

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
(Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Immunhistochemische Untersuchung von Patienten mit Bisphosphonat- assoziierten Osteonekrosen der Kiefer

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jan Wiegel

aus

Homberg (Efze)

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. N. Miosge

Ko-Betreuer/in: PD Dr. med. Dr. med. dent. P. Kauffmann

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. N. Miosge

Ko-Referent/in: PD Dr. med. Dr. med. dent. P. Kauffmann

Drittreferent/in: Prof. Dr. mult. Thomas Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 16.06.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Immunhistochemische Untersuchung von Patienten mit Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen der Kiefer" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie und Physiologie des Knochens.....	1
1.1.1	Regulation des Knochenaufbaus und Knochenabbaus.....	3
1.1.2	Knochenerkrankungen und Medikation.....	3
1.2	Bisphosphonate – ein historischer Überblick.....	4
1.2.1	Klinische Anwendung der Bisphosphonate.....	6
1.2.2	Pharmakokinetik und Pharmakodynamik	8
1.2.3	Wirkungen und Nebenwirkungen der Bisphosphonate.....	13
1.2.4	Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen (BRONJ).....	14
1.2.5	Prophylaxe sowie Therapie.....	17
1.3	Aufgabenstellung und Studienziel.....	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Versuchsaufbau.....	22
2.2	Probengewinnung.....	22
2.3	Probenbearbeitung.....	23
2.3.1	Fixierung und Paraffineinbettung.....	23
2.3.2	Entkalkung	23
2.3.3	Einbettung.....	24
2.3.4	Schnittanfertigung	25
2.3.5	Entparaffinierung der Proben	26
2.4	Färbung der Proben.....	26
2.4.1	Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin	26
2.4.2	IHC-Nachweisreaktion.....	28
2.4.3	Protokoll IHC-Nachweisreaktion.....	28
2.4.4	Lichtgrün für IHC-Nachweisreaktion.....	31
2.5	IHC-Nachweisreaktionen der Proteine	31
2.5.1	Neutrophile Elastase.....	32
2.5.2	Collagen-I	32
2.5.3	RUNX2.....	33
2.5.4	SMURF1	33
2.5.5	SMURF2	34
2.5.6	SMAD2/3.....	34
2.5.7	RANKL.....	34
2.6	Kontrolle der Färbungen.....	35
2.6.1	Negativ-Kontrolle der Färbungen	35
2.6.2	Positiv-Kontrolle der Färbungen.....	35
2.7	Auswertung der histologischen Färbungen.....	36
2.7.1	Vorgehen bei Auswertung und Projektgestaltung in QuPath.....	36
2.7.2	Zell-Detektion innerhalb der Präparate.....	38
2.8	Statistische Auswertung.....	41

3	Ergebnisse.....	43
3.1	Übersichtsfärbungen und Strukturdarstellungen der Gewebeschnitte.....	43
3.2	IHC-Nachweisreaktion spezifischer Proteine in den erkrankten sowie gesunden Kieferknochenpräparaten.....	47
3.2.1	Neutrophile Elastase.....	47
3.2.2	Collagen-I.....	52
3.2.3	RUNX2.....	56
3.2.4	SMURF1.....	59
3.2.5	SMURF2.....	62
3.2.6	SMAD2/3.....	65
3.2.7	RANKL.....	68
4	Diskussion.....	72
4.1	Kofaktoren.....	75
4.1.1	Anamnese und Demographie.....	75
4.1.2	Verabreichungsform und Therapiedauer.....	76
4.2	Diskussion der Methode.....	77
4.2.1	Kieferknochenproben und Gruppeneinteilung.....	77
4.2.2	HE-Übersichtsfärbung.....	78
4.2.3	IHC-Nachweisreaktionen.....	78
4.2.4	Auswertung mit QuPath.....	84
4.3	Statistische Auswertung.....	85
5	Zusammenfassung.....	87
6	Literaturverzeichnis.....	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Pyrophosphat und Bisphosphonat.....	5
Abbildung 2: Übersicht und Auflistung der Bisphosphonate	8
Abbildung 3: Phagozytose der Bisphosphonate in Osteoklasten.....	11
Abbildung 4: Wirkmechanismen der Bisphosphonate im Osteoklasten.....	12
Abbildung 5: Schematischer Versuchsablauf der Studie.....	22
Abbildung 6: Übersicht HE-Färbung BRONJ-Kieferknochenprobe aus Patientengruppe 1 ...	44
Abbildung 7: HE-Färbung BRONJ-Kieferknochenprobe aus Patientengruppe 1.....	45
Abbildung 8: HE-Färbung BRONJ-Kieferknochenprobe aus Patientengruppe 1.....	45
Abbildung 9: Übersicht HE-Färbung BRONJ-Kieferknochenprobe aus Patientengruppe 1 ...	46
Abbildung 10: IHC-Nachweis für neutrophile Elastase in Patientengruppe 1.....	48
Abbildung 11: IHC-Nachweis für neutrophile Elastase in Patientengruppe 2.....	49
Abbildung 12: Q-Q-Diagramm – neutrophile Elastase	51
Abbildung 13: IHC-Nachweis für Col-I in Patientengruppe 1	53
Abbildung 14: IHC-Nachweis für Col-I in Patientengruppe 2.....	54
Abbildung 15: Detailübersicht: IHC-Nachweis für Col-I in Patientengruppe 2.....	55
Abbildung 16: IHC-Nachweis für RUNX2 in Patientengruppe 1	57
Abbildung 17: IHC-Nachweis für RUNX2 in Patientengruppe 2	58
Abbildung 18: IHC-Nachweis für SMURF1 in Patientengruppe 1.....	60
Abbildung 19: IHC-Nachweis für SMURF1 in Patientengruppe 2.....	61
Abbildung 20: IHC-Nachweis für SMURF2 in Patientengruppe 1.....	63
Abbildung 21: IHC-Nachweis für SMURF2 in Patientengruppe 2.....	64
Abbildung 22: IHC-Nachweis für SMAD2/3 in Patientengruppe 1	66
Abbildung 23: IHC-Nachweis für SMAD2/3 in Patientengruppe 2.....	67
Abbildung 24: IHC-Nachweis für RANKL in Patientengruppe 1.....	69
Abbildung 25: IHC-Nachweis für RANKL in Patientengruppe 2.....	70
Abbildung 26: Boxplot-Diagramm: Vergleich Gruppe 1 vs. Gruppe 2	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose (BRONJ)	17
Tabelle 2: Protokoll des Einbettautomaten.....	24
Tabelle 3: Protokoll Entparaffinierung	26
Tabelle 4: Protokoll HE-Färbung	27
Tabelle 5: Standardprotokoll IHC-Nachweisreaktion	29
Tabelle 6: Protokoll Herstellung Lichtgrün.....	31
Tabelle 7: Antikörper	31
Tabelle 8: Protokoll IHC-Nachweisreaktion Collagen-I mit Vorverdau.....	33
Tabelle 9: Parametereinstellung der Zell-Detektion	39
Tabelle 10: Parametereinstellung der positiven Zell-Detektion.....	40

Abkürzungsverzeichnis

AAMOS	American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons
AK	Antikörper
AP	Alkalische-Phosphatase
Aqua dest	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BRONJ	<i>bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Col-I	Collagen Typ I
DGMKG	Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
DMAPP	Dimethylallyl-Pyrophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GPP	Geranylpyrophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HWZ	Halbwertszeit
i.v.	intravenös
IHC- Nachweisreaktion	Immunhistochemische-Nachweisreaktion
IPP	Isopentenyl-Pyrophosphat
JPEG	Joint Photographic Experts Group
OPG	Osteoprotegerin
Q-Q-Diagramm	Quantil-Quantil-Diagramm
QuPath	Quantitative Pathology & Bioimage Analysis
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
RANKL-RANK- OPG	<i>receptor activator of nuclear factor-κB ligand-receptor activator of nuclear factor-κB- osteoprotegerin</i>
RT	Raumtemperatur
RUNX2	<i>runt related gen 2</i>
SERM	Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren
SMURF1/2	<i>smad ubiquitination regulatory factor 1/2</i>
SVS	Aperio ScanScope Virtual Slide
TBS	<i>tris-buffered-saline</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie des Knochens

Die Knochen gehören zu den Binde- und Stützgeweben des menschlichen Körpers und bilden den Hauptanteil des Skeletts aus (Karsenty et al. 2009). Sie dienen als Ursprung sowie Ansatz für Muskulatur und Bänder, wodurch sie die physiologischen Bewegungen des Menschen ermöglichen.

Das Knochengewebe selbst besteht aus vielen verschiedenen Zelltypen und einer Extrazellulärmatrix. Die Hauptkomponenten dieser Matrix sind Collagenfibrillen und Hydroxylapatit-Kristalle, durch welche der Knochen seine biegefesten Eigenschaften erhält. Zusammengesetzt ist die Knochenmatrix aus organischen und anorganischen Bestandteilen. 90% des organischen Knochenanteils besteht aus Collagen Typ I (Col-I) (Bloom und Fawcett 1996). Der anorganische Knochenanteil besteht zu 40% aus Hydroxylapatit und weiteren Ionen wie Fluorid sowie Magnesium. Menschlicher Knochen verfügt über eine hohe biologische Plastizität, die es ihm ermöglicht, sich durch Umbauvorgänge stets an die an ihn herantretenden Reize sowie mechanischen Belastungen anzupassen.

Neben dem Enamelum (Zahnschmelz) und Dentin (Zahnbein) stellen Knochen die härteste Substanz des menschlichen Körpers dar. Die enthaltenen Collagenfibrillen sind mikroskopisch im unreifen Knochen plexiform verwoben (Geflechtknochen) und im reifen Knochengewebe in erkennbaren Schichten lamellenförmig sowie parallel angeordnet (Lamellenknochen). Makroskopisch tritt ein Knochen in zwei verschiedenen Formen auf – der spongiösen sowie der kompakten Form. An den Außenflächen wird der Knochen vom Periost, einem straffen Bindegewebe, umgeben. Unterhalb des Periosts befindet sich die Corticalis, eine Rindenschicht des Knochens, welche auch Substantia compacta genannt wird und aus dicht aneinander liegenden Knochenlamellen zusammengesetzt ist. Die darauffolgende Schicht wird als Substantia spongiosa bezeichnet und besteht aus feinen Knochenbälkchen (Knochen trabekeln), welche ein schwammartiges Konstrukt bilden. Der entstehende Hohlraum wird Markhöhle (Cavum medullare) genannt und von der inneren Knochenhaut, dem Endost, das aus einer dünnen Bindegewebsschicht besteht, ausgekleidet. An dieser Stelle befindet sich das Knochenmark, welches den wichtigsten Teil bei der Blutbildung des Knochens, der sogenannten Hämatopoese, einnimmt.

Neben den blutbildenden Aufgaben sowie der Halte- und Stützfunktion hat der Knochen als Speicherreservoir Einfluss auf die Regulation von verschiedenen Stoffwechselprozessen. Er regelt unter anderem den Mineralstoffwechsel wie den Calcium- und Phosphathaushalt im menschlichen Körper (Bloom und Fawcett 1996). Von den insgesamt 1 – 2 kg Calcium, welche physiologisch im Körper vorhanden sind und gespeichert werden, befinden sich 99% in den Knochen.

Eine weitere wesentliche Aufgabe des Knochens liegt in der Schutzfunktion für die von ihm umgebenen Organe. Die inneren Organe, insbesondere auch die Sinnesorgane und das zentrale Nervensystem sowie das Gehirn, sind von einer soliden Knochenstruktur umgeben, welche sie vor äußeren Verletzungen schützen soll.

Die Arzneimittelgruppe der Bisphosphonat-Medikamente wird heute vor allem zur Behandlung von Neoplasien im Knochen, ossär metastasierenden malignen Erkrankungen sowie zur Prophylaxe und Therapie bei Osteoporose eingesetzt. Sekundäre Tumore in den Knochen in Form von Knochenfiliae (Knochenmetastasen) treten oft bei Mamma-, Prostata-, Nierenzell- oder Lungenkarzinomen auf.

Ein großes Problem stellt die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose – in der englischsprachigen Literatur bekannt unter der Bezeichnung *Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw* (BRONJ) – als schwere Nebenwirkung der Therapie mit Bisphosphonat-Medikamenten dar. Das Auftreten dieser Nebenwirkung wird seit 2003 beobachtet und wurde im selben Jahr erstmalig beschrieben (Marx 2003). Definiert ist die BRONJ als ein Krankheitsbild mit einem mindestens acht Wochen in der Mundhöhle exponierten Kieferknochen, bei welchem eine Radiotherapie im zeitlichen Zusammenhang mit der antiresorptiven Therapie ausgeschlossen werden kann (Ruggiero et al. 2009). Trotz zunehmender Erkenntnisse bei Pathogenese und Therapie einer BRONJ sind seit der erstmaligen Beschreibung im Jahr 2003 bis heute nur unzureichende Fortschritte hinsichtlich der genauen histologischen bzw. pathologischen Analyse der Knochenveränderungen vorhanden. Die fortlaufend steigende Inzidenz dieses Krankheitsbildes bestätigt die Notwendigkeit weiterer intensiver Forschung, welche mit der vorliegenden Studie unterstützt werden soll.

1.1.1 Regulation des Knochenaufbaus und Knochenabbaus

Grundsätzlich werden die wesentlichen Zellen des Knochens in Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten unterschieden (Bloom und Fawcett 1996). Hierbei sind Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteozyten Bezeichnungen verschiedener funktioneller Phasen desselben Zelltyps. Osteoklasten sind für die Knochenresorption und somit für den Knochenabbau verantwortlich. Osteoblasten sind hingegen für den Knochenaufbau zuständig (Long 2011). Beide sind in einem physiologischen Gleichgewicht zueinander, wodurch die Integrität des Knochens gesichert wird und sich dieser an die an ihn herantretenden Belastungen adaptieren kann. Deshalb befindet sich der Knochen in einem ständigen Umbauprozess. Hierbei werden beispielsweise Mikrofrakturen, welche im Alltag am Knochen entstehen können, repariert und die Adaption an die funktionelle Belastung sowie biomechanische Anpassung gesichert (Woo et al. 2006). Das Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten dient – durch den ständigen Knochenumbau und die damit verbundenen Appositions- sowie Resorptionsvorgänge – der Einhaltung der Phosphat- und Calciumhomöostase (Long 2011). Die Kopplung zwischen Osteoblasten und Osteoklasten und der damit zusammenhängende physiologische Knochenumbau wird als Remodeling bezeichnet (Bloom und Fawcett 1996). Reguliert wird dies auf molekularer Ebene durch das *Receptor Activator of NF- κ B Ligand-Receptor Activator of NF- κ B-Osteoprotegerin-System* (RANKL-RANK-OPG-System).

1.1.2 Knochenerkrankungen und Medikation

Den häufigsten Knochenerkrankungen liegt eine gesteigerte Aktivität der Osteoklasten zugrunde, wodurch eine erhöhte Knochenresorption entsteht. Das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau des Knochens ist somit gestört. Der Knochen ist das Organ des menschlichen Körpers, welches am häufigsten vom Befall durch tumorbedingte Metastasen betroffen ist. Laut Coleman (2001) ist hierbei die Prävalenz bei Prostata- und Mamma-karzinomen am höchsten. Gendefekte, degenerative Prozesse, hormonelle Störungen, Infektionen, Stoffwechselerkrankungen und Tumore können zu einem erhöhten Knochenabbau oder -umbau führen und somit die Knochenstrukturen schwächen. Eine pathologische *Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*(RANKL)-Bildung – entstehend durch T-Zellen – kann ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Sie kommt lokal bei der Perioprothetik und der Parodontitis vor (Murakami et al. 1995; Sabokbar et al. 2003). Systemisch tritt dies beim Krankheitsbild des Diabetes mellitus und der rheumatoiden Arthritis auf (Haynes et al. 2001; de Amorim et al. 2008). Ein weiteres Beispiel für das Missverhältnis zwischen

Knochenaufbau und Knochenabbau ist das Krankheitsbild der Osteoporose. Die primäre Osteoporose betrifft zum überwiegenden Teil Frauen ab dem 50. Lebensjahr und beginnt häufig nach der Menopause, in der die Östrogenproduktion reduziert wird. Weitere Faktoren für eine primäre Osteoporose können eine Hyperthyreose, primärer Hyperparathyreodismus oder Diabetes mellitus sein (Alexopoulou et al. 2006; Murphy et al. 2010; Sitges-Serra et al. 2010).

Die sekundäre Form der Osteoporose ist deutlich seltener und kann meistens durch eine Immobilisation oder auch eine chronische Nebenwirkung einer Glukokortikoid-Therapie entstehen (Takata und Yasui 2001; Kim 2010). Beides ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine mangelnde Knochenfestigkeit charakterisiert wird und mit einem erhöhten Frakturrisiko verbunden ist (Mundy 2007). Ein vermehrter Knochenumbau ist auch bei anderen Knochenerkrankungen wie Osteodystrophia deformans, auch genannt Morbus Paget, Osteomyelitis (Pesanti und Lorenzo 1998), Osteogenesis imperfecta (Rauch und Glorieux 2004), Osteomalazie (Basha et al. 2000) und dem multiplen Myelom (Durie et al. 2006) vorhanden. Tumoröse Erkrankungen wie das multiple Myelom oder Metastasen – bedingt durch Prostata- sowie Mammakarzinome – führen häufig zu Knochenschmerzen, Hyperkalzämien und osteolysebedingten Knochenfrakturen (Coleman 2001).

Je nach vorhandener Knochenerkrankung erfolgt die Therapie mit verschiedenen Medikamenten. Bei Osteoporose werden beispielsweise selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) wie der Arzneistoff Raloxifen verabreicht, die einen ähnlichen Effekt wie das weibliche Geschlechtshormon Östrogen haben. Weitere Medikamente sind Bisphosphonate, Calcium, Vitamin-D und der humane monoklonale RANKL-Antikörper Denosumab, der im Knochenstoffwechsel die Wirkung von Osteoprotegerin (OPG) imitiert und somit Einfluss auf die Produktion der Osteoklasten sowie deren Vorläuferzellen nimmt.

1.2 Bisphosphonate – ein historischer Überblick

Die geminalen Bisphosphonate wurden erstmalig im Jahr 1895 vom Chemiker Nikolai Menschutkin synthetisiert (Menschutkin 1865). Durch ihre Eigenschaft, Calciumkarbonat-Ablagerungen auf verschiedenen Oberflächen zu verhindern, wurden sie ursprünglich in der Industrie als chemische Antikorrosiva sowie Antiverkalkungsmittel verwendet (Ruggiero 2009).

Bisphosphonate sind metabolisch stabile Pyrophosphat-Analoga (Sato et al. 1991; Shaw und Bishop 2005). Charakteristisch ist, dass das zentrale Sauerstoffatom des in der Natur

vorkommenden Pyrophosphats (P-O-P) durch ein Kohlenstoffatom ersetzt ist (P-C-P). Dadurch unterscheiden sich die Bisphosphonate von den Pyrophosphaten und sind deutlich stabiler gegenüber einer enzymatischen Spaltung, hitzestabil sowie nicht hydrolysierbar (Abbildung 1). Das Sauerstoffatom der Pyrophosphate ermöglicht eine leichte thermische sowie hydrolytische Spaltung des Stoffs, wodurch sich nur eine begrenzte Anwendbarkeit ergibt. Durch den Austausch des Sauerstoffatoms durch das Kohlenstoffatom wird es ermöglicht, dass zwei verschiedene Seitenketten R1 und R2 aufgenommen werden können. Bedingt durch die jeweilige Seitenkette entstehen individuelle Bisphosphonate, die sowohl ein verschiedenartiges Wirkspektrum als auch eine unterschiedliche antiresorptive Potenz aufweisen.

Durch die grundlegenden Arbeiten zur knochenmineralisierenden und osteotropen Wirkung der Substanzen wurde die Entwicklung der Bisphosphonate zur therapeutischen Verwendung bei metabolischen Knochenerkrankungen von Fleisch et al. (1969) grundlegend vorangetrieben. Daher wird Fleisch auch als der „Vater der Bisphosphonate“ bezeichnet. Heutzutage werden Bisphosphonate nicht nur als Medikament eingesetzt, sondern sind auch ein Inhaltsstoff in Zahnpasten, um der Zahnsteinbildung vorzubeugen, sowie als Zusatz und Weichmacher in Waschmitteln enthalten. Sie werden ebenfalls zur Pasteurisierung sowie Sterilisierung von Nahrungsmitteln und auch als Korrosionsschutz für Metalle genutzt.

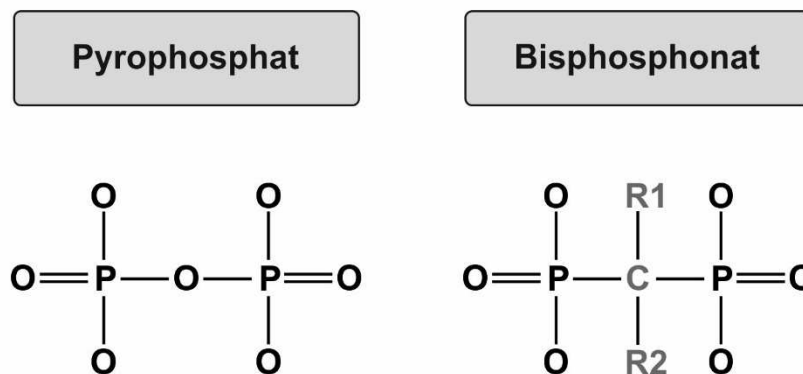


Abbildung 1: Strukturformel Pyrophosphat und Bisphosphonat

Strukturformel von Pyrophosphat (links) und Bisphosphonat (rechts)

1.2.1 Klinische Anwendung der Bisphosphonate

Das Indikationsgebiet für Bisphosphonate liegt heutzutage vor allem in der klinischen Anwendung bei Osteodystrophia deformans (Morbus Paget), Neoplasien im Knochen in Form von Knochenmetastasen bei verschiedenen Tumoren, tumor-assoziierten Hyperkalzämien sowie zur Prophylaxe und Therapie bei postmenopausaler und Glucocorticoid-induzierter Osteoporose (Scriba 2000). Somit ergibt sich eine Indikation für die Anwendung der Bisphosphonate bei allen metabolischen Erkrankungen, welchen eine erhöhte Knochenresorption, bedingt durch eine gesteigerte Aktivität der Osteoklasten, zugrunde liegt. Ein Hauptanwendungsgebiet der Bisphosphonate stellt hierbei jedoch die Osteoporose dar (Shaw und Bishop 2005). Die sogenannten Knochenfiliae, auch Knochenmetastasen, treten besonders häufig bei Mamma-, Prostata-, Nierenzell- oder Lungenkarzinomen auf. Auch beim Krankheitsbild der Osteogenesis imperfecta kann eine Therapie mit Bisphosphonaten ihre Anwendung finden (Rauch und Glorieux 2004).

Die Gabe der Bisphosphonate kann oral oder parenteral stattfinden. Ihre Wirksamkeit ist unabhängig von der Art der Einnahme gewährleistet, jedoch nicht gleich stark. Aufgrund der längeren Halbwertszeit (HWZ) sind Bisphosphonate im Vergleich zu Pyrophosphaten deutlich wirksamer, was durch ihre hohe Affinität zum Calcium-Phosphat und die dadurch entstehende starke Bindung – über je zwei Sauerstoffbrücken – an das Calcium im Knochen begründet ist. Durch ihre Fähigkeit, eine Chelatbindung zu zweiwertigen Atomen wie Magnesium und Calcium herzustellen, dürfen oral verabreichte Bisphosphonate nicht in Kombination mit Milchprodukten eingenommen werden (Lin 1996).

Aufgrund der hohen Lipophilie durch den molekularen Aufbau der Präparate haben oral verabreichte Bisphosphonate lediglich eine Bioverfügbarkeit von 2%. Die Dosierung muss also bei oraler Verabreichung entsprechend angepasst werden. Bei einer intravenösen (i.v.) Gabe liegt die HWZ des Medikaments bei ca. 30 Minuten bis hin zu zwei Stunden. Die zu kalkulierende HWZ hängt außerdem von der Auswahl des Bisphosphonat-Medikaments bzw. der jeweiligen Bisphosphonat-Generation ab, da diese unterschiedlich sind. Ihre Anwendung ist im Allgemeinen nur bei erwachsenen Patienten gestattet. Wegen des Einflusses auf den Knochenstoffwechsel ist die Verwendung bei Säuglingen sowie Kindern unzulässig (Scriba 2000).

Das zentrale sowie vierbindige Kohlenstoffatom der Bisphosphonate verfügt über zwei verschiedene Seitenketten, welche als R1 und R2 bezeichnet werden. Diese haben einen großen Einfluss auf die Potenz der Bisphosphonate, die Plasmaeiweißbindung, die Plasma-HWZ sowie die Knochenbindungsaffinität an die Mineralsubstanz des Knochens (Bartl et

al. 2006). Sie sind maßgeblich für die resorptionshemmenden Eigenschaften, das Wirkspektrum und auch die Effizienz der osteoklastären Knochenresorption verantwortlich. Hierbei trägt R1 in den meisten Fällen eine Hydroxylgruppe und ermöglicht so die Bindung der Bisphosphonate an die Mineralsubstanz der Knochenoberfläche. R2 ist wiederum eine variable Seitenkette und dabei verantwortlich für die Hemmung der osteoklastären Knochenresorption sowie die antiproliferierenden Eigenschaften des jeweiligen Bisphosphonat-Präparats.

Im Laufe der Zeit wurden die Seitenketten der Bisphosphonat-Medikamente mit ihrem jeweiligen Rest immer wieder modifiziert und mehrfach verändert. Dadurch sind die verschiedenen Generationen der Bisphosphonate mit ihren jeweils unterschiedlichen HWZ entstanden. Eine weitere Unterteilung der Bisphosphonate kann in stickstoffhaltige Präparate und nicht stickstoffhaltige Präparate vorgenommen werden. Diese Unterscheidung erfolgt durch das Vorhandensein eines Stickstoffatoms in einem der Kohlenstoffsubstituenten der jeweiligen Substanzklasse der Bisphosphonat-Medikamente.

Die erste Generation der Bisphosphonate verfügt an R2 über eine Alkylseitenkette, die häufig in Form eines Methylrests oder einer Halogensubstitution, z. B. mit einem Chlorrest, vorliegt. Handelt es sich bei R2 um eine Methylgruppe, liegt das Bisphosphonat-Präparat Etidronat vor (Abbildung 2). Weitere Vertreter der ersten Generation sind Clodronat oder Tiludronat. Sie gehören zu den älteren Bisphosphonaten und keines von ihnen verfügt über einen Stickstoffsubstituenten. Daher werden sie auch als sogenannte Nicht-Aminobisphosphonate oder Alkylbisphosphonate bezeichnet.

In der zweiten und auch in der dritten Generation konnte durch die Substitution einer Aminoalkylseitenkette eine Erhöhung der antiresorptiven Eigenschaft erreicht werden. Daher werden beide Generationen auch als Aminobisphosphonate bezeichnet. Das Hinzufügen einer basischen Aminogruppe an der Seitenkette R2 erhöht die Wirkpotenz um den Faktor 10 bis 100 – im Vergleich zu Substanzen ohne einen Aminosubstituenten (Schenk et al. 1986). Vertreter der zweiten Generation sind die Bisphosphonat-Präparate Alendronat oder Ibandronat. Die Substanzen der dritten Generation wurden am Stickstoffatom mit einem Rest substituiert und besitzen basische stickstoffhaltige Heterozyklen an ihrer R2-Seitenkette (Bähr et al. 2013). Dies bewirkt, dass sie weitaus wirksamer sind als die Präparate der früheren Generationen. Arzneistoffe wie Zoledronat oder Risedronat sind typische Bisphosphonate dieser Generation. Durch die Alkylierung des Stickstoffs bzw. die Einführung des N-Heterozyklus weisen die Substanzen der zweiten sowie dritten Generation, im Vergleich zu den Nicht-Aminobisphosphonaten, eine deutlich gesteigerte

Aktivität auf (Takeuchi et al. 1993). Die Potenz der neuen Generationen ist im Vergleich zu Etidronat um bis zu 20.000 mal größer (Bartl und Bartl 2013).



Substanz	Handelsname	R1	R2	Relative Potenz
Etidronat	Didronel®	-OH	-CH ₃	1x
Clodronat	Ostac®	-Cl	-Cl	10x
Pamidronat	Aredia®	-OH	-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	100x
Alendronat	Fosamax®	-OH	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	1000x
Risedronat	Actonel®	-OH	-CH ₂ - 	5000x
Ibandronat	Bondronat® Bonviva®	-OH	-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂ -CH ₃ C ₅ H ₁₁	10000x
Zoledronat	Zometa® Aclasta®	-OH	-CH ₂ -N 	20000x

Abbildung 2: Übersicht und Auflistung der Bisphosphonate

Übersicht der verbreitetsten Bisphosphonat-Medikamente, ihr jeweiliger Handelsname, die zugehörigen Seitenketten R1 und R2 sowie ihre jeweilige relative Wirkpotenz (nach Bartl et al. 2006, S.47). Mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.

1.2.2 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

Bei Bisphosphonaten handelt es sich um synthetische Verbindungen, welche aufgrund ihrer polaren Struktur nur sehr schlecht vom Magen-Darm-Trakt resorbiert werden können. Dies ist vor allem auf ihre unlösliche und feste Calciumkomplexbildung zurückzuführen. Nach einer oralen Einnahme liegt die Bioverfügbarkeit je nach verabreichtem Präparat zwischen 0,5% und 10% (Lin 1996). Über die Blutbahn erfolgt eine systemische Verteilung der Bisphosphonate im Körper. Hier liegen sie größtenteils im Blut an Albumin gebunden vor oder bilden einen Komplex mit zweiwertigen Kationen.

Bisphosphonate werden besonders bevorzugt im Knochen gespeichert. Der einzige Weg zur Ausscheidung der nicht resorbierten Menge erfolgt unverändert und mit gleichbleibender Strukturformel über die Nieren (Scriba 2000). Die vier Kompartimente Magen-Darm-Trakt, Blut, Knochen und Niere sind also klinisch relevant und entscheidend für die Verteilung der Bisphosphonate. Das zentrale Kohlenstoffatom der P-C-P-Bindung sorgt für eine Resistenz gegenüber einer enzymatischen Spaltung (Fleisch 2000). Daher werden die Bisphosphonate bei der Aufnahme in ihrer Strukturformel nicht modifiziert und somit unverändert in den Knochen eingelagert. Nach einer i.v. Applikation beträgt die Serum-HWZ in der Regel zwischen 30 Minuten und 2 Stunden. Beim Bisphosphonat Etidronat liegt eine HWZ von bis zu 6 Stunden vor. Prinzipiell binden die Präparate bevorzugt an Knochenstellen mit einer

hohen Stoffwechsel-Umsatzrate, weshalb keine einheitliche Verteilung im Körper erfolgt (Scriba 2000). Es werden zwischen 30% und 60% der Bisphosphonat-Medikamente innerhalb der ersten Passage im Knochen eingelagert (Scriba 2000). Die Bisphosphonate werden erst dann wieder aus dem Knochen freigesetzt und von den Osteoklasten aufgenommen, wenn das Knochensegment, in welches sie eingefügt wurden, umgebaut und resorbiert wird. Die HWZ im Knochen ist daher von der Umsatzrate des Knochens abhängig und beträgt für gewöhnlich mehr als 10 Jahre (Bähr et al. 2013).

Die exakten Wirkmechanismen der Bisphosphonat-Medikamente sind bis heute nicht vollständig geklärt (Solomayer 2011). Sie sind sehr komplex und bleiben nach wie vor Bestandteil der Forschung. Vom Wirkungsmechanismus sind hauptsächlich die Osteoklasten und die Knochenmineralisation betroffen. Die Bisphosphonate lagern sich – bedingt durch ihre hohe Affinität zum Hydroxylapatit – auf der Knochenoberfläche ab und verhalten sich, solange sie in gebundener Form vorliegen, inert. Aufgrund der hohen Affinität zum Calcium-Phosphat werden sie in großer Menge an den Knochen angeschwemmt und binden hier vor allem an die freien Calcium-Phosphat-Kristalle, die besonders in den Umbauzonen sowie Resorptionslakunen arrodierter Knochenoberflächen vorhanden sind. An diesen Stellen werden sie von den Osteoklasten resorbiert und führen danach bei diesen zu einer Veränderung des Zytoskeletts sowie zu einem Zellaufschluss und einer Zellinaktivierung (Abbildung 3). Des Weiteren kommt es zu einem Verlust des Aktinrings und zu einer Retraktion des Faltsaums, des sogenannten *ruffled border*, an der Basis-Seite der Osteoklasten (Sato et al. 1991). Im Intrazellularraum der Osteoklasten bilden sich Vakuolen aus und es erfolgt eine Depolymerisierung der Mikrotubuli. Die gesamte basolaterale Membran wird hierbei verändert und geschädigt (Abbildung 3). Auch die Säureproduktion verringert sich und die Bindung an den Knochen wird durch die dort auf der Oberfläche vorhandenen Bisphosphonate gestört (Rogers et al. 1997). Darüber hinaus bewirken die Bisphosphonat-Medikamente eine Verminderung der zellulären Leistungen und Mechanismen in den Osteoklasten, z. B. die Synthese prenylierter Proteine wie des RAS-, RHO-, RAB- und RAC-Proteins (Bartl et al. 2006). Diese sind nicht nur essentiell für die Zellfunktionen, sondern auch für vesikuläre Zell- und Membrantransporte wichtig.

Als Konsequenz der Wirkungsweise an den Osteoklasten folgt der Verlust der Resorptionsfähigkeit der osteoklastären Zellen. Darüber hinaus kann durch die Bisphosphonate eine Apoptose der Osteoklasten induziert werden (Hughes et al. 1995). Für die Apoptose sind zwei verschiedene Signaltransduktionswege zu unterscheiden, wobei der Wirkmechanismus bei den stickstofffreien und stickstoffhaltigen Bisphosphonaten variiert.

Beide Gruppen wirken sich auf den Mevalonatstoffwechsel aus und behindern diesen auf unterschiedliche Art und Weise. Durch den Mevalonatzyklus erfolgen ausgehend über die Umwandlung von Acetyl-CoA die Biosynthese von Isoprenoiden und der mögliche Aufbau von Steroiden über entstehende Zwischenprodukte. Zu diesen Produkten gehören Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP) und Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP), die Grundstoffe für die Cholesterin- sowie auch die Steroidbiosynthese sind (Rauthan und Pilon 2011).

