

Aus der Klinik und Poliklinik für
Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
– plastische Operationen –
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Andreas Neff

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Untersuchung zum Einfluss verschiedener Bisphosphonate auf
die Zellviabilität und Migrationsfähigkeit von Osteoblasten,
Fibroblasten, HUVEC und EPC sowie ihrer Beeinflussung
durch Geranyl-Geraniol-Substitution**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Zahnmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Christine Lux
aus Frankfurt am Main
Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 14.03.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. Dr. Thomas Ziebart

1. Koreferentin: Frau Prof. Dr. Christine Knabe-Ducheyne

Inhaltsverzeichnis

Glossar der verwendeten Abkürzungen	V
Abbildungsverzeichnis & Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Allgemeine Einleitung	1
1.2 Ziel der Dissertation	2
2. Literaturdiskussion	3
2.1 Knochenstoffwechsel.....	3
2.2 Bisphosphonate	4
2.2.1 Geschichte der Bisphosphonate.....	4
2.2.2 Chemie und Pharmakologie der Bisphosphonate	5
2.2.3 Indikationsspektrum der Bisphosphonate.....	6
2.2.4 Nebenwirkungen und Komplikationen von Bisphosphonaten.....	8
2.2.5 Angiogenese und antiangiogenetische Effekte der Bisphosphonate.....	12
2.2.6 Die extraskelettale Wirkung der Bisphosphonate	14
2.3 Bisphosphonat assoziierte Kiefernekrose (BP-ONJ)	15
2.4 Die Wirkung der Bisphosphate auf den Mevalonatstoffwechsel.....	22
2.5 Fragestellung	24
3. Material und Methoden.....	25
3.1 Material	25
3.1.1 Verwendete Zelllinien	25
3.1.2 Zellkulturmedien	26
3.2 Methoden.....	27
3.2.1 Isolierungs- und Kultivierungsmethoden der Zellen.....	27
3.2.2 Messmethoden	30
3.3 Statistische Auswertung.....	36
4. Ergebnisse	37
4.1 Beeinflussung der Migrationsfähigkeit durch Bisphosphonate	37
4.1.1 Migrationsassay der Bisphosphonate auf Humane Osteoblasten (HOB).....	37
4.1.2 Migrationsassay der Bisphosphonate auf Fibroblasten (NHDF)....	38
4.1.3 Migrationsassay der Bisphosphonate auf Nabelschnurepithelzellen (HUVEC).....	40

4.1.4	Migrationsassay der Bisphosphonate auf endotheliale Progenitorzellen (EPC).....	42
4.2	Die Beeinflussung des „Colony formings“ der EPC	44
4.3	Die Beeinflussung der Zellviabilität durch Bisphosphonate im MTT-Assay.....	46
4.3.1	MTT-Assay mit NHDF.....	46
4.3.2	MTT Assay mit HUVEC	48
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	50
5.	Diskussion	51
5.1	Beeinflussung der Knochenhomöostase durch Bisphosphonate	51
5.2	Extraskelettale Wirkung der Bisphosphonate	52
5.2.1	Wirkung der Bisphosphonate auf die Weichgewebe	53
5.2.2	Wirkung der Bisphosphonate auf die Angiogenese.....	54
5.3	Diskussion der Ergebnisse in Kontext zur Pathogenese der BP-ONJ.....	56
5.4	Einfluss der Geranyl-Geraniol-Gabe auf die Wirkung der Bisphosphonate und ihr therapeutisches Potential.....	61
6.	Zusammenfassung.....	65
7.	Conclusion.....	68
8.	Literaturverzeichnis	70
9.	Appendix	80
9.1	Curriculum vitae	80
9.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	81
9.3	Danksagung.....	82
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung.....	84

Glossar der verwendeten Abkürzungen

AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
AAOMS	American Association of Oral and Maxillofacial Surgery
ANOVA	Analysis of variance
APR	Akute Phase Reaktion
ATP	Adenosin Triphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft Wissenschaftlicher Medizinischer Fachgesellschaften
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BP-ONJ	Bisphosphonat osteonecrosis of the jaw – Bisphosphonat assoziierte Kiefernekrose
CD	Cluster of Differentiation
CFC	Colony Forming Assay
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
CO ₂	Chemische Abkürzung von Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
EGF	Epidermal Growth Factor
EPC	Endotheliale Progenitor Zellen
FCS	Fetal Calf Serum
FPP	Farnesylpyrophosphat
GG	Geranyl-Geraniol
GGPP	Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat
HCl	Chemische Abkürzung für Salzsäure
hEGF	Human epithelial growth factor
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HOB	Humane Osteoblasten
HUVEC	Human umbilicord vein endothelial cells - Nabelschnurendothelzellen
IFN-Gamma	Interferon-Gamma
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
M-CSF	monocyte/macrophage colony–stimulating factor
MSC	Mesenchymale Stammzellen

INHALTSVERZEICHNIS

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamidadeninukleotid
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NH ₂	Chemische Abkürzung primäres Amin
NH ₃ ⁺	Chemische Abkürzung protoniertes Amin
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor κB
TNF-Alpha	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Abbildungen & Tabellenverzeichnis

Abbildung	Inhalt
01	Klinisches Bild Bisphosphonat assoziierte Kiefernekrose
02	Schematische Darstellung der multifaktoriellen Genese der BP-ONJ
03	Darstellung der Stadieneinteilung der BP-ONJ der AAOMS
04	Schematische Darstellung des Versuchaufbaus des Migrationsassays nach Boyden
05	Darstellung der reduktiven Spaltung im MTT-Assay
06	Schematische Darstellung des Colony Forming Assays
07	Ergebnisse Migrationsassay Humane Osteoblasten
08	Ergebnisse Migrationsassay Fibroblasten (NHDF)
09	Ergebnisse Migrationsassay Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)
10	Ergebnisse Migrationsassay Endotheliale Progenitorzellen (EPC)
11	Ergebnisse Colony Forming unit Assay der endothelialen Vorläuferzellen (EPC)
12	Ergebnisse MTT-Assay der Fibroblasten (NHDF)
13	Ergebnisse MTT-Assay der Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)

Tabelle	Inhalt
01	Tabellarische Zusammenfassung der Bisphosphonatnebenwirkungen
02	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Bisphosphonate sind osteoanabole Substanzen auf der chemischen Basis des Pyrophosphat. Ihr wesentliches Einsatzspektrum ist die Osteoporose, das Multiple Myelom, der Morbus Paget, Knochentumore und osteolytische Knochenmetastasen. Ihre hauptsächliche Wirkung besteht in der Hemmung bzw. Verlangsamung des „bone remodellings“ durch Inhibition der knochenabbauenden Osteoklasten.

Im Rahmen des vermehrten klinischen Einsatzes konnten potentielle Nebenwirkungen einer Bisphosphonattherapie festgestellt werden. Neben der erstmalig 1996 publizierte Nebenwirkung der Ösophagitis stellt vor allem die Bisphosphonat-assoziierte Unterkiefernekrose (BP-ONJ) ein relevantes klinisches Krankheitsbild dar, dessen Ätiologie und Pathogenese bis heute noch nicht hinreichend geklärt ist. Die Erstbeschreibung erfolgte durch Marx und Stern 2002 und durch Marx und Kollegen im Jahre 2003 in Form eines Auftretens von 36 „bony lesions of the upper and lower jaw“ [Marx 2002, Marx 2003].

Ein für die BP-ONJ typisches klinisches Symptom ist die Exposition von freiliegendem nekrotischen Knochen der Kiefer. Dieser ist nicht von Mundschleimhaut bedeckt und heilt meist nur verzögert oder gar nicht aus. In Anlehnung an diese klinische Symptomatik konnte in weiteren Studien festgestellt werden, dass Bisphosphonate einen depressiven Einfluss auf die Wundheilung der Mundschleimhaut und den hierbei beteiligten Zellen der Keratinozyten und Fibroblasten hat [Scheller et al. 2011, Pabst et al. 2012]. Auch die im Rahmen der Wundheilung essentielle Vaskularisierung mit Einsprossung von Kapillaren wird durch Bisphosphonate beeinflusst. Dieser für die nutritive Versorgung der Geweberegeneration entscheidende Schritt wird durch den antiangiogenetischen Effekt von Bisphosphonaten gehemmt. Hierbei konnten nicht nur direkte inhibitorische Einflüsse auf Endothelzellproliferation [Ribatti et al. 2008] sondern auch eine Reduktion des VEGF-Spiegels [Santini et al. 2003] festgestellt werden.

Trotz zahlreicher Untersuchungen über therapeutische Optionen zur Behandlung der BP-ONJ geht die Suche nach einer adäquaten kurativen Therapie weiter [Ruggiero et al. 2008]. Hierbei nimmt das Diterpenem Geranyl-Geraniol (GG), das als Metabolit im Mevalonat-Stoffwechsel vorkommt, eine zentrale Stellung ein. Mittels Substitution von Geranyl-Geraniol kann der inhibitorische Einfluss der

Bisphosphonate auf die Hemmung von Enzymen des Mevalonat-Stoffwechsels verringert werden [Ziebart et al. 2011].

1.2 Ziel der Dissertation

Durch die vorliegende Arbeit soll der Einfluss von verschiedenen Bisphosphonaten auf die Osteoblasten sowie auf die an der Wundheilung beteiligten Zelllinien (Fibroblasten und angiogenetische Zellen) untersucht werden. Hierbei wird insbesondere der antiangiogenetische Effekt auf die an der Vaskularisierung beteiligten Zellen (Endotheliale Progenitor Zellen – EPC, Human umbilicord vein endothelial cells – HUVEC) analysiert.

Eine weitere zentrale Fragestellung in dieser Arbeit ist es, den Einfluss einer Substitution von Geranylgeraniol (GGOH) zur möglichen Verringerung des inhibitorischen Effektes der Bisphosphonate auf den Mevalonat-Stoffwechsel zu untersuchen.

2. Literaturdiskussion

2.1 Knochenstoffwechsel

Das Knochengewebe als Teil des Stützgewebes verfügt über zwei einzigartige Fähigkeiten. Es ist das einzige Gewebe im menschlichen Körper, welches narbenlos verheilt. Des Weiteren passt es sich in seiner Form an die Anforderung der Umwelt an. Ein Phänomen, welches erstmals in Form des sogenannten Wolff's Law 1892 beschrieben wurde [Sommerfeldt et al. 2001]. Hierbei erfüllt der Knochen im wesentlichen drei Funktionen im menschlichen Körper: Stützfunktion, Bereitstellung eines Mineraldepots und die hämatopoetische Funktion des Knochenmarks. Der Aufbau des Knochens teilt sich in einen zellulären Anteil und einer Matrix auf. Die Matrix besteht aus einer organischen Grundsubstanz – dem Osteoid – in Form von Kollagen Typ 1, Glykoproteinen und Proteoglykanen. In ihr sind anorganische Mineralien wie Calcium und Phosphat in geringeren Mengen auch Magnesium und Carbonat eingelagert [Clarke 2008]. Durch diesen Aufbau aus miteinander interagierenden druckfesten Mineralkristallen und zugfesten Kollagenfibrillen weist der Knochen eine hohe Belastbarkeit bei vergleichsweise wenig Gewicht auf [Buck et al. 2012].

Die Anpassung des Knochens an die funktionellen Anforderungen der Umwelt basiert auf dem Prinzip des Remodellings [Clarke 2008]. Hierbei ist Knochen in der Lage, einen Umbau der Matrix durch seine zellulären Anteile durchzuführen. Die Osteoklasten bauen hierfür den Knochen durch Sekretion von Salzsäure und Proteasen ab. Anschließend erfolgt die Knochenregeneration durch Synthese von neuem Osteoid durch die Osteoblasten. Sobald dieser sich von dem von ihm sezernierten Osteoid eingedeckt hat, wird er zum Osteozyt [Feng et al. 2011].

Das physiologische Prinzip des Remodellings dient der Erneuerung des Knochens, dem Ausgleich von Mikrofrakturen und der Regulation des Mineralhaushaltes [Hadjidakis et al. 2006]. Jährlich werden etwa 2-3% des kortikalen Knochens durch Remodelling erneuert [Clarke 2008], wobei die Umbaurate im Skelett deutlich variiert [Huja et al. 2006]. Das Knochenremodelling erfolgt durch das Prinzip des „Couplings“. Bei diesem Prozeß bilden Osteoklasten und Osteoblasten eine durch Zytokine interagierende funktionelle Einheit. Der Knochenumbau wird hierbei in vier Phasen unterteilt: Die erste Phase beschreibt die Aktivierung. Hierbei wird die osteoklastäre Differenzierung der Vorläuferzellen durch eine Stimulierung der

osteoblastären Zelllinie bewirkt. Diese Stimulierung erfolgt im Wesentlichen mit Hilfe der Zytokine RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B) und M-CSF (monocyte/macrophage colony–stimulating factor) [Martin et al. 2007]. In der zweiten Phase erfolgt der Knochenabbau durch die aktivierten Osteoklasten sowie die Rekrutierung von Vorläuferzellen - den Mesenchymalen Stammzellen (MSC) - der Osteoblasten. Die Differenzierung zu Osteoblasten und die anschließende Sekretion von Osteoid finden in Phase drei statt. Phase vier beschreibt die Mineralisation des Osteoids und die Beendigung des Remodellingprozesses [Feng et al. 2011].

Bei der als Marmorkrankheit bekannten Osteopetrosis liegt eine genetische Dysfunktion dieses Remodellingprozesses vor. Hierbei sind acht Unterformen mit unterschiedlicher genetischer Pathogenese bekannt. Die Folge ist eine osteoklastäre Dysfunktion oder Aplasie bei den betroffenen Patienten. Neben anderen klinischen Zeichen wie der Hepatosplenomegalie oder Schwerhörigkeit kann es hier auch zum Auftreten von spontan freiliegenden Kieferknochen – dem pathognomonischen Merkmal der Bisphosphonat assoziierten Kiefernekrose – kommen [Marx 2013].

2.2 Bisphosphonate

2.2.1 Geschichte der Bisphosphonate

Die Entdeckung der Bisphosphonate geht zurück bis ins 19. Jahrhundert mit ersten Publikationen um 1865 und 1897 von Menshutkin und von Bayer. Die damals noch als Diphosphonate bezeichnete Substanzgruppe fanden jedoch nur in der Chemie beispielsweise als Wasserenthärter Anwendung [N. 1865, Von Baeyer H 1897, Russell 2011]. Fleisch und Kollegen waren es, die 1969 erstmalig die Rolle von Pyrophosphaten auf die Calciumhomöostase beim Menschen beschrieben [Fleisch et al. 1966, Russell 2011]. Die jedoch entscheidende Entdeckung für die anschließende pharmakologische Verwendung der Bisphosphonate gelang dem Team um Russell und Fleisch 1970, in der die inhibitorische Wirkung auf die Dissolution von Hydroxylapatit erstmalig beschrieben wurde [Russell et al. 1970]. Diese destruktive Wirkung der Bisphosphonate auf den Knochenabbau begründet letztlich ihren Einsatz als osteoanaboles Medikament.

Bereits 1973 wurde von Schenk und Kollegen eine Studie für die spätere Basis des „Schenk Modells“ zur quantitativen Analyse der biologischen Potenz der Bisphosphonate veröffentlicht. Hierbei wurden Bisphosphonate heranwachsenden Ratten appliziert. Die dabei blockierte Knochenresorption bewirkte ein zurückgebliebenes knöchernes Remodelling im Bereich der Metaphysen, welche radiologisch als dichter und unförmiger erschienen [Schenk et al. 1973, Schenk et al. 1986].

Nach erfolgreichen klinischen Versuchen von Clodronat und Etidronat in den 80er und 90er Jahren begann die Suche nach effektiveren Bisphosphonaten. Ein Meilenstein stellte die Substitution des R1-Restes durch ein Stickstoffatom dar und war die Basis für die Einführung der nitrogenhaltigen Bisphosphonate wie Pamidronat und Alendronat. Eine weitere Verbesserung der antiresorptiven Wirkung wurde durch die Eingliederung des Stickstoffatoms in einen heterozyklischen Ring in Form von Risedronat, Minodronat und Zoledronat 1994-1998 erreicht [Green et al. 1994, Goa et al. 1998].

Neben dem klassischen Indikationsspektrum der Osteoporose kam bereits 1971 mit der medikamentösen Behandlung durch Bisphosphonate der Morbus Paget als Indikationserweiterung hinzu. So veröffentlichten Smith und Kollegen eine dosisabhängige Reduzierung des Knochenabbaus und legten den Grundstein für die bis heute gängige Therapie dieser Erkrankung [Smith et al. 1971]. Nur acht Jahre später konnte van Breukelen die inhibitorische Wirkung von Bisphosphonaten auf osteolytische metastatische Herde nachweisen, welches den Einzug der Bisphosphonate in die Onkologie einleitete [van Breukelen et al. 1979]. Eine weitere onkologische Anwendung der Bisphosphonate war die Malignom-induzierte Hypercalciämie, die von Chapuy 1980 für Knochenmetastasen und von Paterson 1983 für das Multiple Myelom erstmalig beschrieben wurde [Chapuy et al. 1980, Paterson et al. 1983].

2.2.2 Chemie und Pharmakologie der Bisphosphonate

Die Bisphosphonate gehören zur Gruppe der Pyrophosphate und verfügen über einzigartige pharmakologische Eigenschaften, die sie zu den am häufigsten verwendeten Medikamenten zur Behandlung skelettaler Erkrankungen machen. Hierzu zählen besonders ihre bevorzugte Einlagerung in den sich im Umbau

befindlichen Knochen sowie die dortige außergewöhnlich lange Halbwertszeit [Cremers et al. 2011].

Typischen Verabreichungsformen der Bisphosphonate sind die orale und intravenöse Gabe. Die parazelluläre Aufnahme erfolgt über den gesamten Gastrointestinaltrakt und liegt bei unter 2,5%. Hierbei werden die nicht-nitrogenhaltigen Bisphosphonate mit 2-2,5% deutlich besser als die stickstoffhaltigen Bisphosphonate mit ca. 0,7% resorbiert [Cremers et al. 2005]. Diese geringfügige Aufnahme wird durch zeitgleiche Einnahme von Nahrung oder durch calciumhaltige Getränke zusätzlich reduziert. Ein antiazider Magen führt ebenso zu einer verminderten Bisphosphonataufnahme [Gertz et al. 1995, Porras et al. 1999]. Auch bei der Bindung der Bisphosphonate an Calciumkristalle können Unterschiede bei den verschiedenen Substanzen festgestellt werden. So ist das Bindungspotential bei nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonaten deutlich geringer als bei den nitrogenhaltigen Präparaten. Des Weiteren variiert die Verteilung der Bisphosphonate innerhalb des Skelettes. So konnte durch Technetium-markierte Bisphosphonate nachgewiesen werden, dass diese sich beim Menschen vermehrt im Femurhals gegenüber dem Femurschaft einlagern [Carnevale et al. 2000]. Auch die Aufnahme in kortikale und spongiöse Knochenanteile variiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Bisphosphonate im trabekulären Knochenanteil des Kiefers deutlich vermehrt gegenüber dem cortikalen Anteil aufgenommen werden. Neben der Aufnahme ins Skelett wurde eine zusätzliche Anlagerung im angrenzenden Periost nachgewiesen [Weiss et al. 2008].

2.2.3 Indikationsspektrum der Bisphosphonate

Aufgrund ihrer besonders hohen Affinität zum Hydroxylapatit des Knochens und ihrer antiresorptiven sowie antiosteolytischen Eigenschaften werden Bisphosphonate hauptsächlich bei Knochenkrankheiten eingesetzt, welche durch eine überschüssige Osteoklasten-vermittelte Knochenresorption charakterisiert sind [Rosen et al. 1996, Hofbauer 1997].

Die weitreichende Bedeutung dieser osteotropen Medikamentengruppe zeigt sich darin, dass die Indikationsgebiete von der Therapie benigner Erkrankungen des metabolischen Knochenstoffwechsels bis hin zur Prävention sowie der Therapie bei Malignomen in der Hämatologie und Onkologie reichen.

Potentiell sind einzelne Bisphosphonate, welche zur Therapie von Knochenresorptionsstörungen zugelassen sind, untereinander austauschbar. Begründen lässt sich dies darin, dass trotz aller Unterschiede in der chemischen Struktur, die Gemeinsamkeiten in der Wirkweise an ihrem Hauptangriffsort, dem Knochen, überwiegen. In der Realität werden die unterschiedlichen Präparate spezifischen Erkrankungen zugeordnet [Russell 2011]. Hierbei spiegelt das zugelassene Therapiespektrum jedes einzelnen Medikamentes auch die Geschichte der klinischen Entwicklung sowie die Weiterentwicklung zwischen den Bisphosphonaten der 1. bis zur 3. Generation wieder [Russell 2011].

Der primäre klinische Einsatz von Bisphosphonaten in der Geschichte galt als pharmakologischer Hemmstoff der Kalzifikation der Knochenstruktur. Hierbei war Etidronat das Medikament der Wahl, welches zu Therapiezwecken bei der Fibrösen Dysplasie eingesetzt wurde [Russell 2011]. Des Weiteren wurde Etidronat zur Vermeidung von heterotrophen Ossifikationen nach Einbau von Hüft-Endoprothesen eingesetzt [Bijvoet et al. 1974]. Die hierdurch erreichte Verbesserung der Mobilität wirkte sich positiv auf die postoperative Lebensqualität der Patienten aus. Darüber hinaus wurde das Medikament zur Prävention einer ektopen Kalzifikation sowie der Ossifikation nach Rückenmarksverletzungen verordnet [Thomas et al. 1987].

Morbus Paget war eine der ersten klinischen Krankheitsbilder, bei der durch den Einsatz von Bisphosphonaten eine dosisabhängige Inhibition der Knochenresorptionsrate demonstriert werden konnte [Russell et al. 1974]. Morbus Paget (Synonym: Osteodystrophia deformans) ist ein Krankheitsbild, welches durch eine erhöhte Osteoklastenaktivität mit konsekutiv vermehrtem Knochenumbau gekennzeichnet ist. Während zunächst die Behandlung unter oraler Gabe von Etidronat im Vordergrund stand, erfolgte im Zuge der Weiterentwicklung neuerer Bisphosphonate, wie Clodronat, Tiludronat, Risedronat und Alendronat auch eine Anpassung der Therapie zugunsten dieser Medikamente [Delmas et al. 1982].

Heute gilt der Einsatz der hochpotenten Aminobisphosphonate Pamidronat und Zoledronat, die zumeist parenteral appliziert werden, als Mittel der ersten Wahl [Reid et al. 2011, Russell 2011].

Die Applikation von Bisphosphonaten in der Malignom-Behandlung von Patienten lässt sich ebenfalls bis in die frühen achtziger Jahre zurückverfolgen. Hierbei

konnten in unterschiedlichen Studien insbesondere für Clodronat und Pamidronat gute Ergebnisse bei der Behandlung der tumorassoziierten Hypercalcämie aufgezeigt werden. Diese Hypercalcämien kommen durch den gesteigerten Abbau von Knochensubstanz bei osteolytischen Knochenmetastasen oder beim Multiplen Myelom vor. Mit der osteoklastären Hemmung durch Bisphosphonate wird dieser Prozess verlangsamt und die Ausbildung einer Hypercalcämie vermindert [van Breukelen et al. 1979, Chapuy et al. 1980, Paterson et al. 1983].

Auch in der Onkologie sind durch Weiterentwicklungen der Bisphosphonate neue Therapieoptionen und Indikationsklassen entstanden. Heute werden zumeist parenteral applizierte Bisphosphonate zur Therapie und Prävention ossärer Manifestationen von Tumorentitäten herangezogen [Coleman et al. 2011]. Durch den gezielten Einsatz sollen Skelettkomplikationen im Rahmen von Tumorerkrankungen reduziert, Skelettmetastasen vermieden und vorhandene Leiden bei bereits vorhandenen Skelettmetastasen abgeschwächt werden.

In den neunziger Jahren wurde die Stoffklasse der Bisphosphonate zur spezifischen Behandlung der postmenopausalen sowie der glukokortikoidinduzierten Osteoporose weltweit etabliert [Boonen et al. 2005]. Zunächst überwiegte eine medikamentöse Therapie mit Etidronat [Watts et al. 1990, van Staa et al. 1998], die jedoch im weiteren Verlauf durch Alendronat in seiner Verordnungshäufigkeit abgelöst wurde [Bone et al. 2004, Russell 2011]. Dieses wird zumeist einmal wöchentlich oral verabreicht. Des Weiteren wurden die Präparate Risedronat, Ibandronat und Zoledronat mit gleichem Indikationsspektrum zugelassen [McClung et al. 2001, Chesnut et al. 2004, Black et al. 2007].

Weitere Einsatzgebiete, die zur Verordnung der Stoffklasse der Bisphosphonate geführt haben, sind die Krankheitsbilder der Osteogenesis imperfecta, das Riesenzellgranulom und die Riesenzelltumore. Hierbei erhofft man sich durch die osteoklastäre Hemmung, eine Verstärkung der Knochenstruktur und einen verminderten Abbau von Knochensubstanz [Bartl 2006, Russell 2011].

2.2.4 Nebenwirkungen und Komplikationen von Bisphosphonaten

Allgemein zeichnen sich Bisphosphonate bei korrekter Dosierung, individueller Auswahl des Präparates und unter Beachtung der patientenbezogenen Risikofaktoren durch eine hohe Verträglichkeit aus. Jedoch sind eine Vielzahl von

Nebenwirkungen und Komplikationen, die im Rahmen einer Bisphosphonattherapie auftreten können, beschrieben. Diese werden durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst. Zu den wichtigsten beeinflussenden Kriterien gehören die Verabreichungsform (oral oder i.v.), das Bisphosphonatpräparat (stickstoffhaltig oder nicht stickstoffhaltiges Bisphosphonat), die Frequenz der Verabreichung sowie die Dosis der Bisphosphonat-Applikation [Diel et al. 2007]. Ein Überblick über die beschriebenen Bisphosphonatnebenwirkungen ist in Tabelle 01 zusammengefasst (siehe Tabelle 01).

Häufige Nebenwirkungen

Nephrotoxizität

Akute-Phase Reaktion

Gastrointestinale Toxizität

Kiefernekrose

Seltene Nebenwirkungen

Symptomatische Hypocalziämie

Okkuläre Komplikationen (Retinitis, Uveitis, Skleritis)

(Asperin-sensitives) Asthma

Erythema

Phlebitis

Geschmacksveränderungen

ZNS-Nebenwirkungen

Tabelle **01**: Tabellarische Darstellung der wesentlichen beschriebenen Nebenwirkungen der Bisphosphonattherapie aus Diel et. al. 2007 [Diel et al. 2007]

Zu den häufig unter Bisphosphonattherapie auftretenden Nebenwirkungen gehören renale Komplikationen. Prinzipiell verfügen alle auf dem Markt gängigen Bisphosphonatpräparate über chemische Eigenschaften, die zu einer Schädigung des Nierenparenchyms führen können. Die renale Schädigung erfolgt unabhängig von der Verabreichungsform. Der Wirkmechanismus der renalen Schädigung ist derzeit noch nicht abschließend geklärt, lässt sich jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die intratubuläre Ausbildung von unlöslichen Calcium-

Komplexen zurückführen. Hierbei scheinen Art des Bisphosphonatpräparates, Dosis, Verabreichungsfrequenz und –geschwindigkeit die Entstehung dieser Calciumkristalle zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass bei rascher parenteraler Verabreichung hoher Dosen von Clodronat und Etidronat schneller als 200-300 mg / h die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines Nierenversagens deutlich erhöht ist [Miller 2011]. Des Weiteren verstärken Begleitzustände wie beispielsweise eine Hypercalcämie oder ein exsikkiertes Allgemeinzustand die renale Schädigung.

