neutrophile Granulozyten (Pfeile) (Originalvergrößerung x40). MMP8-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E7636/16

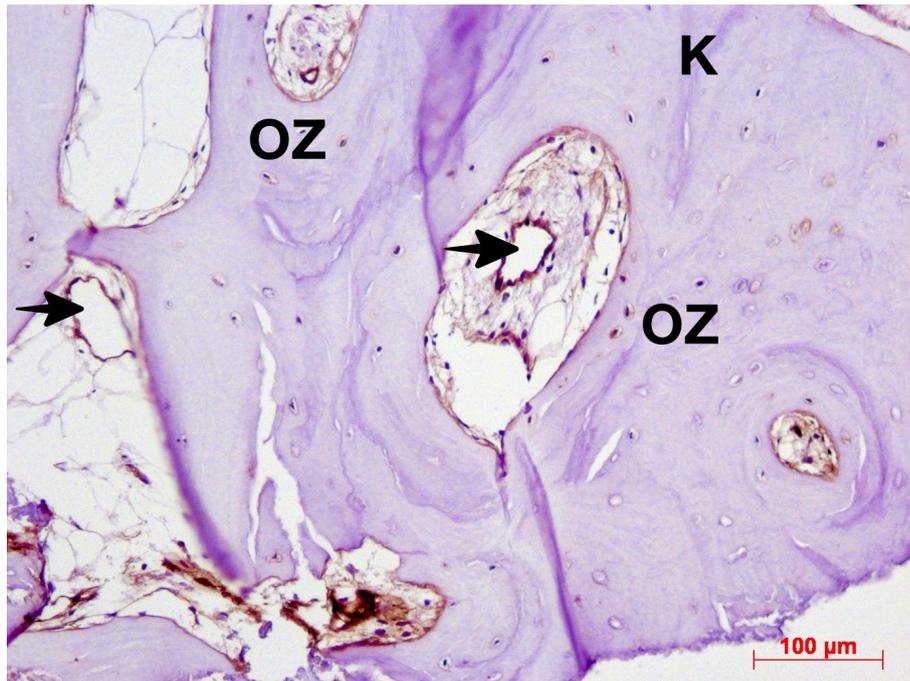


**Abb. 78:** Mehrschichtiges Epithel (E) und Weichgewebe (WG). Erkennbar sind Infiltrate (Pfeile), deren Zellen MMP8-positiv reagierten, sowie die MMP8-positive Reaktion der Epithelzellen (Originalvergrößerung x40). MMP8-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E7104/16

### 3.4.10 vWF

Gesunder Knochen

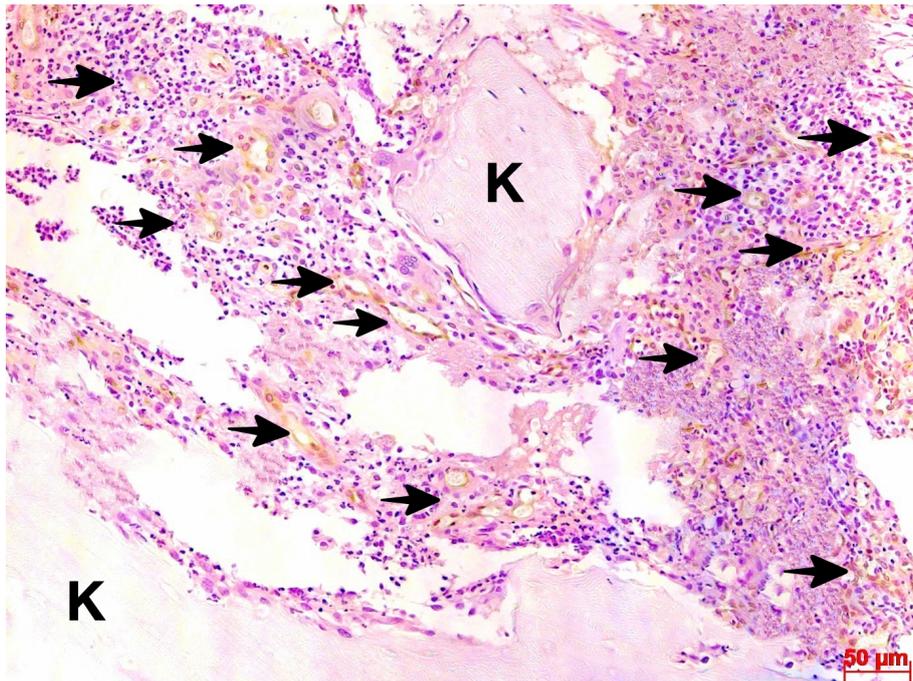
Alle Endothelzellen der Gefäßwände zeigten eine starke Reaktion (Abb. 79).



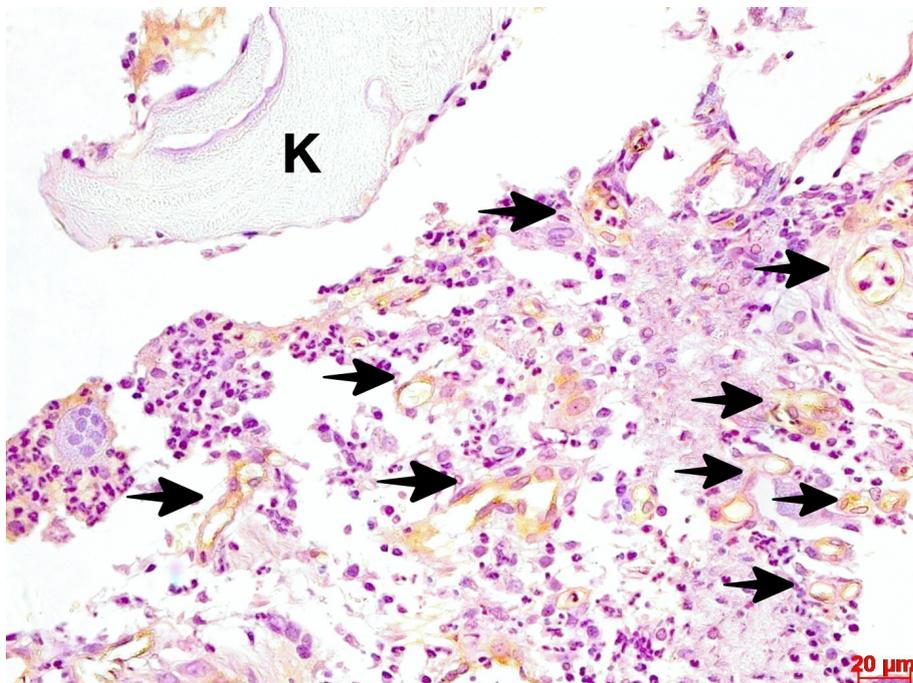
**Abb. 79:** Histologische Darstellung eines gesunden Knochens (K) mit Osteozyten (OZ) und vWF-positiven Gefäßendothelien (Pfeile) (Originalvergrößerung x10). vWF-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Kontrollpräparat

Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

Es reagierten alle Gefäßendothelien vWF-positiv. Während im Knochen weniger Gefäße beobachtet werden konnten, waren im umliegenden Weichgewebe und in infiltrierten zahlreiche Gefäße vorhanden (Abb. 80 und Abb. 81).



**Abb. 80:** Zwei Knochenfragmente (K) mit zahlreichen, umliegenden, angeschnittenen Gefäßen (Pfeile) (Originalvergrößerung x20). vWF-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E3781/18

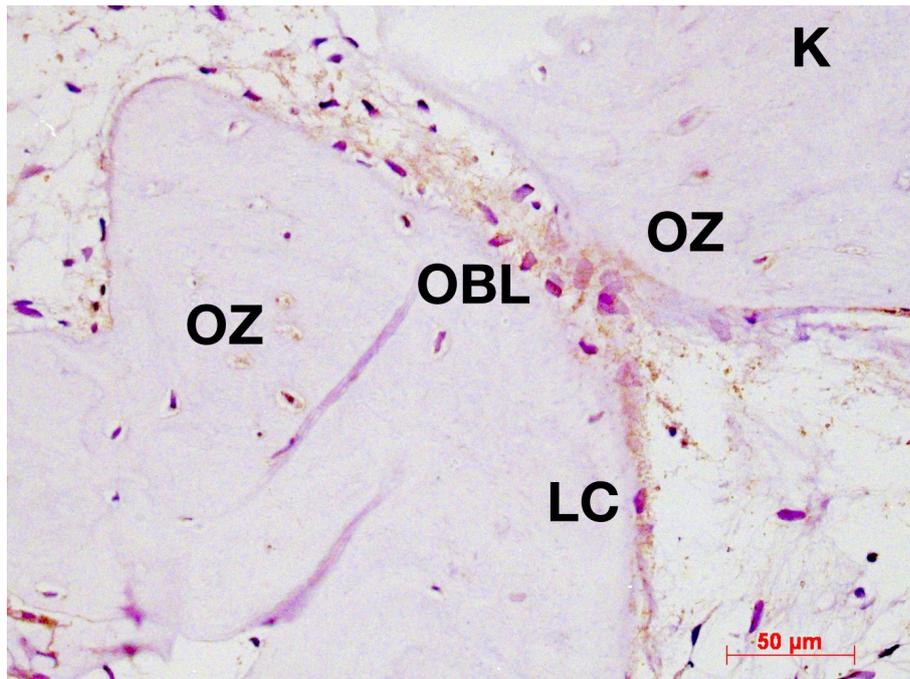


**Abb. 81:** Nekrotischer Knochen (K) und umliegendes Gewebe mit mehreren angeschnittenen Gefäßen (Pfeile) (Originalvergrößerung x40). vWF-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient E3781/18

### 3.4.11 VEGF

#### Gesunder Knochen

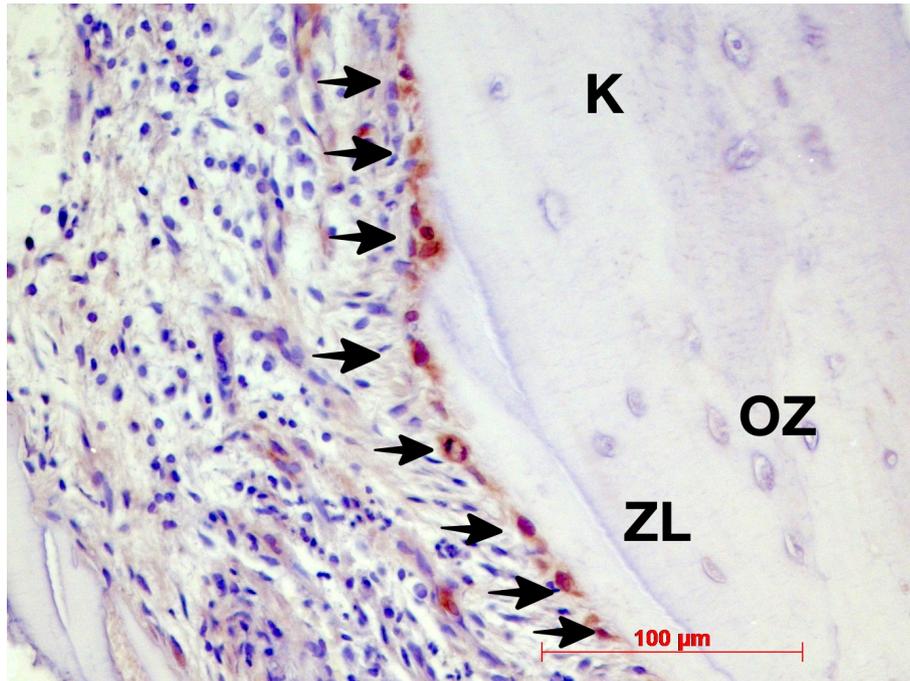
Eine VEGF-positive Immunreaktion zeigten Osteoblasten, lining cells, einige Osteozyten und Endothelzellen der Gefäße (Abb. 82).



**Abb. 82:** Gesunder Knochen (K) mit VEGF-positiven Osteoblasten (OBL) sowie einigen VEGF-positiven Osteozyten (OZ) und lining cells (LC) (Originalvergrößerung x20). VEGF-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Präparat 2097

#### Nekrotischer Knochen von Patienten unter Denosumab-Therapie

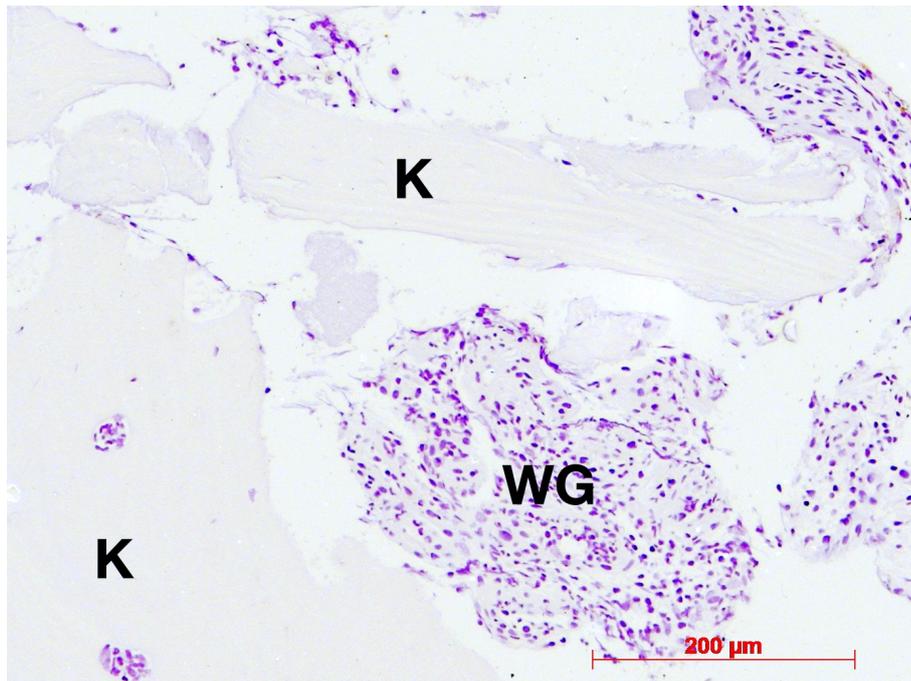
Eine stärkere Immunreaktion erfolgte in den Präparaten der Patientenbiopsien E8299/16, E12955/16, E7104/16, E19442/14, E765/16, E2517/17, E7363/17 und E15632/14. Positiv reagierten Zellen des Bindegewebes, Endothelzellen der Gefäßwände und in den letzten drei Präparaten Osteoblasten. In den Präparaten der Patientenbiopsie E15632/14 reagierten einzelne Osteozyten und im Präparat der Patientenbiopsie 7636/16 einige lining cells VEGF-positiv (Abb. 83).



**Abb. 83:** Knochenfragment (K), umliegendes Weichgewebe, Zementlinie (ZL), VEGF-negativen Osteozyten sowie VEGF-positive Osteoblasten (Pfeile) und lining cells (Pfeile) (Originalvergrößerung x10). VEGF-Immunhistochemie, Färbung: DAB, Patient: E7636/16

### 3.5 Negativ-Kontrollen

Alle Negativkontrollen zeigten keine Immunreaktion (Abb. 84), somit konnte eine unspezifische Färbereaktion ausgeschlossen werden.