Stickstofffreie Bisphosphonate wie Clodronat, Etidronat und Tiludronat induzieren in den Osteoklasten – aufgrund der engen Verwandtschaft zum Pyrophosphat mit Adenosinmonophosphat – die Bildung eines nicht hydrolysierbaren Adenosintriphosphat(ATP)-Analogons (Rogers et al. 2011). Das entstandene ATP-Analogon kann keine Energie bereitstellen und wirkt durch eine entstehende Akkumulation zytotoxisch auf die Zelle. Es stört die vorhandenen Stoffwechselforgänge, die für die Energiegewinnung in Form von ATP-Spaltung durchaus wichtig sind (Russell 2011). Hauptangriffspunkt ist hierbei die Metabolisierung von Mevalonat zu IPP, wofür die ATP-Analoga nicht als Energielieferant zur Verfügung stehen können (Abbildung 4). Das Stören dieser für die Osteoklasten lebensnotwendigen Prozesse beeinträchtigt deren Zellfunktion und führt zum Einleiten der Apoptose.

Die Vertreter der stickstoffhaltigen Bisphosphonat-Präparate, wie z. B. Alendronat, Ibandronat, Pamidronat sowie Zoledronat, greifen ebenfalls in den Mevalonatstoffwechsel ein und inhibieren diesen auf zwei weitere unterschiedliche Weisen. Aminobisphosphonate der zweiten Generation inhibieren kompetitiv die enzymatische Umwandlung von DMAPP zu Geranylpyrophosphat (GPP). Die dritte Generation der Bisphosphonate hemmt zusätzlich die anschließende enzymatische Reaktion der Umwandlung von GPP zu Farnesylpyrophosphat bzw. Geranylgeranylpyrophosphat. Durch diese Inhibition wird die Lipidkettenbildung verhindert, welche für die Guanosintriphosphat(GTP)-asen zur Signalübertragung auf die Zellmembran nötig ist. GTPasen sind kleine Membranproteine, die sich durch die Farnesyl- und Geranylgeranylketten in der Zellmembran verankern und eine signaltransduktorische Wirkung auf eine Vielzahl von Zellfunktionen ausüben. Durch das Stören dieser für die Osteoklastenzelle essentiellen Stoffwechselforgänge verliert die Zelle ihre membran-spezifischen Eigenschaften und es folgt die Einleitung der Apoptose.

Die Wirkmechanismen üben primär einen Einfluss auf die Osteoklasten aus, gelten aber ebenso für andere Zellen, in denen sich Bisphosphonate in genügender Konzentration anreichern (Bartl et al. 2006). Außerdem werden auch weitere Mechanismen und Stoffwechselprozesse durch die Medikamente beeinflusst. Neben der Wirkung auf die Osteoklasten können Bisphosphonate eine Tumorzelladhäsion an der Knochenoberfläche

vermeiden und eine Unterdrückung der Neoangiogenese erreichen sowie in hoher Dosierung auch eine tumorizide Wirkung entfalten (Solomayer 2011). Hierbei führen vor allem die stickstoffhaltigen Bisphosphonat-Präparate (zweite und dritte Generation) zu einer Zytostase und induzieren die Apoptose als programmierten Zelltod der Tumorzellen.

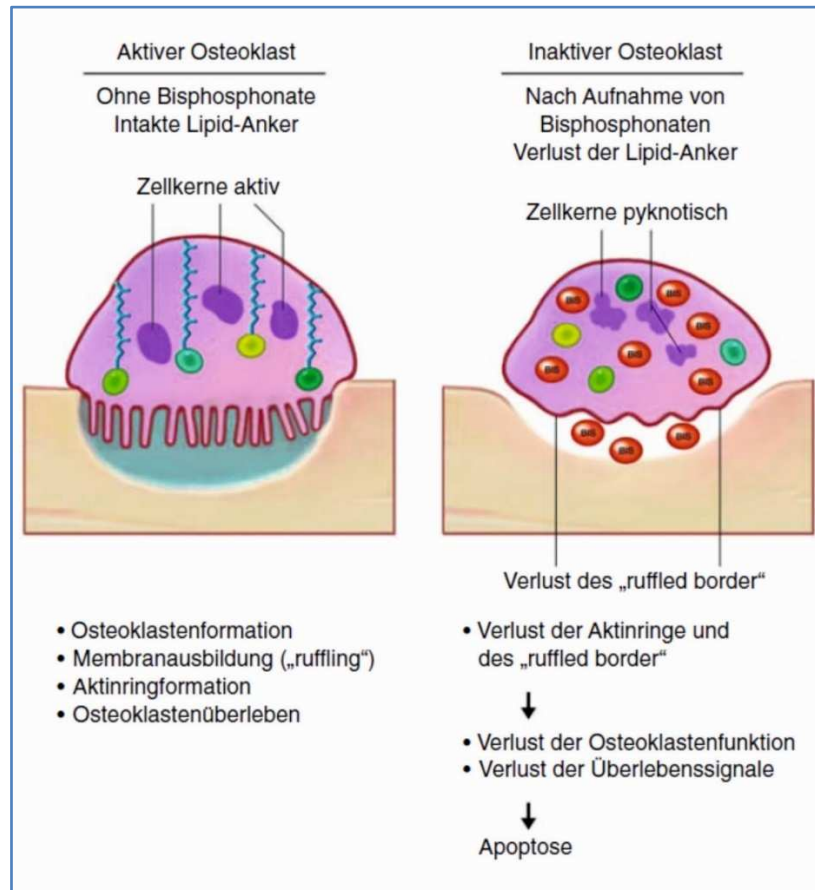


Abbildung 3: Phagozytose der Bisphosphonate in Osteoklasten

Aufnahme und Phagozytose der Bisphosphonate (rot) aus den Resorptionslakunen des Knochens in einem Osteoklasten. Resultierende Inaktivierung, Zellyse und Apoptose des Osteoklasten (Bartl et al. 2006, S.67). Mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.

Die dargestellte Abbildung ist in zwei Teile gegliedert. Auf der **linken Seite** ist ein gesunder und aktiver Osteoklast zu sehen. Der Osteoklast verfügt über intakte Lipidanker an seiner basolateralen Membran und über physiologisch aktive Zellkerne im Lumen. Durch die korrekte Membranausbildung sowie Osteoklasten-Formation wird die Resorption des Knochens gewährleistet. Die zellulären Leistungen sowie Prozesse des gesunden Osteoklasten sind nicht beeinträchtigt. Sein Zytoskelett liegt physiologisch formiert vor.

Auf der **rechten Seite** ist ein inaktiver Osteoklast nach der Phagozytose der Bisphosphonate aus dem Knochen zu erkennen. Die basolaterale Membran des Osteoklasten ist verändert und seine Lipidanker sind nicht mehr vorhanden. Es kommt zu einem Verlust des osteoklastären Faltensaums (*ruffled border*). Das innere Zytoskelett ist deformiert und die Mikrotubuli sind depolymerisiert. Die Aktinringformation ist gestört. Die Zellkerne im Lumen des Osteoklasten sind pyknotisch und inaktiviert. Die Knochenresorption ist gestört und der Osteoklast verliert seine Funktion sowie Überlebenssignale. Die Konsequenz ist die Apoptose der Zelle.

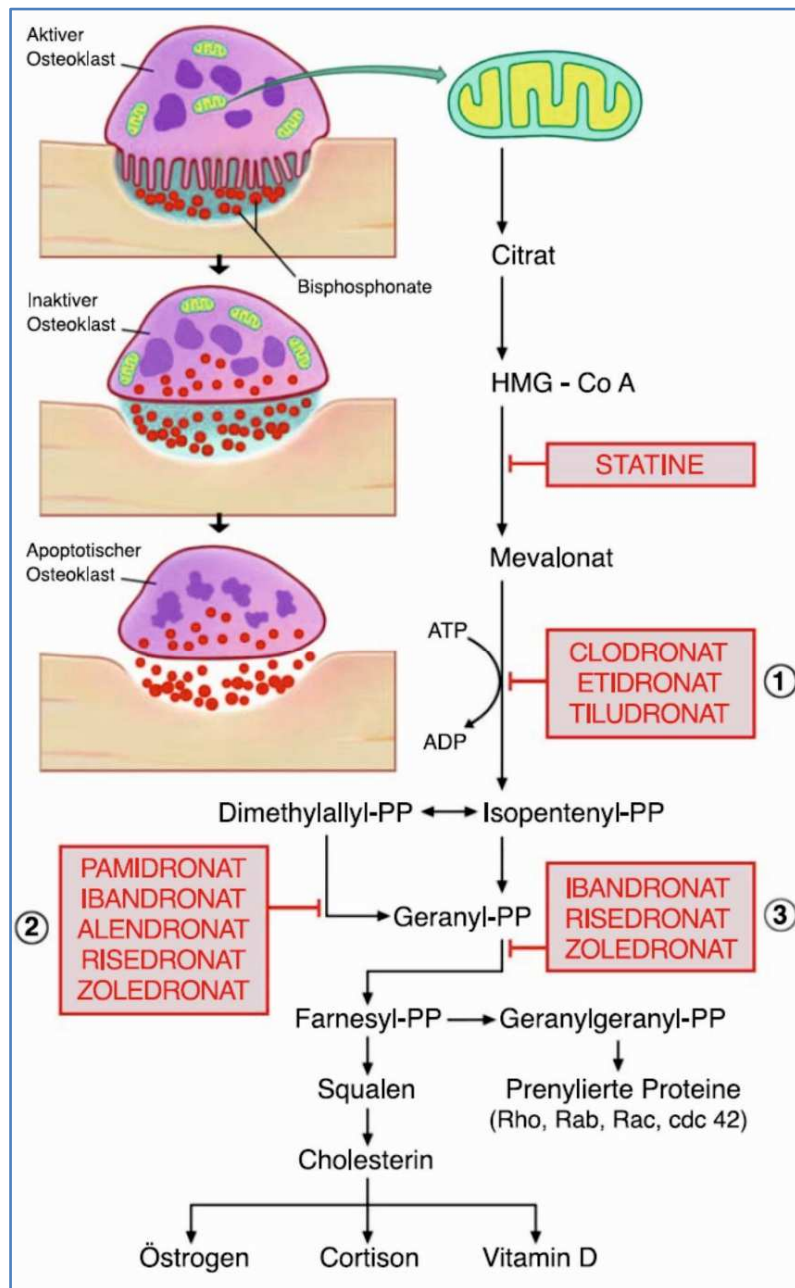


Abbildung 4: Wirkmechanismen der Bisphosphonate im Osteoklasten

Zelluläre und biochemische Wirkmechanismen der Bisphosphonat-Präparate im Osteoklasten: **Oben links** im Bild sind die Bisphosphonate erkennbar, welche sich auf der Knochenoberfläche abgelagert haben und in den Resorptionslakunen der darüber liegenden Osteoklasten befinden. Bei der Resorption des Knochens resorbieren die Osteoklasten die Bisphosphonate und werden durch sie inaktiviert. Es kommt zu einem Verlust des osteoklastären Faltensaums. Bei hoher Dosisgabe der Bisphosphonat-Medikamente kommt es direkt zur vermehrten Einleitung der Apoptose der Osteoklasten. **Oben rechts** im Bild sind der Ablauf und Weg der Biosynthese der Sterine sowie Isoprenoide dargestellt, welche physiologisch im Zytoplasma der Osteoklasten ablaufen. ①, ②, ③: Beschriftung der unterschiedlichen Generationen der Bisphosphonate mit ihren jeweiligen Angriffspunkten im Osteoklasten-Stoffwechsel. Die zweite und dritte Generation der Bisphosphonate führt zu einer Aufstauung von IPP in den Zellen und löst somit eine Akute-Phase-Reaktion aus (Bartl et al. 2006, S.61). Mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.

1.2.3 Wirkungen und Nebenwirkungen der Bisphosphonate

Bisphosphonat-Medikamente sind prinzipiell gut verträglich, können aber bei der Therapie dennoch zu unerwünschten Nebenwirkungen führen, über welche die Patienten vor Therapiebeginn ausführlich aufgeklärt werden müssen. Bedingt durch ihren sauren Charakter und niedrigen pH-Wert können Schleimhautschädigungen im Mund- sowie Rachenraum auftreten. Daher sollten oral verabreichte Präparate mit ausreichend Flüssigkeit eingenommen werden und der Patient sollte bis 30 Minuten nach der Einnahme nicht waagrecht liegen, um die Ösophagus- und Magenschleimhaut zu schützen (Scriba 2000). Weitere gastrointestinale Nebenwirkungen sind möglich und können sich in Form von Übelkeit, Diarrhoe und Magenschmerzen äußern. Bei stickstoffhaltigen Präparaten ist sehr selten auch eine ulzerierende Ösophagitis möglich. Die Einnahmевorschriften sollten daher unbedingt eingehalten werden (Bartl et al. 2006).

Bei Patienten, denen Bisphosphonate i.v. verabreicht wurden, konnten besonders in den ersten Behandlungszyklen grippeähnliche Symptome wie Schüttelfrost, Abgeschlagenheit und Fieber mit einem reversiblen Lymphozytenabfall im Sinne einer Akute-Phase-Reaktion beobachtet werden (Lim et al. 2010). Die Einleitung der Akute-Phase-Reaktion entsteht durch die Inhibierung der enzymatischen Umwandlung im Mevalonatsäurestoffwechsel der Osteoklasten, wodurch ein Rückstau von IPP zustande kommt. Auf diesen Rückstau reagieren die Zellen mit einer erhöhten Ausschüttung des Tumornekrosefaktors- α sowie Interferon- γ , was wiederum zu einem Anstieg von Interleukin-6 führt. Dieses fungiert als Mediator einer systemischen Entzündung und ist für die charakteristischen sowie grippeähnlichen Symptome mit einhergehendem Temperaturanstieg verantwortlich. Um die Akute-Phase-Reaktion möglichst zu vermeiden, wird eine einschleichende Therapie mit niedriger Erstdosierung empfohlen (Bartl et al. 2006). Darüber hinaus können sowohl eine Anämie oder Obstipation als auch Myalgien sowie Arthralgien bei der Behandlung auftreten.

Okuläre Nebenwirkungen in Form von Augenbeschwerden und Sehstörungen treten eher selten auf, können jedoch in Verbindung mit dem Präparat Pamidronat in Einzelfällen vorkommen. Bei den betroffenen Patienten liegen hierbei oft entzündliche Reaktionen als Ursache vor, die zu einer Konjunktivitis, Uveitis oder auch einer erweiterten Retinitis führen können. Diese bilden sich jedoch nach dem Absetzen des Bisphosphonat-Präparats zurück und sind reversibel.

Eine akute Toxizität ist in Form einer Hypokalzämie möglich und entsteht durch die Komplexbildung mit Calcium im Blutserum. Die Hypokalzämie ist häufig symptomlos und lässt sich über die Überwachung der Infusionsgeschwindigkeit bei einer i.v. Gabe vermeiden.

Besonders auch renale Nebenwirkungen mit Schädigungen bis hin zu einem akuten Nierenversagen können bei hohen Dosierungen und vor allem durch zu schnelles Verabreichen der Infusionen auftreten. Daher ist eine i.v. Applikation stets langsam und in niedriger Konzentration durchzuführen, da nur bei Berücksichtigung dieser Faktoren bisher keine Nierenschäden aufgetreten sind. Bereits in der Vergangenheit wurde über Mineralisationsstörungen in Form einer Osteomalazie berichtet, welche jedoch durch die parallele Gabe von Calcium und Vitamin D bei der i.v. Applikation vermieden werden konnten.

Weitere unerwünschte Nebenwirkungen bei der Therapie mit Bisphosphonaten sind die BRONJ, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

1.2.4 Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen (BRONJ)

Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen gelten als eine der schwerwiegendsten Nebenwirkung im Zusammenhang mit einer Bisphosphonat-Therapie. Ihre genaue Symptomatik und ihre Ursachen sind bis heute nicht im Detail geklärt, sie erfordern jedoch eine spezielle sowie gezielte Behandlung.

Seit dem Jahr 2003 sind die ersten Fallberichte über Kiefernekrosen im Rahmen einer Bisphosphonat-Therapie bekannt und Gegenstand der Forschung (Marx 2003). Die vollständige Anerkennung der Zusammenhänge für die auftretende, schwere Nebenwirkung und die daraus resultierende Problematik erfolgte erst bei einer Tagung der Hämatologengesellschaft im Jahr 2005. Bei dieser Zusammenkunft der Fachärzte bestätigten die vielen vorhandenen Fallberichte, dass das Ausmaß der BRONJ größer ist als zuvor angenommen wurde und die antiresorptiven Kiefernekrosen von ursprünglichen 1,8% auf 12% angestiegen sind.

Ab diesem Zeitpunkt war es klar, dass es sich bei der BRONJ um ein globales Krankheitsbild handelt, welches nicht ignoriert werden darf (Ruggiero 2009).

Die BRONJ ist definiert als ein mehr als acht Wochen freiliegender Knochen, bei welchem eine Radiotherapie in zeitlichem Zusammenhang mit der antiresorptiven Therapie ausgeschlossen werden kann (Ruggiero et al. 2009). Des Weiteren muss eine Einnahme von Bisphosphonat-Medikamenten stattgefunden haben. Diese drei festgelegten Kriterien sowie Charakterisierungen müssen laut den anerkannten Gesichtspunkten der Fachgesellschaft American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAMOS) vorliegen, um eine BRONJ zu diagnostizieren. Diese Definition wurde so erstmalig im Jahr 2007 festgelegt.

Außerdem erfolgt nach Ruggiero eine Einteilung in verschiedene Stadien der Kiefernekrosen (Tabelle 1), die durch die AAMOS anerkannt ist und ebenfalls in der S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (DGMKG) für Antiresorptiva-assoziierte Kiefernekrosen aufgeführt wird (Ruggiero et al. 2009; Schiegnitz et al. 2018).

Das Krankheitsbild einer BRONJ tritt meistens in Kombination mit einer schweren sowie malignen, allgemeinen Grunderkrankung auf, die gleichzeitig die Ursache für die Bisphosphonat-Medikation ist (Shaw und Bishop 2005).

Klinisch lassen sich intraoral häufig nicht heilende Extraktionsalveolen oder ein spontan offen liegender Kieferknochen mit erhöhter Sequesterbildung erkennen. Die Differenzierung einer BRONJ zu einer infizierten Osteoradionekrose ist rein klinisch nur sehr schwer möglich. Neben dem freiliegenden Knochen sind begleitende Symptome wie *Foetor ex ore*, Schmerzen an betroffenen Kieferstellen, spontane Sensibilitätsstörungen (Vincent Syndrom), Missempfindungen, Dysästhesie des *Nervus alveolaris inferior*, Zahnlockerungen, exsudative sowie ödematöse Schwellungen der umliegenden Weichgewebe, Kieferkammfisteln oder purulentes Exsudat möglich (Marx et al. 2005; Dannemann et al. 2006; Woo et al. 2006; Otto et al. 2009; Ruggiero et al. 2009). Der in der Mundhöhle freiliegende Knochen stellt sich häufig gräulich oder bräunlich-gelb dar und ist bimssteinartig-porös (Voss und Walter 2013). Der Krankheitsverlauf kann jedoch ebenso asymptomatisch sein und vorerst zu keinen Beschwerden führen (Marx et al. 2005).

Rund 60% der auftretenden Osteonekrosen entstehen nach zahnärztlichen Eingriffen bei Patienten, die mit Bisphosphonat-Medikamenten therapiert werden (Woo et al. 2006). Dabei traten 95% der BRONJ-Erkrankungen nach i.v. Verabreichung sowie hoher Dosis bei malignen Neoplasien auf und lediglich 5% bei oraler Gabe während einer Osteoporose-Therapie (Favus 2007).

In zwei Dritteln aller Fälle ist die Mandibula der Patienten betroffen und lediglich zu einem Drittel die Maxilla (Woo et al. 2006). Es können jedoch auch beide Kiefer betroffen sein (Bagan et al. 2006). Das Entstehen einer BRONJ kann ebenfalls aufgrund von chronischen Druckstellen durch prothetischen Zahnersatz in Form von Teil- bzw. Totalprothesen begünstigt werden. Zahnextraktionen, Parodontopathien sowie oralchirurgische Eingriffe und endodontische Behandlungen stellen demnach Triggerfaktoren für die Erkrankung dar. Eine sekundäre Wundheilungstendenz der umgebenden Weichteile einer Kieferknochennekrose durch Ausbildung von Granulationsgewebe bleibt aus und wird durch die antiangiogenetischen Effekte der Bisphosphonate herabgesetzt.

Es wird vermutet, dass die Entstehung der Nekrosen besonders durch die physiologisch bereits vorhandene, hohe Keimkolonisierung der Mundhöhle und die verhältnismäßig dünne Epithelschicht der Mukosa, welche die Kieferknochen bedeckt, begünstigt wird. Beide Faktoren bergen ein hohes Risiko für eine Knocheninfektion. Des Weiteren ist ein direkter Kontaktweg zu den Bakterien und Keimen der Außenwelt vorhanden, was das Infektionsrisiko ebenfalls erhöht. Der Entstehung einer BRONJ liegt demnach ein multifaktorielles Geschehen in Verbindung mit verschiedenen Kofaktoren zugrunde. Pathogenese und Kausalität der BRONJ sind derzeit noch nicht vollständig geklärt. Bisher werden lediglich verschiedene Ansätze und Theorien in der wissenschaftlichen Literatur diskutiert, weshalb die BRONJ auch häufig als „pathogenetisches Puzzle“ bezeichnet wird.

Neben den bereits beschriebenen Ansätzen ist die Theorie des verminderten *Bone-Remodeling* eine weitere Hypothese für die Entstehung einer BRONJ. Die Hypothese beruht auf der durch die Bisphosphonate induzierten Hemmung der physiologischen Knochenumbauprozesse und der Störung des natürlichen Remodelings des Kieferknochens. Diese Hemmung begünstigt vor allem die Entstehung von Mikrofrakturen und führt zu einer mangelhaften Mineralisation im Kieferknochen (Komatsubara et al. 2004). Die Kieferknochen zeichnen sich durch ihre besonders hohe Umbaurate im Vergleich zu anderen Knochenstrukturen aus. Grund dafür sind die hohen mechanischen Belastungen, welche physiologisch an die Kieferknochen herantreten. Des Weiteren gibt es die Theorie der antiangiogenetischen Wirkung von Bisphosphonat-Medikamenten. Hierbei soll die Entstehung avaskulärer Knochennekrosen durch den hemmenden Einfluss auf die Angiogenese begünstigt werden und schließlich zum Krankheitsbild einer BRONJ führen.

Der Verlust des Knochengewebes bedingt zahlreiche Komplikationen für die betroffenen Patienten. Neben daraus resultierenden Zahnverlusten, pathologischen Knochen- sowie Kieferfrakturen kann es zu erheblichen Beeinträchtigungen der Kaufunktion kommen. Schluck- und Sprachprobleme sowie auch gravierende Folgen für die ästhetische Integrität des Gesichts sind nicht unwahrscheinlich, wenn Teile des Kiefers durch eine chirurgische Therapie entfernt werden müssen. Alle Faktoren haben nicht nur auf die Lebensqualität, sondern auch auf das soziale Umfeld der Patienten einen beträchtlichen Einfluss. Sie können schwere psychische Konsequenzen mit sich bringen, die ebenfalls bei der Behandlung vorab berücksichtigt werden müssen.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose (BRONJ)

BRONJ-Stadium	Klinischer Befund	Präsentation/Symptomatik
0	keine Knochennekrose nachweisbar und kein freiliegender Knochen intraoral; unspezifische radiologische Zeichen (z. B. Verminderung alveolarer Knochensubstanz, Verengung des Canalis mandibularis)	unspezifische Symptome (z. B. Zahnschmerzen, Schmerzen im Bereich des Unterkiefers, Kieferhöhlenschmerzen, Lockerung von Zähnen, Vincent-Syndrom)
1	freiliegende Knochennekrose ohne Infektionsnachweis	asymptomatisch
2	freiliegende Knochennekrose mit Infektionsnachweis in Assoziation mit Schmerzen sowie Schwellung; radiologisch ausgedehnte Osteolyse	symptomatisch Schmerzen, Rötung, purulentes Exsudat
3	freiliegende Knochennekrose mit Infektionsnachweis sowie radiologische Zeichen einer Osteolyse bis an den Unterkieferrand oder an großen Teilen des Oberkiefers. Zusätzlich mindestens eine der folgenden Komplikationen: <ul style="list-style-type: none"> • pathologische Fraktur • Fistelung nach extraoral • Nachweis einer Mund-Antrum-Verbindung • Ausbreitung der Osteolyse auf den Unterkieferunterrand oder Sinus maxillaris 	symptomatisch

Die Tabelle wurde modifiziert nach Ruggiero (Ruggiero et al. 2009, S.7)

1.2.5 Prophylaxe sowie Therapie

1.2.5.1 Prophylaxe

Die Prävention einer BRONJ hat im Rahmen der Bisphosphonat-Therapie einen signifikant hohen Stellenwert (Woo et al. 2006; Schiegnitz et al. 2018). Sie ist zielorientiert und strukturiert zu gestalten. Daher muss die Minimierung der Risikofaktoren für die Entstehung sowie Begünstigung von Kiefernekrosen bereits vor Behandlungsbeginn höchste Priorität haben. Hierzu ist eine ausführliche Aufklärung der Patienten nötig (Koy et al. 2015; Schiegnitz et al. 2018). Auch die interdisziplinäre Zusammenarbeit der behandelnden Ärzte hat einen sehr großen Einfluss auf die Prävention. Nach aktueller Kenntnislage entwickeln Patienten mit einer i.v. Gabe der Bisphosphonat-Medikamente und anschließendem

zahnärztlich-chirurgischen Eingriff vermehrt eine BRONJ. Es erscheint dementsprechend obligat, dass vor Behandlungsbeginn mit der Bisphosphonat-Therapie eine besonders detaillierte, eingehende zahnärztliche Untersuchung, die sogenannte Fokussuche, bei den betreffenden Patienten erfolgen muss.

Die wichtigste Aufgabe der Fokussuche besteht darin, die spätere Notwendigkeit zahnärztlicher Interventionen und Eingriffe so gering wie möglich zu halten, wenn nicht gar vollständig zu vermeiden. Fast jeder zahnärztlich-chirurgische Eingriff ist mit einem daraus resultierenden dentoalveolären Trauma verbunden und beinhaltet somit das Risiko einer potenziellen Wundinfektion. Daher ist eine Kontrolle des Patienten beim Zahnarzt vor Therapiebeginn unumgänglich. Falls indiziert und möglich, muss eine sehr gründliche Zahnsanierung vorab erfolgen. Mehrere Studien bestätigen, dass die präventive Therapie vor Behandlungsbeginn mit Bisphosphonat-Medikamenten das Auftreten einer BRONJ signifikant verringern kann (Bartl et al. 2006; Woo et al. 2006; Dimopoulos et al. 2009; Ruggiero et al. 2009; Koy et al. 2015).

Zur zahnärztlichen Pflicht gehört dabei die Entfernung aller Zähne mit fragwürdiger Prognose und derjenigen, die nicht mehr erhaltungswürdig sind. Vorhandene Kariesläsionen der Zähne von betroffenen Patienten sind konservierend zu versorgen, sofern die Zeit vor dem geplanten Therapiebeginn dies zulässt. Die verbleibende Dentition sollte die Karenz zahnärztlicher Behandlungen während der Therapie sicher überstehen können. Anderenfalls kann sie später potentiell zu einem unvermeidbaren zahnärztlichen Eingriff führen. Auch korrektiv chirurgische Eingriffe können vor einer Bisphosphonat-Therapie nötig sein, um z. B. eine Vorbereitung oder Verbesserung eines Prothesenlagers herzustellen. Weitere präprothetische Eingriffe, wie die Entfernung von Exostosen, Tori oder Schlotterkämmen bei zahnlosen Kiefern, können ebenso indiziert sein. Das Entfernen harter und weicher Zahnbeläge sowie das Durchführen einer indizierten Parodontalbehandlung gehören ebenfalls zu den präventiven Maßnahmen. Impaktierte sowie retinierte Weisheitszähne sollten vor Therapiebeginn entfernt werden. Das Abwarten der Wundregeneration sowie das Ausbilden einer vollständigen Epithelialisierung der durch die Eingriffe entstandenen Wunden ist, wenn möglich und sofern die Behandlungssituation sowie der Patientenzustand dies zulassen, abzuwarten (Dimopoulos et al. 2009). Erst danach sollte die erste Dosisgabe verabreicht werden. Es ist wichtig, dass, falls vorhanden, auch der herausnehmbare Zahnersatz der Patienten regelmäßig überprüft wird. Je nach vorliegendem Befund muss dieser nachträglich angepasst werden, um eine optimale und druckstellenfreie Passung im Patientenmund zu erzielen (Koy et al. 2015). Eine unausgeglichene sowie zu punktuelle

Kraftübertragung auf die unter dem Tegument liegenden Kieferknochen kann eine BRONJ begünstigen. Im Verlauf der Therapie sind regelmäßige, in kurzem Abstand getaktete Kontrolltermine einzuhalten, um mögliche Anzeichen einer Nekrose frühzeitig zu diagnostizieren. Die *Patienten-Compliance* und häusliche Mundhygiene sind ebenfalls stets zu beobachten und zu kontrollieren. Dies ermöglicht gleichzeitig eine kontinuierliche Remotivation der Patienten und eine Verbesserung ihrer Sensibilisierung. Das Anfertigen von Orthopantomogramm-Röntgen-Aufnahmen sollte bei den Kontrollterminen nach Indikationsvorgabe berücksichtigt werden, um Veränderungen und mögliche Beherdungen in den Kieferknochen frühzeitig ausfindig machen zu können.

Falls während einer laufenden Bisphosphonat-Therapie doch ein zahnärztlich-chirurgischer Eingriff notwendig sein sollte, muss eine systemische Antibiotikagabe vor der Behandlung und bis zum Tag der Fadenentfernung stattfinden. Bei Zahnextraktionen ist immer eine plastische Deckung durch einen präparierten Mukosa- oder Mukoperiostlappen zu erzielen. Hierbei hat die subperiostale Präparation (Mukoperiostlappen) gegenüber der epiperiostalen Präparation (Mukosalappen) ein geringeres Risiko für die Entstehung einer BRONJ als Folgekomplikation (Schiegnitz et al. 2018). Scharfe Knochenkanten gilt es zu vermeiden und sie müssen zum Schutz der Kontinuität der darüber liegenden Mundschleimhaut strikt geglättet werden. Zusätzlich sollte eine antiseptische Spülung mit Chlorhexidin, welches eine bakterizide sowie bakteriostatische Wirkung hat, in 0,2%-iger Konzentration erfolgen. Während der laufenden Therapie ist bei den Kontrollen besonders auf einen *Factor ex ore* bei den Patienten zu achten, da dieser ein primärer Hinweis auf eine BRONJ ist.

1.2.5.2 Therapie der BRONJ

Die Therapie richtet sich nach den jeweiligen BRONJ-Stadien (Tabelle 1). Je nach Stadium unterscheiden sich die Behandlungsempfehlungen (Ruggiero et al. 2009). Grundsätzlich wird jedoch zwischen einer konservativen und einer chirurgisch-operativen Therapie unterschieden.

Im **Stadium 0** ist keine Kiefernekrose nachweisbar. Je nach vorliegenden klinischen Symptomen wird ggf. eine systemische Behandlung mit Antibiotika und bei Bedarf auch mit Analgetika empfohlen.

Für **Stadium 1** werden antiseptische Mundspüllösungen, vierteljährliche Kontrolluntersuchungen mit zielorientierter Patientenaufklärung sowie eine Indikationsüberprüfung mit daraus eventuell resultierender Pausierung der Bisphosphonat-Therapie vorgeschlagen.

Bei **Stadium 2** ist neben den antiseptischen Mundspüllösungen eine gezielte erregerspezifische Antibiotika- und Analgetika-Gabe vorgesehen. Darüber hinaus wird ein oberflächliches chirurgisches Debridement als minimalinvasive Therapie empfohlen.

Stadium 3 erfordert neben den in Stadium 2 bereits aufgelisteten Behandlungsmethoden ein erweitertes chirurgisches Debridement inklusive einer Dekortikation des Kieferknochens und einem darauf folgenden plastischen Wundverschluss. Zusätzlich können ausgedehnte chirurgische Eingriffe in Form von Kieferteil- bis hin zu vollständigen Kieferkontinuitätsresektionen notwendig sein (Marx et al. 2005). Kritisch zu beurteilen ist hierbei die nicht vermeidbare Entfernung von physiologisch gesunden Abschnitten des Kieferknochens, um die Resektionsenden während des chirurgischen Eingriffs gesichert im gesunden Knochenbereich festlegen zu können.

An dieser Stelle gibt es ebenfalls einen Unterschied zur S3-Leitlinie der DGMKG, die im Gegensatz zur AAMOS bereits in früheren Stadien ein chirurgisches Vorgehen befürwortet (Schiegnitz et al. 2018). Hierbei wird der zu operierende Bereich großzügig chirurgisch eröffnet und eine vollständige Entfernung des nekrotischen Knochens bis hin zu den makroskopisch eindeutig identifizierbaren Blutungspunkten angeraten. Ziel ist ein vitaler Resektionsrand mit makroskopisch sichtbar intaktem Knochen und einem gesunden Knochenmark. Einer weiteren Progression der Erkrankung soll mit dem operativen Eingriff entgegengewirkt werden. Es folgen das obligate Glätten aller entstandenen scharfen Knochenkanten sowie ein spannungsfreier Wundverschluss mit Hilfe einer sorgfältigen plastischen Deckung. Sollte das vorhandene Weichgewebe nicht für eine plastische Deckung ausreichen, ist diese auch mit Hilfe eines Mukoperiostlappens nach Rehrmann möglich. Der entstandene Knochendefekt muss, falls nötig und je nach vorliegender Defektgröße, mit einem xenogenen Collagenvlies oder einem autologen Knochentransplantat (z. B. aus dem Beckenkamm) aufgefüllt werden. Eine *Platelet-Rich-Fibrin*-Membran kann dabei zusätzlich als eine aus Eigenblut – durch Zentrifugation – gewonnene Barrierschicht für die Bakterien der Mundhöhle – zwischen Kieferknochen und Mukosa – eingebracht werden.

Das freigelegte nekrotische Knochenmaterial wird histopathologisch untersucht, um mögliche Metastasen oder Manifestationen ausschließen zu können (Koy et al. 2015). Auch eine Therapieunterbrechung, ein sogenanntes „*Drug-holiday*“, wird in der Literatur kontrovers diskutiert und muss kritisch betrachtet werden. Aufgrund der langen HWZ der Bisphosphonate im Knochen können diese auch nach dem Absetzen der Medikamente noch weiterhin in den Knochen vorhanden sein. Außerdem steigt das Risiko für die eigentliche Indikation der Medikamenteneinnahme und beinhaltet so beispielsweise ein deutlich

erhöhtes Risiko für pathologische Frakturen bei den vorliegenden Grunderkrankungen wie Osteoporose oder den malignen Knochenerkrankungen. Das Kosten-Nutzen-Verhältnis ist hierbei stets besonders zu berücksichtigen, da häufig die entstehenden Konsequenzen durch das Absetzen drastischer sind als die BRONJ selbst. Das Letalitätsrisiko ist ebenfalls größer als bei einer antiresorptiven Kieferknochennekrose. Daher sollte stets individuell, fallbezogen sowie interdisziplinär mit Absprache aller behandelnden Ärzte eine Entscheidung getroffen werden.

