

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Klinik für Mund- und Kiefer-, Gesichtschirurgie

kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Kleinheinz

**BEEINFLUSSUNG VON OSTEOLASTEN UND
ENDOTHELZELLEN DURCH ZOLEDRONAT IN VITRO**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des
doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Eva Beckmann
aus Gütersloh

2014

*Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster*

Dekan: Univ.-Prof. Dr. h.c. W. Schmitz
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Kleinheinz
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. G. Köhler

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Mund- und Kiefer-, Gesichtschirurgie
kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Kleinheinz
Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Kleinheinz
Korreferentin: Prof. Dr. med. G. Köhler

ZUSAMMENFASSUNG

Beeinflussung von Osteoblasten und Endothelzellen durch Zoledronat in vitro

Beckmann, Eva

Zielsetzung: Mit ansteigenden Verschreibungszahlen der osteotropen Aminobisphosphonate mehren sich die Patientenfälle in denen als Nebenwirkung eine Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose im Kiefer (BP-ONJ) beobachtet wird. Um weitere Hinweise zur unklaren Pathogenese zu sammeln, wurde das Verhalten von Osteoblasten und Endothelzellen in vitro untersucht.

Methode: Bovine Osteoblasten-ähnliche Zellen (OBs) und Endothelzellen aus humaner Vena umbilica (HUVECs) wurden über 14 Tage bei 0,01, 0,1, 1 und 10 μM Zometa[®] (Wirkstoff: Zoledronsäure) kultiviert. An sechs Zeitpunkten wurde die Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay untersucht und die Proliferationsrate mittels Zellzählung auf Fotos (Cell-Count) ermittelt. Immunhistologische Färbungen wurden zur Beurteilung des Expressionsverhaltens von zellspezifischen Proteinen angefertigt und ermöglichten zusammen mit einer Fotodokumentation das Beobachten von Morphologieveränderungen.

Ergebnisse: Ab Tag 1 war für die OBs ein bisphosphonatabhängiger positiver Proliferationseffekt für alle vier Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Für die HUVECs ließ sich kein durch Zoledronsäure verändertes Verhalten nachweisen.

Diskussion: Zoledronsäure führt zu einer gesteigerten Proliferation von OBs. Zusammen mit den bereits bekannten antiangiogenetischen und Osteoklasten-resorptionsinhibierenden Wirkungen könnte dies mit zur Pathogenese einer BP-ONJ beitragen.

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 2014

Eidesstattliche Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit den Titel

„Beeinflussung von Osteoblasten und Endothelzellen durch Zoledronat in vitro“

in der Klinik für Mund- und Kiefer-, Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums
Münster unter Anleitung von

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Kleinheinz

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen
Quellen angefertigt und
sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material
verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen und
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer
in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit,
Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades,
vorgelegt habe.

Münster, den 22. August 2014

Eva Beckmann

Was heute wirkt, es wirkt das ganze Leben.

Johann Wolfgang von Goethe

Inhalt

I. Einleitung.....	1
I.1. Bisphosphonate	1
I.1.1. Indikation	1
I.1.2. Kontraindikation	1
I.1.3. Historie	2
I.1.4. Verschreibungszahlen.....	2
I.1.5. Synthese und chemischer Aufbau	3
I.1.6. Klassifikation in Generationen	4
I.1.7. Pharmakokinetik.....	5
I.1.8. Wirkungsweise	6
I.1.8.a. molekulare Ebene	6
I.1.8.b. zelluläre Ebene	11
I.1.8.c. gewebliche Ebene.....	12
I.1.9. Nebenwirkungen.....	13
I.1.10. Wechselwirkungen	14
I.2. Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose	15
I.2.1. Historie	15
I.2.2. Begriff.....	15
I.2.3. Definition.....	16
I.2.4. Klinik	16
I.2.5. Differenzialdiagnosen	17
I.2.6. Staging	17
I.2.7. Risikofaktoren	18
I.2.8. Komplikationen	19
I.2.9. Inzidenz und Prävalenz.....	19
I.2.10. Therapie	20
I.2.11. Ätiologie und Pathogenese	22

I.3. Osteoblasten und Knochenumbau	26
I.4. Endothelzellen und Angiogenese	29
I.5. Zielsetzung	31

II. Material und Methoden..... 32

II.1. Material.....	32
II.1.1. Material für die Zellkultur	32
II.1.1.a. Zellen.....	32
II.1.1.b. Nährmedien	32
II.1.1.c. Reagenzien und Lösungen.....	33
II.1.2. Material für die Untersuchungsmethoden	36
II.1.2.a. MTT-Assay	36
II.1.2.b. Cell-Count	36
II.1.2.c. Färbungen.....	36
II.1.3. Medikament	38
II.1.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien	39
II.2. Methoden	41
II.2.1. Gewinnung der Zellen	41
II.2.1.a. Gewinnung der Osteoblasten.....	41
II.2.1.b. Gewinnung der Endothelzellen.....	43
II.2.2. Festlegen der Medikamentenkonzentrationen	46
II.2.3. Untersuchungsmethoden	48
II.2.3.a. MTT-Assay	48
II.2.3.b. Cell-Count	51
II.2.3.c. Färbungen.....	52
II.2.3.c.1. Immunfärbung mit Alexa-Fluor®	54
II.2.3.c.2. Immunfärbung mit Dako EnVision®	55
II.2.3.c.3. Richardsonfärbung.....	57
II.2.4. Statistische Methoden zur Auswertung	58

III. Ergebnisse	59
III.1. Ergebnisse der Fotodokumentation	59
III.1.1. Fotodokumentation der Osteoblasten	59
III.1.2. Fotodokumentation der Endothelzellen	63
III.2. Ergebnisse der MTT-Assays	67
III.2.1. MTT-Assay der Osteoblasten	67
III.2.2. MTT-Assay der Endothelzellen	71
III.3. Ergebnisse der Cell-Counts	75
III.3.1. Cell-Count der Osteoblasten	75
III.3.2. Cell-Count der Endothelzellen	79
III.4. Ergebnisse der Färbungen	82
III.4.1. Ergebnisse der Alexa-Fluor [®] -Immunfärbung	82
III.4.1.a. Alexa-Fluor [®] -Färbung der Osteoblasten	82
III.4.1.b. Alexa-Fluor [®] -Färbung der Endothelzellen	83
III.4.2. Ergebnisse der Dako EnVision [®] -Immunfärbung	84
III.4.2.a. Dako EnVision [®] -Färbung der Osteoblasten	84
III.4.2.b. Dako EnVision [®] -Färbung der Endothelzellen	86
III.4.3. Ergebnisse der Richardsonfärbung	88
III.4.3.a. Richardsonfärbung der Osteoblasten	88
III.4.3.b. Richardsonfärbung der Endothelzellen	89
 IV. Diskussion	 90
IV.1. Einordnung der Ergebnisse	90
IV.2. Studienlage	91
IV.2.1. Effekte auf Proliferationsrate und Stoffwechselaktivität ..	92
IV.2.1.a. Proliferation und Stoffwechselaktivität der Osteoblasten	92
IV.2.1.b. Proliferation und Stoffwechselaktivität der Endothelzellen ..	94
IV.2.2. Effekte auf Morphologie und Gestalt der Zellen	97

IV.2.2.a. Morphologie und Gestalt der Osteoblasten.....	97
IV.2.2.b. Morphologie und Gestalt der Endothelzellen	97
IV.2.3. Effekte auf die Expression und Synthese von Proteinen .	99
IV.3. Fehleranalyse der Vorgehensweise	101
IV.3.1. Isolierung und Kultivierung der Zellen	101
IV.3.1.a. Isolierung und Kultivierung der Osteoblasten.....	101
IV.3.1.b. Isolierung und Kultivierung der Endothelzellen.....	101
IV.3.2. Versuchsdauer.....	103
IV.3.3. Verwendete Medikamentenkonzentration	105
IV.3.3.a. Medikamentenkonzentration in den Osteoblastenkulturen	105
IV.3.3.b. Medikamentenkonzentration in den Endothelzellkulturen.	107
IV.3.4. Auswahl der Untersuchungsmethoden	109
IV.4. Erklärung der Ergebnisse	111
IV.5. Schlussfolgerung	113
IV.6. Ausblick und weitere Versuchsansätze	115
Literaturverzeichnis	117
Abkürzungsverzeichnis	133
Abbildungsverzeichnis.....	136
Tabellenverzeichnis.....	137
Lebenslauf.....	138
Danksagung	139

Anhang	I
I. Messdaten	I
I.1. Analysedaten der MTT-Assays	I
I.1.1. Daten der Osteoblasten	I
I.1.2. Daten der Endothelzellen	III
I.2. Analysedaten der Cell-Counts	V
I.2.1. Daten der Osteoblasten	V
I.2.2. Daten der Endothelzellen	VII
II. Ethikvotum	IX

I. Einleitung

I.1. Bisphosphonate

I.1.1. Indikation

Bisphosphonate sind eine Stoffgruppe osteotroper Medikamente die heute ihre Hauptindikation in der Osteologie, Orthopädie und Onkologie finden. Jeweils unterschiedlich für das jeweilige Präparat sind Bisphosphonate heute zugelassen zur Behandlung und teils zur Prävention folgender Erkrankungen: Der postmenopausalen Osteoporose, der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose, dem Morbus Paget des Knochens (Ostitis deformans), der osteolytischen Knochenmetastasen (insbesondere infolge eines Mamma- oder Prostatakarzinoms), der tumorinduzierten Hyperkalzämie und bei durch ein multiples Myelom bedingten Osteolysen [Rote Liste® Service GmbH, 2011]. In der Knochenszintigraphie zur Diagnostik von Knochenläsionen findet Bisphosphonat mit Technetium 99 markiert (z.B. Tc99m MDP, ^{99m}Tc) als Tracer Anwendung [Fleisch H, 2002].

Weiterhin nutzen zahlreiche andere medizinische Disziplinen, wie zum Beispiel die Endokrinologie, die Infektiologie, die Pädiatrie, die Psychiatrie, die Rheumatologie und die Zahnheilkunde Bisphosphonate im off-label-use [Bartl R et al., 2006].

I.1.2. Kontraindikation

Als absolut kontraindiziert gelten Bisphosphonate bei Unverträglichkeit gegenüber der Substanzklasse, schwerer Nieren- bzw. Leberinsuffizienz, oder in der Schwangerschaft und in der Stillzeit, da sie zum Teil plazenta-gängig sind und vermutlich auch über die Muttermilch abgegeben werden. Für Kinder und Jugendliche bis 17 Jahre gilt aufgrund des Eingriffes in den im Wachstum befindlichen Knochenstoffwechsel eine relative Kontraindikation, die eine strenge Indikationsstellung fordert. Patienten mit multiplem Myelom unter Thalidomid-Therapie sollte ebenso kein Bis-

phosphonat verordnet werden. Die orale Gabe von Bisphosphonaten bei Patienten mit Erkrankungen am Ösophagus ist nicht indiziert [Bartl R et al., 2006 und Rote Liste® Service GmbH, 2011].

I.1.3. Historie

Dem Chemiker Nikolai Alexandrowitsch Menschutkin gelang 1865 die erste Synthese eines Bisphosphonates, das er selbst als „acetopyrophosphorige Säure“ bezeichnete [Menschutkin N, 1865]. Diese Etidronsäure findet bis heute unter dem Namen Etidronat als Medikament Anwendung.

Historisch waren Bisphosphonate, bzw. Pyrophosphate, zunächst in der Industrie von Bedeutung. Durch ihre Eigenschaft Calciumcarbonat zu lösen finden sie als Wasserenthärter Einsatz in Waschmitteln und beugen der Kesselsteinbildung vor. Als Antikorrosiva werden sie unter anderem in Bereichen der Metalloberflächenverarbeitung, der Textilindustrie und der Weiterverarbeitung von Raffinerieprodukten angewendet. Im Bereich der Kosmetika sollen Bisphosphonate in Zahnpasten zugesetzt werden, die die Zahnsteinbildung hemmen und konservierende wie antimikrobielle Wirkung zeigen [Blomen L, 1995]. Die medizinische Bedeutung der Bisphosphonate erkannte Herbert Fleisch mit seinen Mitarbeitern in zwei grundlegenden Arbeiten Ende der 1960er Jahre [Fleisch H et al., 1969 und Francis MD et al., 1969]. Sie entdeckten die knochenmineralisierende und osteotrope Wirkung, die das bone remodeling hemmt und zu einer positiven Calciumbilanz führt. Sie entwickelten die Substanz weiter, sodass sie in der Therapie metabolischer Knochenerkrankungen eingesetzt werden konnte. Die erste therapeutische Indikation fand Etidronat bei einem Kind mit Myositis ossificans progressiva 1969 [Bassett CA et al., 1969].

I.1.4. Verschreibungszahlen

In Deutschland sind 2012 38 unterschiedliche Bisphosphonat-Präparate zugelassen [Rote Liste® Service GmbH, 2011]. Weit mehr als die Hälfte der verordneten definierten Tagesdosen (DDD), die in öffentlichen Apotheken an Patienten der gesetzlichen Krankenkassen im Jahr 2010 abgegeben

wurden, enthielten als Wirkstoff Alendronsäure. Ein Bisphosphonat das seine Indikation in der Osteoporosetherapie und -prävention findet. Bei skelettbezogenen Tumorkrankheiten wurden hingegen 0,4 DDD verordnet. Mit Kosten von durchschnittlich 368 Euro pro DDD waren sie erheblich teurer als die Alendronsäure-Präparate, die etwa 0,80 Euro pro DDD kosten. Insgesamt wurden 2010 mehr als 76 Millionen DDD an Medikamenten verordnet, die ein Bisphosphonat enthielten. Verglichen mit dem Vorjahr 2009 sind 2010 erstmals seit der Einführung der Bisphosphonate die Verordnungszahlen nicht weiter angestiegen [Schwabe U et al., 2011].

I.1.5. Synthese und chemischer Aufbau

Der Ausgangspunkt bei der Entwicklung der Bisphosphonate war die Beobachtung, dass das physiologisch vorkommende anorganische Pyrophosphat (PPi), ein endogener Regulator der Knochenmineralisation, die Auflösung des Knochenhauptbestandteils Hydroxylapatit hemmt [Fleisch H et al., 1966]. Die beiden vom zentralen Sauerstoffatom ausgehenden Säureanhydridbindungen, die die Phosphor-Sauerstoff-Phosphor (P-O-P)-Struktur vorgeben, sind enzymatisch spaltbar, also instabil. Eine therapeutische Anwendung des PPi ist somit nicht möglich. Die Bisphosphonate, als Analoga zum Pyrophosphat, charakterisiert ihre zentrale Phosphor-Sauerstoff-Phosphor (P-C-P)-Bindung. Diese Struktur mit zwei Phosphor-ether-Bindungen an ein zentrales Kohlenstoffatom ist metabolisch stabil. Sie kann in den Lakunen der Osteoklasten selbst unter Säureeinfluss nicht hydrolysiert werden [Rogers MJ et al., 2000].

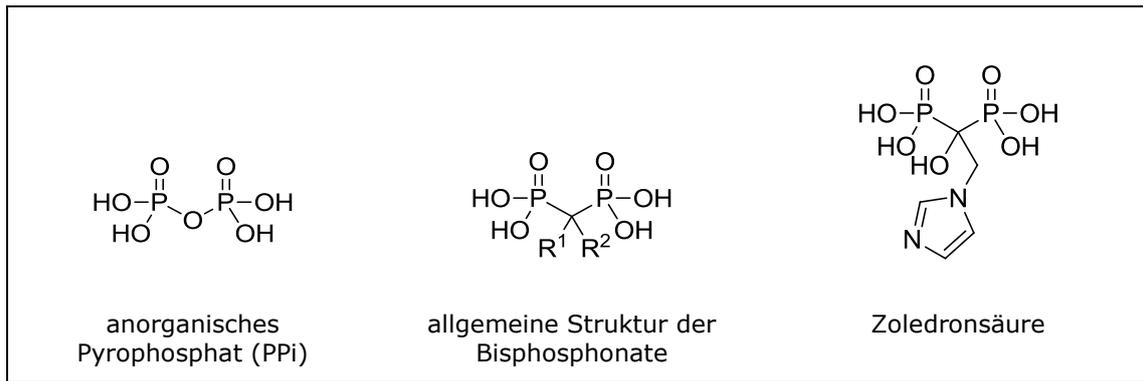


Abbildung 1:
Strukturformeln von Pyrophosphat und Bisphosphonaten im Vergleich

Ein weiterer Vorteil in der Substitution des Sauerstoffs durch ein Kohlenstoffatom ist die Möglichkeit, dass dieses das Anhängen zweier weiterer Seitenketten neben den beiden Phosphatgruppen erlaubt. Dies hat zu der allgemeinen Summenformel $R_1R_2C(PO_3H_2)(PO_3H_2)$ geführt. Durch unterschiedliche Kombinationen von z.B. $-H$, $-NH_2$, $-OH$, $-Cl$, oder $-NR_3R_4$ sowie Alkylketten an den Positionen R_1 und R_2 gelang die Entwicklung weiterer Bisphosphonate mit unterschiedlichen Wirkungspotential und -profil.

Dabei zeigte sich, dass sich die Affinität des Bisphosphonates zu mineralischen Oberflächen, ohnehin schon gegeben durch die dreidimensionale Struktur des Moleküls mit seinen zwei Phosphatgruppen, die eine hohe Bindungsfähigkeit von divalenten Metall-Ionen wie Ca^{2+} aufweisen (Chelatbindung), durch eine Hydroxylgruppe an Position R_1 steigern lässt [Jung A et al., 1973 und Rogers MJ, 2003]. Allein diese Erkenntnis führte zu wirksameren Bisphosphonaten. Denn so gelangen die Bisphosphonate noch schneller aus der Blutzirkulation hin zu ihrem erwünschten Wirkungsort: den Stellen aktiven Knochenbaus [Lin JH, 1996]. Während die beiden Phosphatgruppen zusammen mit der Hydroxylgruppe an R_1 also die Knochenaffinität beeinflussen, ist R_2 maßgeblich für die biologische Aktivität und die Wirkungspotenz [Russell RG et al., 1999 und Widler L et al., 2002].

I.1.6. Klassifikation in Generationen

Anhand der unterschiedlichen aliphatischen Seitenketten an Position von R_2 werden bis heute drei Generationen von Bisphosphonaten klassifiziert:

Bisphosphonate der ersten Generation, die seit 1970 therapeutisch genutzt werden enthalten in R_2 als wichtigstes Merkmal keinen Stickstoff. Entweder besteht R_2 aus einem einzelnen Atom oder aus einer unverzweigten kurzen CH_3 -Kette. Sie zeichnet eine relativ schwache Inhibition der Knochenresorption mit geringer Potenz und kleinem therapeutischen Resorptionsfenster aus. Vertreter dieser Gruppe sind Etidronat, Clodronat und Tiludronat.

Pamidronat, Alendronat, Neridronat, Risedronat, Incadronat gehören bereits der zweiten Generation an. Sie gelten als die primären Aminobisphosphonate (nBP) mit einer basischen Amino-Alkyl-Gruppe, die zu erhöhten antiresorptiven Eigenschaften, einem weiteren therapeutischen Fenster und einem größeren Indikationsgebiet geführt haben.

Die jüngste Generation, die dritte, umfasst die bislang potentesten Bisphosphonate (bis zu 10.000-20.000fach potenter als Etidronat) [Rogers MJ et al., 2000 und Weinstein RS et al., 2009]. Entweder sind es am Stickstoff substituierte Aminobisphosphonate (tertiäre Amine), wie Olpadronat und Ibandronat oder es sind stickstoffhaltige basische Heterozyklen wie Zoledronat, das einen Imidazol- und Risedronat, das einen Pyridin-Ring enthält. Letztere werden als zyklische Aminobisphosphonate uneinheitlich teils auch als 4. Generation betrachtet [Gruber R, 2011].

I.1.7. Pharmakokinetik

Abhängig von ihrem jeweiligen molekularem Aufbau zeigen die Bisphosphonate eine unterschiedliche Pharmakokinetik: Allen gemeinsam ist ihre schlechte intestinale Resorption von 0,5-10 %. Zudem ist die intraindividuelle Variabilität hoch und die gleichzeitige Einnahme eines Bisphosphonates mit Nahrungsmitteln oder Getränken (Ausnahme ist hier Leitungswasser) kann die Bioverfügbarkeit nahezu aufheben, da Bisphosphonate mit Calciumionen unlösliche Chelate bilden. Die geringe Lipophilie und die starke Polarität lassen nur einen parazellulären Transport im Magen und insbesondere im oberen Duodenum zu. Obwohl die neuesten Bisphosphonate aufgrund ihrer hohen Potenz bereits Wirkung entfalten können, wenn sie nur zu 1 % aufgenommen werden, ist die intravenöse Applikation im Gegensatz zur oralen immer noch die effektivere. Die Serumhalbwertszeit ist von

Generation zu Generation deutlich gesunken. Werte von sechs Stunden wie für Etidronat werden heute bei neueren Substanzen durchschnittlich um den Faktor 5 unterschritten. Im Blut erfolgt der Transport an Albumin mit einer Bindungsrate zwischen 50 und 99 %. Bereits in der ersten Passage lagern sich 30-60 % der absorbierten Dosis am Knochen an [Lin JH, 1996]. Die zelluläre Aufnahme des Bisphosphonates ist noch relativ unbekannt. Vermutet werden unspezifische Pinozytose und Endozytose. Sowohl im Cytoplasma als auch in den Organellen, vor allem den Mitochondrien, sind Bisphosphonate nachweisbar [Felix R et al., 1984]. Bisphosphonate werden renal und zu 1 % über die Galle unverändert ausgeschieden. Die Eliminationshalbwertszeit und die glomeruläre Filtrationsrate sind ebenfalls stark von den unterschiedlichen Resten R_1 und R_2 abhängig [Lin JH, 1996]. Die im Knochen gebundenen Bisphosphonate werden während des physiologischen Prozesses des remodelings wieder freigesetzt. Die Knochenhalbwertszeit wird daher von der Knochenumbaurate, die vom Bisphosphonat selbst beeinflusst wird, bestimmt. Für Alendronat wird die Knochenhalbwertszeit auf zehn Jahre geschätzt [Lin JH, 1996]. Auch wenn grundsätzlich davon auszugehen ist, dass nach einer Bisphosphonat-Medikation in der Anamnese ein Leben lang Bisphosphonate im Knochen zu erwarten sind, so ist diese Annahme heute nicht mehr unwidersprochen und wird als übertrieben betrachtet [Kimmel DB, 2007].

I.1.8. Wirkungsweise

Die Wirkungsweise der Bisphosphonate lässt sich auf Ebene des molekularen Stoffwechsels, der Zellen und des Gewebes erklären.

I.1.8.a. molekulare Ebene

In ihrer Wirkung auf molekulare Vorgänge ist zwischen den einzelnen Bisphosphonaten zu differenzieren [Rodan GA, 1998 und Rodan GA et al., 1996]. Ausgangspunkt zur Klärung der molekularen Wirkung war auch hier das Pyrophosphat. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit Bisphosphonaten wurden zahlreiche Stoffwechselwege, in denen Pyrophosphat oder

Adenosintriphosphat (ATP) von Bedeutung sind, analysiert. Letztlich gelang für den Mevalonatweg, einem Stoffwechselweg in dem ausgehend von Acetyl-CoA Isoprenoide, als Grundbaustein der Steroide und Cholesterine, synthetisiert werden, der Nachweis.

Ganz ähnlich der Statine, die durch eine Inhibition der HMG-CoA-Reduktase die Synthese von Mevalonsäure unterdrücken, greifen auch Bisphosphonate in den Steroidstoffwechsel ein. Sie verhindern die Prenylierung neu synthetisierter Proteine (*siehe Abbildung 3 auf Seite 10*).

Bisphosphonate der ersten Generation (insbesondere Clodronat), die strukturell dem Pyrophosphat stark ähneln, können in nicht hydrolysierbare, cytotoxische ATP-Analoga eingebaut werden [Rogers MJ et al., 1994 und Rogers MJ et al., 1996]. Dies hat zur Folge, dass im Mevalonatweg für die Synthese von Isopentenyl-Pyrophosphat keine Energielieferanten bereitstehen. Für Etidronat ist experimentell nachgewiesen, dass es zu einem instabilen Nucleotid-Analogon metabolisiert [Pelorgeas S et al., 1992]. Die für die Knochenresorption bedeutsame osteoklastäre vakuoläre Protonen-ATPase wird durch Tiludronat inhibiert [David P et al., 1996].

Bisphosphonate der zweiten und dritten Generation unterscheiden sich von den bereits seit langer Zeit bekannten Substanzen durch ihren Hauptwirkmechanismus deutlich. Aminobisphosphonate der zweiten Generation inhibieren kompetitiv die enzymatische Umsetzung von Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, C₅-Baustein) zu Geranyl-Pyrophosphat (GPP, C₁₀-Baustein) an dem Enzym Geranyltransferase. Bei den Bisphosphonaten der dritten Generation wird zusätzlich auch der nächste Reaktionsschritt in der Cholesterolsynthese inhibiert. Dies ist die enzymatische Umsetzung von Geranylpyrophosphat zu Farnesylpyrophosphat (FPP, C₁₅) bzw. Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, C₂₀) durch Farnesyldiphosphatsynthetase (FPPS). Beide Reaktionshemmungen sind nur möglich, da große sterische Ähnlichkeiten zwischen den jeweiligen Bisphosphonaten und den physiologischen Substraten von Geranyltransferase bzw. Farnesyldiphosphatsynthetase vorliegen. Die primären Aminobisphosphonate ähneln dem DMAPP-Carbokation, das im Enzym stabilisierende Funktion hat und bei den

Bisphosphonaten der dritten Generation zeigen sich Gemeinsamkeiten mit dem GPP-Carbokation [van Beek E et al., 1999].

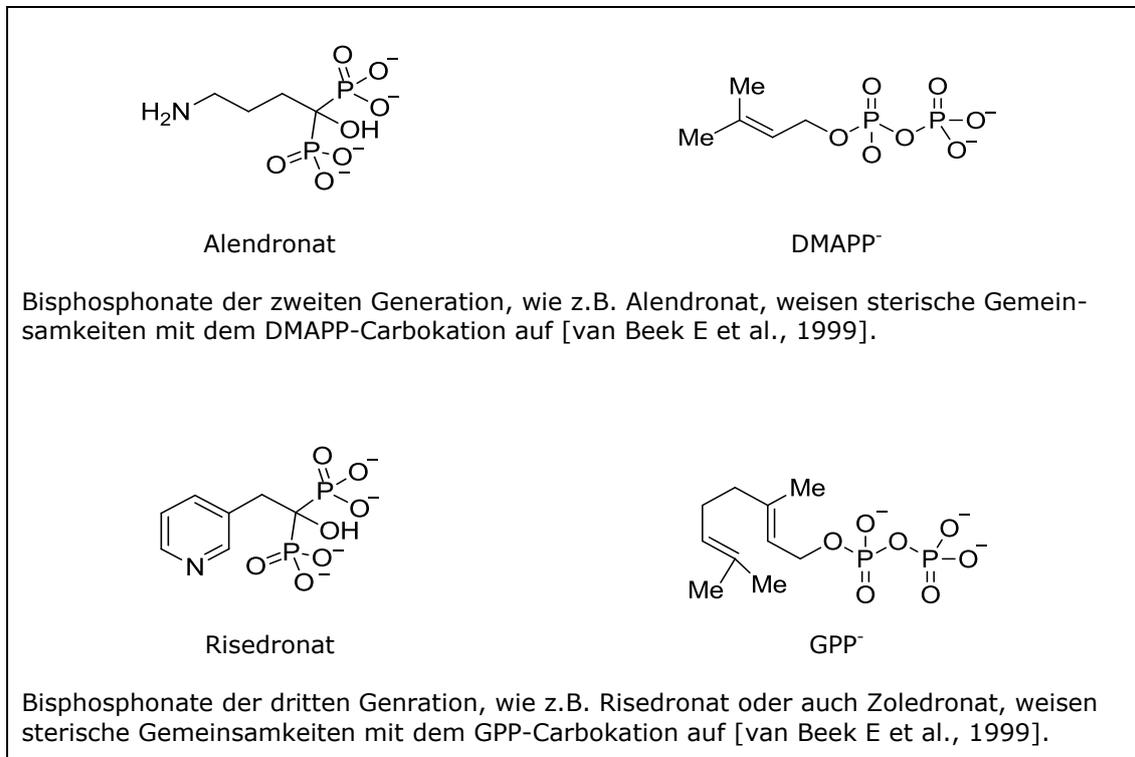


Abbildung 2:
sterische Ähnlichkeiten, die die kompetitive Hemmung ermöglichen

Resultat der kompetitiven Hemmung ist ein Ausbleiben der Protein-Prenylierung, die auch als Isoprenylierung bezeichnet wird. Diese post-translationale Modifikation von Proteinen hat zum Ziel, Lipoproteine mit hydrophoben Gruppen zu verknüpfen. Dies wird durch die kovalente Anhaftung eines Terpen-Restes (Farnesyl- (C₁₅) oder Geranylgeranylrest (C₂₀)) an den Carboxy-terminalen Cysteinrest der Proteine erreicht [Hauser K, 2006]. Diese Modifikation ist auch bei den kleinen GTPasen von Relevanz, denn sie sind nur in ihrer farnesylierten membranständigen Form funktionstüchtig. Rab, roh, rac und ras sind einige Subfamilien dieser Proteine die sich durch ihre Bindung zum Nucleotid GTP bzw. GDP auszeichnen. Ras zum Beispiel, ein Protoonkogen, ist Teil der intrazellulären Signaltransduktionskette und leitet Wachstumsignale von Rezeptortyrosin-kinasen über Proteinkinase an Transkriptionsfaktoren weiter. Weiterhin ist

es bedeutsam für die cytoskelettale Integrität. Bleibt die Prenylierung von Ras aus, kann das Protein sich nicht an der Zellmembran verankern, die Zelle verliert ihre membranspezifischen Eigenschaften, es kommt zum Verlust der cytoskelettalen Integrität, zur Cytostase und schließlich zum programmierten Zelltod, der Apoptose [Bartl R et al., 2006]. Zudem ist zumindest für ein Bisphosphonat der dritten Generation, dem Zoledronat, nachgewiesen, dass es neben seiner Wirkung auf die Enzyme Geranyltransferase und Farnesyldiphosphatsynthetase auch zur Bildung cytotoxischer ATP-Analoga führt, so wie es für die stickstofffreien Bisphosphonate bekannt ist [Flockerzi V, 2009].

Für viele Bisphosphonate der ersten und zweiten Generation ist bekannt, dass sie unterschiedlich spezifisch Tyrosin-Kinasen, die an vielen Signaltransduktionswegen von Bedeutung sind, inhibieren [Endo N et al., 1996 und Schmidt A et al., 1996]. Weiterhin nehmen sie Einfluss auf die intrazelluläre Säureproduktion [Fast DK et al., 1978], die Protonen-ATPase [Rogers MJ et al., 2000], lysosomale Enzyme und Prostaglandine [Bartl R et al., 2006], jeweils mit Konsequenzen für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung.

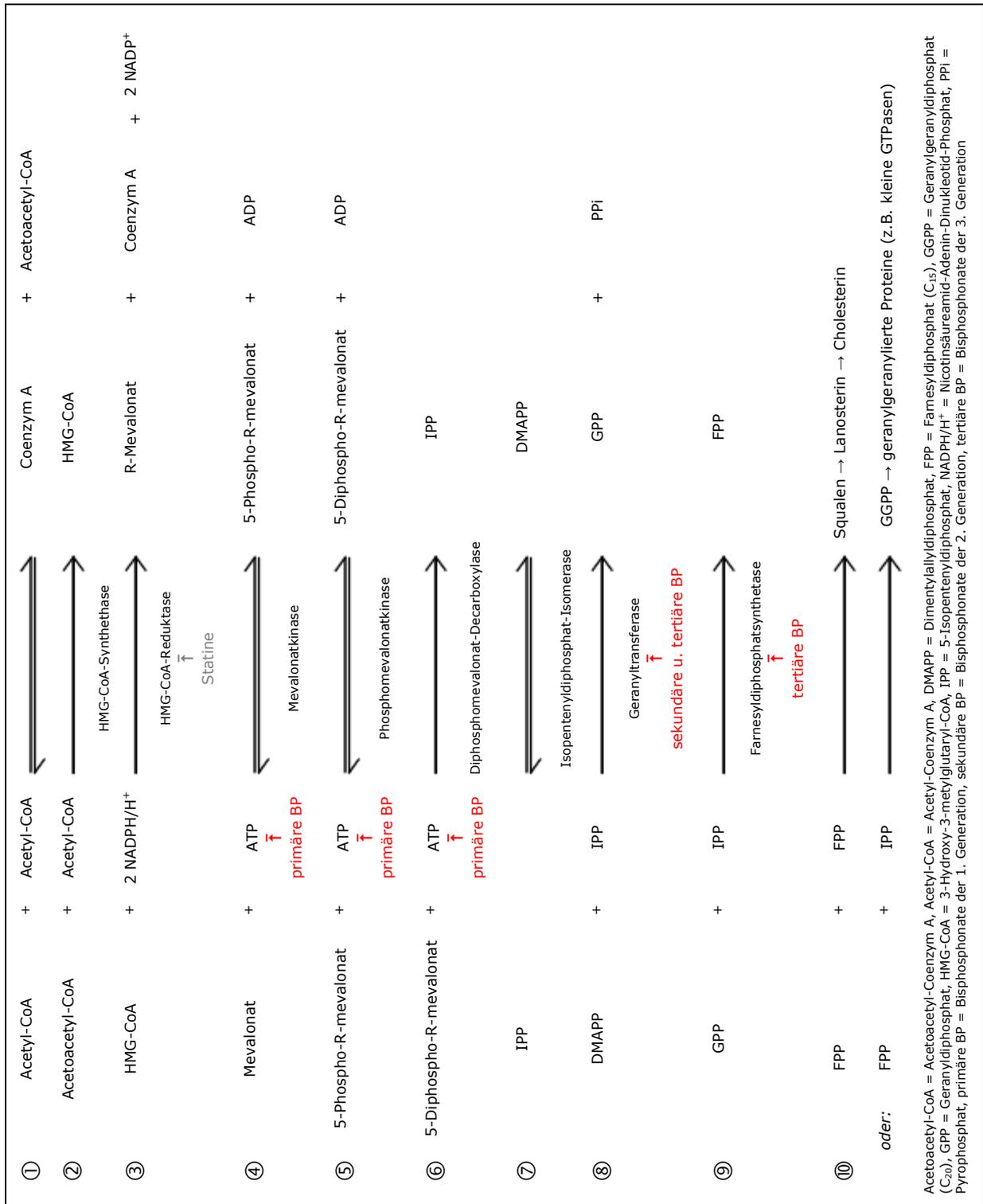


Abbildung 3:
 Der Mevalonatweg und die Wirkorte der unterschiedlichen Generationen von Bisphosphonaten

[van Beek E et al., 1999, Ghoneima AA et al., 2010 und Hauser K, 2006]

I.1.8.b. zelluläre Ebene

Grundsätzlich greifen Bisphosphonate in den Metabolismus aller Zellen ein, da sie jedoch von Osteoklasten vermehrt aufgenommen werden, ist ihre Wirkung dort besonders ausgeprägt. Zum einen lässt sich die Wirkung von Bisphosphonaten auf Osteoklasten als eine Inhibition ihrer Aktivität zusammenfassen, zum anderen hemmen Bisphosphonate die Adhäsion der Osteoklasten an die Knochenoberfläche. Bedeutsamstes Ergebnis der oben beschriebenen Unterdrückung der Protein-Prenylierung ist bei den Osteoklasten die Retraktion und später die völlige Auflösung der Resorptionsmembran mit ihrem Bürstensaum (ruffled border) [Murakami H et al., 1995 und Sato M et al., 1991]. Doch nicht nur direkt, auch indirekt nehmen Bisphosphonate Einfluss auf die Osteoklastenzahl. Bereits die Anzahl der osteoblastären Vorläuferzellen (= Knochenmarkstromazellen) reduzieren sie, indem sie die Proliferation von Makrophagen, die Rekrutierung und die Fusionierung zu Osteoklasten behindern. Der aktivierte Transforming Growth Factor β (TGF β), ein Cytokin, soll hier ein vermittelnder Faktor sein. Außerdem hemmen Osteoblasten indirekt über den Osteoclast Resorption Inhibitor (ORI) die Osteoklastenaktivierung und -rekrutierung [Bartl R et al., 2006].

Die Effekte, die Bisphosphonate auf Osteoblasten haben, sind eng mit denen auf die Osteoklasten verknüpft. So steigern Osteoblasten die osteoklastische Aktivität über die RANK-RANKL-Interaktion und der damit ausgelösten NF κ B-Signalkaskade kontrolliert durch Osteoprotegerin (OPG). Bisphosphonate inhibieren die RANKL-Expression und steigern die OPG-Produktion, was zu einer Reduktion des Knochenabbaus führt [Sarin J et al., 2008].

Osteozyten werden scheinbar durch Bisphosphonate positiv beeinflusst, was die Erklärung dafür sein könnte, warum insgesamt das Frakturrisiko bei Osteoporosepatienten unter Bisphosphonatgabe sinkt, ohne dass die Knochendichte steigt [Bartl R et al., 2006].

Neben den Wirkungen von Bisphosphonaten auf die drei unterschiedlichen Knochenzellen rücken die Endothelzellen als möglicher Wirkungsort erst in jüngster Zeit in den Blickpunkt, obwohl seit 1794 die enge Verknüpfung von Osteogenese und Angiogenese bekannt ist [Hunter J, 1794]. Das von

Osteoklasten exprimierte Matrixmetalloprotein-9 (MMP-9) ist ein Stimulans für die Angiogenese im Knochen [Cackowski FC et al., 2010].

Insbesondere die inhibierende Wirkung der Bisphosphonate auf die tumor-assoziierte Angiogenese ist belegt [Croucher PI et al., 2003]. Die Bisphosphonat-induzierte Hemmung der Proteinprenylierung scheint nicht nur bei Fibroblasten und Osteoblasten zu einer reduzierten Synthese von extrazellulären Proteinen wie Kollagen [Simon MJ et al., 2010], sondern auch zu Konsequenzen im Bereich der Angiogenese zu führen [Ziebart T et al., 2011]. Bisphosphonate sollen zum einen über eine Hemmung von Integrinen und eines Lamininrezeptors auf Endothelzellen diese antiangiogenetischen Effekte vermitteln. Zum anderen nehmen sie Einfluss auf angiogenetische Wachstumsfaktoren wie den Vasculcar Endothelial Growth Factor (VEGF) und den basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) [Bartl R et al., 2006].

Neben der ursprünglichen Indikation von Bisphosphonaten bei metabolischen Knochenerkrankungen finden sie inzwischen auch großen Einsatz in der Onkologie. Dies ist neben der oben beschriebenen Inhibition der tumorassoziierten Angiogenese in der hemmenden Wirkung auf das Tumorstadium durch Störung der intrazellulären Signaltransduktion und dem antiproliferativen Effekt des Medikamentes begründet. In hohen Dosen führen hochpotente Bisphosphonate Tumorzellen direkt in die Apoptose. Indirekt wirken sie über eine Beeinträchtigung der Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen an Knochenoberflächen und der Osteoklastenhemmung und der damit gedrosselten Interleukin-6 (IL-6)-Produktion [Giuliani N et al., 1998], was zu einer verminderten Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der Knochenmatrix führt [Bartl R et al., 2006]. Von großer Bedeutung im Bereich der Effekte auf Tumorzellen ist auch die Wirkung auf das Protoonkogen ras [Li YY et al., 2011] und die Inhibition der MMP-2, 9, und 12 [Brown JE et al., 2004].

I.1.8.c. gewebliche Ebene

Die im Gewebe zu beobachtenden Effekte sind bei allen Bisphosphonaten ähnlich: Sie reduzieren die turnover-Rate des Knochens. Dies resultiert aus einer Reduktion der über das coupling miteinander verbundenen Knochen-

resorption und Knochenneubildung. Auf Ebene der einzelnen remodeling-Einheit erfolgt mehr Formation als Resorption. Ergebnis ist ein Nettozuwachs an Knochen [Rodan GA et al., 1996].

Die antiangiogenetischen Eigenschaften der Bisphosphonate führen zu einer Inhibition der endothelialen Proliferation und zu einer Minderung der Neoangiogenese [Fournier P et al., 2002].

I.1.9. Nebenwirkungen

Bei korrekter Einnahme und Dosierung sind Bisphosphonate allgemein gut verträglich [Adami S et al., 1996]. Bei Einnahme von Zoledronat zeigen etwa ein Drittel der Patienten milde Nebenwirkungen.

Bei intravenös applizierten Aminobisphosphonaten zeigt sich bei der ersten Gabe oft eine Akute-Phase-Reaktion. Durch den Eingriff des Medikamentes in den Mevalonsäurestoffwechsel kommt es zunächst zu einem deutlichen Anstieg der Isopentenyl-Pyrophosphat-Konzentration in den Osteoklasten, was eine Tumor Necrosis Factor α (TNF α)- und Interferon γ (INF γ)-Ausschüttung induziert. Diese vermitteln die Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen und einen IL-6 Anstieg. Klinisch zeigen sich grippeähnliche Symptome mit Temperaturanstieg und Knochenschmerzen.