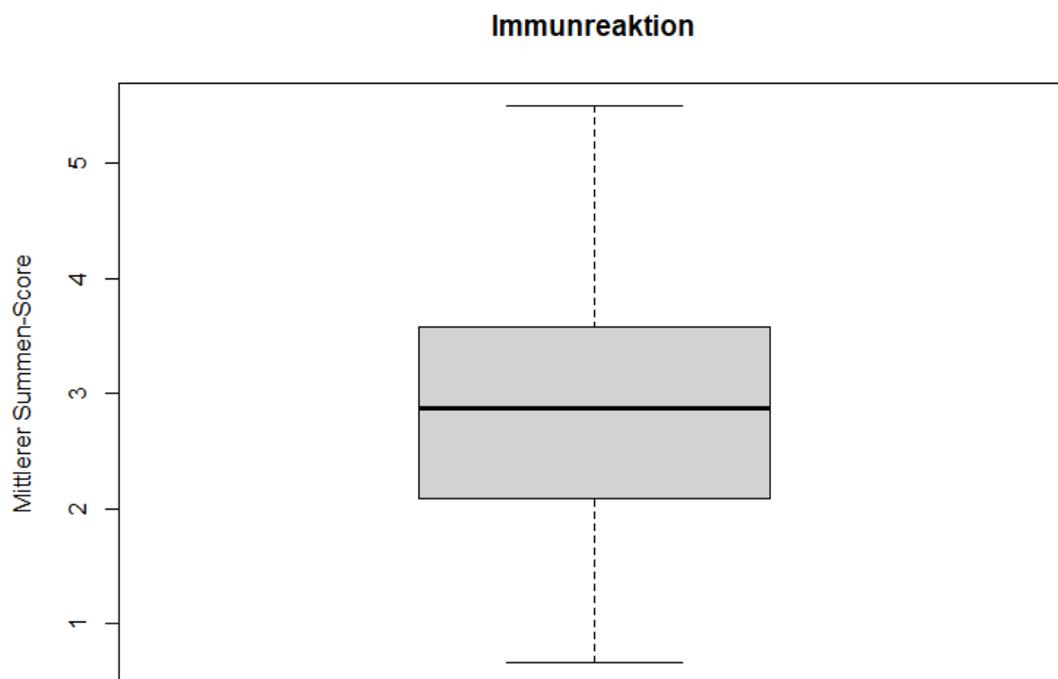
**Abb. 84:** Knochenfragmente (K) und Weichgewebe (WG) mit keiner ersichtlichen Immunreaktion (Originalvergrößerung x5). OPG-Immunhistochemie, Färbung: Negativ-Kontrolle, Patient: E765/17

### 3.6 Positiv-Kontrollen

Alle Positiv-Kontrollen zeigten erwartbare Immunreaktionen.

### 3.7 Statistische Auswertung der Befunde

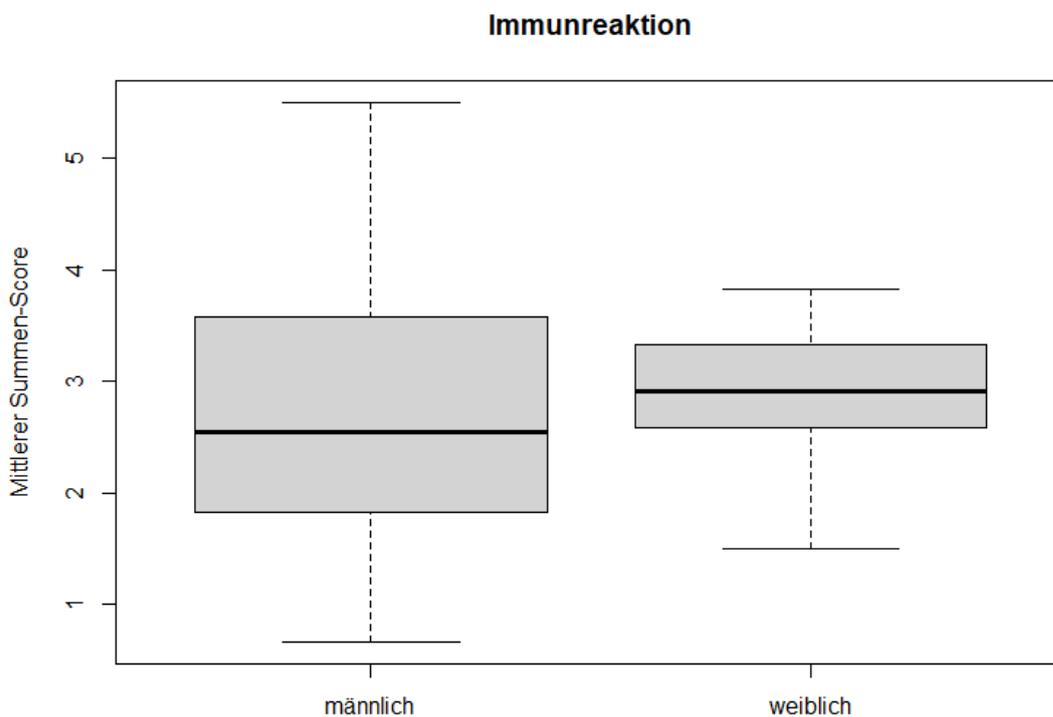
Für eine statistische Betrachtung wurde die Einstufung aller Immunreaktion (0-4) für die drei Gewebearten jeweils aufsummiert. Dies ergab jeweils Werte zwischen 0 und 12. Anschließend wurden diese Summenwerte über die 12 Immunreaktionen gemittelt (Abb. 85).



**Abb. 85:** Box-Plot zur Darstellung der mittleren Summenwerte aller 19 Patienten.

### 3.7.1 Vergleich Geschlecht (Wilcoxon-Rangsummentest)

Die mittleren Summenwerte wurden getrennt nach Geschlecht über Boxplots dargestellt, und mittels Wilcoxon-Rangsummentest verglichen (Abb. 86).

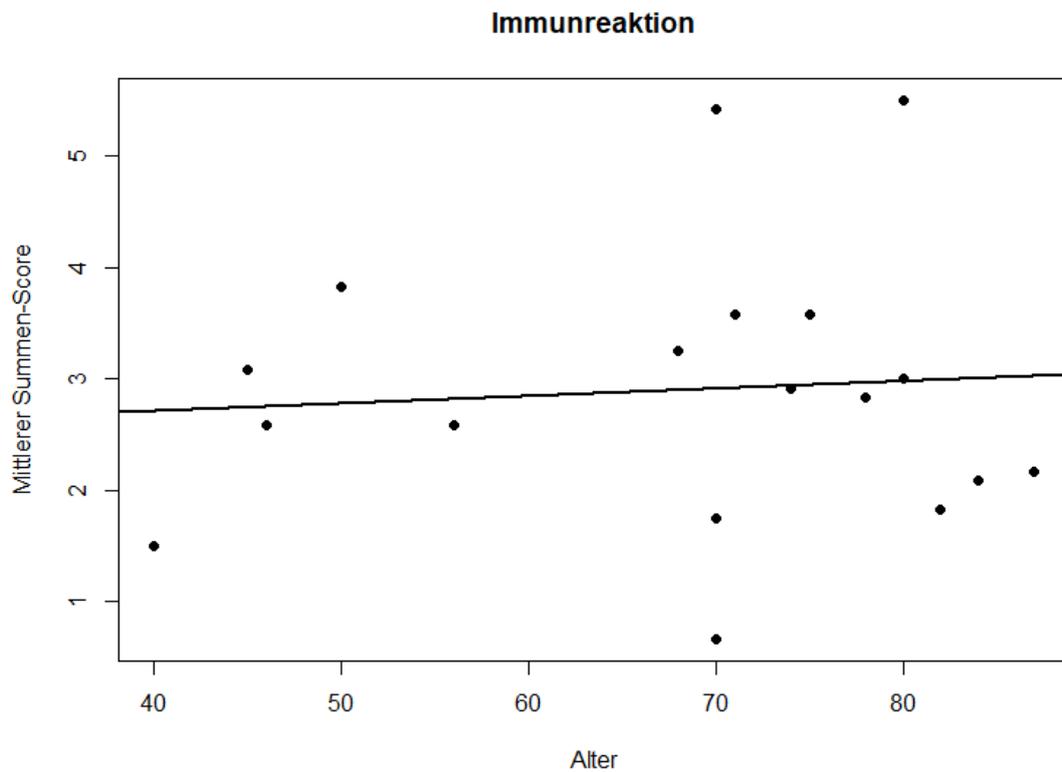


**Abb. 86:** Darstellung des mittleren Summenwertes getrennt nach Geschlechtern durch Boxplots und Vergleich mittels Wilcoxon-Rangsummentests.

Der p-Wert ( $p=0.7896$ ) basiert auf dem Wilcoxon-Rangsummentest.

### 3.7.2 Vergleich Alter (Regressionsmodell)

Um die Assoziation der mittleren Summenwerte zum Alter zu untersuchen wurde eine Scatterplot erstellt und ein univariates lineares Modell berechnet (durchgezogene Linie) (Abb. 87).

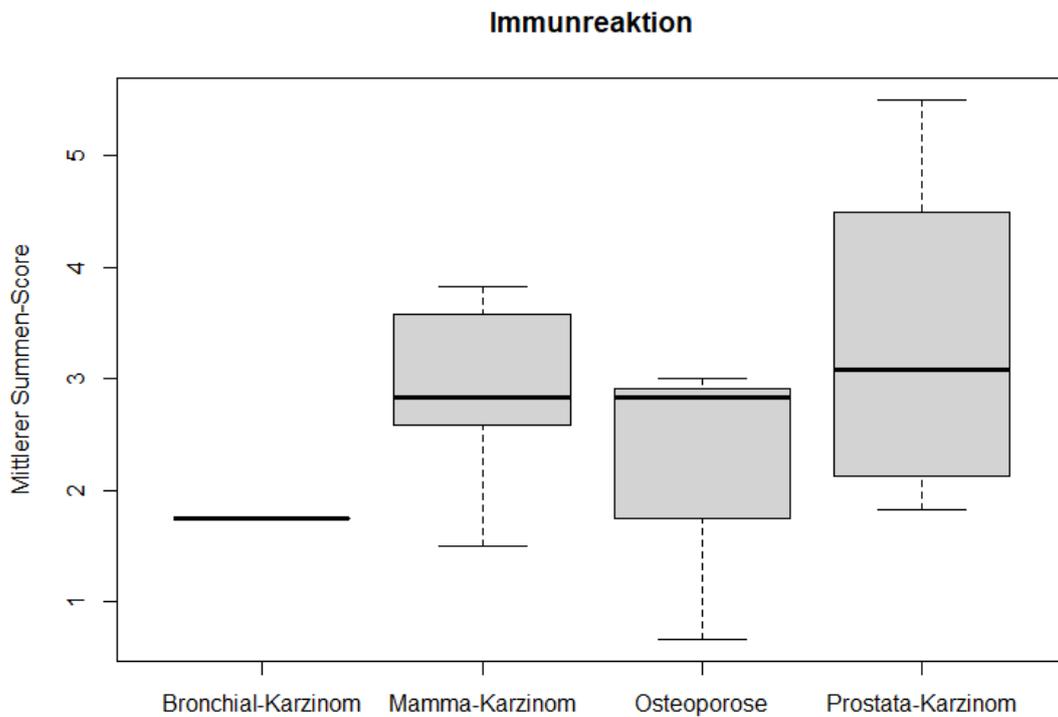


**Abb. 87:** Darstellung des mittleren Summenwertes und des Alters mittels Scatterplot und Berechnung eines univariaten linearen Regressionsmodells (durchgezogene Linie).

Der p-Wert ( $p=0.756$ ) basiert auf einem univariaten linearen Regressionsmodell.

### 3.7.3 Vergleich Grunderkrankung (Varianzanalyse)

Die mittleren Summenwerte wurden außerdem getrennt nach Grunderkrankung über Boxplots dargestellt und mittels einfaktorieller Varianzanalyse verglichen (Abb. 88).



**Abb. 88:** Darstellung des mittleren Summenwertes getrennt nach Grunderkrankungen über Boxplots und Vergleich mittels einfaktorieller Varianzanalyse.

Der p-Wert ( $p=0.427$ ) basiert auf einer einfaktoriellen Varianzanalyse.

In keinem Fall ergab sich eine relevante Signifikanz von  $p \leq 0,05$ .

Somit konnte weder ein Einfluss des Geschlechts, des Alters oder einer Grunderkrankung auf die untersuchten Variablen statistisch belegt werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Histopathologie und Histochemie

Die Kieferknochenpräparate der gesunden Vergleichspatienten zeigten regelrechte, histologische Strukturen (Monje et al., 2015). Es waren kompakte und spongiöse Knochenareale vorhanden, mit Osteonen, in die Knochenmatrix eingebetteten Osteozyten sowie Osteoblasten und Osteoklasten.

Die histologische Untersuchung der Präparate der Denosumabgruppe zeigte nekrotischen, avaskulären, demineralisierten Knochen mit erodierten Oberflächen, fibrosierten Knochenmarksräumen und resorbierten Haver'schen Kanälen auf der einen Seite, aber auch Areale die vital und zellreich erschienen. Dies deckt sich mit Beobachtungen Matsushitas et al. in deren Studie Denosumab-assoziierte Osteonekrosen anhand zweier Patientenfälle untersucht wurden. Sie beschrieben neben Sequestern ohne lebende Zellen und Granulationsgewebe auch vitale Knochenareale (Matsushita et al., 2015). Die Literaturbeschreibungen Bisphosphonat-assoziiierter Osteonekrosen weisen ebenfalls komplett avitales Knochengewebe mit optisch leeren Osteozytenlakunen und anresorbierten Knochenrändern auf der einen Seite und gemischt nekrotisch-vitale Areale mit vitalen Zellen auf der anderen Seite auf (Cho et al., 2012). Die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose geht laut Literatur aber zusätzlich mit verdickten, sklerotische Knochen trabekeln und verkleinerten Osteonen einher, deren Kontakt zum Knochenmark unterbrochen scheint. (Paparella et al., 2011; Mitsimponas et al., 2013). Dies ist eine Beobachtung, die in dieser Studie nicht gemacht werden konnte und sich mit einer Mitteilung von Baron et al. deckt, laut derer Denosumab keine Veränderung der trabekulären Knochenstruktur hervorruft (Baron et al., 2011).

Dieser Effekt könnte auf den unterschiedlichen Wirkmechanismen beider Medikamente beruhen. Während der Antikörper Denosumab ein lösliches Protein ist, das im gesamten Extrazellulärraum zirkuliert, ohne eine übermäßige Bindung an der Knochenoberfläche einzugehen, und sich aus diesem Grund gleichmäßiger in der Knochenarchitektur verteilen kann, werden Bisphosphonate von Osteoklasten internalisiert und entfalten ihre Wirkung intrazellulär (Baron et al., 2011).

Eine weitere Beobachtung der vorliegenden Studie stellten reaktive Geflechtknochenneubildungen in den Präparaten der Patientenbiopsien E20605/15 und E2082/16 dar, die jedoch im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen keine Immunreaktion zeigten. Diese proliferativen ossären Veränderungen wurden bisher im Zusammenhang mit Denosumab-assoziierten Osteonekrosen noch nicht beschrieben, für Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrosen hingegen schon (Marx et al., 2012; Koerdt et al., 2014; Cardemil et al., 2015). Ursächlich könnte hierfür eine Stimulation der Osteogenese mit einer ausbleibenden Knochenresorption sein (Favia et al. 2009; Shuster et al., 2019). Jedoch scheinen entzündliche Prozesse, Traumata, Fremdkörper und Ischämien auch denkbare Auslöser für dieses Phänomens zu sein (Herget et al, 2008).