1.3 Aufgabenstellung und Studienziel

Die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose tritt aufgrund der stets weiter zunehmenden Fallzahl betroffener Patienten zunehmend im Behandlungsalltag des Kieferchirurgen sowie Zahnarztes auf und wird somit durchaus präsent für das Tätigkeitsfeld in der heutigen Zahnmedizin. Im Hinblick darauf rückt das wissenschaftliche Interesse an antiresorptiven Kiefernekrosen, im Kontext der Bisphosphonat-Therapie, immer mehr in den Fokus der Forschung. Dabei wird schnell klar, dass bei zunehmender Fallzahl der BRONJ immer noch unzureichende Erkenntnisse über die genauen histologischen Auswirkungen sowie den Nachweis und das Vorkommen verschiedener Marker-Proteine in den histologischen Knochenpräparaten vorliegen.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, das Vorhandensein, die jeweilige Lokalisation und auch eine Quantifizierung von knochenspezifischen Markern in den erkrankten Kieferknochenproben auszuwerten. Hierbei soll ein Vergleich zu gesunden Kieferknochenproben hergestellt werden.

Es wurden die folgenden Nullhypothesen überprüft:

1. Es sind Osteogenese-Faktoren sowie knochenspezifische Marker im Knochengewebe des Kieferknochenprobenmaterials mit einer entwickelten BRONJ vorhanden, die ebenso im gesunden Knochengewebe auftreten.
2. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den gesunden und den erkrankten Kieferknochenproben hinsichtlich der relativen Quantifizierung der Zell-Detektionen von den jeweiligen Marker-Proteinen.
3. Es bestehen durch die pathologische Veränderung des Knochengewebes keine Unterschiede bei der Lokalisation der verschiedenen spezifischen Marker-Proteine zwischen den gesunden und erkrankten Kieferknochenproben.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Die Übersichtsdarstellung in Abbildung 5 zeigt schematisch den Versuchsablauf der Studie:

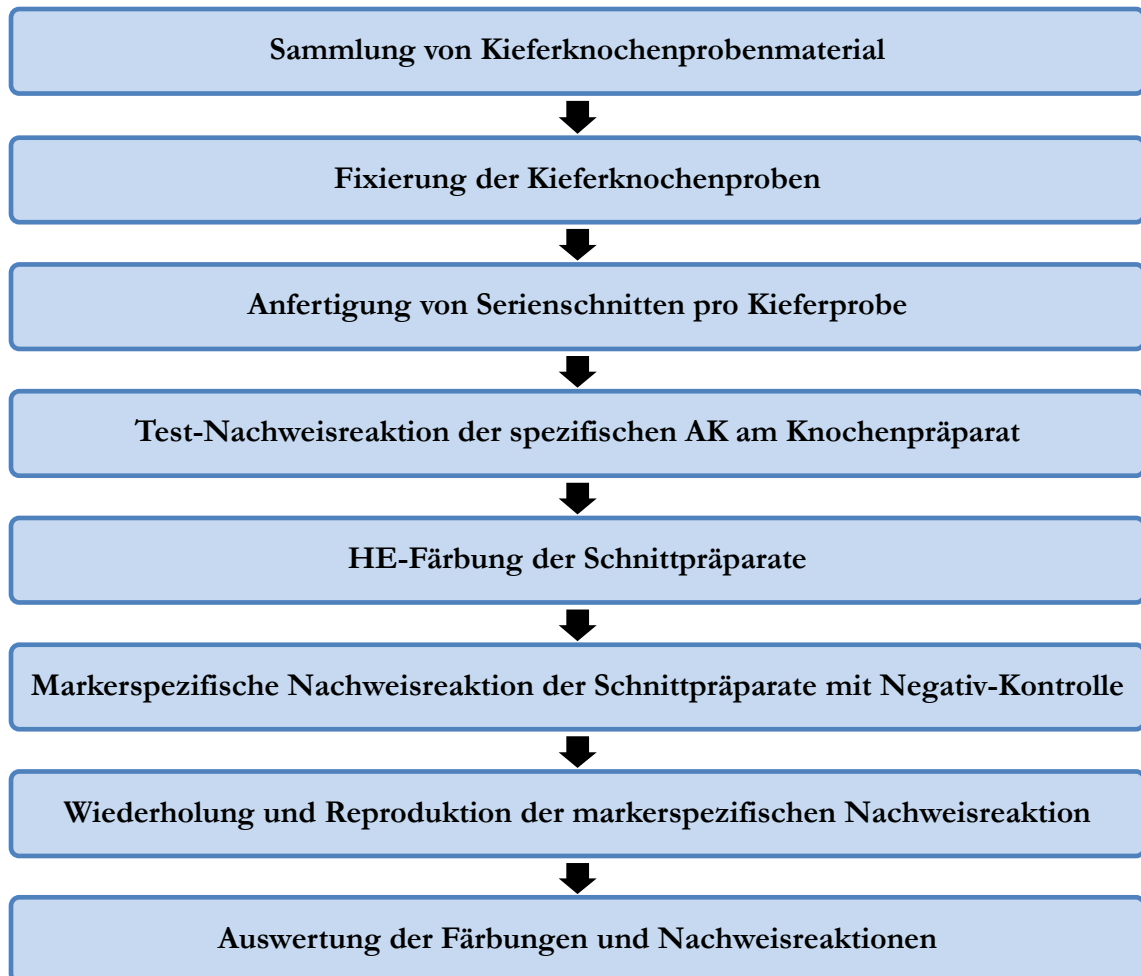


Abbildung 5: Schematischer Versuchsablauf der Studie

2.2 Probengewinnung

Das in der vorliegenden Studie untersuchte Knochenmaterial von den an einer Kieferknochennekrose Erkrankten stammt von fünf verschiedenen Patienten. Jeder dieser Patienten hatte eine antiresorptive Kieferknochennekrose im Rahmen einer Bisphosphonat-Therapie entwickelt, welche aufgrund eines Prostatakarzinoms indiziert gewesen ist. Alle Patienten wurden in der Poliklinik der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikum Göttingen therapiert.

Die Proben wurden – nach ausführlicher Aufklärung und erfolgter Zustimmung der Patienten – im Rahmen von kieferchirurgischen Eingriffen zur Osteonekrose-Therapie während der Operation gewonnen. Direkt nach dem Eingriff wurde das zu untersuchende Knochenmaterial unter Einhaltung einer einheitlichen sowie definierten Vorgehensweise konserviert und in Paraffin eingebettet.

Die vorliegende Studie wurde unter einem gültigen und von der Ethikkommission Göttingen genehmigten Ethikantrag mit der laufenden Antragsnummer 22/1/05 durchgeführt.

2.3 Probenbearbeitung

2.3.1 Fixierung und Paraffineinbettung

Die während des chirurgischen Eingriffs gewonnenen Kieferknochenproben wurden unmittelbar nach der Entfernung in gepuffertes Formalin überführt und über Nacht bei 4 °C fixiert. Durch die Fixierung wurden sowohl das Denaturieren der Proteine im Kieferknochengewebe der Teilresektate als auch der Verfallsprozess der Gewebe selbst verhindert.

2.3.2 Entkalkung

Nach dem Fixieren der Kieferknochenproben wurden alle Präparate für ca. fünf Wochen in 20%-iger Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) entkalkt. Für die Herstellung von EDTA wurden 400 g EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat bei einer Temperatur von 50 °C bis 70 °C in 2000 ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) aufgelöst.

Die Entkalkungsphase war notwendig, um die Knochensubstanz für die späteren Gewebeschnitte vorzubehandeln. Für das Herstellen der Schnittpräparate war eine ausreichende Entkalkifizierung wichtig. Das Wechseln der EDTA-Flüssigkeit erfolgte in der ersten Entkalkungswoche täglich, in der zweiten Entkalkungswoche jeden zweiten und von der dritten bis zur fünften Woche jeden dritten Tag.

Bedingt durch unterschiedliche Knochendicken und Knochenstärken an den verschiedenen Stellen sowie die unterschiedlichen Größen der Präparate ergaben sich geringfügige Unterschiede in der Entkalkungsdauer bei den jeweiligen Proben. Es entstanden hierbei Abweichungen von wenigen Tagen.

Die suffiziente Entkalkung der Knochenpräparate wurde mit Hilfe von speziellen Nadeln durch eine Nadelprobe überprüft. War ein widerstandsloses Eindringen der Nadeln in die Präparate möglich, so konnte von einer ausreichenden Entkalkung des Knochengewebes

ausgegangen werden und der Entkalkungsprozess wurde daraufhin beendet. Als nächster Schritt folgte ein zweimaliges zehnmütiges Waschen der Knochenproben in Leitungswasser. Danach wurden sie über Nacht in Ethanol mit einer Konzentration von 70% und einer Temperatur von 4 °C gelagert.

2.3.3 Einbettung

Die vollständig entkalkten Kieferknochenproben wurden in Paraffin eingebettet, um sie für die Schnittherstellung zu fixieren. Mit Hilfe des Einbettautomaten *Duplex Processor* (Shandon Elliot Ltd., Cheshire, GB) wurden die vor dem Einbetten der Präparate durchzuführenden Arbeitsschritte des Dehydrierens sowie Paraffinierens durchgeführt.

In Tabelle 2 ist das Arbeitsprotokoll des Einbettautomaten mit der jeweiligen Schrittabfolge der einzelnen Tauchbäder aufgelistet. Die mittlere Spalte zeigt den Inhalt der einzelnen Küvetten des Automaten. In der rechten Spalte steht die Angabe für die Verweildauer der Kieferknochenproben in den jeweiligen Küvettenbädern.

Tabelle 2: Protokoll des Einbettautomaten

Schritt	Küvetteninhalt	Zeit
1.	70% Ethanol	3 Std.
2.	80% Ethanol	1 Std.
3.	90% Ethanol	1 Std.
4.	96% Ethanol	1 Std.
5.	99% Ethanol	2 Std.
6.	Isopropylalkohol	2 Std.
7.	Isopropylalkohol	1,5 Std.
8.	Xylol	0,5 Std.
9.	Xylol	0,75 Std.
10.	Xylol	0,75 Std.
11.	Paraplast 52 °C	6 Std.
12.	Paraplast 56 °C	4,5 Std.

Für die jeweiligen Ethanol-Bäder wurde Ethanol (Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE) in einer Ausgangskonzentration von 99% auf die gewünschte Zielkonzentration mit Aqua dest. verdünnt. Das verwendete Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) hatte eine Konzentration von 98,5%, das in die Küvette eingefüllte

Paraplast-Material Paraplast® X-Tra (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) wurde stets zeitgleich mit dem Starten der Maschine erwärmt. Die paraffinierten Gewebepreparate wurden nach dem Durchlaufen der maschinellen Schritte in vorgefertigte Einbettkassetten eingebracht, welche mit Hilfe eines Paraffinspenders (Medax, Rendsburg, DE) vollständig mit Paraffin aufgefüllt wurden. Die fertigen Paraffinblöcke wurden danach auf einer Kühlplatte für 30 Minuten gekühlt. Sie härteten über Nacht bei Raumtemperatur (RT) aus, bevor sie im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden konnten.

2.3.4 Schnittanfertigung

Aus jeder Kieferknochenprobe, die in einem vollständig ausgehärteten Paraffinblock eingebettet worden war, wurden mehrere Serienschnitte für die geplanten histologischen Färbungen hergestellt. Die Schnittanfertigung erfolgte in einer Schichtdicke von 7 µm mit Hilfe eines Biocut-Rotationsmikrotoms (Typ 2035, Leica Instruments GmbH, Wetzlar, DE). Hierbei verlief die Schnittebene entweder in Längsrichtung des Knochenpräparats oder in einer orthogonalen Einstellung, wenn ein Längsschnitt aufgrund der Größe des Probengewebes nicht realisierbar war. Die eingebetteten Proben wurden mit einer speziell für harte Gewebe geeigneten Mikrotom-Klinge Typ R35 (FEATHER Safety Razor, Osaka, JPN) geschnitten. Um eine gute Schnittqualität mit einem sauberen Schnittbild zu erzielen, war es wichtig, die Probenblöcke zuvor auf Eis zu legen und somit zu kühlen. Gelagert wurden die Kieferknochenproben im Kühlschrank bei 5 °C. Das kalte Wachs ermöglichte vor allem bei harten Geweben wie den Kieferknochen einen besonders guten Halt der eingebetteten Probe und sorgte dafür, dass ein gleichmäßiges sowie glattes Schnittbild erzeugt werden konnte. Die angefertigten Schnitte wurden daraufhin in ein mit kaltem Leitungswasser gefülltes Gefäß überführt, um zusammenhängende Schnittpräparate voneinander zu trennen. Das enthaltene Wasser diente ebenfalls dazu, die teilweise durch die Vertikalbewegung des Probenhalters aufgerollten Anteile des Schnittpräparats wieder ausrollen und flach ausbreiten zu können.

Danach wurden die Serienschnitte mit Hilfe eines Objektträgers Superfrost® Plus (Gerhard Menzel B.V.& Co. KG, Braunschweig, DE) in ein Streckbad GFL (Typ 1052, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE) mit einer Wassertemperatur von 37 °C überführt. Dort verblieben die Proben für maximal 10 Minuten und wurden anschließend auf die zuvor beschrifteten Objektträger übertragen. Diese fertigen Objektträger trockneten daraufhin eine Stunde lang auf einer Wärmeplatte Typ 14801 (Medax GmbH & Co. KG, Rendsburg, DE), die auf eine Temperatur von 49 °C eingestellt wurde. Danach wurden die Serienschnitte über

Nacht in einen Wärmeschrank Typ UN 55 (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, DE) gestellt. Die Temperatur im Wärmeschrank betrug konstant 37 °C.

2.3.5 Entparaffinierung der Proben

Für die Durchführung der nach der Serienschrittherstellung geplanten histologischen Färbungen sowie immunhistochemischen Nachweisreaktionen (IHC-Nachweisreaktion) mussten die fertigen Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Hierbei wurde das die Gewebe umgebende Paraffin mit Hilfe von Xylol, welches lipophil und sehr gut zum Entfernen sowie Lösen des Paraffins geeignet ist, entfernt. Nach dem Xylol-Bad wurden die Gewebeschnitte durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Nur so konnte eine homogene Färbung der Proben gewährleistet werden.

Tabelle 3 zeigt die Abfolge der Schritte beim Entparaffinieren der Gewebeschnitte der Kieferknochenproben. Vor der Entparaffinierung erfolgte eine Vorbehandlung der Gewebeschnitte durch eine Hitzefixierung für 30 Minuten bei 80 °C im Wärmeschrank.

Tabelle 3: Protokoll Entparaffinierung

Schritt	Küvetteninhalt	Zeit
1.	Xylol 1	10 Min.
2.	Xylol 2	10 Min.
3.	100% Ethanol	5 Min.
4.	90% Ethanol	5 Min.
5.	80% Ethanol	5 Min.
6.	60% Ethanol	5 Min.
7.	Aqua dest.	3 Min.

2.4 Färbung der Proben

2.4.1 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine der am weitesten verbreiteten Routinefärbungen in der Histologie und diente in der vorliegenden Studie als Übersichtsfärbung der Schnittpräparate. Sie kann die unterschiedlichen Gewebestrukturen der Proben darstellen und besteht aus zwei Einzelfärbungen. Hämatoxylin ist ein natürlich vorkommender Farbstoff aus dem Blauholzbaum und muss, um als histologisches Färbemittel genutzt werden zu können, zum basischen Hämaun umgewandelt werden. Es

färbt alle basophilen, also pH-sauren, Zellstrukturen blau. Hiervon sind insbesondere Zellkerne und das raue endoplasmatische Retikulum betroffen. Eosin hingegen ist ein synthetischer Farbstoff, der einen sauren pH-Wert hat und alle acidophilen (eosinophilen) Zellstrukturen rot anfärbt. Das sind neben den Zellplasmaproteinen vor allem Mitochondrien, Collagen und das glatte endoplasmatische Retikulum. Die vorhandenen Proben wurden manuell und nicht maschinell durch den Doktoranden gefärbt.

Tabelle 4 zeigt das Protokoll der durchgeführten HE-Färbung der Kieferknochenproben nach vorheriger Entparaffinierung – ab Schritt zwei.

Tabelle 4: Protokoll HE-Färbung

Schritt	Arbeitsvorgang	Zeit
1.	Entparaffinierung der Proben (Tabelle 3)	-
2.	Hämalaun-Färbung	-
2.1	Hämalaun 1:4 mit Aqua dest. verdünnt	-
2.2	Hämalaun-Färbung der Präparate	2 – 3 Min.
2.3	Bläuen der Präparate unter fließendem Leitungswasser	15 Min.
3.	Eosin-Färbung	-
3.1	0,1%-ige Lösung vor Gebrauch erneut filtrieren	-
3.2	Eosin-Färbung der Präparate	1 Min.
3.3	Schnittpräparate kurz in Aqua dest. abspülen	30 Sek.
4.	Dehydrieren mit aufsteigender Alkoholreihe	-
4.1	60% Ethanol	20 Sek.
4.2	80% Ethanol	1 Min.
4.3	90% Ethanol	1 Min.
4.4	100% Ethanol	2 Min.
4.5	Xylol 1	10 Min.
4.6	Xylol 2	10 Min.
5.	Eindecken der gefärbten Proben	-
5.1	Aufbringen einer dünnen Schicht Roti®-Histokitt II auf die Proben und Eindecken mit Deckglas unter konstant leichtem Druck	-

Hämalaunlösung für HE-Färbung

Das verwendete Hämalaun nach Mayer (Merck KGaA, Darmstadt, DE) wurde in einer Konzentration von 1:4 mit Aqua dest. verdünnt und anschließend filtriert. Eine weitere Filtrierung erfolgte vor jeder Anwendung.

Eosinlösung für HE-Färbung

Für die Herstellung wurden 1 g Eosin (AppliChem, Darmstadt, DE) verwendet und in 1000 ml Aqua dest. aufgelöst. Die Eosinlösung wurde vor dem Gebrauch mit einigen Tropfen Essigsäure Rotipuran® 100% (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) angesäuert.

Nachdem das Eindeckmedium Roti®-Histokitt II (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) getrocknet war, wurden anschließend die Gewebeschnitte und Färbungen unter dem Lichtmikroskop *PrimoStar* (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, DE) betrachtet und überprüft.

2.4.2 IHC-Nachweisreaktion

In der vorliegenden Studie wurde ein indirekter Nachweis verschiedener spezifischer Proteine in den Schnittpräparaten der Knochengewebeproben erbracht. Die RT während der Inkubationszeit in der feuchten Inkubationskammer und im Verlauf der Versuchsdurchführung lag zwischen 21 °C und 22 °C. Es war wichtig zu beachten, dass die auf die Gewebeprobe aufgebrachte Suspension, die mit dem Antikörper (AK) versehen war, nicht während der Inkubationszeit über Nacht vom Gewebe oder Objektträger herunterfließen konnte. Um dies zu gewährleisten, wurden die Präparate mit dem bei IHC-Nachweisreaktionen verwendeten speziellen Wachsstift *ImmunoPen* (EMD Millipore Corp., Burlington, USA) umrandet, wodurch alle hinzugegebenen Suspensionen auf den Proben fixiert wurden. Je nach AK wurden zwei unterschiedliche Arten der Vorbehandlung und der Vorverdauung für die Versuchsdurchführung angewendet.

2.4.3 Protokoll IHC-Nachweisreaktion

Das Verfahren zum Nachweis spezifischer Proteine mit dem HiDef Detection und Alkalische-Phosphatase(AP)-Polymer-System wurde nach dem folgenden Protokoll in Tabelle 5 durchgeführt und wiederholt. Während der Nachweisreaktion wurden die Kieferknochenproben mehrfach mit *Tris-Buffered-Saline*(TBS)-Puffer gewaschen. Vor jeder IHC-Nachweisreaktion erfolgte als Vorbehandlung der Gewebeproben eine Hitze-fixierung für 30 Minuten bei 80 °C im Wärmeschrank.

Tabelle 5: Standardprotokoll IHC-Nachweisreaktion

Schritt	Arbeitsvorgang	Zeit
1.	Entparaffinierung und Rehydratation	-
1.2	Xylol 1	10 Min.
1.3	Xylol 2	10 Min.
1.4	100% Ethanol	5 Min.
1.5	90% Ethanol	5 Min.
1.6	80% Ethanol	5 Min.
1.7	60% Ethanol	5 Min.
2.	Proben in TBS-Puffer waschen (TBS-Puffer 20 mM mit pH 7,4)	10 Min.
3.	Universalblock Blocken der endogenen Phosphatase und Peroxidasen mit Universalblock. Menge: ca. 150 µl pro Schnitt	15 Min.
4.	Waschen 3x Waschen der Proben mit 20 mM TBS-Puffer (pH: 7,4)	je 2 Min.
5.	Blocken mit 1% TBS/bovines Serumalbumin (BSA) 1% TBS/BSA: 1 g BSA mit 100 ml 1-fach konzentriertem TBS mischen	10 Min.
6.	Waschen 3x Waschen der Proben mit 20 mM TBS-Puffer (pH: 7,4)	je 2 Min.
7.	Primärer AK Hinzugabe des primären AK in jeweils festgelegter Konzentration. Inkubation des primären AK über Nacht bei RT in feuchter Kammer. <u>Wichtig:</u> Nicht bei Negativ-Kontrolle. Diese erhält 20 mM TBS-Puffer.	mind. 12 Std.
8.	Waschen (nach Inkubation) 3x Waschen der Proben mit 20 mM TBS-Puffer (pH: 7,4)	je 2 Min.
9.	Sekundärer AK I Hinzugabe von HiDef Detection Amplifier auf jedes Präparat	10 Min.
10.	Waschen 3x Waschen der Proben mit 20 mM TBS-Puffer (pH: 7,4)	je 2 Min.
11.	Sekundärer AK II Hinzugabe von HiDef Detection Polymer auf jedes Präparat	10 Min.
12.	Waschen 3x Waschen der Proben mit 20 mM TBS-Puffer (pH: 7,4)	je 2 Min.

Schritt	Arbeitsvorgang	Zeit
13.	Chromogenfärbung (mit Chromogenkit)	-
13.1	<u>Zuvor</u> : Herstellung der Chromogenfärbung 1 Teil Chromogen + 1 Teil Substrat vor Gebrauch gut mischen. (450 µl Chromogen + 450 µl Substrat wurden vermischt)	-
13.2	Hinzugabe der Chromogenlösung auf die Schnittpräparate / Färbung Menge: ca. 150 µl pro Schnitt Färbung unter Sicht mit Lichtmikroskop	6 – 12 Min.
13.3	Nach Erreichen der gewünschten Färbewirkung Chromogenlösung direkt auf Zellstoff abgießen	-
14.	Gegenfärbung mit Lichtgrün	-
14.1	<u>Zuvor</u> : Herstellung von Lichtgrün (Tabelle 6)	-
14.2	Gegenfärbung mit Lichtgrün Menge: ca. 150 µl pro Schnitt	45 – 60 Sek..
15.	Eintauchen aller Proben in 1%-ige Essigsäure	1 Min.
15.1	Überführung aller Proben in eine Küvette	-
16.	Dehydrieren mit aufsteigender Alkoholreihe	-
16.1	60% Ethanol	20 Sek.
16.2	80% Ethanol	1 Min.
16.3	90% Ethanol	1 Min.
16.4	100% Ethanol	2 Min.
16.5	Xylol 1	10 Min.
16.6	Xylol 2	10 Min.
17.	Eindecken der gefärbten Proben	-
17.1	Auftragen einer dünnen Schicht Eukitt und Abdecken mit Deckglas unter konstant leichtem Druck	-

Das in dieser Studie verwendete System-Kit für den sekundären AK bei der IHC-Nachweisreaktion hieß AP HiDef Detection (Cell Marque, Rocklin Cal., USA).

Das verwendete Chromogen-Kit war das Perma Red/AP Auto Chromogen Kit (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA).

2.4.4 Lichtgrün für IHC-Nachweisreaktion

Der Farbstoff Lichtgrün wurde für den IHC-Nachweis in einer Konzentration von 1:8 hergestellt. Tabelle 6 zeigt das Protokoll des Herstellungsverfahrens.

Tabelle 6: Protokoll Herstellung Lichtgrün

Schritt	Arbeitsvorgang
1.	Verdünnung von 1%-iger Essigsäure Verdünnung der Essigsäure auf 1:5 mit Aqbe zu einer 0,2%-igen Lösung 400 µl 1%-ige Essigsäure + 1600 µl Aqbe pipettieren und vermischen
2.	1:8 Verdünnung des Farbstoffs 1750 µl aus E-Cup abnehmen und mit 250 µl Lichtgrün in neuem E-Cup vermischen

2.5 IHC-Nachweisreaktionen der Proteine

An den paraffinierten Knochengewebeschnitten wurden IHC-Nachweisreaktionen für die Proteine Neutrophile Elastase, Col-I, *Runt related Gen 2* (RUNX2), *Smad ubiquitination regulatory factor 1* (SMURF1), *Smad ubiquitination regulatory factor 2* (SMURF2), SMAD2/3 sowie RANKL erbracht.

Tabelle 7 zeigt die für die IHC-Nachweisreaktionen verwendeten AK und deren Hersteller. Alle aufgeführten AK sind gegen die jeweiligen humanen Antigene spezifisch.

Tabelle 7: Antikörper

Antikörper	Hersteller, Firmensitz
Collagen-I (R1038)	OriGene Technologies GmbH, Herford, DE
Neutrophile Elastase (ab21595)	Abcam, Cambridge, GB
RANKL (23408-1-AP)	Proteintech Group Inc, Rosemont, USA
RUNX2 (ab23981)	Abcam, Cambridge, GB
SMAD2/3 (sc-133098)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
SMURF1 (H00057154-M01)	Novus Biologicals, Littleton, USA
SMURF2 (sc-393848)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA

Im folgenden Abschnitt werden sowohl Herkunft als auch Beschaffenheit der einzelnen verwendeten AK beschrieben. Außerdem werden Versuchsabweichungen und Modifikationen bei den jeweiligen Nachweisreaktionen zum Standardprotokoll (Tabelle 5) aufgeführt.

2.5.1 Neutrophile Elastase

Bei diesem AK handelte sich um einen affinitätsgereinigten polyklonalen AK vom Wirtstier Kaninchen. Die vom Hersteller empfohlene Konzentration für eine IHC-Nachweisreaktion lag bei 1:20 – 1:200. Eine spezifische Reaktion zeigte der AK bei Proben und Präparaten von Menschen, Mäusen und Ratten.

Abweichungen und Modifikationen zum Standardprotokoll (Tabelle 5)

Der primäre AK wurde bei Schritt 8 in einer Konzentration von 1:50 hinzugegeben. Die Chromogenfärbung bei Schritt 13 erfolgte für eine Dauer von 6 Minuten und die Gegenfärbung mit Lichtgrün 1:8 wurde für 50 Sekunden durchgeführt.

2.5.2 Collagen-I

Beim AK Col-I handelte es sich um einen affinitätsgereinigten polyklonalen AK. Das Wirtstier dieses AK war ein Kaninchen. Die empfohlene Konzentration bei IHC-Anwendung lag bei 1:50 – 1:200. Der AK zeigte eine spezifische Reaktivität bei Proben und Präparaten von Menschen, Rindern, Mäusen und Ratten.

Die Col-I-Nachweisreaktion wurde zusätzlich mit einer Antigenmaskierung und mit einem Vorverdau durchgeführt. Die wesentlichen Abweichungen und Modifikationen zum Standardprotokoll der IHC-Nachweisreaktion (Tabelle 5) sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Der primäre AK wurde in einer Konzentration von 1:100 hinzugegeben. Die Chromogenfärbung erfolgte für eine Dauer von 6 Minuten und die Gegenfärbung mit Lichtgrün 1:8 wurde für 50 Sekunden durchgeführt.

Tabelle 8: Protokoll IHC-Nachweisreaktion Collagen-I mit Vorverdau

Schritt	Arbeitsvorgang	Zeit
1.–5.	Schritte 1–5 in Tabelle 5	1.–5.
6.	Antigendemaskierung mit ProTags bei 60 °C im Wärmeschrank	20 Min.
7.	Waschen 3x Waschen der Proben mit 20 mM TBS-Puffer (pH: 7,4)	je 2 Min.
8.	Vorverdau mit Hyaluronidase	2 Min.
9.	Waschen 3x Waschen der Proben mit 20 mM TBS-Puffer (pH: 7,4)	je 2 Min.
10.	Vorverdau mit Chondroitinase	2 Min.
11.	Waschen 3x Waschen der Proben mit 20 mM TBS-Puffer (pH: 7,4)	je 2 Min.
12.	Vorverdau mit Protease 24	2 Min.
13.	Waschen 3x Waschen der Proben mit 20 mM TBS-Puffer (pH: 7,4)	je 2 Min.
14.– 26.	Ablauf nach bekanntem Protokoll ab 6. – 17. (Tabelle 5)	-

2.5.3 RUNX2

Es handelte sich beim RUNX2-AK um einen polyklonalen AK. Das Wirtstier war ein Kaninchen und die festgelegte Spezies sind Proben von menschlichen Geweben sowie Mäusen und Ratten. Die vom Hersteller empfohlene Konzentration für eine IHC-Nachweisreaktion lag bei 1:50 – 1:500.

Abweichungen und Modifikationen zum Standardprotokoll (Tabelle 5)

Der primäre AK wurde bei Schritt 7 in einer Konzentration von 1:50 hinzugegeben. Die Chromogenfärbung bei Schritt 13 erfolgte für eine Dauer von 7 Minuten und die Gegenfärbung mit Lichtgrün 1:8 wurde für 50 Sekunden durchgeführt.

2.5.4 SMURF1

Es handelte sich um einen monoklonalen AK. Das Wirtstier war eine Maus und die spezifische Reaktivität wurde für menschliche Gewebeproben festgelegt. Die empfohlene Konzentration für IHC-Nachweisreaktionen lag bei 1:10 – 1:500.

Abweichungen und Modifikationen zum Standardprotokoll (Tabelle 5)

Der primäre AK wurde bei Schritt 7 in einer Konzentration von 1:50 hinzugegeben. Die Chromogenfärbung bei Schritt 13 erfolgte für eine Dauer von 9 Minuten und die Gegenfärbung mit Lichtgrün 1:8 wurde für 50 Sekunden durchgeführt.

2.5.5 SMURF2

Es handelte sich um einen monoklonalen AK mit dem Wirtstier Maus. Seine Spezifität ist auf menschliche Gewebeproben festgelegt. Die für IHC-Nachweisreaktionen empfohlene Konzentration lag bei 1:50 – 1:500.

Abweichungen und Modifikationen zum Standardprotokoll (Tabelle 5)

Der primäre AK wurde bei Schritt 7 in einer Konzentration von 1:50 hinzugegeben. Die Chromogenfärbung bei Schritt 13 erfolgte für eine Dauer von 9 Minuten und die Gegenfärbung mit Lichtgrün 1:8 wurde für 50 Sekunden durchgeführt.

2.5.6 SMAD2/3

Es handelte sich um einen monoklonalen AK. Das Wirtstier war eine Maus und die spezifische Reaktivität war auf menschliche Gewebeproben begrenzt. Die empfohlene Konzentration für eine IHC-Nachweisreaktion lag bei 1:50 – 1:500.

Abweichungen und Modifikationen zum Standardprotokoll (Tabelle 5)

Der primäre AK wurde bei Schritt 7 in einer Konzentration von 1:50 hinzugegeben. Die Chromogenfärbung bei Schritt 13 erfolgte für eine Dauer von 9 Minuten. und die Gegenfärbung mit Lichtgrün 1:8 wurde für 50 Sekunden durchgeführt.

2.5.7 RANKL

Hierbei handelte es sich um einen polyklonalen AK vom Wirtstier Kaninchen. Die vom Hersteller empfohlene Konzentration für die IHC-Nachweisreaktion lag bei 1:50 – 1:500. Die festgelegte Spezies für die Anwendung des AK waren Proben von Menschen. Jedoch wurde der AK auch bereits für Gewebepreparate von Mäusen und Ratten erfolgreich verwendet.

Abweichungen und Modifikationen zum Standardprotokoll (Tabelle 5)

Der primäre AK wurde bei Schritt 7 in einer Konzentration von 1:100 hinzugegeben. Die Chromogenfärbung bei Schritt 13 erfolgte für eine Dauer von 7 Minuten und die Gegenfärbung mit Lichtgrün 1:8 wurde für 50 Sekunden durchgeführt.

2.6 Kontrolle der Färbungen

2.6.1 Negativ-Kontrolle der Färbungen

Um beim Nachweis Gewissheit über die spezifische Anfärbung des sekundären AK zu erhalten, wurde für jede einzelne Färbung und jeden Färbedurchgang eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, welche – bis auf die Inkubation mit dem primären AK über Nacht – in allen Schritten identisch behandelt wurde. So ließen sich unspezifische Anfärbungen sowie falsch positive Ergebnisse durch den sekundären AK im Gewebepräparat ausschließen. Die Überprüfung der Spezifität des primären AK erfolgte durch eine Inkubation mit 20 mM TBS-Puffer anstelle des in der Konzentration festgelegten primären AK der Suspension auf den anderen Kieferknochenproben. Im weiteren Versuchsverlauf wurden die Proben danach wieder vollkommen identisch behandelt.

2.6.2 Positiv-Kontrolle der Färbungen

Eine Positiv-Kontrolle wurde ebenfalls für alle spezifischen Marker durchgeführt. Hierfür wurden Gewebeprobe von gesunden Alveolarknochen verwendet.

Die gesunden Kieferknochenpräparate wurden aus Knochenlamellen im Rahmen einer Weisheitszahnosteotomie gewonnen und nach vorherigem Einverständnis der Patienten der vorliegenden Studie zur Verfügung gestellt. Zunächst erfolgte die Herstellung von Gewebeprobekörpern und Anfertigung von Serienschmittpräparaten, die für die Färbungen der Positiv-Kontrollen genutzt werden konnten. Bei der Auswahl der Positiv-Kontrollen wurde besonders darauf Wert gelegt, dass die entnommenen Proben des gesunden Knochens aus der gleichen Entnahmeregion (Kieferknochen) entstammten, sodass ein valider Vergleich der vorliegenden Knochenstrukturen gezogen werden konnte. Ein Vergleich mit Proben aus anderen Knochenregionen, wie beispielsweise Knochenanteilen aus der Knie- oder Beinregion, sollte vermieden werden.

