

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Michael Ehrenfeld

**Untersuchungen zum Einfluss von Konzentration und pH-Wert auf  
die Wirkung von stickstoffhaltigen und nicht-stickstoffhaltigen  
Bisphosphonaten auf humane mesenchymale Stammzellen und  
humane Osteoblasten**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Joanna Schwager

aus

Augsburg

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Sven Otto

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Florian Haasters

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Matthias Folwaczny

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Dr. med. dent. Matthias Tröltzsch

Dekan: Prof. Dr. med. dent Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2018

Meinen Großeltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1. Grundlagen .....	6
1.1.1. Chemische Struktur .....	6
1.1.2. Pharmakologie und Wirkung .....	7
1.2. Therapeutischer Einsatz .....	9
1.2.1. Knochenstoffwechselstörungen und Osteoporose .....	9
1.2.2. Therapie von malignen Erkrankungen mit Skelettbeteiligung .....	10
1.3. Nebenwirkungen .....	11
1.3.1. Allgemeine Nebenwirkungen .....	11
1.3.2. Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose der Kiefer .....	11
1.4. Aufgabenstellung .....	15
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1. Zellkultur .....	16
2.1.1. Zellen und Zellkultur allgemein .....	16
2.1.2. Zellpassagierung .....	17
2.1.3. Zellzählung .....	17
2.1.4. Einfrieren und Auftauen .....	17
2.1.5. Einstellen der unterschiedlichen pH-Werte .....	18
2.1.6. Stimulation mit unterschiedlichen Bisphosphonatkonzentrationen .....	18
2.2. Messmethodik und Auswertung der Versuche .....	21
2.2.1. Zellaktivität mit Hilfe des WST-assay .....	21
2.2.2. Zellüberleben mit Hilfe der Hoechst-Färbung und der Image J Software .....	22
2.2.3. Statistische Auswertung .....	22
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
3.1. Einfluss von Bisphosphonatkonzentration und pH-Wert auf hMSC .....	23
3.1.1. Ergebnisse der Zellaktivität mit Hilfe des WST-assay .....	23
3.1.2. Ergebnisse des Zellüberlebens der hMSC .....	27
3.2. Einfluss von Bisphosphonatkonzentration und pH-Wert auf hOB .....	31
3.2.1. Ergebnisse der Zellaktivität mit Hilfe des WST-assay .....	31
3.2.2. Ergebnisse des Zellüberlebens der hOB .....	34

<b>4. Diskussion .....</b>	<b>38</b>
4.1. Der Einfluss von Bisphosphonatkonzentration und pH-Wert auf die Wirkung von stickstoffhaltigen und nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonaten auf humane mesenchymale Stammzellen und humane Osteoblasten .....	39
4.2. Medikamenten-assoziierte Kiefernekrose .....	45
4.3. Therapieansätze .....	47
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>50</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>52</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>71</b>
Abkürzungsverzeichnis.....	71
Danksagung .....	72
Publikationen.....	73

## 1. Einleitung

### 1.1. Grundlagen

Bisphosphonate werden seit über 40 Jahren in der onkologischen Therapie, beim multiplen Myelom und bei ossären Metastasierungen solider Tumoren, aber auch in der Therapie der Osteoporose und anderen Knochenstoffwechselstörungen, erfolgreich eingesetzt (1, 2). Die Applikation der Bisphosphonate erfolgt oral oder intravenös. Durch die Hemmung der osteoklastären Knochenresorption führen sie zu einem verzögerten Knochenabbau und somit indirekt zu einer positiven Knochenbilanz (3). Dies wiederum senkt das Risiko skelettaler Komplikationen wie Frakturen und verbessert insgesamt die Lebensqualität der Patienten (4).

Jedoch wurde 2003 von Marx erstmals über Fälle von Kiefernekrosen unter Bisphosphonattherapie berichtet (BRONJ= bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw), die sich seitdem zu einem zunehmenden und ernsthaften klinischen Problem entwickelt haben (5-7).

#### 1.1.1. Chemische Struktur

Bisphosphonate sind die chemisch stabileren Analoge des anorganischen Pyrophosphats (8-10) und aufgrund ihrer zentralen P-C-P-Bindung resistenter und stabiler gegenüber enzymatischem Abbau als das physiologisch vorkommende Pyrophosphat mit dessen zentraler Sauerstoffbindung (8, 11, 12).

Diese zentrale Kohlenstoffbindung der Bisphosphonate macht es nun auch möglich, eine größere Anzahl an verschiedenen Bisphosphonaten zu synthetisieren. Jedes Bisphosphonat erhält über die unterschiedlichen Seitenketten R' und R'' seine eigenen chemischen, physikochemischen und biologischen Charakteristika und somit sein individuelles Wirkungsprofil (8, 9, 11). Bisphosphonate können wie folgt in zwei Hauptgruppen mit unterschiedlichen molekularen Wirkungsweisen eingeteilt werden:

## **I. Nicht-stickstoffhaltige Bisphosphonate:**

Zu den nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonaten zählen unter anderem Clodronat oder Etidronat. Clodronat wird sowohl per os, als auch intravenös verabreicht und zur Therapie der durch Knochenmetastasen solider Tumore verursachten Osteolysen, maligner Hyperkalziämien sowie unter anderem in der Therapie des multiplen Myeloms eingesetzt (13).

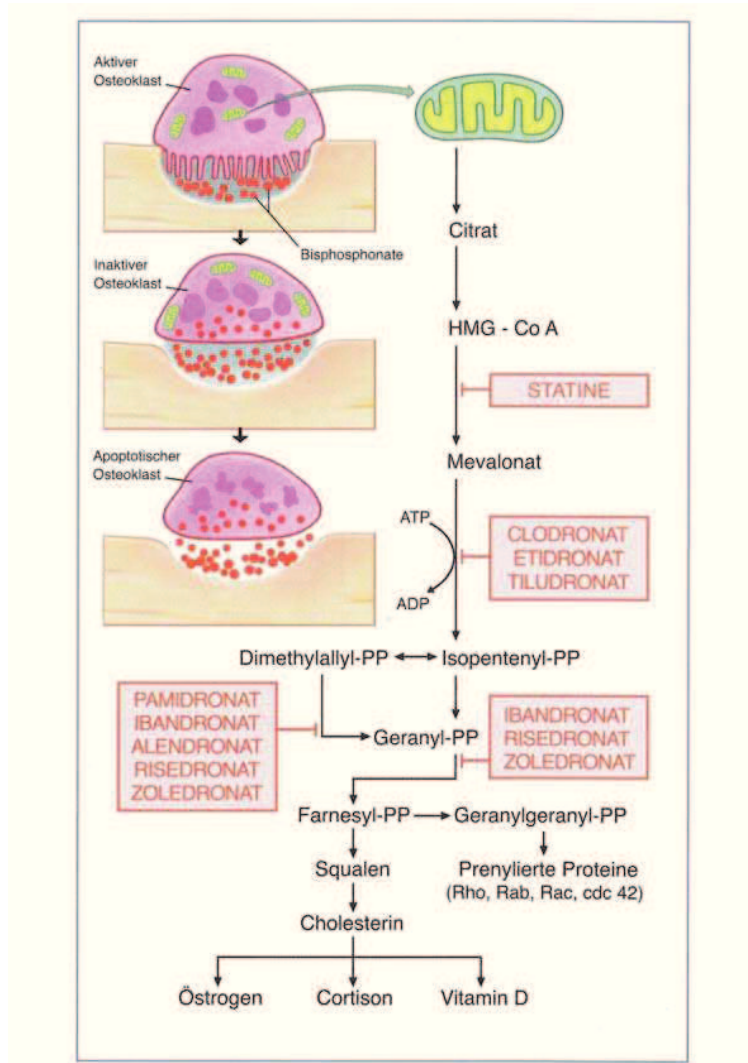
## **II. Stickstoffhaltige Bisphosphonate**

Zu den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten werden Zoledronat und Ibandronat gezählt. Beide werden überwiegend intravenös zur Behandlung der Osteoporose, maligner Hyperkalziämien und Knochenmetastasen verabreicht (14, 15). Zoledronat wird zusätzlich auch in der Therapie des multiplen Myeloms verwendet (16).

### **1.1.2. Pharmakologie und Wirkung**

Bisphosphonate werden oral oder intravenös appliziert. Aufgrund der schlechten Resorbierbarkeit über den Magen-Darm-Trakt, werden bei oraler Bisphosphonatgabe bis zu 99% wieder ausgeschieden (11). Bei intravenöser Applikation, erreichen bis zu 70% der aufgenommenen Menge an Bisphosphonaten aus dem Blutkreislauf die Knochenoberfläche (11). Die vollständige Wirkungsweise der Bisphosphonate auf molekularer Ebene ist nicht abschließend geklärt (4, 11, 17-20), jedoch können einige pharmakologische Vorgänge heute als gesichert betrachtet werden (4, 11). Die klassischen pharmakologischen Effekte der Bisphosphonate entstehen durch deren beiden Haupteigenschaften: die hemmende Wirkung auf die Osteoklastenfunktion und die hohe Affinität zum Kalziumphosphat des Knochens (21). Biochemisch gesehen wirken die nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonate, indem sie ein nicht-hydrolysiertes ATP-Analog bilden und somit der ATP-abhängigen Isopentenyl-Pyrophosphat-Synthese die Energie entziehen (11, 21, 22). Vermehrte Anreicherung dieser nicht-hydrolysierten ATP-Analoga in den Osteoklasten hemmen deren Funktion und induzieren den Zelltod der Osteoklasten (8, 23). Die Gruppe der stickstoffhaltigen Bisphosphonate agiert über die Hemmung des Schlüsselenzyms des Mevalonat/Cholesterin-Stoffwechsels (24). Das Zielenzym hierbei ist die Farnesyl Pyro-

phosphat Synthase (FPPS). FPPS katalysiert die Isoprenylierung GTP-bindender Proteine. Durch die Blockierung der GTPasen, die als Membranproteine für die intrazellulären Signaleigenschaften der Osteoklasten wichtig sind, wird die Zelle inaktiviert und leitet schlussendlich die Apoptose ein (8, 11, 21).



**Abb. 1:** Wirkmechanismen der Bisphosphonate auf zellulärer Ebene im Osteoklasten  
 (aus Bartl, von Tresckow, Bartl 2006: *Bisphosphonat-Manual*, ISBN: 3-540-25362-9;  
 mit freundlicher Genehmigung von Springer)

Bisphosphonate binden kovalent an das Hydroxylapatit des Knochens. Dies geschieht vor allem in den Resorptionslakunen auf der freien Knochenoberfläche. In diesem Zustand bilden sie eine inerte Verbindung. Erst bei sinkendem pH-Wert, wird diese Verbindung wieder gelöst und die Bisphosphonate freigesetzt (11, 25). Bei der Re-



sorption der Knochenoberfläche durch die Osteoklasten, kommt es in diesem Bereich zu einer starken Absenkung des pH-Wertes. Die Bisphosphonate werden aus ihrer Bindung herausgelöst und von den Osteoklasten aufgenommen (26).

Somit stellen die Osteoklasten und deren Vorläuferzellen die eigentlichen Zielzellen der Bisphosphonate dar (11, 27). Mit zunehmender Konzentration zeigen sich hemmende Effekte auch auf Osteoblasten und damit indirekt wieder auf Osteoklasten durch die Blockierung ihrer Aktivierung und Rekrutierung durch die Osteoblasten mittels des RANK/RANKL/OPG Systems (4, 11). Wie lange sich Bisphosphonate im Knochen anlagern ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Angaben über die Halbwertszeit im Knochen schwanken zwischen einem bis über zehn Jahren (28). Marx geht aufgrund der irreversiblen Bindung der Bisphosphonate über ihr zentrales Kohlenstoffatom an den Knochen von zirka elf Jahren aus (29). Neben den Zellen des Knochenstoffwechsels haben Bisphosphonate gegebenenfalls auch Wirkungen gegenüber Zellen des Immunsystems, der Mukosa und des Gefäßsystems (30).

## **1.2. Therapeutischer Einsatz**

### **1.2.1. Knochenstoffwechselstörungen und Osteoporose**

Seit vielen Jahrzehnten haben Bisphosphonate in der Therapie von schweren Knochenstoffwechselerkrankungen wie Osteoporose, Osteogenesis imperfecta oder Morbus Paget einen hohen Stellenwert und werden mit großem Erfolg eingesetzt (1, 4, 11, 28, 31).

Osteoporose ist vor allem bei Frauen nach der Menopause stark verbreitet und führt zu einer Abnahme der Knochendichte bis hin zu Knochenbrüchen (32). Therapeutisch kommen hierbei sowohl oral, als auch intravenös verabreichte Bisphosphonate zur Anwendung (33-35) und reduzieren wirkungsvoll das Frakturrisiko (36). Die meisten der Knochenstoffwechselstörungen gehen mit einer Erhöhung der Osteoklastenaktivität einher. Bei dem Krankheitsbild des Morbus Paget sind lokale Bereiche des Knochens, in denen es zu einem erhöhten Knochenumbau kommt, charakteristisch. Dabei können ein oder mehrere Knochen des Skelettsystems betroffen sein und die Krankheit kann asymptomatisch verlaufen, aber auch mit Schmerzen und patholo-

gischen Knochenbrüchen assoziiert sein (37). Auch hier werden Bisphosphonate oral oder intravenös erfolgreich eingesetzt, um Symptome wie Knochenschmerzen zu lindern und Frakturen zu vermeiden.

### 1.2.2. Therapie von malignen Erkrankungen mit Skelettbeteiligung

In der klinischen Onkologie spielt die Behandlung des multiplen Myeloms, sowie die Therapie der ossären Metastasierung solider Tumore, wie beispielsweise des Mammakarzinoms oder des Prostatakarzinoms eine große Rolle (28, 38-43). Hierbei kommen vor allem intravenöse Bisphosphonate zum Einsatz (28). Mit der Diagnose der Skelettmastasierung ist die maligne Erkrankung häufig nicht mehr kurativ therapierbar und die Patienten leiden zum Teil massiv unter den skelettalen Komplikationen (SRE=skeletal related events) wie osteolytisch bedingten Frakturen, Immobilität, Knochenschmerz und den Folgen der Hyperkalzämie (11, 42).

Im Knochen akkumulieren Bisphosphonate, hemmen dort die osteoklastäre Knochenresorption und schaffen dadurch eine positive Knochenbilanz (4, 11, 41). Somit senken sie das Risiko von SRE. Zusätzlich wird eine direkte antitumoröse Wirkung durch die Hemmung der lokalen Freisetzung tumorstimulierender Wachstumsfaktoren diskutiert (41, 44-46). Bisphosphonate können in der Behandlung von Patienten mit multiplen Myelom und soliden Tumoren mit skelettalen Metastasen eine Minderung der Symptome und eine Steigerung des allgemeinen Wohlbefindens erzielen (40, 41, 47).

### 1.3. Nebenwirkungen

#### 1.3.1. Allgemeine Nebenwirkungen

In der Onkologie haben die Bisphosphonate aufgrund ihrer erfolgreichen Anwendung über viele Jahre einen wichtigen Platz eingenommen. Insgesamt gelten Bisphosphonate als gut verträglich und sicher in der Anwendung (11). Jedoch können je nach Dosis, Bisphosphonattyp und Dauer der Medikation unerwünschte Nebenwirkungen auftreten (4). Bei oraler Bisphosphonatgabe kann es zu Ulzerationen der Speiseröhre, Entzündungen und mit einer Inzidenz von 2-10% zu Magen-Darm-Beschwerden kommen (4, 11, 31, 48). Durch die Hemmung des Mevalonatstoffwechsels der Osteoklasten, fallen im Osteoklasten vermehrt Isopentenyl-PP (21) an, was wiederum eine akute-Phase-Reaktion im Sinne einer Immunreaktion zur Folge hat (4, 11, 49). In der Literatur wird dies mit einer Häufigkeit von 40% nach intravenöser Gabe stickstoffhaltiger Bisphosphonate angegeben und ist durch grippeähnliche Symptome und Knochenschmerzen gekennzeichnet (50). Des Weiteren werden renale Funktionsstörungen, Hypokalzämien und Hypomagnesiämien, sowie seltener allergische Hautreaktionen und Entzündungen im Bereich der Augen beschrieben (4, 11, 40, 49). Zwei seltene, jedoch schwerwiegende Nebenwirkungen sind die atypische Femurfraktur sowie die therapeutisch schwer zu beherrschende Osteonekrose der Kiefer (4, 34, 51).

#### 1.3.2. Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose der Kiefer

Neun Monate nach der offiziellen Marktzulassung gingen 2002 bei der FDA erstmals Berichte über Kiefernekrosen bei onkologischen Patienten, die mit Zoledronat behandelt wurden ein (34, 52). 2003 veröffentlichte Marx eine Studie mit 36 Patientenfällen, die diese neu aufgetretene Form der Osteonekrose mit Knochenexposition der Kiefer unter Pamidronat- und Zoledronattherapie aufwiesen (5, 6, 53). 2004 folgte eine größere Fallsammlung von Ruggiero mit 63 Fällen von Kiefernekrosen unter Bisphosphonattherapie (34, 54). Ein erhöhtes Risiko für eine Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose der Kiefer (BRONJ) scheint abhängig von der Dosis, der Applikationsform und der Dauer der Bisphosphonattherapie zu bestehen (40, 55). Seit den ersten Fallberichten hat sich die BRONJ zu einem zunehmenden und ernst-

haften klinischen Problem entwickelt (56). Die American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) definierte 2007 und nach einem Update 2009, die Diagnose einer Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose. 2014 wurde die Terminologie BRONJ von der AAOMS in Medikamenten-assoziierte Osteonekrose der Kiefer (MRONJ) umbenannt und die Definition wie folgt aktualisiert (168):

1. Anwesenheit von freiliegenderm Knochen (oder Knochen, der durch eine intra-orale oder extraorale Fistel sondiert werden kann) über mehr als 8 Wochen
2. Aktuelle oder vorangegangene Behandlung mit antiresorptiv (Bisphosphonaten oder Denosumab) oder antiangiogenetisch wirkenden Medikamenten
3. Abwesenheit einer Radiatio im Kopf-Hals-Bereich oder von Metastasen im Kieferbereich

Die Bisphosphonat-assoziierte Nekrose kann sich über einen gewissen Zeitraum ohne spezifische Symptome darstellen, jedoch auch mit starken Schmerzen oder Sensibilitätsstörungen im Bereich des Nervus alveolaris inferior, dem sogenannten Vincent Zeichen, einhergehen (38, 57-60). Die nekrotischen Areale können dabei von einer persistierenden Alveole nach Zahnentfernung im Röntgenbild mit teilweise Sklerosierung (38, 61) bis hin zur Sequesterbildung und Weichgewebsbeteiligung reichen (57, 62-64) und im schlimmsten Fall zu pathologischen Frakturen führen (38, 64, 65). Neben den klassischen Entzündungszeichen der umgebenden Mundschleimhaut, tritt häufig Foetor ex ore auf (38, 58, 59). Zusätzlich kann es zu einer zunehmenden Mobilität der Zähne in dem betroffenen Areal mit Abszess- und Fistelbildungen kommen (6, 38, 39, 62-64), wobei diese im maxillären Knochen durch eine Mund-Antrum-Verbindung eine Kieferhöhlenbeteiligung mit einer Sinusitis maxillaris hervorrufen können (66).