In dieser Studie wiesen viele Präparate mehrschichtiges Epithel mit Retezapfen und Weichgewebe auf, in welchem sich Infiltrate mit neutrophilen Granulozyten, Plasmazellen und Lymphozyten befanden. Das gehäufte Vorkommen von Infiltraten ist eine Beobachtung, die sich mit den Literaturergebnissen für Denosumab-assoziierte Osteonekrosen (Matsushita et al., 2015) sowie derer für Bisphosphonat-assoziierte deckt (Weinstein et al., 2009; Cho et al. 2012). Da Osteonekrosen in Zusammenhang mit Extraktionen von Zähnen auftraten, die Parodontopathien aufwiesen (Ruggiero et al., 2014; Soutome, 2018), ist die beobachtete entzündliche Veränderung der Gingiva erwartbar gewesen. Im Präparat der Patientenbiopsie E7104/16 dieser Studie konnte eine im Weichgewebe befindliche ektopische Kalzifizierung beobachtet werden. Dieser Befund wurde im Zusammenhang mit Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen in der Literatur noch nicht beschrieben. Ursächlich für die Ossifikation im Weichgewebe könnten entweder intraoperativ versprengte Knochenmarkszellen sein oder im Bindegewebe lokalisierte mesenchymale pluripotente Knochenvorläuferzellen, die durch einen Stimulus des Knochenmarks zu Osteoblasten differenzierten (Kölbl et al., 2003). Im Präparat der Patientenbiopsie E3781/16 konnte eine knochenferne, mehrkernige Riesenzelle beobachtet werden, die in weiteren Färbungen und immunhistochemischen Untersuchungen keine Auffälligkeiten zeigte. Die beobachtete Riesenzelle ist jedoch nicht mit denen in der Literatur oft beschriebenen großen mehrkernigen Osteoklasten von Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen zu verwechseln (Weinstein et al., 2009; Gross et al., 2017). Diese liegen zwar auch entfernt von der Knochenoberfläche vor, können jedoch bis zu 20 Nuclei aufweisen (Cho et al., 2012) und sind kleiner als die Riesenzelle dieser Studie. Da sowohl die ektopische Kalzifizierung als

auch die Riesenzelle jeweils einmalige Beobachtungen bei je einem Patientenbiopsat dieser Studie waren, müssen sie nicht typisch für Denosumab-assoziierte oder Bisphosphonatassoziierte Osteonekrosen sein.

Die Osteoklasten der vorliegenden Untersuchung besaßen selten mehr als zwei bis drei Nuclei und erweckten teilweise einen unreifen histologischen Eindruck.

Eine Hypothese zur Entstehung von vergrößerten Osteoklasten unter Bisphosphonat-Therapie könnte die Hemmung eines Guanosintriphosphat-bindenden Proteins sein, welches die Ausbildung des ruffled borders an der Knochenoberfläche von Osteoklasten induziert (Franco-Preto et al., 2014). Dieser mit Mikrovilli besetzte Zellmembranabschnitt wird benötigt, um der Knochenoberfläche aufzuliegen und ist somit essentiell für die Knochenresorption. Den in der Literatur beschriebenen Osteoklasten scheint die resorbierende Eigenschaft zu fehlen, stattdessen fusionieren sie mit Makrophagen und akkumulieren auf diese Weise zahlreiche weitere Nuclei (Cho et al., 2012).

Die Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) ergab in den Vergleichspräparaten keine färblichen Unterschiede zu der oben beschriebenen Färbung, jedoch in der PAS-Positivität.

47 % der Präparate der Denosumabgruppe zeigten bakterielle Besiedlungen, die stark PAS-positiv reagierten. In den Bakterienrasen waren magentafarbene, fadenförmige Strukturen erkennbar, bei denen es sich wahrscheinlich um Aktinomyzeten handelte. Die Zellwand dieses Bakteriums besitzt keine äußere Membran, sondern besteht aus mehrschichtigen Peptidoglykanen (Mureinen) (Dworkin et al., 2006), die durch die PAS-Reaktion intensiv angefärbt wurden. Aktinomyzeten sind fakultativ bis obligat anaerobe Mikroorganismen, gehören zur physiologischen Mundflora des Menschen und können nur über Verletzungen und Begleitkeime in tiefere Gewebsschichten eindringen (Schaal et al., 2006), zum Beispiel in Folge von chirurgischen Eingriffen wie Zahnextraktionen oder auch Verletzungen der Mundschleimhaut durch insuffizienten Zahnersatz. Diese Bakterien persistieren lange im Weichgewebe und lösen oftmals chronische Entzündungen aus (Könönen et al., 2015). Aktinomyzeten werden sehr häufig in Knochenbiopsien von sowohl Denosumab-assoziierten Osteonekrosen als auch Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen und anderen Medikamenten-assoziierten Osteonekrosen festgestellt (Almazrooa et al., 2009; Schipmann et al., 2013; Ruggiero et al., 2014; Katsarelis et al., 2015; Russmueller et al., 2016; Yoshimura et al., 2017). Koerdt et al. untersuchten 23 Patienten, die

eine Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose ausgebildet hatten. Bei 18 Patienten konnten Aktinomyzeten nachgewiesen werden (Koerdt et al., 2014).

Welche Rolle die bakterielle Besiedlung des Knochens in der Entwicklung einer Medikamenten-assoziierten Osteonekrose spielt, ist immer noch ungeklärt (Allen und Burr, 2009; Ceulaer et al., 2014; Yoshimura et al., 2017), jedoch wird der Einfluss nach aktuellster Literatur als groß eingeschätzt (Wolff et al., 2019).

Die Trichromfärbung nach Masson-Goldner gilt als eine Standardfärbung der Zahn- und Knochenmorphometrie, da neben einer guten Zellfärbung mineralisierte und nicht-mineralisierte Knochenmatrix klar unterschieden werden können (Bancroft et al., 2008).

Der Knochen der Vergleichspräparate zeigte ein gesundes Verhältnis zwischen mineralisierten und nicht-mineralisierter Knochen. Die Präparate der Biospien der Denosumabpatienten wiesen sowohl grüne, äußere, nicht-mineralisierte Areale als auch rote, innere, mineralisierte Areale auf. Vermutlich handelt es sich bei den grünen Zonen nicht um von Osteoblasten synthetisiertes Osteoid (Boyce et al., 2013), sondern um Entmineralisierungen bedingt durch ossäre Metastasen. In der Literatur finden sich für diese Färbung im Zusammenhang mit Denosumab-assoziierten Osteonekrosen keine Angaben.

Nur die Studie Stürmers befasste sich mit der Trichromfärbung nach Masson-Goldner an Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen. Sie beobachtete wenig Osteoid und viel reife, mineralisierte Knochenmatrix. Stürmer postulierte, dass Bisphosphonate keinen Einfluss auf die Osteoidsynthese hätten (Stürmer, 2013). Dies scheint jedoch nicht für alle Bisphosphonatpräparate zu gelten. Während Bisphosphonate der ersten Generation scheinbar keinen Einfluss auf die Proliferation und sogar eine hemmende Wirkung auf die Differenzierung von Osteoblasten haben, wird bei Präparaten der dritten Generation eine starke Wirkung auf die Proliferation und die Differenzierung der Osteoblasten vermutet (Vassiliadou, 2003).

#### **4.1.1 TRAP-Färbung**

Osteoklasten werden durch eine hohe Syntheserate an Tatratreisistenter saurer Phosphatase (TRAP) charakterisiert, weshalb diese als zytochemischer Marker für Osteoklasten und deren Vorläuferzellen verwendet wird (Park et al., 2011).

Die Osteoklasten der gesunden Vergleichspräparate reagierten schwach TRAP-positiv. 14 Präparate der Denosumabgruppe zeigten eine TRAP-positive Immunreaktion, sieben wiesen eine sehr starke Reaktion auf. Besonders auffallend waren die Präparate der Patientenbiopsien E14168/16 und E8299/16. Hier waren zahlreiche Osteoklasten vorhanden, deren Färbung sehr intensiv war. Dieser Effekt könnte eventuell darauf beruhen, dass diese Patienten wegen Osteoporose therapiert wurden und nicht wegen einer tumorösen Erkrankung. Möglicherweise sind die Osteoklasten und Makrophagen in diesen Fällen aktiver, da sie ansonsten das Isoenzym TRAP womöglich nicht sezernieren würden (Hayman, 2008).

Weiterhin auffallend war, dass viele TRAP-positive Zellen keinen direkten Kontakt zum Knochen aufwiesen, sondern in unmittelbarer Nähe lokalisiert waren. Es könnte sich um knochenresorptionsunfähige Makrophagen handeln. Jedoch muss erwähnt werden, dass diese Befunde auch Artefakte sein könnten, die im Rahmen der Biopsieentnahme entstanden sind. In diesem Zusammenhang muss angemerkt werden, dass Stürmer in ihrer Studie an Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen diese Beobachtung ebenfalls machte (Stürmer, 2013).

Gross et al. untersuchten Knochenbiopsien von Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen und verglichen die Ergebnisse mit denen von Osteoradionekrosen und Osteomyelitiden. Sie fanden heraus, dass die Osteoklasten der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen und Osteoradionekrosen weniger TRAP exprimierten als die der Gruppe der Osteomyelitiden, was eine verminderte Knochenresorptionsfähigkeit dieser Osteoklasten vermuten lässt (Gross et al., 2017).

## **4.2 Immunhistochemie**

Die alkalische Phosphatase wird in der Initialphase der Osteoidsynthese von aktiven Osteoblasten synthetisiert. Ihr Nachweis dient unter anderem der Darstellung der Osteoblastenaktivität und ist ein Indikator für Veränderungen des Knochenstoffwechsels. Jedoch ist sie nicht rein knochenspezifisch, da sie physiologisch in verschiedenen Strukturen des Körpers vorkommt (Wang et al., 2018).

In den Vergleichspräparaten zeigten Osteoblasten, lining cells und Osteozyten eine positive Immunreaktion.

In der Denosumabgruppe fiel die Immunreaktion für das Enzym alkalische Phosphatase schwach aus. In den Präparaten der Patientenbiopsien E 7104/16, E7014/16, E3781/16 und E8299/16 zeigten Osteoblasten, Fibroblasten, Osteozyten Epithel- und Endothelzellen eine schwache Immunreaktion. Diese Beobachtung war zu erwarten, da das Vorkommen alkalischer Phosphatase in all diesen Zelltypen physiologisch ist (Wang et al., 2018). Im Vergleich beschreibt Stürmer eine stärkere Immunreaktion auf den Marker der alkalischen Phosphatase (Stürmer 2013), was ein Hinweis auf ein erhöhtes Vorkommen der alkalischen Phosphatase unter Bisphosphonattherapie sein könnte. Diese Beobachtung wurde unter anderen in einer klinischen Studie gemacht, in der Patienten zwei Jahre mit Bisphosphonaten therapiert wurden und deren Serumparameter für alkalische Phosphatase über 30 % anstiegen (Xu et al., 2016).

Mosch et al. untersuchte den Effekt Denosumabs auf mesenchymale Stammzellen und fanden heraus, dass niedrige Konzentrationen des Medikamentes mit einer Zunahme der alkalischen Phosphatase sowie einer Zunahme der Stammzellproliferation, eine erhöhte Konzentration Denosumabs jedoch mit einer Abnahme der alkalischen Phosphatase und Proliferation der Stammzellen einhergingen. (Mosch et al., 2019). Der Vergleich der Ergebnisse beider Studien mit histopathologischen Befunden ist schwierig.

Osteokalzin ist Bestandteil der extrazellulären nicht-kollagenen Matrix des Knochens und gilt als spezifischer Marker ausdifferenzierter Osteoblasten (Lee et al., 2007).

In der vorliegenden Studie reagierten die meisten Osteoblasten, lining cells und Osteozyten Osteokalzin-positiv. Diejenigen dieser Zellen, die keine Immunreaktion zeigten, befanden sich vermutlich in einem Entwicklungsstadium, welches durch Osteokalzin nicht markiert wird (Stürmer, 2013). In den Präparaten der Patientenbiopsien E765/17 und E14168/16 reagierten Osteoklasten Osteokalzin-positiv, ein Phänomen, das in der Literatur bereits beschrieben wurde (Ivaska et al., 2004; Stürmer, 2013). Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Anreicherung des aufgenommenen Osteokalzins in das Zytoplasma der Osteoklasten (Ivaska et al., 2004).

In einer Langzeitstudie wurden Primaten 16 Monate mit Denosumab behandelt. Hier wurden extrem verringerte Werte der alkalischen Phosphatase und des Osteokalzins im Serum beschrieben, was zu einer vollkommenen Abwesenheit von Osteoklasten führte. Die

mit Bisphosphonaten therapierte Vergleichsgruppe der Langzeitstudie hingegen, zeigte keine Veränderung der Osteoklasten (Baron et al., 2011). Hier könnte die Blockade RANKL's durch Denosumab und die daraus resultierende Beeinflussung der Differenzierung und Funktion von Osteoklasten ursächlich sein.

Sánchez et al. untersuchten im Rahmen ihrer Studie den Einfluss einer einjährigen Denosumabtherapie auf den Knochenstoffwechsel und beobachteten ebenfalls einen signifikante Verringerung der alkalischen Phosphatase und des Osteokalzins im Serum (Sánchez et al., 2016). Jedoch ist der Vergleich zwischen Serumparametern und histopathologischen Befunden problematisch.

Eine Studie zur Untersuchung der Wirkung von Bisphosphonaten auf die Knochendichte von postmenopausalen Frauen mit Osteoporose postulierte ebenfalls einen Abfall der alkalischen Phosphatase und des Osteokalzins im Serum. Eine Erklärung könnte die anti-resorptive Wirkung von Bisphosphonaten sein, die in einer Hemmung des Remodelings resultiert (Lieblich, 2004).

Die Hauptfunktion BMP2's ist die Stimulation mesenchymaler Stammzellen, welche sich daraufhin entweder zu Chondrozyten oder Präosteoblasten weiterentwickeln (Xiao et al., 2007). In den gesunden Vergleichspräparaten zeigten Fibroblasten, Osteoblasten, lining cells und Osteozyten eine schwache Immunreaktion. In der Denosumabgruppe reagierten manche Osteoblasten, lining cells und Osteozyten BMP2-positiv, sowie Endothelzellen und extrazelluläre Matrix. Auffällig waren einige BMP2-positive Osteoklasten im Präparat der Patientenbiopsie E8299/16. Wie zuvor bereits beschrieben, zeigten die Osteoklasten dieser Biopsie zudem eine starke TRAP-positive Färbung. Die 80-jährige Patientin (E8299/16) litt an Osteoporose und wurde identisch medikamentös behandelt (XGEVA® 120 / alle 4 Wochen) wie der Großteil der anderen Patienten dieser Studie. In der Literatur finden sich keine vergleichbaren Fälle, sodass diese histologische Beobachtung nochmals überprüft werden sollte.

Eine immunhistochemische Untersuchung BMP2's an Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen führte Stürmer durch, die ebenfalls einige BMP2-positive Osteoblasten, lining cells und Osteoblastenvorläuferzellen beobachtete, jedoch keine Osteoklasten (Stürmer, 2013).