Zudem wird eine zusätzliche direkte toxische Wirkung der Bisphosphonate auf die Nierentubuli diskutiert [Adami et al. 1996, Diel et al. 2007, Miller 2011]. Klinische Studien konnten zeigen, dass vornehmlich unter Zoledronat-Applikation es zum vermehrten Auftreten von Nierentubulinekrosen kam [Bergner et al. 2006]. Das geringste Risiko, unter Bisphosphonattherapie renale Komplikationen zu entwickeln, ist für Ibandronat beschrieben. Diverse klinische Studien bescheinigten Ibandronat ein hohes nephroprotektives Profil, welches auch in höherer Dosis oder einer verkürzten Applikationszeit nicht beeinträchtigt zu sein scheint. Diese renale Toleranz lässt sich möglicherweise durch die hohe Plasmaeiweißbindung (Ibandronat 87-98% gegenüber Zoledronat 22-56%) und die damit verbundene kurze Gewebehalbwertszeit (Ibandronat 25 Tage, Zoledronat 150-200 Tage) begründen [Diel et al. 2007].

Die Entstehung der „Akut-Phase-Reaktion (APR)“ ist die zweithäufigste Nebenwirkung unter Bisphosphonattherapie. Sie lässt sich lediglich bei der Verabreichung intravenöser Aminobisphosphonaten wie Zoledronat, Ibandronat und Pamidronat beobachten und sie entsteht typischerweise nach Applikation der ersten Infusion [Diel et al. 2007]. Klinisch präsentiert sich die „Akut-Phase-Reaktion“ bei 20-40% der Patienten in grippeähnlichen Symptomen. Diese sind zumeist durch Kopf-, Knochen-, Brust- und Gliederschmerzen sowie durch einen Anstieg der Körperkerntemperatur gekennzeichnet. Zusätzlich kann eine körperliche Schwächesymptomatik auftreten. Neben den klinischen Symptomen lassen sich laborchemische Veränderungen nachweisen. Diese sind ein Lymphozytenabfall und ein Anstieg des C-reaktiven Proteins (CRP)[Bartl 2006]. Der Wirkmechanismus dieser „Akut-Phase-Reaktion“ ist durch den Eingriff der Aminobisphosphonate in den Mevalonatstoffwechsel zu erklären. Über eine Erhöhung von Isopentenyl-Pyrophosphat im Osteoklasten kommt es unter Sezernierung von TNF-alpha und IFN-gamma zur Zellproliferation von gamma-delta T-Lymphozyten. Dies führt zu

einer Erhöhung von IL-6, welcher als wesentlicher Mediator der klinischen Symptomatik fungiert. Bei erneuter parenteraler Gabe von Aminobisphosphonaten wird durch den Rückstau von akkumulierenden Substraten eine Downregulation des Mevalonatstoffwechsels herbeigeführt. Dadurch wird das Ausmaß der „Akut-Phase-Reaktion“ abgeschwächt. Weitere Akkumulation führt zu weiterer Downregulation, bis die Symptome der „Akut-Phase Reaktion“ nicht mehr nachweisbar sind.

Um die Symptomatik der „Akut-Phase-Reaktion“ zu vermindern, kann vor der ersten intravenösen Applikation stickstoffhaltiger Bisphosphonate ein HMG-CoA Reduktase Inhibitor (Statin) verabreicht werden. Alternativ kann hierzu anstelle der primären stickstoffhaltigen Bisphosphonat-Applikation eine einmalige Vorbehandlung mit einem stickstofffreien Bisphosphonat der ersten Generation erfolgen [Bartl 2006].

Weitere häufig zu beobachtende Nebenwirkungen betreffen den Gastrointestinaltrakt. Sie stehen zumeist mit der oralen Applikation von Bisphosphonaten in Zusammenhang. Die Inzidenz dieser Komplikationen liegt bei ca. 2-10%. Typische Symptome sind Diarrhoe, Übelkeit, Völlegefühl, Magenschmerzen und uncharakteristische abdominale Beschwerden [Bartl 2006, Tanvetyanon et al. 2006]. Das Auftreten von schwerwiegenden gastrointestinalen Veränderungen wie beispielsweise der ulzerierenden Ösophagitis sind selten. Sie zeigt sich meist bei einer dosisabhängigen oralen Applikation von stickstoffhaltigen Bisphosphonaten. Zusätzlich begünstigt eine Nichtbeachtung der Einnahmepflicht und prädisponierende gastrointestinale Vorerkrankungen ihre Entstehung [Adami et al. 1996, Diel et al. 2007].

Zu den selten vorkommenden unerwünschten Nebenwirkungen der Bisphosphonate zählen die Hypocalcämie und Hypomagnesiämie. Diese verlaufen oftmals asymptomatisch. Aufgetretene manifeste und somit therapiebedürftige Hypocalcämien stehen nicht selten in Zusammenhang mit einer zu schnell applizierten, hochkonzentrierten, intravenösen Gabe der Bisphosphonate. Bei gleichzeitiger Applikation von Aminoglykosiden steigt die Inzidenz dieser Elektrolytentgleisungen weiter an. Die Ursache für die Toxizität ist eine Komplexbildung der Bisphosphonate mit dem Serumcalcium im Blut, die eine Verringerung des Serum-Calciumspiegels zur Folge hat. Die Affinität der

Bisphosphonate zu den zweiwertigen Magnesiumionen im Serum kann darüber hinaus zu einer Hypomagnesiämie führen [Tanvetyanon et al. 2006].

Ebenfalls selten sind okuläre Nebenwirkungen. Diese werden häufig mit der Gabe von Aminobisphosphonaten, insbesondere mit Pamidronat, in Verbindung gebracht. In Erscheinung treten sie über ausgelöste entzündliche Reaktionen, die zum klinischen Bild einer Konjunktivitis, Skleritis, Uveitis, Episkleritis oder Retinitis führen.

Hämatopoetische Nebenwirkungen konnten in einigen Fällen unter i.v. Bisphosphonat-Applikation mit Zolendronat beobachtet werden. Sie traten in Form von Anämien und Panzytopenien in Erscheinung, waren aber selten therapiebedürftig [Bartl 2006].

In der Vergangenheit kam es unter Bisphosphonattherapie zur Entwicklung von Mineralisationsstörungen. Insbesondere bei Etidronat konnte bei einem langem Applikationszeitraum von mehr als 6 Monaten und hoher Dosierung von über 5 mg / kg KG / Tag eine Mineralisationsstörung mit dem klinischen Bild einer Osteomalazie beobachtet werden. Diese war jedoch nach Absetzen des Medikamentes zumeist nach drei Monaten rückläufig. Bei zeitgleicher Gabe von Calcium und Vitamin D konnte diese Komplikation jedoch vermieden werden. Auch bei Pamidronat wurden ähnliche Beschwerdebilder beschrieben. Die Osteomalazie als Komplikation wurde bei weiterentwickelten Bisphosphonatpräparaten nicht mehr beobachtet [Bartl 2006].

Eine andere gravierende Komplikation sind die beschriebenen Kiefernekrosen, die im Rahmen einer stattgefundenen oder andauernden Bisphosphonattherapie auftreten können. Als wesentlicher Teil dieser Disserationsschrift wird die zuletzt aufgeführte Nebenwirkung gesondert im Einleitungskapitel 2.3. beschrieben.

2.2.5 Angiogenese und antiangiogenetische Effekte der Bisphosphonate

Untersuchungen zur Wirkweise von Bisphosphonaten, insbesondere zu der von ihnen ausgelösten Komplikation der Kiefernekrose, konnten zeigen, dass diese Medikamentengruppe nicht ausschließlich auf Knochenzellen wirkt. Hierbei steht besonders die Wirkung und Nebenwirkung der Bisphosphonate auf die Angiogenese - die Entstehung und das Wachstum von Blutgefäßen - im wissenschaftlichen Fokus. Einen wesentlichen Anteil an der Entstehung und am

Wachstum von Blutgefäßen haben die endothelialen Vorläuferzellen (EPC). Während lange Zeit das Dogma galt, dass die Differenzierung mesodermaler Vorläuferzellen in Angioblasten nur in der Embryonalphase stattfinden würde, konnten Ashara und Kollegen 1997 beweisen, dass CD34+ angereicherte Stammzellen sich zu endothelialen Zellen differenzieren können [Asahara et al. 1997, Urbich et al. 2004]. Hierbei erfüllen die endothelialen Progenitorzellen zwei wesentliche Aufgaben: erstens die Re-Endothelialisierung bei Endotheldefekten und zweitens die Neovaskularisierung und Ausbildung eines neuen Gefäßsystems. Es konnte nachgewiesen werden, dass Ischämie ein potenter Triggerfaktor für die Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen ist. Die gesteigerte Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen führt zu einem deutlichen Anstieg der kapillaren Dichte [Takahashi et al. 1999, Kalka et al. 2000, Ziebart et al. 2008]. Darüberhinaus verfügen endotheliale Progenitorzellen über eine ausgeprägte parakrine Funktion. Durch die Sekretion des Vaskular Endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und anderen Zytokinen wird die Neovaskularisierung zusätzlich unterstützt [Urbich et al. 2005]. Gerade an dieser Schnittstelle konnten Santini und Kollegen 2002 den antiangiogenetischen Effekt von Bisphosphonaten demonstrieren. Sie konnten zeigen, dass bei Krebspatienten mit ossären Metastasen nach intravenöser Gabe von Pamidronat die VEGF Konzentration signifikant innerhalb der ersten sieben Tage reduziert war [Santini et al. 2002]. Weitere Studien, die diese antiangiogenetischen Eigenschaften von Bisphosphonaten unterstützten, folgten. Wood und Kollegen legten dar, dass Zolendronat nicht nur die Proliferation von muren Endothelzellen signifikant hemmt, sondern dass es zusätzlich deren Migrations- und Adhäsionspotential beeinflusst [Wood et al. 2002]. Des Weiteren wurde der inhibitorische Einfluss der Bisphosphonate auf endotheliale Vorläuferzellen festgestellt. Diese werden nicht nur in ihrer Anzahl durch Bisphosphonate reduziert [Allegra et al. 2007], sondern auch in ihrer Differenzierung gehemmt [Yamada et al. 2009]. Die antiangiogenetischen Eigenschaften scheinen für den onkologischen Einsatz der Bisphosphonate förderlich zu sein [Green 2000], können jedoch andererseits zur Entstehung von Bisphosphonat induzierten Kiefernekrosen beitragen [Otto et al. 2010, Walter et al. 2010].

2.2.6 Die extraskeletale Wirkung der Bisphosphonate

Neben dem antiresorptiven Osteoklasten-inhibitorischen Effekt und ihrer antiangiogenen Potenz üben Bisphosphonate zudem eine Wirkung auf die Zellen des Weichgewebes aus. Diese Begleitwirkung wurde erstmalig 2008 durch Landesberg und Kollegen publiziert. In ihrer Veröffentlichung konnte dargestellt werden, dass Pamidronat, die Proliferation oraler Keratinozyten *in vitro* hemmt. Im Rahmen eines *in vitro* Wundheilungsmodells konnte zudem eine verzögerte Wundheilung nach Pamidronatgabe festgestellt werden [Landesberg et al. 2008]. Im Jahre 2011 wurde dieser Wirkung von Pamidronat durch die Arbeitsgruppe von Kim und Kollegen bestätigt. Sie demonstrierten, dass Pamidronat zu einer Vergreisung von oralen Keratinozyten und zu einer verminderten Reepithelialisierung führt [Kim et al. 2011]. Eine genauere Charakterisierung der Wirkung der Bisphosphonate auf orale Keratinozyten gelang ein Jahr später. Hierbei zeigten die stickstoffhaltigen Bisphosphonate einen inhibitorischen Einfluss auf die Lebens- und Migrationsfähigkeit oraler Keratinozyten, während nicht stickstoffhaltige Bisphosphonate in hohen Konzentrationen die Lebensfähigkeit dieser sogar verstärkten. Zudem konnte ein proapoptotischer Effekt nitrogenhaltiger Bisphosphonate auf orale Schleimhautzellen nachgewiesen werden [Pabst et al. 2012]. Der oben beschriebene Einfluss der Bisphosphonate wird durch die durch de Groen erstmalig beschriebene Nebenwirkung auf das Epithel des Gastrointestinaltraktes mit konsekutiven Ösophagitiden unterstützt [de Groen et al. 1996]. Mit dem Nachweis der Wirkung von Bisphosphonaten auf die orale Mukosa wurde das bis dato bestehende Dogma, dass die assoziierte Kiefernekrose vom Knochen - nach dem Prinzip „inside out“ - ausgelöst sei, in Frage gestellt [Landesberg et al. 2008]. Auch die Zellen tieferliegender Weichgewebsschichten werden durch Bisphosphonatgabe beeinflusst. So konnte dem Bisphosphonat Alendronat eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen des peridontalen Ligamentes und des subkutanen Bindegewebes nachgewiesen werden [Moreira et al. 2005, Correia Vde et al. 2006]. Die Wirkung der Bisphosphonate beschränkt sich somit nicht ausschließlich auf das Skelettsystem.

2.3 Bisphosphonat assoziierte Kiefernekrose (BP-ONJ)

Im Jahre 2007 definierte die Amerikanische Gesellschaft für Oral- und Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen (AAOMS) die Bisphosphonat induzierte Osteonekrose des Kiefers als einen Zustand mit exponiertem Knochen vom Kiefer, der länger als 8 Wochen besteht, anamnestisch oder aktuell eine Bisphosphonateinnahme vorliegt und eine Strahlenbehandlung des Kiefers nicht stattfand [Ruggiero et al. 2009]. Dieser exponierte Knochen kann sowohl spontan aber auch in einer Vielzahl der Fälle als Folge von invasiven Eingriffen, wie beispielsweise die Zahnextraktion, auftreten. Der freiliegende Knochen ist hierbei nekrotisch (siehe Abbildung 01). Dieses erstmalig durch Marx und Stern 2002 publizierte Krankheitsbild ist in der Ätiologie und Pathophysiologie noch nicht vollständig geklärt, wird jedoch dem inhibitorischen Effekt der Bisphosphonate auf die Osteoklasten zugeschrieben [Marx 2002]. Dabei kommt es zu einer Störung der Knochenresorption und konsekutiv des Knochenremodellings. Die Folge ist, dass alter Knochen nicht ersetzt wird. Stirbt im Verlauf der zelluläre Anteil des Knochens in Form des Osteozyten ab, liegt avitaler Knochen vor [Marx 2013]. Die ersten Beschreibungen über die Toxizität von dem in den Bisphosphonaten enthaltenen Phosphor stammen von Dearden bereits aus den Jahren 1899 und 1901. Anfangs noch als „*phossy jaw*“ beschrieben, konnte eine Korrelation zwischen der Resorption von Phosphor und dem Auftreten von freiliegendem nekrotischen Kieferknochen festgestellt werden [Dearden 1899, Dearden 1901, Marx 2013].



Abbildung 01: Klinisches Bild von ausgedehnten Arealen freiliegendem Knochen im Unterkiefer als typisches Merkmal der Bisphosphonat assoziierten Kiefernekrose (Bild aus Fotoarchiv Universitätsmedizin Mainz – Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie).

Das Auftreten sowie das Ausmaß der BP-ONJ ist von der Applikationsart und -intensität, des applizierten Präparates sowie einer Begleitmedikation oder -erkrankungen abhängig. Hierbei konnte bis auf Einzelfälle nur bei der Verabreichung von stickstoffhaltigen Bisphosphonaten die Entstehung von Osteonekrosen im Kiefer beobachtet werden [Abu-Id et al. 2008, Otto et al. 2010, Marx 2013].

Je nach Applikationsart sind unterschiedliche Inzidenzen der Bisphosphonat-induzierten Osteonekrose in der Literatur beschrieben. Während sich kleinere Areale freiliegenden Knochens nach oraler Bisphosphonattherapie in vielen Fällen gut behandeln lassen, können bei schwereren Fällen ganze Anteile des Unterkiefers nekrotisch zugrunde gehen und bedürfen einer komplexen chirurgischen Rekonstruktion [Engroff et al. 2007, Mucke et al. 2009, Otto et al. 2011, Marx 2013]. Diese fortgeschrittenen Fälle treten hauptsächlich im Rahmen von onkologischen Indikationen bei intravenöser Applikation der Bisphosphonate auf [Otto et al. 2011]. Die Prävalenz für das Auftreten der medikamentös induzierten

Kiefernekrose liegt bei intravenöser Gabe zwischen 3 und 18% [Wang et al. 2007, Walter et al. 2008, Otto et al. 2011]. Die Entstehung von Kiefernekrosen unter oraler Bisphosphonattherapie ist seltener und wurde in einer Kohortenstudie von Lo und Kollegen mit einer Prävalenz von 0,1% beziffert [Lo et al. 2010]. In einer Arbeit von Otto und Kollegen wird zudem aufgeführt, dass dieses fast schon zu vernachlässigende Risiko dazu geführt hat, dass weder die Amerikanische Gesellschaft der Endokrinologen (AAE) noch der Dachverband Osteologie eine Empfehlung bezüglich dentaler Eingriffe unter oraler Bisphosphonattherapie ausgegeben haben [Otto et al. 2011]. Ein wesentlicher Grund hierfür liegt in der geringen intestinalen Resorption der oralen Bisphosphonate. Jedoch warnen Otto und Kollegen in ihrer multizentrischen Arbeit, die Wirkung der oralen Bisphosphonate auf die Entwicklung von Kiefernekrosen nicht zu unterschätzen. So konnte in einem Patientenkollektiv aus 470 Patienten mit Bisphosphonat-induzierter Kiefernekrose bei 37 Fällen eine orale Applikation festgestellt werden. Diese wesentlichen Gründe für das Auftreten von Kiefernekrosen unter oraler Bisphosphonattherapie können hierbei einer verlängerten Applikationszeit sowie dem Vorliegen zusätzlicher Risikofaktoren zugeschrieben werden. Während die Applikationszeit intravenöser Bisphosphonate in der Regel nur 3,3 Jahre lang war, wurden orale Bisphosphonate mit durchschnittlich 4,8 Jahren signifikant länger appliziert. Des Weiteren wurde bei 43% der Patienten mit oraler Bisphosphonatdauermedikation das Vorliegen von mindestens einem Risikofaktor beschrieben [Otto et al. 2011]. Diabetes mellitus, insuffiziente Mundhygiene, Einnahme von Cortison oder Zytostatika, Anämie sowie Nikotinabusus können die Entstehung von Knochennekrosen unter dieser Therapie begünstigen [Otto et al. 2011, Kajizono et al. 2015].

Neben den anderen beschriebenen Nebenwirkungen unter Bisphosphonatgabe stellt sich die Frage, warum es nur im Kieferbereich zum Auftreten von freiliegenden nekrotischen Knochenarealen kommt. Hierzu wurde vor allem die im Kieferbereich erhöhte Remodelling Rate gegenüber anderen Knochen angeführt. So konnte Dixon und Kollegen 2012 zeigen, dass die Remodellingrate im Kieferbereich zehnfach gegenüber der Tibia erhöht sei. Des Weiteren ist diese im Bereich des Alveolarkamms fünffach gegenüber den kaudalen Anteilen des Unterkiefers erhöht [Dixon RB 1997, Marx 2013]. Diese Theorie lässt sich auch mit der erhöhten Inzidenz von freiliegendem nekrotischen Knochen nach invasiven dentalen Eingriffen wie beispielsweise die Zahnentfernung vereinbaren. Durch das im

Rahmen der Extraktion ausgelöste Trauma kommt es zu vermehrten Umbauvorgängen, die das Risiko für die Entwicklung einer Kiefernekrose vermeintlich erhöhen [Marx 2013]. Jedoch konnte Ristow und Kollegen 2014 zeigen, dass die Knochenremodellingrate (bone turnover rate) des Unterkiefers nicht wesentlich gegenüber anderen Knochen erhöht ist. Zudem weist der Unterkiefer gegenüber dem Oberkiefer eine verminderte *turnover* Rate auf. Dies steht jedoch im Kontrast zu der signifikant erhöhten Inzidenz der Kiefernekrose im Unterkiefer gegenüber dem Oberkiefer. Auch konnte gezeigt werden, dass die Knochenremodellingrate im Kieferbereich nach Bisphosphonatgabe sich nur geringfügig reduziert [Ristow et al. 2014]. In einer weiteren Studie konnten Bauss und Kollegen beweisen, dass auch die Aufnahme von Bisphosphonaten im Kieferbereich im Vergleich mit anderen Knochen wie zum Beispiel die Wirbelsäule nicht erhöht sei [Bauss et al. 2008]. Diese widersprüchlichen Ansätze zur Ätiologie und Pathophysiologie der Bisphosphonatnekrose lassen erkennen, dass die Ursache für die auftretenden freiliegenden nekrotischen Kieferareale noch nicht abschließend geklärt ist.

Otto und Kollegen sehen im oralen pH-Milieu den entscheidenden Faktor für die Entstehung von Kiefernekrosen. Es wird darauf verwiesen, dass Bisphosphonate im pH neutralen Zustand an Calcium binden und im sauren Milieu wieder dissoziieren. Zudem werden stickstoffhaltige Bisphosphonate in saurer Umgebung protoniert ($\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$), was zu einer Zunahme der protonierten Bisphosphonate in potentiell toxischen Konzentrationen führt [Nancollas et al. 2006, Roelofs et al. 2006, Otto et al. 2010]. Ihr toxischer Einfluss auf das umliegende Gewebe mit Inhibition der Angiogenese, Schädigung der Schleimhaut und Unterdrückung des Knochenremodellings durch Hemmung der Osteoklasten kann dann zum multifaktoriellen Krankheitsbild der Kiefernekrose führen (siehe Abbildung 02). Der Kieferknochen ist hierbei prädispositioniert für pH-Schwankungen ins saure Milieu. Entzündungen vom lateralen und apikalen Parodontium, Karies profunda mit pulpitischer Mitbeteiligung sowie Wundheilung nach Zahnextraktion und parodontalchirurgischen Eingriffen führen zu einem Abfall des pH-Wertes im Kieferbereich auf Werte bis 6,2 und können somit ein wesentlicher Faktor für die toxische Wirkung stickstoffhaltiger Bisphosphonate sein [Otto et al. 2010]. Dieser pathophysiologische Ansatz erklärt zudem, warum die Kiefernekrosen hauptsächlich bei stickstoffhaltigen Bisphosphonaten auftreten, während - bis auf

einzelne Fallberichte - nicht-stickstoffhaltige Bisphosphonate dieses Krankheitsbild nicht auslösen [Abu-Id et al. 2008, Otto et al. 2010].

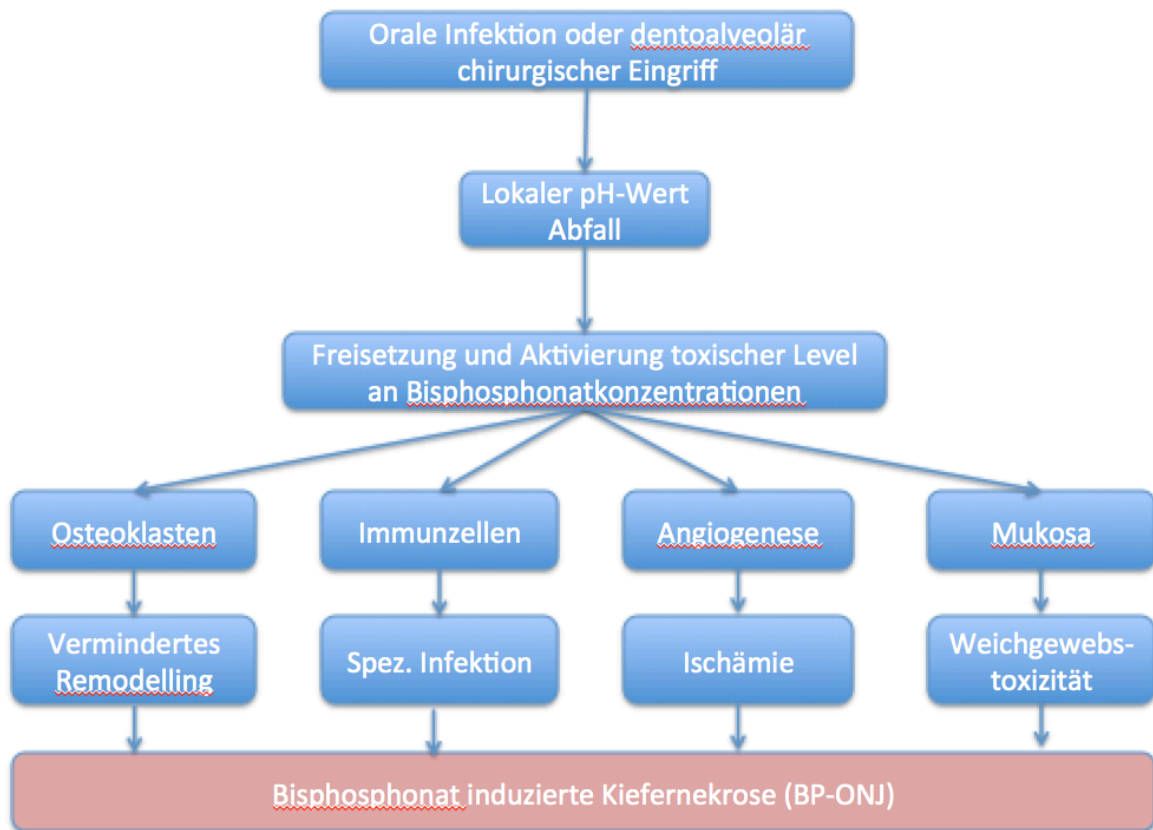


Abbildung 02: Schematische Darstellung der multifaktoriellen Genese der BP-ONJ übersetzt in deutsch aus Otto et al. 2010 [Otto et al. 2010]

Neben den von der AAOMS beschriebenen Kriterien veröffentlichte das „Committee for Medicinal Products for Human Use“ (CHMP) im Jahr 2008 eine entsprechende klinisch und radiologisch basierte Stadieneinteilung (siehe Abbildung 03). Es erfolgt eine Einteilung in vier Stadien. Stadium 0 beschreibt das Vorhandensein von unspezifischen Symptomen ohne das Auftreten von exponiertem nekrotischen Knochen. Stadium I und II beinhalten das Vorliegen von freiliegendem Knochen ohne (Stadium I) und mit Infektion (Stadium II). Stadium III wird durch die Koinzidenz von Komplikationen charakterisiert. Hierbei kann es zu pathologischen Frakturen, Entwicklung cervikaler Abszesse, kutaner Fistelung oder eine Miteinbeziehung des Sinus maxillaris kommen [Ruggiero et al. 2009].

