

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Wiltfang
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**CHARAKTERISIERUNG DER ENTZÜNDUNGSREAKTION UND
APOPTOSEMECHANISMEN BEI DER
BISPHOSPHONATASSOZIIERTEN OSTEONEKROSE DES KIEFERS
ZUR THERAPIEOPTIMIERUNG**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
MIA-LEENA ARNDT
aus **Rendsburg**

Kiel **2018**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Yahya Açil, Klinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Birte Größner-Schreiber, Klinik für Zahnerhaltungskunde
und Parodontologie

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.03.2019

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Bisphosphonatassoziierte Kiefernekrose (BONJ).....	1
1.2. Geschichte der Bisphosphonate und der Phossy Jaws.....	6
1.3. Bisphosphonate: Aufbau und Wirkung	8
1.4. Zytokine.....	14
1.5. Ziel der Studie	14
1.6. Fragestellungen.....	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Aufbau der Studie:.....	16
2.2. Vorbereitung:.....	16
2.2.1. Anzucht der Zellen	16
2.2.2. Ansatz des supplementierten Nährmediums.....	18
2.2.3. Anlage der Zellkultur	18
2.3. Auswertung:	19
2.3.1. MTT-Test	19
2.3.2. Schwarz-Weiß-Fotodokumentation	19
2.3.3. FDA-Färbung	20
2.3.4. Nachweis inflammatorischer Marker	20
2.3.4.1. RNA-Extraktion	21
2.3.4.2. Photometrische Messung	22
2.3.4.3. Reverse Transkription.....	22
2.3.4.4. Polymerase-Kettenreaktion.....	23
2.3.4.5. Quantifizierung.....	26
2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese	26
2.4. Statistik.....	27
3. Ergebnisse	28
3.1. MTT-Test.....	28
3.2. Schwarz-Weiß-Fotodokumentation	32
3.3. FDA-Färbung.....	39

3.4. Nachweis inflammatorischer Marker	46
3.5. Agarose-Gelelektrophorese	63
4. Diskussion	65
4.1. Diskussion – Material und Methoden	65
4.2. Diskussion – Ergebnisse	67
4.2.1. Diskussion - Zellproliferation und Zellvitalität	67
4.2.2. Diskussion - Expression inflammatorischer Marker.....	70
4.3. Diskussion - Schlussfolgerung	73
5. Zusammenfassung	75
6. Anhang	76
6.1. Anhang 1 – PCR, Osteoblasten, Zoledronat	76
6.2. Anhang 2 – PCR, Fibroblasten, Zoledronat.....	79
Tabelle 3: PCR-Daten, Fibroblasten, Zoledronat, 4. Woche	79
6.3. Anhang 3 – PCR, Osteosarkomzellen, Alendronat.....	82
Tabelle 4: PCR-Daten, Osteosarkomzellen, Alendronat, 4. Woche	82
7. Literaturverzeichnis	85
7. Danksagungen	98
8. Eidesstattliche Erklärung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

AAOMS	American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
BMP	Bone morphogenetic protein
BONJ	Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw / Bisphosphonatassoziierte Kiefernekrose
C	Celsius
cDNA	Komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonucleid acid / Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FDA	Fluoreszin Diacetat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min.	Minute
mRNA	Messenger ribonucleid acid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADPH	Reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADH	Reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid
ONJ	Osteonecrosis of the jaw / Kiefernekrose
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerasechainreaction / Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGE2	Prostaglandin E2
PI	Propidium Iodid
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
Rab	Ras-related in brain

Rac	Related to protein kinases A and C
RANKL	Receptor activator of nuclear factor- κ B Ligand
Ras	Rat sarcoma
Rho	Ras homologue
RNA	Ribonucleid acid / Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse transcription Polymerasechainreaction
SAOS-2 Zellen	Osteosarkomzellen
Taq	Thermus aquaticus
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor

1. Einleitung

Seit den 80er Jahren sind Bisphosphonate (BP) [1] aus der Therapie bestimmter Erkrankungen nicht mehr wegzudenken. Eingesetzt werden sie bei Osteoporose, M. Paget, Osteogenesis imperfecta, multiples Myelom (Plasmozytom) und bei Metastasen solider Tumore (Mamma- und Prostatakarziom). Das Risiko der Entstehung neuer Knochenmetastasen kann reduziert sowie daraus resultierende Schmerzen und eine tumorinduzierte Hyperkalzämie können therapiert werden [2-6]. Über die positive Auswirkung auf den Knochenstoffwechsel hinaus wirken BP mittels einer Hemmung der Osteoklasten antiresorptiv [7]. Studien zeigten außerdem direkte und indirekte antineoplastische Wirkungen [8-15].

Trotz dieser Erfolge gibt es auch unerwünschte Wirkungen bei der Behandlung, wie die bisphosphonatassoziierte Kiefernekrose (BONJ = Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw) [2, 8, 16-19]. Hierbei handelt es sich um eine seltene, aber aufgrund ihrer schwierigen Therapie und der einschränkenden Lebensqualität, gravierende Erkrankung [8, 19].

1.1. Bisphosphonatassoziierte Kiefernekrose (BONJ)

Marx beschrieb 2003 in seiner Arbeit 36 Fälle der bisphosphonatassoziierten Kiefernekrose [18]. Zeitgleich berichteten Ruggiero und Kollegen über 63 Patienten [20], weitere Arbeitsgruppen waren die von Wang et al. [21] und Migliorati [19]. Im Verlauf der Jahre stieg die Inzidenz an. Abu-Id und Kollegen veröffentlichten 2006 ihre Arbeit, in der sie 349 in der Literatur beschriebene Fälle, 54 Falldokumentationen und 19 eigene Fälle untersuchten [2].

Zunächst sprach Marx von der medikamenteninduzierten avaskulären Knochennekrose [18]. Laut Definition handelt es sich bei dem Krankheitsbild heutzutage um Folgendes: Freiliegender nekrotischer Knochen in der Kiefergesichtsregion, über mindestens acht Wochen bestehend, der im zeitlichen Zusammenhang mit einer Bisphosphonattherapie, jedoch ohne Bestrahlung des Kopfes oder der Nackenregion in der Vorgeschichte des Patienten, zu sehen ist [22]. Diese Unterscheidung ist wichtig, da das Erscheinungsbild der 1922 von Regaud beschriebenen Osteoradionekrose ähnelt [23, 24]. Definiert wird dieses

Krankheitsbild als ein Zustand, der nach der Bestrahlung bei einer malignen Grunderkrankung an dem exponierten Knochen auftritt, nicht innerhalb von drei bis sechs Monaten abheilt, bei Ausschluss eines Rezidivs oder Resttumors [25]. Histologisch fand man ein hypozelluläres und – vaskuläres Gewebe vor [25]. Trotz des möglichen spontanen Auftretens gilt das Trauma, beispielsweise nach Zahnextraktion, als wichtigster prädisponierender Faktor [26]. Marx beschrieb 1983 den pathophysiologischen Ablauf wie folgt: 1. Bestrahlung, 2. Hypoxisches-hypozelluläres-hypovaskuläres Gewebe, 3. Gewebeuntergang, 4. Nicht-heilende chronische Wunde [25]. Das klinische Erscheinungsbild ist ebenso wie bei der BONJ vielseitig. Es reicht vom asymptomatischen Auftreten über starke Schmerzen, Fistelung, Entzündung bis hin zum freiliegenden Knochen und pathologischen Frakturen [27].

Laut “American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons“ (AAOMS) wird das Risiko des Auftretens der bisphosphonatassoziierten Kiefernekrose anhand folgender Faktoren eingeteilt [22].

1. Medikamentenabhängige Risikofaktoren:

Zum einen unterscheiden sich Bisphosphonate in ihrer Potenz, zum anderen werden nach intravenöser Gabe höhere Konzentrationen als nach oraler Applikation erreicht [28-31]. Pamidronat wirkt 100- bis 700-fach stärker als Etidronat. Ibandronat und Zoledronat hingegen zeigten sich 10.000– bis 100.000-fach potenter als Etidronate [32].

Ebenfalls spielt die Dauer der Therapie eine Rolle. Je länger die Einnahme erfolgt, desto höher ist das Risiko [29].

2. Lokale Risikofaktoren:

Hierzu zählen zahnärztliche Eingriffe wie Wurzelbehandlung, Zahnextraktionen, Implantate [28, 30]. Die Mandibula ist zweimal häufiger betroffen als die Maxilla [20, 33, 34]. Patienten mit entzündlichen Zahnerkrankungen, wie peridontalen oder dentalen Abszessen, haben ein 7-fach erhöhtes Risiko [35].

3. Demographische und systemische Risikofaktoren:

Erhöhtes Alter, Zugehörigkeit der kaukasischen Rasse [30], maligne Grunderkrankung und begleitende Osteopenie beziehungsweise Osteoporose [31] sind negativ prädisponierende Faktoren.

4. Weitere Faktoren sind:

Therapien mit Kortikosteroiden oder Chemotherapeutika, Diabetes mellitus, Rauchen, Alkohol und mangelnde Mundhygiene.

Anhand der Risikofaktoren werden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. Man unterscheidet [2]:

1. Hochrisikopatienten mit einer intravenösen Bisphosphonatgabe und zusätzlicher Chemo-, Kortikosteroid- oder Strahlentherapie von,
2. Niedrigrisikopatienten mit oraler Bisphosphonatgabe ohne begleitende Therapie.

Die Prävalenz der BONJ ist zunehmend [36], sie steigt in Abhängigkeit der Dauer der Medikamenteneinnahme [37]. Die AAOMS unterscheidet 2014 bei Angaben der Inzidenz zwischen den Grunderkrankungen der Patienten. Krebspatienten mit Zoledronattherapie erkranken bis zu 100 Mal häufiger an Osteonekrose des Kiefers (ONJ = osteonecrosis of the jaw) als die Placebogruppe [37]. Die Inzidenz liegt hier zwischen 0,7 – 6,7 % [38, 39]. Bei einer Osteoporose wird die Inzidenz nach oraler Applikation mit 0,1 – 0,21 % [40], bei jährlicher intravenöser Injektion mit 0,017 % [41] angegeben.

In geringer Anzahl wird auch über ein spontanes Auftreten der BONJ berichtet [18, 20], wobei die Verteilung hierbei ungefähr bei 2/3 zu 1/3 liegt [18, 20, 42].

Bis zu 31 % der Patienten sind asymptomatisch und werden per Zufallsdiagnose entdeckt [33]. Wird die Kiefernekrose symptomatisch, können folgende Probleme auftreten: Freiliegender avaskulärer Knochen mit wunden Stellen, Weichteilschwellung, Exsudation [8], foetor ex ore durch Keimzutritt, Abszesse bis hin zur Fistelbildung [8, 18], Auflockerung der Zahnschmelzsubstanz [8], Schmerzen [8, 18], Schwierigkeiten beim Essen und der Mundhygiene [19]. Histopathologisch gleicht das Bild einer chronischen Osteomyelitis [43]. Dies und die schwierige Behandlung führt zu einer verminderten Lebensqualität [19].

Tabelle 1 zeigt die Stadieneinteilung mit Therapieansätzen nach AAOMS [22, 37].

Tabelle 1: Stadieneinteilung und Therapie der BONJ nach der American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

Stadium	Therapie
Risikogruppe: Kein sichtbarer nekrotischer Knochen bei oraler oder intravenöser Bisphosphonattherapie	Keine Therapie Patienten Edukation
Stadium 0: Kein klinischer Beweis für nekrotischen Knochen, aber radiologische Veränderungen und unspezifische Symptome	Systemische Schmerz- und antibiotische Therapie
Stadium 1: Freiliegender und nekrotischer Knochen, oder bis auf den Knochen reichende Fisteln ohne Hinweis auf eine Infektion bei asymptomatischen Patienten	Antibakterielle Mundspülung Vierteljährliche Nachsorge / Kontrollen Patienten Edukation, sowie Überprüfung der Indikation der Bisphosphonattherapie
Stadium 2: Freiliegender und nekrotischer Knochen, oder bis auf den Knochen reichende Fisteln mit schmerzender Infektion sowie geröteter Region des betroffenen Knochens mit oder ohne eitriger Drainage	Antibakterielle Mundspülung Systemische Therapie mit oralen Antibiotika Schmerztherapie Debridement zur Entfernung des betroffenen Weichgewebes und Infektionskontrolle
Stadium 3: Freiliegender und nekrotischer Knochen, oder bis auf den Knochen reichende Fisteln bei Patienten mit Schmerzen, Infektion und mindestens einem weiteren Symptom wie: Über den Alveolarknochen hinaus freiliegender, nekrotischer Knochen mit pathologischer Fraktur, Fistelbildung (extraoral, oroantral, oronasal) oder ausgedehnter Osteolyse	Antibakterielle Mundspülung Schmerz- und antibiotische Therapie Chirurgisches Debridement / Resektion zur Schmerz- und Infektionslinderung

Eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit für die Behandlung der bisphosphonatassoziierten Kiefernekrose wird befürwortet [2, 44].

Eine besondere Rolle nimmt dabei die Prophylaxe, die vor Beginn der Bisphosphonattherapie stattfindet, ein. Hierzu zählt insbesondere die intensive Aufklärung der Patienten vor der Bisphosphonattherapie [45]. Des Weiteren soll eine zahnärztliche Vorstellung zur Mundhöhlensanierung erfolgen. Hierbei sollen Infektionsherde beseitigt werden. Zusätzlich erfolgt eine Kontrolle des Zahnstatus, gegebenenfalls eine korrekte Prothesenanpassung, um Druckstellen und mögliche Eintrittspforten für Keime zu beseitigen. Es wurde gezeigt, dass so das Risiko der Kiefernekrose gesenkt werden konnte [46]. Begünstigende Faktoren wie Rauchen und Alkoholkonsum sollten vermieden werden. Die Patienten sollten unter regelmäßiger Kontrolle stehen und zur Mundhygiene angehalten werden [47]. Unter laufender Bisphosphonattherapie nimmt die Prävention einen bedeutenden Stellenwert ein. Eine regelmäßige fachkundige Inspektion der Mundhöhle soll verhindern, dass die Prävalenz der BONJ unterschätzt wird [48]. Weitere Behandlungsstrategien fortgeschrittener Stadien können der Tabelle 1 entnommen werden.

Die genaue Pathophysiologie der Erkrankung ist bis heute nicht geklärt. Man geht von einem multifaktoriellen Geschehen aus [2, 5]. Die potentiellen Mechanismen sollen im folgenden Text näher erläutert werden.

Bisphosphonate reduzieren das sogenannte „Bone remodelling“, indem sie die Osteoklasten beeinflussen. Sie verringern ihre Differenzierung und Funktion, zugleich induzieren sie deren Apoptose [49-53]. Dieser Eingriff in die Homöostase des Knochenumbaus kann das Auftreten von Mikrofrakturen fördern [54]. An den Alveolen im Kiefer ist der Knochenumsatz erhöht, wodurch sich Bisphosphonate in höheren Konzentrationen ansammeln. Dadurch entsteht ein Prädilektionsort für das Auftreten der BONJ [55-58].

Entzündungen und Infektionen wurden bereits bei den Risikofaktoren erwähnt. Ebenfalls werden sie bei der Stadienteilung sowie den daraus resultierenden Behandlungsempfehlungen berücksichtigt. Laut einer Studie von Hansen et al. wurden bei den untersuchten Patienten sowohl bei der Osteoradionekrose, als auch bei der bisphosphonatassoziierten Kiefernekrose *Actinomyces* gefunden [59]. Spätere Studien zeigten das Vorhandensein von weiteren Bakterien, Pilzen und Viren

[60-62]. Nach Kos und Mitarbeitern begünstigen Bisphosphonate die Entwicklung dieses Biofilmes [63]. Da der Kieferknochen nur durch eine dünne Mukosaschicht von der Umgebung getrennt ist [18], wird das Eindringen von Mikroorganismen erleichtert und somit die Entstehung von Entzündungen und Osteomyelitiden ermöglicht [20].

Bereits 2003 gab Marx Hinweise auf die Pathophysiologie, indem er von einer avaskulären Nekrose sprach [18]. Eine ausreichende Blutversorgung ist für die Aufrechterhaltung eines intakten Gewebes unabdingbar. Antiangionetische Effekte wurden für Bisphosphonate [20, 64], insbesondere für Zoledronat [65-68], nachgewiesen. Der Kiefer weist bestimmte Besonderheiten bei der Blutversorgung auf. So handelt es sich bei den Arterien um Endarterien [43]. Bei der Ausübung seiner Funktion beeinflusst der Kiefer die Durchblutung, da diese stets druckabhängig ist [69].

Im Sinne der Wirkung auf die Osteoklasten wurde auch von Effekten auf Weichgewebe berichtet [32, 70]. Bisphosphonate haben einen proapoptotischen Effekt auf die Keratinozyten des Gastrointestinaltraktes [71, 72] sowie der Mundhöhle [70]. Des Weiteren wird die Proliferation von Mukosazellen, ebenso wie die Wundheilung, inhibiert beziehungsweise verzögert [72]. So berichtet auch die Arbeitsgruppe um Simon von negativen Effekten auf gingivale Fibroblasten, Osteoblasten und Osteosarkomzellen. Sie stellten eine verringerte Produktion extrazellulärer Proteine nach Gabe von Bisphosphonaten fest [73]. Açil et al. befassten sich ebenfalls mit diesen Zelllinien und beobachteten unter der Gabe von Zoledronat, Pamidronat und Alendronat zytotoxische Effekte [74].

Das gehäufte Auftreten von BONJ bei Patienten mit maligner Grunderkrankung [29, 43, 75] legt die Vermutung nahe, dass das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt. Tiermodelle bestätigten den Eindruck, indem sie ein gehäuftes Auftreten der BONJ bei gleichzeitiger immunmodulatorischer Therapie zeigten [76-78].

1.2. Geschichte der Bisphosphonate und der Phossy Jaws

Die Bisphosphonatassoziierte Kiefernekrose wurde wie bereits oben erwähnt 2003 das erste Mal beschrieben. Die Geschichte der Kiefernekrose lässt sich hingegen ins 19. Jahrhundert zurückverfolgen. Erstmals beobachtet wurde sie laut Dearden 1839 in Wien und verlief mit einer Gesamtletalität zwischen 20 – 50 % [2, 79].

Im Jahre 1826 wurden die ersten Luzifer Streichhölzer hergestellt. Seit 1932 wurde auch gelber Phosphor dabei verwendet und so entstanden die „strike anywhere“ Zündhölzer, die zu einem industriellen Boom führten [80].

Smith beschrieb 1865 anschaulich den Zusammenhang zwischen der Phosphorverwendung in der Streichholzindustrie und der Kiefernekrose. Er stellte in seiner Arbeit den Fall eines 35-jährigen Arbeiters bei „Lucifer-Match“ vor.

Ein gewisser Dr. Bristowe beschrieb 1862 die Symptome des Krankheitsbildes ähnlich dem oben erwähnten Fallbeispiel mit folgenden Worten: *„Typischerweise entwickelt sich eine dunkelrote Verfärbung der Schleimhaut, meist in Verbindung mit einem kariösen Zahn. Ein Ulcus bildet sich oder eine Alveole heilt nicht nach Extraktion. Dann gibt es eine fortschreitende Entzündung mit Abstoßung von Sequestern, die porös und sehr leicht sind, wurmdurchlöchert und wie Bimsstein aussehen. Der Knochen wird weiter schwächer. Die Krankheit schreitet langsam voran mit Ausdünnung des Knochens bis zur totalen Nekrose“* [2, 79, 81].

Im „Report to Parliament“ von 1899 werden insgesamt 3134 Arbeiter genannt, die in ihrer Tätigkeit mit gelbem Phosphor in Berührung kamen. Von diesen erkrankten zwischen 1894 und 1897 36 Personen an der Kiefernekrose. Der Bericht erläutert sowohl den chemischen Hintergrund der Phosphorwirkung als auch die Symptome der Patienten [82].

Zum damaligen Zeitpunkt kamen zwei mögliche Entstehungswege in Frage. Der dampfförmige Phosphor, beziehungsweise die nach Knoblauch riechenden Phosphor-Trioxide, wurden eingeatmet. Entweder seien vorbestehende unbehandelte kariöse Zähne und Zahnfleischentzündungen ausschlaggebend gewesen, oder die Absorption des eingeatmeten Phosphor und dessen Umwandlung im Skelett habe zu einer geringeren Widerstandsfähigkeit aller Knochen geführt. Die Präferenz des Auftretens am Kiefer bestand hierbei durch die für die Entzündung vorgegebene Eintrittspforte an Zahnhälsen [80]. Letztere Theorie wurde auch durch Dearden unterstützt, da dieser bereits 1901 bei Arbeitern nach dem Phosphorkontakt erhöhte spontane Knochenbrüche und Osteomyelitiden feststellte [79]. Hughes et al. sowie ein Artikel im „British Dental Journal“ (1944) präferierten ebenfalls den systemischen Weg [80, 83].

Ab 1855 wurde in Schweden kein gelber Phosphor mehr verwendet und im Jahre 1958 begann man mit der Herstellung des sogenannten Vesta-Streichholzes. Dieses ähnelte unseren heutigen Streichhölzern und war in der Herstellung für die Arbeiter

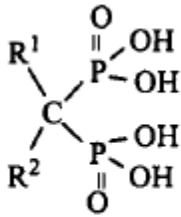
ungefährlich [80]. Trotz möglicher Alternativen und des bekannten Zusammenhanges der Kiefernekrose und der „strike-anywhere-matches“ verschwanden die Zündholzer nur langsam vom Markt [79]. Seit 1906 wurde der gelbe Phosphor in Europa durch die Berner Konvention in der Streichholzherstellung verboten und bietet somit ein Beispiel dafür, dass Gesetze industrielle Erkrankungen ausrotten können. Allerdings konnte der Gebrauch erst 1931 durch massiv erhöhte Steuern komplett eingedämmt werden [84].

In anderen Zweigen der Industrie, wie zum Beispiel für Brandmaterial und militärische Zwecke, wurde gelber Phosphor, der durch verunreinigten weißen Phosphor oder als Zwischenprodukt bei der Herstellung des relativ harmlosen roten Phosphors entsteht, weiter verwendet. Auch nach 1906 wurde von dem Auftreten der Kiefernekrose, insbesondere zu Zeiten der Weltkriege, berichtet. So wurden von Kennon und Hallam (1944) sieben und von Hughes et al. (1962) zehn Fälle der Kiefernekrose beschrieben [80, 83]. Hygienemaßnahmen, entsprechende Lüftungsvorrichtung und regelmäßige ärztliche sowie zahnärztliche Kontrollen reduzierten das Risiko des Auftretens. Durch den Einsatz von Antibiotika wurde eine bessere Therapie ermöglicht.

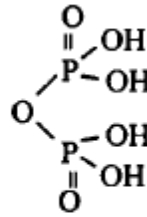
1.3. Bisphosphonate: Aufbau und Wirkung

Bisphosphonate werden bereits seit 1865 chemisch hergestellt [85]. Ihr Einsatz erfolgt als Wasserenthärter, Antikorrosivum, Waschmittel in der Textil-, Düngemittel- und Ölindustrie [5].

Chemisch handelt es sich um Analoga des Pyrophosphats, bei denen das Sauerstoffatom der P-O-P-Bindung durch ein Kohlenstoffatom ersetzt wurde [8, 86]. Die Abbildung 1 zeigt die Struktur von Bisphosphonatsäure und Pyrophosphatsäure im Vergleich. Durch den Austausch des Kohlenstoffatoms wurde die enzymatische Hydrolyse der Bisphosphonate erschwert [8].



Bisphosphonic acid



Pyrophosphoric acid

Abb. 1: Grundstruktur von Bisphosphonatsäure im Vergleich zu Pyrophosphatsäure [87].

Die zwei freien Seitenketten der Verbindung bieten eine große Variationsmöglichkeit [85]. Eine der zwei freien Bindungen des Atoms wird meist durch eine Hydroxylgruppe besetzt, während die andere funktionelle Gruppe die Eigenschaft des jeweiligen Bisphosphonates bestimmt [8]. Dadurch entstehen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen, biologischen, therapeutischen sowie toxikologischen Eigenschaften [85]. Die Länge der aliphatischen Karbonkette ist für die Aktivität entscheidend. Die Potenz der Bisphosphonate kann durch die Wahl der Seitenkette gesteigert werden. So nimmt diese von den Hydroxylgruppen über die Amino- (Alendronat) und Stickstoffgruppen bis hin zu Zoledronat mit einem stickstoffhaltigen Imidazolring stetig zu [85, 88, 89]. Auf biochemischer Ebene greifen Bisphosphonate in die Cholesterinsynthese ein. Man unterscheidet aufgrund der Seitenkette zwei verschiedene Gruppen. Nicht-stickstoffhaltige Bisphosphonate wie Etidronat, Tiludronat und Clodronat wirken über die Bildung zytotoxischer ATP-Analoga (Adenosintriphosphat) [90, 91]. Wie die Abbildung 2 zeigt, wird so die Energiezufuhr für folgende Stoffwechselwege unterbunden [1].

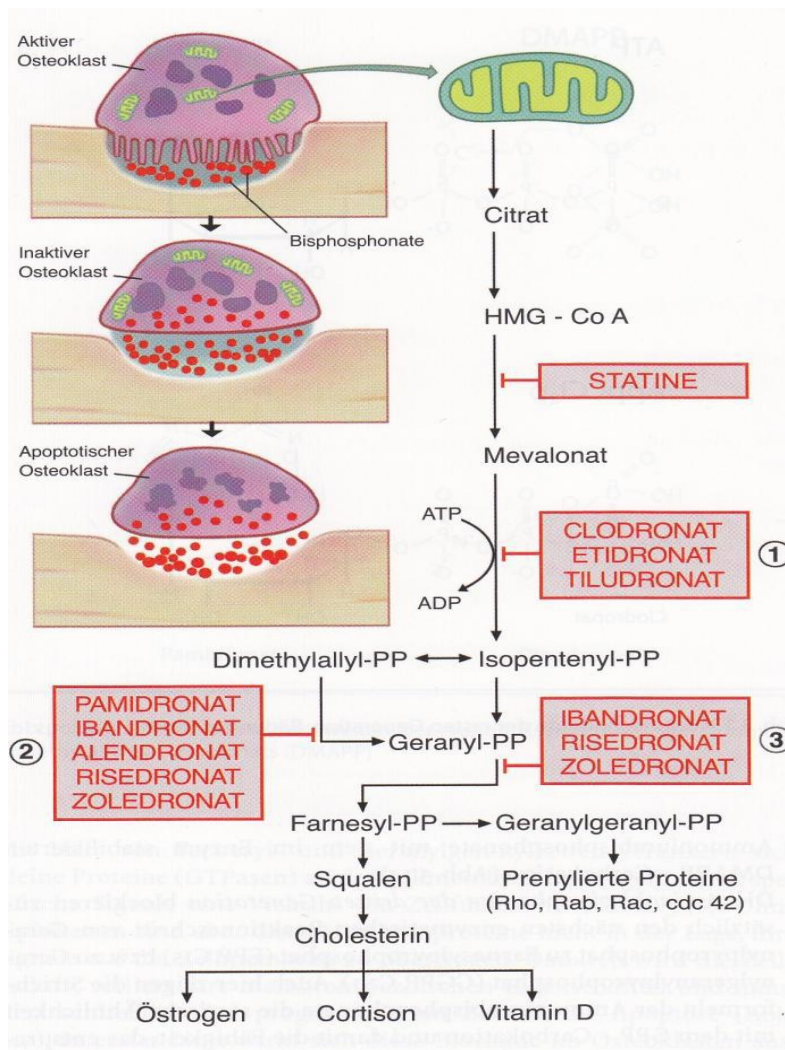


Abb. 2: Wirkorte der verschiedenen Bisphosphonate aus Bartl et al. [1]

Stickstoffhaltige Bisphosphonate, zu denen unter anderem Pamidronat, Alendronat, Risedronat und Zoledronat gehören, entfalten ihre Wirkung im Mevalonsäurestoffwechsel [89, 92, 93]. Die Farnesylpyrophosphat-Synthase wird gehemmt [94, 95]. Dadurch kommt es zur verminderten Bildung von Isoprenoidlipiden wie Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat. Diese sind für die post-translationelle Prenylierung von Proteinen, inklusive der GTP-bindenden (Guanosintriphosphat) Proteine Ras (rat sarcoma), Rho (Ras homologue), Rac (related to protein kinases A and C) und Rab (Ras-related in brain) essentiell. Wie in Abbildung 3 dargestellt, können unterschiedliche Zellfunktionen, beispielsweise die des Zytoskeletts, nicht aufrechterhalten werden [49, 85, 92-101]. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens der Farnesylpyrophosphat-Synthase folgt letztendlich, durch Ausschaltung lebenswichtiger Stoffwechselforgänge, eine

verringerte Aktivität oder eine Induktion der Apoptose verschiedener Zellarten [49, 85].

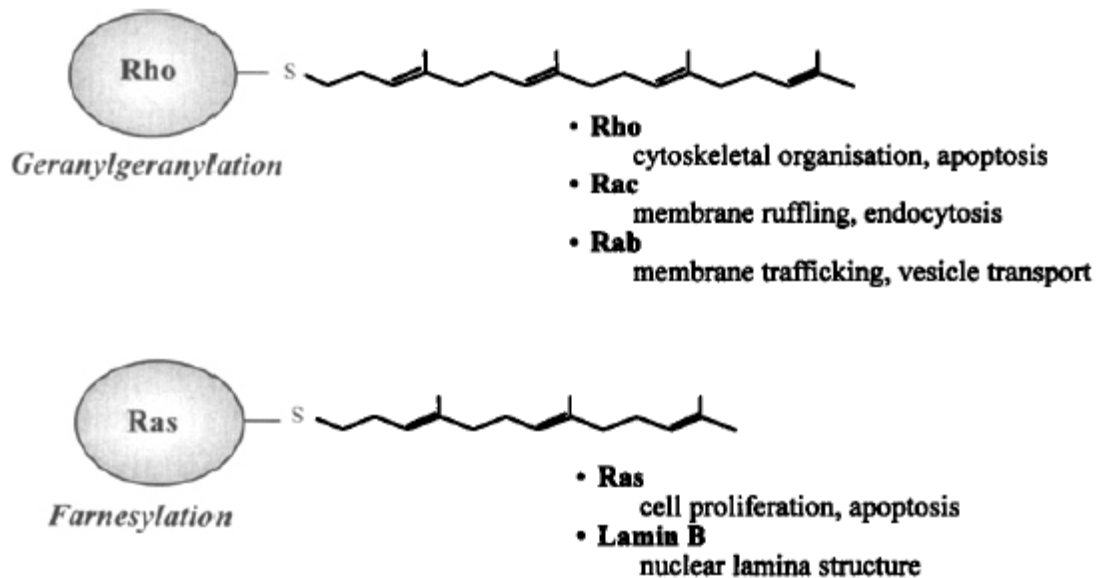


Abb. 3: Funktion der verschiedenen GTP-bindenden Proteine [87].

Extrazelluläres Calcium-Pyrophosphat wird enzymatisch gespalten und in Form von Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}^-$) in den Knochen eingelagert [1]. Bisphosphonate haben eine ausgeprägte Affinität zum Hydroxylapatit und wirken daher besonders auf Knochengewebe [85, 87]. Abbildung 4 zeigt diese Bindung schematisch.

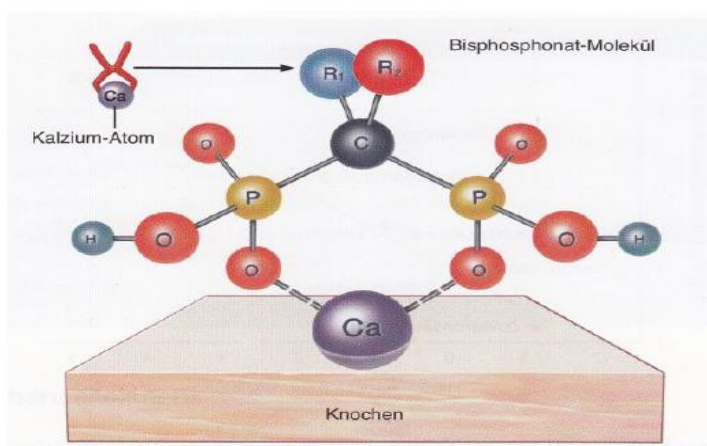


Abb. 4: Bindung von Bisphosphonaten an das Ca-Atom des im Knochen eingelagerten Hydroxylapatits [1].

Beim Knochen handelt es sich nicht um ein festes, statisches Gewebe, sondern es ist durch einen ständigen Auf- und Abbau durch Osteoblasten und Osteoklasten gekennzeichnet [102]. Bisphosphonate wirken auf diese Zellen und greifen so in diesen Kreislauf ein [103].

Knochenabbau findet durch Osteoklasten an sogenannten Resorptionslakunen statt [8, 104-106]. Dabei kommt es zu freiliegenden Hydroxylapatitkristallen, deren weiterer Abbau durch Bisphosphonate gehemmt wird [105, 107, 108]. Indem sich Bisphosphonate an die Kristalle anlagern, können sie die Funktion der Osteoklasten blockieren [105].

Bei den Osteoklasten handelt es sich um die Zielzellen der Bisphosphonate. Aufgrund ihrer Polarität werden sie per Phagozytose aufgenommen [49, 97, 103, 109] und blockieren, über die oben beschriebenen Mechanismen, verschiedene Stoffwechselwege. Unter anderem inhibieren sie die vakuoläre H⁺-ATP-Ase [85]. Außerdem haben Sie einen proapoptotischen Effekt [110-116], reduzieren ihre Aktivität [107, 111, 117-120], die Adhäsion an der Knochenoberfläche [121] sowie die Rekrutierung aus Vorläuferzellen. All diese Vorgänge führen zu einer reduzierten Knochenresorption [2, 111, 122-133].