Die histologischen sowie IHC-Nachweisreaktionen mit ihren Versuchsabläufen wurden bei den Positiv-Kontrollen nach den exakt gleichen Schemata wie bei den Kieferknochenproben der erkrankten Patientengruppe durchgeführt (Tabelle 5). Es wurden hierbei auch die gleichen AK-Konzentrationen während der Inkubationszeit über Nacht verwendet.

2.7 Auswertung der histologischen Färbungen

Die quantitative Auswertung der fertigen Präparate erfolgte mit der *Open-Source*-Software QuPath – Quantitative Pathology & Bioimage Analysis (The Queen's University of Belfast, Belfast, NI). Das vom Anbieter kostenlos zur Verfügung gestellte Analyseprogramm QuPath ermöglichte wegen seiner sehr guten Eignung die Auswertung digitaler Datensätze und Scandateien der Schnittpräparate (Bankhead et al. 2017).

Durch die vielen einstellbaren Parameter wurde eine identische Untersuchung aller Präparate gewährleistet. Das Programm hatte auch den großen Vorteil, dass Bereiche, Areale oder Zellen in einem erstellten Projekt markiert und digital abgespeichert werden konnten. Somit war jederzeit ein Abruf und Zurückgreifen auf die festgelegten Einstellungen möglich. Des Weiteren ließen sich durch verschiedene Farbwertskalierungen der zuvor mit dem Scanner *EasyScan One* (Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, DE) eingescannten Gewebeschnitte die einzelnen Ebenen sowie Farbspektren der Präparate darstellen, wodurch Bereiche sichtbar wurden, die mit menschlichem Auge selbst mit Hilfe eines Mikroskops nicht sichtbar gewesen wären. Nach individuellem Anpassen der Parameter für die verschiedenen Befehle sowie Programmabläufe innerhalb der Software wurde eine sehr genaue Zell-Detektion der positiv und spezifisch angefärbten Zellen ermöglicht. Dies erlaubte – reproduzierbar – eine genaue Aussage über das quantitative Vorkommen von in der Reaktion positiven Zellen in einem definierten Bereich. Darüber hinaus konnten direkte Aufnahmen aus einem Präparatabschnitt als Bilder erstellt werden, die als JPEG (*Joint Photographic Experts Group*)-Datei direkt in das Bildbearbeitungsprogramm *ImageJ* (Bethesda Softworks, Bethesda, USA) importiert werden konnten (Schneider et al. 2012). Für die Auswertung dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden in jedem Präparat zuvor festgelegte Bereiche für die durchgeführte Zell-Detektion genau untersucht.

2.7.1 Vorgehen bei Auswertung und Projektgestaltung in QuPath

Bevor die genauere Auswertung stattfinden konnte, wurde für jeden AK jeweils ein separates und einzelnes Projekt im Programm QuPath erstellt und diente somit einer besseren Übersichtlichkeit sowie Differenzierbarkeit bei der Auswertung der Proben. Hierfür mussten zunächst für jedes Protein Projektordner im Computerlaufwerk angelegt werden, in denen die über QuPath bearbeiteten Dateien abgespeichert werden konnten.

Auch die zugehörigen Negativ-Kontrollen wurden eingescannt, ebenfalls im Programm überprüft und begutachtet. Alle Bilddateien der einzelnen Schnittfärbungen wurden im

Datei-Format einer SVS(Aperio ScanScope Virtual Slide)-Bilddatei eingescannt und lagen in diesem Dateiformat zur weiteren Bearbeitung vor.

Das Erstellen eines neuen Projekts sowie die Projektgestaltung für die jeweiligen Nachweisreaktionen wurden in QuPath wie folgt durchgeführt:

Nach Öffnen des Programms wurde die Schaltfläche „*Project*“ ausgewählt und danach direkt das Feld „*Create project*“ geöffnet. Daraufhin öffnete sich ein Taskfenster und es wurde ein zuvor erstellter Zielordner im Laufwerk ausgewählt. Danach wurde die Schaltfläche „*Add images*“ verfügbar und nach dem Anklicken konnten die SVS-Bilddateien in das Programm importiert werden.

Nach der Projekterstellung wurden die Scans der einzelnen Präparate in das Programm QuPath importiert. Dies war über den Reiter „*Add images*“ möglich.

Beim Importieren der Bilddateien mussten folgende Einstellungen beachtet werden:

Zuerst mussten der Reiter „*Image provider*“ auf die die Einstellung „*Bio-Formats builder*“ und der Bildtyp korrekt ausgewählt werden. Hierfür musste unter dem Reiter „*Set image type*“ das Feld „*Brightfield (H-DAB)*“ angeklickt werden. Daraufhin konnte die Einstellung der Bildrotation („*Rotation image*“) beim Importieren der Bilddatei konfiguriert werden, um alle Gewebepben-Scans in der gleichen Bildposition auszuwerten und gleichmäßig darzustellen.

Anderenfalls konnten die Dateien nicht in das Programm importiert werden. Die Einstellungen wurden für alle Bilder einheitlich durchgeführt. Alle Dateien wurden in gleicher Position eingefügt und miteinander verglichen.

Nach dem Importieren der Bilddateien erfolgte die Auswahl und Festlegung der Farbskalen (*stain vectors*) sowie Bildvektoren im Programm. Hierfür wurde QuPath auf die individuellen Farbwerte der einzelnen Nachweisreaktionen angepasst, sodass eine bessere Differenzierung für die Funktion der Zell-Detektion im Programm möglich war. Es wurden hierzu im Programm QuPath die Farbskalen anhand markanter Pixel-Bereiche innerhalb des Präparats festgelegt, indem die Pixelwerte an den jeweiligen Stellen eingelesen und analysiert worden sind. Besonders für den Farbwert der Gegenfärbung mit Lichtgrün und die spezifisch positiv angefärbten Zellen war dies wichtig, um bei der späteren Zell-Detektion präzise Ergebnisse zu erhalten.

Für die quantitative Auswertung der Zell-Detektionen bei den fertigen Proben wurden in den Präparaten jeweils drei definierte, quadratische Bereiche mit einer Pixelgröße von 500 μm x 500 μm eingefügt. Diese Bereiche wurden daraufhin zufällig verteilt in den

Kieferknochenabschnitten positioniert. Die einzige Ausnahme stellten hierbei die Detektionen für den AK Col-I dar. Bei diesen Gewebeproben mussten die Quadrate für die Auswertung modifiziert werden. Es wurden acht gleich große Quadrate mit einer Pixelgröße von 125 µm x 125 µm ausgewählt. Dies war erforderlich, da sonst keine korrekte Zell-Detektion aufgrund der Pixelformation möglich war.

In den festgelegten Bereichen fand daraufhin die gezielte Zell-Detektion in allen Gewebeproben statt und nach abgeschlossener Detektion wurde das Ergebnis der positiven Detektionen angezeigt.

2.7.2 Zell-Detektion innerhalb der Präparate

Für eine korrekte und vor allem präzise Zell-Detektion (*cell detection*) in den Proben wurden mehrere Testläufe in den festgelegten Bereichen durchgeführt und die Einstellungsparameter dabei immer wieder optimiert. Des Weiteren wurden die Detektionsparameter so angepasst, dass sie auf die nachfolgenden Präparate übertragen werden konnten, um eine konstant gleichmäßige Untersuchung zu erhalten. Hierfür wurde das Programm individuell und manuell angeleert.

Die einzige Ausnahme stellten die Kieferknochenproben mit der Nachweisreaktion für das Protein Col-I dar, da es hier keine einzelnen Zellen, sondern Collagenfasern gab, welche bei der IHC-Nachweisreaktion spezifisch sichtbar wurden. Somit erforderte es eine separate und individuelle Einstellung der Parameter für diese Proben, um nicht zu viele falsch positive Messergebnisse zu erhalten. Einen direkten Weg, Col-I mit dem Programm QuPath zu analysieren und zu detektieren, gibt es bisher noch nicht. Aus diesem Grund musste im Rahmen der vorliegenden Studie eine Lösung gefunden werden, um auch diese Proben quantitativ auswerten zu können. Die Zell-Detektion wurde in zwei große Schritte unterteilt, was bei der Auswertung zu beachten war. Hierbei wurde zuerst die einfache und primäre Zell-Detektion („*cell detection*“) und anschließend die positive Zell-Detektion („*positive cell detection*“) durchgeführt. Die einfache Zell-Detektion (Tabelle 9) bot weniger einstellbare Parameter und diente eher als Orientierung des Programms für die Bildanalyse. Die „*positive cell detection*“ (Tabelle 10), welche deutlich mehr Einstellmöglichkeiten sowie verfeinerte Suchergebnisse bot, ermöglichte eine sehr genaue Bildanalyse der Schnittpräparate.

Schritt 1: Zell-Detektion („*cell detection*“)

Zu finden war diese Funktion unter dem Reiter „*Analyse*“ und daraufhin unter dem *Plugin* „*cell detection*“. Nach dem Auswählen der Programmfunktion öffnete sich ein weiteres Fenster mit einstellbaren Parametern, die in Tabelle 9 aufgelistet worden sind.

Tabelle 9: Parametereinstellung der Zell-Detektion

<i>Setup parameters</i>	
<i>Detection image</i>	<i>Optical density sum</i>
<i>Requested pixel size</i> [μm]	0.26
<i>Nucleus parameters</i>	
<i>Background radius</i> [μm]	8
<i>Median filter radius</i> [μm]	0
<i>Sigma</i> [μm]	1,5
<i>Minimum area</i> [μm^2]	10
<i>Maximum area</i> [μm^2]	400
<i>Intensity parameters</i>	
<i>Threshold</i>	0,1
<i>Max. background intensity</i>	2
<i>Split by shape</i> [Yes/No]	Yes
<i>Exclude DAB (membrane staining)</i> [Yes/No]	No
<i>Cell parameters</i>	
<i>Cell expansion</i> [μm]	5
<i>Include cell nucleus</i> [Yes/No]	Yes
<i>General parameters</i>	
<i>Smooth boundaries</i> [Yes/No]	Yes
<i>Make measurements</i> [Yes/No]	Yes

Schritt 2: Positive Zell-Detektion („*positive cell detection*“)

Tabelle 10: Parametereinstellung der positiven Zell-Detektion

<i>Setup parameters</i>	
<i>Detection image</i>	<i>Optical density sum</i>
<i>Requested pixel size</i> [μm]	0.26
<i>Nucleus parameters</i>	
<i>Background radius</i> [μm]	10
<i>Median filter radius</i> [μm]	0
<i>Sigma</i> [μm]	1,5
<i>Minimum area</i> [μm^2]	8
<i>Maximum area</i> [μm^2]	400
<i>Intensity parameters</i>	
<i>Threshold</i>	0,08
<i>Max. background intensity</i>	2
<i>Split by shape</i> [Yes/No]	Yes
<i>Exclude DAB (membrane staining)</i> [Yes/No]	No
Cell parameters:	
<i>Cell expansion</i> [μm]	5
<i>Include cell nucleus</i> [Yes/No]	Yes
<i>General parameters</i>	
<i>Smooth boundaries</i> [Yes/No]	Yes
<i>Make measurements</i> [Yes/No]	Yes
<i>Intensity threshold parameters</i>	
<i>Score compartment</i>	<i>Nucleus: DAB OD max</i>
<i>Threshold 1+</i>	0,2
<i>Threshold 2+</i>	0,4
<i>Threshold 2+</i>	0,6
<i>Single Threshold</i> [Yes/No]	Yes

2.8 Statistische Auswertung

Die Methodik für die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen erarbeitet. Die erstellten Datensätze wurden mit der Statistik-Software SPSS (IBM, Armonk, USA) ausgewertet und beurteilt.

Es wurden zunächst die Mittelwerte der positiven Detektionen bei den jeweiligen Proben der erkrankten sowie der gesunden Patienten errechnet. Außerdem erfolgten – je nach IHC-Nachweisreaktion – ein Vergleich zwischen den erkrankten und den gesunden Kieferknochenproben (Positiv-Kontrollen) sowie eine Analyse. Dies ermöglichte es, Aussagen über mögliche Abweichungen und die Signifikanz formulieren zu können. Die Daten der Zell-Detektionen für die definierten Messbereiche der jeweiligen Gewebeproben sowie AK wurden in eine Tabelle eingetragen und zusammengefasst. Dabei wurden gleichzeitig die Mittelwerte errechnet und in die Statistik-Software zur weiteren Verarbeitung übernommen.

Die Häufigkeitsverteilung der gebildeten Mittelwerte der Zell-Detektionen wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests sowie zur zusätzlichen Überprüfung mit der grafischen Auswertung des Quantil-Quantil-Diagramms (Q-Q-Diagramms) auf ihre Normalverteilung untersucht. Der Shapiro-Wilk-Test nimmt in seiner Nullhypothese die Normalverteilung der Grundgesamtheit der Daten an. Die Alternativhypothese geht hingegen davon aus, dass keine Normalverteilung der Daten vorliegt.

Aufgrund der geringen Anzahl der Grundgesamtheit (N) der Knochenproben brachte der Shapiro-Wilk-Test nicht in allen Fällen ein signifikantes Ergebnis bei der Prüfung auf Normalverteilung. Es lagen hierbei falsch positive Annahmen der Nullhypothese vor, was durch die zusätzliche grafische Überprüfung auf die Normalverteilung durch das Q-Q-Diagramm auffiel. In den kritischen Fällen konnte die Validität zusätzlich durch die Erweiterung des trendbereinigten Q-Q-Diagramms gestützt und detaillierter analysiert werden. Die Aussagekraft des Q-Q-Diagramms war somit bei einer kleinen Grundgesamtheit höher als jene des Shapiro-Wilk-Tests.

Bei den vorliegenden Datensätzen ergab sich in allen Fällen die Alternativhypothese und es konnte keine Normalverteilung der Daten nachgewiesen werden. Somit wurde für die weitere Auswertung einheitlich ein nicht-parametrischer Test zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben ausgewählt. Um die Unterschiede zwischen der Gruppe der gesunden sowie der erkrankten Knochenpräparate feststellen und besser bewerten zu können, wurde der Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrischer statistischer Test gewählt. Durch dieses

Testverfahren war es möglich, Aussagen hinsichtlich der Signifikanz der Unterschiede zwischen den ermittelten Zell-Detektionen in den Präparaten zu formulieren. Der Mann-Whitney-U-Test vergleicht die Stichproben – anhand von gebildeten Rängen der abhängigen Testvariablen – auf signifikante Unterschiede. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ standardisiert festgelegt.

Ist der errechnete Wert $p > 0,05$, kommt die Nullhypothese zum Tragen, welche keinen signifikanten Unterschied der zu vergleichenden Gruppen annimmt. Bei der Alternativhypothese ($p < 0,05$) hingegen wird ein signifikanter Unterschied der zu vergleichenden Gruppen angenommen. Sobald die Nullhypothese verworfen ist, wird davon ausgegangen, dass der vorliegende Unterschied zwischen den Gruppen nicht zufällig ist, sondern ein signifikanter Unterschied besteht. Da in der vorliegenden Studie die Grundgesamtheit N mit einer Anzahl von insgesamt neun Testobjekten ($N = 9$) kleiner als 30 war, wurde bei der Auswertung der Wert der exakten Signifikanz beim Ergebnis des Mann-Whitney-U-Tests beurteilt. Es handelte sich bei den neun Testobjekten um fünf erkrankte und vier gesunde Kieferknochenproben.

Aufgrund der explorativen Natur der vorliegenden Studie wird auf das Problem des multiplen Testens hingewiesen, aber dennoch auf eine Bonferroni-Korrektur verzichtet. Mit einer erhöhten Anzahl an Versuchsproben sowie Patientengruppen könnten hierüber genauere sowie statistisch reliablere Aussagen getroffen werden, was in zukünftigen Arbeiten berücksichtigt werden könnte.

3 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin sowie die IHC-Nachweisreaktionen der jeweiligen Proteine an den erkrankten (Patientengruppe 1) sowie gesunden (Patientengruppe 2) Kieferknochenpräparaten dargestellt. Die Reaktionsergebnisse der Zell-Detektionen werden hierbei statistisch gegenübergestellt.

3.1 Übersichtsfärbungen und Strukturdarstellungen der Gewebeschnitte

Die HE-Färbungen der Kieferknochenpräparate dienten der Übersichtsdarstellung der Kieferknochenproben. Die Färbungen zeigten hierbei die nekrotischen und somit nicht intakten Bereiche der erkrankten Kieferknochenpräparate. Die Übergänge vom gesunden Lamellenknochen in die Bereiche der Knochennekrosen stellten sich diffus dar. In den Präparaten zeigten sich teilweise vitale, partiell devitale sowie vollständig devitale Bereiche im Knochen (Abbildung 6).

Die Kontinuität der nekrotischen Kieferknochen war unterbrochen und die untersuchten Abschnitte wiesen eine löchrige, fenestrierte Struktur auf. Diese stellte sich bei der mikroskopischen Betrachtung mottenfraßähnlich in ihrer Struktur dar (Abbildung 6). In den vitalen Alveolarknochenanteilen ließ sich die lamellenförmige Struktur des Knochens erkennen. Die vorhandenen Knochenlamellen verliefen in diesen Bereichen parallel, geordnet und dicht nebeneinander angelegt. Diese geordneten Strukturen waren in den nekrotischen Knochenanteilen nicht mehr sichtbar. Die nicht intakten Knochenanteile in den Schnittpräparaten waren zellarm. In diesen Bereichen waren viele Zellen bereits abgestorben oder befanden sich im Apoptoseprozess. Bis auf wenige Ausnahmen waren die vorhandenen Osteozytenlakunen der nekrotischen Kieferknochen leer (Abbildung 7, Abbildung 8). Es ließen sich nur wenige *Lining Cells* lokalisieren und flache Resorptionslakunen lagen vor (Abbildung 6, Abbildung 8). Viele der vorhandenen Havers-Kanäle, welche die zentralen Knochenkanäle in einem Osteon darstellen, waren ebenfalls leer und in ihnen konnten keine Blutgefäße mehr gefunden werden (Abbildung 7). Entzündungszonen mit einer Vielzahl von neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen sowie Lymphozyten waren bei den devitalen Knochenanteilen erkennbar. In den vitalen Knochenanteilen lagen viele Osteone vor. Diese wurden in den Nekrosen aufgelöst und ihre konzentrischen Knochenlamellen waren dort nicht mehr vorhanden. Die anisotrop

verlaufenden Collagenfibrillen in den parallel verlaufenden Knochenlamellen waren aufgelöst und ungeordnet in den Bereichen der Knochennekrosen formiert.

Die Osteolysen in den Kieferknochen und die damit verbundenen Kontinuitätsunterbrechungen erschienen bei Betrachtung der jeweiligen Gewebeproben – abhängig vom Fortschrittsgrad der vorliegenden Kieferknochennekrose – verschieden stark ausgeprägt (Abbildung 9).

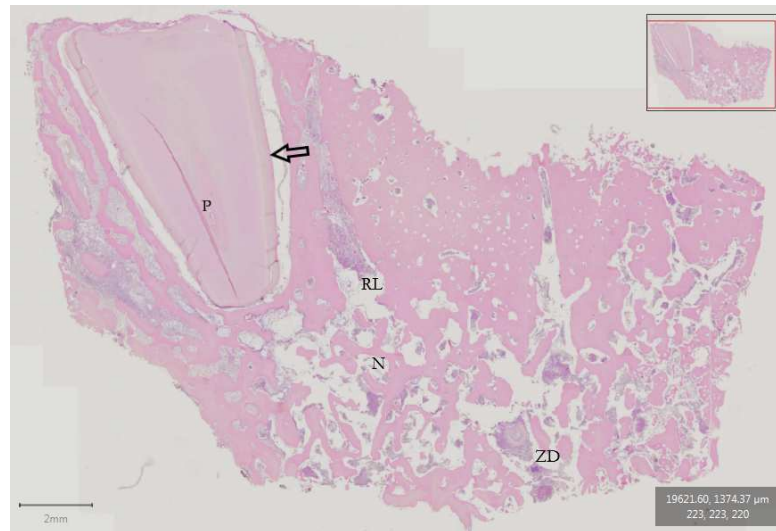


Abbildung 6: Übersicht HE-Färbung BRONJ-Kieferknochenprobe aus Patientengruppe 1

Die Abbildung zeigt eine Übersichtsaufnahme der HE-Färbung von Kieferknochenprobe 2 aus Patientengruppe 1 (erkrankt). Oben links im Knochenpräparat ist ein Zahn (Pfeil) mit Pulpa (P) in der Alveole zu erkennen. Die Nekrose (N) ist in diesem Abschnitt weniger ausgeprägt und breitet sich im Verlauf nach unten rechts weiter aus. Die Lamellen- sowie Bündelknochenanteile lösen sich zunehmend auf und Resorptionslakunen (RL) entstehen. Im unteren Anteil ist ein Zelldetritus (ZD) vorhanden. Oben rechts in der Abbildung ist das *Inset* zu sehen, welches die Präparatübersicht darstellt und im roten, rechteckigen Feld die Position des Bildausschnitts (*Field of view*) im Gesamtpräparat zeigt. Unten rechts sind die Koordinaten des Präparatausschnitts aufgelistet. Unten links der Maßstab von 2 mm. Originalvergrößerung x0,43 (QuPath).



Abbildung 7: HE-Färbung BRONJ-Kieferknochenprobe aus Patientengruppe 1

Dargestellt ist eine Detailaufnahme der HE-Färbung der BRONJ-Kieferknochenprobe 2 aus Patientengruppe 1. Sie zeigt einen gesunden Kieferknochenabschnitt im BRONJ-erkrankten Knochenpräparat. Es sind leere Osteozytenlakunen (OZL) und leere Havers-Kanäle (HK) im Lamellenknochen mit aufgelösten Osteonen erkennbar. Oben rechts ist das *Inset* mit der genauen Lokalisation im Gesamtpräparat dargestellt. Unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* aufgelistet. Maßstab 100 µm. Originalvergrößerung x8,5 (QuPath).

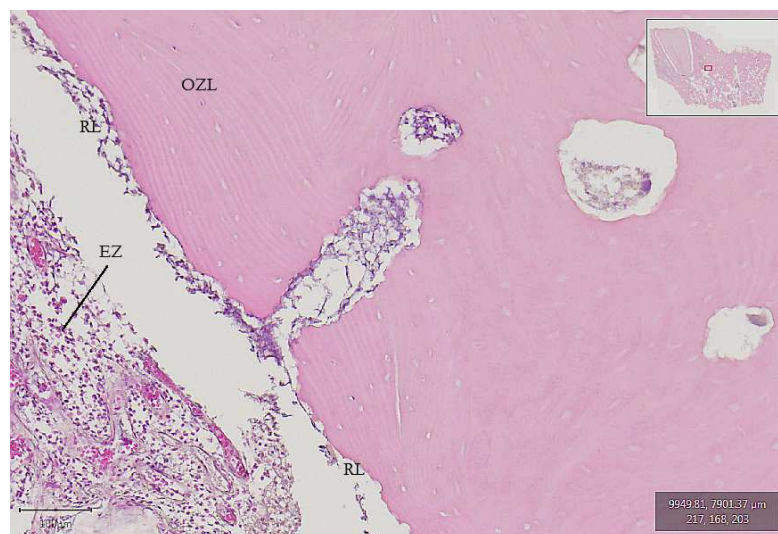


Abbildung 8: HE-Färbung BRONJ-Kieferknochenprobe aus Patientengruppe 1

Dargestellt ist eine zweite Detailaufnahme der HE-Färbung der BRONJ-Kieferknochenprobe 2 aus Patientengruppe 1 mit einem anderen Gebiet im Präparat. Die Abbildung zeigt den Übergang von der Nekrose (links) zum gesunden Anteil des Kieferknochens (rechts). Es sind wenige Osteozytenlakunen (OZL) mit darin enthaltenen Osteozyten erkennbar, überwiegend jedoch leere Osteozytenlakunen. Entzündungszellen (EZ) im Nekrosebereich, flache Resorptionslakunen (RL) im Übergang zum gesunden Knochenanteil. Oben rechts ist das *Inset* mit der genauen Lokalisation im Gesamtpräparat dargestellt. Unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* aufgelistet. Maßstab 100 µm. Originalvergrößerung x8,5 (QuPath).

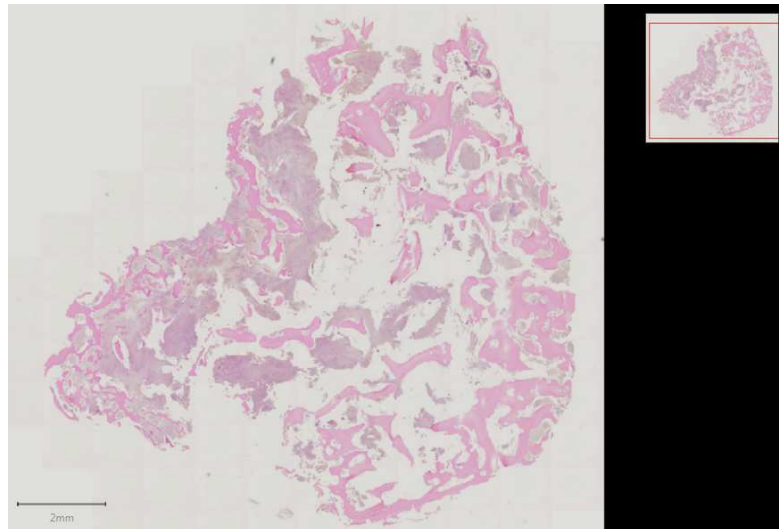


Abbildung 9: Übersicht HE-Färbung BRONJ-Kieferknochenprobe aus Patientengruppe 1

Die Abbildung zeigt eine Übersichtsaufnahme der HE-Färbung von Kieferknochenprobe 3 aus Patientengruppe 1. Dargestellt ist hier die fortgeschrittene Nekrose eines Kieferknochens. Die Kontinuität des Alveolarknochens ist weitläufig unterbrochen und aufgelöst. Die Hohlräume unterteilen den Knochen in diffuse Areale. Das *Inset* oben rechts im Bild zeigt die Präparatübersicht mit dem *Field of view* im Gesamtpräparat. Unten links der Maßstab von 2 mm. Originalvergrößerung x0,52 (QuPath).

3.2 IHC-Nachweisreaktion spezifischer Proteine in den erkrankten sowie gesunden Kieferknochenpräparaten

Jeder Versuch hat einen Reaktionsnachweis für die jeweiligen Antigene ergeben und in allen Proben hat eine Reaktion stattgefunden. In den nekrotischen Arealen sowie im Zelldetritus reagierten die AK ebenfalls. Es konnten in den Nekrosen der Kieferknochen Blutgefäße neben vielen Granulozyten sowie Lymphozyten und weiteren Entzündungszellen lokalisiert werden.

3.2.1 Neutrophile Elastase

In allen Gewebepräparaten von Patienten mit einer entwickelten Kieferknochennekrose (Gruppe 1) zeigte der AK gegen die neutrophile Elastase eine Reaktion, die im gesamten Schnittpräparat verteilt zu erkennen war. Die positive Reaktion war für den Entzündungsmarker neutrophile Elastase in den nekrotischen sowie auch den gesunden Knochenarealen der Kieferknochenpräparate lokalisiert (Abbildung 10). Hierbei fanden die Reaktionen besonders im Lamellen- und Bündelknochen statt. Auch in den Blutgefäßen im Knochen sowie den Nekrosen konnte eine Reaktion mit dem Entzündungsmarker nachgewiesen werden. Vermehrt hat diese in den vorliegenden Entzündungsbereichen der Nekrose stattgefunden, besonders im Zelldetritus war eine Reaktion des AK nachzuweisen (Abbildung 10). In der Zahnpulpa, welche im Kieferknochenpräparat 2 der erkrankten Patientengruppe zu erkennen ist, konnte ebenfalls eine Reaktion lokalisiert werden.

In den gesunden Knochenpräparaten der Patienten ohne Kiefernekrose und ohne Bisphosphonat-Einnahme (Gruppe 2) zeigte der AK gegen die neutrophile Elastase ebenfalls eine positive Reaktion an. Diese war im Knochen in den Osteozytenlakunen, den Blutgefäßen sowie auch den Havers-Kanälen vorhanden (Abbildung 11). Auch in den Volkmann-Kanälen, den transversalen Verbindungskanälen der Havers-Kanäle, ließ sich eine Reaktion lokalisieren. Im Bindegewebe lag ebenfalls ein Nachweis für das Protein vor (Abbildung 11).

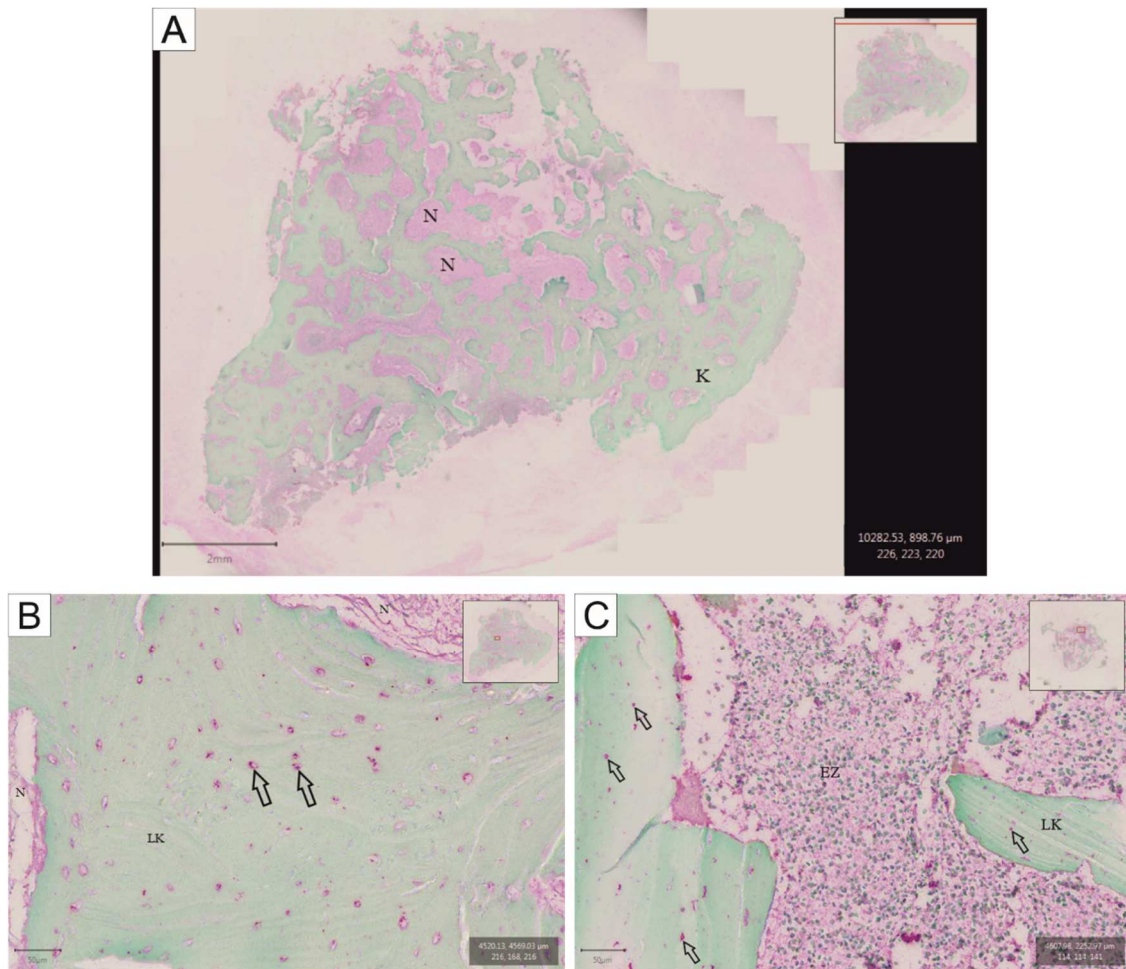


Abbildung 10: IHC-Nachweis für neutrophile Elastase in Patientengruppe 1

Dargestellt wird hier der IHC-Nachweis für die neutrophile Elastase in Kieferknochenprobe 1 (A, B) und Kieferknochenprobe 4 (C) aus der Gruppe der erkrankten Knochenproben. **A:** Die Abbildung zeigt eine Übersichtsaufnahme des Präparats. Es lassen sich die Nekrosebereiche (N) mit darin enthaltenem Zelldetritus innerhalb des Kieferknochens (K) erkennen. Die Abbildungen **B und C** zeigen Detailaufnahmen des jeweiligen Knochenpräparats. Beide veranschaulichen die Reaktion des AK gegen die neutrophile Elastase (Pfeile) im Lamellenknochen (LK) und den Nekrosebereichen (N). Viele Zellen im Präparat zeigen eine Reaktion an.

C: In dieser Abbildung lassen sich zusätzlich viele Entzündungszellen (EZ) in den Nekrosebereichen erkennen. **A:** Maßstab: 2 mm, Originalvergrößerung x0,6 (QuPath), **B:** Maßstab 50 μ m, Originalvergrößerung x20 (QuPath). **C:** Maßstab: 50 μ m, Originalvergrößerung x14,0 (QuPath). **A, B, C:** Oben rechts ist in der jeweiligen Abbildung das *Inset* mit der genauen Lokalisation des dargestellten Bildausschnitts im Gesamtpräparat zu sehen und unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* erkennbar.