Laut der Literatur bewirkt eine Hemmung RANKL's eine erhöhte Wirksamkeit von BMP2 (Bougioukli et al., 2016), was bedeuten würde, dass Denosumab einen positiven Einfluss auf die Osteoblastendifferenzierung haben müsste.

In Studien wurde belegt, dass Bisphosphonate zwar zu einem Anstieg des BMP2's im Serum führten (von Knoch et al., 2005), dies jedoch die Differenzierung der Osteoblasten nur initial anregte und nicht grundsätzlich steigerte (Wehrhan et al., 2011).

RUNX2 gilt als Haupttranskriptionsfaktor der frühen Osteoblastendifferenzierung, ist jedoch in einem späteren Stadium für Osteoblasten nicht mehr essentiell. Für die terminale Differenzierung von Osteoblasten zu Osteozyten muss dieser sogar unterdrückt werden (Liu und Lee, 2013). Die Immunreaktion erfolgte sowohl in den Präparaten der gesunden Patienten als auch in der Gruppe der mit Denosumab behandelten Patienten schwach. Es war nur eine dezente Färbung von einigen lining cells, wenigen Osteoblasten und deren Vorläuferzellen erkennbar. Andere Strukturen wurden nicht angefärbt. Dieses Ergebnis könnte auf der Tatsache beruhen, dass RUNX2 von Präosteoblasten zur Knochenneubildung exprimiert und von reifen Osteoblasten supprimiert wird (Liu und Lee, 2013). Außerdem wird die Expression von RUNX2 durch BMP2 reguliert (Jang et al., 2012), und da die BMP2 Immunreaktion schwach ausfiel, war zu vermuten, dass die des RUNX2 Faktors ebenfalls schwach sein würde.

Eine immunhistochemische Untersuchung RUNX2's an Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen führte Stürmer durch. Sie beschrieb eine starke Immunreaktion und beobachtete RUNX2-positive Osteoblasten und Osteozyten.

Rezende et al. untersuchten in ihrer Studie den Effekt von Bisphosphonaten auf die Osteogenese junger Ratten und wiesen eine Abnahme der RUNX2-Expression nach (Rezende et al., 2017).

Welchen direkten Einfluss Denosumab auf Osteoblasten hat, ist noch nicht eindeutig geklärt.

Osteoklasten üben zwar über verschiedene Faktoren wie IGF (insulin-like-growth factor), TGF  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) und BMP einen stimulierenden Einfluss auf Osteoblasten aus, aber ob die Hemmung der Osteoklastenvorläuferzellen wirklich zu einer Verminderung der Osteoblastenaktivität führt, ist unklar (Baron et al., 2011; Sims und Wah,

2014). Denkbar wäre eine zumindest temporäre Steigerung der Aktivität, da Denosumab zu einer Verbesserung der Knochendichte führt (Sánchez et al., 2016) und dies nicht ohne eine positive Beeinflussung des Osteoblastenstoffwechsels möglich ist (Merck, 2010). Jedoch scheint Zusammenhang zwischen der Höhe der Denosumabkonzentration und dem Einfluss auf die Proliferation mesenchymaler Stammzellen zu bestehen. Eine Studie zeigte, dass hohe Denosumabkonzentration die Proliferation mesenchymaler Stammzellen hemmen, während eine niedrige Konzentration die Stammzellproliferation förderte (Mosch et al., 2019).

Das Protein RANKL ist essentiell für die Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten (Fujiwara et al., 2016) und wesentlich am Remodeling des Knochens beteiligt. Wenn RANKL gehemmt wird, wie es bei Denosumab der Fall ist, wird die osteoblastenabhängige Osteoklastogenese unterbrochen und unter anderem die Aktivität der Osteoklasten vermindert (Baron et al., 2011)

In den Präparaten der gesunden Patienten war nur eine schwache Immunreaktion einiger lining cells, Osteoblasten und Osteoklasten zu beobachten. In der Denosumabgruppe reagierten nur die Präparate der Patienten E12139/16, E12955/16 und E3781/16. Eine stärkere RANKL-positive Immunreaktion zeigten Fibroblasten, wohin gegen Osteoblasten, lining cells, Osteoklasten und Osteozyten nur schwächer reagierten. Zusätzlich wurden Gefäßendothelien intensiv angefärbt.

Poubel et al. fanden in ihrer Studie eine unveränderte RANKL-Expression, nachdem sie Ratten eine Woche lang jeweils Denosumab und Bisphosphonate verabreicht hatten und daraufhin Biopsien der Mandibularknochen immunhistochemisch untersuchten (Poubel et al., 2018). Die Literaturangaben bezüglich Bisphosphonat-assoziiertes Osteonrekoen und der Expression RANKL's sind widersprüchlich. Während Wehrhan et al. in ihrer Studie eine Hemmung der RANKL-Expression unter Bisphosphonat-Therapie (Wehrhan et al., 2017) beobachteten, fanden Kim et al. eine signifikante Steigerung (Kim et al., 2019). Di Nisio et al. beschrieben zwar einen Anstieg RANKL's in der Genexpression, führen dies jedoch nicht auf die Wirkung von Bisphosphonaten zurück, sondern auf den Einfluss der Lipopolysaccharide in der Zellmembran des Bakteriums *Aggregatibacter Actinomyces comitans* (Di Nisio et al., 2015).

Das Protein Osteoprotegerin (OPG) wird von Osteoblasten sezerniert und dient unter anderem der Osteoklastendifferenzierung (Baron et al., 2011). Das Gleichgewicht zwischen OPG und RANKL bestimmt den Grad der Proliferation und Aktivität der Osteoklasten (Theolyre et al., 2004). In den gesunden Vergleichspräparaten reagierten lining cells und Osteoblasten OPG-positiv. In der Denosumabgruppe erfolgte nur bei den Präparaten der Patientenbiospien E8299/16, E3781/16, E12139/16, E7636/16 und E2517/17 eine Immunreaktion. Osteozyten, Osteoblasten in Knochennähe, lining cells und vereinzelt Osteoblastenvorläuferzellen reagierten OPG-positiv. In der Literatur werden erhöhte OPG Werte im Serum bei Prostatakarzinompatienten beschrieben (Narayanam, 2013). In dieser Studie waren die Präparate der Patientenbiospien E12139/16, E7636/16 und E2517/17, die wegen eines Prostatakarzinoms therapiert wurden, stärker OPG-positiv. Dies stellt zwar eine interessante Beobachtung dar, jedoch ist der Zusammenhang zwischen Serumwerten und immunhistochemische Untersuchungen schwer zu beurteilen. Miyazaki et al. beobachteten in ihrer histopathologischen Studie an Mäusen eine erhöhte OPG-Expression nach Denosumab-Therapie (Miyazaki et al., 2014).

Die Literaturangaben bezüglich des Einflusses von Bisphosphonaten auf OPG-Werte sind widersprüchlich. Während Koch et al. eine erhöhte OPG-Expression von Osteoblasten unter Einwirkung von Bisphosphonaten *in vitro* beschreiben (Koch et al., 2011), wurden in anderen Studien sowohl *in vivo* (Gulseren et al., 2011) als auch *in vitro* (Lin et al., 2007) keine signifikanten Unterschiede zwischen der OPG-Sekretion von gesunden und mit Bisphosphonaten therapierten Patienten gefunden.

Aktuellere Literatur hingegen zeigte eine Reduktion des Serum OPG-Wertes unter Bisphosphonat-Therapie (Rezende et al., 2017).

Der Transmembranrezeptor RANK befindet sich auf der Oberfläche von Prä-Osteoklasten und dient als Ligand für RANKL (Boyce and Xing, 2008). Diese Interaktion führt zu Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung und somit zur Knochenresorption (Geusens, 2012).

Die Immunreaktion in den gesunden Vergleichspräparaten fiel einheitlich stark aus. Während Osteoblasten und lining cells intensiv angefärbt wurden, zeigten die extrazelluläre Matrix und Fibroblasten eine leichte Reaktion, während Osteoklasten nicht reagierten.

In der Denosumabgruppe zeigten die Präparate der Patientenbiopsien E12955/16, E7636/16, E8299/16, E12139/16, E14168/16, E765/17, E2517/17, E7194/16 eine intensive Immunreaktion. Anfärbt wurden Osteoblasten, lining cells und Osteozyten. RANK-positive Osteoklasten zeigten die Präparate der Patientenbiopsien E7636, E12139/16 und E14168/16. Fibroblasten und Gefäßwände wurden schwach anfärbt.

Für eine immunhistochemische Untersuchung der RANK-Expression unter Denosumab-Therapie sowie Bisphosphonat-Therapie fanden sich in der Literatur keine Hinweise.

Kimachi et al. untersuchten in ihrer Studie die Wirkung von Bisphosphonaten auf die Migration von Osteoklastenvorläuferzellen während der Osteoklastogenese. Sie beobachteten eine inhibierte RANK-Expression (Kimachi et al., 2011). Di Nisio et al. hingegen beschrieben einen Anstieg des RANK-Wertes in einer Genanalyse von Patienten mit Bisphosphonat-assoziiierter Osteonekrose (Di Nisio et al., 2015).

Cathepsin K ist eine Zysteinprotease, die von Osteoklasten exprimiert wird und im Rahmen der Knochenresorption Kollagen Typ I proteolytisch abbaut (Drake et al., 2017).

In den gesunden Vergleichspräparaten reagierten Osteoklasten, lining cells und Fibroblasten schwach Cathepsin K-positiv. In der Denosumabgruppe zeigten die Präparate der Patientenbiopsien E15632/14, E7636/16, E15526/15, E2282/16, E12139/16, E7014/16 und E2517/17 eine positive Immunreaktion. Auffallend war, dass diese Cathepsin K-positiven Osteoklasten selten mehr als zwei Nuclei aufwiesen und dass bis auf Patientenbiopsie E15632/14 alle Patienten wegen eines Prostatakarzinoms therapiert wurden. Außerdem war ungewöhnlich, dass die Präparate der Patientenbiopsien E8299/16 und E14168/16 viele Osteoklasten erkennen ließen, eine positive Immunreaktion auf Cathepsin K aber ausblieb. Interessanterweise reagierten die Osteoklasten dieser beiden Präparate jedoch sehr stark TRAP-positiv. Das Ausbleiben einer Cathepsin K-positiven Reaktion könnte ein Hinweis auf eine fehlende knochenresorbierende Funktion dieser Osteoklasten sein. Matsushita et al. (2016) untersuchten Knochenbiopsate von zwei mit Denosumab therapierten Patienten histologisch und immunhistochemisch (Cathepsin K) und stellten fest, dass die geringe Anzahl von Osteoklasten, die vorhanden waren, unabhängig von der Nähe zum Knochen, nur wenige Nuclei aufwiesen und einen unreifen histologischen Eindruck erweckten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, da die Osteoklasten auch hier wenige Zellkerne aufwiesen und verhältnismäßig klein

erschienen. Das Fehlen jeglicher Osteoklasten unter Denosumabtherapie beschrieben Miller et al. (Miller et al.; 2008) und Baron et al. (Baron et al.; 2011). Widersprüchlich sind die Literaturangaben zur Apoptose von Osteoklasten unter Denosumab-Einfluss. Auf der einen Seite vermuteten Boyce et al., Denosumab würde eine Apoptose der Osteoklasten induzieren (Boyce et al., 2013), auf der anderen Seite postulierten Hoefert et al., dass Denosumab keine Apoptose in Makrophagen, den Vorläuferzellen der Osteoklasten, auslösen würde (Hoefert et al., 2015).

Kaibuchi et al. untersuchten in ihrer Studie Knochenpräparate unter Bisphosphonat-Therapie und beobachteten von der Knochenoberfläche gelöste, mehrkernige Zellen, die Cathepsin K-positiv reagierten (Kaibuchi et al., 2019) Nagaoka et al zeigten eine gehemmte Cathepsin K-Expression unter Einfluss von Bisphosphonaten (Nagaoka et al., 2015).

Eine Studie aus dem Jahre 2011 untersuchte die Wirkung von Bisphosphonaten auf Osteoklasten und zeigte, dass ihre Anzahl erhöht und ihre Funktionsfähigkeit eingeschränkt war (Ralte et al., 2011). Weinstein et al. wiesen ebenfalls eine gestörte Knochenresorption der Osteoklasten unter Bisphosphonat-Einfluss nach, jedoch eine unveränderte Anzahl und zudem eine veränderte Morphologie (Weinstein et al., 2009).

Die Matrix-Metallo-Protease 8 (MMP8) ist eine Kollagenase, die am Abbau von Fasern extrazellulärer Matrix des Parodonts und Krankheitsprozessen wie Arthritis und Metastasen beteiligt ist. Sie ist ein Marker für akute und chronische entzündliche Geschehen (Van Lint et al., 2006), beispielsweise Parodontitis und Periimplantitis (Kasuma et al., 2018).

In den gesunden Vergleichspräparaten zeigten lining cells, Osteoblasten, Osteozyten, Fibroblasten, extrazellulärer Matrix und Gefäßwände eine schwache Immunreaktion. In der Denosumabgruppe war die Immunreaktion in den Präparaten nahezu ausschließlich stark. Es wurden Osteozyten, lining cells, Osteoblasten, Gefäßwände und neutrophile Granulozyten angefärbt. Bis auf das Stratum superficiale war in tieferen Schichten des Epithels eine Immunreaktion erkennbar, eine Beobachtung, die in der Literatur zuvor noch nicht beschrieben wurde. Es konnten keine Literaturstellen, die sich mit MMP8 und Denosumab-assoziierten Osteonekrosen oder Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen befassten, gefunden werden.

Mukaihara et al. untersuchten die Matrix-Metallo-Protease 9 (MMP 9) unter Denosumab-Einfluss histochemisch und beobachteten eine erhöhte Expression insbesondere in Bindegewebszellen (Mukaihara et al., 2016).

Allam et al. untersuchten in ihrer Studie Biopsien von Hunden unter Bisphosphonat-Therapie. Sie beobachteten in ihrer immunhistochemischen Untersuchung hingegen eine verminderte Expression MMP9's und wiesen eine apoptotische Wirkung von Bisphosphonaten auf epitheliale Zellen nach (Allam et al., 2011). Weitere Studien haben belegt, dass Bisphosphonate einen inhiierenden Effekt auf verschiedene Matrix-Metallo-Proteasen haben können (Nakaya et al., 2000; Stamenkovic 2003), die Tumorzellen das Eindringen in umliegendes Gewebe erleichtern (Pfammatter et al., 2011).

Antiresorptiva scheinen einen unterschiedlich starken Einfluss auf Zellen der Gingiva, wie Fibroblasten, Keratinozyten und Gefäßzellen, zu haben. Ein Zusammenhang zwischen Entzündungen in diesem Bereich und dem Entstehen von Kieferosteonekrosen scheint mit großer Wahrscheinlichkeit zu bestehen (Wolff et al., 2019).

#### **4.2.1 Gefäße**

Der Antikörper gegen den von Endothelzellen und Megakarozyten gebildeten Von-Willebrand-Faktors (vWF) wird in der Immunhistochemie zur selektiven Anfärbung von Gefäßen und ihrer Quantifizierung verwendet (Matos et al., 2011).

In den gesunden Vergleichspräparaten wurden alle Gefäßwände und Endothelzellen stark angefärbt.