Osteoklasten und Osteoblasten beeinflussen sich gegenseitig, sodass die Gabe von Bisphosphonaten auch stets indirekt auf die jeweils andere Zelllinie wirkt [103, 130, 131, 134-136]. Die Interaktion geschieht über verschiedene Zytokine. Die Stimulation von Osteoklasten erfolgt durch RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B Ligand), IL-1 (Interleukin 1), IL-6 (Interleukin 6), PGE₂ (Prostaglandin E₂), TNF- α und - β (Tumornekrosefaktor α und β), PTH (Parathormon), PTHrP (Parathyroid hormone-related protein), TGF (transforming growth factor) und Thyroxin. Die Inhibierung von Osteoklasten wird durch BMP (bone morphogenetic protein) 2 und 4, TGF, Calcitonin, Interferon, Glukokortikoide und PDGF (Platelet Derived Growth Factor) reguliert [137, 138]. Aufgabe der Osteoblasten ist unter anderem die Produktion von knochenspezifischem Kollagen und BMP [137, 139]. Osteoklasten beeinflussen diese über die Sezernierung von RANKL und OPG (Osteoprotegerin) im Sinne einer Stimulation beziehungsweise einer Inhibition über BMP. Für einen physiologischen Knochenumsatz ist ein Gleichgewicht unabdingbar [140, 141]. Aufgrund ihrer polaren Eigenschaft werden Bisphosphonate nur schlecht resorbiert. Die Bioverfügbarkeit ist relativ gering, sie beträgt nach oraler Gabe nur 0,5 bis 10 % [2, 32, 103]. Durch intravenöse Gabe kann sie auf bis zu 50 % gesteigert werden

[142]. Um eine Komplexbildung durch andere Nahrungsmittel und Getränke zu vermeiden, sollte die Einnahme der Medikamente ausschließlich mit Leitungswasser und hinreichendem Zeitabstand erfolgen [103]. Nach 24 Stunden werden ungefähr 30 – 40 % bereits über den Urin ausgeschieden, der Rest im Knochen metabolisiert [103, 130, 143].

Auch die Halbwertszeit variiert deutlich. Im Plasma liegt sie zwischen 20 Minuten bis zu 3 Stunden, im Knochen hingegen kann sie sogar bis zu Jahren andauern [32, 103, 107, 144-146]. Sobald Bisphosphonate in den Knochen eingelagert worden sind, werden sie erst durch die osteoklastäre Resorption wieder freigesetzt [103]. Der klinische Einsatz erfolgt sowohl zu diagnostischen als auch zu therapeutischen Zwecken. Als skelettale Marker für Osteolysen werden sie mit ^{99m}Tc (Technetium) versetzt und in der Radiologie verwendet [85]. Als Inhibitor werden sie in der Therapie bei ektopter Kalzifizierung und Ossifikation eingesetzt [85, 103]. Die positiven Effekte im Sinne eines verringerten Knochenumsatzes mit resultierender erhöhter Kalziumkonzentration und gesteigerter Knochendichte, macht man sich bei metabolischen Erkrankungen mit gesteigerter Osteoklastenaktivität zu Nutze [103, 147]. Hierzu zählen die glucocorticoidinduzierte- und postmenopausale Osteoporose, M. Paget, Hyperkalziämie sowie tumorinduzierte Osteolysen [6, 85, 86, 102, 103, 148]. Gierloff und Kollegen zeigten, dass Zoledronat einen positiven Einfluss auf die strahleninduzierte Knochenzerstörung hat. Sie nehmen an, dass dies durch die Wirkung auf die Osteoklasten bedingt sei [149].

Die Nebenwirkungen unter der Bisphosphonattherapie lassen sich in die folgenden vier Gruppen einteilen: Akut-Phase-Reaktion (Inzidenz bei i. v. Gabe bis zu 10 %) [150-153], gastrointestinale Effekte (Inzidenz 2 – 10%), Nephrotoxizität (Inzidenz bei i. v. Gabe bis zu 10 %) und bisphosphonatassoziierte Kiefernekrose [154, 155]. Bei korrekter Anwendung gelten sie als nebenwirkungsarm [153]. Beispielsweise können Ulcera im Magen-Darm-Trakt oder Ösophagitiden durch ausreichend Leitungswasser und eine aufrechte Lage vor und nach der Einnahme deutlich reduziert werden. Durch langsame Infusion lässt sich die durch Komplexbildung ausgelöste Nephrotoxizität minimieren. Elektrolytstörungen können durch ausreichende Diurese sowie regelmäßige Blutbildkontrollen kontrolliert werden [103].

1.4. Zytokine

Bei den Zytokinen handelt es sich um Botenstoffe, die von verschiedenen Zelltypen produziert oder auch nur sezerniert werden. Über Bindung von Rezeptoren an der Zelloberfläche beeinflussen sie verschiedene Stoffwechselwege und zelluläre Mechanismen [156]. Im folgenden Text soll ein Überblick über eine Auswahl von Zytokinen und deren Funktion vermittelt werden.

Man unterteilt die Zytokine in verschiedene Untergruppen wie Interleukine, zytotoxische Faktoren, Interferone, koloniestimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren.

In ihrer Wirkung auf das Immunsystem kann man Zytokine dem angeborenen oder dem erworbenen Immunsystem zuordnen [157].

Bei einer akuten Entzündungsreaktion kommt das angeborene Immunsystem zum Einsatz. Hierzu zählen unter anderem Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und die Interleukine 1 und 6. Von Monozyten, Lymphozyten, Endothelzellen und T-Zellen gebildet, wirken sie auf beispielsweise Osteoklasten, Osteoblasten und B-Zellen. Sie stimulieren die Osteoklasten und steigern die Knochenresorption [157-159].

Die Interleukine 10 und 12 werden dem erworbenen Immunsystem und somit einer chronischen Entzündungsreaktion zugeteilt. Über Aktivierung und Inhibierung beeinflussen sie die Abwehrzellen [157].

Im Gegensatz zu den bisher genannten Zytokinen wirkt Interleukin 4 antiinflammatorisch. Der Immunglobulinklassenwechsel wird angeregt, die Lymphozytenproliferation gehemmt [157]. Ebenso wie Interleukin 10 wirkt auch Interleukin 4 auf den Knochen antiresorptiv [158, 159].

1.5. Ziel der Studie

Das Ziel vorliegender Studie bestand darin, die Kiefernekrose unter dem Aspekt des multifaktoriellen Geschehens genauer zu betrachten. Die Hintergründe im Pathomechanismus sollten besser verstanden werden, um eine Grundlage für schonendere Therapieverfahren oder auch präventive Maßnahmen zu ermöglichen. Hierzu wurde ein in-vitro Modell erstellt, um die Auswirkungen der Bisphosphonate Zoledronat und Alendronat auf verschiedene Zellen des Kieferknochens und angrenzenden Weichgewebes zu untersuchen. Ich legte Kulturen mit humanen

Gingivafibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen (Osteosarkomzellen) an, die über vier Wochen ausgewertet worden sind.

Das Interesse bestand zum einen darin, die Induktion der Apoptose sowie mögliche resultierende morphologische Charakteristika genauer zu betrachten.

Zum anderen sollte der Zusammenhang zwischen der BONJ und Infektionen und Entzündungen im Mundraum genauer untersucht werden. Dafür wurde die Betrachtung von Zytokinen gewählt, die sowohl pro- und antiinflammatorisch wirken als auch die akute und chronische Entzündung repräsentieren. Somit galt der zweite Teil der Studie der Genexpression des Tumornekrosefaktors α sowie der Interleukine-1 β , -4, -6, -10 und -12. Diese sollten Aufschlüsse über die stattfindende Reaktion an der Grenzfläche Knochen/Weichgewebe geben.

1.6. Fragestellungen

Wie wirkt sich die Gabe von Bisphosphonaten auf die Vitalität von Osteosarkomzellen, Fibroblasten und Osteoblasten aus?

Gibt es Auswirkungen auf die Genexpression inflammatorischer Marker, wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und der Interleukine-1 β , -4, -6, -10 und -12?

Welche Unterschiede gibt es zwischen den Medikamenten Alendronat und Zoledronat in Bezug auf die Vitalität der Zellen sowie der Zytokinexpression?

Welche Unterschiede gibt es zwischen den Konzentrationen im Hinblick auf die Vitalität und Genexpression?

2. Material und Methoden

2.1. Aufbau der Studie:

Es wurden drei Zelllinien (humane Gingivafibroblasten [im folgenden Fibroblasten], Osteoblasten und SaOS-2- Zellen [Osteosarkomzellen]) für diese Studie benutzt. Die Osteoblasten und Fibroblasten stammen aus dem Beckenkamm und Zahnfleisch gesunder Patienten, die beispielsweise wegen einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte am Kiefer operiert wurden, jedoch bisher keine Bisphosphonattherapie erhalten haben. Gewonnen wurde das Zellmaterial vorab von einer anderen Arbeitsgruppe um Açil, die Patienten sind im Vorfeld informiert und einverstanden gewesen (Ethiknummer D 402/07). Für die folgende Studie waren die Zellen bei minus 70 ° C tiefgefroren. Das genaue Vorgehen des Verfahrens ist von Açil et al. beschrieben worden [160, 161]. Die SaOS-2-Zellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) sind kommerziell erworben worden. Ich legte für die Zelllinien über vier Wochen Kulturen an und behandelte sie mit den Bisphosphonaten Alendronat (Fosamax® von MSD Sharp & Dohme GmbH) und Zoledronat (Zoledronic acid, Zometa®, Novartis®).

Jede Woche wurde ein Teil der Kultur einem MTT-Test (farbmetrisches Verfahren zur Messung der Zellproliferation mit Tetrazolium-Salz/MTT), einer FDA (Fluoreszein Diacetat) - Färbung und einer PCR (Polymerasechainreaction) - Analyse zur Auswertung unterzogen. Außerdem ist das Wachstumsverhalten mit einer Digitalkamera festgehalten worden. Des Weiteren wurde in der 1. und 3. Woche vorsichtshalber, falls es während des Experiments Probleme mit den Primern der PCR-Analyse geben sollte, Nährmedium für einen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) eingefroren.

Der genaue Ablauf der Studie wird nun im Folgenden dargestellt.

2.2. Vorbereitung:

2.2.1. Anzucht der Zellen

Um die für die Studie erforderliche Zellmenge von 5×10^4 zu erreichen, wurden die Zellen vorsichtig aufgetaut und auf mehrere Zellkulturflaschen (Tissue Culture Flask, PE Vented Cap, Sarsted, Newton, NC, USA) mit je 10 ml Nährmedium verteilt.

Dieses bestand aus 500 ml Minimum essential medium eagle der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland), 50 ml fötalem Kälberserum (Perbio Science Deutschland, Bonn, Deutschland), 10 ml Glutamin (L-Alanyl-L-Glutamin von Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 5 ml eines Penicillin-Streptomycin-Vitamin C-Gemisches (100 E. / ml Penicillin und 100 µg / ml Streptomycin jeweils von Biochrom AG, Berlin, Deutschland; 1 mmol / l Vitamin C von Sigma-Aldrich, München, Deutschland). Bei den SaOs2-Zellen und den Osteoblasten wurde außerdem 1 ml Dexamethason (100 nmol / l SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) hinzugegeben. Aufbewahrt wurden die bestückten Zellkulturflaschen in einem Brutschrank mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und einer Luftzusammensetzung von 5 % CO₂ und 95 % Außenluft (Firma Heraeus Christ, Osterode, Deutschland).

Zweimal pro Woche bekamen die Zellen frisches Nährmedium und wurden dann auch lichtmikroskopisch (Leitz, Wetzlar, Deutschland) auf mögliche Kontamination untersucht.

Bis die entsprechende Zellzahl erreicht wurde, mussten die Zellen mehrfach passagiert werden. Hierzu wurde zunächst das alte Nährmedium entfernt und die Flaschen mit PBS-Dulbeco (Phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) von Biochrom AG (Berlin, Deutschland) gewaschen, um das verbliebene Nährmedium zu entfernen. Anschließend wurden 3 ml einer Trypsin-EDTA (Ethylen-Diamintetraessigsäure)-PBS-Mischung (0,05 % Trypsin, 0,01 % EDTA in PBS, Verhältnis 1:10, Biochrom AG, Seromed, Berlin, Deutschland, Trypsin-EDTA-Solution) hinzugegeben, verteilt und 5 Minuten im Brutschrank kultiviert. Aus vorangegangenen Studien hat sich diese Methode als optimale Möglichkeit erwiesen, die Zellen zu lösen. Die so gelösten Zellen wurden in 50 ml Röhren von Sarstedt (Newton, NC, USA) pipettiert, die zuvor mit 10 ml Nährmedium gefüllt worden sind und anschließend zentrifugiert (Laborzentrifuge Haereus Christ, Osterode, Deutschland). Danach wurde der Überstand abgesaugt (Absauger von Serres Oy, Kauhajoki, Finnland) und die verbliebenen, nun vom Trypsin befreiten Zellen mit 1 ml Nährmedium vermengt. Im Anschluss daran fand eine Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer (Mercateo AG, München, Deutschland) statt, um die genaue Menge für die Anlage der Zellkultur zu bestimmen.

2.2.2. Ansatz des supplementierten Nährmediums

Für das Experiment wurde das Nährmedium mit den Bisphosphonaten, Alendronat und Zoledronat, in verschiedenen Konzentrationen (2,5 µm; 1,25 µm; 0,625 µm; 0,3125 µm; 0,15625 µm) versetzt. Die Kontrolle wurde immer mit dem ursprünglichen Nährmedium versorgt.

2.2.3. Anlage der Zellkultur

Jede Zelllinie wurde während der Studie über einen Zeitraum von vier Wochen beobachtet. Somit wurden jeweils folgende Platten bzw. Objektträger bestückt: 24 X 6er-Well-Platten (Tissue Culture Plate, Flat-Bottom-Cell +, Sarstedt, Newton, NC, USA) mit einer Konzentration von 5×10^4 Zellen und 2 ml Nährmedium für die schwarz-weiß Fotos der Zellkultur, die PCR-Analyse und ELISA. Es wurde für jede Woche jeweils für Alendronat beziehungsweise Zoledronat je 3 6er-Well-Platten pro Test angelegt. Es sind für die Kontrolle und die verschiedenen Konzentrationen immer 3 Vertiefungen bestückt worden.

4 X 96er Well-Mikrotiter-Platten (Tissue Culture Plate, Flat-Bottom-Cell +, Sarstedt, Newton, NC, USA) mit einer Konzentration von 5×10^3 Zellen und 0,1 ml Nährmedium für den MTT-Test. Für Jede Woche wurde eine Platte mit jeweils 8- Wells für die Kontrollen und entsprechenden Konzentrationen der Medikamente bestückt.

8 X 8er Objektträger (Nunc® Lab-Tek® II Chamber Slide™ System, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) mit einer Konzentration von 1×10^4 Zellen mit 0,3 ml Nährmedium für die FDA-Färbung und anschließende Foto-Dokumentation. Es waren pro Woche immer 3 Vertiefungen mit der Kontrolle und die restlichen 5 mit jeweils einer der verschiedenen Konzentrationen der Medikamente bestückt.

Am nächsten Tag wurde ein Wechsel des Nährmediums vorgenommen und die Zellen haben von diesem Zeitpunkt an stets das supplementierte Nährmedium erhalten.

Ein weiterer Wechsel erfolgte zwei Tage später. In der kommenden Woche, vier Tage nach dem Wechsel, ist mit der ersten Auswertung begonnen worden.

Der Ablauf gestaltete sich nun wie folgt: Immer montags habe ich die Auswertung mittels fotografischer Dokumentation und FDA-Färbung gemacht, Zellmaterial für die

PCR-Analyse und Elisa eingefroren, das Nährmedium gewechselt sowie den MTT-Test vorbereitet und diesen am darauffolgenden Dienstag dann abgelesen. Am Donnerstag fand ein erneuter Wechsel des Nährmediums statt.

2.3. Auswertung:

2.3.1. MTT-Test

Der MTT-Test dient der Bestimmung des Anteils der vitalen Zellen innerhalb einer Zellpopulation. Benutzt wurde hierfür das Cell-Proliferation Kit I der Firma Roche (Roche® Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) [162]. Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass der Farbumschlag vom gelben Tetrazolium-Salz (MTT) zu violetten Formazan-Kristallen, der durch metabolisch aktive Zellen verursacht wird, gemessen wird. Für die hierbei stattfindende Redoxreaktion werden die Koenzyme NADH und NADPH benötigt.

Hierzu wurde zu den Zellen in den 96er-Well-Mikrotiter-Platten 10 µl MTT-Reagenz pipettiert, ohne das Nährmedium vorher gewechselt zu haben. Nach vier Stunden Inkubationszeit im Brutschrank haben sich die violetten Formazan-Kristalle ausgebildet. Diese sind in Wasser unlöslich und wurden daher mit 100 µl eines im Kit enthaltenen Lösungsmittels (10% SDS in 0,01 M Salzsäure) vermengt. Nach weiteren 24 Stunden im Brutschrank konnte das gelöste Formazan-Produkt in einem Photometer (SpectraMax plus, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) bei einer Wellenlänge von 550 nm quantifiziert werden. Viele vitale Zellen sorgen für eine hohe metabolische Aktivität in der Probe. Dies wiederum korreliert direkt mit der Menge an Formazan-Kristallen, die ausgebildet werden.

2.3.2. Schwarz-Weiß-Fotodokumentation

Die schwarz-weiß-Fotos der Zellkultur wurden mit einer Digitalkamera (Nikon E 5000, Japan) unter lichtmikroskopischer Vergrößerung (Leitz, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen. Sie dienen der Beurteilung des Aussehens der Zellen im Hinblick auf die Vitalität und das Wachstumsverhalten.

2.3.3. FDA-Färbung

Die FDA-Färbung ermöglicht unter Zuhilfenahme zweier Lösungen, Propidiumiodid (PI) und Fluoreszindiaceat (FDA) (jeweils von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), die Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop. Das Prinzip der Färbung beruht darauf, dass FDA von den Esterasen vitaler Zellen umgesetzt wird und diese so im Fluoreszenzmikroskop grün leuchten. Im Gegensatz dazu ist die Zellmembran toter Zellen für PI permeabel. Es dringt in die Zelle ein und bindet an die DNA und RNA. Dadurch erscheinen diese Zellen im Fluoreszenzmikroskop rot.

Zur Vorbereitung wurden die Gebrauchslösungen frisch angesetzt. Dafür sind von der Stammlösung beim PI 500 μ l (1 mg / ml in Aqua dest.) und beim FDA 30 μ l (1 mg / ml in Aceton) mit je 10 ml PBS vermengt worden.

Das Nährmedium wurde von den 8er-Objektträgern abgesaugt und einmal unsteril mit PBS-Lösung gewaschen.

Anschließend wurde die FDA-Gebrauchslösung aufpipettiert und die Zellen 15 min. bei 37 °C im Brutschrank gefärbt.

Diese wurde wieder entfernt, die PI-Gebrauchslösung hinzugegeben und im Dunkeln bei Raumtemperatur zwei Minuten stengelassen, damit sich die Färbung ausbilden kann. Um die Objektträger in PBS lagern zu können, mussten die Kammern vorsichtig entfernt werden. Insgesamt stand nun ungefähr eine Stunde Zeit zur Verfügung, um unter dem Fluoreszenzmikroskop Fotos (Digitalkamera Nikon FX-35DX, Japan) zu machen. Ab der PI-Färbung erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte im Dunkeln, damit die Fluoreszenz der Zellen für die Fotos gut sichtbar blieb.

2.3.4. Nachweis inflammatorischer Marker

Ein Teil der Studie bestand darin, den Einfluss der beiden verwendeten Bisphosphonate auf die Entzündungsreaktion zu untersuchen. Dafür wurde die Genexpression der Zytokine Tumornekrosefaktor α und der Interleukine 1 β , 4, 6, 10 und 12 gemessen und zur Kontrolle außerdem die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) bestimmt.

Dies wurde mit einer besonderen Form der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase chain reaction), nämlich der reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR), gemacht. Hierbei werden zwei molekularbiologische Verfahren miteinander

gekoppelt.

Bevor dieses Verfahren angewendet werden konnte, musste das Zellmaterial zunächst vorbereitet werden. Dazu wurde als erstes eine RNA-Extraktion vorgenommen. Anschließend wurde mit einem Photometer (SpectraMax plus, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) die so gewonnene mRNA-Menge bestimmt, um dann mit Hilfe der reversen Transkriptase eine zum mRNA-Strang komplementäre DNA zu erstellen. Im letzten Schritt konnte dann die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt und so die DNA amplifiziert werden.

2.3.4.1. RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurde das RNeasy Plus Mini Kit der Firma Qiagen (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet [163]. Das Prinzip dieses Kits beruht darauf, dass zunächst die Probe immer wieder auf Säulen mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften gegeben wird und so die RNA nach und nach von den übrigen zellulären Bestandteilen getrennt wird.

Dazu sind die 6er Well-Platten der jeweiligen Woche vom Nährmedium befreit und anschließend mit 2,5 ml PBS gewaschen worden. Als nächstes wurde 1 ml PBS hinzugegeben und der Zellbestand vorsichtig mit einem cell-scraper (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) gelöst, in eine Mikroküvette (Biosphere® plus Safe Seal Micro Tubes 1,5 ml, Sarstedt, Newton, NC, USA) pipettiert und zentrifugiert (Centrifuge 5702 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Nachdem sich so die Zellen am Boden gesammelt haben, wurde der Überstand abgesaugt und die Küvette mit 350 µl RLT-Puffer aufgefüllt, von dem zur Vorbereitung 1 ml mit 10 µl Mercaptoethanol vermischt wurde. Der RLT-Puffer enthält Guanidiniumisothiocyanat zur Lyse von Zellen und Mercaptoethanol dient der Denaturierung von Proteinen. Um mit Hilfe der Lösungen das Erbgut aus den vitalen Zellen zu lösen, muss man das Gemisch zwei Minuten lang vortexen (mischen) (Schüttler von IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland).

Der Überstand wurde auf die gDNA Eliminator spin column (column = Säule) pipettiert, die auf dem 2 ml Sammelröhrchen stand. Diese Säule enthält Cellulose, die durch die Zugabe von Wasser die DNA-Freigabe ermöglicht, da die Affinität zu Wasser höher ist als die zur DNA.

Nun wurde alles 30 Sekunden bei 10.000 U / min (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert, die Säule wurde verworfen und das Eluat mit 350 µl frisch angesetztem

70-prozentigen Ethanol (Ethanol 100 % von J. T. Baker, Deventer, Niederlande und Aqua dest.) vermischt.

Anschließend wurden die gewonnenen 700 µl auf die RNeasy Spinsäule pipettiert und wieder 30 Sekunden bei 10.000 U / min zentrifugiert. Das nach der Zentrifugation unten in der Säule enthaltene Eluat konnte verworfen werden.

Nun wurde die Säule zunächst mit 700 µl RW1-Puffer und anschließend zwei Mal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Dazu wurde die Probe jeweils 30 Sekunden bei 10.000 U / min zentrifugiert.

Nach dem zweiten Waschschrift mit dem RPE-Puffer wurde die Zeit der Zentrifugation auf zwei Minuten angehoben und das Eluat wieder entsorgt.

Zum Schluss wurden die Säulen noch einmal auf frische Rörhrchen gesetzt, eine Minute bei 13.000 U / min zentrifugiert und dann auf die 1,5 ml Sammel-Rörhrchen gegeben.

Die RNA konnte dann durch zweimalige Zugabe von je 30 µl eines Gemisches aus Aqua dest. und DEPC (100 ml Aqua dest. mit 100 µl DEPC = Diethyl Pyrocarbonat) und wiederholte Zentrifugation (eine Minute bei 10.000 U / min) herausgelöst werden.

2.3.4.2. Photometrische Messung

Um für die Reverse Transkription die genaue RNA-Menge bestimmen zu können, wurde ein photometrisches Verfahren verwendet. Hierzu wurden 60 µl Aqua dest. und 15 µl der vorher extrahierten RNA vermengt (der Rest wurde eingefroren). Nach dem Vortexen wurde das Gemisch in eine Küvette gegeben und bei einer Wellenlänge von 260 nm, dies entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen und 320 nm gemessen.

Die gewonnenen Werte wurden in eine Excel-Tabelle (Microsoft® Office 2010, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) eingegeben und so konnte, anhand von Formeln, die für die weitere Verarbeitung benötigten µl RNA der einzelnen Proben berechnet werden.

2.3.4.3. Reverse Transkription

Um den gewünschten DNA Abschnitt mit Hilfe der PCR zu amplifizieren, wurde zunächst die extrahierte mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Verwendet wurde hierfür das QuantiTect Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland), das sowohl die reverse Transkriptase als auch einen Primer-Mix enthält [164].

Bei der reversen Transkriptase handelt es sich um eine, je nach Hersteller und Einsatzgebiet variierende, veränderte Enzymvariante unterschiedlicher Retroviren, die die cDNA anhand der mRNA-Vorlage erstellt. Hierfür wird ein sogenannter Primer als Startmolekül benötigt, der sich an das polyadenylierte 3'-Ende der mRNA anlagert. Der im Kit enthaltene Primer-Mix besteht aus Oligo-d(T)-Primern, die wiederum aus mehreren Thyminbasen aufgebaut sind. Die genauen Sequenzen werden vom Hersteller nicht preisgegeben. Der genaue Ablauf wird im Folgenden beschrieben.

Zunächst wurden 2 µl des darin enthaltenen gDNA Wipeout Puffers mit 1 µg der zuvor extrahierten RNA zusammengegeben. Wie viele µl der RNA 1 µg entsprechen wurde durch die Photometrie ermittelt.

Aufgefüllt wurden die Proben dann mit Aqua dest. bis überall ein Endvolumen von 14 µl erreicht wurde.

Nun wurde das Gemisch zwei Minuten in einem Wasserbad (Grant JB series, Grant Instruments, Cambridge, UK) bei 42 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.

Schließlich wurden zu jeder Probe noch 6 µl eines Reaktionsmixes hinzu pipettiert. Dieser bestand aus 1 µl reverser Transkriptase, 4 µl Quantiscript RT Puffer und 1 µl RT Primer Mix. So ergab sich zum Schluss ein Endvolumen von 20 µl.

Die Proben wurden zunächst 15 Minuten bei 42 °C im Wasserbad, dann 3 Minuten bei 95 °C auf einem Heizblock (TB1 Thermoblock, Biometra® GmbH, Göttingen, Deutschland) inkubiert und anschließend bis zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion eingefroren.

2.3.4.4. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion, ein Verfahren, das Mitte der achtziger Jahre von Kary Mullis entdeckt und beschrieben wurde, ermöglicht die Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes [165]. Als Vorlage für dieses Verfahren dient die physiologisch stattfindende Teilung von Zellen, denn auch hier muss die DNA vermehrt werden.

Bis eine ausreichende Menge an DNA-Material erreicht wird, müssen mehrere

Zyklen der PCR durchlaufen werden. Diese finden immer in der gleichen Reihenfolge statt.

Begonnen wird mit der Denaturierung, dem Schmelzen der doppelsträngigen DNA. Anschließend erfolgt die Primerhybridisierung und die Anlage der Primer, die als Startpunkt für die entstehende DNA Kopie dienen. Nun beginnt die Elongation, die Verlängerung der Kopie durch DNA Polymerasen. Da bei der Analyse im Labor häufige Temperaturwechsel vorkommen, bedient man sich der Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, die während der PCR nur einen sehr geringen Leistungsverlust hat [165].

Ein DNA-Strang besitzt immer ein 3'- und ein 5'-Ende. Der gegenüberliegende Strang verläuft genau entgegengesetzt. Da die DNA-Polymerase am 3'-Ende des Einzelstranges mit der Synthese beginnt, entsteht ein Produkt, welches am eigenen 3'-Ende Überlänge aufweist. Der Grund hierfür ist, dass der Primer nur einen Start-, nicht aber einen Zielpunkt festlegt. Die Länge des entstehenden DNA-Produktes wird durch einen neuen Zyklus und die damit einsetzende Denaturierung begrenzt. Beim zweiten Zyklus stehen nun anstatt zwei Einzelsträngen vier zur Verfügung. Zum einen die beiden ursprünglichen DNA-Stränge und zum anderen die davon neu gebildeten. Die erstellten Kopien sind durch den Primer an ihrem 5'-Ende definiert. Bei der Anfertigung einer Kopie dieses Stranges ist also sowohl ein Anfang als auch ein Ende durch die Primer vorgegeben.

Somit erhält man ab dem zweiten Zyklus Produkte einer genau definierten Länge, die sich beim Durchlaufen weiterer Zyklen exponentiell vermehren. Die Produkte mit einem Überhang am 3'-Ende erhöhen sich nur linear, da lediglich die ursprünglich eingesetzten DNA-Stränge als Vorlage dienen. Je mehr Zyklen bei der PCR durchgeführt werden, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die entstehenden Fragmente kleiner werden als die gewünschte Ziel-DNA.

Verwendet wurde für die Analyse das Quanti Tect SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) [166]. Hierbei wird zusätzlich ein fluoreszierender Farbstoff, in diesem Falle SYBR-Green, eingesetzt, mit dessen Hilfe die Menge des amplifizierten DNA-Abschnittes gemessen werden kann. Der Vorteil des Stoffes ist seine Stabilität, die es ermöglicht mehrere PCR-Zyklen durchzuführen.

Insgesamt sind sechs verschiedene Primer zum Einsatz gekommen. Jede Probe wurde auf die Produktion des Tumornekrosefaktor α sowie der Interleukine 1 β , 4, 6,

10 und 12 getestet und vervielfältigt. Von der Kontrolle und jeder Konzentration wurde eine Analyse mit insgesamt drei Wiederholungen durchgeführt. Demnach wurden von jedem Marker pro Woche 18 Messungen durchgeführt. Eine Auswahl der entsprechenden Tabellen befindet sich im Anhang dieser Arbeit. Außerdem wurde GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphat-dehydrogenase) als zusätzliche Kontrolle verwendet.

Zur Durchführung wurden die jeweiligen Primer der gewünschten Produkte mit 1,1 ml Tris-EDTA Puffer vermengt und somit gelöst. Der verwendete Puffer wiederum bestand aus 1 ml 1 M TRIS-HCL, 0,2 ml 0,5 M EDTA und 98,8 ml Aqua dest.. Anschließend wurde der Reaktionsmix nach Herstellerangaben zusammengestellt. Dazu wurden 10 µl QuantiTect SYBR-Green PCR Master Mix, 2 µl Primer, das entspricht 0,5 µM, und 7 µl Aqua dest. mit 1 µl cDNA in eine Kapillare pipettiert. Mit einem Light-Cycler® der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) wurden nun die Messungen durchgeführt.

Im Detail lief die PCR dieser Versuchsreihe folgendermaßen ab:

Vorbereitung: 2 Minuten bei 50 °C

Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase: 15 Minuten bei 95 °C

Denaturierung: 15 Sekunden bei 94 °C

Annealing: 20 Sekunden bei 55 °C

Amplifikation: 20 Sekunden bei 72 °C

Verschmelzung: 15 Sekunden bei 65 °C

Abkühlung: 30 Sekunden bei 40 °C

Da die verwendete cDNA bereits als Einzelstrang vorlag, konnten die Primer binden und die im Kit enthaltene HotStarTaq Polymerase aktiv werden. Diese unterscheidet sich von der gewöhnlichen Taq-Polymerase durch einen zusätzlichen Antikörper, der die Enzymaktivität bei geringen Temperaturen inhibiert und so die Vermehrung unspezifischer Produkte vermindert.

Ungebundenes SYBR-Green fluoresziert nur sehr gering, aber sobald sich ein Primer an die DNA gebunden hat, kann auch der Farbstoff an die DNA gebunden werden und die Fluoreszenz nimmt zu. Je mehr DNA-Produkte neu synthetisiert wurden, desto stärker ist auch das Fluoreszenz-Signal. Dies wird in Echtzeit von dem LightCycler® aufgezeichnet, bis am Ende der Elongationsphase das Maximum erreicht wird. Sobald die DNA-Stränge für einen neuen Zyklus denaturiert werden,

wird weniger SYBR-Green gebunden, die Fluoreszenz fällt und der Ablauf beginnt von vorn.

Die untere Grenze der gemessenen Fluoreszenz wurde bei 5 % festgelegt. Sobald eine Probe diese Schwelle überschritten hat, ist der sogenannte crossing point erreicht, das heißt, die Fluoreszenz hat die Hintergrundaktivität überwunden.

Da bei jeder PCR die Schritte in bis zu 45 Zyklen wiederholt werden, kann man über den crossing point Rückschlüsse auf die Konzentration des PCR-Produktes ziehen. Je kleiner die Zyklenzahl, bei der die 5 % Schwelle bereits erreicht wird, desto höher ist die Konzentration des gewünschten Produktes [167].

Dennoch zeichnet sich die Messung der Fluoreszenz durch eine geringe Spezifität aus, die durch die Schmelzkurvenanalyse ausgeglichen wird. Dazu wird im Anschluss an die PCR die Probe abgekühlt, um dann die Temperatur langsam anzuheben, bis der DNA-Strang bei einer für das Fragment spezifischen Temperatur denaturiert. SYBR-Green wird freigesetzt und die Änderung der Fluoreszenz kann gemessen werden. Über die Höhe des Peaks der Schmelzkurve kann man Rückschlüsse auf die Menge der gebildeten DNA-Fragmente ziehen.

2.3.4.5. Quantifizierung

Um eine relative Quantifizierung vornehmen zu können, wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Referenzgen gemessen. Dabei handelt es sich um ein Enzym der Glykolyse, das in lebenden Zellen unentbehrlich ist. Es gehört zur Gruppe der sogenannten House-Keeping-Gene [168-170].

Die eingesetzte RNA-Menge variiert von Probe zu Probe, da es bei einer experimentellen Studie immer wieder zu Problemen bei der Gewinnung des Materials, in diesem Fall Zellen, kommen kann. Die GAPDH ist unabhängig vom Zelltyp, Zellzyklus und äußeren Einflüssen und bietet somit ideale Voraussetzung, um als Kontrolle zu dienen.

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur bildlichen und quantitativen Darstellung der PCR-Ergebnisse wurden im Anschluss an diese von einigen Proben Gele angefertigt. Für die Anfertigung eines Agarose-Gels wurde zunächst 2,5 ml TBE-Puffer (=Tris-Borsäure-EDTA-Puffer) mit 47,5 ml Aqua dest. vermischt. Nachdem 1 g Agarose Pulver (von Bio-rad

Labaratories, Hercules, CA, USA) hinzugegeben wurde, ist das Gemisch auf einer magnetischen Kochplatte (Ikamag® RCT, Ika®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) erhitzt worden, bis eine klare Flüssigkeit entstanden ist. Diese wurde unter ständigem Rühren langsam abgekühlt und 6 µl Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben.

Die Flüssigkeit wurde in eine Form gegossen und nach einiger Zeit bildete sich ein Gel aus den Agarosepolymeren. Je größer der zugegebene Agarose-Anteil ist, desto kleiner werden die Poren.

Auf das fertige Gel wurden dann immer zweimal ein Standard (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und die entsprechenden Proben mit je 7 µl aufgetragen.