BP-ONJ Stadium	Beschreibung
Stadium 0	kein Hinweis auf nekrotischen Knochen, aber unspezifische, nicht durch Zahnerkrankungen erklärbare Befunde wie Schmerzen oder Zahnlockerung
Stadium I	freiliegender und nekrotischer Kieferknochen ohne Beschwerden oder Zeichen der Infektion
Stadium II	freiliegender und nekrotischer Kieferknochen mit Schmerzen und Infektionszeichen
Stadium III	freiliegender Kieferknochen mit Schmerzen, Infektion und mindestens einem weiteren Befund wie extraorale Fistel, Mund-Antrum Verbindung, pathologische Fraktur, ausgedehnte Osteolysen über den Unterkieferunterrand oder den Sinusboden

Abbildung 03: Darstellung der AAOMS-Stadieneinteilung der BP-ONJ aus Ruggiero et al. 2009 [Ruggiero et al. 2009]

Die hier vorgelegte Einteilung erlaubt zudem eine stadiengerechte Therapie. Vor Beginn jeder Bisphosphonattherapie sollte eine ausführliche Patientenaufklärung, sowie eine zahnärztliche bzw. kieferchirurgische Vorstellung erfolgen. Beherdete und parodontal nicht haltbare Zähne sollen hierfür zuerst entfernt werden. Des Weiteren wird die Entfernung teilretinierter Zähne sowie großer multilobulierter Tori des Gaumens empfohlen. Kleinere Tori und vollständig retinierte Zähne können belassen werden [Marx 2013]. Bei nicht-invasiven dentalen Maßnahmen muss eine geplante Bisphosphonattherapie nicht verschoben werden. Es sollten jedoch zeitnah mit der Therapie begonnen werden, da durch die Akkumulation der Bisphosphonate das Risiko für die Entwicklung einer Kiefernekrose mit jeder Applikation ansteigt [Marx 2013].

Wenn invasive Maßnahmen im Stadium 0 bei bereits eingeleiteter Therapie – ohne freiliegendem Knochen – durchgeführt werden müssen, empfiehlt sich eine prophylaktische Antibiotikagabe [Marx 2013]. Im Stadium I sollten antibakterielle Mundspüllösungen zur Anwendung kommen [Ruggiero et al. 2009]. Hierbei kann mit Chlorhexidin in 0,12% Lösung bis zu 3x täglich gespült werden [Marx 2013]. Zudem sollten vierteljährliche zahnärztliche Kontrollen mit Inspektion des nekrotischen Areals erfolgen. Interdisziplinär empfiehlt sich eine Reevaluation der Indikation der Bisphosphonattherapie durchzuführen [Ruggiero et al. 2009].

Im Stadium II mit dem Vorliegen einer Infektion sollte eine symptomatische Antibiotikatherapie zur antibakteriellen Mundspüllösung unterstützend hinzukommen. Hierbei wird Penicillin V als Standardantibiotikum empfohlen. Als Alternativpräparat bietet sich Doxycyclin an. Levofloxacin oder Azithromycin sollten nur während symptomatischer Phasen zum Einsatz kommen [Marx 2013]. Zudem ist eine suffiziente analgetische Therapie einzuleiten. Des Weiteren kann durch ein oberflächliches Debridement die Weichgewebsirritation reduziert werden [Ruggiero et al. 2009].

Bei Stadium III kommen neben den in Stadium I und II angewandten Therapiemodalitäten invasive Therapieoptionen hinzu. Sie beinhalten neben der Behandlung der Komplikationen, wie zum Beispiel Abszeßinzision und -drainage oder der osteosynthetischen Versorgung pathologischer Frakturen, vor allem die Entfernung nekrotischer Kieferareale. Es konnte gezeigt werden, dass unter schonender aber vollständiger Entfernung nekrotischer Kieferareale mit anschließender spannungsfreier gut vaskularisierter plastischer Defektdeckung langfristige Wundheilungsraten von ca. 90% erreicht werden können [Stockmann et al. 2010]. Die AWMF-Leitlinie zur „Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose (BP-ONJ) und anderen Medikamenten-assoziierten Kiefernekrosen“ empfiehlt als „notwendige“ Begleitmaßnahme eine systemische Antibiotikatherapie und ausreichende Anästhesie. Fakultative Maßnahmen können die Anwendung von Lasertherapie, eine Fluoreszenzmarkierung oder ein perioperatives Kostformmanagement bis hin zur Einbringung von nasogastralen Ernährungssonden beinhalten [Grötz K.A. 2012]. Bei ausgedehntem Befall des Kieferknochens kann eine Kasten- oder Kontinuitätsresektion mit alloplastischer oder autologer Rekonstruktion durchgeführt werden [Engroff et al. 2007, Mucke et al. 2009, Otto et al. 2011, Marx 2013].

Weitere Therapieoptionen sind die Anwendung von thrombozytenreichem Plasma [Mozzati et al. 2012], hyperbarem Sauerstoff [Freiberger et al. 2007] und der intermittierenden Gabe von Teriparatid [Kwon et al. 2012]. Letztere ist jedoch in der onkologischen Anwendung wegen der Gefahr von Hypercalciämien kontraindiziert. Aufgrund des Fehlens einer kausalen Therapieoption stellt die Prävention und Früherkennung den wichtigsten Schritt in der Behandlung der Bisphosphonat-induzierten Kiefernekrosen dar [Ruggiero et al. 2008].

2.4 Die Wirkung der Bisphosphate auf den Mevalonatstoffwechsel

Der biochemische und molekulare Wirkmechanismus der Bisphosphonate galt viele Jahre als unbekannt. Eine Vielzahl von Studien versuchte den eigentlichen Wirkmechanismus zu beschreiben und ordnete den Bisphosphonaten inhibitorische Eigenschaften auf die Glykolyse [Fast et al. 1978], den lysosymalen Enzymen [Felix et al. 1976] oder der H⁺-ATPase der Osteoklasten [Carano et al. 1990] zu. Der Durchbruch in der Erklärung der biochemischen Funktionsweise dieser Medikamentengruppe gelang 1988 zunächst bei den nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonaten. So konnten Klein und Kollegen anhand von Medronate beweisen, dass dieses metabolisch in ein methylen-haltiges ATP-Analoga (ATP -> AppCp) eingebaut wird. Dieses widersteht der hydrolytischen Spaltung, akkumuliert intrazellulär und führt letztendlich zur Induktion von Apoptose. Ein analoger Wirkmechanismus konnte für Etidronat und Clodronat demonstriert werden [Selander et al. 1996, Hiroi-Furuya et al. 1999]. Die spezifische Wirkung auf die Osteoklasten wird nicht durch die molekulare Wirkung des Bisphosphonates selbst, sondern durch ihre intrazelluläre Aufnahme bestimmt. Hierbei akkumulieren Bisphosphonate über die Bindung zum Hydroxylapatit im Knochen. Durch die anstehende Knochenresorption kommt es in den Resorptionslakunen der Osteoklasten zu einem aziden pH-Wert und damit zur Dissoziation der Bisphosphonate aus dem Mineralkomplex. Die somit freiwerdenden Bisphosphonate können dann intrazellulär über Endozytose aufgenommen werden und entfalten so ihre Wirkung. Da nur Osteoklasten in der Lage sind, derartig saure pH-Verhältnisse im Bereich des Knochens zu erzeugen, sind nur sie mit den hohen Konzentrationen an dissoziierten Bisphosphonaten konfrontiert [Coxon et al. 2008]. Anders als die Bisphosphonate der ersten Generation konnte bei den weiterentwickelten Bisphosphonaten der 2. und 3. Generation keine metabolische Inkorporation in ATP-Analoga festgestellt werden [Benford et al. 1999]. Ihr Wirkmechanismus scheint demnach ein anderer zu sein. Erste Entdeckungen über Wirkmechanismen der nitrogenen-Bisphosphonate entstanden 1992 eher zufällig auf der Suche nach Hemmstoffen der Cholesterinbiosynthese. Hier konnten Amin und Kollegen zeigen, dass die nitrogenhaltigen Bisphosphonate Ibandronat und Incadronat die Squalensynthase und mögliche andere Enzyme des Mevalonatstoffwechsels in Makrophagen hemmen [Amin et al. 1992]. Im Rahmen

weiterer Studien wurde nachgewiesen, dass nicht ausschließlich die Squalensynthese durch die weiterentwickelten Bisphosphonate inhibiert wird, sondern dass eine Vielzahl von Enzymen des Mevalonatstoffwechsels gehemmt werden. Hauptangriffsenzym der antiresorptiven, nitrogenhaltigen Bisphosphonate stellt die Farnesylpyrophosphatsynthase dar [Bergstrom et al. 2000, Otto et al. 2010, Rogers et al. 2011]. Durch diese Hemmung können die Metabolite Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP) nicht gebildet werden. Sie werden benötigt, um eine post-translationale Modifikation (Prenylierung) wichtiger Signalproteine der Untergruppe der kleinen GTPasen (ras, rab, rho, rac) zu bewerkstelligen. Ohne Prenylierung kann eine Verankerung dieser GTPase in den Zellmembranen der Osteoklasten nicht erfolgen. Als Konsequenz werden eine Vielzahl von regulatorischen Prozessen und Transduktionskaskaden inhibiert. Hierdurch wird die Zelle inaktiv, verliert ihre membranspezifischen Eigenschaften und induziert die Apoptose [Zhang et al. 1995, Luckman et al. 1998, Luckman et al. 2005, Russell 2011].

2.5 Fragestellung

Im Rahmen dieser Dissertationsschrift sollen folgende Fragestellungen gezielt untersucht und beantwortet werden:

- Welchen Einfluss haben die unterschiedlichen Bisphosphonate (Clodronat, Ibandronat, Pamidronat, Zoledronat) auf die verschiedenen getesteten Zelllinien (Osteoblasten, Fibroblasten, mature Endothelzellen und endotheliale Vorläuferzellen)?
- Wie ändert sich die Beeinflussung der oben genannten Zelllinien durch die Bisphosphonatsubstitution in Abhängigkeit von der applizierten Dosis?
- Wie unterscheidet sich die Wirkung stickstofffreier gegenüber stickstoffhaltiger Bisphosphonate auf die untersuchten Zelllinien?
- Wie wird die Wirkung der Bisphosphonate durch die Zugabe von Geranyl-Geraniol beeinflusst?
- Gibt es Unterschiede in der Wirkungsbeeinflussung durch Geranyl-Geraniol Zugabe zwischen stickstofffreien und stickstoffhaltigen Bisphosphonaten?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Zelllinien

Nabelschnurepithelzellen (HUVEC)

Die kommerziell zu erwerbenden humanen, venösen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) dienten neben den isolierten EPCs als Vertreter der Endothelzellen in den folgenden Versuchsreihen. Bezogen wurden sie von der Firma Lonza (Basel / Schweiz - No. CC-2517)

Fibroblasten (NHDF)

Humane gingivale Fibroblasten, welche ebenfalls über die Firma Lonza (Basel / Schweiz - No. CC 7049) erworben wurden, fungierten in den Versuchsreihen als Vertreter der Binde- und Stützgewebe mit mesenchymaler Herkunft.

Humane Osteoblasten (HOB)

Um die Wirkung der Bisphosphonate auf den Knochen zu untersuchen, wurden kommerziell erworbene humane Osteoblasten von der Firma PromoCell (Heidelberg / Deutschland - No. C-12720) verwendet.

Epitheliale Progenitorzellen (EPCs)

EPCs stellten in den Versuchsreihen die zweiten Vertreter der Endothelzellen dar. Sie sind Vorläuferzellen differenzierter Endothelzellen und wurden zur Untersuchung der anti-angiogenetischen Effekte der Bisphosphonate verwendet. Sie konnten über einen Buffy Coat in einem speziellen Verfahren isoliert und kultiviert werden (siehe Isolation EPCs Kapitel 3.2.1). Diese wurden über das Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Mainz, Deutschland bereitgestellt.

3.1.2 Zellkulturmedien

Zellkulturmedium der HUVEC Zellen

Zur Herstellung eines Zellkulturansatzes für die verwendeten HUVEC-Zelllinien wurden dem hierfür geeigneten Basismedium der Firma Lonza (Basel / Schweiz) diverse Substanzen zugegeben.

Diese zugefügten Bestandteile setzten sich wie folgt zusammen:

- 10 % fetales Kälberserum (FCS)
- Gentamycin (50 µg/ml)
- Amphotericin B (50ng/ml)
- Rinderhirnextrakt (12 µg/ml)
- Hydrocortison (1 µg/ml)
- „Epidermal growthfactor“ 10 ng/ml (EGF)

Zellkulturmedium der Fibroblasten (NHDF)

Die Kultivierung der kommerziell erworbenen Fibroblasten konnte in einem speziellen Basismedium (DMEM der Firma Lonza; Basel / Schweiz) erfolgen, dem folgende Zusätze substituiert wurden:

- Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) 500ng/ml
- 1% Streptomycin-Penicillin-Neomycin-Mischung
- 10 % fetales Kälberserum (FCS).

Zellkulturmedium der Osteoblasten

Die kommerziell erworbenen Osteoblasten wurden in einem dafür vorgesehenen Kulturmedium ausgebracht und zur Kultivierung gebracht. Dem Basismedium (Dulbecco`s modified Eagle Medium: DMEM, der Firma Gibco Thermo Fisher Scientific, USA) wurden folgende Stoffe zugefügt:

- L-Glutamin 1%
- 10% fetales Kälberserum (FCS)
- 1% Streptomycin-Penicillin-Neomycin-Mischung
- 20µg Dexamethason
- 150mg Ascorbinsäure

Zellkulturmedium der EPCs

Die aus den Buffy-Coats isolierten Epithelialen Progenitorzellen (EPCs) wurden in einem speziellen Basismedium ausgebracht und kultiviert. Dem Endothelial-Cell-Basal-Medium (EBM; Firma Lonza / Basel / Schweiz) konnten folgende Zusätze substituiert werden:

- Gentamycin 1000
- Bovine Brain Extract
- 20% fetales Kälberserum (FCS)
- Hydrocortison
- 0,5ml hEGF

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierungs- und Kultivierungsmethoden der Zellen

Kultivierung der Zellen

Die Zellkultivierung der zu untersuchenden kommerziell erworbenen Zelllinien erfolgte streng nach den Protokollen des jeweiligen Herstellers. Die Inkubation wurde unter Standardbedingungen (37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂) in einem Inkubator durchgeführt. Ein Zellsplitting und die erneute Aussaat der Zellen erfolgten bei einer Konfluenz von 90% des Bodens der Kulturflasche standardmäßig. Die Passagen P2-P5 wurden für die durchgeführten Versuche verwendet, während die Zellen, die die Passage 5 überschritten hatten, verworfen wurden.

Passagieren der Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte bei Erreichen einer Konfluenz von 90% des Zellbodens oder der Verwendung der Zellen zur Durchführung von Versuchen. Hierbei mussten diese möglichst ohne Schädigung vom Boden der verwendeten Kulturflasche abgelöst werden. Die Kulturflaschen wurden aus dem Inkubator entnommen und unter der Werkbank mit 5 ml Trypsin versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten im Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt erfolgte die anschließende Abschwächung der Trypsinwirkung durch Zugabe von 10ml Zellmedium der jeweiligen Zelllinie. Die Zell-Enzym-Mediums-Lösung wurde gleichmäßig auf Zentrifugenröhrchen verteilt und anschließend für 5 Minuten bei 1600g zentrifugiert. Nach Entfernung der Lösung wurde das am Boden des Zentrifugenröhrchens befindliche Zellpellet entnommen. Die Zellzahl wurde bestimmt. Es erfolgte entweder eine erneute Aussaat oder Verwendung der Zellen in den durchgeführten Versuchen.

Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer (Optik Labor, Friedrichsdorf, Deutschland). Hierfür wurde aus der auszuzählenden Zellsuspension 50µl entnommen. Im nächsten Schritt erfolgte das Anfärben der Zellen durch die Zugabe der gleichen Menge (50µl) von Trypan blau. 10µl der bestehenden Lösung wurden anschließend auf die Neubauer-Zählkammer appliziert. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte nun die Zellzählung in den vier Eckquadraten der Zählkammer. Durch den hierdurch bestimmten Mittelwert, ließ sich die Zellzahl pro Milliliter anhand der nachfolgenden Formel extrapolieren:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Mittelwert} \times 2 \times 10^4$$

Isolierung der EPC

Die Isolierung der EPC erfolgte aus humanem Peripherblut mittels Dichtezentrifugation. Hierbei wird ausgenutzt, dass die im Blut befindlichen Anteile auf Grund unterschiedlicher Dichte sich nach Zentrifugation räumlich aufteilen. Die roten Blutkörperchen mit der höchsten Dichte sinken auf den Boden des Röhrchens

ab. Das Blutplasma mit der geringsten Dichte befindet sich ganz oben und der Buffy Coat bildet eine sog. Grenzschicht zwischen beiden. Hauptbestandteile des Buffy Coats sind demnach Blutplättchen und weiße Blutkörperchen.

Der Buffy Coat wurde von der Transfusionsmedizin der Johannes Gutenberg Universität bereitgestellt. Aus ihm erfolgte die weitere Isolierung der EPC.

Dazu wurde eine Mischung des „Peripherblutes“ aus dem Buffy Coat mit einer PBS-Lösung im Verhältnis 1:1 vorgenommen. In einem 50ml Falcon-Röhrchen wurde je 15ml Ficoll ausgebracht und vorsichtig mit je 25ml der vorbereiteten Buffy-Blut-PBS-Mischung überschichtet. Danach erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 2000g ohne Bremse. Dies dient der Separation der Lymphozytenschicht von Erythrozyten und Granulozyten.

Dann konnten die EPCs vorsichtig aus der Interphase zwischen Ficoll und Serumschicht abpipetiert und erneut in ein 50ml Falcon-Tube überführt werden. Um ein EPC-Zellpellet zu gewinnen, wurde eine erneute Dichtezentrifugation bei 2000g für 10min mit Bremse durchgeführt. Das am Boden des Tubes vorhandene Zellpellet konnte nach vorsichtigem Entfernen des Überschusses mit PBS aufgefüllt und einem erneuten Waschvorgang zugeführt werden. Dieser Aufreinigungsvorgang erfolgte solange bis der befindliche Überschuss klar war.

Nach dem letzten Aufreinigungsschritt wurde nach Entfernung des klaren Überschusses das vorhandene Zellpellet auf exakt 10ml aufgefüllt und nach gründlicher Durchmischung hieraus 500 μ l Zellsuspension mittels steriler Eppendorf Pipette entnommen. Im darauffolgenden Schritt wurden 50 μ l der Zellsuspension zur Bestimmung der Zellzahl isoliert und in einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl ermittelt.

Die übrigen Zellen wurden erneut zentrifugiert, der PBS-Überschuss entfernt und das gewonnene Zellpellet wurde einem EPC Medium zugeführt. Es wurde eine Konzentration von 8×10^6 Zellen / ml EPC Medium hergestellt, welches nun zum Ausbringen in Kulturflaschen bereitsteht.

Um eine ausreichende Adhärenz der gewonnenen EPC am Kulturflaschenboden zu garantieren, benötigten die zu verwendenden Kulturflasche eine Fibronectinbeschichtung. Dies erreichte man, indem eine Stunde vor Beginn der Aussaat eine Fibronectin-PBS Mischung in einem Verhältnis von 1:100 hergestellt wurde. Jede 75cm² Kulturflasche wurde mit jeweils 5ml dieser Fibronectin-PBS-Mischung beschichtet und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in der Kulturflasche belassen. Abschließend konnte die Lösung vorsichtig abpipetiert und

die Zellen ausgebracht werden. Es wurden jeweils 10ml der Zell-Mediums-Mischung in die 75cm² Kulturflasche eingebracht. Die Inkubation erfolgte anschließend für 3 Tage im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit.

Nur adhärenente Zellen wurden am Tag 3 nach der Isolation für weitere Versuche herangezogen. Die nicht-anhaftenden Zellen konnten mittels vorsichtiger PBS-Waschung aus der Kulturflasche entfernt werden. 24 h vor Versuchsbeginn wurde den EPC neues Kulturmedium zugeführt.

3.2.2 Messmethoden

3.2.2.1 Migrations Assay nach Boyden

Der Boyden Chamber Assay ist auf seinen Erfinder Stephen Boyden zurückzuführen, welcher den angewandten Migrationsassay zur Chemotaxis von Leukozyten erstmals 1962 publizierte [Boyden 1962].

Bei dem Boyden-Chamber handelt es sich um ein Zellkulturgefäß, in der eine migrierte Zelllinie quantitativ erfasst werden soll. Sie besteht aus zwei ineinander greifenden Kammern, die jeweils mit spezifischen Medien befüllt werden. Zwischen den Kammern befindet sich eine semipermeable, mikroporöse Membran (PET).

In die obere Kammer wird die zur Migration anzuregende Zelllinie eingebracht. Im darunter befindlichen Kompartiment befindet sich das spezifische Medium mit „chemotaktischen Agentien“ wie Wachstumsfaktoren und Chemokinen. Da viele eukaryotische Zellen die Fähigkeit zur Migration besitzen, wird die Wahl der PET Membran anhand der zu untersuchenden Zelllinie getroffen. Die Porengröße sollte hierbei klein genug sein, um eine passive Wanderung zu verhindern, jedoch groß genug, um eine aktive Passage entlang eines ausgebildeten Migrationsgefälles zu ermöglichen. Leukozyten benötigen beispielsweise eine Porengröße von 3µm, Epithel- und Tumorzellen bedürfen 8µm Porengröße. Nach ausreichender Inkubationszeit können die aktiv migrierten Zellen an der Unterseite der Membran gefärbt, abgelöst und gezählt werden [Chen 2005].

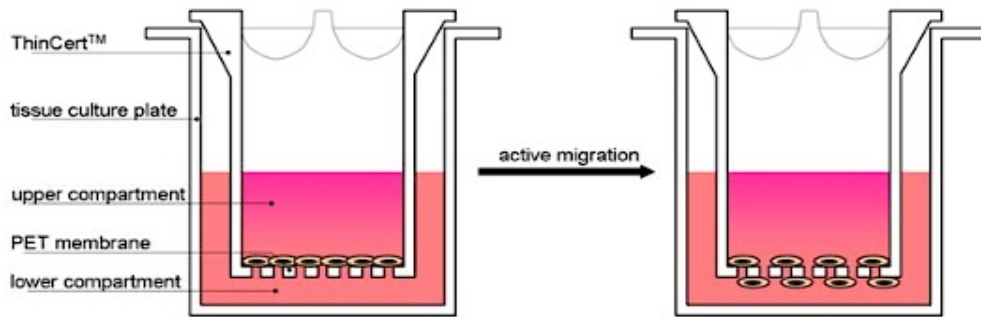


Abbildung 04: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Migrationsassays nach Boyden (http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/Protocol_Invasion_Assays.pdf)

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden bei dem oben beschriebenen Migrationsassay nach Boyden vier verschiedene Zelllinien (EPC, HUVEC, Fibroblasten und Osteoblasten) kultiviert und ihre Migrationsfähigkeit unter Inkubation mit den vier zu analysierenden Bisphosphonaten sowie der Substitution von Geranyl-Geraniol untersucht.

Dabei wurden nach Ausbringung der Zelllinien in 75cm² Zellkulturflaschen die EPC nach drei Tagen und die anderen Zelllinien bereits nach 24 Stunden in 2 Gruppen unterteilt. Während alle Kulturflaschen der Gruppe 1 eine Substitution mit Geranyl-Geraniol (10µM) erhielten, wurde den Kulturflaschen der Gruppe 2 zum Ausgleich der Lösungsmittelunterschiede und den damit möglicherweise verbundenen Ungenauigkeiten, 1,16µl DMSO pro Milliliter Medium zugegeben. Zusätzlich wurden den Ansätzen die Bisphosphonate Clodronat, Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat in der Konzentration 50µM beigegeben. Je eine Kulturflasche pro Zelllinie aus der Gruppe eins und zwei verblieb als Kontrollgruppe ohne Bisphosphonat Applikation. Die Inkubation erfolgte bei standardisierten Bedingungen (37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit) für 72 Stunden im Brutschrank. Danach wurde das Zellmedium entfernt. Die Zellen konnten mittels Trypsin abgelöst und anschließend gezählt werden.

Für den weiteren Versuchsansatz wurden Boyden-Chambers im 24 Well-Format verwendet. Die eingesetzte PET Membran wies hierbei eine Porengröße von 8µm auf. Die oberen Einsätze erhielten vor Einbringung der Zellsuspensionslösung eine Vorbehandlung mit je 100µl Fibronectin in einer Konzentration von 10µg/ml. Diese musste nach einer Stunde sorgfältig eliminiert werden und diente zunächst der

Zelladhäsion am Boden der Kammer.

Während jedes obere Kompartiment mit 400µl des jeweiligen spezifischen Zellsuspensionsmediums befüllt wurde, enthielt die untere Kammer 800µl Medium mit einem selektiven Wachstumsfaktor.

Als chemotaktischer Wirkstoff fungierte bei den EPCs und den HUVEC Zellen VEGF (2,5 µl / ml Medium), bei den Osteoblasten PDGF (2 µl / ml Medium) und bei den Fibroblasten bFGF (2,5 µl / ml Medium). Die Boyden Chamber wurden mit einem Deckel versehen und für 24h im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Versuchstag erfolgte die Ausbringung von 600µl zellspezifischem Medium mit 6µl Calcein / Well in eine durchsichtige 24 Well-Platte. Nach vorsichtigem Entfernen des Zellmediums aus den inkubierten Boyden Chambers, wurden die Einsätze für ca. 1 Stunde in das Calcein-Bad eingetaucht und danach vorsichtig in einer sterilen PBS-Lösung aufgereinigt. Eine schwarze 24 Well-Platte mit je 500µl Trypsin / Well wurde vorbereitet. In diese mussten die o.g. Boyden Chamber Einsätze eingebracht und für 5 Minuten inkubiert werden. Das Ablösen der migrierten Zellen von der Unterseite der Membran erfolgte durch vorsichtiges Aufklopfen und Rütteln der Well Platte. Um die quantitative Bestimmung der Migration vornehmen zu können, wurden nach gründlicher Durchmischung der einzelnen Zell-Lösungen diese in eine Well-Platte mit durchsichtigem Boden überführt. Die photometrische Auswertung fand bei einer Emission von 538 nm mit einer Exzitation von 485 nm Wellenlänge und 100 ms / Well statt.

3.2.2.2 MTT Assay

Die Erstbeschreibung des MTT-Assay erfolgte durch Mosmann im Jahr 1983 [Mosmann 1983]. Der Assay ist eine Möglichkeit mittels photometrischer Messungen quantitativ die Anzahl von lebenden Zellen zu bestimmen und ist somit ein Gradmesser der Zellviabilität.

Die Buchstaben MTT kennzeichnen den verwendeten Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid. Dieser ist ein gelbes, wasserlösliches Tetrazoliumsalz, das sich durch seine gute Membrangängigkeit auszeichnet und mittels Endozytose ausschließlich in lebende Zellen aufgenommen

wird.