2009 erfolgte durch die AAOMS eine Stadieneinteilung der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose (67). 2014 wurde auch diese Einteilung von der AAOMS aktualisiert (68):

- Stadium 0: kein freiliegender Knochen, jedoch unspezifische klinische oder radiologische Symptome
- Stadium I: freiliegender und nekrotischer Knochen bei asymptomatischen Patienten ohne Entzündungszeichen
- Stadium II: freiliegender und nekrotischer Knochen mit Zeichen einer Entzündung: Schmerzen, Rötung mit oder ohne eitrige Exsudation
- Stadium III: freiliegender und nekrotischer Knochen mit Entzündungszeichen und mindestens einer der folgenden Befunde: ausgedehnte Osteolyse bis zur Kieferbasis oder Beteiligung der Kieferhöhle, pathologische Fraktur, extraorale oder oroantrale Fistelung

Wie es genau zu einer Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose kommen kann, ist bisher noch nicht abschließend geklärt (10, 28, 48, 59, 63). Zu den möglichen Risikofaktoren zählen zum einen die Bisphosphonatgabe selbst, insbesondere die Darreichungsform und die Dauer der Medikation (55). Orale Bisphosphonate werden, wie bereits zu Beginn dieser Arbeit beschrieben, schlecht absorbiert und erreichen nur in geringeren Mengen den Knochen, als intravenös applizierte Bisphosphonate. Darüberhinaus ist die Dosis zur Behandlung maligner Erkrankungen sehr viel höher angesetzt und erfolgt meist intravenös im Gegensatz zur Therapie von Knochenstoffwechselerkrankungen. Osteonekrosen unter oraler Bisphosphonatgabe treten sehr viel seltener auf (69). Die Literatur zeigt, dass die Behandlung mit Zoledronat das Risiko eine BRONJ zu entwickeln erhöht (60, 70). Insgesamt stellt die hochdosierte intravenöse Langzeittherapie mit einem stickstoffhaltigen Bisphosphonat ein vergleichsweise hohes Risiko dar (40, 62, 65, 71, 72). Auch das Alter des Patienten, Stoffwechselerkrankungen wie beispielsweise Diabetes mellitus oder Knochenstoffwechselstörungen wie Osteoporose, werden zu den möglichen systemischen Risikofaktoren gerechnet (58, 59, 70, 73, 74). Zu den lokalen Risikofaktoren zählen neben der schlechten Mundhygiene auch die parodontalen Erkrankungen (39, 40, 70, 72, 75, 76). Diese Umstände ziehen häufig zahnärztliche und auch oralchirurgische Eingriffe nach sich. Invasive Eingriffe wie beispielsweise Zahnentfernungen, Wurzelkanalbehandlungen, parodontal- sowie auch oralchirurgische Eingriffe und mechanische Druckstellen durch Zahnersatz erhöhen das Risiko eine Kiefernekrose zu entwickeln (11, 39, 62, 64, 71-74, 76-78). So findet man in der Literatur Angaben, dass in 60 bis 70% der BRONJ Fälle ein zahnärztlich chirurgischer Eingriff vorangegangen

sei (79). Das Auftreten einer Osteonekrose wird dabei in der Mandibula häufiger beobachtet als in der Maxilla (64, 80). Jedoch treten Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrosen auch spontan und ohne eines dieser vorherigen Ereignisse auf (64, 81) und so erscheinen die vielen verschiedene Theorien zur Pathogenese die aktuell in der Literatur diskutiert werden, eher spekulativ (28, 30, 48, 59, 63, 82):

1. Die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose könnte durch eine exzessive Unterdrückung des Knochenstoffwechsels aufgrund einer lokal toxischen Bisphosphonatkonzentration hervorgerufen werden (30, 31, 83-85). Hohe Bisphosphonatkonzentrationen könnten sich aufgrund der hohen Affinität im Knochen anreichern und dadurch die Osteoklastenfunktion hemmen bis schließlich bei zu hohen lokalen Akkumulationen der gesamte Knochenstoffwechsel unterdrückt werden würde (30). Trotz höherer Umbauraten im Kieferknochen im Vergleich zu anderen skelettalen Abschnitten (30, 86, 87), gibt es bisher keinen eindeutigen Beleg dafür, dass sich Bisphosphonate vermehrt im Kieferknochen anlagern (30, 88).
2. Des Weiteren wird diskutiert, dass die BRONJ eine spezifische Infektion mit Aktinomyzeten als Ursache haben könnte. Es ist bei Bisphosphonaten bekannt, dass sie die Immunantwort unterschiedlicher Zellen beeinflussen und somit das Immunsystem anfälliger für bestimmte pathogene Keime wird (30, 89, 90).
3. Ebenfalls wird die direkte Schleimhauttoxizität von Bisphosphonaten als mögliche Ursache der BRONJ in der Literatur diskutiert (91). Die lokale Akkumulation von Bisphosphonaten bis in die für die Schleimhaut toxischen Dosisbereiche (30, 63) könnte einerseits die Anfälligkeit gegenüber Infektionen aus der Mundhöhle erhöhen, beziehungsweise die Heilung der Schleimhaut hemmen (91) oder könnte in Kombination mit anderen onkologisch relevanten Medikamenten zu einer mukosalen Verletzung gefolgt von freiliegendem Knochen und der Bisphosphonat-assoziierten Nekrose führen (30, 92). Jedoch stellt freiliegender Knochen nicht das einzige Symptom dar und eine BRONJ kann auch bei intakter Mukosa auftreten (54, 57). Dies wird in der Einteilung der AAOMS als Stadium 0 bezeichnet.
4. Auch eine mögliche antiangiogenetische Wirkung der Bisphosphonate wird diskutiert (59, 71, 75). Jedoch scheint die Angiogenese während der Knochenneuformation nicht von den Bisphosphonaten beeinflusst zu werden (30, 93, 94).

## 1.4. Aufgabenstellung

All diese unterschiedlichen Pathogenesetheorien können an der Entstehung der Kiefernekrose beteiligt sein, jedoch kann keine dieser Theorien für sich alleine oder in Kombination erklären, weshalb hauptsächlich der Kieferknochen von einer Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose betroffen ist und warum stickstoffhaltige Bisphosphonate mit einem viel höheren Risiko verbunden sind als nicht-stickstoffhaltige Bisphosphonate (56). Ebenfalls bleibt im Unklaren welche Rolle die bekannten Risikofaktoren und auslösenden Ereignisse spielen. Die Eigenschaften der Bisphosphonate bilden eine mögliche Erklärung. Eine neue Hypothese zur Osteonekroseentstehung schreibt dem lokalen pH-Wert eine bedeutende Rolle zu. Bisphosphonate binden bei neutralem pH-Wert an Hydroxylapatit. Stickstoffhaltige Bisphosphonate werden bei saurem pH-Wert vom Knochen gelöst und aktiviert (25). Den Kieferknochen unterscheidet von allen anderen Knochen, dass er viel häufiger Infektionen ausgesetzt ist als die restlichen Knochen des Skelettsystems (56). In der 5. Deutschen Mundgesundheitsstudie wurde in der Gruppe der jüngeren Senioren (den 65 bis 74-Jährigen) bei 44,8% eine mittelschwere Parodontitis und bei 19,8% eine schwere Form der Parodontitis aufgezeigt. Bei den älteren Senioren ab 75 Jahren wurde bei 9 von 10 Fällen eine moderate beziehungsweise schwere Parodontitis nachgewiesen (95). Die Entzündung hat eine Absenkung des pH-Wertes im betroffenen Areal zur Folge und kann zu einer vermehrten Freisetzung und Aktivierung der Bisphosphonate führen (30). Es ist bekannt, dass Bisphosphonate die Aktivität, das Zellüberleben und die Rekrutierung der Osteoklasten unterdrücken (96) und die Osteoklasten die Hauptzielzellen der Bisphosphonate darstellen. Jedoch zeigen Studien, dass auch weitere Zellen mögliche Ziele der Bisphosphonate sein können, wie beispielsweise Osteoblasten, Endothelzellen, Immunzellen, aber auch Tumorzellen (50).

In der folgenden Arbeit soll gezeigt werden, welchen Einfluss unterschiedliche Konzentrationen und sinkende pH-Werte auf die Wirkung stickstoffhaltiger und nicht-stickstoffhaltiger Bisphosphonate und somit auf das Zellüberleben und die Zellaktivität haben. Untersucht werden humane mesenchymale Stammzellen und humane Osteoblasten, da diesen Zellen eine wesentliche Rolle im Bereich des Knochenstoffwechsel und der Wundheilung zukommt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zellkultur

#### 2.1.1. Zellen und Zellkultur allgemein

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) (Lonza, Köln, Deutschland) verwendet. hMSC-Zellen sind Vorläuferzellen im Knochenmark, die sowohl zur Replikation zu undifferenzierten Zellen als auch zur Differenzierung zu Knochen, Knorpel, Fett, Muskel, Sehnen oder Knochenmarkstroma in der Lage sind. Sie wurden aus dem hinteren Beckenkamm des Hüftknochens gesunder Spender gewonnen. Die Lagerung der Zellen erfolgte in der zweiten Passage bei -80 Grad Celsius. Die Zellen wurden in MEM alpha-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert und expandiert. Dem MEM alpha-Medium wurde 10 % hitzeinaktiviertes fetales Rinderserum (FBS) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 1 % Penicillin (10000 internationale Einheiten (IU)/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (PAA, Pasching, Österreich) zugesetzt. Bei 37 Grad Celsius, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlendioxid-Atmosphäre wurden die Zellen kultiviert, wobei das Medium täglich gewechselt wurde.

Zusätzlich wurden humane Osteoblasten (hOB) (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) verwendet. hOB-Zellen sind hochspezialisierte Zelltypen mesenchymalen Ursprungs und am Knochenaufbau sowie -umbau beteiligt. Sie wurden in der zweiten Passage bei -80 Grad Celsius eingefroren. Nach dem Auftauen wurden diese Zellen in Osteoblast Growth Medium (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) mit 10 % Osteoblast Growth Medium Supplement Mix und 1 % Penicillin (1000 IU/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) bei 37 Grad Celsius im feuchten Milieu bei 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlendioxid-Atmosphäre kultiviert. Auch hier erfolgte täglich der Mediumwechsel.



### 2.1.2. Zellpassagierung

Die Passagierung der Zellen wurde bei Konfluenzneigung des Zellrasens in den Kulturflaschen vorgenommen. Für die Zellpassagierung ist das Splitten beziehungsweise Trypsinieren notwendig. Das Waschen der Zellen wurde mit 10 % (v/v) PBS (Sigma, München, Deutschland) und 1 ml Trypsin/EDTA (PAA, Pasching, Österreich) durchgeführt.

### 2.1.3. Zellzählung

Die Zellen wurden nach der Färbung in der gewünschten Verdünnung gezählt. 10  $\mu$ l der Zellsuspension wurden mit 5  $\mu$ l Trypanblau (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) vermengt. 5  $\mu$ l dieser Mischsuspension wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und im Anschluss die Zellzahl pro Volumen berechnet.

### 2.1.4. Einfrieren und Auftauen

Bevor die Zellen eingefroren werden konnten, wurde das Einfriermedium angesetzt. Hierfür wurden 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Whitehouse Station, USA) mit 20 % hitzeinaktiviertem fetalem Rinderserum (FBS) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 70 % des entsprechenden Kulturmediums vermengt und steril filtriert. Anschließend wurden die Zellen wie in Kap. 2.2.2 beschrieben trypsiniert und gezählt. Die Zellen wurden in dem Einfriermedium resuspendiert und pro Kryoröhrchen in einem Volumen von 1,5 ml wurden ca.  $2 \times 10^6$  Zellen bei -80 Grad Celsius eingefroren.

Um die Zellen aufzutauen wurden 5 ml des entsprechenden Kulturmediums in einem 15 ml Falcon vorgelegt. Die eingefrorenen Zellen wurden in dem Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 Grad Celsius aufgetaut. Zur Entfernung des DMSO wurde die Zellsuspension in dem vorgelegten Medium resuspendiert und dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und ausgesät.

### 2.1.5. Einstellen der unterschiedlichen pH-Werte

Um 250 ml Medium für hMSC-Zellen zu erhalten, wurden 2,54 g MEM alpha-Mediumpulver ohne Pufferkomponente (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 0,894 g HEPES (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in 150 ml destilliertem Wasser gelöst. 1 M HEPES-Puffer wurde verwendet, um die jeweiligen pH-Werte (6,7, 7,0 und 7,4) einzustellen. Während der Erwärmung auf 37 Grad Celsius wurden 0,25 ml NaHCO<sub>3</sub> (0,5M) sowie 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. Bei dieser Temperatur wurde anschließend mittels pH-Meter und durch Zugabe 0,5 M sowie 1M NaOH-Lösung der pH-Wert genau eingestellt. Das Volumen wurde mit destilliertem Wasser exakt eingestellt und anschließend mit dem Filter der Firma Millex GP steril filtriert.

Für die hOB-Zellen wurden 44 ml des Stammmediums ohne Puffer (Osteoblast Growth Medium w/o Bicarbonat/HEPES) (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) unter Zugabe von 10 % Osteoblast Growth Medium Supplement Mix und 1 % Penicillin (1000 IU/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) auf 37 Grad Celsius erwärmt, um 50 ml Medium zu erhalten. Die pH-Einstellung wurde mittels pH-Meter bei exakt 37 Grad Celsius unter Zugabe 1 M HEPES-Puffer durchgeführt. Nach exakter Volumeneinstellung mit destilliertem Wasser erfolgte die Sterilfiltrierung des Mediums.

### 2.1.6. Stimulation mit unterschiedlichen Bisphosphonatkonzentrationen

Nach Zellzählung mittels einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in einer 96 well-Mikrotiterplatte (NUNC, Roskilde, Dänemark) ausgesät. Die Konzentration lag dabei bei  $2,64 \times 10^3$  Zellen/ml in je 200 µl Zellsuspension pro Vertiefung (well) der Platte. Nach einer Anheftungszeit von 24 Stunden bei 37 Grad Celsius, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlendioxid-Atmosphäre, wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf Veränderungen bzw. atypisches Wachstum kontrolliert und gegebenenfalls aussortiert. Das Kulturmedium wurde gegen das Behandlungsmedium mit dem entsprechenden pH-Wert (6,7, 7,0 und 7,4) ausgetauscht. Es wurden 100 µl Medium pro well vorgelegt. Danach wurden die unterschiedlichen Bisphosphonatkonzentrationen hinzugegeben. Die Werte der unterschiedlichen Bisphosphonatkonzentrationen basieren auf Berechnungen vorangegangener Studien (56). In den folgenden Versuchen wurden die molaren Konzentrationen für die stickstoffhaltigen Bisphosphonate verwendet, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind:

**Tabelle 1:** Darstellung der theoretischen Bisphosphonatkonzentrationen im Knochen abhängig von der Behandlungsdauer (nach Otto S, Pautke C, Opelz C, Westphal I, Drosse I, Schwager J, et al. *Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration, and acidic milieu on the pathomechanism*. Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 2010;68:2837-45)

	Zoledronat $\mu\text{mol/L}$	Ibandronat $\mu\text{mol/L}$
1-Monat Äquivalentdosis (1 M)	1.05	1.19
3-Monat Äquivalentdosis (3 M)	3.15	3.58
6-Monat Äquivalentdosis (6 M)	6.31	7.15
1-Jahr Äquivalentdosis (1 A)	12.61	14.31
3-Jahr Äquivalentdosis (3 A)	37.82	42.92
5-Jahr Äquivalentdosis (5 A)	63.03	71.54
10-Jahr Äquivalentdosis (10 A)	126.06	143.08

Dabei wurden die in der Onkologie üblichen Dosierungen berechnet. Für Zoledronat 4 mg intravenös alle vier Wochen und Ibandronat 6 mg intravenös alle vier Wochen bei 70 kg Körpergewicht und einer Knochenmasse von 10 % des Körpergewichtes (7 kg Knochenmasse) (56). Das nicht-stickstoffhaltige Bisphosphonat Clodronat wurde mit den äquimolaren Konzentrationen für die stickstoffhaltigen Bisphosphonate verglichen und die oben genannten Werte übernommen, da aufgrund unterschiedlicher Anwendung, Dosierung und Resorption keine direkte Berechnung der Dosierung wie bei den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten möglich ist (56). Für die Experimente wurden Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationsstufen hergestellt. Für jedes Bisphosphonat wurde eine *erste Stammlösung* angesetzt wie die folgende Tabelle zeigt:

**Tabelle 2:** Erste 400  $\mu\text{M}$  Bisphosphonat-Stammlösung

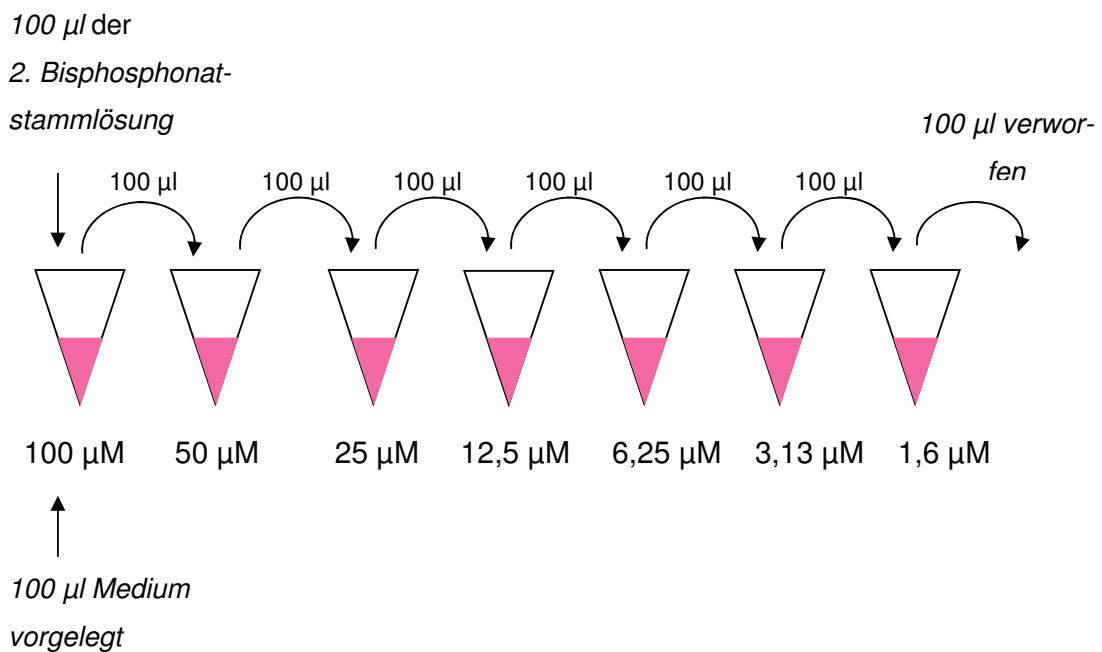
Zoledronat: 970 $\mu\text{l}$ Medium + 30 $\mu\text{l}$ Zoledronsäure	→	400 $\mu\text{M}$
Ibandronat: 966,7 $\mu\text{l}$ Medium + 33,33 $\mu\text{l}$ Ibandronsäure	→	400 $\mu\text{M}$
Clodronat: 966,7 $\mu\text{l}$ Medium + 33,33 $\mu\text{l}$ Clodronsäure	→	400 $\mu\text{M}$

Zusätzlich wurde eine *Stammlösung* für die Kontrollgruppe ohne Bisphosphonat hergestellt:

**Tabelle 3:** 200  $\mu\text{M}$  Stammlösung für die Kontrollgruppe ohne Bisphosphonat

*Kontrolle:* 983,3  $\mu\text{l}$  Medium + 16,7  $\mu\text{l}$  sterile Kochsalzlösung (NaCl)  $\Rightarrow$  200  $\mu\text{M}$

Ausgehend von diesen *ersten 400  $\mu\text{M}$  Bisphosphonat-Stammlösungen* wurden jeweils 250  $\mu\text{l}$  entnommen und mit 250  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Mediums in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt. Von dieser *zweiten Stammlösung (200  $\mu\text{M}$ )* wurden 100  $\mu\text{l}$  entnommen und mit den vorgelegten 100  $\mu\text{l}$  Medium durchmischt, sodass eine 100  $\mu\text{M}$  Lösung entstand. Danach wurde wie in der folgenden Abbildung dargestellt, verdünnt bis die einzelnen Konzentrationen erreicht wurden.



**Abb.2 :** Schematische Darstellung der Verdünnungsreihe der unterschiedlichen Bisphosphonatkonzentrationen

Nach der Stimulation mit Bisphosphonaten wurden die Zellen für 72 Stunden im feuchten Milieu bei 37 Grad Celsius ohne Kohlenstoffdioxid-Atmosphäre inkubiert.

Die folgende Abbildung zeigt das Aussaatmuster einer 96 well-Platte mit den unterschiedlichen Bisphosphonatkonzentrationen:

	Zoledronat			Ibandronat			Clodronat					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KO	KO	KO	KO	KO	KO	KO	KO	KO			
B	100 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$			
C	50 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$			
D	25 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$			
E	12,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$			
F	6,25 $\mu\text{M}$	6,25 $\mu\text{M}$	6,25 $\mu\text{M}$	6,25 $\mu\text{M}$	6,25 $\mu\text{M}$	6,25 $\mu\text{M}$	6,25 $\mu\text{M}$	6,25 $\mu\text{M}$	6,25 $\mu\text{M}$			
G	3,13 $\mu\text{M}$	3,13 $\mu\text{M}$	3,13 $\mu\text{M}$	3,13 $\mu\text{M}$	3,13 $\mu\text{M}$	3,13 $\mu\text{M}$	3,13 $\mu\text{M}$	3,13 $\mu\text{M}$	3,13 $\mu\text{M}$			
H	1,6 $\mu\text{M}$	1,6 $\mu\text{M}$	1,6 $\mu\text{M}$	1,6 $\mu\text{M}$	1,6 $\mu\text{M}$	1,6 $\mu\text{M}$	1,6 $\mu\text{M}$	1,6 $\mu\text{M}$	1,6 $\mu\text{M}$			

**Tabelle 5:** Schematische Darstellung eines Aussaatmuster einer 96-well Platte mit den unterschiedlichen Bisphosphonatkonzentrationen für Zoledronat, Ibandronat und Clodronat, sowie den jeweiligen Kontrollgruppen

## 2.2. Messmethodik und Auswertung der Versuche

### 2.2.1. Zellaktivität mit Hilfe des WST-assay

Die metabolische Zellaktivität wurde mit Hilfe des WST-assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) gemessen. Hierbei wird das Substrat WST-I, welches zunächst hellrot ist, enzymatisch durch die Succinatdehydrogenase in intensivrotes Formazan umgesetzt. Dadurch ändert sich auch die Extinktion und dies kann mittels des ELISA-plate-readers bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt werden.