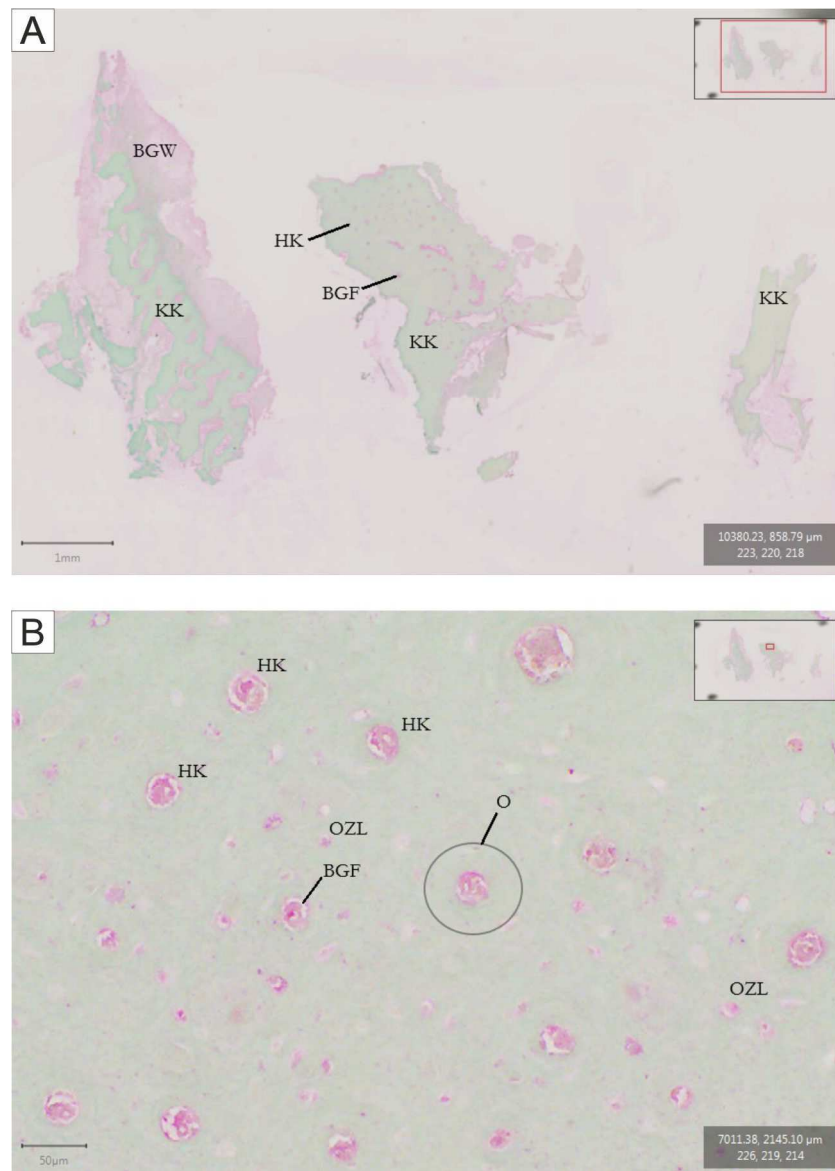


Abbildung 11: IHC-Nachweis für neutrophile Elastase in Patientengruppe 2

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für die neutrophile Elastase in Kieferknochenprobe 3 aus der Gruppe der gesunden Knochenproben. In Bild A ist eine Übersichtsaufnahme dargestellt und Bild B zeigt eine Detailaufnahme der Knochenprobe. **A:** Eine Reaktion liegt im Kieferknochen (KK), im Bindegewebe (BGW), in den Blutgefäßen (BGF) und Havers-Kanälen (HK) vor. Es sind keine nekrotischen Knochenareale vorhanden. Maßstab 1 mm, Originalvergrößerung x1,0 (QuPath). **B:** Osteon (O; umkreist) mit Havers-Kanälen (HK) und darin enthaltenen Blutgefäßen (BGF), deren Endothelwände sowie Lumen das Protein nachweisen. Die Osteozytenlakunen (OZL) sind ebenfalls in der Reaktion positiv und nicht leer. Maßstab 50 µm, Originalvergrößerung x14,2 (QuPath). **A, B:** Jeweils oben rechts im Bild ist das *Inset* mit dem genauen *Field of view* im Gesamtpräparat dargestellt. Unten rechts sind die Bildkoordinaten aufgelistet.

Der Vergleich der Knochenpräparate beider Patientengruppen für die neutrophile Elastase zeigte, dass in den erkrankten Kieferknochenproben eine höhere Anzahl an positiven Zell-Detektionen als bei den gesunden Kieferknochenproben vorhanden war. Dies zeigte sich bei der Auswertung mit dem Programm QuPath. In den erkrankten Knochenpräparaten lag ein Mittelwert von 1768 positiven Zell-Detektionen vor, bei den gesunden lag dieser hingegen lediglich bei 312 in den definierten Messbereichen. Bei den Mittelwerten der Zell-Detektionen lag nach vorheriger Prüfung und Auswertung des Q-Q-Diagramms (Abbildung 12) sowie des Shapiro-Wilk-Tests keine Normalverteilung vor.

Beim Vergleich der Stichproben beider Gruppen ergab sich im nicht-parametrischen Testverfahren des Mann-Whitney-U-Tests eine exakte Signifikanz von $p = 0,016$. Aufgrund des p -Werts wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese bestätigt, welche davon ausgeht, dass ein Unterschied zwischen dem erkrankten und dem gesunden Knochen für den Nachweis der neutrophilen Elastase vorliegt. Somit zeigte sich – statistisch betrachtet – ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an positiven Zell-Detektionen in den gesunden bzw. erkrankten Kieferknochenpräparaten, die hierbei eine signifikant höhere Anzahl an Zell-Detektionen aufwiesen. Der hohe Mittelwert der Messwerte für die Zell-Detektionen in den erkrankten Kieferknochenproben spricht für eine hohe Anzahl an Entzündungszellen sowie einen verstärkten Entzündungsvorgang in dem BRONJ-betroffenen Knochen. Besonders auffällig war beim Vergleich der Zellzählungen der Unterschied in den maximalen Mittelwerten, der in der erkrankten Patientengruppe mehr als achtmal größer war als in der Gruppe der gesunden Kieferknochenproben. Hierbei wurde in der erkrankten Gruppe (Gruppe 1) der Maximalwert eines Ausreißers mit 2838 Detektionen festgestellt, bei den gesunden Proben (Gruppe 2) lag dieser bei maximal 351.

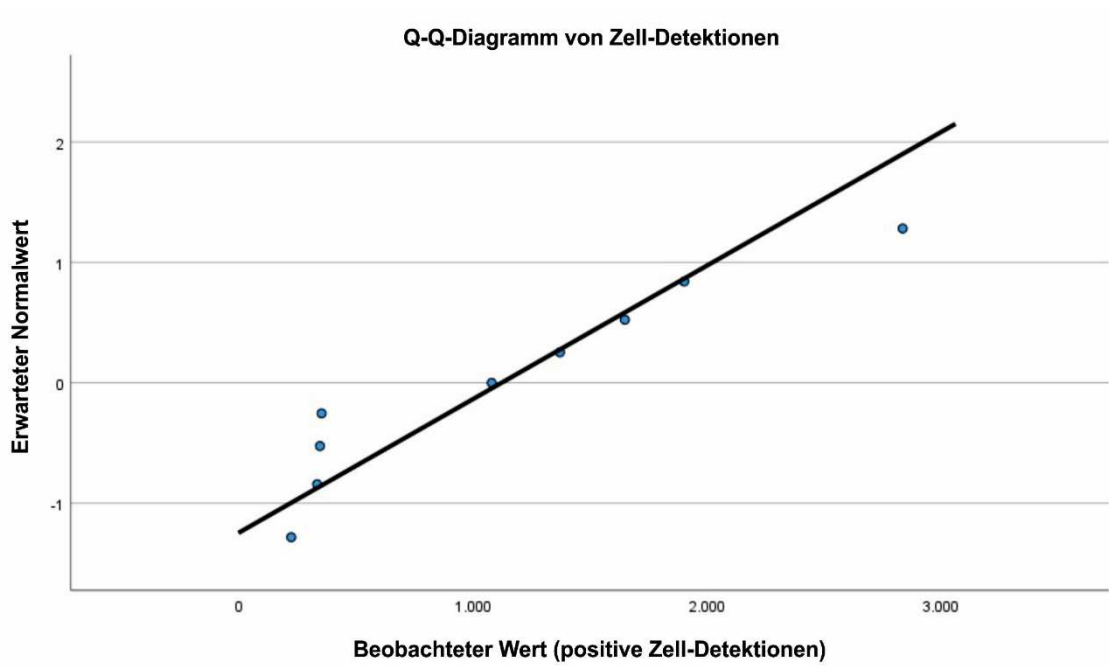


Abbildung 12: Q-Q-Diagramm – neutrophile Elastase

Die einzelnen Punkte im Q-Q-Diagramm stellen die Messwerte der positiven Zell-Detektionen in den definierten Messbereichen der gesunden und erkrankten Kieferknochenproben dar. Die schwarze diagonale Linie zeigt die Normalverteilung der Daten an, bei der der beobachtete Wert dem erwarteten Normalwert entspricht. Würden die Punkte nah an oder auf der Linie liegen, würde eine Normalverteilung der Werte bestehen. Dies ist in diesem Diagramm für die Detektionen in den Knochenproben nicht der Fall.

3.2.2 Collagen-I

Collagen Typ I konnte in allen Gewebeschnitten von Patienten mit entwickelter Kieferknochennekrose (Gruppe 1) durch die IHC-Nachweisreaktion lokalisiert werden. Der gegen Col-I gerichtete AK zeigte eine Reaktion im vorhandenen Restknochengewebe (Abbildung 13A), jedoch nicht in den aufgelösten Knochenbereichen innerhalb der Nekrose. In Abbildung 13B lassen sich die Collagenfibrillen erkennen, welche parallel bzw. anisotrop in den Knochenlamellen angeordnet sind. Die in der Reaktion positiven Fibrillen, welche konzentrisch in den einzelnen parallelen Knochenlamellen verliefen, bildeten ein geordnetes Osteonmuster. Im Zelldetritus der Nekrosen wurde Col-I ebenso sichtbar, eine Vielzahl von Zellen und aufgelöstem Zellmaterial wurde angefärbt (Abbildung 13A). Im Kieferknochenpräparat 2 kam es auch im Parodontalspalt zu einer Reaktion des AK, bei der Anteile der Sharpey-Fasern erkennbar wurden (Abbildung 13A). Auch die Zahnpulpa zeigte einen Reaktionsnachweis für das Protein Col-I.

In allen gesunden Kieferknochenproben von den Patienten ohne Kiefernekrose (Gruppe 2) hat eine Reaktion beim AK gegen das Protein Col-I stattgefunden. In den Gewebeschnitten wurden die Collagenfibrillen lokalisierbar, welche im Lamellenknochen parallel bzw. anisotrop zueinander verliefen. Ihre Einheit bildete ein strukturiertes Osteonmuster (Abbildung 15). In den jeweiligen Osteonen wurden Havers-Kanäle lokalisierbar, die Blutgefäße mit einer ebenfalls positiven Reaktion für das Protein aufwiesen. Der Kieferknochen ließ eine Unterscheidung hinsichtlich des Geflecht- sowie Lamellenknochens zu (Abbildung 15C). Ein Zelldetritus war in keiner der Gewebeschnitte vorhanden. Die Osteozytenlakunen waren sichtbar und ebenfalls positiv in der Nachweisreaktion. Im vorhandenen Bindegewebe wurde Col-I detektiert (Abbildung 14).

Bei der Auswertung der Zell-Detektionen für den AK gegen Col-I lag bei den Mittelwerten der verglichenen Zell-Detektionen keine Normalverteilung vor. Der Vergleich der Mittelwerte beider Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zell-Detektionen bei den Kieferknochenproben für Col-I. Die exakte Signifikanz von $p = 0,190$ wurde als Ergebnis des statistischen Testverfahrens errechnet. Somit konnte die Nullhypothese nicht verworfen werden. Es bestand also kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben. Der durchschnittliche Mittelwert der Zell-Detektionen bei den erkrankten Kieferknochenproben lag bei 321 und bei den gesunden bei 522 Zellen pro Schnittpräparat.

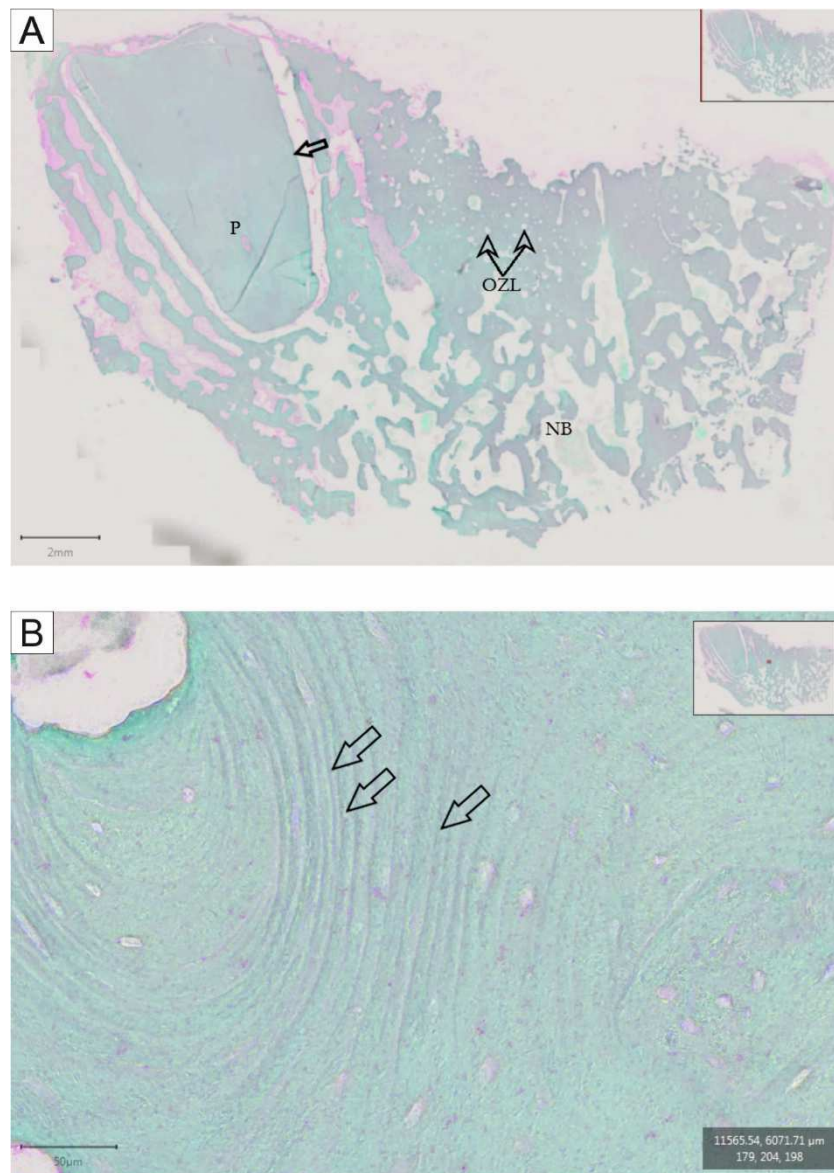


Abbildung 13: IHC-Nachweis für Col-I in Patientengruppe 1

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für das Protein Col-I in Kieferknochenprobe 2 aus der Gruppe der erkrankten Knochenproben. In Bild A ist eine Übersichtsaufnahme der Nachweisreaktion dargestellt und Bild B zeigt eine Detailaufnahme der Knochenprobe. **A:** Abbildung A zeigt einen Zahn (Pfeil) inklusive Pulpa (P) mit positivem Reaktionsnachweis im Inneren. Leere Osteozytenlakunen (OZL) im Kieferknochen sowie ein Nekrosebereich mit Zelldetritus lassen sich erkennen. Maßstab 2 mm, Originalvergrößerung x0,3 (QuPath). **B:** Es lässt sich im Detailbild die konzentrisch und parallel verlaufenden Collagenfibrillen (Pfeil) erkennen. Der Havers-Kanal oben links im Bild enthält Überreste eines Blutgefäßes. Maßstab 50 μm, Originalvergrößerung x17,0 (QuPath).

A, B: Oben rechts ist in der jeweiligen Abbildung das *Inset* mit der genauen Lokalisation des dargestellten Bildausschnitts im Gesamtpräparat zu sehen und unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* erkennbar.



Abbildung 14: IHC-Nachweis für Col-I in Patientengruppe 2

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für das Protein Col-I in Kieferknochenprobe 3 aus der Gruppe der gesunden Knochenproben. Zu sehen sind der Kieferknochen (grün) und die darin enthaltenen Havers-Kanäle (HK) und Bindegewebsanteile (BGW). Rechts oben im roten Rechteck ist das *Field of view* in Bezug auf das Gesamtpräparat dargestellt. Rechts unten werden die Lokalisationskoordinaten angezeigt. Maßstab: 2 mm. Originalvergrößerung x0,4 (QuPath).

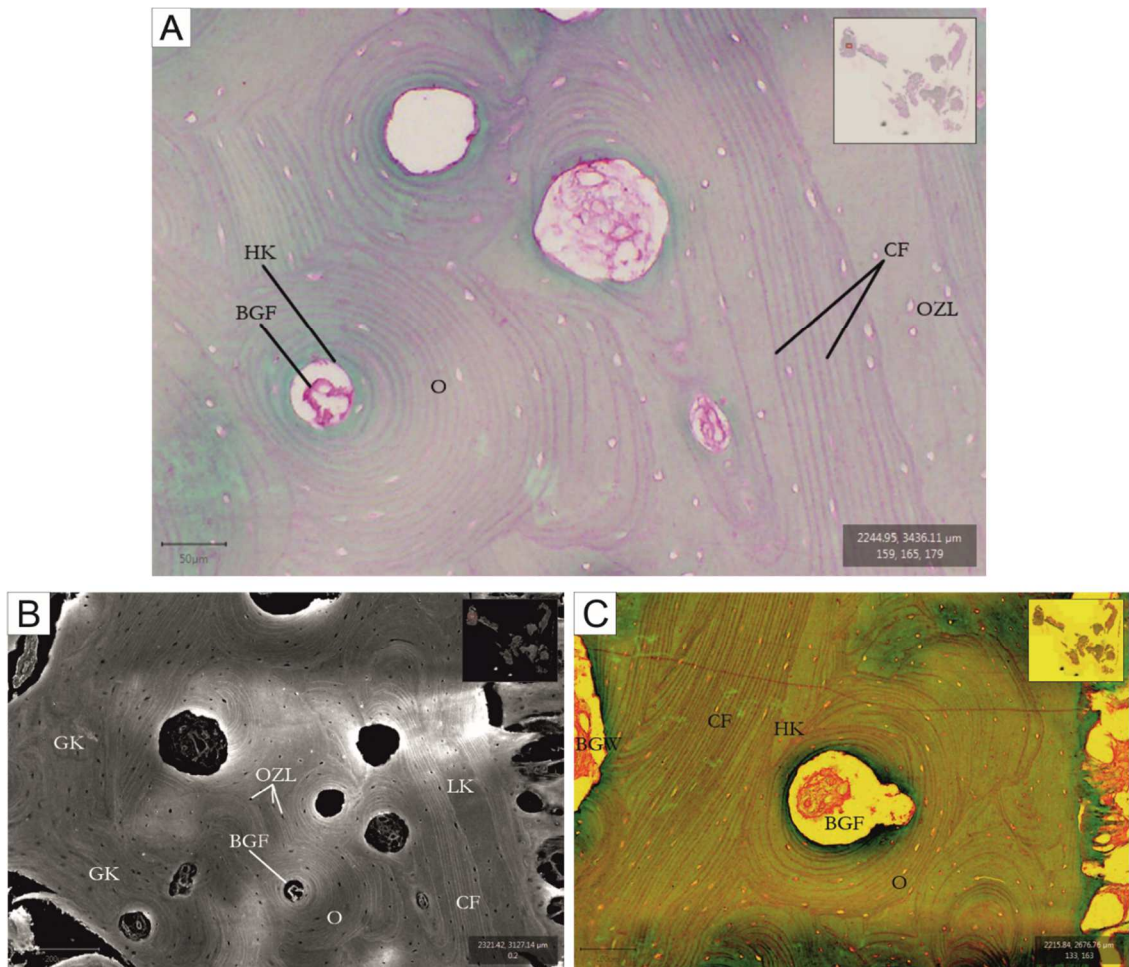


Abbildung 15: Detailübersicht: IHC-Nachweis für Col-I in Patientengruppe 2

Die Abbildung zeigt verschiedene Detailaufnahmen der Kieferknochenprobe 4 aus der Gruppe der gesunden Knochenproben ohne Bisphosphonat-Medikation und ohne entwickelte BRONJ. Jeweils oben rechts ist das *Field of view* zu sehen. Unten rechts befinden sich die Positionskoordinaten. **A:** Collagenfibrillen (CF), Havers-Kanal (HK), Blutgefäß (BGF), Osteon (O), Osteozytenlakunen (OZL). Maßstab: 50 µm. Originalvergrößerung x14,1 (QuPath). **B:** Darstellung unter Kontrast- sowie Helligkeitseinstellung *Optical density sum* zur besseren Veranschaulichung der Collagenfibrillen im Kieferknochen. Verdeutlichung von Geflechtknochen (GK) und Lamellenknochen (LK). Osteozytenlakunen (OZL), geordnete sowie parallele Collagenfibrillen (KF), Blutgefäß (BGF) und Osteon (O). Maßstab: 200 µm. Originalvergrößerung x7,0 (QuPath). **C:** Verdeutlichung der Verlaufsrichtung und Darstellung der Collagenfibrillen (KF) mit hinterlegtem Rot-Grün-Filter im Programm QuPath, Standardeinstellung der Intensität beibehalten. Blutgefäß (BGF) im Havers-Kanal (HK) und Osteon (O), Bindegewebe (BGW). Maßstab: 100 µm. Originalvergrößerung x9,2 (QuPath).

3.2.3 RUNX2

In allen Kieferknochenproben der an einer BRONJ erkrankten Patienten zeigte der AK gegen das Protein RUNX2 eine Reaktion. Diese hat im Knochengewebe und in den nekrotischen Knochenarealen sowie dem nekrotischen Zelldetritus stattgefunden (Abbildung 16A). RUNX2 konnte in den Osteozytenlakunen sowie den Osteozyten des Lamellenknochens nachgewiesen werden (Abbildung 16B). In den Endothelzellwänden der Blutgefäße im Knochen und in den Nekrosen wurde RUNX2 ebenfalls lokalisierbar.

Das Protein RUNX2 konnte in allen Kieferknochenproben der gesunden Patienten nachgewiesen werden. In dem an den Knochen angrenzenden Bindegewebe wurde RUNX2 lokalisierbar (Abbildung 17A). Des Weiteren lag eine Reaktion im Knochengewebe, den Blutgefäßen und in deren Endothelzellwänden vor (Abbildung 17B).

Der Vergleich der Knochenpräparate zwischen der gesunden und erkrankten Patientengruppe für das Protein RUNX2 zeigte, dass bei der Auswertung für die Messwerte der Zeldetektionen keine Normalverteilung der Werte vorlag. Die statistische Auswertung durch den Mann-Whitney-U-Test ergab eine exakte Signifikanz von $p = 0,016$. Daher wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese war für das Protein RUNX2 gültig. Es lag somit ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeldetektionen in den gesunden und den erkrankten Proben bei der Auswertung vor.

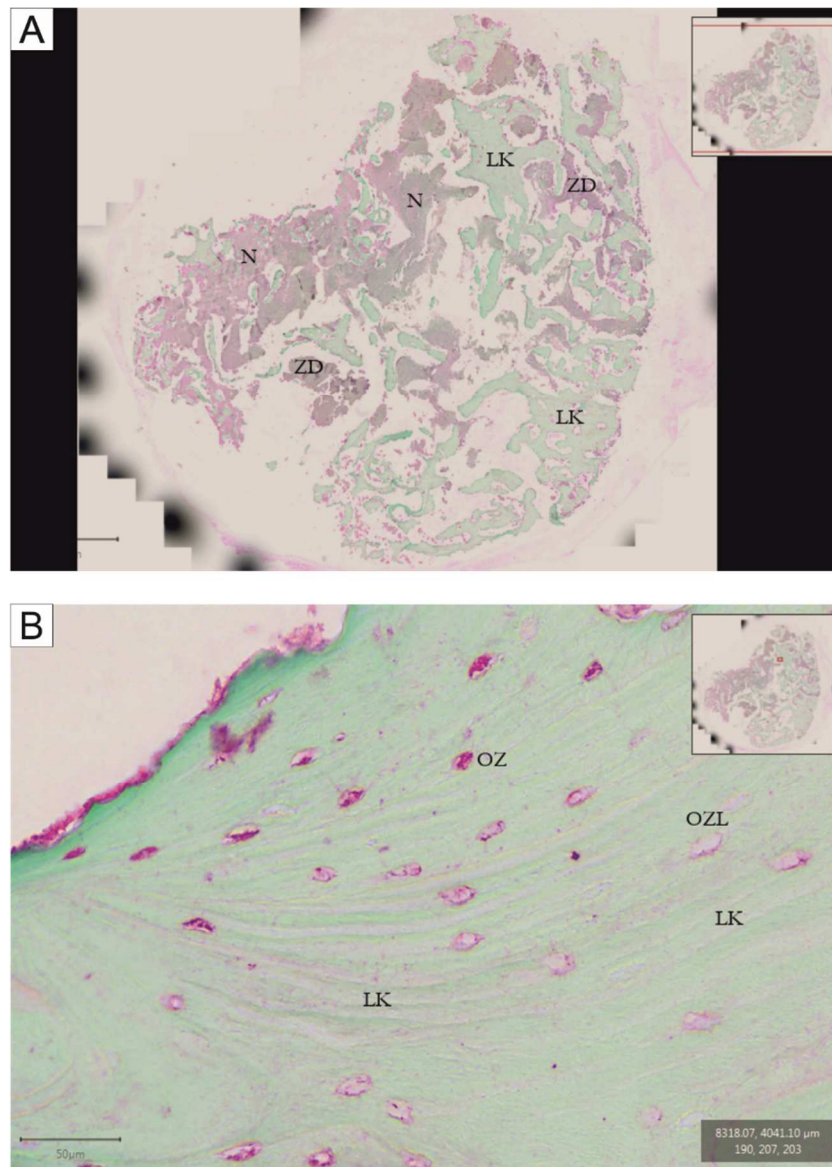


Abbildung 16: IHC-Nachweis für RUNX2 in Patientengruppe 1

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für das Protein RUNX2 in Kieferknochenprobe 3 aus der Gruppe der erkrankten Knochenproben. In Bild A ist eine Übersichtsaufnahme der Nachweisreaktion dargestellt und Bild B zeigt eine Detailaufnahme der Knochenprobe. **A:** Die Abbildung veranschaulicht, dass im Lamellenknochen (LK), in der Nekrose (N) und auch dem vorhandenen Zelldetritus (ZD) eine Reaktion stattgefunden hat. Maßstab 2 mm, Originalvergrößerung x0,30 (QuPath). **B:** Im Detailbild ist zu erkennen, dass ein Reaktionsnachweis für das Protein RUNX2 in den Osteozyten (OZ) und den Osteozytenlakunen (OZL) stattgefunden hat. Der Bildausschnitt befindet sich im Lamellenknochen (LK). Maßstab 50 µm, Originalvergrößerung x20,0 (QuPath).

A, B: Oben rechts ist in der jeweiligen Abbildung das *Inset* mit der genauen Lokalisation des dargestellten Bildausschnitts im Gesamtpräparat zu sehen und unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* erkennbar.

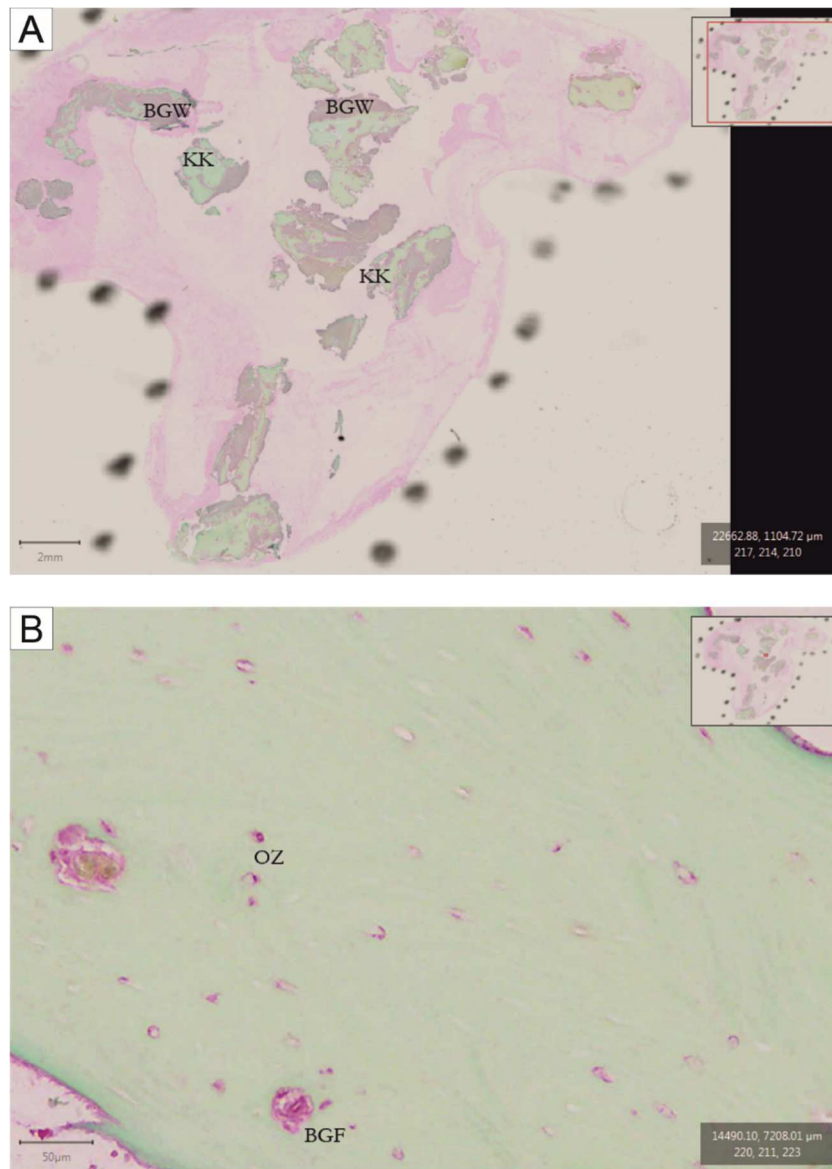


Abbildung 17: IHC-Nachweis für RUNX2 in Patientengruppe 2

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für das Protein RUNX2 in Kieferknochenprobe 4 aus der Gruppe der gesunden Knochenproben. In Bild A ist eine Übersichtsaufnahme der Nachweisreaktion dargestellt und Bild B zeigt eine Detailaufnahme der Knochenprobe. **A:** Abbildung A zeigt die Reaktion im Kieferknochen (KK) und dem Bindegewebe (BGW). Es liegen keine nekrotischen Knochenareale vor. Maßstab 2 mm, Originalvergrößerung x0,33 (QuPath). **B:** Es lassen sich im Detailbild die positive Reaktion für RUNX2 in den Blutgefäßen (BGF) und deren Endothelwänden erkennen. Die Osteozytenlakunen sind nicht leer. In den Osteozyten wurde RUNX2 lokalisierbar. Maßstab 50 μ m, Originalvergrößerung x16,06 (QuPath).

A, B: Oben rechts ist in der jeweiligen Abbildung das *Inset* mit der genauen Lokalisation des dargestellten Bildausschnitts im Gesamtpräparat zu sehen und unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* erkennbar. Die schwarzen Marker-Punkte dienen zur Umrandung der Kieferknochenproben.

3.2.4 SMURF1

Der AK gegen SMURF1 zeigte bei allen Gewebepreparaten der Patientengruppe 1 eine Reaktion an. Das Protein SMURF1 wurde im Kieferknochen und in den Nekrosearealen lokalisierbar. Im Zelldetritus lag eine positive Reaktion für SMURF1 vor (Abbildung 18). Der Kieferknochen enthielt wenig intakte Havers-Kanäle, in den meisten lag ein leeres Lumen vor.

Die Kieferknochenproben ohne entwickelte BRONJ der Patientengruppe 2 zeigten eine Reaktion im Knochengewebe an. In den enthaltenen Havers-Kanälen wurde das Protein SMURF1 lokalisierbar. Hierbei hat sowohl in den Havers-Kanälen als auch in den Endothelzellwänden der in ihnen enthaltenen Blutgefäße eine Reaktion stattgefunden (Abbildung 19B). Ihr Lumen war weder kollabiert noch leer. In den um die Havers-Kanäle lokalisierbaren Osteonen konnte SMURF1 nachgewiesen werden. Innerhalb der an den Kieferknochen angrenzenden Bindegewebsstrukturen hat ebenfalls eine Reaktion stattgefunden.

Beim Vergleich der Stichproben aus beiden Gruppen hinsichtlich der Nachweisreaktion für das Protein SMURF1 ergab das nicht-parametrische Testverfahren des Mann-Whitney-U-Tests eine exakte Signifikanz von $p = 0,286$. Aufgrund des errechneten p-Werts konnte die Nullhypothese nicht verworfen werden. Es lag somit kein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten und den gesunden Kieferknochenproben für die Nachweisreaktion des Proteins SMURF1 vor. Die Messwerte beider Gruppen wiesen nach der Auswertung des Q-Q-Diagramms keine Normalverteilung auf.

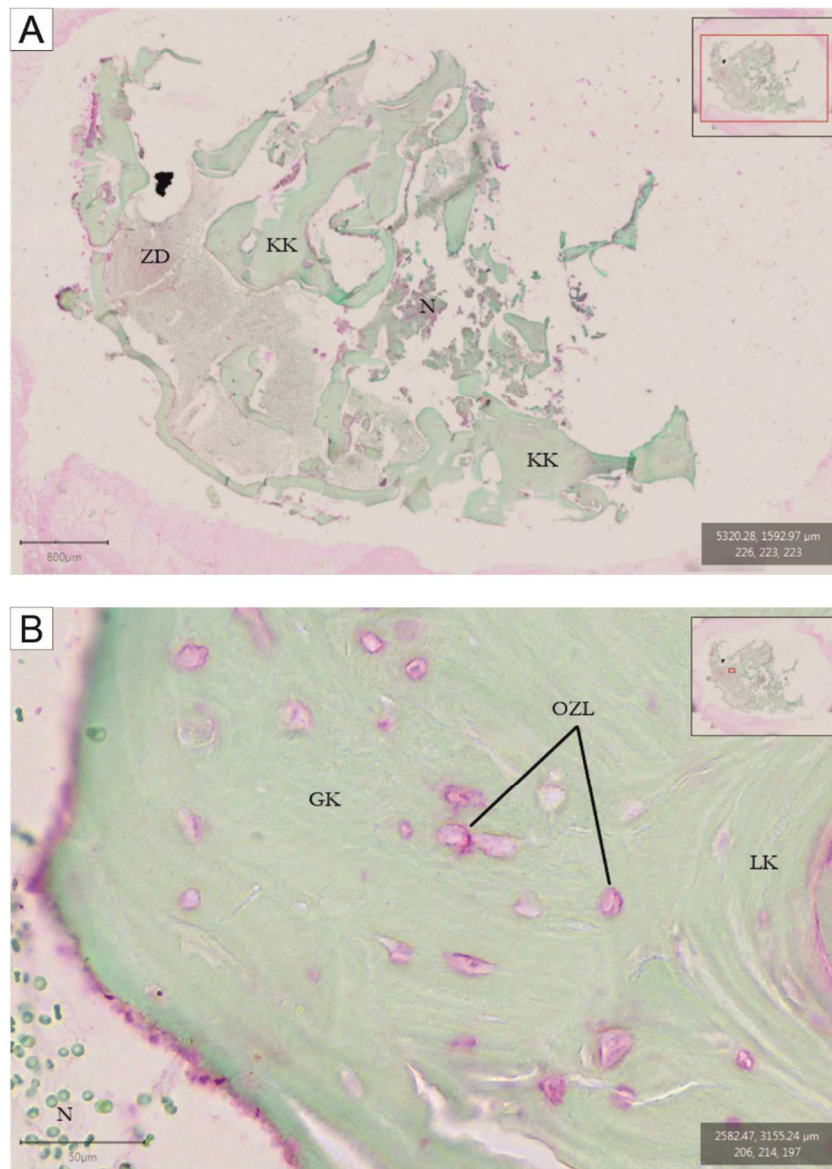


Abbildung 18: IHC-Nachweis für SMURF1 in Patientengruppe 1

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für das Protein SMURF1 in Kieferknochenprobe 4 aus der Gruppe der erkrankten Knochenproben. In Bild A ist eine Übersichtsaufnahme der Nachweisreaktion dargestellt und Bild B zeigt eine Detailaufnahme der Knochenprobe. **A:** Im Kieferknochen (KK), in der Nekrose (N) sowie im Zelldetritus (ZD) liegt eine positive Reaktion vor. Maßstab 800 µm, Originalvergrößerung x1,0 (QuPath).