Intrazellulär erfolgt eine reduktive Spaltung des Tetrazoliumringes. Hierdurch entstehen wasserunlösliche blaue Formazan-Kristalle, die in proliferierenden lebenden Zellen akkumulieren. Der größte Anteil der zellulären Bio-reduktion des aufgenommenen MTT ist an Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums gebunden und erfordert die Anwesenheit des reduzierten Pyridin-Nukleotids NADH und in kleineren Anteilen NADPH. Die ursprünglich angenommene Reduktion mittels mitochondrialer Succinat-Dehydrogenase kommt nur noch eine vergleichsweise kleine Bedeutung zu. Dabei fungiert Succinat als ein schwacher Elektronen-Donor und wird selbst zu Fumarat oxidiert.

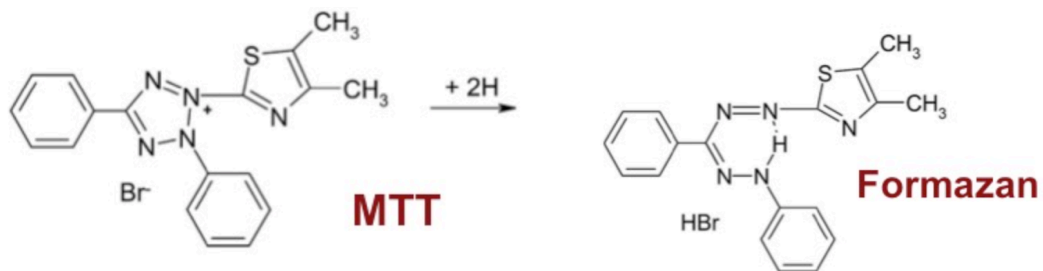


Abbildung 05: Darstellung der reduktiven Spaltung von gelbem MTT ins blaue Formazan (https://www.cellapplications.com/sites/default/files/images_product_type/MTT.jpg)

Nach forcierter Lyse der behandelten Zellen sowie der Lösung der Kristalle mittels Solubilisierung erfolgt eine kolorimetrische Analyse in einem Photospektrometer bei 550nm Wellenlänge.

Dieser Versuchsansatz wurde bei den HUVEC- und den NHDF Zellen durchgeführt. Hierbei konnten die bereits kultivierten Zellansätze verwendet werden. Nach Ablösen der Zellen aus der Kulturflasche erfolgte die Ermittlung der Zellzahl sowie das Überführen der Zellen in vorbereitete 6 Well-Plates. Pro Well wurden 1×10^5 Zellen im geeigneten Nährmedium (2,5 ml / Well) ausgebracht und zur Adhärenzvermittlung 24h bei Standardbedingungen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

Am nächsten Tag konnten nach einem Mediumwechsel die 6 Well-Plates in 2 Gruppen unterteilt werden. In der ersten Gruppe erfolgte die Applikation von Geranyl-Geraniol (1,16µl / ml Medium). In der 2. Gruppe wurde zum Ausgleich der Lösungsmittelunterschiede DMSO in gleicher Menge substituiert.

Darüberhinaus wurden mit Ausnahme der Kontrollgruppen den Versuchsansätzen die Bisphosphonate Clodronat, Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat in den Konzentrationen 5 µM und 50 µM zugegeben. Danach erfolgte die Inkubation für weitere 72h im Brutschrank.

Am 4. Tag nach Überführung der Zellen in die 6-Well-Plates wurde der MTT Assay vorbereitet, um die Viabilität der Zellen im Anschluss photometrisch darstellen zu können. Hierfür konnte den Zellversuchsreihen eine MTT-Stammlösung zugegeben werden (250 µl / Well). Diese wurde nach vierstündiger Inkubation zusammen mit dem Medium vorsichtig aus den Well-Platten abgezogen. Anschließend erfolgte die Auswaschung des Wells in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mittels PBS.

Im folgenden Schritt konnte ein Lysepuffer aus 49ml Propanol und 1ml 2M HCl angesetzt werden. Dieser diente dem Ablösen der verbliebenen adhärennten Zellen und wurde den Well-Plates zugegeben, welche im Anschluss für 25 Minuten inkubiert werden konnten.

Nach der Durchmischung erfolgte die Überführung von 1000µl des Puffer-Zellgemisches mittels Pipette in die vorbereiteten MTT-Messröhrchen. Zwecks Leerwertbestimmung wurde ein Messröhrchen ausschließlich mit Lysepuffer bestückt. Die Auswertung der übrigen Messröhrchen konnte in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 550nm vorgenommen werden (*LAB-Systems, Hagedorn, Deutschland*)

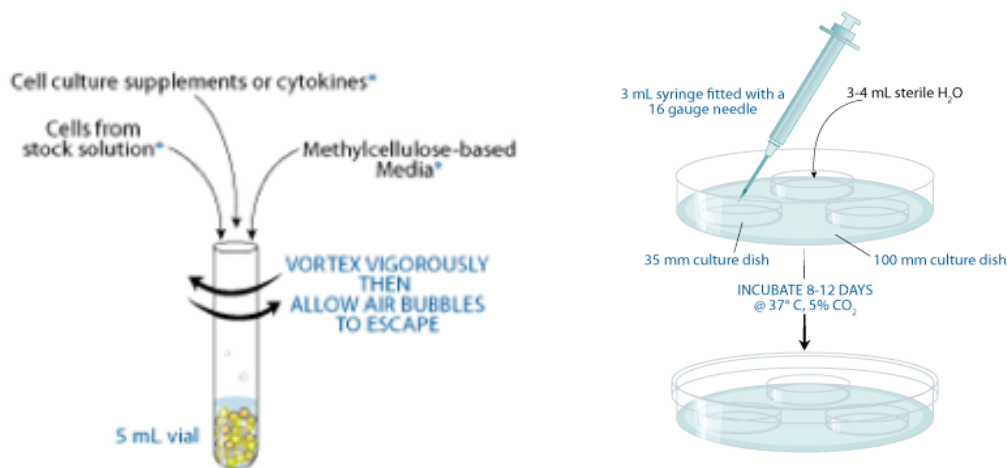
3.2.2.3 Colony Forming Cell Assay (CFC)

Der CFC - Synonym Methylcellulose-Assay - ist ein *in vitro* Assay, der zur Erforschung von haemapoetischen Stammzellen herangezogen wird. Grundlage bildet die Fähigkeit von haemapoetischen Stammzellen, im geeigneten Zellmedium unter Stimulation mit Zytokinen zu proliferieren, zu differenzieren und Kolonien auszubilden. Diese letztere Eigenschaft kann mit dem CFC Assay quantitativ erfasst werden.

Die für den CFC Assay benötigten endothelialen Progenitorzellen (EPC) wurden nach beschriebener Methode isoliert und kultiviert (8×10^6 Zellen / ml Nährmedium in einer 75 cm² Kulturflasche). Die Buffy Coats stellte die Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Mainz zur Verfügung. Nach Inkubation

der Zellen für 3 Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit) erfolgte die Auswaschung der non-adhären Zellen. Die adhären Zellen wurden anschließend mittels Trypsin aus der Kulturf Flasche abgelöst, zentrifugiert und gezählt nach den beschriebenen Standards. Das Ausbringen der Zielzellen erfolgte in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen pro 400µl EPC Medium. Je 4 ml eines methylcellulose-haltigen Mediums, dem sog. Methocult (Stemcells Technologies, Köln, Deutschland), wurden in 15ml Tubes gefüllt und mit 4µl VEGF versetzt. Danach erfolgte die Ausbringung der EPC-Zellsuspension in je eines der 4ml Methocult-VEGF-Tubes. Jedes Tube enthielt 400µl-EPC-Zellmedium mit 300 000 EPC Zellen.

Abschließend wurden die vier Bisphosphonate (Clodronat, Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat) in den Konzentrationen 0; 5, 25 und 50yM zugegeben und gevortext. Um die Wirkung von Geranyl-Geraniol zu untersuchen, erfolgte die Einteilung der Ansätze in 2 Gruppen. Gruppe 1 erhielt zusätzlich 1,16µl / ml Geranyl-Geraniol in jedes Tube. Der Gruppe 2 wurde zum Ausgleich der Lösungsmittelunterschiede DMSO in gleicher Menge appliziert. Um das Entweichen von Luftblasen nach dem Mischvorgang zu gewährleisten, erfolgte die Inkubation der Tubes für fünf Minuten. Zudem wurden zwei Kontrollgruppen ohne Bisphosphonate jedoch mit Geranyl-Geraniol oder in analoger Menge DSMO angesetzt.



A

B

Abbildung 06: Schematische Darstellung des Colony Forming Assays. A) Herstellung der Methylcellulose-Zell-Suspension. B) Aussaat auf Kulturplatten zur Bestimmung der Colonieanzahl. (<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/human-colony-forming-cell-cfc-assay-using-methylcellulose-based-media>)

Anschließend konnten pro Gruppe (mit / ohne GG) und pro Bisphosphonat in jeder einzelnen Konzentration eine 10ml Plate mit je drei 35ml Well-Plates bestückt und zur Erkennung beschriftet werden. Es erfolgte die Ausbringung des blasenfreien Methocult-VEGF-Bisphosphonat-Zellgemisches mit und ohne GG. In jedes der 35ml Well-Plates wurde eine Zellkonzentration von 10^5 Zellen ausgebracht und gleichmäßig verteilt. Das 10ml Plate konnte mit 2ml PBS benetzt werden, um eine gleichmäßige Zufuhr von Feuchtigkeit zu gewährleisten. Es folgte eine 10 tägige Inkubation im Brutschrank unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit). Nach 10 Tagen wurden die gebildeten Kolonien unter einem Lichtmikroskop ausgezählt.

3.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden als Mittelwert und Standardabweichung präsentiert. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer ANOVA Varianzanalyse sowie eines post-hoc T-Testes. Ein Bonferoni-Holme korrigiertes $p < 0,05$ kennzeichnet eine Signifikanz.

4. Ergebnisse

4.1 Beeinflussung der Migrationsfähigkeit durch Bisphosphonate

Im Rahmen des angewandten Migrations-Assay wurde mit Hilfe des Boyden-Chamber Experimentes der Einfluss der Bisphosphonate Clodronat, Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat in einer Konzentration von 50µM auf die Zelllinien der Osteoblasten (HOB), Fibroblasten (NHDF), Nabelschnurepithelzellen (HUVEC) und endothelialen Progenitorzellen (EPC) getestet. Des Weiteren wurde die Einflussnahme von Geranyl-Geraniol (GG) in Kombination mit den Bisphosphonaten auf die Migrationsfähigkeit der o.g. Zelllinien untersucht.

4.1.1 Migrationsassay der Bisphosphonate auf Humane Osteoblasten (HOB)

Im Rahmen des Migrationsassays konnte gezeigt werden, dass Bisphosphonate das Migrationsverhalten humaner Osteoblasten bei einer Konzentration von 50µM beeinflussen.

Im direkten Vergleich zwischen der Kontrollgruppe ohne GG-Zugabe und den jeweiligen Versuchsreihen mit ausschließlich Bisphosphonatzusatz konnte eine generalisierte signifikante Hemmung des Migrationsverhaltens humaner Osteoblasten festgestellt werden.

Der inhibitorische Effekt auf die Migration war bei Zoledronat am stärksten ausgeprägt. Die Migration war im Mittel um etwas mehr als die Hälfte gegenüber der Kontrolle reduziert (Kontrolle 100% gegenüber Zoledronat 45%). Clodronat zeigte die geringste Hemmung auf das Migrationsverhalten in diesem Vergleich.

Unter Zugabe von GG zu den jeweiligen Bisphosphonat-Ansätzen konnte lediglich in der Pamidronat- und der Zoledronatgruppe eine signifikante Hemmung der Migrationsfähigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne GG-Substitution demonstriert werden.

Clodronat und Ibandronat beeinflussten unter Zugabe von GG das Migrationsverhalten der HOB im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant.

Bei der Auswertung der Beeinflussung der Migrationsfähigkeit durch die Zugabe von Geranyl-Geraniol zu den jeweiligen Gruppen konnte eine generalisierte Steigerung der Migrationstendenz festgestellt werden. Diese Zunahme war jedoch nur in der Kontroll- und der Ibandronatgruppe signifikant. Zusammenfassend ergibt sich, dass bei Applikation von GG in diesen beiden Gruppen im Vergleich zur

ERGEBNISSE

gleichen Versuchsreihe ohne GG-Substitution eine gesteigerte Migrationsfähigkeit zu verzeichnen war.

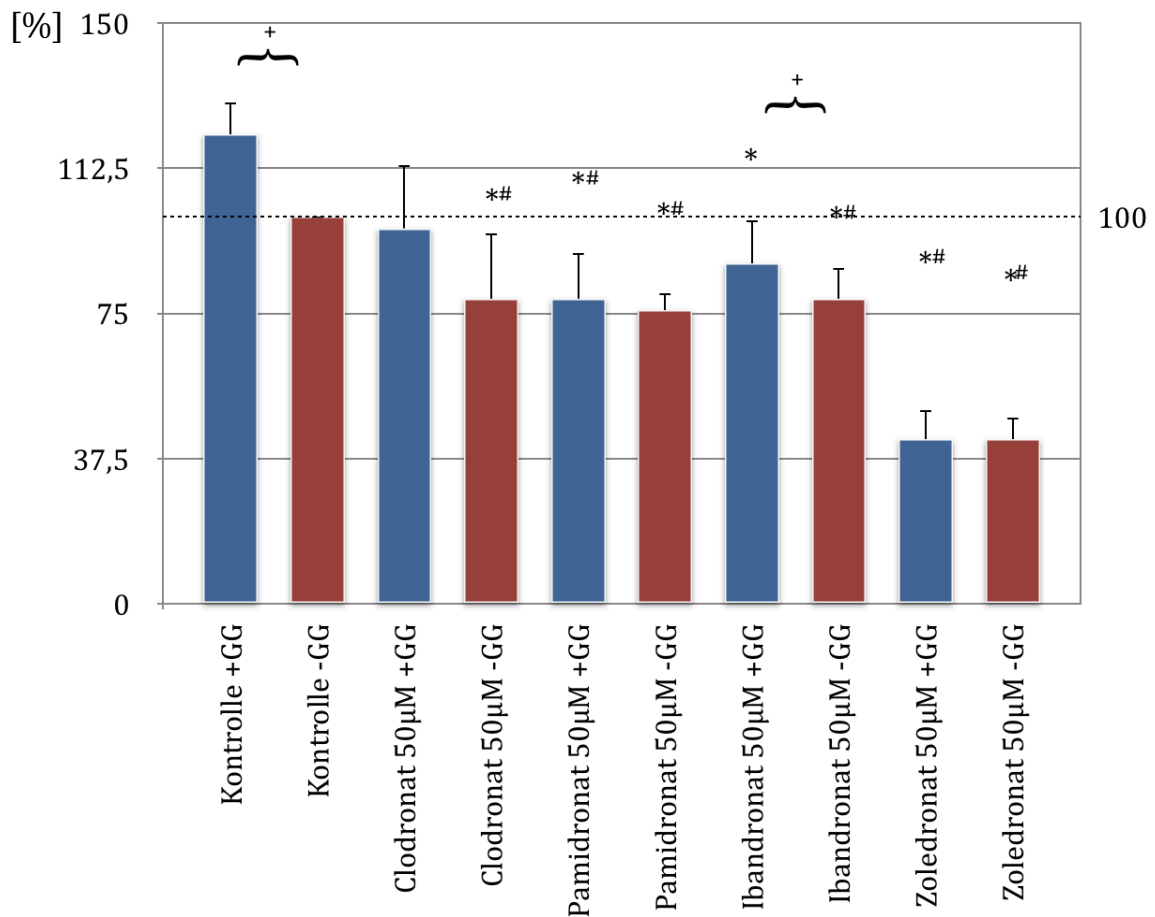


Abbildung 07: Migrationsassay Humane Osteoblasten (HOB); (#) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle ohne Geranyl-Geraniol-Substitution. (*) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle mit Geranyl-Geraniol-Substitution. (+) symbolisiert signifikante Veränderung des Migrationsverhaltens nach Zugabe von Geranyl-Geraniol zur gleichen Substanzgruppe, respektive Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz gilt bei $p < 0,05$.

4.1.2 Migrationsassay der Bisphosphonate auf Fibroblasten (NHDF)

Bei der Auswertung der Ergebnisse des Einflussverhaltens der Bisphosphonate auf Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten Bisphosphonate ohne GG Substitution eine signifikante Inhibition der Migration gegenüber der Kontrollgruppe ohne GG aufwiesen. Auch bei den NHDF war die stärkste Hemmung durch Zoledronat gegeben, gefolgt von Ibandronat und Pamidronat. Der

am schwächsten ausgeprägte negative Effekt auf das Migrationsverhalten der Zellen wies Clodronat auf.

Pamidronat, Ibandronat und Zoledronat mit jeweils Geranyl-Geraniol-Substitution zeigten gegenüber der Kontrollgruppe ohne GG-Zusatz eine signifikante Hemmung der Zellmigration. Clodronat unter Einfluss von GG wies unterdessen eine Steigerung der Migration gegenüber der gleichen Kontrollgruppe auf. Diese war jedoch nicht signifikant.

Bei der Analyse des Migrationsprofils konnte eine signifikante Steigerung des Migrationsverhaltens durch Zugabe von Geranyl-Geraniol in den Gruppen Clodronat, Pamidronat, Ibandronat und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Dies lag bei Zoledronat nicht vor.

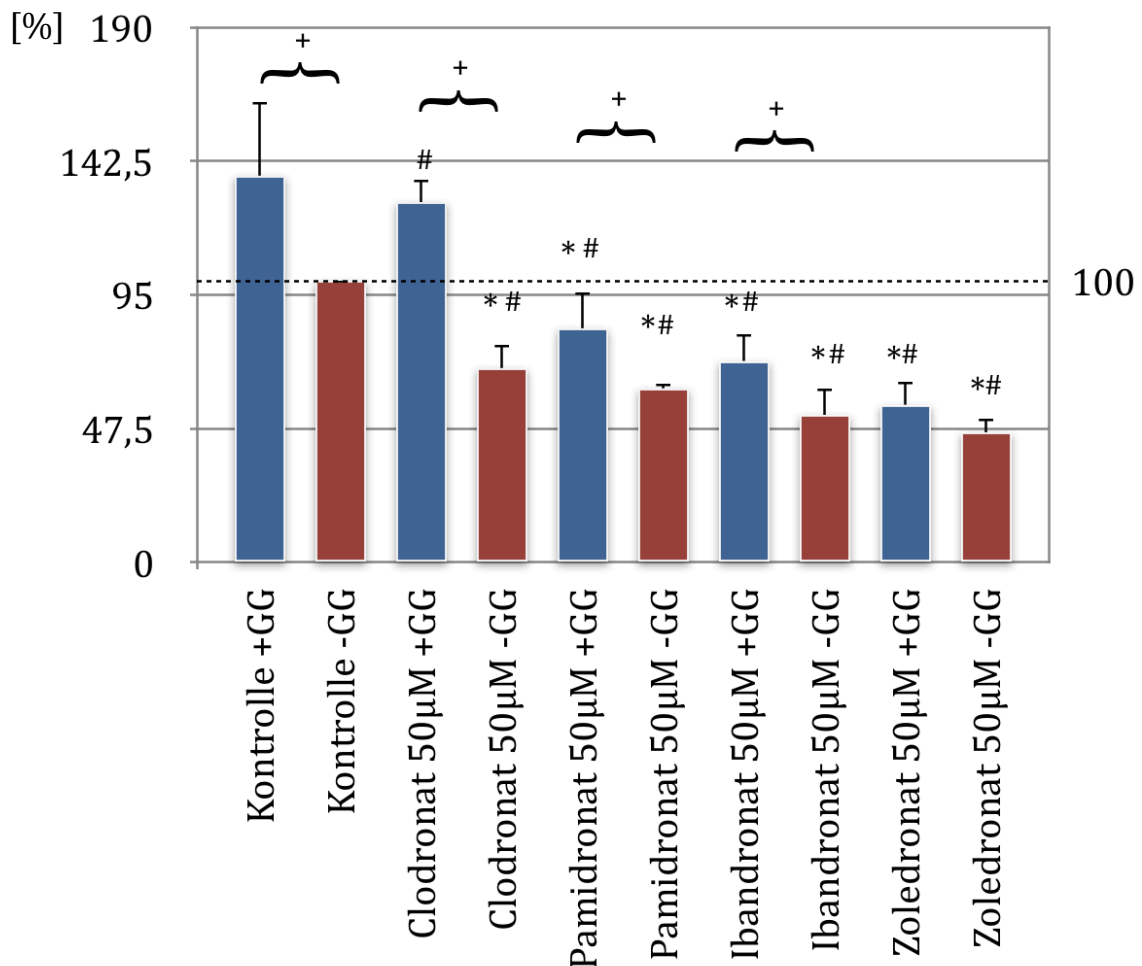


Abbildung 08: Migrationsassay Fibroblasten (NHDF); (#) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle ohne Geranyl-Geraniol-Substitution. (*) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle mit Geranyl-Geraniol-Substitution. (+) symbolisiert signifikante Veränderung des Migrationsverhaltens nach Zugabe von Geranyl-Geraniol zur gleichen Substanzgruppe, respektive Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz gilt bei $p < 0,05$.

4.1.3 Migrationsassay der Bisphosphonate auf Nabelschnurepithelzellen (HUVEC)

Im Rahmen des Migrationsassays der HUVEC-Zellen unter Inkubation mit den Bisphosphonaten Clodronat, Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat in 50µM Konzentration mit und ohne Zugabe von Geranyl-Geraniol konnten folgende Ergebnisse festgestellt werden:

Die Bisphosphonate Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat hemmen signifikant das Migrationsverhalten der HUVEC-Zellen (Kontrollgruppe ohne GG-Zugabe). Den stärksten Negativeinfluss wies Zoledronat auf, gefolgt von Ibandronat und Pamidronat.

Unter Clodronatinkubation wurde keine Hemmung, sondern eine leichte jedoch signifikante Steigerung in der Migration beobachtet. Bei der Beurteilung der Zellen unter Clodronatapplikation mit Geranyl-Geraniol war gegenüber der Kontrollgruppe ohne GG eine signifikante Zunahme der Migration zu beobachten. Für die mit Ibandronat und Pamidronat behandelten Zellen mit GG im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne GG lässt sich folgendes feststellen: die signifikante Hemmung des Migrationsverhaltens, welches unter reinem Bisphosphonat Einfluss zu verzeichnen ist, wurde durch die zusätzliche Inkubation der Zellen mit Geranyl-Geraniol aufgehoben.

Nur unter Zoledronateinfluss mit GG konnte die Migration gegenüber der Kontrollgruppe ohne GG signifikant reduziert werden.

Im direkten Vergleich der Gruppen mit und ohne GG zeigten alle fünf Proben, dass GG die inhibitorische Wirkung auf das Migrationsverhalten der HUVEC signifikant abschwächt. Folglich führt die GG Zugabe zu einer signifikanten Steigerung des Migrationsverhaltens der HUVEC Zellen in allen getesteten Gruppen.

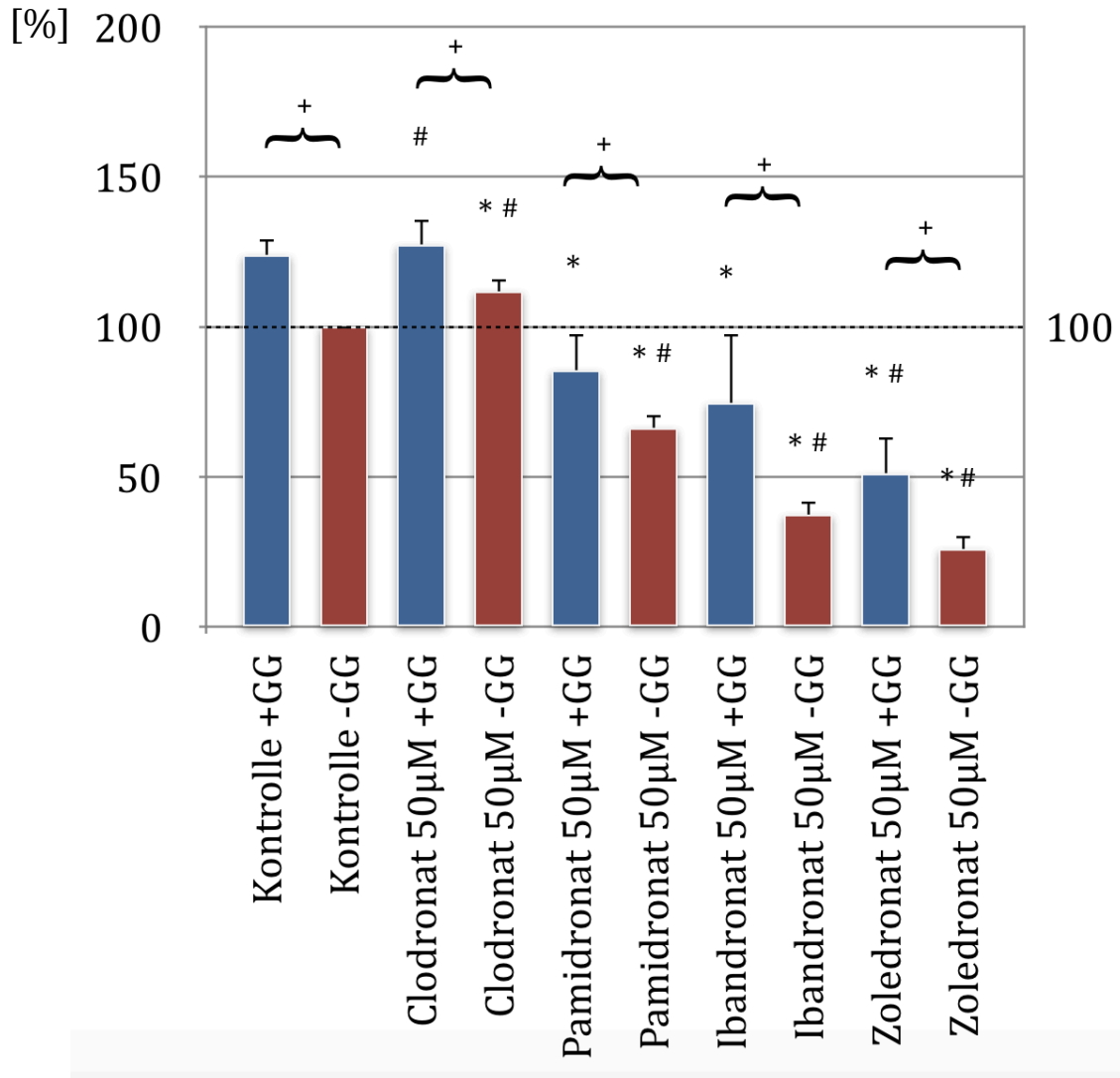


Abbildung 09: Migrationsassay Humane umbilicalcord vein endothel cells (HUVEC); (#) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle ohne Geranyl-Geraniol-Substitution. (*) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle mit Geranyl-Geraniol-Substitution. (+) symbolisiert signifikante Veränderung des Migrationsverhaltens nach Zugabe von Geranyl-Geraniol zur gleichen Substanzgruppe, respektive Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz gilt bei $p < 0,05$.