Das WST-I-Reagenz wurde bei 37 Grad Celsius im Verhältnis 1:10 mit HEPES-Medium bei pH 7,4 verdünnt. Hiervon wurden 100  $\mu\text{l}$  pro well der 96 well-Platte pipetiert. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 Grad Celsius ohne Kohlenstoffdioxid in feuchter Atmosphäre wurde die optische Dichte bei 450 nm mittels des ELISA readers MPP 3408 T (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland) bestimmt.

### 2.2.2. Zellüberleben mit Hilfe der Hoechst-Färbung und der Image J Software

Um das Zellüberleben nach der Bisphosphonatbehandlung darzustellen, wurde eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung vorgenommen. Hierfür wurde der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid Hoechst 33342 (H 33342) verwendet. Dieser diffundiert durch die Zellmembran und bindet unspezifisch an alle Adenin-Thymin-Basenpaare der DNA. Nach Anregung mit ultraviolettem Licht bei 350 nm fluoresziert der Hoechstfarbstoff mit blauer Farbe bei 460 bis 490 nm. Zur Herstellung der Stammlösung für die Durchführung der Hoechstfärbung wurden 2 µl Hoechst-Farbstoff in 20 ml PBS (1:10000) verdünnt. Vor der Färbung wurden die 96 well-Platten zweimal mit jeweils 100 µl PBS pro well gewaschen um Interferenzen der Färbelösung mit Mediumrückständen zu vermeiden. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen mit 100 µl Formaldehyd (4 %) pro well für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS, wurden die Zellen mit je 100 µl pro well der Hoechst-Stammlösung gefärbt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss. Nach Absaugung der Färbelösung und abschließender zweimaliger Waschung mit PBS erfolgte die umgehende Fluoreszenzmikroskopie. Diese wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes Axiovert 100 (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Es kam hierbei ein Triple Band Filter F61-002 (AHF, Tübingen, Deutschland) zur Anwendung. Die Bilder wurden mit der Digitalkamera Axio-Cam MRm (Zeiss, Jena, Deutschland) in Mosaikbildern (6x6) aufgenommen. Die Weiterverarbeitung und Speicherung erfolgte unter Zuhilfenahme der zugehörigen Software AxioVision Rel 4.8.1 (Zeiss, Jena, Deutschland). Die anschließende Zellzählung fand automatisch durch die Software Image J 1.43 statt (Find Maxima).

### 2.2.3. Statistische Auswertung

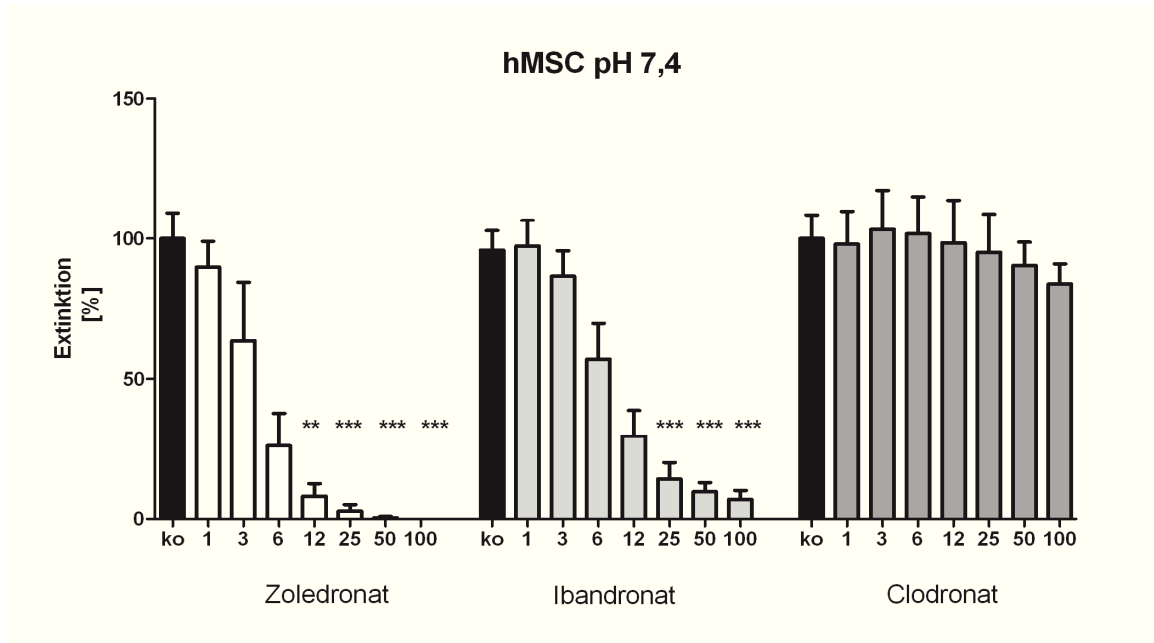
Jedes der Experimente wurde mindestens zweifach durchgeführt und die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5. Bei der Analyse der Daten konnte keine Gleichverteilung festgestellt werden. Deshalb wurde ein parameterfreier Test, der Kruskal-Wallis-Tests mittels Dunns Einzelvergleich verwendet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Testgruppen wurden durch  $p^* < 0,05$ ,  $p^{**} < 0,01$  und  $p^{***} < 0,001$  dargestellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Einfluss von Bisphosphonatkonzentration und pH-Wert auf hMSC

##### 3.1.1. Ergebnisse der Zellaktivität mit Hilfe des WST-assay

Bei neutralem pH-Wert von 7,4 zeigt sich bei niedrigen Bisphosphonatkonzentrationen von 3  $\mu\text{M}$  nur eine leichte Abnahme der Aktivität der hMSC im Vergleich zur bisphosphonatfreien Kontrollgruppe. Im Vergleich der verschiedenen Bisphosphonate untereinander ist dieser Effekt bei den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten deutlicher erkennbar als bei dem nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonat Clodronat. Mit steigender Bisphosphonatdosierung zeigen sich auch verstärkt hemmende Effekte auf die Zellaktivität der hMSC. Bei einer Zoledronat- und Ibandronatkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  zeigen sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei Zoledronat ist der hemmende Effekt hierbei noch ausgeprägter. Bei dem nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonat Clodronat zeigen die hMSC bei zunehmender Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  jedoch keine signifikanten Unterschiede in ihrer Aktivität im Vergleich zur clodronatfreien Gruppe. Nach Zugabe der höchsten Konzentration von jeweils 100  $\mu\text{M}$  sind bei Zoledronat keine Zellen mehr aktiv. Hier zeigt sich der hemmende Effekt am deutlichsten ( $p < 0,001$ ). Auch bei Ibandronat zeigt sich bei 100  $\mu\text{M}$  ein signifikanter hemmender Einfluss ( $p < 0,001$ ) auf die Aktivität der hMSC, jedoch sind hier, anders als bei Zoledronat, noch einige Zellen aktiv. Im Gegensatz dazu zeigen sich die hMSC auch unter hoher Clodronatdosierung von 100  $\mu\text{M}$  in ihrer Zellaktivität nur leicht beeinflusst. Eine signifikante, dosisabhängige Reduktion der Zellaktivität lässt sich mit zunehmenden Konzentrationen stickstoffhaltiger Bisphosphonate erkennen und deutlichere Effekte bei gleichen Konzentrationen wie Ibandronat stellt man bei Zoledronat fest. Bei Clodronat hingegen lassen sich keine signifikanten dosisabhängigen Veränderungen in der Zellaktivität mit zunehmenden äquimolaren Konzentrationen feststellen.

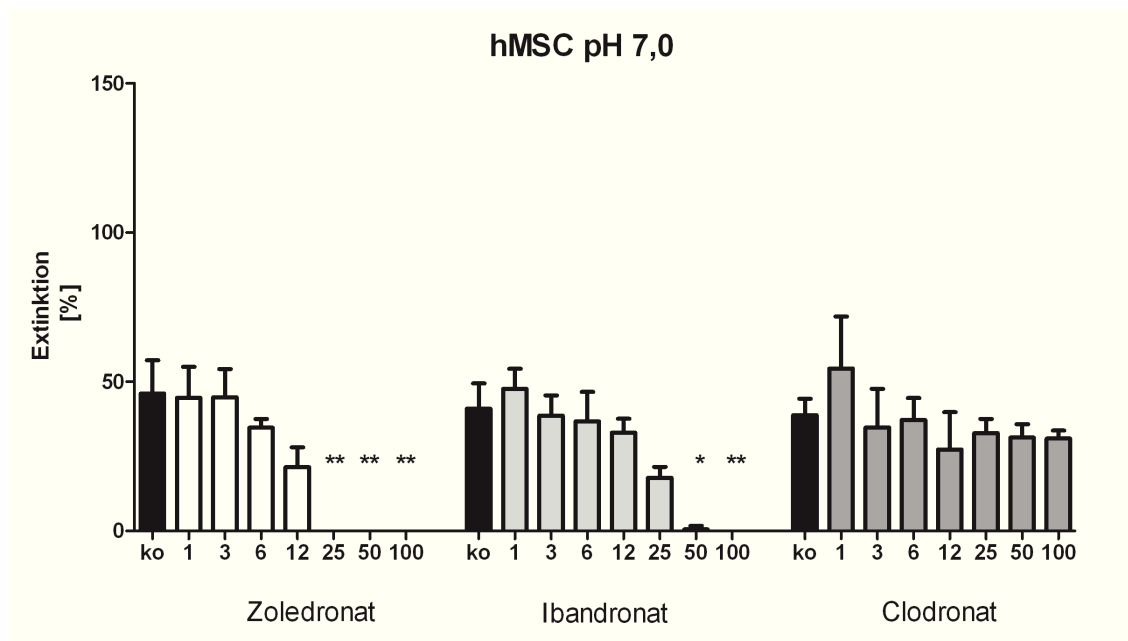


**Abb. 3:** Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die **Zellaktivität der hMSC**. Die hMSC wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,4 drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zellaktivität mit dem WST-1 Reagenz gemessen. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hMSC. Bei Clodronat ist nur ein leichter Effekt zu erkennen.

Mit sinkendem pH-Wert zeigt sich bei pH 7,0 eine generelle Abnahme der Aktivität der hMSC im zunehmend sauren Milieu. Der pH-Wert selbst wirkt sich hemmend auf die Zellaktivität aus. Die Extinktion und damit die metabolische Aktivität der Zellen, liegt bei pH 7,0 im Bereich der bisphosphonatfreien Kontrollgruppen nur noch bei ungefähr der Hälfte im Vergleich zur Aktivität bei neutralem pH von 7,4. Bei niedrigen Dosierungen von 3 µM zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität sowohl bei den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten als auch beim nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonat. Sehr geringe Konzentrationen von 1 µM scheinen bei Clodronat und Ibandronat einen leichten stimulierenden Effekt zu haben, da die Zellzahl etwas über der Kontrollgruppe liegt. Bei zunehmender Bisphosphonatdosierung zeigt sich bei einer Konzentration von 25 µM bei Zoledronat eine signifikante Abnahme ( $p < 0,01$ ) der Aktivität bei sinkendem pH-Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bereits bei dieser Konzentration weisen hMSC keine Zellaktivität mehr auf. In der Gruppe des anderen stickstoffhaltigen Bisphosphonates Ibandronat stellt sich dieser Effekt bei einer Konzentration von 25 µM nicht so eindeutig dar. Hier zeigen sich noch keine signifikanten Unterschiede gegenüber der



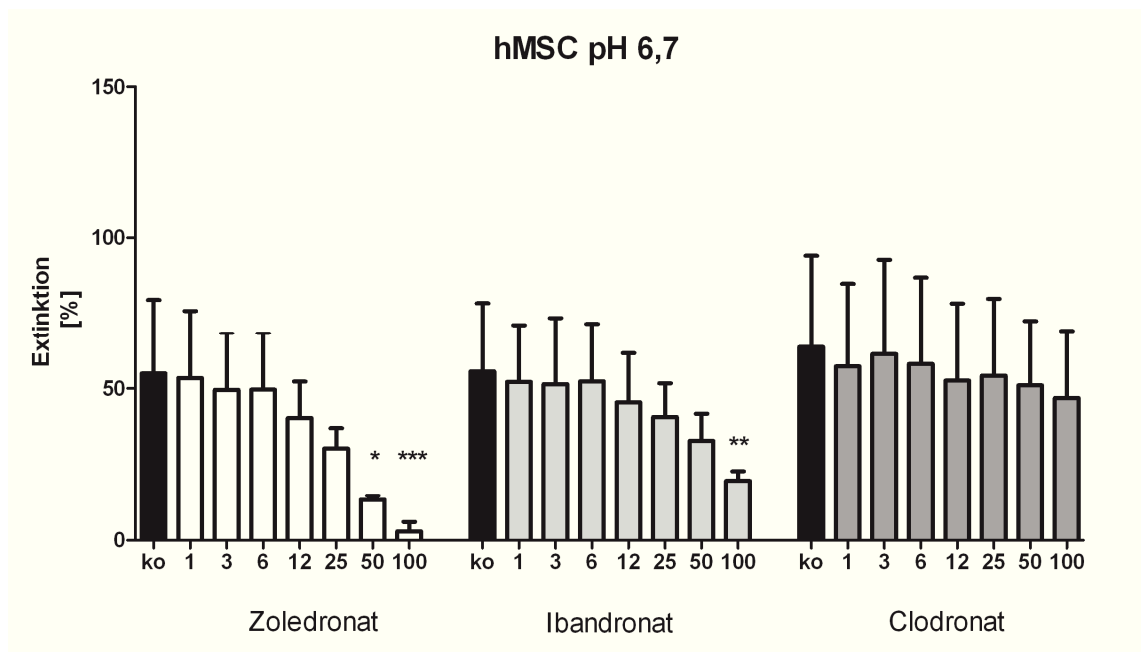
bisphosphonatfreien Kontrollgruppe. Die Aktivität ist reduziert, jedoch nicht signifikant. Erst bei sehr hohen Dosierungen ab 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) und 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ) zeigen sich bei Ibandronat signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Clodronat hingegen weist sowohl bei hohen Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$ , als auch bei sehr hohen Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität der hMSC im Vergleich zur Mediumkontrolle bei pH 7,0 auf. Ein leichter Effekt ist jedoch zu erkennen.



**Abb. 4:** Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die **Zellaktivität der hMSC**. Die hMSC wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,0 drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zellaktivität mit dem WST-1 Reagenz gemessen. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hMSC. Auch bei Clodronat ist ein leichter, jedoch kein signifikanter Effekt zu erkennen.

Bei pH 6,7 zeigt sich ebenfalls wie bei pH 7,0 eine deutlich reduzierte Aktivität der hMSC, wie man an der Kontrollgruppen ohne Bisphosphonate im Vergleich zum neutralen pH 7,4 erkennen kann. Im zunehmend sauren Milieu von pH 6,7 zeigen sich bei niedrigen Bisphosphonatkonzentrationen von 3  $\mu\text{M}$  keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle, sowohl bei den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten, als auch bei Clodronat.

Mit steigender Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  wird bei Zoledronat und Ibandronat ein hemmender Effekt auf die Zellaktivität erkennbar, jedoch kein signifikanter dosisabhängiger Unterschied zur Kontrolle. Bei Clodronat sind hingegen nur leichte Unterschiede bei äquimolaren Konzentrationen auszumachen. Sehr hohe Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) bis 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) zeigen bei Zoledronat einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Ibandronat zeigt erst bei sehr hohen Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  eine signifikante ( $p < 0,01$ ) Reduktion der Zellaktivität der hMSC im Vergleich zur bisphosphonatfreien Gruppe. Clodronat zeigt bei äquimolaren Konzentrationen keine signifikante Wirkung auf die Zellaktivität über die Wirkung des sauren pH-Wertes hinaus. Sowohl bei niedrigen Konzentrationen als auch bei höheren von 25 bis 100  $\mu\text{M}$  zeigt Clodronat keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe und auch im Vergleich bei neutralem pH von 7,4. Eine hemmende Wirkung bei sinkendem pH-Wert und steigender Konzentration ist jedoch erkennbar.

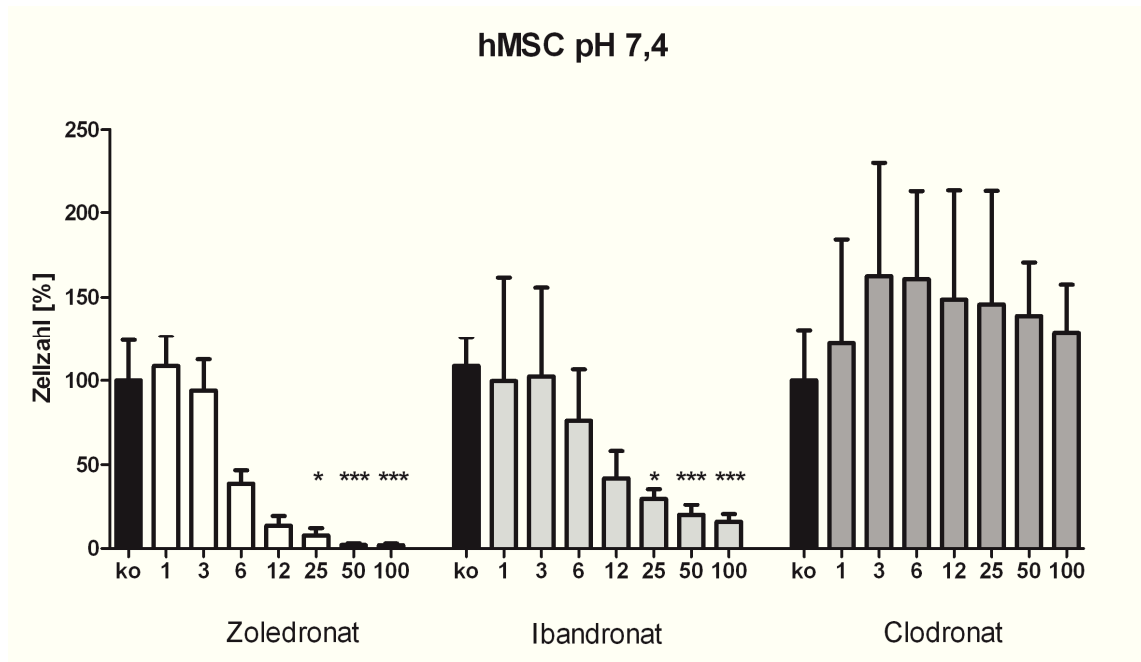


**Abb. 5:** Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die **Zellaktivität der hMSC**. Die hMSC wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=6,7 drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zellaktivität mit dem WST-1 Reagenz gemessen. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hMSC. Auch bei Clodronat ist ein Effekt zu erkennen.

### 3.1.2. Ergebnisse des Zellüberlebens der hMSC

Wie bei der Zellaktivität nimmt im Kulturmedium pH 7,4 die Zellzahl der mesenchymalen Stammzellen mit steigender Konzentration an stickstoffhaltigen Bisphosphonaten signifikant ab. Bei geringen Dosierungen von 3  $\mu\text{M}$  zeigt sich bei den beiden stickstoffhaltigen Bisphosphonaten eine geringe Reduktion der Zellviabilität der hMSC. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Bei dem nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonat Clodronat scheinen äquimolare Konzentrationen eine leicht stimulierende Wirkung auf die Zellzahl zu haben, verglichen mit der bisphosphonatfreien Gruppe. Zunehmende Konzentrationen von 6  $\mu\text{M}$  führen unter Zoledronatbehandlung bereits zu einer Reduzierung des Zellüberlebens auf weniger als die Hälfte der Kontrollgruppe ohne Bisphosphonate.