Insbesondere bei Patienten mit vorgeschädigten Nieren kann die Komplexierung des Calciums durch die Bisphosphonate zu einem akuten Nierenversagen führen. Die Inzidenz hierfür ist jedoch stark von der jeweiligen Pharmakokinetik des gewählten Präparates abhängig.

Ebenso ist die Hypokalzämie mit der Chelatbildung des Bisphosphonates mit Ca²⁺-Ionen zu erklären. Die Abnahme des ionisierten Calciums im Serum bleibt in aller Regel jedoch symptomlos. Die im Blutbild zu diagnostizierende Hypophosphatämie gilt als die häufigste Nebenwirkung.

2-10 % der Patienten, die Bisphosphonate oral einnehmen, berichten von gastrointestinalen Nebenwirkungen (wie Diarrhoe, Übelkeit, Völlegefühl, Magenschmerzen und uncharakteristischen Bauchbeschwerden), die in plazebokontrollierten Studien jedoch nicht nachgewiesen werden konnten, jedoch teils zu einer schlechten Compliance führen [Bartl R et al., 2006]. Eine ulzerierende Ösophagitis bei Aminobisphosphonaten kann als schwere

Nebenwirkung sicher durch striktes Einhalten der Einnahmeverordnungen (Einnahme mit ausreichend Leitungswasser und anschließenden Einhalten einer aufrechten Körperposition für mindestens 30 Minuten) verhindert werden [Adami S et al., 1996].

Bei weniger als einem von hundert, aber mehr als einem von eintausend Behandelten treten okuläre, hämatologische oder ototoxische Effekte auf. Weiterhin sind auch Asthmaanfälle, Hautausschläge und lokal auftretende Phlebitiden zu beobachten [Bartl R et al., 2006].

Über atypische Stressfrakturen des proximalen Femurschafts bei Osteoporosepatienten unter Langzeit-Bisphosphonatgabe (insbesondere solcher die Alendronsäure enthalten) wurden nach der Markteinführung von neueren Bisphosphonat-Präparaten vermehrt Fallberichte publiziert [Abrahamsen B et al., 2012 und Hsiao FY et al., 2011], woraufhin 2011 das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte nach einem Beschluss der Europäischen Kommission anordnete, die atypischen Stressfrakturen in der Liste möglicher Nebenwirkungen aufzuführen [Bundesinstitut für Arzneimittel u. Medizinprodukte, 2011]. Dennoch gilt diese Nebenwirkung als selten. Immer wieder wird über Vorhofflimmern als mögliche Nebenwirkung einer Bisphosphonat-Medikation diskutiert [Pazianas M et al., 2010].

Eine als gelegentlich auftretende eingestufte, aber relevante Komplikation, über die der Patient vor der Verschreibung aufzuklären ist, ist die Osteonekrose des Kieferknochens (*siehe I.2. Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose ab Seite 15*).

I.1.10. Wechselwirkungen

Die gleichzeitige Gabe von Medikamenten, die polyvalente Kationen (Ca^{2+} , Al^{3+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$) enthalten, senkt die Absorption von Bisphosphonaten. Bei Aminoglykosiden, die additive Effekte auf den Serumcalciumspiegel nehmen können, und bei Substanzen, die Einfluss nehmen auf die Nierenfunktion, ist Vorsicht geboten [Rote Liste® Service GmbH, 2011].

I.2. Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose

I.2.1. Historie

Unter dem relativ neuen Begriff der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose wurden erstmals im Jahre 2003 von Marx Patientenbefunde in einem Fallbericht zusammen getragen, die alle ein ähnliches klinisches Bild zeigten und zudem eine Bisphosphonat-Medikation in der Anamnese aufwiesen [Marx RE, 2003]. Häufig waren bei den überwiegend onkologisch grunderkrankten Patienten zahnärztlich-chirurgische Eingriffe vorgenommen worden, bevor sie die beschriebene Klinik entwickelten. Daher wurde ein kausaler Zusammenhang zwischen Bisphosphonaten und Knochennekrose zunächst bezweifelt [Tarassoff P, Csermak K, 2003].

Von der Erstbeschreibung bis zum Jahre 2012 sind 1.100 Publikationen zu Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen veröffentlicht worden, in denen unter anderem insgesamt 12.000 Patientenfälle dokumentiert wurden [Marx RE, 2012].

I.2.2. Begriff

Für ein und das gleiche Krankheitsbild werden heute in der Literatur verschiedene Terminologien genutzt. Am weitesten verbreitet ist in der Literatur der englische Begriff „bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw“ (abgekürzt als BP-ONJ, selten auch als BAONJ) und im Deutschen äquivalent dazu „Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose bzw. Osteonekrose“. Dies ist auch der Terminus der in dieser Arbeit verwendet wird.

Je nachdem, welchen Aspekt ein Autor betonen möchte, finden sich auch „bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws“ (BIONJ), „bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws“ (BRONJ), „avascular necrosis“ (AVN) oder auch „osteonecrosis“ [Marx RE, 2012].

Die allgemeiner gefasste Bezeichnung ist die der Medikamenten-assoziierten Kiefernekrose [Grötz KA et al., 2012].

I.2.3. Definition

Im Jahre 2007 definierte die Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (DGMKG) die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose als pathophysiologisch eigene Entität der Knochennekrosen mit Osteonekrosen der Kieferknochen, freiliegendem Knochen ohne Tendenz zur Spontanheilung und Assoziation einer Bisphosphonat Langzeittherapie, die lokal nicht durch ein anderes (z.B. malignes) Geschehen erklärt werden kann. Weiterhin zeichnet diese Erkrankung ihre ausgeprägte Morbidität mit langwierigem Verlauf aus [Al-Nawas B et al., 2007]. Nach der American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) müssen folgende drei Kriterien zur Diagnose einer Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose des Kiefers vorliegen: Der freiliegende Kieferknochen persistiert seit mindestens acht Wochen, der Patient weist eine Bisphosphonat-Therapie und keine Radiatio im Kopf-Hals-Bereich in seiner Anamnese auf [Ruggiero SL et al., 2009]. Diese Definition verwendet seit 2012 auch die DGMKG [Grötz KA et al., 2012].

I.2.4. Klinik

Als klinische Symptome zeigen sich, ähnlich einer infizierten Osteoradionekrose, dabei insbesondere ein Os liber, eine kompromittierte primäre Wundheilung sowie ein dominanter Foetor ex ore. Weiterhin können oftmals Schmerzen, Schwellungen, Exsudationen, Zahnlockerungen, Abszesse und Fistelungen im betroffenen Areal des Kieferknochens beobachtet werden. Als Funktionsstörungen treten Sensibilitätsstörungen wie das Vincent-Syndrom in der Mandibula oder ein Trismus auf [Otto S et al., 2009].

Radiologisch zeigt sich im frühen Stadium kein pathognomonisches Bild. Später können auch lange Zeit nach einer Extraktion radiologisch persistierende, nicht knöchern remodellierte Alveolen, eine veränderte Knochendichte bzw. Radioopazität im Sinne einer Osteolyse und Sequestrierungen ggf. mit „Totenladenphänomen“, wie es als typisch für eine Osteomyelitis gilt, dargestellt werden [Grötz KA et al., 2006]. Oft können auch Parodontalspalterweiterungen diagnostiziert werden [Grötz KA et al., 2006a].

Zu einem Drittel ist ein solcher Befund im Oberkiefer lokalisiert. Weitaus häufiger, zu zwei Dritteln, hingegen im Unterkiefer. Grundsätzlich kann eine solche Nekrose spontan oder assoziiert mit anderen Faktoren auftreten. So können Druckstellen durch nicht kongruenten tegmental gelagerten Zahnersatz oder festsitzende Brückenglieder, die der Schleimhaut mit Druck aufliegen, am Beginn der Ätiologie stehen. Eine nennenswerte Komplikation ist die BP-ONJ nach zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen, wie der Zahnextraktion ohne plastische Deckung.

I.2.5. Differenzialdiagnosen

Mazziotti et al. führen unterschiedliche Erkrankungen als Differenzialdiagnosen zur BP-ONJ auf [Mazziotti S et al., 2012]. So kann eine Metastase von einem Brust-, Nieren-, Prostata-, Lungen- oder Magentumor, eine Osteomyelitis, eine Osteoradionekrose oder eine neuralgie-induzierende kavitätenbildende Osteonekrose ähnliche klinische und/oder radiologische Befunde wie eine Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose zeigen.

I.2.6. Staging

Es liegen unterschiedliche Konzepte zur Gradifizierung einer Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose vor. Weit verbreitet ist die Kategorisierung, die die AAOMS 2009 vorgestellt hat [Ruggiero SL et al., 2009].

Neben den Einteilungen Stage 0-3 führt sie Patienten ohne jegliche Symptomatik, aber mit positiver Bisphosphonat-Anamnese in einer gesonderten Gruppe auf. Stage 0 beschreibt unspezifische klinische Befunde und Symptome allerdings ohne Evidenz eines Os liber. Demnach fehlt bei der Stage 0-Diagnose ein wesentliches, laut Definition zwingendes, Kennzeichen der BP-ONJ. Patienten mit exponierten und nekrotischen Knochen ohne Symptomatik oder Infektion werden in die Gruppe Stage 1 eingeteilt. Stage 2 hingegen beschreibt einen infizierten Os liber bei Schmerzen. Zeigt sich zusätzlich zu den drei Kennzeichen, die zur Einteilung Stage 2 führen, noch ein weiterer Befund, so ist die BP-ONJ als Stage 3 zu

klassifizieren. Mögliche Befunde können sein: Freiliegender Knochen über den Alveolarfortsatz hinaus, pathologische Frakturen, extraorale Fisteln, oral antral/oral nasale Verbindungen und/oder Osteolysen mit einer Ausdehnung bis in die inferiore Begrenzung der Mandibula oder an den Kieferhöhlenboden.

I.2.7. Risikofaktoren

Bei 60 % aller an BP-ONJ erkrankten Patienten steht zu Beginn der klinischen Symptomatik ein dentoalveoläres Trauma. Somit ist dieses sicher als Hauptrisikofaktor zu nennen, auch wenn von spontan auftretenden Fällen berichtet wird [Vescovi P et al., 2012].

Detaillierter kann zwischen drei Gruppen von Risikofaktoren unterschieden werden: Lokale Faktoren wie die anatomische Gegebenheit einer prominenten Linea mylohyoidea, eine bakterielle Infektion mit *Actinomyces* sowie insgesamt dentogene Infektionen, Weichteil-Knochen-Wunden unterschiedlichster Genese, Knochendestruktionen durch eine Radiatio oder enossale Metastasen im Kopf-Hals-Bereich in der bisherigen Anamnese und parodontale Erkrankungen können die Entwicklung einer ONJ begünstigen [Aghaloo TL et al., 2011]. Patienten mit einer entzündlichen dentalen Erkrankung wie z.B. einem dentogenen Abszess haben ein um den Faktor 7 gesteigertes Risiko an einer BP-ONJ zu erkranken [Hoff AO et al., 2008].

Als allgemeine oder generelle Risikofaktoren gelten neben dem Allgemein-, Ernährungs- und Kräftezustand [Al-Nawas B et al., 2007], eine schlechte Mundhygiene und Alkohol- und Tabakkonsum auch verschiedene Grunderkrankungen (insbesondere Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen, maligne Tumorerkrankungen und hämatologische oder thrombotische Erkrankungen sowie genetische Mutationen in Form von Polymorphismen) [Leuci S et al., 2012]. Weiterhin erkranken mehr Menschen mit einem Lebensalter > 60 Jahren und mehr Frauen als Männer [Oteri G, 2012].

Drittens sind die medikamentösen Risikofaktoren zu nennen. Verstärkend kann die Einnahme immunmodulierender oder immunsuppressiver Medikamente wie Chemotherapeutika oder Kortikosteroide und von Thalidomid wirken [Leuci S et al., 2012 und Oteri G, 2012].

Die Konzentration des CTX-Wertes im Blutserum gilt als Marker für das Knochenremodeling und die Knochenresorption [Rosen HN et al., 2000]. Sie ist bei BP-ONJ-Patienten verändert und kann nach einer von Marx entwickelten Richtlinie bei der Risikoabschätzung nach chirurgischen Eingriffen hilfreich sein [Marx RE et al., 2007].

I.2.8. Komplikationen

Als Komplikationen einer BP-ONJ sind rezidivierende oder persistierende Nekrosen bekannt. Sie können mit voranschreitendem Knochenverlust, bis hin zu einer pathologischen Fraktur, verbunden sein. Gefürchtet ist eine Infektionsausbreitung. Im Verlauf der Erkrankung kann es zu einer Mitbeteiligung der Zähne, meist deren Verlust, kommen. Als Folge von Sensibilitätsstörungen, Motilitätsstörungen und Fisteln kann es zu Kau-, Schluck- und Sprechfunktionsstörungen sowie zur Mundöffnungseinschränkung kommen [Al-Nawas B et al., 2007].

I.2.9. Inzidenz und Prävalenz

Bis heute ist die genaue Ätiologie der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose nicht geklärt. Gesichert ist hingegen, dass das Risiko für eine BP-ONJ mit der Dosis, der Therapiedauer und der Potenz des verabreichten Bisphosphonates steigt [Dodson TB , 2009 und Otto S et al., 2011].

In einer klinischen Studie mit 252 Teilnehmern konnten Bamias et al. nachweisen, dass die Inzidenz einer BP-ONJ mit der Zeit der Exposition von 1,5 % bei Patienten die 4-12 Monate Bisphosphonate erhielten auf 7,7 % nach einer Behandlung über 37-48 Monate anstieg. Zudem entwickelten Patienten, die den Wirkstoff Zoledronat erhielten, signifikant häufiger eine Kiefernekrose, als Patienten die ein anderes Bisphosphonat-Präparat erhielten [Bamias A et al., 2005].

Intravenös verabreichte Bisphosphonate bergen immer ein höheres Risiko für eine ONJ als Spätkomplikation als oral applizierte. Ob oral verabreichte Bisphosphonate wie sie bei der Therapie einer Osteoporose Einsatz finden

überhaupt eine Kiefernekrose auslösen können ist zurzeit strittig [Grötz KA et al., 2012]. Für Osteoporosepatienten konnte eine Inzidenz von weniger als einem Fall pro 100.000 Expositionsjahren errechnet werden, wobei die Inzidenz einer Kieferosteonekrose in der Allgemeinbevölkerung unbekannt ist [Khan AA et al., 2009]. Beruhend auf diesen Risikoparametern teilt die DGMKG in der aktuellen S3-Leitlinie die Patienten in drei Risikoprofile mit unterschiedlich hoher Prävalenz für eine ONJ ein. In der Gruppe mit einem niedrigen Risiko eine BP-ONJ zu entwickeln (Prävalenz $\sim 0,1$ %) sieht sie Patienten mit einer primären Osteoporose und oraler Bisphosphonat-Therapie oder einmal jährlicher Infusion. Für Patienten mit therapie-induzierter Osteoporose und intravenöser Bisphosphonat-Therapie alle 6 Monate wird ein mittleres Risiko, mit einer Prävalenz von ~ 1 % angegeben. Mit einer Prävalenz von 1-19 % tritt eine Kieferosteonekrose bei Patienten auf, denen aufgrund einer Tumorerkrankung monatlich Bisphosphonate verabreicht werden. Sie müssen als Hochrisikopatienten betrachtet werden. Bei einer Kombination von Bisphosphonaten mit einem Angiogenesehemmer wird von einer Prävalenzsteigerung um den Faktor 15, im Vergleich zur alleinigen Bisphosphonat-Gabe, berichtet [Grötz KA et al., 2012].

Zur Inzidenz finden sich Werte zwischen 3 und 10 %, wobei noch weiter nach Art der Grunderkrankung und der damit gestellten Indikation zur Bisphosphonat-Therapie unterschieden werden kann [Bamias A et al., 2005, Dimopoulos MA et al., 2006 und Zervas K et al., 2006].

Seit der Erstbeschreibung der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose häufen sich die Fallberichte zu diesem Erkrankungsbild, sodass offenbar von einer progredienten Erkrankungshäufigkeit auszugehen ist [Carter G et al., 2005, Melo MD et al., 2005 und Purcell PM et al., 2005].

I.2.10. Therapie

Grundsätzlich kann zwischen konservativen (sogenannten nicht-chirurgischen) und chirurgischen Behandlungsformen unterschieden werden. Im Rahmen einer konservativen Behandlung kann neben dem Einsatz von Medikamenten und Spüllösungen, Sauerstoff (in Form einer hyperbaren Sauerstoff-Therapie) und Ozon [Agrilli A, 2012] ebenso wie die LASER-

Technologie Anwendung finden [Vescovi P, 2012a]. Die chirurgische Intervention kann in minimalinvasive Therapie [Marchetti C et al., 2012] und große Chirurgie [Catalfamo L et al., 2012] eingeteilt werden. Aus diesen Optionen leiten sich unterschiedliche Konzepte zur Therapie der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose ab.

So wird beschrieben, dass durch ausschließlich konservatives Vorgehen bei der Hälfte der behandelten BP-ONJ-Patienten Beschwerdefreiheit und bei einem Viertel Heilung erzielt werden kann [Hoff AO et al., 2008]. Von Heilungsraten zwischen 30 und 60 % wird nach einer partiellen Nekroseabtragung ohne plastische Weichteildeckung berichtet [Lazarovici TS et al., 2009]. Bei nahezu 100 % der Patienten, bei denen die Nekrose operativ vollständig abgetragen und der Defekt plastisch gedeckt wurde, konnte eine Ausheilung der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose verzeichnet werden [Wilde F et al., 2011, Stockmann P et al., 2010 und Carlson ER et al., 2009]. Ob diese Ausheilung auch langfristig stabil ist, ist strittig. So werden klinische Rezidive nach gezielter operativer Abtragung der Osteonekrose mit anschließender plastischer Deckung ohne Teilresektion des betroffenen Kiefers diagnostiziert [Abu-Id MH et al., 2006 und Abu-Id MH et al., 2007]. Diskutiert wird weiterhin ob die Unterbrechung der Bisphosphonat-Gabe („drug holiday“) bis zur Ausheilung einer Osteonekrose indiziert ist [Marchetti C et al., 2012 und Grötz KA et al., 2012].

Die Empfehlungen und Leitlinien zur Therapie einer Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose unterscheiden sich im deutschsprachigen Raum deutlich von dem anglo-amerikanischen Vorgehen, wobei jeweils auch andere Therapieziele angestrebt werden. Die DGMKG strebt eine Heilung der BP-ONJ, eine Rezidivprophylaxe und eine Rehabilitation des Patienten an. Dazu empfiehlt sie eine primär operative Nekrose-spezifische Therapie mit adjuvant konservativen Maßnahmen [Al-Nawas B et al., 2007]. Die AAOMS strebt den Erhalt der Lebensqualität unter Begleitung der laufenden onkologischen Therapie als Therapieziel an. Dabei zeigt sie ein stadienbezogenes Vorgehen auf, das sich am klinischen Erscheinungsbild orientiert. Die erste Stufe bildet hier eine konservative Therapie mittels CHX-Spülungen, Antibiotikagabe und Entfernung loser Knochensequester. Erst

als zweite Stufe empfiehlt sie chirurgische Debridements und Resektionen [Ruggiero SL et al., 2009].

Unstrittig ist die Notwendigkeit einer Prophylaxe vor und die Prävention einer Kiefernekrose während und nach einer Bisphosphonat-Therapie. Vor einer Bisphosphonat-Medikation sollten alle Patienten vom verordnenden Arzt an einen Zahnarzt und/oder einen MKG-Chirurgen zur Sanierung entzündlicher Prozesse im intraoralen Schleimhaut- und Kieferbereich überwiesen werden. Vergleichbar mit dem Konzept vor einer geplanten Radiatio im Kopf-Hals-Bereich. Allerdings liegen bei einer BP-ONJ keine Anhaltspunkte für eine raschere Progredienz einer Karies vor und es tritt keine pharmakogene Xerostomie oder eine erhöhte Vulnerabilität der Mukosa ein.

Maßgeblich bei der Erstellung eines Behandlungsplanes ist der jeweilige Parodontalzustand der Zähne. Zähne, die in absehbarer Zeit nicht (parodontal) zu sanieren sind, gilt es vor oder unmittelbar zu Beginn einer Bisphosphonat-Therapie bei Hochrisikopatienten (*siehe oben*) zu entfernen. Scharfe Kanten und Druckstellen als Prädilektionsstellen sind ebenso zu beseitigen.

Unter laufender Bisphosphonat-Therapie wird den Patienten ein Recall im Abstand von sechs Monaten zur Prävention und Früherkennung einer ONJ empfohlen. Kommt es zu Komplikationen ist unmittelbar zu reagieren. Sind operative Eingriffe erforderlich, so empfiehlt sich ein atraumatisches Vorgehen, bei systemisch verabreichter Antibiotikaprophylaxe mit plastischer Deckung der weichgeweblichen Wunden [Grötz KA et al., 2006a].

I.2.11. Ätiologie und Pathogenese

Bereits Marx führte in seiner Erstbeschreibung der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose Erklärungen zur Pathogenese an [Marx RE, 2003]. Dabei beschreibt er die Aminobisphosphonate als einen Faktor in der multifaktoriellen Ätiologie der avaskulären Nekrose im Kieferknochen.

Zur Hemmung der Osteoklastenaktivität zeigte er unterschiedliche, bereits bekannte Mechanismen auf: So wird die Ausbildung der Vorläuferzellen der Osteoklasten im Knochenmark verhindert [Hughes DE et al., 1989], ebenso

die Osteoklastenentwicklung aus den Monozyten. Die Apoptoserate der Osteoklasten wird unter Bisphosphonat-Medikation gesteigert [Hughes DE et al., 1995], der Osteoklasteninhibitionsfaktor wird stimuliert [Vitte C et al., 1996] und die Minderung der Osteoblastenaktivität führt zu einer Herabregulation der Matrix-Metalloproteinasen [Sato M et al., 1990].

Neben der Wirkung auf die Osteoklasten zeigen aber auch Endothelzellen (bzw. experimentell HUVECs) ein verändertes Verhalten unter Bisphosphonaten. Konzentrationsabhängig nimmt es Einfluss auf die Proliferation, die Adhäsion und die Migration [Wood J et al., 2002]. Der antiangiogenetische Effekt erfolgt über eine Inhibition der Angiogenese und eine Verminderung des Blutflusses [Allen MR et al., 2009]. Das physiologische Gleichgewicht der osteoklastischen Stimulation der Angiogenese über einen MMP-9-Schutzmechanismus bricht zusammen [Yin G et al., 2011].

Insgesamt finden sich in der Pathogenese somit die molekularen und zellulären Wirkmechanismen der Bisphosphonate wieder (*siehe oben*). Doch bleiben in der Ätiologie und der Pathogenese der Erkrankung Fragen offen [Allen MR et al., 2009].

Unterschiedliche Hypothesen werden zur Beantwortung dieser Fragen herangezogen. Die Beobachtung, dass sich Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrosen besonders häufig nach zahnärztlichen Eingriffen oder in Folge von Druckstellen entwickeln, lässt einen direkten kausalen Zusammenhang vermuten [Vahtsevanos K et al., 2009]. Folglich stünden Veränderungen im Weichgewebe am Beginn der Pathogenese. Die Epithelisierung als maßgeblicher Faktor in der Wundheilung könnte durch Bisphosphonate gestört werden und zu dem typischen klinischen Bild eines Os liber führen. Doch selbst wenn Bisphosphonate in hohen Konzentrationen auf die Mundschleimhaut lokal aufgebracht cytotoxische Wirkungen zeigen [Rubegni P et al., 2006], so erklärt dies nicht das Auftreten einer ONJ bei intravenöser Applikation von Bisphosphonaten. Anders als im Knochen, in dem Bisphosphonate aufgrund der hohen Affinität zu Hydroxylapatit akkumulieren, kommt die Mundschleimhaut nicht über längere Zeit mit hohen Konzentrationen an Bisphosphonaten in Kontakt, noch reichert sie diese Substanz an [Lin JH, 1996]. Auch der abfallende pH-Wert bedingt

durch eine Infektion, der dazu führt, dass im Knochen gebundenes Bisphosphonat wieder freigesetzt wird, wird als Ursache diskutiert [Otto S et al., 2010]. Ebenso die häufig mit einer Osteonekrose im Kiefer assoziierte Besiedlung mit Actinomyceten [Hansen T et al., 2007 und Sedghizadeh PP et al., 2008].

Wahrscheinlicher ist es jedoch, dass am Anfang einer BP-ONJ Veränderungen innerhalb des Skeletts stehen [Allen MR et al., 2009]. Weit verbreitet ist die Hypothese, dass die durch Bisphosphonate künstlich unterdrückte remodeling-Rate des Knochens Ausgangspunkt der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose ist [Allen MR et al., 2009]. Grundlage dieser Überlegung ist, dass im physiologischen Zustand die Knochenumbaurate im Kieferknochen im Vergleich zu anderen Knochen besonders hoch ist. Das intracorticale remodeling im Kieferknochen ist 3-6 Mal höher als z.B. im Femur [Huja SS et al., 2006]. Bei einer verringerten Umbaurate können Knochenbereiche mit Mikrofrakturen, die im Kiefer aufgrund seiner enorm hohen Kaubelastung, bei der Kräfte um 1,7 kN wirken [Körber KH et al., 1983], gehäuft auftreten, nicht zeitnah resorbiert und neu synthetisiert werden [Marx RE, 2003, Berglundh T et al., 2003 und Cardaropoli G et al., 2003].

Die reine Feststellung dieser Fakten lässt es aber nicht zu einen kausalen Zusammenhang zwischen Bisphosphonaten und der Osteonekrose isoliert im Kieferknochen herzustellen. Auffällig ist, dass bei Patienten denen im Rahmen einer Osteoporose- oder Krebstherapie Denosumab, ein relativ neu entwickelter monoklonaler anti-RANKL-Antikörper (Markteinführung des ersten Präparates 2010), der die turnover-Rate ebenfalls deutlich (bis zu 50 %) reduzieren kann, verabreicht wurde ebenfalls das klinische Bild einer ONJ beobachtet werden konnte [Taylor KH et al., 2010 und Kyrgidis A et al., 2011]. Auch Patienten mit genetischen Mutationen, die die Aktivität von Osteoklasten betreffen (z.B. autosomal dominante Osteopetrosis (ADO) oder auch als Albers-Schönberg-Erkrankung bezeichnet), bilden Osteonekrosen im Kieferknochen aus [Waguespack SG et al., 2003].

Widersprüchlich zu diesen Erkenntnissen ist die Tatsache, dass bei Kindern mit Osteogenesis imperfecta, die hohe Dosen an Bisphosphonaten erhalten, bislang keine Fälle von BP-ONJ publiziert sind [Malmgren B et al., 2008].

Möglicherweise ist in der Pathogenese der ONJ der entscheidende Punkt nicht die Wirkung des Bisphosphonates auf bereits bestehenden Knochen oder dem im Rahmen der Wundheilung gebildeten Geflechtknochen, sondern entscheidend ist, dass unter Bisphosphonaten der Umbau hin zu laminären Knochen verlangsamt erfolgt [Cardaropoli G et al., 2003 und Kingsmill VJ, 1999]. So wie es auch für die Frakturheilung unter Bisphosphonaten beschrieben ist, dass das remodeling des Kallus verlangsamt erfolgt [McDonald MM et al., 2008]. Die Verzögerung im Umbau des Knochens, der während der Wundheilung in der Mundhöhle gebildet wurde, könnte zu einer Osteonekrose führen [Allen MR et al., 2009].

Eine weitere Hypothese dazu, warum isoliert im Kieferknochen Nekrosen assoziiert mit Bisphosphonat-Medikation auftreten, ähnliches aber nicht an anderen Lokalisationen des Skelettes zu beobachten ist, bezieht sich auf die Angiogenese. Es ist bekannt, dass Osteoklasten und Osteoblasten für die Angiogenese über einen Mechanismus, in dem MMP-9 freigesetzt wird, bedeutsam sind. Allerdings scheinen in den unterschiedlichen Knochen des Skeletts mal eher die Osteoklasten und mal eher die Osteoblasten (vor allem in den langen Röhrenknochen) die für die Angiogenese stimulierenden Zellen zu sein. Bisphosphonate wirken insbesondere auf die Osteoklasten. Wären diese im Kieferknochen die dominierenden Zellen in der Angiogenese-Stimulanz, könnte dieser Mechanismus im Verständnis der Pathogenese der BP-ONJ weiter helfen [Cackowski FC et al., 2010].

I.3. Osteoblasten und Knochenumbau

Jedes Knochengewebe besteht zu 35 % aus organischen und zu 65 % aus mineralischen Komponenten, die überwiegend aus dem zwischen den Kollagenfibrillen der organischen Matrix liegendem Hydroxylapatit besteht. Neben Wasser sind die vier knochenspezifischen Zellen, die Osteoblasten, die Osteoklasten, die Osteozyten und die endostalen Belegzellen, der vierte Hauptbestandteil des Knochens [Fleisch H, 2000].

Näher soll hier auf die Knochenmatrix synthetisierenden Osteoblasten eingegangen werden. Ihren Ursprung nehmen diese Zellen in ihren multipotenten Stammzellen der osteogenen Zell-Linie in den mesenchymalen oder stromalen Stammzellen, auch „colony forming units–fibroblasts“ (kurz: CFU-f) genannt. In Verbänden von 100-400 Zellen ordnen sich Osteoblasten epithelartig auf der Knochenoberfläche an, wobei der jeweils einzelne Zellkern auf der dem Knochen abgewandten Seite lokalisiert ist [Bartl R et al., 2006] und die Zellen untereinander über Connexone zu gap junctions verbunden sind [Fleisch H, 2000]. Entsprechend ihrer Hauptfunktion, der Knochenbildung ist das Cytoplasma reich an alkalischer Phosphatase und stark basophil. Neben dem Osteoid werden unter anderem Kollagen Typ I, Osteocalcin, Osteonectin und bone morphogenic protein (BMP) synthetisiert. Im Laufe des Syntheseprozesses differenzieren sich die Osteoblasten zu einem Gerüst nicht mehr teilungsfähiger Osteozyten.

Insulin-like Growth Factors (IGFs), TGF β , saure und basische bFGFs, platelet-derived growth factor (PDGF), BMPs und Prostaglandine nehmen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der Zelle. Fluoride, Statine und PTH fördern die Syntheseleistung an Osteoid, Leptin hemmt sie. Im Rahmen des couplings regulieren Osteoblasten die Osteoklastenaktivität und nehmen so indirekt Einfluss auf den Knochenabbau [Bartl R et al., 2006].

Knochendefekte, wie sie zum Beispiel nach einer Zahnextraktion oder einer Fraktur entstehen, können über die Osteogenese, einem Regenerationsprozess knöcherner Strukturen ohne Bildung von Narben- oder

Ersatzgewebe, ausheilen. Ihren Ausgang nimmt die Wundheilung in der extrazellulären Matrix [Reddi AH, 1994]. Ausgangspunkt ist das Fibrin-Fibronectin Blutgerinnsel, das von Kollagen und Glykoproteinen gerüstartig durchzogen wird. Über die Stimulierung pluripotenter mesenchymaler Stammzellen, die Proliferation determinierter Osteoblastenvorläuferzellen und durch metaplastische Umwandlung von Zellen des Binde- und Stützgewebes kommt es zur Osteoinduktion [Kübler NR, 1997]. Getriggert wird dieser Vorgang durch BMPs. Sobald ausreichend Knochenmatrix-synthetisierende Osteoblasten bereitgestellt sind, modulieren lokal wirksame Wachstumsfaktoren - wie insbesondere TGF β , IGF, bFGF und PDGF [Hollinger J et al., 1996a und Schaub RG et al., 1991] - und systemische Faktoren - wie beispielsweise Parathormon, Vitamin D₃, Calcitonin und Östrogene [Hollinger J et al., 1996] - die weitere Osteogenese.

Unabhängig davon wie und wann ein Knochen im menschlichen Skelett gebildet wurde, ob nach dem Mechanismus der enchondralen Ossifikation oder der intramembranösen Ossifikation, ob makroskopische Corticalis oder Compacta, ob mikroskopischer Geflecht- oder Lamellenknochen, einmal gebildet unterliegt jeder Knochen lebenslang einem physiologischen Prozess des Umbaus.

Dieser erfolgt nach dem Prinzip des modeling und des remodeling.

Wobei beim modeling, im Rahmen einer biomechanischen Adaptation, Knochen an einem anderen Ort als an dem er resorbiert wurde neu synthetisiert wird. Dies erlaubt eine Veränderung von Form und Struktur des Skeletts und ist im Wachstum von großer Bedeutung, ermöglicht aber auch Anpassungsvorgänge des Knochens in späteren Lebensphasen.

Vorherrschend im Erwachsenenalter ist jedoch das remodeling. Ein Prozess in dem Knochenresorption und Knochenformation zeitlich und räumlich aneinander gekoppelt sind (coupling).

Beide Umbauvorgänge tragen physiologisch zum Erhalt der mechanischen Integrität des Knochens bei. Weiterhin ermöglicht die stetige turnover-Rate dem Knochen seine Funktion als Mineralienspeicher mit großer Bedeutung für die Calcium-Homöostase.

Jährlich werden zwischen 2 und 10 % der Knochenmasse im Skelett umgebaut. Angeregt wird dieser Prozess über Parathormon, Thyroxin, Wachstumshormone oder auch durch Mikrofrakturen und mechanische Belastung, gehemmt hingegen durch Calcitonin, Östrogen, Glucocorticoide und mechanische Ruhigstellung. Obwohl spongioser Knochen nur 20 % der gesamten Knochenmasse ausmacht, erfolgt dort 80 % der gesamten knöchernen turnover-Leistung.

Die morphologische dynamische Struktur, in der der knöcherne Umbau erfolgt ist die basic multicellular unit (MBU) oder auch bone remodeling unit (BRU) [Fleisch H, 2000]. Sie besteht aus einem oder wenigen Osteoklasten und mehreren Osteoblasten sowie begleitenden, nutritiven Kapillaren. Innerhalb von zwei Wochen erfolgt die Knochenresorption. Die anschließende Mineralisationsphase bis hin zum ausgereiften Knochen dauert hingegen Monate [Bartl R et al., 2006]. Nach Abschluss des Umbaus wird diese Einheit als bone structural unit (BSU) bezeichnet. In der Corticalis ist dies gleichzusetzen mit einem Osteon.

Ein jeder remodeling-Vorgang besteht aus zwei Teilschritten: Der Knochenauflösung durch einen Osteoklasten und der Knochenbildung durch einen Osteoblasten. Beide Zellen sind über den Mechanismus des couplings eng in ihrer Aktivität miteinander verknüpft.

Zu Beginn des remodeling-Prozesses ruht die Mehrzahl der Knochenzellen. Die Knochenresorption beginnt sobald Präosteoblasten fusionieren. In der Knochenmatrix gebundenes latentes TGF β wird durch die Osteoklastenaktivität freigesetzt und aktiviert. In einer Rückkopplung nimmt TGF β Einfluss auf die Osteoklasten. Es hemmt ihre Aktivität und führt sie in die Apoptose. In die durch die Resorption entstandenen Knochenlakunen wandern Osteoblasten, vermittelt durch Knochenmatrixbestandteile, Kollagenfragmente, Osteocalcin, TGF β und auch PDGF, ein. IGF und TGF β fördern die Proliferation von Osteoblastenvorläuferzellen. Im Anschluss an die Proliferation und die Synthese der extrazellulären Matrix differenzieren sich die Osteoblasten unter Einfluss von BMPs, 1,25-(OH) $_2$ Vitamin D $_3$, Fluorid und Vitamin A [Guise TA et al., 1998 und Mundy GR et al., 1995].

I.4. Endothelzellen und Angiogenese

Endothelzellen sind mesenchymaler Herkunft und liegen in der Tunica intima eines jeden Blutgefäßes als einschichtiges Epithel der Basalmembran auf. Durch Zonulae occludentes, Nexus und einzelne gap junctions sind die länglichen Zellen (bis zu 50 µm lang und 10-15 µm breit) miteinander zu einem Endothel verbunden. Die Regenerationsfähigkeit des Endothels, z.B. bei einer Kapillarneubildung durch Aussprossung, gilt als gut. Für Endothelzellen sind die zahlreichen Trans- und Pinozytosevesikel charakteristisch. Synthetisiert werden vasoaktive Substanzen wie Endothelin, Stickstoffmonoxid und Prostazykline. Weiterhin setzen Endothelzellen Cytokine, Wachstumsfaktoren, gerinnungsmodulierende Faktoren wie insbesondere den von Willebrand-Faktor (vWF) und Adhäsionsmoleküle frei. In Endothelzellen aus Arterien zeigen sich elektronenmikroskopisch die Weibel-Palade-Körperchen, in denen der vWF gespeichert wird. Bedeutsam sind die Endothelzellen in der Hämostase, in der Permeabilität von Blutgefäßen und in ihrer Reaktionsfähigkeit auf physiologische und pathologische Stimuli [Welsch U et al., 2003]. Weiterhin haben die Zellen eine entscheidende Funktion in der Angiogenese.

Als Angiogenese wird die Ausbildung neuer Gefäßstrukturen aus einem vorgebildeten Kapillarsystem bezeichnet, was insbesondere bei Regenerationsprozessen und der Wundheilung von Bedeutung ist. Abzugrenzen ist die Angiogenese von der Vaskulogenese in der Embryonalzeit, bei der sich über zirkulierende Angioblasten de novo Endothelzellen ausbilden [Risau W et al., 1995].

Die Angiogenese kann durch Sprossung oder Gefäßspaltung (Intussuszeption) (sprouting or non-sprouting angiogenesis) erfolgen. Wobei zunächst die dem Gefäß benachbarte extrazelluläre Matrix proteolytisch degradiert wird, Endothelzellen aus dem Gefäß heraus migrieren und proliferieren. Anschließend bildet sich ein neues Gefäßlumen, glatte Muskulatur und die von Perizyten verstärkte Gefäßwand. Vermittelt wird dieser Prozess über Wachstums- und Angiogenesefaktoren [Deetjen P et al., 2005]. Anhand ihrer

Wirkungsweise und dem Potenzial können diese Faktoren unterschiedlich beurteilt und in Gruppen eingeteilt werden. Die wichtigsten sind sicher der VEGF, Angiopoietin 1, Ephrin-B2, und der bFGF. Weiterhin sind Angiogenin, Angiotropin, TNF α , Prostaglandin₁₊₂ (PGE₁₊₂) und die Interleukine zu nennen [Folkman J et al., 1987].

Bereits John Hunter erkannte 1794, dass die Anwesenheit von Blutgefäßen eines der entscheidenden Kriterien für den Prozess der Osteogenese, sowohl in der Neusynthese von Knochen als auch beim remodeling, ist [Hunter J, 1794]. Die knochenbildenden Osteoblasten und die gefäßbildenden Endothelien stehen in direkter Wechselwirkung zueinander [Wang DS et al., 1997]. So exprimieren über 1,25-(OH)₂D₃ aktivierte Osteoblasten vermehrt mRNA die den VEGF codiert. Die Proliferation und Differenzierung von osteoblast-like cells hingegen wird durch osteogene Faktoren der Endothelzellen gesteigert [Hauschka PV et al., 1986]. Auch die Differenzierung von Osteopräkursorzellen aus kapillären Perizyten wird beschrieben [Brighton CT et al., 1992].

In der Pathophysiologie einiger Erkrankungen zeigt sich wie bedeutsam die Interaktion zwischen Endothelzellen und Osteoblasten ist und wozu eine gestörte Mikrovaskularisation des Knochens führen kann. Die Osteomyelitis [Bartkowski SB et al., 1994], die Osteoradionekrose [Marx RE et al., 1987], das Symptom der trockenen Alveole (dry socket) [Amler MH, 1999] und vermutlich auch die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose [Carter G et al., 2005] sind im Bereich der Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde zu nennen.

I.5. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es das Verhalten von Osteoblasten und Endothelzellen unter Bisphosphonat-Medikation zu untersuchen und damit weitere Hinweise zur Klärung der Pathologie der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose zu erhalten.

Dabei war von Interesse, ab welcher Konzentration eines Bisphosphonat-Präparates (Zometa[®], Wirkstoff: Zoledronsäure) und ab welcher Dauer der Medikation die Zellen reagieren. Im Verlauf von 14 Tagen wurden hierfür die Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay, das Zellpopulationswachstum mittels Cell-Count und die morphologischen Veränderungen mittels Fotodokumentation der Zellkulturen und durch Immunfärbungen untersucht.

Osteoblasten gelten zwar nicht als primäre Zielzelle des Medikaments [Rodan GA et al., 1996], doch ist über ihr Verhalten auf Bisphosphonate relativ wenig bekannt und insbesondere nicht über ihr Verhalten in vitro über einen längeren Zeitraum [Walter C et al., 2010]. Erste bereits vorliegende Studien zeigen zudem heterogene Ergebnisse [Walter C et al., 2011, Rogers MJ et al., 2000 und Eriksen EF et al., 2002].

Endothelzellen und eine gestörte Angiogenese scheinen die Pathophysiologie der Bisphosphonat assoziierten Osteonekrose mit zu erklären [Yin G et al., 2011 und Fournier P et al., 2002]. Bisher gilt die Annahme, dass die Angiogenese über die gestörte Osteogenese sekundär durch die Bisphosphonat-Gabe beeinträchtigt wird. Weitgehend ungeklärt ist hingegen ob Bisphosphonate auch direkt einen Einfluss auf die Endothelzellen nehmen.

II. Material und Methoden

II.1. Material

Für die Versuche wird folgendes Material verwendet:

II.1.1. Material für die Zellkultur

II.1.1.a. Zellen

- primäre bovine Osteoblasten-ähnliche Zellen
(bzw. Präosteoblasten, im Weiteren kurz als Osteoblasten bezeichnet)
aus dem Perisostgewebe vom Metacarpus frisch geschlachteter Kälber
(bezogen von der Westfleisch Vieh- und Fleischzentrale Westfalen eG,
Kranstraße 32, 59071 Hamm)
- primäre Endothelzellen aus humaner Vena umbilica
(human umbilical vein endothelial cells, kurz: HUVECs)
(aus dem Kreißsaal des Universitätsklinikums Münster)
(siehe Anhang, II. Ethikvotum, Seite IX)

II.1.1.b. Nährmedien

- für die Osteoblasten:

- MM0-f-Medium:
 - 500 ml High-GEM (High Growth Enhancement-Medium)
(Molecular Probes[®], Leiden Niederlande)
 - + 60 ml fetales Kälberserum (FKS 690)
(Biochrom AG seromed[®], Berlin)
 - + 5 ml Amphotericin B (Biochrom AG seromed[®], Berlin)
 - + 5 ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG seromed[®], Berlin)
 - + 5 ml L-Glutamin (Biochrom AG seromed[®], Berlin)Anschließend erfolgt eine sterile Filtration.
- MM1-f-Medium:
 - Standard-MM0-Medium

- + 10 mmol/l β -Glycerophosphat (*Sigma, Taufkirchen*)
 - + 25 μ g/ml L-Ascorbinsäure (*Sigma, Taufkirchen*)
- Anschließend wird durch 0,2 μ m Poren steril filtriert.

- für die Endothelzellen:

- Endothelial Cell Growth-Medium (*Promocell, Heidelberg*)
- + 0,4 % ECGS/H
- + 2 % FKS
- + 1,0 μ g/ml Hydrocortison
- + 0,1 ng/ml Epidermal Growth Factor
- + 1,0 ng/ml Basic Fibroblast Factor
- + 50 ng/ml Amphotericin B
- + 50 μ g/ml Gentamicin

II.1.1.c. Reagenzien und Lösungen

- für die Osteoblasten:

- Accutase[®] (*PAA Laboratories GmbH, Cölbe*)
Lagerung bei < -15 °C über ein Jahr möglich,
bei 2-8 °C über 2 Monate
- autoklaviertes Aqua dest. (*Hausapotheke des UKM*)
- Casy[®] clean-Lösung (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*)
trockene, lichtgeschützte Lagerung bei 15-25 °C
- Casy[®] ton-Lösung (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*)
trockene, lichtgeschützte Lagerung bei 15-30 °C
- Earle's Salzkonzentrat (*Hausapotheke des UKM*)
6,80 g NaCl
0,40 g KCl
0,14 g NaH₂PO₄ x H₂O
0,20 g MaSO₄ x 7 H₂O
0,20 g CaCl₂ x H₂O
0,26 g CaCl₂ x 2 H₂O
1,00 g Glucose
2,20 g NaHCO₂ x H₂O

0,01 g Phenolrot

- Earle's Salzlösung I (*Hausapotheke des UKM*):
450 ml Aqua dest., autoklaviert
50 ml Earle's Salzkonzentrat
3 ml 7,5%iges NaHCO₃
Lagerung bei Raumtemperatur oder bei 4 °C im Kühlschrank
- Earle's Salzlösung II (*Hausapotheke des UKM*):
200 ml Earle's Salzlösung
2 ml Amphotericin
2 ml Penicillin/Streptomycin
Lagerung bei Raumtemperatur oder bei 4 °C im Kühlschrank
- Ethanol (80 %) vergällt, gefärbt, filtriert (*Hausapotheke des UKM*)
- NaCl (0,9 %) steril, (*Braun Melsungen AG, Melsungen*)
- PBS-Zellpassagepuffer (phosphatgepufferte Salzlösung),
ohne Ca²⁺ und Mg²⁺
1000 ml Aqua dest. (*Hausapotheke des UKM*)
+ 8,0 g NaCl (*Merck KGaA, Darmstadt*)
+ 0,2 g KCl (*Merck KGaA, Darmstadt*)
+ 0,2 g KH₂PO₄ (*Merck KGaA, Darmstadt*)
+ 1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O (*Merck KGaA, Darmstadt*)
steril filtrieren, pH 7,3-7,4, Lagerung bei Raumtemperatur
oder bei 4 °C im Kühlschrank
- **für die Endothelzellen:**
 - autoklaviertes Aqua dest. (*Hausapotheke des UKM*)
 - Casy® clean-Lösung (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*)
trockene, lichtgeschützte Lagerung bei 15-25 °C
 - Casy® ton-Lösung (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*)
trockene, lichtgeschützte Lagerung bei 15-30 °C
 - Collagenase A (1 %) (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*)
von *Clostridium histolyticum*, Lagerung bei 4 °C,
Verdünnung mit entsprechender Menge an autoklaviertem PBS
Dulbecco und sterile Filtration zur Herstellung einer Arbeitslösung von
0,05 %

- Ethanol (70 %) technisch vergällt mit Ketonen
(*AppliChem GmbH, Darmstadt*) Lagerung bei Raumtemperatur
- Gelatine (2 % in H₂O) (*Sigma-Aldrich[®], Saint Louis (USA)*)
- PBS Dulbecco (phosphatgepufferte Salzlösung) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺
(*Biochrom AG seromed[®], Berlin*) 9,55 g PBS Dulbecco Pulver in
1000 ml Aqua dest. lösen und autoklavieren, pH 7,4
- Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) in PBS, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺
(*Biochrom AG seromed[®], Berlin*) Lagerung bei maximal -20 °C

II.1.2. Material für die Untersuchungsmethoden

II.1.2.a. MTT-Assay

- 2-Propanol (*Merck KGaA, Darmstadt*)
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (*Sigma-Aldrich[®], Saint Louis (USA)*)

II.1.2.b. Cell-Count

(*identisch mit II.1.1. Material für die Zellkultur, Seite 32*)

II.1.2.c. Färbungen

- AEC + High Sensitivity Substrate Chromogen
(*Dako, Glostrup (Dänemark)*), Code K3461, Lagerung bei 2-8 °C
- Aqua dest. (*Hausapotheke des UKM*)
- Blocking Solution (*CANDOR[®] Bioscience GmbH, Wangen*),
Lagerung über 1 Jahr bei -20 °C
- Fluorescence Mounting-Medium (*Dako, Glostrup (Dänemark)*),
Code S3023, Lagerung bei 2-8 °C
- Methanol (100 %) (*Merck KGaA, Darmstadt*)
- Methylenblau-Azur II-Stammlösung
1%iges Methylenblau in 1%iger Boraxlösung (*Hausapotheke des UKM*)
1%iges Azur II in Aqua dest. (*Hausapotheke des UKM*)
- PBS (phosphatgepufferte Salzlösung),
ohne Ca²⁺ und Mg²⁺
1000 ml Aqua dest. (*Hausapotheke des UKM*)
+ 8,0 g NaCl (*Merck KGaA, Darmstadt*)
+ 0,2 g KCl (*Merck KGaA, Darmstadt*)
+ 0,2 g KH₂PO₄ (*Merck KGaA, Darmstadt*)
+ 1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O (*Merck KGaA, Darmstadt*)
steril filtrieren, pH 7,3-7,4, Lagerung bei Raumtemperatur
oder bei 4 °C im Kühlschrank
- TBST-Puffer (*Hausapotheke des UKM*)
5,26 g Tris und 8,78 g NaCl in 250 ml Aqua dest. lösen

400 ml 0,1 M HCl, 1 ml Tween 20 und 350 ml Aqua dest. zugeben
pH = 7,4-7,6 einstellen
→ 1000 ml 0,05 M Tris/HCl mit 0,15 M NaCl und 0,1 % Tween 20

- **primäre Antikörper**

- Monoclonal Anti-CD31 (PECAM-1) antibody, produced in mouse

- (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*)

Produktnummer: P8590, Lagerung bei -20 °C

- Anti-vWF, antibody, produced in rabbit

(*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*)

Produktnummer: HPA001815, Lagerung bei -20 °C

- Anti-Collagen I antibody (COL-1), mouse monoclonal

(*Abcam[®], Cambridge (England)*)

Product Code: ab6308, Lagerung bei -20 °C

- Monoclonal antibody to Osteonectin, mouse Ig

(*TaKaRa BIO Inc., Ostu (Japan)*)

Code No. M124, Clone No. OSN4-2, Lagerung bei -20 °C

- Monoclonal Antibody to Bovine Osteocalcin, mouse Ig

(*TaKaRa BIO Inc., Ostu (Japan)*)

Code No. M041, Clone No. OC4-30, Lagerung -20 °C

- **sekundäre Antikörper**

- Alexa Fluor[®] 488 Goat Anti-Mouse IgG

(*Life Technologies GmbH, Molecular Probes[®], invitrogen[®], Darmstadt*)

Produktnummer A11001

- Alexa Fluor[®] 488 Goat Anti-Rabbit IgG

(*Life Technologies GmbH, Molecular Probes[®], invitrogen[®], Darmstadt*)

Produktnummer A11008

- EnVision[®]+ System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse

(*Dako, Glostrup (Dänemark)*), Code K4000,

lichtgeschützte Lagerung bei 2-8 °C

- EnVision[®]+ System-HRP Labelled Polymer Anti-rabbit

(*Dako, Glostrup (Dänemark)*), Code K4002, Lagerung bei 2-8 °C

II.1.3. Medikament

- Zometa® 4 mg/5 ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung
(*Novartis Pharma GmbH, Basel (Schweiz)*),
Wirkstoff (INN): 4 mg Zoledronsäure

II.1.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Alufolie
- Analysenwaage (*Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern*)
- Bechergläser
- CO₂-Inkubator HeraCell240
(*Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf*)
- Dampfdruck-Autoklav VARIOKLAV® Steam Sterilizer
(*Thermo Scientific®*, Part of *Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, Massachusetts (USA))
- Deckgläser (*Engelbrecht, Labor- und Medizintechnik, Edermünde*)
- Einmalklingen Nr. 21 für Mehrwegskalpelle, Griff 4
(*Bayha, Tuttlingen*)
- Einmalskalpelle Nr. 21 (*Bayha, Tuttlingen*)
- Einmalspitzen (5 und 10 ml)
- ELISA-Reader µQuant (*Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall*)
- Fluoreszenzmikroskop, Zeiss Axioplan 2
(*Carl Zeiss MircoImaging GmbH, Jena*)
- Glasflaschen (50 ml, 100 ml und 250 ml)
- Handschuhe
- Lab-Tek® Chamber Slide® (2 Well Permanox® Slide) (*nunc, Part of Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, Massachusetts (USA))
Kat. Nr. 177429
- Lichtmikroskop Diaphot-TMD (*Nikon Kogaku K.*, Tokyo (Japan))
- Magnetrührer
(*Janke & Kunkel GmbH & Co KA IKA® Labortechnik, Staufen*)
- Pinzette (klein und groß)
- Rührfische
- Rüttler KS 25basic
(*Janke & Kunkel GmbH & Co KA IKA® Labortechnik, Staufen*)
- Schere
- Scherenklemmen
- Skalpellhalter, Griff 4

- Software: ImageJ (*Rasband W., Image Java. National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland (USA)*), <http://rsb.info.nih.gov/ij>
- Software: SPSS 15.0 für Windows (*SPSS Inc., Illinois (USA)*)
- Spiegelreflexkamera Nikon 801 (*Nikon Kogaku K., Tokyo (Japan)*)
- Spülkanüle
- sterile Tücher
- sterile Werkbank HeraSafe (*Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf*)
mit üblichem Zubehör wie Pipettus, Einmalpipetten, sterilisierte Pasteurpipette, Absaugvorrichtung u. ä.
- sterile Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml
(*TPP® Techno Plastic Products AG, Trasadingen (Schweiz)*)
- Vakuumpumpe
(*neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg*)
- Wasserbad (37 °C)
(*GFL® Gesellschaft für Labortechnik mbH, Großburgwedel*)
- wasserfester Folienstift
- Zellkulturschalen (146 x 21mm und 96 x 21 mm)
(*TPP® Techno Plastic Products AG, Trasadingen (Schweiz)*)
- Zellkulturtestplatten, 24er und 96er Well Plates
(*TPP® Techno Plastic Products AG, Trasadingen (Schweiz)*)
- Zellzähl-System CASY® I, Modell TT
(*Schärfe System GmbH, Reutlingen*)
- Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R®
(*Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf*)

II.2. Methoden

II.2.1. Gewinnung der Zellen

II.2.1.a. Gewinnung der Osteoblasten

Das Verfahren zur Gewinnung der primären Osteoblasten-ähnlichen Zellen (im Weiteren kurz als Osteoblasten bezeichnet) orientiert sich in dieser Arbeit auf einer von Jones und Boyde 1977 erstmals beschriebenen Methode [Jones SJ et al., 1977], welche auf der Beobachtung beruht, dass Osteoblasten unter geeigneten Kulturbedingungen aus präpariertem Periostgewebe auswachsen.

Hierfür wurden die Ossa Metacarpalia tagfrisch geschlachteter Kälber präpariert. Zunächst grob semisteril: Haut und Fell am Kälberbein wurden entfernt, das Fußgelenk eröffnet, sodass der Huf und alle unterhalb des Gelenkes liegenden Strukturen abgetrennt und entfernt werden konnten. Das isolierte Os Metacarpus wurde mit Aqua dest. abgespült und mit 80%igem Ethanol desinfiziert.

Die weitere Feinpräparation, die Abpräparation von auf dem Periost liegenden Strukturen, fand unter sterilen Bedingungen statt. Nach dem Abtragen des Weichgewebes mittels Skalpell und Pinzette wurde der Knochen samt Periost mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Schmale Perioststreifen von ca. 0,5 cm Breite wurden im Bereich der Metaphyse in Längsrichtung vom Knochen gelöst und dienten dann als Grundlage der eigentlichen Zellgewinnung.

Dafür wurden die Perioststreifen zunächst in Earle´s-I-, dann in Earle´s-II-Salzlösung gewaschen. Anschließend wurden die Streifen in Quadrate mit ca. 0,5 cm Kantenlänge geschnitten und in Gruppen von 20-25 Stück mit der osteogenen Seite nach unten sowie ausreichenden Abstand zueinander in eine sterile TPP-Schale (146 x 21 mm) gelegt. Innerhalb von 20 Minuten hafteten die Periostpräparate am Polystyrolboden der Zellkulturschale an. Zu jeder Schale wurden 20 ml MM0-f-Medium, welches als Standardmedium für Osteoblasten-Zellkulturen gilt, hinzugegeben bevor sie in einen CO₂-Inkubator bei 100%iger Luftfeuchtigkeit, einer Temperatur von 37 °C und

einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert wurden. Innerhalb von zwei bis drei Wochen bildete sich ein konfluenten Monolayer, wobei das Nährmedium wöchentlich ausgetauscht wurde und die ausgesiedelten Periostpräparate je nach Proliferationsgeschwindigkeit nach gut einer Woche entfernt werden konnten. Bei einer konfluenten Besiedlung mit Osteoblasten-ähnlichen Zellen konnte von einer Zelldichte von etwa 60.000 Zellen/cm² ausgegangen werden.

Die so auf dem Polystyrolboden der Kulturschale gewachsenen Zellen wurden beim „Passagieren“ vorsichtig gelöst und für die weiteren Versuche ausgesiedelt. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und zweimal mit PBS (frei von Ca²⁺- oder Mg²⁺-Ionen) gewaschen. Dann wurde nach Zugabe von 10 ml Accutase[®]-Lösung pro Schale für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die gelösten Osteoblasten zeigten sich als grauer Schleier in der Lösung, wobei die Ablösung der Zellen vom Schalenboden durch Aufnehmen der Accutase[®]-Lösung mittels einer Einmalpipette und Zurückspülen in die Schale unterstützt werden konnte.

Zur Bestimmung der Zellzahl und Zellgrößenverteilung mithilfe eines Zellzählgerätes (CASY[®] I Modell TT, Schärfe System GmbH, Reutlingen) wurden 100 µl dieser aus allen Schalen zusammen gesammelten Zellsuspension zu 10 ml Casy[®] ton-Lösung pipettiert und bei 600 U/min 10 Minuten unter Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellzahl wurde mittels Casy[®] I pro ml Accutase[®]-Lösung bestimmt. Durch Einsetzen der tatsächlich verwendeten Menge an Accutase[®] war die tatsächliche Zellzahl im Zellpellet zu errechnen. Die Accutase[®]-Lösung konnte danach als Überstand abgesaugt werden und das verbleibende Zellpellet in MM0-Medium im Verhältnis 1 ml Medium pro 1 Millionen Zellen resuspendiert werden. Damit stand für die weiteren Versuche die gewünschte Menge an Zellen, gelöst in der Zellsuspension, bereit.

II.2.1.b. Gewinnung der Endothelzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Endothelzellen (genauer: Human umbilical vein endothelial cells, kurz: HUVECs) sind aus isolierten Zellen einer humanen Vena umbilicalis, nach einer Methode die 1973 Eric A. Jaffe [Jaffe EA et al., 1973] und 2001 Valérie Marin [Marin V et al., 2001] beschrieben haben, gewonnen worden.

Vor der eigentlichen Präparation wurde die Nabelschnur aus dem auf 4 °C temperierten Transportmedium entnommen und oberflächlich mit 70%igen Alkohol gewaschen. Die eigentliche Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen. In der Nabelschnur verlaufen drei Gefäße: Eine große, elastische Vene und die beiden an ihrem stärkeren Wandaufbau zu erkennenden Arterien. An einem Ende der Nabelschnur wurde vorsichtig eine Spülkanüle in der Vene mit einer Scherenklemme fixiert. Durch diese wurde die über einem Becherglas aufgehängte Nabelschnur so lange mit angewärmten PBS Dulbecco blutleer gespült, bis die Spüllösung keine Verfärbungen mehr zeigte.

Nach diesen Vorbereitungen konnte die eigentliche Zellgewinnung durchgeführt werden. Dazu wurde auch das andere Ende der Nabelschnur abgeklemmt. Über die Spülkanüle wurde die Vene nun mit 0,05%iger Collagenase A befüllt. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Suspension aus der Nabelschnur durch die Spülkanüle in ein darunter gestelltes Zentrifugenröhrchen, in welches zuvor Endothelial Cell Growth-Medium vorgelegt wurde, tropfen gelassen. Anschließend wurde die gleiche Menge an Medium durch die Spülkanüle in das Lumen der Vena umbilicalis gegeben, die Nabelschnur zur Unterstützung der Zellablösung durchgeknetet und schließlich auch in ein zweites Röhrchen austropfen gelassen.

Nach 7 Minuten Zentrifugation bei 1200 U/min setzten sich in beiden Röhrchen die in der Lösung befindlichen Zellen am Boden ab. Der Mediumüberstand konnte abgesaugt werden und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert werden. So standen die Endothelzellen zur Aussiedlung bereit.

Endothelzellen lassen sich auf beschichteten Schalen besser anzüchten [Breithaupt-Faloppa AC et al., 2008 und Jaffe EA et al., 1973], daher wurden die Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 90 mm vor der Aussiedlung wie folgt vorbereitet: 2%ige Gelatine wurde im Wasserbad erwärmt und mit PBS Dulbecco auf 0,5 % verdünnt (d.h. in einem Verhältnis von 1 zu 3 Teilen). 5 ml dieser Gelatine-Lösung wurden auf jede Schale gegeben und für 20 Minuten in den Brutschrank gestellt. Auf die so beschichteten Schalen konnten dann sofort oder innerhalb von einer Woche die Endothelzellen ausgesiedelt werden, wobei unmittelbar vor der Aussiedlung die Schalen zweimal mit je 10 ml PBS Dulbecco gewaschen wurden.

Die zuvor gewonnenen und in Medium suspendierten Endothelzellen, hier als P_0 -Zellen zu bezeichnen, wurden zusammen mit je 10 ml Endothelial Cell Growth-Medium als Nährmedium auf die Schalen zur Anzucht gegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde mit P_2 -Zellen gearbeitet: Sobald sich die Zellen in den Schalen zu einem konfluenten Monolayer entwickelt hatten wurden sie passagiert, d. h. die Zellen wurden aus den Anzuchtschalen gelöst und auf eine verdoppelte Anzahl von Kulturschalen umgesiedelt. Das Ergebnis waren P_1 -Zellen. Nach gut einer Woche war wieder der Zeitpunkt des Passagierens erreicht und das Aussiedeln der Zellen für den jeweiligen Versuchszweck war möglich. In aller Regel vergingen zwischen Präparation der Nabelschnur und Versuchsbeginn somit drei bis fünf Wochen.

Dafür wurden zunächst die Kulturschalen zweimal mit je 10 ml PBS Dulbecco gewaschen, um die Trypsin-inhibierende Wirkung des FKS-enthaltenden Mediums auszuschließen. Dann wurde zur Ablösung der Zellen vom Schalenboden 2 ml einer Lösung aus 0,05%igem Trypsin und 0,02%igem EDTA hinzugegeben. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde 1 bis 2 Minuten abgewartet, bevor mit der Zugabe von 4 ml Endothelial Cell Growth-Medium die Trypsinwirkung aufgehoben wurde. Makroskopisch zeigten sich die abgelösten Zellen als weißlich-silbrige Schlieren in der Kulturschale. Zur Unterstützung des Ablösevorganges wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer Einmalpipette umgespült bevor sie aufgenommen

und in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert wurde. 100 µl der Suspension wurden in 10 ml Casy[®] ton-Lösung verdünnt und zur Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung verwendet. Die in der Suspension enthaltenen Endothelzellen setzten sich nach 4 Minuten Zentrifugation bei 1000 U/min als Zellpellet am Röhrchenboden ab. Der Überstand an Medium wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml Endothelial Cell Growth-Medium resuspendiert. Anhand der Zellzahlbestimmung ließ sich die Menge an Zellen berechnen, die so für die weiteren Versuche zur Verfügung standen. Weiterhin ermittelte der Zellcounter Casy[®] I Modell TT die Größe der Zellen und gab den kleinsten und den größten Wert an. Vor Versuchsbeginn konnten die Zellen mikroskopisch anhand ihrer Morphologie und immunhistologisch über spezielle Antikörper (anti vWF, anti CD31 oder eine negative Reaktion auf anti- α -smooth-muscle-actin) als Endothelzellen charakterisiert werden [Breithaupt-Faloppa AC et al., 2008].

II.2.2. Festlegen der Medikamentenkonzentrationen

Für Aminobisphosphonate ist bekannt, dass sie ab einer Konzentration von 100 μM Knochenzellen in die Apoptose führen können und bei Konzentrationen unterhalb von 100 μM die Cytoskelettbildung und den vesikulären Transport inhibieren [Kimmel DB, 2007].

Eine Hemmung der Proliferation von HUVECs wird bereits bei einer Zoledronsäure-Konzentration von $\sim 4 \mu\text{M}$ beschrieben [Wood J et al., 2002]. In Abgrenzung zu vorliegenden Studien in denen mit definierten Konzentrationsreihen von 0,5 μM , 5 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM und 500 μM gearbeitet wurde [Ziebart T et al., 2011 und Walter C et al., 2010] wurden für diese Arbeit vier physiologisch auftretende Konzentrationen von 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM und 10 μM gewählt. Orientierung gab dabei das Wissen, dass klinisch ein bis zwei Stunden nach einer Standardinfusion von 4 mg Zometa[®] im Blutserum maximale Konzentrationen von 1-2 μM erreicht werden [Michailidou M et al., 2010].

Für die folgenden Untersuchungsmethoden (MTT-Assay, Cell-Count und Immunfärbungen) wurden sowohl die Osteoblasten als auch die Endothelzellen mit diesen vier unterschiedlichen Stoffmengenkonzentrationen an Zoledronsäure inkubiert.

Bezeichnung der Lösung	Konzentration an Zoledronsäure
KZOA1	10 μM ($\cong 10.000 \text{ nM}$)
KZOA2	1 μM ($\cong 1.000 \text{ nM}$)
KZOA3	0,1 μM ($\cong 100 \text{ nM}$)
KZOA4	0,01 μM ($\cong 10 \text{ nM}$)

Tabelle 1:
Bezeichnung der vier Zoledronsäurekonzentrationen

In 1 ml des Zometa[®] 4 mg/5 ml-Konzentrats zur Herstellung einer Infusionslösung sind 0,8 mg Zoledronsäure gelöst. Entsprechend der molaren Masse von Zoledronsäure (290,11 g/mol [Novatis Pharmaceuticals

Australia, 2012]) wurden 0,0029 g der Zometa[®]-Lösung für eine Zoledronsäure-Lösung der Konzentration 10 µM benötigt. Dies entspricht 0,0036 ml der Zometa[®]-Lösung auf 1 l (1000 ml). Entsprechend dieser Berechnung konnten die Lösungen KZOA1 bis KZOA4 durch Verdünnung mit einem Medium hergestellt werden. Für die Osteoblasten ist dieses das Mineralisationsmedium MM0-f, für die Endothelzellen Endothelial Cell Growth-Medium.

II.2.3. Untersuchungsmethoden

II.2.3.a. MTT-Assay

Zur präzisen Ermittlung der Proliferationsrate und der Stoffwechselaktivität der Osteoblasten und Endothelzellen über den Versuchszeitraum von 14 Tagen wurde ein MTT-Assay, als quantitative Kalorimetrie durchgeführt.

Dieser 1983 von Tim Mosmann eingeführte Test beruht auf der Metabolisierung des gelblichen, wasserlöslichen Thiazolyl-Tetrazolium-Bromids (genauer: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromids, kurz: MTT), einem Mono-Tetrazolium-Salz, durch die mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen der zu untersuchenden vitalen Zellen [Mosmann T, 1983 und Hansen MB et al., 1989].

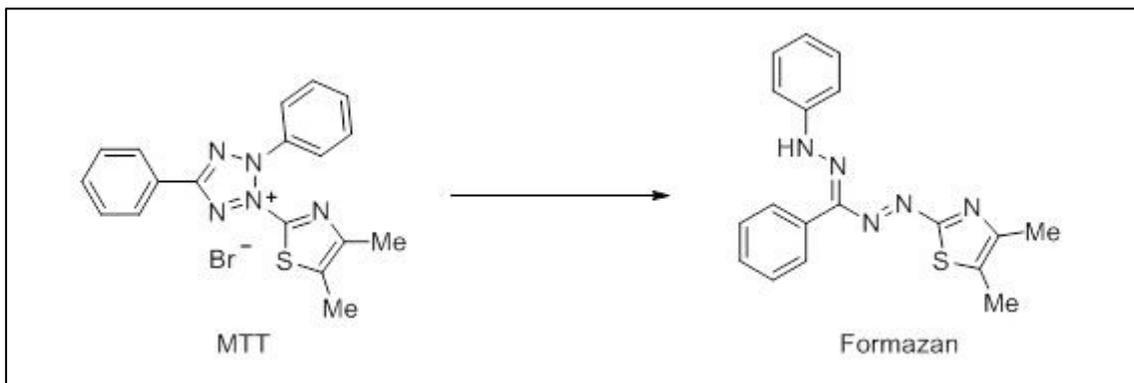


Abbildung 4:
Farbreaktion des MTTs

In der enzymatisch katalysierten Reduktion wird der Tetrazoliumring des gelösten, in die Zelle eingedrungenen MTTs gespalten und als Produkt entstehen blau-violette, wasserunlösliche Formazankristalle. Nach Absaugen des Mediums erfolgt die Lyse der Zellen durch Zugabe von Propanol wobei die ausgefallenen Kristalle in Lösung gehen. Anschließend erfolgt die Messung der Extinktion photometrisch mittels eines ELISA-Readers. Die ermittelten Werte verhalten sich proportional zu dem in den Zellen umgesetzten MTT und sind daher im Vergleich zu einer Negativkontrolle ein

Maß für die Menge an vitalen Zellen und für die Stoffwechselaktivität der Zellen nach Medikamenteninkubation.

Sowohl für die Osteoblasten als auch für die Endothelzellen wurde ein MTT-Assay nach Inkubation mit den Medikamentenkonzentrationen KZOA1-KZOA4 (10.000 nM, 1.000 nM, 100 nM und 10 nM, *siehe oben*) und je zwei Negativkontrollen (Kontrolle 1 und Kontrolle 2), nur mit den entsprechenden Zellen und dem Nährmedium ohne Medikamentenzusatz, an sechs Messzeitpunkten durchgeführt. Gearbeitet wurde jeweils mit einer Zelldichte von 10.000/cm² in 24er Well Plates mit einem Arbeitsvolumen von 1 ml pro Vertiefung. Somit wurden für die Osteoblasten 14 Well Plates benötigt, ebenso wie für die Endothelzellen. Folgendes Pipettierschema war für beide Zellreihen identisch:

	1	2	3	4	5	6
A	KZOA1	KZOA1	KZOA1	KZOA1	KZOA1	KZOA1
B	KZOA2	KZOA2	KZOA2	KZOA2	KZOA2	KZOA2
C	KZOA3	KZOA3	KZOA3	KZOA3	KZOA3	KZOA3
D	KZOA4	KZOA4	KZOA4	KZOA4	KZOA4	KZOA4

je 10.000 Zellen in 1 ml Medium + Medikament
 KZOA1 = 10.000 nM, KZOA2 = 1.000 nM, KZOA3 = 100 nM, KZOA4 = 10 nM

Tabelle 2:
 MTT-Assay: Pipettierschema für 24er Well Plate A

	1	2	3	4	5	6
A	K1	K1	K1	K1	K1	K1
B	K2	K2	K2	K2	K2	K2
C						
D						

je 10.000 Zellen in 1 ml Medium
 K1 = Kontrolle 1, K2 = Kontrolle 2

Tabelle 3:
 MTT-Assay: Pipettierschema für 24er Well Plate B

Die so vorbereiteten Well Plates wurden bei 37 °C und $\leq 5\%$ CO₂ bis zum jeweiligen Messzeitpunkt 1, 3, 6, 8, 10 oder 14 Tagen inkubiert.

Das jeweils entsprechende Nährmedium, MM0-f bzw. Endothelial Cell Growth-Medium, wurde über den gesamten Versuchszeitraum alle zwei Tage gewechselt. Wobei je Vertiefung 600 µl des verbrauchten Mediums ohne Kontakt zu den adhären Zellen abpipettiert wurde und durch 600 µl einer Lösung bestehend aus dem entsprechenden Medium und (mit Ausnahme der Negativkontrollen) der jeweiligen Zoledronsäure-Menge ersetzt wurde.

Unmittelbar vor der Durchführung eines MTT-Assays, wurde die MTT-Gebrauchslösung hergestellt. Dazu wurden 7,5 ml des MTT-Stocks, der in 2 ml großen Aliquots vor Versuchsbeginn bei -20 °C eingefroren worden war, aufgetaut und mit 30 ml Medium versetzt. Als MTT-Stock wird eine Lösung von 50 mg pulverigem, gelben MTT in 10 ml PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) bezeichnet.

Am entsprechenden Messtag wurden je 1 ml der Gebrauchslösung in jede Vertiefung pipettiert, bevor erneut für drei Stunden bei 37 °C und $\leq 5\%$ CO₂ inkubiert wurde. Im Anschluss wurde die Gebrauchslösung ohne Kontakt zu den ausgefallenen Formazankristallen abgesaugt. Nachdem pro Well 300 µl 2-Propanol hinzugegeben wurden und die Well Plates für 10 Minuten auf dem Rüttler gestanden hatten, färbten sich die Lösungen in den Wells unterschiedlich intensiv blau-violett. Beim Extinktionsmaximum von Formazan, der Welllänge 570 nm, wurde im ELISA-Reader die Extinktion einer jeden Lösung in den 36 zu untersuchenden Wells bestimmt. Eine zweite photometrische Messung bei gleicher Wellenlänge erfolgte in einer 96er Well Plate. Dazu wurde aus jeder Vertiefung der 24er Well Plates zweimal je 100 µl in eine separate Vertiefung pipettiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KZ1											
B	KZ2											
C	KZ3											
D	KZ4											
E	K1											
F	K2											
G												
H												

KZ1 = 10.000 nM, KZ2 = 1.000 nM, KZ3 = 100 nM, KZ4 = 10 nM
 K1 = Kontrolle 1, K2 = Kontrolle 2

Tabelle 4:
 MTT-Assay: Pipettierschema für 96er Well Plate

II.2.3.b. Cell-Count

Mit Hilfe der Methode des Cell-Counts (visuelle Zellzählung anhand von Fotos) konnte bei beiden Zellarten über den gesamten Versuchszeitraum von 14 Tagen das Zellpopulationswachstum numerisch ermittelt werden. Zudem ermöglichte die Fotodokumentation das Erkennen und Festhalten gegebenenfalls auftretender morphologischer Auffälligkeiten der Zellen.

Auf die Unterseite einer jeden Vertiefung von vier 24er Well Plates wurde mit einem wasserfesten Folienstift ein Koordinatenkreuz gezeichnet. Diese Markierungen ermöglichten bei der anschließenden Fotodokumentation das reproduzierbare Auffinden eines definierten Well-Ausschnittes. Nach der Gelatinebeschichtung der Platten für die Endothelzellen wurden je 10.000 kultivierte Zellen (Osteoblasten/Endothelzellen) gelöst in 1 ml des entsprechenden Mediums (MM0-f/Endothelial Cell Growth-Medium) je Vertiefung ausgebracht. Wie oben bereits für den Ansatz des MTT-Assays beschrieben, wurde bei den Osteoblasten und Endothelzellen identisch auf einer Well Plate in die Reihe A ein Medium, das 10.000 nM Zoledronsäure enthält hinzugeben. In Reihe B wurde eine Konzentration von 1.000 nM untersucht, in Reihe C ein Medium, das 100 nM Zoledronsäure enthielt und

in Reihe D die geringste Konzentration (10 nM). Auf den beiden anderen Platten sollten ebenso, wie oben beschrieben, in je 12 Vertiefungen Negativkontrollen ohne Medikamentenzusatz beobachtet werden.

Zu jedem der sechs Messzeitpunkte (Tag 1, 3, 6, 8 10 und 14 nach Versuchsbeginn) wurden alle definierten Wellausschnitte bei einer zehnfachen Vergrößerung fotografiert (Kamera Nikon 801, Software NIS-Elements) und digital im TIFF-Format archiviert. Pro Messzeitpunkt entstanden so für jede Zellart sechs Aufnahmen mit identischer Zometa®-Konzentration von den vier Vergleichsgruppen und zwölf Bilder von der Negativkontrolle. Insgesamt lagen so von Osteoblasten und Endothelzellen nach Abschluss des Versuches 432 Bilder vor. Diese sollten zum einen nach morphologischen Gesichtspunkten ausgewertet werden, zum anderen konnte die jeweilige Zellzahl (mit Hilfe des Programmes ImageJ) ausgezählt werden.

II.2.3.c. Färbungen

Zur Beurteilung der Zelldifferenzierung und der Synthese von zellspezifischen Proteinen der Osteoblasten und Endothelzellen unter einer Zoledronsäure-Gabe in abgestufter Konzentrationsreihe eignen sich immunhistochemische Färbungen, deren Methodik auf einer Antigen-Antikörper-Bindung beruht. In den Proben vorhandene antigene Determinanten (Epitope) reagieren mit spezifischen primären Antikörpern. Diese sind bei dem hier verwendeten Prinzip der indirekten Immunmarkierung nicht selbst sichtbar. Markiert ist ein sekundärer Antikörper, der an den Primärantikörper bindet. Dabei wird der Sekundärantikörper aus anderen Spezies gewonnen als der primäre. Die Detektion der Immunfärbung erfolgt über Markersubstanzen und ermöglicht erst die mikroskopische Darstellung. Bei den hier verwendeten Immunfärbemethoden sind dies Fluorochrome (Fluoreszenzfarbstoffe) bzw. Enzyme [Mulisch M et al., 2010].

Die Differenzierung der Osteoblasten wurde durch eine Alexa-Fluor®-Immunfärbung des von diesen Zellen charakteristisch exprimierten Kollagens Typ I und durch eine enzymgekoppelte Antikörperfärbung mittels

Dako EnVision® der Proteine Osteocalcin, Osteonectin und Kollagen Typ I untersucht. Die Endothelzellen wurden an von ihnen exprimierten immunphänotypischen Oberflächenproteinen, dem Clusters of Differentiation 31 (CD31)-Antigen und dem Trägerprotein des Blutgerinnungsfaktors VIII, dem von Willebrand-Faktor (vWF), mithilfe des Dako EnVision® Systems und dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor® 488 gefärbt.

CD31-Färbungen an Endothelzellen liefern Bilder von der exakten Oberflächenmorphologie mit all ihren Ausläufern und Fortsätzen. Deutlich stellen sich die Zell-zu-Zell-Kontakte dar, die alle zusammen betrachtet den Eindruck eines Netzwerkes entstehen lassen. Cytoplasma und Zellkern bleiben bei dieser Färbemethode, entsprechend der Lokalisation des CD31-Proteins an der Zelloberfläche ungefärbt.

Endothelzellen die über eine Antigen-Antikörper-Bindung am vWF markiert werden, zeigen hingegen ein konträres Erscheinungsbild.

Der vWF wird nach seiner Synthese in den Endothelzellen in Kern nah gelegenen Weibel-Palade-Körperchen bis zu seiner Freisetzung gespeichert [Welsch U et al., 2003]. Genau in dieser Region fluoreszieren die Zellen demnach am intensivsten leuchtend grün. Zelloberfläche, Zellausläufer, dem Zellkern ferne Bereiche des Cytoplasmas und der Zellkern selbst bleiben ungefärbt. Die genaue Zellform und Begrenzung auszumachen erlaubt diese Methode somit im Gegensatz zur CD31-Färbung nicht.

Bei beiden Zellarten gab eine Richardsonfärbung eine Übersicht.

Um ein optimales Ergebnis zu erhalten wurde für jede Färbemethode als Vorversuch der geeignete Verdünnungsfaktor der Reagenzien bestimmt.

Für jede Medikamentenkonzentration (KZOA1-KZOA4) wurden für beide Zellarten in je zwei 2 Well Permanox® Slides, mit einem Arbeitsvolumen von maximal 2 ml, in die jeweils 1 ml des Nährmediums (MM0-f/Endothelial Cell Growth-Medium) vorgelegt wurden, Osteoblasten bzw. Endothelzellen mit einer Zelldichte von 15.000 Zellen/cm³ gelöst in 1 ml des entsprechenden Nährmediums, versetzt mit der entsprechenden Zoledronsäure-Konzentration, ausgesiedelt. Zum Konfluenzzeitpunkt der ebenfalls untersuchten Negativkontrolle, der am siebten Tag nach Versuchsbeginn erwartet

wurde, sollten die Immunfärbungen erfolgen. So wie oben beschrieben wurde jeden zweiten Tag das Medium gewechselt.

II.2.3.c.1. Immunfärbung mit Alexa-Fluor®

Sowohl die Osteoblasten als auch die P₂-Endothelzellen, jeweils versetzt mit den Medikamentenkonzentrationen 1-4 sowie eine Kontrolle, wurden am siebten Tag nach Versuchsansatz, zum Zeitpunkt der Konfluenz nach folgendem Protokoll gefärbt:

Die in Lab-Tek®-Chambers kultivierten Zellen wurden zunächst mit -20 °C kaltem 100%igem Methanol 20 Minuten fixiert, nachdem das Medium abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen worden war.

Nach der Inkubation wurde das Methanol abgesaugt, zweimal mit TBST-Puffer rehydratisiert und nach Zugabe von Blocking Solution wurde erneut für 15 Minuten inkubiert. Der verdünnte Primärantikörper wurde hinzu pipettiert (siehe Tabelle 5 und Tabelle 6) und die Chambers für 1 Stunde bei 37 °C und ≤ 5 % CO₂ in den Brutschrank gestellt.

1. AK	Hersteller	Verdünnung		Berechnung
Kollagen Typ I	Abcam®	1:100	anti-mouse	4 µl AK + 396 µl BS

1. AK = primärer Antikörper, BS = Blocking Solution

Tabelle 5:
Alexa Fluor®-Färbung der Osteoblasten (primärer Antikörper)

1. AK	Hersteller	Verdünnung		Berechnung
CD31	Sigma	1:100	anti-mouse	37,5 µl AK + 3713 µl BS
vWF	Sigma	1:400	anti-rabbit	10 µl AK + 3990 µl BS

1. AK = primärer Antikörper, BS = Blocking Solution

Tabelle 6:
Alexa Fluor®-Färbung der Endothelzellen (primärer Antikörper)

Dreimal 5 Minuten wurde mit TBST-Puffer gespült, bevor eine weitere Stunde nach der Zugabe des mit Blocking Solution verdünnten Sekundärantikörpers (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8) inkubiert wurde. Je nach Herkunft des Primärantikörpers musste hier ein Präparat gegen Kaninchen- oder Maus-Antikörper gewählt werden.

1. AK	2. AK	Hersteller	Berechnung
Kollagen Typ I	Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse	invitrogen®	50 µl AK + 4950 µl BS

1. AK = primärer Antikörper, 2. AK = sekundärer Antikörper, BS = Blocking Solution

Tabelle 7:

Alexa Fluor®-Färbung der Osteoblasten (sekundärer Antikörper)

1. AK	2. AK	Hersteller	Berechnung
CD31	Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse	invitrogen®	50 µl AK + 4950 µl BS
vWF	Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit	invitrogen®	50 µl AK + 4950 µl BS

1. AK = primärer Antikörper, 2. AK = sekundärer Antikörper, BS = Blocking Solution

Tabelle 8:

Alexa Fluor®-Färbung der Endothelzellen (sekundärer Antikörper)

Weitere dreimal erfolgte eine Spülung mit TBST für jeweils 5 Minuten bevor die Wände der Chambers gelöst werden konnten und das Präparat in Fluorescence Mounting Medium unter Deckgläschen eingeschlossen wurde. Die Proben wurden bis zur fotografischen Dokumentation der Zellkulturmorphologie unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 488 nm zur späteren deskriptiven Auswertung, lichtgeschützt aufbewahrt.

II.2.3.c.2. Immunfärbung mit Dako EnVision®

Ebenso wie die Fluoreszenzfärbung wurde die Chromogenfärbung der Zellkulturen am Tag 7 nach Versuchsstart durchgeführt.

Die Färbung erfolgte wiederum in zwei Schritten und basiert auf einem HRP (horseradish peroxidase)- markierten Polymer das mit dem sekundären

Antikörper verknüpft ist. Bis zur Zugabe des Sekundärantikörpers war die Vorgehensweise identisch zu der bei einer Immunfärbung mit Alexa-Fluor® (siehe oben): Es wurde gewaschen, fixiert, inkubiert, rehydratisiert, inkubiert, der Primärantikörper hinzugesetzt (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10), inkubiert und erneut gespült.

1. AK	Hersteller	Verdünnung		Berechnung
Kollagen Typ I	Abcam®	1:100	anti-mouse	4 µl AK + 396 µl BS
Osteocalcin	TaKaRa	1:100	anti-mouse	5 µl AK + 495 µl BS
Osteonectin	TaKaRa	1:300	anti-mouse	5 µl AK + 1495 µl BS

1. AK = primärer Antikörper, BS = Blocking Solution

Tabelle 9:
Dako EnVision®-Färbung der Osteoblasten (primärer Antikörper)

1. AK	Hersteller	Verdünnung		Berechnung
CD31	Sigma	1:100	anti-mouse	37,5 µl AK + 3713 µl BS
vWF	Sigma	1:400	anti-rabbit	10 µl AK + 3990 µl BS

1. AK = primärer Antikörper, BS = Blocking Solution

Tabelle 10:
Dako EnVision®-Färbung der Endothelzellen (primärer Antikörper)

Dann erfolgte die direkte Benetzung der Proben mit Dako EnVision®+ System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse bzw. Anti-rabbit und eine einstündige Inkubation bei 37 °C.

1. AK	2. AK	Hersteller
Kollagen Typ I	EnVision®+ System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse	Dako
Osteocalcin	EnVision®+ System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse	Dako
Osteonectin	EnVision®+ System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse	Dako

1. AK = primärer Antikörper, 2. AK = sekundärer Antikörper, BS = Blocking Solution

Tabelle 11:
Dako EnVision®-Färbung der Osteoblasten (sekundärer Antikörper)

1. AK	2. AK	Hersteller
CD31	EnVision®+ System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse	Dako
vWF	EnVision®+ System-HRP Labelled Polymer Anti-rabbit	Dako

1. AK = primärer Antikörper, 2. AK = sekundärer Antikörper, BS = Blocking Solution

Tabelle 12:

Dako EnVision®-Färbung der Endothelzellen (sekundärer Antikörper)

Nachdem der Überschuss an Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper in drei Waschgängen mit TBST-Puffer à 5 Minuten ausgewaschen worden war, wurde das Substrat-Chromogen ACE (3-Amino-9-ethylcarbazol) zugesetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Der Überschuss an Chromogen wurde zunächst in einem Wasserbad aus den Chambers gewaschen, dann die heraus gelösten Objektträger mit Aqua dest. abgespült. Die Farblösung fiel am Antigen als rot-brauner Niederschlag aus und ermöglichte so die Lokalisation positiv gefärbter Zellen.

Lichtmikroskopisch bei einer 10fachen Vergrößerung wurde das Ergebnis fotografisch festgehalten.

II.2.3.c.3. Richardsonfärbung

Zur histologischen Übersicht wurden Osteoblasten und Endothelzellen mit Methylenblau-Azur II nach einer 1960 von Richardson et al. beschriebenen Methode gefärbt [Richardson KC et al., 1960].

Nach Waschung mit PBS, Methanolfixierung, wie oben bereits beschrieben, und Spülen mit TBST-Puffer wurden die Proben mit einer Stammlösung beträufelt, die zuvor im Verhältnis 1:1 aus 1 % Methylenblau in 1%iger wässriger Boraxlösung und 1 % Azur in Aqua dest. hergestellt und auf 60 °C erwärmt worden war. Nach einer Minute Einwirkzeit wurden die Proben unter Leitungswasser abspült und anschließend mit Aqua dest. nachgespült. Nach dem Trocknen zeigten sich basophile und eosinophile Substanzen blau, metachromatische Strukturen rot-violett.

II.2.4. Statistische Methoden zur Auswertung

Die mittels Cell-Count und MTT-Assay ermittelten numerischen Messwerte wurden statistisch mit Hilfe der Software SPSS 15.0 für Windows (SPSS Inc., Illinois (USA)) ausgewertet.

Für die Tage 1, 3, 6, 8, 10 und 14 nach Versuchsbeginn wurden sowohl bei den Osteoblasten als auch bei den Endothelzellen identische Werte für beide Untersuchungsmethoden berechnet. Für die zuvor festgelegten Gruppen (für jede Zellart je zwei Negativkontrollen die zu einer Gruppe zusammengefasst wurden und die vier Medikamentenkonzentrationen KZOA1-KZOA4) wurden der arithmetische Mittelwert (mean), die Standardabweichung (SD) und die 95%-Konfidenzintervalle (CI) ermittelt. Mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) - mit dem Tamhane T2-Post-Hoc-Tests als robustes konservatives Testverfahren durchgeführt - wurde die Gruppendifferenz auf Signifikanz analysiert.

Zusätzlich zu der statistischen Auswertung der für den Cell-Count angefertigten Fotografien wurden diese, ebenso wie die Fotografien als Ergebnisse der Immunhistologie, auch deskriptiv ausgewertet.

III. Ergebnisse

III.1. Ergebnisse der Fotodokumentation

III.1.1. Fotodokumentation der Osteoblasten

Die aus dem Periost des Metacarpus frisch geschlachteter Kälber gewonnenen Osteoblasten entwickelten sich nach gut zwei Wochen zu einem konfluenten Monolayer und konnten passagiert werden. Dabei zeigten sie mikroskopisch ihr charakteristisches kuboidales Erscheinungsbild. Die Zellgröße, ermittelt mit Hilfe des Zellcounters Casy[®] I Modell TT, betrug zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 16,8 µm.

Im Verlauf des Untersuchungszeitraumes, der mit der Aussiedlung der Zellen in 24er Well Plates und dem Beginn der Inkubation unter MM0-f-Medium versetzt mit vier unterschiedlichen Zoledronsäure-Konzentrationen, bzw. reinem MM0-f-Medium startete veränderte sich die Morphologie der unterschiedlichen Zellkulturen. Beobachtet und dokumentiert wurde diese an 6 Zeitpunkten innerhalb von 14 Tagen. Die Fotografien zeigten insgesamt im Vergleich schwach unterschiedliche Abstufungen im Graubereich. Diese waren abhängig von der jeweiligen Belichtung während der Fotodokumentation.

Am Tag 1 nach Versuchsbeginn zeigten die Osteoblasten in allen 36 Vertiefungen eine ähnliche gestreckte, vielförmige Gestalt. Im Zentrum der Zellen lag teils gut abgrenzbar der Zellkern. Erste Zellen bildeten Fortsätze aus. Zell-zu-Zell-Kontakt war aber die Ausnahme. Insgesamt zeigten alle definierten Ausschnitte aus den Wells eine niedrige aber zugleich gleichmäßige Besiedlungsdichte.

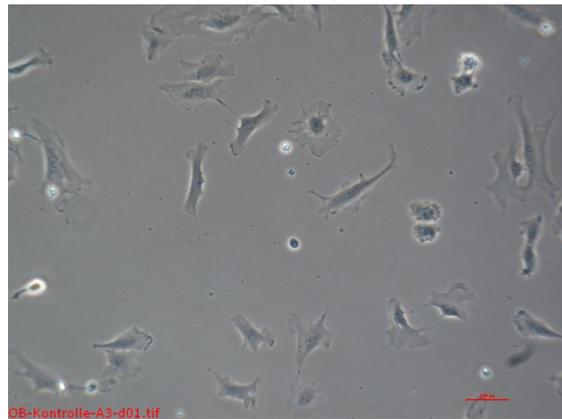
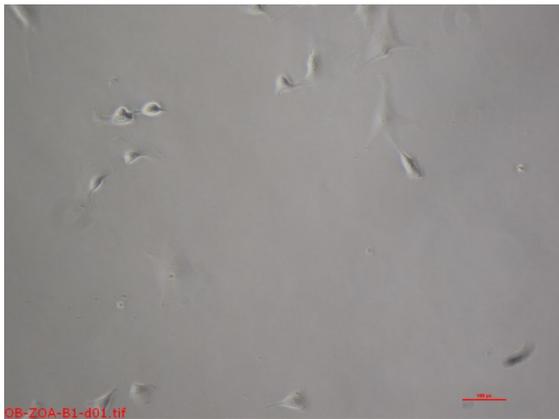
Zwei Tage später am Versuchstag 3 standen nunmehr fast alle Zellen mit anderen über zahlreiche Fortsätze in Verbindung. Pro Zelle zeigten sich zumeist zwei, in einer Achse orientierte Ausläufer. Zwischen den Zellen lag weiterhin freie Welloberfläche. Die Kontur der Zellen zeigte sich polygonal, von splitter- bis sternförmig.

Deutlich verändert stellte sich die Morphologie der Kultur am Tag 6 des Versuches dar, wobei zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrolle nicht zu differenzieren war. Alle Wells waren dicht und regelmäßig besiedelt. Die Freiräume zwischen den Zellen waren minimal. Der vorherrschende Zellumriss war langgezogen spindelförmig. Der Zellkörper war nicht von den Zellfortsätzen abzugrenzen. Die einzelnen Osteoblasten lagen mit ihren Längsseiten aneinander und vermittelten so das Bild einer Faserstruktur, die in unterschiedlichen Bereichen des dokumentierten Wellausschnittes in verschiedene Richtungen orientiert schien.

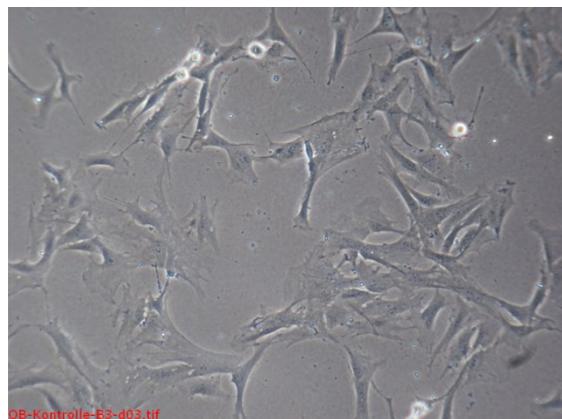
Auch am achten Tag waren die Zellen die der Zoledronsäure in unterschiedlichen Konzentrationen exponiert worden waren, nicht von der Negativkontrolle zu unterscheiden. Die gesamte Welloberfläche war dicht an dicht mit Zellen ausgefüllt.

Nahezu unverändert das Bild am Tag 10. Erstmals ließen sich hier aber Unterschiedlichkeiten zwischen den vier Vergleichsgruppen und der Kontrolle ohne Medikamentenzusatz erahnen.

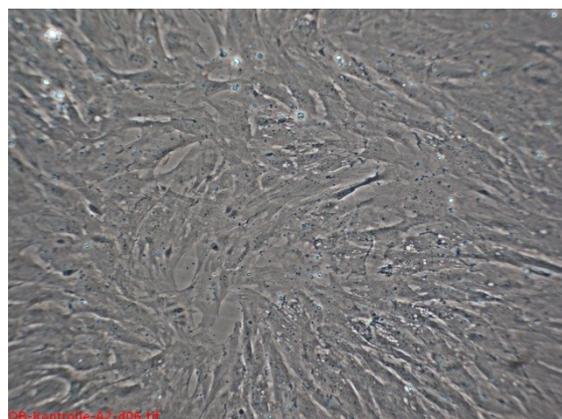
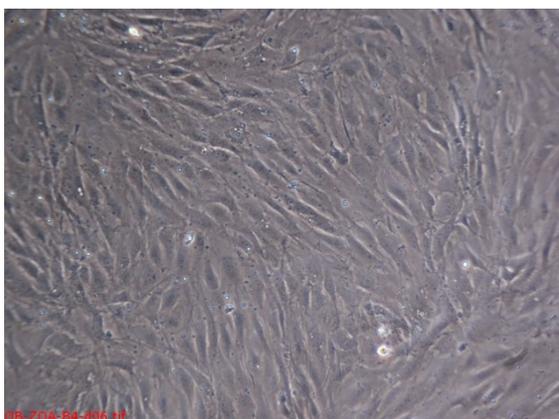
Die dann am letzten Versuchstag, vier Tage später, merklich hervortraten: Während auf den Fotografien der reproduzierbar auffindbaren Wellbereiche der Kontrollen, die Osteoblasten ihre längliche Spindelform beibehielten, wenn auch weniger deutlich ausgeprägt als am Tag 6 beschrieben, so zeigten die unter Zometa[®] inkubierten Zellen eine rundliche bis kubische äußere Form. Somit entstand der Eindruck eines Netzes während in der Kontrollgruppe die faserige Struktur erhalten blieb. Eine Abstufung zwischen den verschiedenen Zoledronsäure-Konzentrationen von 0,01 bis 10 µM war nicht feststellbar.



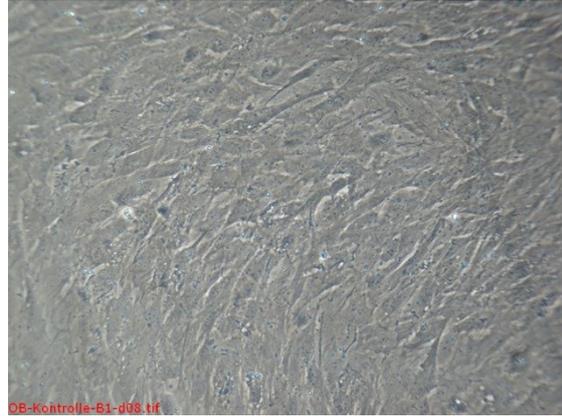
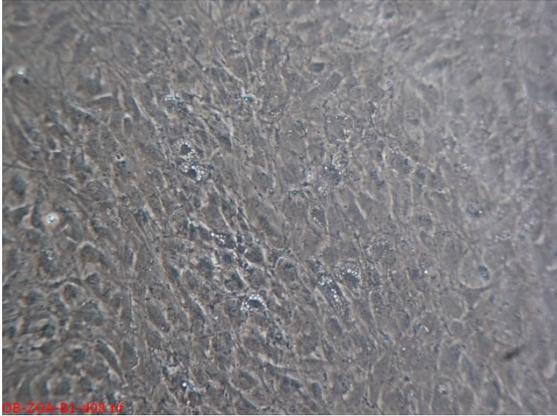
Osteoblasten am Tag 1: Zometa®-Konzentration von 1 μM (li.), Negativkontrolle (re.)



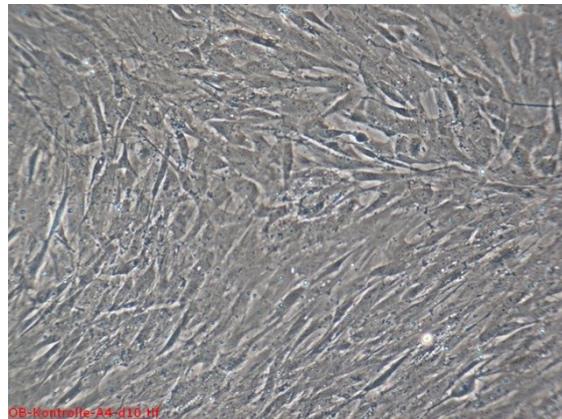
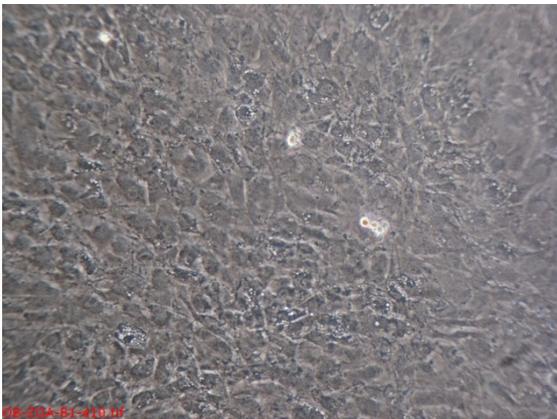
Osteoblasten am Tag 3: Zometa®-Konzentration von 1 μM (li.), Negativkontrolle (re.)



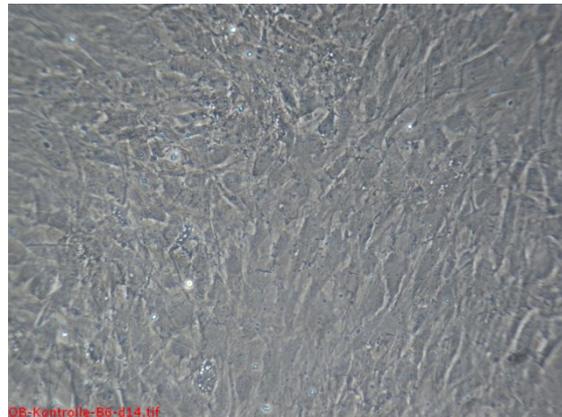
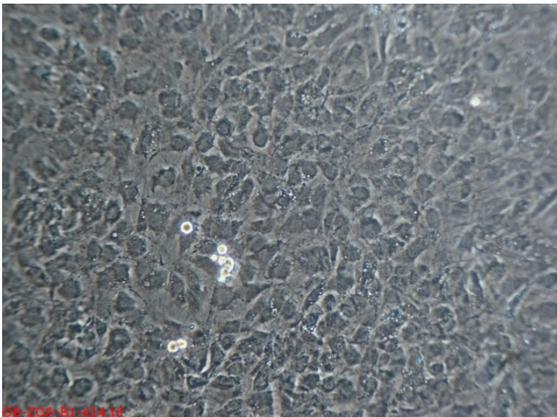
Osteoblasten am Tag 6: Zometa®-Konzentration von 1 μM (li.), Negativkontrolle (re.)



Osteoblasten am Tag 8: Zometa[®]-Konzentration von 1 µM (li.), Negativkontrolle (re.)



Osteoblasten am Tag 10: Zometa[®]-Konzentration von 1 µM (li.), Negativkontrolle (re.)



Osteoblasten am Tag 14: Zometa[®]-Konzentration von 1 µM (li.), Negativkontrolle (re.)

Abbildung 5:
exemplarische Auswahl aus den dokumentierten Wellenausschnitten der Osteoblastenkulturen
in 10facher Vergrößerung

III.1.2. Fotodokumentation der Endothelzellen

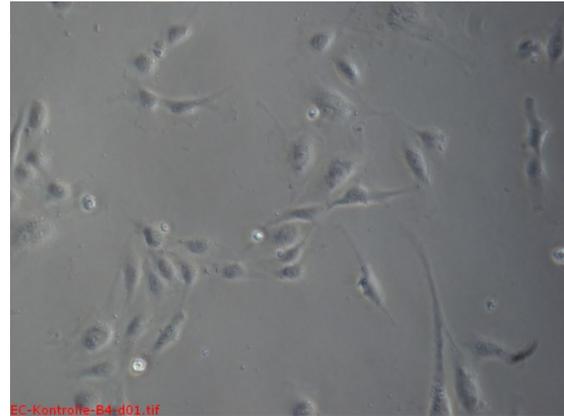
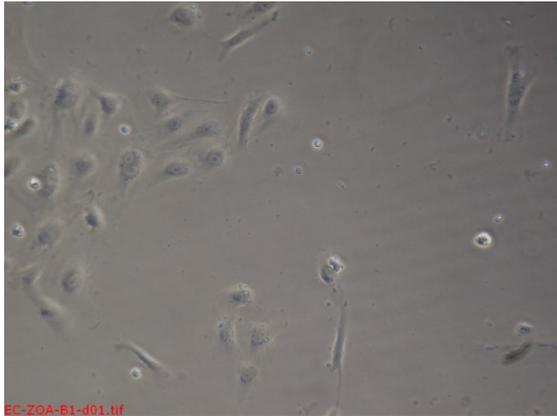
Etwa vier Wochen nach der Präparation einer humanen Nabelschnur lagen nach zweimaligem Passagieren P₂-Endothelzellen vor. Die Umsiedlung der Zellen war jeweils erfolgt sobald sich ein konfluenter Monolayer entwickelt hatte. Dabei zeigten sich die HUVECs lichtmikroskopisch gut voneinander abgrenzbar mit engem Zellkontakt allerdings ohne Zellüberlappungen. Ihre Morphologie entsprach der ihnen charakteristischen Gestalt: Ihre äußere Form zeigte sich rundlich-ellipsoid bis spindelförmig. Im Zentrum der Zelle stellte sich der ovale Zellkern dar. Teils waren mehrere Nukleoli abzugrenzen. Zugleich bildete das Zentrum der Zelle den Bereich mit dem größten Durchmesser. Die nach peripher verlaufenden Fortsätze waren hingegen graziler und dementsprechend lichtmikroskopisch transparenter.

Die Zellgrößenbestimmung mittels des Zellcounters Casy[®] I Modell TT unmittelbar vor Aussiedlung der Zellen und Zugabe der unterschiedlichen Zoledronsäure-Konzentrationen gelöst im Endothelial Cell Growth-Medium ergab eine Durchschnittsgröße pro Zelle von 15,9 µm. Über zwei Wochen wurde die Entwicklung der Endothelzellen in den verschiedenen Versuchsansätzen verfolgt.

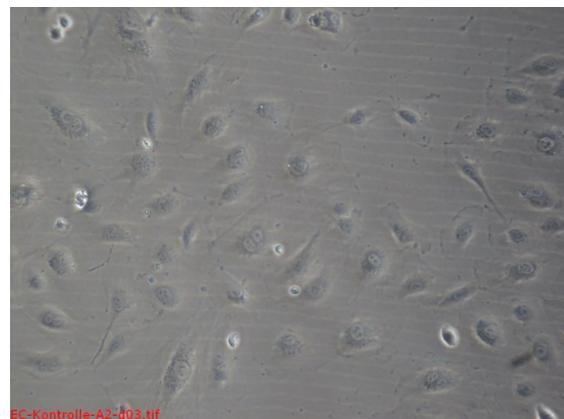
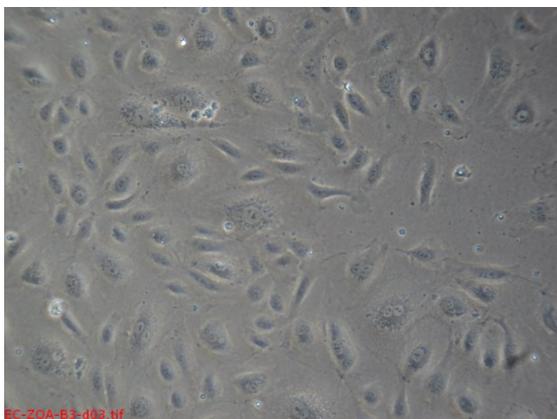
Einen Tag nach Medikamentenzugabe unterschieden sich die vier Vergleichsgruppen von der Kontrolle in ihrer Zellmorphologie nicht. Die Konturen der HUVECs ließen sich deutlich von der Welloberfläche abgrenzen, die Besiedlungsdichte war gering. Benachbarte Zellen traten über Zellfortsätze zueinander in Kontakt. Die äußere Form der Endothelzellen war länglich-tropfenförmig, Zellkerne und Nukleoli nur vereinzelt darzustellen. Auch am dritten Versuchstag zeigten sich alle zu untersuchenden Wells homogen in ihrem Erscheinungsbild. Die Kolonisationsdichte war durch Proliferation der Zellen deutlich angestiegen. Diese hatten sich in ihrer Form zum Teil weiterentwickelt und zeigten sich nun auch langgestreckt spindelförmig.

Drei Tage später, am sechsten Versuchstag war die Welloberfläche in allen 36 Vertiefungen von einem konfluenten Monolayer überzogen. Vermehrt zeigten sich nun punktuell, rundlich-helle Strukturen zwischen den Endo-

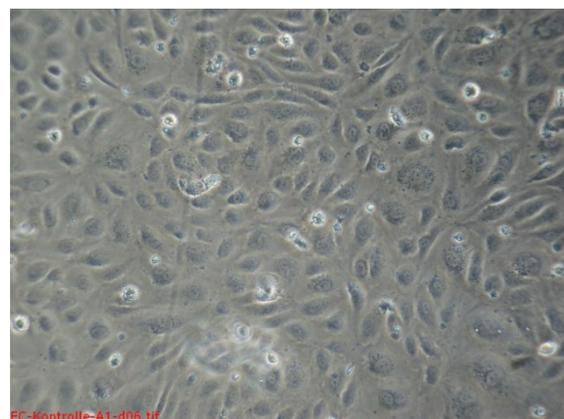
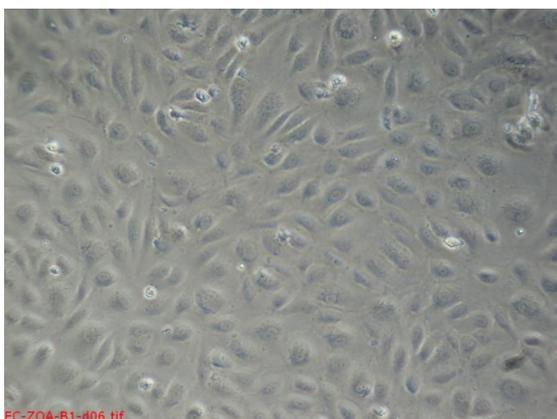
thelzellen. Diese waren über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten, nahmen im Verlauf der 14 Tage jedoch zu. Vermutlich waren es Mineralablagerungen die auf das Nährmedium zurückzuführen sind. Weiterhin sind kleine Luftblasen im Nährmedium und Strukturen in der Welloberfläche die sich als linienförmiges Muster darstellten als Artefakte zu nennen. An den folgenden drei festgelegten Beobachtungszeitpunkten, dem 8., 10. und 14. Tag nach Aussiedlung der Zellen und Medikamentenzusatz zu den Vergleichsgruppen zeigten sich keine Veränderungen in der Zellmorphologie. Die Besiedlungsdichte blieb in den Wellausschnitten der Versuchs- und Kontrollgruppe konstant und vergleichbar dicht. Teils ordneten sich die HUVECs zu stern- oder lumenartigen Formationen an.



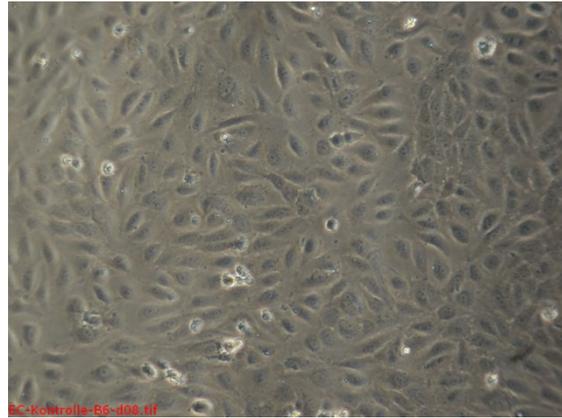
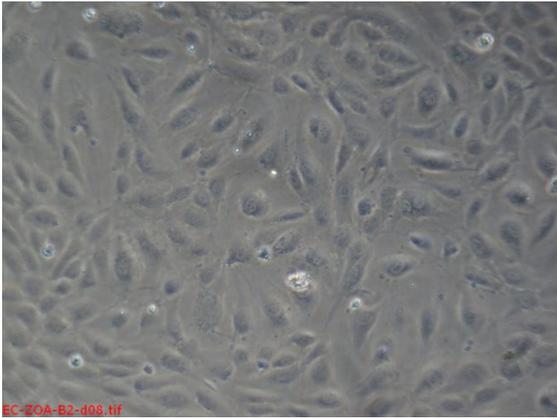
Endothelzellen am Tag 1: Zometa®-Konzentration von 1 µM (li.), Negativkontrolle (re.)



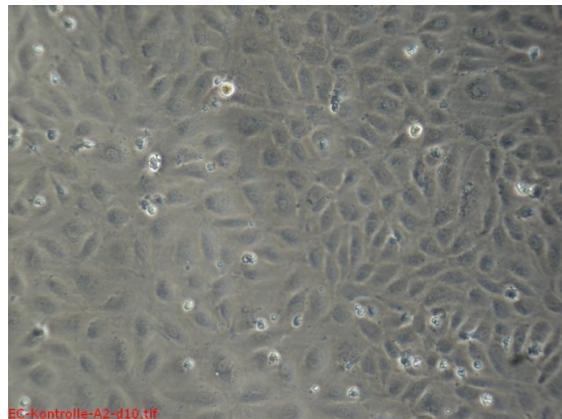
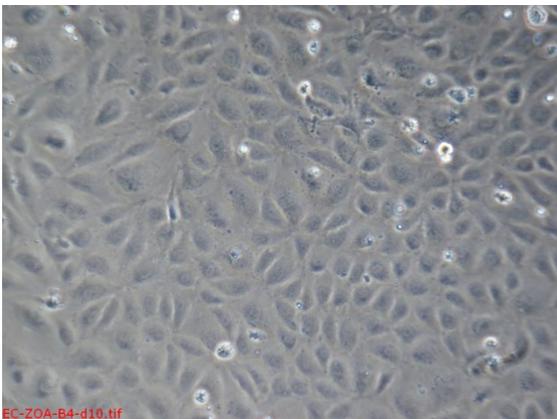
Endothelzellen am Tag 3: Zometa®-Konzentration von 1 µM (li.), Negativkontrolle (re.)



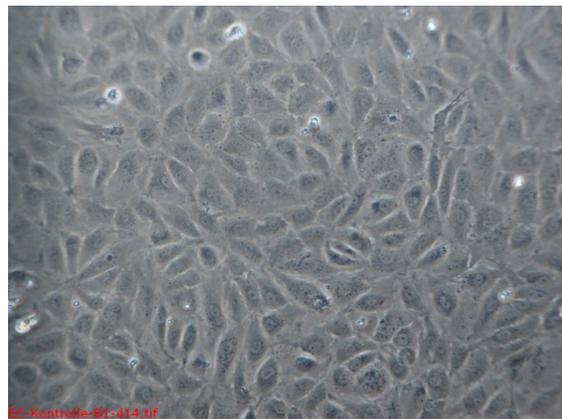
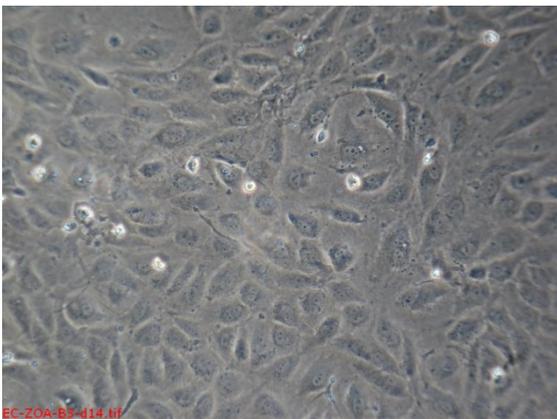
Endothelzellen am Tag 6: Zometa®-Konzentration von 1 µM (li.), Negativkontrolle (re.)



Endothelzellen am Tag 8: Zometa[®]-Konzentration von 1 μ M (li.), Negativkontrolle (re.)



Endothelzellen am Tag 10: Zometa[®]-Konzentration von 1 μ M (li.), Negativkontrolle (re.)



Endothelzellen am Tag 14: Zometa[®]-Konzentration von 1 μ M (li.), Negativkontrolle (re.)

Abbildung 6:
exemplarische Auswahl aus den dokumentierten Wellenausschnitten der Endothelzellkulturen in
10facher Vergrößerung

III.2. Ergebnisse der MTT-Assays

III.2.1. MTT-Assay der Osteoblasten

Der MTT-Assay der Osteoblasten lieferte pro Versuchstag jeweils 72 Extinktionswerte als Maß für die Anzahl der vitalen Zellen und für die Stoffwechselaktivität dieser Zellen nach Medikamenteninkubation.

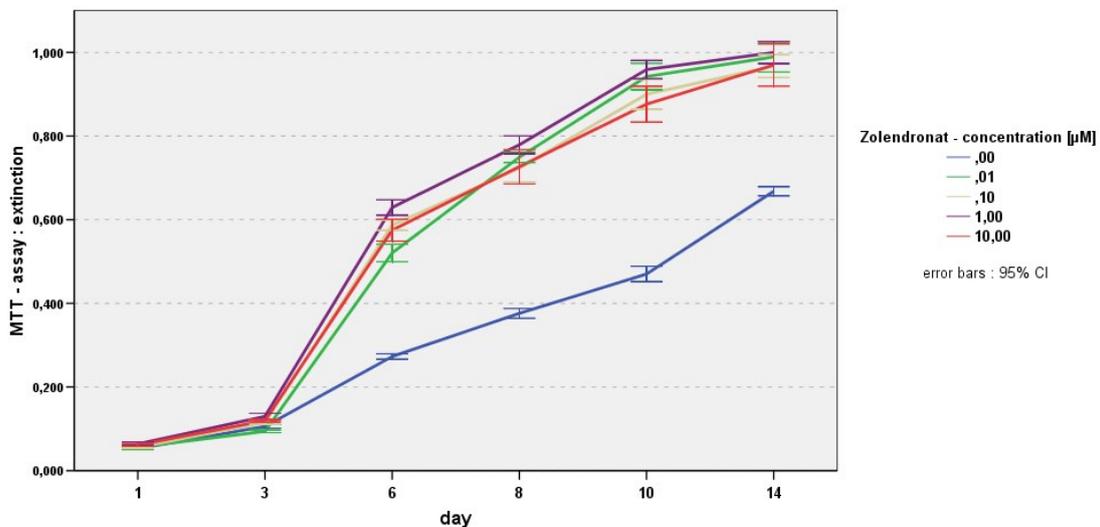


Abbildung 7:
Liniendiagramm der Ergebnisse des MTT-Assays der Osteoblasten

Ein Liniendiagramm (*siehe oben Abbildung 7*) gibt eine orientierende Übersicht über den gesamten Versuchszeitraum von 14 Tagen. Auf der y-Achse wurden die arithmetischen Mittelwerte der mittels Photometrie festgestellten Extinktionen, mit einem minimalen Wert von 0 und einem maximalen von 1, aufgetragen. Die x-Achse zeigt den Versuchsverlauf in Tagen mit den insgesamt 6 Messzeitpunkten. In jeweils unterschiedlichen Farben sind die Kurven für die Kontrollgruppe (0 μM) bzw. die vier Vergleichsgruppen mit den Bisphosphonat-Konzentrationen 0,01, 0,1, 1 und 10 μM dargestellt. Weiterhin wurden bei allen Werten einer Gruppe die 95%-Konfidenzintervalle eingezeichnet.

Ausnahmslos weisen alle Kurven durchgehend eine positive Steigung auf.

Deutlich erkennbar weisen die vier mit Bisphosphonat versetzten Osteoblastenkulturen ab Tag 6 bei einer Wellenlänge von 570 nm deutlich größere Extinktionswerte (zwischen 0,52 und 0,63) und somit eine höhere Stoffwechselaktivität auf als die Negativkontrolle (um 0,27). Im Vergleich zum Tag 3 verdreifachen sich am Tag 6 die Werte der Vergleichsgruppen. Davor und danach steigen die ermittelten Extinktionswerte weniger stark. Die Werte der Kontrollgruppe folgen im Versuchszeitraum annähernd einem linearen Verlauf. Ab dem dritten Messzeitpunkt am 6. Versuchstag ergaben die Extinktionsmessungen der Negativkontrolle Werte, die annähernd nur halb so hoch liegen wie die der vier Vergleichsgruppen. Nach zwei Wochen erreichten die mit Bisphosphonat versetzten Zellkulturen im MTT-Assay beinahe den Maximalwert von 1. Für die Kontrollgruppe liegt der Mittelwert zu diesem Zeitpunkt etwa bei 0,67. Die exakten Zahlen als Ergebnis der univariaten ONYWAY deskriptiven Statistik (Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler, 95%-Konfidenzintervall sowie Minimum und Maximum) sind tabellarisch für jeden Messtag einzeln im *Anhang, I.1.1. Daten der Osteoblasten, ab Seite I* dargestellt.

Bisphosphonate zeigten hier insgesamt auf Osteoblasten eine proliferations- und stoffwechselaktivitätsfördernde Wirkung. Dieser Effekt war bis zum 14. Tag des Versuches zu beobachten, wobei keine Dosiswirkungsbeziehung im Liniendiagramm aus den Ergebnissen des MTT-Assays abzulesen ist.

Detailliertere Aussagen zur Gruppendifferenz hinsichtlich der Signifikanz der Ergebnisse ermöglicht die ANOVA, die mit dem Post-Hoc-Test durchgeführt wurde. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse eines jeden Messtages bieten die Boxplots in der *Abbildung 8 auf Seite 70*. Diese zeigen einzeln für jede der fünf Gruppen (0 (Kontrolle), 0,01, 0,1, 1 und 10 μ M) den Median der Extinktionswerte als schwarzen waagerechten Balken und den Interquartilsabstand als Streuungsmaß, in dem 50 % der Daten liegen, als Box um den Mittelwert. Die außerhalb der Box liegenden Werte werden, durch die Länge der Antenne, die auch als Whisker bezeichnet wird, symbolisiert. Vereinzelte Ausreißer werden als Kreise bzw. Sternchen abgebildet.

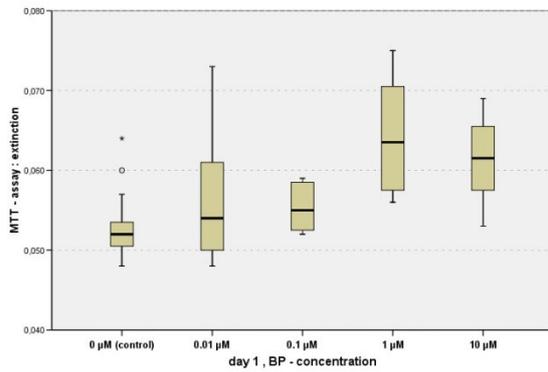
Bereits am Versuchstag 1 liefert der Mehrfachvergleich der Extinktionsmittelwerte zwischen allen fünf Gruppen zum Teil Ergebnisse mit schwach

signifikanten Abweichungen ($p < 0,05$). Insbesondere zu nennen sind hier jedoch die beobachteten mittleren Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen mit 1 bzw. 10 μM , jeweils mit einer Signifikanz von $p = 0,001$, die als hoch einzuordnen ist. Diese hohe Signifikanz zwischen der Negativkontrolle und den beiden höchst konzentriertesten Bisphosphonat-Gruppen bleibt den gesamten Versuchszeitraum über bestehen. Ab dem zweiten Messzeitpunkt erreicht sie $p < 0,001$. Von da an zeigen auch die mit niedrigeren Dosen an Zometa[®] inkubierten Osteoblastenkulturen im MTT-Assay mittlere Differenzen im Vergleich zur Kontrollgruppe, die als schwach (0,1 μM) bzw. hoch (0,01 μM) einzuordnen sind. In den folgenden vier Messungen innerhalb der nächsten elf Tage bestätigte sich diese Tendenz, wobei dann jeweils im Vergleich zwischen 0 μM mit 0,01, 0,1, 1 und 10 μM p-Werte von $< 0,001$ erreicht werden.

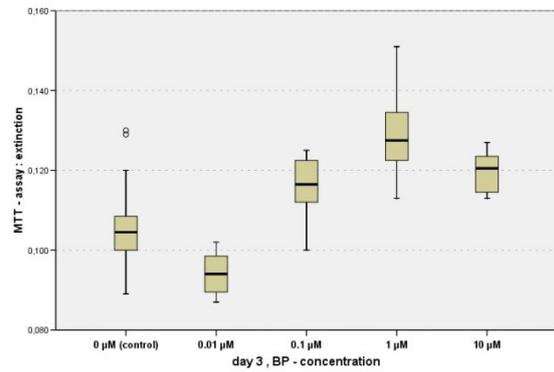
Während sich vor dem Tag 6 der MTT-Messwert für die 0,01 μM Zometa[®] signifikant von dem Messwert der 0 μM als auch von den höheren Konzentrationen unterschied, war er ab Versuchstag 8 nicht mehr signifikant von den höheren Konzentrationen abgrenzbar.

Insgesamt zeigt die Analyse des MTT-Assays, dass Zoledronat auf den mitochondrialen Stoffwechsel der Osteoblasten aktivierend wirkt, wobei sich trotz tageweise hochsignifikanter metabolischer Aktivierungseffekte zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen (KZOA1-KZOA4), die sich im Post-Hoc-Test zeigen, nach 14 Tagen keine Aussagen zur Konzentrationsabhängigkeit treffen lassen.

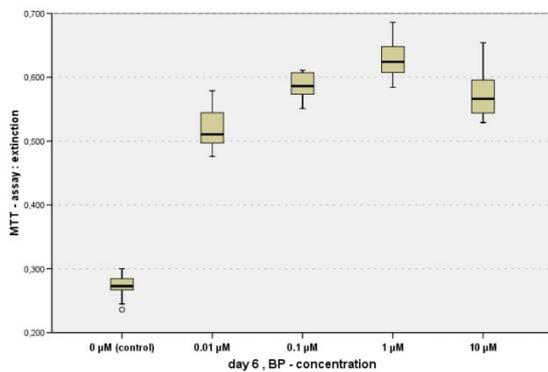
III. Ergebnisse, III.1. Ergebnisse der MTT-Assays



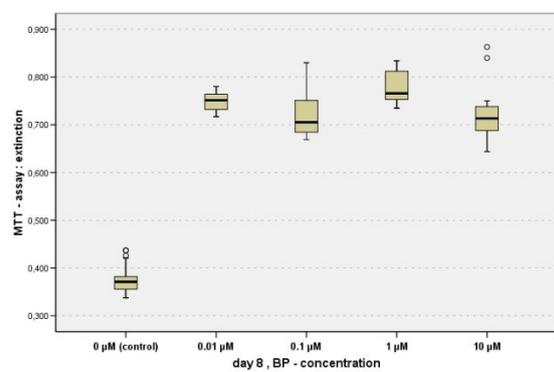
Ergebnisse des MTT-Assays am Tag 1 als Boxplot



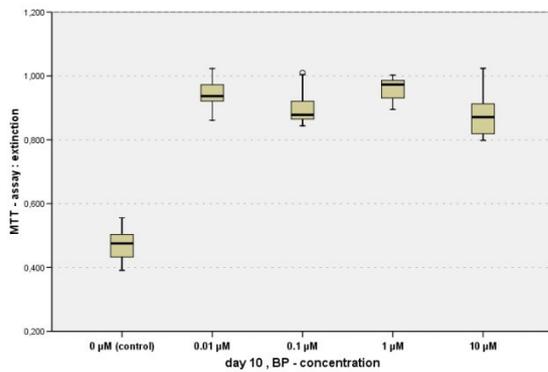
Ergebnisse des MTT-Assays am Tag 3 als Boxplot



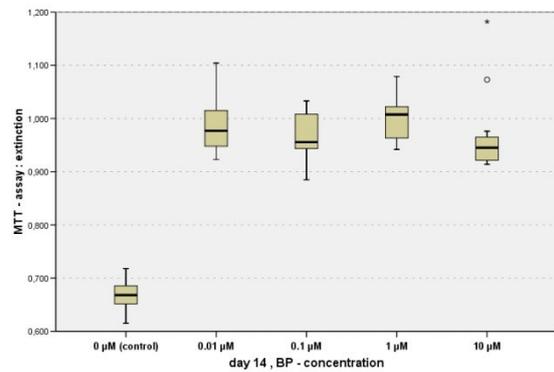
Ergebnisse des MTT-Assays am Tag 6 als Boxplot



Ergebnisse des MTT-Assays am Tag 8 als Boxplot



Ergebnisse des MTT-Assays am Tag 10 als Boxplot



Ergebnisse des MTT-Assays am Tag 14 als Boxplot

Abbildung 8:
Ergebnisse des MTT-Assays der Osteoblasten als Boxplots

III.2.2. MTT-Assay der Endothelzellen

Wie oben beschrieben wurde auch an sechs Zeitpunkten innerhalb des Versuchszeitraumes ein MTT-Assay an den vier Endothelzellkulturen, die mit Nährmedien inkubiert worden waren, deren Gehalt an Zoledronsäure unterschiedlich hoch gewählt war, sowie einer Kontrollkultur, die frei von einem Medikamentenzusatz blieb, durchgeführt.

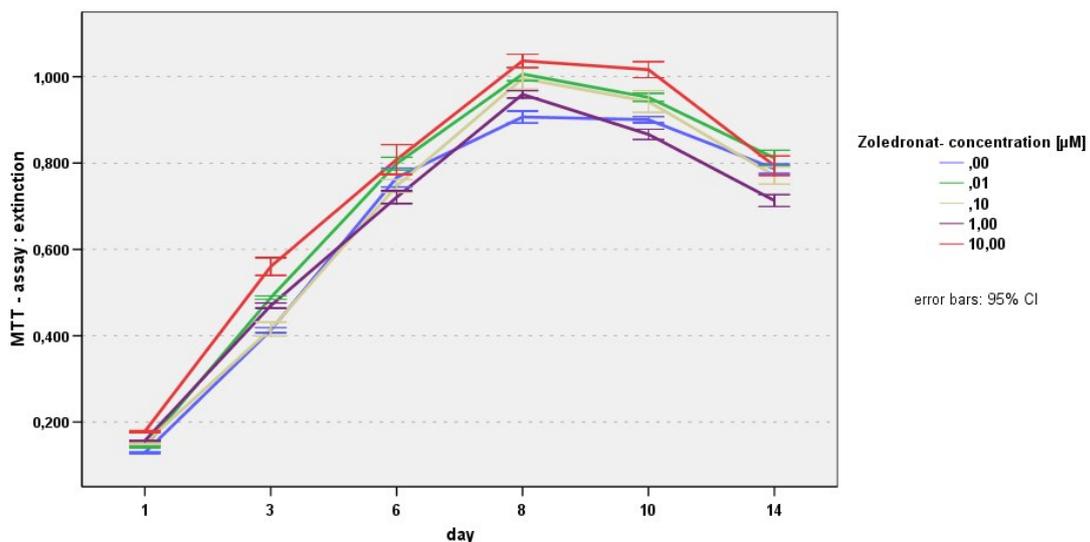


Abbildung 9:
Liniendiagramm über die Ergebnisse des MTT-Assays der Endothelzellen

Die Mittelwerte der erhobenen 72 Einzelextinktionen zeigt das Liniendiagramm oben in *Abbildung 9*, das analog zu dem im Kapitel *III.2.1. MTT-Assay der Osteoblasten auf Seite 67* beschriebenen Diagramm aufgebaut ist. Ausgehend von Werten $< 0,18$ am ersten Versuchstag, verlaufen alle fünf Graphen bis zum Tag 8 mit positiver, annähernd konstanter und linearer Steigung bis zu einem Wert zwischen 1,04 (10 μM) und 0,91 (0 μM). Diese Mittelwerte bilden in jeder der fünf Gruppen einen Wendepunkt von dem an, die jeweilige Kurve unterschiedlich stark bis zum Versuchsende abfällt. Eine Ausnahme bildet die Kontrollgruppe. Ihre mittlere Extinktion bleibt von Tag 8 auf Tag 10 konstant und fällt erst dann, ebenso wie die 0,01, 0,1 und 10 μM -Gruppe auf $\sim 0,93$ ab. Der Graph der fünften Gruppe, Endothelzellen die mit einer Dosis von 1 μM Zoledronat

inkubiert worden waren, erreicht am 14. Versuchstag, wie auch schon am achten Tag einen medianen Extinktionswert von 0,87.

Insgesamt bietet diese Übersicht der Ergebnisse ein einheitlicheres Bild als bei der Analyse des MTT-Assay der Osteoblasten. Kontroll- und Vergleichsgruppen zeigen im Liniendiagramm der Mittelwerte des MTT-Assays ein nahezu identisches Verhalten. Die erhobenen Werte als Maß für die Stoffwechselaktivität der Endothelzellen steigen annähernd gleichwertig bis zum Tag 8 bis auf den Maximalwert und verringern sich in den folgenden vier Tagen, ebenfalls einheitlich, um ein Fünftel. Ein stoffwechselfördernder oder -hemmender Effekt des Bisphosphonats auf Endothelzellen ist nicht ersichtlich. Die exakten Werte, die dem Diagramm zugrunde liegen, finden sich tabellarisch dargestellt im *Anhang, I.1.2. Daten der Endothelzellen ab Seite III*.

Die mit dem Tamhan-Test durchgeführten Mehrfachvergleiche zwischen den Extinktionswerten der fünf Gruppen zeigen direkt am Tag 1 hoch signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Medianen aller Gruppen, die aus der Analyse des Liniendiagrammes nicht zu erwarten waren. Bis auf den Vergleich zwischen 0 μM und 0,1 μM ($p = 1,000$) bleibt die Signifikanz in allen denkbaren Gruppenvergleichen auch am 2. Messzeitpunkt mit $p < 0,001$ hoch. Am sechsten Versuchstag zeigt sich ein anderes Bild. Die Kontrollgruppe weist im Vergleich mit den Gruppen KZOA1 (10 μM), KZOA3 (1 μM) und KZOA4 (0,01 μM) keinen signifikant abweichenden Extinktionsmittelwert auf. Einzig für KZOA2 (1 μM) lässt sich im Vergleich mit 0 μM eine Signifikanz ($p = 0,009$) nachweisen. Weiterhin hoch signifikant unterschiedliche Ergebnisse ($p < 0,001$) zeigt die Gegenüberstellung folgender Endothelzellengruppen: 0,01 μM gegenüber 0,1 μM und 1 μM sowie 1 μM gegenüber 10 μM .

Zwei Tage später lassen sich alle vier Vergleichsgruppen wieder sicher anhand ihrer mittleren Extinktionswerte von der Negativkontrolle abgrenzen (jeweils $p < 0,001$). Ebenfalls hoch signifikante Ergebnisse zeigen sich im Mehrfachvergleich von 0,01 μM mit 1 μM und 1 μM mit 10 μM .

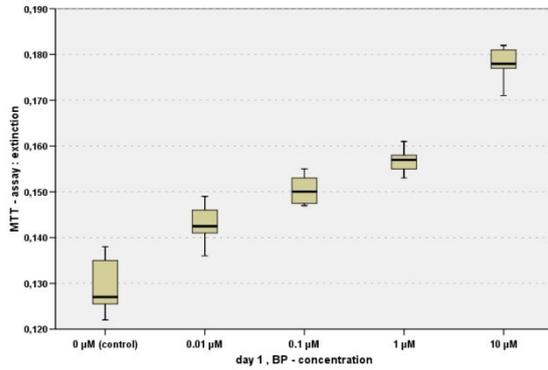
Wie es auch der Boxplot der Ergebnisse des MTT-Tests in *Abbildung 10 auf Seite 74* darstellt, grenzen sich am Tag 10 die gemessenen Extinktions-

werte der Gruppen 10 μM und 1 μM im Vergleich mit allen anderen Gruppen signifikant ab. Die Kontrolle (0 μM) lässt sich eindeutig mit $p < 0,001$ zu den Bisphosphonat-Gruppen abgrenzen. Einzig zur 0,1 μM -Gruppe fällt die Differenz mit $p = 0,035$ schwach aus. Im Vergleich mit den Endothelzellen die mit 0,01 μM bisphosphonathaltigem Nährmedium inkubiert worden waren zeigt die 0,1 μM -Gruppe keine statistisch abweichenden Extinktionswerte.

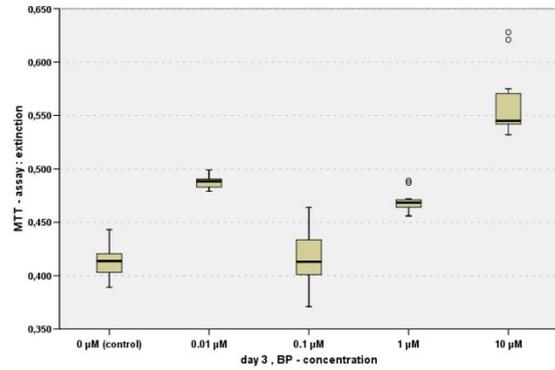
Am letzten Versuchstag ergab der MTT-Assay weniger statistisch abweichende Ergebnisse. Wie der Boxplot in *Abbildung 10 auf Seite 74* und das Liniendiagramm in *Abbildung 9 auf Seite 71* andeuten, bleibt jedoch die hoch signifikante Differenz zwischen KZOA2 und den anderen vier Gruppen, wie bereits am Tag 10, bestehen. Zudem liefert die Gegenüberstellung von 0,1 μM mit 0,01 μM schwach signifikant abweichende Ergebnisse ($p = 0,030$).

Über die gesamte Versuchsdauer betrachtet gibt der MTT-Assay, trotz tagesweiser hoch signifikanter Differenzen im Mehrgruppenvergleich, keinen klaren Anhaltspunkt dafür, dass die Endothelzellen in ihrer Stoffwechselaktivität durch Zometa[®] beeinflusst werden.

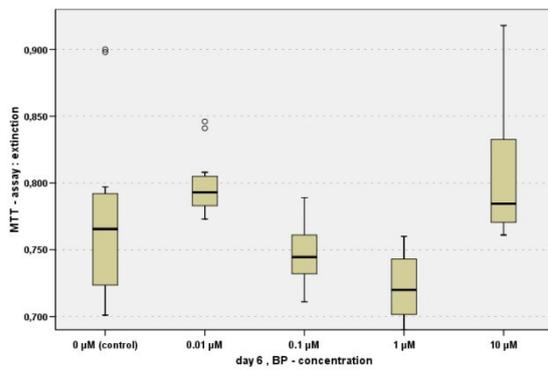
III. Ergebnisse, III.1. Ergebnisse der MTT-Assays



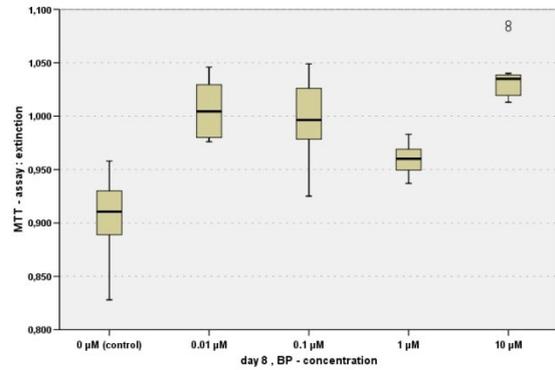
Ergebnisse des MTT-Assays am Tag 1 als Boxplot



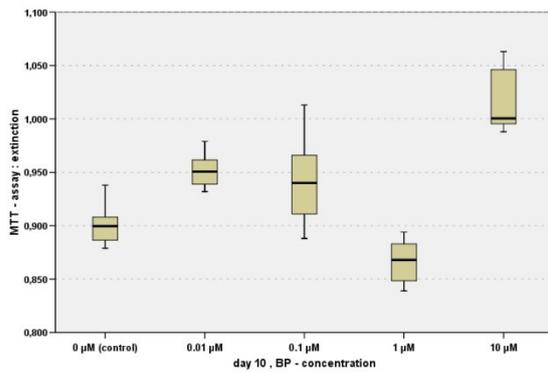
Ergebnisse des MTT-Assays am Tag 3 als Boxplot



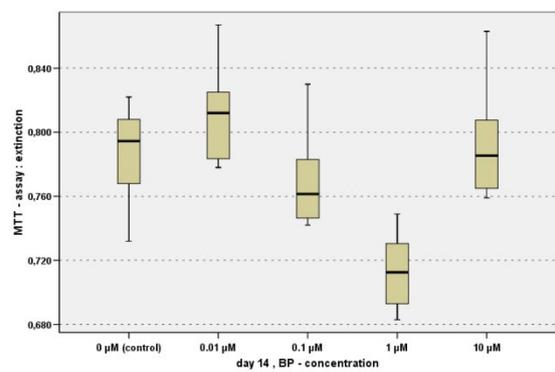
Ergebnisse des MTT-Assays am Tag 6 als Boxplot



Ergebnisse des MTT-Assays am Tag 8 als Boxplot



Ergebnisse des MTT-Assays am Tag 10 als Boxplot



Ergebnisse des MTT-Assays am Tag 14 als Boxplot

Abbildung 10:
Ergebnisse des MTT-Assays der Endothelzellen als Boxplots

III.3. Ergebnisse der Cell-Counts

III.3.1. Cell-Count der Osteoblasten

Die 216 Fotografien der verschiedenen Osteoblastenkulturen, aufgenommen an Tag 1, 3, 6, 8, 10 und 14 des Beobachtungszeitraumes, wurden nicht nur zur Dokumentation möglicher Morphologieveränderungen genutzt (siehe III.1.1. Fotodokumentation der Osteoblasten ab Seite 59) sondern waren auch Grundlage einer Zellzählung, die mit dem Programm ImageJ durchgeführt wurde. Ausgezählt wurde jeweils bei 10facher Vergrößerung ein reproduzierbar wiederauffindbarer Well-Ausschnitt von 0,93 x 1,25 mm Größe.

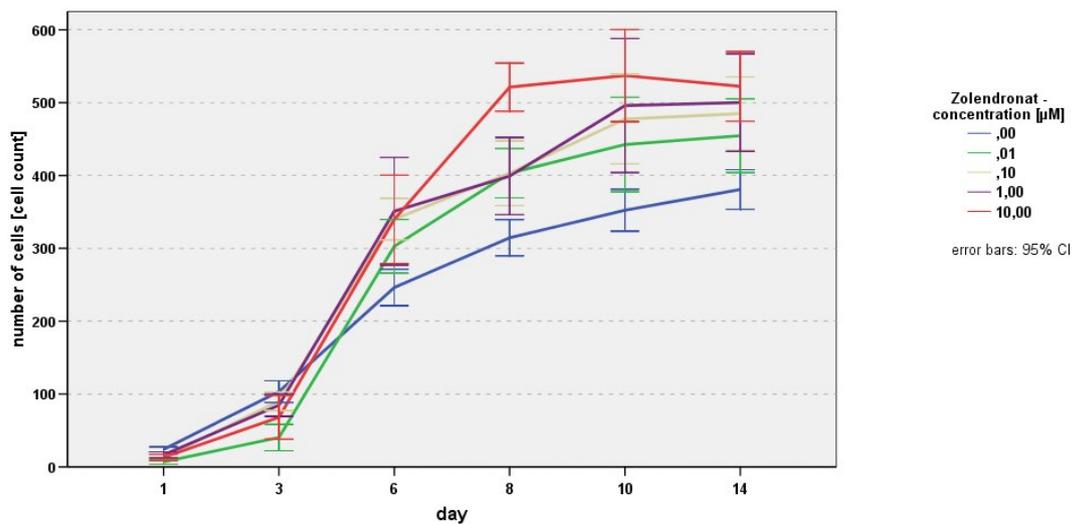


Abbildung 11:
Liniendiagramm über die Ergebnisse des Cell-Counts der Osteoblasten

Abbildung 11 stellt die mittelwertige Zellzahl der vier Bisphosphonat-Vergleichsgruppen und der Kontrolle samt der 95%-Konfidenzintervalle an sechs Zeitpunkten innerhalb von 14 Tagen als Ergebnis des Cell-Counts als Liniendiagramm dar. Ausgehend von mittleren Zellzahlen zwischen 7 und 24 am Tag 1 steigen alle fünf Graphen zu Tag 3 mäßig auf Werte um 80 an. Am Tag 6 ergab der Cell-Count fast eine Vervierfachung der mittleren

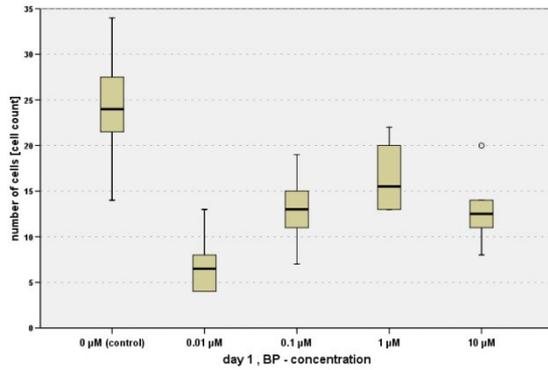
Zellanzahl aller fünf Gruppen im Vergleich zum vorherigen Messzeitpunkt. Diese deutliche Proliferation zeigte auch bereits der MTT-Assay der Osteoblasten am Tag 6. Ebenfalls äquivalent zum Liniendiagramm des MTT-Assays zeigt die Kontrollgruppe auch im Cell-Count im Vergleich zu den anderen Osteoblastenkulturen die geringsten Werte. Nach 14 Tagen erreichte sie, nach stets positivem Wachstum, als Maximalwert 380,8 ausgezählte Zellen. Ab Versuchstag 8 zeigt die Auswertung die höchsten Zellzahlen für die höchst konzentrierteste Gruppe (521,3) und die niedrigste für die Negativkontrolle (314,5). Dazwischen liegen die Mittelwerte der Bisphosphonat-Gruppen in abfallender Konzentrationsreihe (1 μM : 399,2 und 0,1 sowie 0,01 μM : 403,2). An den folgenden sechs Tagen bleibt diese Reihenfolge bei schwach steigenden Zellzahlen bestehen. Einzig der Graph der KZOA1-Gruppe zeigt vom zehnten Tag (537,2) auf den Tag 14 (522,3) eine geringe negative Steigung. (Eine komplette tabellarische Übersicht der Ergebnisse ist im *Anhang, I.2.1. Daten der Osteoblasten ab Seite V* zu finden.)

Im Mehrfachvergleich zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den mittleren Zellzahlen zunächst insbesondere im Vergleich der Kontrolle mit den Bisphosphonat-Gruppen. Am Tag 1 fällt die Differenz zwischen 0 μM und 0,01 μM hoch signifikant aus, zwischen 0 μM und 0,1 sowie 10 μM signifikant und zwischen 0 μM und 10 μM noch schwach signifikant (vergleiche auch die Darstellung der Ergebnisse als Boxplot in *Abbildung 12 auf Seite 78*). Auch die Gegenüberstellung der 0,01 μM -Gruppe mit der 1 μM -Gruppe ergibt einen p-Wert $< 0,05$. Der p-Wert = 0,000 für den Vergleich 0 μM mit 0,01 μM bleibt am dritten Versuchstag bestehen. Zudem ergibt die Analyse signifikante Unterschiede zwischen 0,01 μM und 0,1 sowie 1 μM . Die dritte Auszählung der Osteoblasten am Tag 6 ergab nur eine hohe Signifikanz (zwischen der Negativkontrolle und der KZOA3-Gruppe). Diese zeigte sich zwei Tage später als nur noch schwach ausgeprägt ($p = 0,018$). Dafür ergibt der T-Test hohe Signifikanzen für 0 und 0,01 μM gegenüber 10 μM , und mittelmäßig ausgeprägte für 0 μM gegenüber 0,01 und 0,1 μM sowie 1 μM gegenüber 10 μM . Am Tag 10 ergab der Cell-Count weniger aussagekräftige Ergebnisse. Allerdings weist die bisphosphonatfreie Osteo-

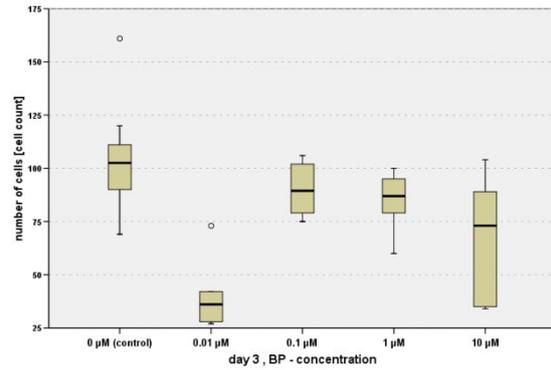
blastenkultur weniger Zellen auf als die mit 10 μM Zometa[®] versetzte. Am Tag 14 ist diese Differenz sogar hoch signifikant. Der schwache statistische Unterschied zwischen 0 μM und 0,01 μM blieb auch an Tag 10 und 14 bestehen. Außerdem ergibt der Vergleich zwischen 0 μM und 1 μM am letzten Tag des Versuches eine schwache Signifikanz.

Insgesamt zeigt der Cell-Count der Osteoblasten bisphosphonatabhängige Proliferationseffekte. Allerdings sind diese am Tag 14 nur im Vergleich zwischen der Negativkontrolle und der 10 μM -Gruppe hoch signifikant. Die Dosisabhängigkeit, die das Liniendiagramm vermuten lässt, ist im Mehrfachvergleich nicht statistisch eindeutig zu verifizieren.

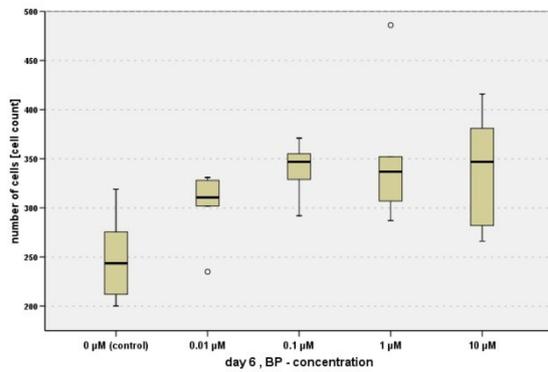
III. Ergebnisse, III.3. Ergebnisse der Cell-Counts



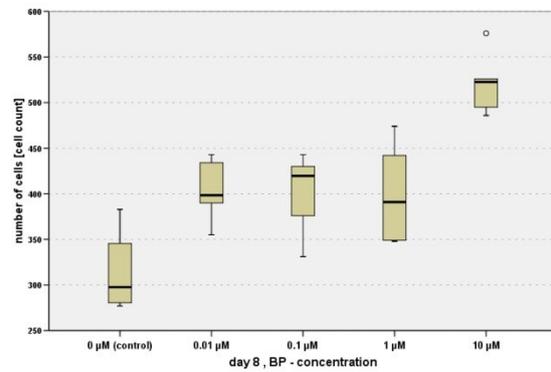
Ergebnisse des Cell-Counts am Tag 1 als Boxplot



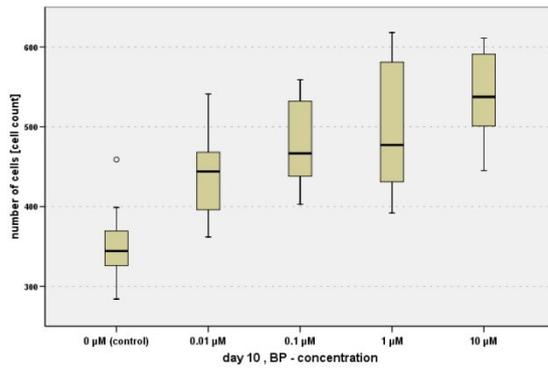
Ergebnisse des Cell-Counts am Tag 3 als Boxplot



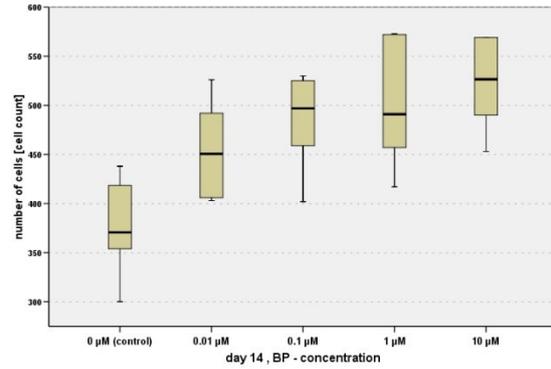
Ergebnisse des Cell-Counts am Tag 6 als Boxplot



Ergebnisse des Cell-Counts am Tag 8 als Boxplot



Ergebnisse des Cell-Counts am Tag 10 als Boxplot



Ergebnisse des Cell-Counts am Tag 14 als Boxplot

Abbildung 12:
Ergebnisse des Cell-Counts der Osteoblasten als Boxplots

III.3.2. Cell-Count der Endothelzellen

Auch von den Endothelzellkulturen wurden pro festgelegten Messzeitpunkt 36 Fotografien angefertigt, sodass nach der Zellauszählung aus sechs Werten bei den Vergleichsgruppen und zwölf Werten bei der Negativkontrolle der Median ermittelt werden konnte.

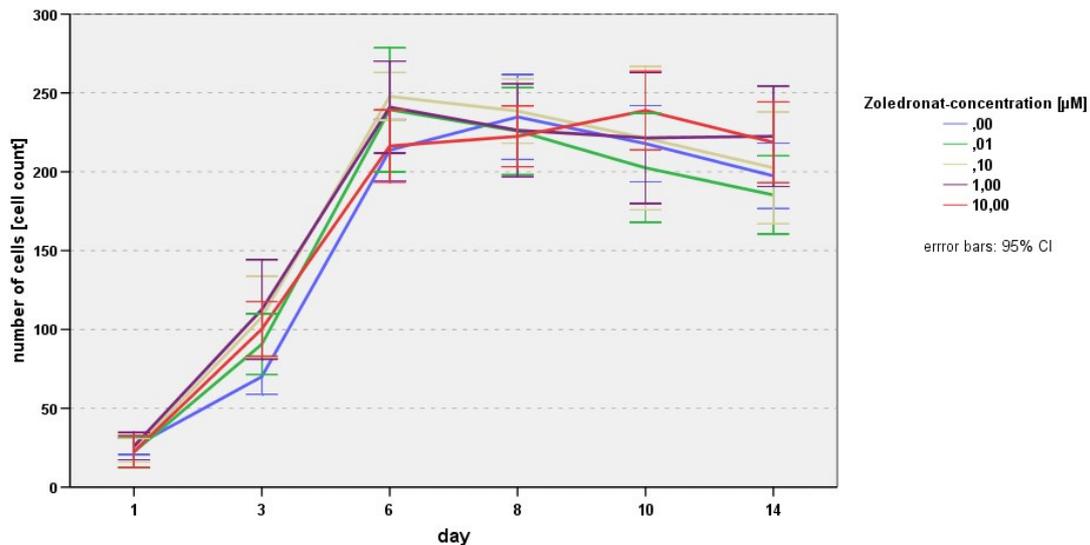


Abbildung 13:
Liniendiagramm über die Ergebnisse des Cell-Counts der Endothelzellen

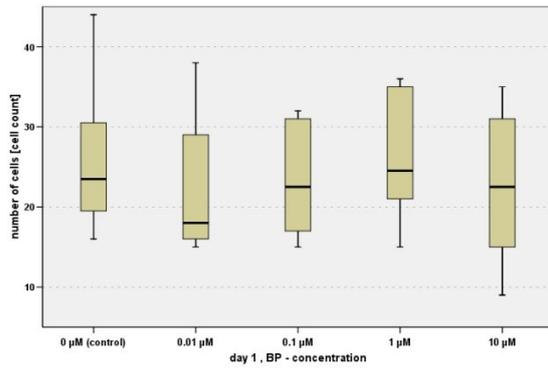
Das Liniendiagramm in *Abbildung 13* gibt eine Übersicht über die ermittelten Zellzahlen für die fünf unterschiedlichen Gruppen im Versuchverlauf. Beginnend mit einer mittleren Zellzahl von 24,3 am Tag 1, sind an den Tagen 3 und 6 Proliferationsraten um mehr als den Faktor 3 bzw. 2,5 festzustellen, wobei die Negativkontrolle jeweils den geringsten Wert aufweist. Ab dem dritten Messpunkt ändert sich die Steigung der Graphen deutlich. Durchschnittlich ist vom Tag 6 zum Tag 8 keine nennenswerte Proliferation abzulesen, ab dann kehrt sie sich in ein negatives Wachstum um. Eine Ausnahme bildet der Graph der 10 µM-Gruppe. Dieser steigt von Tag 8 auf den Tag 10 nochmals an um 16,3 Zellen an, bevor auch er abfällt. Die maximale mittlere Zellzahl wurde am Tag 6 von der 0,1 µM-Gruppe mit einem Wert von 247,8 erreicht. Am Versuchsende liegt der Mittelwert aller gezählten Zellen bei 204,0. Der Verlauf der Graphen erinnert mit dem

starken einheitlichen Wachstum bis Tag 6 an das Linien-diagramm (*siehe Abbildung 9 auf Seite 71*) des MTT-Assays. Ebenfalls gemeinsam sind die am Versuchsende abfallenden Werte und die insgesamt recht homogen verlaufenden Kurven.

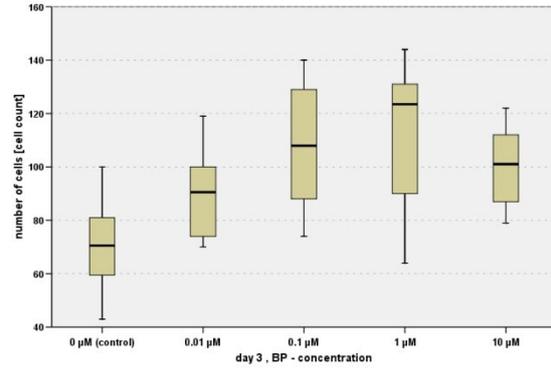
Der Post-Hoc-Test kann an fünf der sechs Untersuchungszeitpunkten ebenfalls keine statistisch nachweisbaren Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen. Lediglich am Tag 3 ergibt die Analyse eine schwache Signifikanz zwischen den Ergebnissen der Negativkontrolle und der 10 μM -Gruppe. In den Boxplots (*siehe Abbildung 14 auf Seite 81*) zeigt sich diese fehlende Differenzierbarkeit zwischen den mittleren Zellzahlen der fünf Gruppen in der Überschneidung der Interquartilsabstände und der Whiskers.

So geben weder die Ergebnisse des Cell-Counts noch des MTT-Assays ein Zeichen dafür, dass Zoledronat eine Wirkung, im Sinne eines Proliferations- oder Stoffwechselaktivitätseffektes, auf Endothelzellen *in vitro* hat.

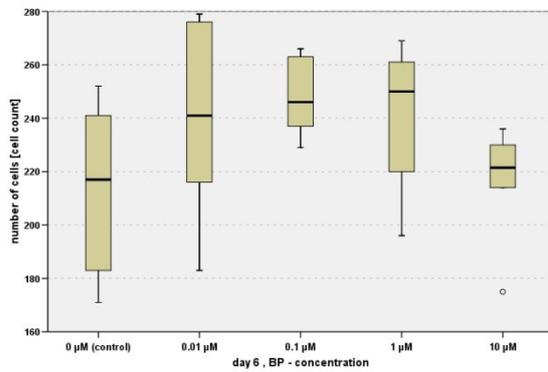
III. Ergebnisse, III.3. Ergebnisse der Cell-Counts



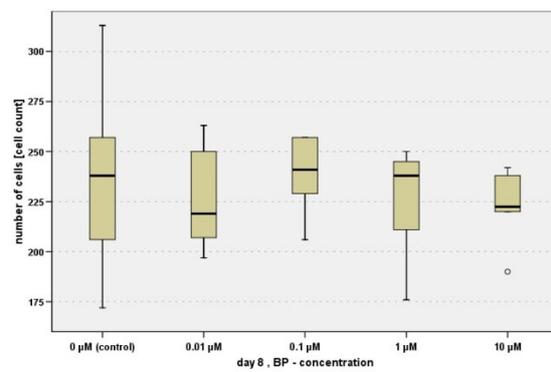
Ergebnisse des Cell-Counts am Tag 1 als Boxplot



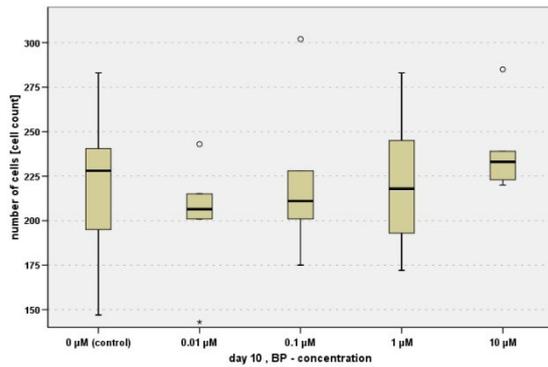
Ergebnisse des Cell-Counts am Tag 3 als Boxplot



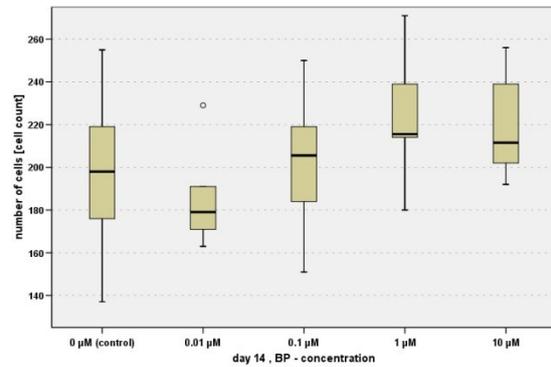
Ergebnisse des Cell-Counts am Tag 6 als Boxplot



Ergebnisse des Cell-Counts am Tag 8 als Boxplot



Ergebnisse des Cell-Counts am Tag 10 als Boxplot



Ergebnisse des Cell-Counts am Tag 14 als Boxplot

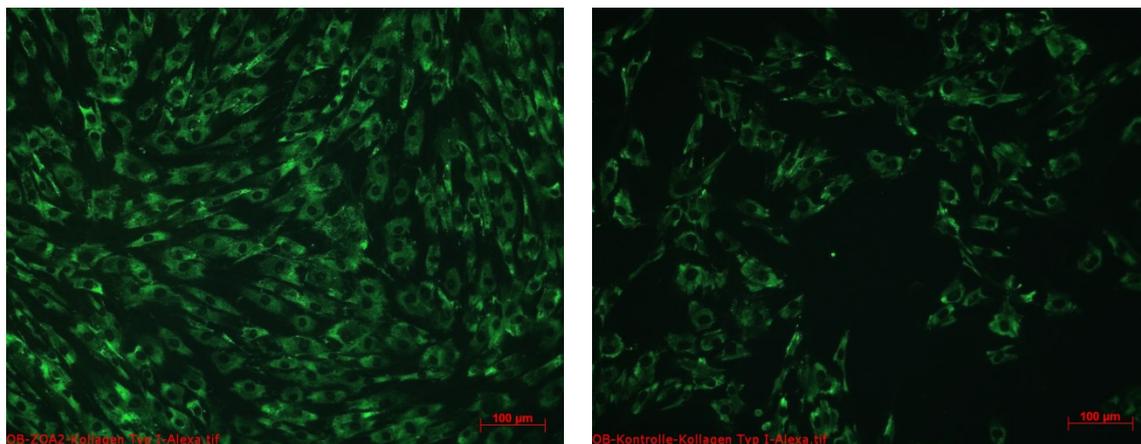
Abbildung 14:
Ergebnisse des Cell-Counts der Endothelzellen als Boxplots

III.4. Ergebnisse der Färbungen

III.4.1. Ergebnisse der Alexa-Fluor®-Immunfärbung

III.4.1.a. Alexa-Fluor®-Färbung der Osteoblasten

Mittels der Antigen-Antikörper-Reaktion konnte das von aktiven Osteoblasten typischerweise synthetisierte Kollagen Typ I unter Fluoreszenzlicht bei 488 nm dargestellt werden. Die angefärbten Osteoblastenkulturen die sieben Tage mit einem Nährmedium inkubiert worden waren, welchem 10.000, 1.000, 100 bzw. 10 nM Zoledronsäure zugeben worden war, sowie eine Negativkontrolle wiesen keine nennenswerten Differenzen auf. Alle fünf repräsentativ ausgewählten und dokumentierten Ausschnitte zeigten Zellen mit einem leuchtend grün fluoreszierenden Cytoplasma vor einem schwarzen Hintergrund. Ebenso ungefärbt stellten sich die Zellkerne dar. Die Form der Zellen war vielfältig, von kubisch über spindelförmig bis rundlich. Die Besiedlungsdichte war homogen als hoch einzustufen, obwohl zugleich vereinzelt Freiräume zwischen den Zellen in allen Färbungen auszumachen waren.

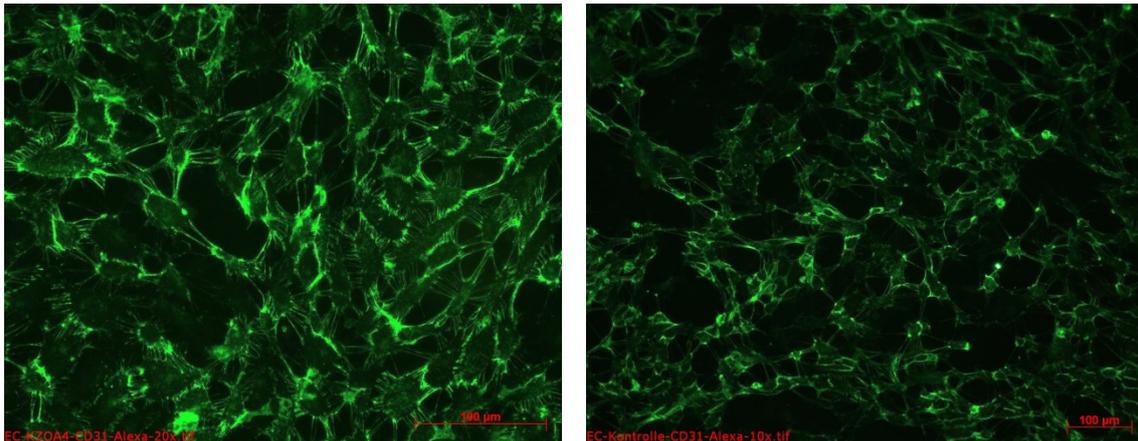


Osteoblasten am Tag 7: Zometa®-Konzentration von 1µM (li.), Negativkontrolle (re.)

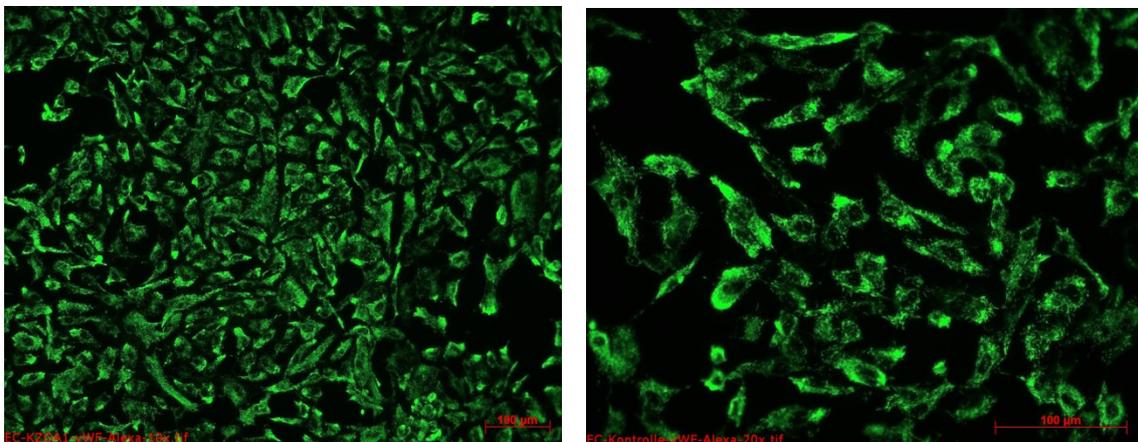
Abbildung 15:
exemplarische Auswahl aus den Kollagen Typ I-Alexa-Fluor®-Färbungen der Osteoblasten,
jeweils in 10facher Vergrößerung

III.4.1.b. Alexa-Fluor®-Färbung der Endothelzellen

Die am Tag 7 gefärbten Endothelzellen stellten sich in allen vier Versuchsansätzen und in der Negativkontrolle sowohl in der durch CD31, als auch durch den vWF-Faktor vermittelten Färbung gleich dar. Alle zehn Kulturen wiesen einen konfluenten Zellmonolayer auf.



Endothelzellen am Tag 7: CD31-Alexa-Fluor®-Färbung;
Zometa®-Konzentration von 0,01 µM in 20facher Vergrößerung (li.),
Negativkontrolle in 10facher Vergrößerung (re.)



Endothelzellen am Tag 7: vWF-Alexa-Fluor®-Färbung;
Zometa®-Konzentration von 10 µM in 10facher Vergrößerung (li.),
Negativkontrolle in 20facher Vergrößerung (re.)

Abbildung 16:
exemplarische Auswahl aus den CD31- und vWF-Alexa-Fluor®-Färbungen der Endothelzellen

III.4.2. Ergebnisse der Dako EnVision®-Immunfärbung

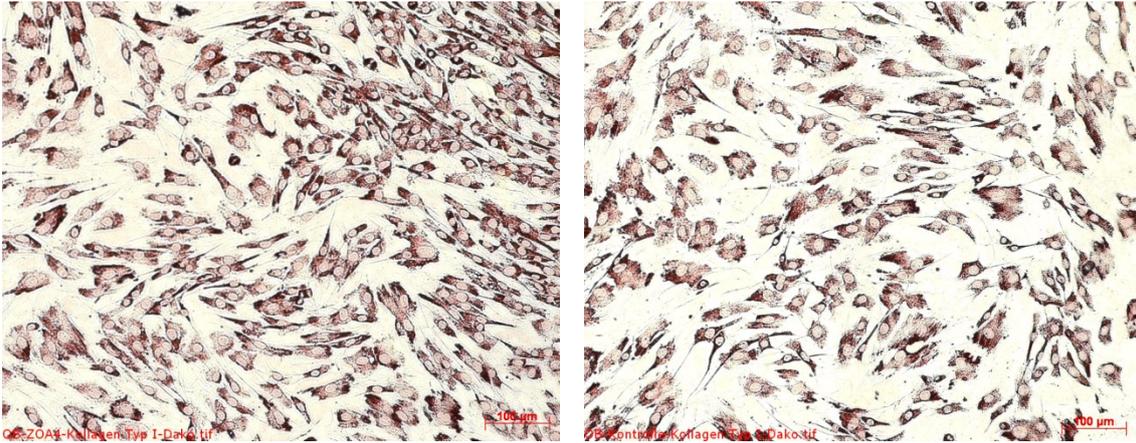
III.4.2.a. Dako EnVision®-Färbung der Osteoblasten

Osteoblasten synthetisieren die Knochenproteine Kollagen Typ I, Osteocalcin und Osteonectin. Sie sind zusammen mit anderen Komponenten der Hauptbestandteil der Knochenmatrix.

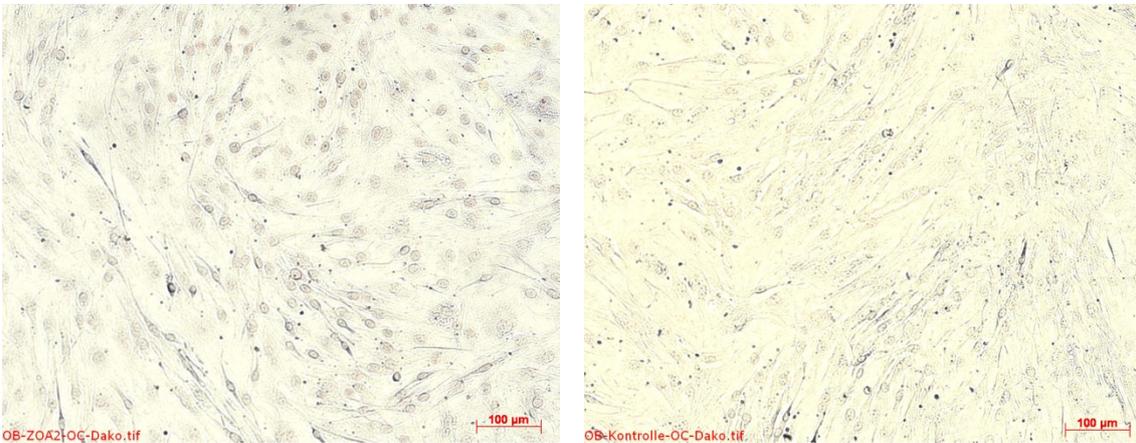
Mittels der spezifisch ausgewählten primären und sekundären Antikörper und dem Chromogen ACE wurden die Osteoblasten nach oben erörtertem Versuchsprotokoll am Versuchstag 7 gefärbt. Dabei war von einem positiven Nachweis auszugehen, wenn das ACE an den zuvor markierten Proteinen rot-braun ausfällt.

Alle drei unterschiedlichen Dako EnVision®-Färbungen ergaben keine Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen, die mit Zoledronsäure in vier unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert worden waren, und der Negativkontrolle. Einheitlich dicht war ebenso die Besiedlungsdichte der Osteoblasten und die Morphologie der Zellen. Diese war spindelförmig bis langgestreckt, bei zentral liegendem runden bis ovalen Zellkern. Die Zellgröße betrug in ihrer größten Ausdehnung bis zu 200 µm.

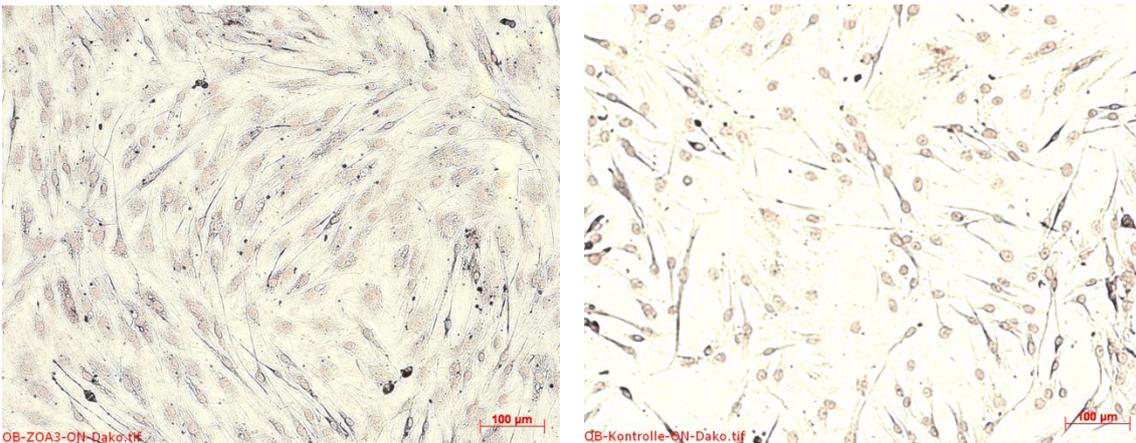
III. Ergebnisse, III.4. Ergebnisse der Färbungen



Osteoblasten am Tag 7: Kollagen Typ I-Dako EnVision®-Färbung;
Zometa®-Konzentration von 0,01 µM (li.), Negativkontrolle (re.)



Osteoblasten am Tag 7: Osteocalcin-Dako EnVision®-Färbung;
Zometa®-Konzentration von 1 µM (li.), Negativkontrolle (re.)



Osteoblasten am Tag 7: Osteonectin-Dako EnVision®-Färbung;
Zometa®-Konzentration von 0,1 µM (li.), Negativkontrolle (re.)

Abbildung 17:
exemplarische Auswahl aus den Kollagen Typ I-, Osteocalcin- und Osteonectin-
Dako EnVision®-Färbungen der Osteoblasten, jeweils in 10facher Vergrößerung

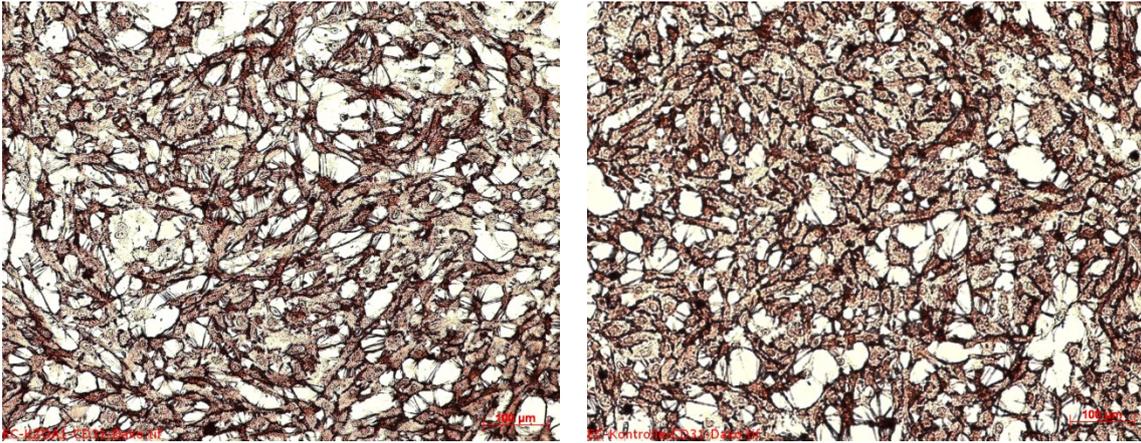
III.4.2.b. Dako EnVision®-Färbung der Endothelzellen

Als Ergebnis der HUVEC-Färbung an dem Protein CD31 und dem von Willebrand-Faktor am siebten Versuchstag zeigte sich ein ähnliches Bild, wie bereits oben als Ergebnis der Alexa-Fluor®-Färbung beschrieben.

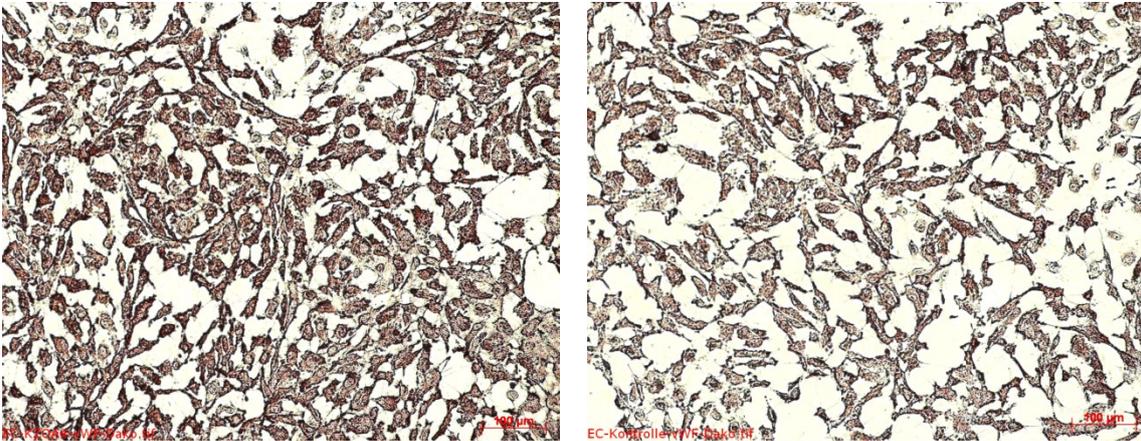
Entsprechend der Lokalisation der Epitope stellte die CD31-Färbung die äußere Kontur der Zellen mit samt ihren Zellausläufern, was die Bestimmung der Zellgröße (bis zu 100 µm) ermöglichte, und ihre Verknüpfung untereinander durch intensiven roten Niederschlag dar. Das Cytoplasma zeigte sich nur schwach koloriert. Freiräume zwischen den Zellen wurden bei den Waschvorgängen im Anschluss an den Chromogenauftrag gänzlich freigespült.

Die Färbung am vWF ließ den Eindruck von isoliert voneinander liegenden Zellen entstehen, da hier lediglich das Cytoplasma nicht jedoch Zellfortsätze oder die Zelloberfläche gefärbt worden waren. Im Vergleich zur CD31-Färbung wurde eine kleinere Zellgröße vorgetäuscht.

Morphologische Differenzen zwischen den einzelnen, unterschiedlich stark mit Zoledronsäure konfrontierten Zellkulturen waren nicht feststellbar. Auch die Endothelzellen, die mit reinem Nährmedium versorgt worden waren, waren nicht von den anderen Versuchsansätzen abzugrenzen.



Endothelzellen am Tag 7: CD31-Dako EnVision®-Färbung;
Zometa®-Konzentration von 10 μ M (li.), Negativkontrolle (re.)



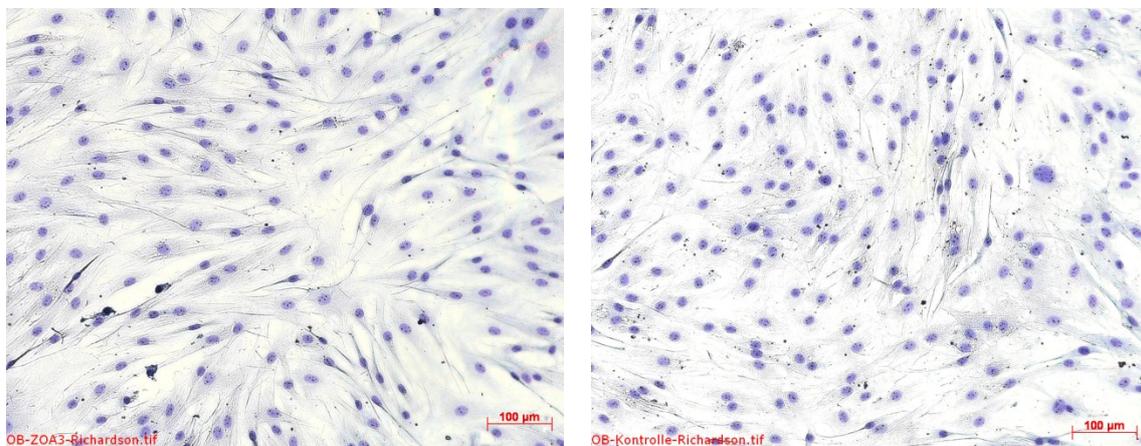
Endothelzellen am Tag 7: vWF-Dako EnVision®-Färbung;
Zometa®-Konzentration von 0,01 μ M (li.), Negativkontrolle (re.)

Abbildung 18:
exemplarische Auswahl aus den CD31- und vWF-Dako EnVision®-Färbungen
der Endothelzellen, jeweils in 10facher Vergrößerung

III.4.3. Ergebnisse der Richardsonfärbung

III.4.3.a. Richardsonfärbung der Osteoblasten

Die Schnellfärbung der Osteoblasten mit Methyleneblau-Azur II am siebten Tag nach Versuchsbeginn zeigte Zellen mit einer spindelförmigen bis ovalen Morphologie. Ihre Längsachse erreichte eine Ausdehnung von bis zu 300 µm. Zentral lag jeweils ein, im Verhältnis zur Gesamtgröße der Zelle, großer intensiv blau gefärbter Zellkern. Die Osteoblasten standen über ausgebildete Fortsätze miteinander in einem engen Zell-zu-Zell-Kontakt, sodass ein Bild eines Netzwerkes entstand. Zwischen den Vergleichsgruppen und der Negativkontrolle ohne Zoledronsäure-Zusatz war kaum zu differenzieren. Insgesamt erschien der Ausschnitt der Osteoblastenkultur der über sieben Tage mit einem Nährmedium inkubiert worden war, das eine Konzentration von 1000 nM Zometa[®] enthielt, geringfügig weniger dicht mit Zellen besiedelt als die anderen vier Ausschnitte.

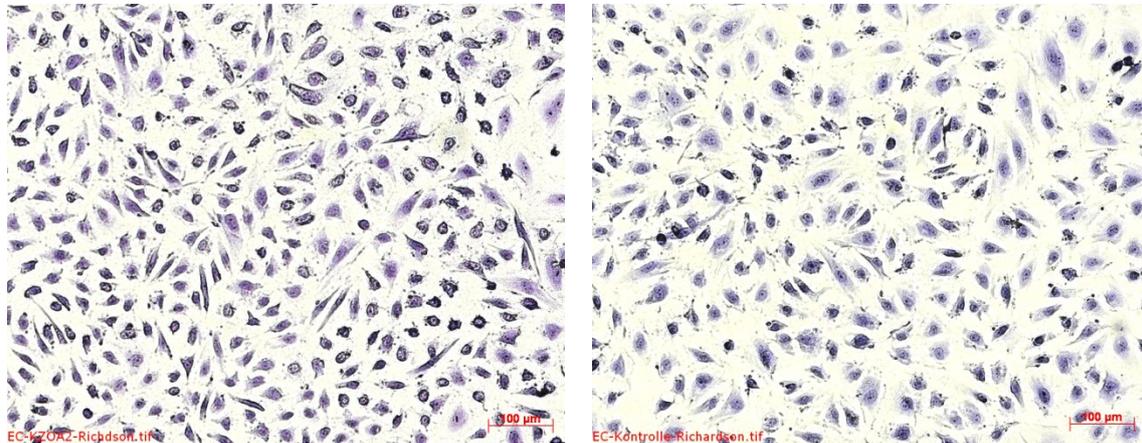


Osteoblasten am Tag 7: Zometa[®]-Konzentration von 0,1 µM (li.), Negativkontrolle (re.)

Abbildung 19:
exemplarische Auswahl aus den Richardson-Färbungen der Osteoblasten

III.4.3.b. Richardsonfärbung der Endothelzellen

In dieser Übersichtsfärbung stellten sich die HUVECs in ihrem typischen Phänotyp, als flache, längliche Zellen dar. Ihre maximale Ausdehnung betrug weniger als 100 µm. Die äußere Begrenzung der Zellen war nach der Färbung kaum auszumachen. Die Zellkerne hingegen waren homogen violett gefärbt. Sie lagen zentral im Cytoplasma der Zellen und enthielten jeweils mehrere dunkel schwarz-violett kolorierte Nucleoli. Zwischen den Zellen lagen am siebten Tag des Beobachtungszeitraumes nicht besiedelte Freiräume. Unterschiede zwischen den vier Vergleichsgruppen und der Kontrolle waren nicht ersichtlich.



Endothelzellen am Tag 7: Zometa®-Konzentration von 1 µM (li.), Negativkontrolle (re.)

Abbildung 20:
exemplarische Auswahl aus den Richardson-Färbungen der Endothelzellen

IV. Diskussion

IV.1. Einordnung der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von Osteoblasten und Endothelzellen unter unterschiedlich hohen Dosen an Zometa® zu untersuchen, um mit den gewonnenen Ergebnissen zur Klärung der unklaren Pathogenese der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose beizutragen.

Die mit Zoledronsäure inkubierten Osteoblasten zeigten im Versuchsverlauf von der Kontrollgruppe abweichende Ergebnisse. Ab Tag 1 zeigte sich im MTT-Assay ein bisphosphonatabhängiger positiver Proliferationseffekt. Eine Dosisabhängigkeit, die das Liniendiagramm aus den Ergebnissen des Cell-Counts (*siehe Abbildung 11 auf Seite 75*) vermuten ließ, ließ sich im Mehrfachvergleich statistisch nicht verifizieren. In der Fotodokumentation zeigten sich die Osteoblasten unter Zoledronat in ihrer Gestalt nach 14 Tagen im Vergleich zur Kontrolle schwach verändert.

Die humanen Endothelzellen hingegen zeigten unter Zoledronat-Gabe von 0,01, 0,1, 1, und 10 µM in allen gewählten Untersuchungsmethoden kein von der Kontrollgruppe abweichendes Verhalten.

IV.2. Studienlage

Auch wenn die Studienlage zum Verhalten von Osteoblasten und Endothelzellen unter Bisphosphonaten nicht so umfangreich ist wie die zu den gut untersuchten Osteoklasten, so liegt inzwischen doch mehr und mehr Literatur dazu vor. Gleiches gilt für den Wirkstoff Zoledronsäure, der erst seit wenigen Jahren als Medikament zur Verfügung steht, im Vergleich zu anderen Bisphosphonaten. Zoledronsäure unterscheidet sich deutlich in ihrer Pharmakokinetik und Potenz von anderen Vertretern ihrer Substanzklasse. Damit sind Ergebnisse, die für andere Bisphosphonate gelten, nicht ohne weiteres auf Zometa® zu übertragen [Russell RG et al., 2008].

IV.2.1. Effekte auf Proliferationsrate und Stoffwechselaktivität

IV.2.1.a. Proliferation und Stoffwechselaktivität der Osteoblasten

Sowohl Bellido und Plotkin, als auch Maruotti et al. haben unabhängig voneinander, jeweils in einer Übersicht Studien zusammengetragen, die adversative Effekte von Bisphosphonaten auf Osteoblasten unterschiedlicher Spezies dokumentieren [Bellido T et al., 2011 und Maruotti N et al., 2012]. Bei verwendeten Konzentrationen zwischen 0,001 und 1 μM wurden den Bisphosphonaten proliferationsfördernde und antiapoptotische Effekte nachgewiesen, bei Dosen $> 10 \mu\text{M}$ hemmende.

Auch Dominguez et al. fassten unterschiedliche Arbeiten in einem Übersichtsartikel zusammen. Ihr Ergebnis war ähnlich. Bisphosphonate in einer Konzentration zwischen 0,00001 und 1 μM wirken auf Osteoblasten proliferations- und differenzierungsfördernd, während Dosen $> 10 \mu\text{M}$ gegenteilige Effekte auslösen [Dominguez LJ et al., 2011].

In zwei von Dominguez et al. nicht berücksichtigten Arbeiten von Walter et al. wurden unter anderem über ein MTT-Assay stoffwechselaktivitäts- und proliferations-inhibierende Effekte für unterschiedliche Bisphosphonate, insbesondere auch für Zoledronat, auf humane Osteoblasten bzw. Präosteoblasten, nach 72 Stunden Inkubation, bereits bei einer Konzentration von 5 μM nachgewiesen [Walter C et al., 2010 und Walter C et al., 2011].

Açil et al. haben humane Osteoblasten aus dem Beckenkamm über 4 Wochen mit Zoledronsäure inkubiert. Sie beschreiben bei einer Konzentration von 5 μM ein Absterben der Zellen, was als Apoptose gewertet werden kann [Açil Y et al., 2012].

Unter einer Zoledronat-Konzentrationsreihe von 0,01, 0,1, 1 und 10 μM untersuchten Orriss et al. die Zellproliferation, alkalische Phosphatase-Aktivität und -Expression, die Kollagen-Produktion sowie die Zellviabilität an Osteoblasten aus dem Schädeldach von Ratten in vitro über 14 Tage [Orriss IR et al., 2009]. Bei Konzentrationen $> 0,1 \mu\text{M}$ stellten sie reduzierte Zellzahlen im Verlauf des Versuches fest. Die Konzentration von 10 μM bezeichnen sie als stark toxisch, da die Osteoblasten unter dieser Dosis

nach zwei Tagen eine dreifach stärkere Abnahme der Zellviabilität und eine 90%ige Abnahme der Zellzahl nach 14 Tagen im Vergleich zu einer Kontrolle zeigten. Zusammenfassend für die anderen Konzentrationen stellen die Autoren fest, dass die chronische Exposition von Zoledronat im nM-Bereich zu einer selektiven Inhibition der Mineralisation in der Knochenformation führt und Konzentrationen $> 1 \mu\text{M}$ die Osteoblastenproliferation, die Kollagenproduktion und die Ablagerung trabekelförmigen Knochens cytotoxisch inhibieren.

Pan et al. sprechen Zoledronsäure bereits bei Konzentrationen $> 0,5 \mu\text{M}$ eine cytostatische bis apoptotische Wirkung auf humane adulte Osteoblasten-ähnliche Zellen zu, obwohl sie auch noch nach drei Tagen Kultivierung bei einer Zoledronat-Konzentration von $5 \mu\text{M}$ Zellteilungen nachwiesen [Pan B et al., 2004].

Mit einer anderen Zielsetzung als diese Arbeit, untersuchten Im et al. die Proliferation und Reifung von Osteoblasten, gewonnen aus humanem Femurknochen, unter Bisphosphonat-Gabe, allerdings nicht von Zometa® [Im GI et al., 2004]. Sie wollten Erkenntnisse dazu gewinnen, wie der lokale osteoklastische Knochenverlust nach einer Implantation im Kieferknochen behandelt werden kann. Dazu strebten sie die orale Gabe von Bisphosphonaten an, denen sie unter Verweis auf andere Autoren anabole Effekte zuschreiben. In einem Cell-Count wiesen sie für Alendronat und Risedronat bis zu einer Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ im Vergleich zur Kontrolle steigende Zellzahlen in einer primären humanen trabeculären Knochenzellkultur und in einer transformierten Osteoblastenzelllinie, der MG-63, nach. Bei $100 \mu\text{M}$ beobachteten sie bei den humanen Osteoblasten-ähnlichen MG-63-Zellen eine Inhibition der Proliferationsrate.

Eine Umkehr von einem auf Osteoblasten proliferationsstimulierenden in einen proliferationshemmenden bis apoptotischen Effekt bei einer Zoledronat-Konzentration zwischen 5 und $10 \mu\text{M}$ kann entgegen der diskutierten Arbeiten in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

Die Beobachtungen von Orriss et al. stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit, die auch für diese als toxisch bezeichnete Kon-

zentration von 10 μM Zoledronat einen proliferationsförmenden Effekt auf Osteoblasten boviner Herkunft nach 14 Tagen nachweist.

Auch die von Pan et al. und Im et al. veröffentlichten, auf Osteoblasten proliferationsinhibierend wirkenden Konzentrationen von Zoledronat sind kleiner als 10 μM und stehen damit im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit.

IV.2.1.b. Proliferation und Stoffwechselaktivität der Endothelzellen

Im Jahre 2002 veröffentlichten Wood et al. eine Arbeit, die als eine der ersten anti-angiogenetische Effekte von Zoledronsäure dokumentierte [Wood J et al., 2002]. Die mit fetalem Kälberserum (FKS), bFGF und VEGF in vitro stimulierten HUVECs wurden konzentrationsabhängig (3-30 μM) durch Zoledronsäure in ihrer Proliferation gehemmt und in ihrer Adhäsion und Migration beeinflusst. Mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von $\text{IC}_{50} = 4,1 \pm 0,6$ bzw. $4,2 \pm 0,4$ μM Zoledronsäure konnte die mit FKS bzw. die mit bFGF stimulierte Proliferation der HUVECs in vitro gehemmt werden. Mit $\text{IC}_{50} = 6,9 \pm 0,4$ μM lag die ermittelte Zometa[®]-Konzentration zur Inhibition der mit VEGF stimulierten Proliferation etwas höher.

Mittels eines TUNEL-Assays konnte selbst bei einer Konzentration von 30 μM Zoledronsäure keine Apoptose der HUVECs nachgewiesen werden.

In einer in vitro-Untersuchung der Proliferation von Endothelzellen verwendeten Michailidou et al. eine Konzentrationsreihe von 1, 10, 25 und 50 μM Zoledronat [Michailidou M et al., 2010]. Also Werte die teils identisch sind mit denen in dieser Arbeit gewählt. Für Zoledronsäure-Konzentrationen von 25 und 50 μM beschreiben Michailidou et al. sinkende Proliferationsraten der untersuchten human dermal microvascular endothelial cells (HuD-MEC). Für die kleineren Konzentrationen ermittelten sie im Vergleich zur Kontrolle identisch hohe Proliferationsraten bzw. leicht hemmende Effekte.

Im Vergleich zu Michailidou et al. veröffentlichten Morgan et al. kontroverse Ergebnisse [Morgan C et al., 2009]. Sie untersuchten HUVECs über acht Tage und simulierten in vitro eine metronomische Therapie. In der täglich geringe Dosen an Ibandronat, wie Zoledronat ein Aminobisphosphonat, als

niedrig dosierte Chemotherapie, verabreicht wurden. In vivo wurden daher die Zellen täglich für eine Stunde dem Wirkstoff in einer Konzentration von 1-10 μM exponiert und anschließend von ihm mittels PBS-Auswaschung getrennt. Während für die Zellen, die täglich eine Stunde mit 1 μM Ibandronat inkubiert worden waren, kein verändertes Zellwachstum nachgewiesen werden konnte, zeigten die HUVECs, die mit 2 μM inkubiert worden waren, eine signifikante Reduktion (48 %) des Zellwachstums. Bei höheren Dosen konnte kein deutlicher Rückgang der Zahlen im Vergleich zu den Werten von 2 μM beobachtet werden. Es stellte sich ein Plateau ein. In weiterführenden Versuchen mit einer kleinschrittiger gewählten Konzentrationsreihe ermittelten Morgan et al., dass ab 1,25 μM im Vergleich zu 1 μM eine signifikante Reduktion der Zellzahlen nachzuweisen ist. Damit wiesen die Autoren für Ibandronat, welches als weniger potent gilt als Zoledronat, eine proliferationsinhibierende Wirkung auf Endothelzellen für eine Konzentration nach, die um mehr als den Faktor 10 niedriger liegt als der von Michailidou et al. ermittelte Wert.

Ziebart et al. beschreiben die durch Bisphosphonate inhibierte Angiogenese als einen Faktor in der Pathogenese der BP-ONJ [Ziebart T et al., 2011]. Experimentell untersuchten sie an HUVECs und endothelialen Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells = EPCs) mittels verschiedener Methoden die Wirkung unterschiedlicher Bisphosphonate (auch für Zoledronat) in den Konzentrationen 0, 5, 50, 100, 200 und 500 μM . Eine Zellzählung der EPCs nach 48 Stunden ergab für > 50 μM Zoledronat im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduzierte Zahlen. Ebenfalls bei > 50 μM Zoledronat wiesen sie für die HUVECs eine reduzierte Zellviabilität und -migration nach. In einem Angiogenese-Assay waren nach 48 Stunden Inkubation bei 50 μM Zoledronat keine Aussprossungen aus den HUVECs festzustellen.

Somit decken sich die Ergebnisse dieser Arbeit, die einen neutralen Effekt von Zoledronat in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1 und 10 μM auf HUVECs dokumentiert, mit anderen Ergebnissen aus der Literatur, auch wenn Morgan et al. bereits bei 1,25 μM proliferationsinhibierende Effekte nachwiesen. Dies allerdings in einem Versuchsaufbau, der von dem hier

gewählten abweicht. Zudem ist ungewiss, wie gut die Ergebnisse von Ibandronat auf Zoledronat übertragbar sind.

IV.2.2. Effekte auf Morphologie und Gestalt der Zellen

IV.2.2.a. Morphologie und Gestalt der Osteoblasten

Walter et al. griffen in ihrer Untersuchung von HUVECs, Fibroblasten und Präosteoblasten auf Bisphosphonat-Gaben auch auf visualisierende Methoden zurück [Walter C et al., 2010]. Allerdings verwendeten sie in diesen Zometa[®] in Konzentrationen von 50 bzw. 100 µM. Eine Vitalfärbung der Präostoblasten ergab nach 72 Stunden Inkubation bei 100 µM eine reduzierte Zelldichte und einen Verlust der charakteristischen Zellmorphologie. Lamellipodien und Filopodien, als typische Zellausläufer, waren nicht zu beobachten. Der zelluläre Phänotyp wirkte atrophiert. Den Umriss der Zellen beschreiben sie als einfache geometrische Formen, wie rundlich, spindelförmig und dreieckig. Dies werten sie als Hinweis auf eine eingeschränkte zelluläre Homöostase.

Açil et al. veröffentlichen Auszüge aus ihrer Fotodokumentation von humanen Osteoblasten, die 2 Wochen lang unter Bisphosphonaten inkubiert worden waren [Açil Y et al., 2012]. Allerdings finden sich nur Aufnahmen von den Zellen, die mit 5 µM Alendronat kultiviert worden sind. Diese zeigen im Vergleich zur Negativkontrolle ein Absterben der Zellen auf. Für die wenigen noch vitalen Zellen konnten sie keine Kollagen-Produktion nachweisen.

Ein veränderter Phänotyp der Osteoblasten, so wie Walter et al. ihn für Zoledronat-Konzentrationen von 100 µM nach 72 Stunden Inkubation beschreiben, konnte in dieser Arbeit für Konzentrationen von 0,01–10 µM nach 14 Tagen beobachtet werden. Ein Absterben der Zellen, so wie Açil et al. ihn bei 5 µM dokumentieren, hingegen nicht.

IV.2.2.b. Morphologie und Gestalt der Endothelzellen

Aufnahmen von HUVECs unter Zoledronat-Gabe, die mit denen in dieser Arbeit vergleichbar sind, liegen nicht vor. Entsprechende Literatur, die die Wirkung von Bisphosphonaten auf Endothelzellen untersucht, nutzt als visuelle Methode oftmals ein Tube-Formation-Assay zur Dokumentation der

Gefäßneubildung (z.B. [Michailidou M et al., 2010 oder Morgan C et al., 2009]). Mit den hier verwendeten Methoden konnte keine Veränderung der Morphologie der Endothelzellen unter 0,01–10 μM Zometa[®] nach sieben Tagen Inkubation nachgewiesen werden.

IV.2.3. Effekte auf die Expression und Synthese von Proteinen

Die Immunfärbung der Osteoblasten und Endothelzellen erfolgte an von diesen Zellen charakteristisch synthetisierten Proteinen.

Der Differenzierungsgrad von Osteoblasten lässt sich an den von der Zelle synthetisierten Proteinen bestimmen. Kollagen Typ I, Osteocalcin und Osteonectin gehören zu den sogenannten Osteoblastenmarkern. Während Kollagen Typ I bereits von jungen Osteoblasten synthetisiert wird, werden Osteocalcin und Osteonectin erst in späteren Reifestadien gebildet und gelten zudem als positive Faktoren der Mineralisation [Aubin JE, 1998]. Die Färbungen an Osteocalcin und Osteonectin fielen, wie *Abbildung 17 auf Seite 85* zeigt sehr schwach aus. Dies ist im Alter der Zellen begründet und entspricht ihrem Reifestadium.

Das Oberflächenprotein CD31 und der vWF sind zwei der bekannten Endothelzellmarker.

Die in dieser Arbeit angewandten Immunhistologien, die auf der Detektion ausgewählter Proteine beruhen, sind sicher nicht geeignet um Expressionsraten exakt zu bestimmen. Dennoch zeigten sie, wenn auch wenig detailliert, dass die sieben Tage lang unter Zometa[®] inkubierten Osteoblasten und Endothelzellen in ihrem Expressionsverhalten keine Veränderungen im Vergleich zur Negativkontrolle aufwiesen.

In der Literatur sind zum Verhalten der Osteoblasten uneinheitliche Beobachtungen beschrieben.

Koch et al. untersuchten die Kollagenexpression von humanen Osteoblasten über 14 Tage bei einer Inkubation von 50 µM Zoledronat [Koch FP et al., 2010]. Sie wiesen am Tag 2 für die behandelten Osteoblasten eine um 330 %, im Vergleich zur Kontrolle, gesteigerte Genexpression nach. Nach zwei Wochen lag dieser Wert um 12 % höher als der der Kontrollgruppe. Aus diesen anabolen Effekten und weiteren gewonnenen Erkenntnissen (keine Erhöhung der Proliferationsrate) schlussfolgern die Autoren, dass eine Aminobisphosphonat-Gabe die Differenzierung der Osteoblasten von einem Proliferationsstadium hin in ein nicht proliferierendes reifes sezernierendes Matrixstadium beschleunigt.

Eine Inhibition der Kollagen-Produktion um ~ 80 bzw. 100% weisen Orriss et al. hingegen nach 7 bzw. 14 Tagen für Osteoblasten nach, die mit $1\text{--}10\ \mu\text{M}$ Zoledronat behandelt worden waren [Orriss IR et al., 2009]. Für Konzentrationen $\leq 100\ \text{nM}$ wurden keine Effekte nachgewiesen.

IV.3. Fehleranalyse der Vorgehensweise

IV.3.1. Isolierung und Kultivierung der Zellen

Sowohl die in den Osteoblasten- als auch die in den Endothelzellkulturen verwendeten Zellen wurden nach bewährten, standardisierten Methoden gewonnen.

IV.3.1.a. Isolierung und Kultivierung der Osteoblasten

Die Osteoblasten-ähnlichen Zellen wurden nach einem von Jones und Byode vorgestellten Protokoll aus bovinem Periost frisch geschlachteter Kälber gewonnen und kultiviert [Jones SJ et al., 1977]. Auch Hartig et al. griffen in ihrer Arbeit auf diese Methoden zurück und beobachteten, dass diese Zellen den ihnen typischen Phänotyp ausbildeten. In immunhistochemischen und biochemischen Untersuchungen zur Darstellung ihrer klassischen Marker wie Osteonectin und Osteocalcin verhielten sich die so gewonnenen Osteoblasten ebenfalls charakteristisch [Hartig M et al., 2000].

In mit dieser Arbeit vergleichbaren Untersuchungen wurde mit Zellen anderer Herkunft gearbeitet. Entweder mit kommerziell erwerblichen humanen Zellen, entnommen aus dem Hüftknochen [Koch FP et al., 2010], oder ohne nähere Angabe der Spenderregion (z.B. [Walter C et al., 2010 und Walter C et al., 2011]). Orriss et al. arbeiteten mit Zellen aus dem Schädeldach von Ratten [Orriss IR et al., 2009].

Beide Vorgehensweisen haben Vor- und Nachteile, die es abzuwägen gilt. Zum einem bleibt die Ungewissheit inwieweit die Ergebnisse aus Kulturen mit Zellen einer anderen Spezies auf den Menschen übertragbar sind. Zum anderen ist es schwierig zu bewerten, ob humanes Spendermaterial im ausreichenden Umfang zu Verfügung steht und ob die Gewinnung dessen ethisch und moralisch zu befürworten ist.

IV.3.1.b. Isolierung und Kultivierung der Endothelzellen

Die Isolierung von HUVECs aus humaner Nabelschnur, wie Jaffe et al. sie vor fast 40 Jahren erstmals publizierten, gilt heute als Standardverfahren [Jaffe EA et al., 1973]. Die gewonnenen Zellen zeichnen ihr geringes Alter und

die damit einhergehende hohe Proliferationsrate aus. Zudem können sie unter Laborbedingungen bis zu fünf Monate für Versuchszwecke eingesetzt werden. Mögliche perinatale Kontaminationen des Gewebes können in der Zellkultur zu Komplikationen führen. Durch die Zugabe von Antibiotika und Antimykotika in das Nährmedium sind diese jedoch beherrschbar. Die Zellen zeigten in der Kultivierung für die Versuche dieser Arbeit eine typische Morphologie wie Jaffe et al. sie auch beschreiben. Sie waren groß und polygonal in ihrer Form. Im Zentrum lag abgrenzbar der Zellkern. Die Zellgrenzen hingegen waren undeutlich. Die gesamte Kultur war homogen und die einzelnen HUVECs lagen eng aneinander.

Endothelzellen weisen in vivo eine große Heterogenität auf [McCarthy SA et al., 1991]. Beispielsweise exprimieren sie je nach Lokalisation im Organismus unterschiedliche Oberflächenantigene [Page C et al., 1992]. Herausgelöst aus ihrem physiologischen Umfeld, mit all seinen Einflüssen (wie z.B. Cytokinen) können die Zellen diese Eigenschaften verlieren [Lacorre DA et al., 2004]. Dies ist bei der Übertragung von Ergebnissen aus HUVEC-Kulturen auf die in vivo-Situation unter anderem zu beachten.

Weiterhin muss bei der Übertragung der Ergebnisse aus dieser in vitro-Arbeit berücksichtigt werden, dass physiologisch im Knochen Endothelzellen und keine HUVECs vorliegen.

Das Arbeiten mit humanen Nabelschnüren mag zwar potenziell ethische Konflikte in sich bergen (*siehe im Anhang, II. Ethikvotum, Seite IX*), umgeht aber zugleich die Problematik der invasiven Gewebeentnahme und der Ungewissheit bei der Übertragbarkeit von Ergebnissen anderer Spezies auf den Menschen. Eine Alternative stellt das Arbeiten mit Zellen tierischer Herkunft oder mit kommerziell erhältlichen HUVEC-Kulturen dar.

IV.3.2. Versuchsdauer

Im Vergleich mit anderen Studien (wie [Walter C et al., 2010 und Walter C et al., 2011]), mit Beobachtungszeiten von 72 Stunden, wurde hier mit 14 Tagen Versuchsdauer das Verhalten der Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg beobachtet. Andere Arbeiten zu diesem Thema basieren hingegen ebenfalls auf Daten die in einer Zeitspanne von zwei Wochen erhoben wurden (z.B. [Orriss IR et al., 2009]).

Die erhobenen Ergebnisse bestätigen die Wahl eines längeren Kultivierungszeitraumes. Sowohl in den Osteoblasten- als auch in den Endothelzellansätzen zeigten Cell-Count und MTT-Assay bis zum achten Versuchstag (bzw. beim Cell-Count der Endothelzellen bis zum sechsten Versuchstag) einen deutlichen Anstieg der Zellzahlen und der Stoffwechselaktivität. Danach flachten die Kurven ab, was allerdings insbesondere auf die konfluente Zellschicht und den Platzmangel in den gewählten Wells zurückzuführen ist. Hätten die Zellen über die zwei Wochen hinaus kultiviert werden sollen, wäre eine Passage oder die Wahl anderer Zellkulturschalen oder -platten, unumgänglich gewesen. Argumente für einen Zeitraum von 14 Tagen finden sich auch in der statistischen Auswertung der Zahlenwerte. Am dritten Versuchstag lassen sich für Osteoblasten und Endothelzellen für Cell-Count und MTT-Assay zusammen 42 signifikante Differenzen zwischen den unterschiedlichen Ansätzen finden. Am Tag 14 wies die Analyse hingegen nur 24 Werte mit $p < 0,05$ auf (*siehe Kapitel III.2. Ergebnisse der MTT-Assays und III.3. Ergebnisse der Cell-Counts ab Seite 67 sowie Anhang, I. Messdaten ab Seite I*). Über einen längeren Zeitraum scheinen sich insbesondere die Differenzen zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen mit unterschiedlich hoher Konzentration an Zometa[®] zu nivellieren. Letztlich zeigte sich, dass die im Versuchsverlauf noch dosisabhängigen hoch signifikanten Unterschiede am Versuchsende nicht mehr nachzuweisen waren. Für Bisphosphonate, mit ihrer extrem langen Halbwertszeit und der damit gegebenen langen Speicherung im Knochen, kann dies unter der nötigen Vorsicht bei der Übertragung von in vitro-Ergebnissen auf in vivo-Verhältnisse, einen Hinweis auf die Bedeutung der vom Patienten eingenommenen Medikamentendosis liefern. Dabei sind allerdings die hier

relativ niedrig gewählten Bisphosphonat-Konzentrationen (*siehe auch IV.3.3. Verwendete Medikamentenkonzentration ab Seite 105*) und die Tatsache, dass Patienten, die an einer BP-ONJ erkranken, oft monate- bis jahrelang ein Bisphosphonat intravenös verabreicht wurde, zu beachten [Bamias A et al., 2005].

IV.3.3. Verwendete Medikamentenkonzentration

Die Wahl einer Medikamentenkonzentration für diese in vitro-Untersuchung, die möglichst gut die Verhältnisse im Knochen bzw. im Weichgewebe eines Patienten während oder nach einer Behandlung mit Zometa® widerspiegelt, scheint besonders relevant für die Übertragbarkeit der Ergebnisse in die in vivo-Situation und damit der Pathogenese der BP-ONJ zu sein. Die Zometa®-Medikation wird zwar nach Erkrankungsbild unterschiedlich hoch gewählt und trägt so zum Risikoprofil der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose bei, eine Einzeldosis liegt in aller Regel jedoch bei 4-5 mg und lediglich das Intervall bis zur erneuten Gabe variiert stark von 1 bis 12 Monaten [Grötz KA et al., 2012].

IV.3.3.a. Medikamentenkonzentration in den Osteoblastenkulturen

Chen und Berenson haben den Plasmagehalt an Zoledronsäure bei Patienten nach einer Infusion mit 4-16 mg Zometa®, verabreicht über einen Zeitraum von 5–15 Minuten, im Verlauf über mehr als einem Monat untersucht [Chen T et al., 2002]. Innerhalb der ersten Stunden nach der Zometa®-Gabe sank, unabhängig von der Art der Verabreichung und der Dosis, die Dichte von Werten um 8.000 ng/ml auf Werte zwischen 1-10 ng/ml, was einer Konzentrationsentwicklung von Zometa® (relative molare Masse 290,1 mol/l [Novatis Pharmaceuticals Australia, 2012]) von 27,6 µM auf Werte zwischen 0,00345 und 0,0345 µM entspricht. Nach einer Woche stabilisierten sich die Plasmakonzentrationen um 0,1 ng/ml (\cong 0,000345 µM). Diese Werte beziehen sich allerdings auf das Blutplasma, nicht auf die Situation im Knochen, in dem sich das auf Hydroxylapatit hoch affine Zoledronat anreichert [Jung A et al., 1973, Lin JH, 1996 und Rogers MJ, 2003]. Bei einer häufig verwendeten Dosierung von 4 mg Zometa® verabreicht über 5 Minuten werden nach Chen et al. bei der ersten Infusion maximale Plasmawerte von $c_{\max} = 401 \pm 118$ ng/ml (\cong 1,38345 µM) erreicht. (Bei folgenden Infusionen bzw. anderen Dosierungen weichen die Werte teils erheblich ab.) Weiterhin geben sie an, dass kurz nach einer Zoledronsäure-Infusion im Knochen Konzentrationen erreicht werden, die um den Faktor

100 höher liegen können als c_{\max} und sich diese Werte über 6 Monate nach der Infusion nur langsam abbauen [Chen T et al., 2002]. Daraus lässt sich folgern, dass im Knochen Zoledronat-Konzentrationen von 138,3 μM unmittelbar nach einer Standardinfusion Zometa[®] erreicht werden. Demnach sind die in dieser Arbeit gewählten Konzentrationen von 0,01, 0,1, 1 und 10 μM Zometa[®] im Nährmedium der Osteoblasten erheblich zu gering gewählt, um eine in vivo-Situation zu simulieren.

Allerdings wiesen Sato et al. bereits 1991 für Alendronat, einem primären Aminobisphosphonat, nach, dass dieses zwar mit einer sehr hohen Dichte an Osteoklastenoberflächen bindet, allerdings nur moderat an Osteoblasten [Sato M et al., 1991].

Otto et al. beschreiben in ihrer Arbeit, in der sie die Effekte von Bisphosphonaten auf mesenchymale Stammzellen bei unterschiedlichen pH-Werten untersuchten, recht exakt und kleinschrittig wie sie die zu verwendende Medikamentenkonzentration ermittelt haben [Otto S et al., 2010a]. Für einen Patienten mit 70 kg Körpergewicht, der die Standarddosis von 4 mg Zoledronat im Rahmen einer onkologischen Therapie alle 4 Wochen erhalten hat, geben sie z.B. eine Zoledronat-Konzentration im Knochen nach einem Monat von 1,05 $\mu\text{M/l}$ an. Nach einem Jahr liegt der theoretische Wert bei 12,61 $\mu\text{M/l}$ und nach zehn Jahren bei 126,1 $\mu\text{M/l}$. Allerdings beachten sie in ihrer Berechnung nicht die Aussage, dass Bisphosphonate im Kieferknochen im Vergleich zu anderen Knochen akkumulieren, da sie diese für spekulativ erachten.

Weiss und Mitarbeiter konnten in einer tierexperimentellen Studie für Novartis an Hunden 96 Stunden nach einer Zoledronat-Gabe, die der Standarddosis von 5 mg beim Menschen entspricht, für die Mandibula eine Zoledronat-Konzentration von 468 pmol/g (\cong 0,000468 $\mu\text{mol/g}$) ermitteln. Diese ist im Vergleich mit der in einem lumbalen Wirbelkörper gemessenen Konzentration von 2358 pmol/g gering [Weiss HM et al., 2008].

Im Knochen von Patienten die hingegen einmal jährlich 5 mg Zoledronat im Rahmen einer Osteoporosetherapie erhalten, werden sicherlich nicht solch

hohe Konzentrationen erreicht (siehe I.2.9. Inzidenz und Prävalenz ab Seite 19).

Genauere klinische Daten darüber wie hoch der Zoledronat-Gehalt im Knochen während oder nach einer intravenösen Zometa[®]-Therapie ist, bzw. genaue Werte aus am BP-ONJ erkrankten Knochen fehlen bislang.

IV.3.3.b. Medikamentenkonzentration in den Endothelzellkulturen

Mit 1-2 μM werden in einem Artikel von Michailidou et al. vergleichbare Werte für die Serumkonzentration von Zoledronsäure 1-2 Stunden nach einer 4 mg-Infusion angegeben [Michailidou M et al., 2010]. Diese Konzentrationsangabe übertragen die Autoren unverändert auf die Situation im Weichgewebe, denn es liegen keine Anhaltspunkte dafür vor, dass sich Bisphosphonate dort anreichern. Vielmehr wurden 24 Stunden nach einer Gabe von 4 mg Zometa[®] innerhalb von 15 Minuten 40 % renal ausgeschieden und im Plasma wurden Werte um 1 ng/ml (\triangleq 0,345 μM) erreicht [Chen T et al., 2002]. Das Konzentrationsspektrum im Nährmedium der Endothelzellen von 0,01 bis 10 μM Zometa[®] umfasst somit den Zustand in vitro.

In ihrer Diskussion merken Wood und Mitarbeiter hingegen an, dass es unwahrscheinlich ist, dass die zu einer Proliferationsinhibition in vitro benötigten Zoledronsäure-Konzentration, wie sie eine in ihrer Arbeit untersucht haben, in vivo kontinuierlich erreicht wird [Wood J et al., 2002]. Denn die Halbwertszeit von Zoledronsäure im Plasma ist kurz und während sie im Knochen akkumuliert, wird das viszerale Gewebe nur gering diesem Wirkstoff exponiert. Nähme der mit Zoledronsäure angereicherte Knochen auf noch ungeklärte Weise über Signalmoleküle oder Vorläuferzellen über das Knochenmark, welches für die Angiogenese im entfernt liegenden Gewebe von Bedeutung ist, Einfluss, so könnte dies den in vivo beobachteten antiangiogenetischen Effekt erklären.

Die identische Auswahl der Zometa[®]-Konzentration für Osteoblasten und Endothelzellen, als Simulation der Situation in Knochen und Weichgewebe,

ist somit hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf die Pathogenese der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose kritisch zu betrachten.

IV.3.4. Auswahl der Untersuchungsmethoden

Zur Untersuchung des in vitro-Verhaltens von Osteoblasten und Endothelzellen auf Zoledronsäure wurden vier unterschiedliche Methoden ausgewählt.

Die Fotodokumentation der verschiedenen Ansätze an sechs Zeitpunkten, die das Verfolgen von Morphologieveränderungen und einen Cell-Count ermöglichte, gab eher eine Orientierung. Eine Fehlerrate beim Auszählen der Zellen, ist sicherlich zu beachten, doch ermöglichen die erhobenen Werte dennoch vergleichende Aussagen zum Zellwachstum. Eine deskriptive Bewertung von Zellmorphologien ist immer weniger exakt als Zahlenwerte und schlechter reproduzierbar oder kalibrierbar. Doch zeigt sie Tendenzen an und ermöglicht zudem das Auffinden von Verunreinigungen oder nekrotischen Bereichen innerhalb einer Zellkultur.

Für die immunhistologischen Färbungen gilt ähnliches wie für die direkte Fotodokumentation der Zellkultur. Kritisch zu bewerten ist sicherlich, inwieweit der Versuch einer Detektion von Osteonectin und insbesondere Osteocalcin an maximal sieben Tage alten Osteoblasten sinnvoll war.

Zur Untermauerung der erhobenen Proliferationsraten anhand des Cell-Counts wurde zeitgleich auch immer ein MTT-Assay durchgeführt. Dieses 1983 von Tim Mosmann vorgestellte Verfahren zur Ermittlung von Cytotoxizität, Proliferation oder Stoffwechselaktivität [Mosmann T, 1983] gilt heute als anerkanntes, häufig eingesetztes Verfahren, das Werte hoher Genauigkeit liefert. Zudem ermöglichten die Extinktionswerte eine statistische Auswertung, im Gegensatz zu den deskriptiven Varianten. Insgesamt zeigten sich die Ergebnisse aus dem MTT-Assay und dem Cell-Count im Vergleich zueinander schlüssig, auch wenn der Cell-Count, bedingt durch seine zugrunde liegende Methodik, weniger präzise war.

Bei allen Untersuchungsmethoden kann grundsätzlich, trotz striktem Einhalten des Versuchsprotokolls, ungenaues Arbeiten während der Zellpassage und Zellkultur, wie verschiedene Pippettiermethoden, unterschiedliche Öffnungsdaten der verwendeten Chemikalien und Lösungen

sowie deren Lagerung, die Umgebungsbedingungen und ähnliches, ungewollt Einfluss auf die Ergebnisse genommen haben.

IV.4. Erklärung der Ergebnisse

Während die Wirkung, die Bisphosphonate auf Osteoklasten nehmen, auf geweblicher, zellulärer und molekularer Ebene mit dem Eingriff in den Mevalonatweg, in dem die Farnesyldiphosphatsynthetase inhibiert wird und so keine Resorptionsmembran (ruffled border) ausgebildet werden kann, gut beschrieben ist, sind die Beobachtungen über das Verhalten von Osteoblasten und Endothelzellen unter Bisphosphonat-Gabe auf molekularer Ebene bislang nur ansatzweise bis nicht verstanden und geklärt.

Den Nachweis, dass Bisphosphonate überhaupt mit Osteoblasten interagieren können lieferten Morelli und Mitarbeiter indem sie Zielorte für Bisphosphonate an Osteoblasten ermitteln konnten [Morelli S et al., 2011]. Lokalisiert sind diese vermutlich an einer oder mehreren Tyrosin-spezifischen Protein-Phosphatasen im Inneren oder an der Oberfläche von Osteoblasten. Die Bindung eines Bisphosphonat-Moleküls bewirkt eine Reduktion der von diesem Enzym katalysierten posttranslationalen Modifikation, bei der Phosphat-Gruppen aus phosphorylierten Tyrosinresten an Proteinen entfernt werden. So nehmen die Bisphosphonate Einfluss auf den Phosphorylierungszustand vieler Signalmoleküle, die bei der Kontrolle des Zellzyklus, des Zellwachstums, der Proliferation, Differenzierung und Transformation von Bedeutung sind [Böhmer F et al., 2012].

Zur Erklärung der anabolen Effekte, die von einer Steigerung der osteoblastären Aktivität ausgehen, auf molekularem Niveau verweisen Im et al. in ihrer Arbeit [Im GI et al., 2004] auf Erklärungsansätze von Giuliani et al. und Mundy et al..

Giuliani und Mitarbeiter [Giuliani N et al., 1998] wiesen nach, dass Bisphosphonate, in Dosen wie sie in vivo Knochenresorption verhindern, in vitro direkt auf Osteoblasten wirken, indem sie die stimulierte Produktion von IL-6 inhibieren. IL-6 wird von Osteoblasten Cytokin-induziert freigesetzt und fördert die Knochenresorption. Für Alendronat wiesen sie weiterhin nach, dass es die bFGF-Produktion in den Osteoblasten steigert und so positiv auf den Knochenumbau wirkt [Giuliani N et al., 1995].

Mundy et al. sahen Parallelen zwischen der durch Statine bewirkten Stimulation der BMP-2-Genexpression und der Wirkung der Bisphosphonate aufgrund des identischen Wirkortes der Medikamente - dem Mevalonatweg [Mundy G et al., 1999]. BMP-2 ist als Wachstumsfaktor insbesondere für die Proliferation und Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzellen von Bedeutung und führt zur Neubildung von Knochengewebe [Wozney JM et al., 1988].

Bisphosphonate, nicht allerdings explizit Zoledronat, wie sie in der Therapie Glukokortikoid-induzierter Osteoporosen eingesetzt werden, inhibieren die Apoptose von Osteoblasten. So publizierten Plotkin und Mitautoren es für Osteoblasten, gewonnen aus murinen Kalotten, für Konzentrationen zwischen 0,0001–1 μM , also für Dosen, die um den Faktor 3 niedriger liegen, als die Konzentrationen, die auf Osteoklasten apototisch wirken. Dieser antiapoptotische Effekt auf die Osteoblasten ist jeweils gekoppelt mit einer Zunahme der Fraktion an extrazellulären Signal-regulierten Kinasen (ERK) die phosphoryliert vorliegen [Plotkin LI et al., 1999].

Somit scheint der Wirkmechanismus der Bisphosphonate auf Osteoblasten, ebenso wie bei den Osteoklasten, ein Eingriff in die posttranslationale Modifikation von Proteinen zu sein, der Konsequenzen auf die Faktoren des Zellstoffwechsels hat.

IV.5. Schlussfolgerung

Bisphosphonate, insbesondere die der dritten Generation (wie z.B. Zometa®), werden in den letzten Jahren zunehmend zur Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen eingesetzt [Schwabe U et al., 2011]. Im Jahre 2003 führte Marx eine Form der Kieferosteonekrose auf die Einnahme von Medikamenten dieser Wirkstoffgruppe zurück. Bisphosphonate nehmen Einfluss auf Osteoklasten und können so antiresorptiv wirken. Dieser Einfluss erfolgt direkt, aber auch indirekt über Vorläuferzellen sowie Mediatoren und Faktoren, so wie es Marx es bereits bei seiner Erstbeschreibung annahm. Dabei betonte er das Vorliegen einer multifaktoriellen Ätiologie [Marx RE, 2003]. Weitere Studien zeigten wie Walter et al. es beschreiben, dass sogar von einer multizellulären, multifaktoriellen Ätiologie auszugehen ist [Walter C et al., 2010].

Neben den seit langem bekannten und sehr wahrscheinlich auch dominierenden Effekten von Bisphosphonaten auf Osteoklasten (z.B. [Marx RE, 2003]), können auch Osteoblasten (z.B. [Maruotti N et al., 2012]), Endothelzellen (z.B. [Wood J et al., 2002]), Keratinozyten (z.B. [Pabst AM et al., 2012]), Epithelzellen, Fibroblasten (z.B. [Ravosa MJ et al., 2011]), Neutrophile [Kuiper JW et al., 2012], Makrophagen [Pazianas M, 2011] und mesenchymale Stammzellen [Otto S et al., 2010a] ein verändertes Verhalten unter Bisphosphonat-Gabe zeigen und so, neben der gewünschten therapeutischen antiresorptiven Wirkung, auch als ungewünschte Nebenwirkung mit zur Entwicklung einer Osteonekrose beitragen. Wobei die Homöostase zwischen Osteoklasten, Osteoblasten und den Zellen des benachbarten Gewebes mit all den zugehörigen Mediatoren und Wachstumsfaktoren beeinträchtigt wird.

Pathohistologisch zeigt sich in vielen Fällen eine reduzierte Dichte an Blutgefäßen in entnommenen Knochenproben. Gelegentlich sind sogar avaskuläre Nekrosen zu diagnostizieren [Ziebart T et al., 2011]. Sowohl über klinische als auch über andere in vitro-Studien sind antiangiogenetische Wirkungen der Bisphosphonate nachgewiesen worden [Wood J et al., 2002]. Im Kieferknochen liegt die remodeling-Rate um den Faktor 3-6 höher als in

anderen Regionen des Skeletts [Huja SS et al., 2006]. Somit akkumulieren Bisphosphonate dort besonders stark und behindern beim Knochenumbau bzw. bei der Knochenformation nach Traumen, wie z.B. einer Zahnextraktion, die als Risikofaktor in vielen Genesen einer BP-ONJ zu Beginn der klinischen Symptomatik steht [Vescovi P et al., 2012], die Vaskularisation des Knochens und damit dessen Versorgung und Regeneration.

Anders als es viele bisherige Studien nachweisen, kann diese Arbeit keine inhibierende bis toxische Wirkung der Bisphosphonate auf die HUVECs nachweisen. Wohl aber eine proliferierende Wirkung von Zoledronsäure auf Osteoblasten. Eine direkte Übertragung dieser Beobachtungen auf die klinische Situation der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose ist sicherlich unzulässig. Aber doch kann diese Arbeit zeigen, dass bei der Genese dieser Nebenwirkung einer Bisphosphonat-Medikation neben Osteoklasten und Endothelzellen auch Osteoblasten involviert sind.

IV.6. Ausblick und weitere Versuchsansätze

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zum Verhalten von Osteoblasten und Endothelzellen unter einer Zoledronsäure-Konzentration zwischen 0,01 und 10 μM erlauben es nicht eine neue Hypothese zur Ätiologie der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose zu formulieren. Doch mit Hilfe weiterführender Studien könnten dazu weitere Beiträge gesammelt werden:

Von großer Brisanz ist dafür zunächst die Ermittlung von realistischen klinischen Werten des Zoledronat-Gehaltes im Kieferknochen und Weichgewebe bei Patienten, die eine BP-ONJ entwickelt haben und die Information, in welchen Dosen und welchen Intervallen der Wirkstoff verabreicht wurde. Dieses Wissen ist grundlegend für eine Übertragbarkeit der in vitro-Ergebnisse auf die in vivo-Situation. Das gilt umso mehr, da besonders die Osteoblasten konzentrationsabhängig von Zoledronat stimuliert oder inhibiert werden können, ihre Affinität zu Bisphosphonaten aber eine andere zu sein scheint, als die im Mittelpunkt bisheriger Untersuchungen stehender Osteoklasten. Mit diesen exakten Konzentrationen sind Morphologieveränderungen, Stoffwechselaktivität und Proliferationsraten erneut isoliert für Osteoblasten und Endothelzellen über einen Zeitraum von 14 Tagen, bei ansonsten im Vergleich zu dieser Arbeit unveränderten Versuchsbedingungen, zu bestimmen.

Eine Osteoblasten-Endothelzellen-Kokultur als dreidimensionales in vitro-Modell gäbe die Möglichkeit, das Wachstum beider Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft parallel zu untersuchen. Auch Kombinationen mit Osteoklasten sind denkbar und im weiteren Verlauf wünschenswert. Die Interaktion der Zellen erhalte dabei mehr Beachtung. Wie relevant diese ist, zeigt auch der Wirkmechanismus der Bisphosphonate auf die Osteoblasten (*siehe auch IV.4. Erklärung der Ergebnisse ab Seite 111*).

Andere Methoden zur Untersuchung der Zellen unter Zoledronsäure-Exposition sind denkbar. So könnte beispielsweise über ein Scratch-Assay die Wundheilung, bzw. Knochenformation nach Traumen simuliert werden, die bei vielen Patienten nach Bisphosphonat-Therapie gestört verläuft und

oftmals Ausgangspunkt der klinischen Manifestation der BP-ONJ ist [Rizzoli R et al., 2008 und Reid IR et al., 2007].

Auch wenn Zometa[®] das Medikament ist, nach dessen Applikation die meisten Osteonekrosefälle dokumentiert sind, so sind auch Versuche mit anderen Vertretern der Bisphosphonat-Stoffgruppe anzustreben.

Die in vitro gewonnenen Einsichten zum Verhalten unterschiedlicher Zellen unter Zoledronsäure-Gabe sollen schließlich dazu führen, den Pathomechanismus, der zur Osteonekrose im Kiefer führt, zu verstehen und damit diese schwerwiegende Nebenwirkung, der in anderen Gebieten der Medizin so segensreichen und unverzichtbaren Bisphosphonate, beherrschbar und therapierbar zu machen. Der sicherste Weg zur Verhinderung von weiteren Patientenfällen, also der Verzicht auf hochpotente Aminobisphosphonate, ist unrealistisch und unverhältnismäßig, da sie doch in anderen Körperregionen lebensrettend sein können. Umso bedeutsamer ist es die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen, um, wenn schon nicht ursächliche, dann aber doch effiziente Therapieoptionen zu entwickeln. Es ist zu hoffen, dass damit später hilflose nichtinvasive Therapieversuche, aber auch massives bis entstellendes chirurgisches Vorgehen immer seltener indiziert sein werden.

Bis dahin ist die Aufgabe der Prävention und Aufklärung durch Ärzte und Zahnärzte im Vorfeld einer Bisphosphonat-Therapie und währenddessen durch nichts zu ersetzen.

Literaturverzeichnis

[Abrahamsen B et al., 2012] Abrahamsen B, Einhorn TA (2012) Beyond a reasonable doubt? Bisphosphonates and atypical femur fractures. *Bone* 50(5):1196-200 [Epub ahead of print]

[Abu-Id MH et al., 2006] Abu-Id MH, Açil Y, Gottschalk J, Kreuzsch T (2006) Bisphosphonatassoziierte Osteonekrose des Kiefers. *Mund Kiefer Gesichtschir* 10(2):73-81

[Abu-Id MH et al., 2007] Abu-Id MH, Warnke PH, Wiltfang J, Kreuzsch T (2007) Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw (ONJ): staging and surgical therapy. *Int J Oral & Maxillofac Surg* (36)11:1043

[Açil Y et al., 2012] Açil Y, Möller B, Niehoff P, Rachko R, Gassling V, Wiltfang J, Simon MJ (2012) The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Craniomaxillofac Surg* 40(8):e229-35 [Epub ahead of print]

[Adami S et al., 1996] Adami S, Zamberlan N (1996) Adverse effects of bisphosphonates. A comparative review. *Drug Saf* 14(3):158-170

[Aghaloo TL et al., 2011] Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, Bezouglaia O, Dry SM, Tradis S (2011) Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *Jornal of Bone and Mineral Research* 26:1871-1882

[Agrilli A, 2012] Agrilli A (2012) Conservative Treatment: Oxygen-Ozone Therapy. In: De Ponte FS (Hrsg.) *Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw*. Springer-Verlag, Italien, 1. Aufl., S. 121-125

[Allen MR et al., 2009] Allen MR, Burr DB (2009) The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg* 67(5):61-70

[Al-Nawas B et al., 2007] Al-Nawas B, Grötz KA, Piesold JU, für die Leitliniengruppe "Septische Chirurgie", DGMKG (2007) S1-Leitlinie Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose. www.awmf.org (Zugriff am: 17. März 2012)

[Amler MH, 1999] Amler MH (1999) Disturbed healing of extraction wounds. *J Oral Implantol* 25(3):179-184

[Aubin JE, 1998] Aubin JE (1998) Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* 76(6):899-910

[Bamias A et al., 2005] Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, Koutsoukos V, Gika D, Anagnostopoulos A, Papadimitriou C, Trepos E, Dimopoulos MA (2005) Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 23:8580-8587

[Bartkowski SB et al., 1994] Bartkowski SB, Heczko PB, Lisiewicz J, Dorozynki J, Kurek M, Kusiderski J, Kasprzyk J (1994) Combined treatment with antibiotic, heparin and streptokinase - a new approach to the therapy of bacterial osteomyelitis. *J Craniomaxillofac Surg* 22:167-176

[Bartl R et al., 2006] Bartl R, von Treschow E, Bartl C (2006) Bisphosphonat-Manual Wirkungen, Indikationen, Strategien. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1. Aufl., S. 9-27, S. 41-93 und S. 251-264

[Bassett CA et al., 1969] Bassett CA, Donath A, Macagno F, Preisig R, Fleisch H (1969) Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans. *Lancet* 2(7625):845

[Bellido T et al., 2011] Bellido T, Plotkin LI (2011) Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone* 49(1):50-55

[Berglundh T et al., 2003] Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res* 14(3):251-262

[Bundesinstitut für Arzneimittel u. Medizinprodukte, 2011] Bundesinstitut für Arzneimittel u. Medizinprodukte (2011) Bisphosphonathaltige Arzneimittel (Alendronat, Clodronat, Etidronat, Ibandronat, Neridronat, Pamidronat, Risedronat, Tiludronat, Zoledronat): Risiko für atypische Stressfrakturen. <http://www.bfarm.de/DE/Pharmakovigilanz/stufenplanverf/Liste/stp-bisphosphonate-stressfrakturen.html> (Zugriff am: 7. März 2012)

[Blomen L, 1995] Blomen L (1995) History of bisphosphonates: discovery and history of the non-medical uses of bisphosphonates. In: Bijvoet O, Fleisch H, Canfield R, Russell R (Hrsg.) *Bisphosphonate on bones*. Elsevier, Amsterdam, S. 111-124. Zitiert nach Bartl R, von Treschow E, Bartl C (2006) *Bisphosphonat-Manual Wirkungen, Indikationen, Strategien*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1. Aufl., S. 43

[Böhmer F et al., 2012] Böhmer F, Szedlacsek S, Taberner L, Ostman A, den Hertog J (2012) Protein-tyrosine phosphatase structure-function relationships in regulation and pathogenesis. *FEBS J* 280(2):314-31 [Epub ahead of print]

[Breithaupt-Faloppa AC et al., 2008] Breithaupt-Faloppa AC, de Lima WT, Oliveira-Filho RM, Kleinheinz J (2008) In vitro behaviour of endothelial cells on a titanium surface. *Head Face Med* 4:14

[Brighton CT et al., 1992] Brighton CT, Lorch DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA (1992) The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res* 275:287-299

[Brown JE et al., 2004] Brown JE, Neville-Webbe H, Coleman RE (2004) The role of bisphosphonates in breast and prostate cancers. *Endocr Relat Cancer* 11(2):207-224

[Cackowski FC et al., 2010] Cackowski FC, Anderson JL, Patrene KD, Choksi RJ, Shapiro SD, Windle JJ, Blair HC, Roodman GD (2010) Osteoclasts are important for bone angiogenesis. *Blood* 115(1):140-149

[Cardaropoli G et al., 2003] Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J (2003) Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 30(9):809-818

[Carlson ER et al., 2009] Carlson ER, Basile JD (2009) The role of surgical resection in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 67: 85-95

[Carter G et al., 2005] Carter G, Gross AN, Doeckel C (2005) Bisphosphonates and avascular necrosis of the jaws: A possible association. *Med J Aust* 182:413-415

[Catalfamo L et al., 2012] Catalfamo L, Nava C, Lombardo G, De Ponte FS (2012) Major Surgery in BIONJ. In: De Ponte FS (Hrsg.) *Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw*. Springer-Verlag, Italien, 1. Aufl., S. 157-166

[Chen T et al., 2002] Chen T, Berenson J, Vescio R, Swift R, Gilchick A, Goodin S, LoRusso P, Ma P, Ravera C, Deckert F, Schran H, Seaman J, Skerjanec A (2002) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol* 42(11):1228-1236

[Croucher PI et al., 2003] Croucher PI, De Hendrik R, Perry MJ, Hijzen A, Shipman CM, Lippitt J, Green J, Van Marck E, Van Camp B, Vanderkerken K (2003) Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. *J Bone Miner Res* 18(3):482-492

[David P et al., 1996] David P, Nguyen H, Barbier A, Baron R (1996) The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. *J Bone Miner Res* 11(10):1498-1507

- [Deetjen P et al., 2005]** Deetjen P, Speckmann E-J, Hescheler J (2005) Physiologie. Urban und Fischer, München, 4. Aufl., S. 190-196
- [Dimopoulos MA et al., 2006]** Dimopoulos MA, Katritis E, Anagnostopoulos A, Melakopoulos I, Gika D, Mouloupoulos LA, Bamia C, Terpos E, Tsionos K, Bamias A (2006) Osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma treated with bisphosphonates: evidence of increased risk after treatment with zoledronic acid. *Haematologica* 91:968-971
- [Dodson TB , 2009]** Dodson TB (2009) Intravenous Bisphosphonate Therapy and Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *J Oral Maxillofac Surg* 67(1):44-52
- [Dominguez LJ et al., 2011]** Dominguez LJ, Di Bella G, Belvedere M, Barbagallo M (2011) Physiology of the aging bone and mechanisms of action of bisphosphonates. *Biogerontology* 12(5):397-408
- [Endo N et al., 1996]** Endo N, Rutledge SJ, Opas EE, Vogel R, Rodan GA, Schmidt A (1996) Human protein tyrosine phosphatase-sigma: alternative splicing and inhibition by bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 11(4):535-543
- [Eriksen EF et al., 2002]** Eriksen EF, Melsen F, Sod E, Barton I, Chines A (2002) Effects of long-term risedronate on bone quality and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis. *Bone* 31(5):620-625
- [Fast DK et al., 1978]** Fast DK, Felix R, Dowse C, Neuman WF, Fleisch H (1978) The effects of diphosphonates on the growth and glycolysis of connective-tissue cells in culture. *Biochem J* 172(1):97-107
- [Felix R et al., 1984]** Felix R, Guenther HL, Fleisch H (1984) The subcellular distribution of [¹⁴C]dichloromethylenebisphosphonate and [¹⁴C]1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate in cultured calvaria cells. *Calcif Tissue Int* 36(1):108-113
- [Fleisch H et al., 1966]** Fleisch H, Russell RG, Straumann F (1966) Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 212(5065):901-903
- [Fleisch H et al., 1969]** Fleisch H, Russell RG, Francis MD (1969) Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 165(3899):1262-1264
- [Fleisch H, 2000]** Fleisch H (2000) Bisphosphonates in Bone Disease: Form the Laboratory to the Patient. Academic Press, San Diego London, 4. Aufl., S. 1-15
- [Fleisch H, 2002]** Fleisch H (2002) Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 4(1):30-34

[Flockerzi V, 2009] Flockerzi V (2009) Calciumstoffwechsel. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB und Starke K (Hrsg.) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag, München, 10. Aufl., S. 737

[Folkman J et al., 1987] Folkman J, Klagsbrun M (1987) Angiogenic factors. *Science* 235(4787):442-447

[Fournier P et al., 2002] Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, Clézardin P (2002) Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 62(22):6538-6544

[Francis MD et al., 1969] Francis MD, Russell RG, Fleisch H (1969) Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science* 165(3899):1264-1266

[Ghoneima AA et al., 2010] Ghoneima AA, Allam ES, Zunt SL, Windsor LJ (2010) Bisphosphonates treatment and orthodontic considerations. *Orthod Craniofac Res* 13:1-10

[Giuliani N et al., 1995] Giuliani N, Girasole G, Pedrazzoni M, Passeri G, Gatti C, Passeri M (1995) Alendronate stimulates bFGF production and mineralized nodule formation in human osteoblastic cells and osteoclastogenesis in human bone-marrow cultures. *J Bone Miner Res* 10:S171

[Giuliani N et al., 1998] Giuliani N, Pedrazzoni M, Passeri G, Girasole G (1998) Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol* 27(1):38-41

[Grötz KA et al., 2006a] Grötz KA, Kreuzsch T (2006) Gemeinsame Stellungnahme der DGZMK, der AG Kieferchirurgie und der DGMKG: Zahnärztliche Betreuung von Patienten unter/nach Bisphosphonat-Medikation. www.dgzmk.de (Zugriff am 7. März 2012)

[Grötz KA et al., 2006] Grötz KA, Al-Nawas B (2006) Persisting alveolar sockets - a radiologic symptom of BP-ONJ?. *J Oral Maxillofac Surg* 64:1571-1572

[Grötz KA et al., 2012] Grötz KA, Piesold J-U, Al-Nawas B (2012) Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose (BP-ONJ) und andere Medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen. AWMF online, www.awmf.org (Zugriff am: 21. Juli 2012) 3S-Leitlinie

[Gruber R, 2011] Gruber R (2011) Nekrosen im Kieferbereich. *J Klin Endokrinol Stoffw* 1:8-12

[Guise TA et al., 1998] Guise TA, Mundy GR (1998) Cancer and bone. *Endocr Rev* 19(1):18-54

[Hansen MB et al., 1989] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119(2):203-210

[Hansen T et al., 2007] Hansen T, Kunkel M, Springer E, Walter C, Weber A, Siegel E, Kirkpatrick CJ (2007) Actinomycosis of the jaws - histopathological study of 45 patients shows significant involvement in bisphosphonate-associated osteonecrosis and infected osteoradionecrosis. *Virchows Arch* 451(6):1009-1017

[Hartig M et al., 2000] Hartig M, Joos U, Wiesmann HP (2000) Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro. *Eur Biophys J* 29(7):499-506

[Hauschka PV et al., 1986] Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrati MD, Doleman SE, Klagsbrun M (1986) Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem* 261(27):12665-12674

[Hauser K, 2006] Hauser K (2006) Aufbau biologischer Membranen. In: Bob A und Bob K (Hrsg.) *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 1. Aufl., S. 341

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

[Hollinger J et al., 1996] Hollinger J, Leong K (1996) Poly(α -hydroxy acids): carriers for bone morphogenetic proteins. *Biomaterials* 17(2):187-194

[Hollinger J et al., 1996a] Hollinger J, Wong ME (1996) The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 82(6):594-606

[Hsiao FY et al., 2011] Hsiao FY, Huang WF, Chen YM, Wen YW, Kao YH, Chen LK, Tsai YW (2011) Hip and subtrochanteric or diaphyseal femoral fractures in alendronate users: a 10-year, nationwide retrospective cohort study in Taiwanese women. *Clin Ther* 33(11):1659-1667

[Hughes DE et al., 1989] Hughes DE, MacDonald BR, Russell RG, Gowen M (1989) Inhibition of osteoclast-like cell-formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest* 83:1930-1935

[Hughes DE et al., 1995] Hughes DE, Wright KR, Uy HL, et al. (1995) Bisphosphonates promotes apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 10:1478-1487

[Huja SS et al., 2006] Huja SS, Fernandez SA, Hill KJ, Li Y (2006) Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288(12):1243-1249

[Hunter J, 1794] Hunter J (1794) *A Treatise on the Blood, Inflammation and Gun-shot Wounds*. London, veröffentlicht 2007 in *Clin Orthop Relat Res* 458:27-34

[Im GI et al., 2004] Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS (2004) Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 25(18):4105-4115

[Jaffe EA et al., 1973] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52(11):2745-2756

[Jones SJ et al., 1977] Jones SJ, Boyde A (1977) The migration of osteoblasts. *Cell Tissue Res* 184(2):179-193

[Jung A et al., 1973] Jung A, Bisaz S, Fleisch H (1973) The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calcif Tissue Res* 11(4):269-280

[Khan AA et al., 2009] Khan AA, Sándor GK, Dore E, Morrison AD, Alsahli M, Amin F, Peters E, Hanley DA, Chaudry SR, Lentle B, Dempster DW, Glorieux FH, Neville AJ, Talwar RM, Clokie CM, Mardini MA, Paul T, Khosla S, Josse RG, Sutherland S, Lam DK, Carmichael RP, Blanas N (2009) Bisphosphonate associates osteonecrosis of the jaw. *J Rheumatol* 36(3):478-490

[Kimmel DB, 2007] Kimmel DB (2007) Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Dent Res* 86(11):1022-1033

[Kingsmill VJ, 1999] Kingsmill VJ (1999) Post-extraction remodeling of the adult mandible. *Crit Rev Oral Biol Med* 10(3):384-404

[Koch FP et al., 2010] Koch FP, Yekta SS, Merkel C, Ziebart T, Smeets R (2010) The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and Collagen gene expression in vitro. *Head Face Med* 6:12

[Körber KH et al., 1983] Körber KH, Ludwig P (1983) Maximale Kaukraft als Berechnungsfaktor zahntechnischer Rekonstruktionen. Dent Lab, 31:55-60, In: Eichner E und Kappert HF (Hrsg.) Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, Bd 1, 8. Aufl., S. 360

[Kübler NR, 1997] Kübler NR (1997) Osteoinduktion und -reparation. Mund Kiefer Gesichtschir 1:2-25

[Kuiper JW et al., 2012] Kuiper JW, Forster C, Sun C, Peel S, Glogauer M (2012) Zoledronate and pamidronate depress neutrophil functions and survival in mice. Br J Pharmacol 165(2):532-539

[Kyrgidis A et al., 2011] Kyrgidis A, Toulis KA (2011) Denosumab-related osteonecrosis of the jaws. Osteoporos Int 22(1):369-370

[Lacorre DA et al., 2004] Lacorre DA, Baekkevold ES, Garrido I, Brandtzaeg P, Haraldsen G, Amalric F, Girard JP, Haraldsen G, Amalric F, Girard JP. (2004) Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. Blood 103(11):4164-4172

[Lazarovici TS et al., 2009] Lazarovici TS, Yahalom R, Taicher S, Elad S, Hardan I, Yarom N (2009) Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a single-center study of 101 patients. J Oral Maxillofac Surg 67(4):850-855

[Leuci S et al., 2012] Leuci S, Friscia M, Mignogna MD (2012) Microbiological Aspects of the Osteonecrosis of the Jaw. In: De Ponte HS (Hrsg.) Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw. Springer-Verlag, Italien, 1. Aufl., S. 97-103

[Li YY et al., 2011] Li YY, Chang JW, Liu YC, Wang CH, Chang HJ, Tsai MC, Su SP, Yeh KY (2011) Zoledronic acid induces cell-cycle prolongation in murine lung cancer cells by perturbing cyclin and Ras expression. Anticancer Drugs 22(1):89-98

[Lin JH, 1996] Lin JH (1996) Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. Bone 18(2):75-85

[Malmgren B et al., 2008] Malmgren B, Aström E, Söderhäll S (2008) No osteonecrosis in jaws of young patients with osteogenesis imperfecta treated with bisphosphonates. J Oral Pathol Med 37(4):196-200

[Marchetti C et al., 2012] Marchetti C, Pelliccioni GA, Moretti F, De Ponte FS, Lombardo G, Nava C (2012) Minimally Invasive Surgical Treatment. In: De Ponte FS (Hrsg.) Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw. Springer-Verlag, Italien, 1. Aufl., S. 141-156

[Marin V et al., 2001] Marin V, Kaplanski G, Grès S, Farnarier C, Bongran P (2001) Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods* 254(1-2):183-190

[Maruotti N et al., 2012] Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP (2012) Bisphosphonates: effects on osteoblast. *Eur J Clin Pharmacol* 68(7):1013-1018

[Marx RE et al., 1987] Marx RE, Johnson RP (1987) Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 64(4):379-390

[Marx RE, 2003] Marx RE (2003) Pamidronate (Adredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61(9):1115-1118

[Marx RE et al., 2007] Marx RE, Cillo JE jr, Ulloa JJ (2007) Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 65(12):2397-2410

[Marx RE, 2012] Marx RE (2012) Introduction. In: De Ponte FS (Hrsg.) *Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw*. Springer-Verlag, Italien, 1. Aufl., S. 1-11

[Mazziotti S et al., 2012] Mazziotti S, Mileto A, Gaeta M, Ascenti G, Salamone I, Visalli C, Blandino A (2012) Instrumental Diagnosis. In: De Ponte FS (Hrsg.) *Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw*. Springer-Verlag, Italien, 1. Aufl., S. 85-95

[McCarthy SA et al., 1991] McCarthy SA, Kuzu I, Gatte KC, Bicknell R (1991) Heterogeneity of the endothelial cell and its role in organ preference of tumour metastasis. *Trends Pharmacol Sci* 12(12):462-467

[McDonald MM et al., 2008] McDonald MM, Dulai S, Godfrey C, Amanat N, Szynda T, Little DG (2008) Bolus or weekly zoledronic acid administration does not delay endochondral fracture repair but weekly dosing enhances delays in hard callus remodeling. *Bone* 43(4):653-662

[Melo MD et al., 2005] Melo MD, Obeid G (2005) Osteonecrosis of the maxilla in a patient with a history of bisphosphonate therapy. *J Can Dent Assoc* 71:111-113

[Menschutkin N, 1865] Menschutkin N (1865) Über die Einwirkung des Chlorazetyls auf phosphorige Säure. *Ann Chem Pharm* 133:317-320

[Michailidou M et al., 2010] Michailidou M, Brown HK, Lefley DV, Evans A, Cross SS, Coleman RE, Brown NJ, Holen I (2010) Microvascular

endothelial cell responses in vitro and in vivo: modulation by zoledronic acid and paclitaxel?. J Vasc Res 47(6):481-493

[Morelli S et al., 2011] Morelli S, Bilbao PS, Katz S, Lezcano V, Roldán E, Boland R, Santillan G (2011) Potein phosphatases: possible bisphosphonate binding sites mediating stimulation of osteoblast proliferation. Arch Biochem Biophys 507(2):248-253

[Morgan C et al., 2009] Morgan C, Jeremiah S, Wagstaff J (2009) Metronomic administration of ibandronate and its anti-angiogenic effects in vitro. Microvasc Res 78(3):453-458

[Mosmann T, 1983] Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65(1-2):55-63

[Mulisch M et al., 2010] Mulisch M, Welsch U (Hrsg.) (2010) Romeis; Mikroskopische Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 18. Aufl., Immunlokalisation, S. 387-417

[Mundy GR et al., 1995] Mundy GR, Boyce B, Hughes D, Wright K, Bonewald L, Dallas S, Harris S, Ghosh-Choudhury N, Chen D, Dunstan C et al. (1995) The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. Bone 17(2):71S-75S

[Mundy G et al., 1999] Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G (1999) Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. Science 286(5446):1946-1949

[Murakami H et al., 1995] Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A, Suda T (1995) A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. Bone 17(2):137-144

[Novatis Pharmaceuticals Australia, 2012] Novatis Pharmaceuticals Australia (2012) Product Information (PI) for Novartis Pharmaceuticals products: Zometa® (Zoledronic acid). <http://www.novartis.com.au> (Zugriff am: 17. März 2012)

[Orriss IR et al., 2009] Orriss IR, Key ML, Colston KW, Arnett TR (2009) Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. 106(1):109-118

[Oteri G, 2012] Oteri G (2012) Prevention an the Role of the Dentist. In: De Ponte FS (Hrsg.) Bisphosphonate and Osteonecrosis of the Jaw. Springer-Verlag, Italien, 1. Aufl., S. 105-120

[Otto S et al., 2009] Otto S, Hafner S, Grötz KA (2009) The role of inferior alveolar nerve involvement in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Maxillofac Surg* 67:589-592

[Otto S et al., 2010] Otto S, Hafner S, Mast G, Tischer T, Volkmer E, Schieker M, Stürzenbaum SR, von Tresckow E, Kolk A, Ehrenfeld M, Pautke C (2010) Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: is pH the missing part in the pathogenesis puzzle?. *J Oral Maxillofac Surg* 68(5):1158-1161

[Otto S et al., 2010a] Otto S, Pautke C, Opelz C, Westphal I, Drosse I, Schwager J, Bauss F, Ehrenfeld M, Schieker M (2010) Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration, and acidic milieu on the pathomechanism. *J Oral Maxillofac Surg* 68(11):2837-2845

[Otto S et al., 2012] Otto S, Schreyer C, Hafner S, Mast G, Ehrenfeld M, Stürzenbaum S, Pautke C (2012) Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - Characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Craniomaxillofac Surg* 40(4):303-9
[Epub ahead of print]

[Pabst AM et al., 2012] Pabst AM, Ziebart T, Koch FP, Taylor KY, Al-Nawas B, Walter C (2012) The influence of bisphosphonates on viability, migration, and apoptosis of human oral keratinocytes - in vitro study. *Clin Oral Investig* 16(1):87-93

[Page C et al., 1992] Page C, Rose M, Yacoub M, Pigott R (1992) Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am J Pathol* 141(3):673-683

[Pan B et al., 2004] Pan B, To LB, Farrugia AN, Findlay DM, Green J, Gronthos S, Evdokiou A, Lynch K, Atkins GJ, Zannettino AC (2004) The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro. *Bone* 34(1):112-123

[Pazianas M et al., 2010] Pazianas M, Compston J, Huang CL (2010) Atrial fibrillation and bisphosphonate therapy. *J Bone Miner Res* 25(1):2-10

[Pazianas M, 2011] Pazianas M (2011) Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages. *J Natl Cancer Inst* 103(3):232-240

[Pelorgeas S et al., 1992] Pelorgeas S, Martin JB, Satre M (1992) Cytotoxicity of dichloromethane diphosphonate and of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonate in the amoebae of the slime mould *Dictyostelium discoideum*. A ³¹P NMR study. *Biochem Pharmacol* 44(11):2157-2163

[Plotkin LI et al., 1999] Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T (1999) Prevention of osteocyte and osteoblast

apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104(10):1363-1374

[Purcell PM et al., 2005] Purcell PM, Boyd IW (2005) Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *Med J Aust* 182:417-418

[Ravosa MJ et al., 2011] Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS (2011) Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Arch Oral Biol* 56(5):491-498

[Reddi AH, 1994] Reddi AH (1994) Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 4(5):737-744

[Reid IR et al., 2007] Reid IR, Bolland MJ, Grey AB (2007) Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity?. *Bone* 41(3):318-320

[Richardson KC et al., 1960] Richardson KC, Jarett L, Finke EH (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 35:313-323

[Risau W et al., 1995] Risau W, Flamme I (1995) Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73-91

[Rizzoli R et al., 2008] Rizzoli R, Burlet N, Cahall D, Delmas PD, Eriksen EF, Felsenberg D, Grbic J, Jontell M, Landesberg R, Laslop A, Wollenhaupt M, Papapoulos S, Sezer O, Sprafka M, Reginster JY (2008) Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonate treatment for osteoporosis. *Bone* 42(5):841-847

[Rodan GA et al., 1996] Rodan GA, Fleisch HA (1996) Bisphosphonates: Mechanisms of Action. *J Clin Invest* 97(12):2692-2696

[Rodan GA, 1998] Rodan GA (1998) Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:375-388

[Rogers MJ et al., 1994] Rogers MJ, Ji X, Russell RG, Blackburn GM, Williamson MP, Bayless AV, Ebetino FH, Watts DJ (1994) Incorporation of bisphosphonates into adenine nucleotides by amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J* 303(1):303-311

[Rogers MJ et al., 1996] Rogers MJ, Brown RJ, Hodkin V, Blackburn GM, Russell RG, Watts DJ (1996) Bisphosphonates are incorporated into adenine nucleotides by human aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 224(3):863-869

[Rogers MJ et al., 2000] Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC (2000) Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88(12):2961-2978

[Rogers MJ, 2003] Rogers MJ (2003) New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 9(32):2643-2658

[Rosen HN et al., 2000] Rosen HN, Moses AC, Garber J, Iloputaife ID, Ross DS, Lee SL, Greenspan SL (2000) Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif Tissue Int* 66(2):100-103

[Rote Liste® Service GmbH, 2011] Rote Liste® Service GmbH (2011) Hauptgruppe 68.B.1.1. Bisphosphonate. <http://www.rote-liste.de> (Zugriff am: 8. März 2012)

[Rubegni P et al., 2006] Rubegni P, Fimiani M (2006) Images in clinical medicine. Bisphosphonate-associated contact stomatitis. *N Engl J Med* 355(22):25

[Ruggiero SL et al., 2009] Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B, Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis (2009) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws - 2009 Update. *Aust Endod J* 35(3):119-130

[Russell RG et al., 1999] Russell RG, Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Croucher PI, Shipman C, Fleisch HA (1999) The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *J Bone Miner Res* 14(2):53-65

[Russell RG et al., 2008] Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ (2008) Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 19(6):733-759

[Sarin J et al., 2008] Sarin J, DeRossi SS, Akintoye SO (2008) Updates on bisphosphonates and potential pathobiology of bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis. *Oral Dis* 14(3):277-285

[Sato M et al., 1990] Sato M, Grasser W (1990) Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. *J Bone Miner Res* 5(1):31-40

[Sato M et al., 1991] Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, Golub E, Rodan GA (1991) Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 88(6):2095-2105

[Schaub RG et al., 1991] Schaub RG, Wozney J (1991) Novel agents that promote bone regeneration. *Cur Opin Biotechnol* 2(6):868-871

[Schmidt A et al., 1996] Schmidt A, Rutledge SJ, Endo N, Opas EE, Tanaka H, Wesolowski G, Leu CT, Huang Z, Ramachandaran C, Rodan SB, Rodan GA (1996) Protein-tyrosine phosphatase activity regulates osteoclast formation and function: inhibition by alendronate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7):3068-3073

[Schwabe U et al., 2011] Schwabe U, Paffrath D (2011) *Arzneiverordnungs-Report 2011: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1. Aufl., S. 785-796

[Sedghizadeh PP et al., 2008] Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW (2008) Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 66(4):767-775

[Simon MJ et al., 2010] Simon MJ, Niehoff P, Kimmig B, Wiltfang J, Açil Y (2010) 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. *Clin Oral Investig* 14(1):51-58

[Stockmann P et al., 2010] Stockmann P, Vairaktaris E, Wehrhan F, Seiss M, Schwarz S, Spriewald B, Neukam FW, Nkenke E (2010) Osteotomy and primary wound closure in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a prospective clinical study with 12 month follow-up. *Support Care Cancer* 18:448-460

[Tarassoff P, Csermak K, 2003] Tarassoff P, Csermak K (2003) Avaskular necrosis of the jaws: Risk factors in metastatic cancer patients. *Oral Maxillofac Surg* 61:1238-1239

[Taylor KH et al., 2010] Taylor KH, Middlefell LS, Mizen KD (2010) Osteonecrosis of the jaws induced by anti-RANK ligand therapy. *Br J Oral Maxillofac Surg* 48(3):221-223

[Vahtsevanos K et al., 2009] Vahtsevanos K, Kyrgidis A, Verrou E, Katodritou E, Triaridis S, Andreadis CG, Boukovinas I, Koloutsos GE, Teleioudis Z, Kitikidou K, Paraskevopoulos P, Zervas K, Antoniadis K (2009) Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Clin Oncol* 27(32):5356-5362

[van Beek E et al., 1999] van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Löwik C, Papapoulos S (1999) Farnesyl Pyrophosphate Synthase Is the Molecular Target. *Biochem Biophys Res Commun* 264(1):108-111

[Vescovi P et al., 2012] Vescovi P, Merigo E, Meleti M, Manfredi M, Guidotti R, Nammour S (2012) Bisphosphonates-related osteonecrosis of

the jaws: a concise review of the literature and a report of a single-centre experience with 151 patients. *J Oral Pathol Med* 41(3):214-221

[Vescovi P, 2012a] Vescovi P (2012) Conservative Treatment: LASER (Biostimulation and Minimally Invasive Surgical Treatment). In: De Ponte FS (Hrsg.) *Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw*. Springer-Verlag, Italien, 1. Aufl., S. 127-139

[Vitte C et al., 1996] Vitte C, Fleisch H, Guenthes HL (1996) Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclastic mediated resorption. *Endocrinology* 137:2324-2333

[Waguespack SG et al., 2003] Waguespack SG, Koller DL, White KE, Fishburn T, Carn G, Buckwalter KA, Johnson M, Kocisko M, Evans WE, Foroud T, Econs MJ (2003) Chloride channel 7 (CLCN7) gene mutations and autosomal dominant osteopetrosis, type II. *J Bone Miner Res* 18(8):1513-1518

[Walter C et al., 2010] Walter C, Klein MO, Pabst A, Al-Nawas B, Duschner H, Ziebart T (2010) Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clin Oral Investig* 14(1):35-41

[Walter C et al., 2011] Walter C, Pabst A, Ziebart T, Klein M, Al-Nawas B (2011) Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral Dis* 17(2):194-199

[Wang DS et al., 1997] Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K (1997) Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology* 138(7):2953-2962

[Weinstein RS et al., 2009] Weinstein RS, Roberson PK, Manolagas SC (2009) Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy. *N Engl J Med* 360(1):53-62

[Weiss HM et al., 2008] Weiss HM, Pfaar U, Schweitzer A, Wiegand H, Skerjanec A, Schran H (2008) Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid. *Drug Metab Dispos* 36(10):2043-2049

[Welsch U et al., 2003] Welsch U, Sobotta J (2003) *Lehrbuch Histologie; Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie*. Urban & Fischer, München, 1. Aufl., S. 119-133 und S. 212-219

[Widler L et al., 2002] Widler L, Jaeggi KA, Glatt M, Müller K, Bachmann R, Bisping M, Born AR, Cortesi R, Guiglia G, Jeker H, Klein R, Ramseier U, Schmid J, Schreiber G, Seltenmeyer Y, Green JR (2002) Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). *J Med Chem* 15;45(17):3721-3738

[Wilde F et al., 2011] Wilde F, Heufelder M, Winter K, Hendricks J, Frerich B, Schramm A, Hemprich A (2011) The role of surgical therapy in the management of intravenous bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 111:153-163

[Wood J et al., 2002] Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, Castronovo V, Green JR (2002) Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 302(3):1055-1061

[Wozney JM et al., 1988] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242(4885):1528-1534

[Yin G et al., 2011] Yin G, Bai Y, Luo E (2011) Angiogenic suppression of osteoclasts may play a role in developing bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Med Hypotheses* 76(3):347-349

[Zervas K et al., 2006] Zervas K, Verrou E, Teleioudis Z, Vahtsevanos K, Banti A, Mihou D, Krikelis D, Trepos E (2006) Incidence, risk factors and management of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma: a single-centre experience in 303 patients. *Br J Haematol* 134:620-623

[Ziebart T et al., 2011] Ziebart T, Pabst A, Klein MO, Kämmerer P, Gauss L, Brüllmann D, Al-Nawas B, Walter C (2011) Bisphosphonates: restrictions for vasculogenesis and angiogenesis: inhibition of cell function of endothelial progenitor cells and mature endothelial cells in vitro. *Clin Oral Investig* 15(1):105-111

Abkürzungsverzeichnis

AAOMS	American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons
ACE	3-Amino-9-ethylcarbazol
Acetoacetyl-CoA	Acetoacetyl-Coenzym A
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AK	Antikörper
ANOVA	analysis of variance
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
AVN	avascular necrosis
BAONJ	bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw, siehe auch BP-ONJ
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BIONJ	bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws
BMP	bone morphogenetic protein
BP	Bisphosphonat bzw. Bisphosphonate
BP-ONJ	bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw
BRONJ	bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws
BRU	bone remodeling unit
BS	Blocking-Solution
BSU	bone structural unit
CD31	Cluster of Differentiation 31
CFU-f	colony forming units–fibroblasts
CHX	Chlorhexidin
CTX	C-terminal cross-linking teleopeptide des Kollagen Typ I
DDD	definierte Tagesdosis
DGMKG	Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMAPP	Dimentylallyldiphosphat
EC/ECs	endothelial cell/endothelial cells
ECGS/H	Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPC	endothelial progenitor cell
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase

FKS	fetales Kälberserum
FPP	Farnesylpyrophosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranyl-Pyrophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HRP	horseradish peroxidase
HUVEC/HUVECs	human umbilical vein endothelial cell/cells
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
INF γ	Interferon γ
IPP	5-Isopentenylidiphosphat
KZOA1	Lösung die 10 μ M (\cong 10.000 nM) Zometa [®] enthält
KZOA2	Lösung die 1 μ M (\cong 1.000 nM) Zometa [®] enthält
KZOA3	Lösung die 0,1 μ M (\cong 100 nM) Zometa [®] enthält
KZOA4	Lösung die 0,01 μ M (\cong 10 nM) Zometa [®] enthält
MBU	basic multicellular unit
MM0-f	Standard-Mineralisationsmedium ohne weitere Zusätze, filtriert
MM1-f	Mineralisationsmedium mit weiteren Zusätzen, filtriert
MMP	Matrixmetalloprotein
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
NADPH/H ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nBP	Aminobisphosphonat
NF κ B	Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
OB/OBs	osteoblast/osteoblasts
ONJ	osteonecrosis of the jaw
OPG	Osteoprogenin
ORI	Osteoclast Resorption Inhibitor
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGE	Prostaglandin
PPi	anorganisches Pyrophosphat (inorganic pyrophosphate)
PTH	Parathormon
R	Rest

rab	ras-related in brain
rac	ras-related C3-botulinum toxin substrate 1
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
ras	rat sarcoma
roh	ras homology
TBST	Tris Buffered Saline mit Tween 20
TGF β	Transforming Growth Factor β
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
UKM	Universitätsklinikum Münster
VEGF	Vasculcar Endothelial Growth Factor
vWF	von Willebrand-Faktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln von Pyrophosphat und Bisphosphonaten im Vergleich	4
Abbildung 2: sterische Ähnlichkeiten, die die kompetitive Hemmung ermöglichen	8
Abbildung 3: Der Mevalonatweg und die Wirkorte der unterschiedlichen Generationen von Bisphosphonaten	10
Abbildung 4: Farbreaktion des MTTs.....	48
Abbildung 5: exemplarische Auswahl aus den dokumentierten Wellausschnitten der Osteoblastenkulturen in 10facher Vergrößerung	62
Abbildung 6: exemplarische Auswahl aus den dokumentierten Wellausschnitten der Endothelzellkulturen in 10facher Vergrößerung.....	66
Abbildung 7: Liniendiagramm der Ergebnisse des MTT-Assays der Osteoblasten	67
Abbildung 8: Ergebnisse des MTT-Assays der Osteoblasten als Boxplots ...	70
Abbildung 9: Liniendiagramm über die Ergebnisse des MTT-Assays der Endothelzellen	71
Abbildung 10: Ergebnisse des MTT-Assays der Endothelzellen als Boxplots	74
Abbildung 11: Liniendiagramm über die Ergebnisse des Cell-Counts der Osteoblasten	75
Abbildung 12: Ergebnisse des Cell-Counts der Osteoblasten als Boxplots ..	78
Abbildung 13: Liniendiagramm über die Ergebnisse des Cell-Counts der Endothelzellen	79
Abbildung 14: Ergebnisse des Cell-Counts der Endothelzellen als Boxplots	81
Abbildung 15: exemplarische Auswahl aus den Kollagen Typ I-Alexa-Fluor®-Färbungen der Osteoblasten, jeweils in 10facher Vergrößerung	82
Abbildung 16: exemplarische Auswahl aus den CD31- und vWF-Alexa-Fluor®-Färbungen der Endothelzellen	83
Abbildung 17: exemplarische Auswahl aus den Kollagen Typ I-, Osteocalcin- und Osteonectin- Dako EnVision®-Färbungen der Osteoblasten, jeweils in 10facher Vergrößerung	85
Abbildung 18: exemplarische Auswahl aus den CD31- und vWF-Dako EnVision®-Färbungen der Endothelzellen, jeweils in 10facher Vergrößerung	87
Abbildung 19: exemplarische Auswahl aus den Richardson-Färbungen der Osteoblasten	88
Abbildung 20: exemplarische Auswahl aus den Richardson-Färbungen der Endothelzellen	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezeichnung der vier Zoledronsäurekonzentrationen	46
Tabelle 2: MTT-Assay: Pipettierschema für 24er Well Plate A.....	49
Tabelle 3: MTT-Assay: Pipettierschema für 24er Well Plate B.....	49
Tabelle 4: MTT-Assay: Pipettierschema für 96er Well Plate	51
Tabelle 5: Alexa Fluor®-Färbung der Osteoblasten (primärer Antikörper) ..	54
Tabelle 6: Alexa Fluor®-Färbung der Endothelzellen (primärer Antikörper)	54
Tabelle 7: Alexa Fluor®-Färbung der Osteoblasten (sekundärer Antikörper)	55
Tabelle 8: Alexa Fluor®-Färbung der Endothelzellen (sekundärer Antikörper)	55
Tabelle 9: Dako EnVision®-Färbung der Osteoblasten (primärer Antikörper)	56
Tabelle 10: Dako EnVision®-Färbung der Endothelzellen (primärer Antikörper)	56
Tabelle 11: Dako EnVision®-Färbung der Osteoblasten (sekundärer Antikörper)	56
Tabelle 12: Dako EnVision®-Färbung der Endothelzellen (sekundärer Antikörper)	57

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Beckmann

Vorname: Eva

Danksagung

Vielen unterschiedlichen Menschen möchte ich Danke sagen.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Johannes Kleinheinz, dem ich die Möglichkeit für meine Arbeit verdanke.

Ich möchte mich bei Ihnen dafür bedanken, dass Sie mir umfangreich und unkompliziert die Gelegenheit eingeräumt haben in dem Forschungslabor der Klinik für Mund- und Kiefer-, Gesichtschirurgie an der Universitätsklinik Münster meine experimentellen Arbeiten durchzuführen.

Frau Prof. Dr. Gabriele Köhler danke ich freundlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Dr. Kai Wermker danke ich herzlich für die stetige und zuverlässige Betreuung während meiner Promotionszeit.

Ich danke Dir für die viele gefundene Zeit des Korrekturlesen, die immer zeitnahe Beantwortung meiner Fragen, für die Hilfe bei der statistischen Auswertung, Deine Anregungen bezüglich weiterführender Literatur und für den unumstößlichen Glauben daran, dass meine Formulierungen wissenschaftlichen Ansprüchen gerecht werden.

Einen ganz besonderen Dank sage ich Dr. Tobias Annussek.

Dir verdanke ich die Idee zu diesem Dissertationsthema. Es hat mich gefreut, dass Du mich gefragt hast, ob ich an diesem Thema forschen wolle. Danke für das Vermitteln des nötigen Wissens, um die Versuche durchführen zu können und die gemeinsame Zeit im Labor. Auch danke ich Dir für die vielen Botengänge in der Klinik. Es war stets beruhigend zu wissen, dass Du weder an mir noch an dem Gelingen dieser Arbeit zweifelst. Unvergessen sind für mich darüber hinaus aber vor allem Dein feines Gespür und Deine offenen Ohren und Augen.

Frau Irene Grabiniok, als Chemisch-technischer Angestellter, und Frau Hildegard Segbert, als Medizinisch-technischer Angestellter im Forschungs-

labor, möchte ich meinen Dank aussprechen für die Hilfe und die fachkundige Anleitung. Ich danke ihnen beiden für Ihre offene, hilfsbereite und stets freundliche Art und wünsche Ihnen weiterhin alles Gute.

Bei Susanne Schäfer möchte ich mich bedanken für den Austausch über Präpariertechniken und die Herstellerangaben der verwendeten Materialien.

Auch wenn sie mir namentlich unbekannt sind, so möchte ich doch den Frauen danken, die nach ihrer Entbindung die Nabelschnur ihrer geborenen Kinder der Forschung zur Verfügung gestellt haben.

Über die unkomplizierte Hilfe von Frau Dr. Kristina Zumbansen habe ich mich sehr gefreut. Ich danke Dir, für Deinen chemischen Sachverstand und die Hilfe beim Zeichnen von Molekülformeln.

Dr. Nora Ellen Liebergesell-Kilian und Dr. Carolin Böckenfeld danke ich für die gemeinsame, oft unerwartete Zeit abseits des Schreibtischs.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken.

Meinem Vater Dr. Wilfried Beckmann sage ich danke für die viele Zeit die Du mir fürs Korrekturlesen und Kommasetzen geschenkt hast, ebenso wie für Deine vielen aufmunternden, zuversichtlichen Worte. Ich danke Dir auch für Deine schnelle Hilfe bei plötzlichen Hardware-Problemen.

Glücklich bin ich über die mir hilfreichen Kenntnisse meiner Mutter Anne Beckmann betreffend der versteckten Möglichkeiten meines Textverarbeitungsprogramms. Nicht nur dafür danke ich Dir.

Bei Euch beiden zusammen möchte ich mich dafür bedanken, dass ihr mir diesen Freiraum zum Experimentieren, Recherchieren, Lesen, Einarbeiten, Verstehen und Schreiben ermöglicht habt.

Meine Schwester Carla Beckmann hat mit großer Ausdauer die automatische Literaturverzeichnis-Funktion der Textverarbeitung überlistet. Allein dafür, dass es Dich in Deiner unbeschreiblichen Art gibt, bin ich Dir dankbar.

Meiner gesamten Familie, also auch meiner Schwester Johanna Beckmann, sage ich Danke für die lustigen, abwechslungsreichen und informativen Gespräche quer durch Deutschland und darüber hinaus, die mich abends oft daran erinnert haben, nicht an meinem Schreibtisch zu übernachten.

Anhang

I. Messdaten

I.1. Analysedaten der MTT-Assays

I.1.1. Daten der Osteoblasten

Tag 1

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

MTT- assay: extinction

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	24	,05271	,003641	,000743	,05117	,05425	,048	,064
0.01 µM	12	,05650	,008006	,002311	,05141	,06159	,048	,073
0.1 µM	12	,05550	,002844	,000821	,05369	,05731	,052	,059
1 µM	12	,06400	,007097	,002049	,05949	,06851	,056	,075
10 µM	12	,06133	,005123	,001479	,05808	,06459	,053	,069
gesamt	72	,05713	,006741	,000794	,05554	,05871	,048	,075

Tag 3

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

MTT- assay: extinction

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	24	,10579	,010338	,002110	,10143	,11016	,089	,130
0.01 µM	12	,09400	,005027	,001451	,09081	,09719	,087	,102
0.1 µM	12	,11575	,007794	,002250	,11080	,12070	,100	,125
1 µM	12	,12975	,011639	,003360	,12235	,13715	,113	,151
10 µM	12	,11975	,005137	,001483	,11649	,12301	,113	,127
gesamt	72	,11181	,014372	,001694	,10843	,11518	,087	,151

Tag 6

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

MTT- assay: extinction

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	24	,27292	,015634	,003191	,26631	,27952	,236	,300
0.01 µM	12	,52050	,032645	,009424	,49976	,54124	,476	,579
0.1 µM	12	,58683	,019319	,005577	,57456	,59911	,551	,611
1 µM	12	,62925	,028964	,008361	,61085	,64765	,584	,686
10 µM	12	,57500	,041171	,011885	,54884	,60116	,529	,654
gesamt	72	,47624	,150574	,017745	,44085	,51162	,236	,686

Tag 8

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

MTT- assay: extinction

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall' für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	24	,37608	,027916	,005698	,36430	,38787	,338	,437
0.01 µM	12	,74950	,020129	,005811	,73671	,76229	,717	,780
0.1 µM	12	,72375	,051669	,014915	,69092	,75658	,669	,830
1 µM	12	,77900	,033629	,009708	,75763	,80037	,735	,834
10 µM	12	,72667	,064299	,018562	,68581	,76752	,644	,863
gesamt	72	,62185	,180282	,021246	,57948	,66421	,338	,863

Tag 10

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

MTT- assay: extinction

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	24	,47013	,043635	,008907	,45170	,48855	,391	,556
0.01 µM	12	,94217	,050134	,014472	,91031	,97402	,861	1,023
0.1 µM	12	,89975	,056350	,016267	,86395	,93555	,844	1,010
1 µM	12	,95892	,034323	,009908	,93711	,98072	,895	1,003
10 µM	12	,87617	,067550	,019500	,83325	,91909	,798	1,024
gesamt	72	,76954	,220401	,025975	,71775	,82133	,391	1,024

Tag 14

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

MTT- assay: extinction

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	24	,66804	,025964	,005300	,65708	,67901	,615	,718
0.01 µM	12	,98925	,057003	,016455	,95303	1,02547	,923	1,104
0.1 µM	12	,96717	,043007	,012415	,93984	,99449	,885	1,033
1 µM	12	,99958	,041719	,012043	,97308	1,02609	,942	1,079
10 µM	12	,96967	,079297	,022891	,91928	1,02005	,914	1,182
gesamt	72	,87696	,156545	,018449	,84017	,91374	,615	1,182

I.1.2. Daten der Endothelzellen

Tag 1

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

MTT- assay: extinction

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	24	,12921	,005090	,001039	,12706	,13136	,122	,138
0.01 µM	12	,14300	,004023	,001161	,14044	,14556	,136	,149
0.1 µM	12	,15050	,003030	,000875	,14857	,15243	,147	,155
1 µM	12	,15675	,002563	,000740	,15512	,15838	,153	,161
10 µM	12	,17817	,003639	,001050	,17585	,18048	,171	,182
gesamt	72	,14781	,017514	,002064	,14369	,15192	,122	,182

Tag 3

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

MTT- assay: extinction

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	24	,41288	,013857	,002829	,40702	,41873	,389	,443
0.01 µM	12	,48817	,006088	,001757	,48430	,49203	,479	,499
0.1 µM	12	,41550	,025278	,007297	,39944	,43156	,371	,464
1 µM	12	,46983	,009543	,002755	,46377	,47590	,456	,489
10 µM	12	,56025	,032314	,009328	,53972	,58078	,532	,628
gesamt	72	,45992	,057247	,006747	,44646	,47337	,371	,628

Tag 6

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

MTT- assay: extinction

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	24	,76629	,051939	,010602	,74436	,78822	,701	,900
0.01 µM	12	,79858	,023267	,006717	,78380	,81337	,773	,846
0.1 µM	12	,74700	,023363	,006744	,73216	,76184	,711	,789
1 µM	12	,72083	,023292	,006724	,70603	,73563	,690	,760
10 µM	12	,80817	,054352	,015690	,77363	,84270	,761	,918
gesamt	72	,76786	,049662	,005853	,75619	,77953	,690	,918

Tag 8

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

MTT- assay: extinction

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	24	,90671	,032514	,006637	,89298	,92044	,828	,958
0.01 µM	12	1,00600	,024335	,007025	,99054	1,02146	,976	1,046
0.1 µM	12	,99550	,038121	,011004	,97128	1,01972	,925	1,049
1 µM	12	,95917	,013395	,003867	,95066	,96768	,937	,983
10 µM	12	1,03683	,024297	,007014	1,02140	1,05227	1,013	1,087
gesamt	72	,96849	,056869	,006702	,95512	,98185	,828	1,087

Tag 10

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

MTT- assay: extinction

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	24	,90033	,016573	,003383	,89334	,90733	,879	,938
0.01 µM	12	,95217	,014603	,004215	,94289	,96144	,932	,979
0.1 µM	12	,94258	,039592	,011429	,91743	,96774	,888	1,013
1 µM	12	,86642	,018783	,005422	,85448	,87835	,839	,894
10 µM	12	1,01642	,029072	,008392	,99795	1,03489	,988	1,063
gesamt	72	,92971	,053881	,006350	,91705	,94237	,839	1,063

Tag 14

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

MTT- assay: extinction

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	24	,78688	,025932	,005293	,77592	,79783	,732	,822
0.01 µM	12	,81175	,028326	,008177	,79375	,82975	,778	,867
0.1 µM	12	,77117	,031252	,009022	,75131	,79102	,742	,830
1 µM	12	,71317	,021624	,006242	,69943	,72691	,683	,749
10 µM	12	,79400	,035540	,010260	,77142	,81658	,759	,863
gesamt	72	,77731	,041735	,004919	,76750	,78711	,683	,867

I.2. Analysedaten der Cell-Counts

I.2.1. Daten der Osteoblasten

Tag 1

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

number of cells [cell count]

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	12	24,08	5,600	1,616	20,53	27,64	14	34
0.01 µM	6	7,00	3,347	1,366	3,49	10,51	4	13
0.1 µM	6	13,00	4,195	1,713	8,60	17,40	7	19
1 µM	6	16,50	3,834	1,565	12,48	20,52	13	22
10 µM	6	13,00	4,099	1,673	8,70	17,30	8	20
gesamt	36	16,28	7,603	1,267	13,71	18,85	4	34

Tag 3

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

number of cells [cell count]

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	12	103,33	23,438	6,766	88,44	118,23	69	161
0.01 µM	6	40,33	17,247	7,041	22,23	58,43	27	73
0.1 µM	6	90,17	12,254	5,003	77,31	103,03	75	106
1 µM	6	84,67	14,597	5,959	69,35	99,99	60	100
10 µM	6	68,00	28,460	11,619	38,13	97,87	34	104
gesamt	36	81,64	29,707	4,951	71,59	91,69	27	161

Tag 6

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

number of cells [cell count]

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	12	246,25	39,430	11,383	221,20	271,30	200	319
0.01 µM	6	302,83	35,131	14,342	265,97	339,70	235	331
0.1 µM	6	340,17	27,243	11,122	311,58	368,76	292	371
1 µM	6	351,00	70,498	28,781	277,02	424,98	287	486
10 µM	6	339,83	57,763	23,582	279,21	400,45	266	416
gesamt	36	304,39	62,643	10,441	283,19	325,58	200	486

Tag 8

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

number of cells [cell count]

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	12	314,50	39,137	11,298	289,63	339,37	277	383
0.01 µM	6	403,17	32,307	13,189	369,26	437,07	355	443
0.1 µM	6	403,17	42,348	17,289	358,72	447,61	331	443
1 µM	6	399,17	50,467	20,603	346,20	452,13	348	474
10 µM	6	521,33	31,481	12,852	488,30	554,37	486	576
gesamt	36	392,64	79,813	13,302	365,63	419,64	277	576

Tag 10

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

number of cells [cell count]

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	12	352,33	45,215	13,053	323,60	381,06	284	459
0.01 µM	6	442,50	61,906	25,273	377,53	507,47	362	541
0.1 µM	6	477,50	58,702	23,965	415,90	539,10	403	559
1 µM	6	496,00	87,693	35,800	403,97	588,03	392	618
10 µM	6	537,17	60,294	24,615	473,89	600,44	445	611
Gesamt	36	442,97	91,238	15,206	412,10	473,84	284	618

Tag 14

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

number of cells [cell count]

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	12	380,83	42,793	12,353	353,64	408,02	300	438
0.01 µM	6	454,67	48,248	19,697	404,03	505,30	403	526
0.1 µM	6	485,00	47,979	19,587	434,65	535,35	402	530
1 µM	6	500,17	63,710	26,010	433,31	567,03	417	573
10 µM	6	522,33	45,579	18,608	474,50	570,17	453	569
gesamt	36	453,97	72,661	12,110	429,39	478,56	300	573

I.2.2. Daten der Endothelzellen

Tag 1

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

number of cells [cell count]

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	12	25,75	8,058	2,326	20,63	30,87	16	44
0.01 µM	6	22,33	9,180	3,748	12,70	31,97	15	38
0.1 µM	6	23,33	7,062	2,883	15,92	30,74	15	32
1 µM	6	26,00	8,295	3,386	17,30	34,70	15	36
10 µM	6	22,50	9,670	3,948	12,35	32,65	9	35
gesamt	36	24,28	8,084	1,347	21,54	27,01	9	44

Tag 3

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

number of cells [cell count]

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	12	70,08	17,625	5,088	58,89	81,28	43	100
0.01 µM	6	90,67	18,327	7,482	71,43	109,90	70	119
0.1 µM	6	107,83	24,710	10,088	81,90	133,76	74	140
1 µM	6	112,67	30,064	12,274	81,12	144,22	64	144
10 µM	6	100,33	16,537	6,751	82,98	117,69	79	122
gesamt	36	91,94	26,346	4,391	83,03	100,86	43	144

Tag 6

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

number of cells [cell count]

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	12	213,75	30,559	8,822	194,33	233,17	171	252
0.01 µM	6	239,33	37,506	15,312	199,97	278,69	183	279
0.1 µM	6	247,83	14,470	5,907	232,65	263,02	229	266
1 µM	6	241,00	27,792	11,346	211,83	270,17	196	269
10 µM	6	216,33	21,824	8,909	193,43	239,24	175	236
gesamt	36	228,67	30,227	5,038	218,44	238,89	171	279

Tag 8

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

number of cells [cell count]

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	12	234,75	42,375	12,233	207,83	261,67	172	313
0.01 µM	6	225,83	26,248	10,716	198,29	253,38	197	263
0.1 µM	6	238,50	19,460	7,945	218,08	258,92	206	257
1 µM	6	226,33	28,105	11,474	196,84	255,83	176	250
10 µM	6	222,50	18,349	7,491	203,24	241,76	190	242
gesamt	36	230,44	30,210	5,035	220,22	240,67	172	313

Tag 10

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

number of cells [cell count]

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	12	217,83	38,067	10,989	193,65	242,02	147	283
0.01 µM	6	202,50	32,898	13,431	167,98	237,02	143	243
0.1 µM	6	221,33	43,302	17,678	175,89	266,78	175	302
1 µM	6	221,50	39,657	16,190	179,88	263,12	172	283
10 µM	6	238,83	23,761	9,700	213,90	263,77	220	285
gesamt	36	219,97	36,039	6,007	207,78	232,17	143	302

Tag 14

Univariat: ONEWAY deskriptive Statistiken

number of cells [cell count]

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 µM (control)	12	197,42	32,620	9,417	176,69	218,14	137	255
0.01 µM	6	185,33	23,645	9,653	160,52	210,15	163	229
0.1 µM	6	202,50	33,828	13,810	167,00	238,00	151	250
1 µM	6	222,50	30,336	12,385	190,66	254,34	180	271
10 µM	6	218,67	24,427	9,972	193,03	244,30	192	256
gesamt	36	203,97	31,064	5,177	193,46	214,48	137	271

II. Ethikvotum



WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Medizinische Fakultät

- Ethikkommission -

- Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen Lippe -

Universität Münster - Medizinische Fakultät - Ethikkommission -
D - 48129 Münster

D - 48129 Münster,

Herrn Prof.Dr.med.Dr.med.dent.Dr.h.c. Ulrich Joos
Herrn PD Dr.med.Dr.med.dent Johannes Kleinböhnitz
Herrn Dr.med. Hans-Peter Wiesmann
Klinik u. Poliklinik f. Mund- u. Kiefer-Gesichtschirurgie
Waldeyerstr. 30

Hausadresse: 05.11.01
Waldeyerstraße 27 Prof.Hu/R8
D - 48149 Münster

Telefon: Vermittlung (02 51) 83 - 0
Telefax: (02 51) 83 - 5 53 39
Telefon: Durchwahl (02 51) 83 - 5 52 90
e-mail: ethikkom@uni-muenster.de

Reg.Nr.: IIXKleil (Beim Schriftwechsel bitte stets angeben.)

Betr.: Beurteilung eines biomedizinischen Forschungsvorhabens am Menschen durch die
Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Hier: Ihr Antrag vom 10.08.2001: „Entnahme von Nabelschnurvenen zur Anzucht und
Kultivierung humaner Endothelzellen.“

Folgende Unterlagen haben uns vorgelegen: Der Antrag vom 10.08.2001:

Sehr geehrte Herren Kollegen,

vielen Dank für Ihr Schreiben vom 31.10.2001, mit dem Sie uns zur o.g. Studie folgende Dokumente
senden;

Die gemäß unseren Empfehlungen vom 19.09.2001 erstellte gesonderte Patientenaufklärung nebst
Einwilligungsformular.

Wir bestätigen Ihnen gerne, dass seitens der Kommission nunmehr weder ethische noch juristische
Bedenken gegen die Durchführung Ihres Forschungsvorhabens bestehen.

Mit freundlichen Grüßen

Prof.Dr.med.Dr.phil. Peter Hucklenbroich

Stellvertretender Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder: J. van de Loo (Vorsitzender), P. Hucklenbroich (Geschäftsführer und stellv. Vorsitzender),
B. Brinkmann, H. Kolbrosser, H. Kresse, E. Lesäing, J. Rüter, N. Seminger, L. Siep, T. Wolf