B: In der Detailaufnahme lassen sich der Lamellenknochen (LK) und der Geflechtknochen (GK) erkennen. In den Osteozytenlakunen (OZL) ist das Protein SMURF1 lokalisierbar. Die Nekrose (N) grenzt links im Bild an den Kieferknochen an. Maßstab 50 µm, Originalvergrößerung x20,0 (QuPath).

A, B: Oben rechts ist in der jeweiligen Abbildung das *Inset* mit der genauen Lokalisation des dargestellten Bildausschnitts im Gesamtpräparat zu sehen und unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* erkennbar.

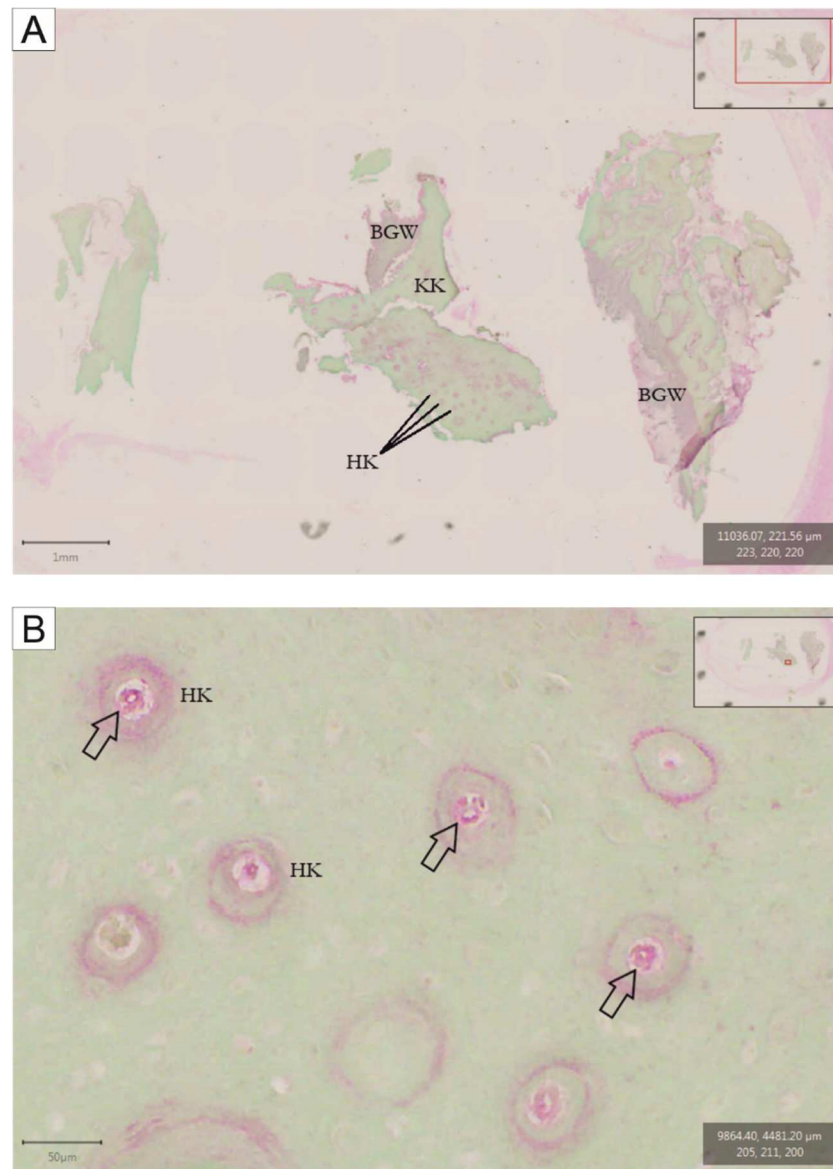


Abbildung 19: IHC-Nachweis für SMURF1 in Patientengruppe 2

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für das Protein SMURF1 in Kieferknochenprobe 4 aus der Gruppe der gesunden Knochenproben. In Bild A ist eine Übersichtsaufnahme der Nachweisreaktion dargestellt und Bild B zeigt eine Detailaufnahme der Knochenprobe. **A:** Im Kieferknochen (KK) und dem an den Knochen angrenzenden Bindegewebe (BGW) liegt ein Reaktionsnachweis vor. Die im Kieferknochen liegenden Havers-Kanäle (HK) sind in der Reaktion positiv und lassen sich in der Übersichtsaufnahme erkennen. Maßstab 1 mm, Originalvergrößerung x0,95 (QuPath). **B:** Die Detailaufnahme zeigt die Havers-Kanäle (HK) und die darin enthaltenen Blutgefäße (Pfeil) im Alveolarknochen. In den Havers-Kanälen und in den Endothelwänden der Blutgefäße ist SMURF1 lokalisierbar. Maßstab 50 μm, Originalvergrößerung x17,3 (QuPath).

A, B: Oben rechts ist in der jeweiligen Abbildung das *Inset* mit der genauen Lokalisation des dargestellten Bildausschnitts im Gesamtpräparat zu sehen und unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* erkennbar. Die schwarzen Marker-Punkte dienen zur Umrandung der Kieferknochenproben.

3.2.5 SMURF2

In allen Gewebepreparaten von Patienten mit einer entwickelten Kieferknochennekrose (Gruppe 1) zeigte der AK gegen das Protein SMURF2 eine Reaktion, die im gesamten Schnittpräparat verteilt lokalisierbar war. In den nekrotischen Knochenarealen der Kieferknochenproben hat eine positive Reaktion stattgefunden (Abbildung 20A). Im Knochengewebe wurde eine Reaktion für SMURF2 erkennbar (Abbildung 20B). Die Osteozytenlakunen zeigten vereinzelt einen Nachweis für das Protein. Viele Lakunen waren leer und wiesen keine Reaktion auf. In den Blutgefäßen der nekrotischen Kieferknochenareale wurde SMURF2 lokalisierbar.

In den gesunden Knochenpreparaten der Patienten ohne Kiefernekrose und ohne Bisphosphonat-Einnahme (Gruppe 2) zeigte der AK gegen SMURF2 eine positive Reaktion an. Diese lag im Knochen und auch im angrenzenden Bindegewebe vor (Abbildung 21A). Die Havers-Kanäle mit den darin enthaltenen Blutgefäßen wiesen in der Reaktion einen Nachweis für das Protein auf (Abbildung 21B). In den Osteozytenlakunen sowie den enthaltenen Nuclei wurde SMURF2 lokalisierbar.

Der Vergleich zwischen den Knochenpreparaten der gesunden und der erkrankten Patientengruppe für das Protein SMURF2 zeigte, dass in den erkrankten Kieferknochenproben keine wesentlich höhere Anzahl an positiven Zell-Detektionen als bei den gesunden vorhanden war, was durch die Auswertung mit dem Programm QuPath bestätigt wurde. In den Knochenpreparaten von Gruppe 1 wurde ein Mittelwert von 610 positiven Zell-Detektionen errechnet, für Gruppe 2 von 548 in den definierten Messbereichen. Bei den Mittelwerten der Zell-Detektionen lag nach Prüfung und Auswertung mit Hilfe des Q-Q-Diagramms keine Normalverteilung vor. Es wurde im Rahmen der statistischen Auswertung der Messwerte eine exakte Signifikanz von $p = 0,905$ errechnet. Somit konnte die Nullhypothese nicht verworfen werden. Es liegt als Ergebnis daher kein signifikanter Unterschied für das Protein SMURF2 hinsichtlich des Vergleichs beider Patientengruppen vor.

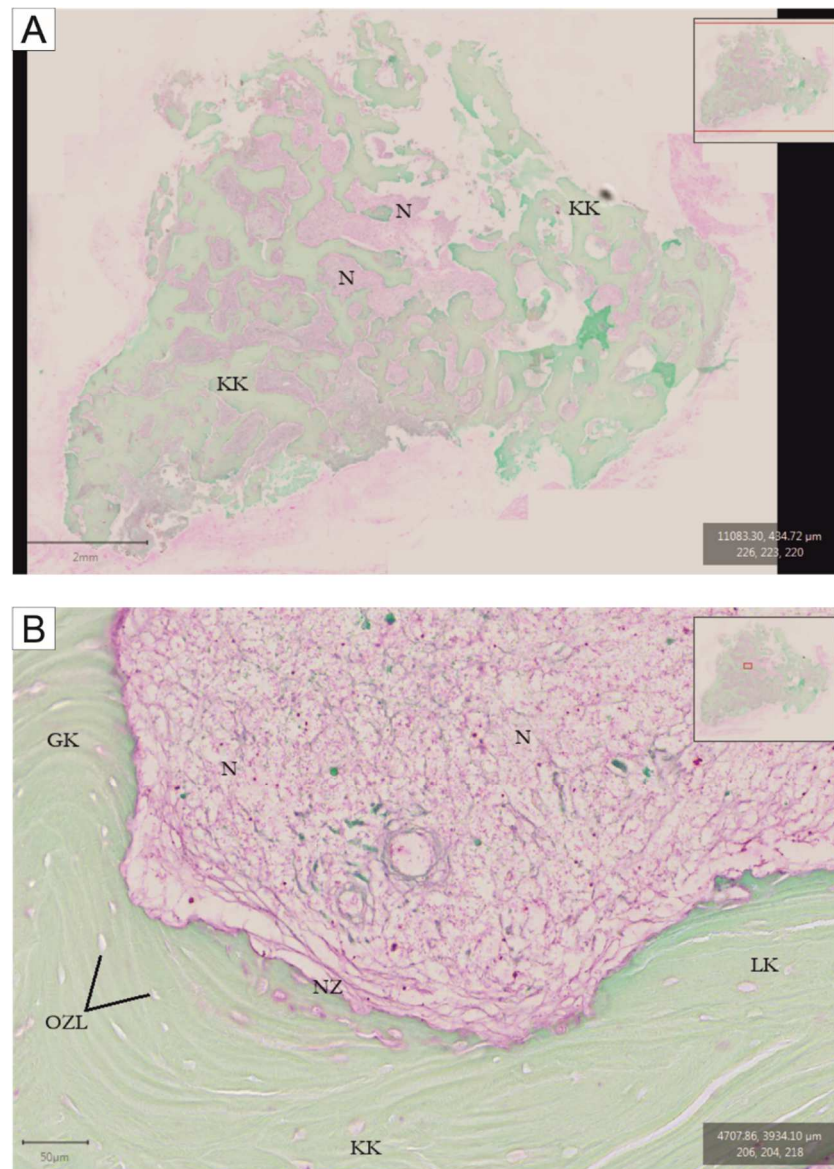


Abbildung 20: IHC-Nachweis für SMURF2 in Patientengruppe 1

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für das Protein SMURF2 in Kieferknochenprobe 1 aus der Gruppe der erkrankten Knochenproben. In Bild A ist eine Übersichtsaufnahme der Nachweisreaktion dargestellt und Bild B zeigt eine Detailaufnahme der Knochenprobe. **A:** Im Kieferknochen (KK) und in der Nekrose (N) liegt ein Reaktionsnachweis vor. Maßstab 2 mm, Originalvergrößerung x1,0 (QuPath). **B:** Die Detailaufnahme zeigt den Übergang vom Kieferknochen (KK) zur Nekrose (N) und die dazwischen liegende Nekrosezone (NZ). Viele der vorhandenen Osteozytenlakunen sind leer und in der Reaktion negativ. Nur wenige weisen eine positive Reaktion auf. Ein Übergang vom Lamellenknochen (LK) hin zum Geflechtknochen (GK) lässt sich erkennen. Maßstab 50 µm, Originalvergrößerung x19,0 (QuPath).

A, B: Oben rechts ist in der jeweiligen Abbildung das *Inset* mit der genauen Lokalisation des dargestellten Bildausschnitts im Gesamtpräparat zu sehen und unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* erkennbar.

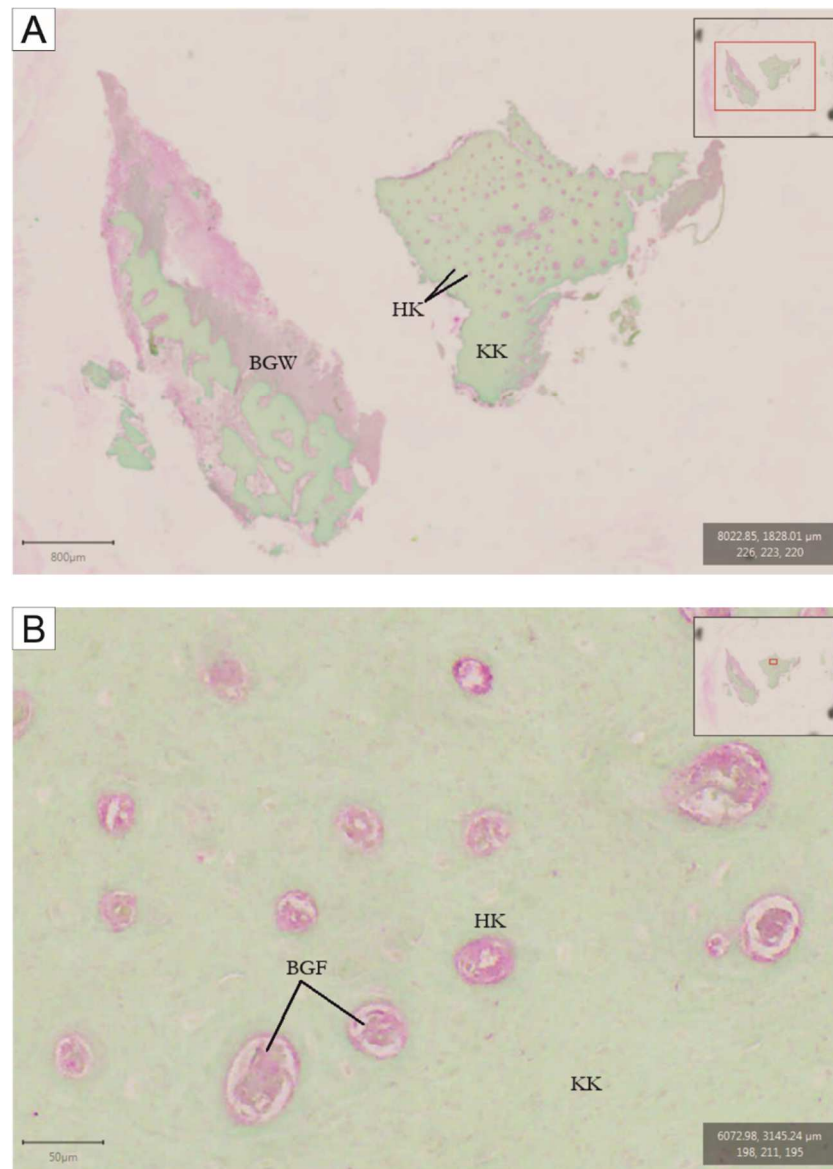


Abbildung 21: IHC-Nachweis für SMURF2 in Patientengruppe 2

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für das Protein SMURF2 in Kieferknochenprobe 1 aus der Gruppe der gesunden Knochenproben. Bild A zeigt eine Übersichtsaufnahme der Nachweisreaktion und Bild B zeigt eine Detailaufnahme der Knochenprobe. **A:** Im Kieferknochen (KK) liegt ein Reaktionsnachweis für das Protein SMURF2 vor. Auch im angrenzenden Bindegewebe ist eine Reaktion erkennbar. In den im Alveolarknochen liegenden Havers-Kanälen hat eine Reaktion stattgefunden. SMURF2 wurde in den Blutgefäßen lokalisierbar. Maßstab 800 μm, Originalvergrößerung x1,25 (QuPath). **B:** Die Detailaufnahme zeigt einen Bildausschnitt aus dem gesunden Kieferknochen (KK) und den darin liegenden Havers-Kanälen (HK). Die Blutgefäße wiesen in der Reaktion einen positiven Nachweis für das Protein auf. Maßstab 50 μm, Originalvergrößerung x17,8 (QuPath).

A, B: Oben rechts ist in der jeweiligen Abbildung das *Inset* mit der genauen Lokalisation des dargestellten Bildausschnitts im Gesamtpräparat zu sehen und unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* erkennbar.

3.2.6 SMAD2/3

Das Protein SMAD2/3 konnte in allen Gewebeschnitten der Patienten aus Gruppe 1 durch die IHC-Nachweisreaktion lokalisiert werden. Der gegen SMAD2/3 gerichtete AK zeigte eine Reaktion im vorhandenen Kieferknochen und in der vorliegenden Nekrose (Abbildung 22A). Im Knochen wurden weniger SMAD2/3-positive Zellen lokalisierbar als in Bereichen der Nekrose. Im vorhandenen Zelldetritus konnte das Protein nachgewiesen werden und in den Blutgefäßen des Knochens hat eine Reaktion für SMAD2/3 stattgefunden. Die Detailaufnahme (Abbildung 22B) zeigt den Nachweis des Proteins SMAD2/3 in der Kieferknochennekrose sowie im Zelldetritus.

In allen gesunden Kieferknochenproben aus Gruppe 2 der Patienten ohne Knochennekrose wurde SMAD2/3 lokalisierbar. Hierbei hat im Kieferknochen sowie im angrenzenden Bindegewebe eine Reaktion stattgefunden (Abbildung 23A). In den Blutgefäßen des Kieferknochens wurde das Protein lokalisiert (Abbildung 23B). Die Reaktion verteilte sich im Alveolarknochen eher auf die Markhöhlen der Kieferknochenabschnitte als auf den Lamellen- und Geflechtknochen.

Der Vergleich der Stichproben beider Patientengruppen hat gezeigt, dass im Kieferknochen selbst bei Patientengruppe 2 mehr SMAD2/3-positive Zell-Detektionen vorlagen als in der erkrankten Patientengruppe 1. Die Prüfung der Messwerte auf ihre Normalverteilung ergab, dass diese beim Protein SMAD2/3 nicht vorlag. Bei der statistischen Auswertung mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde eine exakte Signifikanz von $p = 0,032$ errechnet. Die Nullhypothese wurde daher verworfen und die Alternativhypothese war für das Protein SMAD2/3 gültig. Es lag somit ein signifikanter Unterschied zwischen den Zell-Detektionen in den gesunden und in den erkrankten Knochenproben vor. In den erkrankten Kieferknochenproben lagen mehr SMAD2/3-positive Zellen bei den Zell-Detektionen vor als in den gesunden Knochenpräparaten. In Gruppe 1 lag der höchste errechnete Mittelwert bei 1763 in den definierten drei Messbereichen, bei Gruppe 2 lag er bei 736 Zell-Detektionen. Innerhalb der Nekrosen des Kieferknochens lagen hohe Detektionswerte vor.

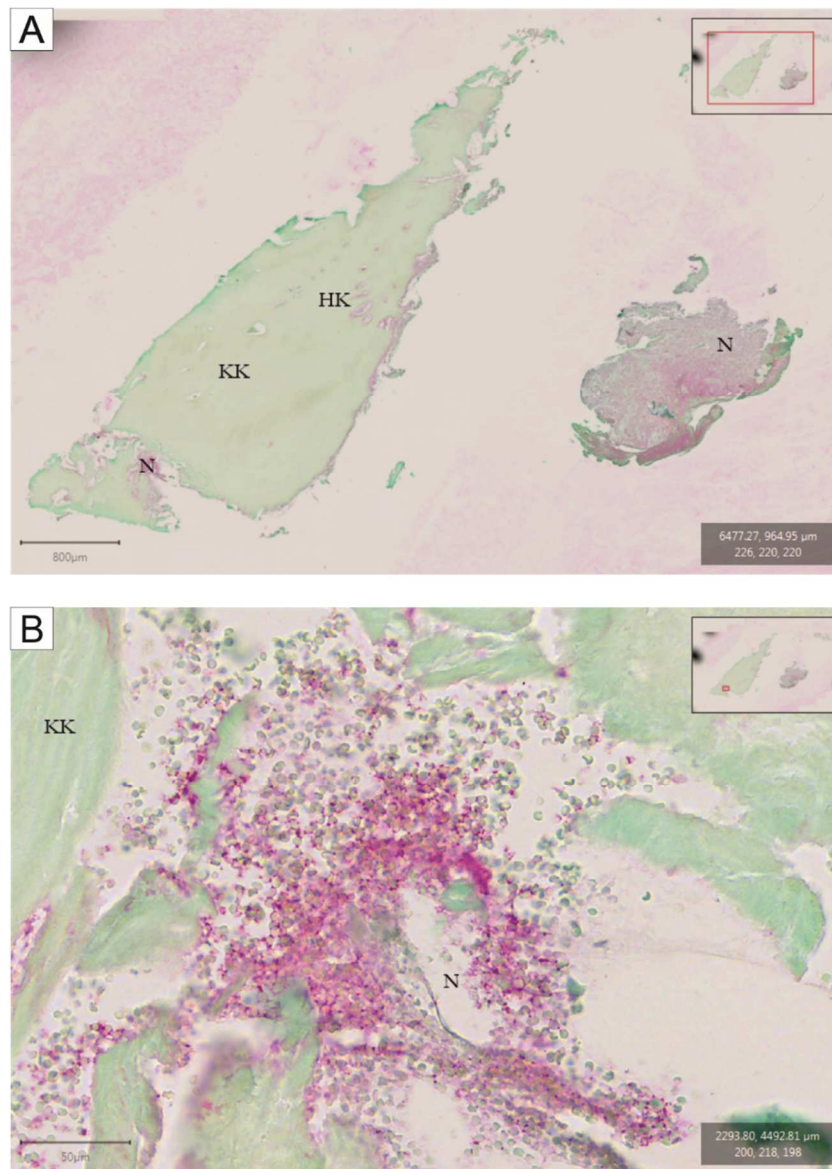


Abbildung 22: IHC-Nachweis für SMAD2/3 in Patientengruppe 1

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für das Protein SMAD2/3 in Kieferknochenprobe 3 aus der Gruppe der erkrankten Knochenproben. Bild A zeigt eine Übersichtsaufnahme der Nachweisreaktion und Bild B zeigt eine Detailaufnahme der Knochenprobe. **A:** Im Kieferknochen (KK) liegt ein Reaktionsnachweis für das Protein SMAD2/3 vor. Im Alveolarknochen sind wenige Havers-Kanäle (HK) erkennbar. Die Nekrose (N) lässt sich deutlich vom gesunden Kieferknochen unterscheiden. In der Nekrose hat ebenfalls ein Reaktionsnachweis stattgefunden. Maßstab 800 µm, Originalvergrößerung x1,30 (QuPath). **B:** Die Detailaufnahme zeigt einen Bildausschnitt aus dem erkrankten Kieferknochen (KK) und der Nekrose (N) sowie dem Übergang beider Knochenbereiche. In der Nekrose hat eine vermehrte Reaktion stattgefunden. In dem nekrotischen Knochenareal liegen viele Entzündungszellen vor. Maßstab 50 µm, Originalvergrößerung x19,0 (QuPath).

A, B: Oben rechts ist in der jeweiligen Abbildung das *Inset* mit der genauen Lokalisation des dargestellten Bildausschnitts im Gesamtpräparat zu sehen und unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* erkennbar.

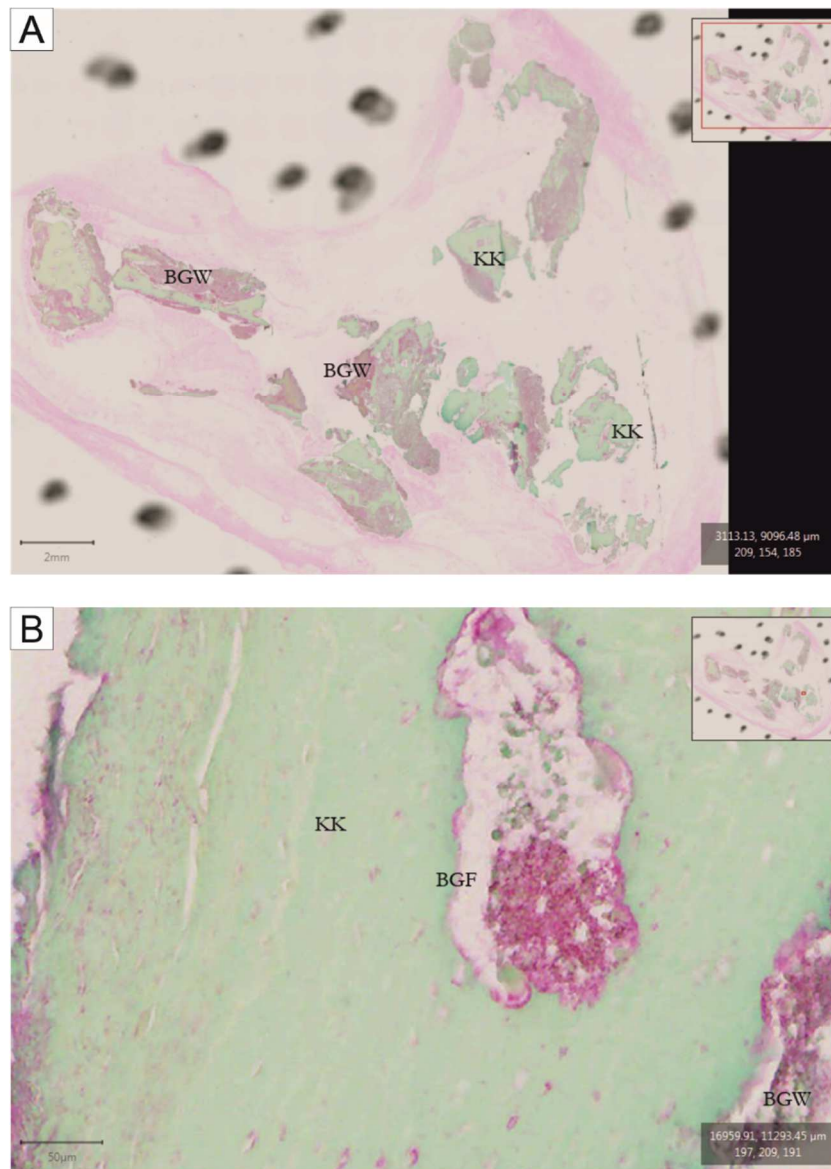


Abbildung 23: IHC-Nachweis für SMAD2/3 in Patientengruppe 2

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für das Protein SMAD2/3 in Kieferknochenprobe 4 aus der Gruppe der gesunden Knochenproben. In Bild A zeigt eine Übersichtsaufnahme der Nachweisreaktion und Bild B zeigt eine Detailaufnahme der Knochenprobe. **A:** Im Kieferknochen (KK) liegt ein Reaktionsnachweis für das Protein SMAD2/3 vor. Auch im angrenzenden Bindegewebe hat eine Reaktion stattgefunden. Maßstab 2 mm, Originalvergrößerung x0,4 (QuPath). **B:** Die Detailaufnahme zeigt einen Bildausschnitt aus dem gesunden Kieferknochen (KK) und einem darin enthaltenen Blutgefäß (BGF). Sowohl im Kieferknochen als auch im Blutgefäß hat eine Reaktion stattgefunden. Das angrenzende Bindegewebe (BGW) war ebenfalls in der Reaktion positiv. Maßstab 50 µm, Originalvergrößerung x18,04 (QuPath).

A, B: Oben rechts ist in der jeweiligen Abbildung das *Inset* mit der genauen Lokalisation des dargestellten Bildausschnitts im Gesamtpräparat zu sehen und unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* erkennbar. Die schwarzen Marker-Punkte dienen zur Umrandung der Kieferknochenproben.

3.2.7 RANKL

In allen Kieferknochenproben der an einer BRONJ erkrankten Patientengruppe zeigte der AK gegen das Protein RANKL eine Reaktion im Knochengewebe, die in der Nekrose wie auch im Kieferknochen selbst stattgefunden hat (Abbildung 24A). Im Kieferknochen wurden die Osteoblasten in den Knochen trabekeln der verbliebenen gesunden Areale des Alveolarknochens sichtbar. In den Osteoblasten sowie den Gefäßwänden der Blutgefäße in den Havers-Kanälen war RANKL lokalisiert (Abbildung 24B). Die vorliegenden Osteozytenlakunen waren in den Kieferknochen von Gruppe 1 nicht leer.

Der gegen das Protein RANKL gerichtete AK zeigte bei allen Knochenproben aus Gruppe 2 eine Reaktion. Bei den gesunden Knochenproben wurde RANKL im Kieferknochen sowie im angrenzenden Bindegewebe lokalisierbar (Abbildung 25A). Hierbei ließen sich die Havers-Kanäle bereits in der Übersichtsaufnahme erkennen. Die Detailaufnahme zeigte einen Reaktionsnachweis für das Protein RANKL in den Gefäßwänden der enthaltenen Blutgefäße im Kieferknochen (Abbildung 25B). Im Alveolarknochen hat in den Osteoblasten eine Reaktion stattgefunden, die in den Lakunen sichtbar wurde.

Beim Vergleich der Stichproben beider Patientengruppen wurde nach Prüfung durch das Q-Q-Diagramm bestätigt, dass bei den vorhandenen Messwerten keine Normalverteilung vorgelegen hat. Bei der statistischen Auswertung und Berechnung der exakten Signifikanz mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde ein p-Wert von $p = 0,032$ errechnet. Die Nullhypothese des Tests wurde in diesem Fall verworfen und es lag ein signifikanter Unterschied zwischen den positiven Zell-Detektionen in beiden Gruppen vor. Die errechneten Mittelwerte der Zell-Detektionen waren bei den erkrankten Kieferknochenproben größer als bei den gesunden. Hierbei lag der höchste Detektions-Mittelwert in Gruppe 1 bei 1050 positiven Zellen, in Gruppe 2 hingegen bei 560.

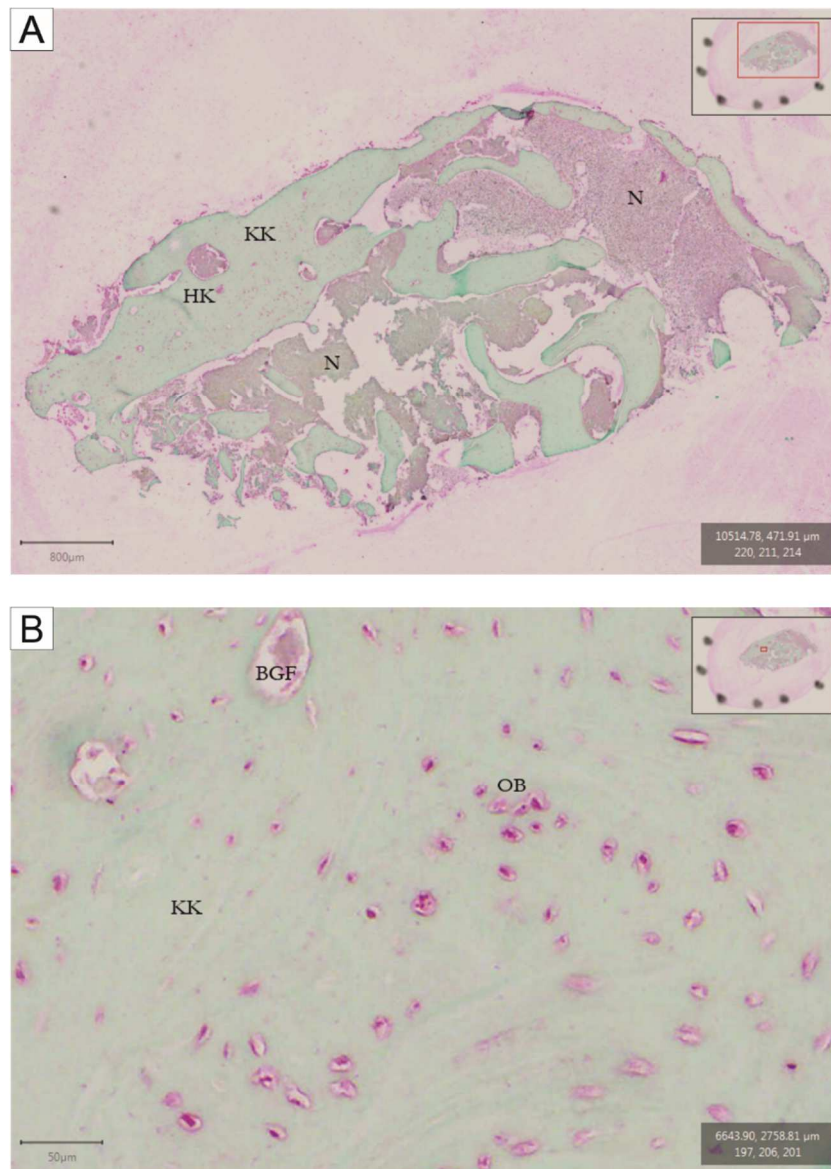


Abbildung 24: IHC-Nachweis für RANKL in Patientengruppe 1

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für das Protein RANKL in Kieferknochenprobe 4 aus der Gruppe der erkrankten Knochenproben. Bild A zeigt eine Übersichtsaufnahme der Nachweisreaktion und Bild B eine Detailaufnahme der Knochenprobe. **A:** Im Kieferknochen (KK) wurde RANKL lokalisierbar. Im Alveolarknochen sind Havers-Kanäle (HK) erkennbar. Die Nekrose (N) lässt sich gut vom Kieferknochen unterscheiden. Im nekrotischen Areal hat ebenfalls eine Reaktion stattgefunden. Maßstab 800 µm, Originalvergrößerung x1,27 (QuPath). **B:** Die Detailaufnahme zeigt einen Bildausschnitt aus dem erkrankten Kieferknochen (KK) mit erkennbaren Osteoblasten (OB), in denen das Protein RANKL lokalisiert werden konnte. Auch in den Gefäßwänden der Blutgefäße (BGF) konnte RANKL nachgewiesen werden. Maßstab 50 µm, Originalvergrößerung x18,05 (QuPath).