45-60 Minuten dauerte ein Durchlauf bei 100 Volt in 500 ml 0,5 M TBE-Puffer. Durch die Anlage eines elektrischen Feldes wandern die durch Phosphatgruppen negativ geladenen Fragmente zur positiven Anode. Hierbei wurden die DNA-Moleküle nach der Größe aufgetrennt, da kleinere Moleküle schneller wandern.

Anschließend wurde das Gel noch mit einer Digitalkamera (Canon Power shot A620) fotografiert. Sichtbar wurden die Banden unter UV Licht (Bio Doc Analyse, Biometra, Göttingen) durch das Ethidiumbromid, da dieses die Eigenschaft besitzt sich an Nukleinsäuren zu binden und dann fluoresziert.

2.4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Informatik und Statistik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Verwendet wurde das Programm „R“ (The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich).

Der MTT-Test wurde anhand von Box-Plot Diagrammen ausgewertet. Dazu wurde für jede Zelllinie und Konzentration der jeweiligen Woche jeweils das Minimum, Maximum, der Median, das 1. und 3. Quartil bestimmt. Danach konnten die Diagramme gezeichnet werden. Zur Veranschaulichung wurden die Daten als Liniendiagramme abgebildet.

Die relative Zytokinexpression, die mit Hilfe der PCR-Analyse ermittelt wurde, wird anhand von Streudiagrammen (siehe Abschnitt 3.4.) dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Skalierung der Y-Ordinate fertigte ich zur besseren Übersicht zusätzlich Liniendiagramme an.

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die konzentrationsabhängigen Auswirkungen zweier Bisphosphonate (Alendronat, Zoledronat) auf humane Osteoblasten und Gingivafibroblasten sowie Osteosarkomzellen zu erläutern.

Es galt die Induktion der Apoptose, daraus resultierende morphologische Charakteristika sowie die Expression inflammatorischer Zytokine zu untersuchen. Dazu wurden über vier Wochen angelegte Zellkulturen, anhand verschiedener Verfahren, wöchentlich ausgewertet.

3.1. MTT-Test

Die Auswertung des MTT-Tests, der die Zellproliferation mittels Farbumschlag bei stoffwechselaktiven Zellen misst, erfolgte anhand von Liniendiagrammen. Mit einer Excel-Tabelle wurden diese, durch Eingabe der photometrisch ermittelten Werte, erstellt. Der prozentuale Proliferationsanstieg unter Bisphosphonatgabe verschiedener Konzentrationen (2,5 μM ; 1,25 μM ; 0,625 μM ; 0,3125 μM ; 0,15625 μM ; die Konzentrationen werden im weiteren Text vereinfacht mit 2 Stellen hinter dem Komma angegeben) wurde im Vergleich zur Kontrolle aufgetragen.

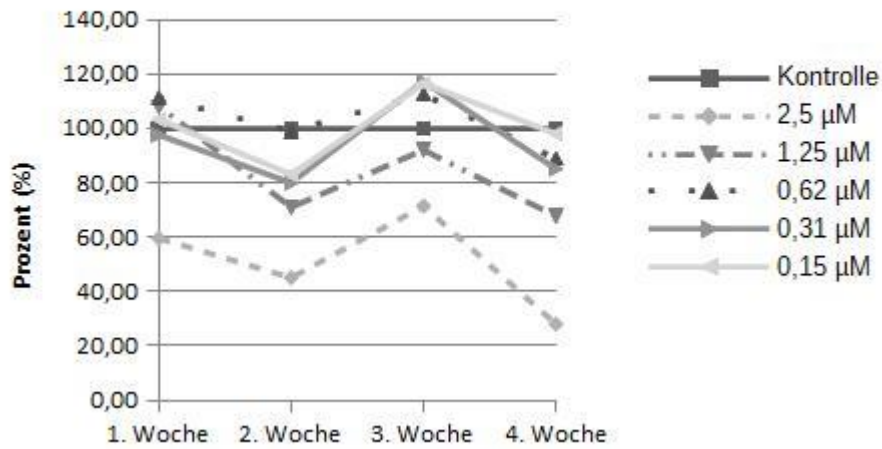
Bei allen Zellreihen präsentierte sich Zoledronat mit einer potenteren Wirkung als Alendronat.

Abbildung 5 zeigt bei den Osteoblasten, abgesehen von einem vorübergehenden Erholungseffekt in der dritten Woche, insgesamt eine Abnahme der Zellzahl. Die Wirkung von Zoledronat war konzentrationsabhängig toxischer als Alendronat, was sich ab 1,25 μM mit einem Unterschied von 20 % im Vergleich zu 65 % darstellte. Ähnlich stellten sich die Auswirkungen auf die Fibroblasten in der Abbildung 6 dar. Auch hier wurde die Zellproliferation, wenn auch geringer als bei den Osteoblasten, in Abhängigkeit von der Konzentration, gehemmt.

Die Osteosarkomzellen unterschieden sich in ihrer Reaktion von den anderen Zellreihen. Abbildung 7 demonstriert einen positiven Effekt auf das Zellüberleben bei geringer Konzentration (0,62 μM ; 0,31 μM ; 0,15 μM) beider Bisphosphonate.

Am Ende der vierten Woche wurde bei 0,31 μM eine Zellzunahme auf 180 % bei Zoledronat sowie auf 120 % bei Alendronat gemessen.

a) MTT Osteoblasten Alendronat



b) MTT Osteoblasten Zoledronat

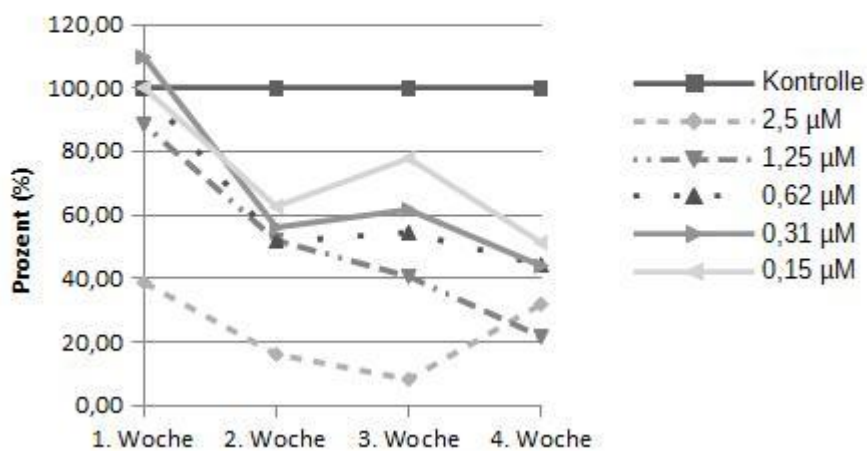
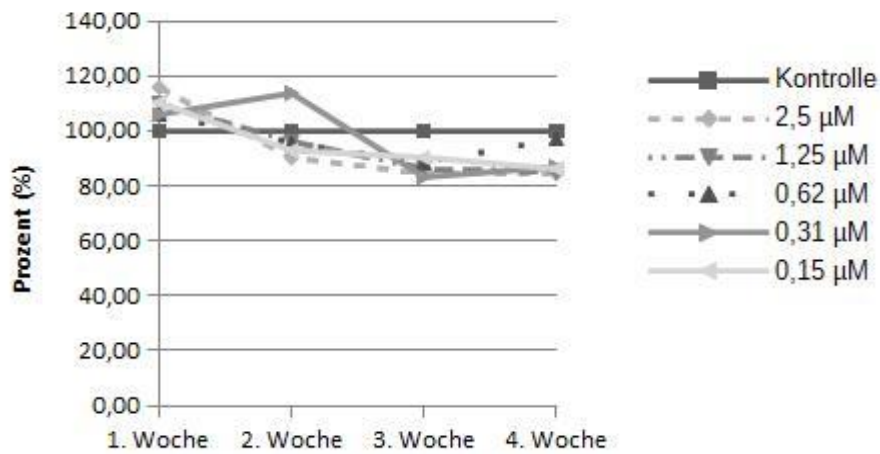


Abb. 5: Bei der Darstellung der Zellproliferation der Osteoblasten zeigte sich unter a) Alendronat bei geringer Konzentrierung zunächst ein Proliferationsvorteil (0,62 µM; 0,31 µM und 0,15 µM). Insgesamt wurde jedoch, wie auch bei b) Zoledronat eine Abnahme der Zellproliferation festgestellt.

a) MTT Fibroblasten Alendronat



b) MTT Fibroblasten Zoledronat

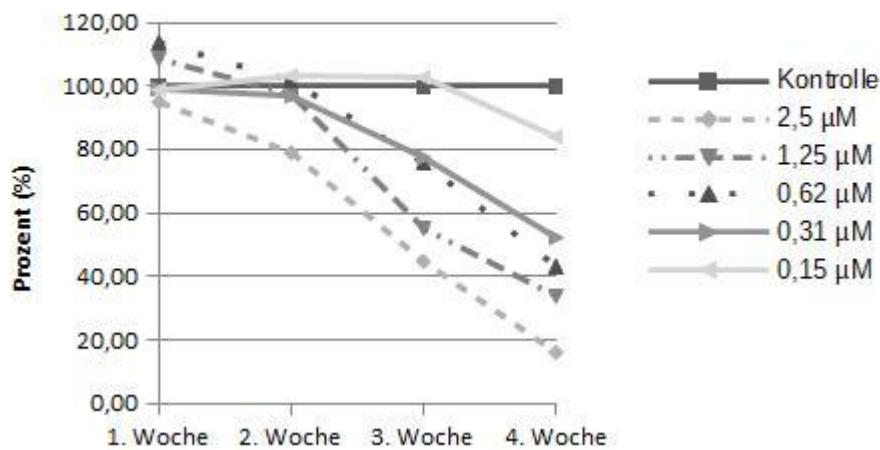
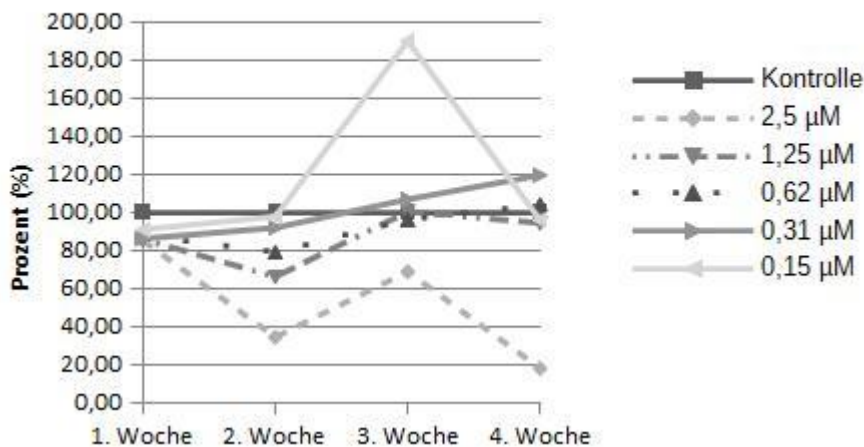


Abb. 6: Die potente Wirkung von b) Zoledronat spiegelt sich in einem steiler abfallenden Linienvverlauf als bei a) Alendronat wieder. Bei geringer Konzentration (0,62 µM; 0,31 µM und 0,15 µM) wurde unter beiden Medikamenten ein anfänglicher Proliferationsvorteil festgestellt. Letztendlich zeigte sich eine toxische Wirkung auf die Zellen.

a) MTT Osteosarkomzellen Alendronat



b) MTT Osteosarkomzellen Zoledronat

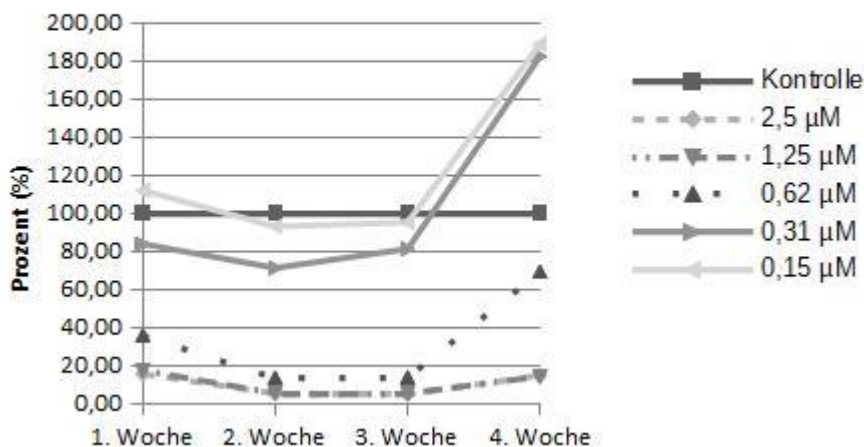


Abb. 7: Unter Bisphosphonatgabe zeigten die Osteosarkomzellen unterschiedliche Reaktionen. Bei geringer Medikamentengabe war ein Proliferationsanstieg sowohl unter a) Alendronat, als auch unter b) Zoledronat sichtbar. Unter höherer Dosierung äußerte sich eine toxische Wirkung.

3.2. Schwarz-Weiß-Fotodokumentation

Die Auswirkungen von Alendronat und Zoledronat auf die Zellvitalität der Osteoblasten, Fibroblasten und Osteosarkomzellen wurden wöchentlich anhand von Fotos mit der Digitalkamera dokumentiert. Bilder der Zellkulturen jeder Konzentration (2,5 µM; 1,25 µM; 0,62 µM; 0,31 µM; 0,15 µM) sowie der Kontrolle wurden angefertigt. Auf den folgenden Seiten ist eine Auswahl dargestellt.

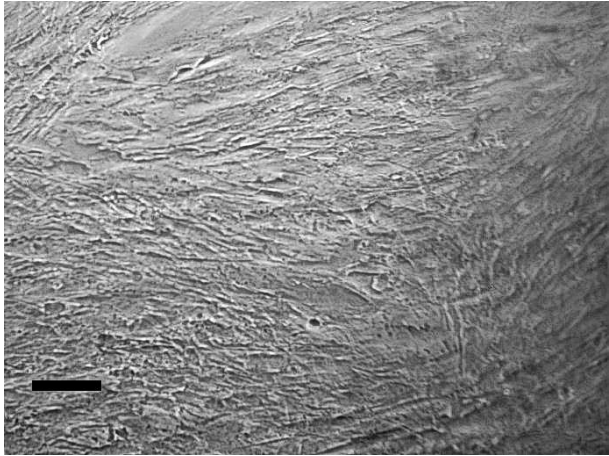
Wie bereits beim MTT-Test erwies sich Alendronat gegenüber den Zellen weniger toxisch als Zoledronat.

Abbildung 8 und 9 präsentieren diesen Effekt anhand der Osteoblasten. Es zeigte sich konzentrationsabhängig eine geringe Abnahme der Zellen nach der Gabe von Alendronat. Unter der Supplementation von Zoledronat kam es zur deutlichen Rarefizierung der Zellzahl. In der vierten Woche waren erst bei einer Konzentration von 0,125 µM wieder wenig vitale Zellen auffindbar.

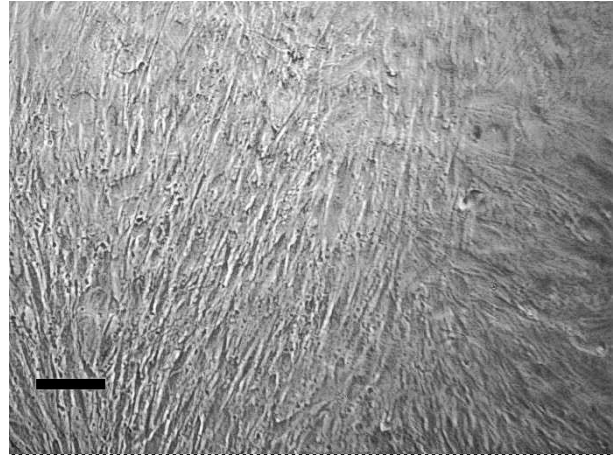
Bei den Kontrollen der Fibroblasten wurde ein reges Zellwachstum über die Wochen beobachtet. Die Verabreichung von Alendronat ließ keine Unterschiede wahrnehmen (Abb.10). Zoledronat hemmte das Zellwachstum, wie in Abbildung 11 sichtbar, nicht so ausgeprägt wie bei den Osteoblasten.

Zunächst zeigten die Osteosarkomzellen, wie in Abbildung 12 ersichtlich, ein spärliches Wachstum. Die Zugabe von Alendronat ins Nährmedium ließ bei geringer Konzentration einen dichten Zellrasen entstehen. Höhere Konzentrationen wirkten hingegen entgegengesetzt.

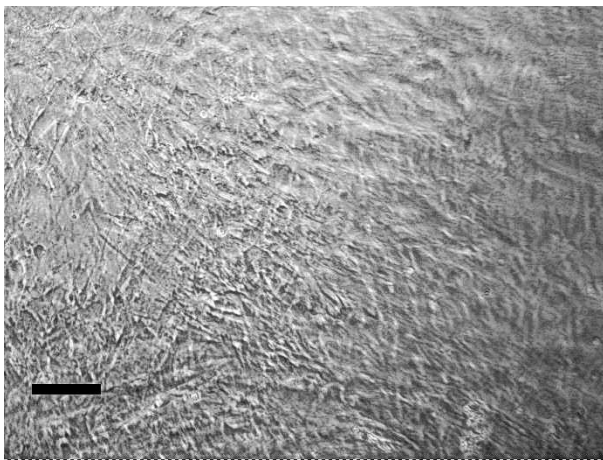
Ähnlich, wenn auch deutlich ausgeprägter, war der Effekt von Zoledronat (Abb. 13). Morphologische Veränderungen aller Zellen wurden durch Zoledronat hervorgerufen. Außerdem wurden durch den Zusatz von Alendronat Unterschiede bei den Osteosarkomzellen ersichtlich.



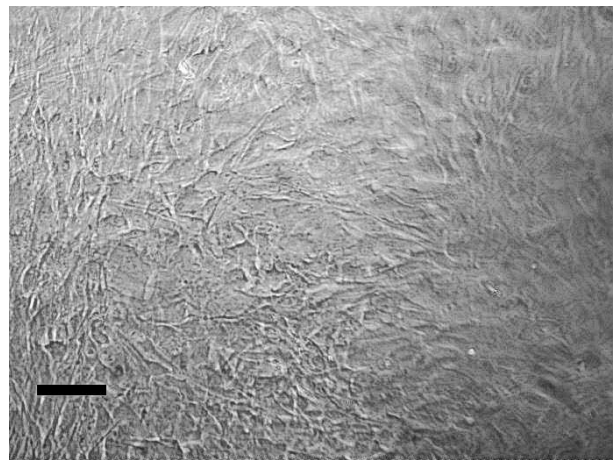
a) Kontrolle 1. Woche



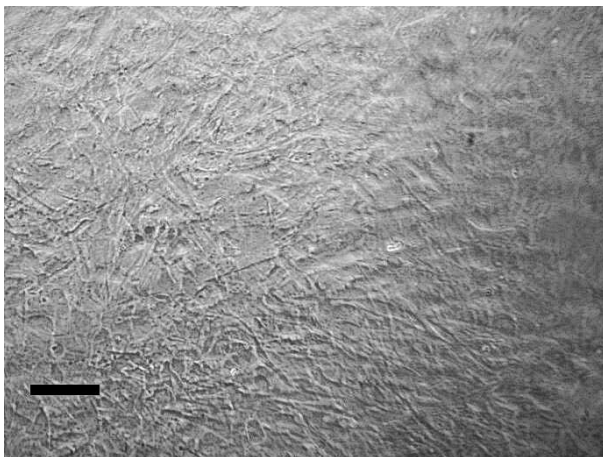
b) Alendronat 2,5 µM 1. Woche



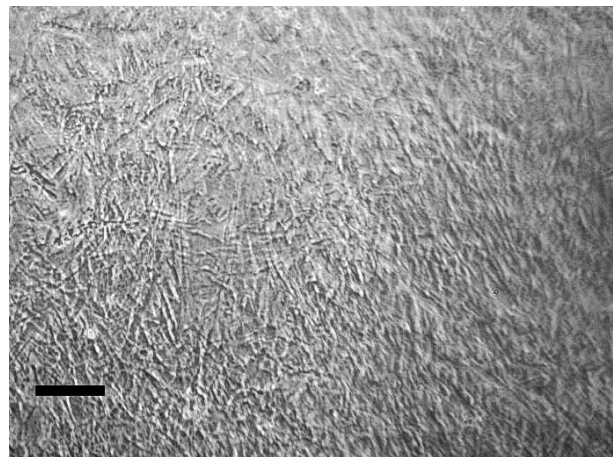
c) Kontrolle 4. Woche



d) Alendronat 2,5 µM 4. Woche



e) Alendronat 1,25 µM 4. Woche

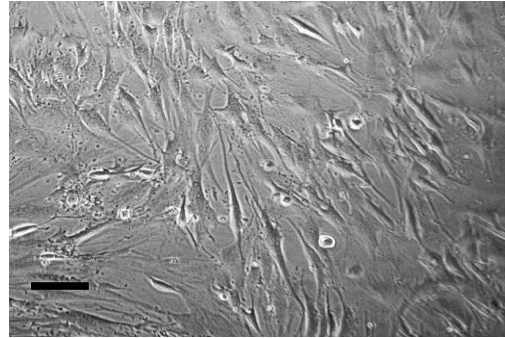


f) Alendronat 0,62 µM 4. Woche

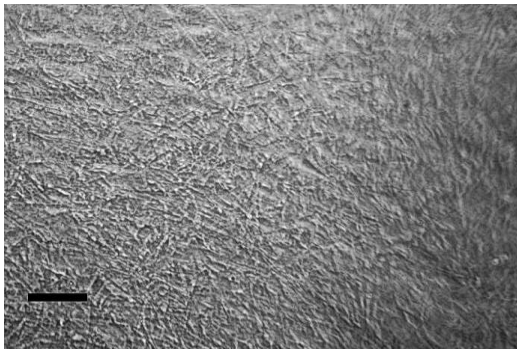
Abb. 8: Unter Alendronatgabe zeigten die Osteoblasten, in Abhängigkeit von der Konzentration, eine Abnahme der Zellzahl. Ab Bild f war kein Unterschied zur Kontrolle mehr wahrnehmbar. Maßstab: Balken = 100 µm.



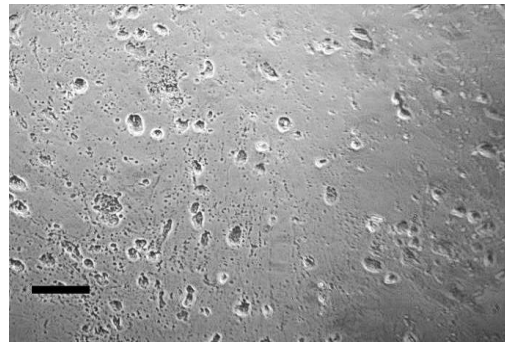
a) Kontrolle 1. Woche



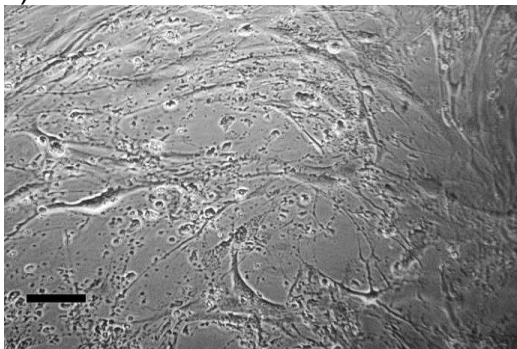
b) Zoledronat 2,5 µM 1. Woche



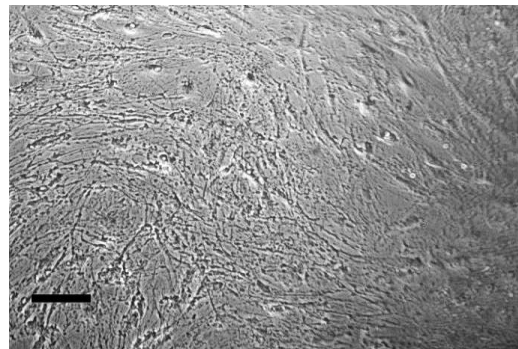
c) Kontrolle 4. Woche



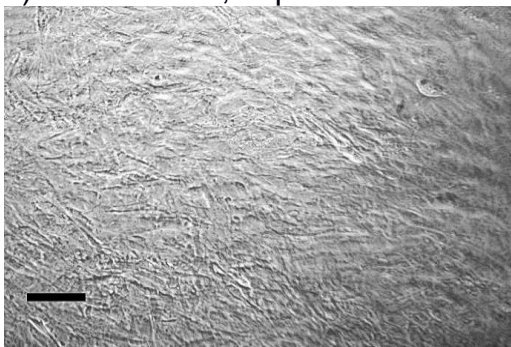
d) Zoledronat 2,5 µM 4. Woche.



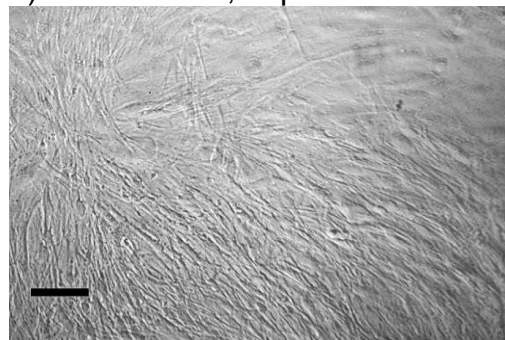
e) Zoledronat 1,25 µM 4. Woche



f) Zoledronat 0,62 µM 4. Woche

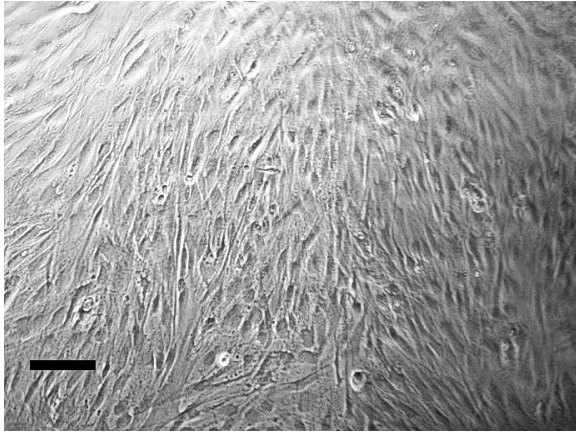


g) Zoledronat 0,31 µM 4. Woche

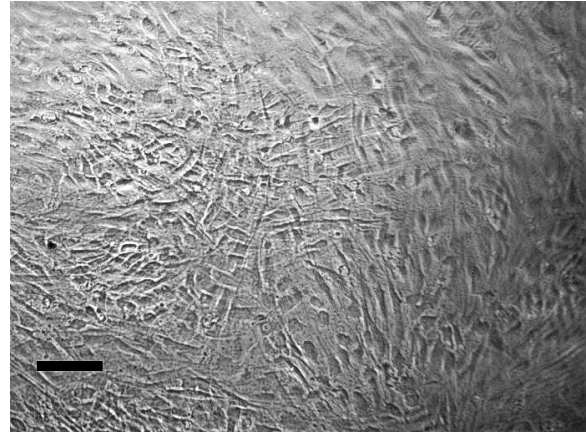


h) Zoledronat 0,15 µM 4. Woche

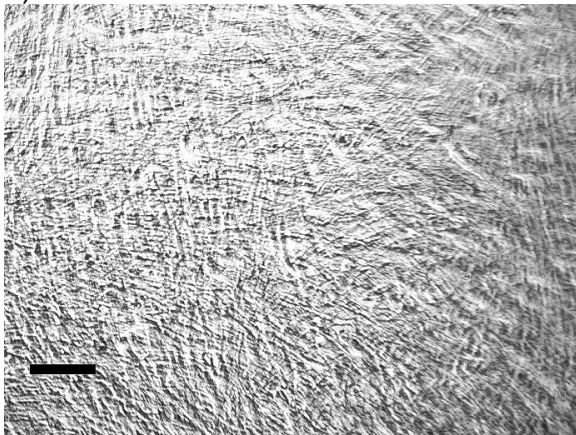
Abb. 9: Zoledronat reduzierte die Anzahl vitaler Osteoblasten deutlich. Bei geringerer Konzentration waren vitale Zellen detektabel, die Anzahl aber weiterhin verringert. Maßstab: Balken = 100 µm.



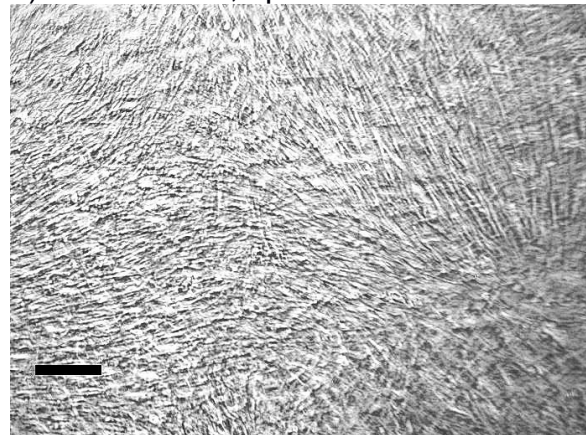
a) Kontrolle 1. Woche



b) Alendronat 2,5 µM 1. Woche

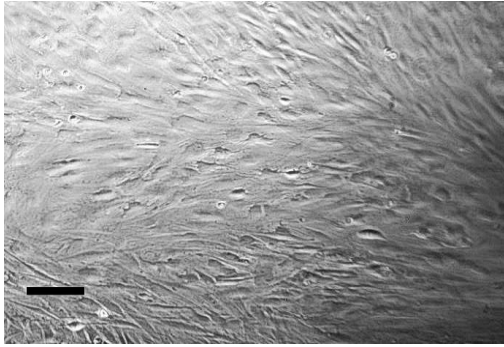


c) Kontrolle 4. Woche

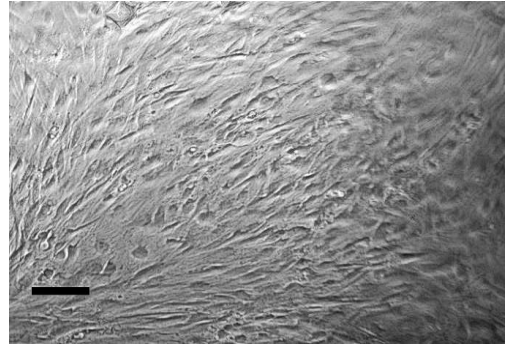


d) Alendronat 2,5 µM 4. Woche

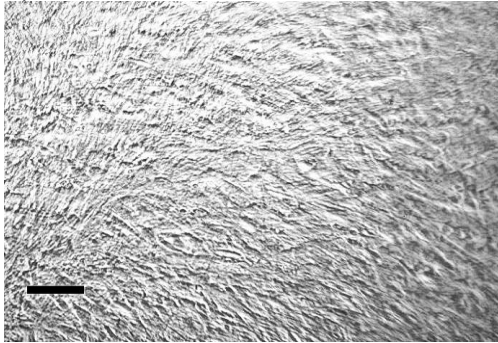
Abb. 10: Die Darstellung der Fibroblasten unter Alendronat zeigt keine Unterschiede zur Kontrolle. Maßstab: Balken = 100 µm.



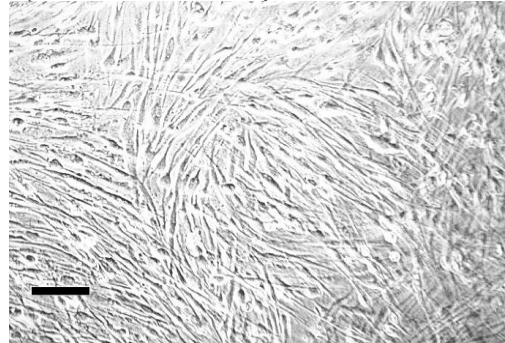
a) Kontrolle 1. Woche



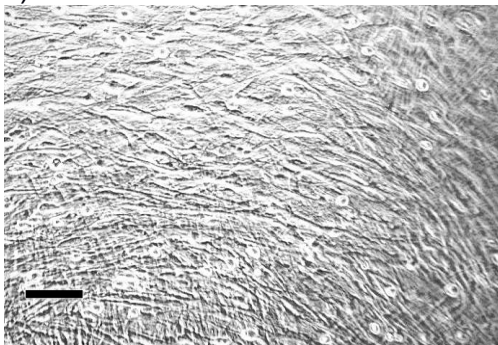
b) Zoledronat 2,5 μM 1. Woche



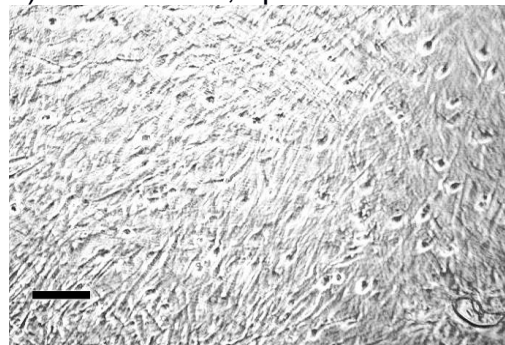
c) Kontrolle 4. Woche



d) Zoledronat 2,5 μM 4. Woche



e) Zoledronat 1,25 μM 4. Woche



f) Zoledronat 0,62 μM 4. Woche

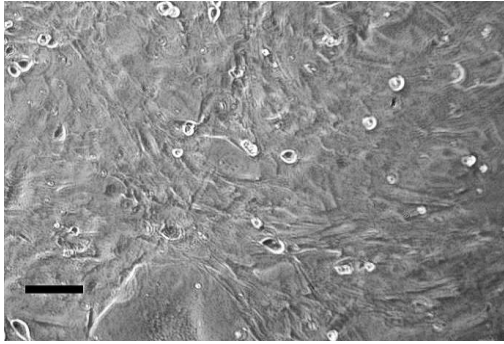


g) Zoledronat 0,31 μM 4. Woche

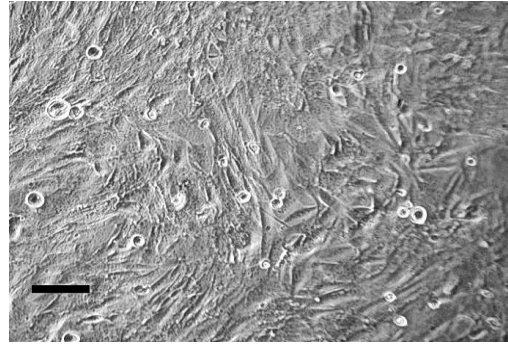


h) Zoledronat 0,15 μM 4. Woche

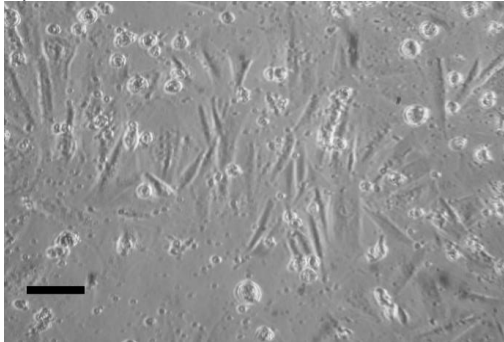
Abb. 11: In Abhängigkeit der Konzentration von Zoledronat ist eine Abnahme der Zelldichte der Fibroblasten erkennbar. Maßstab: Balken = 100 μm.



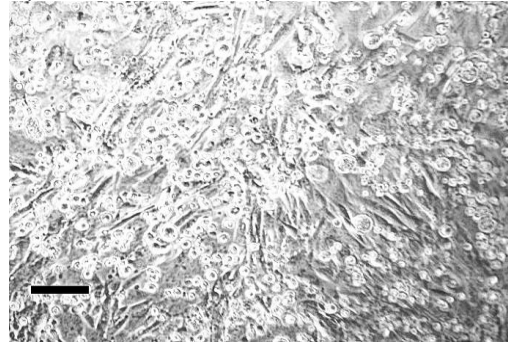
a) Kontrolle 1. Woche



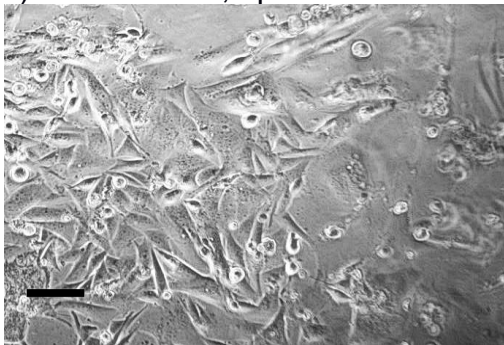
b) Alendronat 2,5 µM 1. Woche



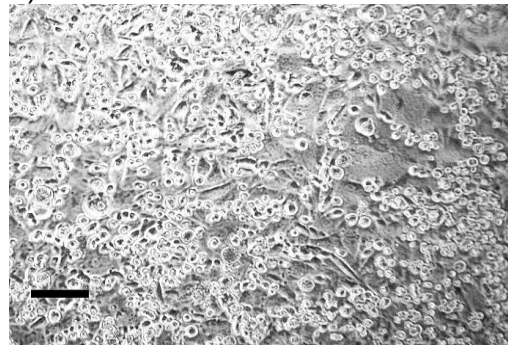
c) Alendronat 2,5 µM 2. Woche



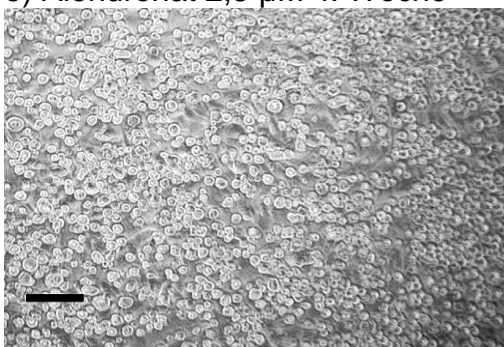
d) Kontrolle 4. Woche



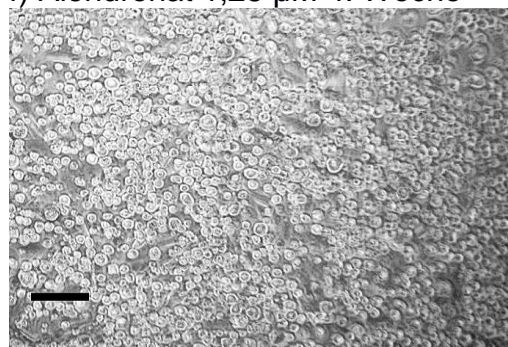
e) Alendronat 2,5 µM 4. Woche



f) Alendronat 1,25 µM 4. Woche

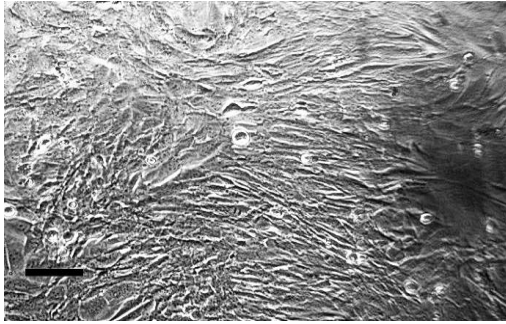


g) Alendronat 0,31 µM 4. Woche

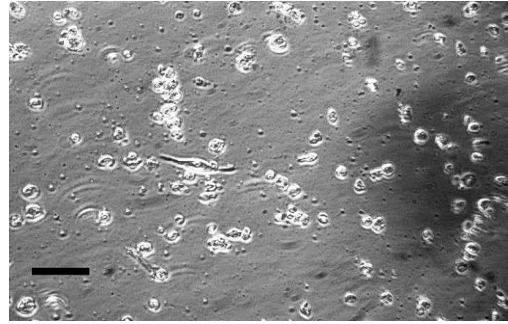


h) Alendronat 0,15 µM 4. Woche

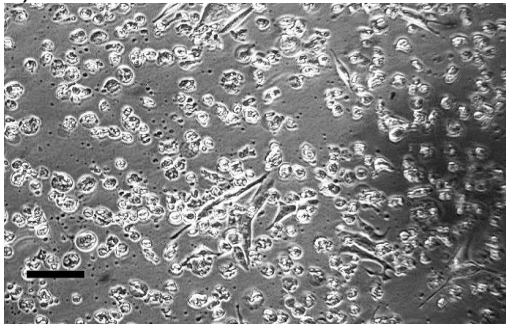
Abb. 12: Osteosarkomzellen wuchsen zunächst spärlich. Ab der zweiten Woche zeigt f die toxische Wirkung bei hoher Alendronatkonzentration. Im Gegensatz dazu proliferierten die Zellen bei geringer Gabe. Maßstab: Balken = 100 µm.



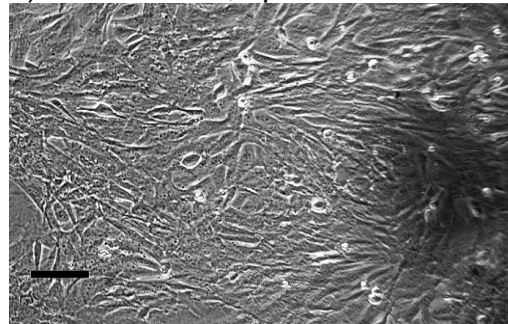
a) Kontrolle 1. Woche



b) Zoledronat 2,5 µM 1. Woche



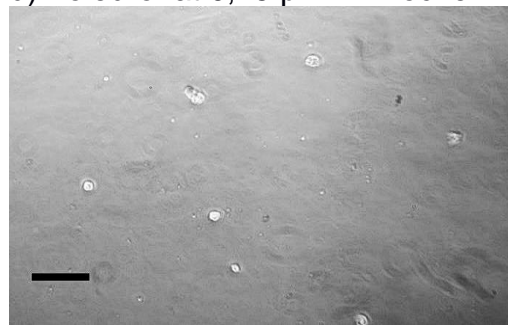
c) Zoledronat 0,62 µM 1. Woche



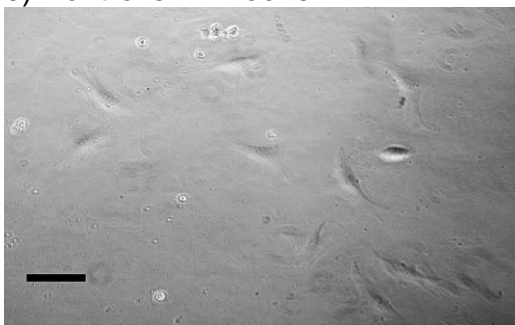
d) Zoledronat 0,15 µM 1. Woche



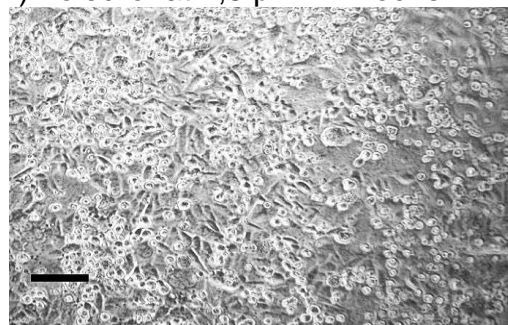
e) Kontrolle 4. Woche



f) Zoledronat 2,5 µM 4. Woche



g) Zoledronat 0,62 µM 4. Woche



h) Zoledronat 0,15 µM 4. Woche

Abb. 13: Bereits ab der ersten Woche konnten unter Zoledronat bei 2,5 µM nur noch Zelltrümmer der Osteosarkomzellen abgelichtet werden. Vereinzelt vitale Zellen waren ab einer Konzentration von 0,62 µM in der 1. Woche sichtbar. In der 4. Woche war bei einer Konzentration von 0,15 µM ein Zellzuwachs ersichtlich. Maßstab: Balken = 100 µm.

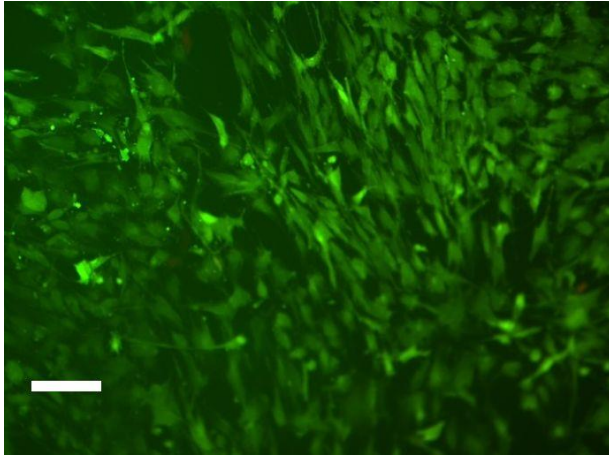
3.3. FDA-Färbung

Die ebenfalls wöchentlich durchgeführte FDA-Färbung ermöglichte eine Unterscheidung von vitalen und toten Zellen im Fluoreszenzmikroskop. Die lebenden Zellen, bei denen noch Stoffwechselaktivität vorhanden war, erschienen grün, die avitalen Zellen rot.

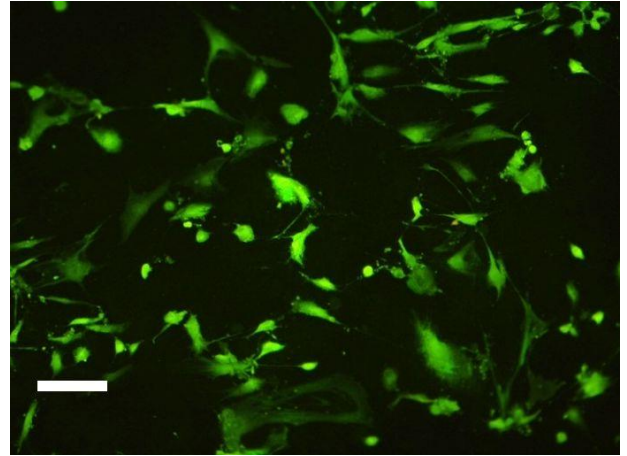
Im Vergleich zu Alendronat bestätigte sich erneut die toxischere Wirkung von Zoledronat gegenüber allen Zellreihen.

Die Gabe von Alendronat zu den Osteoblasten spiegelt sich diskret in vereinzelt inaktiven Zellen bei hoher Konzentration wieder (Abb. 14). So lassen sich unter dem grünen Zellrasen einzelne rote, avitale Zellen erkennen. Zudem unterscheiden sich vitale Zellen morphologisch von avitalen Zellen. Lebende Zellen erscheinen langgestreckt und haften am Boden, tote Zellen hingegen verlieren den Kontakt und erscheinen dadurch abgerundet. Die Abbildung 15 hingegen verdeutlicht die potente Wirkung Zoledronats. Im Vergleich zur 1. Woche sind die Unterschiede in der 4. Woche weniger deutlich ausgeprägt. Es sind jedoch auch hier im Vergleich mehr abgekugelte und somit tote Zellen unter Zoledronat sichtbar als bei der Kontrolle. Abbildung 16 und 17 lassen bei den Fibroblasten nach Bisphosphonatgabe nur geringe Unterschiede zur Kontrolle erkennen, doch auch hier zeigt sich Zoledronat potenter als Alendronat.

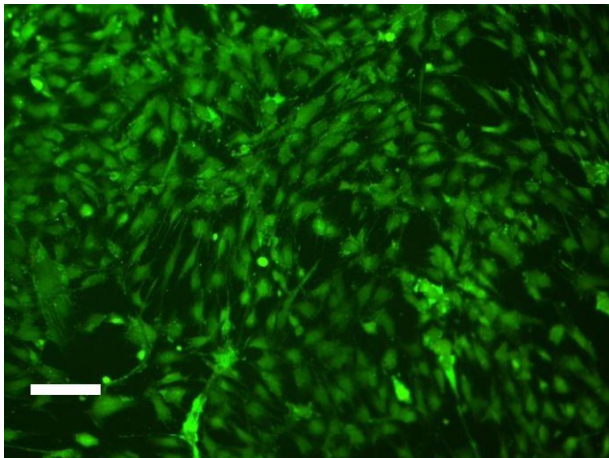
Sowohl nach Zusatz von Alendronat als auch von Zoledronat waren Zellproliferation und –überleben der Osteosarkomzellen zunächst stark herabgesetzt. Zum Ende der Versuchsreihe kam es zu einem Erholungseffekt. Sichtbar sind die Ergebnisse in den Abbildungen 18 und 19.



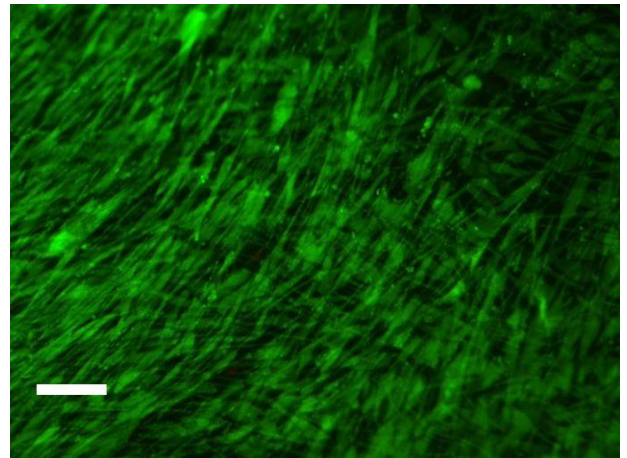
a) Kontrolle 1. Woche



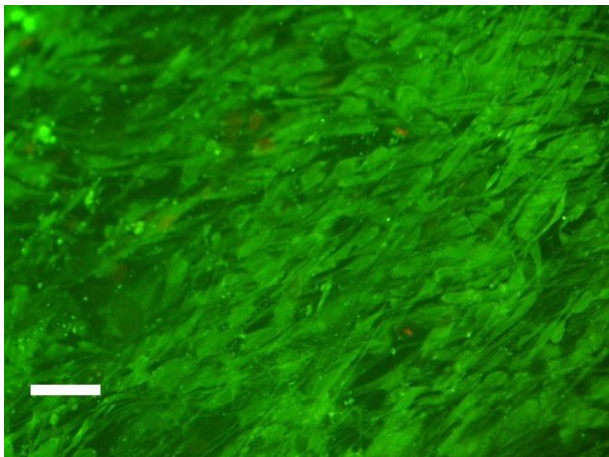
b) Alendronat 2,5 µM 1. Woche



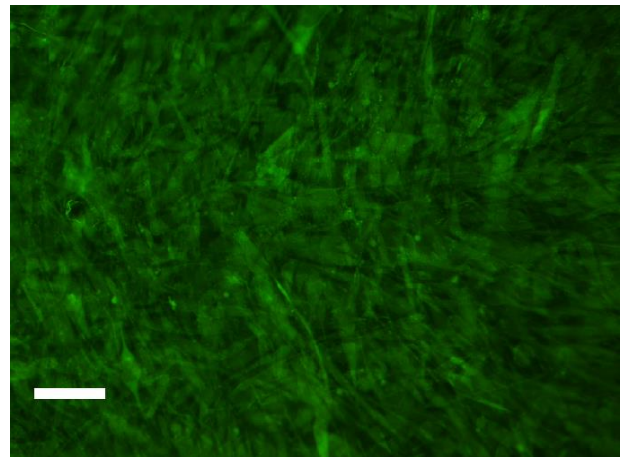
c) Alendronat 0,62 µM 1. Woche



d) Kontrolle 4. Woche

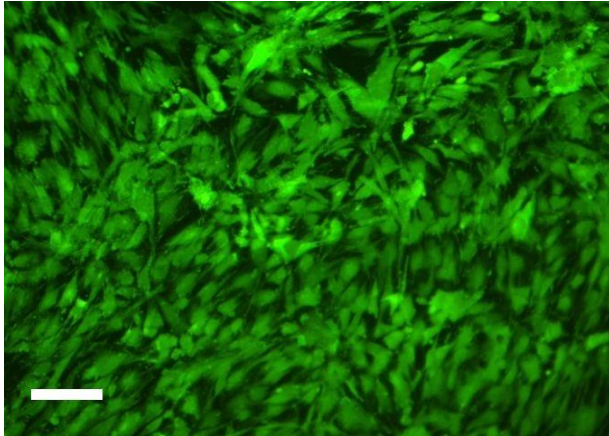


e) Alendronat 2,5 µM 4. Woche

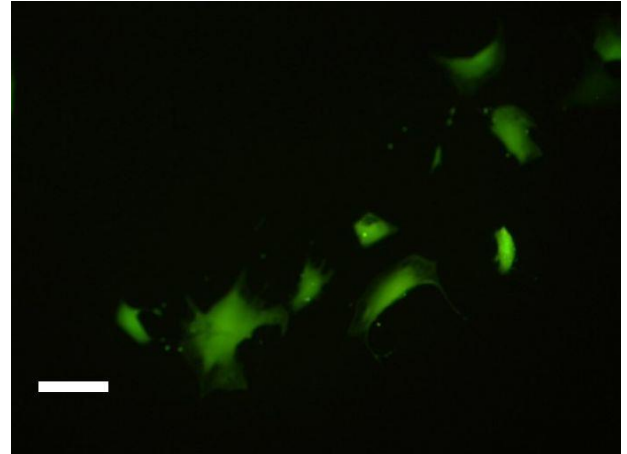


f) Alendronat 0,62 µM 4. Woche

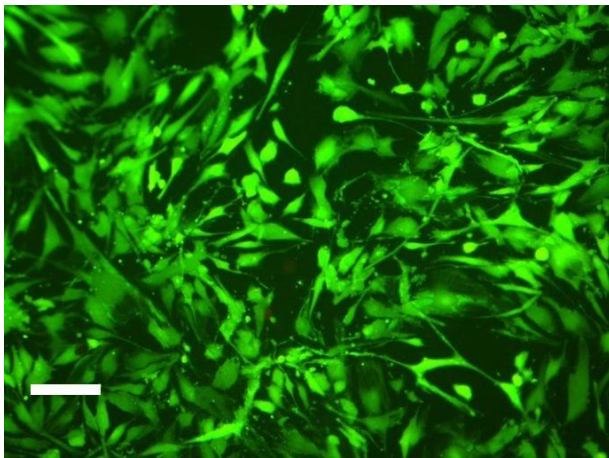
Abb. 14: Alendronat entfaltet seinen hemmenden Effekt auf die Osteoblasten bereits zu Beginn. In den folgenden Wochen wurde dies durch rot leuchtende, stoffwechsellinaktive Zellen sichtbar. Maßstab: Balken = 100 µm.



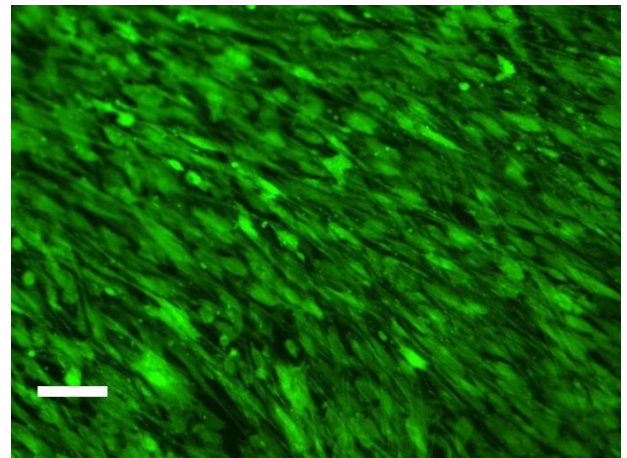
a) Kontrolle 1. Woche



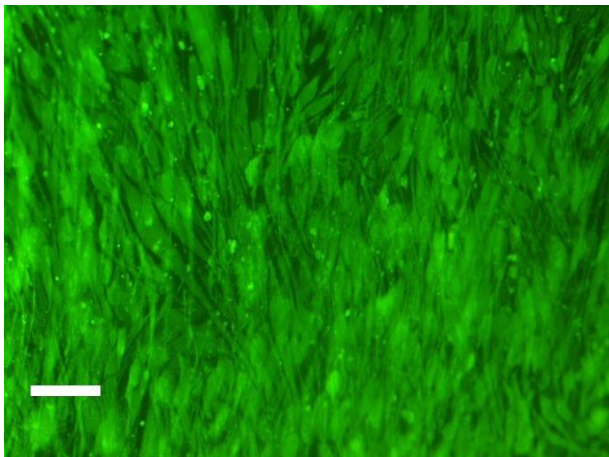
b) Zoledronat 2,5 µM 1. Woche



c) Zoledronat 0,62 µM 1. Woche

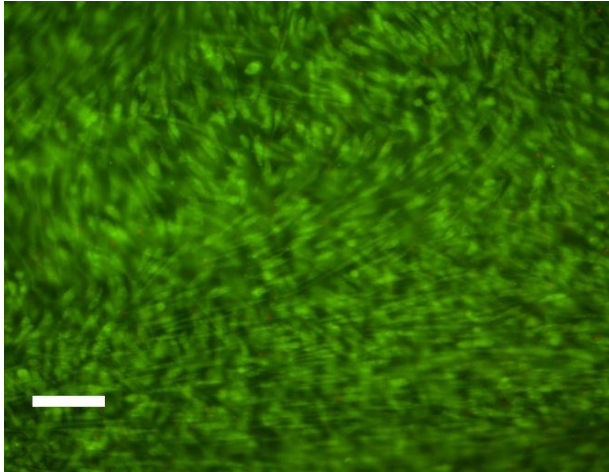


d) Kontrolle 4. Woche

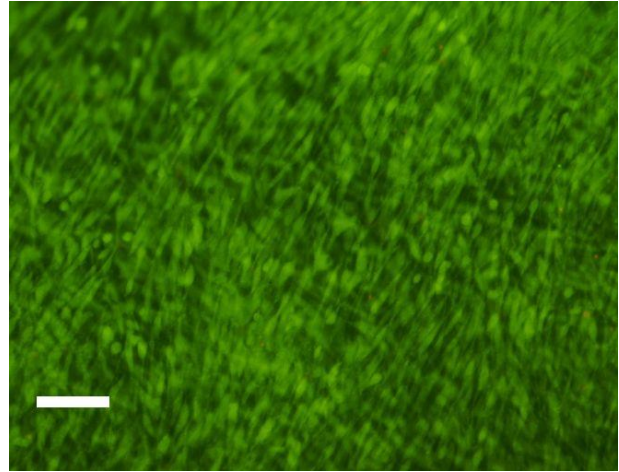


e) Zoledronat 1,25 µM 4. Woche

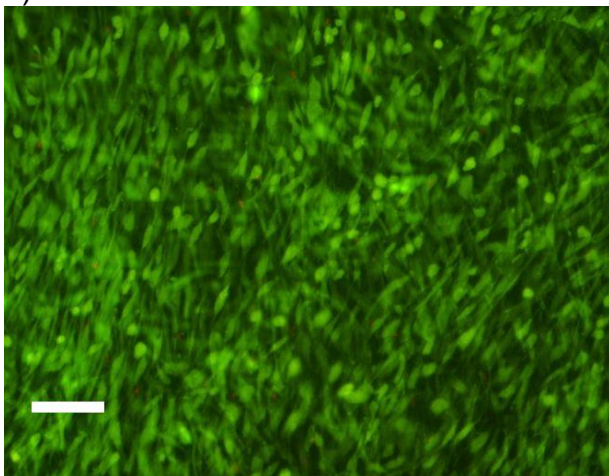
Abb. 15: Deutlich zeigt sich die toxische Wirkung Zoledronats gegenüber den Osteoblasten. Im Vergleich zur Kontrolle präsentieren sich unter Zoledronat konzentrationsabhängig avitale Zellen. Maßstab: Balken = 100 µm.



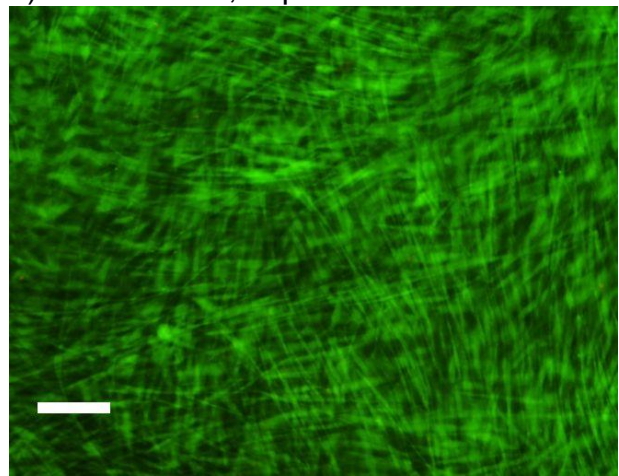
a) Kontrolle 3. Woche



b) Alendronat 1,25 µM 3. Woche

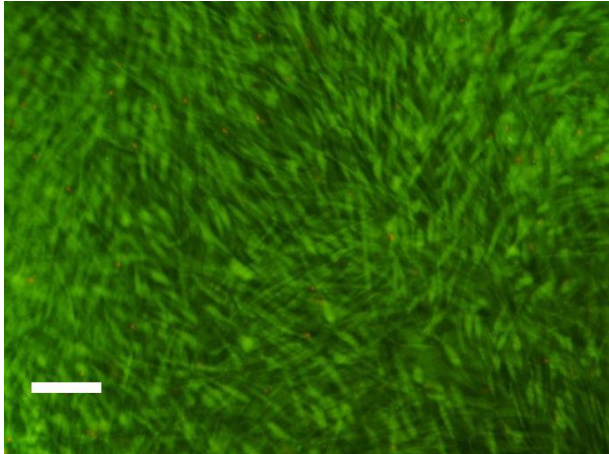


c) Kontrolle 4. Woche

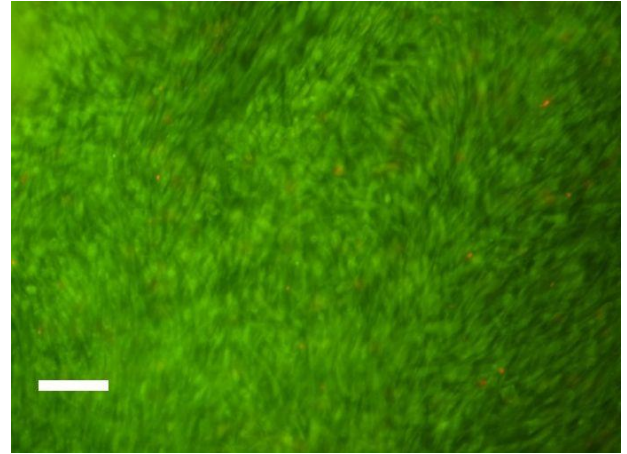


d) Alendronat 2,5 µM 4. Woche

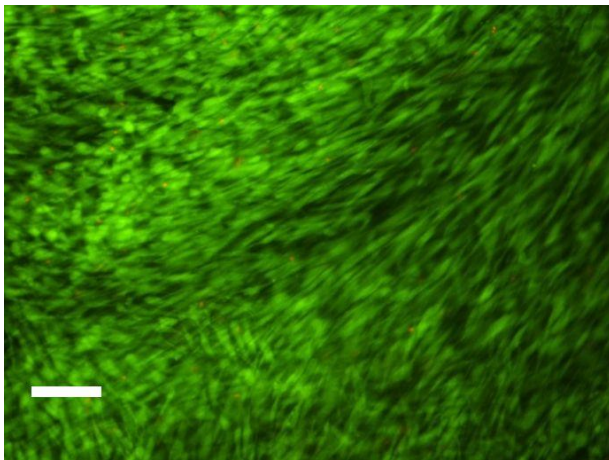
Abb. 16: Die Darstellung der Fibroblasten unter Alendronat gleicht der Kontrolle.
Maßstab: Balken = 100 µm.



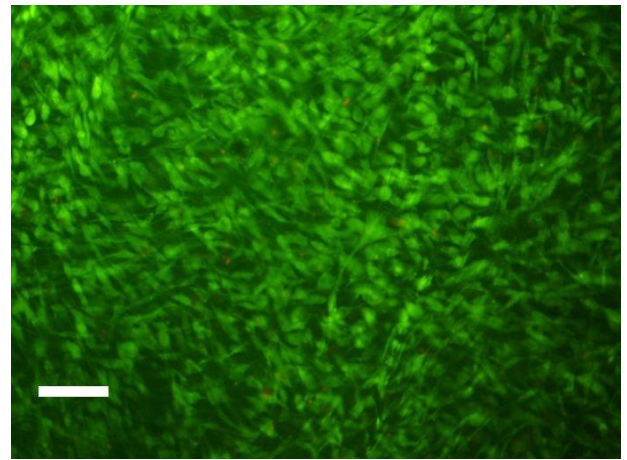
a) Kontrolle 3. Woche



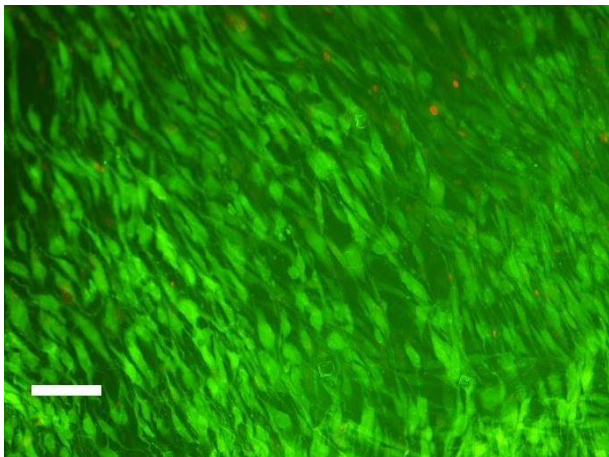
b) Zoledronat 2,5 µM 3. Woche



c) Kontrolle 4. Woche

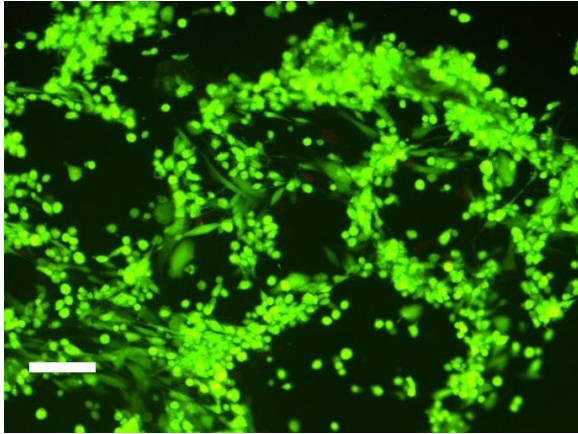


d) Zoledronat 2,5 µM 4. Woche

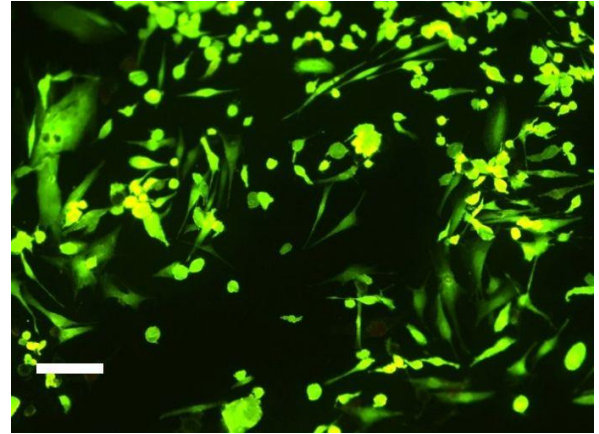


e) Zoledronat 0,31 µM 4. Woche

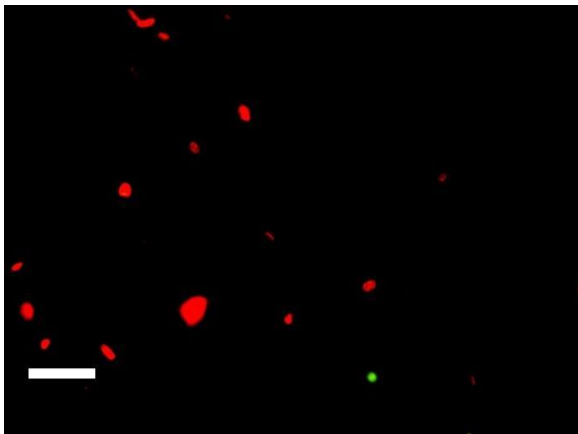
Abb. 17: Anhand der Fibroblasten zeigt sich erneut die stärkere Wirkung von Zoledronat durch vermehrt sichtbare leblose Zellen. Ab der vierten Woche verringerte sich die Zellproliferation. Maßstab: Balken = 100 µm.