4.1.4 Migrationsassay der Bisphosphonate auf endotheliale Progenitorzellen (EPC)

Die Untersuchungen des Einflussverhaltens der Bisphosphonate in einer Konzentration von 50µM auf die Migrationsfähigkeit von Endothelialen Progenitorzellen, die im Rahmen des Versuchsansatzes anteilig mit Geranyl-Geraniol substituiert wurden, haben folgende Ergebnisse gezeigt:

Alle Bisphosphonate in ihrer getesteten Konzentration ohne GG-Zugabe wiesen eine signifikante Inhibition in ihrem Migrationsverhalten gegenüber der Kontrollgruppe ohne GG auf.

Hierbei zeigte sich Zoledronat als stärkster Hemmstoff, gefolgt von Clodronat. Den schwächsten inhibitorischen Effekt auf die EPCs konnte durch Pamidronat demonstriert werden.

Auch der direkte Vergleich der Kontrollgruppe mit GG-Substitution und den Versuchsansätzen der Bisphosphonate mit Geranyl-Geraniol führte zu signifikanten Veränderungen in der Migration. Jedes der getesteten Bisphosphonate mit GG Applikation senkte das Migrationsbestreben der EPCs gegenüber der Kontrollgruppe mit Geranyl-Geraniol.

Die Gruppenanalyse zeigte, dass ein GG Zusatz zu den Zellreihen im Vergleich zu einer Inkubation ohne Geranyl-Geraniol, in allen Versuchsansätzen das Bestreben zur Migration der Zellen signifikant positiv beeinflusste.

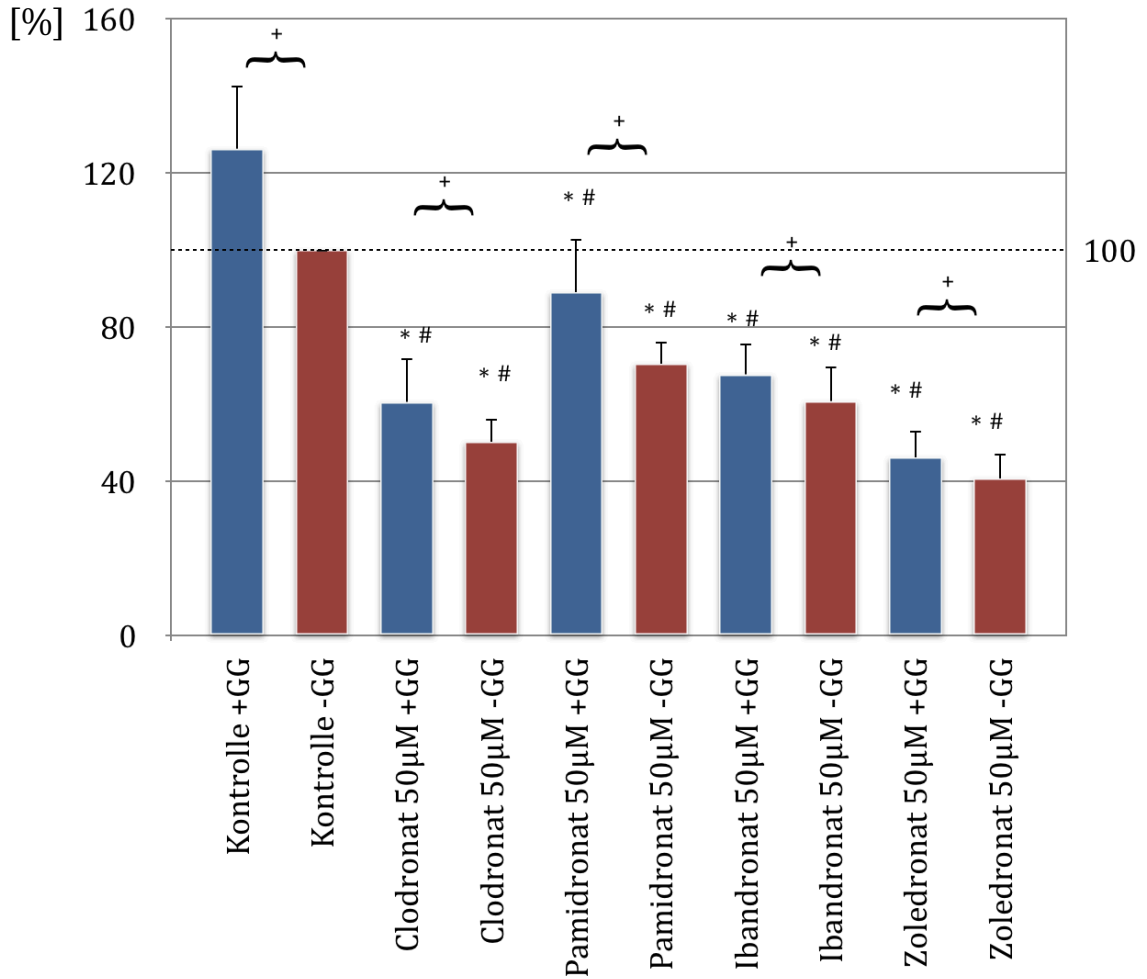


Abbildung 10: Migrationsassay endothelialer Progenitorzellen (EPC); (#) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle ohne Geranyl-Geraniol-Substitution. (*) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle mit Geranyl-Geraniol-Substitution. (+) symbolisiert signifikante Veränderung des Migrationsverhaltens nach Zugabe von Geranyl-Geraniol zur gleichen Substanzgruppe, respektive Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz gilt bei $p < 0,05$.

4.2 Die Beeinflussung des „Colony formings“ der EPC

Bei dem Versuchsaufbau des Colony Forming Assays soll das Bestreben der EPCs eine Kolonie in geeignetem Nährmedium auszubilden unter Inkubation mit den Bisphosphonaten Clodronat, Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat untersucht werden. Hierzu werden die Bisphosphonate in den Konzentrationen 5µM, 25µM und 50µM zugesetzt. Des Weiteren wird bei der Hälfte der Versuchsreihen Geranyl-Geraniol substituiert, um den Einfluss von GG auf die Zellen und die Bisphosphonatwirkung darzustellen. Es verbleibt eine Kontrollgruppe ohne Bisphosphonate und ohne GG, die als 100% gesetzt wird. Zudem wird eine Kontrollgruppe ohne Bisphosphonatzugabe jedoch unter GG Einfluss als weitere Vergleichsgruppe angesetzt.

Die Ergebnisse zeigten, dass in den Bisphosphonatversuchsreihen ohne GG Substitution eine signifikante konzentrationsabhängige Verminderung des Koloniebildungsverhaltens gegenüber der Kontrollgruppe ohne GG-Applikation vorlag.

Diese Reduktion in der Koloniezahl zeigte sich am deutlichsten bei hoher Bisphosphonatkonzentration (50µM) und am geringsten bei 5µM Konzentration. Weiterhin war das Bestreben, Kolonien auszubilden beim hochpotenten stickstoffhaltigen Zoledronat am deutlichsten vermindert, gefolgt von der Clodronat- und der Ibandronatversuchsreihe. Die meisten gebildeten Kolonien entstanden unter Pamidronatsubstitution.

Bei der Betrachtung der Versuchsreihen, die zu dem Bisphosphonat zusätzlich GG substituiert bekamen, zeigten sich gegenüber der Kontrollgruppe ohne GG Zugabe eine konzentrationsabhängige Verminderung der Koloniezahl.

Jedoch war die inhibitorische Tendenz nicht so stark ausgeprägt wie bei den Bisphosphonatgruppen ohne GG Einfluss.

In der Gruppenanalyse untereinander konnte folgendes dargestellt werden: Je höher die Bisphosphonatkonzentration, desto stärker wird die Kolonienzahl vermindert. Die Applikation von GG zu den Bisphosphonatversuchsreihen führte bei den EPC zu einer signifikanten Zunahme des Koloniebildungsverhaltens verglichen mit der Versuchsreihe ohne GG-Zugabe.

ERGEBNISSE

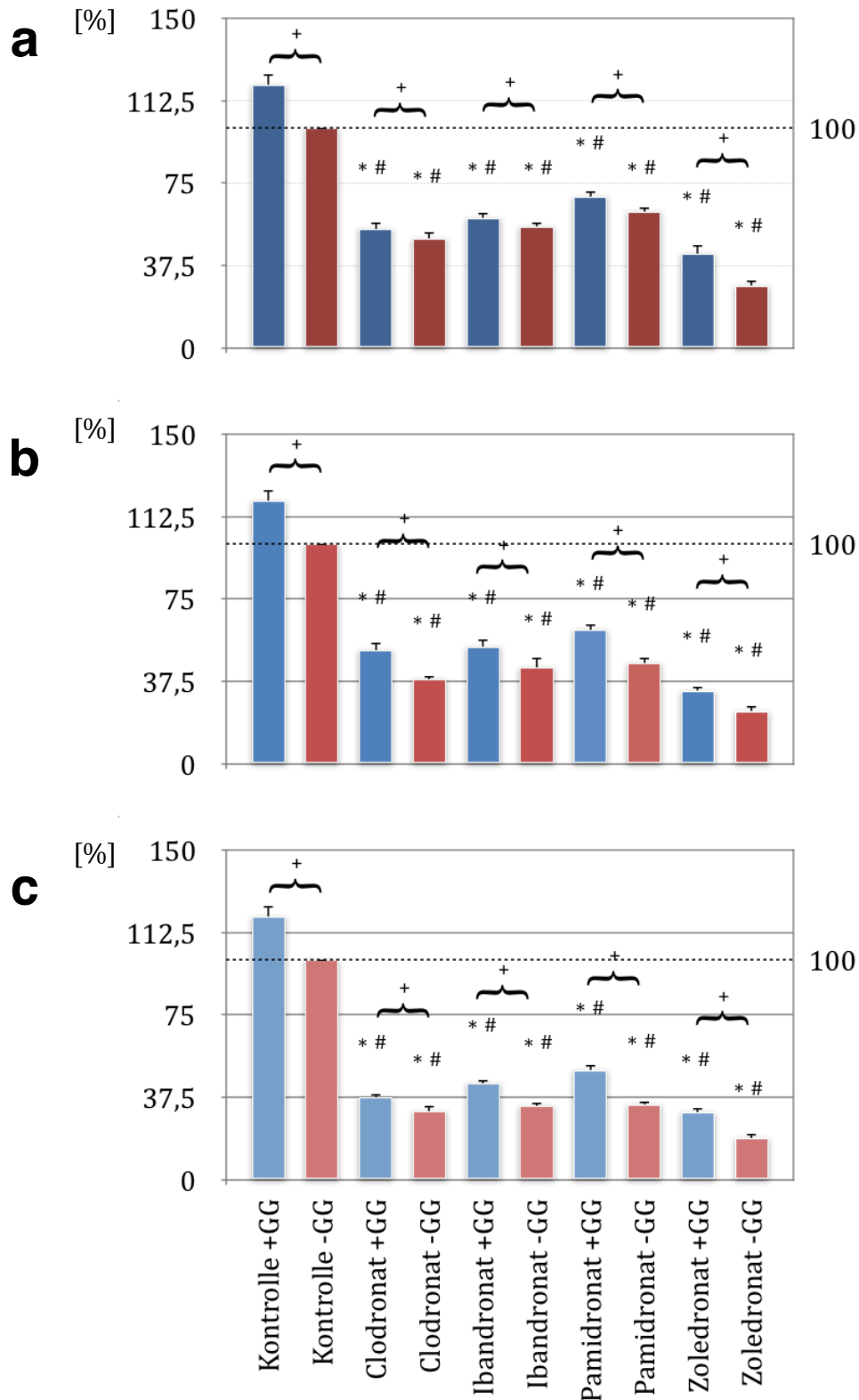


Abbildung 11: Colony Forming unit Assay der endothelialen Vorläuferzellen (EPC); (a) Substituierte Bisphosphonate in 5µM Konzentration; (b) Substituierte Bisphosphonate in 25µM Konzentration; (c) Substituierte Bisphosphonate in 50µM Konzentration; (#) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle ohne Geranyl-Geraniol-Substitution. (*) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle mit Geranyl-Geraniol-Substitution. (+) symbolisiert signifikante Veränderung des Kolonieförungsverhaltens nach Zugabe von Geranyl-Geraniol zur gleichen Substanzgruppe, respektive Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz gilt bei $p < 0,05$.

4.3 Die Beeinflussung der Zellviabilität durch Bisphosphonate im MTT-Assay

Im Rahmen des angewandten MTT-Assay wurde der Einfluss der Bisphosphonate Clodronat, Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat in den Konzentrationen von 5µM und 50µM auf die Zelllinien der Fibroblasten (NHDF) und der humanen umbilikal venösen Endothelzellen (HUVEC) getestet. Des Weiteren wurde neben der Auswirkung der Bisphosphonate auf die Viabilität der o.g. Zelllinien zusätzlich der Einfluss von Geranyl-Geraniol untersucht.

4.3.1 MTT-Assay mit NHDF

Der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den getesteten Bisphosphonaten ohne GG-Substitution ergab eine signifikante Inhibition der Viabilität der Fibroblasten bei Clodronat 50µM, Pamidronat 50µM und Zoledronat 50µM. Unter Inkubation der Zellen mit Ibandronat 50µM zeigten sich keine Signifikantien gegenüber der Kontrollgruppe. Den stärksten Negativeinfluss demonstrierte in dieser Analyse Pamidronat, gefolgt von Clodronat und Zoledronat.

Die Kultivierung der Zellen unter ausschließlicher Bisphosphonat-Gabe in der niedrigeren Konzentration von 5µM führte zu folgenden Feststellungen:

Während die Bisphosphonate Clodronat, Ibandronat und Pamidronat zwar eine Verminderung in der Viabilität zeigten, konnten die Werte jedoch nicht als signifikant gegenüber der Kontrolle ohne GG-Zugabe eingestuft werden. Zoledronat löste darüber hinaus keinen inhibitorischen Effekt aus.

Stellt man die Ergebnisse der Versuchsreihen, die neben Bisphosphonate in den Konzentrationen 5µM und 50µM auch mit Geranyl-Geraniol substituiert wurden, der Kontrollgruppe ohne GG-Zugabe gegenüber, so zeigte sich ausschließlich für Pamidronat 50µM eine signifikante Verringerung der Viabilität der NHDF.

In den Ibandronat-Versuchsreihen der Konzentrationen 5µM und 50µM sowie in dem Zellsatz, der mit Zoledronat 5µM inkubiert wurde, führte die Substitution von Geranyl-Geraniol zu einer signifikanten Zunahme der Viabilität.

Bei den verbleibenden Bisphosphonatversuchsreihen konnte unter GG-Zugabe tendenziell eine Verminderung des inhibitorischen Einflusses gegenüber alleiniger Bisphosphonatapplikation festgestellt werden. Dieser war jedoch nicht signifikant.

ERGEBNISSE

Zusammenfassend konnte in der Gruppenanalyse dargestellt werden, dass sich ein GG-Zusatz zu den Bisphosphonat-Zellreihen gegenüber einer Inkubation ohne Geranyl-Geraniol bei Ibandronat 5µM und 50µM sowie bei Zoledronat 50µM signifikant positiv auf die Zellviabilität auswirkt und den inhibitorischen Effekt der Bisphosphonatgabe eindämmt.

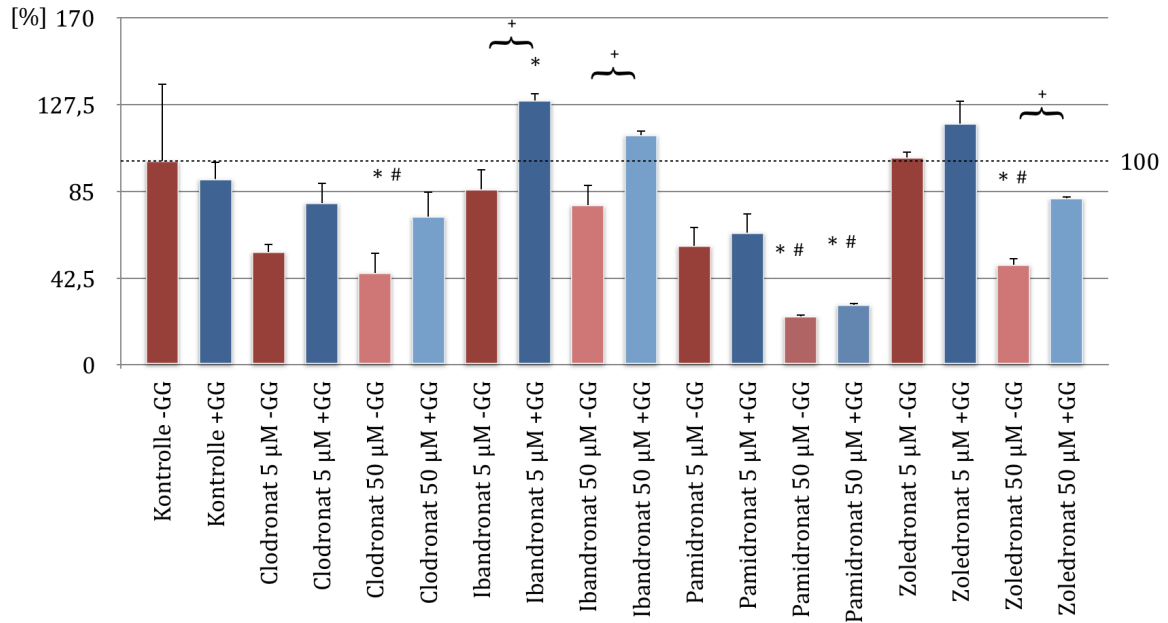


Abbildung 12: MTT-Assay der Fibroblasten (NHDF); (#) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle ohne Geranyl-Geraniol-Substitution. (*) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle mit Geranyl-Geraniol-Substitution. (+) symbolisiert signifikante Veränderung der Zellviabilität nach Zugabe von Geranyl-Geraniol zur gleichen Substanzgruppe, respektive Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz gilt bei $p < 0,05$.

4.3.2 MTT Assay mit HUVEC

Im MTT Assay der HUVEC-Zellen konnte im direkten Vergleich der unter den Bisphosphonat-inkubierten Zellen ohne GG-Applikation und der Kontrollgruppe ohne GG-Zugabe folgendes festgestellt werden:

Bei allen vier getesteten Bisphosphonaten wurde ein konzentrationsabhängiger inhibitorischer Effekt aufgezeigt. Gegenüber der 5µM Konzentration präsentierten die Bisphosphonate bei einer 50µM Konzentration gleichermaßen eine stärkere Beeinflussung der HUVEC-Zellen.

Die Ergebnisse des MTT Assays zeigten, dass alle vier Bisphosphonate in einer 50µM Konzentration ohne GG-Substitution gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Hemmung der Zellviabilität verursachen. Diese Inhibition war am stärksten bei Zoledronat ausgeprägt, gefolgt von Ibandronat und Clodronat. Der schwächste Einfluss gegenüber der Kontrollgruppe ohne GG-Substitution war bei Pamidronat zu verzeichnen.

In der Analyse der Bisphosphonat-Versuchsreihe in 5µM Konzentration ohne GG Zugabe und der Kontrollgruppe ohne Geranyl-Geraniol-Applikation zeigte sich lediglich bei Ibandronat und Zoledronat eine signifikante Hemmung der Viabilität. Diese fiel für Zoledronat geringfügig stärker aus als für Ibandronat. HUVEC-Zellen unter reinem Einfluss von Clodronat und Pamidronat in der Konzentration 5µM zeigen zwar eine Tendenz zur Inhibition gegenüber der Kontrollgruppe, jedoch ohne Signifikanz.

Im Vergleich der Versuchsreihen zwischen Bisphosphonaten mit GG-Substitution und der Kontrollgruppe ohne GG-Zugabe zeigten die Bisphosphonate Clodronat, Ibandronat und Zoledronat in 50µM Konzentration eine signifikante Verminderung der Zellviabilität.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der Gruppen, bei denen GG substituiert wurde versus den Gruppen, die keine Applikation von Geranylgeraniol erhalten haben konnte folgendes aufgezeigt werden:

Bei allen Gruppen, die unter Bisphosphonateinfluss standen, konnte die hemmende Tendenz der Medikamente durch den Einfluss des zugeführten GG abgeschwächt werden. Eine signifikante Abschwächung des hemmenden Einflusses wurde lediglich unter der Applikation von Clodronat 50µm, Zoledronat 5µM und Zoledronat 50µM beobachtet.

ERGEBNISSE

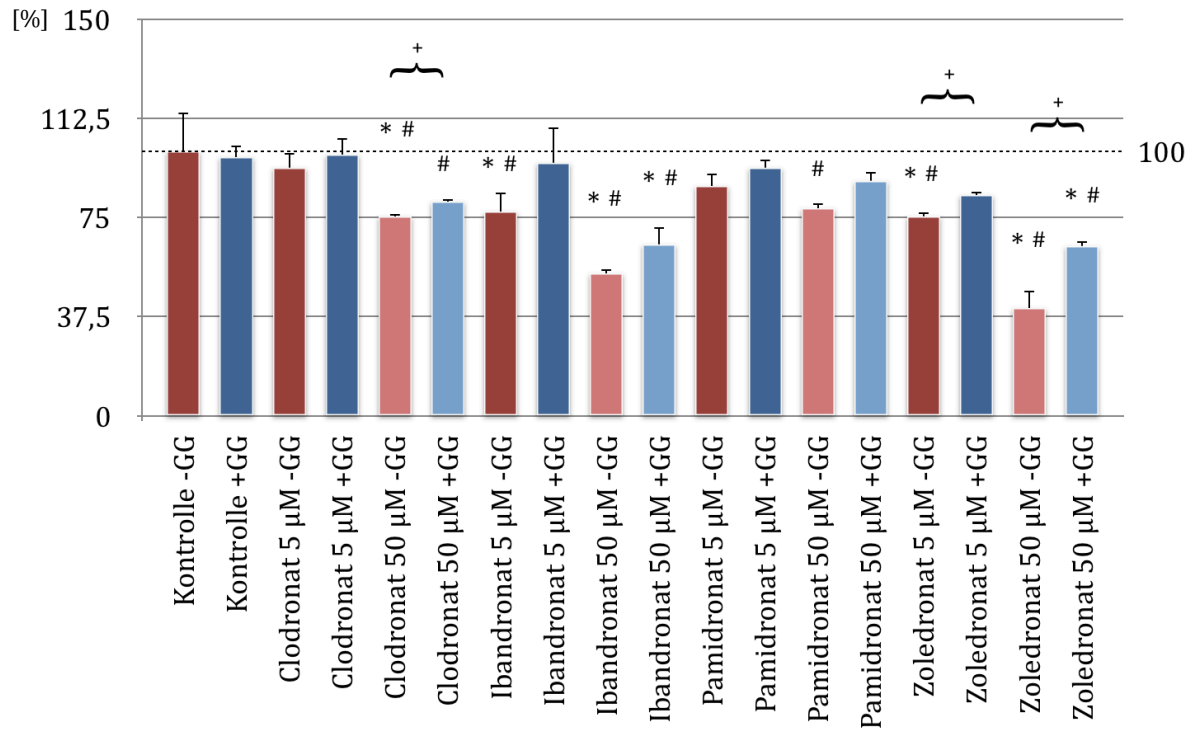


Abbildung 13: MTT-Assay der Humane umbilicalcord vein endothel cells (HUVEC); (#) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle ohne Geranyl-Geraniol-Substitution. (*) symbolisiert statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle mit Geranyl-Geraniol-Substitution. (+) symbolisiert signifikante Veränderung der Zellviabilität nach Zugabe von Geranyl-Geraniol zur gleichen Substanzgruppe, respektive Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz gilt bei $p < 0,05$.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich tabellarisch wie folgt zusammenfassen.

	Clodronat	Pamidronat	Ibandronat	Zoledronat
Migration [50µM]				
- Osteoblast	↓	↓	↓*	↓
- NHDF	↓*	↓*	↓*	↓
- HUVEC	↑*	↓*	↓*	↓*
- EPC	↓*	↓*	↓*	↓*
Colony Forming				
- EPC 5µM	↓*	↓*	↓*	↓*
- EPC 25µM	↓*	↓*	↓*	↓*
- EPC 50µM	↓*	↓*	↓*	↓*
MTT-Assay				
- NHDF 5µM	0	0	0*	0
- NHDF 50µM	↓	↓	0*	↓*
- HUVEC 5µM	0	0	↓	↓*
- HUVEC 50µM	↓*	↓	↓	↓*

Tabelle 02: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse; (↑) symbolisiert signifikante Steigerung gegenüber der Kontrollgruppe ohne GG-Zugabe; (↓) kennzeichnet signifikante Verminderung gegenüber der Kontrollgruppe ohne GG-Substitution; (0) kennzeichnet keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrollgruppe ohne GG-Substitution (*) stellt eine signifikante Verminderung der Bisphosphonatwirkung durch die Zugabe von Geranyl-Geraniol dar;

5. Diskussion

5.1 Beeinflußung der Knochenhomöostase durch Bisphosphonate

Die Medikamentengruppe der Bisphosphonate gehört zur Kategorie der osteoanabolen Stoffe. Sie werden bei Indikationen wie beispielsweise der Osteoporose - einer generalisierten Abnahme der Knochendichte - eingesetzt. Ein weiteres Einsatzgebiete ist die Hemmung der Progredienz osteolytischer Metastasen und onkologischer Krankheitsbilder. Die hierbei zu erreichenden therapeutischen Erfolge kommen durch die Bisphosphonat induzierte Hemmung der Osteoklasten zustande. Sie wird als Schlüsselzelle für die osteoanabole Wirkung der Bisphosphonate angesehen. Der hierdurch verminderte Knochenabbau bewirkt eine Veränderung der Knochenhomöostase in Richtung Knochenaufbau [Aghaloo et al. 2015].

Jedoch wirken Bisphosphonate nicht isoliert auf die Osteoklasten. So konnte gezeigt werden, dass Bisphosphonate auch auf die im Knochen befindlichen Zelllinien der Osteozyten und Osteoblasten Einfluss nehmen. Der Effekt von Bisphosphonaten auf Osteoblasten konnte erstmalig von Khokher und Dandona 1989 demonstriert werden. Sie zeigten, dass durch die Bisphosphonatzugabe die Proliferation von Osteoblasten sowie ihre Sekretion von alkalischer Phosphatase durch die Bisphosphonate Clodronat und Etidronat gehemmt werden [Khokher et al. 1989]. Die hier beschriebene inhibitorische Wirkung der Bisphosphonate auf die Osteoblasten wurde in den Jahren 2006 durch Iwata, 2008 durch Idris und 2009 durch Orriss bestätigt. Insbesondere die Aminobisphosphonate wie Pamidronat und Alendronat zeigten ein vermindertes Osteoblastenwachstum sowie eine gesteigerte Osteoblastenapoptose. Ebenso wurde eine dosisabhängige Hemmung der Protein-Prenylierung der Osteoblasten beschrieben [Iwata et al. 2006, Idris et al. 2008, Orriss et al. 2009].