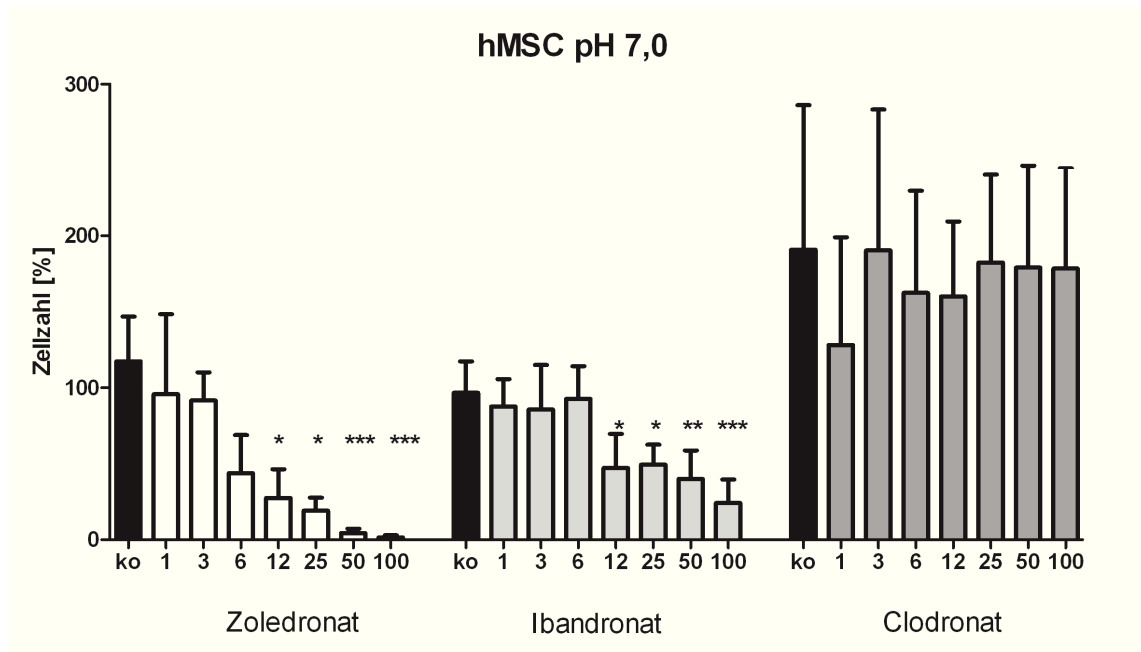
Die Zellzahl der mesenchymalen Stammzellen zeigt unter Ibandronateinfluss bei gleicher Konzentration nur leichte Veränderungen und unter Clodronat ist kein hemmender Effekt auszumachen. Auch hier führt Clodronat zu einem geringen Anstieg der Zellzahl. Die stickstoffhaltigen Bisphosphonate Zoledronat und Ibandronat zeigen bei Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) dosisabhängigen Unterschied im Vergleich zu der Kontrolle. Ibandronat wirkt dabei jedoch weniger hemmend als Zoledronat. Bei Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  wirken sowohl Zoledronat als auch Ibandronat signifikant ( $p < 0,001$ ) reduzierend auf die Zellzahl der humanen mesenchymalen Stammzellen. Clodronat zeigt auch bei steigenden Konzentrationen keine dosisabhängige hemmende Wirkung auf die Zellzahl der hMSC im Vergleich zur Kontrollgruppe.



**Abb. 6:** Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die **Zellzahl der hMSC**. Die hMSC wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,4 drei Tage inkubiert. In 4 % Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit dem Hoechst Farbstoff gefärbt und unter Verwendung der Image J Software automatisch gezählt. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hMSC. Bei Clodronat ist kein hemmender Effekt erkennbar.

Bei der Kultivierung im Medium mit pH 7,0 lässt sich bei niedrigen Konzentrationen von 3 µM bei Zoledronat eine Abnahme der Zellzahl feststellen. Bei einer Zoledronatdosis von 6 µM sinkt die Zellzahl der humanen mesenchymalen Stammzellen auf unter 50 %. Ein dosisabhängiger Effekt ist bei Ibandronat bei sinkendem pH-Wert nicht so deutlich zu erkennen wie bei Zoledronat. Clodronat zeigt bei 1 µM eine Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei zunehmenden Konzentrationen ist diese Wirkung jedoch nicht mehr zu erkennen. Mit Zunahme der Dosierung und sinkendem pH-Wert wirken sich die stickstoffhaltigen Bisphosphonate weiter negativ auf die Vitalität der Zellen aus. Dies ist bei der Stimulation mit 12 µM bei pH 7,0 sowohl bei Ibandronat, als auch bei Zoledronat signifikant ( $p < 0,05$ ). Wobei Zoledronat stärker inhibierend wirkt als Ibandronat. Bei einer Zoledronatdosis von 100 µM überleben kaum noch hMSC. Der Unterschied zur bisphosphonatfreien Kontrollgruppe ist signifikant ( $p < 0,001$ ). Bei Ibandronat ist bei äquimolaren Konzentrationen die Zellzahl stark reduziert, doch vereinzelte Zellen überleben auch bei diesen hohen Konzentrationen verglichen mit Zoledronat. Aber auch hier ist der Unterschied

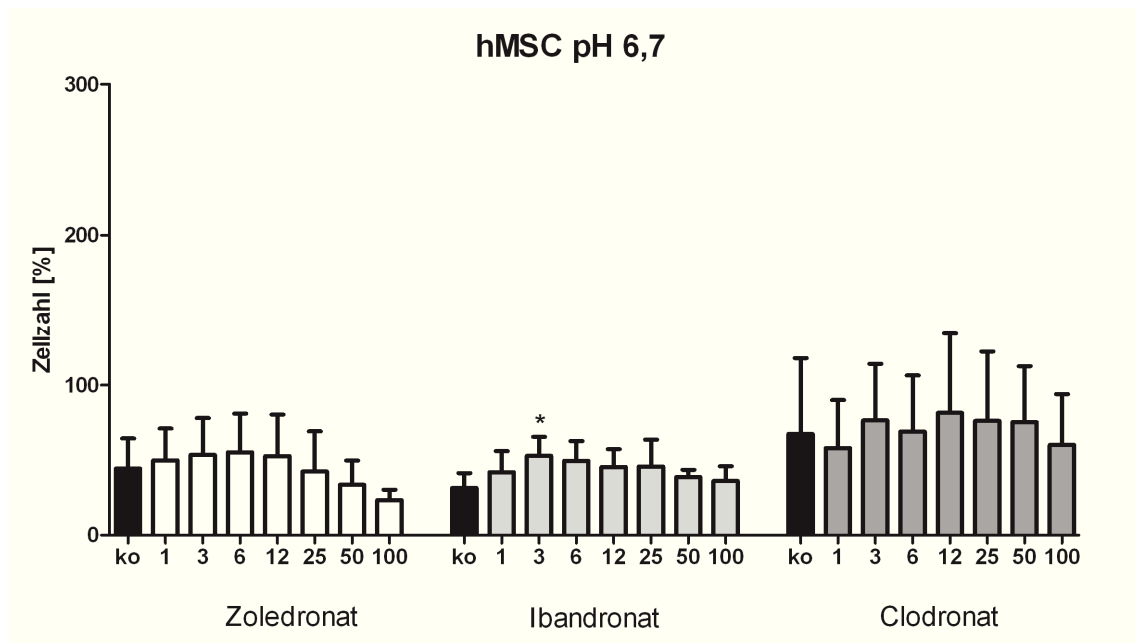
zur Kontrollgruppe signifikant ( $p < 0,001$ ). Humane mesenchymale Stammzellen unter Clodronatstimulation zeigen sich hingegen unbeeinträchtigt bezüglich ihres Zellüberlebens. Auch bei der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich ohne Bisphosphonatstimulation.



**Abb. 7:** Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die **Zellzahl der hMSC**. Die hMSC wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,0 drei Tage inkubiert. In 4% Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit dem Hoechst Farbstoff gefärbt und unter Verwendung der Image J Software automatisch gezählt. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hMSC. Bei Clodronat ist kein dosisabhängiger Effekt erkennbar.

Mit Absenkung des pH-Wertes auf 6,7 reduziert sich insgesamt die Zellzahl der mesenchymalen Stammzellen der Kontrollgruppe aufgrund des niedrigen pH-Wertes im Vergleich mit den Werten bei neutralem pH. Im sauren Kulturmedium wachsen die Zellen schlechter. Niedrige Bisphosphonatkonzentrationen von 3  $\mu\text{M}$  zeigen bei Zoledronat keinen Einfluss auf das Zellüberleben. Die Zellzahl ist allgemein auf die Hälfte reduziert. Bei Ibandronat ist bei einer Dosis von 3  $\mu\text{M}$  ein diskret reduzierender Effekt zu beobachten. Ab einer Zoledronatkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  sinkt die Zellzahl. Ibandronat und Clodronat zeigen bei diesem Wert noch keinen Effekt. Mit zunehmender Konzentration bis 100  $\mu\text{M}$  ist bei Zoledronat ein dosisabhängiger Unterschied bei niedrigem pH-Wert erkennbar. Auch Clodronat zeigt einen Effekt bei ho-

her Dosierung. Die Versuche mit den beiden stickstoffhaltigen Bisphosphonaten führen zu einer Abnahme der Aktivität und der Zellzahl der humanen mesenchymalen Stammzellen mit zunehmender Bisphosphonatkonzentration und sinkenden pH-Werten (7,0 und 6,7). Die Effekte sind dabei ausgeprägter bei Zoledronat als bei Ibandronat. Die kombinierte Wirkung von Bisphosphonatdosis und pH-Wert konnte nur bei den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten beobachtet werden. Keine signifikanten dosisabhängigen Effekte bei sinkenden pH-Werten konnte bei äquimolaren Konzentrationen von Clodronat festgestellt werden.

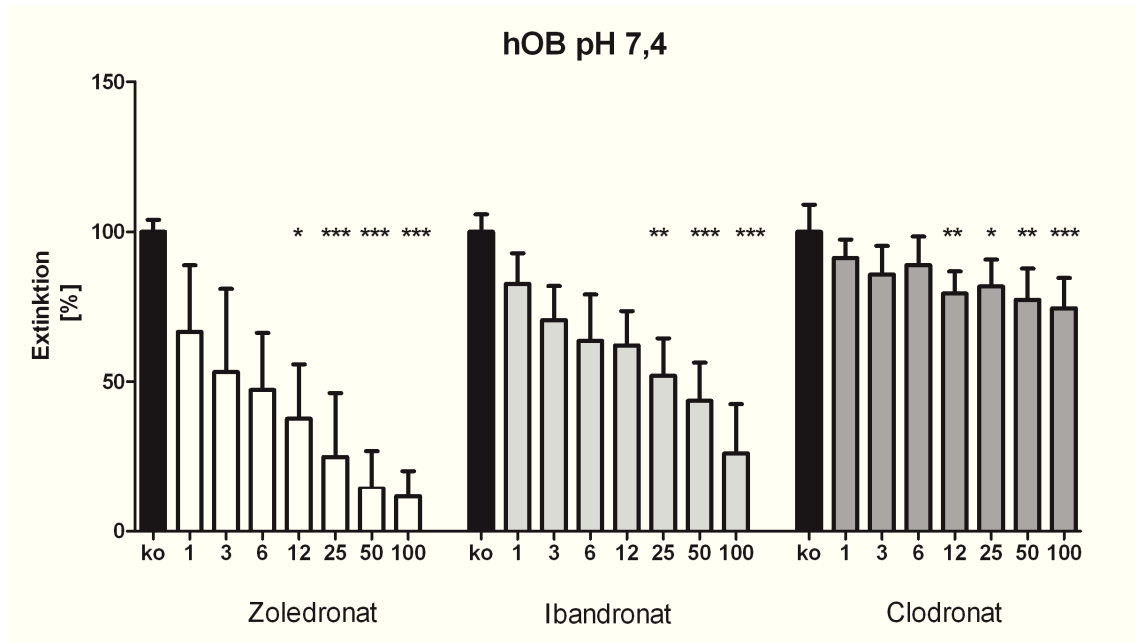


**Abb.8:** Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die **Zellzahl der hMSC**. Die hMSC wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=6,7 drei Tage inkubiert. In 4% Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit dem Hoechst Farbstoff gefärbt und unter Verwendung der Image J Software automatisch gezählt. Der niedrige pH-Wert selbst reduziert die Zellzahl der hMSC. Zoledronat wirkt ab Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  toxisch auf die Zellzahl, jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

## 3.2. Einfluss von Bisphosphonatkonzentration und pH-Wert auf hOB

### 3.2.1. Ergebnisse der Zellaktivität mit Hilfe des WST-assay

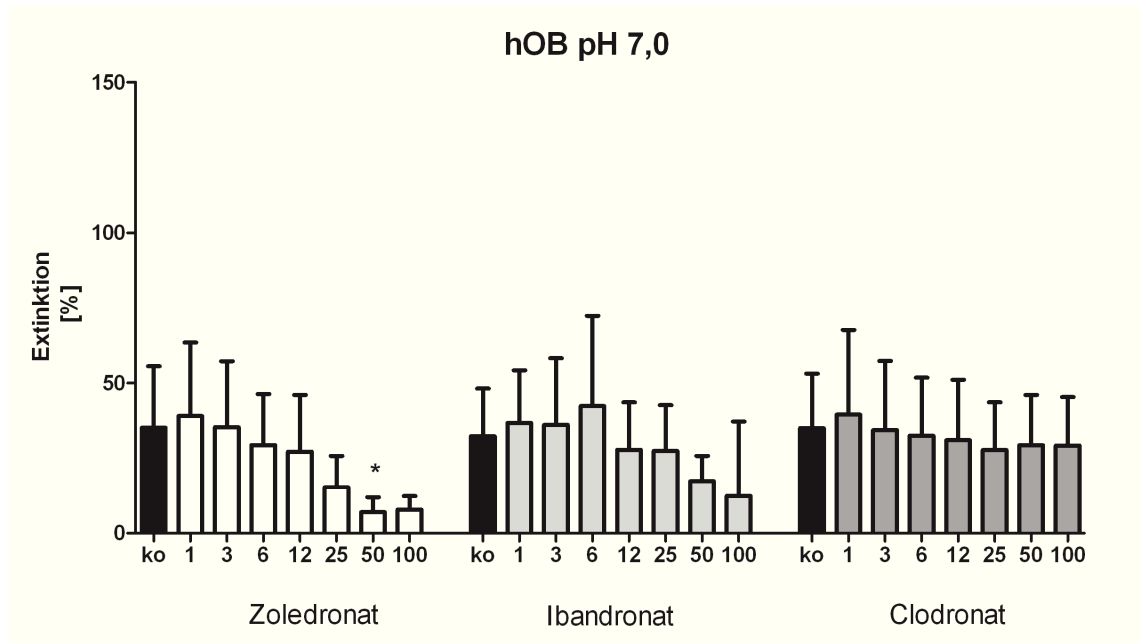
Wie bei den hMSC nimmt bei der Kultivierung der humanen Osteoblasten im Medium mit pH 7,4 die Zellaktivität mit steigenden Bisphosphonatkonzentrationen vor allem bei den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten Zoledronat und Ibandronat stark ab. Jedoch zeigen sich bei den hOB im Gegensatz zu den hMSC unter Clodronat auch hemmende Effekte auf die Zellaktivität. Dabei wirkt Zoledronat stärker hemmend auf die Zellaktivität als Ibandronat. Bei geringen Konzentrationen von 3  $\mu\text{M}$  ist eine Abnahme der metabolischen Aktivität sowohl bei Zoledronat als auch bei Ibandronat zu erkennen. Bei 6  $\mu\text{M}$  zeigt Zoledronat bereits signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Ab einer Konzentration von 12  $\mu\text{M}$  sind die Unterschiede deutlich und signifikant ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ibandronat zeigt ab einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  geringere, jedoch ebenfalls signifikante ( $p < 0,01$ ) Unterschiede. Und bei der Höchstdosis zeigen sich deutliche und signifikante ( $p < 0,001$ ) Differenzen. Bei der Zugabe von Clodronat ist bei geringen Konzentrationen (3  $\mu\text{M}$ ) keine signifikante Hemmung der Zellaktivität zu beobachten. Jedoch tritt bei höheren Konzentrationen von 12  $\mu\text{M}$  ebenfalls eine signifikante ( $p < 0,01$ ) Abnahme der Aktivität ein. Bei 100  $\mu\text{M}$  ist auch bei Clodronat eine deutliche und signifikante ( $p < 0,001$ ) Reduktion der Extinktion erkennbar.



**Abb. 9:** Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die **Zellaktivität der hOB**. Die Osteoblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,4 drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zellaktivität mit dem WST-1 Reagenz gemessen. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hOB. Auch bei Clodronat ist ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen.

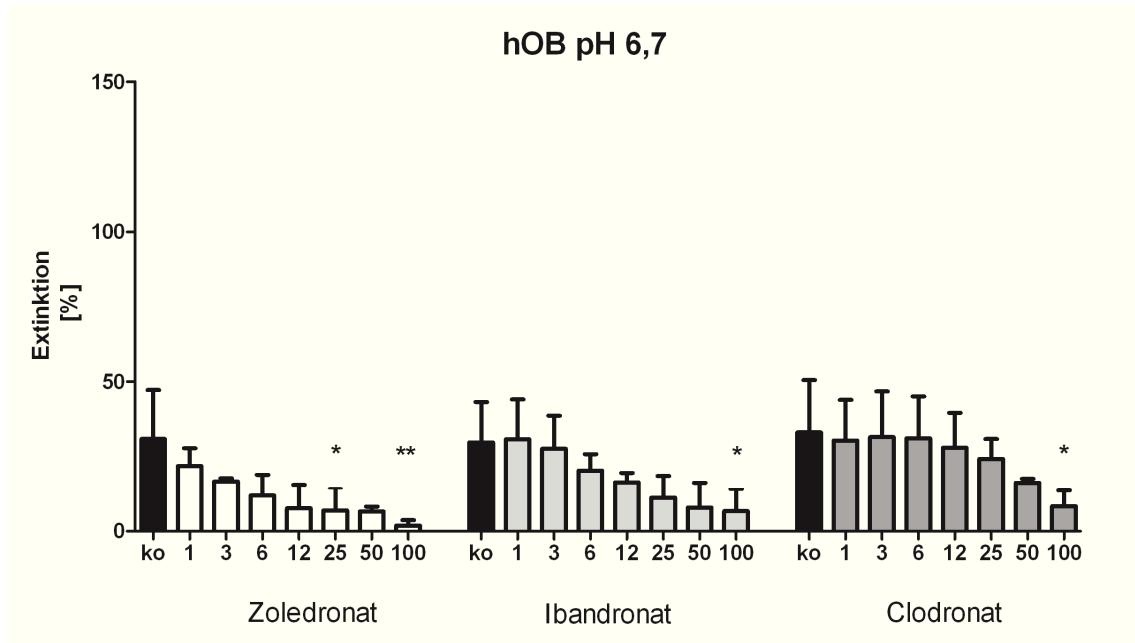
Bei sinkendem pH-Wert des Kulturmediums auf pH 7,0 ist die Zellaktivität insgesamt reduziert, da auch die Osteoblasten im sauren Milieu schlechter wachsen und weniger aktiv sind. So weist die Aktivität der Kontrollgruppe bei pH 7,0 nur etwa die Hälfte der Extinktion der hOB bei neutralem pH 7,4 auf. Jedoch nimmt die Zellaktivität in Anwesenheit stickstoffhaltiger Bisphosphonate mit steigenden Konzentrationen bei pH 7,0 stetig ab. Bei niedrigen Konzentrationen von 3 µM ist noch kein hemmender Effekt erkennbar. Ab Konzentrationen von 25 µM lässt sich eine deutliche Abnahme der Aktivität erkennen. Bei 50 µM zeigt sich ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied verglichen mit der Kontrolle. Bei zunehmenden Ibandronatkonzentrationen tritt ein ähnlich hemmender Effekt auf, jedoch zeigt Zoledronat im Vergleich die deutlich toxischere Wirkung. Clodronat weist sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Dosierungen keine deutliche und signifikante Differenz im Vergleich zur Gruppe ohne Clodronat auf.





**Abb. 10:** Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die **Zellaktivität der hOB**. Die Osteoblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,0 drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zellaktivität mit dem WST-1 Reagenz gemessen. Die stickstoffhaltigen Bisphosphonate wirken dabei toxischer auf die hOB als das nicht-stickstoffhaltige Clodronat. Nur bei Zoledronat ist jedoch ein signifikanter Unterschied zu erkennen.

Im Kulturmedium mit einem pH-Wert von 6,7 zeigt sich insgesamt eine Abnahme der Zellaktivität aufgrund des sauren Milieus. Auch hier ist die Extinktion der Kontrollgruppe um etwa die Hälfte im Vergleich zum neutralen pH reduziert. Bei geringen Konzentrationen von 3 µM zeigen die stickstoffhaltigen Bisphosphonate Zoledronat und Ibandronat bereits eine Hemmung der Aktivität. Dies ist bei Zoledronat deutlicher zu erkennen als bei Ibandronat. Bei steigender Konzentration von 25 µM nimmt diese Wirkung zu und Zoledronat weist einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Unterschied im Vergleich zur bisphosphonatfreien Kontrollgruppe auf. Zoledronat hat auch bei pH 6,7 einen stärker hemmenden Effekt und zeigt bei Konzentrationen von 100 µM deutliche und signifikante ( $p < 0,01$ ) Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Im sauren Milieu zeigt jedoch auch Clodronat ab höheren Konzentrationen von 25 µM einen hemmenden Einfluß auf die Aktivität der hOB. In sehr hohen Dosierungen von 100 µM sind diese Auswirkungen signifikant ( $p < 0,05$ ). Eine dosis- und pH-abhängige Wirkung zeigt sich bei allen getesteten Bisphosphonaten. Das stickstoffhaltige Bisphosphonat Zoledronat zeigt jedoch schon bei geringeren Konzentrationen eine signifikante Wirkung.