A, B: Oben rechts ist in der jeweiligen Abbildung das *Inset* mit der genauen Lokalisation des dargestellten Bildausschnitts im Gesamtpräparat zu sehen und unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* erkennbar. Die schwarzen Marker-Punkte dienen zur Umrandung der Kieferknochenproben.

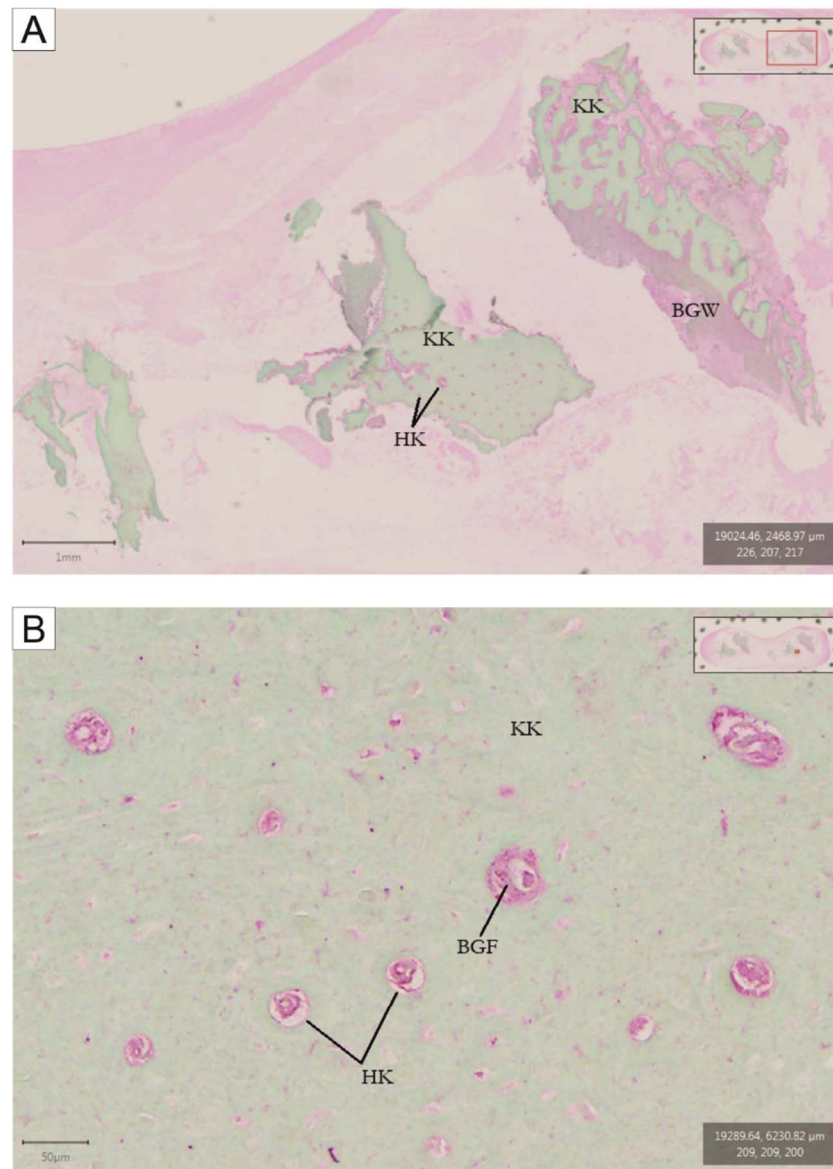


Abbildung 25: IHC-Nachweis für RANKL in Patientengruppe 2

Die Abbildung zeigt den IHC-Nachweis für das Protein RANKL in Kieferknochenprobe 3 aus der Gruppe der gesunden Knochenproben. Bild A zeigt eine Übersichtsaufnahme der Nachweisreaktion und Bild B eine Detailaufnahme der Knochenprobe. **A:** Im Alveolarknochen sind die Havers-Kanäle (HK) erkennbar. Im Kieferknochen (KK) und dem umliegenden Bindegewebe (BGW) konnte das Protein RANKL nachgewiesen werden. Maßstab 800 μ m, Originalvergrößerung x1,27 (QuPath). **B:** Die Detailaufnahme zeigt einen Bildausschnitt aus dem erkrankten Alveolarknochen. Im Kieferknochen (KK) hat vor allem in den Havers-Kanälen (HK) und dort in den Gefäßwänden der enthaltenen Blutgefäße (BGF) eine Reaktion stattgefunden. Maßstab 50 μ m, Originalvergrößerung x18,05 (QuPath).

A, B: Oben rechts ist in der jeweiligen Abbildung das *Inset* mit der genauen Lokalisation des dargestellten Bildausschnitts im Gesamtpräparat zu sehen und unten rechts sind die Koordinaten des *Field of view* erkennbar. Die schwarzen Marker-Punkte dienen zur Umrandung der Kieferknochenproben.

Im Folgenden sollen die beiden Patientengruppen anhand eines Boxplot-Diagramms hinsichtlich der Zell-Detektionen bei den IHC-Nachweisreaktionen für die jeweiligen knochenspezifischen Marker-Proteine verglichen werden. Hierbei veranschaulicht Abbildung 26 die Zell-Detektionen der jeweiligen Marker-Proteine im Vergleich zwischen Patientengruppe 1 und Patientengruppe 2. Durch das Diagramm lassen sich sowohl die unterschiedlichen Ergebnisse der jeweiligen Proteine gut visualisieren als auch die verschiedenen Zell-Detektionswerte innerhalb beider Patientengruppen darstellen.

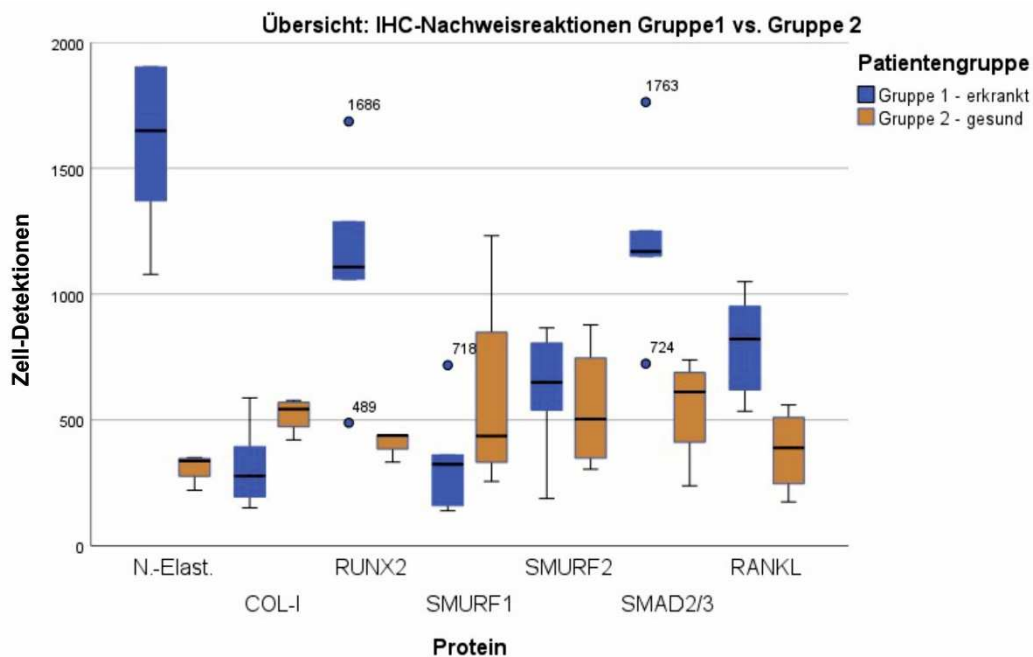


Abbildung 26: Boxplot-Diagramm: Vergleich Gruppe 1 vs. Gruppe 2

Die Abbildung zeigt ein Boxplot-Diagramm, welches die Zell-Detektionen der IHC-Nachweisreaktionen für die verschiedenen Marker-Proteine in Patientengruppe 1 und Patientengruppe 2 darstellt. Die x-Achse gibt das jeweilige knochenspezifische Protein an. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zell-Detektionen zu erkennen. Oben rechts im Bild befindet sich die Farblegende: Blau wird Patientengruppe 1 mit einer entwickelten BRONJ und braun Patientengruppe 2 dargestellt. Die jeweils farbige Box zeigt den Interquartilsabstand zwischen dem ersten und dritten Quartil. Die in der Box zu erkennende horizontale Linie veranschaulicht den Median. Die Antennen zeigen nach oben die Maximal- und nach unten die Minimalwerte an. Die Punkte stellen Ausreißer dar, die den 1,5-fachen Interquartilsabstand überschritten haben.

4 Diskussion

Die IHC-Nachweisreaktionen der vorliegenden Studie wurden an Kieferknochenproben, die im Rahmen einer chirurgischen Therapie bei Patienten mit einer Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose entnommen wurden, durchgeführt. Ziel war es, einen Vergleich zwischen den Knochenproben einer gesunden Patientengruppe und denen einer erkrankten Patientengruppe herzustellen. Das Vorkommen verschiedener Proteine wurde quantitativ ausgewertet und die resultierenden Datensätze wurden statistisch analysiert.

Die Indikation für die Anwendung der Bisphosphonate liegt bei allen metabolischen Erkrankungen vor, welchen eine erhöhte Knochenresorption zugrunde liegt. Das Hauptanwendungsgebiet stellen hierbei neben Osteoporose Erkrankungen wie eine tumorbedingte Hyperkalzämie, das multiple Myelom, Morbus Paget und Neoplasien im Knochen dar (Sato et al. 1991; Scriba 2000). Knochenfiliae treten häufig bei Mamma-, Prostata-, Nierenzell- oder Lungenkarzinomen auf.

Bisphosphonate sind Medikamente, die einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nehmen, indem sie zu einer Inaktivierung der Osteoklasten führen und somit eine gesteigerte Knochenresorption, die z. B. bei Tumorerkrankungen auftreten kann, inhibieren (Sato et al. 1991). Bei einer solchen Therapie stellt aus zahnmedizinischer Sicht die Bisphosphonat-assoziierte Knochennekrose der Kiefer die Hauptnebenwirkung dar (Marx 2003). Diese Nebenwirkung ist ein ernstzunehmendes und relevantes Problem, welches frühzeitig erkannt werden muss, um ein gezieltes Therapievorgehen einzuleiten.

Es finden sich in der Literatur viele Quellen und Studien zur Thematik der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrosen, deren Beschreibung anhand von Patienten-Fallbeispielen, Krankheitsverläufen, Therapieansätzen und daraus resultierenden Folgen für die Betroffenen detailliert erfolgt. Dennoch ist bis heute keine exakte und definierte Ätiologie für die genaue Entstehung der seit dem Jahr 2005 offiziell anerkannten, persistierenden Erkrankung der BRONJ aufgeführt (Ruggiero et al. 2009). Die genauen Knochenveränderungen wurden bisher im Hinblick auf IHC-Nachweisreaktionen nur wenig erforscht.

In der vorliegenden Studie wurden aus den gewonnenen Kieferknochenproben histologische Gewebeschnitte erstellt. Diese wurden sowohl quantitativ als auch auf Lokalisation der spezifischen Marker-Proteine – neutrophile Elastase, Col-I, SMURF1, SMURF2, SMAD2/3 und RANKL – in den hergestellten Schnittpräparaten untersucht.

Der Studienaufbau ermöglichte es, etwaige Entzündungen im Kieferknochen zu detektieren und zu beurteilen sowie dessen Stoffwechsel durch das Verhältnis der am Remodeling

beteiligten Gegenspieler – Osteoblasten und Osteoklasten – zu analysieren. Bedingt durch die hohe Knochenumbaurate, die unter anderem physiologisch durch die hohen Belastungen bei Kieferknochen entsteht, kommt es besonders in diesen Knochenanteilen zu einer vermehrten Bisphosphonat-Akkumulation (Ohe et al. 2012). Ständige Reizanforderungen an die Kiefer durch einwirkende Kaubelastungen erfordern individuelle Anpassungen der Knochen und ihrer anliegenden sowie umgebenden Gewebe. Durch diese Belastung hervorgerufene Defekte, wie Mikrofrakturen oder kleine Verletzungen der Mundschleimhaut durch eingebissene Nahrung und Kauverletzungen, müssen abheilen und repariert werden. Die Versorgung und Ausheilung der entstandenen Mikrofrakturen wird sonst bei gesunden Patienten ohne Bisphosphonat-Einnahme durch das hohe Remodeling der Kieferknochen gewährleistet (Komatsubara et al. 2004). Die Kiefer erfahren eine schwerwiegendere Hemmung ihrer Umbaurate, die schon von Natur aus deutlich höher ist als bei anderen Knochen im Körper. Eine Inhibition des Remodelings aufgrund der beschriebenen Bisphosphonat-Akkumulation hat somit gravierendere Folgen in den Kiefern als in anderen Knochenstrukturen.

Gleichzeitig ist eine gute Immunabwehr in den Kieferknochen notwendig, da ein direkter Kontakt zur Mundhöhle mit einer hohen Bakteriendichte besteht und somit mögliche Infektionen begünstigt werden. Außerdem sind ein unmittelbarer Kontakt zur Außenwelt sowie ein großer Einfluss exogener Reize vorhanden (Wehrhan et al. 2011).

Diese Faktoren führen dazu, dass die Kieferknochen deutlich häufiger von einer BRONJ betroffen sind als andere Knochenstrukturen des menschlichen Körpers. Des Weiteren hat die Hemmung der physiologisch hohen *Turnover-Rate* schwere Auswirkungen, da viele der nötigen Knochenstoffwechselprozesse wie das Abheilen und Reparieren von Mikrofrakturen nicht mehr stattfinden können. Es ergeben sich somit erneute Nischen für Infektionen des Kieferknochens, wenn es zu einer Verletzung der darüber liegenden Schleimhaut kommt. Die Wundheilung bei Patienten mit einer Bisphosphonat-Therapie ist generell herabgesetzt. Dies zeigten auch Pautke et al. (2012) in ihrer Forschungsarbeit über die Ausheilung der Extraktionswunden am Beispiel des Göttinger Minischweins. Die Schleimhaut der Mundhöhle hat keine große Schichtdicke und stellt daher für Mikroorganismen keine gute sowie strapazierfähige Barriere dar. Über eine Extraktionsalveole, hervorgerufen durch die Entfernung von nicht erhaltungswürdigen Zähnen, stehen die Kieferknochen ebenfalls mit der Mundhöhle und den im Speichel enthaltenen Bakterien in unmittelbarem Kontakt, wenn es zu einer notwendigen Extraktion während der Bisphosphonat-Therapie kommt (Ruggiero 2009). Der Zusammenhang mit einer fehlenden sekundären Wundheilung bei einer

Zahnextraktion während einer antiresorptiven Therapie und der daraus resultierenden Ausbildung einer BRONJ ist unbestritten (Bartl et al. 2006; Allen und Burr 2008; Voss und Walter 2013). Darüber hinaus hat die durch die antiresorptive Therapie hervorgerufene Hemmung der Osteoklasten einen erheblichen Einfluss auf die Beseitigung der nekrotischen Knochenareale, da diese sonst bei physiologischer Funktion von den Osteoklasten abgebaut werden würden. Das Auftreten einer Kieferknocheninfektion wird ebenfalls durch das Vorhandensein sowie das nicht mögliche Beseitigen der nekrotischen Knochenbereiche begünstigt. Auf kleine lokalisierte Bereiche beschränkte Osteonekrosen sind gewöhnlich durchaus physiologisch und treten während des regulär stattfindenden Remodelings auf. Dieser Prozess wird jedoch bei Patienten mit einer BRONJ pathologisch im Hinblick auf die Progression. Das physiologische Gleichgewicht geht verloren, da die Bereiche nicht durch die Osteoklasten resorbiert werden können (Allen und Burr 2008). Die physiologisch stattfindenden Umbauprozesse in der Extraktionsalveole sind durch die gehemmten Funktionen der Osteoklasten sowie Osteoblasten gestört und stellen ein Risiko dar, da die offen gelegten Knochenbereiche und -oberflächen nicht regulär abheilen können (Pautke et al. 2012).

In zwei Dritteln aller Fälle ist die Mandibula der Patienten von einer Kieferknochennekrose betroffen und die Maxilla lediglich zu einem Drittel (Woo et al. 2006). Auch in der vorliegenden Studie war dies bei den Kieferknochenproben der Fall. Die Einschränkung der Kieferknochen-Vaskularisierung führt ebenfalls zu einer Unterversorgung der betroffenen Kieferabschnitte und somit zu einer verringerten Immunabwehr in diesen Bereichen (Bartl et al. 2006). Zusätzlich trägt die herabgesetzte Angiogenese verstärkend zur verminderten Abheilung von nekrotischen oder infizierten Knochenabschnitten bei. Bereits nach einer einzigen Dosisgabe des Bisphosphonat-Präparats Zoledronat konnte ein rapider Abfall des *Vascular Endothelial Groth Factor* im Blut beobachtet werden (Santini et al. 2006). Dadurch wurde vor allem die Angiogenese deutlich reduziert, welche bei der Abheilung nekrotischer Knochenbereiche von großer Bedeutung ist. Ischämische Nekrosen werden hierbei begünstigt und können bei den Patienten auftreten.

Auffallend bei den durchgeführten Nachweisreaktionen in der vorliegenden Studie war jedoch, dass in den Nekrosearealen häufig Blutgefäße mit intakten Erythrozyten vorhanden waren. Dies spricht für eine gewisse Restvitalität in den als devital angesehenen Kieferknochennekrosen. Somit konnten die Ergebnisse von (Pautke et al. 2012) nicht bestätigt werden, in denen das Ausbleiben der Blutgefäße beschrieben wird.

4.1 Kofaktoren

4.1.1 Anamnese und Demographie

Hinsichtlich der Anamnese der Patienten erscheinen mehrere Faktoren für das Begünstigen der Entstehung einer Kieferknochennekrose relevant. Dabei hat das Alter eine nicht unwesentliche Auswirkung auf die Entstehung von antiresorptiven Kieferknochennekrosen. Die in dieser Studie untersuchten Patienten hatten alle bereits das 60. Lebensjahr vollendet und fielen somit in das Kollektiv für Personen, welche bei einer Bisphosphonat-Therapie prädestiniert eine BRONJ entwickeln. Das Durchschnittsalter für die Ausbildung von Kieferknochennekrosen liegt bei 64,5 Jahren. Beim Patientenkollektiv diesen Alters liegt oft auch bereits eine metabolische oder metastasierende Knochenerkrankung vor (Stanton und Balasanian 2009). Das Risiko für Knochenerkrankungen ist besonders in der Altersgruppe ab dem 60. Lebensjahr deutlich erhöht, da Inzidenz und Prävalenz für Grunderkrankungen oder maligne Entitäten ab diesem Alter erhöht sind (Hadji et al. 2013).

In der Literatur finden sich zu vielen anamnestischen Risikofaktoren hinsichtlich der Entstehung von Kieferknochennekrosen verschiedene und teils widersprüchliche Angaben. So sollen regelmäßiger Nikotin- sowie Alkoholkonsum, Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus, Komorbiditäten wie Tumorerkrankungen, durchgeführte Chemotherapien und der Nachweis von *Actinomyces* sowie eine schlechte Mundhygiene und ein dentaler Behandlungsbedarf deren Entstehung begünstigen (Gliklich und Wilson 2009; Ruggiero et al. 2009). Genau geklärt ist der einzelne Einfluss dieser verschiedenen Faktoren jedoch bis heute nicht. Allerdings ist klar, dass eine Anhäufung dieser Faktoren die Entstehungswahrscheinlichkeit einer BRONJ während einer Bisphosphonat-Therapie durchaus begünstigen kann, jedoch allein – ohne Einnahme der Medikamente – nicht zu einer solchen Knochenerkrankung führt.

Generell sollte für betroffene Patienten ein entsprechendes Risikoprofil für die Entstehungswahrscheinlichkeit einer Osteonekrose der Kiefer erstellt werden, da nicht jeder das gleiche Risiko für Entstehung sowie Ausbildung einer BRONJ trägt (Wolff et al. 2019). Hierfür beinhaltet die aktuelle S3-Leitlinie für Bisphosphonat-assoziierte und andere Medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen der DGMKG eine klare Hilfestellung und Einteilungsmöglichkeit des Patientenkollektivs (Schiegnitz et al. 2018).

4.1.2 Verabreichungsform und Therapiedauer

Die Verabreichungsform der Bisphosphonat-Medikamente hat einen großen Einfluss auf die Dosisgabe sowie Dosiswahl der Wirkstoffe. Hierbei ist generell zu sagen, dass bei oraler Verabreichung beispielsweise aufgrund einer primären Osteoporose die Konzentration deutlich geringer ist als bei der i.v. Applikation bei Tumorpatienten mit malignen sowie metastasierenden Knochenerkrankungen (Abu-Id et al. 2008; Scriba 2000). Daraus resultiert der in der Literatur bereits festgestellte Zusammenhang, dass bei i.v. Gabe der Bisphosphonat-Medikamente das Risiko deutlich höher ist, eine Kieferknochennekrose zu erleiden. Dabei sind auch bisher mehr Knochennekrosen aufgetreten (Dodson 2009; Favus 2007; Hoff et al. 2008).

Ebenso hat die Therapiedauer mit den Bisphosphonat-Medikamenten einen erheblichen Einfluss auf die Ausbildung der BRONJ. Besonders bei verlängerter Gabe und hoher Dosierung des Bisphosphonat-Präparats Zoledronat ist laut Literatur ein deutlich gesteigertes Risiko vorhanden (Dodson 2009). Die Gefahr der Entwicklung einer antiresorptiven Kiefernekrose erhöht sich bei einer längeren Einnahmedauer in einem Zeitraum von über drei Jahren deutlich, wenn dabei die Gesamtdosis, welche über den Therapiezeitraum verabreicht wurde, hoch ist (Ruggiero 2009).

Des Weiteren ist jedoch heutzutage auch bekannt, dass nicht nur durch Bisphosphonat-Medikamente die beschriebenen Nekrosen in den Kiefern auftreten können, sondern auch neue Medikamente wie Denosumab diese unerwünschten Nebenwirkungen hervorrufen (Tröltzsch et al. 2014; Boquete-Castro et al. 2016). Denosumab ist ein antiresorptiv wirksamer AK mit Bisphosphonat-ähnlichem Einsatzgebiet wie osteolytischen Metastasen und primärer Osteoporose. Der AK bindet an RANKL und inhibiert auf diesem Weg die Stimulierung sowie Differenzierung der Osteoklasten. Darüber hinaus sind bei der Monotherapie oder auch in Kombination mit einer Bisphosphonat-Therapie Kieferknochennekrosen beim antiangiogenetischen AK Bevacizumab und dem Immunsuppressivum Everolimus bekannt (Tröltzsch et al. 2014). Dies führt dazu, dass auch bei diesen Medikamenten eine große Vorsicht geboten ist. Es ist auf sämtliche Anzeichen, die eine Nekrose-Entstehung andeuten, sowie auf eine sorgfältige Prophylaxe zu achten.

Hinsichtlich des Langzeiterfolgs bei der Therapieform stellt die chirurgische Sanierung der betroffenen Kieferareale in Form einer vollständigen Nekrosektomie, Dekortikation oder Kieferresektion das erfolgreichste Therapiekonzept dar (Abu-Id et al. 2008). Konservative Therapiekonzepte sind auf die frühen Stadien einer Kiefernekrose beschränkt und erzielen bei etablierten Nekroseformen sowie fortgeschrittenen Kieferknochennekrostadien keinen

langfristigen Erfolg. Laut aktueller Literatur waren sie nur in 23% der Fälle erfolgreich (Hoff et al. 2008). Daher scheint auch bei den Patienten der vorliegenden Studie die chirurgische Sanierung der aufgetretenen Nekrosen im fortgeschrittenen Stadium die korrekte Behandlungsform gewesen zu sein. Jedoch kann über den Langzeiterfolg hierbei noch keine Aussage getroffen werden, da die Operationen bisher maximal zwei Jahre zurückliegen.

Als weitere Therapieform und Optimierung der chirurgischen Sanierung gilt die Tetracyclin-unterstützte Knochenfluoreszenz, die die Differentialdiagnose von osteonekrotischen Entitäten der Kieferknochen zum gesunden Knochen unterstützt (Pautke et al. 2010). Sie hilft die Ausbreitung der entstandenen Nekrose zu markieren und ermöglicht somit intraoperativ eine fluoreszenzgeführte Entfernung der betroffenen Kieferknochenareale – ohne optische Hilfe – durchzuführen. Ein solches Erkennen der Nekroseränder und Übergangsbereiche funktionierte bisher klinisch nur dann, wenn eine deutliche und physiologische Knochenblutung beim Entfernen der devitalen Knochenareale auftrat.

4.2 Diskussion der Methode

4.2.1 Kieferknochenproben und Gruppeneinteilung

Für die vorliegende Studie wurden fünf erkrankte und vier gesunde Kieferknochenproben ausgewählt, welche in zwei Patientengruppen (Gruppe 1 und Gruppe 2) eingeteilt wurden. Gruppe 1 stellte die Patientengruppe der erkrankten Kieferknochenproben mit einer durchgeführten Bisphosphonat-Therapie und entwickelten BRONJ dar. Bei Gruppe 2 handelte es sich um die gesunden Kieferknochenproben ohne die Einnahme von Bisphosphonat-Medikamenten sowie ohne entwickelte BRONJ. Die Kieferknochenproben der erkrankten Patientengruppe wurden im Rahmen der chirurgischen Therapie gewonnen. Die Proben der gesunden Patientengruppe wurden im Rahmen von Weisheitszahnosteotomien aus den an den Weisheitszähnen anliegenden Knochenlamellen, die bedingt durch die Extraktion entfernt werden mussten, gewonnen.

Da es sich um menschliche Gewebeproben handelte, konnte schon aus anatomischen sowie physiologischen Gründen nicht von einer völligen Gleichheit aller Knochenproben ausgegangen werden. Zusätzlich lagen bei der erkrankten Patientengruppe in den Kieferknochen teilweise unterschiedliche Nekrorestadien vor, welche durch die chirurgische Therapie zu verschiedenen großen Knochenpräparaten führten. Bei allen Patienten der erkrankten Gruppe lag ein Prostatakarzinom als Erkrankung vor. Die Untersuchung an humanen Gewebeproben und Kieferknochenpräparaten ermöglichte einen direkten Einblick

in die Auswirkungen von Bisphosphonat-Medikamenten auf den menschlichen Organismus und Knochenstoffwechsel.

Wichtig für einen korrekten Vergleich aller Kieferknochenproben war ebenfalls die exakt gleiche Behandlung und Versuchsdurchführung. Dies wurde zusätzlich dadurch garantiert, dass alle Versuche durch den Doktoranden vorgenommen worden sind, um einen einheitlichen Ablauf für die Durchführung der Nachweisreaktionen zu gewährleisten.

4.2.2 HE-Übersichtsfärbung

Bereits in den histologischen Übersichtsfärbungen waren deutliche Nekroseanteile und einige Resorptionsstellen in den BRONJ-Knochenpräparaten zu erkennen. Stürmer (2013) konnte in ihrer Studie mit BRONJ-Kieferknochenproben vom Menschen ebenfalls diese Nekroseareale feststellen. In ihrer Studie beschrieb sie auch die teilweise nekrotischen sowie vitalen Kieferknochenabschnitte und die darin enthaltenen zellarmen Bereiche, die in der hier vorliegenden Studie ebenfalls nachgewiesen werden konnten.

Die Kieferknochenproben von Patientengruppe 1 waren häufig durch typische Merkmale eines devitalen Knochens gekennzeichnet, der sich – wie in der Literatur beschrieben – durch unklare, nicht scharfe Zellgrenzen, leere Knochenlakunen sowie die Abwesenheit von Osteozyten, Osteoblasten und mehrkernigen Osteoklasten erkennen ließ (Pautke et al. 2012).

4.2.3 IHC-Nachweisreaktionen

Die IHC-Nachweisreaktion von Proteinen stellt schon seit vielen Jahren eine adäquate sowie etablierte Methode zum gezielten Nachweis von Proteinen in Gewebeproben dar. Sie ermöglichte bei der Auswertung in der vorliegenden Studie einen direkten Vergleich zwischen den erkrankten und gesunden Knochenproben hinsichtlich der verschiedenen Proteine.

Die Auswahl der zu untersuchenden Proteine in den Knochenpräparaten wurde bewusst getroffen. Der Nachweis eines Großteils der markerspezifischen Proteine, die mit einer Bisphosphonat-Therapie sowie daraus entstandenen Kieferknochennekrosen korrelieren, wurde in der vorliegenden Studie erstmalig an menschlichen BRONJ-Kieferknochenproben untersucht. Es liegen hierzu bislang keine Daten in der Literatur vor.

Die neutrophile Elastase wird von neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen während einer inflammatorischen Entzündungsreaktion abgesondert und gilt als ein Neutrophilen-Marker. Erstmals wurde durch die vorliegende Studie der Nachweis der neutrophilen

Elastase bei Kieferknochenproben mit einer vorhandenen BRONJ durchgeführt. Er fiel bei den gesunden Kieferknochenpräparaten im Vergleich zu den nekrotischen deutlich schwächer aus und es waren ersichtlich weniger Zellen mit einer positiven Reaktion in den Schnittpräparaten vorhanden. Dies erklärte sich dadurch, dass sich im gesunden Kieferknochen deutlich weniger – und wenn physiologisch auftretend – kleine Entzündungsreaktionen durch exogene Reize abspielen als im erkrankten sowie nekrotischen Alveolarknochen der BRONJ-Patientengruppe. Die Effekte auf den Anstieg einer Immunreaktion sowie die häufig auftretende Akute-Phase-Reaktion nach erstmaliger Gabe vor allem beim Bisphosphonat-Präparat Ibandronat wurden auch in der Literatur bestätigt (Bartl et al. 2006). Hierbei erläutern die Autoren auch die Steigerung der inflammatorischen Zytokine durch stickstoffhaltige Bisphosphonate (Bartl et al. 2006). Die entzündliche Reaktion und Infiltration des Knochengewebes mit neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten wird als typisches histologisches Geschehen einer Kieferknochennekrose beschrieben (Marino et al. 2012; Voss und Walter 2013). Das histologische Bild der BRONJ gleicht dem der primär chronischen sowie der akut hämatogenen Osteomyelitis. Bei der Osteomyelitis liegt ebenfalls eine entzündliche Infiltration im Knochengewebe vor und es dominieren neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten bei der mikroskopischen Betrachtung der histologischen Schnittpräparate (Jundt und Jani 1997; Bartl et al. 2006).

Col-I ist ein Protein, welches beim Menschen ein fibrilläres Collagen darstellt und im Bindegewebe sowie dem Knorpel, aber auch in der Haut, den Knochen und den Sehnen vorkommt. Es ist der am häufigsten auftretende Collagentyp bei Menschen und Säugetieren. Col-I dient vor allem der Festigkeit sowie der Formung und Strukturbildung von Knochen. Gleichzeitig ermöglicht es eine gewisse Eigenelastizität der Knochen bei physiologischer Belastung (Bartl et al. 2006). Durch die vorhandene Quervernetzung sorgt es für Stabilität in den verschiedenen Geweben. Hinsichtlich der extrazellulären Matrix und der Knochenformierung ist Col-I mit das wichtigste Matrixprotein. Die vorliegenden Collagenfibrillen lagen im gesunden Knochen deutlich besser erkennbar, formierter und weniger aufgelöst vor als in den nekrotischen Arealen der BRONJ-Proben. Die lamelläre Anordnung der Collagenfibrillen in den Kieferknochenproben der gesunden Patienten verlief parallel und geordnet. Dies bestätigen auch die Ergebnisse von Koch et al. (2010), die den Effekt von Bisphosphonaten an kultivierten menschlichen Hüftknochen hinsichtlich der Collagenexpression untersucht haben. Der innerhalb der ersten Therapietage festgestellte Anstieg von Collagen in den Knochenproben konnte in der hier vorliegenden Studie nicht bestätigt werden, was jedoch damit zusammenhängen kann, dass die erkrankten

Knochenproben von Patienten stammen, welche bereits über längere Zeit mit Bisphosphonat-Medikamenten therapiert worden waren. Zu Beginn der Bisphosphonat-Therapie wäre das direkte Auftreten derartiger teils fortgeschrittener Kieferknochennekrosen eher unwahrscheinlich gewesen.

Mitsimponas et al. (2014) untersuchten in ihrer Studie histopathologisch Mandibulakieferknochenproben von Patienten mit einer BRONJ sowie Patienten mit einer Osteoradionekrose und verglichen diese mit gesunden Knochenproben. Es konnte dabei kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Proteins Col-I bei der Auswertung des Vergleichs zwischen den BRONJ-Knochenproben und denen der gesunden Patientengruppe festgestellt werden (Mitsimponas et al. 2014). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie stehen im Einklang mit den Resultaten der Untersuchungen von Marino et al. (2012), deren Arbeitsgruppe in ihren Untersuchungen unter anderem auch den Collagenabbau im Mandibulaknochen von Sprague-Dawley-Ratten nach einer Zoledronat-Bisphosphonat-Therapie und anschließend stattgefundenen Zahnextraktion untersuchten. Hierbei lag ebenfalls kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Collagenproteins zwischen den Kieferknochenproben aus der Untersuchungsgruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vor und die leeren Osteozytenlakunen wurden bestätigt (Marino et al. 2012).

Das Protein RUNX2 ist verantwortlich für die Knochenneubildung und gleichzeitig als unerlässlicher Schlüsseltranskriptionsfaktor sehr wichtig für die Osteoblastendifferenzierung aus mesenchymalen Stammzellen sowie die Aktivierung osteogener Faktoren (Long 2011). Darüber hinaus ist RUNX2 essentiell für die Knochenmineralisierung. Für beide Ossifikationstypen, also die desmale sowie die enchondrale Ossifikation, ist das Protein RUNX2 ein unentbehrlicher Einflussfaktor. Ein Verlust, eine gezielte Blockade oder die Deletion des Proteins führte bei Tierversuchen zu einem vollständigen Verlust der Osteoblasten oder zu hypoplastischen Knochen bei deren Ossifikation (Long 2011). Mutationen des Proteins sind assoziiert mit dem Syndrom der cleidocranialen Dysplasie. Die RUNX2-Bildung wird durch das *Bone morphogenic protein* (BMP) 2 reguliert.

In der vorliegenden Studie wurde die Nachweisreaktion für das Protein RUNX2 in beiden Patientengruppen durchgeführt, um genauere Informationen über das Vorkommen in den BRONJ-erkrankten Kieferknochen zu erhalten. Im direkten Vergleich lagen bei RUNX2 signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zell-Detektionen in den Kieferknochenproben vor. Zum gleichen Ergebnis eines geringeren Auftretens des Proteins RUNX2 in gesunden

Kieferknochenpräparaten kam Stürmer (2013) in ihrer Studie zur immunhistologischen Untersuchung von BRONJ-Kieferknochenproben im Vergleich zu gesunden Knochenproben. Gegensätzliche Ergebnisse wurden von He et al. (2017) festgestellt. Sie berichteten von einer geringeren Expression des Proteins RUNX2 in ihren BRONJ-Proben, welche bei drei verschiedenen Patienten im Rahmen des chirurgischen Kieferknochen-Debridements gewonnen wurden, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (He et al. 2017). Der Zusammenhang wird hierbei anhand der unmittelbar verminderten Knochenregeneration sowie auch des gehemmten Reparaturmechanismus der Knochen durch die Bisphosphonat-Medikamente hergestellt (He et al. 2017). Wagner et al. (2017) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis bei Patienten, die an einer Osteomyelitis erkrankt waren. Sie stellten fest, dass auch bei diesen Patienten eine verminderte Genexpression von RUNX2 vorlag und das Protein in geringerem Maße in den erkrankten Knochenproben vorkam. Jedoch sind nicht nur die Regeneration der Knochen, sondern auch die allgemeine Knochenneubildung während der Bisphosphonat-Therapie reduziert. Es wurde durch die Arbeitsgruppe von Shoji et al. (2010) bestätigt, dass die allgemeine Expression von RUNX2 während der Bisphosphonat-Gabe – zusammenhängend mit der allgemeinen *Turnover-Rate* der Knochen – vermindert ist. Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Es gibt bis zum heutigen Zeitpunkt keine genaue Angabe in der Literatur, welche die Auswirkung auf RUNX2 im unmittelbaren Zusammenhang mit einer Bisphosphonat-Therapie thematisiert.

Bei SMURF1 handelt es sich um eine Ubiquitin-Protein-Ligase, welche SMAD-Proteine mit dem Protein Ubiquitin versorgt und einen regulatorischen Einfluss auf BMP nimmt. Darüber hinaus bindet SMURF1 an rezeptorregulierte SMAD-Proteine für BMP und fördert sowie induziert deren Abbau. Erstmals wurden in der vorliegenden Studie das Vorkommen untersucht und Zellzählungen in Kieferknochenproben von BRONJ-erkrankten Patienten vorgenommen. Ein möglicher Zusammenhang mit der geringeren Zahl an gezählten SMAD2/3-Proteinen ist hierbei durchaus denkbar. Eine Untersuchung hinsichtlich einer Veränderung der SMURF1-Konzentration bei einer Bisphosphonat-Therapie und deren Auswirkung bei Kieferknochennekrosen liegt bisher in der Literatur noch nicht vor. Daher gibt es keine vergleichbaren Studien und Forschungsergebnisse, die die vorhandenen widerlegen oder bestätigen können. In einer Zellkultur-Studie zu osteoporotischen Knochenfrakturen kam die Arbeitsgruppe von Sun et al. (2018) zu gegenteiligen Ergebnissen bezüglich des Proteins SMURF1 und beschrieb ein geringeres Vorkommen von SMURF1 im osteoporotischen Knochengewebe. Das konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden, da ein nicht signifikanter Unterschied bei den Ergebnissen der Zell-Detektionen vorlag.

Beim Protein SMURF2 handelt es sich ebenfalls um eine spezifische Ubiquitin-Protein-Ligase, die selektiv mit SMAD1 und SMAD2 interagiert. Durch SMURF2 wird die Degeneration von SMAD2 begünstigt. Des Weiteren übt das Protein SMURF2 eine erhöhte Stimulation auf den *Transforming growth factor beta* (TGF- β) aus (Lin et al. 2000). Eine Erklärung für das leicht verminderte Auftreten von SMURF2 bei den Zell-Detektionen wäre, dass ein ebenfalls deutlicher Abfall von TGF- β 1 bereits in der Literatur bei BRONJ-Proben festgestellt wurde (Wehrhan et al. 2011). Dieser Abfall könnte mit dem reduzierten Vorkommen von SMURF2 korrelieren.

Bei den SMAD2/3-Proteinen handelt es sich um rezeptorregulierte Proteine, welche extrazelluläre Signale des Zytokins TGF- β empfangen und durch die TGF-Rezeptoren an den Zellkern weitertragen. Dort aktivieren, steuern und regulieren diese daraufhin die Transkription bestimmter Gene und sind ebenfalls in viele pathologische Prozesse involviert. TGF- β ist zusammen mit SMAD2/3 für die Fibroblasten-Proliferation sowie Fibroblasten-Differenzierung mit verantwortlich (Flanders 2004). In der vorliegenden Studie wurden in den Kieferknochenproben von Patientengruppe 1 mehr SMAD2/3-positive Zellen detektiert als in der gesunden Vergleichsgruppe 2.

Wehrhan et al. (2011) kamen zu anderen Ergebnissen bei ihren Untersuchungen von Gewebeproben der Mukosa. Sie stellten einen Vergleich von Patienten mit Ausbildung einer BRONJ unter der Therapie mit Bisphosphonaten und einer Kontrollgruppe gesunder Patienten ohne Bisphosphonat-Therapie her (Wehrhan et al. 2011). Es resultierte aus der Inhibition der Osteoklasten auch die verringerte Menge an aktiviertem TGF- β (Shoji et al. 2010). Dies würde wiederum ein vermindertes Auftreten von SMAD2/3 erklären, welches mit TGF- β korreliert, was jedoch in dieser Studie nicht bestätigt werden konnte. Auch das Protein SMAD2/3 wurde erstmalig im Hinblick auf anti-resorptive Kieferknochennekrosen in der vorliegenden Studie untersucht.

RANKL ist ein Protein, welches als Ligand im RANKL-OPG-System agiert und zu den Tumornekrosefaktoren gehört. Es fördert die Aktivierung der Osteoklasten und stimuliert ihre Differenzierung durch die Bindung am passenden RANKL-Rezeptor, der auf den Osteoklasten vorhanden ist. RANKL hat eine einflussreiche Auswirkung sowie Kontrolle über die Differenzierung und Funktion der Osteoklasten. Es inhibiert die Apoptose der Osteoklasten und spielt eine Schlüsselrolle im Knochenmetabolismus. Produziert wird RANKL von den Osteoblasten und dient als ein guter Osteoklastenmarker. Antagonisiert wird RANKL durch das Protein Osteoprotegerin, welches ebenfalls von den Osteoblasten sezerniert wird. Im Immunsystem wirkt RANKL aktivierend auf die T-Zellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie für das Protein RANKL sprechen für eine weitläufige Verteilung des Proteins im Knochen. Der Einfluss und die Erhöhung der RANKL-Konzentration während der Bisphosphonat-Therapie stimmen ebenfalls mit den Erkenntnissen aus der Literatur überein (Koch et al. 2012; Gross et al. 2017). Die Autoren berichteten von einem bereits messbaren Anstieg der Genexpression von RANKL innerhalb eines Zeitraums von 48 Stunden nach Beginn der Therapie mit den Bisphosphonaten Ibandronat und Zoledronat (Koch et al. 2012). Ein signifikanter Unterschied der Expression vom RANKL-Gen sowie auch OPG während der ersten zehn Behandlungstage einer Therapie mit dem Bisphosphonat Zoledronat – im Vergleich zum Ausgangstag – wurde auch in weiteren Studien bestätigt (Sievers 2012). Dabei zeigten sich nur geringe Unterschiede der Expression des RANKL-Gens in Abhängigkeit von der verwendeten Dosisgabe des Bisphosphonats Zoledronat. Die Expression von OPG wird jedoch bei hoher Dosisgabe von Zoledronat signifikant herunterreguliert (Sievers 2012).

Der in der vorliegenden Studie beobachtete Anstieg der RANKL-Konzentration bei längerer Therapiedauer – im Vergleich zur Kontrollgruppe und dem Zeitpunkt der Messung vor der Bisphosphonat-Gabe – wurde in einer klinischen Studie mit Morbus-Paget-Patienten, in welcher der RANKL-Serumspiegel vor und nach Bisphosphonat-Infusionen gemessen und verglichen wurde, bestätigt (Martini et al. 2007). Diese Ergebnisse konnten von Çankaya et al. (2013) in ihrer Studie zur IHC-Untersuchung der RANKL-Expression bei Sprague-Dawley-Ratten teilweise bestätigt werden. Hierbei kam es im Mandibulaknochen zu einer Verringerung der RANKL-Expression, aber in der Kontrollgruppe mit Präparaten aus dem Tibiaknochen zu einem Anstieg (Çankaya et al. 2013). Die Verringerung der RANKL-Expression im Knochen nach einer Bisphosphonat-Gabe wurde von Yang et al. (2015) bestätigt. Auch in dieser Studie wurden die Versuche an Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt (Yang et al. 2015). He et al. (2017) zeigten ähnliche Ergebnisse in ihrer Studie mit BRONJ-Probenmaterialien auf. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu denen der vorliegenden Studie. Es lässt sich feststellen, dass die aktuelle Studienlage zur Untersuchung des Proteins RANKL bei Kiefernekrosen, ausgelöst durch eine antiresorptive Therapie, widersprüchlich ist und sie in Zukunft noch weiterer Klärung bedarf.

Die Anzahl der untersuchten Gewebeproben war in dieser Studie limitiert, ermöglichte aber einen durchaus guten Einblick in die Auswirkungen der Bisphosphonate auf den Alveolarknochen.

4.2.4 Auswertung mit QuPath

Die vollständige Auswertung und Bildmaterialerstellung erfolgte mit Hilfe des Programms QuPath. Diese Software bietet neben der hochauflösenden digitalen Auswertung viele weitere Vorteile und ermöglicht ein standardisiertes Auswertungsverfahren. Dieses ist als *Open-Source-Software* frei zugänglich und kann kostenlos genutzt werden (Bankhead et al. 2017). Die Software steht somit nicht nur speziellen Einrichtungen zur Verfügung, sondern kann ebenso frei und privat genutzt werden, was ein erheblicher Vorteil im Vergleich zu anderen Auswertungsprogrammen für digitale Scandateien histologischer Nachweisreaktionen ist. Hierdurch wurde eine direkte, einheitliche sowie genaue Auswertung der Schnittpräparate, deren Funktion und programmierte Vorgehensweise für weitere Studien nachvollziehbar bleibt, möglich. Anhand der Pixelklassifizierung wurden die in der Reaktion positiven Zellen der Gewebe stets gleich identifiziert, klassifiziert und objektiv ausgewertet.

Eine falsche bzw. fehlerhafte Zählung wie bei einer mikroskopischen Auswertung mit einem Zählgitter oder ein Übersehen der Zellen durch das menschliche Auge bei der Zellzählung konnte hierbei weitgehend vermieden werden, da jede einzelne Zählung im Programm mehrfach wiederholt und stets nochmal nachträglich vom Anwender kontrolliert wurde. Hierbei wurden positiv sowie negativ detektierte Zellen durch das Programm nachvollziehbar markiert. Diese Zellen konnten daraufhin zusätzlich überprüft und korrigiert werden, falls es erforderlich war.

Mit dem Einsatz des Algorithmus für die Zell-Detektion und dem korrekten Anlernen dieser Anwendung durch das Einstellen und Festlegen der verschiedenen Parameterfunktionen bot das Programm eine sehr gute Möglichkeit, die Kieferknochenpräparate auszuwerten.

Bisher wurde die Software noch bei keiner wissenschaftlichen Studie in Bezug auf die Thematik der BRONJ verwendet. Die wenigen vorhandenen Studien in der Literatur nutzten die klassische Auswertung für IHC-Nachweisreaktionen, bei der anhand der Intensität der Färbung das Vorhandensein sowie die Quantität der spezifischen Proteine nachgewiesen wurden und daraufhin mittels einer einfachen Einstufung in „-“ (kein Reaktionsnachweis), „+“ (leicht positiver Reaktionsnachweis), „++“ (stark positiver Reaktionsnachweis) oder „+++“ (sehr starker positiver Reaktionsnachweis) eingeteilt wurden (Bartl et al. 2006; Stürmer 2013; He et al. 2017). Die Studie von Stürmer (2013) ähnelt im Grundsatz der vorliegenden Studie, unterscheidet sich jedoch bei der Auswertung, welche konventionell durchgeführt wurde. Die Software QuPath kann nicht nur reproduzierbare, sondern auch deutlich genauere Ergebnisse als die konventionelle Auswertung liefern, was einen großen Vorteil dieser Technik darstellt. Die erfolgreiche Nutzung von QuPath für IHC-

Nachweisreaktionen und die Zell-Klassifizierung wiesen Bankhead et al. (2017) bereits im Jahr 2017 nach.

Die Anwendung des Programms wurde bisher noch nicht standardisiert in die IHC-Auswertung der Labore integriert. Eine gründliche Einarbeitungszeit war für die Konfiguration der in dieser Studie durchgeführten Nachweisreaktionen erforderlich. Gerade hinsichtlich der Gegenfärbung mit Lichtgrün mussten neue Wege erarbeitet werden, um die Zell-Detektion durchführen zu können. Jedoch bot diese Gegenfärbung kontrastreichere Bilder und stärkere Unterschiede bei der Identifikation für die Zell-Detektionen als eine Gegenfärbung mit dem Farbstoff Hämalan. In Bezug auf die Col-I-Nachweisreaktion musste eine individuelle Lösung gefunden werden, da diese nicht über den klassischen Algorithmus ausgewertet werden konnte (Bankhead et al. 2017). Dies erforderte bei der Methodik mehrere Versuchsdurchläufe, um eine zufriedenstellende und genaue Detektion für die Quantifizierung zu erhalten. Die Software bietet vor allem für zukünftige wissenschaftliche Arbeiten eine gute Möglichkeit für die Auswertung von Schnittpräparaten. Sie eröffnet neue Optionen auf diesem Gebiet, ohne weitere Kosten hervorzurufen.

4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse in der vorliegenden Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Institut für medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen. Eine direkte Anlehnung an die Vorgehensweise vorangegangener histologischer Studien war nicht möglich, da diese in den Veröffentlichungen oftmals keine Angaben zur statistischen Auswertung vorgenommen haben. Bei den erhobenen Datensätzen und Detektionswerten der Zellzählungen lag – wie zuvor erwartet – keine Normalverteilung vor. Alle Daten wurden nach einem einheitlichen Schema durch den Doktoranden ausgewertet. Hierbei war durchaus bekannt, dass parametrische Tests eine höhere Aussagekraft besitzen als die nicht-parametrischen Testverfahren der Statistik. Es wurde aufgrund der explorativen Natur der vorliegenden Studie gezielt auf eine Bonferroni-Korrektur zur Vermeidung der Alphafehler-Kumulierung für multiples Testen verzichtet. Die durchgeführte Auswertung sollte das Aufzeigen vorherrschender Signifikanzunterschiede ermöglichen können. Mit einer größeren Grundgesamtheit N an Testobjekten wären genauere statistische Aussagen möglich gewesen. Daher sollte eine kritische Deutung der Statistik-Ergebnisse und ihrer Auswertung vorgenommen werden. Die nicht signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Zell-Detektionen beider Patientengruppen können tatsächlich nicht signifikant sein. Ein

statistischer β -Fehler wäre jedoch möglich und kann nicht ausgeschlossen werden (Wilhelm und Rainer 2017). Dies würde zu einer fehlerhaften Interpretation der Ergebnisse führen.

Die durch das Programm QuPath ermittelten Zell-Detektionen für die jeweils untersuchten Proteine der Knochenproben mit einer entwickelten BRONJ – erkrankte Patientengruppe – wurden mit denen ohne entwickelte Kieferknochennekrose – gesunde Kontrollgruppe – verglichen und ausgewertet. Für eine statistische Analyse ist die bei dieser Studie herangezogene Versuchszahl von neun Knochenproben eher als zu gering zu bewerten. Nur durch eine sehr große Grundgesamtheit N und der damit verbundenen Abhängigkeit einer großen statistischen *Power* können valide und gültige statistische Aussagen getroffen werden und lediglich so können verlässliche Signifikanzunterschiede generiert werden (Wilhelm und Rainer 2017). Eine derart hohe Testobjektanzahl lässt sich nur schwierig realisieren, da das Probenmaterial häufig begrenzt ist und auch die histologische Aufarbeitung der Knochenproben sowie die Schnittpräparat-Herstellung von harten sowie weichen Anteilen der eingebetteten Kieferknochen sich nicht einfach gestalten.

Für die statistische Auswertung der Datensätze wurde der Mann-Whitney-U-Test gewählt, bei welchem keine Normalverteilung der Daten vorausgesetzt wird. Dieser Test vergleicht zwei unabhängige Stichproben anhand der Ränge der jeweils abhängigen Variablen auf signifikante Unterschiede. Es werden die Mediane der unverbundenen Stichproben verglichen. Hierzu werden keine metrisch skalierten Daten benötigt und es können ordinal skalierte Daten verarbeitet werden. Der Mann-Whitney-U-Test arbeitet somit mit deutlich weniger Anforderungen als der statistische t-Test, der jedoch eine Normalverteilung der Datensätze voraussetzt, aber aus eben diesem Grund nicht angewandt werden konnte.

5 Zusammenfassung

Bisphosphonat-Medikamente finden heutzutage als Osteoklastenhemmer ihre Hauptanwendung zur Prophylaxe und Therapie der Osteoporose sowie zur Behandlung von Neoplasien im Knochengewebe. Hierbei sind sie das Medikament der ersten Wahl. Knochenfiliae treten häufig bei Mamma-, Prostata-, Nierenzell- oder Lungenkarzinomen auf. Ein weiteres Indikationsgebiet sind ossäre Erkrankungen wie Morbus Paget und das multiple Myelom. Seit dem Jahr 2003 stellt die schwerwiegendste Nebenwirkung bei der Therapie die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose dar, bei der ein multifaktorielles Geschehen vorhanden ist. Bis heute sind die Entstehungsmechanismen und die zugrunde liegende Pathologie nur unzureichend geklärt. Auffällig ist jedoch, dass die Knochennekrosen fast ausschließlich in den Kiefern auftreten.

In der vorliegenden Studie wurden fünf Teilresektate von Patienten mit BRONJ durch eine Bisphosphonat-Therapie verwendet und mit vier gesunden Kieferknochenproben von Patienten ohne BRONJ hinsichtlich verschiedener osteogener Faktoren verglichen. Das Probenmaterial der erkrankten Patientengruppe wurde bei operativen Eingriffen zur Therapie der BRONJ und bei den gesunden Patienten während Weisheitszahnosteotomien gewonnen. Die Proben wurden nach einem festgelegten und einheitlichen Schema konserviert sowie in Paraffin eingebettet. Es wurden histologische Serienschnitte von jeder Probe angefertigt und danach IHC-Nachweisreaktionen durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine neutrophile Elastase, Col-I, RUNX2, SMURF1, SMURF2, SMAD2/3 und RANKL nachgewiesen. Die fertigen Schnittpräparate wurden mit dem Programm QuPath ausgewertet und die Zell-Detektionen wurden quantitativ mit denen der gesunden Kieferknochenproben verglichen sowie statistisch analysiert. Bei der Auswertung bestätigte sich eine signifikant höhere Anzahl an Entzündungszellen in den BRONJ-Proben. Bei den Proteinen RUNX2, SMAD2/3 und RANKL lag ein signifikanter Unterschied zwischen der gesunden und der erkrankten Patientengruppe vor. Die Proteine Col-I, SMURF1 und SMURF2 wiesen statistisch betrachtet keinen signifikanten Unterschied der Zell-Detektionen auf.

6 Literaturverzeichnis

- Abu-Id MH, Warnke PH, Gottschalk J, Springer I, Wiltfang J, Acil Y, Russo PAJ, Kreusch T (2008): „Bis-phosphy jaws“ - high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg* **36**, 95–103
- Alexopoulou O, Jamart J, Devogelaer JP, Brichard S, de Nayer P, Buyschaert M (2006): Bone density and markers of bone remodeling in type 1 male diabetic patients. *Diabetes Metab* **32**, 453–458
- Allen MR, Burr DB (2008): Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. *J Oral Maxillofac Surg* **66**, 987–994
- Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Hernandez S, Poveda R, Sanchis JM, Diaz JM, Scully C (2006): Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncol* **42**, 327–329
- Bähr J, Stoll P, Bach G (2013): Bisphosphonattherapie und Osteonekrose des Kiefers. *Implantologie Journal* **17**, 30–36
- Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, et al. (2017): QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* **7**, 1–7
- Bartl R, Bartl C: Osteoporose-Manual: Diagnostik, Prävention und Therapie. Springer, Berlin 2013
- Bartl R, Tresckow E, Bartl C: Bisphosphonat-Manual: Wirkungen - Indikationen - Strategien. Springer, Berlin 2006
- Basha B, Rao DS, Han ZH, Parfitt AM (2000): Osteomalacia due to vitamin D depletion: a neglected consequence of intestinal malabsorption. *Am J Med* **108**, 296–300
- Bloom W, Fawcett DW: A textbook of histology. 4. Auflage; Chapman & Hall, London 1996
- Boquete-Castro A, Gómez-Moreno G, Calvo-Guirado JL, Aguilar-Salvatierra A, Delgado-Ruiz RA (2016): Denosumab and osteonecrosis of the jaw. A systematic analysis of events reported in clinical trials. *Clin Oral Implants Res* **27**, 367–375
- Çankaya M, Cizmeci Şenel F, Kadioglu Duman M, Muci E, Dayisoğlu EH, Balaban F (2013): The effects of chronic zoledronate usage on the jaw and long bones evaluated using RANKL and osteoprotegerin levels in an animal model. *Int J Oral Maxillofac Surg* **42**, 1134–1139
- Coleman R (2001): Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev* **27**, 165–176
- Dannemann C, Zwahlen R, Grätz KW (2006): Clinical experiences with bisphosphonate induced osteochemonecrosis of the jaws. *Swiss Med Wkly* **136**, 504–509

- de Amorim FPLG, Ornelas SS, Diniz SF, Batista AC, da Silva TA (2008): Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *J Mol Histol* 39, 401–408
- Dimopoulos MA, Kastiritis E, Bamia C, Melakopoulos I, Gika D, Roussou M, Migkou M, Eleftherakis-Papaiakovou E, Christoulas D, Terpos E, et al. (2009): Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. *Ann Oncol* 20, 117–120
- Dodson TB (2009): Intravenous bisphosphonate therapy and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 67, 44–52
- Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Dimopoulos M, Westin J, Sonneveld P, et al. (2006): International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 20, 1467–1473
- Favus MJ (2007): Diabetes and the risk of osteonecrosis of the jaw. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 817–818
- Flanders KC (2004): Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 85, 47–64
- Fleisch H: Bisphosphonates in Bone Disease: From the Laboratory to the Patient. 4. Auflage; Academic Press, San Diego 2000
- Fleisch H, Russell RG, Francis MD (1969): Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 165, 1262–1264
- Gliklich R, Wilson J (2009): Epidemiology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: the utility of a national registry. *J Oral Maxillofac Surg* 67, 71–74
- Gross C, Weber M, Creutzburg K, Möbius P, Preidl R, Amann K, Wehrhan F (2017): Osteoclast profile of medication-related osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy: a comparison with osteoradionecrosis and osteomyelitis. *J Transl Med* 15, 128
- Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013): The epidemiology of osteoporosis-Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Dtsch Arztebl Int* 110, 52–57
- Haynes DR, Crotti TN, Loric M, Bain GI, Atkins GJ, Findlay DM (2001): Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. *Rheumatology (Oxford)* 40, 623–630
- He LH, Xiao E, An JG, He Y, Chen S, Zhao L, Zhang T, Zhang Y (2017): Role of Bone Marrow Stromal Cells in Impaired Bone Repair from BRONJ Osseous Lesions. *J Dent Res* 96, 539–546

- Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, Nooka A, Sayegh G, Guarneri V, Desrouleaux K, et al. (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
- Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR, Boyce BF (1995): Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 10, 1478–1487
- Jundt G, Jani L (1997): Primary chronic osteomyelitis. *Orthopade* 26, 889–893
- Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C (2009): Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 629–648
- Kim HJ (2010): New understanding of glucocorticoid action in bone cells. *BMB Rep* 43, 524–529
- 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, 1–6
- Koch FP, Merkel C, Ziebart T, Smeets R, Walter C, Al-Nawas B (2012): Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. *Clin Oral Invest* 16, 79–86
- Komatsubara S, Mori S, Mashiba T, Li J, Nonaka K, Kaji Y, Akiyama T, Miyamoto K, Cao Y, Kawanishi J, et al. (2004): Suppressed bone turnover by long-term bisphosphonate treatment accumulates microdamage but maintains intrinsic material properties in cortical bone of dog rib. *J Bone Miner Res* 19, 999–1005
- Koy S, Schubert M, Koy J, Ney M, Lauer G, Sabatowski R (2015): Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Schmerz* 29, 171–178
- Lim MJ, Kwon SR, Park SG, Park W (2010): Acute effects of intravenous administration of pamidronate in patients with osteoporosis. *J Korean Med Sci* 25, 1277–1283
- Lin JH (1996): Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 18, 75–85
- Lin X, Liang M, Feng XH (2000): Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 275, 36818–36822
- Long F (2011): Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 27–38
- Marino KL, Zakhary I, Abdelsayed RA, Carter JA, O'Neill JC, Khashaba RM, Elsalanty M, Stevens MR, Borke JL (2012): Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *J Oral Implantol* 38, 511–518

- Martini G, Gennari L, Merlotti D, Salvadori S, Franci MB, Campagna S, Avanzati A, De Paola V, Valleggi F, Nuti R (2007): Serum OPG and RANKL levels before and after intravenous bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. *Bone* 40, 457–463
- Marx RE (2003): Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61, 1115–1117
- Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V (2005): Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 63, 1567–1575
- Menschutkin N (1865): Über die Einwirkung des Chloracetyls auf phosphorige Säure. *Ann Chem Pharm* 133, 317–320
- Mitsimponas KT, Moebius P, Amann K, Stockmann P, Schlegel KA, Neukam FW, Wehrhan F (2014): Osteo-radio-necrosis (ORN) and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ): the histopathological differences under the clinical similarities. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 496–508
- Mundy GR (2007): Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev* 65, 147–151
- 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, 137–144
- Murphy E, Glüer CC, Reid DM, Felsenberg D, Roux C, Eastell R, Williams GR (2010): Thyroid function within the upper normal range is associated with reduced bone mineral density and an increased risk of nonvertebral fractures in healthy euthyroid postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 3173–3181
- Ohe JY, Kwon YD, Lee HW (2012): Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived osteoblasts. *Clin Oral Invest* 16, 1153–1159
- 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
- Pautke C, Bauer F, Bissinger O, Tischer T, Kreutzer K, Steiner T, Weitz J, Otto S, Wolff KD, Stürzenbaum SR, et al. (2010): Tetracycline bone fluorescence: a valuable marker for osteonecrosis characterization and therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 68, 125–129
- Pautke C, Kreutzer K, Weitz J, Knödler M, Münzel D, Wexel G, Otto S, Hapfelmeier A, Stürzenbaum S, Tischer T (2012): Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: A minipig large animal model. *Bone* 51, 592–599

- Pesanti EL, Lorenzo JA (1998): Osteoclasts and effects of interleukin 4 in development of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 355, 290–299
- Rauch F, Glorieux FH (2004): Osteogenesis imperfecta. *Lancet* 363, 1377–1385
- Rauthan M, Pilon M (2011): The mevalonate pathway in *C. elegans*. *Lipids Health Dis* 10, 243
- Rogers MJ, Watts DJ, Russell RGG (1997): Overview of bisphosphonates. *Cancer* 80, 1652–1660
- Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J (2011): Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 49, 34–41
- Ruggiero SL (2009): Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): initial discovery and subsequent development. *J Oral Maxillofac Surg* 67, 13–18
- Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B (2009): American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. *Aust Endod J* 35, 119–130
- Russell RGG (2011): Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone* 49, 2–19
- Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA (2003): Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 21, 73–80
- Santini D, Vincenzi B, Hannon RA, Brown JE, Dicuonzo G, Angeletti S, La Cesa A, Coleman RE, Tonini G, Budillon A, et al. (2006): Changes in bone resorption and vascular endothelial growth factor after a single zoledronic acid infusion in cancer patients with bone metastases from solid tumours. *Oncol Rep* 15, 1351–1357
- 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, 2095–2105
- Schenk R, Eggli P, Fleisch H, Rosini S (1986): Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tissue Int* 38, 342–349
- Schiegnitz E, Al-Nawas B, Hoefert S, Otto S, Pautke C, Ristow O, Voss P, Grötz KA (2018): S3-Leitlinie Antiresorptiva-assoziierte Kiefernekrosen (AR-ONJ). AWMF Registernummer: 007-091; https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007-0911_S3_Antiresorptiva-assoziierte-Kiefernekrosen-AR-ONJ_2018-12.pdf; abgerufen am 15.04.2021
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675
- Scriba GK (2000): Bisphosphonates in review. *Pharm unserer Zeit* 29, 50–56

- Shaw NJ, Bishop NJ (2005): Bisphosphonate treatment of bone disease. *Arch Dis Child* 90, 494–499
- Shoji S, Tabuchi M, Miyazawa K, Yabumoto T, Tanaka M, Kadota M, Maeda H, Goto S (2010): Bisphosphonate inhibits bone turnover in OPG(-/-) mice via a depressive effect on both osteoclasts and osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 87, 181–192
- Sievers N: Auswirkung von Bisphosphonaten auf die Expression von Osteoprotegerin (OPG) und Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) in Osteoblastenkulturen aus Unterkiefer und Becken - Eine Pilotstudie am Hausschwein. Med. Diss. Göttingen. 2012
- Sitges-Serra A, García L, Prieto R, Peña MJ, Nogués X, Sancho JJ (2010): Effect of parathyroidectomy for primary hyperparathyroidism on bone mineral density in postmenopausal women. *Br J Surg* 97, 1013–1019
- Solomayer E (2011): Indikationen und aktuelle Datenlage zur Bisphosphonat-Anwendung. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie* 8, 82–83
- Stanton DC, Balasanian E (2009): Outcome of surgical management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: review of 33 surgical cases. *J Oral Maxillofac Surg* 67, 943–950
- Stürmer S: Immunhistochemische Untersuchungen zur Differenzierung unterschiedlicher Knochenreaktionen auf Bisphosphonate in Humanpräparaten. Med. Diss. Bonn. 2013
- Sun X, Xie Z, Ma Y, Pan X, Wang J, Chen Z, Shi P (2018): TGF- β inhibits osteogenesis by upregulating the expression of ubiquitin ligase SMURF1 via MAPK-ERK signaling. *J Cell Physiol* 233, 596–606
- Takata S, Yasui N (2001): Disuse osteoporosis. *J Med Invest* 48, 147–156
- Takeuchi M, Sakamoto S, Yoshida M, Abe T, Isomura Y (1993): Studies on novel bone resorption inhibitors. I. Synthesis and pharmacological activities of aminomethylenebisphosphonate derivatives. *Chem Pharm Bull* 41, 688–693
- Tröltzsch M, Pache C, Otto S, Tröltzsch M (2014): Die Bedeutung neuer Antiresorptiva, Neoangiogenesehemmer und Immuno-Modulatoren für die Entstehung von Osteonekrosen der Kiefer. *Quintessenz* 65, 471–476
- Voss PJ, Walter C (2013): Bisphosphonatassoziierte Kiefernekrose. *MKG-Chirurg* 6, 101–106
- Wagner JM, Jaurich H, Wallner C, Abraham S, Becerikli M, Dadras M, Harati K, Duhan V, Khairnar V, Lehnhardt M, et al. (2017): Diminished bone regeneration after debridement of posttraumatic osteomyelitis is accompanied by altered cytokine levels, elevated B cell activity, and increased osteoclast activity. *J Orthop Res* 35, 2425–2434
- Wehrhan F, Hyckel P, Guentsch A, Nkenke E, Stockmann P, Schlegel KA, Neukam FW, Amann K (2011): Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw is linked to suppressed TGF β 1-

signaling and increased Galectin-3 expression: a histological study on biopsies. *J Transl Med* 2, 102

Wilhelm G, Rainer M: *Medizinische Statistik: Angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe*. Schattauer, Stuttgart 2017

Wolff TF, Schiegnitz E, Grötz KA (2019): Indication and treatment strategies in antiresorptive risk patients. *Dtsch Zahnärztl Z Int* 1, 16–23

Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR (2006): Narrative review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med* 144, 753–761

Yang H, Pan H, Yu F, Chen K, Shang G, Xu Y (2015): A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 5161–5167

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung in seiner Arbeitsgruppe und seinem Labor sowie besonders dafür, mir die Möglichkeit zur Durchführung dieser Studie gegeben zu haben.

Ich danke Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. Philipp Kauffmann als zweitem Mitglied des Betreuungsausschusses und der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Poliklinik der Universitätsmedizin Göttingen für ihre sehr gute Unterstützung, insbesondere auch Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. Philipp Brockmeyer für seine freundliche Hilfe bei der Erstellung der Scandateien der Kieferknochenproben. Durch ihn wurde die digitale Auswertung der Präparate möglich.

Ein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Dr. med. dent. Boris Schminke für seine stets hervorragende Unterstützung sowie vorbildliche Hilfestellung bei vielen Herausforderungen, die sich bei der Durchführung dieser Studie ergeben haben.

Frau Elvira Henze möchte ich für ihre kompetente Hilfe und Unterstützung beim Erlernen der wissenschaftlichen Methoden und besonders der Färbemethoden der immunhistochemischen Nachweisreaktionen sowie für die Ermöglichung eines reibungslosen Ablaufs im Laboralltag danken. Ebenso bedanke ich mich bei meinen Kollegen und Mitdoktoranden für das angenehme Arbeitsklima und die gegenseitige Hilfe.

Herrn Holger Wiegel und Frau Birgit Beiderwellen-Wiegel möchte ich von Herzen danken, dass sie mir die Freiheit und Unterstützung ermöglichten, nach dem absolvierten Studium die vorliegende Studie verfassen zu können.

Die Widmung der Dissertation gilt meinen geliebten Großeltern Erich und Brunhilde Beiderwellen.