Der in der Literatur aufgezeigte inhibitorische Einfluss der Bisphosphonate auf Osteoblasten deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie. Im Rahmen des Migrationsassays konnte eine signifikante Hemmung der Migrationsfähigkeit humaner Osteoblasten bei allen vier Bisphosphonatpräparaten (Clodronat, Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat) festgestellt werden. Dieser war bei dem Bisphosphonat der ersten Generation Clodronat geringer ausgeprägt. Die

Hemmung der Migrationsaktivität der Osteoblasten war bei der Zugabe von Zoledronat am größten. Hier wurde im Durchschnitt eine relative Hemmung auf 45% der Migrationsfähigkeit zur Kontrollgruppe verzeichnet. Auch hier stehen die demonstrierten Ergebnisse dieser Studie in Einklang mit den in der Literatur publizierten Daten [Idris et al. 2008]. Des Weiteren kann gezeigt werden, dass der inhibitorische Einfluss von Aminobisphosphonaten auf Osteoblasten ausgeprägter ist als der von Bisphosphonaten der ersten Generation wie beispielsweise Clodronat.

Im Jahre 2011 wurden zusätzlich pro-apoptotische Effekte der Aminobisphosphonate auf humane Osteoblasten *in vitro* publiziert. Während Clodronat als Bisphosphonat der ersten Generation keine gesteigerte Apoptoserate bei humanen Osteoblasten induzierte, war diese bei Zoledronat und Pamidronat signifikant gegenüber Clodronat und der Kontrollgruppe gesteigert [Walter et al. 2011].

Zudem konnte ein Einfluss durch Bisphosphonat-Applikation auf die dritte im Knochen befindliche Zelllinie der Osteozyten festgestellt werden. Es wurde zusätzlich eine dosisabhängige Unterdrückung der Kollagenproduktion der Osteozyten durch Etidronat nachgewiesen. Zudem erfolgte bei einer langfristigen Gabe von Etidronat eine Hemmung der Knochenmineralisation, welche zum Krankheitsbild einer medikamenten-induzierten, reversiblen Osteomalazie führen kann [Adami et al. 1996, Fleisch 1997].

5.2 Extraskelletale Wirkung der Bisphosphonate

Die Tatsache, dass die Medikamentengruppe der Bisphosphonate eine Wirkung außerhalb des Knochens zeigen, ist spätestens seit den beschriebenen Nebenwirkungen zum Beispiel der Ösophagitis oder Nephritis bekannt [Markowitz et al. 2001, Cryer et al. 2002]. Dabei sind besonders die Effekte der Bisphosphonate auf die zellulären Bestandteile der Wundheilung wie Fibroblasten oder Zelllinien der Angiogenese im wissenschaftlichen Fokus.

5.2.1 Wirkung der Bisphosphonate auf die Weichgewebe

Die Wirkung der Bisphosphonate auf extraskelettales Gewebe wurde in einer *in vivo* Versuchsreihe an Ratten im Rahmen eines dentoalveolären Traumamodelles analysiert. Hierbei sollte nach einem experimentell induziertem traumatischen Zahnverlust im Sinne eines Avulsionstraumas, die hierbei entstehende Komplikation einer externen Resorption nach chirurgischer Replantation durch topische Applikation des Bisphosphonates Alendronat unterdrückt werden. Um diese klinische Versuchsreihe durchzuführen, musste vorab die Biokompatibilität von Alendronat am umliegenden Weichteilgewebe analysiert werden. Bei dieser Analyse konnte eine ausgeprägte Zytotoxizität des Alendronates auf Endothelzellen und subkutanes Bindegewebe nachgewiesen werden [Moreira et al. 2005]. Im darauffolgenden Jahr untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe die Wirkung von Alendronat auf die in der Alveole ansässigen Fibroblasten des peridontalen Ligamentes. Es zeigte sich, dass die Alendronatapplikation von 10µM einen direkten zytotoxischen Effekt auslöst [Correia Vde et al. 2006]. Der Effekt der Bisphosphonate auf Fibroblasten wurde zudem an humanen Zellen getestet. Es konnte eine zytotoxische Wirkung der Bisphosphonate Alendronat und Pamidronat demonstriert werden. Bei beiden Versuchsreihen wurden den Bisphosphonaten Apoptose-induzierende und proliferationsinhibitorische Eigenschaften zugeschrieben. Vor allem die Förderung der Apoptose war in der Pamidronatgruppe signifikant im Vergleich zu Alendronat gesteigert [Soydan et al. 2015]. Bei der Untersuchung des Einflussverhaltens des potentesten Bisphosphonats Zoledronat auf Fibroblasten konnte ein zytotoxischer Effekt festgestellt werden. Basso und Kollegen zeigten in ihrer Arbeit eine signifikant verminderte Viabilität der Fibroblasten bei Konzentrationen von 5µM [Basso et al. 2013]. Scherper und Kollegen konnten in ihrer Studie demonstrieren, dass 5µM Zolendronat die maximale Konzentration darstellt, welche sowohl im Knochen als auch im Speichel bei Patienten, die unter einer intravenösen Bisphosphonattherapie stehen, erreicht werden [Scherper et al. 2009].

Die hier in Literatur beschriebenen Ergebnisse stehen nur zum Teil im Einklang mit den Ergebnissen dieser Studien. Im Rahmen des hier durchgeführten Migrationsassays mit 50µM Bisphosphonaten konnte eine signifikante Hemmung der Fibroblasten festgestellt werden. Der inhibitorische Effekt verhielt sich linear zur relativen biologischen Potenz der getesteten Bisphosphonate. Hier zeigte

Zoledronat die stärkste und Clodronat die schwächste Hemmung der Migrationsfähigkeit. Auch beim MTT-Assay konnte für die Bisphosphonate Clodronat, Pamidronat und Zoledronat in einer Konzentration von 50µM eine signifikante Reduktion der Viabilität der Fibroblasten aufgezeigt werden. Bei Ibandronatgabe mit 50µM zeigte sich ein negativer Einfluss auf die Viabilität. Dieser war jedoch nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Anders als in der Studie von Basso und Kollegen konnte bei der Bisphosphonatinkubation in 5µM Konzentration keine signifikante Verminderung der Viabilität im MTT Assay demonstriert werden [Basso et al. 2013]. Der festzustellende inhibitorische Effekt korrelierte nicht mit der biologischen Potenz. Demzufolge scheinen Bisphosphonate in Konzentrationen von 5µM keinen zielgerichteten proportionalen Einfluss auf die Viabilität von NHDF auszuüben.

5.2.2 Wirkung der Bisphosphonate auf die Angiogenese

Durch die inhibitorische Wirkung der Bisphosphonate auf die Tumorexpansion bei onkologischen Krankheitsbildern wurde lange Zeit ein antiangiogenetischer Effekt dieser Medikamentengruppe vermutet. Dieser konnte 2002 klinisch durch Santini und experimentell durch Wood und Kollegen nachgewiesen werden. Während Santini einen Rückgang im Blut zirkulierender proangiogener Faktoren wie VEGF unter Bisphosphonattherapie nachwies, zeigte Wood, dass die Proliferation, Adhäsion und Migration von Endothelzellen (HUVEC) signifikant durch Zoledronat gehemmt werden [Santini et al. 2002, Wood et al. 2002]. Ein ähnlicher kausaler Zusammenhang konnte 2007 durch Allegra und Kollegen aufgezeigt werden. Hierbei wurde demonstriert, dass die Anzahl an zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen im Blut bei Patienten mit Bisphosphonat induzierter Kiefernekrose signifikant gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe vermindert war [Allegra et al. 2007]. Im Umkehrschluss wurden Studien publiziert, in denen das klinische Bild von Kiefernekrosen nicht nach der Einnahme von Bisphosphonaten, sondern nach antiangiogenetischer Therapie - wie dem VEGF-Antikörper Bevacicumab - beobachtet wurden [Estilo et al. 2008]. Neben Zoledronat konnte auch für die Bisphosphonate Aledronat [Hashimoto et al. 2007], Neridronat [Ribatti et al. 2007], Risedronat und Ibandronat [Fournier et al. 2002] Angiogenese hemmende Eigenschaften demonstriert werden. Fournier und Ribatti wiesen in ihren Arbeiten

auch den nicht stickstoffhaltigen Bisphosphonaten wie Clodronat eine antiangiogenetische Wirkung nach [Fournier et al. 2002, Ribatti et al. 2007, Ribatti et al. 2008]. Diesen Effekt konnte Ribatti des Weiteren *in vivo* bestätigen. Hier wurde mit Hilfe des CAM Assays an Hühnerembryos durch Clodronatinkubation eine Hemmung der FGF-2 induzierten Angiogenese demonstriert [Ribatti et al. 2008]. In einem experimentellen Parodontitismodell konnte Cetinkaya und Kollegen beweisen, dass der antiangiogenetische Effekt des Bisphosphonates Risedronat erst nach einer gewissen Latenzzeit von bis zu 8 Wochen auftritt. Bei kurzfristigen Gaben von Risedronat wurden die antiangiogenetischen Eigenschaften jedoch nicht bestätigt [Cetinkaya et al. 2008].

Basso konnte ebenfalls zeigen, dass die Sekretion von antiangiogenetischen Zytokinen wie VEGF bei humanen Epithelzellen bereits durch Konzentrationen von 5µM signifikant gehemmt werden [Basso et al. 2013].

In einem direkten Vergleich der antiangiogenetischen Wirkung zwischen nicht-nitrogen und nitrogenhaltigen Bisphosphonaten wurde bei beiden Stoffgruppen eine Hemmung der Angio- und Vaskulogenese nachgewiesen. Hierbei waren die inhibitorischen Eigenschaften der stickstoffhaltigen Bisphosphonate Zoledronat und Pamidronat auf HUVEC und EPCs am stärksten ausgeprägt [Ziebart et al. 2011].

Die im Rahmen dieser Studie erfassten Daten zeigten ebenfalls eine Hemmung der Bisphosphonate auf Zellen des Gefäßsystems. Es wurden Vorläuferzellen (EPC) und ausdifferenzierte Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) untersucht. Das Migrationsverhalten dieser beiden Zelllinien konnte durch die Zugabe der Aminobisphosphonate Pamidronat, Ibandronat und Zoledronat linear zu ihrer biologischen Potenz signifikant reduziert werden. Das nicht nitrogenhaltige Clodronat unterschied sich in seinem Effekt auf die beiden getesteten Zelllinien. Hierbei kam es nur bei den Endothelialen Progenitorzellen zu einer Hemmung der Migrationsfähigkeit. Im Rahmen von weiteren Versuchen wurde das Koloniebildungsverhalten und die Zellviabilität mittels MTT Assay konzentrationsabhängig untersucht. Es kann bei einer Konzentration von 5µM nur eine signifikante Reduktion der Viabilität von HUVEC Zellen bei den stärksten Bisphosphonaten Ibandronat und Zoledronat nachgewiesen werden. Eine Tendenz zur Hemmung der Viabilität ist bei Clodronat und Pamidronat in gleicher Konzentration zu verzeichnen. Bei einer Konzentration von 50µM haben alle vier Bisphosphonate einen negativen Einfluss auf die Viabilität der angiogenetischen

HUVEC Zellen. Auch hier korreliert die Auswirkung auf die Viabilität der maternalen Endothelzellen mit der biologischen Potenz der Aminobisphosphonate.

Analog zu den Ergebnissen der Migration und des MTT Assays konnte eine generalisierte Hemmung des Koloniebildungsverhaltens durch Aminobisphosphonate bei EPCs nachgewiesen werden. Diese ließ sich konzentrationsabhängig und linear zur biologischen Potenz des jeweiligen stickstoffhaltigen Bisphosphonates abbilden. Wie bereits bei der Migration der EPCs zu sehen war, ist der Einfluss von Clodronat in Relation zu seiner biologischen Wirksamkeit stärker ausgeprägt als anzunehmen und zeigte die zweitstärkste konzentrationsabhängige Hemmung der Koloniebildung nach Zoledronat. Diese Ergebnisse stehen in Einklang zu der durch Ribatti und Fournier beschriebenen starken antiangiogenetischen Wirkung von Clodronat [Fournier et al. 2002, Ribatti et al. 2008]. Auch bei den von Scherper beschriebenen physiologischen Konzentrationen von 5µM zeigten alle vier Bisphosphonate eine Hemmung des Koloniebildungsverhaltens von EPCs [Scherper et al. 2009].

Im Zuge von Folgearbeiten mit den gleichen Bisphosphonatpräparaten konnte die *in vivo* Auswirkung dieser Medikamente mit Hilfe einer 3D Matrigel Assay Analyse nachgewiesen werden. Hierbei wurde das Matrigel in weibliche Nacktmäuse implantiert und die Auswirkung auf die mikrovaskuläre Dichte, Raum und Größe hin untersucht. Nach drei Wochen zeigte sich eine signifikante Verminderung der mikrovaskulären Dichte und des Raumes. Die Größe der mikrovaskulären Gefäße wurde bei allen vier Bisphosphonaten nicht reduziert. Gerade in Bezug auf die Kapillaritätsdichte wiesen vor allem die Aminobisphosphonate ausgeprägtere inhibitorische Effekte auf als die non-Aminobisphosphonate [Pabst et al. 2014].

5.3 Diskussion der Ergebnisse in Kontext zur Pathogenese der BP-ONJ

Die vollständige Pathophysiologie der Bisphosphonat assoziierten Kiefernekrose ist derzeit noch nicht abschließend geklärt. Seit ihrer Erstbeschreibung durch Marx und Stern 2002 wurden zahlreiche Entstehungshypothesen postuliert. Hierbei wurde vor allem die hohe, physiologische Remodellingrate der Kiefer als eine wesentliche Ursache angesehen [Dixon RB 1997, Marx 2013]. Nachdem man nachweisen konnte, dass diese jedoch nicht höher als bei anderen Knochen – z.B. die Wirbelsäule – ist, wurde eine direkte pathognomonische Wirkung als

unwahrscheinlich erachtet [Bauss et al. 2008, Ristow et al. 2014]. Durch den fehlenden Beweis einer direkten exo- oder endogenen Ursache liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine multifaktorielle Genese handelt. Diese Annahme wird in der Literatur zunehmend unterstützt [Otto et al. 2010, Walter et al. 2011, Aghaloo et al. 2015]. In diesem Kontext postuliert Aghaloo, dass Therapieansätze diese multifaktorielle Genese berücksichtigen müssen, um erfolgreich sein zu können [Aghaloo et al. 2015]. Im Wesentlichen werden vier Hypothesen mit potenziell synergistischen Effekten diskutiert:

- die Beeinflussung des Knochenremodellings,
- die Weichgewebstoxizität,
- die Inhibition der Angiogenese sowie
- der Einfluss auf das Immunsystem in Kombination mit entzündlichen Prozessen und Infektionen.

Beeinflussung des Knochenremodellings

Da der Hauptwirkmechanismus der Bisphosphonate die Inhibition der Osteoklastenfunktion ist, wird diese Beeinflussung des Remodellingprozesses als Ursache der Entwicklung von Kiefernekrosen angesehen [Suzuki et al. 2006, Kimmel 2007]. Die Osteoklastenaktivität wird zumeist über das RANK/RANKL/OPG System reguliert. Hierbei nimmt RANKL die zentrale Position dieses Regulierungskreislaufes ein. Durch vermehrte Expressierung von RANKL durch Osteoblasten und aktivierte T-Lymphozyten wird der an den Osteoklastenvorläuferzellen befindliche Rezeptor RANK aktiviert. Dies setzt die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung der Vorläuferzelle zu einem reifen Osteoklasten in Gang. Das von Osteoblasten produzierte Osteoprotegerin (OPG) bindet RANKL und inaktiviert es in seiner Funktion. Dadurch wird die osteoklastäre Reifung und Aktivierung unterbunden [Suda et al. 1999]. Mit der Beschreibung der Entwicklung von Kiefernekrosen durch die medikamentöse Applikation des RANKL-IgG2-Antikörpers Denosumab wurde die Hypothese des veränderten Knochenremodellings als eines der auslösenden Faktoren bekräftigt [Taylor et al. 2010]. Die Häufigkeit für das Auftreten von Kiefernekrosen unterscheidet sich nicht zwischen Denosumab und Aminobisphosphonaten [Lipton et al. 2012]. Jedoch führt der unterschiedliche Wirkmechanismus zu unterschiedlichen Halbwertszeiten.

Während bei Denosumab eine reversible Hemmung des RANKL zu verzeichnen ist, werden Bisphosphonate in die Knochenmatrix eingebaut. Demzufolge ist die Halbwertszeit von Denosumab deutlich geringer und nach Ausschleichen der Medikation kann zeitnah - innerhalb von maximal 32 Tagen - eine Reversibilität der antiresorptiven Effekte festgestellt werden [Aghaloo et al. 2015]. Bei den Bisphosphonaten zeigte sich *in vitro* eine unterschiedlich starke Affinität zum Hydroxylapatit. Diese bestimmt vor allem die Wirkung nach dem Absetzen des jeweiligen Bisphosphonates. Die bei den nicht-nitrogen haltigen Bisphosphonaten beschriebene Affinität ist gegenüber den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten deutlich erniedrigt. Eine Korrelation zur biologischen Potenz besteht hierbei jedoch nicht [Bartl 2006].

Während die Entstehung der Kiefernekrose zumeist bei intravenöser Applikation von Aminiobisphosphonaten beobachtet wurde, beläuft sich ihr Auftreten bei nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonaten auf Einzelfallbeschreibungen [Abu-Id et al. 2008, Otto et al. 2010]. Auch im Rahmen dieser Studie konnte ein stärker ausgeprägter inhibitorischer Effekt der Aminobisphosphonate gegenüber dem nicht stickstoffhaltigen Bisphosphonat Clodronat auf das Migrationsverhalten von Osteoblasten demonstriert werden. Ein hierdurch entstehender direkter Effekt auf die Remodellingaktivität des Knochens beispielsweise über das RANK/RANKL/OPG System sollte Ziel weiterer Forschungsarbeiten sein.

Aus der klinischen Routine kann beobachtet werden, dass die Entstehung von Kiefernekrosen zeitlich mit einem dentoalveolären Trauma oder einer Infektion korrelieren [Otto et al. 2010]. Die antiresorptiven Eigenschaften scheinen somit nicht alleine ausschlaggebend für die Entstehung einer Kiefernekrose zu sein.

Weichgewebstoxizität

Als weitere Hypothese wurde eine toxische Schädigung der Bisphosphonate auf die Weichgewebe diskutiert. Hierbei sollte durch Schädigung der Weichgewebe, beispielsweise im Rahmen eines dentoalveolären Traumas die anschließende Wundheilung durch Bisphosphonate gestört werden. Dies führt dann zu einem konsekutiven Integritätsverlust der oralen Mukosa. Über eine sekundäre bakterielle Infektion kommt es dann zum klinischen Bild von freiliegenden nekrotischen Knochen [Reid et al. 2007]. Ein zytotoxischer Effekt der Bisphosphonate konnte *in vitro* und *in vivo* auf Epithelzellen und Zellen des subkutanen Gewebes nachgewiesen werden [Moreira et al. 2005]. Reid und Kollegen beschreiben, dass

die im Knochen akkumulierenden Bisphosphonate in Konzentrationen vorkommen die einen direkten toxischen Effekt auf das Epithel haben. Dabei begünstigt die dünne Schleimhautschicht, die sowohl dem Periost als auch dem Knochen im Kieferbereich aufliegt, das Auftreten von freiliegenden Knochenarealen [Reid et al. 2007]. Auch im Rahmen dieser Studie konnte ein Einfluss der Bisphosphonate auf Weichgewebszellen in Form von Fibroblasten festgestellt werden. Hierbei konnte eine Reduktion der Viabilität und Migration insbesondere durch die Aminobisphosphonate demonstriert werden.

Zwei Gründe sprechen jedoch gegen die Hypothese, dass die Weichgewebstoxizität die alleinige Ursache für die Entstehung der Kiefernekrose sei. Zum einen können im AAOMS Stadium 0 mit intakter oraler Mukosa histologische Anzeichen einer Kiefernekrose und ihrer klinischen Symptome nachgewiesen werden. Zum anderen konnte unter einer medikamentösen Therapie mit dem nicht weichgewebstoxischen RANKL-Antikörper Denosumab trotzdem das Bild einer Kiefernekrose beschrieben werden [Otto et al. 2010, Taylor et al. 2010, Aghaloo et al. 2015]. Der nachgewiesene zytotoxische Effekt der Bisphosphonate auf das Weichgewebe scheint somit nur eine synergistische Wirkung auf die Entstehung von Kiefernekrosen zu haben.

Inhibition der Angiogenese

Der Einfluss der Angiogenesehemmung wurde insbesondere nach der Beschreibung von Kiefernekrosen im Rahmen von antiangiöser Therapie - wie beispielsweise dem VEGF-Antikörper Bevacizumab - zunehmend diskutiert. Mit der Beschreibung der Entstehung von Kiefernekrosen unter antiangiogenetischer Therapie ohne Bisphosphonat- oder Denosumabeinnahme durch Estilo 2008 wurde ein Umdenkungsprozess angestoßen. Dieser Prozess führte 2014 dazu, dass die Leitlinien der AAOMF verändert wurden. Die ehemals Bisphosphonat assoziierten Kiefernekrosen wurden in Medikamenten assoziierte Kiefernekrosen (kurz MRONJ – medication related osteonecrosis of the jaw) umbenannt [Estilo et al. 2008, Ruggiero et al. 2014]. Die antiangiogene Wirkung der Bisphosphonate war bereits seit 2002 durch die Publikationen der Arbeitsgruppen von Santini und Wood bekannt [Santini et al. 2002, Wood et al. 2002]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten die antiangiogenetischen Eigenschaften der Bisphosphonate Clodronat, Ibandronat, Pamidronat und Zoledronat nachgewiesen werden. Die hierbei

beobachteten Viabilitätseinschränkungen der differenzierten Zellen (HUVEC) traten zumeist konzentrationsabhängig ab 50µM auf. Sie konnten sowohl für Amino- als auch für nicht stickstoffhaltige Bisphosphonate demonstriert werden. Eine Beeinträchtigung der Vorläuferzelle vom Endothel der endothelialen Progenitorzellen wurde bereits bei niedrigeren Konzentrationen von 5µM bei allen getesteten Bisphosphonaten registriert. Hierbei wurde eine typische Eigenschaft der endothelialen Progenitorzellen, die Ausbildung von Kolonien, gehemmt. Wie in der Literatur dargelegt, besteht auch in den Ergebnissen dieser Arbeit ein hemmender Einfluss des nicht-stickstoffhaltigen Bisphosphonat Clodronat auf die Zellen der Angiogenese [Fournier et al. 2002, Ribatti et al. 2008]. Der hemmende Effekt ist jedoch bei stickstoffhaltigen Bisphosphonaten insbesondere Zoledronat stärker ausgeprägt. Bei beiden Zelllinien wurde zudem eine Beeinträchtigung der Migration durch die Bisphosphonate beobachtet. Wie es sich zeigte, war der Einfluss der einzelnen Stoffgruppen inhomogen. Während bei den EPC bei allen vier getesteten Bisphosphonaten eine inhibitorische Wirkung - unabhängig von dem Vorhandensein von Stickstoff - demonstriert werden konnte, zeigte die Zugabe des nicht-nitrogenhaltigen Bisphosphonats Clodronat eine signifikante Steigerung der Migrationsfähigkeit der HUVEC. Die nitrogenhaltigen Bisphosphonate hemmten signifikant das Migrationsverhalten entsprechend ihrer relativen Potenz linear.

Analog zur Weichgewebstoxizität kann auch hier aufgezeigt werden, dass der RANKL-Antikörper Denosumab zwar keine antiangiogenetischen Eigenschaften aufweist, jedoch dennoch das klinische Bild einer Kiefernekrose induzieren kann. Zudem konnte im Rahmen von post-mortem Analysen keine Einschränkung der Vaskularisierung in der histopathologischen Aufarbeitung festgestellt werden [Hellstein et al. 2011, Aghaloo et al. 2015]. Die antiangiogenetische Wirkung der Bisphosphonate scheint somit ein wichtiger Bestandteil – jedoch nicht die alleinige Ursache - für die Entwicklung von Kiefernekrosen zu sein.

Einfluss auf das Immunsystem in Kombination mit entzündlichen Prozessen

Der Einfluss der Bisphosphonate auf das Immunsystem und die Beeinflussung von entzündlichen Prozessen wurde im Rahmen dieser Studie nicht untersucht. Die Wirkung der Bisphosphonate auf das Immunsystems und damit auf die Entstehung von Kiefernekrosen ist jedoch in der Literatur beschrieben. Hierbei ist besonders die erhöhte Inzidenz und der verstärkte Ausprägungsgrad der Kiefernekrosen bei einer Begleitmedikation mit Glukocorticoiden nachgewiesen worden. Der fördernde

Einfluss von Cortison-haltigen Medikamenten auf die Entstehung von Kiefernekrosen konnte in klinischen und tierexperimentellen Studien bestätigt werden [Marx et al. 2005, Ali-Erdem et al. 2011, Kuroshima et al. 2014, Ruggiero et al. 2014, Aghaloo et al. 2015].

Zusammenfassend sollte die Bisphosphonat assoziierte Kiefernekrose als eine multifaktorielle Erkrankung angesehen werden, deren genaue pathophysiologische Ursache bisher noch nicht abschließend geklärt werden konnte. Auch die Einnahme der Bisphosphonate ist nicht zwangsläufig an die Entstehung einer Kiefernekrose geknüpft. Die Inzidenz für die Entwicklung von Kiefernekrosen schwankt zwischen 0,8 – 12% [Aghaloo et al. 2015]. Durch die Kombination der verschiedenen Einflüsse der Bisphosphonate wird die Homöostase der Mundhöhle und der beteiligten Knochen empfindlich beeinflusst und die Entstehung von Kiefernekrosen induziert. Das Ausmaß der einwirkenden Faktoren bestimmt somit die Entwicklung und die Dimension der Kiefernekrose [Aghaloo et al. 2015].

5.4 Einfluss der Geranyl-Geraniol-Gabe auf die Wirkung der Bisphosphonate und ihr therapeutisches Potential

Während sich das Auftreten von Bisphosphonat assoziierten Kiefernekrosen bei nicht stickstoffhaltigen Präparaten auf Einzelfallbeschreibungen beschränkt, liegt die Inzidenz für die Entwicklung von Kiefernekrosen bei der Gabe von nitrogenhaltigen Bisphosphonaten zwischen 0,8-12% [Aghaloo et al. 2015]. Zudem wirken die verschiedenen Präparate über einen unterschiedlichen Wirkmechanismus. Während die Bisphosphonate der ersten Generation über den Einbau in ATP-Analoga zu einer toxischen Akkumulation in der Zelle führen, üben die Bisphosphonate der Folgegenerationen ihre Wirkung über den Mevalonatstoffwechsel aus. Hier führen sie durch die Hemmung der Farnesylpyrophosphatsynthase zu einer verminderten Bildung der Metabolite Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Diese sind entscheidend für die post-translationale Modifikation wichtiger zellulärer Signalproteine der Untergruppe der kleinen GTPasen.