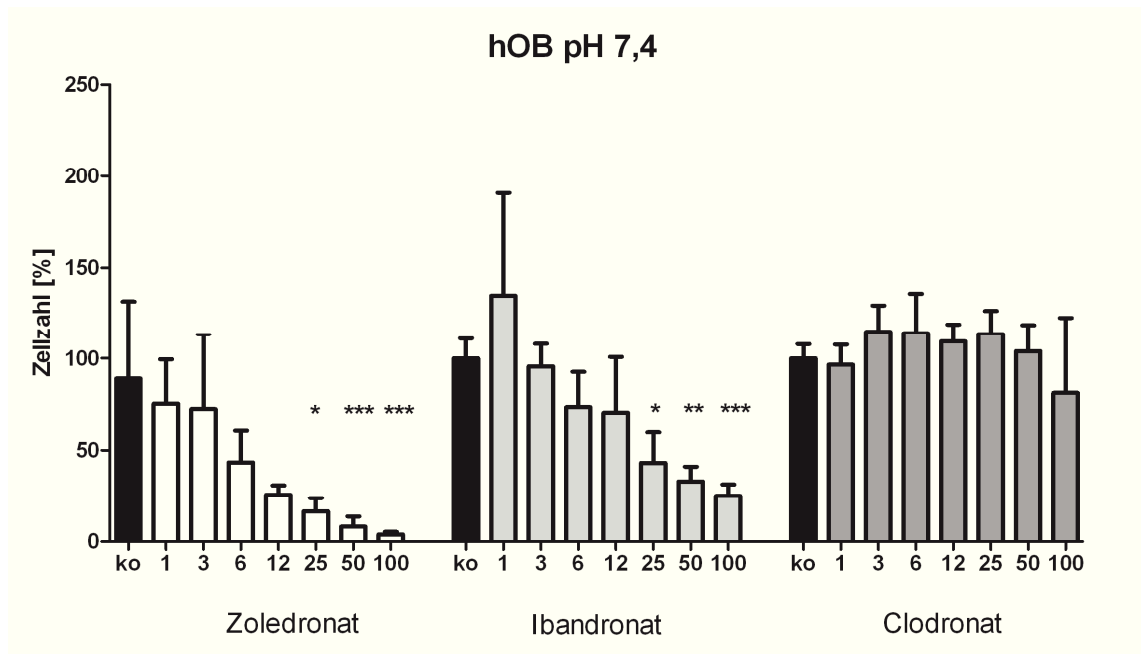


**Abb. 11:** Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die **Zellaktivität der hOB**. Die Osteoblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=6,7 drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zellaktivität mit dem WST-1 Reagenz gemessen. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hOB. Auch bei Clodronat ist ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen. Insgesamt reduziert der niedrige pH-Wert die Zellzahl stark.

### 3.2.2. Ergebnisse des Zellüberlebens der hOB

Das Zellüberleben der Osteoblasten bei neutralem pH-Wert von 7,4 zeigt unter Zoledronatbehandlung eine stetige Abnahme mit zunehmender Konzentration. Bereits niedrige Konzentrationen von 3 µM reduzieren die Zellviabilität. Bei Ibandronat und Clodronat ist bei diesen niedrigen Konzentrationen noch keine deutliche Abnahme erkennbar. Erst bei höheren Dosierungen zeigt sich bei Ibandronat eine Abnahme der Zellzahl. Zoledronat wirkt hier jedoch auch stärker reduzierend. Bei Konzentrationen von 25 µM zeigen sowohl Zoledronat, als auch Ibandronat einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe. Clodronat zeigt hier keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Bei 50 µM und 100 µM überleben unter Zoledronatstimulation nur noch vereinzelt Zellen ( $p < 0,001$ ). Auch bei Ibandronat ist der Unterschied bei 50 µM ( $p < 0,01$ ) und 100 µM ( $p < 0,001$ ) signifikant und deutlich erkennbar. Clodronat zeigt im Gegensatz zu den beiden stickstoffhaltigen Bisphosphonaten erst bei sehr hohen Konzentrationen (100 µM) hemmende Einflüsse auf

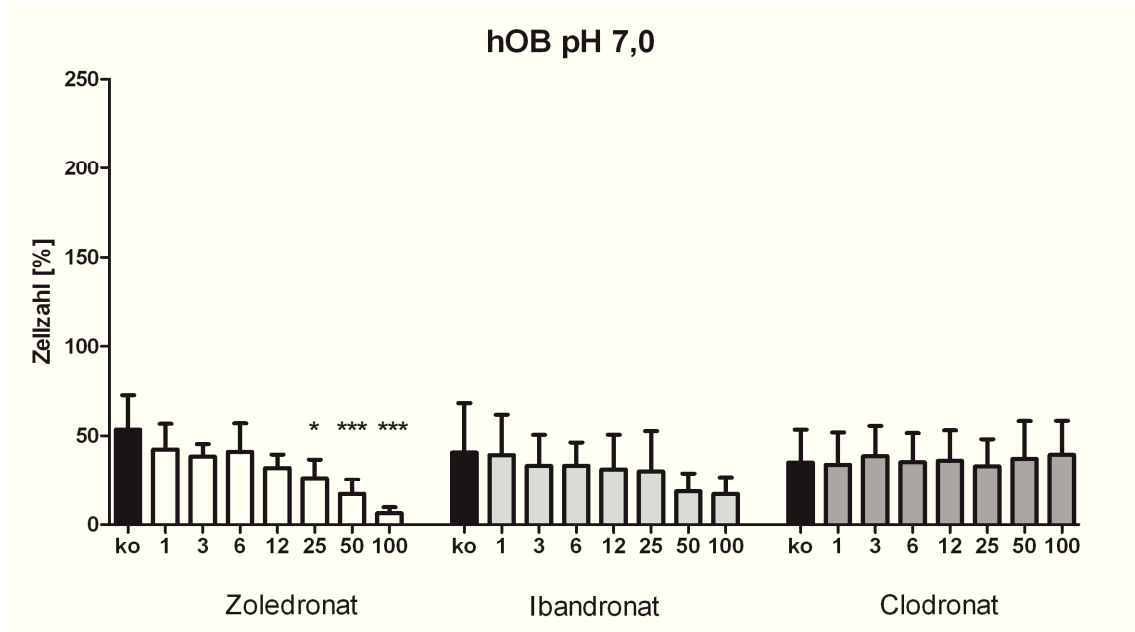
das Zellüberleben. Diese sind jedoch nicht signifikant wie bei den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten Zoledronat und Ibandronat.



**Abb. 12:** Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die **Zellzahl der hOB**. Die Osteoblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,4 drei Tage inkubiert. In 4 % Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit dem Hoechst Farbstoff gefärbt und unter Verwendung der Image J Software automatisch gezählt. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die Osteoblasten. Auch bei Clodronat ist ein Effekt zu erkennen.

Im Osteoblastenmedium bei einem pH-Wert von 7,0 wachsen die humanen Osteoblasten, wie bereits oben beschrieben, insgesamt schlechter als bei neutralem pH. Bei der Kontrollgruppe ohne Bisphosphonate überleben bei einem abgesenkten pH-Wert nur etwa die Hälfte der hOB im Vergleich zum neutralen Medium. Unter geringer Zugabe von Zoledronat (3 µM) lässt sich bereits eine deutliche Abnahme der Zellzahl erkennen. Mit steigender Zoledronatkonzentration sinkt die Zellzahl der Osteoblasten stetig. Bei einer Konzentration von 25 µM ist die Differenz zur Kontrolle bereits signifikant ( $p < 0,05$ ) und mit zunehmend höheren Dosierungen (50 und 100 µM) wird dieser Unterschied noch deutlicher ( $p < 0,001$ ). Ibandronat zeigt unter zunehmender Dosierung ebenfalls eine stetige Abnahme der Zellzahl, jedoch ist dieser Effekt nicht signifikant. Zoledronat wirkt auch hier stärker hemmend als Ibandronat. Clodronat zeigt bei pH 7,0 keinen Einfluss auf die Zellviabilität über den sauren pH-

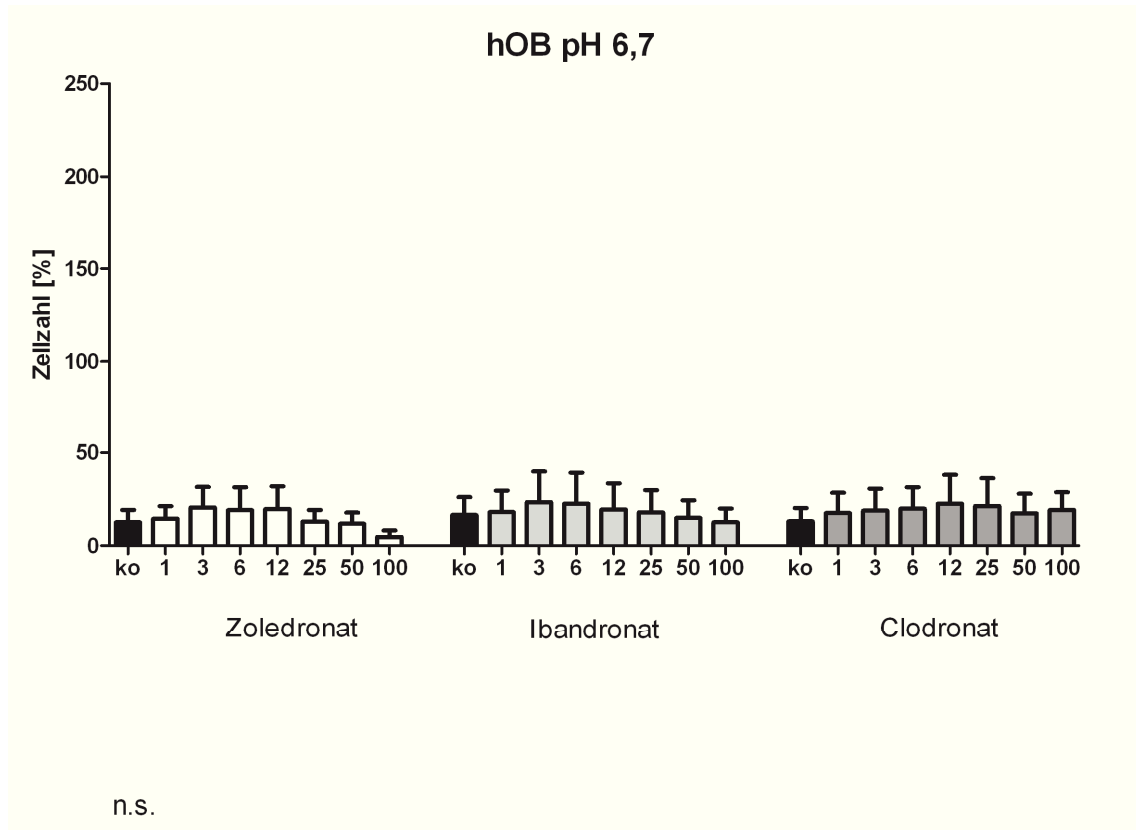
Wert hinaus. Sowohl bei niedrigen Konzentrationen von 3  $\mu\text{M}$ , als auch bei 100  $\mu\text{M}$  ist kein signifikanter Unterschied verglichen mit der Kontrolle erkennbar.



**Abb. 13:** Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die **Zellzahl der hOB**. Die Osteoblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,0 drei Tage inkubiert. In 4 % Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit dem Hoechst Farbstoff gefärbt und unter Verwendung der Image J Software automatisch gezählt. Zoledronat wirkt signifikant toxischer auf die Osteoblasten. Auch bei Ibandronat ist ein Unterschied zu erkennen. Clodronat hingegen zeigt keine Effekte. Der niedrige pH-Wert an sich reduziert die Zellzahl.

Bei einem pH-Wert des Kulturmediums von 6,7, ist die Osteoblastenzahl sehr stark reduziert. Der zunehmend saure pH-Wert hemmt das Zellwachstum sehr stark. Dies ist bereits bei der Kontrollgruppe ersichtlich, bei der die Anzahl der Osteoblasten deutlich unter 50 % liegt. Zoledronat zeigt jedoch auch hier noch einen Einfluss auf das Zellüberleben der verbliebenen Osteoblasten. Mit zunehmender Konzentration wird ihre Zahl weiter reduziert. Jedoch ist kein eindeutig signifikanter Unterschied bezüglich der Kontrolle erkennbar. Ab Werten von 25  $\mu\text{M}$  sinkt die Zellzahl und bei der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ist sie noch weiter reduziert. Bei den Bisphosphonaten Ibandronat und Clodronat sind die Unterschiede nach der Behandlung ebenfalls nicht signifikant verglichen mit der Kontrolle. Insgesamt zeigt die Behandlung der Osteoblasten mit Bisphosphonaten eine dosis- und pH-abhängige Reduktion

der Zellviabilität. Eine signifikante dosisabhängige Abnahme der Zellzahl lässt sich mit zunehmenden Konzentrationen und sinkendem pH-Werten (7,0 und 6,7) bei den beiden stickstoffhaltigen Bisphosphonaten beobachten, wobei Zoledronat bei äquimolaren Konzentrationen deutlichere Effekte als Ibandronat zeigte. Bei Clodronat konnten keine signifikanten dosis- und pH-abhängigen Veränderungen beobachtet werden.



**Abb. 14:** Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die **Zellzahl der hOB**. Die Osteoblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=6,7 drei Tage inkubiert. In 4 % Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit dem Hoechst Farbstoff gefärbt und unter Verwendung der Image J Software automatisch gezählt. Der niedrige pH-Wert selbst reduziert die Zellzahl. Bisphosphonate wirken hier im Vergleich mit der Kontrollgruppe weniger toxisch. Es ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Jedoch zeigt sich bei Zoledronat bei Konzentrationen von 100  $\mu$ M ein leichter Effekt.

## 4. Diskussion

Die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose stellt seit ihrer Erstbeschreibung 2003 (5, 6) Mediziner vor ein bis heute schwer zu beherrschendes Krankheitsbild, vor allem bei der intravenösen Therapie mit stickstoffhaltigen Bisphosphonaten (56). Unterschiedliche Theorien zu der Entstehung der Osteonekrose werden diskutiert, wie beispielsweise eine zu exzessive Unterdrückung des Knochenstoffwechsels, die spezifischen Infektionen mit Aktinomyzeten, antiangiogenetische Effekte und die direkte Schleimhauttoxizität durch Bisphosphonate (83). Während die exakte Entstehungsursache jedoch immer noch unklar erscheint und all diese Theorien nicht erklären können, weshalb die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose fast ausschließlich im Kieferknochen auftritt, scheint der Frage nach der lokalen Entzündung, wie sie häufig in der Mundhöhle auftritt, sowie den Veränderungen des pH-Wertes die damit einhergehen, eine Schlüsselrolle zukommen. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet werden.

Unlängst wurden Osteonekrosen im Kieferknochen auch unter Denosumab Therapie, einem antiresorptiv wirksamen monoklonalen Antikörper gegen den RANK-Liganden, beschrieben (97, 98). Auch unter Behandlung mit dem Angiogeneshemmer Bevacizumab, dem Tyrosinkinasehemmer Sunitinib (99) und dem Immunsuppressivum Everolimus in Monotherapie oder in Kombination mit Bisphosphonaten wurden Kiefernekrosen beobachtet (100, 101). Mit dem Wissen, dass Denosumab auch das Risiko für Osteonekrosen erhöht, wird deutlich, dass in Zukunft noch weitere Untersuchungen zur genauen Entstehung der Kiefernekrose notwendig sind (102).

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Bisphosphonatkonzentrationen und unterschiedlicher pH-Werte auf die Wirkung von stickstoffhaltigen und nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonaten auf humane mesenchymale Stammzellen und humane Osteoblasten.

#### **4.1. Der Einfluss von Bisphosphonatkonzentration und pH-Wert auf die Wirkung von stickstoffhaltigen und nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonaten auf humane mesenchymale Stammzellen und humane Osteoblasten**

Der exakte Pathomechanismus der medikamenten-assoziierten Nekrose bleibt bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar (28, 48, 59, 103). Es finden sich in der Literatur verschiedene Theorien zur Erklärung ihrer Entstehung. Als allgemein anerkannt gilt, dass die medikamenten-assoziierte Osteonekrose ein multifaktorielles Geschehen als Ursache hat (10). Einige Autoren sehen die Ursache in einer zu exzessiven Unterdrückung des Knochenstoffwechsels (30, 56, 104). Bisphosphonate haben eine starke Affinität zum Hydroxylapatit und lagern sich im Knochen an (105). Die Knochenresorption wird gehemmt und die Osteoklastenapoptose induziert. Es wird diskutiert, dass es zu einer Überakkumulation von Bisphosphonaten im Kieferknochen kommt, die schlussendlich zu einer Nekrose führt (106, 107). Die in der Literatur am häufigsten diskutierten Thesen zur Pathogenese sind zum einen, dass der Kieferknochen einer viel höheren Knochenurnoverrate unterliegt und andererseits, dass das Knochenremodelling durch die Bisphosphonate zu exzessiv unterdrückt wird (108, 109). Neben den bekannten hemmenden Effekten auf die Osteoklasten zeigt diese Arbeit, dass Bisphosphonate auch mit anderen Zellen interagieren können und dass vor allem stickstoffhaltige Bisphosphonate die biologische Aktivität und Zellviabilität von Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen hemmen. Jedoch erklärt dies allein nicht, weshalb der Kieferknochen fast ausschließlich von der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose betroffen ist. Bis heute sind keine eindeutigen Beweise erbracht worden, dass es zu einer Überakkumulation von Bisphosphonaten im Kieferknochen (106) im Vergleich zu den anderen Knochen des Skelettsystems kommt. In einer Studie von 2014 (18) konnte gezeigt werden, dass die Mandibula eine geringere Knochenumbaurate als die Maxilla aufweist und da die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose mit einer Inzidenz von zwei Dritteln im Unterkieferknochen auftritt, steht das im Widerspruch zu der oben genannten Hypothese. Darüberhinaus wird beschrieben, dass der Knochenstoffwechsel im Kiefer nicht übermäßig durch die Bisphosphonate unterdrückt wurde (106). Somit erscheint diese Theorie der übersteigerten Unterdrückung des Knochenstoffwechsels im Kieferknochen als

alleinige Erklärung der Entstehung der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose unwahrscheinlich.

Desweiteren wird die Ursache der Kiefernekrosen in der spezifischen Infektion mit Aktinomyzeten (110-113) gesehen. Aufgrund der regelmäßigen Präsenz verschiedener Aktinomyzetenstämme auch bei Osteoradionekrosen gilt jedoch diese Erklärung als alleinige Ursache für die Entstehung einer Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose als unwahrscheinlich (106, 114, 115) und auch wenn Aktinomyzeten regelmäßig in freiliegendem nekrotischen Knochen gefunden werden, treten Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen auch auf, wenn keine Aktinomyzeten vorhanden sind (115, 116).

Die antiangiogenetischen Eigenschaften der Bisphosphonate werden ebenfalls in der Literatur diskutiert (79, 117-119), zumal die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose zunächst als avaskuläre Nekrose beschrieben wurde (6). Dabei könnten die Bisphosphonate direkt toxisch auf die Endothelzellen wirken, die eine wichtige Rolle in der Gefäßneubildung spielen und darüber hinaus wird die zellgebundene Angiogenese gehemmt (106). Dies könnte zu einer Hemmung der knöchernen Gefäßneubildung führen. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass vor allem stickstoffhaltige Bisphosphonate zu einer Funktionsstörung des Zytoskeletts führen, sowie zu einer gestörten Genexpression (106, 120). Insgesamt betrachtet könnte die knöcherne Gefäßneubildung in der Pathogenese der Osteonekrose eine Rolle spielen, jedoch konnte während der Knochenneubildung keine eindeutige Beeinträchtigung durch die Bisphosphonate festgestellt werden (30, 93, 94). Der Oberkieferknochen weist aufgrund der ausgeprägten Spongiosastruktur eine höhere Durchblutung auf, als die Mandibula (11). Es zeigte sich, dass die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose häufiger in der Mandibula als in der Maxilla lokalisiert ist (18, 108, 121) und die Therapieverläufe im Unterkiefer schlechter sind (57). Weshalb jedoch fast nur der Kieferknochen und kein anderer Knochen des Skelettsystems betroffen ist (122), wird dadurch nicht erklärt.

Eine weitere mögliche Ursache für die Kiefernekrose wird darin gesehen, dass die Bisphosphonate direkt toxisch auf verschiedene Zellen wirken (91, 123-125) und somit auch auf Zellen der Mundschleimhaut. Dies könnte wiederum erklären, weshalb



bei Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrosen ein Symptom der freiliegende Knochen ist (106). Die direkte Bisphosphonattoxizität könnte eine Rolle in der Pathogenese spielen, da sie erklären würde, weshalb nach chirurgischen dentoalveolären Eingriffen, die Mukosawundheilung stark gehemmt ist (91). Jedoch ist das Merkmal des freiliegenden Knochens nicht in allen Stadien vorhanden, vor allem nicht in den frühen Stadien (126). Eine Kiefernekrose kann unter einer geschlossenen Schleimhaut jedoch bereits vorliegen (127). Es treten dann beispielsweise klinische Symptome wie das sog. Vincent Zeichen mit der Hypästhesie des N. alveolaris inferior auf oder die Nekrose zeigt sich radiologisch obwohl die Mukosa noch intakt ist (57). All diese Theorien könnten eine mögliche Rolle in der Pathogenese der Bisphosphonat- bzw. medikamenten-assoziierten Kiefernekrose spielen, jedoch konnte bisher keine von ihnen für sich allein oder in Kombination mit anderen umfassende Antworten auf folgende Fragen liefern (30, 55, 56, 106):

- Warum ist fast ausschließlich der Kieferknochen betroffen?
- Warum stellen stickstoffhaltige Bisphosphonate ein höheres Risiko dar eine Kiefernekrose zu entwickeln, als nicht-stickstoffhaltige Bisphosphonate?
- Was ist die Rolle sogenannter Risikofaktoren und „trigger events“ in der Entwicklung von BRONJ?

Eine Schlüsselrolle bei der Erklärung spielen dabei dentogene Infektionen. Über die Zähne und damit einhergehende potentielle Erkrankungen, steht der Kieferknochen im direkten Kontakt zu den pathogenen Keimen der Mundhöhle (111) und unterliegt damit im Vergleich zu dem restlichen Skelettsystems viel häufiger Entzündungen (56). In der aktuellen 5. Mundgesundheitsstudie, wurde gezeigt, dass 9 von 10 Senioren ab 75 Jahren an einer moderaten bis schweren entzündlichen Erkrankung des Zahnbettes, Parodontitis, leiden. Auch Karies und endodontische Probleme sind weit verbreitet (95). Somit unterliegt der Kieferknochen vermehrt akuten und chronischen Entzündungen und dies hat somit auch zahnärztliche und chirurgische Behandlungen zur Folge (128). Eine Studie von Aguirre et al. zeigte im Tiermodell, dass onkologische Konzentrationen von Zoledronat in Kombination mit einer Parodontitis Kiefernekrosen verursachen können (129).

Bekannt ist, dass es bei Infektionen, aber auch nach chirurgischen Eingriffen während des Wundheilungsprozesses zu einem Absinken des lokalen pH-Wertes kommt (30, 130). Dabei wurde beispielsweise in einer Studie von Wiese et al. in Abszessen ein pH-Wert von 6,2 gemessen (131). Eine wesentliche Eigenschaft der Bisphosphonate besteht in ihrer hohen Affinität zu dem Hydroxylapatit des Knochens. Sie binden bei neutralem pH-Wert an den Knochen und verhalten sich, solange sie gebunden sind, auch über Jahre inert (125). Im sauren Milieu werden die Bisphosphonate wieder gelöst und aktiviert. Physiologischerweise findet dies während der aktiven Resorption in den stark sauren Kontaktstellen zwischen Osteoklasten und Knochen statt (Howship Lakunen). Dabei wird das vormals gebundene Bisphosphonat aus seiner Bindung zum Kalzium gelöst. (25, 132). Darüberhinaus führt der niedrige pH-Wert zu einer Protonierung der stickstoffhaltigen Gruppen und somit zu einer Aktivierung der stickstoffhaltigen Bisphosphonate (30). Der niedrige pH-Wert im Rahmen von Entzündungen hat für sich selbst eine hemmende Wirkung auf die mesenchymale Stammzellen und Osteoblasten und diese Zellen wachsen im sauren Milieu sehr viel schlechter als bei neutralem pH, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Er kann jedoch auch zu einer lokalen Freisetzung und Aktivierung vor allem der stickstoffhaltigen Bisphosphonate aus dem Knochen bis hin zu potentiell toxischen Werten führen (23). Dies könnte ein wesentlicher Grund für die Entstehung Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrosen sein (30).

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, steigt mit sinkendem pH-Wert der zellhemmende Effekt der Bisphosphonate. Stickstoffhaltige Bisphosphonate in Lösung zeigen dabei stärkere hemmende Effekte auf die Zellaktivität und das Zellüberleben der mesenchymalen Stammzellen und der Osteoblasten als das nichtstickstoffhaltige Clodronat bei äquimolaren Konzentrationen. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die stickstoffhaltige Gruppe bei niedrigem pH-Wert protoniert und damit aktiviert wird. Auch unter diesen beiden Bisphosphonaten zeigen sich Unterschiede, wobei Zoledronat stärker zellinhibierend wirkt als Ibandronat. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Zoledronat schon bei einem pH-Wert von 7,4 bis zu 50% protoniert vorliegt im Vergleich zu Ibandronat (56). Diese Untersuchungen in vitro stimmen mit den klinischen Befunden überein, in denen die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose in den meisten Fällen nach einer intravenösen Langzeitbehandlung mit stickstoffhaltigen Bisphosphonaten auftraten (55, 78) und dabei vor al-

lem unter Zoledronattherapie beobachtet wurden (64, 81, 135, 136). Patienten, die mit einem hochpotenten stickstoffhaltigen Bisphosphonat therapiert werden, haben also ein erhöhtes Risiko eine BRONJ zu entwickeln (54). Verschiedene Studien zeigen, dass eine Nekrose des Kieferknochens gehäuft bei Zoledronat und Pamidronat auftritt (40, 64, 75) und dies vor allem nach intravenöser Applikation (70, 71, 137, 138). Die jeweilige Darreichungsform des Bisphosphonates (oral oder intravenös), die Dauer der Anwendung, sowie die Stärke der Wirkung des Bisphosphonates haben maßgeblichen Einfluss auf die Entwicklung einer BRONJ (109). Somit stellt die Therapie mit hochdosiertem stickstoffhaltigen Zoledronat in Kombination mit lokalen Entzündungen ein erhöhtes Risiko dar, eine Osteonekrose zu entwickeln (139). Im Gegensatz dazu haben Patienten unter oraler Bisphosphonatgabe ein niedrigeres Risiko (140, 141). In der Literatur finden sich nur vereinzelte Fälle einer Osteonekrose unter nicht-stickstoffhaltiger Bisphosphonatgabe (72). Obwohl die nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonate seit Jahrzehnten eingesetzt werden, sind nur sehr wenige Fälle einer BRONJ bekannt (142).

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese hemmenden Effekte der stickstoffhaltigen Bisphosphonate auf das Zellüberleben und die Zellaktivität der hMSC und hOB noch verstärkt wurde, wenn der pH-Wert sank. Der niedrige pH-Wert wirkte selbst hemmend auf das Zellwachstum der getesteten Zellen. Zoledronat zeigte sowohl bei den hOB als auch hMSC Zellen eine signifikant inhibierende Wirkung auf die Zellaktivität (siehe Abb. 5 und 11). Bereits bei leichter Abnahme des pH-Wertes auf 7,0 zeigt sich bei den hMSC und hOB eine signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Zellaktivität und des Zellüberlebens unter stickstoffhaltiger Bisphosphonatbehandlung. Dieser Effekt ist bei Zoledronat ausgeprägter als bei Ibandronat. Während bei Clodronat kein signifikanter Unterschied zu erkennen ist. Diese Ergebnisse stimmen mit den klinischen Daten überein, bei denen nachgewiesen werden konnte, dass die meisten Fälle einer Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose nach Entzündungen auftraten (106, 143) und dass die Häufigkeit einer BRONJ nach oraler Bisphosphonatbehandlung zwischen 0,01 und 0,05 % auftritt, nach Zahnextraktionen jedoch höher ist. Nach intravenöser Bisphosphonatbehandlung kann eine BRONJ mit einer Häufigkeit von 10 % auftreten (106).

An den Knochen gebundene Bisphosphonate verhalten sich inert. Wird jedoch eine kritische Konzentration von gelöstem Bisphosphonat erreicht, wirken Bisphosphonate nicht nur auf Osteoklasten, sondern wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, auch auf mesenchymale Stammzellen und Osteoblasten inhibierend. Diese hemmenden Effekte werden auch bei Endothelzellen und immunkompetenten Zellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten vermutet (106, 144, 145). Eine Studie von Agis et al. zeigte dies anhand von Fibroblastenversuchen. Dabei verhielt sich das an den Knochen gebundene Bisphosphonat inert, während die gleiche Konzentration stickstoffhaltiger Bisphosphonate in Lösung zellinhibierende Effekte zeigte (125). Eine weitere Studie von Ohe et al. vermutet als Ursache für die Entstehung der BRONJ eine Kombination aus der hemmenden Wirkung der Bisphosphonate auf die Osteoklasten und die Osteoblastendifferenzierung (96). Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass steigende Konzentrationen gelöster stickstoffhaltiger Bisphosphonate hemmend auf die Zellaktivität und das Zellüberleben Osteoblasten wirken. Dies bestätigt weitere Arbeiten, die feststellten, dass hohe Konzentrationen stickstoffhaltiger Bisphosphonate toxisch auf Osteoblasten wirken (85, 146). Im Gegensatz dazu gibt es in der Literatur einige Publikationen, die bei niedrigen Konzentrationen einen leicht anabolischen Effekt der Bisphosphonate zeigen (147, 148). Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, bei denen geringe Konzentrationen von Clodronat aber auch sehr niedrige Konzentrationen von Ibandronat einen stimulierenden Effekt auf das Zellwachstum haben (Tabelle 7, 9, 13,15).

Auch die Lokalisation und die Häufigkeit mit der die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose auftritt, spricht für die Entzündung und den damit einhergehenden niedrigen pH-Wert als mögliche Erklärung. Die meisten Fälle der BRONJ treten in der Mandibula auf, wobei eine Häufung in der Prämolaren- und Molarenregion festgestellt wurde (55). Aufgrund der größeren Wurzeloberfläche dieser Zähne und der dort oft auftretenden Entzündungen. Zusätzlich resultieren daraus gehäuft zahnärztliche und chirurgische Eingriffe. Dass der pH-Wert eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Kiefernekrose spielt, zeigt sich auch anhand der weiteren Nebenwirkungen der Bisphosphonate. Diese treten zum einen gehäuft im Magen-Darm-Trakt nach oraler Bisphosphonateinnahme auf (149, 150), wenn die Bisphosphonate im stark sauren Milieu der Magensäure gelöst und aktiviert vorliegen. Bei intravenösen Bisphosphonaten zeigen sich die Nebenwirkungen in der Niere (50), wo die Bisphosphonate in

Lösung treten und der pH-Wert des Primärurins nahe der Tubuluszellen sehr niedrig ist (106). Auch die Fälle einer Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose, die außerhalb des Kieferknochens beschrieben wurden, sprechen dafür. So wird vermehrt über Osteonekrosen im Bereich des äußeren Gehörganges berichtet (151, 152). Dieser Bereich ist ebenfalls vermehrt von Infektionen betroffen und weist nur eine dünne Integumentschicht auf. Auch hier kann es dadurch zu lokalen Veränderungen des pH-Wertes kommen.

## **4.2. Medikamenten-assoziierte Kiefernekrose**

Osteonekrosen im Kieferbereich scheinen nach neuestem Forschungsstand nicht mehr allein unter Bisphosphonattherapie aufzutreten (153-155). Neue antiresorptive Medikamente stehen im Verdacht allein oder in Kombination mit Bisphosphonaten zu Kiefernekrosen zu führen (156-158). 2010 traten erste Berichte über Osteonekrosen unter Denosumab, einem monoklonalen Antikörper gegen den RANK Liganden (97, 159) auf. Denosumab bindet an RANKL und hemmt dadurch die Stimulation und die Differenzierung der Osteoklasten und verhält sich somit ähnlich wie das Osteoprotegerin (OPG), welches von Osteoblasten und Stromazellen sezerniert wird (106, 160, 161). Denosumab wurde als alternatives antiresorptives Medikament zu den Bisphosphonaten eingeführt und deckt ein ähnliches therapeutisches Einsatzgebiet ab. Auch die Nebenwirkung einer Kiefernekrose, wie sie unter Bisphosphonattherapie beschrieben ist, taucht unter Denosumabbehandlung auf, obwohl die beiden Medikamente einen vollkommen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus aufweisen (161). Zukünftige Untersuchungen zu den neuen Antiresorptiva sind notwendig, da die Zahl der Denosumab-assoziierten Kiefernekrosen ansteigt und Denosumab vielfach eingesetzt wird. In diesem Zusammenhang wurde auch 2014 die Terminologie von der AAOMS in MRONJ (=medication-related osteonecrosis of the jaw) geändert (68). Die genaue Ursache für die Entstehung einer MRONJ ist noch unklar, jedoch zeigen Studien, dass die Häufigkeit der Denosumab-assoziierten Kiefernekrose ähnlich der der stickstoffhaltigen Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose ist (106, 162). Wie bei den Bisphosphonaten scheint ein erhöhtes Risiko der onkologischen Dosierung einherzugehen. Denosumab wird jedoch nicht in den Knochen aufgenommen, hat im Vergleich zu Bisphosphonaten eine geringere Halbwertszeit und scheint vornehmlich Wirkung gegenüber den Osteoklasten und nicht wie die Bis-

phosphonate gegenüber allen Zelllinien zu haben (106). Es ist jedoch unklar, ob Denosumab auf immunkompetente Zellen wirkt (106). Weitere Studien dazu werden zukünftig notwendig sein. Deshalb wird in der Prophylaxe und in der Therapie der Denosumab-assoziierten Osteonekrose das Vorgehen wie bei der BRONJ empfohlen (163).

Der antiangiogenetisch wirksame Antikörper Bevacizumab wird seit 2004 vor allem in der Therapie onkologischer Erkrankungen eingesetzt wie beispielsweise beim fortgeschrittenen Kolonkarzinom oder Ovarial- und Lungenkarzinomen aber auch in der Behandlung der Makuladegeneration (99, 164). Die Wirkung von Bevacizumab besteht dabei in der Hemmung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) (99). Neueste Berichte zeigen einen Zusammenhang zwischen der Bevacizumabtherapie und dem gehäuften Auftreten von Kiefernekrosen (155). Dabei handelt es sich jedoch vor allem um Fallberichte und es kann nicht genau gesagt werden, dass Bevacizumab allein ursächlich für das Auftreten der Osteonekrosen ist (99, 106, 165).

Ein weiteres Medikament ist der Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib, dessen Wirksamkeit auf antiangiogenetischen und immunomodulatorischen Effekten beruht (166). 2007 erfolgte die Zulassung von Sunitinib durch die FDA. Es wird seitdem erfolgreich in der Onkologie zum Beispiel in der Therapie neuroendokriner Tumore sowie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms eingesetzt (167). Seit 2009 wird über verschiedene Fälle berichtet, in denen Kiefernekrosen unter alleiniger Sunitinibtherapie oder in Kombination mit anderen Medikamenten auftraten (168, 169). Mögliche Ursachen werden in der Hemmung der Makrophagenfunktion, dem Rückgang der Blutversorgung und der Schleimhauttoxizität, die zum Zerfall der Epithelbarriere führt, gesehen. Jedoch scheint es wahrscheinlicher, dass Sunitinib, ähnlich wie Bevacizumab, als Komedikation in den Zusammenhang mit dem Auftreten von Kiefernekrosen gebracht wird (106). Ein hohes Risiko eine Osteonekrose zu entwickeln scheinen Patienten zu haben, die zur selben Zeit Bisphosphonate und Sunitinib erhalten (106, 170).

Das neueste Medikament, das im Verdacht steht Kiefernekrosen zu begünstigen ist Everolimus (100). 2003 wurde Everolimus, ein Immunsuppressivum aus der Grup-

pe der mTOR-Inhibitoren (mTOR = mammalian Target of Rapamycin), von der FDA zur Immunsuppression in der Transplantationsmedizin und zur Therapie des Mammakarzinoms, neuroendokriner Tumore, des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms und weiterer onkologischer Erkrankungen zugelassen (106). In jüngster Zeit erschienen Fallberichte über Everolimus-assoziierte Osteonekrosen (101). Intensivere Forschungen sind jedoch notwendig und ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Osteonekrosen und der Everolimus-therapie sind somit noch rein spekulativ. Die Einführung neuer Medikamente führte in den letzten Jahren zu einem Anstieg der Osteonekrosefälle. Ein Zusammenhang zwischen der Einnahme von Denosumab und dem Auftreten einer Kiefernekrose wurde bereits bewiesen (98), vor allem die Kombination von Bisphosphonaten und antiangiogenetisch wirksamen Medikamenten wie Sunitinib und Bevacizunab scheinen das Risiko zu erhöhen (171). Der genaue Pathomechanismus ist jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt.

### **4.3. Therapieansätze**

Da sich sowohl die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose, als auch die oben beschriebene Medikamenten-assoziierte Kiefernekrose als schwer zu behandelndes Krankheitsbild (172) zeigen, gelten bisher die gleichen Richtlinien für die Therapie. Ein hoher Stellenwert kommt der frühzeitigen Diagnose zu. Da Osteonekrosen im Frühstadium einfacher zu therapieren sind und sich günstigere Heilungstendenzen zeigen als im Spätstadium (106). Zudem ist es unverzichtbar, dass die Therapie interdisziplinär zwischen den behandelnden Ärzten, Zahnärzten und spezialisierten Kliniken koordiniert verläuft. Die AAOMS hat 2014 eine stadienspezifische Behandlung empfohlen, die sowohl konservative als auch chirurgische Konzepte beinhaltet (67, 68, 173). So wird im Stadium 0 und 1 ein eher konservatives Vorgehen empfohlen, das aus lokal begrenztem Debridement, lokal antiseptischen Maßnahmen und einer Antibiose besteht. Ab dem Stadium 2 wird die chirurgische Therapie empfohlen. Diese beinhaltet die chirurgische Abtragung der Osteonekrose, den speichel-dichten Wundverschluss sowie eine antibiotischen Therapie. Studien zeigen jedoch, dass die Erfolgsrate bei chirurgischen Maßnahmen mit vollständiger Entfernung des nekrotischen Knochens höher ist, als bei lokalem Debridement (174, 175). Daher weichen die Empfehlungen der deutschsprachigen Fachgesellschaften sowie das Therapiekonzept der Ludwig-Maximilians-Universität in München von den Empfeh-

lungen der AAOMS ab. Vor dem Hintergrund der hohen Erfolgchancen chirurgischer Therapieansätze wird eine zeitnahe chirurgische Intervention auch im Frühstadium empfohlen (176). Zusätzlich erfolgt die histologische Diagnosesicherung, um differentialdiagnostisch Metastasen einer malignen Grunderkrankung auszuschließen.

In diesem Zusammenhang wurde ein weiterer Therapieansatz von Pautke et al. mit der fluoreszenzorientierte Osteonekroseabtragung als eine zuverlässige Methode zur chirurgischen Therapie und der genaueren Abgrenzung der osteonekrotischen Bereiche gegenüber vitalem Knochen etabliert (176). Das allgemeine Risiko eine Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose zu entwickeln, hängt wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde, von der Grunderkrankung und der damit einhergehenden Art des Bisphosphonates ab sowie von der Dauer und Dosis des Bisphosphonates. Ein individuelles Risiko kann dabei nicht exakt vorhergesagt werden und somit kommt der Prophylaxe und der dentalen Sanierung mit Beseitigung aller möglichen entzündlichen Prozesse vor Therapiebeginn eine wichtige Bedeutung zu (72, 177-179). Dazu zählen die Extraktion bzw. operative Entfernung nicht erhaltungswürdiger Zähne oder Implantate, die Therapie der Periimplantitis sowie die systematische Parodontaltherapie. Darüberhinaus sollten teilretinierte Zähne mit chronischer Perikoronitis, Zysten und Fremdkörper entfernt werden. Avitale Zähne sollten wurzelkanalbehandelt werden und Wurzelspitzenresektionen sollten bei vorliegender Indikation erfolgen. Zudem sollten Prothesen auf mögliche Druckstellen untersucht und diese entfernt werden (106, 180). Ein engmaschiges Recall-System sowie intensive Mundhygieneinstruktionen und -motivationen zeigen hierbei Erfolge. Auch während und nach Therapie mit antiresorptiv wirksamen Medikamenten sind zahnärztliche und mund-, kiefer-, gesichtschirurgische Eingriffe durchführbar, wenn möglich sollten jedoch konservative Behandlungsmöglichkeiten bevorzugt werden. Chirurgische Eingriffe sollten dabei unter antibiotischer Abschirmung sowie mit einem plastischen und spannungsfreiem Wundverschluss erfolgen (181). Ein Absetzen der Bisphosphonate unter laufender Therapie zum Zwecke zahnärztlich-chirurgischer Eingriffe, die sogenannte „drug holiday“ wird nicht zwangsläufig empfohlen, da aufgrund der hohen Knochenbindung der Bisphosphonate und ihrer langen Halbwertszeit, eine Elimination aus dem Organismus nicht in einem kurzen Zeitraum erfolgen kann. Unter Deno-



sumabtherapie wird jedoch über ein mögliches Aussetzen der Behandlung diskutiert (172).

Die Effektivität der prophylaktischen Maßnahmen vor Beginn der Langzeittherapie mit Bisphosphonaten gilt als erwiesen (75, 179). Die Vermeidung von entzündlichen Prozessen (109) und den damit verbundenen lokalen pH-Wert-Absenkungen im Kieferbereich durch die Sanierung vor und unter Bisphosphonat-Therapie kommt eine wesentliche Stellung im Rahmen der Prophylaxe Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen zu. Auch dies scheint die Rolle lokaler Gewebe-pH-Wert-Verschiebungen in der Pathogenesetheorie der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose zu belegen.

## 5. Zusammenfassung

Hintergrund und Fragestellung:

Bisphosphonate werden seit über 40 Jahren erfolgreich in der Therapie von Osteoporose, ossären Metastasierungen solider Tumore sowie der Behandlung des multiplen Myeloms eingesetzt. Seit ihrer Erstbeschreibung 2003 hat sich die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose zu einem häufigen und ernsthaften klinischen Problem entwickelt. Obwohl sich seitdem viele Studien mit der Pathophysiologie und der Behandlung der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose beschäftigen, bleibt die exakte Pathogenese weiterhin unklar. Alle bisherigen Theorien erklären nicht, weshalb fast ausschließlich der Kieferknochen betroffen ist. Eine neue Hypothese zur Pathogenese lässt dem pH-Wert eine Schlüsselrolle zukommen, da bei niedrigen pH-Werten, wie sie beispielsweise im Rahmen von Entzündungen auftreten, Bisphosphonate die vorher im Knochen gebunden waren freigesetzt und aktiviert werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Bisphosphonatdosierungen und pH-Werte auf mesenchymale Stammzellen und Osteoblasten in-vitro, da diesen Zellen im Rahmen der Wundheilung und des Knochenumbaus eine wesentliche Rolle zukommt.

Material und Methode:

Der Einfluss von zwei stickstoffhaltigen Bisphosphonaten (Zoledronat und Ibandronat) und eines nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonates (Clodronat) auf humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) und humane Osteoblasten (hOB) wurde hinsichtlich der Konzentration und des lokalen pH-Wertes unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Gemessen wurde die Zellaktivität mit Hilfe eines WST-assay, sowie das Zellüberleben mit der Hoechst-Färbung und der Image J Software. Der pH-Wert wurde über den Untersuchungszeitraum von drei Tagen mittels Puffer auf 7,4; 7,0 und 6,7 konstant gehalten.

**Ergebnisse:**

Der Einfluss von stickstoffhaltigen (Zoledronat, Ibandronat) und nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonaten (Clodronat) auf die untersuchten Zellen unterscheidet sich deutlich. Stickstoffhaltige Bisphosphonate zeigen signifikante konzentrations- und pH-Wert-abhängige Einflüsse auf die Zellaktivität und das Zellüberleben humaner mesenchymaler Stammzellen und Osteoblasten. Mit zunehmender stickstoffhaltiger Bisphosphonatkonzentration (Zoledronat, Ibandronat) und sinkenden pH-Werten, nimmt die Zahl der überlebenden Zellen, sowie die Zellaktivität signifikant ab. Hierbei sind die Effekte unter Behandlung mit Zoledronat stärker als bei Ibandronat. Äquimolare Konzentrationen von Clodronat zeigen mit zunehmender Dosierung und sinkenden pH-Werten keine signifikanten Effekte hinsichtlich Zellaktivität und Zellüberleben.

**Schlussfolgerung:**

Hohe Konzentrationen von stickstoffhaltigen Bisphosphonaten und lokalen pH-Wert Verschiebungen im Gewebe, wie sie im Rahmen von entzündlichen Prozessen im Kiefer auftreten, könnten eine Schlüsselrolle bei der Entstehung Bisphosphonat-assoziiertes Kiefernekrosen spielen. Dies würde auch erklären, weshalb die Nekrosen fast ausschließlich im Kieferbereich auftreten und weshalb die von zahlreichen Fachgesellschaften empfohlenen Prophylaxemaßnahmen vor und unter Bisphosphonattherapie Wirkung zeigen. Die Vermeidung entzündlicher Prozesse im Kiefer durch zahnärztliche Sanierung vor und unter Therapie sollte auch zukünftig eine wesentliche Rolle in der Prophylaxe der Bisphosphonat- sowie der Medikamenten-assoziierten Kiefernekrose spielen.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Grötz K A KT. Zahnärztliche Betreuung von Patienten unter/nach Bisphosphonat-Medikation. DGZMK 2006.
- (2) Rosini S, Rosini S, Bertoldi I, Frediani B. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19: 3309-3317.
- (3) Faiman B, Pillai AL, Benghiac AG. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: historical, ethical, and legal issues associated with prescribing. *J Adv Pract Oncol* 2013; 4: 25-35.
- (4) Piesold JU, Al-Nawas B, Grotz KA. [Osteonecrosis of the jaws by long term therapy with bisphosphonates]. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG* 2006; 10: 287-300.
- (5) Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003; 21: 4253-4254.
- (6) Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2003; 61: 1115-1117.
- (7) Paiva-Fonseca F, Santos-Silva AR, Della-Coletta R, Vargas PA, Lopes MA. Alendronate-associated osteonecrosis of the jaws: a review of the main topics. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014; 19: e106-111.
- (8) Russell RG, Rogers MJ, Frith JC, et al. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1999; 14 Suppl 2: 53-65.
- (9) Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* 2011; 49: 2-19.
- (10) Eid A, Atlas J. The role of bisphosphonates in medical oncology and their association with jaw bone necrosis. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America* 2014; 26: 231-237.
- (11) Bartl R vTE, Bartl C. Bisphosphonat-Manual Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 2006.
- (12) Fleisch H. [Introduction to bisphosphonates. History and functional mechanisms]. *Der Orthopade* 2007; 36: 103-104, 106-109.
- (13) Frediani B, Bertoldi I. Clodronate: new directions of use. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2015; 12: 97-108.

- (14) Van Acker HH, Anguille S, Willemen Y, Smits EL, Van Tendeloo VF. Bisphosphonates for cancer treatment: Mechanisms of action and lessons from clinical trials. *Pharmacol Ther* 2016; 158: 24-40.
- (15) Luftner D, Henschke P, Possinger K. Clinical value of bisphosphonates in cancer therapy. *Anticancer Res* 2007; 27: 1759-1768.
- (16) Noriega Aldave AP, Jaiswal S. Severe resistant hypocalcemia in multiple myeloma after zoledronic acid administration: a case report. *J Med Case Rep* 2014; 8: 353.
- (17) Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1998; 13: 581-589.
- (18) Ristow O, Gerngross C, Schwaiger M, et al. Is bone turnover of jawbone and its possible over suppression by bisphosphonates of etiologic importance in pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis? *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2014; 72: 903-910.
- (19) Favia G, Tempesta A, Limongelli L, Crincoli V, Maiorano E. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws: Considerations on a New Antiresorptive Therapy (Denosumab) and Treatment Outcome after a 13-Year Experience. *Int J Dent* 2016; 2016: 1801676.
- (20) Katsarelis H, Shah NP, Dhariwal DK, Pazianas M. Infection and medication-related osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res* 2015; 94: 534-539.
- (21) Russell RG, Xia Z, Dunford JE, et al. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007; 1117: 209-257.
- (22) Russell RG. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics* 2007; 119 Suppl 2: S150-162.
- (23) Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 2643-2658.
- (24) Wada S, Kamiya S, Ono K. [Bisphosphonates: the molecular targets and mechanisms of action]. *Clin Calcium* 2005; 15: 819-824.
- (25) Sato M, Grasser W, Endo N, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *The Journal of clinical investigation* 1991; 88: 2095-2105.
- (26) Hoshino H, Yamazaki K. [Mechanisms of action in bisphosphonates]. *Clin Calcium* 2005; 15: 88-92.

- (27) Carano A, Teitelbaum SL, Konsek JD, Schlesinger PH, Blair HC. Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro. *The Journal of clinical investigation* 1990; 85: 456-461.
- (28) Wang EP, Kaban LB, Strewler GJ, Raje N, Troulis MJ. Incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma and breast or prostate cancer on intravenous bisphosphonate therapy. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2007; 65: 1328-1331.
- (29) Marx RE. A decade of bisphosphonate bone complications: what it has taught us about bone physiology. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 2014; 29: e247-258.
- (30) Otto S, Hafner S, Mast G, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: is pH the missing part in the pathogenesis puzzle? *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2010; 68: 1158-1161.
- (31) Reid IR, Bolland MJ, Grey AB. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone* 2007; 41: 318-320.
- (32) Seeley DG, Browner WS, Nevitt MC, Genant HK, Scott JC, Cummings SR. Which fractures are associated with low appendicular bone mass in elderly women? The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Annals of internal medicine* 1991; 115: 837-842.
- (33) Bilston LE, Little DG, Smith NC, Williams P, Briody J. Zoledronic acid improves the mechanical properties of normal and healing bone. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2002; 17: 716-718.
- (34) Papapetrou PD. Bisphosphonate-associated adverse events. *Hormones (Athens)* 2009; 8: 96-110.
- (35) Sieber P, Lardelli P, Kraenzlin CA, Kraenzlin ME, Meier C. Intravenous bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: safety profiles of zoledronic acid and ibandronate in clinical practice. *Clin Drug Investig* 2013; 33: 117-122.
- (36) Zimmermann EA, Schaible E, Gludovatz B, et al. Intrinsic mechanical behavior of femoral cortical bone in young, osteoporotic and bisphosphonate-treated individuals in low- and high energy fracture conditions. *Sci Rep* 2016; 6: 21072.
- (37) Ralston SH, Langston AL, Reid IR. Pathogenesis and management of Paget's disease of bone. *Lancet* 2008; 372: 155-163.
- (38) Diel IJ, Fogelman I, Al-Nawas B, et al. Pathophysiology, risk factors and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Is there a diverse relationship of amino- and non-aminobisphosphonates? *Critical reviews in oncology/hematology* 2007; 64: 198-207.
- (39) Reid IR. Osteonecrosis of the jaw: who gets it, and why? *Bone* 2009; 44: 4-10.

- (40) Bamias A, Kastritis E, Bamia C, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; 23: 8580-8587.
- (41) Green JR. Antitumor effects of bisphosphonates. *Cancer* 2003; 97: 840-847.
- (42) Saad F. The role of bisphosphonates in the management of prostate cancer. *Current oncology reports* 2006; 8: 221-227.
- (43) van der Pluijm G, Vloedgraven H, van Beek E, van der Wee-Pals L, Lowik C, Papapoulos S. Bisphosphonates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrices in vitro. *The Journal of clinical investigation* 1996; 98: 698-705.
- (44) Gobel A, Thiele S, Browne AJ, et al. Combined inhibition of the mevalonate pathway with statins and zoledronic acid potentiates their anti-tumor effects in human breast cancer cells. *Cancer Lett* 2016.
- (45) Huang CY, Wang L, Feng CJ, et al. Bisphosphonates enhance EGFR-TKIs efficacy in advanced NSCLC patients with EGFR activating mutation: A retrospective study. *Oncotarget* 2015.
- (46) Ottanelli S. Prevention and treatment of bone fragility in cancer patient. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2015; 12: 116-129.
- (47) Kademani D, Koka S, Lacy MQ, Rajkumar SV. Primary surgical therapy for osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic* 2006; 81: 1100-1103.
- (48) Weitzman R, Sauter N, Eriksen EF, et al. Critical review: updated recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in cancer patients--May 2006. *Critical reviews in oncology/hematology* 2007; 62: 148-152.
- (49) Diel IJ, Bergner R, Grotz KA. Adverse effects of bisphosphonates: current issues. *The journal of supportive oncology* 2007; 5: 475-482.
- (50) Pozzi S, Raje N. The role of bisphosphonates in multiple myeloma: mechanisms, side effects, and the future. *Oncologist* 2011; 16: 651-662.
- (51) Afif H, Mukka S, Sjoden G, Sayed-Noor AS. Do Bisphosphonate-related Atypical Femoral Fractures and Osteonecrosis of the Jaw Affect the Same Group of Patients? A Pilot Study. *Orthop Rev (Pavia)* 2014; 6: 5067.
- (52) Edwards BJ, Gounder M, McKoy JM, et al. Pharmacovigilance and reporting oversight in US FDA fast-track process: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *The lancet oncology* 2008; 9: 1166-1172.
- (53) Wang J, Goodger NM, Pogrel MA. Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2003; 61: 1104-1107.

- (54) Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2004; 62: 527-534.
- (55) Otto S, Schreyer C, Hafner S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - Characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2012; 40: 303-309.
- (56) Otto S, Pautke C, Opelz C, et al. Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration, and acidic milieu on the pathomechanism. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2010; 68: 2837-2845.
- (57) Otto S, Hafner S, Grotz KA. The role of inferior alveolar nerve involvement in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2009; 67: 589-592.
- (58) Zervas K, Verrou E, Teleioudis Z, et al. Incidence, risk factors and management of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma: a single-centre experience in 303 patients. *British journal of haematology* 2006; 134: 620-623.
- (59) Badros A, Weikel D, Salama A, et al. Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006; 24: 945-952.
- (60) Hoff AO, Toth BB, Altundag K, et al. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2008; 23: 826-836.
- (61) Groetz KA, Al-Nawas B. Persisting alveolar sockets-a radiologic symptom of BP-ONJ? *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2006; 64: 1571-1572.
- (62) Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA, Sturm I, Massenkeil G. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. *Oral oncology* 2008; 44: 857-869.
- (63) Reid IR, Cundy T. Osteonecrosis of the jaw. *Skeletal radiology* 2009; 38: 5-9.
- (64) Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *Journal of oral and maxillofacial*



- surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 2005: 63: 1567-1575.
- (65) Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. *The lancet oncology* 2006: 7: 508-514.
- (66) Pazianas M, Miller P, Blumentals WA, Bernal M, Kothawala P. A review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis treated with oral bisphosphonates: prevalence, risk factors, and clinical characteristics. *Clinical therapeutics* 2007: 29: 1548-1558.
- (67) Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2009: 67: 2-12.
- (68) Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2014: 72: 1938-1956.
- (69) Lo JC, O'Ryan FS, Gordon NP, et al. Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2010: 68: 243-253.
- (70) Wessel JH, Dodson TB, Zavras AI. Zoledronate, smoking, and obesity are strong risk factors for osteonecrosis of the jaw: a case-control study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2008: 66: 625-631.
- (71) Walter C, Al-Nawas B, Frickhofen N, et al. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Head & face medicine* 2010: 6: 11.
- (72) Abu-Id MH, Warnke PH, Gottschalk J, et al. "Bis-phossy jaws" - high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2008: 36: 95-103.
- (73) Rizzoli R, Burlet N, Cahall D, et al. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonate treatment for osteoporosis. *Bone* 2008: 42: 841-847.
- (74) Khamaisi M, Regev E, Yarom N, et al. Possible association between diabetes and bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2007: 92: 1172-1175.
- (75) Dimopoulos MA, Kastiris E, Anagnostopoulos A, et al. Osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma treated with bisphosphonates: evidence

- of increased risk after treatment with zoledronic acid. *Haematologica* 2006; 91: 968-971.
- (76) Novince CM, Ward BB, McCauley LK. Osteonecrosis of the jaw: an update and review of recommendations. *Cells, tissues, organs* 2009; 189: 275-283.
- (77) Yazdi PM, Schiodt M. Dentoalveolar trauma and minor trauma as precipitating factors for medication-related osteonecrosis of the jaw (ONJ): a retrospective study of 149 consecutive patients from the Copenhagen ONJ Cohort. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2015; 119: 416-422.
- (78) Kos M. Incidence and risk predictors for osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *Arch Med Sci* 2015; 11: 319-324.
- (79) Ficarra G, Beninati F. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an update on clinical, pathological and management aspects. *Head Neck Pathol* 2007; 1: 132-140.
- (80) Estilo CL, Van Poznak CH, Williams T, et al. Osteonecrosis of the maxilla and mandible in patients with advanced cancer treated with bisphosphonate therapy. *Oncologist* 2008; 13: 911-920.
- (81) Otto S, Abu-Id MH, Fedele S, et al. Osteoporosis and bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw: not just a sporadic coincidence--a multi-centre study. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2011; 39: 272-277.
- (82) Morrison A, Khan A, Tetradis S, Peters E. Osteonecrosis of the Jaw: An Update for Dentists. *J Can Dent Assoc* 2015; 81: f19.
- (83) Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2009; 67: 61-70.
- (84) Walter C, Klein MO, Pabst A, Al-Nawas B, Duschner H, Ziebart T. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clinical oral investigations* 2010; 14: 35-41.
- (85) Orriss IR, Key ML, Colston KW, Arnett TR. Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. *Journal of cellular biochemistry* 2009; 106: 109-118.
- (86) Huja SS, Fernandez SA, Hill KJ, Li Y. Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 2006; 288: 1243-1249.
- (87) Vignery A, Baron R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *The Anatomical record* 1980; 196: 191-200.

- (88) Bauss F, Pfister T, Papapoulos S. Ibandronate uptake in the jaw is similar to long bones and vertebrae in the rat. *Journal of bone and mineral metabolism* 2008; 26: 406-408.
- (89) Wolf AM, Rumpold H, Tilg H, Gastl G, Gunsilius E, Wolf D. The effect of zoledronic acid on the function and differentiation of myeloid cells. *Haematologica* 2006; 91: 1165-1171.
- (90) Roelofs AJ, Jauhiainen M, Monkkonen H, Rogers MJ, Monkkonen J, Thompson K. Peripheral blood monocytes are responsible for gammadelta T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *British journal of haematology* 2009; 144: 245-250.
- (91) Reid IR, Cornish J. Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8: 90-96.
- (92) Sonis ST, Elting LS, Keefe D, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 2004; 100: 1995-2025.
- (93) Deckers MM, Van Beek ER, Van Der Pluijm G, et al. Dissociation of angiogenesis and osteoclastogenesis during endochondral bone formation in neonatal mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2002; 17: 998-1007.
- (94) Cetinkaya BO, Keles GC, Ayas B, Gurgor P. Effects of risedronate on alveolar bone loss and angiogenesis: a stereologic study in rats. *Journal of periodontology* 2008; 79: 1950-1961.
- (95) Jordan RA, Micheelis W, Cholmakow-Bodechtel C, et al. Fünfte Mundgesundheitsstudie (DMS V) - Kompakt: KZBV, BZÄK, 2016.
- (96) Ohe JY, Kwon YD, Lee HW. Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived osteoblasts. *Clinical oral investigations* 2012; 16: 1153-1159.
- (97) Aghaloo TL, Felsenfeld AL, Tetradis S. Osteonecrosis of the jaw in a patient on Denosumab. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2010; 68: 959-963.
- (98) Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, et al. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; 28: 5132-5139.
- (99) Troeltzsch M, Woodlock T, Kriegelstein S, Steiner T, Messlinger K, Troeltzsch M. Physiology and pharmacology of nonbisphosphonate drugs implicated in osteonecrosis of the jaw. *J Can Dent Assoc* 2012; 78: c85.
- (100) Giancola F, Campisi G, Lo Russo L, Muzio LL, Di Fede O. Osteonecrosis of the jaw related to everolimus and bisphosphonate: a unique case report? *Ann Stomatol (Roma)* 2013; 4: 20-21.

- (101) Kim DW, Jung YS, Park HS, Jung HD. Osteonecrosis of the jaw related to everolimus: a case report. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2013; 51: e302-304.
- (102) Khan AA, Morrison A, Hanley DA, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2015; 30: 3-23.
- (103) Rasmusson L, Abtahi J. Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: an update on pathophysiology, risk factors, and treatment. *Int J Dent* 2014; 2014: 471035.
- (104) Wehrhan F, Amann K, Mobius P, et al. BRONJ-related jaw bone is associated with increased Dlx-5 and suppressed osteopontin-implication in the site-specific alteration of angiogenesis and bone turnover by bisphosphonates. *Clinical oral investigations* 2015; 19: 1289-1298.
- (105) Mashiba T. [Bone Cell Biology Assessed by Microscopic Approach. The effects of bisphosphonates on bone remodeling, microdamage accumulation and fracture repair process]. *Clin Calcium* 2015; 25: 1537-1540.
- (106) Otto S. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws: Bisphosphonates, Denosumab, and New Agents: Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg 2015, 2015.
- (107) Sedghizadeh PP, Jones AC, LaVallee C, et al. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling for assessing risk of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; 115: 224-232.
- (108) Ristow O, Gerngross C, Schwaiger M, et al. Does regular zoledronic acid change the bone turnover of the jaw in men with metastatic prostate cancer: a possible clue to the pathogenesis of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw? *J Cancer Res Clin Oncol* 2014; 140: 487-493.
- (109) Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Annals of internal medicine* 2006; 144: 753-761.
- (110) Allen MR. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: moving from the bedside to the bench. *Cells, tissues, organs* 2009; 189: 289-294.
- (111) Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2008; 66: 767-775.
- (112) Wanger G, Gorby Y, El-Naggar MY, et al. Electrically conductive bacterial nanowires in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; 115: 71-78.

- (113) Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW, Sedghizadeh PP. The role of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate therapy. *Curr Osteoporos Rep* 2010; 8: 40-48.
- (114) Hansen T, Kunkel M, Kirkpatrick CJ, Weber A. Actinomyces in infected osteoradionecrosis--underestimated? *Hum Pathol* 2006; 37: 61-67.
- (115) Hansen T, Kunkel M, Springer E, et al. Actinomycosis of the jaws--histopathological study of 45 patients shows significant involvement in bisphosphonate-associated osteonecrosis and infected osteoradionecrosis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2007; 451: 1009-1017.
- (116) Filleul O, Crompton E, Saussez S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1117-1124.
- (117) Ziebart T, Pabst A, Klein MO, et al. Bisphosphonates: restrictions for vasculogenesis and angiogenesis: inhibition of cell function of endothelial progenitor cells and mature endothelial cells in vitro. *Clinical oral investigations* 2011; 15: 105-111.
- (118) Wood J, Bonjean K, Ruetz S, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 1055-1061.
- (119) Petcu EB, Ivanovski S, Wright RG, Slevin M, Miroiu RI, Brinzaniuc K. Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw (BRONJ): an anti-angiogenic side-effect? *Diagn Pathol* 2012; 7: 78.
- (120) Pabst AM, Ziebart T, Ackermann M, Konerding MA, Walter C. Bisphosphonates' antiangiogenic potency in the development of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: influence on microvessel sprouting in an in vivo 3D Matrigel assay. *Clinical oral investigations* 2014; 18: 1015-1022.
- (121) Martins MA, Martins MD, Lascaia CA, et al. Association of laser phototherapy with PRP improves healing of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in cancer patients: a preliminary study. *Oral oncology* 2012; 48: 79-84.
- (122) Simon MJ, Niehoff P, Kimmig B, Wiltfang J, Acil Y. Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clinical oral investigations* 2010; 14: 51-58.
- (123) Arai N, Inoue S, Tomihara K, Tsuno H, Noguchi M. In vitro synergistic effects of zoledronic acid and calcium on viability of human epithelial cells. *Oral Dis* 2013; 19: 200-205.
- (124) Dik EA, van Es RJ, Bergsma JE. [A toxic reaction of the oral mucosa to alendronate (Fosamax)]. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 2010; 117: 387-390.
- (125) Agis H, Blei J, Watzek G, Gruber R. Is zoledronate toxic to human periodontal fibroblasts? *J Dent Res* 2010; 89: 40-45.

- (126) Aghaloo TL, Dry SM, Mallya S, Tetradis S. Stage 0 osteonecrosis of the jaw in a patient on denosumab. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2014; 72: 702-716.
- (127) Patel S, Choyee S, Uyanne J, et al. Non-exposed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a critical assessment of current definition, staging, and treatment guidelines. *Oral Dis* 2012; 18: 625-632.
- (128) Otto S, Troltsch M, Jambrovic V, et al. Tooth extraction in patients receiving oral or intravenous bisphosphonate administration: A trigger for BRONJ development? *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2015; 43: 847-854.
- (129) Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, et al. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2012; 27: 2130-2143.
- (130) Hays RC, Mandell GL. PO<sub>2</sub>, pH, and redox potential of experimental abscesses. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974; 147: 29-30.
- (131) Wiese KG. [Electrolyte concentration, real and osmotic pressure in abscesses]. *Zentralbl Chir* 1994; 119: 54-59.
- (132) Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008; 19: 733-759.
- (133) Voss PJ, Stoddart M, Ziebart T, et al. Zoledronate induces osteonecrosis of the jaw in sheep. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2015; 43: 1133-1138.
- (134) Thumbigere-Math V, Tu L, Huckabay S, et al. A retrospective study evaluating frequency and risk factors of osteonecrosis of the jaw in 576 cancer patients receiving intravenous bisphosphonates. *Am J Clin Oncol* 2012; 35: 386-392.
- (135) Lazarovici TS, Yahalom R, Taicher S, Elad S, Hardan I, Yarom N. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a single-center study of 101 patients. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2009; 67: 850-855.
- (136) Mavrokokki T, Cheng A, Stein B, Goss A. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2007; 65: 415-423.
- (137) Van den Wyngaert T, Claeys T, Huizing MT, Vermorken JB, Fossion E. Initial experience with conservative treatment in cancer patients with osteonecrosis of the jaw (ONJ) and predictors of outcome. *Annals of oncology : official*

- journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2009: 20: 331-336.
- (138) Vahtsevanos K, Kyrgidis A, Verrou E, et al. Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009: 27: 5356-5362.
- (139) Sawatari Y, Marx RE. Bisphosphonates and bisphosphonate induced osteonecrosis. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America* 2007: 19: 487-498, v-vi.
- (140) Jeffcoat MK. Safety of oral bisphosphonates: controlled studies on alveolar bone. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 2006: 21: 349-353.
- (141) AAOMS. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons: Position Paper on Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaws - 2009 Update. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2009: 67: 2-12.
- (142) Ryan JL, Larson E. Osteonecrosis of the Torus Palatinus in the Setting of Long-Term Oral Bisphosphonate Use--A Case Report. *S D Med* 2016: 69: 23-25.
- (143) Lesclous P, Abi Najm S, Carrel JP, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a key role of inflammation? *Bone* 2009: 45: 843-852.
- (144) Pazianas M. Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages. *J Natl Cancer Inst* 2011: 103: 232-240.
- (145) Kimachi K, Kajiya H, Nakayama S, Ikebe T, Okabe K. Zoledronic acid inhibits RANK expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2011: 383: 297-308.
- (146) Pozzi S, Marcheselli R, Falorio S, et al. Bisphosphonates-associated osteonecrosis of the jaw: A long-term follow-up of a series of 35 cases observed by GISL and evaluation of its frequency over time. *Am J Hematol* 2009: 84: 850-852.
- (147) Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *The Journal of clinical investigation* 1999: 104: 1363-1374.
- (148) Plotkin LI, Lezcano V, Thostenson J, Weinstein RS, Manolagas SC, Bellido T. Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2008: 23: 1712-1721.
- (149) Wat WZ. Current perspectives on bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. *Ther Clin Risk Manag* 2014: 10: 977-983.

- (150) de Groen PC, Lubbe DF, Hirsch LJ, et al. Esophagitis associated with the use of alendronate. *N Engl J Med* 1996; 335: 1016-1021.
- (151) Salzman R, Hoza J, Perina V, Starek I. Osteonecrosis of the external auditory canal associated with oral bisphosphonate therapy: case report and literature review. *Otol Neurotol* 2013; 34: 209-213.
- (152) Kharazmi M, Hallberg P, Persson U, Warfvinge G. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the auditory canal. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2013; 51: e285-287.
- (153) Bozas G, Roy A, Ramasamy V, Maraveyas A. Osteonecrosis of the jaw after a single bisphosphonate infusion in a patient with metastatic renal cancer treated with sunitinib. *Onkologie* 2010; 33: 321-323.
- (154) Brunello A, Saia G, Bedogni A, Scaglione D, Basso U. Worsening of osteonecrosis of the jaw during treatment with sunitinib in a patient with metastatic renal cell carcinoma. *Bone* 2009; 44: 173-175.
- (155) Estilo CL, Fournier M, Farooki A, Carlson D, Bohle G, 3rd, Huryn JM. Osteonecrosis of the jaw related to bevacizumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008; 26: 4037-4038.
- (156) Fizazi K, Carducci M, Smith M, et al. 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.
- (157) Henry DH, Costa L, Goldwasser F, et al. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; 29: 1125-1132.
- (158) Scagliotti GV, Hirsh V, Siena S, et al. Overall survival improvement in patients with lung cancer and bone metastases treated with denosumab versus zoledronic acid: subgroup analysis from a randomized phase 3 study. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 1823-1829.
- (159) Taylor KH, Middlefell LS, Mizen KD. Osteonecrosis of the jaws induced by anti-RANK ligand therapy. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2010; 48: 221-223.
- (160) Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-342.
- (161) Baron R, Ferrari S, Russell RG. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone* 2011; 48: 677-692.
- (162) Sivoilella S, Lumachi F, Stellini E, Favero L. Denosumab and anti-angiogenic drug-related osteonecrosis of the jaw: an uncommon but potentially severe disease. *Anticancer Res* 2013; 33: 1793-1797.



- (163) Hellstein JW, Adler RA, Edwards B, et al. Managing the care of patients receiving antiresorptive therapy for prevention and treatment of osteoporosis: executive summary of recommendations from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J Am Dent Assoc* 2011; 142: 1243-1251.
- (164) Ortega J, Vigil CE, Chodkiewicz C. Current progress in targeted therapy for colorectal cancer. *Cancer Control* 2010; 17: 7-15.
- (165) Santos-Silva AR, Belizario Rosa GA, Castro Junior G, Dias RB, Prado Ribeiro AC, Brandao TB. Osteonecrosis of the mandible associated with bevacizumab therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; 115: e32-36.
- (166) Mena AC, Pulido EG, Guillen-Ponce C. Understanding the molecular-based mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitor: sunitinib. *Anticancer Drugs* 2010; 21 Suppl 1: S3-11.
- (167) Goodman VL, Rock EP, Dagher R, et al. Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1367-1373.
- (168) Koch FP, Walter C, Hansen T, Jager E, Wagner W. Osteonecrosis of the jaw related to sunitinib. *Oral Maxillofac Surg* 2011; 15: 63-66.
- (169) Ayllon J, Launay-Vacher V, Medioni J, Cros C, Spano JP, Oudard S. Osteonecrosis of the jaw under bisphosphonate and antiangiogenic therapies: cumulative toxicity profile? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2009; 20: 600-601.
- (170) Beuselinck B, Wolter P, Karadimou A, et al. Concomitant oral tyrosine kinase inhibitors and bisphosphonates in advanced renal cell carcinoma with bone metastases. *Br J Cancer* 2012; 107: 1665-1671.
- (171) Lescaille G, Coudert AE, Baaroun V, et al. Clinical study evaluating the effect of bevacizumab on the severity of zoledronic acid-related osteonecrosis of the jaw in cancer patients. *Bone* 2014; 58: 103-107.
- (172) Svejda B, Muschitz C, Gruber R, et al. [Position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ)]. *Wien Med Wochenschr* 2016; 166: 68-74.
- (173) Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws AAoO, Maxillofacial S. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2007; 65: 369-376.
- (174) Holzinger D, Seemann R, Klug C, et al. Long-term success of surgery in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJs). *Oral oncology* 2013; 49: 66-70.
- (175) Graziani F, Vescovi P, Campisi G, et al. Resective surgical approach shows a high performance in the management of advanced cases of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a retrospective survey of 347 cases. *Journal*

of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 2012: 70: 2501-2507.

- (176) Pautke C, Bauer F, Tischler T, et al. Fluorescence-guided bone resection in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2009: 67: 471-476.
- (177) Shannon J, Shannon J, Modelevsky S, Grippo AA. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *J Am Geriatr Soc* 2011: 59: 2350-2355.
- (178) Bocanegra-Perez MS, Vicente-Barrero M, Sosa-Henriquez M, et al. Bone metabolism and clinical study of 44 patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012: 17: e948-955.
- (179) Ripamonti CI, Maniezzo M, Campa T, et al. Decreased occurrence of osteonecrosis of the jaw after implementation of dental preventive measures in solid tumour patients with bone metastases treated with bisphosphonates. The experience of the National Cancer Institute of Milan. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2009: 20: 137-145.
- (180) Grötz K A PJU, Al-Nawas B. S3 Leitlinie: Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose (BP-ONJ) und andere Medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen. AWMF online2012.
- (181) Piccioli A. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with breast cancer. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 2015: 25: 29-37.

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der theoretischen Bisphosphonatkonzentrationen im Knochen abhängig von der Behandlungsdauer (nach Otto S, Pautke C, Opelz C, Westphal I, Drosse I, Schwager J, et al. *Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration, and acidic milieu on the pathomechanism*. Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 2010;68:2837-45)

Tabelle 2: Erste 400 µM Bisphosphonat-Stammlösung

Tabelle 3: 200 µM Stammlösung für die Kontrollgruppe ohne Bisphosphonat

Tabelle 4: Schematische Darstellung eines Aussaatmuster einer 96-well Platte mit unterschiedlichen Bisphosphonatkonzentrationen für Zoledronat, Ibandronat und Clodronat, sowie der jeweiligen Kontrollgruppen

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Wirkmechanismen der Bisphosphonate auf zellulärer Ebene im Osteoklasten (nach Bartl, Tresckow, Bartl 2006: *Bisphosphonat-Manual*, ISBN: 3-540-25362-9; Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Springer)

Abb. 2: Schematische Darstellung der Verdünnungsreihe der unterschiedlichen Bisphosphonatkonzentrationen

Abb. 3: Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die Zellaktivität der hMSCs. Die hMSC wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,4 drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zellaktivität mit dem WST-1 Reagenz gemessen. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hMSC. Auch bei Clodronat ist ein Effekt zu erkennen.

Abb. 4: Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die Zellaktivität der hMSCs. Die hMSC wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,0 drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zellaktivität mit dem WST-1 Reagenz gemessen. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hMSC. Auch bei Clodronat ist ein Effekt zu erkennen.

Abb. 5: Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die Zellaktivität der hMSCs. Die hMSC wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=6,7 drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zellaktivität mit dem WST-1 Reagenz gemessen. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hMSC. Auch bei Clodronat ist ein Effekt zu erkennen.

Abb. 6: Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die Zellzahl der hMSCs. Die hMSC wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,4 drei Tage inkubiert. In 4 % Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit dem Hoechst Farbstoff gefärbt und unter Verwendung der Image J Software automatisch gezählt. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hMSC. Auch bei Clodronat ist ein Effekt zu erkennen.

Abb. 7: Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die Zellzahl der hMSCs. Die hMSC wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,0 drei Tage inkubiert. In 4 % Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit dem Hoechst Farbstoff gefärbt und unter Verwendung der Image J Software automatisch gezählt. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hMSC. Auch bei Clodronat ist ein Effekt zu erkennen.

Abb. 8: Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die Zellzahl der hMSCs. Die hMSC wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=6,7 drei Tage inkubiert. In 4 % Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit dem Hoechst Farbstoff gefärbt und unter Verwendung der Image J Software automatisch gezählt. Der niedrige pH-Wert selbst reduziert die Zellzahl der hMSC. Zoledronat wirkt ab Konzentrationen von 25  $\mu$ M toxisch auf die Zellzahl, jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Abb. 9: Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die Zellaktivität der hOBs. Die Osteoblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,4 drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zellaktivität mit dem WST-1 Reagenz gemessen. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hOBs. Auch bei Clodronat ist ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen.

Abb. 10: Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die Zellaktivität der hOBs. Die Osteoblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,0 drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zellaktivität mit dem WST-1 Reagenz gemessen. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hOBs. Auch bei Clodronat ist ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen.

Abb. 11: Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die Zellaktivität der hOBs. Die Osteoblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=6,7 drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zellaktivität mit dem WST-1 Reagenz gemessen. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die hOBs. Auch bei Clodronat ist ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen. Insgesamt reduziert der niedrige pH-Wert die Zellzahl stark.

Abb. 12: Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die Zellzahl der hOBs. Die Osteoblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,4 drei Tage inkubiert. In 4 % Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit dem Hoechst Farbstoff gefärbt und unter Verwendung der Image J Software automatisch gezählt. Zoledronat und Ibandronat wirken signifikant toxischer auf die Osteoblasten. Auch bei Clodronat ist ein Effekt zu erkennen.

Abb. 13: Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die Zellzahl der hOBs. Die Osteoblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=7,0 drei Tage inkubiert. In 4 % Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit dem Hoechst Farbstoff gefärbt und unter Verwendung der Image J Software automatisch gezählt. Zoledronat wirkt signifikant toxischer auf die Osteoblasten. Auch bei Ibandronat ist ein Unterschied zu erkennen. Clodronat hingegen zeigt keine Effekte. Der niedrige pH-Wert an sich reduziert die Zellzahl.

Abb. 14: Dosis- und pH-abhängiger Einfluss von Bisphosphonaten auf die Zellzahl der hOBs. Die Osteoblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Bisphosphonaten bei pH=6,7 drei Tage inkubiert. In 4 % Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit dem Hoechst Farbstoff gefärbt und unter Verwendung der Image J Software automatisch gezählt. Der niedrige pH-Wert selbst reduziert die Zellzahl. Bisphosphonate wirken hier im Vergleich mit der Kontrollgruppe weniger toxisch. Es ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Jedoch zeigt sich bei Zoledronat bei Konzentrationen von 100  $\mu$ M ein Effekt.

## 9. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BRONJ	bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum (fetales Kälbersserum)
FCS	fetal calf serum
FDA	US Food and Drug Administration
FPPS	Farnesyl Pyrophosphat Synthase
GTP	Guanosintriphosphat
hOB	Humane Osteoblasten
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IU	International unit (internationale Einheit)
M	Molare Masse M, Molmasse
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline
pg	Pikogramm
RANK	Rezeptor-Aktivator des nukleären Faktors K-B
RANKL	Rezeptor-Aktivator des nukleären Faktors K-B-Ligand
WST	water soluble tetrazolium salt (wasserlösliches Tetrazoliumsalz)

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Michael Ehrenfeld danke ich sehr für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit und Promotion an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der LMU München.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Sven Otto gilt besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit, seine Hilfsbereitschaft, intensive Betreuung und sein großes Engagement, das er mir, trotz Belastung in Klinik und Forschung, entgegenbrachte.

Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Matthias Tröltzsch danke ich herzlichst für die kompetente und umfassende Betreuung während der Erstellung dieser Dissertation.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für all ihre Unterstützung und die Möglichkeit meine Ziele zu verwirklichen.



**Publikationen:**

Otto S, Pautke C, Opelz C, Westphal I, Dorsse I, **Schwager J**, Bauss F, Ehrenfeld M, Schieker M

Osteonecrosis of the jaw: impact of bisphosphonate type, local concentration and acidic milieu on the pathomechanism. J Oral Maxillofac Surg 2010 Nov 68 (11), 2837-45 [IF 2010: 1.580]

**Auszeichnungen:****„Highlighted poster“-Auszeichnung ASORS-Jahreskongress 2011**

Otto S, **Schwager J**, Opelz C, Westphal I, Schieker M, Ehrenfeld M, Pautke C

Einfluss von Bisphosphonatdosis und pH-Wert auf die Entstehung Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen

2. ASORS-Jahreskongress „Supportive Therapie und Rehabilitation bei Krebs – State of the Art 2011“

25.03. – 26.03.2011 in Berlin

**Vorträge:**

Otto S, **Schwager J**, Schieker M, Ehrenfeld M, Pautke C

The role of bisphosphonate type, local concentration and acidic milieu in the pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw

21<sup>st</sup> International conference on Oral and Maxillofacial Surgery

21.10. - 24.10.2013 in Barcelona (Spanien)

Otto S, **Schwager J**, Ehrenfeld M, Schieker M, Pautke C

Zellkulturelle Untersuchungen zum Einfluss von Bisphosphonatdosis und pH-Wert auf die Pathogenese bisphosphonat-induzierter Kiefernekrosen

17. Jahreskongress der Österreichischen Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie

29.01. – 01.02.2013 in Bad Hofgastein (Österreich)

Otto S, Pautke C, Westphal I, **Schwager J**, Bauss F, Ehrenfeld M, Schieker M  
The impact of bisphosphonate type, local concentration and acidic milieu on the pathomechanism of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw  
21. Congress of the European Association of for Craniomaxillofacial Surgery  
11.09. – 15.09.2012 in Dubrovnik (Kroatien)

Otto S, Pautke C, Westphal I, **Schwager J**, Bauss F, Ehrenfeld M, Schieker M  
The impact of bisphosphonate type, local concentration and acidic milieu on the pathomechanism of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw  
20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery  
01.11. – 04.11.2011 in Santiago de Chile

Otto S, **Schwager J**, Drosse I, Bauss F, Pautke C, Ehrenfeld M, Schieker M  
Zellkulturelle Untersuchungen zum Einfluss von Dosis und pH-Wert auf die Pathogenese Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen  
61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie  
16.06. – 18.06.2011 in Bamberg

Otto S, **Schwager J**, Opelz C, Westphal I, Schieker M, Ehrenfeld M, Pautke C  
Einfluss von Bisphosphonatdosis und pH-Wert auf die Entstehung Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen  
2. ASORS-Jahreskongress „Supportive Therapie und Rehabilitation bei Krebs – State of the Art 2011“  
25.03. – 26.03.011 in Berlin

Otto S, **Schwager J**, Opelz C, Westphal I, Schieker M, Ehrenfeld M, Pautke C  
Zellkulturelle Untersuchungen zum Einfluss von Dosis und pH-Wert auf die Pathogenese Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen  
15. Jahreskongress der Österreichischen Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie  
02.02. – 05.02.2011 in Bad Hofgastein

Otto S, **Schwager J**, Drosse I, Westphal I, Schieker M, Ehrenfeld M, Pautke C  
Einfluss von Dosis und pH-Wert auf die Entstehung Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen

60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie  
25.05.-29.05.2010 in München

### **Posterpräsentationen:**

Otto S, Pautke C, **Schwager J**, Westphal I, Bauss F, Ehrenfeld M, Schieker M  
Dose and acidic milieu: Crucial factors for the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw?

61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie  
16.06. – 18.06.2011 in Bamberg

Otto S, **Schwager J**, Opelz C, Westphal I, Schieker M, Ehrenfeld M, Pautke C  
Einfluss von Bisphosphonatdosis und pH-Wert auf die Entstehung Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen

2. ASORS-Jahreskongress „Supportive Therapie und Rehabilitation bei Krebs – State of the Art 2011“  
25.03. – 26.03.011 in Berlin

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Joanna Valery Schwager, an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Untersuchungen zum Einfluss von Konzentration und pH-Wert auf die Wirkung von stickstoffhaltigen und nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonaten auf humane mesenchymale Stammzellen und humane Osteoblasten“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