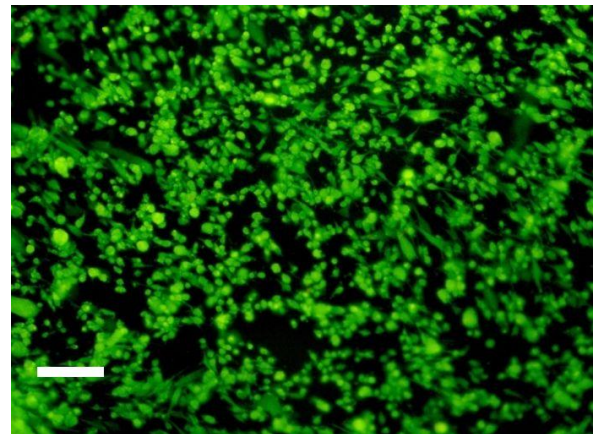
a) Kontrolle 1. Woche



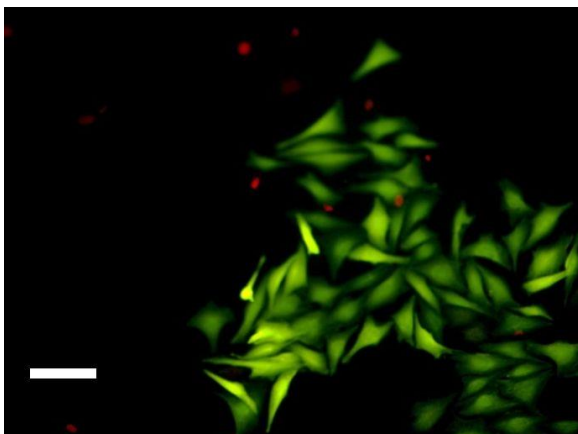
b) Alendronat 2,5 µM 1. Woche



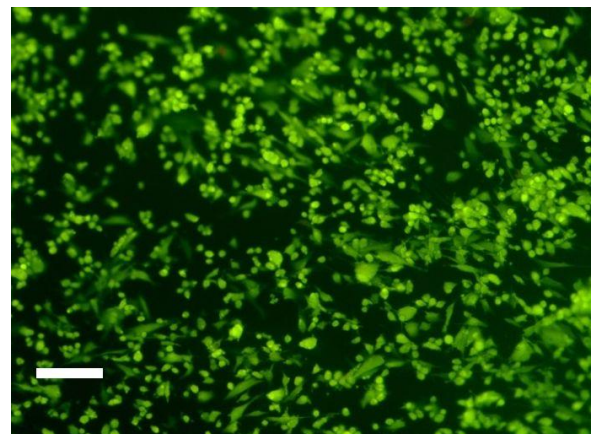
c) Alendronat 2,5 µM 2. Woche



d) Kontrolle 4. Woche

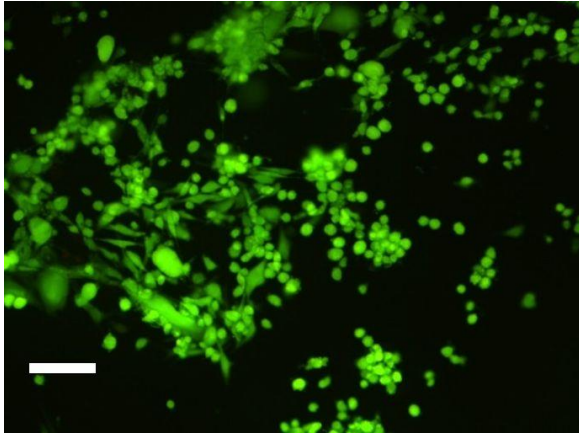


e) Alendronat 2,5 µM 4. Woche

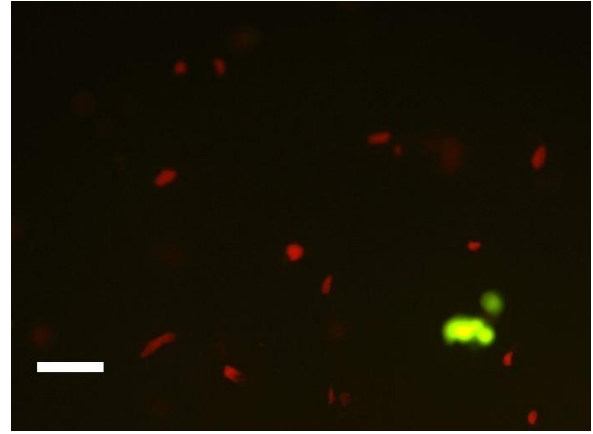


f) Alendronat 1,25 µM 4. Woche

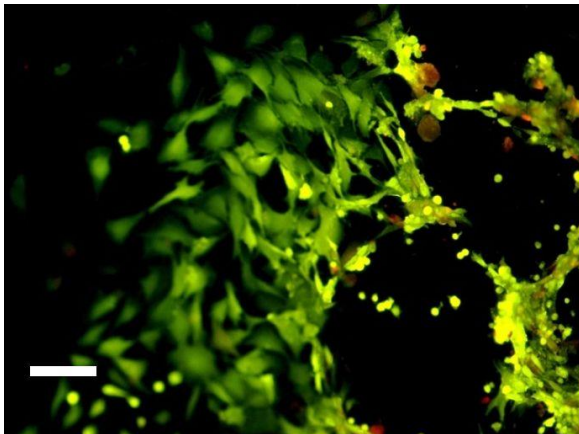
Abb. 18: Im Vergleich zur Kontrolle, ist die Anzahl der Osteosarkomzellen unter Alendronat bereits in der ersten Woche unverkennbar reduziert. In der zweiten Woche ist die Toxizität noch ausgeprägter sichtbar. Gegen Ende der Versuchsreihe kommt es zu einer gewissen Erholung. Maßstab: Balken = 100 µm.



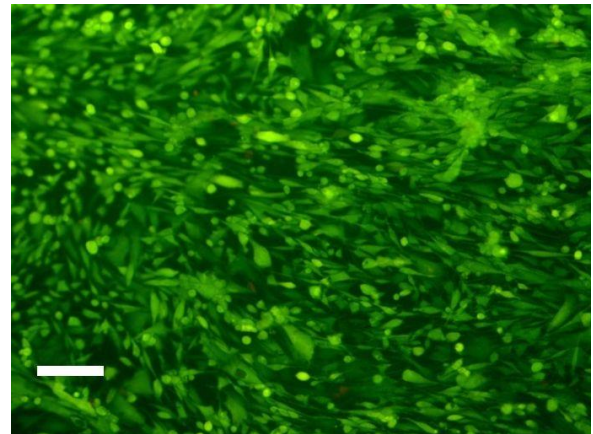
a) Kontrolle 1. Woche



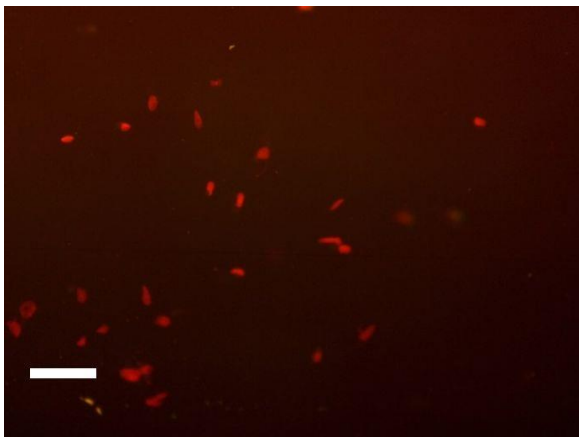
b) Zoledronat 2,5 µM 1. Woche



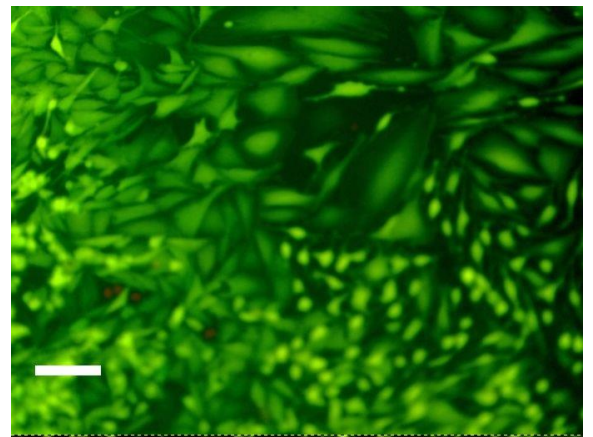
c) Zoledronat 0,62 µM 2. Woche



d) Kontrolle 4. Woche



e) Zoledronat 2,5 µM 4. Woche



f) Zoledronat 0,62 µM 4. Woche

Abb. 19: Die Auswirkungen von Zoledronat auf die Osteosarkomzellen präsentieren sich wie folgt: In Abhängigkeit von der Konzentration sind bei b keine, ab c wenige vitale Zellen sichtbar. Ab der vierten Woche kam es bei geringer Konzentration zur Zellproliferation. Maßstab: Balken = 100 µm.

3.4. Nachweis inflammatorischer Marker

Die Auswertung der Daten der PCR-Analyse erfolgte wöchentlich. Von der Kontrolle und jeder Konzentration wurde eine Analyse mit insgesamt drei Wiederholungen durchgeführt. Um eine Auswertung möglich zu machen, musste die relative Expression einen Schwellenwert erreichen. Daher lagen nicht für jede Zellreihe und jedes Zytokin Daten vor. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse sind im Folgenden einige Streudiagramme dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden zusätzlich Liniendiagramme abgebildet, die den Verlauf der Mittelwerte über die 4 Wochen zeigen. Die Tabellen der Daten der PCR-Analyse sind im Anhang beigefügt.

Die Daten der Interleukine 1 β , 4, und 10 waren meist breit gestreut, ohne eine klare Richtung erkennen zu lassen.

Die Zugabe von Alendronat führte weder bei den Osteoblasten noch bei den Fibroblasten zur vermehrten Ausschüttung der Zytokine. Wie die Abbildungen 24, 25 sowie 27 zeigen, war die Wirkung auf die Osteosarkomzellen anders. Es kam bei hoher Medikamentenkonzentration zur größeren Ausbeute von Tumornekrosefaktor alpha, Interleukin 6 und 12.

Alle Zellreihen reagierten auf die Zoledronatsubstitution mit erhöhter relativer Expression von Interleukin 6. Im Vergleich zur Kontrolle konnten sowohl bei den Osteoblasten als auch den Fibroblasten eine vermehrte Expression gemessen werden, die bei den Osteosarkomzellen sogar noch höhere Werte erreichte (Abb. 20, 23, 26). Abbildung 21 präsentiert bei den Osteoblasten einen Anstieg von Interleukin 12 nach hoher Medikamentengabe.

Die Fibroblasten reagierten auf Zoledronat (2,5 μ M) anhand einer massiven Interleukin-1 β Vermehrung in der vierten Woche, die sich in der Abbildung 22 widerspiegelt.

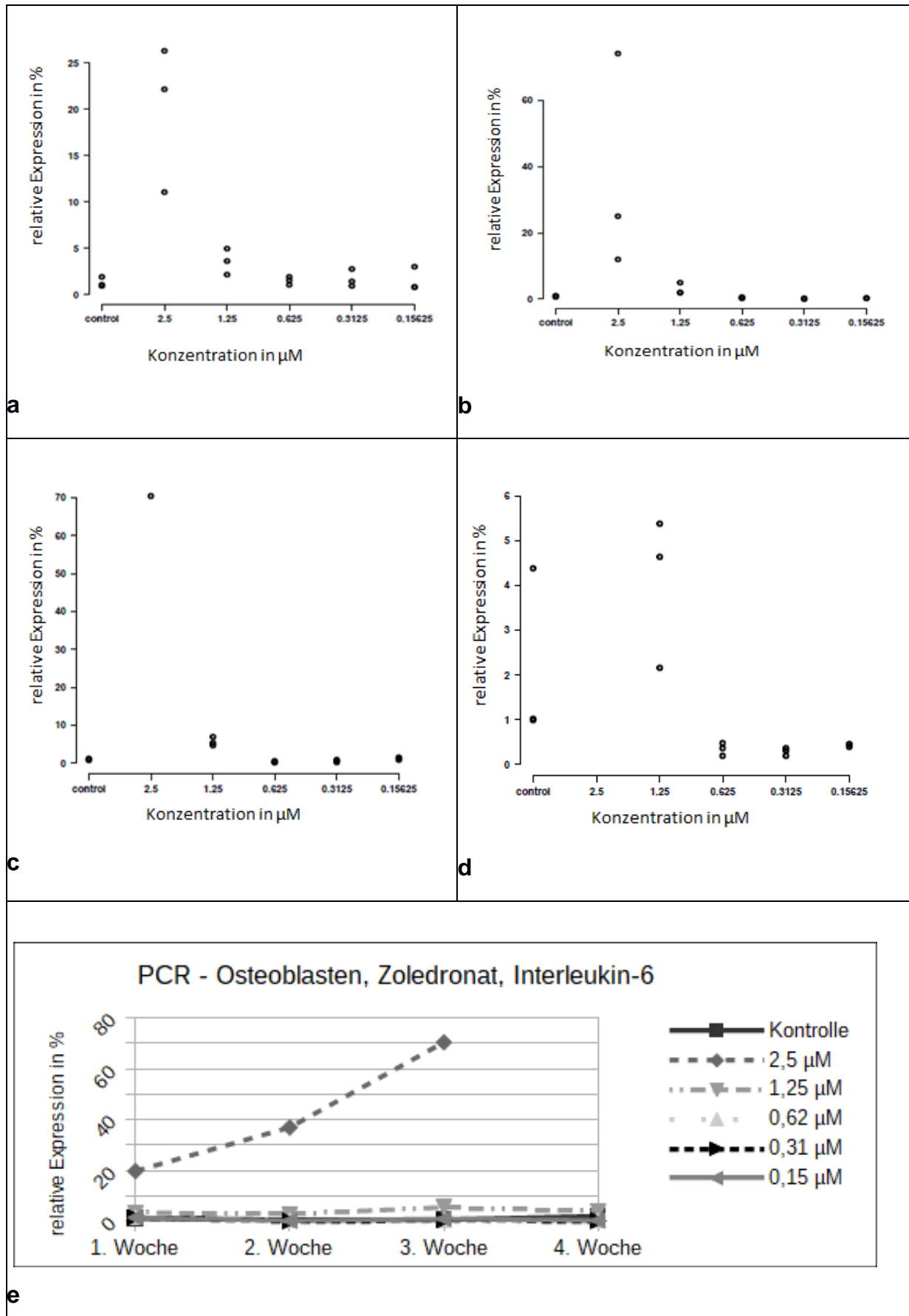


Abb. 20: Die relative Expression von Interleukin 6 bei den Osteoblasten stieg unter 2,5 μ M Zoledronat auf das bis zu 70-fache an. In der vierten Woche lagen jedoch keine Daten vor. a) 1. Woche b) 2. Woche c) 3. Woche d) 4. Woche e) Liniendiagramm anhand der Mittelwerte.

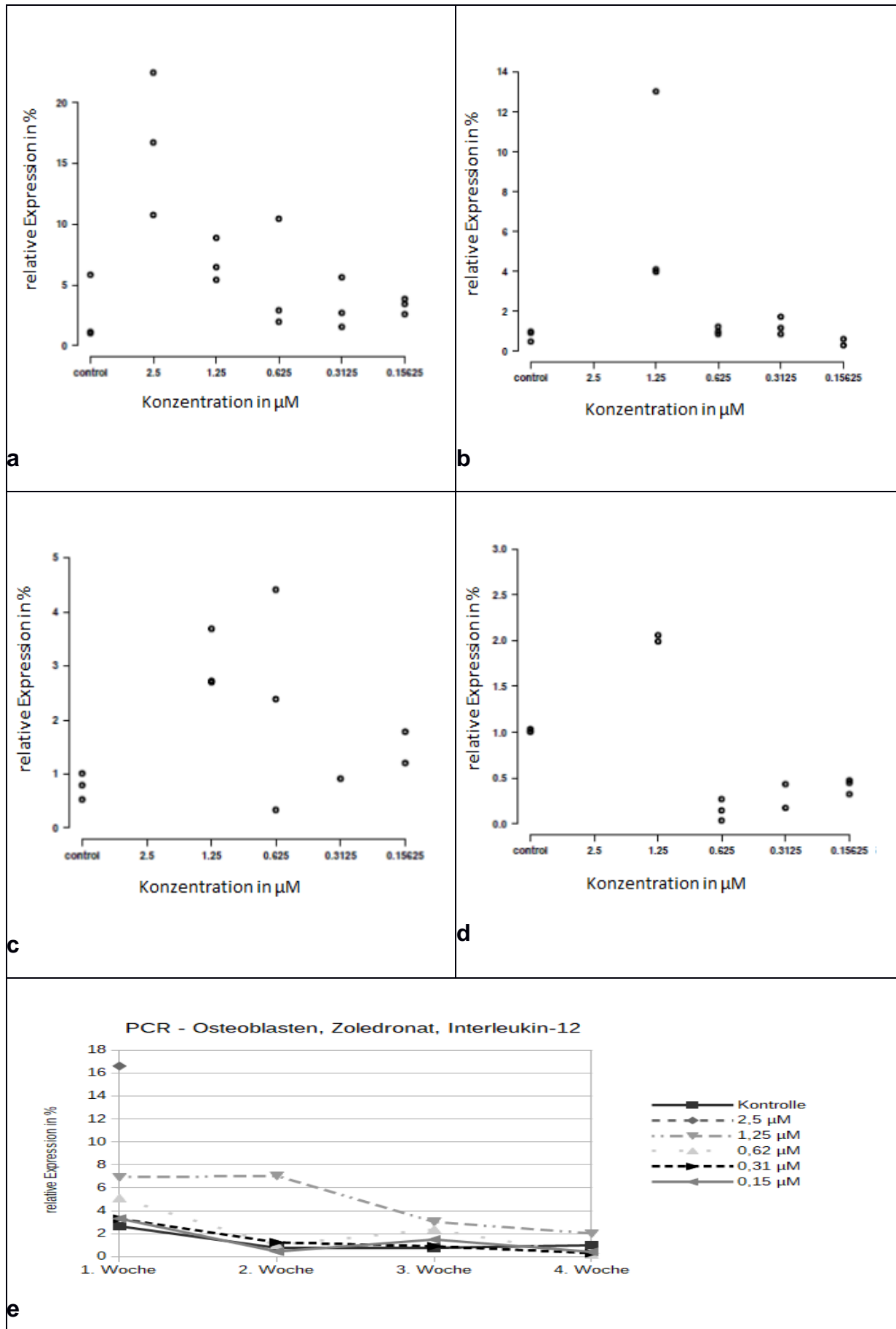


Abb. 21: Eine anfängliche erhöhte Ausbeute von Interleukin 12 bei einer Zoledronatgabe von 2,5 μM ließ sich aufgrund fehlender Daten nicht bestätigen. Allerdings zeigten die Osteoblasten auch bei geringerer Konzentration diskret steigende Werte. a) 1. Woche b) 2. Woche c) 3. Woche d) 4. Woche e) Liniendiagramm anhand der Mittelwerte.

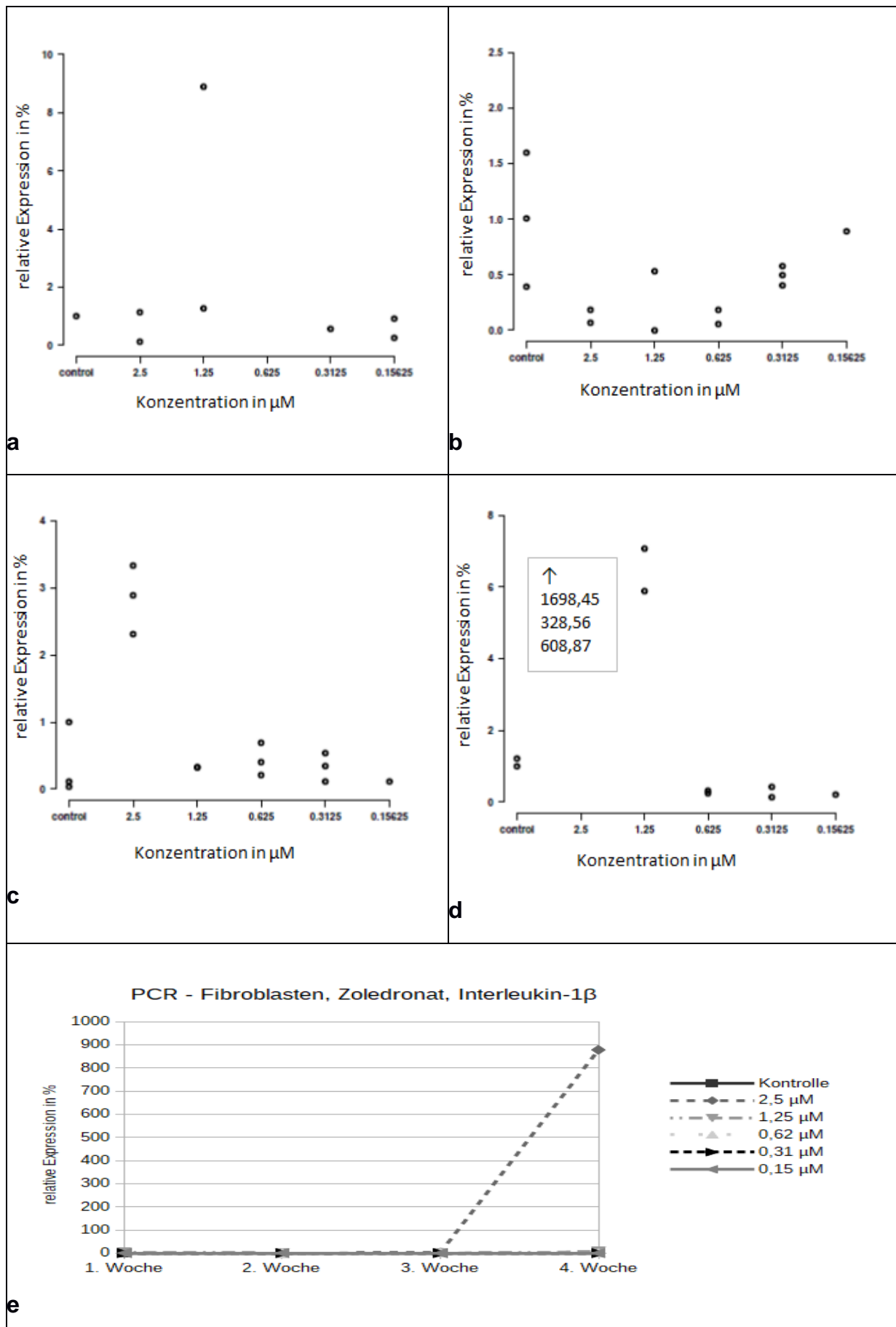


Abb. 22: Eine sprunghafte Zunahme von Interleukin-1 β zeigten die Fibroblasten unter dem Einfluss von Zoledronat in der vierten Woche bei einer Konzentration von 2,5 μ M. a) 1. Woche b) 2. Woche c) 3. Woche d) 4. Woche e) Liniendiagramm anhand der Mittelwerte.

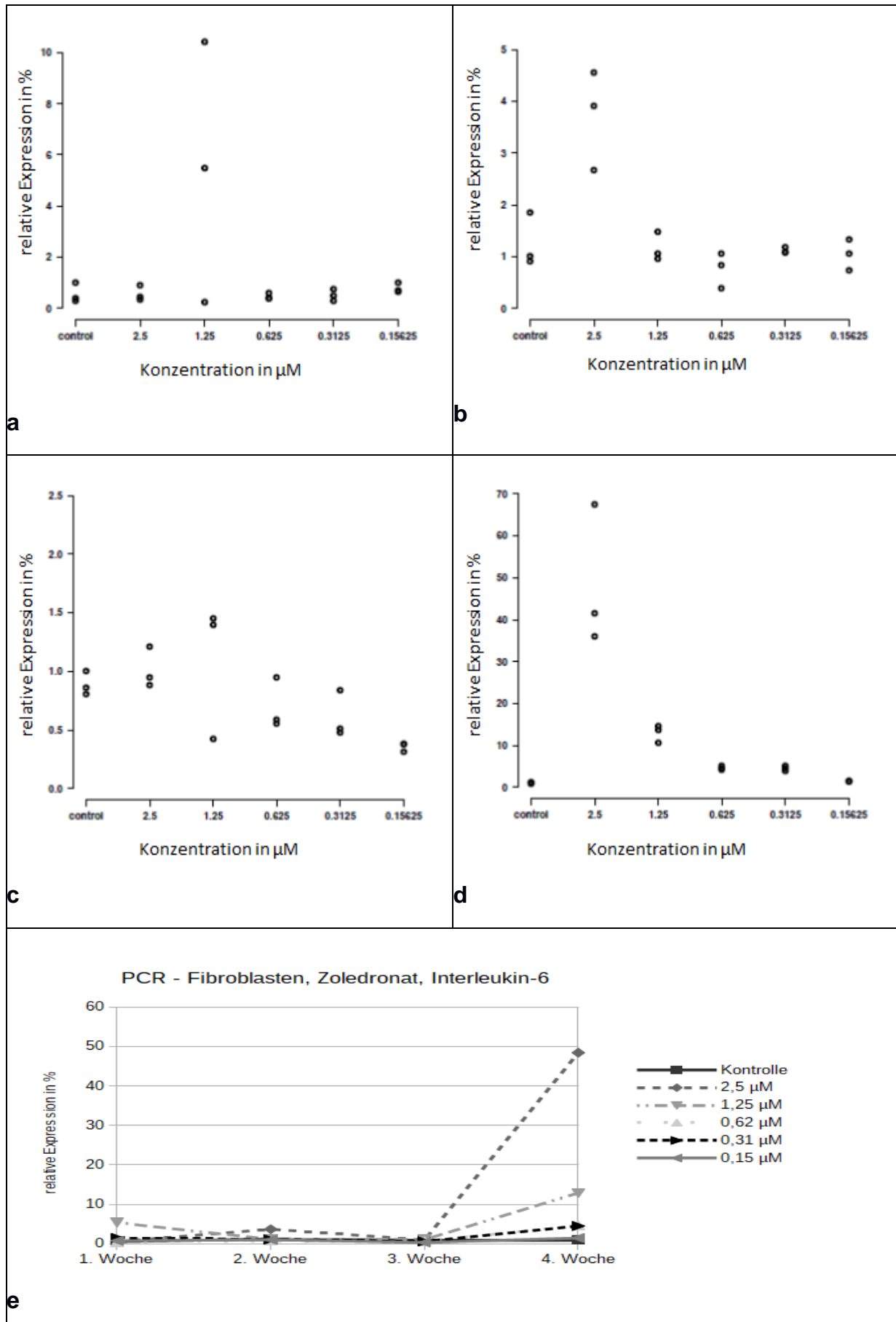


Abb. 23: Die Darstellung der relativen Expression von Interleukin 6 bei den Fibroblasten unter Zoledronat zeigt gewisse Parallelen zu der der Osteoblasten. So kommt es bei hoher Konzentration im Verlauf der Wochen zu einem Anstieg der relativen Zytokinexpression. a) 1. Woche b) 2. Woche c) 3. Woche d) 4. Woche e) Liniendiagramm anhand der Mittelwerte.

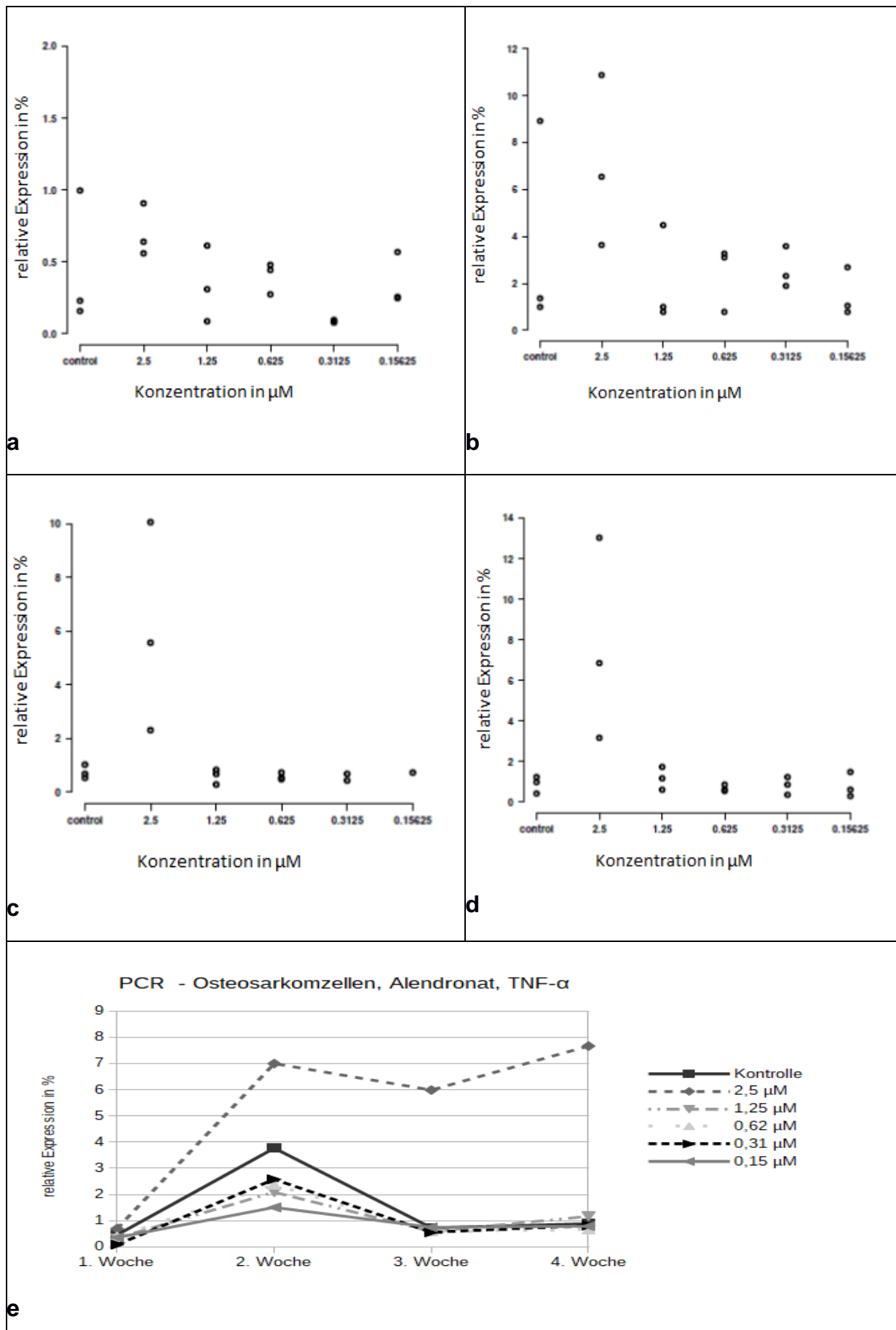


Abb. 24: Bei einer Konzentration von 2,5 μM zeigte sich über die vier Wochen bei den Osteosarkomzellen eine vermehrte Bildung von TNF- α unter Alendronat. a) 1. Woche b) 2. Woche c) 3. Woche d) 4. Woche e) Liniendiagramm anhand der Mittelwerte.

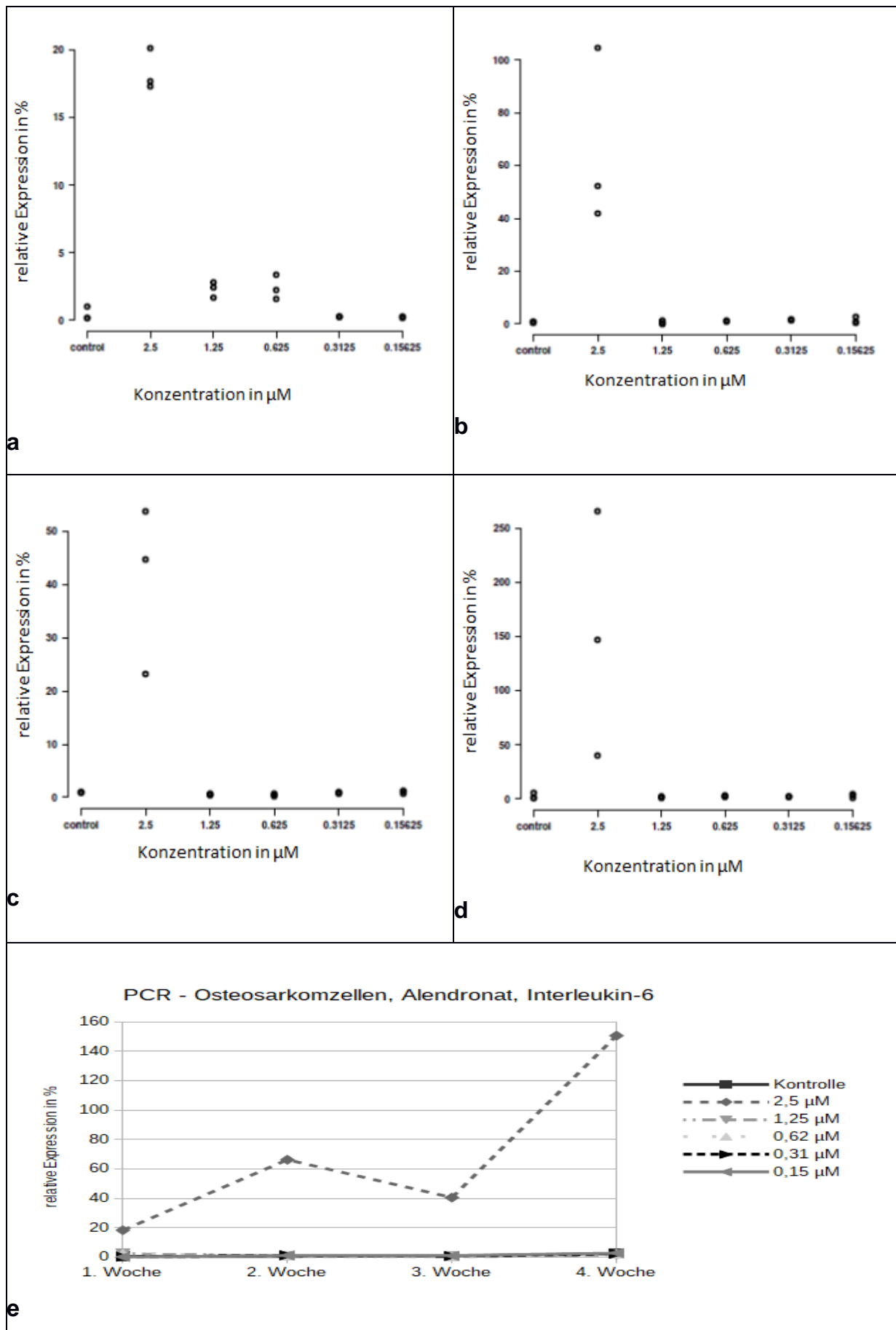


Abb. 25: Deutlich erhöht zeigte sich die Expression von Interleukin 6 durch die Osteosarkomzellen unter Alendronatsubstitution. a) 1. Woche b) 2. Woche c) 3. Woche. In der vierten Woche stiegen die Werte bei 2,5 μM im Vergleich zur Kontrolle 250-fach an d) 4. Woche e) Liniendiagramm anhand der Mittelwerte.

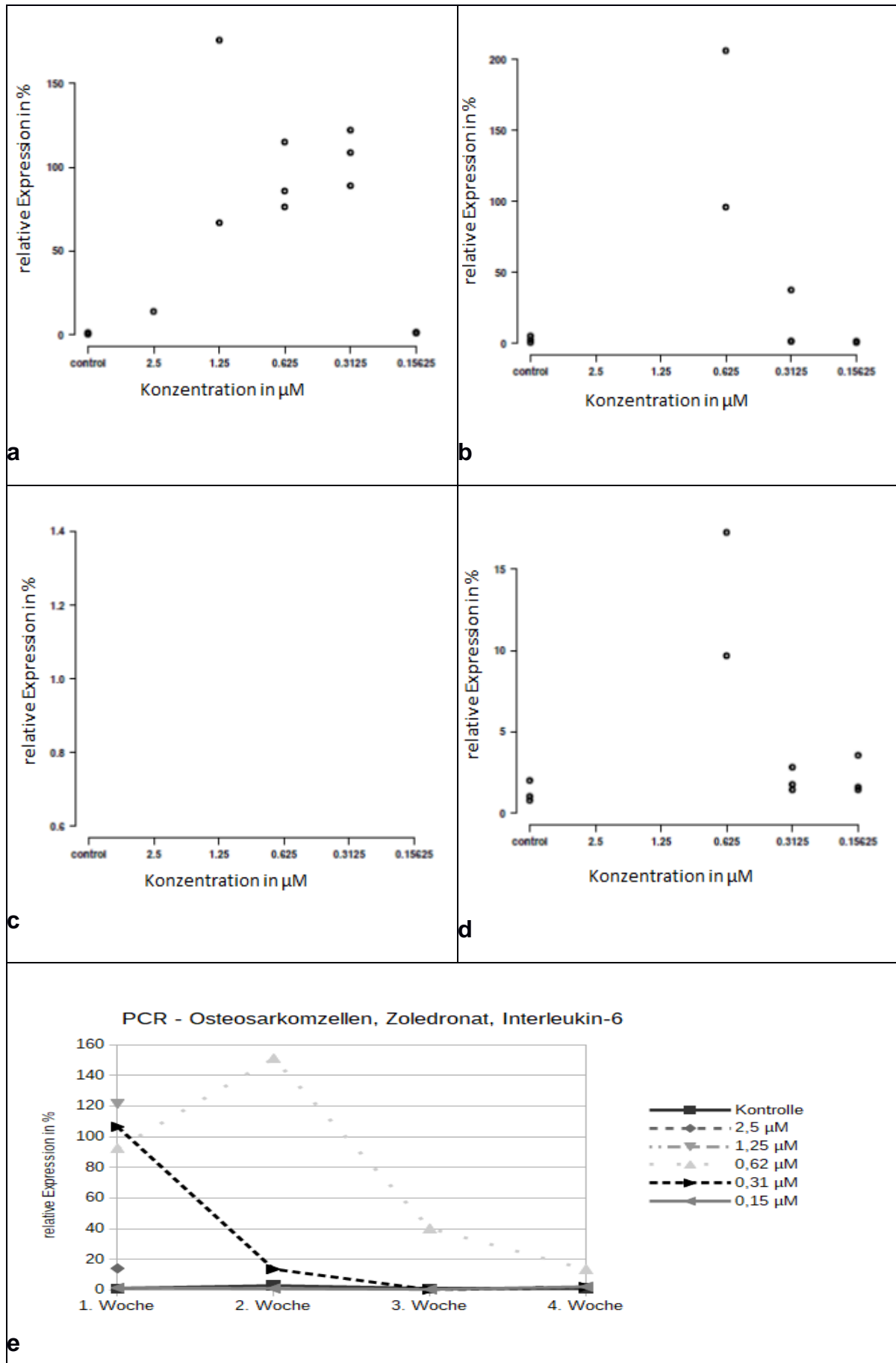


Abb. 26: Auch bei den Osteosarkomzellen ließ sich unter Zoledronat die steigende Interleukin-6-Expression erkennen, jedoch waren die Daten lückenhaft. a) 1. Woche b) 2. Woche c) 3. Woche d) 4. Woche e) Liniendiagramm anhand der Mittelwerte.

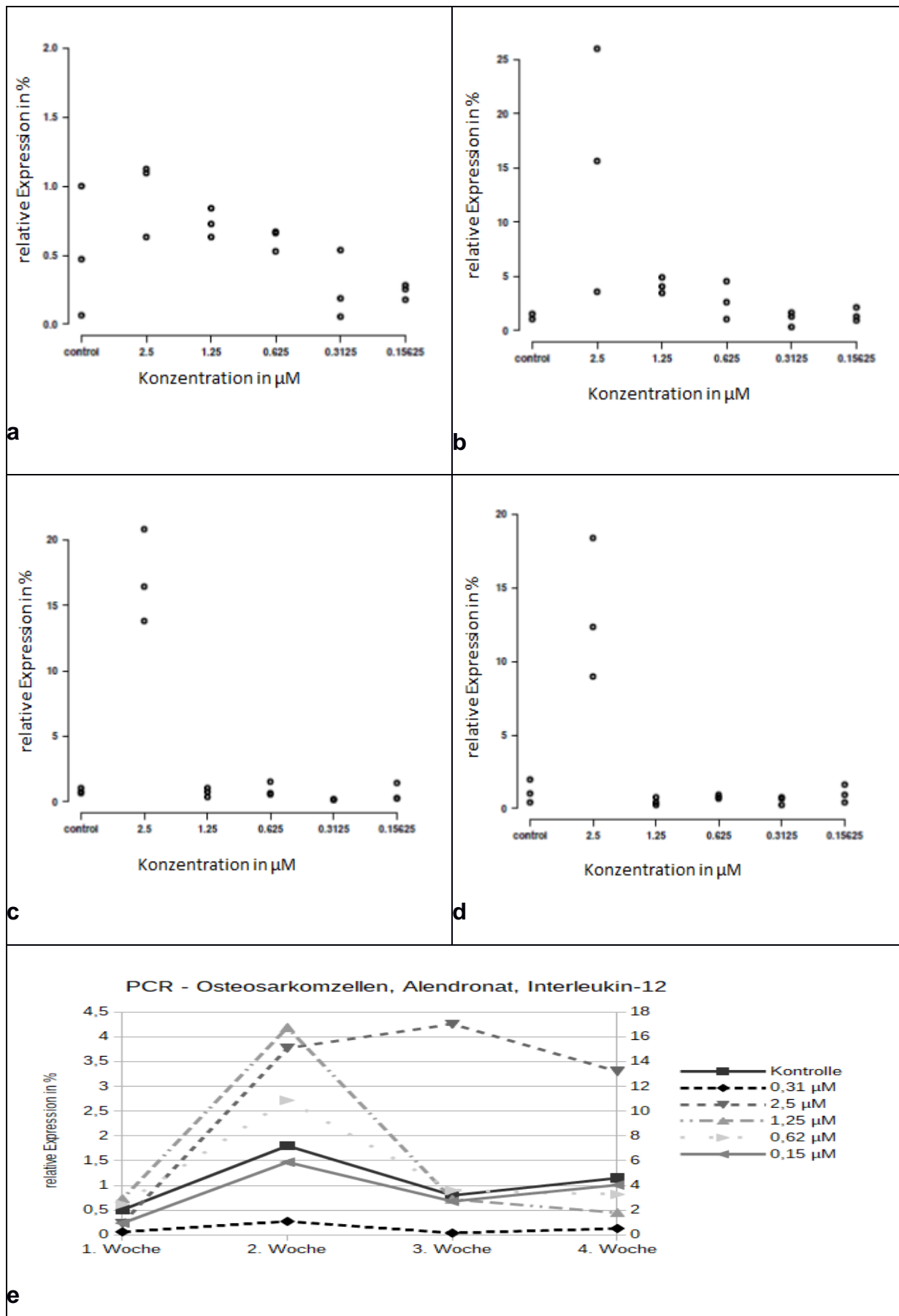


Abb. 27: Im Verlauf der Wochen kam es bei den Osteosarkomzellen nach Alendronatgabe von 2,5 μM wiederholt zur vermehrten relativen Expression von Interleukin 12. Bei geringerer Konzentration zeigte sich dieser Effekt nur in der 2. Woche. a) 1. Woche b) 2. Woche c) 3. Woche d) 4. Woche e) Liniendiagramm anhand der Mittelwerte.

3.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Anfertigung der Agarose-Gele diente der quantitativen Darstellung der PCR-Ergebnisse.

Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden je Zellreihe und Medikament die Interleukine 1 β und 6 der ersten Woche gewählt. Zur Kontrolle der korrekten Anfertigung dienten Gele der GAPDH.

Anhand der Abbildung 28 zeigt sich, dass die Gele korrekt angefertigt worden sind. In allen Probestaschen, außer bei der Negativ-Kontrolle, lässt sich DNA der GAPDH unter UV-Licht anhand der Banden darstellen. Bei den Osteoblasten ließ sich unter Alendronat die DNA von Interleukin 6 nachweisen. Allerdings zeigen sich die Banden in Abbildung 29 weniger deutlich als bei der Abbildung 28. Unter Zoledronat ließ sich bei den Fibroblasten, wie die Abbildung 30 erkennen lässt, nur vereinzelt DNA nachweisen. Doch auch hier zeigen sich einige Banden unter dem UV-Licht.

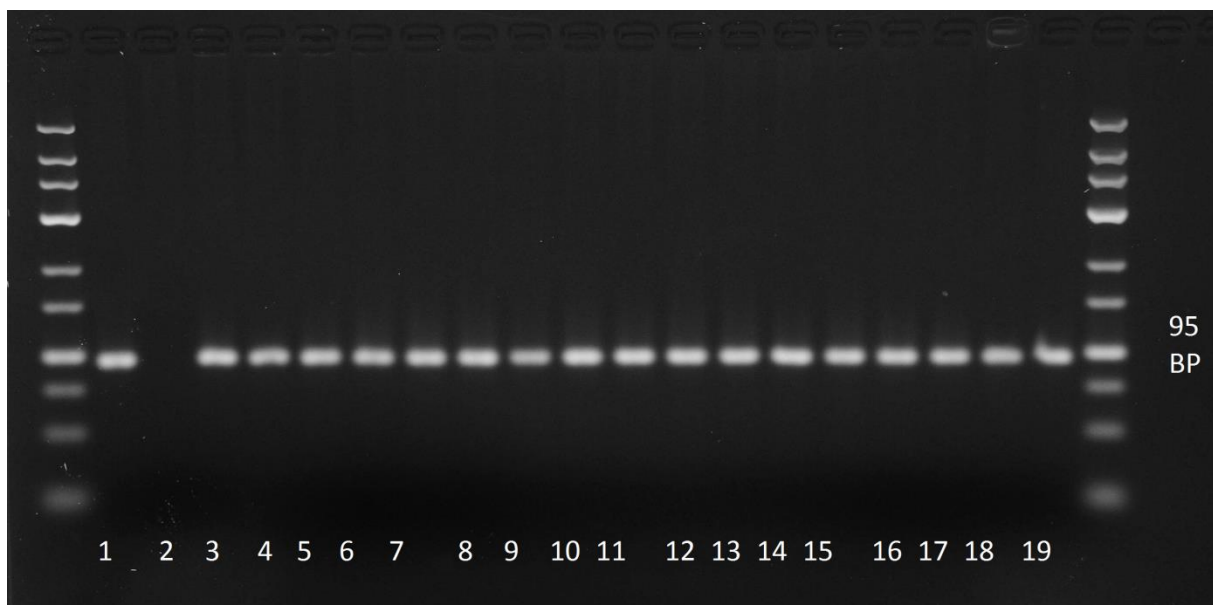


Abb. 28: Fibroblasten unter Alendronat, GAPDH-Expression: 1 + 19 = Standard, 2 = negativ Kontrolle, 3 = Kontrolle, 4 - 6 = 2,5 μ M, 7 - 9 = 1,25 μ M, 10 - 12 = 0,62 μ M, 13 - 15 = 0,31 μ M, 16 - 18 = 0,15 μ M

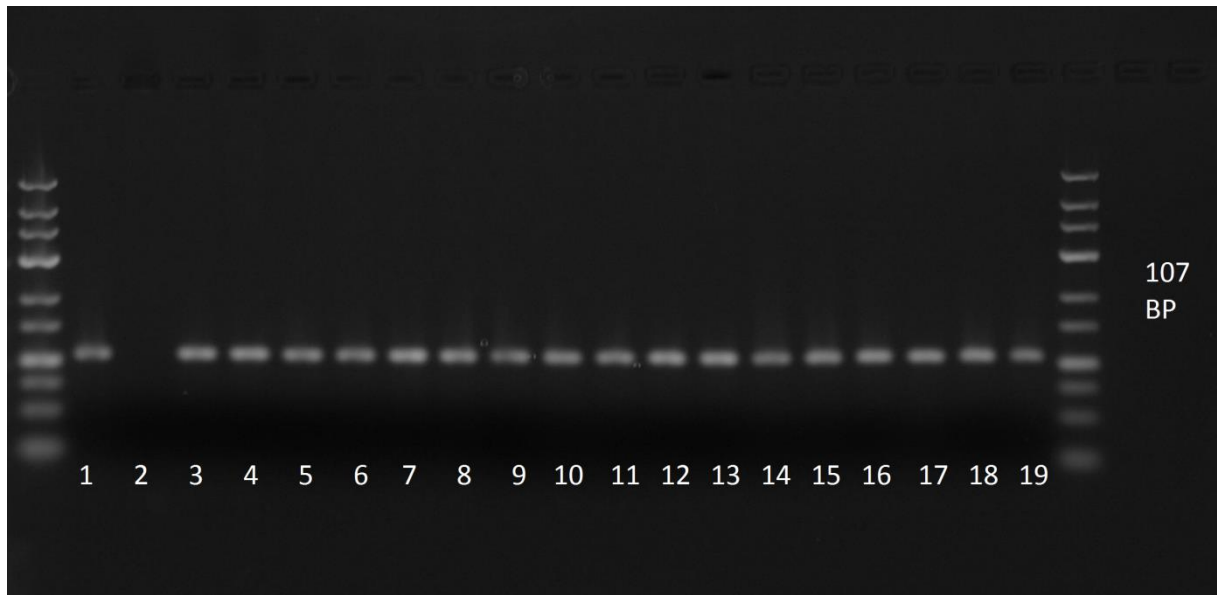


Abb. 29: Expression von Interleukin 6 bei Osteoblasten unter Alendronat: 1 + 19 = Standard, 2 = negativ Kontrolle, 3 = Kontrolle, 4 - 6 = 2,5 μM , 7 - 9 = 1,25 μM , 10 - 12 = 0,62 μM , 13 - 15 = 0,31 μM , 16 - 18 = 0,15 μM

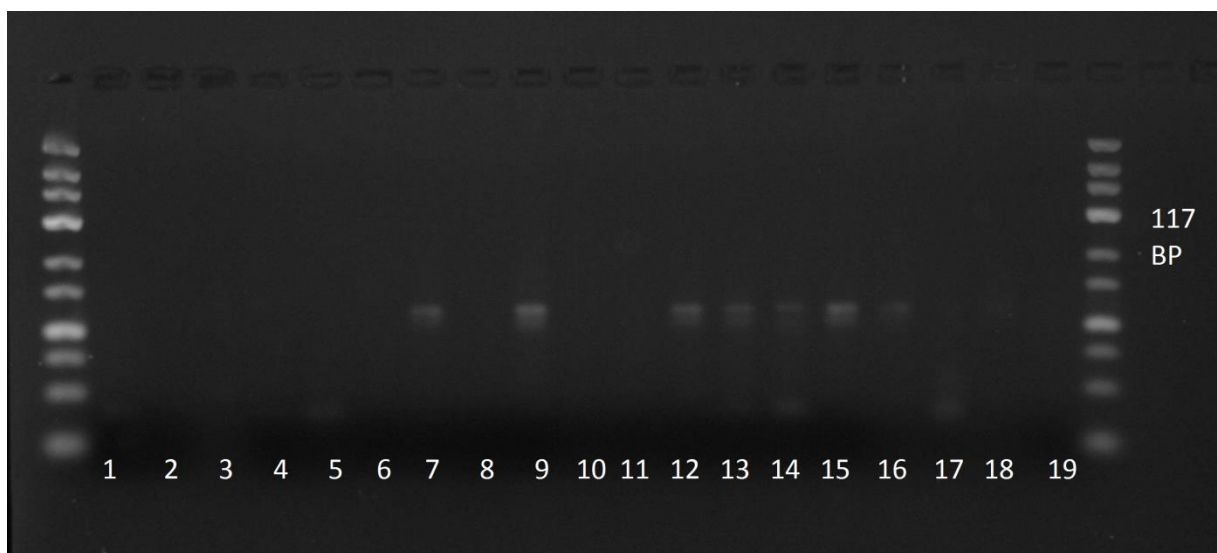


Abb. 30: Expression von Interleukin 1 β bei Fibroblasten unter Zoledronat: 1 + 19 = Standard, 2 = negativ Kontrolle, 3 = Kontrolle, 4 - 6 = 2,5 μM , 7 - 9 = 1,25 μM , 10 - 12 = 0,62 μM , 13 - 15 = 0,31 μM , 16 - 18 = 0,15 μM

4. Diskussion

Das Ziel der Studie lag zum einen darin, die Induktion der Apoptose und das Proliferationsverhalten von humanen Osteoblasten, humanen Gingivafibroblasten und Osteosarkomzellen nach der Gabe von Alendronat und Zoledronat zu beobachten. Zum anderen habe ich die begleitende Entzündungsreaktion näher untersucht. Dazu ist die relative Expression von sechs unterschiedlichen Zytokinen (Tumornekrosefaktor α , Interleukin 1 β , 4, 6, 10 und 12) mittels PCR gemessen worden. Mögliche Unterschiede zwischen den beiden Bisphosphonaten sowie den verwendeten Konzentrationen (2,5 μ M, 1,25 μ M, 0,62 μ M, 0,31 μ M, 0,15 μ M) wurden in wöchentlichen Abständen festgehalten.

4.1. Diskussion – Material und Methoden

Seitdem 2003 von der bisphosphonatassoziierten Kiefernekrose berichtet wurde, sind immer weitere Fälle bekannt geworden. Als ursächliches Agens wurden verschiedene Bisphosphonate erwähnt. Viele Studien, unter anderem von Marx und Kollegen [33], Ruggiero et al. [20], die Arbeitsgruppen um Açil [74] sowie die um Abu-Id [2], Simon [73], Ficarra [171] und Felsenberg [172] nannten Zoledronat als eines der häufigsten. Es handelt sich um ein Bisphosphonat, das zur Behandlung der tumorinduzierten Hyperkalziämie, des Multiplen Myeloms und bei Metastasen solider Tumore zugelassen ist. Die Gabe des Medikaments erfolgt intravenös [173]. Die parenterale Gabe gilt als Risikofaktor der BONJ, jedoch wurde sie auch bei oraler Applikation beobachtet [174]. Alendronat wird zur oralen Therapie der Osteoporose verschrieben [20] und gehört zu den meist verordneten Bisphosphonaten [175]. Ein erhöhtes Auftreten der BONJ wurde von Autoren wie Madrid et al. [176], Shin et al. [177], Kos et al. [178] und Bedogni et al. [179] belegt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden für die vorliegende Studie die Therapeutika Alendronat und Zoledronat gewählt. Beide werden mit einem erhöhten Risiko der BONJ assoziiert, häufig verordnet und repräsentieren jeweils eine Applikationsform.

Die Studie wurde über einen Zeitraum von vier Wochen angelegt, um längerfristige Auswirkungen beobachten zu können. Vorherige Experimente dauerten deutlich kürzer an, oft nur Tage bis zu einer Woche [92, 180, 181]. Da die untersuchten

Medikamente zur Therapie in der Regel langfristig verabreicht werden, wurde ein größerer Zeitrahmen gewählt. Zur Veranschaulichung des zeitlichen Verlaufes wurde eine wöchentliche Auswertung vorgenommen.

Ishtiaq und Kollegen [182] zeigten anti-angionetische Effekte bei Osteoblasten durch stickstoffhaltige Bisphosphonate in geringer Konzentration (10^{-9} – 10^{-6} M). Die Induktion der Apoptose verschiedener Zellen bei hoher Bisphosphonatgabe ist in mehreren Studien gezeigt worden [28, 110, 113, 183, 184]. 2003 wurde von Donoyelle und Mitarbeitern noch berichtet, dass bei Konzentrationen bis zu $10 \mu\text{M}$ keine Veränderungen unter Zoledronat festzustellen waren [185]. Andere Wissenschaftler beobachteten ab $10 \mu\text{M}$ eine Inhibition durch Bisphosphonate [92, 186]. Nach intravenöser Gabe geben Skerjanec et al. die Peak-Plasma Konzentration zwischen 1 bis $10 \mu\text{M}$ an [187]. Bei Patienten mit bisphosphonatassoziierter Kiefernekrose wurden im Speichel und Knochen Konzentrationen von $0,4$ – $5 \mu\text{M}$ festgestellt [188]. Für die vorliegende Arbeit wurden geringe Zoledronat und Alendronat Gaben ($2,5 \mu\text{M}$, $1,25 \mu\text{M}$, $0,62 \mu\text{M}$, $0,31 \mu\text{M}$, $0,15 \mu\text{M}$) gewählt. Maßgeblich für diese Entscheidung waren die Erkenntnisse der Arbeitsgruppen um Açil [74] und Simon [73], da sie bei den gewählten Konzentrationen (1 , 5 , 10 , $20 \mu\text{M}$) zum einen zytotoxische Effekte feststellten und es zum anderen zu einer geringen Materialgewinnung für die PCR-Analyse kam. Eine definitiv toxische Menge sollte bei dieser Arbeit nicht erreicht werden, zudem sollten neue Erkenntnisse bei minimalen Konzentrationen gewonnen werden.

Die Zellproliferation wurde mit Hilfe des MTT-Testes gemessen wobei es sich um ein etabliertes Verfahren zur Messung der Zytotoxizität, Proliferation und Aktivierung handelt. Das Verfahren überzeugt durch seine Schnelligkeit und Präzision [189]. Fotos der Zellkultur und der FDA-Färbung sollten die Ergebnisse bestätigen und Aufschluss über die Vitalität der untersuchten Zelllinien geben.

Die FDA-Färbung dient der Messung der Fluoreszenz nach der intrazellulären Hydrolyse von Fluoreszeindiacetat. Dies gilt als Indikator für die Lebensfähigkeit der Zellen und die Membranintegrität [190]. Die Durchführung der FDA-Färbung gestaltete sich im Großen und Ganzen sehr schwierig, da die Zellen nicht ausreichend fest auf dem Untergrund hafteten und somit schnell abgespült wurden. Besonders die Fibroblasten zeigten sich anfällig gegenüber dem Verfahren. Es kam zu einer geringen Ausbeute an brauchbarem Fotomaterial, weshalb es sich

empfiehlt, dies bei zukünftigen Studien zu beachten und geeignete Alternativen zu finden. Möglicherweise könnten veränderte Konzentrationen der verwendeten Lösungen zum Erfolg führen.

Die relative Zytokinexpression wurde mittels PCR-Analyse ermittelt. Die verwendete real-time PCR mit SYBR Green ermöglicht die Kombination von schneller Amplifikation und Spezifität in einem Verfahren, außerdem kann so das Risiko der Verunreinigung reduziert werden [191]. Um eine Auswertung zu ermöglichen, musste die relative Expression einen Schwellenwert erreichen. Häufig war die Ausbeute der Proben zu gering, sodass entweder gar keine oder nur einzelne Werte ermittelt werden konnten. Statistisch signifikante Aussagen im Hinblick auf die Expression der untersuchten Zytokine konnten somit nicht getroffen werden, wodurch Vergleiche zu anderen Studien nur unvollständig möglich sind. Bei weiterer Forschung sollte dieses Problem berücksichtigt und der Stichprobenumfang im Hinblick auf die Signifikanz erhöht werden.

4.2. Diskussion – Ergebnisse

4.2.1. Diskussion - Zellproliferation und Zellvitalität

Ich untersuchte die Zellvitalität und –proliferation mit Hilfe des MTT-Tests sowie Fotografien der Zellkultur und der FDA-Färbung. Bei allen drei Verfahren zeigte sich Zoledronat stets zytotoxischer in seiner Wirkung als Alendronat. Wie bereits erwähnt, hängt das Risiko der bisphosphonatassoziierten Kiefernekrose von der Wahl der Bisphosphonate ab, wobei die unterschiedlichen Potenzen und die Art der Verabreichung eine Rolle spielen. Anhand dieser Arbeit wird ein erhöhtes Auftreten der Kiefernekrose unter Zoledronat gegenüber Alendronat nachvollziehbar. Unter der Gabe der Bisphosphonate zeigten sich insbesondere bei Zoledronat toxische Effekte. Dies zeigt sich in einer Abnahme der Zellproliferation im MTT-Test und konnte durch die Fotografien bestätigt werden. Unter Alendronat waren in der dritten Woche auch positive Effekte gegenüber den Zellen sichtbar und die Proliferation stieg bei geringer Konzentration um 20 % an. Bei den Fibroblasten wurde die Zellvermehrung ebenfalls konzentrationsabhängig gehemmt, beziehungsweise ein vermindertes Überleben festgestellt. Im Vergleich zu den Osteoblasten zeigten sich ähnliche, wenn auch diskreter ausfallende Veränderungen

bei den Fibroblasten.

Die Osteosarkomzellen unterschieden sich in ihrer Reaktion auf die Gabe der Bisphosphonate von den Osteoblasten und Fibroblasten. Bei hohen Konzentrationen zeigten sich ebenfalls negative Effekte gegenüber den Zellen, unter geringem Zusatz proliferierten die Zellen jedoch. Insbesondere unter Zoledronat kam es gegen Ende des Experiments zum Zellwachstum. Die FDA-Färbung zeigte bei Beginn deutlich toxische Effekte.

Osteoklasten dienen als Hauptangriffszelle der Bisphosphonate. Andere Zelllinien sind bei weitem nicht in der Ausführlichkeit untersucht worden. Bei langfristiger Anwendung wurden insbesondere hemmende Auswirkungen auf Osteoblasten [5, 73, 74, 192, 193], deren Vorläuferzellen, Osteozyten, verschiedene Tumorzellen [49, 186], Fibroblasten [5, 73, 74, 193] und Osteosarkomzellen [73, 74, 194] festgestellt.

Guiliani et al. begannen als eine der ersten im Jahre 1998 mit Experimenten an Osteoblasten [186]. Anhand von koloniestimulierenden Faktoren von Fibroblasten untersuchten sie die Auswirkungen von Alendronat auf die Bildung von Osteoblasten und zeigten im Tiermodell hemmende Einflüsse bei hoher Konzentration. Bei niedrigen Gaben wurden proliferationsfördernde Eigenschaften festgestellt.

Die Wirkung von Bisphosphonaten auf Osteoblasten wird in Studien unterschiedlich dargestellt [195]. Zum einem wird berichtet, dass durch die Gabe der Medikamente konzentrationsabhängig die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten angeregt werden soll [186, 196-198]. Andere Studien berichteten bei höherer Bisphosphonat-Konzentration von einer Hemmung der Proliferation, Adhäsion und Migration [196, 199]. Auch zytotoxische Effekte, wie die Induktion der Apoptose werden beschrieben [74, 183, 193, 200], während Plotkin 1999 noch von einem Schutz der Osteoblasten und Osteozyten sprach [201].

Bei der Wundheilung der bisphosphonatassoziierten Kiefernekrose sind sowohl Fibroblasten als auch Osteoblasten beteiligt [202]. Durch negative Effekte auf diese Zellen, wie beispielsweise die Induktion der Apoptose, kann die physiologische Funktion nicht aufrechterhalten werden. Wundheilung ist abhängig von einer ausreichenden Durchblutung des Gewebes und Störungen in der Angiogenese bewirken somit eine Verzögerung oder sogar eine Verhinderung der Reparaturvorgänge [19]. Der Einfluss der Bisphosphonate auf diese Zellen kann als Erklärung für die schwierige Therapie und die mangelnde Heilung des Krankheitsbildes herangezogen werden. Cozin et al. stellten in ihrer Arbeit die

negativen Auswirkungen von Bisphosphonaten auf gingivale Fibroblasten dar und lieferten so ebenfalls einen Beweis für die verzögerte Wundheilung [203]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen sich am ehesten mit denen der Arbeitsgruppen um Prof. Açil [74] und Simon [73] vergleichen. Unter der Gabe von Zoledronat und weiterer Bisphosphonate stellten sie eine Induktion der Apoptose, beziehungsweise eine verringerte Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix bei Osteoblasten, gingivalen Fibroblasten sowie Osteosarkomzellen fest. Einen direkten Einfluss sollen stickstoffhaltige Bisphosphonate auf Osteoblasten haben, indem sie mit dem OPG/RANK/RANKL System interagieren [204]. RANKL stimuliert Osteoklasten und OPG ist der Gegenspieler, der den Rezeptor blockiert [198, 199]. Werden nun die Osteoblasten in ihrer Funktion gehindert, unterbleibt dieser Einfluss, Osteoklasten werden nicht mehr stimuliert und können Mikrofrakturen nicht mehr abbauen. Mashiba und Kollegen beschrieben ein erhöhtes Auftreten solcher Schäden unter Bisphosphonatgabe [54, 143], was als pathophysiologische Erklärung für die Osteonekrose herangezogen werden kann [8], zumal Osteoklasten nicht nur indirekt über die Osteoblasten, sondern bereits direkt über die Bisphosphonate gehemmt werden. Besonders im Kiefer ist der Knochenstoffwechsel erhöht, wodurch dessen Hemmung weitreichende Folgen haben kann [205]. So wird seit einigen Jahren unter Therapie mit Bisphosphonaten von der atypischen Stressfraktur am proximalen Femur berichtet [206]. Auch bei osteolytischen Pathologien, wie Osteosarkomen, wurden Veränderungen im OPG/RANK/RANKL-System festgestellt [207, 208]. Es wird vermutet, dass Osteosarkomzellen über die Produktion von RANKL auf Osteoklasten wirken. Diese werden an der Knochenoberfläche rekrutiert, können Knochen resorbieren und so Platz für den Tumor bereiten [194]. Beim Eingriff in das OPG/RANKL-Verhältnis durch Bisphosphonate können Osteoklasten gehemmt und die Ausdehnung des Tumorwachstums reduziert werden [209]. Laut Mackie und Mitarbeitern kam es bei einer Konzentration von 10^{-5} M zur Inhibition der Proliferation sowie einer erhöhten Induktion der Apoptose bei Osteosarkomzellen [194]. Es kam zur verringerten Expression von RANKL, OPG hingegen wurde nicht beeinflusst. Dies gleicht meinen Ergebnissen, bei denen es ebenfalls bei der höheren Dosierung zu negativen Effekten gegenüber den SAOS-2 Zellen kam. Auch Chang et al. untersuchten in ihrer Arbeit Osteosarkomzellen im Hinblick auf Proliferation und Apoptose. Sie stellten unter Zoledronat signifikante Ergebnisse fest. Eine erhöhte Expression von OPG

wurde registriert, die Proliferation der Osteosarkomzellen wurde inhibiert und die Apoptose induziert. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurden deutlich höhere Konzentrationen verabreicht, außerdem waren die Versuche bereits nach drei Tagen abgeschlossen. Die Wissenschaftler gingen von einer direkten Wirkung auf die Zellen aus [207].

Es wird angenommen, dass die Apoptose, wie bei den Osteoklasten auch, durch eine Störung des Mevalonat-Stoffwechselweges ausgelöst wird. Die Farnesylpyrophosphat-Synthase wird durch stickstoffhaltige Bisphosphonate gehemmt [93, 210]. Untersuchungen ergaben, dass der Zellzyklus in unterschiedlichen Phasen gestört wurde, wodurch es zur Proliferationshemmung kam [93, 207, 211, 212].

Viele lebenswichtige Zellfunktionen, unter anderem auch die Signaltransduktion zur Proteinproduktion wie RANKL [213], werden über diesen Weg gesteuert. Daher wird bei Bisphosphonatdosierungen, die nicht ausreichen, um die Apoptose zu induzieren, trotzdem der Knochenumbau beeinflusst [214].

Ziel weiterführender Forschung sollte es sein, die genauen biochemischen Veränderungen verschiedener Zellen zu untersuchen. Weiterführende Betrachtungen der Interaktion von Bisphosphonaten mit dem OPG/RANK/RANKL-System scheinen, insbesondere im Hinblick auf die doppelte Hemmung der Osteoklasten, sinnvoll. Außerdem gilt es weiterhin die optimale Dosierung auch in vivo zu ermitteln.

4.2.2. Diskussion - Expression inflammatorischer Marker

Vor dem Hintergrund einer multifaktoriellen Genese der bisphosphonatassoziierten Kiefernekrose, sollte die Expression einiger Zytokine untersucht werden. Ausgewählt wurden Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β , -4, -6, -10 und -12, da diese sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen ausüben.

IL-1, IL-6 und TNF- α sind Schlüsselenzyme für die Osteoklastendifferenzierung [215] und beeinflussen die Knochenresorption. Bei einer Akut-Phase-Reaktion, die als Nebenwirkung nach intravenöser Bisphosphonatapplikation beobachtet wurde, werden sie ausgeschüttet [216-218]. TNF wird hauptsächlich von Makrophagen gebildet. Wie auch Interleukin-1 β ist es an der Regulation biologischer Prozesse wie Entzündungsreaktion, Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt [219, 220].

TNF und IL-1 β gehören zu den Metaboliten, die an osteolytischen Knochenkrankheiten wie dem multiplen Myelom beteiligt sind [221]. Auch bei Patienten mit BONJ sind erhöhte Interleukin-1 β Werte im Speichel der Zahnfleischtaschen gefunden worden [222]. Lichtenstein et al. fanden signifikant erhöhte Konzentrationen von TNF und IL-1 β bei Patienten mit Knochenerkrankungen [223]. So liegt die Vermutung nahe, dass die Osteolysen durch eine Hemmung dieser Zytokine gemindert werden können [224]. Pennanen und Kollegen beobachteten eine verminderte Expression durch die Gabe von Bisphosphonaten [224]. Auch Sun et al. kamen zu diesem Ergebnis indem sie Patienten mit bisphosphonatassoziiertes Kiefernekrose bei multiplen Myelom untersuchten [225]. Bei der Analyse der Proben dieser Arbeit stellte ich lediglich bei den Fibroblasten Veränderungen der Interleukin-1 β Expression fest. Unter hoher Gabe von Zoledronat wurde diese, im Gegensatz zu den oben genannten Studien, massiv gesteigert. Bei 2,5 μ M wurden deutlich höhere Werte erreicht. Allerdings streuten die Werte stark, sodass auch an Ausreißer gedacht werden muss. Für die SAOS-2 Zellen und Osteoblasten lagen keine Daten vor. Ähnlich kontroverse Ergebnisse berichteten auch Deng et al. bei der Untersuchung von Makrophagen im Hinblick auf die Pathogenese der BONJ. Sie fanden unter Alendronat erhöhte Werte von IL-1, jedoch keine Veränderungen von TNF. Clodronat hingegen, ein nicht-stickstoffhaltiges Bisphosphonat, führte zur verringerten IL-1 Expression [226]. Die Auswertung des TNF- α bereitete die bereits erwähnten Probleme der geringen Zellmaterialausbeute. Wenn genug Zellmaterial vorhanden war, ließen sich im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderungen feststellen.

Die aufgrund der Akut-Phase-Reaktion erhöhten Interleukin-6 Konzentrationen sollen laut Naidu und Mitarbeitern einen Beitrag zur Entstehung der BONJ leisten. Allerdings ließ sich in ihren Untersuchungen keine erhöhte Ausschüttung von Interleukin-6 durch Alendronat oder Zoledronat an Osteoblasten feststellen. Ihr Experiment führten sie über drei Tage durch [205]. Hingegen berichteten Thiebaud et al. über einen deutlichen Anstieg von Interleukin-6 und TNF- α im Vergleich einer in vivo und in vitro Studie. Interleukin-1 zeigte keine Reaktion auf die Bisphosphonatgabe [227]. In der vorliegenden Arbeit ließen sich erneut Unterschiede zwischen den verwendeten Medikamenten feststellen. So kam es unter Zoledronat bei hoher Gabe zur erhöhten Expression von Interleukin-6 durch alle Zellreihen. Unter Alendronat war dieser Effekt nur bei den Osteosarkomzellen zu beobachten.

Eine schlechte Mundhygiene sowie vorbestehende orale Infektionen zählen zu den Risikofaktoren der Kiefernekrose. Es zeigte sich, dass Bakterien Osteoblasten zur Ausschüttung von Zytokinen anregen können [228, 229]. Bost et al. beobachteten eine erhöhte Expression von Interleukin-6 und -12 bei murinen und humanen Osteoblasten nach einer *Staphylococcus aureus* Infektion [228]. Der Keim gilt als der Haupterreger bei einer Osteomyelitis [230], ein Krankheitsbild, das der BONJ ähnelt. Aufgrund dieser Erkenntnis ist es interessant, die Wirkung von Bisphosphonaten auf die Zytokinproduktion bei zugrundeliegender Infektion zu ermitteln.

Interleukin-12 dient der Abwehr intrazellulärer Pathogene. Hierfür wird die zelluläre TH-1 Immunantwort aktiviert, die Entwicklung von Interleukin-4 produzierenden TH-Zellen inhibiert [231]. Unter Zoledronat war bei den Osteoblasten und unter Alendronat bei den Osteosarkomzellen eine steigende Produktion von IL-12, insbesondere bei höherer Konzentration der Medikamente, feststellbar.

Bisher ist die Datenlage in Bezug auf den Zusammenhang zwischen Bisphosphonaten und Interleukin-4 und -10 unzureichend. Durch Interleukin-12 wird ihre Bildung gehemmt [232]. Da sie zu den antiinflammatorischen Zytokinen zählen, wurde die Expression ebenfalls untersucht. Der für die PCR-Analyse benötigte Schwellenwert konnte in dieser Arbeit häufig nicht erreicht werden. Bei vorhandenen Daten waren Unterschiede zur Kontrolle bei der Expression dieser Zytokine nicht wahrnehmbar.

Immer wieder wurde der Unterschied zwischen den beiden verwendeten Bisphosphonaten deutlich. Auch die Differenz zwischen den Osteoblasten und Fibroblasten auf der einen Seite und den Osteosarkomzellen auf der anderen Seite bestätigte sich wiederholt. Insgesamt konnte ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine, die teilweise einen positiven Effekt auf Osteoklasten ausüben, beobachtet werden. Die Daten sind teilweise lückenhaft, sodass es sich empfiehlt, die Ergebnisse anhand weiterer Studien zu bestätigen. Auch die teils widersprüchlichen Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit weiterer Forschung auf diesem Gebiet.

4.3. Diskussion - Schlussfolgerung

Eingangs wurden mehrere Fragen formuliert, die die Ziele der Studie aufzeigen. Es sollte untersucht werden, wie sich die Gabe von Zoledronat und Alendronat auf die Proliferation und Vitalität der drei Zelllinien auswirkt. Mögliche Unterschiede zwischen den Medikamenten und den Konzentrationen sollten festgehalten werden. Die Ergebnisse zeigten, dass es, in Abhängigkeit von der Konzentration, zu einer Abnahme der Proliferation und Vitalität kam. Eine Ausnahme bildeten die SAOS-2 Zellen, wo es bei geringer Konzentration zur Steigerung der Proliferation kam. Unter der Applikation der beiden Therapeutika ließen sich deutliche Unterschiede feststellen. Nach Zusatz von Zoledronat waren zum einen toxischere Auswirkungen wahrzunehmen. Zum anderen ließen sich diese bis zu geringsten Dosierungen nachvollziehen. Dadurch bestätigt sich die Differenz der Potenz der Medikamente. Das Risiko der bisphosphonatassoziierten Kiefernekrose hängt von der Wahl der Bisphosphonate ab [28-31]. Durch die vorliegende Studie wird ein erhöhtes Auftreten unter Zoledronat gegenüber Alendronat nachvollziehbar.

Weiterhin wurden die Effekte auf die Genexpression inflammatorischer Marker, wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und der Interleukine-1 β , -4, -6, -10 und -12 untersucht. Auch hier sollten die Besonderheiten der Medikamente und ihrer Dosierungen herausgearbeitet werden. Veränderungen wurden nur bei einigen Zytokinen wahrnehmbar. So stieg die Expression von IL-1 β bei den Fibroblasten. Auch bei der PCR-Analyse wurden Unterschiede zwischen den Medikamenten deutlich. Zoledronat steigerte die Produktion von IL-6 bei allen Zelllinien, Alendronat nur bei den Osteosarkomzellen. Dies geschah stets in Abhängigkeit von der Konzentration. IL-12 wurde bei hoher Gabe von Zoledronat bei den Osteoblasten und unter Alendronat bei den Osteosarkomzellen vermehrt exprimiert. Es kam zu einem Anstieg der proinflammatorischen Marker. Dies unterstützt die Theorie, dass Bisphosphonate die entzündliche Reaktion der Kiefernekrose begünstigen. Weitere Untersuchungen, insbesondere mit größerem Stichprobenumfang, sollten durchgeführt werden. Dadurch kann Klarheit in die teils noch sehr widersprüchlichen Ergebnisse im Hinblick auf die Zytokinexpression gewonnen werden.

Bei der bisphosphonatassoziierte Kiefernekrose scheint eine Vielfalt von Zellen beteiligt zu sein. Von einem multifaktoriellen Geschehen ist auszugehen [2, 5]. Weitere Untersuchungen insbesondere auf zellulärer und biochemischer Ebene werden neue Erkenntnisse bringen. Das Ziel, eine bessere Behandlung

beziehungsweise schonendere Therapieverfahren durch Bisphosphonate zu ermöglichen, ist noch nicht erreicht.

Für einige Erkrankungen sind Bisphosphonate zur Behandlung essentiell [2-6]. Die Therapie sollte stets bedacht und risikoadaptiert durchgeführt werden. Weiterhin gilt es die Patienten zu regelmäßigen ärztlichen und zahnärztlichen Kontrollen sowie zur ausreichenden Mundhygiene anzuhalten [22, 47].

Insbesondere Patienten mit einer malignen Grunderkrankung, die mit einer reduzierten Immunabwehr einhergeht, sind von der BONJ betroffen. Daher können Forschungen im Bereich der Immunantwort und Modulation, die durch Bisphosphonate bedingt sind, für die Therapie hilfreich sein.

Es gilt die in vitro errungenen Erkenntnisse auch in vivo zu beurteilen. Dazu müssen entsprechende Modelle erstellt werden.

Die Auswirkungen von Bisphosphonaten auf Infektion und Immunantwort sollten näher betrachtet werden. Veränderungen in Bezug auf die Regulation der beteiligten Immunzellen können Angriffspunkte für Therapieverfahren beinhalten.

Bisphosphonate und die durch ihre Verwendung entstehenden Komplikationen werden auch in Zukunft Grundlage vieler Forschungen sein.

5. Zusammenfassung

Bisphosphonate, Analoga des Pyrophosphats, werden seit den achtziger Jahren zur Behandlung von Erkrankungen mit negativer Knochenbilanz eingesetzt. Aufgrund ihrer ausgeprägten Affinität zum Knochen akkumulieren die Medikamente in dem Gewebe. Ihre Bioverfügbarkeit ist gering, die Halbwertszeit kann mehrere Jahre andauern.

Seit 2003 wurde vermehrt von der bisphosphonatassoziierten Kiefernekrose als eine mögliche Nebenwirkung berichtet. Das Krankheitsbild weist Ähnlichkeiten zu der Berufskrankheit „Phossy Jaw“ aus dem 20. Jahrhundert und zu der Radioosteonekrose auf. Die Behandlung gestaltet sich bis heute schwierig. Aus diesen Gründen wurde ein in vitro Modell angefertigt und die Auswirkungen zweier Bisphosphonate, Alendronat und Zoledronat, auf drei verschiedene Zellreihen, Osteoblasten, humane Gingivafibroblasten und Osteosarkomzellen untersucht. Ich betrachtete zum einen die Zellproliferation und Vitalität, zum anderen die Expression inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor α , Interleukin 1 β , 4, 6, 10 und 12. Über vier Wochen wurden die Zellreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 μ M, 1,25 μ M, 0,62 μ M, 0,31 μ M und 0,15 μ M) der Bisphosphonate behandelt. Bei der Bestimmung der Zellproliferation mittels MTT-Test wurde eine Hemmung der Zelllinien beobachtet. Die Vitalität, die durch Fotografien der Zellkultur und FDA-Färbung dokumentiert wurde, war reduziert. Unterschiede zwischen den Medikamenten und den Konzentrationen wurden deutlich. Zoledronat wirkte stets toxischer im Vergleich zu Alendronat. Bei den Fibroblasten waren die Auswirkungen geringer ausgeprägt als bei den Osteoblasten. Unter geringer Bisphosphonatgabe proliferierten die Osteosarkomzellen, hohe Dosen wirkten wie bei den anderen Zelllinien ebenfalls toxisch.

Die Expression der inflammatorischen Zytokine zeigte unterschiedliche Ergebnisse. TNF- α , IL-4 und IL-10 zeigten keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Bei einzelnen Zelllinien wurde die Produktion von IL-1 β und IL-12 gesteigert. Unter Zoledronat zeigte sich bei allen Zelllinien eine vermehrte IL-6 Expression. Unter der Gabe von Alendronat geschah dies nur bei den Osteosarkomzellen.

Weitere Forschungen in diesem Bereich insbesondere auch in-vivo Studien werden neue Erkenntnisse bringen, um das Ziel, die Prävention und Therapie der bisphosphonatassoziierten Kiefernekrose zu optimieren, zu erreichen.

6. Anhang

6.1. Anhang 1 – PCR, Osteoblasten, Zoledronat

Tabelle 2: PCR-Daten, Osteoblasten, Zoledronat, 3. Woche

Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	Primer	TNF
				dCT (Sample)-	Relative
				dCT (STD)	Expression
OZ37 100%		16,70	-16,70	0,00	1,00
OZ37 10%		20,27	-20,27	-3,57	11,88
OZ37 1%		23,89	-23,89	-7,19	146,02
OZ38		17,72	-17,72	-1,02	2,03
OZ39		16,75	-16,75	-0,05	1,04
OZ40		30,10	-30,10	-13,40	10809,41
OZ41		29,87	-29,87	-13,17	9216,48
OZ42		31,02	-31,02	-14,32	20452,65
OZ43		20,02	-20,02	-3,32	9,99
OZ44		18,50	-18,50	-1,80	3,48
OZ45		17,72	-17,72	-1,02	2,03
OZ46		17,75	-17,75	-1,05	2,07
OZ47		20,20	-20,20	-3,50	11,31
OZ48		17,36	-17,36	-0,66	1,58
OZ49		19,98	-19,98	-3,28	9,71
OZ50		17,71	-17,71	-1,01	2,01
OZ51		19,00	-19,00	-2,30	4,92
OZ52		17,55	-17,55	-0,85	1,80
OZ53		19,12	-19,12	-2,42	5,35
OZ54		17,59	-17,59	-0,89	1,85

Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	Primer	IL1
				dCT (Sample)-	Relative
				dCT (STD)	Expression
OZ37 100%		16,70	-16,70	0,00	1,00
OZ37 10%		20,27	-20,27	-3,57	11,88
OZ37 1%		23,89	-23,89	-7,19	146,02
OZ38		17,72	-17,72	-1,02	2,03
OZ39		16,75	-16,75	-0,05	1,04
OZ40		30,10	-30,10	-13,40	10809,41
OZ41		29,87	-29,87	-13,17	9216,48
OZ42		31,02	-31,02	-14,32	20452,65
OZ43		20,02	-20,02	-3,32	9,99
OZ44		18,50	-18,50	-1,80	3,48
OZ45		17,72	-17,72	-1,02	2,03
OZ46		17,75	-17,75	-1,05	2,07
OZ47		20,20	-20,20	-3,50	11,31
OZ48		17,36	-17,36	-0,66	1,58
OZ49		19,98	-19,98	-3,28	9,71
OZ50		17,71	-17,71	-1,01	2,01
OZ51		19,00	-19,00	-2,30	4,92
OZ52		17,55	-17,55	-0,85	1,80

OZ53		19,12	-19,12	-2,42	5,35
OZ54		17,59	-17,59	-0,89	1,85

Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	Primer	IL4
				dCT (Sample)- dCT (STD)	Relative Expression
OZ37 100%		16,70	-16,70	0,00	1,00
OZ37 10%		20,27	-20,27	-3,57	11,88
OZ37 1%		23,89	-23,89	-7,19	146,02
OZ38		17,72	-17,72	-1,02	2,03
OZ39		16,75	-16,75	-0,05	1,04
OZ40		30,10	-30,10	-13,40	10809,41
OZ41		29,87	-29,87	-13,17	9216,48
OZ42		31,02	-31,02	-14,32	20452,65
OZ43		20,02	-20,02	-3,32	9,99
OZ44		18,50	-18,50	-1,80	3,48
OZ45		17,72	-17,72	-1,02	2,03
OZ46		17,75	-17,75	-1,05	2,07
OZ47		20,20	-20,20	-3,50	11,31
OZ48		17,36	-17,36	-0,66	1,58
OZ49		19,98	-19,98	-3,28	9,71
OZ50		17,71	-17,71	-1,01	2,01
OZ51		19,00	-19,00	-2,30	4,92
OZ52		17,55	-17,55	-0,85	1,80
OZ53		19,12	-19,12	-2,42	5,35
OZ54		17,59	-17,59	-0,89	1,85

Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	Primer	IL6
				dCT (Sample)- dCT (STD)	Relative Expression
OZ37 100%		16,70	-16,70	0,00	1,00
OZ37 10%		20,27	-20,27	-3,57	11,88
OZ37 1%		23,89	-23,89	-7,19	146,02
OZ38		17,72	-17,72	-1,02	2,03
OZ39		16,75	-16,75	-0,05	1,04
OZ40		30,10	-30,10	-13,40	10809,41
OZ41		29,87	-29,87	-13,17	9216,48
OZ42		31,02	-31,02	-14,32	20452,65
OZ43		20,02	-20,02	-3,32	9,99
OZ44		18,50	-18,50	-1,80	3,48
OZ45		17,72	-17,72	-1,02	2,03
OZ46		17,75	-17,75	-1,05	2,07
OZ47		20,20	-20,20	-3,50	11,31
OZ48		17,36	-17,36	-0,66	1,58
OZ49		19,98	-19,98	-3,28	9,71
OZ50		17,71	-17,71	-1,01	2,01
OZ51		19,00	-19,00	-2,30	4,92
OZ52		17,55	-17,55	-0,85	1,80
OZ53		19,12	-19,12	-2,42	5,35
OZ54		17,59	-17,59	-0,89	1,85

Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	Primer	IL10
				dCT (Sample)-	Relative
				dCT (STD)	Expression
OZ37 100%		16,70	-16,70	0,00	1,00
OZ37 10%		20,27	-20,27	-3,57	11,88
OZ37 1%		23,89	-23,89	-7,19	146,02
OZ38		17,72	-17,72	-1,02	2,03
OZ39		16,75	-16,75	-0,05	1,04
OZ40		30,10	-30,10	-13,40	10809,41
OZ41		29,87	-29,87	-13,17	9216,48
OZ42		31,02	-31,02	-14,32	20452,65
OZ43		20,02	-20,02	-3,32	9,99
OZ44		18,50	-18,50	-1,80	3,48
OZ45		17,72	-17,72	-1,02	2,03
OZ46		17,75	-17,75	-1,05	2,07
OZ47		20,20	-20,20	-3,50	11,31
OZ48		17,36	-17,36	-0,66	1,58
OZ49		19,98	-19,98	-3,28	9,71
OZ50		17,71	-17,71	-1,01	2,01
OZ51		19,00	-19,00	-2,30	4,92
OZ52		17,55	-17,55	-0,85	1,80
OZ53		19,12	-19,12	-2,42	5,35
OZ54		17,59	-17,59	-0,89	1,85

Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	Primer	IL12
				dCT (Sample)-	Relative
				dCT (STD)	Expression
OZ37 100%		16,70	-16,70	0,00	1,00
OZ37 10%		20,27	-20,27	-3,57	11,88
OZ37 1%		23,89	-23,89	-7,19	146,02
OZ38		17,72	-17,72	-1,02	2,03
OZ39		16,75	-16,75	-0,05	1,04
OZ40		30,10	-30,10	-13,40	10809,41
OZ41		29,87	-29,87	-13,17	9216,48
OZ42		31,02	-31,02	-14,32	20452,65
OZ43		20,02	-20,02	-3,32	9,99
OZ44		18,50	-18,50	-1,80	3,48
OZ45		17,72	-17,72	-1,02	2,03
OZ46		17,75	-17,75	-1,05	2,07
OZ47		20,20	-20,20	-3,50	11,31
OZ48		17,36	-17,36	-0,66	1,58
OZ49		19,98	-19,98	-3,28	9,71
OZ50		17,71	-17,71	-1,01	2,01
OZ51		19,00	-19,00	-2,30	4,92
OZ52		17,55	-17,55	-0,85	1,80
OZ53		19,12	-19,12	-2,42	5,35
OZ54		17,59	-17,59	-0,89	1,85

6.2. Anhang 2 – PCR, Fibroblasten, Zoledronat

Tabelle 3: PCR-Daten, Fibroblasten, Zoledronat, 4. Woche

Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	Primer	TNF
				dCT (Sample)-	Relative
				dCT (STD)	Expression
FZ55 100%	neg	15,91	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ55 10%	neg	19,09	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ55 1%	neg	22,66	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ56	34,97	15,31	19,66	#WERT!	#WERT!
FZ57	36,05	15,72	20,33	#WERT!	#WERT!
FZ58	29,46	15,31	14,15	#WERT!	#WERT!
FZ59	32,17	15,92	16,25	#WERT!	#WERT!
FZ60	31,75	16,14	15,61	#WERT!	#WERT!
FZ61	33,79	17,03	16,76	#WERT!	#WERT!
FZ62	neg	20,28	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ63	34,09	15,58	18,51	#WERT!	#WERT!
FZ64	neg	15,60	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ65	neg	15,74	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ66	neg	15,49	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ67	neg	15,67	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ68	neg	16,09	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ69	neg	15,74	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ70	neg	16,16	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ71	neg	15,55	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ72	neg	17,26	#WERT!	#WERT!	#WERT!

Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	Primer	IL1
				dCT (Sample)-	Relative
				dCT (STD)	Expression
FZ55 100%	37,62	15,91	21,71	0,00	1,00
FZ55 10%	neg	19,09	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ55 1%	neg	22,66	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ56	neg	15,31	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ57	37,13	15,72	21,41	-0,30	1,23
FZ58	26,29	15,31	10,98	-10,73	1698,45
FZ59	29,27	15,92	13,35	-8,36	328,56
FZ60	28,60	16,14	12,46	-9,25	608,87
FZ61	36,18	17,03	19,15	-2,56	5,90
FZ62	neg	20,28	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ63	34,47	15,58	18,89	-2,82	7,06
FZ64	neg	15,60	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ65	39,37	15,74	23,63	1,92	0,26
FZ66	38,95	15,49	23,46	1,75	0,30
FZ67	38,66	15,67	22,99	1,28	0,41
FZ68	40,68	16,09	24,59	2,88	0,14
FZ69	neg	15,74	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ70	40,28	16,16	24,12	2,41	0,19
FZ71	neg	15,55	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ72	neg	17,26	#WERT!	#WERT!	#WERT!

Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	Primer	IL4
				dCT (Sample)-	Relative
				dCT (STD)	Expression
FZ55 100%	36,09	15,91	20,18	0,00	1,00
FZ55 10%	nach 41	19,09	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ55 1%	nach 41	22,66	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ56	35,78	15,31	20,47	0,29	0,82
FZ57	35,42	15,72	19,70	-0,48	1,39
FZ58	nach 41	15,31	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ59	nach 41	15,92	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ60	40,95	16,14	24,81	4,63	0,04
FZ61	nach 41	17,03	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ62	neg	20,28	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ63	40,68	15,58	25,10	4,92	0,03
FZ64	38,87	15,60	23,27	3,09	0,12
FZ65	37,73	15,74	21,99	1,81	0,29
FZ66	40,23	15,49	24,74	4,56	0,04
FZ67	37,92	15,67	22,25	2,07	0,24
FZ68	40,15	16,09	24,06	3,88	0,07
FZ69	38,03	15,74	22,29	2,11	0,23
FZ70	39,16	16,16	23,00	2,82	0,14
FZ71	37,84	15,55	22,29	2,11	0,23
FZ72	40,78	17,26	23,52	3,34	0,10

Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	Primer	IL6
				dCT (Sample)-	Relative
				dCT (STD)	Expression
FZ55 100%	23,90	15,91	7,99	0,00	1,00
FZ55 10%	26,71	19,09	7,62	-0,37	1,29
FZ55 1%	29,89	22,66	7,23	-0,76	1,69
FZ56	23,25	15,31	7,94	-0,05	1,04
FZ57	23,80	15,72	8,08	0,09	0,94
FZ58	17,22	15,31	1,91	-6,08	67,65
FZ59	18,74	15,92	2,82	-5,17	36,00
FZ60	18,75	16,14	2,61	-5,38	41,64
FZ61	21,16	17,03	4,13	-3,86	14,52
FZ62	24,50	20,28	4,22	-3,77	13,64
FZ63	20,17	15,58	4,59	-3,40	10,56
FZ64	21,24	15,60	5,64	-2,35	5,10
FZ65	21,63	15,74	5,89	-2,10	4,29
FZ66	21,32	15,49	5,83	-2,16	4,47
FZ67	21,49	15,67	5,82	-2,17	4,50
FZ68	21,72	16,09	5,63	-2,36	5,13
FZ69	21,73	15,74	5,99	-2,00	4,00
FZ70	23,47	16,16	7,31	-0,68	1,60
FZ71	23,02	15,55	7,47	-0,52	1,43
FZ72	24,69	17,26	7,43	-0,56	1,47

Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	Primer	IL10
				dCT (Sample)-	Relative
				dCT (STD)	Expression

FZ55 100%	34,90	15,91	18,99	0,00	1,00
FZ55 10%	neg	19,09	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ55 1%	neg	22,66	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ56	33,53	15,31	18,22	-0,77	1,71
FZ57	34,24	15,72	18,52	-0,47	1,39
FZ58	34,67	15,31	19,36	0,37	0,77
FZ59	35,11	15,92	19,19	0,20	0,87
FZ60	35,52	16,14	19,38	0,39	0,76
FZ61	35,11	17,03	18,08	-0,91	1,88
FZ62	35,27	20,28	14,99	-4,00	16,00
FZ63	34,51	15,58	18,93	-0,06	1,04
FZ64	36,91	15,60	21,31	2,32	0,20
FZ65	34,58	15,74	18,84	-0,15	1,11
FZ66	35,28	15,49	19,79	0,80	0,57
FZ67	34,94	15,67	19,27	0,28	0,82
FZ68	35,58	16,09	19,49	0,50	0,71
FZ69	34,47	15,74	18,73	-0,26	1,20
FZ70	34,53	16,16	18,37	-0,62	1,54
FZ71	33,69	15,55	18,14	-0,85	1,80
FZ72	35,12	17,26	17,86	-1,13	2,19

Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	Primer	IL12
				dCT (Sample)-	Relative
				dCT (STD)	Expression
FZ55 100%	32,79	15,91	16,88	0,00	1,00
FZ55 10%	38,85	19,09	19,76	2,88	0,14
FZ55 1%	neg	22,66	#WERT!	#WERT!	#WERT!
FZ56	32,07	15,31	16,76	-0,12	1,09
FZ57	31,84	15,72	16,12	-0,76	1,69
FZ58	32,57	15,31	17,26	0,38	0,77
FZ59	32,21	15,92	16,29	-0,59	1,51
FZ60	32,61	16,14	16,47	-0,41	1,33
FZ61	33,76	17,03	16,73	-0,15	1,11
FZ62	34,44	20,28	14,16	-2,72	6,59
FZ63	31,34	15,58	15,76	-1,12	2,17
FZ64	32,61	15,60	17,01	0,13	0,91
FZ65	35,80	15,74	20,06	3,18	0,11
FZ66	33,35	15,49	17,86	0,98	0,51
FZ67	33,54	15,67	17,87	0,99	0,50
FZ68	34,34	16,09	18,25	1,37	0,39
FZ69	34,55	15,74	18,81	1,93	0,26
FZ70	36,91	16,16	20,75	3,87	0,07
FZ71	34,65	15,55	19,10	2,22	0,21
FZ72	34,23	17,26	16,97	0,09	0,94

6.3. Anhang 3 – PCR, Osteosarkomzellen, Alendronat

Tabelle 4: PCR-Daten, Osteosarkomzellen, Alendronat, 4. Woche

				Primer	TNF
				dCT (Sample)-	Relative
Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	dCT (STD)	Expression
SA55100%	34,17	13,61	20,56	0,00	1,00
SA55 10%	36,12	16,63	19,49	-1,07	2,10
SA551%	neg	19,74	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA56	34,59	14,33	20,26	-0,30	1,23
SA57	35,05	13,31	21,74	1,18	0,44
SA58	33,48	16,62	16,86	-3,70	13,00
SA59	35,99	17,10	18,89	-1,67	3,18
SA60	34,94	17,15	17,79	-2,77	6,82
SA61	33,81	14,05	19,76	-0,80	1,74
SA62	35,86	14,57	21,29	0,73	0,60
SA63	34,35	14,03	20,32	-0,24	1,18
SA64	34,69	13,93	20,76	0,20	0,87
SA65	34,81	13,55	21,26	0,70	0,62
SA66	35,79	14,30	21,49	0,93	0,52
SA67	36,19	14,12	22,07	1,51	0,35
SA68	34,15	13,92	20,23	-0,33	1,26
SA69	34,48	13,70	20,78	0,22	0,86
SA70	36,05	13,80	22,25	1,69	0,31
SA71	36,41	15,10	21,31	0,75	0,59
SA72	33,73	13,74	19,99	-0,57	1,48
				Primer	IL1
				dCT (Sample)-	Relative
Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	dCT (STD)	Expression
SA55100%	neg	13,61	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA55 10%	neg	16,63	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA551%	neg	19,74	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA56	neg	14,33	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA57	neg	13,31	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA58	neg	16,62	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA59	neg	17,10	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA60	neg	17,15	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA61	neg	14,05	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA62	neg	14,57	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA63	neg	14,03	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA64	neg	13,93	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA65	neg	13,55	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA66	neg	14,30	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA67	neg	14,12	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA68	neg	13,92	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA69	neg	13,70	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA70	neg	13,80	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA71	neg	15,10	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA72	neg	13,74	#WERT!	#WERT!	#WERT!

				Primer	IL4
				dCT (Sample)-	Relative
Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	dCT (STD)	Expression
SA55100%	36,15	13,61	22,54	0,00	1,00
SA55 10%	nach 41	16,63	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA551%	nach 41	19,74	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA56	36,57	14,33	22,24	-0,30	1,23
SA57	37,31	13,31	24,00	1,46	0,36
SA58	neg	16,62	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA59	37,93	17,10	20,83	-1,71	3,27
SA60	neg	17,15	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA61	36,13	14,05	22,08	-0,46	1,38
SA62	35,61	14,57	21,04	-1,50	2,83
SA63	35,85	14,03	21,82	-0,72	1,65
SA64	35,22	13,93	21,29	-1,25	2,38
SA65	35,03	13,55	21,48	-1,06	2,08
SA66	35,19	14,30	20,89	-1,65	3,14
SA67	34,93	14,12	20,81	-1,73	3,32
SA68	35,29	13,92	21,37	-1,17	2,25
SA69	35,26	13,70	21,56	-0,98	1,97
SA70	34,44	13,80	20,64	-1,90	3,73
SA71	35,18	15,10	20,08	-2,46	5,50
SA72	35,27	13,74	21,53	-1,01	2,01
				Primer	IL6
				dCT (Sample)-	Relative
Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	dCT (STD)	Expression
SA55100%	33,64	13,61	20,03	0,00	1,00
SA55 10%	neg	16,63	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA551%	neg	19,74	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA56	31,92	14,33	17,59	-2,44	5,43
SA57	33,16	13,31	19,85	-0,18	1,13
SA58	31,33	16,62	14,71	-5,32	39,95
SA59	29,08	17,10	11,98	-8,05	265,03
SA60	29,98	17,15	12,83	-7,20	147,03
SA61	33,28	14,05	19,23	-0,80	1,74
SA62	34,15	14,57	19,58	-0,45	1,37
SA63	33,29	14,03	19,26	-0,77	1,71
SA64	33,05	13,93	19,12	-0,91	1,88
SA65	31,91	13,55	18,36	-1,67	3,18
SA66	33,29	14,30	18,99	-1,04	2,06
SA67	32,72	14,12	18,60	-1,43	2,69
SA68	32,68	13,92	18,76	-1,27	2,41
SA69	32,89	13,70	19,19	-0,84	1,79
SA70	31,55	13,80	17,75	-2,28	4,86
SA71	33,50	15,10	18,40	-1,63	3,10
SA72	34,57	13,74	20,83	0,80	0,57
				Primer	IL10
				dCT (Sample)-	Relative
Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	dCT (STD)	Expression

SA55100%		35,76	13,61	22,15	0,00	1,00
SA55 10%	neg		16,63	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA551%	neg		19,74	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA56		35,12	14,33	20,79	-1,36	2,57
SA57		36,20	13,31	22,89	0,74	0,60
SA58	neg		16,62	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA59	neg		17,10	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA60	neg		17,15	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA61		34,73	14,05	20,68	-1,47	2,77
SA62	neg		14,57	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA63	neg		14,03	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA64		36,18	13,93	22,25	0,10	0,93
SA65		35,93	13,55	22,38	0,23	0,85
SA66		36,93	14,30	22,63	0,48	0,72
SA67		36,84	14,12	22,72	0,57	0,67
SA68	neg		13,92	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA69		34,88	13,70	21,18	-0,97	1,96
SA70	neg		13,80	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA71		37,20	15,10	22,10	-0,05	1,04
SA72		35,60	13,74	21,86	-0,29	1,22
					Primer	IL12
					dCT (Sample)-	Relative
Sample	GOI CT	HKG CT	dCT	dCT (STD)	dCT (STD)	Expression
SA55100%		33,18	13,61	19,57	0,00	1,00
SA55 10%		36,51	16,63	19,88	0,31	0,81
SA551%	neg		19,74	#WERT!	#WERT!	#WERT!
SA56		32,90	14,33	18,57	-1,00	2,00
SA57		34,02	13,31	20,71	1,14	0,45
SA58		33,03	16,62	16,41	-3,16	8,94
SA59		32,47	17,10	15,37	-4,20	18,38
SA60		33,10	17,15	15,95	-3,62	12,30
SA61		35,97	14,05	21,92	2,35	0,20
SA62		34,54	14,57	19,97	0,40	0,76
SA63		35,01	14,03	20,98	1,41	0,38
SA64		34,00	13,93	20,07	0,50	0,71
SA65		33,17	13,55	19,62	0,05	0,97
SA66		34,21	14,30	19,91	0,34	0,79
SA67		34,32	14,12	20,20	0,63	0,65
SA68		33,95	13,92	20,03	0,46	0,73
SA69		35,46	13,70	21,76	2,19	0,22
SA70		33,50	13,80	19,70	0,13	0,91
SA71		33,94	15,10	18,84	-0,73	1,66
SA72		34,45	13,74	20,71	1,14	0,45

7. Literaturverzeichnis

1. Bartl, R., *Bisphosphonat-Manual: Wirkungen - Indikationen - Strategien - Trends*. . 2006, Berlin - Heidelberg; : Springer-Verlag; . 45-61
2. Abu-Id, M.H., et al., [*Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw*]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2006. **10**(2): p. 73-81.
3. Peterson, J.D. and E.H. Bedrossian, Jr., *Bisphosphonate-associated orbital inflammation--a case report and review*. *Orbit*, 2012. **31**(2): p. 119-23.
4. Susa, M., et al., *Alendronate inhibits growth of high-grade chondrosarcoma cells*. *Anticancer Res*, 2009. **29**(6): p. 1879-88.
5. Walter, C., et al., *Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells*. *Clin Oral Investig*, 2010. **14**(1): p. 35-41.
6. Fleisch, H., *Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease*. *Drugs*, 1991. **42**(6): p. 919-44.
7. Black, D.M., et al., *Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: the Fracture Intervention Trial. FIT Research Group*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(11): p. 4118-24.
8. Piesold, J.U., B. Al-Nawas, and K.A. Grotz, [*Osteonecrosis of the jaws by long term therapy with bisphosphonates*]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2006. **10**(5): p. 287-300.
9. Ito, M., et al., *Comparison of cytotoxic effects of bisphosphonates in vitro and in vivo*. *Calcif Tissue Int*, 1998. **63**(2): p. 143-7.
10. Hiraga, T., et al., *The bisphosphonate ibandronate promotes apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells in bone metastases*. *Cancer Res*, 2001. **61**(11): p. 4418-24.
11. Senaratne, S.G., et al., *Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines*. *Br J Cancer*, 2000. **82**(8): p. 1459-68.
12. Fromigue, O., L. Lagneaux, and J.J. Body, *Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro*. *J Bone Miner Res*, 2000. **15**(11): p. 2211-21.
13. Derenne, S., et al., *Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment*. *J Bone Miner Res*, 1999. **14**(12): p. 2048-56.
14. Daubine, F., et al., *Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis*. *J Natl Cancer Inst*, 2007. **99**(4): p. 322-30.
15. Journe, F., et al., *Additive growth inhibitory effects of ibandronate and antiestrogens in estrogen receptor-positive breast cancer cell lines*. *Breast Cancer Res*, 2006. **8**(1): p. R2.
16. Abu-Id, M.H., et al., "*Bis-phossy jaws*" - high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg*, 2008. **36**(2): p. 95-103.
17. Ruggiero, S.L., et al., *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update*. *J Oral Maxillofac Surg*, 2009. **67**(5 Suppl): p. 2-12.
18. Marx, R.E., *Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic*. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2003. **61**(9): p. 1115-1117.
19. Migliorati, C.A., *Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis*. *J*

- Clin Oncol, 2003. **21**(22): p. 4253-4.
20. Ruggiero, S.L., et al., *Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases*. J Oral Maxillofac Surg, 2004. **62**(5): p. 527-34.
 21. Wang, J., N.M. Goodger, and M.A. Pogrel, *Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy*. J Oral Maxillofac Surg, 2003. **61**(9): p. 1104-7.
 22. Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, A.A.o.O. and S. Maxillofacial, *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws*. J Oral Maxillofac Surg, 2007. **65**(3): p. 369-76.
 23. Gutta, R. and P.J. Louis, *Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: science and rationale*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007. **104**(2): p. 186-93.
 24. Regaud, C., *Sur la necrosis des os attente par un processus cancreux et traits par les radiations*. Compt Rend Soc Biol., 1922: p. 87:427.
 25. Marx, R.E., *Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology*. J Oral Maxillofac Surg, 1983. **41**(5): p. 283-8.
 26. Chrcanovic, B.R., et al., *Osteoradionecrosis of the jaws--a current overview--part 1: Physiopathology and risk and predisposing factors*. Oral Maxillofac Surg, 2010. **14**(1): p. 3-16.
 27. Schwartz, H.C. and A.R. Kagan, *Osteoradionecrosis of the mandible: scientific basis for clinical staging*. Am J Clin Oncol, 2002. **25**(2): p. 168-71.
 28. Durie, B.G., M. Katz, and J. Crowley, *Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates*. N Engl J Med, 2005. **353**(1): p. 99-102; discussion 99-102.
 29. Bamias, A., et al., *Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors*. J Clin Oncol, 2005. **23**(34): p. 8580-7.
 30. Badros, A., et al., *Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors*. J Clin Oncol, 2006. **24**(6): p. 945-52.
 31. Hoff, A.O., et al., *Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous bisphosphonate therapy*. ASCO Meeting Abstracts, 2006. **24**(18_suppl): p. 8528.
 32. Lin, J.H., *Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties*. Bone, 1996. **18**(2): p. 75-85.
 33. Marx, R.E., et al., *Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment*. J Oral Maxillofac Surg, 2005. **63**(11): p. 1567-75.
 34. Ruggiero, S.L., J. Fantasia, and E. Carlson, *Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **102**(4): p. 433-41.
 35. Hoff, A.O., et al. *Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous bisphosphonate therapy*. J Clin Oncol 2006 [cited 24, No. 18; Available from: [.jco.org/cgi/content/abstract/24/18_suppl/8528](http://jco.org/cgi/content/abstract/24/18_suppl/8528)].
 36. Walter, C., et al., *Prevalence and risk factors of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in prostate cancer patients with advanced disease treated with zoledronate*. Eur Urol, 2008. **54**(5): p. 1066-72.
 37. Ruggiero, S.L., et al., *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014*

- update. *J Oral Maxillofac Surg*, 2014. **72**(10): p. 1938-56.
38. Coleman, R., et al., *Safety of zoledronic acid and incidence of osteonecrosis of the jaw (ONJ) during adjuvant therapy in a randomised phase III trial (AZURE: BIG 01-04) for women with stage II/III breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **127**(2): p. 429-38.
 39. Vahtsevanos, K., et al., *Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(32): p. 5356-62.
 40. Lo, J.C., et al., *Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure*. *J Oral Maxillofac Surg*, 2010. **68**(2): p. 243-53.
 41. Grbic, J.T., et al., *The incidence of osteonecrosis of the jaw in patients receiving 5 milligrams of zoledronic acid: data from the health outcomes and reduced incidence with zoledronic acid once yearly clinical trials program*. *J Am Dent Assoc*, 2010. **141**(11): p. 1365-70.
 42. Greenberg, M.S., *Intravenous bisphosphonates and osteonecrosis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2004. **98**(3): p. 259-260.
 43. Bagan, J.V., et al., *Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases*. *J Oral Pathol Med*, 2005. **34**(2): p. 120-3.
 44. Wang, E.P., et al., *Incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma and breast or prostate cancer on intravenous bisphosphonate therapy*. *J Oral Maxillofac Surg*, 2007. **65**(7): p. 1328-31.
 45. Migliorati, C.A., K. Mattos, and M.J. Palazzolo, *How patients' lack of knowledge about oral bisphosphonates can interfere with medical and dental care*. *J Am Dent Assoc*, 2010. **141**(5): p. 562-6.
 46. Haidar, A., et al., *Bisphosphonate (zoledronic acid)-induced osteonecrosis of the jaw*. *Scand J Urol Nephrol*, 2009. **43**(6): p. 442-4.
 47. Grötz, K.A., J.U. Piesold, and B. Al-Nawas, *Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose (BP-ONJ) und andere Medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen*. AWMF online, 2012: p. .
 48. Walter, C., et al., *Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients*. *Head Face Med*, 2010. **6**: p. 11.
 49. Roelofs, A.J., et al., *Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(20 Pt 2): p. 6222s-6230s.
 50. Baron, R., S. Ferrari, and R.G. Russell, *Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects*. *Bone*, 2011. **48**(4): p. 677-92.
 51. Lacey, D.L., et al., *Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(5): p. 401-19.
 52. Russell, R.G. and M.J. Rogers, *Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again*. *Bone*, 1999. **25**(1): p. 97-106.
 53. Russell, R.G., et al., *Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy*. *Osteoporos Int*, 2008. **19**(6): p. 733-59.
 54. Mashiba, T., et al., *The effects of suppressed bone remodeling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib*. *J Bone Miner Metab*, 2005. **23 Suppl**: p. 36-42.
 55. Huja, S.S., et al., *Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs*. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2006. **288**(12): p. 1243-9.
 56. Zaki, A.E. and G. Vanhuysen, *Histology of the Periodontium Following Tooth*

- Movement*. J Dent Res, 1963. **42**: p. 1373-9.
57. Allen, M.R. and D.B. Burr, *The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data*. J Oral Maxillofac Surg, 2009. **67**(5 Suppl): p. 61-70.
 58. Allen, M.R. and D.B. Burr, *Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment*. J Oral Maxillofac Surg, 2008. **66**(5): p. 987-94.
 59. Hansen, T., et al., *Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates - histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis*. J Oral Pathol Med, 2006. **35**(3): p. 155-60.
 60. Sedghizadeh, P.P., et al., *Microbial biofilms in osteomyelitis of the jaw and osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy*. J Am Dent Assoc, 2009. **140**(10): p. 1259-65.
 61. Sedghizadeh, P.P., et al., *Metagenomic investigation of microbes and viruses in patients with jaw osteonecrosis associated with bisphosphonate therapy*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2012. **114**(6): p. 764-70.
 62. Wanger, G., et al., *Electrically conductive bacterial nanowires in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw biofilms*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2013. **115**(1): p. 71-8.
 63. Kos, M., et al., *Pamidronate enhances bacterial adhesion to bone hydroxyapatite. Another puzzle in the pathology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw?* J Oral Maxillofac Surg, 2013. **71**(6): p. 1010-6.
 64. Fournier, P., et al., *Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats*. Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6538-44.
 65. Wood, J., et al., *Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(3): p. 1055-61.
 66. Bezzi, M., et al., *Zoledronate sensitizes endothelial cells to tumor necrosis factor-induced programmed cell death: evidence for the suppression of sustained activation of focal adhesion kinase and protein kinase B/Akt*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43603-14.
 67. Santini, D., et al., *Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(8): p. 2893-7.
 68. Vincenzi, B., et al., *Zoledronic acid-related angiogenesis modifications and survival in advanced breast cancer patients*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(3): p. 144-51.
 69. Rygh, P., *Ultrastructural vascular changes in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic movement*. Scand J Dent Res, 1972. **80**(4): p. 307-21.
 70. Reid, I.R., M.J. Bolland, and A.B. Grey, *Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity?* Bone, 2007. **41**(3): p. 318-20.
 71. Reszka, A.A., J. Halasy-Nagy, and G.A. Rodan, *Nitrogen-bisphosphonates block retinoblastoma phosphorylation and cell growth by inhibiting the cholesterol biosynthetic pathway in a keratinocyte model for esophageal irritation*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(2): p. 193-202.
 72. Landesberg, R., et al., *Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates*. J Oral Maxillofac Surg, 2008. **66**(5): p. 839-47.
 73. Simon, M.J., et al., *Expression profile and synthesis of different collagen types*

- I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment.* Clin Oral Investig, 2010. **14**(1): p. 51-8.
74. Acil, Y., et al., *The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells.* J Craniomaxillofac Surg, 2012. **40**(8): p. e229-35.
 75. Migliorati, C.A., et al., *Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates in cancer: a narrative review.* Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(1): p. 34-42.
 76. Kikuri, T., et al., *Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice.* J Bone Miner Res, 2010. **25**(7): p. 1668-79.
 77. Bi, Y., et al., *Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice.* Am J Pathol, 2010. **177**(1): p. 280-90.
 78. Lopez-Jornet, P., et al., *Perioperative antibiotic regimen in rats treated with pamidronate plus dexamethasone and subjected to dental extraction: a study of the changes in the jaws.* J Oral Maxillofac Surg, 2011. **69**(10): p. 2488-93.
 79. Dearden, W.F., *The causation of phosphorus necrosis.* . BMJ, 1901. **2**: p. 408-410
 80. Miles, A.E., *Phosphorus necrosis of the jaw: 'phossy jaw'.* Br Dent J, 1972. **133**(5): p. 203-6.
 81. Simon, J., *Fifth Report of the Medical Officer of the Privy Council.* 1863, H.M.S.O.: London.
 82. Thorpe, T.E., T. Oliver, and G. Cunningham, *Report on the use of phosphorus in manufactur of Lucifer Matches.* 1899 H.M.S.O.: London.
 83. Hughes, J.P., et al., *Phosphorus necrosis of the jaw: a present-day study.* Br J Ind Med, 1962. **19**: p. 83-99.
 84. Hunter, D., *the deseases of Occupations in English Univ. Press.* 1969 London. p. pp. 127, 374-383.
 85. Fleisch, H., *Development of bisphosphonates.* Breast Cancer Res, 2002. **4**(1): p. 30-4.
 86. Fleisch, H., *Experimental basis for the use of bisphosphonates in Paget's disease of bone.* Clin Orthop Relat Res, 1987(217): p. 72-8.
 87. Russell, R.G., et al., *The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action.* J Bone Miner Res, 1999. **14 Suppl 2**: p. 53-65.
 88. Senzaki, H., et al., *Alendronate inhibits urinary calcium microlith formation in a three-dimensional culture model.* Urol Res, 2004. **32**(3): p. 223-8.
 89. Luckman, S.P., et al., *Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages.* J Bone Miner Res, 1998. **13**(11): p. 1668-78.
 90. Rogers, M.J., et al., *Bisphosphonates are incorporated into adenine nucleotides by human aminoacyl-tRNA synthetase enzymes.* Biochem Biophys Res Commun, 1996. **224**(3): p. 863-9.
 91. Frith, J.C., et al., *Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro.* J Bone Miner Res, 1997. **12**(9): p. 1358-67.
 92. Luckman, S.P., et al., *Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras.* J Bone Miner Res, 1998. **13**(4): p. 581-9.

93. Dunford, J.E., et al., *Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **296**(2): p. 235-42.
94. van Beek, E., et al., *Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **264**(1): p. 108-11.
95. Bergstrom, J.D., et al., *Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase*. Arch Biochem Biophys, 2000. **373**(1): p. 231-41.
96. Lane, K.T. and L.S. Beese, *Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I*. J Lipid Res, 2006. **47**(4): p. 681-99.
97. Thompson, K., et al., *Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(5): p. 1624-32.
98. Xing, L. and B.F. Boyce, *Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(3): p. 709-20.
99. Amin, D., et al., *Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis*. J Lipid Res, 1992. **33**(11): p. 1657-63.
100. Zhang, F.L. and P.J. Casey, *Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 241-69.
101. Coxon, F.P., et al., *Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(8): p. 1467-76.
102. Fleisch, H., *Bisphosphonates in osteoporosis*. Eur Spine J, 2003. **12 Suppl 2**: p. S142-6.
103. Scriba, G.K., *[Bisphosphonates in review]*. Pharm Unserer Zeit, 2000. **29**(1): p. 50-6.
104. Rogers, M.J., *New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(32): p. 2643-58.
105. Masarachia, P., et al., *Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones*. Bone, 1996. **19**(3): p. 281-90.
106. Adamson, B.B., et al., *Mineralisation defects with pamidronate therapy for Paget's disease*. Lancet, 1993. **342**(8885): p. 1459-60.
107. Sato, M., et al., *Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure*. J Clin Invest, 1991. **88**(6): p. 2095-105.
108. Jung, A., S. Bisaz, and H. Fleisch, *The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals*. Calcif Tissue Res, 1973. **11**(4): p. 269-80.
109. Coxon, F.P., et al., *Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells*. Bone, 2008. **42**(5): p. 848-60.
110. Benford, H.L., et al., *Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro*. Bone, 2001. **28**(5): p. 465-73.
111. Hughes, D.E., et al., *Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo*. J Bone Miner Res, 1995. **10**(10): p. 1478-87.
112. Monkkonen, H., et al., *The cellular uptake and metabolism of clodronate in RAW 264 macrophages*. Pharm Res, 2001. **18**(11): p. 1550-5.

113. Rogers, M.J., et al., *Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells in vitro by a nitric oxide-independent mechanism*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(10): p. 1482-91.
114. Fischer, B.A., S. Mundle, and A.A. Cole, *Tumor necrosis factor-alpha induced DNA cleavage in human articular chondrocytes may involve multiple endonucleolytic activities during apoptosis*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(3): p. 236-42.
115. Reszka, A.A., et al., *Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 34967-73.
116. Ito, M., et al., *Ultrastructural and cytochemical studies on cell death of osteoclasts induced by bisphosphonate treatment*. Bone, 1999. **25**(4): p. 447-52.
117. Schmidt, A., et al., *Protein-tyrosine phosphatase activity regulates osteoclast formation and function: inhibition by alendronate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 3068-73.
118. Sato, M. and W. Grasser, *Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy*. J Bone Miner Res, 1990. **5**(1): p. 31-40.
119. van Beek, E.R., C.W. Lowik, and S.E. Papapoulos, *Effect of alendronate treatment on the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in mice*. Bone, 1997. **20**(4): p. 335-40.
120. Sietsema, W.K., et al., *Antiresorptive dose-response relationships across three generations of bisphosphonates*. Drugs Exp Clin Res, 1989. **15**(9): p. 389-96.
121. Colucci, S., et al., *Alendronate reduces adhesion of human osteoclast-like cells to bone and bone protein-coated surfaces*. Calcif Tissue Int, 1998. **63**(3): p. 230-5.
122. D'Amelio, P., et al., *Risedronate reduces osteoclast precursors and cytokine production in postmenopausal osteoporotic women*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(3): p. 373-9.
123. Rodan, G.A. and H.A. Fleisch, *Bisphosphonates: mechanisms of action*. J Clin Invest, 1996. **97**(12): p. 2692-6.
124. Rogers, M.J., D.J. Watts, and R.G. Russell, *Overview of bisphosphonates*. Cancer, 1997. **80**(8 Suppl): p. 1652-60.
125. Hughes, D.E., et al., *Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow*. J Clin Invest, 1989. **83**(6): p. 1930-5.
126. Cecchini, M.G., et al., *Effect of bisphosphonates on proliferation and viability of mouse bone marrow-derived macrophages*. J Bone Miner Res, 1987. **2**(2): p. 135-42.
127. Lowik, C.W., et al., *Migration and phenotypic transformation of osteoclast precursors into mature osteoclasts: the effect of a bisphosphonate*. J Bone Miner Res, 1988. **3**(2): p. 185-92.
128. Evans, C.E. and I.P. Braidman, *Effects of two novel bisphosphonates on bone cells in vitro*. Bone Miner, 1994. **26**(2): p. 95-107.
129. Rodan, G.A., *Mechanisms of action of bisphosphonates*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998. **38**: p. 375-88.
130. Lin, J.H., et al., *Physiological disposition of alendronate, a potent anti-*

- osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. Drug Metab Dispos, 1991. 19(5): p. 926-32.*
131. Yu, X., J. Scholler, and N.T. Foged, *Interaction between effects of parathyroid hormone and bisphosphonate on regulation of osteoclast activity by the osteoblast-like cell line UMR-106. Bone, 1996. 19(4): p. 339-45.*
 132. Polson, A.M., S.W. Meitner, and H.A. Zander, *Trauma and progression of marginal periodontitis in squirrel monkeys. III Adaption of interproximal alveolar bone to repetitive injury. J Periodontal Res, 1976. 11(5): p. 279-89.*
 133. Boonekamp, P.M., et al., *Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. Bone Miner, 1986. 1(1): p. 27-39.*
 134. Vitte, C., H. Fleisch, and H.L. Guenther, *Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. Endocrinology, 1996. 137(6): p. 2324-33.*
 135. Sahni, M., et al., *Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. J Clin Invest, 1993. 91(5): p. 2004-11.*
 136. Nishikawa, M., et al., *Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. Bone, 1996. 18(1): p. 9-14.*
 137. Bonewald, L.F. and S.L. Dallas, *Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. J Cell Biochem, 1994. 55(3): p. 350-7.*
 138. Olney, R.C., *Regulation of bone mass by growth hormone. Med Pediatr Oncol, 2003. 41(3): p. 228-34.*
 139. Buck, D.W., 2nd and G.A. Dumanian, *Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. Plast Reconstr Surg, 2012. 129(6): p. 1314-20.*
 140. Teitelbaum, S.L., *Bone resorption by osteoclasts. Science, 2000. 289(5484): p. 1504-8.*
 141. Aubin, J.E. and E. Bonnellye, *Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. Osteoporos Int, 2000. 11(11): p. 905-13.*
 142. Ezra, A. and G. Golomb, *Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption. Adv Drug Deliv Rev, 2000. 42(3): p. 175-95.*
 143. Mashiba, T., et al., *Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. J Bone Miner Res, 2000. 15(4): p. 613-20.*
 144. Chen, T., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. J Clin Pharmacol, 2002. 42(11): p. 1228-36.*
 145. Lin, J.H., G. Russell, and B. Gertz, *Pharmacokinetics of alendronate: an overview. Int J Clin Pract Suppl, 1999. 101: p. 18-26.*
 146. Monkkonen, J., H.M. Koponen, and P. Ylitalo, *Comparison of the distribution of three bisphosphonates in mice. Pharmacol Toxicol, 1990. 66(4): p. 294-8.*
 147. Gasser, A.B., et al., *The influence of two diphosphonates on calcium metabolism in the rat. Clin Sci, 1972. 43(1): p. 31-45.*
 148. Fleisch, H., *Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. Recent Results Cancer Res, 1989. 116: p. 1-28.*
 149. Gierloff, M., et al., *Effects of zoledronate on the radiation-induced collagen breakdown: a prospective randomized clinical trial. Clin Transl Oncol, 2015. 17(6): p. 454-61.*
 150. Russell, R.G., *Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. Pediatrics, 2007. 119 Suppl 2: p. S150-62.*

151. Bijvoet, O.L., et al., *APD in Paget's disease of bone. Role of the mononuclear phagocyte system?* Arthritis Rheum, 1980. **23**(10): p. 1193-204.
152. Adami, S., et al., *The acute-phase response after bisphosphonate administration.* Calcif Tissue Int, 1987. **41**(6): p. 326-31.
153. Adami, S. and N. Zamberlan, *Adverse effects of bisphosphonates. A comparative review.* Drug Saf, 1996. **14**(3): p. 158-70.
154. Diel, I.J., R. Bergner, and K.A. Grotz, *Adverse effects of bisphosphonates: current issues.* J Support Oncol, 2007. **5**(10): p. 475-82.
155. Berenson, J.R., *Advances in the biology and treatment of myeloma bone disease.* Semin Oncol, 2002. **29**(6 Suppl 17): p. 11-6.
156. Gysling, E., *Zytokine. pharma-kritik*, 2009. **5**: p. 20-21.
157. Wolf, H.F. and e. al, *Farbatlanten der Zahnmedizin - Parodontologie.* Vol. 3. . 2003: Thieme.
158. Fleisch, H., *Bisphosphonates in Bone Disease: From the Laboratory to the Patient.* . Academic Press, San Diego London, 2000. **4th ed.** .
159. Papachroni, K.K., et al., *Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease.* Trends Mol Med, 2009. **15**(5): p. 208-16.
160. Acil, Y., et al., *Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral.* J Biomed Mater Res, 2000. **51**(4): p. 703-10.
161. Acil, Y., et al., *Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials.* J Cell Biochem, 2002. **86**(1): p. 90-8.
162. Roche, *Cell Proliferation Kit I (MTT).* Roche Applied Science, 2005.
163. Qiagen, *RNeasy-Plus-Mini-Handbook.* QIAGEN Sample and Assay Technologies, 2010.
164. Qiagen, *QuantiTect-Reverse-Transcription-Handbook.* QIAGEN Sample and Assay Technologies, 2009.
165. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
166. Qiagen, *QuantiTect-SYBR-Green-PCR-Handbook.* QIAGEN Sample and Assay Technologies, 2011.
167. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.* Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026-30.
168. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits.* J Biotechnol, 1999. **75**(2-3): p. 291-5.
169. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.* J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
170. Bustin, S.A., *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.* J Mol Endocrinol, 2002. **29**(1): p. 23-39.
171. Ficarra, G., et al., *Osteonecrosis of the jaws in periodontal patients with a history of bisphosphonates treatment.* J Clin Periodontol, 2005. **32**(11): p. 1123-8.
172. Felsenberg, D., et al., *Kiefernekrosen nach hoch dosierter Bisphosphonattherapie.* Deutsches Ärzteblatt, 2006. **46**: p. A3078 - A3080.
173. Novartis, *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION.* 2009.
174. *Abstracts of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) 89th Annual Meeting, October 8-13, 2007, Honolulu, Hawaii.* J Oral Maxillofac Surg, 2007. **65**(9 Suppl 2): p. 1-118.

175. Pazianas, M., et al., *A review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis treated with oral bisphosphonates: prevalence, risk factors, and clinical characteristics*. Clin Ther, 2007. **29**(8): p. 1548-58.
176. Madrid, C. and M. Sanz, *What impact do systemically administered bisphosphonates have on oral implant therapy? A systematic review*. Clin Oral Implants Res, 2009. **20 Suppl 4**: p. 87-95.
177. Shin, E.Y., et al., *Implant failure associated with oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw*. J Periodontal Implant Sci, 2010. **40**(2): p. 90-5.
178. Kos, M., et al., *Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a review of 34 cases and evaluation of risk*. J Craniomaxillofac Surg, 2010. **38**(4): p. 255-9.
179. Bedogni, A., et al., *Oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw after implant surgery: a case report and literature review*. J Oral Maxillofac Surg, 2010. **68**(7): p. 1662-6.
180. Woodward, J.K., et al., *Combined effects of zoledronic acid and doxorubicin on breast cancer cell invasion in vitro*. Anticancer Drugs, 2005. **16**(8): p. 845-54.
181. Basso, F.G., et al., *Low-level laser therapy for osteonecrotic lesions: effects on osteoblasts treated with zoledronic acid*. Support Care Cancer, 2014. **22**(10): p. 2741-8.
182. Ishtiaq, S., et al., *The effect of nitrogen containing bisphosphonates, zoledronate and alendronate, on the production of pro-angiogenic factors by osteoblastic cells*. Cytokine, 2015. **71**(2): p. 154-60.
183. Manzano-Moreno, F.J., et al., *High doses of bisphosphonates reduce osteoblast-like cell proliferation by arresting the cell cycle and inducing apoptosis*. J Craniomaxillofac Surg, 2015. **43**(3): p. 396-401.
184. Coxon, J.P., et al., *Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation*. BJU Int, 2004. **94**(1): p. 164-70.
185. Denoyelle, C., et al., *New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects*. Br J Cancer, 2003. **88**(10): p. 1631-40.
186. Giuliani, N., et al., *Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo*. Bone, 1998. **22**(5): p. 455-61.
187. Skerjanec, A., et al., *The pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with varying degrees of renal function*. J Clin Pharmacol, 2003. **43**(2): p. 154-62.
188. Scheper, M.A., et al., *A novel bioassay model to determine clinically significant bisphosphonate levels*. Support Care Cancer, 2009. **17**(12): p. 1553-7.
189. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
190. Rotman, B. and B.W. Papermaster, *Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. **55**(1): p. 134-41.
191. Twagira, M.F., et al., *Development of a real-time PCR assay on the Roche Light-Cycler for the detection of erm and mef erythromycin resistance genes in beta-haemolytic streptococci*. J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(4): p. 793-4.

192. Adwan, H., et al., *Decreased levels of osteopontin and bone sialoprotein II are correlated with reduced proliferation, colony formation, and migration of GFP-MDA-MB-231 cells*. *Int J Oncol*, 2004. **24**(5): p. 1235-44.
193. Walter, C., et al., *Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro*. *Oral Dis*, 2011. **17**(2): p. 194-9.
194. Mackie, P.S., et al., *Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line*. *Br J Cancer*, 2001. **84**(7): p. 951-8.
195. Bukowski, J.F., C.C. Dascher, and H. Das, *Alternative bisphosphonate targets and mechanisms of action*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **328**(3): p. 746-50.
196. Reinholz, G.G., et al., *Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts*. *Cancer Res*, 2000. **60**(21): p. 6001-7.
197. Pan, B., et al., *The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro*. *Bone*, 2004. **34**(1): p. 112-23.
198. Im, G.I., et al., *Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates*. *Biomaterials*, 2004. **25**(18): p. 4105-15.
199. Viereck, V., et al., *Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **291**(3): p. 680-6.
200. Garcia-Moreno, C., et al., *Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts*. *Bone*, 1998. **22**(3): p. 233-9.
201. Plotkin, L.I., et al., *Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(10): p. 1363-74.
202. Walter, C., et al., *Der Einfluss von Bisphosphonaten auf die Apoptoserate von Endothelzellen, Fibroblasten und Osteoblasten*. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie*, 2010. **7**(02): p. A184.
203. Cozin, M., et al., *Novel therapy to reverse the cellular effects of bisphosphonates on primary human oral fibroblasts*. *J Oral Maxillofac Surg*, 2011. **69**(10): p. 2564-78.
204. Wittrant, Y., et al., *RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1704**(2): p. 49-57.
205. Naidu, A., et al., *The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2008. **106**(1): p. 5-13.
206. *drug safety update*. MHRA CHM, 2009. **2**(8).
207. Chang, J., et al., *Bisphosphonates regulate cell proliferation, apoptosis and pro-osteoclastic expression in MG-63 human osteosarcoma cells*. *Oncol Lett*, 2012. **4**(2): p. 299-304.
208. Grimaud, E., et al., *Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(5): p. 2021-31.
209. Zhang, J., et al., *Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(10): p. 1235-44.
210. Ishikawa, C., et al., *Bisphosphonate incadronate inhibits growth of human T-cell leukaemia virus type I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukaemia cells by interfering with the mevalonate pathway*. *Br J Haematol*,

2007. **136**(3): p. 424-32.
211. Caraglia, M., et al., *Emerging anti-cancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13**(1): p. 7-26.
 212. Ory, B., et al., *Zoledronic acid activates the DNA S-phase checkpoint and induces osteosarcoma cell death characterized by apoptosis-inducing factor and endonuclease-G translocation independently of p53 and retinoblastoma status*. *Mol Pharmacol*, 2007. **71**(1): p. 333-43.
 213. Kim, J.Y., et al., *Atorvastatin inhibits osteoclastogenesis by decreasing the expression of RANKL in the synoviocytes of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2012. **14**(4): p. R187.
 214. Ohba, T., et al., *Bisphosphonates inhibit osteosarcoma-mediated osteolysis via attenuation of tumor expression of MCP-1 and RANKL*. *J Bone Miner Res*, 2014. **29**(6): p. 1431-45.
 215. Cao, J.J., *Effects of obesity on bone metabolism*. *J Orthop Surg Res*, 2011. **6**: p. 30.
 216. Sanders, J.L., et al., *Alendronate/interleukin-1beta cotreatment increases interleukin-6 in bone and UMR-106 cells: dose dependence and relationship to the antiresorptive effect of alendronate*. *J Bone Miner Res*, 1998. **13**(5): p. 786-92.
 217. Pietschmann, P., et al., *The effect of alendronate on cytokine production, adhesion molecule expression, and transendothelial migration of human peripheral blood mononuclear cells*. *Calcif Tissue Int*, 1998. **63**(4): p. 325-30.
 218. Darnay, B.G. and B.B. Aggarwal, *Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations*. *J Leukoc Biol*, 1997. **61**(5): p. 559-66.
 219. Gordon, J.R. and S.J. Galli, *Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin*. *Nature*, 1990. **346**(6281): p. 274-6.
 220. Vangsted, A.J., et al., *Single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the IL1B gene influence outcome in multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy independently of relapse treatment with thalidomide and bortezomib*. *Ann Hematol*, 2011. **90**(10): p. 1173-81.
 221. Sati, H.I., et al., *Expression of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in plasma cells from patients with multiple myeloma*. *Br J Haematol*, 1999. **104**(2): p. 350-7.
 222. Tsao, C., et al., *Oral health risk factors for bisphosphonate-associated jaw osteonecrosis*. *J Oral Maxillofac Surg*, 2013. **71**(8): p. 1360-6.
 223. Lichtenstein, A., et al., *Production of cytokines by bone marrow cells obtained from patients with multiple myeloma*. *Blood*, 1989. **74**(4): p. 1266-73.
 224. Pennanen, N., et al., *Effect of liposomal and free bisphosphonates on the IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from RAW 264 cells in vitro*. *Pharm Res*, 1995. **12**(6): p. 916-22.
 225. Sun, J., et al., *Bioinformatics analyses of differentially expressed genes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma*. *Onco Targets Ther*, 2015. **8**: p. 2681-8.
 226. Deng, X., et al., *Alendronate augments interleukin-1beta release from macrophages infected with periodontal pathogenic bacteria through activation of caspase-1*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **235**(1): p. 97-104.
 227. Thiebaud, D., et al., *An in vitro and in vivo study of cytokines in the acute-phase response associated with bisphosphonates*. *Calcif Tissue Int*, 1997. **61**(5): p. 386-92.

228. Bost, K.L., et al., *Staphylococcus aureus* infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *J Infect Dis*, 1999. **180**(6): p. 1912-20.
229. Marriott, I., et al., *Osteoblasts express the inflammatory cytokine interleukin-6 in a murine model of Staphylococcus aureus osteomyelitis and infected human bone tissue*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(4): p. 1399-406.
230. Lew, D.P. and F.A. Waldvogel, *Osteomyelitis*. *N Engl J Med*, 1997. **336**(14): p. 999-1007.
231. Manetti, R., et al., *Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells*. *J Exp Med*, 1993. **177**(4): p. 1199-204.
232. D'Andrea, A., et al., *Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells*. *J Exp Med*, 1992. **176**(5): p. 1387-98.
233. Nicolatou-Galitis, O., et al., *Osteonecrosis of the jaw in oncology patients treated with bisphosphonates: prospective experience of a dental oncology referral center*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2011. **112**(2): p. 195-202.

7. Danksagungen

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Y. Açil für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Dissertation zu verfassen. Auf seine Unterstützung als Ansprechpartner konnte ich mich stets verlassen. Seine zügigen Korrekturen mit aufmunternden Worten habe ich sehr geschätzt.

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang möchte ich für Bereitstellung der räumlichen und finanziellen Mittel danken, die diese Arbeit an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel ermöglichten.

Einen herzlichen Dank möchte ich Frau G. Refrath aussprechen, die mir die Arbeiten im Labor ausführlich erläuterte, mich tatkräftig bei den Experimenten unterstützte und für meine Fragen ein offenes Ohr hatte.

Bei Herrn J. Hedderich vom Institut für medizinische Informatik und Statistik am Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel bedanke ich mich ebenfalls für die Beratung und Hilfe.

Meinen Eltern, Geschwistern, meinem Freund, Freunden und Chuck Norris danke ich für die Unterstützung, das ständige Korrekturlesen, Zuhören und die Ablenkung. Sie waren mir eine große Hilfe während des Studiums, der Dissertation und in weiteren Lebenslagen, wofür ich sehr dankbar bin.

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt und verfasst habe, dass alle Hilfsmittel und sonstigen Hilfen angegeben und dass alle Stellen, die ich wörtlich oder dem Sinne nach aus anderen Veröffentlichungen entnommen habe, kenntlich gemacht worden sind;

Die Dissertation ist in der vorgelegten oder einer ähnlichen Fassung noch nicht zu einem früheren Zeitpunkt an der Christian-Albrechts-Universität Kiel oder einer anderen in- oder ausländischen Hochschule als Dissertation eingereicht worden.