Dieser Quantensprung in der Häufigkeitsverteilung der Bisphosphonat assoziierten Kiefernekrosen der unterschiedlichen Präparategenerationen lässt vermuten, dass das Krankheitsbild der Kiefernekrose vornehmlich über den Wirkmechanismus der Hemmung des Mevalonatstoffwechsels ausgelöst wird. Die hierdurch induzierten Effekte auf die Zellviabilität mit konsekutiver Promotion von Apoptose aller beteiligten Zelllinien könnte so in dem Endstadium zum Absterben von Knochen des Kiefers – dem klinischen Bild der Bisphosphonat assoziierten Kiefernekrose – führen. Ziel einer adäquaten Therapie sollte prinzipiell die Behandlung, Verminderung oder Eliminierung des auslösenden Faktors und nicht die Bekämpfung und Eindämmung der Symptome sein. Eine hierbei hypothetische Therapieoption ist die Substitution der ausbleibenden Substrate Farnesyl- und Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat. Für eine Substitution von extern ist eine Penetration in die entsprechenden Zellen notwendig. Hierbei würden jedoch die hydrophilen Pyrophosphatanteile die Aufnahme nach intrazellulär vermindern. Eine Alternative bietet Geranyl-Geraniol (GG). Dies wird nach Penetration durch die Zellmembran diphosphoryliert und kann dann anaploretisch die Funktion des Mevalonatstoffwechsels mit anschließender post-translationaler Geranylierung wichtiger zellulärer Signalproteine aufrecht erhalten [Crick et al. 1997].

In dieser Arbeit wurde bei sämtlichen Versuchsreihen der direkte Einfluss von Geranyl-Geraniol (GG) untersucht. Hierbei profitierten alle mit Bisphosphonat inkubierten Zelllinien (EPC, HOB, HUVEC, NHDF) durch die Zugabe von Geranyl-Geraniol.

Eine Analyse des Einflussverhaltens von Geranyl-Geraniol auf die angiogenetischen Zellen EPC und HUVEC konnte zeigen, dass das Migrationsverhalten durch die Geranyl-Geraniol-Substitution bei allen Bisphosphonaten signifikant gesteigert werden kann. Bei der Zellviabilität zeigte der MTT Assay der HUVEC, dass nur bei Zoledronat und Clodronat in einer Konzentration von 50µM eine signifikante Besserung durch zusätzliche Inkubation von Geranyl-Geraniol erreicht werden kann. Zoledronat zeigte bereits in der 5µM Konzentration eine signifikante Verbesserung der Zellviabilität durch GG-Zugabe. Analog zum Migrationstest wurde auch beim Colony Forming Assay eine signifikante Steigerung der koloniebildenden Eigenschaft der EPCs durch Geranyl-Geraniol-Zugabe erreicht. Auch bei den Zellen des Stützgewebes war ein positiver Einfluss durch Zugabe von Geranyl-Geraniol sichtbar. Während das Migrationsverhalten bei humanen Osteoblasten durch Geranyl-Geraniol Zugabe bei

allen getesteten Bisphosphonaten gesteigert werden konnte, lag eine signifikante Steigerung nur bei Ibandronat vor. In der Zellgruppe der Fibroblasten konnte bei den Bisphosphonaten Clodronat, Pamidronat und Ibandronat eine signifikante Steigerung des Migrationspotentials durch Geranyl-Geraniol Zugabe beobachtet werden. Die Analyse der Zellviabilität ergab eine signifikante Steigerung im MTT Assay bei den Bisphosphonaten Ibandronat sowohl in 5µM als auch in 50µM Konzentration und Zoledronat nur in 50µM Konzentration.

In allen Versuchsreihen wurde durch die Substitution von Geranyl-Geraniol ein zytoprotektiver Effekt demonstriert. Die Ergebnisse dieser Studie stehen in Einklang mit den hierzu in der Literatur veröffentlichten Daten. Auch hier konnte eine Verbesserung der Zellviabilität nachgewiesen werden [Cozin et al. 2011, Ziebart et al. 2011]. In einer Arbeit von Zafer und Kollegen wurde 2014 beschrieben, dass durch die Zugabe von Geranyl-Geraniol proangiogenetische Gene bei humanen gingivalen Fibroblasten vermehrt exprimiert werden. Zusätzlich zu dem zytoprotektiven Effekt kommen zudem die angiogenen Eigenschaften von Geranyl-Geraniol hinzu [Zafar et al. 2014]. In einer Folgearbeit wies Zafer 2016 nach, dass durch Zugabe von Geranyl-Geraniol die Bisphosphonat induzierte Dysregulation spezifischer angiogenetischer Gene vermindert wird. Diese Erkenntnis unterstreicht zum einen die Vermutung, dass der inhibitorische Einfluss der Bisphosphonate über die Veränderung des Mevalonat-Stoffwechsels ausgelöst wird. Zum Anderen bietet es einen Ausblick für ein mögliches therapeutisches Potential, wie in dem Artikel von Zafer und Kollegen diskutiert [Zafar et al. 2016].

Die Suche nach einer therapeutischen Lösung zur Behandlung von Kiefernekrosen gestaltet sich als anspruchsvoll. Diese begründet sich zumeist damit, dass gerade beim onkologischen Einsatz der Bisphosphonate, eine Abschwächung der Medikamentenwirkung mit einem Progress der Tumorerkrankung einhergehen könnte. Während bei der Behandlung von Osteoporose ein vorübergehender Wechsel der osteoanabolen Medikation beispielsweise auf ein Parathormon-Analoga (Teriparatid) möglich wäre, ergibt sich diese Option beim Multiplen Myelom oder osteolytischen Metastasen nicht. Hier besteht wegen der Gefahr der Entwicklung von Hyperkalciämien eine absolute Kontraindikation. Ziel einer idealen Therapie sollte daher sein, die positiven Wirkungen der Bisphosphonate auf den gesamten Knochenstoffwechsel zu erhalten und im Gebiet der Kiefernekrosen ihren Effekt zu eliminieren oder abzuschwächen. Die Ergebnisse dieser Studie sowie

weiterer in der Literatur verfügbarer Arbeiten lassen auf ein therapeutisches Potential von Geranyl-Geraniol hoffen [Ziebart et al. 2011, Zafar et al. 2016]. Wichtig hierbei wäre eine topische Applikation, um eine generalisierte Abschwächung der Bisphosphonatwirkung, wie sie *in vitro* nachgewiesen werden konnte, zu vermeiden [Ziebart et al. 2011]. Dieses könnte sich insbesondere bei onkologischen Krankheitsbildern als nachteilig auswirken. Im Rahmen von Folgearbeiten sollte dieses Potential von Geranyl-Geraniol insbesondere bei topischer Applikation weiter untersucht werden. Der sich hierdurch ergebende Therapieansatz greift an den eigentlichen Wirkmechanismus direkt an und würde so die Möglichkeit bieten, die toxischen Folgen der Bisphosphonattherapie lokal zu vermindern.

6. Zusammenfassung

Die Medikamentengruppe der Bisphosphonate gehört zu den osteoanabolen Stoffen, die bei einer Vielzahl von Krankheiten des Knochengewebes eingesetzt werden. Wesentliche Indikationen sind Osteoporose, Morbus Paget sowie onkologische Krankheitsbilder wie das Multiple Myelom oder ossäre Metastasen. Eine Nebenwirkung ist die Entstehung von Kiefernekrosen unter Bisphosphonattherapie. Die Bisphosphonat assoziierte Kiefernekrose kennzeichnet sich durch einen freiliegenden nekrotischen Kieferknochen und stellt eine wesentliche Beeinträchtigung der oralen Gesundheit der betroffenen Patienten dar. Die Pathogenese der Bisphosphonat assoziierten Kiefernekrose ist derzeit nicht vollständig geklärt, wird aber als multifaktorieller Genese angesehen. Neben dem Haupteffekt auf den Knochen üben Bisphosphonate auch eine extraskelettale Wirkung aus. Die Wirkung erfolgt, abhängig vom applizierten Bisphosphonat, über einen Einbau als ATP-Analogon oder über die Hemmung wichtiger Enzyme des Mevalonatstoffwechsels. Bei Letzterem kommt es zur verminderten Bildung von Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat und konsekutiver Beeinflussung wichtiger zellulärer Signalproteine der kleinen GTPasen. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss verschiedener Bisphosphonate aus unterschiedlichen Generationen (Clodronat, Pamidronat, Ibandronat und Zoledronat) auf den Knochen (Osteoblasten), das Weichgewebe (Fibroblasten) sowie das Gefäßsystem (HUVEC und EPC) zu untersuchen. Des Weiteren soll der Effekt der Substitution des lipophilen Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Analoga Geranyl-Geraniol analysiert werden.

Im Rahmen dieser Studie konnte ein generalisierter inhibitorischer Effekt aller Bisphosphonate auf alle untersuchten Zelllinien festgestellt werden. Hierbei wurde das Migrationsverhalten von humanen Osteoblasten, endothelialen Progenitorzellen, maturen Endothelzellen der Nabelschnur und Fibroblasten durch alle getesteten Bisphosphonate signifikant gehemmt. Bei den Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) konnte bei allen stickstoffhaltigen Bisphosphonaten (Pamidronat, Ibandronat und Zoledronat) eine signifikante Einschränkung der Migrationsfähigkeit demonstriert werden. Eine Ausnahme bildete hierbei das nicht-stickstoffhaltige Clodronat, bei dem dieser Effekt nicht festgestelltbar war. Bei einer Analyse der HUVEC über den MTT Assay zeigten alle Bisphosphonate in einer Konzentration von 50µM eine Einschränkung der Viabilität. Eine signifikante Verminderung der Viabilität bei 5µM konnte nur bei den Bisphosphonaten mit hoher

biologischer Wirksamkeit (Ibandronat und Zoledronat) und nicht bei Clodronat und Pamidronat gezeigt werden. Einen inhibitorischen Einfluss auf die Zellviabilität der Fibroblasten übten nur Clodronat, Pamidronat und Zoledronat in 50µM Konzentration aus. Besonders ausgeprägt war der Einfluss aller Bisphosphonate auf die typische Eigenschaft der EPC, die Formation von Kolonien. Es wurde bei allen Bisphosphonaten ab einer 5µM Konzentration eine signifikante Verminderung dieses zelltypischen Verhaltensmusters festgestellt.

Die Zugabe von Geranyl-Geraniol, wie sie im Rahmen sämtlicher durchgeführter Versuchsreihen zusätzlich analysiert wurde, zeigte einen abschwächenden Effekt der Bisphosphonatwirkung. Während bei den Osteoblasten im Migrationsassay eine generalisierte Abschwächung der Bisphosphonatwirkung unter Substitution von Geranyl-Geraniol beobachtet wurde, war dieser Effekt nur bei Ibandronat signifikant. Bei der Versuchsreihe mit Fibroblasten wurde bei allen Bisphosphonaten außer Zoledronat eine signifikante Verbesserung der Migrationstendenz durch die Substitution von Geranyl-Geraniol beobachtet. Der inhibitorische Effekt bei der Migration konnte bei beiden Zellen der Angiogenese (EPC und HUVEC) durch die Gabe von Geranyl-Geraniol signifikant verbessert werden. Auch bei der Zellviabilität wurde ein abschwächender Effekt der Bisphosphonatwirkung durch Geranyl-Geraniol demonstriert. Dieser war beim MTT Assay bei HUVEC Zellen bei Clodronat in 50µM Konzentration und Zoledronat in 5µM und 50µM Konzentration zu verzeichnen. Die Fibroblasten zeigten eine signifikante Verminderung der Bisphosphonatwirkung durch Geranyl-Geraniol-Substitution bei Zoledronat 50µM und Ibandronat in 5µM und 50µM Konzentration. Geranyl-Geraniol sorgte für eine signifikante Verbesserung der EPC in der Formation von Kolonien in 5µM, 25µM und 50µM Konzentration bei allen getesteten Bisphosphonaten.

Bisphosphonate üben einen inhibitorischen Einfluss auf Osteoblasten und extraskelettale Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen (HUVEC) und endotheliale Vorläuferzellen (EPC) aus. Dieser konnte sowohl auf die Zellviabilität als auch auf das Migrationsverhalten dieser Zellen demonstriert werden. Die Substitution von Geranyl-Geraniol verminderte diesen Effekt. Durch die anaploretische Eigenschaft des Geranyl-Geraniol auf den Mevalonatstoffwechsel könnte eine lokale Verminderung der Bisphosphonatwirkung vielleicht auch *in vivo* erreicht werden. Dies würde insbesondere zur Behandlung der Bisphosphonat assoziierten Kiefernekrose eine mögliche therapeutische Option darstellen. Diese Eigenschaft

sollte in Folgearbeiten weiter untersucht werden und würde einen ersten therapeutischen Ansatz der Bisphosphonat-induzierten Kiefernekrose darstellen.

7. Conclusion

Bisphosphonates are osteoanabolic drugs commonly used in the treatment of bone diseases including malignant bone neoplasia, bone metastasis, multiple myeloma, Paget's disease or osteoporosis. Despite their therapeutical properties one main side effect is the development of osteonecrosis of the jaw (BP-ONJ). The pathogenesis of BP-ONJ remains unclear, however it is assumed to be multifactorial. Although the main mechanism of action of bisphosphonates is the inhibition of osteoclasts leading to a reduced bony remodelling, extra-skeletal effects of bisphosphonates have been published throughout literature. Regarding the generations of the bisphosphonate there are two different molecular mechanisms of action. While first generation bisphosphonates like Clodronate induced their effect by incorporation in an ATP-analogue, recent bisphosphonate generations inhibit enzymes in the mevalonate pathway. This leads to a reduced activation of small GTP-binding proteins. The following cellular signaling-pathways are impaired. The aim of this study was to analyse the impact of four bisphosphonates (Clodronate, Pamidronate, Ibandronate and Zoledronate) on four different cell lines (Osteoblasts, Fibroblasts, Endothelial Progenitor Cells and Endothelial Cells of the human umbilical cord). Furthermore the influence of geranyl-geraniol substitution should be investigated.

The data of the present study revealed a significant depressing effect of all four bisphosphonates on the migration ability of fibroblasts, endothelial progenitor cells and osteoblasts. The nitrogen containing bisphosphonates (pamidronate, ibandronate and zoledronate) had furthermore a significant inhibitory impact on HUVEC. The results of the MTT assay demonstrated a decreased cell viability of HUVEC of all four bisphosphonates in a 50 µM concentration. The bisphosphonates with increased biological potency (zoledronate, ibandronate) revealed even an inhibitory effect of cell viability in 5 µM concentration. The cell viability of fibroblast was decreased in the MTT assay in 50 µM concentration of clodronate, ibandronate and zoledronate. All four bisphosphonates showed a depressing effect on endothelial progenitor cells typical characteristic of colony forming even in a 5 µM concentration.

Geranyl-Geraniol substitution demonstrated an attenuated impact on bisphosphonate effect on all four cell lines. The migration ability of cells of angiogenesis (EPC and HUVEC) was significantly elevated with geranyl-geraniol substitution of all

bisphosphonates. Geranyl-geraniol substitution led to a significantly improved migration ability of fibroblasts when added to the bisphosphonates clodronate, pamidronate and ibandronate. Also a significant increase of migration after geranyl-geraniol substitution could be observed in osteoblasts when pretreated with ibandronate.

The tests on the viability showed an improvement after geranyl-geraniol substitution. The viability of fibroblasts could be significantly increased after geranyl-geraniol substitution when pretreatment with ibandronate in 50µM or 5µM and zoledronate 50µM concentration had been performed. In HUVEC a significantly enhanced viability could be observed after geranyl-geraniol substitution in the 50µM clodronate and 5 and 50µM zoledronate group. The impact on the typical characteristic of EPC the colony forming property could be significantly improved after geranyl geraniol substitution within all four bisphosphonate groups regardless of the tested concentrations (5, 25 and 50µM).

Bisphosphonates have an inhibitory effect on the migration ability of all tested cells. Furthermore they highly influence the cell-viability. Both characteristics can be weakened by the substitution of geranyl-geraniol. These *in vitro* findings are a promising approach for further testing in an *in vivo* model as a potential local therapeutical agency against bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw.

8. Literaturverzeichnis

- Abu-Id, M. H., P. H. Warnke, J. Gottschalk, I. Springer, J. Wiltfang, Y. Acil, P. A. Russo and T. Kreuzsch (2008). ""Bis-phosphy jaws" - high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw." J Craniomaxillofac Surg **36**(2): 95-103.
- Adami, S. and N. Zamberlan (1996). "Adverse effects of bisphosphonates. A comparative review." Drug Saf **14**(3): 158-170.
- Aghaloo, T., R. Hazboun and S. Tetradis (2015). "Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaws." Oral Maxillofac Surg Clin North Am **27**(4): 489-496.
- Ali-Erdem, M., A. Burak-Cankaya, S. Cemil-Isler, S. Demircan, M. Soluk, C. Kasapoglu and C. Korhan-Oral (2011). "Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **16**(7): e879-883.
- Allegra, A., G. Oteri, E. Nastro, A. Alonci, G. Bellomo, V. Del Fabro, E. Quartarone, C. Alati, F. S. De Ponte, D. Cicciu and C. Musolino (2007). "Patients with bisphosphonates-associated osteonecrosis of the jaw have reduced circulating endothelial cells." Hematol Oncol **25**(4): 164-169.
- Amin, D., S. A. Cornell, S. K. Gustafson, S. J. Needle, J. W. Ullrich, G. E. Bilder and M. H. Perrone (1992). "Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis." J Lipid Res **33**(11): 1657-1663.
- Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman and J. M. Isner (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-967.
- Bartl, R. v. T., E.; Bartl, C. (2006). "Bisphosphonat-Manual: Wirkungen - Indikationen - Strategien." Springer.
- Basso, F. G., T. N. Pansani, C. F. de Oliveira, A. P. Turrioni, D. G. Soares, J. Hebling and C. A. Costa (2013). "Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts." Braz Dent J **24**(6): 551-558.
- Basso, F. G., A. P. Turrioni, J. Hebling and C. A. de Souza Costa (2013). "Zoledronic acid decreases gene expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor by human epithelial cells." Br J Oral Maxillofac Surg **51**(8): 971-973.
- Bauss, F., T. Pfister and S. Papapoulos (2008). "Ibandronate uptake in the jaw is similar to long bones and vertebrae in the rat." J Bone Miner Metab **26**(4): 406-408.
- Benford, H. L., J. C. Frith, S. Auriola, J. Monkkonen and M. J. Rogers (1999). "Farnesol and geranylgeraniol prevent activation of caspases by aminobisphosphonates: biochemical evidence for two distinct pharmacological classes of bisphosphonate drugs." Mol Pharmacol **56**(1): 131-140.
- Bergner, R., I. J. Diel, D. Henrich, M. Hoffmann and M. Uppenkamp (2006). "Differences in nephrotoxicity of intravenous bisphosphonates for the treatment of malignancy-related bone disease." Onkologie **29**(11): 534-540.
- Bergstrom, J. D., R. G. Bostedor, P. J. Masarachia, A. A. Reszka and G. Rodan (2000). "Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase." Arch Biochem Biophys **373**(1): 231-241.

- Bijvoet, O. L., A. J. Nollen, T. J. Slooff and R. Feith (1974). "Effect of a diphosphonate on para-articular ossification after total hip replacement." Acta Orthop Scand **45**(6): 926-934.
- Black, D. M., P. D. Delmas, R. Eastell, I. R. Reid, S. Boonen, J. A. Cauley, F. Cosman, P. Lakatos, P. C. Leung, Z. Man, C. Mautalen, P. Mesenbrink, H. Hu, J. Caminis, K. Tong, T. Rosario-Jansen, J. Krasnow, T. F. Hue, D. Sellmeyer, E. F. Eriksen, S. R. Cummings and H. P. F. Trial (2007). "Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis." N Engl J Med **356**(18): 1809-1822.
- Bone, H. G., D. Hosking, J. P. Devogelaer, J. R. Tucci, R. D. Emkey, R. P. Tonino, J. A. Rodriguez-Portales, R. W. Downs, J. Gupta, A. C. Santora, U. A. Liberman and I. I. I. O. T. S. G. Alendronate Phase (2004). "Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women." N Engl J Med **350**(12): 1189-1199.
- Boonen, S., R. F. Laan, I. P. Barton and N. B. Watts (2005). "Effect of osteoporosis treatments on risk of non-vertebral fractures: review and meta-analysis of intention-to-treat studies." Osteoporos Int **16**(10): 1291-1298.
- Boyden, S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes." J Exp Med **115**: 453-466.
- Buck, D. W., 2nd and G. A. Dumanian (2012). "Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals." Plast Reconstr Surg **129**(6): 1314-1320.
- Carano, A., S. L. Teitelbaum, J. D. Konsek, P. H. Schlesinger and H. C. Blair (1990). "Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro." J Clin Invest **85**(2): 456-461.
- Carnevale, V., F. Dicembrino, V. Frusciante, I. Chiodini, S. Minisola and A. Scillitani (2000). "Different patterns of global and regional skeletal uptake of 99mTc-methylene diphosphonate with age: relevance to the pathogenesis of bone loss." J Nucl Med **41**(9): 1478-1483.
- Cetinkaya, B. O., G. C. Keles, B. Ayas and P. Gurgor (2008). "Effects of risedronate on alveolar bone loss and angiogenesis: a stereologic study in rats." J Periodontol **79**(10): 1950-1961.
- Chapuy, M. C., P. J. Meunier, C. M. Alexandre and E. P. Vignon (1980). "Effects of disodium dichloromethylene diphosphonate on hypercalcemia produced by bone metastases." J Clin Invest **65**(5): 1243-1247.
- Chen, H. C. (2005). "Boyden chamber assay." Methods Mol Biol **294**: 15-22.
- Chesnut, C. H., 3rd, A. Skag, C. Christiansen, R. Recker, J. A. Stakkestad, A. Hoiseth, D. Felsenberg, H. Huss, J. Gilbride, R. C. Schimmer, P. D. Delmas, A. Oral Ibandronate Osteoporosis Vertebral Fracture Trial in North and Europe (2004). "Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis." J Bone Miner Res **19**(8): 1241-1249.
- Clarke, B. (2008). "Normal bone anatomy and physiology." Clin J Am Soc Nephrol **3** **Suppl 3**: S131-139.
- Coleman, R. E. and E. V. McCloskey (2011). "Bisphosphonates in oncology." Bone **49**(1): 71-76.
- Correia Vde, F., C. L. Caldeira and M. M. Marques (2006). "Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts." Dent Traumatol **22**(6): 312-317.
- Coxon, F. P., K. Thompson, A. J. Roelofs, F. H. Ebetino and M. J. Rogers (2008). "Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells." Bone **42**(5): 848-860.

- Cozin, M., B. M. Pinker, K. Solemani, J. M. Zuniga, S. C. Dadaian, S. Cremers, R. Landesberg and S. Raghavan (2011). "Novel therapy to reverse the cellular effects of bisphosphonates on primary human oral fibroblasts." J Oral Maxillofac Surg **69**(10): 2564-2578.
- Cremers, S. and S. Papapoulos (2011). "Pharmacology of bisphosphonates." Bone **49**(1): 42-49.
- Cremers, S. C., G. Pillai and S. E. Papapoulos (2005). "Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis." Clin Pharmacokinet **44**(6): 551-570.
- Crick, D. C., D. A. Andres and C. J. Waechter (1997). "Novel salvage pathway utilizing farnesol and geranylgeraniol for protein isoprenylation." Biochem Biophys Res Commun **237**(3): 483-487.
- Cryer, B. and D. C. Bauer (2002). "Oral bisphosphonates and upper gastrointestinal tract problems: what is the evidence?" Mayo Clin Proc **77**(10): 1031-1043.
- de Groen, P. C., D. F. Lubbe, L. J. Hirsch, A. Daifotis, W. Stephenson, D. Freedholm, S. Pryor-Tillotson, M. J. Seleznick, H. Pinkas and K. K. Wang (1996). "Esophagitis associated with the use of alendronate." N Engl J Med **335**(14): 1016-1021.
- Dearden, W. F. (1899). "Fragilitas Ossium amongst Workers in Lucifer Match Factories." Br Med J **2**(2013): 270-271.
- Dearden, W. F. (1901). "The causation of phosphorus necrosis." Br Med J **1901**;2:408.
- Delmas, P. D., M. C. Chapuy, E. Vignon, S. Charhon, D. Briancon, C. Alexandre, C. Edouard and P. J. Meunier (1982). "Long term effects of dichloromethylene diphosphonate in Paget's disease of bone." J Clin Endocrinol Metab **54**(4): 837-844.
- Diel, I. J., R. Bergner and K. A. Grotz (2007). "Adverse effects of bisphosphonates: current issues." J Support Oncol **5**(10): 475-482.
- Dixon RB, T. N., Garetto LP (1997). "Bone turnover in elderly canine mandible and tibia." J Dent Res **1997**:76-336: [abstract 2579].
- Engroff, S. L. and D. D. Kim (2007). "Treating bisphosphonate osteonecrosis of the jaws: is there a role for resection and vascularized reconstruction?" J Oral Maxillofac Surg **65**(11): 2374-2385.
- Estilo, C. L., M. Fornier, A. Farooki, D. Carlson, G. Bohle, 3rd and J. M. Huryn (2008). "Osteonecrosis of the jaw related to bevacizumab." J Clin Oncol **26**(24): 4037-4038.
- Fast, D. K., R. Felix, C. Dowse, W. F. Neuman and H. Fleisch (1978). "The effects of diphosphonates on the growth and glycolysis of connective-tissue cells in culture." Biochem J **172**(1): 97-107.
- Felix, R., R. Graham, G. Russell and H. Fleisch (1976). "The effect of several diphosphonates on acid phosphohydrolases and other lysosomal enzymes." Biochim Biophys Acta **429**(2): 429-438.
- Feng, X. and J. M. McDonald (2011). "Disorders of bone remodeling." Annu Rev Pathol **6**: 121-145.
- Fleisch, H. (1997). "Mechanisms of action of the bisphosphonates." Medicina (B Aires) **57** Suppl 1: 65-75.
- Fleisch, H., R. G. Russell and F. Straumann (1966). "Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis." Nature **212**(5065): 901-903.