In der untersuchten Denosumabgruppe zeigten 13 Präparate eine Immunreaktion, von denen der Patientenbiopsien E7104/16, E3781/18, E7636/16 und E14168/16 stärker ausfiel. Insbesondere im entzündlichen Gewebe waren die Endothelzellen der Blutgefäße intensiv gefärbt sowie Gefäße in Haver'schen Kanälen vitaler Areale. Baud'huin et al. wiesen in ihrer Arbeit nach, dass vWF an RANKL bindet und dadurch die Osteoklastogenese hemmt (Baud'huin et al., 2009). Dies könnte eine Erklärung für die in der vorliegenden Studie beobachtete, starke vWF-positive Immunreaktion sein, da RANKL bereits durch Denosumab blockiert wäre und dementsprechend vermehrt im Blut zirkulieren könnte.

Allen und Burr befassten sich mit der Pathogenese von Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen. Sie postulierten eine Abhängigkeit des Blutvolumens zur metabolischen Aktivität des Knochens. Sie vermuteten, dass Bisphosphonate zu einem verminderten Remodeling des Knochens führen, was in einer veränderten Gefäßarchitektur und einem geringeren Blutvolumen resultieren würde. Da Osteoblastenvorläuferzellen sich in Knochengefäßwänden befinden, führe dies zu einer Reduktion der Osteoblastenzahl und einer zusätzlichen Beeinträchtigung der Regenerationsfähigkeit des Knochens (Allen und Burr, 2009).

Stantan und Balsanian beschrieben in ihrer Studie keine Veränderung der Gefäßdichte, jedoch eine Verringerung des Gefäßdurchmessers unter Bisphosphonat-Behandlung (Balsian et al., 2009), eine Beobachtung, die Stürmer in ihrer Studie ebenfalls machte (Stürmer, 2013).

Bedogni et al. beobachteten in ihrer histologischen Untersuchung von Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen Arteriolen mit hypertrophierten Muskeln, verkleinertem Lumen und kubischen Epithelzellen (Bedogni et al., 2008), was in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden konnte.

Der Vascular endothelial growth factor (VEGF) wird während der Embryogenese von Chondrozyten produziert, später von Osteoblasten, mehrkernigen Riesenzellen, Fibroblasten und Lymphozyten (Matos et al., 2011). VEGF ist verantwortlich für die Gefäßneubildung während Wachstumsphasen und nach ischämischer Schädigung des Endothels sowie für die Vitalität der Kapillaren (Bigi et al., 2010).

In den gesunden Vergleichspräparaten zeigten Osteoblasten, lining cells, Fibroblasten, Endothelzellen und Osteozyten eine positive Immunreaktion. In der Denosumabgruppe erfolgte in den Präparaten der Patientenbiopsien E8299/16, E12955/16, E7104/16, E19442/14, E765/16, E2517/17, E7363/17 und E15632/14 eine mittelstarke Immunreaktion. Positiv reagierten Zellen des Bindegewebes, Endothelzellen der Gefäßwände und in den Präparaten der Patientenbiopsien E2517/17, E7363/17 und E15632/14 zusätzlich Osteoblasten. In dem Präparat E15632/14 reagierten einzelne Osteozyten und im Präparat der Patientenbiopsie E7636/16 einige lining cells VEGF-positiv. Im Gegensatz zu Denosumab-assoziierten Osteonekrosen existieren Literaturangaben zum Zusammenhang

von VEGF-Werten und Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen. Santini et al. beschrieben einen Abfall des VEGF Serumwertes nach Bisphosphonatbehandlung (Santini et al., 2003). Sharma et al. beobachteten ebenfalls einen Abfall bis 21 Tage nach Gabe von Bisphosphonaten (sharma et al., 2013). Eine klinische Studie von Ferretti et al. zeigte einen Abfall des VEGF-Wertes im Serum 48 Stunden nach einer einzelnen intravenösen Dosis von Bisphosphonaten und einen Anstieg über den Ausgangswert nach einer Woche (Ferretti et al., 2005). Di Nisio et al. untersuchten die VEGF-Expression von Bisphosphonatpatienten immunhistochemisch und stellen keine signifikanten Unterschiede zu gesunden Vergleichsgruppe fest (Di Nisio et al., 2015).

Ob Denosumab durch die Hemmung von RANKL eine antiangiogene Wirkung aufweist, wurde in der Vergangenheit widersprüchlich diskutiert. Neben Studien, die fanden, dass RANKL die Angiogenese fördert (Min et al., 2007; McGonigle et al., 2009), existieren andere Studien, die keinen angiogenen Effekt von RANKL beschreiben (Baron et al., 2011; Misso et al., 2012).

Der antioangiogene Effekt von Bisphosphonaten, der ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Osteonekrose darstellt, ist in der Literatur hingegen vielfach beschrieben worden (Ruggiero et al., 2009; Baron et al., 2011; Sivoilella et al., 2013; Pabst et al. 2014; Kim et al., 2016). Ursächlich für diesen Effekt scheint die Hemmung endothelialer Progenitorzellen und ein negativer Einfluss auf die Funktionsfähigkeit reifer Endothelzellen durch Bisphosphonate zu sein (Cho et al., 2012; Sharma et al., 2013; Pabst et al., 2014).

### **4.3 Bewertung der Statistik**

Im Rahmen der statistischen Untersuchung wurden Mittelwerte der beobachteten Immunreaktionen errechnet. Statistische Zusammenhänge zwischen den Immunreaktionen und dem Geschlecht, dem Alter beziehungsweise der Grunderkrankung wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest, einem linearen Regressionsmodell beziehungsweise einer einfaktoriellen Varianzanalyse überprüft. In keinem Fall ergab sich eine relevante Signifikanz von  $p \leq 0,05$ .

Die in dieser Studie durchgeführten Messungen zeigten daher keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Immunreaktionen und den Faktoren Geschlecht, Alter beziehungsweise Grunderkrankungen der untersuchten Patientengruppe.

Somit konnten keine Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen den immunhistochemischen und klinischen Daten gezogen werden.

Eine denkbare Erklärung dieser Studie könnte sein, dass keiner der untersuchten Werte eine Auswirkung auf den pathophysiologischen Verlauf von Denosumab-assoziierten Osteonekrosen hat. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass bei einer Gruppengröße von 19 Patienten nur sehr starke Effekte statistisch nachgewiesen werden können.

Literaturhinweise auf vergleichbare Untersuchungen lagen weder für Denosumab-assoziierte noch Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrosen vor.

Zusammenhänge zwischen den Parametern Geschlecht, Alter und Grunderkrankungen wurden für die Pathologie und Pathogenese von medikamenten-assoziierten Osteonekrosen jedoch in der Vergangenheit bereits beschrieben.

Laut Ruggiero et al. sind tendenziell mehr Frauen von medikamenten-assoziierten Osteonekrosen betroffen, was durch eine erhöhte Prävalenz von Grunderkrankungen erklärt wurde, für die die antiresorptiven Medikamente verschrieben wurden (Osteoporose, Mammakarzinom) (Ruggiero et al., 2014). Dies ist ein Zusammenhang, der in dieser Studie nicht bestätigt werden konnte. Weiterhin beschrieben verschiedene Autoren einen Altersdurchschnitt von meist über 60 Jahren und sahen mit steigendem Alter ein zunehmendes Erkrankungsrisiko (de Oliveira et al., 2016; Yoshimura et al., 2017). Der Durchschnitt des Alters der Patienten dieser Studie lag bei 68 Jahren.

Laut mehrerer Studien manifestiert sich eine Osteonekrose des Kiefers bei Patienten mit malignen Grunderkrankungen wie einem Mamma- oder Prostatakarzinom besonders häufig (Marc et al., 2005; Reid et al. 2009), eine Beobachtung, die in der vorliegenden Studie ebenfalls gemacht werden konnte, da acht Patienten wegen eines Prostatakarzinoms und sieben Patientinnen wegen eines Mammakarzinoms behandelt wurden.

## 5. Zusammenfassung

Der Begriff der Kieferosteonekrose beschreibt einen Gewebsuntergang und darauf folgendes Absterben des Kieferknochens. Vor 15 Jahren wurde erstmalig von einem Kausalzusammenhang zwischen der Einnahme von antiresorptiven Medikamenten, zu denen unter anderem Bisphosphonate und Denosumab zählen, und der Entstehung von Kieferosteonekrosen berichtet. In der vorliegenden Studie wurden Knochenbiospien von Patienten mit Denosumab-assoziierten Osteonekrosen histologisch, histochemisch und immunhistochemisch untersucht, um mögliche Unterschiede zu bisher veröffentlichten Befunden Bisphosphonat-assoziiierter Osteonekrosen zu finden.

Für die hier vorgelegte Studie wurden von 19 Patienten im Rahmen eines chirurgischen Eingriffes Gewebeproben aus Kieferknochen entnommen, histologisch aufgearbeitet und immunhistochemisch untersucht. Die Knochenbiospien wurden fixiert, entkalkt, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Nach der Anfertigung von Serienschnitten erfolgte eine Entparaffinierung der Schnitte und eine Durchführung von histologischen Übersichtsfärbungen (Hämatoxylin-Eosin und Trichrom nach Masson-Goldner) und histochemischen Färbungen (PAS und TRAP). Immunhistochemische Untersuchungen erfolgten mit Hilfe verschiedener Antikörper gegen anabole und katabole Marker sowie Gefäßmarker (Alkalische Phosphatase, Osteokalzin, BMP2, RUNX2, RANKL, OPG, RANK, Cathepsin K, MMP8, vWF, VEGF), die unter anderem zur Darstellung der Lokalisation und Aktivität von Osteoklasten dienen, entzündliche Geschehen nachwiesen und die Vaskularisation der Knochenpräparate indirekt beurteilen ließen.

Im Allgemeinen zeigten sich ähnliche histopathologische Befunde wie bei Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen, nämlich nekrotischer, avaskulärer, demineralisierter Knochen mit erodierten Oberflächen, fibrosierten Knochenmarksräumen und resorbierten Havers'scher Kanälen auf der einen Seite, aber auch Areale die vital und zellreich erschienen. Außerdem wiesen viele Präparate mehrschichtiges Epithel und Weichgewebe auf, in welchem sich Infiltrate mit neutrophilen Granulozyten, Plasmazellen und Lymphozyten befanden. Das Erscheinungsbild der knöchernen Struktur erschien im Vergleich zu Beschreibungen bisphosphonat-assoziiierter Osteonekrosen homogener. In neun Präparaten dieser Studie konnten Aktinomyzeten nachgewiesen werden, ein Befund wie bei Bis-

phosphonat-assoziierten Osteonekrosen. Die Literatur stellt eine enge Verbindung zwischen dem Auftreten von Aktinomyzeten und der Pathogenese von Kieferosteonekrosen her.

Im Unterschied zu den Befunden bei Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen, bei denen histologisch meist große mehrkernige Osteoklasten beschrieben sind, fand sich in den Präparaten der hier untersuchten Nekrosen unter Denosumab meist kleine Osteoklasten mit weniger Nuclei. Eine weitere Auffälligkeit stellten Osteoklasten in Präparaten der Patienten, die wegen einer Osteoporoseerkrankung mit Denosumab therapiert wurden, dar: Diese Osteoklasten reagierten stark TRAP-positiv, jedoch Cathepsin K-negativ, was auf eine verminderte resorbierende Funktion dieser Zellen schließen lassen könnte. Diesbezüglich erscheinen weiterführende Untersuchungen sinnvoll.

Nahezu alle Biopsien dieser Studie zeigten eine starke MMP8-positive Reaktion, was ein Hinweis auf ausgeprägte entzündliche Geschehen ist. In der Literatur werden Entzündungen im Kieferbereich in einem engen Zusammenhang mit der Entwicklung von Kieferosteonekrosen gesehen.

Im Gegensatz zu Literaturangaben über Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrosen, die von verringerten Gefäßlumina berichten, konnte diese Beobachtung in der vorliegenden Studie nicht gemacht werden.

Es ergaben sich keine statistischen Zusammenhänge zwischen den Immunreaktionen und dem Geschlecht, dem Alter beziehungsweise der Grunderkrankung der untersuchten Patientengruppe.

Weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven sind notwendig, um Hinweise auf mögliche weitere Unterschiede in der Pathologie zwischen Bisphosphonat-assoziierten und Denosumab-assoziierten Osteonekrosen finden zu können.

## 6. Anhang

**Anhang 1:** Tabelle zur Erfassung der immunhistochemischen Befunde (Alkalische Phosphatase)

Patient	Nekrotische Areale	Weichgewebe	Vitaler Knochen
E2282/16	0	2	0
E765/15	3	3	0
E15632/14	3	2	3
E11572/16	0	0	0
E3803/16	0	2	0
E20605/15	0	2	0
E19442/14	4	4	0
E12139/16	2	3	0
E7636/16	4	4	0
E15526/15	4	4	0
E3781/16	4	4	0
E7014/16	1	2	0
E7140/16	1	3	0
E12955/16	2	2	2
E8299/16	0	3	3
E4613/15	1	3	3
E2517/17	4	4	3
E14168/16	0	3	3
E21376/14	0	0	0

**Anhang 2:** Tabelle zur Erfassung der immunhistochemischen Befunde (Osteokalzin)

Patient	Nekrotische Areale	Weichgewebe	Vitaler Knochen
E2282/16	2	1	0
E765/15	2	1	1
E15632/14	3	3	0
E11572/16	0	0	0
E3803/16	0	0	0
E20605/15	3	3	0
E19442/14	3	0	0
E12139/16	2	2	0
E7636/16	4	2	4
E15526/15	1	1	0
E3781/16	3	0	0
E7014/16	1	1	0
E7140/16	0	2	0
E12955/16	0	0	1
E8299/16	2	0	0
E4613/15	4	4	4
E2517/17	2	2	0
E14168/16	0	3	3
E21376/14	0	0	0

**Anhang 3:** Tabelle zur Erfassung der immunhistochemischen Befunde (BMP2)

Patient	Nekrotische Areale	Weichgewebe	Vitaler Knochen
E2282/16	0	3	0
E765/15	2	3	0
E15632/14	2	3	0
E11572/16	3	3	0
E3803/16	0	0	0
E20605/15	2	3	0
E19442/14	4	0	0
E12139/16	0	2	0
E7636/16	4	4	4
E15526/15	4	4	0
E3781/16	4	4	4
E7014/16	3	4	3
E7140/16	3	1	0
E12955/16	2	3	3
E8299/16	0	3	0
E4613/15	2	3	2
E2517/17	4	2	4
E14168/16	0	1	2
E21376/14	0	0	0

**Anhang 4:** Tabelle zur Erfassung der immunhistochemischen Befunde (RUNX2)

Patient	Nekrotische Areale	Weichgewebe	Vitaler Knochen
E2282/16	0	1	0
E765/15	1	1	0
E15632/14	0	0	0
E11572/16	0	0	0
E3803/16	0	0	0
E20605/15	0	0	0
E19442/14	0	0	0
E12139/16	0	0	0
E7636/16	2	1	0
E15526/15	0	0	0
E3781/16	0	0	0
E7014/16	0	0	0
E7140/16	0	0	0
E12955/16	0	1	0
E8299/16	0	3	2
E4613/15	1	1	1
E2517/17	3	2	2
E14168/16	0	0	0
E21376/14	0	0	0

**Anhang 5:** Tabelle zur Erfassung der immunhistochemischen Befunde (RANKL)

Patient	Nekrotische Areale	Weichgewebe	Vitaler Knochen
E2282/16	0	2	0
E765/15	2	0	0
E15632/14	1	2	3
E11572/16	3	3	0
E3803/16	0	2	0
E20605/15	1	1	0
E19442/14	3	0	0
E12139/16	2	3	0
E7636/16	2	1	0
E15526/15	3	3	0
E3781/16	3	3	0
E7014/16	1	3	0
E7140/16	1	2	0
E12955/16	1	3	1
E8299/16	0	2	0
E4613/15	1	0	1
E2517/17	4	3	0
E14168/16	0	1	1
E21376/14	0	0	0

**Anhang 6:** Tabelle zur Erfassung der immunhistochemischen Befunde (OPG)

Patient	Nekrotische Areale	Weichgewebe	Vitaler Knochen
E2282/16	0	2	0
E765/15	3	2	0
E15632/14	0	0	0
E11572/16	2	0	0
E3803/16	0	0	0
E20605/15	0	0	0
E19442/14	3	0	0
E12139/16	1	2	0
E7636/16	3	2	0
E15526/15	3	2	0
E3781/16	4	0	0
E7014/16	2	0	0
E7140/16	0	0	0
E12955/16	1	1	0
E8299/16	0	2	3
E4613/15	1	0	1
E2517/17	3	2	0
E14168/16	0	1	1
E21376/14	0	0	0

**Anhang 7: Tabelle zur Erfassung der immunhistochemischen Befunde (RANK)**

Patient	Nekrotische Areale	Weichgewebe	Vitaler Knochen
E2282/16	0	2	0
E765/15	1	0	0
E15632/14	2	0	2
E11572/16	2	1	0
E3803/16	0	3	0
E20605/15	0	0	0
E19442/14	1	0	0
E12139/16	1	2	0
E7636/16	4	0	0
E15526/15	2	2	0
E3781/16	1	1	0
E7014/16	1	0	0
E7140/16	0	3	0
E12955/16	1	1	0
E8299/16	0	1	0
E4613/15	1	1	1
E2517/17	3	2	0
E14168/16	0	2	2
E21376/14	0	0	0

**Anhang 8:** Tabelle zur Erfassung der immunhistochemischen Befunde (Cathepsin K)

Patient	Nekrotische Areale	Weichgewebe	Vitaler Knochen
E2282/16	4	0	0
E765/15	0	0	0
E15632/14	4	0	0
E11572/16	0	0	0
E3803/16	0	0	0
E20605/15	0	0	0
E19442/14	0	0	0
E12139/16	2	4	0
E7636/16	3	0	0
E15526/15	1	1	0
E3781/16	0	0	0
E7014/16	0	0	0
E7140/16	0	0	0
E12955/16	0	0	0
E8299/16	0	0	0
E4613/15	0	0	0
E2517/17	0	4	0
E14168/16	0	0	0
E21376/14	0	0	0

**Anhang 9:** Tabelle zur Erfassung der immunhistochemischen Befunde (MMP8)

Patient	Nekrotische Areale	Weichgewebe	Vitaler Knochen
E2282/16	0	3	0
E765/15	3	0	0
E15632/14	2	1	0
E11572/16	2	1	0
E3803/16	0	1	0
E20605/15	1	0	0
E19442/14	3	3	0
E12139/16	3	4	3
E7636/16	3	4	3
E15526/15	3	4	0
E3781/16	4	3	1
E7014/16	0	0	0
E7140/16	2	3	0
E12955/16	2	3	2
E8299/16	0	4	4
E4613/15	2	3	0
E2517/17	4	3	0
E14168/16	0	2	2
E21376/14	0	0	0

**Anhang 10:** Tabelle zur Erfassung der immunhistochemischen Befunde (vWF)

Patient	Nekrotische Areale	Weichgewebe	Vitaler Knochen
E2282/16	0	0	0
E765/15	0	3	0
E15632/14	0	1	0
E11572/16	0	0	0
E3803/16	0	0	0
E20605/15	0	2	0
E19442/14	0	1	0
E12139/16	0	0	0
E7636/16	0	4	0
E15526/15	0	1	0
E3781/16	0	3	0
E7014/16	0	1	0
E7140/16	0	3	0
E12955/16	0	3	0
E8299/16	0	0	0
E4613/15	0	2	0
E2517/17	0	2	0
E14168/16	0	4	0
E21376/14	0	0	0

**Anhang 11:** Tabelle zur Erfassung der immunhistochemischen Befunde (VEGF)

Patient	Nekrotische Areale	Weichgewebe	Vitaler Knochen
E2282/16	0	0	0
E765/15	0	0	0
E15632/14	0	0	0
E11572/16	0	1	0
E3803/16	0	0	0
E20605/15	0	0	0
E19442/14	0	0	0
E12139/16	0	1	0
E7636/16	0	0	0
E15526/15	0	0	0
E3781/16	0	0	0
E7014/16	1	1	0
E7140/16	0	0	0
E12955/16	0	0	0
E8299/16	1	1	0
E4613/15	0	0	0
E2517/17	0	1	0
E14168/16	1	1	1
E21376/14	0	0	0

## 7. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Strukturformeln verschiedener Bisphosphonate	Seite 14
<b>Abbildung 2:</b> Darstellung des Wirkmechanismus von Denosumab	Seite 18
<b>Abbildung 3:</b> Klinisches Beispiel einer Denosumab-assoziierten Osteonekrose regio 23 (Computertomographie)	Seite 31
<b>Abbildung 4:</b> Klinisches Beispiel einer Denosumab-assoziierten Osteonekrose regio 33 (Computertomographie)	Seite 32
<b>Abbildung 5:</b> Klinisches Beispiel einer Periostschwiele des linken Unterkiefers (Compu- tertographie)	Seite 32
<b>Abbildung 6:</b> Klinisches Beispiel einer Denosumab-assoziierten Osteonekrose regio 44 (Computertomographie)	Seite 33
<b>Abbildung 7:</b> Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x20). H&E	Seite 57
<b>Abbildung 8:</b> Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E2517/17 (Originalvergrö- ßerung x10). H&E	Seite 58
<b>Abbildung 9:</b> Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E2517/17 (Originalvergrö- ßerung x20). H&E	Seite 59
<b>Abbildung 10:</b> Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E2517/17 (Originalver- größerung x40). H&E	Seite 59
<b>Abbildung 11:</b> Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E12139/16 (Originalver- größerung x20). H&E	Seite 60
<b>Abbildung 12:</b> Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E12139/16 (Originalver- größerung x40). H&E	Seite 61
<b>Abbildung 13:</b> Histologische Darstellung Riesenosteoklast, E12139/16 (Originalvergrö- ßerung x40). H&E	Seite 61
<b>Abbildung 14:</b> Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E15526/15 (Originalver- größerung x10). H&E	Seite 62
<b>Abbildung 15:</b> Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E19442/24 (Originalver- größerung x10). H&E	Seite 63
<b>Abbildung 16:</b> Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E19442/24 (Originalver- größerung x20). H&E	Seite 64

- Abbildung 17:** Histologische Darstellung Bindegewebe und Knochen, E19442/24 (Originalvergrößerung x20). H&E Seite 64
- Abbildung 18:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E21376/14 (Originalvergrößerung x5). H&E Seite 65
- Abbildung 19:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E21376/14 (Originalvergrößerung x40). H&E Seite 66
- Abbildung 20:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E14168/16 (Originalvergrößerung x10). H&E Seite 67
- Abbildung 21:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E14168/16 (Originalvergrößerung x40). H&E Seite 68
- Abbildung 22:** Histologische Darstellung Knochentrabekel, E8299/16 (Originalvergrößerung x20). H&E Seite 69
- Abbildung 23:** Histologische Darstellung Knochen, E8299/16 (Originalvergrößerung x20). H&E Seite 70
- Abbildung 24:** Histologische Darstellung Arterie, E8299/16 (Originalvergrößerung x20). H&E Seite 70
- Abbildung 25:** Histologische Übersichtsdarstellung Unterkiefer-Sagittalschnittes, E4613/15. Seite 71
- Abbildung 26:** Histologische Darstellung Unterkiefer-Sagittalschnittes, E4613/15 (Originalvergrößerung x5). H&E Seite 72
- Abbildung 27:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E12955/16 (Originalvergrößerung x20). H&E Seite 73
- Abbildung 28:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E7014/16 (Originalvergrößerung x10). H&E Seite 74
- Abbildung 29:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E3781/16 (Originalvergrößerung x5). H&E Seite 75
- Abbildung 30:** Histologische Darstellung Riesenzellen, E3781/16 (Originalvergrößerung x20). Seite 75
- Abbildung 31:** Histologische Darstellung Knochenfragment, E7104/16 (Originalvergrößerung x5). H&E Seite 76
- Abbildung 32:** Histologische Darstellung mehrschichtiges Epithel, E7104/16 (Originalvergrößerung x20). H&E Seite 77

- Abbildung 33:** Histologische Darstellung ektope Kalzifizierung, E7014/16 (Originalvergrößerung x20). H&E Seite 77
- Abbildung 34:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E11572/16 (Originalvergrößerung x10). H&E Seite 78
- Abbildung 35:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E11572/16 (Originalvergrößerung x40). H&E Seite 79
- Abbildung 36:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E15526/15 (Originalvergrößerung x10). H&E Seite 80
- Abbildung 37:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen, E20605/15 (Originalvergrößerung x10). H&E Seite 81
- Abbildung 38:** Histologische Darstellung mehrschichtiges Epithel, E20605/15 (Originalvergrößerung x20). H&E Seite 81
- Abbildung 39:** Histologische Darstellung subgingivales Bindegewebe, E3803/16 (Originalvergrößerung x20). H&E Seite 82
- Abbildung 40:** Histologische Darstellung mehrschichtiges Epithel, E3803/16 (Originalvergrößerung x20). H&E Seite 83
- Abbildung 41:** Histologische Darstellung Weichgewebe (Originalvergrößerung x5). H&E
- Abbildung 42:** Histologische Darstellung Knochentrabekel, E7636/16 (Originalvergrößerung x20). H&E Seite 84
- Abbildung 43:** Histologische Darstellung Knochen, E765/17 (Originalvergrößerung). H&E-Färbung Seite 85
- Abbildung 44:** Histologische Darstellung Osteoklasten, E765/17 (Originalvergrößerung x40). H&E Seite 86
- Abbildung 45:** Histologische Darstellung Knochen, E2282/16 (Originalvergrößerung x40). H&E Seite 87
- Abbildung 46:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x5). MG-Färbung Seite 88
- Abbildung 47:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen (Originalvergrößerung x20). MG-Färbung Seite 89
- Abbildung 48:** Histologische Darstellung Epithel (Originalvergrößerung x20). MG-Färbung Seite 89

- Abbildung 49:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x40).  
PAS-Färbung Seite 90
- Abbildung 50:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen (Originalvergrößerung).  
PAS-Färbung Seite 91
- Abbildung 51:** Histologische Darstellung Epithel (Originalvergrößerung x20). PAS-Färbung  
Seite 92
- Abbildung 52:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x20).  
TRAP-Färbung Seite 93
- Abbildung 53:** Histologische Darstellung TRAP-positiver Zellen (Originalvergrößerung  
x40). TRAP-Färbung Seite 94
- Abbildung 54:** Histologische Darstellung TRAP-positiver Osteoklasten (Originalvergrößerung  
40x). TRAP-Färbung Seite 95
- Abbildung 55:** Histologie TRAP-positiver Osteoklasten (Originalvergrößerung x40).  
TRAP-Färbung Seite 95
- Abbildung 56:** Histologische Darstellung gesunden Knochens (Originalvergrößerung  
x40). Färbung mittels Antikörper gegen alkalische Phosphatase (AP) Seite 96
- Abbildung 57:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen (Originalvergrößerung  
x10). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen alkalische Phosphatase  
(AP) Seite 97
- Abbildung 58:** Histologische Darstellung Epithel (Originalvergrößerung x20). Immunhis-  
tochemische Färbung mittels Antikörper gegen alkalische Phosphatase (AP) Seite 97
- Abbildung 59:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x10).  
Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen Osteokalzin Seite 98
- Abbildung 60:** Histologische Darstellung Osteoklasten und Osteozyten (Originalvergrößerung  
x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen Osteokalzin  
Seite 99
- Abbildung 61:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x10).  
Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen BMP2 Seite 100
- Abbildung 62:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen (Originalvergrößerung  
x20). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen BMP2 Seite 100
- Abbildung 63:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x40).  
Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen RUNX2 Seite 101

- Abbildung 64:** Histologische Darstellung RUNX2-positiver Zellen (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen RUNX2 Seite 102
- Abbildung 65:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen RANKL Seite 103
- Abbildung 66:** Histologische Darstellung Knochen und Weichgewebe (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen RANKL Seite 104
- Abbildung 67:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen OPG Seite 105
- Abbildung 68:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen OPG Seite 105
- Abbildung 69:** Histologische Darstellung OPG-positiver Zellen (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen OPG Seite 106
- Abbildung 70:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x10). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen RANK Seite 107
- Abbildung 71:** Histologische Darstellung nekrotisches Knochentrabekel (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen RANK Seite 107
- Abbildung 72:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen Cathepsin K Seite 108
- Abbildung 73:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen Cathepsin K Seite 109
- Abbildung 74:** Histologische Darstellung Cathepsin K-positiver Zellen (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen Cathepsin K Seite 109
- Abbildung 75:** Histologische Darstellung Cathepsin K-negativer Zellen (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen Cathepsin K Seite 110
- Abbildung 76:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x5). MMP8 Seite 111
- Abbildung 77:** Histologische Darstellung nekrotischer Knochen (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen MMP8 Seite 112
- Abbildung 78:** Histologische Darstellung Epithel und Weichgewebe (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen MMP8 Seite 112

- Abbildung 79:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x20). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen vWF Seite 113
- Abbildung 80:** Histologische Darstellung zweier Knochenfragmente (Originalvergrößerung x20). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen vWF Seite 114
- Abbildung 81:** Histologische Darstellung Knochen und Weichgewebe (Originalvergrößerung x40). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen vWF Seite 114
- Abbildung 82:** Histologische Darstellung gesunder Knochen (Originalvergrößerung x20). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen VEGF Seite 115
- Abbildung 83:** Histologische Darstellung Knochen und Weichgewebe (Originalvergrößerung x10). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen VEGF Seite 116
- Abbildung 84:** Histologische Darstellung Knochen und Weichgewebe (Originalvergrößerung 5x). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen OPG (Negativ-Kontrolle) Seite 117
- Abbildung 85:** Summenwert der Immunreaktion aller Patienten Seite 118
- Abbildung 86:** Vergleich des Summenwertes und des Geschlechts mittels Wilcoxon-Rangsummentest Seite 119
- Abbildung 87:** Vergleich des Summenwertes und des Alters mittels Regressionsmodell Seite 120
- Abbildung 88:** Vergleich des Summenwertes und der Grunderkrankungen mittels Varianzanalyse Seite 121

## 8. Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Anamnese der Patienten mit Denosumab-assoziiertes Osteonekrose

Seite 28

**Tabelle 2:** Verwendete Primärantikörper

Seite 36

**Tabelle 3:** Verwendete Sekundärantikörper

Seite 37

## 9. Literaturverzeichnis

Aghaloo TL, Felsenfeld AL, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral and Maxillofac Surg* 2004; 65: 527-534

Aghaloo TL, Trocken SM, Mallaya S, Tetradis S. Stage 0 osteonecrosis of the jaw in a patient on denosumab. *J Oral Maxillofac Surg* 2014 ; 72: 702-716

Aljohani S, Gaudin R, Weiser J, Tröltzsch M, Ehrenfeld M, Kaeppler G, Smeets R, Otto S. Osteonecrosis of the jaw in patients treated with denosumab: A multicancer case series. *J Cranio-Maxillofac Surg* 2018; 46: 1515-1525

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

Allam E, Allen M, Chu TM, Windsor LJ. In vivo effects of zoledronic acid in oral mucosal epithelial cells. *Oral Dis* 2011; 17: 291-291

Almazrooa SA, Woo SB. Bisphosphonate and nonbisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *J Am Dent Assoc* 2009; 140: 864-875

Al-Nawas B, Grötz Ja, Krüger M, 2018. Infizierte Osteoradionekrose der Kiefer. *zm online*. <https://www.zm-online.de/archiv/2018/17/zahnmedizin/infizierte-osteoradionekrose-der-kiefer-iorn/> (Zugriffsdatum 09.01.2019)

AMGEN Europe BV. XGEVA® (Denosumab). München: AMGEN GmbH, 2012

AMGEN Europe BV, 2015. Prolia® 60mg-Injektionslösung in einer Fertigspritze. <http://www.pharmazie.com/graphic/A/40/091840.pdf> (Zugriffsdatum 09.01.2019)

AMGEN Swiss, 2010. Prolia® (denosumab) granted marketing authorization in the european union.<http://investors.amgen.com/news-releases/news-release-details/proliar-denosumab-granted-marjeting-authorization-european-union?ID=1432232&c=61656&p=irol-newsArticle> (Zugriffsdatum 26.03.2019)

Baltensperger MM, Eyrich GKH. Osteomyelitis of the jaws. New York: Springer, 2008

Baron R, Ferrari S, Russell RGG. Denosumab and bisphosphonates: different mechanism of action and effects. *Bone* 2011; 48: 677-692

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

Bedogni A, Blandamura S, Lokmic Z, Palumbo C, Ragazzo M, Ferrari F, Tregnaghi A, Pietrogrande F, Procopio O, Saia G, Ferretti M, Bedogni G, Chiarini L, Ferronato G, Ninfo V, Lo Russo L, Lo Muzio L, Nocini PF. Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105: 358-364

Berenson JR, Stopeck AT, Kyle RA, Drews RE, Savarese DM, 2015. Medication-related osteocrosis of the jaw in patients with cancer. <https://www.uptodate.com/contents/medication-related-osteonecrosis-of-the-jaw-in-patients-with-cancer> (Zugriffsdatum 26.10.2018)

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

Black DM, Reid RI, Boonen S, Bucci-Rechtweg C, Cauley JA, Cosman F, Cummings SR,

Hue TF, Lipuner K, Lakatos P, Leung PC, Man Z, Martinez RL, Tan M, Ruzycky ME, Su G, Eastell R. The effect of 3 versus 6 years of zoledronic acid treatment of osteoporosis: a randomised extension to the HORIZON-pivotal fracture trial (PET). *J Bone Min Res* 2012; 27: 243-254

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

Bougioukli S, Jain A, Sugiyama O, Tinsley BA, Tang AH, Adamas JA, Kostenuik PJ, Lieberman JR. Combination therapy with BMP-2 and a systemic RANKL inhibitor enhances bone healing in a mouse critical-sized femoral defect. *Bone* 2016; 84: 93-103

Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: S1

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

Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF- $\kappa$ B-mediated regulation of osteoclast-genesis. *Endocrinol Metab* 2015; 30: 35-44

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

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

Cardemil C, Thomsen P, Larsson Wexell C. Jaw bone samples from bisphosphonate-treated patients: a pilot cohort study. *Clin Imp Dent Rel Res* 2015; 17: 2

Cho YA, Yoon HJ, Lee JI, Hong SP, Hong SD. Histopathological features of bisphosphonate-associated osteonecrosis: findings in patients treated with partial mandibulectomies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 114: 785-791

Chrcanovic BR, Reher P, Sousa AA, Harris M. Osteoradionecrosis of the jaws- a current overview- part 1: physiopathology and risk predisposing factors. *Oral Maxillofac Surg* 2010; 14: 3-16

Ceulaer De J, Tacconelli E, Vandecasteele SJ. Actinomyces osteomyelitis in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): the missing link? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 1873-1880

Chang J, Hakam AE, McCauley LK. Current understanding of the pathophysiology of osteonecrosis of the jaw. *Curr Osteop Rep* 2018;16: 584-595

Coleman RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res* 2006;12: 6243-6246

Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Cur Opin Pharmacol* 2006; 6: 307-312

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

Cremers S, Drake MT, Ebetino FH, Bilezikian JP, Russell RGG. Pharmacology of bisphosphonates. *Br J Clin Pharmacol* 2019; 85: 1052-1062

Dearden WF. The causation of phosphorus necrosis. *Br Med J* 1901; 2: 408

De Oliveira C-C, Brizeno L-A-C, de Sousa F-B, Mota MR, Alves AP. Osteonecrosis of the jaw by receptor activator nuclear factor- $\kappa$ B ligand (denosumab) – review. *Med Oral Patol Cir Bucal*, 2016; 21: e431-439

Di Nisio C, Zizzari VL, Zara S, Falconi M, Teti G, Nori A, Zavaglia V, Cataldi A. RANK/RANKL/OPG signaling pathway in necrotic jaw bone from bisphosphonate-treated subjects. *Eur J Histochem* 2015; 58: 2455

Diomedea F, D'Aurora M, Gugliandolo A, Mercurio I, Ettore V, Bramanti A, Piattelli A, Gatta V, Mazzone E, Fontana A, Trubiani O. A novel role in skeletal segment regeneration of extracellular vesicles released from periodontal-ligament stem cells. *Int J Nanomedicine* 2018; 13: 3805-3826

Donoghue M. Bisphosphonates and osteonecrosis: analogy to phossy jaw. *Med J Aust* 2005; 3: 163-164

Dougall WC, Sullivan JK, Martin JS, Dansey R. Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Disc.* 2012; 5: 401-419

Drake MT, Clarke BL, Oursler MJ, Khosla S. Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned. *Endocrine Reviews* 2017;38: 325-350

Dworkin M, Falkow F, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The prokaryotes. A handbook of the biology of bacteria. Vol 3. Archaea bacteria: Firmicutes, actinomyces. New York, 2006

Egloff-Juras C, Gallois A, Salleron J, Massard V, Dolivet G, Guillet J, Phulpin. Denosumab-related osteonecrosis of the jaw: a retrospective study. *J Oral Path Med* 2017; 47: 66-70

Emon B, Bauer J, Jain Y, Jung B, Saif T. Biophysics of tumor microenvironment and cancer metastasis – a mini review. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018; 6: 279-287

Favia G, Pilolli GP, Maiorano E. Histologic and histomorphometric features of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an analysis of 31 cases of confocal laser scanning microscopy. *Bone* 2009; 45: 406-413

Ferretti G, Fabi A, Carlini P, Papaldo P, Cordiali FP, 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 pro-inflammatory cytokines in metastatic breast cancer patients. *Oncology* 2005; 69: 35-43

Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damiao R, Brown J, Karsh L, Milecki P, Shore N, Rader M, Wang H, Jiang Q, Tadros S, Dansey R, Goessi C. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet* 2011; 377: 813-822

Franco-Preto E, Pacheco M, Moreno A, Messa O, Gnecco J. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: clinical, imaging and histopathology findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014;118: 408-417

Freudlsperger C, Hoffmann J, 2014. Osteomyelitis der Kiefer. *zm online*.

<https://www.zm-online.de/archiv/2014/24/titel/osteomyelitis-der-kiefer/> (Zugriffsdatum: 07.03.2019)

Freyschmidt J. *Skeletterkrankungen: Klinisch-radiologische Diagnose und Differential-Diagnose (4.Auflage)*. Heidelberg: Springer-Verlag, 2016

Fujiwara Y, Piemontese M, Liu Y, Thostenson JD, Xiong J, O'Brien CA. RANKL (receptor activator of  $\text{nf-}\kappa\text{b}$  ligand) produced by osteocytes is required for the increase in B cells and bone loss caused by estrogen deficiency in mice. *J Biol Chem* 2016; 291: 24838-24850

Geoffroy V, Eleftherios P, Paschalis P, Libouban H, Blouin S, Ostertag A, Chappard D, Magali C, Phillips R, de Vernejoul MC. Effects of risedronate in Runx2 overexpressing

mice, an animal model for evaluation of treatment effects on bone quality and fractures. *Calcified tissue international* 2011; 88: 464-475

George EL, Lin Y-L, Saunders MM. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a mechanobiology perspective. *Bone Reports* 2018; 8: 104-109

Geusens P. The role of RANK ligand/osteoprotegerin in rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012; 4: 225-33

Gnant M et al. Adjuvant denosumab in breast cancer (ABCSG-18): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015; 368: 433-443

Groß S. Die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose des Kieferknochens und das Risikobewusstsein Bisphosphonat verschreibender Mediziner in den Bezirken Graz und Graz-Umgebung. Medizinische Universität Graz, 2014

Groetz KA, Piesold J-U, Al-Nawas B, 2012. Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose (BP-ONJ) und andere Medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen. AWMF online. [https://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/za/007-091l\\_S3\\_Bisphosphonat-assoziierte\\_Kiefernekrose\\_2012-04.pdf](https://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/za/007-091l_S3_Bisphosphonat-assoziierte_Kiefernekrose_2012-04.pdf) (Zugriffsdatum 05.05.2019)

Gross C, Weber M, Creutzburg K, Möbius P, Preidl R, Amann K, Wehrhan F. Osteoclast profile of medication-related osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy: a comparison with osteoradionecrosis and osteomyelitis. *J Transl Med* 2017; 15: 128

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

Guerrini MM, Takayanagi H. Review: The immune system, bone and RANKL. *Arch Biochem Biophys* 2014; 561: 118-123

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

Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* 2008; 41: 218-223

Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, Scagliotti GV, Sleeboom H, Spencer A, Vadhan-Raj S, Von Moos R, Willenbacher W, Woll PJ, Wang J, Jiang Q, Jun S, Dansey R, Yeh H. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1125-1132

Hellstein JW, Marek CL. Bisphosphonate osteochemonecrosis (bis-phossy jaw): is this the phossy jaw of the 21st century? *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 682-689

Herget GW, Uhl M, Rottenburger C. *Radiologische Diagnostik von Knochentumoren*. Stuttgart: Thieme 2008

Hernandez M, Phulpin B, Mansuy L, Droz D. Use of new targeted cancer therapies in children: effects on dental development and risk of jaw osteonecrosis: a review. *J Oral Path Med* 2016; 46: 321-326

Hoefert S, Hoefert CS, Albert M, Munz A, Grimm M, Northoff H, Reinert S, Alexander D. Zoledronate but not denosumab suppresses macrophagic differentiation of THP-1 cells. An aetiologic model of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Clin Oral Invest* 2015; 9: 1307-1318

Hofbauer LC. Bedeutung des RANK/RANKL/OPG-Signalwegs für den Knochenstoffwechsel. *Osteologie* 2010; 19: 354-357

Ikegame M, Ejiri S, Okamura H,. Expression of non collagenous bone matrix proteins in osteoblasts stimulated by mechanical stretching in the cranial suture of neonatal

mice. *J Histochem Cytochem* 2019; 67: 107-116

Ivaska KK, Hentunant TA, Vääraniemi J, Ylipahkala H, Petterson K, Väänänen HK. Release of intact and fragmental osteocalcin molecules from bone matrix during bone resorption in vitro. *J Bio Chem* 2004; 279: 18361-18369

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

Kagami H, Inoue M, Kobayashi A, Taguchi A, Li X, Yoshizawa M. Issues with the surgical treatment of antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis* 2018; 24: 52-56

Kaibuchi N, Iwata T, Onizuka S, Yano K, Tsumanuma Y, Yamato M, Okano T, Ando T. Allogenic multipotent mesenchymal stromal cell sheet transplantation promotes healthy healing of wounds caused by zoledronate and dexamethason in canine mandibular bones. *Regen Ther* 2019;10: 77-83

Kang JH, Ko HM, Moon JS, Yoo HI, Jung JY, Kim MS, Koh JT, Kim WJ, Kim SH. Osteoprotegerin expressed by osteoclasts an autoregulator of osteoclastogenesis. *J Dent Res* 2014; 93: 1116-1123

Kasuma N, Oenzil F, Darwin E, Sofyan Y. The analysis of matrix metalloproteinase-8 in gingival crevicular fluid and periodontal diseases. *Indian J Dent Res* 2018; 29: 450-454

Kassenärztliche Bundesvereinigung. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft: UAW\_news International Sicherheitsaspekte bei der Anwendung von Denosumab: Fälle von Vaskulitis und Risiko für schwere Hypokalzämien. *Dtsch Arztebl* 2014;111: A-472 / B-404 / C.388

Katsarelis H, Shah NP, Dhariwal DK und Pazianas M. Infection and medication-related

ostonecrosis of the jaw. *J Dent Res* 2015; 94: 534-539

Kim SG, Kweon H-Y, Lee S-K. Uncommon presentation of potential medication-related osteonecrosis of the jaw. *SpringerPlus* 2016; 5: 187

Kim HJ, Kim HJ, Choi Y, Bae MK, Hwang DS, Shin SH, Lee JY. Zoledronate enhances osteocyte-mediated osteoclast differentiation by IL-6/RANKL axis. *Int J Mol Sci.* 2019; 6: 20

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

Koerdt S, Dax S, Grimaldi H, Ristow O, Kuebler AC, Reuther T. Histomorphologic characteristics of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Pathol Med* 2014; 43: 448-453

Kölbl O, Barthel T, Krödel A, Seegenschmiedt MH. Prävention von heterotopen Ossifikationen nach Totalendoprothesen des Hüftgelenks. *Dtsch Arztebl* 2003; 100: A-2944/B-2441/C-29291

Könönen E, Wade WG. Actinomyces and related organisms in human infections. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28: 419-442

Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol* 2010; 658: 43-49

Kuroshima S, Sasaki M, Sasawe T. Medication-related osteonecrosis of the jaw: a literature review. *J Oral Biosci* 2019; 61: 99-104

Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, Kosteuik PJ, Dougall WC, Sullivan JK, San Martin J, Dansey R. Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 401-419

Landesberg R, Woo V, Cremers S, Cozin M, Marolt D, Vunjak-Novakovic G, Kousteni S, Raghavan S. Potential pathophysiological mechanisms in osteonecrosis of the jaw. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1218: 62-79

Lasnig S. Die Denosumab-assoziierte Osteonekrose des Kieferknochens und der Informationsstand der verschreibenden MedizinerInnen in den Bezirken Graz und Graz-Umgebung. Medizinische Universität Graz, 2011

Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jund DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130: 456-469

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

Liu T, Gao Y, Sakamoto K, Minamizato T, Furukawa K, Tzukazaki T, Shibata Y, Bessho K, Komori T, Yamaguchi A. BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in runx2-deficient cell lines. *J Cell Physiol* 2007; 211: 728-735

Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)/RANK/Osteoprotegerin system in bone and other tissues (review). *Mol Med Rep* 2015; 11: 3212-3218

Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent Bone development. *Tissue Eng Part B Rev* 2013; 19: 254-263

Lo JC, O'Ryan FS, Gordon NP, Yang J, Hui RL, Martin D, Hutchinson M, Lathon PV, Sanchez G, Silver P, Chandra M, McCloskey CA, Staffa JA, Willy M Selby JV, Go AS.

Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68: 243-253

Marx RE. Pamidronate (aredia) and zoledronate (zometa) induced avascular necrosis of 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. 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

Marx RE, Tursun R. Suppurative osteomyelitis, bisphosphonate induced osteonecrosis, osteoradionecrosis: a blinded histopathologic comparison and implications for the mechanism of each disease. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012; 41: 283-289

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

Matsushita J, Hayashida S, Morishita K, Sakamoto H, Naruse T, Sakamoto Y, Yamada SI, Yanamoto S, Fujta S, Ikeda S, Umeda M. Denosumab-associated osteonecrosis of the jaw affects osteoclast formation and differentiation: pathological features of two cases. *Mol clinical oncol* 2016; 4:191-194

McGonigle JS, Giachelli CM, Scatena M. Osteoprotegerin and RANKL differentially regulate angiogenesis and endothelial cell function. *Angiogenesis* 2009;12: 35-36

Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim Y, Kim JH, Yu YS, Rho J, Mochizuki N, Kim YM, Oh GT, Kwon YG. Receptor activator of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B ligand (RANKL) increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Blood* 2007; 109: 1495-1502

Misso G, Porru M, Stoppacciaro A, Castellano M, De Cicco F, Leonetti C, Santini D, Caraglia M. Evaluation of the in vitro and in vivo antiangiogenic-effects of denosumab and zoledronic acid. *Cancer Biol Ther* 2012; 13: 1491-1500

Miyazaki T, Tokimura F, Tanaka S. A review of denosumab for the treatment of osteoporosis. *Dove Press* 2014; 8: 463-471

MonjeA, Chan HL, Galindo-Morena P, Elnayef B, Suarez-Lopez del Amo F, Wang T, Wang HL. Alveolar bone architecture: a systematic review and meta-analysis. *J periodontol* 2015; 86: 1231-1248

Mosch A, Ettl, T, Mamilos A, Schreml S, Spörl S, Spanier G, Klingelhöffer C. Physiological concentrations of denosumab enhance osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells of the jaw bone. *Arch Oral Bio* 2019; 101: 23-29

Mukaihara K, Suehara Y, Kohsaka S, Akaike K, Tanabe Y, Kubota D, Ishii M, Fujimara T, Kazuno S, Okubo T, Takagi T, Yao T, Kaneko K, Saito T. Protein expression profiling of giant cell tumor bone treated with denosumab. *PLoS one* 2016; 11: e0148401

Nakaya H, Osawa G, Iwasaki N, Cochran DL, Kamoi K, Oates TW. Effects of bisphosphonate on matrix metalloproteinase enzymes in human periodontal ligament cells. *J Periodon* 2000; 71: 1158-1166

Narayanam P. Denosumab: a comprehensive review. *South Asian J Cancer* 2013; 2: 272-277

Ochsenbein A.F. Monoklonale Antikörper als therapeutische Substanzen. *Schweiz Med Forum*. 2008; 8:140-143

Otto S, Pautke C, Van den Wyngaert T, Niepel D, Schiødt M. Medication-related osteonecrosis of the jaw: prevention, diagnosis and mangement in patients with cancer and bone metastses. *Cancer Treatment Reviews* 69, 2018: 177-187

Pabst AM, Ziebart T, Ackermann M, Konerding MA, Walter C. Bisphosphonats antiangiogenic potency in the development of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: influence on microvessel sproutin in an in vivo 3D matrigel assay. *Clin Oral Invest* 2014; 18: 1015-1022

Park E-J, Kim SA, Choi Y-M, Kwon H-K, Shim W, Lee G, Sangdun C. Capric acid inhibits NO production and stat activation during LPS-induced osteoclastogenesis. *PLoS One* 2011; 6: e27739

Pfammatter C, Kühn S, Filippi A, Labrecht JT. Patienten unter Bisphosphonat-Therapie. *Quintessenz* 2011; 62: 795-801

Pittman K, C Antill Y, Goldrick A, Goh J, H De Boer R. Denosumab: prevention and management of hypocalcemia, osteonecrosis of the jaw and atypical fractures. *Asia-Pac J Clin Onco*, 2016; 13: 266-276

Poubel VLDN, Capella DL, Santos ARS, Correa M, Ruhland L, Rivero EC. Evaluation of mandibular bone after dental extraction in rats treated with antiresorptive drugs. *J Oral Maxillofac Surg* 2018; 76: 474-482

Qi W, Tang L, He A, Yao Y, Shen Z. Risk of osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving denosumab: a meta-analysis of seven randomized controlled trials. *Inter J clinical onco* 2014; 19: 403-410

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

Reid IR, Cundy T. Osteonecrosis of the jaw. *Skeletal Radiol* 2009; 38: 5-9

Reid IR, Miller PD, Brown JP, Kendler DL, Fahrleiter-Pammer A, Valter I, Maasalu K, Bolognese MA, Woodson G, Bone H, Ding B, Wagman RB, San Martin J, Ominsky MS,

Dempster DW. Effects of denosumab on bone histomorphometry: the FREEDOM and STAND studies. *J Bone Min Res* 2010; 25: 2256-2265

Rezende E, Bradaschia-Correa V, Siviero F, Ambrosio LMB, Arana-Chavez VE. Effects of bisphosphonates on osteogenesis and osteoclastogenesis signaling during the enchondral ossification of growing rats. *Cell Tissue Res* 2017; 368: 287-300

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

Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw – 2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2014; 72: 1938-1956

Russell RGG, Graham R. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics* 2007; 119: 150-162

Russmueller G, Seemann R, Weiss K, Stadler V, Speiss M, Perisanidis C, Fuereder T, Willinger B, Sulzbacher I, Steininger C. The association of medication-related osteonecrosis of the jaw with actinomyces spp. infection. *Sci* 2016; 6: 31604

Saad D, Saad P. Report of a jaw osteonecrosis possibly caused by denosumab. *Eur J Oral Implantol* 2017; 10: 213-222

Saccardin F, Filippi A, Kühl S. Antiresorptive Medikamente: Oralmedizinische Konsequenzen und Therapieansätze bei Osteonekrosen des Kiefers. *Quintessenz* 2015; 66: 691-700

Sánchez A, Brun LR, Salerni H, Costanzo PR, González D, BAgur A, Oliveri B, Zanchetta MB, Farias V, Maffei L, Premrou V, Mansur JL, Larroudé MS, Sarli MA, Rey P, Ulla MR,

Pavlove MM, Karlsbrum S, Brance ML. Effect of denosumab on bone mineral density and markers of bone turnover among postmenopausal women with osteoporosis. *J Osteoporos* 2016; 2016; 8738959

Schaal KP, Yassin AF, Stackebrandt E. The family Actinomycetaceae: The genera *Actinomyces*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium*, *Varibaculum*, and *Mobiluncus*. In: Dworkin M, Falokow S, Rosenberg E, Schleider KH, Stackebrandt E, Hrsg. *The prokaryotes-a handbook on the biology of bacteria*. New York: Springer Verlag, 2006: 430-537

Schiegnitz E, Al-Nawas B, Hoefert S, Otto S, Pautke C, Ristow O, Voss P, Grötz AW, 2018. S3-Leitlinie 007/091: Antiresorptiva-assoziierte Kieferosteonekrose (AR-ONJ) (aktueller Stand 12/2018). AWMF online. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/007-091I\\_S3\\_Antiresorptiva-assoziierte-Kieferosteonekrosen-AR-ONJ\\_2018-12.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007-091I_S3_Antiresorptiva-assoziierte-Kieferosteonekrosen-AR-ONJ_2018-12.pdf) (Zugriffsdatum 26.03.2019)

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

Schipmann S, Metzler O, Rössle M, Zemmann W, von Jachowski J, Obwegeser JA, Grätz KW, Jacobsen C. Osteopathology associated with bone resorption inhibitors- which role does *Actinomyces* play? A presentation of 51 cases with systematic review of the literature. *J Oral Pathol Med* 2013; 42: 587-593

Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, Kenner L, Pospisilik JA, Lee HJ, Hanada R, Joshi PA, Aliprantis A, Glimcher L, Pasparakis M, Khokha R, Ormandy CJ, Widschwendter M, Schett G, Penninger JM. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterone-driven mammary cancer. *Nat* 2010; 468: 98-102

Sharma D, Ivanovski S, Selvin M, Hamlet S, Pop TS, Brinzaniuc K, Pecteu EB, Miroiu RI. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): diagnostic criteria and possible pathogenic mechanisms of an unexpected anti-angiogenic side effect. *Vasc cell* 2013; 5: 1

Shirota T, Nakumara A, Matsui Y, Hatori M, Nakumara 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

Shuster A, Reiser V, Trejo L, Ianculovici C, Kleinman S, Kaplan I. Comparison of the histopathological characteristics of osteomyelitis, medication-related osteonecrosis of the jaw and osteoradionecrosis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2019; 48: 17-22

Sigl V, Schramek D, Penninger JM. RANK und RANKL- Vom Knochen zum Mammakarzinom. *Journal für Mineralstoffwechsel und Muskuloskelettale Erkrankungen* 2012; 19: 27-32

Sigl V, Penninger JM. RANKL/RANK – From bone physiology to breast cancer. *Cytokine Growth Fact Rev* 2014; 25: 205-214

Sigl V, Jones LP, Penninger JM. RANKL/RANK: from bone loss to the prevention of breast cancer. *Open Biol* 2016; 6: 160230

Sims NA, Wah NK. Implications of osteoblast-osteoclast interactions in the management of osteoporosis by antiresorptive agents denosumab and odanacatib. *Curr Osteoporos Rep* 2014; 12: 98-106

Siovella S, Lumachi F, Stellini E, Favero L. Denosumab and anti-angionetic drug-related osteonecrosis of the jaw: an uncommon but potentially severe disease. *Anticancer Res* 2013; 33: 1793-1798

Soutome S, Hayashida S, Funahara M, Sakamoto Y, Kojima Y, Yamamoto S, Umeda M. Factors affecting development of medication-related osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving high-dose bisphosphonate or denosumab therapy: Is tooth extraction a risk factor? *PLoS One* 2018; 13: e0201343

Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metallo-proteinases. *J Pathol* 2003; 200: 448-464

Stanton DC, Balsanian 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

Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, Steger GG, Tonkin K, de Boer HH, Lichinitser M, Fujiwara J, Yardley DA, Viniegra M, Fan M, Jiang Q, Dansey R, Jun S, Braun A. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 5132-5139

Stürmer ST. Immunhistochemische Untersuchungen zur Differenzierung unterschiedlicher Knochenreaktionen auf Bisphosphonate in Humanpräparaten. Hohe Medizinische Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn, 2013

Sutjandra L, Rodriguez RD, Doshi S, Ma M, Peterson MC, Jang GR, Chow AT, Pérez-Ruixu JJ. Population pharmacokinetic meta-analysis of denosumab in healthy subjects and postmenopausal women with osteopenia or osteoporosis. *Clin Pharmacokinet* 2011; 50: 793-807

Taylor KH, Middlefell LS and Mizen KD: Osteonecrosis of the jaws induced by anti-RANK Ligand-therapy. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2010; 48: 221-223

Theolyre S, Wittrant Y, Tak SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/Rank/RankL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Fact Rev* 2004; 15: 457-475

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

Van Lint P, Libert C. Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. *Cytokine Growth*

Fact Rev 2006; 17: 217-223

Vassiliadou A. Humane Osteoblasten und Bisphosphonate- Eine in vitro-Studie des Verhaltens von humanen Osteoblasten unter dem Einfluss von Bisphosphonaten verschiedener Generationen. Justus-Liebig-Universität Gießen, 2019

Vehmanen L, Suojanen J, Kontio R, Utriainen T, Blomqvist C. High frequency of osteonecrosis of the jaw among denosumab-treated prostate cancer patients. Letter to the editor. Act Onco 2017; 56: 104-106

Von Knoch F, Jaquier C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, Rubash HE, Shanbag AS. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. Biomaterials 2005; 26: 6941-6949

Walter C, 2015. Osteonekrosen der Kiefer. ZMK-aktuell. [https://www.zmk-aktuell.de/fachgebiete/allgemeine-zahnheilkunde/story/osteonekrosen-der-kiefer\\_\\_1296.html](https://www.zmk-aktuell.de/fachgebiete/allgemeine-zahnheilkunde/story/osteonekrosen-der-kiefer__1296.html) (Zugriffdatum 28.01.2019)

Wang Y, Wang R, Zhang F. Icarrin promotes the proliferation and differentiation of osteoblasts from the rat mandible by the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway. Mol Med Rep 2018; 18: 3445-3450

Wehrhan F, Moebius P, Amann K, Ries J, Preidl R, Neukam FW, Weber M. Macrophage and osteoclast polarization in bisphosphonate associated necrosis and osteoradionecrosis. J Cran Max Fac Surg 2017; 45: 944-953

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

Wolff TF, Schiegnitz E, Grötz KA. Indikationsfindung und Behandlungsstrategien bei Antiresorptiva-Risikopatienten. Dtsch Zahnärztl Z 2019; 74: 44-52

Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. Mini review: bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362: 550-553

Xu XJ, Ma DD, Wang JY, Liu Y, Xia WB, Jiang Y, Wang O, Xing XP, Yu W, Li M. The clinical characteristics and efficiency of bisphosphonates in adult patients with osteogenesis imperfecta. *Endocr Pract* 2016; 22: 1267-1276

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

Yoshimura H, Ohba S, Yoshida H, Saito K, Inui K, Yasui R, Ichikawa D, Aiki M, Kobayashi J, Matsuda S, Imamura Y, Sano K. Denosumab-related osteonecrosis of the jaw in a patient with bone metastases of prostate cancer: a case report and literature review. *Oncol Lett* 2017;14: 127-131

## 10. Danksagung

Mein größter Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Götz, dem Leiter des Labors für Oralbiologische Grundlagen-Forschung der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, ohne dessen großartige Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht hätte entstehen können.

Dankbar für viele wertvolle Hinweise und die Bereitstellung der Präparate bin ich Herrn Dr. Heim, Assistenzarzt der Abteilung für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Bonn (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. Franz-Josef Kramer). Auch Herrn Dr. Berger, wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie des Universitätsklinikums Bonn, sei vielmals gedankt.

Ein großer Dank kommt der Elsbeth-Bonhoff-Stiftung zu, die dieses Projekt unterstützte. Sie bezweckt die Förderung von Wissenschaft und Forschung in Deutschland sowie die Entwicklung neuer Präventions- und Heilmethoden auf dem Gebiet der Osteoporose und artverwandter Krankheiten.

Besonderen Dank für die Einführung in die Labortätigkeit und die unschätzbare Hilfe bei der Durchführung der Versuche, verdienen Frau Bay-Müller und Frau van Dyck, die medizinisch-technischen Assistentinnen des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde.

Nicht zuletzt danke ich meinen verständnisvollen Eltern, deren Liebe ich mir immer gewiss sein darf, was für mich das größte Glück bedeutet.