- Fournier, P., S. Boissier, S. Filleur, J. Guglielmi, F. Cabon, M. Colombel and P. Clezardin (2002). "Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats." *Cancer Res* **62**(22): 6538-6544.
- Freiberger, J. J., R. Padilla-Burgos, A. H. Chhoeu, K. H. Kraft, O. Boneta, R. E. Moon and C. A. Piantadosi (2007). "Hyperbaric oxygen treatment and bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a case series." *J Oral Maxillofac Surg* **65**(7): 1321-1327.
- Gertz, B. J., S. D. Holland, W. F. Kline, B. K. Matuszewski, A. Freeman, H. Quan, K. C. Lasseter, J. C. Mucklow and A. G. Porras (1995). "Studies of the oral bioavailability of alendronate." *Clin Pharmacol Ther* **58**(3): 288-298.
- Goa, K. L. and J. A. Balfour (1998). "Risedronate." *Drugs Aging* **13**(1): 83-91; discussion 92.
- Green, J. R. (2000). "Anti-tumor potential of bisphosphonates." *Med Klin (Munich)* **95 Suppl 2**: 23-28.
- Green, J. R., K. Muller and K. A. Jaeggi (1994). "Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound." *J Bone Miner Res* **9**(5): 745-751.
- Grötz K.A., P. J.-U., Al-Nawas B. (2012). "Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose (BP-ONJ) und andere Medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen." *AWMF*.
- Hadjidakis, D. J. and Androulakis, II (2006). "Bone remodeling." *Ann N Y Acad Sci* **1092**: 385-396.
- Hashimoto, K., K. Morishige, K. Sawada, M. Tahara, S. Shimizu, S. Ogata, M. Sakata, K. Tasaka and T. Kimura (2007). "Alendronate suppresses tumor angiogenesis by inhibiting Rho activation of endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **354**(2): 478-484.
- Hellstein, J. W., R. A. Adler, B. Edwards, P. L. Jacobsen, J. R. Kalmar, S. Koka, C. A. Migliorati, H. Ristic and A. American Dental Association Council on Scientific Affairs Expert Panel on Antiresorptive (2011). "Managing the care of patients receiving antiresorptive therapy for prevention and treatment of osteoporosis: executive summary of recommendations from the American Dental Association Council on Scientific Affairs." *J Am Dent Assoc* **142**(11): 1243-1251.
- Hiroi-Furuya, E., T. Kameda, K. Hiura, H. Mano, K. Miyazawa, Y. Nakamaru, M. Watanabe-Mano, N. Okuda, J. Shimada, Y. Yamamoto, Y. Hakeda and M. Kumegawa (1999). "Etidronate (EHDP) inhibits osteoclastic-bone resorption, promotes apoptosis and disrupts actin rings in isolate-mature osteoclasts." *Calcif Tissue Int* **64**(3): 219-223.
- Hofbauer, L. C. G., R.; Heufelder, A. E. (1997). "Aktueller Stand zur Therapie mit Bisphosphonaten." *Dtsch med Wochenschr* **122**(25/26): 835-841.
- Huja, S. S., S. A. Fernandez, K. J. Hill and Y. Li (2006). "Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **288**(12): 1243-1249.
- Idris, A. I., J. Rojas, I. R. Greig, R. J. Van't Hof and S. H. Ralston (2008). "Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro." *Calcif Tissue Int* **82**(3): 191-201.
- Iwata, K., J. Li, H. Follet, R. J. Phipps and D. B. Burr (2006). "Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia." *Bone* **39**(5): 1053-1058.
- Kajizono, M., H. Sada, Y. Sugiura, Y. Soga, Y. Kitamura, J. Matsuoka and T. Sendo (2015). "Incidence and Risk Factors of Osteonecrosis of the Jaw in Advanced

- Cancer Patients after Treatment with Zoledronic Acid or Denosumab: A Retrospective Cohort Study." *Biol Pharm Bull* **38**(12): 1850-1855.
- Kalka, C., H. Masuda, T. Takahashi, W. M. Kalka-Moll, M. Silver, M. Kearney, T. Li, J. M. Isner and T. Asahara (2000). "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3422-3427.
- Khokher, M. A. and P. Dandona (1989). "Diphosphonates inhibit human osteoblast secretion and proliferation." *Metabolism* **38**(2): 184-187.
- Kim, R. H., R. S. Lee, D. Williams, S. Bae, J. Woo, M. Lieberman, J. E. Oh, Q. Dong, K. H. Shin, M. K. Kang and N. H. Park (2011). "Bisphosphonates induce senescence in normal human oral keratinocytes." *J Dent Res* **90**(6): 810-816.
- Kimmel, D. B. (2007). "Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates." *J Dent Res* **86**(11): 1022-1033.
- Kuroshima, S., P. Entezami, L. K. McCauley and J. Yamashita (2014). "Early effects of parathyroid hormone on bisphosphonate/steroid-associated compromised osseous wound healing." *Osteoporos Int* **25**(3): 1141-1150.
- Kwon, Y. D., D. W. Lee, B. J. Choi, J. W. Lee and D. Y. Kim (2012). "Short-term teriparatide therapy as an adjunctive modality for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws." *Osteoporos Int* **23**(11): 2721-2725.
- Landesberg, R., M. Cozin, S. Cremers, V. Woo, S. Kousteni, S. Sinha, L. Garrett-Sinha and S. Raghavan (2008). "Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates." *J Oral Maxillofac Surg* **66**(5): 839-847.
- Lipton, A., K. Fizazi, A. T. Stopeck, D. H. Henry, J. E. Brown, D. A. Yardley, G. E. Richardson, S. Siena, P. Maroto, M. Clemens, B. Bilynsky, V. Charu, P. Beuzeboc, M. Rader, M. Viniegra, F. Saad, C. Ke, A. Braun and S. Jun (2012). "Superiority of denosumab to zoledronic acid for prevention of skeletal-related events: a combined analysis of 3 pivotal, randomised, phase 3 trials." *Eur J Cancer* **48**(16): 3082-3092.
- Lo, J. C., F. S. O'Ryan, N. P. Gordon, J. Yang, R. L. Hui, D. Martin, M. Hutchinson, P. V. Lathon, G. Sanchez, P. Silver, M. Chandra, C. A. McCloskey, J. A. Staffa, M. Willy, J. V. Selby, A. S. Go and I. Predicting Risk of Osteonecrosis of the Jaw with Oral Bisphosphonate Exposure (2010). "Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure." *J Oral Maxillofac Surg* **68**(2): 243-253.
- Luckman, S. P., F. P. Coxon, F. H. Ebetino, R. G. Russell and M. J. Rogers (1998). "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* **13**(11): 1668-1678.
- Luckman, S. P., D. E. Hughes, F. P. Coxon, G. G. Russell and M. J. Rogers (2005). "JBMR anniversary classic. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. Originally published in Volume 7, number 4, pp 581-9 (1998)." *J Bone Miner Res* **20**(7): 1265-1274.
- Markowitz, G. S., G. B. Appel, P. L. Fine, A. Z. Fenves, N. R. Loon, S. Jagannath, J. A. Kuhn, A. D. Dratch and V. D. D'Agati (2001). "Collapsing focal segmental glomerulosclerosis following treatment with high-dose pamidronate." *J Am Soc Nephrol* **12**(6): 1164-1172.
- Martin, T. J. and E. Seeman (2007). "New mechanisms and targets in the treatment of bone fragility." *Clin Sci (Lond)* **112**(2): 77-91.

- Marx, R. E. (2003). "Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic." J Oral Maxillofac Surg **61**(9): 1115-1117.
- Marx, R. E. (2013). "Bisphosphonat-induzierte Osteonekrose der Kiefer: Ätiologie, Prävention, Behandlung." Quintessenz Verlag.
- Marx, R. E., Y. Sawatari, M. Fortin and V. Broumand (2005). "Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment." J Oral Maxillofac Surg **63**(11): 1567-1575.
- Marx, R. E., Stern D.S. (2002). "Biopsy principles and techniques. Oral and Maxillofacial Pathology: A Rationale for Diagnosis and Treatment." Quintessenz: 36-38.
- McClung, M. R., P. Geusens, P. D. Miller, H. Zippel, W. G. Bensen, C. Roux, S. Adami, I. Fogelman, T. Diamond, R. Eastell, P. J. Meunier, J. Y. Reginster and G. Hip Intervention Program Study (2001). "Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly women. Hip Intervention Program Study Group." N Engl J Med **344**(5): 333-340.
- Miller, P. D. (2011). "The kidney and bisphosphonates." Bone **49**(1): 77-81.
- Moreira, M. S., E. Katayama, A. C. Bombana and M. M. Marques (2005). "Cytotoxicity analysis of alendronate on cultured endothelial cells and subcutaneous tissue. a pilot study." Dent Traumatol **21**(6): 329-335.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Mozzati, M., G. Gallesio, V. Arata, R. Pol and M. Scoletta (2012). "Platelet-rich therapies in the treatment of intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a report of 32 cases." Oral Oncol **48**(5): 469-474.
- Mucke, T., S. Haarmann, K. D. Wolff and F. Holzle (2009). "Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws treated by surgical resection and immediate osseous microvascular reconstruction." J Craniomaxillofac Surg **37**(5): 291-297.
- N., M. (1865). "Ueber die Einwirkung des Chloracetyls auf phosphorige Saure." Ann Chem Pharmacol **1865**;133:317-20.
- Nancollas, G. H., R. Tang, R. J. Phipps, Z. Henneman, S. Gulde, W. Wu, A. Mangood, R. G. Russell and F. H. Ebetino (2006). "Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite." Bone **38**(5): 617-627.
- Orriss, I. R., M. L. Key, K. W. Colston and T. R. Arnett (2009). "Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates." J Cell Biochem **106**(1): 109-118.
- Otto, S., M. H. Abu-Id, S. Fedele, P. H. Warnke, S. T. Becker, A. Kolk, T. Mucke, G. Mast, R. Kohnke, E. Volkmer, F. Haasters, O. Lieger, T. Iizuka, S. Porter, G. Campisi, G. Colella, O. Ploder, A. Neff, J. Wiltfang, M. Ehrenfeld, T. Kreuzsch, K. D. Wolff, S. R. Sturzenbaum, M. Schieker and C. Pautke (2011). "Osteoporosis and bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw: not just a sporadic coincidence--a multi-centre study." J Craniomaxillofac Surg **39**(4): 272-277.
- Otto, S., S. Hafner, G. Mast, T. Tischer, E. Volkmer, M. Schieker, S. R. Sturzenbaum, E. von Tresckow, A. Kolk, M. Ehrenfeld and C. Pautke (2010). "Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: is pH the missing part in the pathogenesis puzzle?" J Oral Maxillofac Surg **68**(5): 1158-1161.

- Pabst, A. M., T. Ziebart, M. Ackermann, M. A. Konerding and C. Walter (2014). "Bisphosphonates' antiangiogenic potency in the development of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: influence on microvessel sprouting in an in vivo 3D Matrigel assay." Clin Oral Investig **18**(3): 1015-1022.
- Pabst, A. M., T. Ziebart, F. P. Koch, K. Y. Taylor, B. Al-Nawas and C. Walter (2012). "The influence of bisphosphonates on viability, migration, and apoptosis of human oral keratinocytes--in vitro study." Clin Oral Investig **16**(1): 87-93.
- Paterson, A. D., J. A. Kanis, E. C. Cameron, D. L. Douglas, D. J. Beard, F. E. Preston and R. G. Russell (1983). "The use of dichloromethylene diphosphonate for the management of hypercalcaemia in multiple myeloma." Br J Haematol **54**(1): 121-132.
- Porras, A. G., S. D. Holland and B. J. Gertz (1999). "Pharmacokinetics of alendronate." Clin Pharmacokinet **36**(5): 315-328.
- Reid, I. R., M. J. Bolland and A. B. Grey (2007). "Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity?" Bone **41**(3): 318-320.
- Reid, I. R. and D. J. Hosking (2011). "Bisphosphonates in Paget's disease." Bone **49**(1): 89-94.
- Ribatti, D., N. Maruotti, B. Nico, V. Longo, D. Mangieri, A. Vacca and F. P. Cantatore (2008). "Clodronate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo." Oncol Rep **19**(5): 1109-1112.
- Ribatti, D., B. Nico, D. Mangieri, N. Maruotti, V. Longo, A. Vacca and F. P. Cantatore (2007). "Neridronate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo." Clin Rheumatol **26**(7): 1094-1098.
- Ristow, O., C. Gerngross, M. Schwaiger, B. Hohlweg-Majert, V. Kehl, H. Jansen, L. Hahnefeld, S. Otto and C. Pautke (2014). "Is bone turnover of jawbone and its possible over suppression by bisphosphonates of etiologic importance in pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis?" J Oral Maxillofac Surg **72**(5): 903-910.
- Roelofs, A. J., K. Thompson, S. Gordon and M. J. Rogers (2006). "Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status." Clin Cancer Res **12**(20 Pt 2): 6222s-6230s.
- Rogers, M. J., J. C. Crockett, F. P. Coxon and J. Monkkonen (2011). "Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates." Bone **49**(1): 34-41.
- Rosen, C. J. and C. R. Kessenich (1996). "Comparative clinical pharmacology and therapeutic use of bisphosphonates in metabolic bone diseases." Drugs **51**(4): 537-551.
- Ruggiero, S. L., T. B. Dodson, L. A. Assael, R. Landesberg, R. E. Marx, B. Mehrotra, A. A. o. O. Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws and S. Maxillofacial (2009). "American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update." Aust Endod J **35**(3): 119-130.
- Ruggiero, S. L., T. B. Dodson, J. Fantasia, R. Goodday, T. Aghaloo, B. Mehrotra, F. O'Ryan, O. American Association of and S. Maxillofacial (2014). "American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update." J Oral Maxillofac Surg **72**(10): 1938-1956.
- Ruggiero, S. L. and S. B. Woo (2008). "Biophosphonate-related osteonecrosis of the jaws." Dent Clin North Am **52**(1): 111-128, ix.
- Russell, R. G. (2011). "Bisphosphonates: the first 40 years." Bone **49**(1): 2-19.

- Russell, R. G., R. C. Muhlbauer, S. Bisaz, D. A. Williams and H. Fleisch (1970). "The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats." *Calcif Tissue Res* **6**(3): 183-196.
- Russell, R. G., R. Smith, C. Preston, R. J. Walton and C. G. Woods (1974). "Diphosphonates in Paget's disease." *Lancet* **1**(7863): 894-898.
- Santini, D., B. Vincenzi, G. Avvisati, G. Dicuonzo, F. Battistoni, M. Gavasci, A. Salerno, V. Denaro and G. Tonini (2002). "Pamidronate induces modifications of circulating angiogenetic factors in cancer patients." *Clin Cancer Res* **8**(5): 1080-1084.
- Santini, D., B. Vincenzi, G. Dicuonzo, G. Avvisati, C. Massacesi, F. Battistoni, M. Gavasci, L. Rocci, M. C. Tirindelli, V. Altomare, M. Tocchini, M. Bonsignori and G. Tonini (2003). "Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients." *Clin Cancer Res* **9**(8): 2893-2897.
- Scheller, E. L., C. M. Baldwin, S. Kuo, N. J. D'Silva, S. E. Feinberg, P. H. Krebsbach and P. C. Edwards (2011). "Bisphosphonates inhibit expression of p63 by oral keratinocytes." *J Dent Res* **90**(7): 894-899.
- Schenk, R., P. Eggli, H. Fleisch and S. Rosini (1986). "Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat." *Calcif Tissue Int* **38**(6): 342-349.
- Schenk, R., W. A. Merz, R. Muhlbauer, R. G. Russell and H. Fleisch (1973). "Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl 2 MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats." *Calcif Tissue Res* **11**(3): 196-214.
- Scheper, M. A., A. Badros, A. R. Salama, G. Warburton, K. J. Cullen, D. S. Weikel and T. F. Meiller (2009). "A novel bioassay model to determine clinically significant bisphosphonate levels." *Support Care Cancer* **17**(12): 1553-1557.
- Selander, K. S., J. Monkkonen, E. K. Karhukorpi, P. Harkonen, R. Hannuniemi and H. K. Vaananen (1996). "Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages." *Mol Pharmacol* **50**(5): 1127-1138.
- Smith, R., R. G. Russell and M. Bishop (1971). "Diphosphonates and Page's disease of bone." *Lancet* **1**(7706): 945-947.
- Sommerfeldt, D. W. and C. T. Rubin (2001). "Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton." *Eur Spine J* **10 Suppl 2**: S86-95.
- Soydan, S. S., K. Araz, F. V. Senel, E. Yurtcu, F. Helvacioğlu, A. Dagdeviren, M. A. Tekindal and F. Sahin (2015). "Effects of alendronate and pamidronate on apoptosis and cell proliferation in cultured primary human gingival fibroblasts." *Hum Exp Toxicol* **34**(11): 1073-1082.
- Stockmann, P., E. Vairaktaris, F. Wehrhan, M. Seiss, S. Schwarz, B. Spriewald, F. W. Neukam and E. Nkenke (2010). "Osteotomy and primary wound closure in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a prospective clinical study with 12 months follow-up." *Support Care Cancer* **18**(4): 449-460.
- Suda, T., N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M. T. Gillespie and T. J. Martin (1999). "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families." *Endocr Rev* **20**(3): 345-357.

- Suzuki, K., S. Takeyama, Y. Sakai, S. Yamada and H. Shinoda (2006). "Current topics in pharmacological research on bone metabolism: inhibitory effects of bisphosphonates on the differentiation and activity of osteoclasts." J Pharmacol Sci **100**(3): 189-194.
- Takahashi, T., C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Magner, J. M. Isner and T. Asahara (1999). "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization." Nat Med **5**(4): 434-438.
- Tanvetyanon, T. and P. J. Stiff (2006). "Management of the adverse effects associated with intravenous bisphosphonates." Ann Oncol **17**(6): 897-907.
- Taylor, K. H., L. S. Middlefell and K. D. Mizen (2010). "Osteonecrosis of the jaws induced by anti-RANK ligand therapy." Br J Oral Maxillofac Surg **48**(3): 221-223.
- Thomas, B. J. and H. C. Amstutz (1987). "Prevention of heterotopic bone formation: clinical experience with diphosphonates." Hip: 59-69.
- Urbich, C. and S. Dimmeler (2004). "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology." Circ Res **95**(4): 343-353.
- Urbich, C., C. Heeschen, A. Aicher, K. Sasaki, T. Bruhl, M. R. Farhadi, P. Vajkoczy, W. K. Hofmann, C. Peters, L. A. Pennacchio, N. D. Abolmaali, E. Chavakis, T. Reinheckel, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2005). "Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization." Nat Med **11**(2): 206-213.
- van Breukelen, F. J., O. L. Bijvoet and A. T. van Oosterom (1979). "Inhibition of osteolytic bone lesions by (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1, 1-bisphosphonate (A.P.D.)." Lancet **1**(8120): 803-805.
- van Staa, T. P., L. Abenhaim and C. Cooper (1998). "Use of cyclical etidronate and prevention of non-vertebral fractures." Br J Rheumatol **37**(1): 87-94.
- Von Baeyer H, H. K. (1897). "Acetodiphosphorige Saure." Berichte Dtsch Chem Ges **1897**;20:1973-8.
- Walter, C., B. Al-Nawas, K. A. Grotz, C. Thomas, J. W. Thuroff, V. Zinser, H. Gamm, J. Beck and W. Wagner (2008). "Prevalence and risk factors of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in prostate cancer patients with advanced disease treated with zoledronate." Eur Urol **54**(5): 1066-1072.
- Walter, C., M. O. Klein, A. Pabst, B. Al-Nawas, H. Duschner and T. Ziebart (2010). "Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells." Clin Oral Investig **14**(1): 35-41.
- Walter, C., A. Pabst, T. Ziebart, M. Klein and B. Al-Nawas (2011). "Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro." Oral Dis **17**(2): 194-199.
- Wang, E. P., L. B. Kaban, G. J. Strewler, N. Raje and M. J. Troulis (2007). "Incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma and breast or prostate cancer on intravenous bisphosphonate therapy." J Oral Maxillofac Surg **65**(7): 1328-1331.
- Watts, N. B., S. T. Harris, H. K. Genant, R. D. Wasnich, P. D. Miller, R. D. Jackson, A. A. Licata, P. Ross, G. C. Woodson, 3rd, M. J. Yanover and et al. (1990). "Intermittent cyclical etidronate treatment of postmenopausal osteoporosis." N Engl J Med **323**(2): 73-79.
- Weiss, H. M., U. Pfaar, A. Schweitzer, H. Wiegand, A. Skerjanec and H. Schran (2008). "Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid." Drug Metab Dispos **36**(10): 2043-2049.
- Wood, J., K. Bonjean, S. Ruetz, A. Bellahcene, L. Devy, J. M. Foidart, V. Castronovo and J. R. Green (2002). "Novel antiangiogenic effects of the

- bisphosphonate compound zoledronic acid." *J Pharmacol Exp Ther* **302**(3): 1055-1061.
- Yamada, J., N. H. Tsuno, J. Kitayama, T. Tsuchiya, S. Yoneyama, M. Asakage, Y. Okaji, Y. Shuno, T. Nishikawa, J. Tanaka, K. Takahashi and H. Nagawa (2009). "Anti-angiogenic property of zoledronic acid by inhibition of endothelial progenitor cell differentiation." *J Surg Res* **151**(1): 115-120.
- Zafar, S., D. E. Coates, M. P. Cullinan, B. K. Drummond, T. Milne and G. J. Seymour (2014). "Zoledronic acid and geranylgeraniol regulate cellular behaviour and angiogenic gene expression in human gingival fibroblasts." *J Oral Pathol Med* **43**(9): 711-721.
- Zafar, S., D. E. Coates, M. P. Cullinan, B. K. Drummond, T. Milne and G. J. Seymour (2016). "Effects of zoledronic acid and geranylgeraniol on the cellular behaviour and gene expression of primary human alveolar osteoblasts." *Clin Oral Investig* **20**(8): 2023-2035.
- Zhang, D., N. Udagawa, I. Nakamura, H. Murakami, S. Saito, K. Yamasaki, Y. Shibasaki, N. Morii, S. Narumiya, N. Takahashi and et al. (1995). "The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts." *J Cell Sci* **108 (Pt 6)**: 2285-2292.
- Ziebart, T., F. Koch, M. O. Klein, J. Guth, J. Adler, A. Pabst, B. Al-Nawas and C. Walter (2011). "Geranylgeraniol - a new potential therapeutic approach to bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw." *Oral Oncol* **47**(3): 195-201.
- Ziebart, T., A. Pabst, M. O. Klein, P. Kammerer, L. Gauss, D. Brullmann, B. Al-Nawas and C. Walter (2011). "Bisphosphonates: restrictions for vasculogenesis and angiogenesis: inhibition of cell function of endothelial progenitor cells and mature endothelial cells in vitro." *Clin Oral Investig* **15**(1): 105-111.
- Ziebart, T., C. H. Yoon, T. Trepels, A. Wietelmann, T. Braun, F. Kiessling, S. Stein, M. Grez, C. Ihling, M. Muhly-Reinholz, G. Carmona, C. Urbich, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2008). "Sustained persistence of transplanted proangiogenic cells contributes to neovascularization and cardiac function after ischemia." *Circ Res* **103**(11): 1327-1334.

9. Appendix

9.1 Curriculum vitae

Christine Lux

9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in **Frankfurt am Main** waren die Damen und Herren:

Boles, Bonzelius, Brandes, Busse, Deppe, Dietz, Klein, Korf, Müller-Ester, Nürnberger, Oehlschläger, Russ, Stehle, Tikkanen, Wicht, Winkler.

Meine akademischen Lehrer in **Mainz** waren die Damen und Herren:

Al-Nawas, Breter, Burwinkel, Christmann, Coerdts, Daubländer, DeHoedt, Dietrich, Dietz, Dzieniszewski, Erbe, Galle, Grabbe, Grimmiger, Helling, Kahaly, Kasaj, Kirkpatrick, Kleinert, Korenkov, Kraft, Luhmann, Mang, Matthias, Münzel, Pietsch, Rumpel, Scharrer, Scheller, Schulte, Schulz, Schulze, Sommer, Teufel, Treinen, Wagner, Walter, Wegener, Wehrbein, Wentaschek, Willershausen, Woelfel, Wriedt.

9.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. Dr. Dr. Thomas Ziebart für die Leitung und Unterstützung meiner Doktorarbeit herzlichst bedanken. Jeder einzelne Part dieser Dissertation wurde von ihm beispielhaft und überaus professionell betreut. Er half mir mit seiner Expertise und seiner konstruktiven Kritik mich auftretenden Problemen stellen zu können, wissenschaftliche Sackgassen zu umgehen und mich für die praktische und experimentelle Thematik der Bisphosphonat induzierten Osteonekrose zu begeistern. Hierbei zeigte er uneingeschränkt seine geduldige Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion.

Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle an Prof. Dr. Dr. Andreas Neff und Prof. Dr. Dr. Winfried Wagner als Direktoren der Kliniken, in der diese Arbeit durchgeführt wurde. Sie stellten die Grundvoraussetzungen für experimentelles Arbeiten und sind Vorbilder in ihrem Engagement für die Erkundung wissenschaftlicher Fragestellungen.

In gleichem Maße zu Dank verpflichtet fühle ich mich gegenüber Prof. Dr. Dr. Christian Walter, der in der Anfangsphase sowie bei der Ausarbeitung und Überlassung der interessanten Fragestellung einen entscheidenden Anteil an dieser Arbeit trug.

Ein großes Dankeschön gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitdoktoranden im Labor, in der der experimentelle Teil durchgeführt wurde. Sie haben mir das wissenschaftliche Arbeiten mit Zellkulturen nähergebracht, mich zu jeder Zeit tatkräftig unterstützt und mir mit ihrer freundlichen und stets motivierenden Art zur Seite gestanden. Der intellektuelle Austausch mit Ihnen hat zu mancherlei neuer Denkweise geführt und die Doktorarbeit massgeblich beeinflusst.

Nicht zu kurz kommen sollte an dieser Stelle auch meine Familie:

Lieber Christopher, keiner kennt mich so gut wie du und weiß wie viel Kraft und Durchhaltevermögen es mich gekostet hat nicht einfach aufzugeben und etwas Neues zu beginnen. Du hast bei allen Wochenendrunden, Nachtschichten und bei allen damit verbundenen Wutausbrüchen immer an mich geglaubt, die Nerven bewahrt, mir gut zugeredet und mich immer wieder aufs Neue ermutigt

weiterzumachen. Für Deine bedingungslose Unterstützung als mein Fels in der Brandung bin ich Dir zu tiefst dankbar.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Mama. Du warst in meinem Leben immer die größte Unterstützerin. Du hast mich motiviert und inspiriert, aber auch kritisiert, wann immer es notwendig erschien. Du hast mir Mut zugesprochen und für neue Denkanstöße gesorgt. Zu jeder Tages- und Nachtzeit hast du mir tröstende Worte gespendet und ein offenes Ohr für mich gehabt. Aber das Wichtigste: Du hast immer an mich geglaubt! Du bist die beste Mama auf der Welt.

Lieber Oscar, ohne Dich wäre die Doktorarbeit möglicherweise immer noch nicht fertig. Du warst der vielleicht größte Antrieb mich endlich hinzusetzen und die Ergebnisse in Worte zu fassen. Bei jeder geschriebenen Seite, habe ich daran gedacht, wie mein Leben mit einem Säugling aussehen wird und dass wohl kaum Zeit bleiben wird Unvollendetes fertigzustellen. Ich sollte Recht behalten und ich bin Dir sehr dankbar, dass das letzte Wort am Abend vor deiner Geburt verfasst wurde. Du hast mein Leben bereichert und vervollständigt! Und du hast mir gezeigt, was das Wichtigste im Leben ist!

Liebe Moni, lieber Uwe vielen lieben Dank für die Zeit und Mühe, die ihr investiert habt diese Doktorarbeit Korrektur zu lesen. Mit Eurer Hilfe sind so einige holprige Stellen sowie grammatikalische Hürden überwunden worden.

Und zuletzt möchte ich all denen danken, die zu jedem Zeitpunkt für alle meine Fragen und Frustrationen ein offenes Ohr hatten und ohne deren Unterstützung die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung