

Aus der
Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Tübingen
Abteilung Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-
und Gesichtschirurgie

**Medikamenten-assoziierte Kieferosteonekrosen (MRONJ) –
eine statische und dynamische (histo)morphometrische
Analyse mittels Micro-CT und (Immun-)Histologie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Schönhof, Rouven Jan Michael**

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: PD Dr. Dr. S. Hoefert

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Nüssler

3. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. A. Eckert

Tag der Disputation: 12.09.2022

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
2	EINLEITUNG	11
2.1	Der Knochen und Kieferknochen	11
2.1.1	Stoffwechsel des Kieferknochens	12
2.2	Bone remodeling	12
2.3	Pathologien der Knochen und Kieferknochen	15
2.3.1	Osteoporose.....	15
2.3.2	Skeletal-related events (SREs).....	16
2.3.3	Osteopetrose.....	16
2.3.4	Osteomyelitis des Kieferknochens (OMJ).....	17
2.4	Grundlegendes Therapiekonzept osteoporotischer Erkrankungen und Prävention von skeletal related events (SREs).....	17
2.5	Antiresorptive Medikamente	18
2.5.1	Historie der antiresorptiven Medikamente.....	18
2.5.2	Chemische Grundlagen	19
2.5.3	Wirkstoffteilerung.....	21
2.5.4	Wirkmechanismus.....	22
2.5.5	Pharmakokinetik.....	26
2.5.6	Generelle Nebenwirkungen.....	28
2.6	Medikamenten-assoziierte Kiefernekrose (MRONJ)	29
2.6.1	Definition	29
2.6.2	Historie	29
2.6.3	Klinisches Bild und Diagnose.....	30
2.6.4	Pathoätiologie der MRONJ	33
2.6.5	Prophylaxe	36
2.6.6	Therapie.....	36
2.7	Grundlagen der histologischen Färbungen.....	37
2.7.1	Grundlagen der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	37
2.7.2	Grundlagen der Toluidinblau-Färbung	37

Inhaltsverzeichnis

2.7.3	Grundlagen der RANKL-Färbung.....	38
2.7.4	Grundlagen der OPG-Färbung.....	38
2.7.5	Grundlagen der TRAP-Färbung.....	38
2.8	Fragestellung und Zielsetzung	39
3	MATERIAL UND METHODEN	40
3.1	Kieferknochenproben	40
3.1.1	Patientengut, Patientenvariablen und Einschlusskriterien	40
3.1.2	Gruppen	41
3.2	Mikro-computertomographische Untersuchung.....	43
3.2.1	Probenfixierung	43
3.2.2	Bilderstellung mit Siemens Inveon micro-CT und microCAT II (CT).....	43
3.2.3	Analyse mit Microview.....	44
3.3	Histologische Untersuchung	45
3.3.1	Probenfixierung	45
3.3.2	Standardfärbungen	47
3.3.3	Immunhistologische Färbungen	48
3.3.4	Bildanfertigung/Digitalisierung.....	50
3.3.5	Analyse	51
3.4	Statistische Auswertung	54
4	ERGEBNISSE.....	56
4.1	Patientenkollektiv.....	56
4.2	Micro-CT Analyse	62
4.2.1	Bone-Volume-Density (BV/TV)	62
4.2.2	Bone-Surface-Density (BS/BV).....	63
4.2.3	Trabekelparameter.....	63
4.2.4	Euler-Charakteristik.....	65
4.2.5	Relativ bone/tissue mineral density (BMD/TMD)	66
4.3	(Immun-)Histologie.....	69
4.3.1	Osteozyten-, Lakunen- und Kittliniendichte	69
4.3.2	RANKL- und OPG-Färbung	71
4.3.3	Osteoklastendichte.....	73

4.4	Ergebnisse der NB-Linien (Nebenanalyse)	75
4.4.1	NB-Linien Micro-CT Analyse.....	75
4.4.2	NB-Linien (Immun-)Histologie Analyse	76
5	DISKUSSION	79
5.1	Diskussion von Material und Methode	80
5.1.1	Allgemein	80
5.1.2	Micro-CT	80
5.1.3	Histologie	81
5.2	Diskussion der Ergebnisse	82
5.2.1	MRONJ Lokalisation	82
5.2.2	Micro-CT Analyse.....	82
5.2.3	Bone-Volume-Density (BV/TV)	83
5.2.4	Bone-Surface-Density (BS/BV) und Trabekel-Parameter.....	83
5.2.5	Euler-Charakteristik.....	84
5.2.6	Mineralisation	85
5.2.7	Osteozyten- und Lakunendichte	86
5.2.8	Kittliniendichte	87
5.2.9	RANKL- und OPG-Färbung	87
5.2.10	TRAP-Färbung (Osteoklastendichte).....	88
5.3	Diskussion der NB-Proben	89
5.3.1	Allgemeine Diskussion der NB-Linie	89
5.3.2	Diskussion der mikro-CT Analyse und (Immun-)histologie der NB-Linie	90
5.4	Einfluss der Studienergebnisse in die aktuellen MRONJ-Theorien	92
5.5	Zusammenfassendes MRONJ-Pathoätiologiemodell	95
6	ZUSAMMENFASSUNG	96
7	LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN	98
8	LITERATURVERZEICHNIS	99
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	108

Inhaltsverzeichnis

9.1	Abbildungen	108
9.2	Tabellen	110
10	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL.....	111
11	DANKSAGUNG	113

1 Abkürzungsverzeichnis

AAOMS	American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons
ADU	arbitrary density unit
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AR	Antiresorptiva
ATP	Adenosintriphosphat
ATPasen	Adenosintriphosphatasen
beta-HMG-CoA-Reduktase	beta-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
BMD	relatives Maß für Knochendichte der gesamten Tissue Volume/ROI (Bone Mineral Density)
BMUs	basic multicellular units
BP _{exp}	Bisphosphonat exponierter Knochen
BPO _{mar}	Bisphosphonat assoziierte Nekrose, Randgebiet
BPO _{NB}	Neo-Knochen nach Bisphosphonat assoziierter Nekrose
BPO _{seq}	Bisphosphonat assoziierte Nekrose, Sequester
BRONJ	Bisphosphonate-related osteonecrosis of the Jaw
BS/BV	Knochenoberflächendichte
BV/TV	Knochenvolumendichte
CATK	Cathepsin K
C _{HB}	gesunder Knochen
C _{OP}	osteoporotischer Knochen
CSF-1	Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor

Abkürzungsverzeichnis

CT/ μ -CT's	Computertomographie/Micro- Computertomographie
CTX	beta-CrossLaps (Kollagenabbau-Marker)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC-STAMP	Dendrozyten-exprimiertes Sieben- Transmembran-Protein
Dmab _{exp}	Denosumab exponierter Knochen
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DmabO _{mar}	Denosumab-assoziierte Nekrose, Randgebiet
DmabO _{NB}	Neo-Knochen nach Denosumab-assoziiertes Nekrose
DmabO _{seq}	Denosumab-assoziierte Nekrose, Sequester
GTPasen	Guanosintriphosphatasen
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HU	Hounsfield unit
HWZ	Halbwertszeit
IgG2	Immunglobulin G2
kVp	peak kilovoltage
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
M _{exp}	Bisphosphonat und Denosumab exponierter Knochen
MO _{mar}	Bisphosphonat und Denosumab-assoziierte Nekrose, Randgebiet
MO _{NB}	Neo-Knochen nach Bisphosphonat und Denosumab-assoziiertes Nekrose
MO _{seq}	Bisphosphonat und Denosumab-assoziierte Nekrose, Sequester
MRONJ	Medication-related osteonecrosis of the jaw
MSX-1	Msh homebox 1
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

Abkürzungsverzeichnis

NIH	National Institutes of Health
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OMJ	osteomyelitis of the jaw
ONJ	osteonecrosis of the jaw
OPG	Osteoprotegrin
OT	Objektträger
OUBS	orale Ulzerationen und benigne Sequestrationen
PBS	phosphate-buffered saline
PDT	Photodynamische Therapie
PTH	Parathormon
RANK/RANKL	Receptor Activator of NF- κ B/ Receptor Activator of NF- κ B Ligand
ROI	Region of Interest
SREs	Skeletal-related events
TK-Zellen	T-Killerzellen
TH-Zellen	T-Helferzellen
TMD	relatives Maß für Knochendichte des reinen Knochenvolumens/BV (Tissue Mineral Density)
TRAP	Tartratresistente Säurephosphatase
Tr. Th.	Trabekeldicke (Trabecular thickness)
Tr. N.	Trabekelanzahl (Trabecular number)
Tr. Sp.	Trabekelabstand (Trabecular space)
VOI	Volume of Interest

2 Einleitung

2.1 Der Knochen und Kieferknochen

Mit dem Ende der 8. Embryonalperiode beginnt im Menschen das einst knorpelige (chorale) Skelett, welches sich überwiegend aus dem mittleren Keimblatt (Mesoderm) gebildet hat, zu mineralisieren bzw. zu verknöchern [1]. Neben der rein physikalischen Grundlage, der strukturellen Stabilität des Körpers sowie der Voraussetzung für Bewegung, wie wir sie kennen, dienen die Knochen zusätzlich dem Schutz innerer Organe, der Aufrechterhaltung der Homöostase zahlreicher Elektrolyte, dem Gleichgewicht des Säure-Base-Haushalts und dem Habitat für blutbildendes Knochenmark [2, 3].

Im Kiefer dient der Knochen speziell der festen Verankerung der Zähne und ist obligater Bestandteil für die physiologische Nahrungsaufnahme sowie die Fähigkeit zu sprechen. Zudem ist er maßgeblich an Form und Ästhetik des Gesichts beteiligt.

Die Funktion des Knochens wird in Abbildung 1 dargestellt:

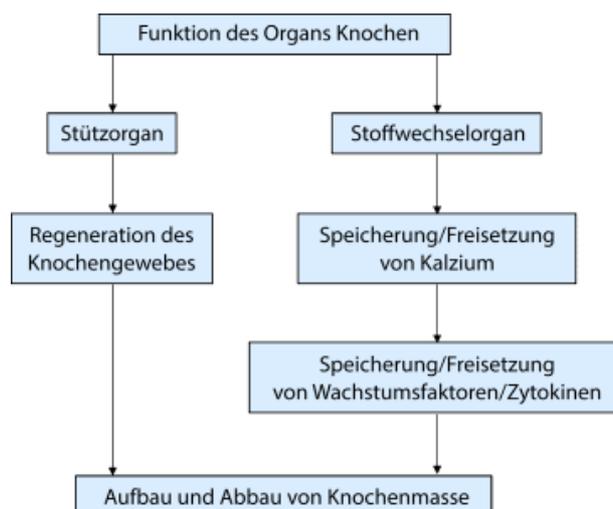


Abbildung 1: Aufgaben und Funktion des Organs Knochen nach Seubert et al. [4].

2.1.1 Stoffwechsel des Kieferknochens

Wie alle Knochen unterliegen auch die Knochenzellen im Kiefer einer komplexen Regulation ihres Stoffwechsels. Hauptverantwortlich für diese Regulation sind: PTH (Parathormon), Calcitonin, Sexualhormone (Estrogene, Androgene etc.), Wachstums- und Schilddrüsenhormone sowie Vitamin D und Glukokortikoide [5]. Besonders im Kiefer: Im Gegensatz zum restlichen Skelett leitet sich das Viszerokranium nicht vom Mesoderm, sondern von dem Ektoderm (genauer: der kranialen Neuralleiste) ab [6]. Dabei hat der in der kranialen Neuralleiste gebildete Transkriptionsfaktor MSX-1 eine herausragende Bedeutung für die Entwicklung des gesamten Viszerokraniums [7]. Er unterdrückt die terminale Differenzierung osteogener Zellen in den Knochenanlagen und ist obligat für ihre Proliferation [8]. Zudem wird seine Produktion im Vergleich zum mesenchymal gebildeten MSX-1 nach der Maturation nicht herunter reguliert [7, 9].

2.2 Bone remodeling

Das Knochengewebe von Vertebraten ist mit dem Abschluss des Wachstums kein erstarrtes Gebilde, sondern unterliegt dynamischen Prozessen. Es unterliegt ständigen Umbauprozessen und Adaption, um Größe, Form, Ernährung, strukturelle Erhaltung, Umbau und Anpassung des skelettalen Systems aufrecht zu erhalten. Dieses „Remodeling“ ist verantwortlich für Wachstum, die Adaptation (induziert durch mechanische Belastung) sowie die Versorgung von Knochenschäden. Des Weiteren ist es obligater Bestandteil der Homöostase und Regulation des Elektrolythaushalts [10].

Um dieses System zu regulieren, sind viele mitwirkende Zellen und molekulare Effektoren beteiligt (auch als „coupling“ bezeichnet). Die Knochenreformation zieht sich über mehrere Wochen und wird zusammen von Osteoklasten und Osteoblasten in sog. BMUs (basic multicellular units) ausgeführt [10, 11]. BMUs bestehen aus einem oder mehreren Osteoklasten, die sich in der Kortikalis an der Spitze („Bohrkopf“) eines Tunnels (sog. Haver'scher Kanal) und in der

Spongiosa an der Oberfläche der Trabekel befinden und Osteoblasten, die sich nach den Osteoklasten an den Knochen anlagern. Osteoblasten bauen sich im Verlauf selbst ein und differenzieren sich zu Osteozyten (siehe Abbildung 2 und 3) [10].

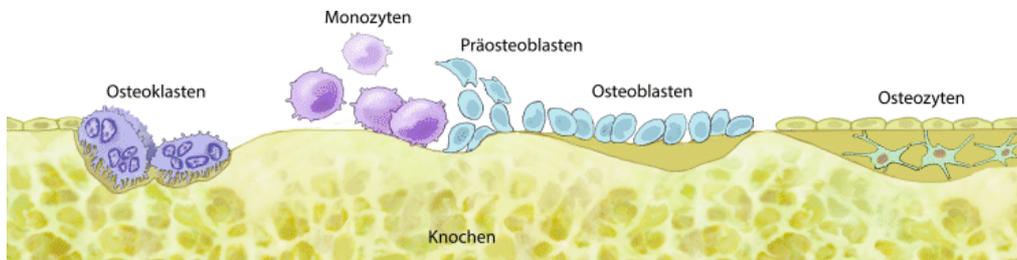


Abbildung 2: Grafische Übersicht über die einzelnen Schritte der Knochengeweberemodellierung nach Seubert et al. [4].

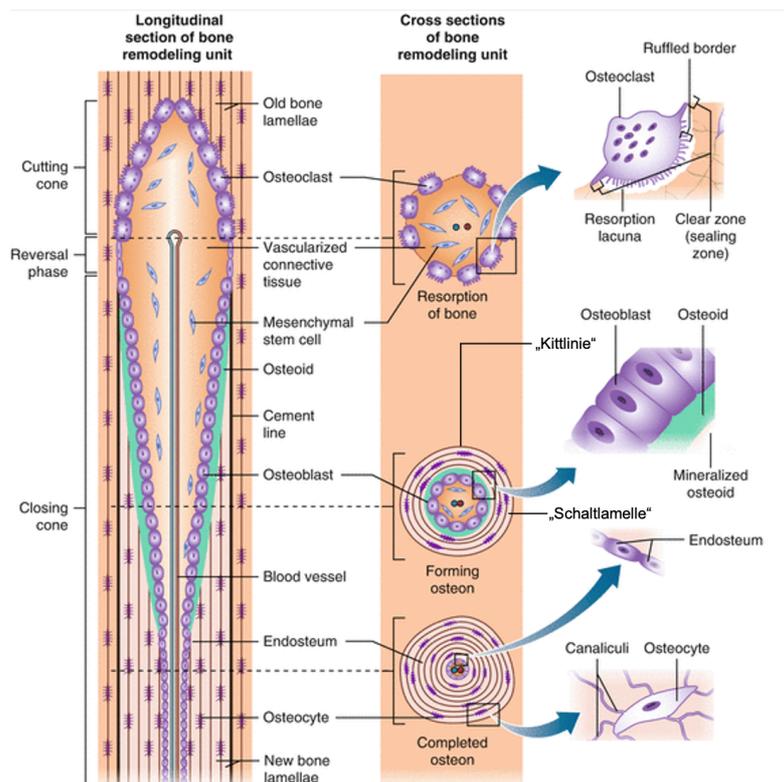


Abbildung 3: Grafische Darstellung des Aufbaus eines Osteons modifiziert nach Rehfeld et al. [12].

Kommt es zu Schäden im Knochen, reagieren Osteoblasten auf chemische Signale von Osteozyten und beginnen MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) zu produzieren. Dies verstärkt die RANKL-induzierte Osteoklastenbildung [10, 13]. Der Osteoklastenrezeptor RANK (receptor

activator of NF- κ B) und dessen Ligand (RANKL) sind essentielle Regulatoren der Osteoklasten und notwendig für ihre Differenzierung, ihr Überleben und ihr Wachstum [10, 14]. Zudem produzieren Osteoblasten (stimuliert durch MCP-1) noch die Hauptmodulatoren RANKL, OPG (Osteoprotegrin) und CSF-1 [10, 15]. OPG bindet und hemmt RANKL, während CSF-1 ein Synergist von RANKL ist [10, 16]. Als Folge lagern sich Osteoklasten an die Knochenmatrix an und beginnen den Knochen zu resorbieren. Hauptverantwortlich für die Resorption ist ein saures Milieu und die gebildeten Enzyme TRAP (Tartrat-resistent acid phosphatase) und CATK (Catepsin K) [17]. Die gebildeten „Bohrgruben“ werden als Howship'sche Lakunen bezeichnet. Eine komplexe Kette an Modulatoren sorgt dann dafür, dass sich die Osteoklasten wieder lösen bzw. weiterwandern und Osteoblasten ihren Platz einnehmen, die nun damit beginnen, Osteoid (unmineralisierter Knochen) zu bilden. Das Osteoid mineralisiert im Verlauf durch die Anwesenheit von gelöstem Kalzium. Osteoblasten bilden die Matrix kontinuierlich um sich herum, sodass sie sich darin zum Schluss selbst einmauern und sich zu einer inaktiveren Form, den Osteozyten, differenzieren. Diese auf- und abbauenden Prozesse finden kontinuierlich und zu jeder Zeit überall im skelettalen System des Körpers statt [10].

Das Remodeling-System unterliegt hochfeinen, molekularen und zellulären Regulationsmechanismen. Treten in Teilbereichen oder im gesamten System Störungen oder Ungleichgewichte auf, so ist für eine medikamentöse Behandlung zu beachten, dass es sich auf vielerlei Körperfunktionen auswirken kann. Der Anwendung von antiresorptiven Medikamenten, wie Bisphosphonate und Denosumab, kommt diesbezüglich eine besondere Rolle zu. Ihr Therapieansatz, u.a. zur Stabilisierung der Knochen, ist zwar gut verstanden, jedoch sind ihre langfristigen Auswirkungen auf den Körper sowie das skelettale System und speziell die potentiellen Nebenwirkungen auf die Kiefer (die Medikamenten-assoziierte Nekrose des Kiefers – MRONJ), noch lange nicht vollständig geklärt.

Um Hinweise zu einem besseren Verständnis zu finden, ist es zuerst notwendig, das Einsatzgebiet sowie die Medikamente selbst näher zu betrachten.

2.3 Pathologien der Knochen und Kieferknochen

2.3.1 Osteoporose

Die Osteopenie/Osteoporose ist definiert als verminderte Knochenmasse/-dichte und geht einher mit einem erhöhten Frakturrisiko. Die Osteoklastenaktivität ist hierbei entweder relativ oder absolut erhöht. Deshalb unterscheidet man high- und low-turnover Varianten [18].

Im Kieferknochen ist Osteoporose mit einer Verminderung des Alveolarknochens (obligater Bestandteil des Zahnhalteapparats) verbunden und damit mit einer erhöhten Zahnmobilität und dem vermehrten Verlust der Zähne. Ferner haben Patienten mit Osteoporose ein schlechteres Outcome nach invasiven zahnmedizinischen Eingriffen [19].

Von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde die Osteoporose als Volkskrankheit deklariert, da sie zu den zehnt häufigsten Erkrankungen weltweit gehört. In Deutschland leiden rund sechs Millionen Menschen daran. Da die Krankheit jedoch häufig unentdeckt bleibt, ist eine genaue Bestimmung schwierig [20, 21]. Frauen sind mit ca. 80 Prozent öfter betroffen als Männer. Zurückgeführt wird dies auf den in den Wechseljahren fallenden Östrogenspiegel. Osteoporose bei Männern ist zu über 50 Prozent sekundär, beispielsweise durch Kortison-Therapie oder mangelnde Ernährung bedingt [20]. Hauptproblem der Osteoporose ist verminderte Stabilität der Knochen und das damit verbundene erhöhte Risiko für Frakturen. Die Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie geht davon aus, dass über 90 Prozent der Patienten mit Oberschenkelhalsbrüchen eine verminderte Knochendichte besitzen [20]. Die direkten Kosten einer Schenkelhalsfraktur betragen ca. 20.000 Euro, die Folgekosten nicht mit einberechnet. Aufgrund der Schenkelhalsbrüche werden ca. 20 Prozent der Patienten zum Pflegefall. Summiert schätzt man die Gesamtkosten damit auf ungefähr 2,5 Milliarden Euro jährlich in Deutschland [20]. Die WHO geht davon aus, dass sich die Anzahl an osteoporotischen Knochenbrüchen bis 2050 vervierfachen wird [20, 22].

2.3.2 Skeletal-related events (SREs)

Als Skeletal-related events (SREs) bezeichnet man knöcherne Komplikationen in Form von Läsionen und pathologischen Frakturen bei malignen Erkrankungen wie beispielsweise knöchern metastasierten Karzinomen der Mamma oder der Prostata sowie dem Multiplem Myelom. Die Metastasen bilden lokale Schwachstellen der Knochen. 65-90 % der Patienten mit Mamma- oder Prostatakarzinom und ungefähr 35 % der Patienten mit Lungenkarzinomen entwickeln Knochenmetastasen und davon entwickeln nahezu alle SREs. Vergleichbar mit o.g. osteoporotischen Schenkelhalsfrakturen betragen die direkten Kosten eines SRE ca. 14.000-23.000 Euro. Sie stellen neben der Osteoporose ebenfalls eine große Belastung für das Budget der Krankenkassen dar [23].

2.3.3 Osteopetrose

Die Osteosklerose/Osteopetrose hingegen ist in der gestörten Differenzierung oder Funktion von Osteoklasten begründet [24]. Sie entspricht einer erhöhten Knochenmasse/-dichte, also eine Hyperossifikation der Knochen. Klinisch ist diese seltene, genetische Erkrankung sehr variabel. Man unterscheidet grob eine infantile/maligne und „late-onset“ Verlaufsform. Ein erhöhtes Frakturrisiko liegt, unabhängig der Knochenmasse, auch hier vor. Vordergründig sind bei der infantilen Form aber hämatologische (Panzytopenie) und neurologische Komplikationen. Therapeutisch kann die Osteopetrose durch eine Knochenmarkstransplantation behandelt werden. Dabei kann es zu einer Reimplementierung des Monozyten/Makrophagensystems und damit sogar zu einer Heilung kommen [25].

Der Kauapparat kann bei einer Osteopetrose durch Mineralisationsstörungen der Zähne und Osteomyelitiden der Kieferknochen betroffen sein [25]. Zudem kann es zu Gesichtsfehlbildungen kommen, wie: „open mouth outline“, Mikrognathie, Kieferdysplasien und persistierende Milchzähne [26, 27]. Bemerkenswerterweise stellt die Osteopetrose auch einen hereditären Risikofaktor für die Entwicklung

einer Kieferosteonekrose dar, vergleichbar der Bisphosphonat-assoziierten Kieferosteonekrose [28].

2.3.4 Osteomyelitis des Kieferknochens (OMJ)

Die Osteomyelitis des Kieferknochens (OMJ) lässt sich in akute, sekundär-chronische und primär-chronische (selten) OMJ einteilen. Die akute und sekundär-chronische OMJ entstehen aufgrund pyogener Infektionen. Als Eintrittspforte der Keime dienen invasive, zahnmedizinische Eingriffe (auch Leitungsanästhesie), Kieferfrakturen oder die hämatogene Streuung (bei Kindern). Das klinische Erscheinungsbild der OMJ präsentiert sich mit typischer Entzündungssymptomatik (Calor, Rubor, Dolor, Tumor und Functio laesa), bis hin zu chronischen Symptomen wie Fistelung, Sequestrierung, freiliegende Knochen und pathologischen Frakturen. Die Therapie besteht aus einer systemischen, antibiotischen Therapie sowie ggf. der chirurgischen Sanierung mittels Débridement [29].

2.4 Grundlegendes Therapiekonzept osteoporotischer Erkrankungen und Prävention von skeletal related events (SREs)

Bei rund 90% aller Osteopathien liegen aktivitätssteigernde Störungen der Osteoklasten vor. Lediglich zwei Osteopathien zeigen primär keine Assoziation mit vermehrter Osteoklastenaktivität: die Osteopetrose und die Osteomalazie (abgesehen des sekundären Hyperparathyreodismus). Eine Prävention (neben Lebensstilanpassung) und Therapie der meisten Knochenkrankheiten bieten daher Wirkstoffe (Hormone, Medikamente und Antikörper), welche die Osteoklastenaktivität reduzieren. Hierfür ergeben sich vier therapeutische Angriffspunkte:

- Hemmung der Rekrutierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen,

- Verkürzung der Lebenszeit (Apoptose) von Osteoklasten,
- Hemmung der Zellaktivität von Osteoklasten,
- Störung der Interaktion zwischen Osteoklast und Knochenoberfläche [30].

Etablierte Wirkstoffe mit diesen Angriffspunkten sind Bisphosphonate und der Antikörper Denosumab.

2.5 Antiresorptive Medikamente

2.5.1 Historie der antiresorptiven Medikamente

Obwohl die Bisphosphonate deutschen Chemikern bereits seit 1865 [31, 32] bekannt sind, ist ihre biologische Wirkung erst 1968 [32, 33] beobachtet worden. Entdeckt wurde dies bei der Suche nach einer Antwort auf die Frage, warum sowohl im Plasma [32, 34], als auch im Urin [32, 35] die Ausfällung von Kalziumphosphatkristallen in vitro gehemmt wird. Da der gesuchte Hemmstoff durch die alkalische Phosphatase selbst inhibiert wurde, ging man davon aus, dass die Zielsubstanz als Charakteristikum Polypyrophosphat (P-O-P-Verbindungen) beinhaltet. Polypyrophosphat-Verbindungen waren bereits durch ihre Fähigkeit, die Ausfällung von Kalziumkarbonat zu hemmen, aus der Industrie bekannt (u.a. in Waschpulvern). Die Zielsubstanz im menschlichen Körper, welche die Ausfällung der Kalziumphosphatkristalle hemmt, stellte sich nun tatsächlich nachweislich als Polypyrophosphat heraus, genau genommen sogar als das einfachste, anorganische Pyrophosphat (P-O-P). Hieraus wurde nun allgemein abgeleitet, dass Pyrophosphat den Prozess der Verkalkung im Körper hemmen würde. Zudem war zusätzlich bekannt, dass Kristallisationshemmer auch die Kristallauflösung selbst bremsen können [32]. Dies gilt auch für die Polypyrophosphate [32, 36].

Beide Wirkungen sind mit der hohen Affinität von Polypyrophosphaten zur Kristalloberfläche verbunden [32, 37]. Zuzüglich der Einflussnahme in die

Kristallauflösung, bestand also nun auch die Annahme, dass Pyrophosphate die Auflösung von mineralisiertem Knochen regulieren bzw. hemmen könnte [32, 36]. Da es für die ersten Pyrophosphate, wegen ihrer geringen Halbwertszeit (HWZ) durch die enzymatische Spaltung, noch wenig Indikationen gab, wurden Wirkstoffe entwickelt, welche die physikalisch-chemische Wirkung der Pyrophosphate besitzen, jedoch nicht enzymatisch gespalten werden können und damit metabolisch resistent sind. Diese Wirkstoffgruppe stellt die bis heute verwendete Gruppe der Bisphosphonate dar [32].

Seit 1995 sind Bisphosphonate nun etablierte Wirkstoffe zur Therapie und Prävention von osteopenischen Knochenerkrankungen [38].

Der RANK/RANKL-Signalweg wurde erst in den späten 1990ern als bedeutender Regulationsmechanismus für die physiologische und pathologische Resorption des Knochens identifiziert [14, 39-42]. Als erster Mitregulator dieses Systems wurde OPG durch genetisch-basierte Analysen entdeckt. Im Mäuseversuch zeigte sich, dass OPG in der Lage ist, RANKL zu binden und zu inhibieren [42, 43]. Dies resultierte in einer verminderten Knochenresorption und einer gesteigerten Knochenmasse.

Als Folge dieses Zusammenspiels ist in einem umfassenden klinischen Entwicklungsprogramm der humane, monoklonale Antikörper Denosumab entwickelt worden, um Osteopenie und Knochendestruktion v.a. bei Patienten mit Knochenmetastasen therapieren zu können [42].

Im Frühjahr 2010 wurde Denosumab in allen 27 Mitgliedstaaten der Europäischen Union zugelassen [44].

2.5.2 Chemische Grundlagen

Bisphosphonate sind Analoga des physiologisch vorkommenden Pyrophosphats, nur wurde bei ihnen das zentrale Sauerstoffatom der P-O-P Bindung durch Kohlenstoff ersetzt (P-C-P Bindung), wie Abb. 4 zeigt. Damit ist die Bindung resistenter gegenüber Hitze und enzymatischer Spaltung. Bisphosphonate, bei denen die beiden Phosphatbindungen am Kohlenstoffatom lokalisiert sind,

werden als sog. „geminale Bisphosphonate“ bezeichnet. Dies ist für alle pharmakologisch eingesetzten Bisphosphonate der Fall. Modifiziert werden können Bisphosphonate, indem entweder die beiden Wasserstoffatome am C-Atom substituiert werden oder durch eine Veresterung der Phosphatgruppen. Dadurch entstehen zahlreiche neue Bisphosphonate mit unterschiedlichem Wirkungspotential und charakteristischem Wirkungsprofil. Daher ist jede Substanz bezüglich der Pharmakologie und Toxikologie eigenständig zu betrachten. Chemisch lassen sich die Bisphosphonate nach ihrer aliphatischen Seitenkette in drei Gruppen einteilen:

- Bisphosphonate ohne Stickstoffsubstitution
Etidronat, Clodronat, Tiludronat
- Aminobisphosphonate
Pamidronat, Alendronat, Neridronat
- Am Stickstoff substituierte Bisphosphonate (tertiäre Amine und stickstoffhaltige Heterozyklen)
Olpadronat, Ibandronat, Risedronat (Pyridin-Ring), Zolendronat (Imidazol-Ring) [30].

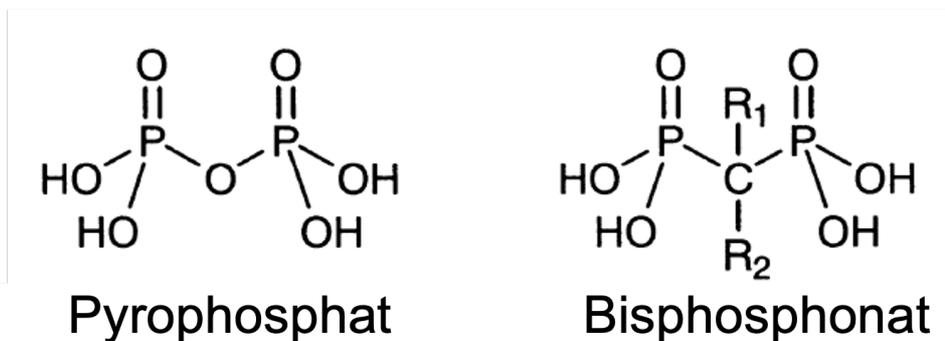


Abbildung 4: Chemische Struktur Pyrophosphat und Bisphosphonat. C = Kohlenstoff, H = Wasserstoff, O = Sauerstoff, P = Phosphat, R_{1/2} = Seitenketten verschiedener Bisphosphonate nach Scriba et al. [45].

Denosumab hingegen gehört als humaner, monoklonaler IgG2 Antikörper zur Gruppe der Proteine. Er ist demnach wie jeder monoklonale Antikörper ein Peptid und in der entsprechenden Antikörper-Klasse (IgG2) konfiguriert [46].

2.5.3 Wirkstoffeinteilung

Tabelle 1 zeigt, wie Bisphosphonate sich anhand ihrer Seitenketten und ihrer Potenz einteilen lassen:

INN	R ₁	R ₂	relative Potenz	Handelsname
Etidronsäure	OH	CH ₃	1	Diphos [®] , Didronel [®] , Etidronat [®] 200
Clodronsäure	Cl	Cl	10	Bonefos [®] , Ostac [®]
Cimadronsäure	H	NH- 	–	–
Tiludronsäure	H	S- 	10	Skelid [®]
Pamidronsäure	OH	CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	100	Aredia [®]
Alendronsäure	OH	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	100–1000	Fosamax [®]
Neridronsäure	OH	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	100	–
Olpadronsäure	OH	CH ₂ -CH ₂ -N(^{CH₃}) ₂	100–1000	–
Ibandronsäure	OH	CH ₂ -CH ₂ -N(^{CH₃}) ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	1000–10000	Bondranat [®]
EB-1053	OH	CH ₂ -CH ₂ -N 	100–1000	–
Risedronsäure	OH	CH ₂ - 	1000–10000	Actonel ^{®a)}
Minodronsäure	OH	CH ₂ - 	> 10000	–
Zoledronsäure	OH	CH ₂ - 	> 10000	–

a) bisher nur in den USA zugelassen

Tabelle 1: Übersicht über die chemischen Bezeichnungen, chemische Struktur der Seitenketten, der relativen Wirkpotenz im Vergleich zu Etidronsäure und Handelsname verschiedener Bisphosphonate nach Scriba et. al ohne Anspruch auf Vollständigkeit nach Scriba et al. [45].

2.5.4 Wirkmechanismus

2.5.4.1 Wirkmechanismus auf molekularer Ebene:

Der hauptsächliche physikalisch-chemische Effekt beruht auf der verminderten Auflösbarkeit der Knochensubstanz und Veränderungen des Mineralisationsprozesses. Dies gelingt durch den festen Einbau der Bisphosphonate in die Hydroxylapatit-Kristalle und in die Knochenmatrix der Knochenoberfläche (Hemmung der Kristallbildung, -aggregation und -auflösung). Bedingung hierfür ist eine besonders hohe Affinität zu Festphasen-Kalziumphosphat. Aufgrund ihrer hohen Potenz und damit niedrigen Dosierung hat bei modernen (Amino-)Bisphosphonaten der physikalisch-chemische Effekt praktisch keine besagte Wirkung mehr [30].

Die biochemische Wirkung findet sich vor allem im Bereich des Mevalonat-Stoffwechsels. Im Gegensatz zu Statinen, welche die beta-HMG-CoA-Reduktase hemmen und damit die Synthese von Mevalonsäure beeinträchtigen, greifen Bisphosphonate tiefer in den Prozess der Prenylierung und des Steroidstoffwechsels ein. Klinisch von Bedeutung sind hierbei der Angriffspunkte der Mevalonsäure-Syntheseschritte (siehe Abbildung 5):

- Bisphosphonate der ersten Generation bilden mit AMP (Adenosinmonophosphat) ein nicht hydrolysierbares ATP (Adenosintriphosphat)-Analog und entziehen so der Synthese von Isopentenyl-Pyrophosphat die Energie.
- Aminobisphosphonate der zweiten Generation hemmen kompetitiv die enzymatische Umsetzung von Dimethylallylpyrophosphat zu Geranylpyrophosphat.
- Aminobisphosphonate der dritten Generation blockieren zusätzlich den enzymatischen Reaktionsschritt von Geranylpyrophosphat zu Farnesylpyrophosphat bzw. zu Geranylgeranylpyrophosphat. Mit ihnen verankern sich GTPasen (Guanosintriphosphatasen) an der

Zellmembran. Die GTPasen verlieren dadurch ihre membranspezifische Funktion und induzieren schließlich die Apoptose. Dies wirkt sich v.a. auf Osteoklasten aus (durch die hohe Aufnahme an Bisphosphonaten an der Knochenoberfläche). Des Weiteren greift die Bisphosphonatwirkung molekular in das Zellwachstum und die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoklasten ein (Hemmung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen). Schließlich können intrazellulär noch die Säureproduktion, sowie Protonen-ATPasen, lysosomale Enzyme und Prostaglandine gehemmt werden [30].

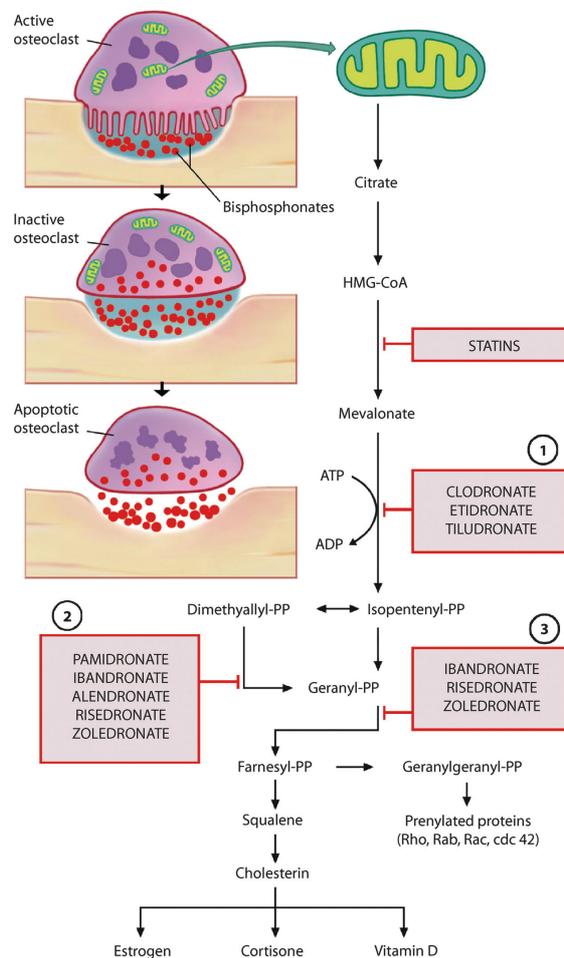


Abbildung 5: Schematisch/grafische Darstellung der Beeinflussung des Osteoklastenstoffwechsels durch Bisphosphonate nach Bartl et al. -PP = -Pyrophosphat. [47]

Denosumab wirkt, indem er in das RANK/RANKL-System eingreift. Dieses System dient der Regulierung von Osteoklasten. Eine Aktivierung des Rezeptors bewirkt die Reifung des Osteoklasten und ist für seine Funktion und sein Überleben essenziell. OPG ist ein physiologischer Inhibitor dieses Systems. Estrogene fördern die Ausschüttung von OPG aus den Osteoblasten. Aus diesem Grund führen verminderte Estrogenspiegel zu einem vermehrten Knochenabbau. Denosumab ist in der Lage, wie OPG den RANKL zu binden (sogar mit höherer Affinität als OPG) und damit eine Bindung von RANKL an RANK zu verhindern. Dies führt in Folge zu einer verminderten Aktivität der Osteoklasten [48].

2.5.4.2 Wirkung auf Zellebene

2.5.4.2.1 Wirkung auf Osteoklasten

Die Aufnahme von Bisphosphonaten in Osteoklasten bewirkt eine Verminderung der Zelleistung, der Säure- und Enzymproduktion sowie des vesikulären Transportsystems. Die Osteoklasten entfernen sich daraufhin aus ihren Lakunen und Osteoblasten füllen diese mit neuer Matrix auf. Die Bisphosphonate verbleiben dort eingelagert. Diese mit Bisphosphonaten beschichteten Knochenoberflächen hemmen nun erneut bei Aufnahme den Stoffwechsel in den Osteoklasten und bewirken zudem den Verlust des Anhaftens von Osteoklasten. Dies erfolgt aufgrund der Akkumulation von Isopentylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat. Dadurch wird das extrazelluläre Milieu zwischen der „ruffled border“ (der resorbierenden/knochenzugewandten Seite des Osteoklasten) und dem Knochen beeinflusst bzw. die ruffled border komplett aufgelöst. Systemisch wird die Proliferation von Makrophagen sowie die Rekrutierung und Fusionierung der Makrophagen zu Osteoklasten gehemmt und sogar ihre Apoptose (moderne Bisphosphonate) oder Nekrose (ältere Bisphosphonate) induziert [30].

2.5.4.2.2 Wirkung auf Osteoblasten

Es gibt Hinweise, dass Bisphosphonate indirekt über Osteoklasten und das RANKL-OPG-System auch Einfluss auf die Knochenbildung der Osteoblasten haben. Histomorphometrisch konnten in Knochenbiopsien therapierter Patienten ein Anstieg der Osteoblasten- und Osteoidsäume dokumentiert werden [49, 50].

2.5.4.2.3 Wirkung auf Osteozyten

Die Wirkung auf Osteozyten ist noch nicht gut erforscht. Der antiapoptotische Effekt auf Osteoblasten wirkt sich auch auf die später differenzierten Osteozyten aus und sorgt für ihr verlängertes Überleben [51]. Dieses verlängerte Überleben und die erhöhte Osteoblastendichte soll zu einer erhöhten Osteozytendichte sowie einer besseren Versorgung von Mikrofrakturen führen [52]. Ebenso wurden auch zytotoxische Effekte von Bisphosphonaten beobachtet [53], bzw. dementiert [54].

Denosumab bewirkt mit seiner Bindung an RANKL eine ähnliche Wirkung wie OPG. Es hemmt Osteoklasten in ihrer Funktion und verhindert die Differenzierung von Osteoklasten und damit ihr weiteres Überleben [55, 56]. Damit sinkt ebenfalls die Zahl der Osteoklasten und das Gleichgewicht des Remodeling wird auf Seiten des Knochenaufbaus verschoben. Es wird vermutet, dass Denosumab vergleichbare indirekte Effekte auf Osteoblasten und Osteozyten hat wie Bisphosphonate [55].

Abbildung 6 zeigt schematisch die Wirkung von Bisphosphonaten und Denosumab:

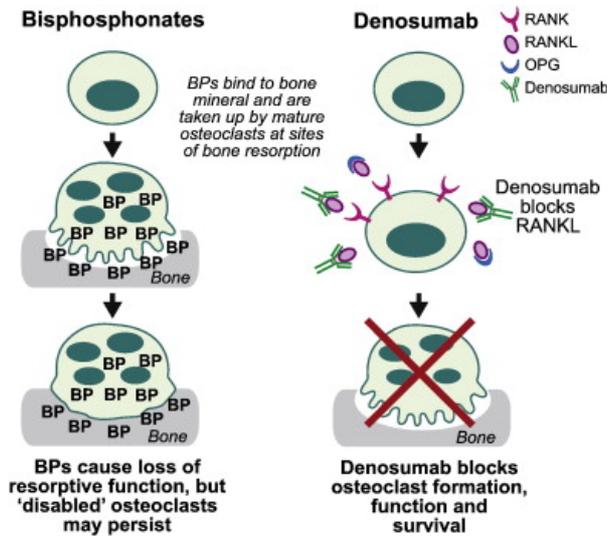


Abbildung 6: Grafische Darstellung des Wirkmechanismus von Bisphosphonaten und Denosumab nach Baron et al. [56].

2.5.5 Pharmakokinetik

Die Bisphosphonat-Verteilung findet im Körper in vier klinisch relevanten Kompartimenten statt: dem Magen-Darm-Trakt, dem Blutsystem, den Knochen und der Niere. Als synthetische Verbindungen werden Bisphosphonate schlecht im Magen-Darm-System resorbiert, dies beruht auf sehr geringer Lipophilie und negativen Ladungen. Dadurch wird der transzelluläre Transport durch die epithelialen Zellen des Darms behindert. Die Resorption beträgt nur zwischen <1% und 10%. Ein paralleles Vorhandensein von positiven Ionen (besonders Kalzium) hemmt die Bisphosphonataufnahme und ist dadurch bedingt, dass beide unlösliche Chelat-Komplexe bilden. Gleichzeitiger Verzehr von Milchprodukten, Eisenpräparaten etc. ist daher zu vermeiden. Anschließend werden die Bisphosphonate über die Blutbahn systemisch verteilt. Dort werden sie, an Albumin und Magnesium oder Calcium gebunden, transportiert. Die unterschiedlichen Seitenketten der Bisphosphonate führen präparatabhängig zu erheblichen Unterschieden der Plasmahalbwertszeit (15-120h). Aus dem Plasma gelangen die Bisphosphonate an die Knochenoberfläche, wo sie aktiv gebunden werden. Am Knochen steigt dadurch ihre Konzentration bis zum Hundertfachen der Plasmakonzentration. Die dortige Halbwertszeit kann bis zu mehreren Jahren

betragen. Gespalten werden kann die P-C-P-Bindung der Bisphosphonate nicht. Diese Kombination ist eine Erklärung für ihre lange Wirkungszeit. Die zelluläre Aufnahme ist bisher noch sehr unbekannt. Es werden Pinozytose, sowie Endozytose des extrazellulären Gewebes in Betracht gezogen, da Transportproteine nicht bekannt sind. Besonders reich finden sie sich in Makrophagen und Osteoklasten. Die Elimination erfolgt aktiv im proximalen Tubulus der Niere. Da die Elimination stark innerhalb der Bisphosphonate variiert, sollte das Präparat möglichen Komorbiditäten wie Niereninsuffizienz und/oder Dialyse angepasst werden [30, 48].

Denosumab wird subkutan verabreicht. Als Antikörper ist das Hauptverteilungskompartiment das Blut. Eine Plasmaspitzenkonzentration wird mit einer minimalen Frist von 5-42 Tagen erst sehr langsam erreicht. Die biologische Verfügbarkeit liegt bei 61% und damit bedeutend höher als bei Bisphosphonaten. Bei der Elimination geht man davon aus, dass sie wie bei allen Antikörpern abläuft, sprich zum Beispiel über das retikuloendotheliale System. Eine mögliche Leber- oder Niereninsuffizienz hat keine Auswirkung auf die Elimination. Die Halbwertszeit lässt sich insgesamt bei ca. 30 Tagen einordnen [57-59]. Abbildung 7 veranschaulicht die Pharmakokinetik und -dynamik von Denosumab:

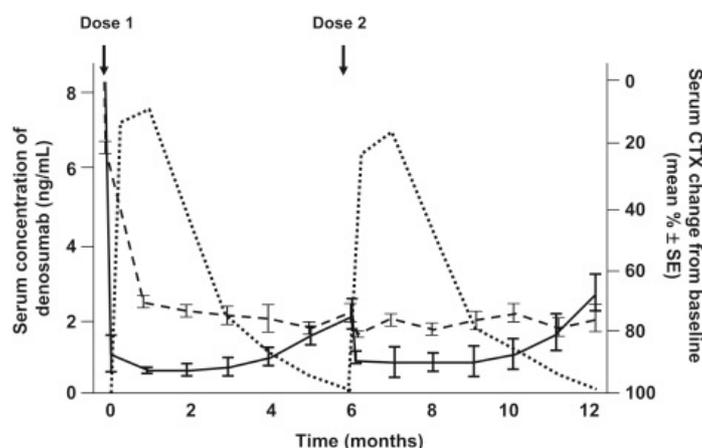


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Pharmakokinetik und pharmakodynamischen Antwort nach einer subkutanen Injektion von 60 mg Denosumab. Serum Denosumab Level ...; Serum CTX nach Denosumab ___; Serum CTX nach Alendronat 70 mg wöchentlich - - -; CTX: beta-CrossLaps (Kollagenabbau-Marker) nach McClung et al. [60].

2.5.6 Generelle Nebenwirkungen

2.5.6.1 *Generelle Nebenwirkungen von Bisphosphonaten*

Zu den generellen Nebenwirkungen von Bisphosphonaten gehören folgende:

- Medikamenten-assoziierte Osteonekrose des Kiefers
- Erosive Ösophagitis
- Akute Phase Reaktion (Fieber, Myalgie und Arthralgie)
- Muskulo-Skelettale Schmerzen
- Hypocalciämie
- Ösophageale Tumore (fraglich als Folge einer erosiven Ösophagitis)
- Entzündungen der Augen (Uveitits, Konjunktivits, Episkleritis, Skleritis)
- Atypische Frakturen [61].

2.5.6.2 *Generelle Nebenwirkungen von Denosumab*

Zu den generellen Nebenwirkungen von Denosumab gehören folgende:

- Medikamenten-assoziierte Osteonekrose des Kiefers
- Kardiovaskulär (periphere Ödeme, Hypertonie, Angina pectoris)
- Neurologisch (Fatigue, Kopfschmerzen, Ischialgie)
- Dermatologisch (Hautausschlag, Dermatitis, Ekzem)
- Endokrin (Hypophosphatämie, Hypocalciämie, Hypomagnesiämie)
- Gastrointestinal (Diarrhoe, Übelkeit, Appetitminderung, Flatulenz)
- Hämatologisch (Anämie, Thrombozytämie, maligne Neoplasie)
- Infektion
- Muskulo-Skelettale Schmerzen
- Katarakt
- Respiratorisch (Dyspnoe, Husten, Pneumonie, Nasopharyngitis) [62].

2.6 Medikamenten-assoziierte Kiefernekrose (MRONJ)

2.6.1 Definition

Die aktuelle und international anerkannte Definition von medikamenten-assoziierten Kiefernekrosen liefert im Jahr 2015 die International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw, publiziert im Journal of Bone and Mineral Research. Ihre Definition lautet wie folgt:

- freiliegender Kieferknochen, der nicht innerhalb von 8 Wochen nach fachärztlicher Behandlung abheilt,
- antiresorptive Medikation in der Anamnese
- keine Bestrahlung der Kopf-Hals-Region in der Anamnese [63].

Zudem kommt der Ansatz der American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) aus dem Jahr 2014, welche ursprünglich den Begriff „medication related osteonecrosis of the jaw (MRONJ)“ prägt. Sie grenzten orale Ulzerationen und benigne Sequestrationen (OUBS) ab und schließen zudem mit dem Präfix „Medikamenten-...“ nicht nur Bisphosphonate (wie bei der BRONJ), sondern auch andere antiresorptive Medikamente wie Denosumab mit ein [64].

Nach der deutschen S3-Leitlinie für Antiresorptiva-assoziierte Kiefernekrosen (AR-ONJ) liegt eine MRONJ vor, wenn die Trias aus:

- mehr als 8 Wochen freiliegender oder sondierbarer Knochen
- Antiresorptiva in der Anamnese und
- keine Kopf-Hals-Radiatio in der Anamnese

zutrifft [65].

2.6.2 Historie

2003 berichtete Marx als erster über die avaskuläre Nekrose des Kiefers, welche überwiegend bei onkologischen Patienten auftrat, die intravenös mit Bisphosphonaten therapiert wurden [66]. In Deutschland wurde sie erst am 2. August 2004 thematisiert, als im „deutschen Ärzteblatt“ der Artikel

„Osteonekrosen des Kiefers unter Bisphosphonaten“ und unmittelbar danach im Oktober in der „zm“ der Artikel „Mögliche unerwünschte Wirkung von Bisphosphonaten“ erschien [30, 67].

Besonders auffällig ist, dass antiresorptiv-therapierte Patienten mit Nekrose überwiegend metastasierte Tumorerkrankungen (95%) als Primärleiden haben, während die Osteoporose den bedeutend geringeren Teil ausmacht (5%) [68]. Die Mandibula ist ungefähr doppelt so häufig betroffen wie die Maxilla (2:1). Ferner wurde beobachtet, dass in einer retrospektiven Studie 60% der MRONJ-Patienten einer vorherigen Zahnbehandlung unterzogen wurden, was sich mit den Erkenntnissen von Marx deckt [65, 66, 69].

Heute gibt es starke wissenschaftliche Evidenz, dass die Nekrosen des Kiefers als schwerwiegende Nebenwirkung von intravenösen und oralen Bisphosphonaten, Denosumab sowie Angiogenesehemmern (z.B. Bevacizumab) gilt und in seltenen, schweren Fällen auch bei Osteoporose-Patienten auftreten kann [64].

2.6.3 Klinisches Bild und Diagnose

Initial berichten Patienten meistens über unspezifische Schmerzen in den betroffenen Arealen. Begleitet werden die Schmerzen gerne von geringfügiger Schleimhautschwellung. Für den Untersucher ist es zu diesem Stadium noch schwer, eine Differentialdiagnose zu treffen. Gefolgt wird die Schwellung von Schleimhaurötungen. Im weiteren Verlauf beginnt die Nekrose Fisteln zu bilden, meist im Alveolarkamm, anschließend werden immer mehr Knochenanteile der Kiefernekrose freigelegt. Schreitet die Erkrankung weiterhin ohne Behandlung fort, bilden sich großflächige nekrotische Areale, die sowohl intra- als auch extraoral liegen können. Zudem kann es zu Frakturen des Kiefers kommen. Entzündungsprozesse können dabei auch auf umliegende Gewebe und Organsysteme übergreifen. Abbildung 8 zeigt die klinische Präsentation der verschiedenen AAOMS-Stadien. In der radiologischen Bildgebung zeigen sich die Kiefernekrosen sowohl hyperdense sklerosierend, als auch lytisch [70].

Tabelle 2 zeigt die klinische 4-Stadien-Einteilung der Medikamenten-assoziierten Kiefernekrose nach der AAOMS:

Stadium	Klinischer Befund
At-risk category	Fehlende klinische Anzeichen für nekrotischen Knochen bei Patienten mit oraler oder intravenöser antiresorptiver Therapie.
0	Fehlende klinische Anzeichen für nekrotischen Knochen, aber unspezifische klinische Symptome und radiologische Auffälligkeiten: <ul style="list-style-type: none"> - Schmerzen (z.B. Zähne, Kiefergelenke, Kieferhöhlen), Zahnverlust - Fisteln ohne erkennbare Ursache
1	Exponierter und nekrotischer Knochen oder bis auf den Knochen sondierbare Fisteln asymptomatischer Patienten ohne Hinweis auf Infektion
2	Exponierter und nekrotischer Knochen oder bis auf den Knochen sondierbare Fisteln einhergehend mit Infektion, Schmerzen, Rötung des Randbereichs des nekrotischen Areals mit oder ohne purulente Sekretion
3	Exponierter und nekrotischer Knochen oder bis auf den Knochen sondierbare Fisteln mit Schmerzen und Infektion sowie ≥ 1 eine der folgenden Aspekte: <ul style="list-style-type: none"> - exponierter und nekrotischer Knochen der über den Alveolarfortsatz hinausreicht (z.B. Unterkieferkante und Ramus mandibulae, Kieferhöhle, Jochbein) - pathologische Frakturen - extraorale Fistelung - oro-antrale oder oro-nasale Verbindung - Osteolyse, die sich bis zum unteren Rand der Unterkieferkante oder bis zum Kieferhöhlenboden ausbreitet

Tabelle 2: Klinische Stadien-Einteilung der MRONJ nach der AAOMS [71].



Abbildung 8: Grafische Darstellung des intraoralen Befundes von MRONJ-Patient entsprechend der AAOMS Stadien I-III.

Das Besondere an dieser Art der Medikamenten-assoziierten Osteonekrosen ist, dass sie, trotz systemischer Wirkung und der Anreicherung in allen Knochen, ausschließlich im Kieferbereich auftreten. Man nimmt an, dass lokale Infekte eine große Rolle bei der Entstehung der Nekrose spielen. Dies lässt sich besonders gut mit dem Aspekt der häufig vorangegangenen zahnmedizinisch/chirurgischen Behandlungen in Verbindung bringen. Es ist auch möglich, dass lokale Infekte migrieren und eine Osteonekrose im benachbarten Gebiet auftritt. Trotz höherer Inzidenz nach oralen Eingriffen können Medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen auch spontan auftreten, dann bevorzugt in bezahnten Abschnitten [70]. Das Risiko, eine BP-assoziierte Kieferosteonekrose zu entwickeln, beträgt ungefähr 0,8-12% [65, 72], wohingegen es bei Dmab-assoziierten Kieferosteonekrosen bei ca. 1,7% [65, 73] pro Jahr, in dem die Therapie durchgeführt wird, beträgt. Obwohl alle Kieferabschnitte betroffen sein können, beträgt das Verhältnis des Auftretens zwischen Ober- und Unterkiefer ungefähr 1:2 [74].

2.6.4 Pathoätiologie der MRONJ

Die genaue Pathogenese der Medikamenten-assoziierten Nekrose und vor allem ihr ausschließliches Auftreten im Kiefer, ist bis heute nicht endgültig geklärt. Zur Begründung des gehäuften Auftretens unter antiresorptiven Therapien werden folgende Gründe/begünstigende Faktoren angeführt:

- Mikrofrakturen durch starke Belastung des Kieferknochens
- Zahn- und Kiefereingriffe als Eintrittspforte für Bakterien
- Spezielle Durchblutungssituation im Kieferbereich
- Antiangiogenetische Wirkung der AR
- Hemmung des physiologischen Knochen-Remodeling der AR
- Defizite des Immunsystems oder parallele immunsuppressive und/oder chemotherapeutische Therapie durch AR
- Kombinationstherapie aus Bisphosphonaten und Denosumab mit additiver Wirkung
- Lange Therapiedauer der AR [30, 75].

Von diesen Ätiologien scheinen sich Folgende als signifikant zu erweisen: Insuffizienter Knochenumbau, immunologische Kompromittierung und die Therapiedauer.

Durch das gehemmte Remodeling kann es zu einer Hyperossifikation des Kieferknochens kommen, vergleichbar mit der Überossifikation der Osteopetrose. Die erhöhte Knochendichte soll die vaskuläre Blutversorgung unterdrücken, was ein Absterben der Osteozyten zu Folge hat und in Konsequenz eine aseptische, ischämische Nekrose [28].

Auch die immunmodulatorische Wirkung der Bisphosphonate könnte eine entscheidende Rolle spielen. Untersuchungen von Pecherstorfer et al. aus dem Jahr 2000 haben die unterschiedlichen Auswirkungen verschiedener Bisphosphonate gezeigt. Besonders Pamidronat kann die totale

Lymphozytenzahl im Körper (v.a. NK-Zellen, TK-Zellen und TH-Zellen) um bis zu 30-40% senken, während andere Bisphosphonattherapien auch signifikante Anstiege bestimmter Lymphozyten-Gruppen zur Folge haben können [76]. Bei Makrophagen kommt es durch die Hemmung des Mevalonsäure-Stoffwechsels nachgewiesen zu einer Akkumulation von IPP und DMAPP und konsekutiv zu Apoptose [77]. Dass Bisphosphonate ebenfalls Einfluss auf den Stoffwechsel von Leukozyten haben, lässt sich auf ihre gemeinsamen Vorläuferzellen zurückführen. Abbildung 9 zeigt, wie sich Osteoklasten und unterschiedliche Leukozyten aus gemeinsamen Vorläuferzellen entwickeln.

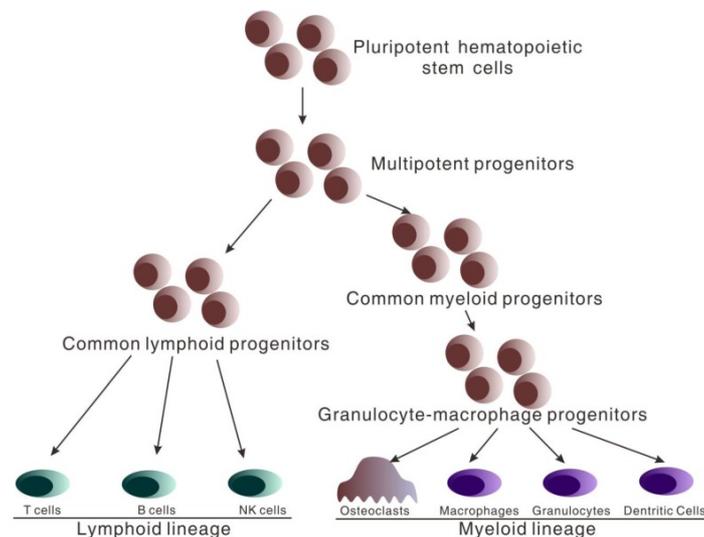


Abbildung 9: Schematisch/grafische Darstellung der hämatopoetischen Stammzellendifferenzierung. Ausgehend von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark entwickeln sich multipotente Stammzellen. Dann wird durch komplexe Regulationsmechanismen eine myeloische Reihe (aus der Osteoklasten, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen hervorgehen) und eine lymphatische Reihe (aus der T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen hervorgehen) gebildet. Nach Zhao [78].

Von besonderer Bedeutung ist zusätzlich die Dauer einer bereits durchgeführten antiresorptiven Therapie [69]. Patienten mit einer Behandlungsdauer von 4 bis 12 Monaten weisen eine Inzidenz von 1,5% auf, während sie bei Patienten mit 37-48 Monaten auf 7,7% ansteigt [79]. Auch eine lokale, entzündungsbedingte Erniedrigung des pH-Wertes könnte als begünstigender Kofaktor betrachtet werden [70].

Die bisher bekannteste und anerkannteste MRONJ-Ätiologietheorie ist die Inside-outside Theorie und wurde 2016 von Lombard et al. aufgestellt. Die Theorie wird in Abbildung 10 dargestellt:

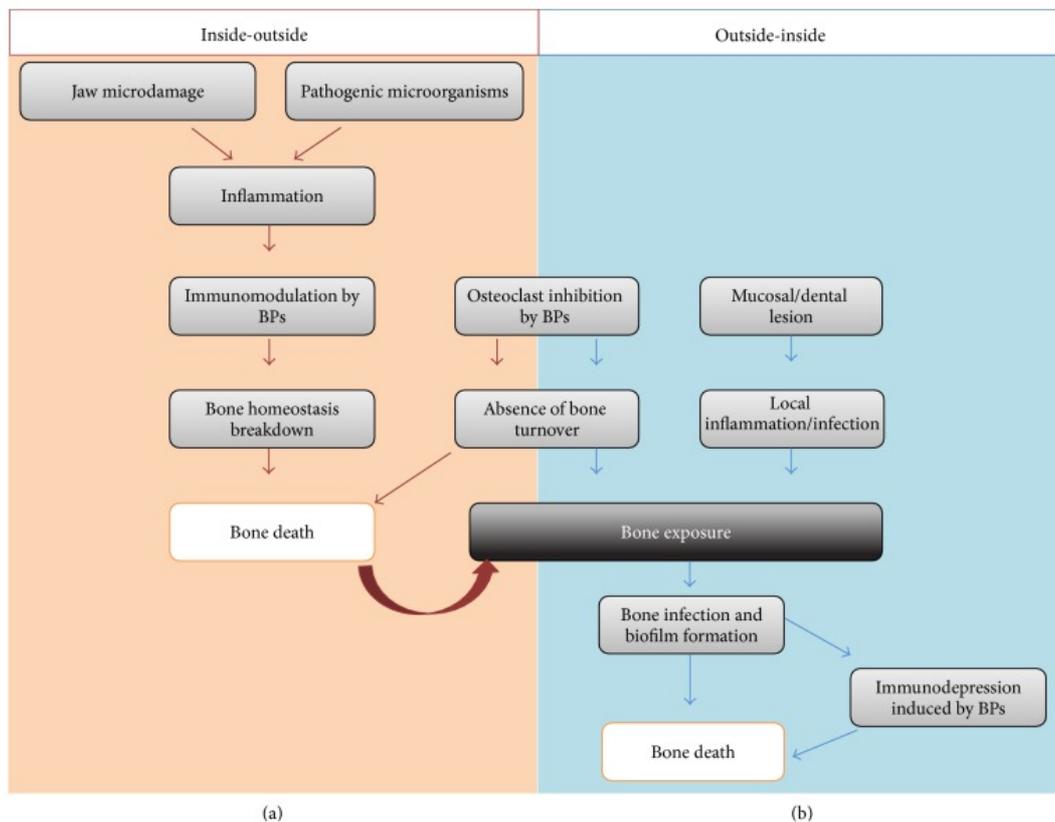


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Inside-outside MRONJ-Ätiologietheorie nach Lombard et al. [80]

Wie und ob all diese Faktoren in Zusammenhang stehen, ist bisher noch nicht hinreichend erklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Es besteht daher weiterhin die Empfehlung, Tumorpatienten die Möglichkeit einer modernen antiresorptiven Therapie, unter Beachtung sorgfältiger Prophylaxe, nicht vorzuenthalten. Der osteologische Nutzen überwiegt aktuell den medikamentösen Nebenwirkungen [30].

2.6.5 Prophylaxe

Eine ausführliche Aufklärung über Risiken und Nebenwirkungen des Patienten ist obligat [65]. Dies gilt aber auch für alle anderen involvierten behandelnden Ärzte (Zahnärzte, onkologische Internisten, Strahlentherapeuten etc.). Dabei ist v.a. die anamnestische Erfassung von Risikogruppen durch die Zahnärzte essentiell [70]. Maßgeblich steht aber bei der Prophylaxe die Infektionsprophylaxe im Vordergrund. Eine gute Infektionsprophylaxe wird erzielt, wenn der Patient sorgfältig auf die Mundhygiene achtet und regelmäßige Kontrolluntersuchungen beim Zahnarzt wahrnimmt. Rauchen und übermäßiger Alkoholkonsum sollte reduziert und wenn möglich beendet werden. Für Krebspatienten gilt, gesondert vor Therapiebeginn eine ausführliche orale Untersuchung durchzuführen, sowie detaillierte Bildgebungen anzufertigen. Wenn möglich sollte vor Therapiebeginn jegliche zahnärztliche Behandlung abgeschlossen sein. Sollten trotzdem oralchirurgische Eingriffe durchgeführt werden, wird eine Verzögerung des Therapiebeginns von bis zu zwei Monaten empfohlen, bis zur vollständigen Abheilung der Wunde. Zudem sollten prophylaktisch während des Eingriffs Antibiotika verabreicht werden. Ist vor dem Eingriff bereits eine Therapie angesetzt, wird ein „drug holiday“ diskutiert, wobei diese Pause, aufgrund der langen Halbwertszeit v.a. im Knochen selbst, kontrovers diskutiert wird [30, 81-83].

2.6.6 Therapie

Der entscheidende Faktor bei der Therapie der MRONJ ist, ob die Nekrose infiziert ist oder nicht. Nach den angloamerikanischen Leitlinien werden nicht infizierte Osteonekrosen rein konservativ mit antibakterieller Mundspülung, systemischer Analgesie und Antibiotikatherapie sowie vierteljährlichen Kontrolluntersuchungen therapiert [84] während nach der deutschen S3-Leitlinie AR-ONJ unabhängig einer Infektion bereits die unten genannten invasiven Therapien empfohlen werden [65].

Die Behandlung infizierter Knochenabschnitte ist vergleichbar mit der Therapie von infizierten Osteoradionekrosen. Je nach Ausprägung variiert die Strategie von antibiotischer Therapie, über chirurgische Sanierung infizierter Zähne (diese Zähne können die Infektionsquelle darstellen) bis hin zum lokalen Débridement der infektiösen Nekrose mit anschließender plastischer Deckung und der Versorgung pathologischer Frakturen des Kiefers. Auch autologe Knochentransplantate z.B. aus dem Beckenkamm können schlussendlich indiziert sein. Die genaue Therapieempfehlung je nach Stadium ist den Leitlinien der AAOMS und der S3-Leitlinie AR-ONJ zu entnehmen. Trotz S3-Leitlinien wird das Vorgehen der chirurgischen Therapie noch kontrovers diskutiert. Als grober Anhalt scheint sich aber abzuzeichnen, dass sofern eine chirurgische Intervention notwendig ist, eine gute Strategie darin besteht, möglichst früh und so minimalinvasiv wie möglich lokal zu therapieren [70].

2.7 Grundlagen der histologischen Färbungen

2.7.1 Grundlagen der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung ist eine der am häufigsten durchgeführten histologischen Färbungen. Sie färbt saure/basophile Strukturen (Zellkerne, Kalk, grampositive Bakterien) durch das Hämatoxylin blau-violett. Im Kontrast werden basische/azidophile Strukturen (Cytoplasma, Kollagenfasern und das restliche Gewebe) durch das Eosin in Rottönen/Pink gefärbt [85]. Damit werden beispielsweise Knochen rot/pink und die Zellkerne von Osteocyten blau-violett angefärbt.

2.7.2 Grundlagen der Toluidinblau-Färbung

Die Toluidinblau-Färbung ist eine weitere, sehr häufig verwendete Standardfärbung. Das Toluidinblau färbt saure/basophile Strukturen [86].

Toluidinblau eignet sich, um die Dichte der Kittlinien quantitativ zu bestimmen. Kittlinien sind vergleichbar mit „Jahresringen“ im Knochen. Sie sind feine Linien um Haver'sche Kanäle oder entlang der Kortikalis. Durch den in der Knochenmatrix entstehenden Kontrast zwischen den hellen Schaltlamellen und den dunklen Kittlinien (siehe Abbildung 3) können Abweichungen der Morphologie der Knochenmatrix untersucht werden.

2.7.3 Grundlagen der RANKL-Färbung

Die RANKL-Immunhistofärbung färbt das von Osteoblasten exprimierte RANKL-Protein. Da RANKL ein Ligand und kein Rezeptor ist, ist die Färbung jedoch nicht ausschließlich spezifisch für Osteoblasten. Als Positivkontrolle kann Kallus verwendet werden [87]. Die Färbung kann dafür verwendet werden, um die Aktivität der RANKL-Expression von Osteoblasten darzustellen.

2.7.4 Grundlagen der OPG-Färbung

Mit der OPG-Färbung wird ein weiteres Peptid gefärbt, welches von Osteoblasten sezerniert wird. OPG ist ebenfalls nicht rein spezifisch für Osteoblasten. Als Positivkontrolle kann Kallus verwendet werden [87]. Auch OPG kann dafür verwendet werden, um die OPG-Expressionsaktivität vom Osteoblasten zu bestimmen.

2.7.5 Grundlagen der TRAP-Färbung

Die Tartrate-resistant acid Phosphatase (TRAP) wird von Osteoklasten auf der knochenzugewandten Seite sezerniert. Allerdings wird es auch in Monozyten, den Vorläuferzellen von Osteoklasten, exprimiert. Als Positivkontrolle kann Plazenta verwendet werden [88]. Unter Einbezug der speziellen Morphologie der Osteoklasten (groß, mehrkernig) und ihrer Nähe zum Knochen, kann TRAP verwendet werden, um Osteoklasten zu identifizieren und zu quantifizieren.

2.8 Fragestellung und Zielsetzung

Alle Erklärungsansätze zur genauen Ursachen-Folge-Beziehung sowie Pathogenese der Medikamenten-assoziierten Nekrose des Kiefers bleiben bislang noch rein hypothetisch. Bisher ist es schlicht noch nicht gelungen, einen endgültigen kausalen Zusammenhang zwischen den Antiresorptiva und den Osteonekrosen des Kiefers (außer klinischen Beobachtungen) herzustellen. Ein besseres Verständnis dieses Krankheitsbildes kann zukünftig vielleicht die Prävention verbessern und sich auf neue Therapiekonzepte auswirken.

Diese Studie soll sich mit der antiresorptiven Wirkung der Medikamente speziell auf den Kieferknochen befassen und untersuchen, wie und ob sich der Kieferknochen auf mikroskopischer Ebene durch die verschiedenen Antiresorptiva verändert. Es sollen Hinweise dafür gefunden werden, wie und ob die AR-Therapie Veränderungen der histomorphologischen Struktur des Knochens bewirkt und in welchem Rahmen die beteiligten Zellen des bone remodelings funktionell dabei Einfluss haben.

Hierfür haben wir am trabekulären Knochen der Kieferknochenproben von Bisphosphonat- und/oder Denosumab-therapierten Patienten wie folgt untersucht:

1. Morphometrische Untersuchung mit mikroradiologischer Computertomographie (μ -CT's) zur der Knochenarchitektur und Knochendichtemessung,
2. Histologische Untersuchung mit Standardfärbungen zur Messung der zellulären Durchsetzung sowie quantitativer und qualitativer Bestimmung der lamellaren Struktur der Knochenmatrix auf mikroskopischer Ebene,
3. Immunhistochemische Untersuchung mit Färbungen zur semiquantitativen Untersuchung der zellulären Konstellation des bone remodelings.

3 Material und Methoden

3.1 Kieferknochenproben

3.1.1 Patientengut, Patientenvariablen und Einschlusskriterien

Die Kieferknochenproben wurden zwischen 2014 und 2018 in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen gesammelt. Genehmigt wurde die Studie (Knochenproben) von der klinischen Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Tübingen, konform der Deklaration von Helsinki (521/2010B02). Die Diagnose und das „Staging“ erfolgte nach den Kriterien der AAOMS 2014 [84].

Die Patienten und Patienten-Proben unterscheiden sich im Geschlecht, demographischer Herkunft, Alter, primärer Hauptdiagnose, aktuellen Erkrankungen, Medikamenteneinnahme, Therapiedauer, Symptomen, Auftreten der Osteonekrose, Risikofaktoren, AAOMS Stadium, Restbezahnung sowie intraorale Probenlokalisierung. Die Probengröße unterscheidet sich ebenfalls, abhängig der Defektgröße, von kleinen Resektionen durch Glätten des Knochens, bis hin zu großer Sequestrektomie mit plastischer Rekonstruktion, wie es an anderer Stelle beschrieben wurde [89].

Knochenproben der exponierten Gruppen (ohne MRONJ) wurden von Patienten gewonnen, bei denen aufgrund von Zahnextraktionen scharfe Knochenkanten geglättet werden mussten, entsprechend der deutschen S3-Leitlinie für Eingriffe unter AR-Therapie [65].

Die Einschlusskriterien der Studie orientieren sich an der Definition des Krankheitsbildes durch AAOMS [90, 91] und lauten wie folgt:

- a. Zum Zeitpunkt der chirurgischen Sanierung besteht eine vorangegangene und/oder andauernde orale und/oder intravenöse Bisphosphonat- und/oder Denosumabtherapie.
- b. Zustand nach ambulanter oder stationärer chirurgischer Sanierung.
- c. Keine Bestrahlung im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich.
- d. Exponierter Knochen seit mehr als 8 Wochen.

Eingeschlossen wurden die Patienten, die nach Diagnosestellung und Operationseinverständnis die Verwendung von Knochenmaterial für Forschungszwecke eingewilligt hatten.

3.1.2 Gruppen

Die Proben wurden in folgende 14 Gruppen unterteilt, abhängig der Medikation und dem Bezug zum Sequester bzw. zur Exposition (siehe Abbildung 11):

BP-Linie:

1. **BP_{exp}** = Bisphosphonat exponierter Knochen
2. **BPO_{mar}** = Bisphosphonat-assoziierte Nekrose, Randgebiet
3. **BPO_{seq}** = Bisphosphonat-assoziierte Nekrose, Sequester

Dmab-Linie:

4. **Dmab_{exp}** = Denosumab exponierter Knochen
5. **DmabO_{mar}** = Denosumab-assoziierte Nekrose, Randgebiet
6. **DmabO_{seq}** = Denosumab-assoziierte Nekrose, Sequester

M-Linie:

7. **M_{exp}** = Bisphosphonat und Denosumab exponierter Knochen
8. **MO_{mar}** = Bisphosphonat und Denosumab-assoziierte Nekrose, Randgebiet
9. **MO_{seq}** = Bisphosphonat und Denosumab-assoziierte Nekrose, Sequester

NB-Linie (Nebenanalyse):

- 10. **BPO_{NB}** = Neo-Knochen nach Bisphosphonat-assoziiierter Nekrose
- 11. **DmabO_{NB}** = Neo-Knochen nach Denosumab-assoziiierter Nekrose
- 12. **MO_{NB}** = Neo-Knochen nach Bisphosphonat und Denosumab-assoziiierter Nekrose

Vergleichsgruppen:

- 13. **C_{HB}** = gesunder Knochen
- 14. **C_{OP}** = osteoporotischer Knochen

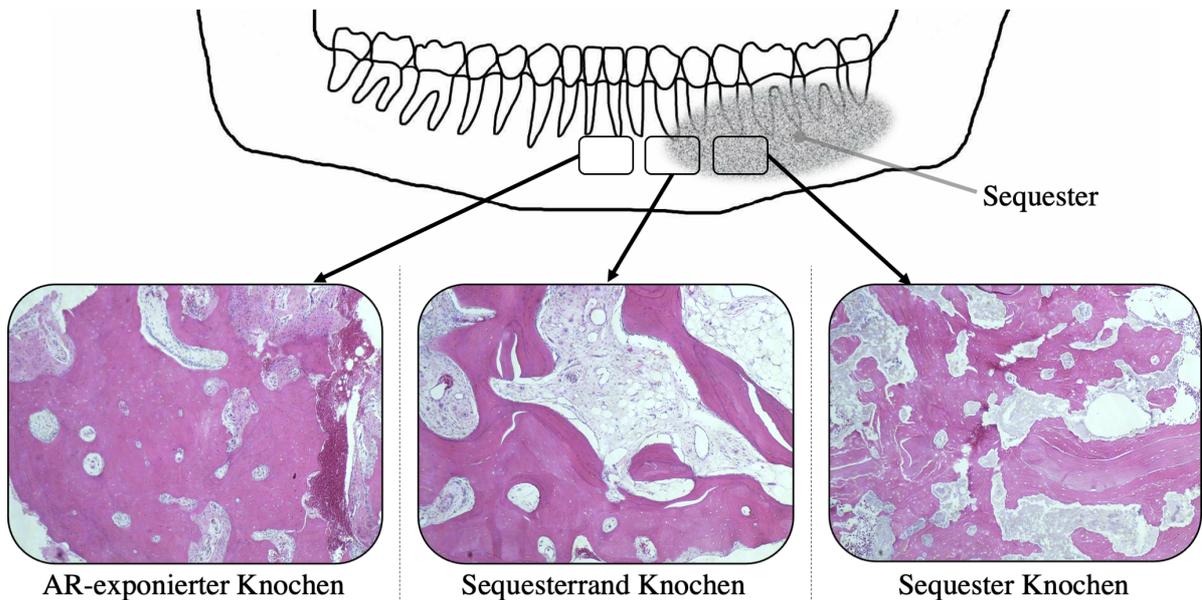


Abbildung 11: Schematisch/grafische Darstellung der Probenlokalisierung in Bezug auf den Sequester in Abhängigkeit der Histologie am Mund eines MRONJ-Patienten. Von links nach rechts: AR-exponierter Knochen (BP_{exp}/Dmab_{exp}/M_{exp}-Gruppe), Sequesterrand Knochen (BPO_{mar}/DmabO_{exp}/MO_{exp}-Gruppe) und Sequester Knochen (BPO_{seq}/DmabO_{seq}/MO_{seq}-Gruppe).

3.2 Mikro-computertomographische Untersuchung

3.2.1 Probenfixierung

Nachdem die Knochenfragmente vom Patienten gewonnen wurden, wurden sie in 4%tiger Formaldehydlösung (Otto Fischar GmbH & CoKG, Deutschland) aufbewahrt.

Für den CT-Scan wurden sie in (CT-) Scan-Behälter (Siemes AG, Deutschland) gebracht und folgendermaßen mit Wachs fixiert: Aus rosa Modellierwachsplatten (Gebdi Standard Modellierwachs, Deutschland) wurden runde Scheiben (Durchmesser wie CT-Behälter) ausgestanzt. Diese bildeten die Grundlage einer Schicht (Layer). Diese wurden dann zur Orientierung in Viertel unterteilt. Je nach Probengröße gab es in einem CT-Behälter ein bis drei Layer. Markiert wurden die Layer auf 12 Uhr mit 1-3 Guttapercha Stücken, entsprechend der Layer. Anhand der eingeteilten Viertel wurden nun die Knochenproben angeordnet. Fixiert wurden sie mit blauem Peripheriewachs (Yeti Dental Peripheriewachs, Deutschland). Bevor die CT-Behälter verschlossen wurden, wurde ein Stück in 4%igem Formaldehyd getränkte Watte mit hineingegeben, um ein Austrocknen der Proben zu verhindern, da die Proben für den Scan ca. 24 Stunden außerhalb ihres Ursprungsgefäßes mit Formaldehydlösung waren. Der digitale Vermerk (Kartographie) zum Rückverfolgen der Position der Proben im Scan-Behälter und später im CT erfolgte anhand einer PowerPoint-Präsentation.

3.2.2 Bilderstellung mit Siemens Inveon micro-CT und microCAT II (CT)

Die Proben wurden mit der Mikro-CT Einheit Siemens Inveon micro-CT (Siemens AG, Deutschland) mit 80kVp Röntgenstrahlen-Quelle und einer Schichtdicke von bis zu 15 Mikrometer über eine 192°-Rotation durchleuchtet.

Jeder einzelne CT-Behälter wurde digitalisiert und die darin enthaltenen Knochenproben mit dem Programm microCAT II (CT) (Siemens AG,

Deutschland) in einzelne CT-Datensätze geschnitten und anhand der vorher erstellten Kartographie benannt. Anschließend wurden die Datensätze in DICOM-Dateien überführt und gespeichert.

3.2.3 Analyse mit Microview

3.2.3.1 Software

Zur mikroradiologischen Analyse wurde das open source Programm MicroView (Version: Standard 2.5.0-3768) von der Firma Parallax Innovations (General Electric, USA) verwendet [92, 93].

3.2.3.2 Die Messung (Einstellung und Rahmenbedingungen)

1. Knochen definieren: Mit dem Threshold im „Bone Analysis-Tool“ wurden die Graustufenwerte (Integer-Skala: -65.534 bis 65.535 ADU – Arbitrary Density Units; linear skaliert) des Knochens definiert. Nachdem der Threshold gemessen wurde, wurde der Wert in das „Isosurface-Tool“ übertragen und damit ein 3D-Modell rekonstruiert. Hieran wurde die ROI (region of interest) ausgewählt und visuell der Threshold-Wert überprüft.
2. Auswahl der ROI: Über das „Standard-ROI-Tool“ wurden quaderförmige ROI's, die vornehmlich so viel trabekulären Knochen wie möglich einschließen, zusätzlich aber nicht über die Trabekelzonen-Grenze hinaus in die Kompakta bzw. in den leeren Raum gehen, ausgewählt.
3. Messeinstellungen: Im „Bone-Analysis-Tool“ wurden „BMD“ (Bone Mineral Density) und „Stereology“ aktiviert. Dann wurden unter „Advanced Options“ die Rahmenparameter festgelegt. Die „Bone ADU“ wurde entsprechend dem Threshold festgelegten Wert gewählt. Als „Water ADU“ wurde -32.759 ADU gewählt (aus der ebenfalls linear skalierten Hounsfield-Skala, entsprechend dem für Wasser definierten Wert von 0 HU, errechneter Wert). Anschließend erfolgte unter „Advanced Options“ und „Stereology“ die Aktivierung von „Enable verbose output“ und „Enable

purify algorithm“. Zum Schluss wurde mit „Run“ die Messung durchgeführt und als txt-Datei gespeichert.

3.2.3.3 Messvariablen

Es wurden folgende Parameter erhoben:

- BV/TV – Knochenvolumen (Bone Volume) dividiert durch Gewebe/ROI Volumen (Tissue Volume); Knochenvolumendichte
- BS/BV – Knochenoberfläche (Bone surface) dividiert durch Knochen Volumen (Bone Volume); Knochenoberflächendichte
- $Tr. Th.$ – Trabekeldicke (Trabecular thickness)
- $Tr. N.$ – Trabekelanzahl (Trabecular number)
- $Tr. Sp.$ – Trabekelabstand (Trabecular space)
- *Euler-Charakteristik* – Maß für Trabekelverbindungen pro Knochengewebvolumen
- BMD – Relatives Maß für Knochendichte der gesamten Tissue Volume/ROI (Bone Mineral Density); Knochenmineraldichte
- TMD – Relatives Maß für Knochendichte des reinen Knochenvolumens/BV (Tissue Mineral Density); Gewebemineraldichte

3.3 Histologische Untersuchung

3.3.1 Probenfixierung

3.3.1.1 Entkalkung

Die Knochenproben wurden für ca. 2 Stunden mit Leitungswasser ausgewaschen. Anschließend wurden sie mit 10-25%iger EDTA-Lösung (MEDITE USEDECAL) pH-neutral entkalkt. Dabei wurde die Lösung ständig durch vorsichtiges Magnetrühren durchmischt. Ein Wechsel des Mediums fand

alle 2-3 Tage statt. Die Knochenproben variierten stark in ihrer Größe, daher wurden Entkalkungszeiten von nur 6 bis hin zu 55 Tagen erreicht.

3.3.1.2 Dehydrierung, Einbettung und Schnittanfertigung

Eine Entwässerung wurde mit einer aufsteigenden Alkohol-Reihe durchgeführt und die Einbettung erfolgte anschließend über Xylol und Paraffin (60°C):

- Entwässerung
 - 1. Leitungswasser 30 Minuten
 - 2. 50% Ethanol 30 Minuten
 - 3. 70% Ethanol 30 Minuten
 - 4. 90% Ethanol 30 Minuten
 - 5. 100% Ethanol 1 Stunde
 - 6. 100% Xylol über Nacht

- Einbettung bei 60°C
 - 5x 100% Paraffin 30 Minuten

Mit einem Einbettsystem (MEDITE TES 99.250) wurden die Proben anschließend in Paraffinblöcke eingebettet und danach aktiv gekühlt.

Die Blöcke wurden daraufhin mit einem Schlittenmikrotom (Leitz Wetzlar) in einer Schichtdicke von ca. 3 µm geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Standardfärbungen erhielten nicht beschichtete Objektträger, immunhistochemische Färbungen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Superfrost Objektträgern durchgeführt.

Anschließend kamen die Objektträger mit dem aufgetragenen, geschnittenen Präparat für 30 Minuten bis 1 Stunde bei 60°C in den Ofen.

Für die Entparaffinierung galt folgendes Protokoll:

1.	100%	Xylol	10 Minuten
2.	70%	Xylol	10 Minuten
3.	100%	Alkohol	5 Minuten
4.	90%	Alkohol	5 Minuten
5.	80%	Alkohol	5 Minuten
6.	70%	Alkohol	kurz
7.	100%	Aqua	5 Minuten

3.3.2 Standardfärbungen

3.3.2.1 *Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)*

Die Färbung wurde nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

1. Schnitte entparaffinieren (siehe oben)
2. Kernfärbung in Mayer's Hämatoxylin 5 Minuten
3. Aqua spülen
4. in lauwarmen Leitungswasser bläuen 5-10 Minuten
5. Plasmafärbung in 2% wässrigem Eosin Y +
1 ml Eisessig auf 100 ml 2 Minuten
6. in Leitungswasser spülen
7. entwässern in aufsteigender Alkoholreihe je 1-2 x eintauchen
8. klären in Xylol
9. eindecken in synthetischem, Xylol-löslichem
Medium [94].

3.3.2.2 *Toluidinblau-Färbung*

Die Färbung wurde nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

1. Schnitte entparaffinieren (siehe oben)
2. Toluidinblau 5-10 Minuten

- | | |
|-------------------------------------------------------------|------------|
| 3. Aqua | spülen |
| 4. 70 % Alkohol | 10 Minuten |
| 5. 100% Alkohol differenzieren/entwässern | kurz |
| 6. klären in Xylol | |
| 7. eindecken in synthetischem, Xylol-löslichem Medium [95]. | |

3.3.3 Immunhistologische Färbungen

3.3.3.1 RANKL-Färbung

Die Färbung wurde nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

1. Schnitte entparaffinieren (siehe oben)
2. OT in Citratpuffer (pH 6,0), Behälter in Wasserbad (95°C), 45 Minuten
3. Abkühlen lassen
4. PBS Puffer 2x spülen
5. Primär-AK RANKL 1:200 (CD254 Antibody, Thermo Scientific, USA, AK-Verdünnungslösung: Dako S2022), über Nacht
6. PBS Puffer 2x spülen
7. Sekundär-AK: anti-Rabbit (SuperVision 2, DetectionLine, DCS, Deutschland), 20 Minuten
8. PBS Puffer 2x spülen
9. HRP-Polymer (SuperVision 2, DetectionLine, DCS, Deutschland), 10 Minuten
10. PBS Puffer 2x vorsichtig spülen
11. DAB (40µl Chromogen + 1000µl Puffer, ChromoLine, DCS, Deutschland), 3-4 Minuten
12. Leitungswasser kurz
13. Aqua kurz
14. Hämalau, 5 Minuten
15. in lauwarmen Leitungswasser bläuen

16. Aqua
17. Eindecken in Aquatex

3.3.3.2 OPG-Färbung

Die Färbung wurde nach dem folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

1. Schnitte entparaffinieren (siehe oben)
2. OT in Citratpuffer (pH 6,0), Behälter in Wasserbad (95°C), 45 Minuten
3. Abkühlen lassen
4. PBS Puffer 2x spülen
5. Primär-AK OPG 1:200 (OPG/N-20: sc-8468, Santa Cruz Biotechnology, INC., USA, AK-Verdünnungslösung: Dako S2022), über Nacht
6. PBS Puffer 2x spülen
7. Sekundär-AK 1:200 (Biotin konj. F(ab') Fragments Donkey anti goat Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC., USA), 30 Minuten
8. PBS Puffer 2x vorsichtig spülen
9. HRP-Polymer (SuperVision 2), 10 Minuten
10. PBS Puffer 2x vorsichtig spülen
11. DAB (40µl Chromogen + 1000µl Puffer, DCS ChromoLine), 3-4 Minuten
12. Leitungswasser kurz
13. Aqua kurz
14. Hämalun, 5 Minuten
15. in lauwarmen Leitungswasser bläuen
16. Aqua
17. Eindecken in Aquatex

3.3.3.3 TRAP-Färbung

Die Färbung wurde nach dem folgenden Standardprotokoll durchgeführt:

1. Schnitte entparaffinieren (siehe oben)
2. OT in Citratpuffer (pH 6,0), Behälter in Wasserbad (95°C), 45 Minuten

3. Abkühlen lassen
4. PBS Puffer 2x spülen
5. Primär-AK TRAP 1:100 (TRAP/26E5 Leica Biosystems, Deutschland, AK-Verdünnungslösung: Dako S2022), über Nacht
6. PBS Puffer 2x spülen
7. Sekundär-AK: anti-Rabbit (SuperVision 2, DetectionLine, DCS, Deutschland), 20 Minuten
8. PBS Puffer 2x vorsichtig spülen
9. HRP-Polymer (SuperVision 2, DetectionLine, DCS, Deutschland), 10 Minuten
10. PBS Puffer 2x vorsichtig spülen
11. DAB (40µl Chromogen + 1000µl Puffer, ChromoLine, DCS, Deutschland), 4-5 Minuten
12. Leitungswasser kurz
13. Aqua kurz
14. Hämalun, 5 Minuten
15. in lauwarmen Leitungswasser bläuen
16. Aqua
17. Eindecken in Aquatex

3.3.4 Bildanfertigung/Digitalisierung

Alle Präparate wurden an einem Leica DM IL LED Mikroskop (Leica, Deutschland) und zugehöriger Software digitalisiert. Von den HE- und Toluidinblau-Färbungen wurden Aufnahmen in 4-facher Vergrößerung und von den immunhistochemischen-Färbungen sowohl 4-facher, als auch 20-facher Vergrößerung erstellt.

3.3.5 Analyse

3.3.5.1 Osteozytendichte (quantitativ)

Für die quantitative Osteozytendichte-Bestimmung wurden die HE-Färbungen in 4-fach Vergrößerung verwendet. Die Bildanalyse erfolgte, wie bei allen histologisch-quantitativen Messungen, mit ImageJ (NIH, USA). Geeignete Ansichten der Probe wurde dafür in das Programm importiert. Folgender Algorithmus wurde anschließend auf jede Probe angewandt:

1. ROI's - definition (Rechtecke, nur Knochenfläche)
2. Filter - adjust (Minimum: 3.0)
3. Ggf. Kontrast - adjust
4. Color Threshold RGB - adjust (G* und B*: max, R* adjust)
5. Select and cut outside (OZ-ROI's)
6. 8-Bit - Konvertierung
7. Threshold - adjust
8. Analyze Particles - calculation

Das Ergebnis der Zählung und die Fläche der ROI's wurden gespeichert. Die Osteozytendichte wird aus der Osteozytenzahl dividiert durch die Fläche der untersuchten ROI's berechnet.

3.3.5.2 Lakunendichte (quantitativ)

Fast analog zur Osteozytendichte-Bestimmung wird die Lakunendichte bestimmt. Es wurden ebenfalls die Aufnahmen in 4-facher Vergrößerungen der HE-Färbungen verwendet, sowie die selben ROI's, damit für die Lakunen auch die Osteozyten (welche die weiße Lakune vollständig blau ausfüllen) mitgezählt werden, um halb blau/weiße Lakunen nicht doppelt zu zählen wurde folgender Algorithmus auf jede Probe angewandt:

1. ROI's - Definition entsprechen ROI's Osteozytediche-Bestimmung
2. Filter - adjust (adjust Maximum: 3.0)

3. Ggf. Kontrast - adjust
4. Color Threshold YUV- adjust (U* und V*: max, Y* adjust)
5. Auswählen und Hinzufügung der Osteozytediche- ROI's
6. Cut outside
7. 8-Bit Konvertierung
8. Threshold - adjust
9. Analyze Particles - calculation

Dokumentation der Zählung und der Fläche der ROI's werden erneut festgehalten. Die Lakunendichte ergibt sich wieder aus der Lakunenzahl dividiert durch die Fläche der untersuchten ROI's.

Sowohl bei der Osteozytenzahl, als auch bei der Lakunenzahl erfolgte eine Gegenkontrolle mit manueller Auszählung und vorbehaltlichen Korrekturen.

3.3.5.3 Kittliniendichte (*quantitativ*)

Für jede Probe wurde in 4-fach Vergrößerung bis zu vier geeignete Osteone für die Zählung ausgewählt. Die Zählung selbst erfolgte manuell. Aus Gründen der Erkennbarkeit wurden die Schaltlamellen gezählt; diese liegen zu den Kittlinien im Verhältnis 1:1 vor. Da die Linien allerdings in jeder Ebene bzw. jedem Winkel angeschnitten sein können, mussten Kriterien geschaffen werden, um die Messung zu standardisieren und den Fehler gering zu halten. Es wurden daher folgende Richtlinien vorgegeben:

Die dichtgelegenste (1. Priorität), mehrheitliche (2. Priorität) Sequenz der Kittlinien am Haver'schen Kanal wird gezählt und die Referenzstrecke ergibt sich aus der kürzesten, diametralen Strecke, in der die Sequenz vollständig erhalten ist.

Die Dichte ergibt sich dann rechnerisch aus der Kittlinienzahl dividiert durch die Referenzstrecke.

3.3.5.4 RANKL- und OPG (semiquantitativ)

Sowohl die immunhistologischen Färbungen von RANKL, als auch von OPG, wurden semiquantitativ analysiert. ROI's, welche möglichst viel gefärbte Zellen (auch keine Färbung ist möglich) enthalten, wurden in 4-fach und 20-fach Vergrößerung betrachtet. Zur Quantifizierung wurde ein Punktesystem nach Allred (Allred-score) verwendet. Dieser ergibt sich summarisch aus: geschätzter Zellzahl (negativ=0, 0-1%=1, 1-10%=2, 10-33%=3, 33-66%=4, 66-100%=5) und Farbintensität (negativ = 0, schwach = 1, mäßig = 2, stark = 3) [96]. Damit bewegt sich die Gesamtpunktzahl im Bereich von 0 bis 8. Betrachtet wurden ausschließlich Zellen in direkter Umgebung von Knochen. Von 0-2 wurden die Proben als negativ gewertet, von 3-8 als positiv. Zwischen den Gruppen wurde das Verhältnis aus positiven und negativen Proben verglichen.

3.3.5.5 TRAP-Analyse

Die TRAP-Analyse wurde fast komplett analog zu den anderen immunhistologischen Analysen durchgeführt. Es wurden ebenfalls 4-fach und 20-fach Vergrößerungen von Bereichen mit möglichst viel positiven Zellen betrachtet. Da die TRAP+-Zellen nicht so häufig sind, wurde hier ein modifiziertes Punktesystem nach Allred [96] angewandt: estimated Count (negativ=0, selten=1, vereinzelt=2, häufig=3, sehr häufig=4) und color (negativ = 0, schwach = 1, mäßig = 2, stark = 3). Der Punktzahlbereich lag hier also bei 0 bis 7 (siehe Abbildung 12). Es wurden erneut nur Zellen in unmittelbarer Umgebung des Knochens gewertet. Ähnlich wie bei RANKL und OPG wurden die Proben von 0-4 als negativ gewertet, von 4-7 als positiv. Zwischen den Gruppen wurde ebenfalls das Verhältnis aus positiven und negativen Proben verglichen.

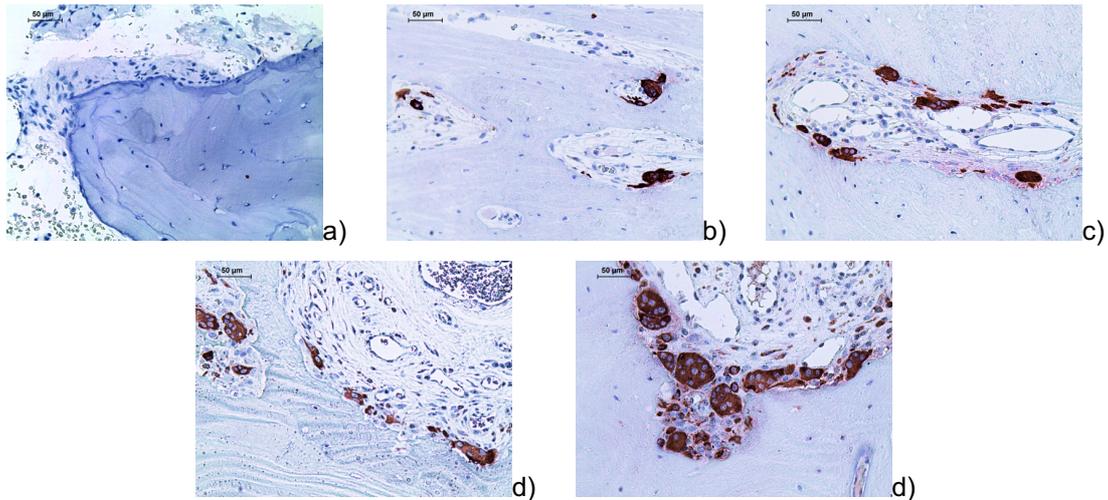


Abbildung 12: Grafische, exemplarische Darstellung von TRAP-Färbungen in 20-facher Vergrößerung zur Erhebung des (modifizierten) Allred-scores (=Farbintensität 0-3 + geschätzte Zellzahl 0-5): a) 0+0=0; b) 3+1=4; c) 3+2=5; e) 3+3=6; f) 3+4=7.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Instituts für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie durchgeführt. Die immunhistochemischen Parameter wurden mit IBM SPSS Statistics 25 ausgewertet, alle anderen mit Hilfe von JMP 12 (SAS Institute). Als Signifikanzniveaus wurden $p < 0,2$ (mäßig signifikant) und $p < 0,05$ (signifikant) gewählt.

Die 14 Gruppen wurden in den drei folgenden Systemen verglichen (Abkürzungen siehe Gruppen):

1. Intra – Gruppenvergleich (medikationsabhängig)

- **BP-Linie** (BP_{exp} , BPO_{mar} , BPO_{seq} , C_{OP} , C_{HB}) – Bisphosphonate
- **Dmab-Linie** ($Dmab_{exp}$, $DmabO_{mar}$, $DmabO_{seq}$, C_{OP} , C_{HB}) – Denosumab
- **M-Linie** (M_{exp} , MO_{mar} , MO_{seq} , C_{OP} , C_{HB}) – Bisphosphonate und Denosumab

2. Inter – Gruppenvergleich (lokalisationsabhängig)

- **Mar-Linie** (BP_{exp} , BPO_{mar} , $Dmab_{exp}$, $DmabO_{mar}$, M_{exp} , MO_{mar} , C_{OP} , C_{HB}) – Sequesterrand
- **Seq-Linie** (BP_{exp} , BPO_{seq} , $Dmab_{exp}$, $DmabO_{seq}$, M_{exp} , MO_{seq} , C_{OP} , C_{HB}) – Sequester

3. NB – Gruppenvergleich (Nebenanalyse)

- **NB-Linie** (BPO_{NB} , $DmabO_{NB}$, MO_{NB}) – Neoknochen

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 210 Proben von 108 Patienten, aufgeteilt in 14 verschiedenen Gruppen (siehe Abbildung 13 und Tabelle 3). Die meisten Patienten waren weiblich (62%), mit einem mittleren Alter von $68,8 \pm 10,2$ Jahren und einer Spanne von 37-90 Jahren, wohingegen der Anteil an männlichen Patienten (38%) ein mittleres Alter von $68,5 \pm 8,7$ Jahren und eine Spanne von 47-87 aufwies (siehe Abbildung 14 und 15).

	Abkürzung	Bezeichnung/Erklärung
1.	BP _{exp}	Bisphosphonat exponierter Knochen
2.	BPO _{mar}	Bisphosphonat-assoziierte Nekrose, Randgebiet
3.	BPO _{seq}	Bisphosphonat-assoziierte Nekrose, Sequester
4.	Dmab _{exp}	Denosumab exponierter Knochen
5.	DmabO _{mar}	Denosumab-assoziierte Nekrose, Randgebiet
6.	DmabO _{seq}	Denosumab-assoziierte Nekrose, Sequester
7.	M _{exp}	Bisphosphonat und Denosumab exponierter Knochen
8.	MO _{mar}	Bisphosphonat und Denosumab-assoziierte Nekrose, Randgebiet
9.	MO _{seq}	Bisphosphonat und Denosumab-assoziierte Nekrose, Sequester
10.	BPO _{NB}	Neo-Knochen nach Bisphosphonat-assoziiierter Nekrose
11.	DmabO _{NB}	Neo-Knochen nach Denosumab-assoziiierter Nekrose
12.	MO _{NB}	Neo-Knochen nach Bisphosphonat und Denosumab-assoziiierter Nekrose
13.	C _{HB}	gesunder Knochen
14.	C _{OP}	osteoporotischer Knochen

Tabelle 3: Abkürzungen und Bezeichnungen/Erklärungen der Gruppen.

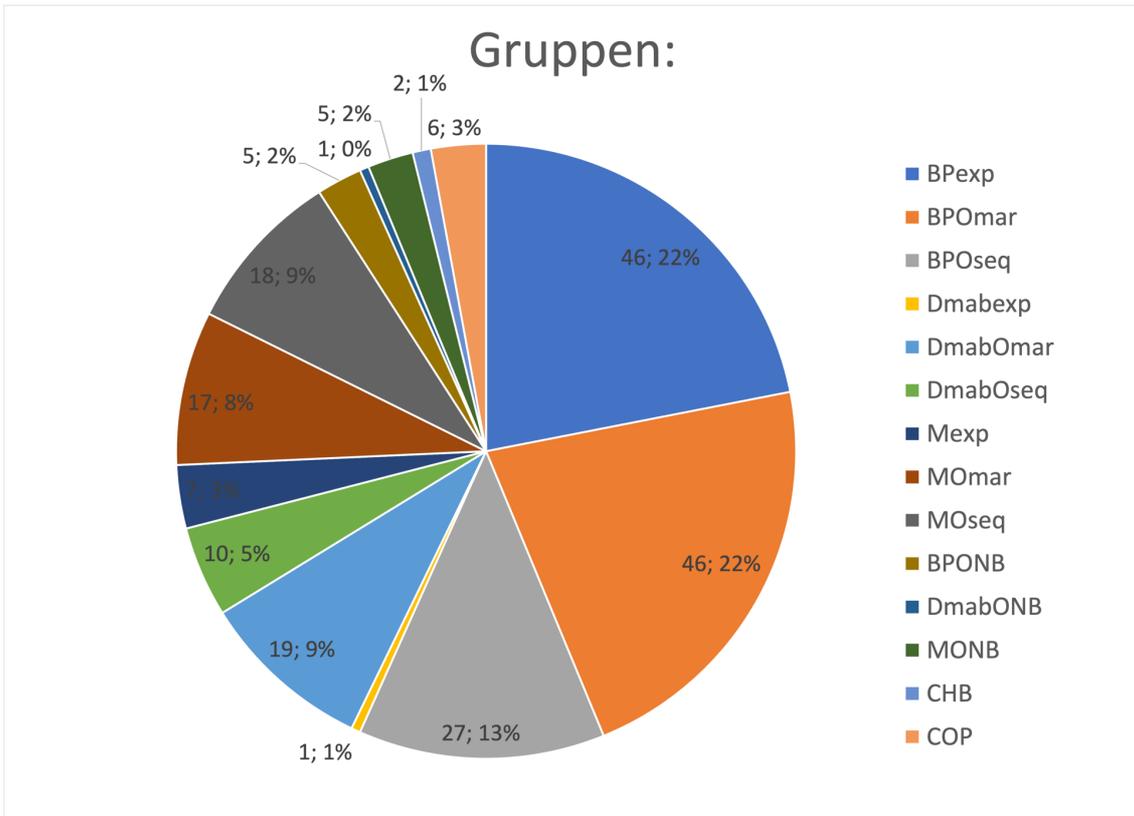


Abbildung 13: Kreisdiagramm der Verteilung der Proben nach den unterschiedlichen Gruppen.

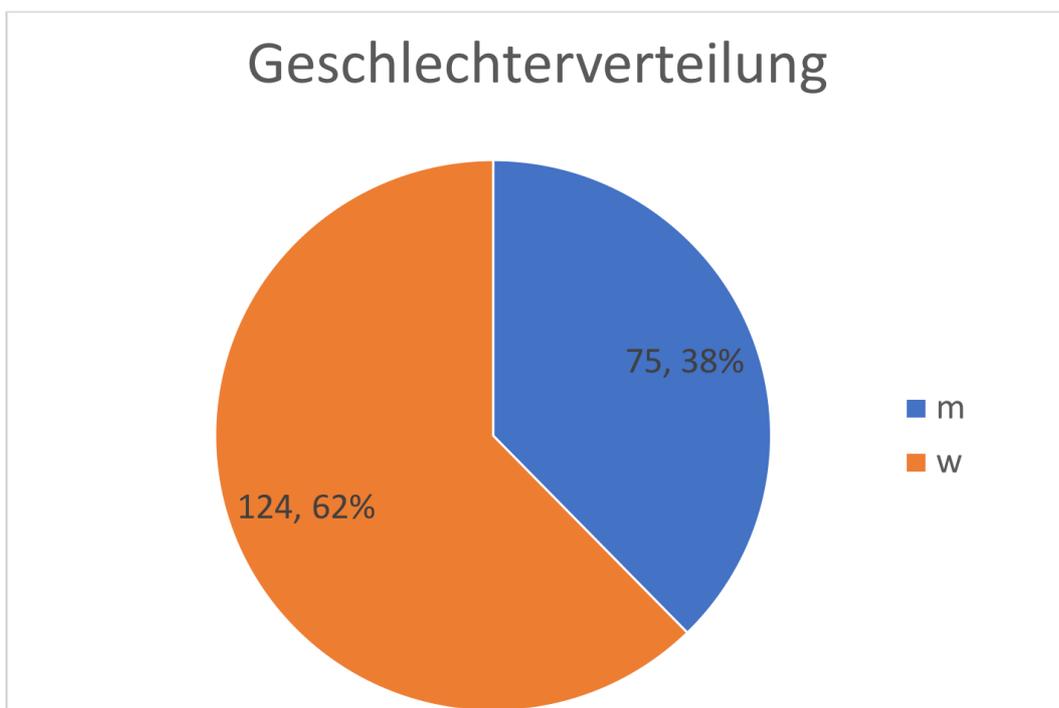


Abbildung 14: Kreisdiagramm der Verteilung der Knochenproben nach Geschlecht, weiblich: 124 (62%), männlich 75 (38%). Ohne NB-Proben (8 x männlich, 3 x weiblich).

Ergebnisse

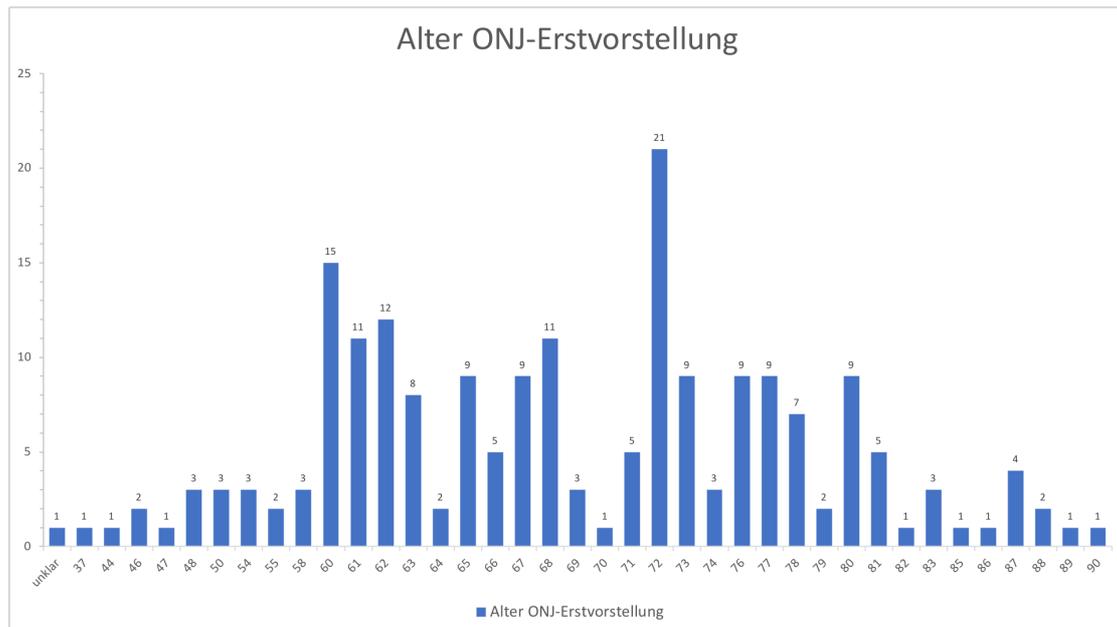


Abbildung 15: Balkendiagramm der Verteilung der Knochenproben in Abhängigkeit des Patientenalters. Ohne NB-Proben.

Die Hauptgründe für die antiresorptive Therapie waren Brustkrebs (16%), metastasierter Brustkrebs (16%), gefolgt von Prostatakrebs (27%) und primäre Osteoporose (15%). Andere Grunderkrankungen waren multiples Myelom, rheumatoide Arthritis, Nierenzellkarzinom etc.) (siehe Abbildung 16).

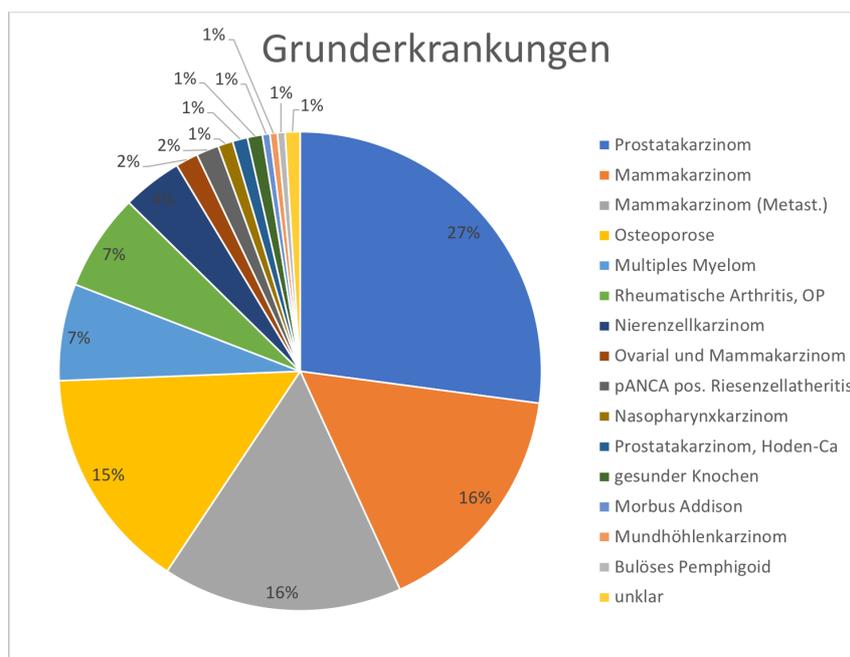


Abbildung 16: Kreisdiagramm der Verteilung der Proben nach der Grunderkrankung. Ohne NB-Proben.

Die antiresorptive Therapie mit Bisphosphonaten (65% der behandelten Patienten) bestand aus Alendronat (17%), Ibandronat (15%), Pamidronat (10%) und Zolendronat (70%). Die antiresorptive Therapie mit Denosumab (15% der behandelten Patienten) bestand hauptsächlich aus monatlichen Dosen von 120 mg (XGeva®, Amgen, München, Germany) (70%) oder halbjährlichen Dosen von 60 mg (Prolia®, Amgen, München, Germany) (13%) (siehe Abbildung 17). Die Mischmedikationen von Bisphosphonaten und Denosumab ergaben sich aus Denosumab, zusammen mit Alendronat (8%), Clodronat (3%), Ibandronat (3%), Pamidronat (15%), Risedronat (23%), Zoledronat (65%) und betrug 20% der behandelten Patienten (siehe Abbildung 18).

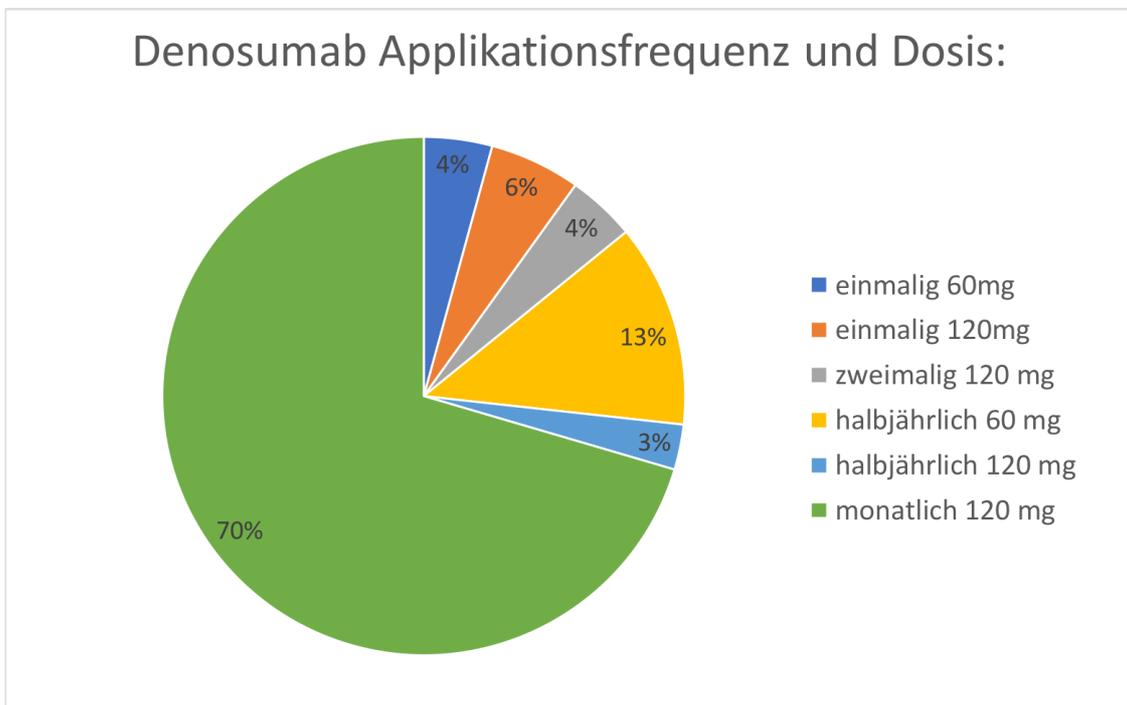


Abbildung 17: Kreisdiagramm der Verteilung der Dmab-Proben der Patienten nach Dosis und Verabreichungsintervallen.

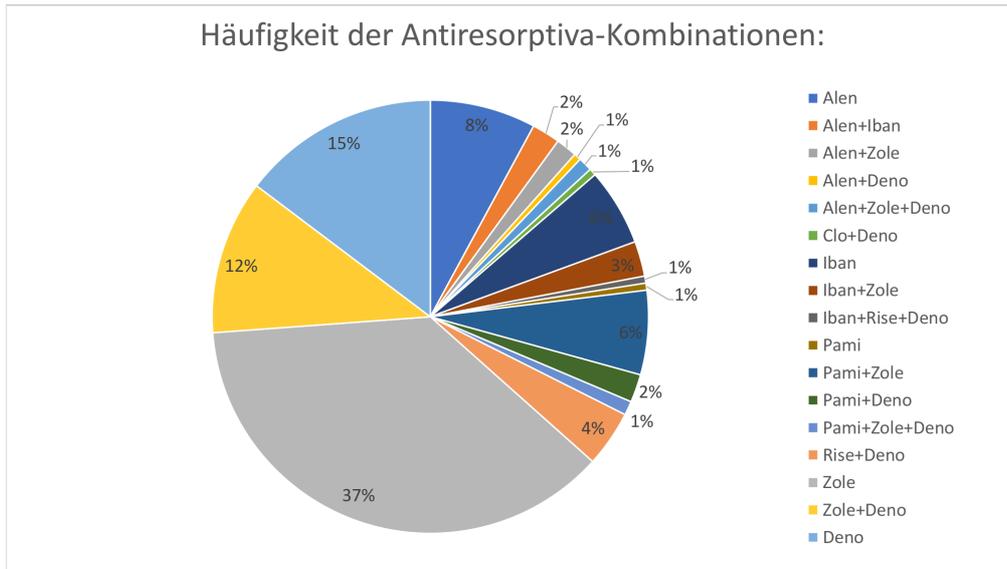


Abbildung 18: Kreisdiagramm der Verteilung der AR-Proben nach AR-Kombinationen. Ohne NB-Proben. Alen (Alendronat), Clo (Clodronat), Deno (Denosumab), Iban (Ibandronat), Pami (Pamidronat), Rise (Risedronat), Zole (Zoledronat).

93% der Patienten erhielten eine zusätzliche Therapie in der Zeit, in der die Osteonekrose auftrat. Diese zusätzlichen Therapien, einschließlich Kombinationen, waren Chemotherapie (53%), anti-hormonelle Therapie (46%), Immunsuppression (9%) und Radiochemotherapie mit Xofigo® (1%) (siehe Abbildung 19).

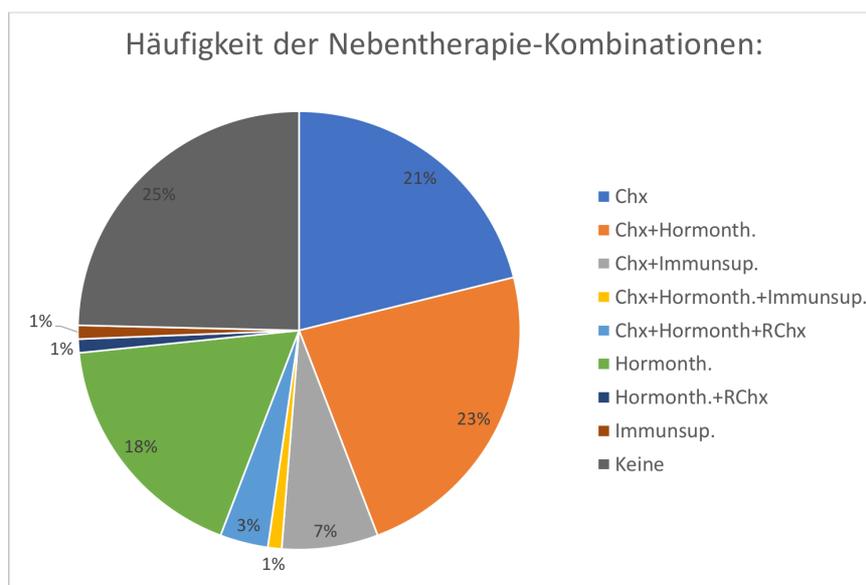


Abbildung 19: Kreisdiagramm der Verteilung der AR-Proben nach zusätzlichen medikamentösen Therapien. Ohne NB-Proben. Chx (Chemotherapie), Hormonth. (Hormontherapie), Immunsup. (Immunsuppression)

Ergebnisse

Zusammengefasst stammten 29% der Sequester-Proben aus der Maxilla (BPO_{seq}: 41%, DmabO_{seq}: 30%, MO_{seq}: 11%) und 71% aus der Mandibula (BPO_{seq}: 59%, DmabO_{seq}: 70%, MO_{seq}: 89%). Die Sequester-Entstehungsregionen im Probenkollektiv waren hauptsächlich Seitenzahnregionen, besonders im Unterkiefer und die Region um die unteren Schneidezähne (siehe Abbildung 20).

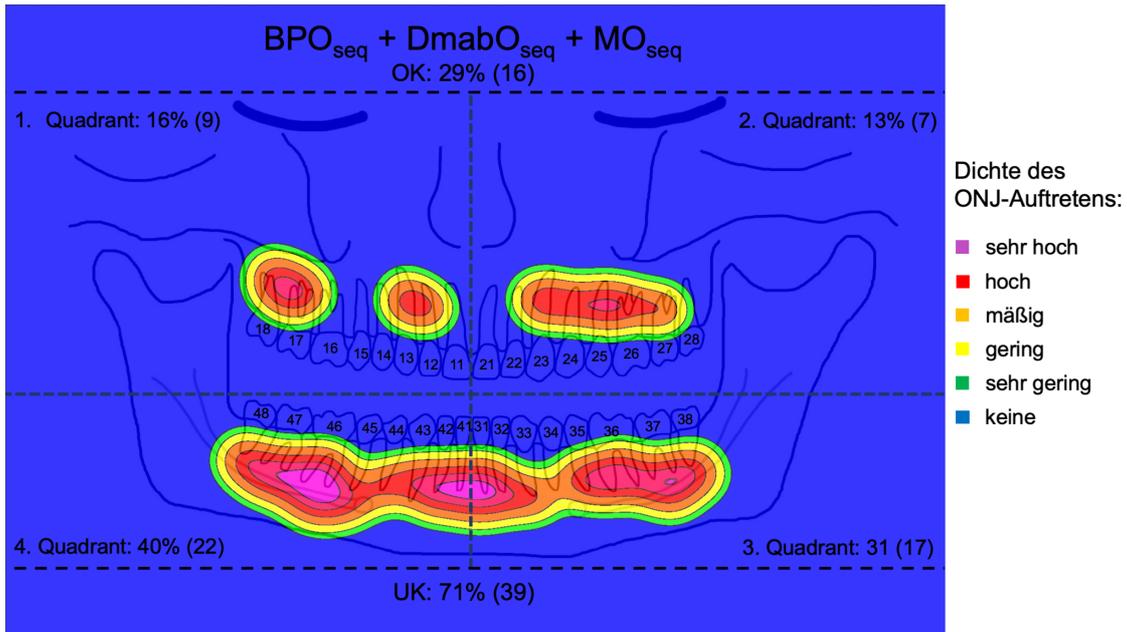


Abbildung 20: Schematisch/grafische Darstellung einer Heatmap der Sequester-Entstehungsregionen.

In den folgenden Abschnitten erfolgt die Box-Plot Darstellung der Ergebnisse entsprechend der in Tabelle 4 dargestellten, üblichen Kennwerte:

Minimum	Kleinsten Datenwert des Datensatzes	Ende eines Whiskers oder entferntester Ausreißer
Unteres Quantil	Die kleinsten 25 % der Datenwerte sind kleiner als dieser oder gleich diesem Kennwert	Beginn der Box
Median	Die kleinsten 50 % der Datenwerte sind kleiner als dieser oder gleich diesem Kennwert	Strich innerhalb der Box
Oberes Quartil	Die kleinsten 75 % der Datenwerte sind kleiner als dieser oder gleich diesem Kennwert	Ende der Box
Maximum	Größter Datenwert des Datensatzes	Ende eines Whiskers oder entferntester Ausreißer
Spannweite	Gesamter Wertebereich des Datensatzes	Länge des gesamten Box-Plots (inklusive Ausreißer)

Ergebnisse

Interquartilsabstand	Wertebereich, in dem sich die mittleren 50 % der Daten befinden. (Liegt zwischen dem 0,25- und dem 0,75-Quartil.)	Ausdehnung der Box
----------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------

Tabelle 4: Kennwerte der in den Ergebnissen dargestellten Box-Plots.

4.2 Micro-CT Analyse

4.2.1 Bone-Volume-Density (*BV/TV*)

In der *BV/TV* konnte mit Hilfe des Tukey-Tests vor allem eine Erhöhung von der C_{OP} - zur M_{exp} -Gruppe festgestellt werden ($p < 0,05$) sowie von der BP_{exp} - zur M_{exp} -Gruppe ($p < 0,05$). Von M_{exp} - zur MO_{seq} -Gruppe nahm die *BV/TV* wieder ab ($p < 0,2$). Außerdem zeigte sich ein höherer Wert der MO_{seq} - im Vergleich zur BPO_{seq} -Gruppe ($p < 0,2$). Siehe Abbildung 21:

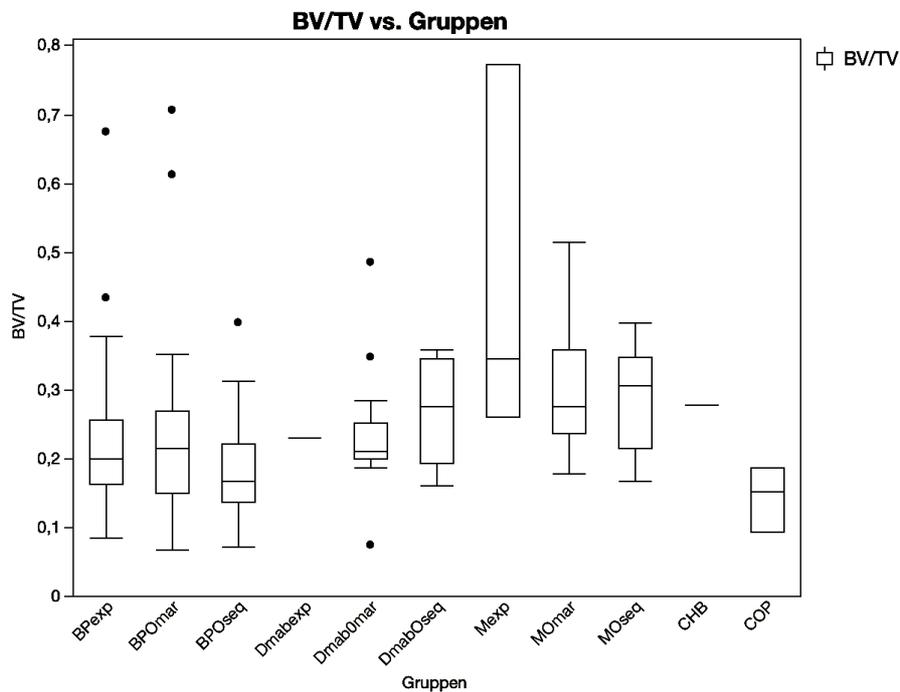


Abbildung 21: Box-Plot der *BV/TV* nach Gruppen.

4.2.2 Bone-Surface-Density (BS/BV)

In der BS/BV zeigte sich im Tukey-Test eine Oberflächenzunahme von der BP_{exp} - zur BPO_{seq} -Gruppe ($p < 0,2$). Im Vergleich von der BPO_{seq} -Gruppe zu den anderen Sequester-Gruppen $DmabO_{seq}$ und MO_{seq} zeigten sich eine geringere Oberfläche ($p < 0,2$). Siehe Abbildung 22:

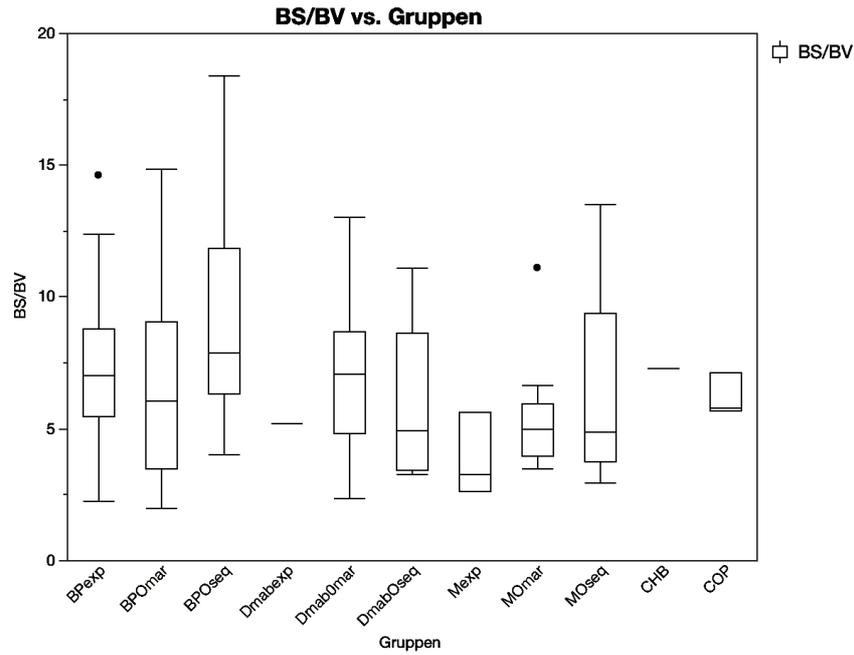


Abbildung 22: Box-Plot der BS/BV nach Gruppen.

4.2.3 Trabekelparameter

Ähnlich wie bei der BS/BV zeigten die Gruppen $DmabO_{seq}$ ($p < 0,2$) und MO_{seq} ($p < 0,05$) in der $Th. Th.$ zur BPO_{seq} -Gruppe eine Erhöhung, ebenfalls analysiert mittels Tukey-Test. Siehe Abbildung 23:

Ergebnisse

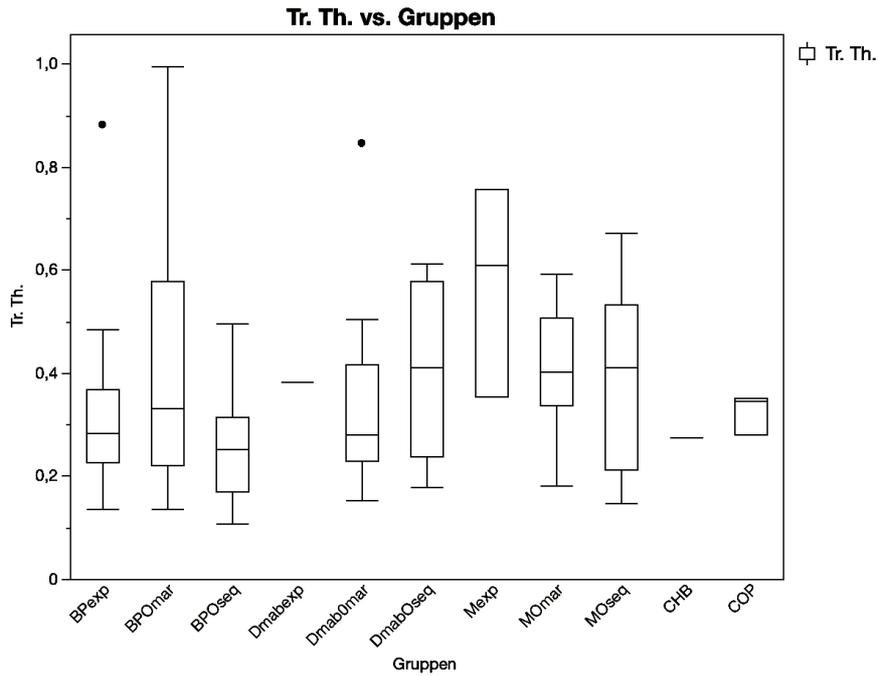


Abbildung 23: Box-Plot der Tr. Th. nach Gruppen.

In den histomorphometrischen Parametern Trabecular number (*Tr. N.*) und Trabecular space (*Tr. Sp.*) konnten zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Siehe Abbildung 24 und 25:

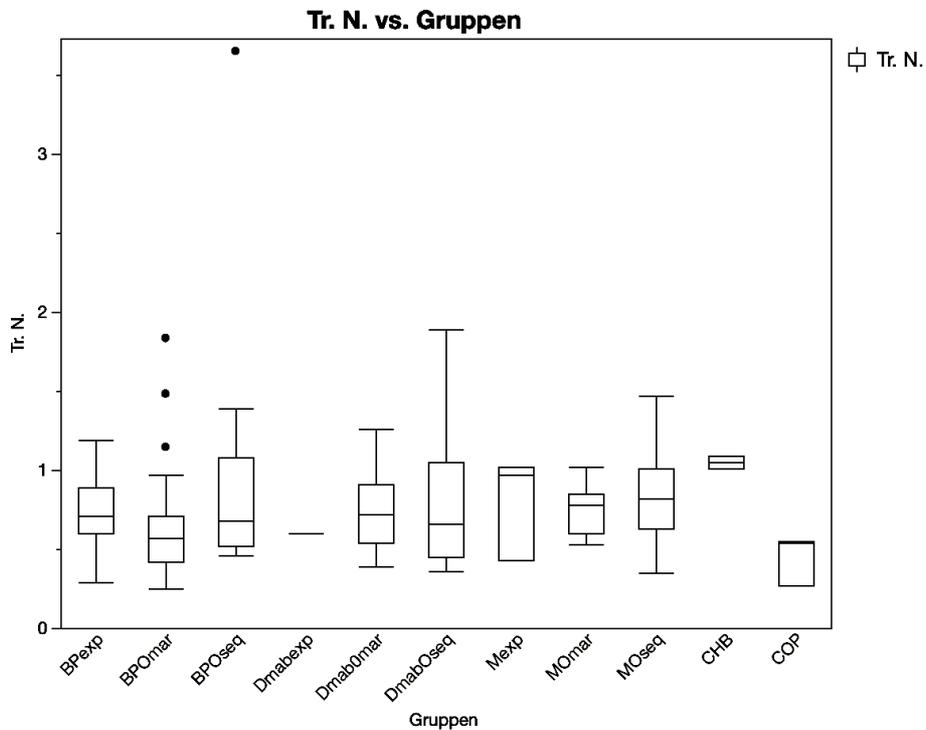


Abbildung 24: Box-Plot der Tr. N. nach Gruppen.

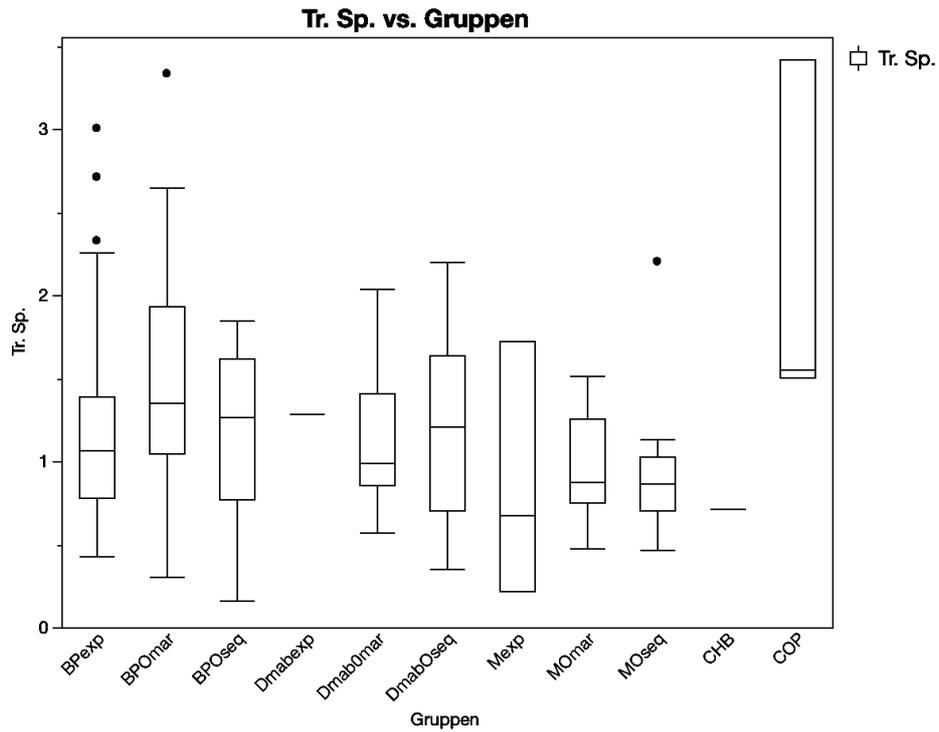


Abbildung 25: Box-Plot der Tr. Sp. nach Gruppen.

4.2.4 Euler-Charakteristik

Die Euler-Charakteristik der BPO_{seq}-Gruppe betrug im Vergleich zur COP-Gruppe ($p < 0,2$) und zur BP_{exp}-Gruppe ($p < 0,05$) ungefähr das Doppelte, dies indizierte einen massiven Konnektivitätsverlust der BPO_{seq}-Gruppe. Zwischen den anderen Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Getestet wurde mittels der Steel-Dwass Methode. Siehe Abbildung 26:

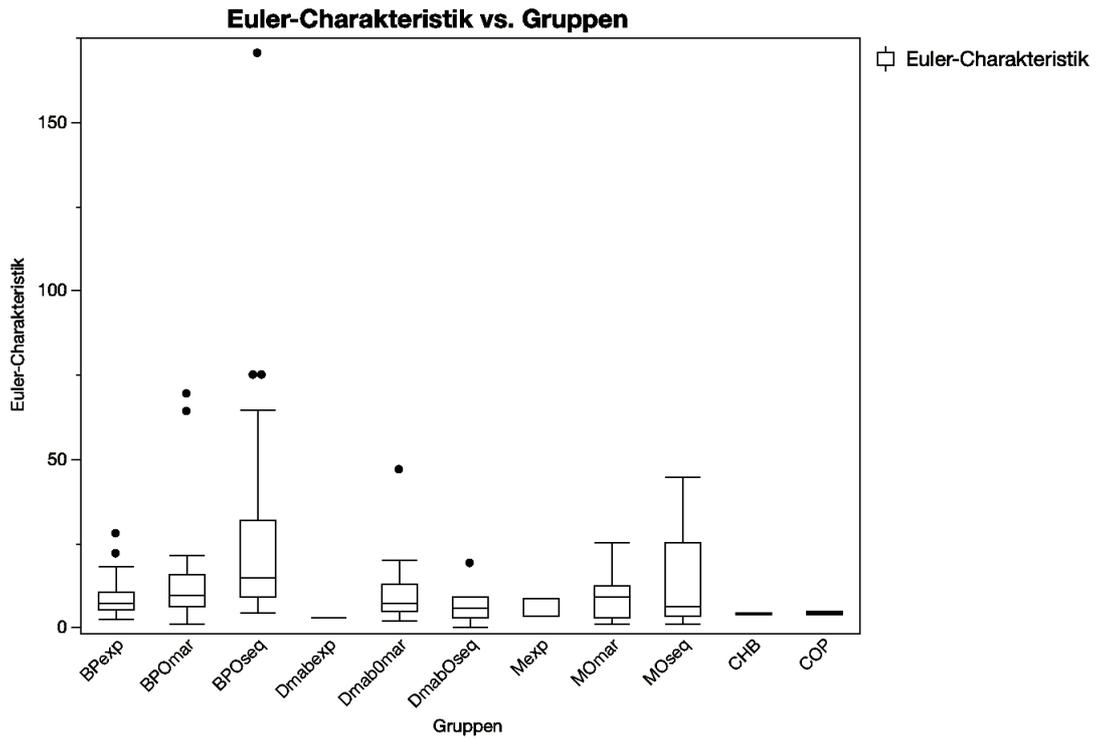


Abbildung 26: Box-Plot der Euler-Charakteristik nach Gruppen.

4.2.5 Relativ bone/tissue mineral density (*BMD/TMD*)

Unterschiede in der BMD zeigten sich mittels Tukey-Tests v.a. im Anstieg der COP-Gruppe im Vergleich zur M_{exp}-Gruppe ($p < 0,2$) sowie im Abfall der M_{exp}- zu MO_{mar}-Gruppe ($p < 0,2$). In der TMD zeigten sich keine Unterschiede. Siehe Abbildung 27 und 28:

Ergebnisse

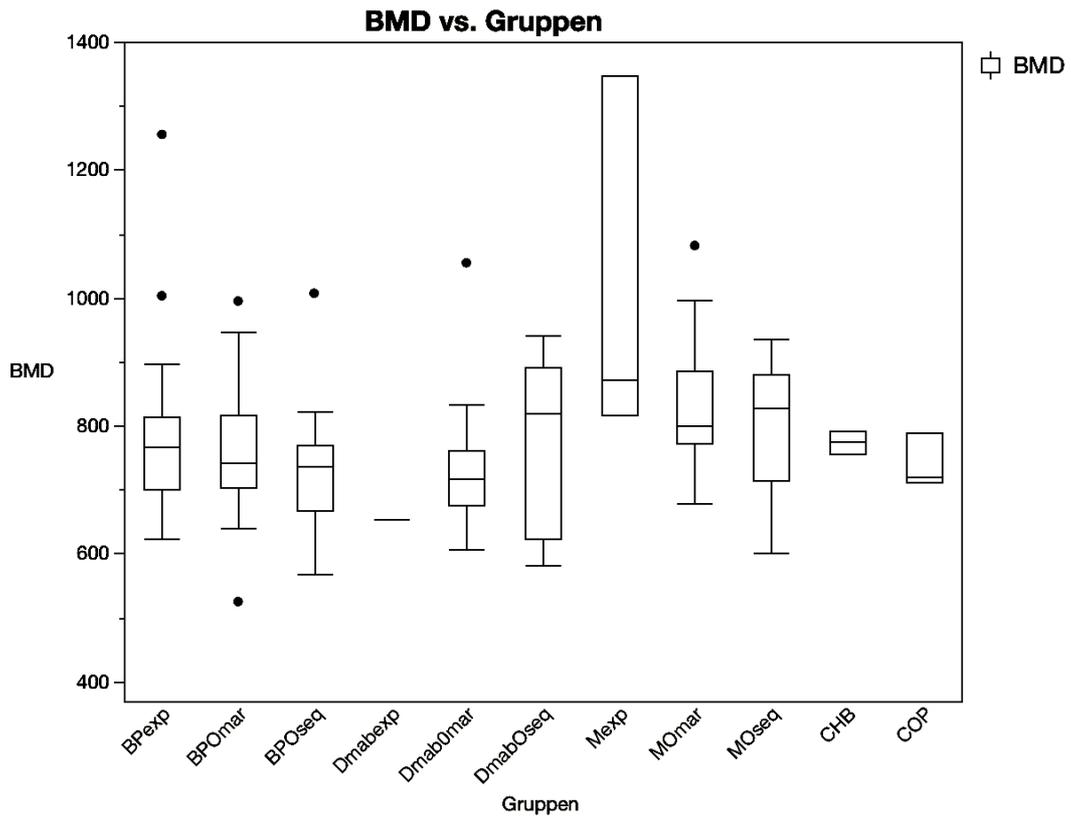


Abbildung 27: Box-Plot der BMD nach Gruppen.

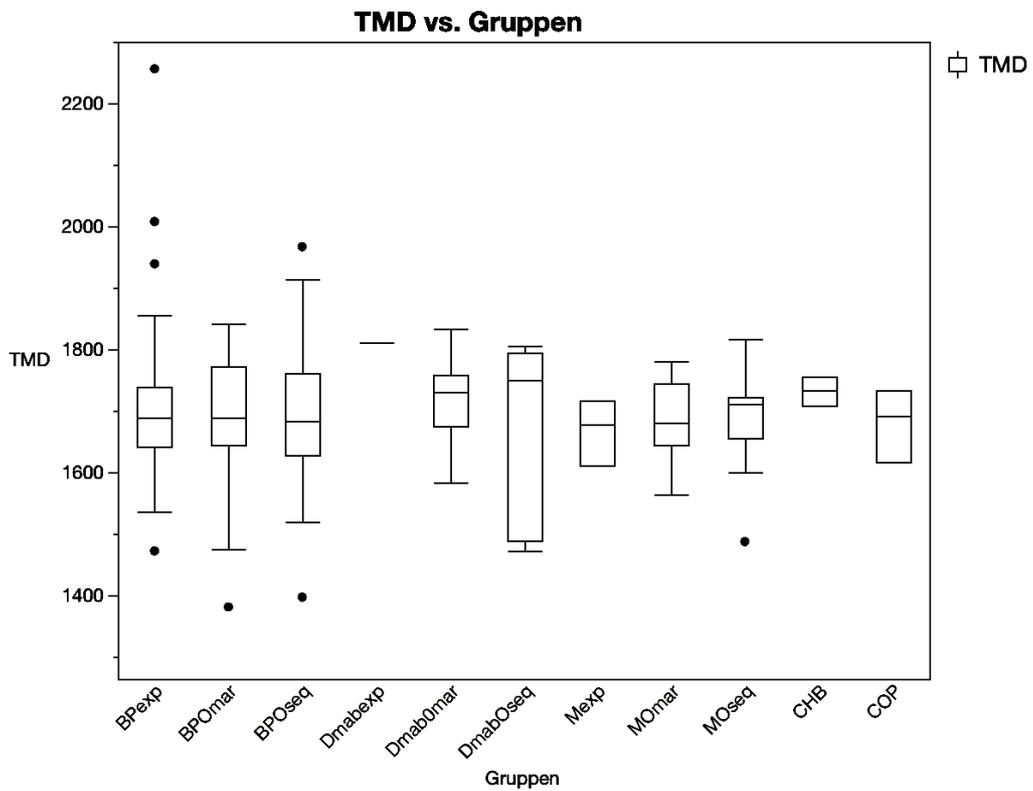


Abbildung 28: Box-Plot der TMD nach Gruppen.

3D-Mikroarchitektur:

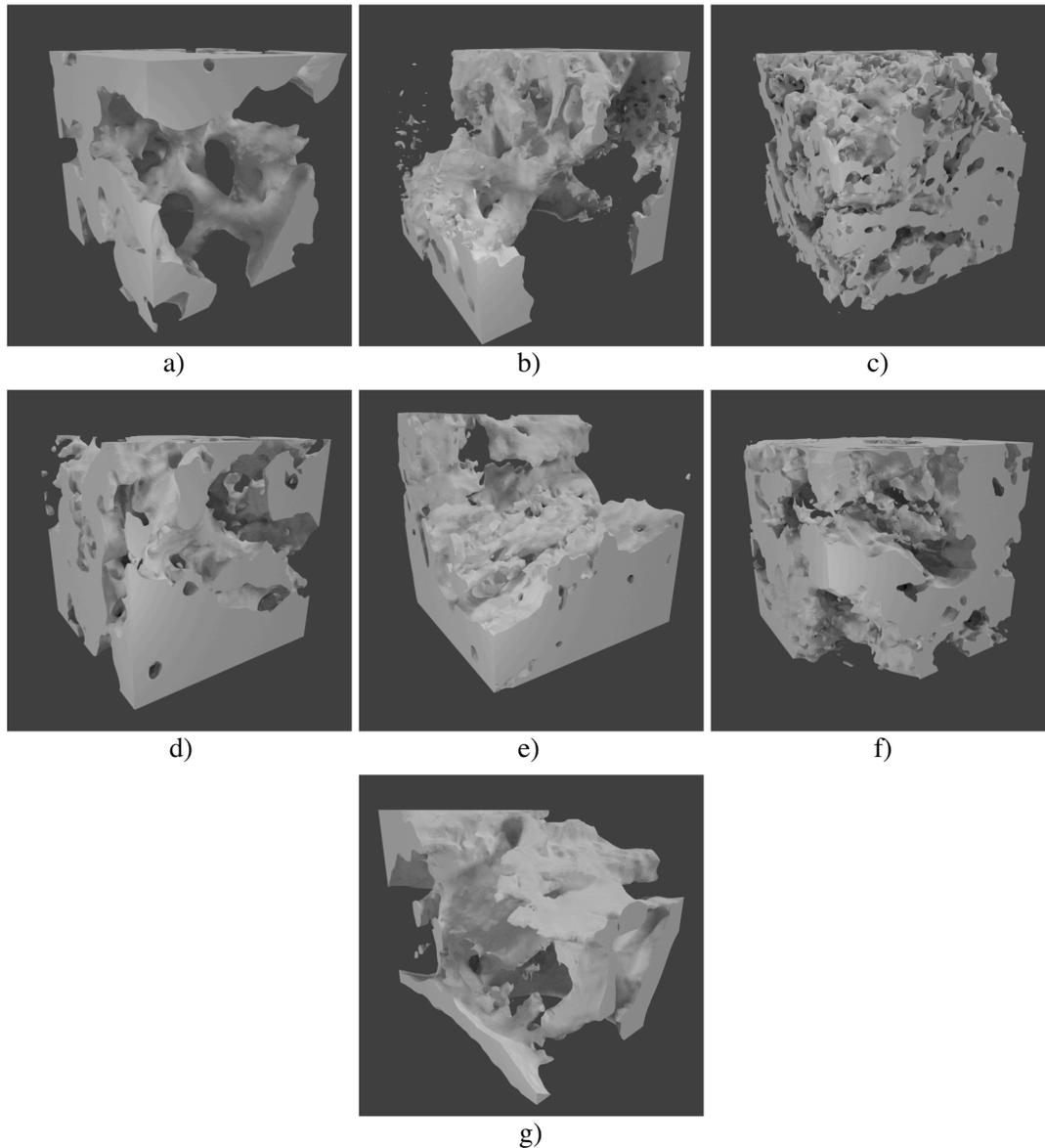


Abbildung 29: Grafische, exemplarische Darstellung von 3D-Bildern würfelförmiger Ausschnitte von Referenzproben der unterschiedlichen Gruppen. Softwaretechnische Visualisierung mit Blender (Blender Foundation, Niederlande); a: BP_{exp} ; b: BPO_{mar} ; c: BPO_{seq} ; d: M_{exp} ; e: MO_{mar} ; f: MO_{seq} ; g: C_{OP} . Die BP-Linie zeigt eine progrediente Zunahme der Trabekeldicke. Die BPO_{mar} - sowie die BPO_{seq} -Gruppe zeigen auffällige Resorptionsprozesse, welche eine dünne, „pseudo-Trabekula“-artige Mikroarchitektur zufolge hat. Kongruent zeigt sich dies in der M-Linie. Die M_{exp} -Gruppe zeigt zudem ein deutlich erhöhtes Knochenvolumen im Vergleich zur C_{OP} -Gruppe. Die dicken Knochenplatten in der C_{OP} -Gruppe repräsentierten die Alveolarwände. Diese Alveolarwände ausgeschlossen zeigt die C_{OP} -Gruppe dünne Trabekel mit weiten intertrabekulären Abständen. (Würfelmaße: 2mm x 2mm x 2mm).

4.3 (Immun-)Histologie

4.3.1 Osteozyten-, Lakunen- und Kittliniendichte

Die Osteozytendichte der C_{OP} -Gruppe und der Expositions-Gruppen BP_{exp} und M_{exp} nahmen zu den Sequestern fast komplett ab ($p < 0,05$). Die Lakunendichte blieb hingegen durchweg konstant. Getestet wurde mittels Kruskal-Wallis Test (Mar-Linie) und der Steel-Dwass Methode (Seq-Linie). Siehe Abbildung 30 und 31:

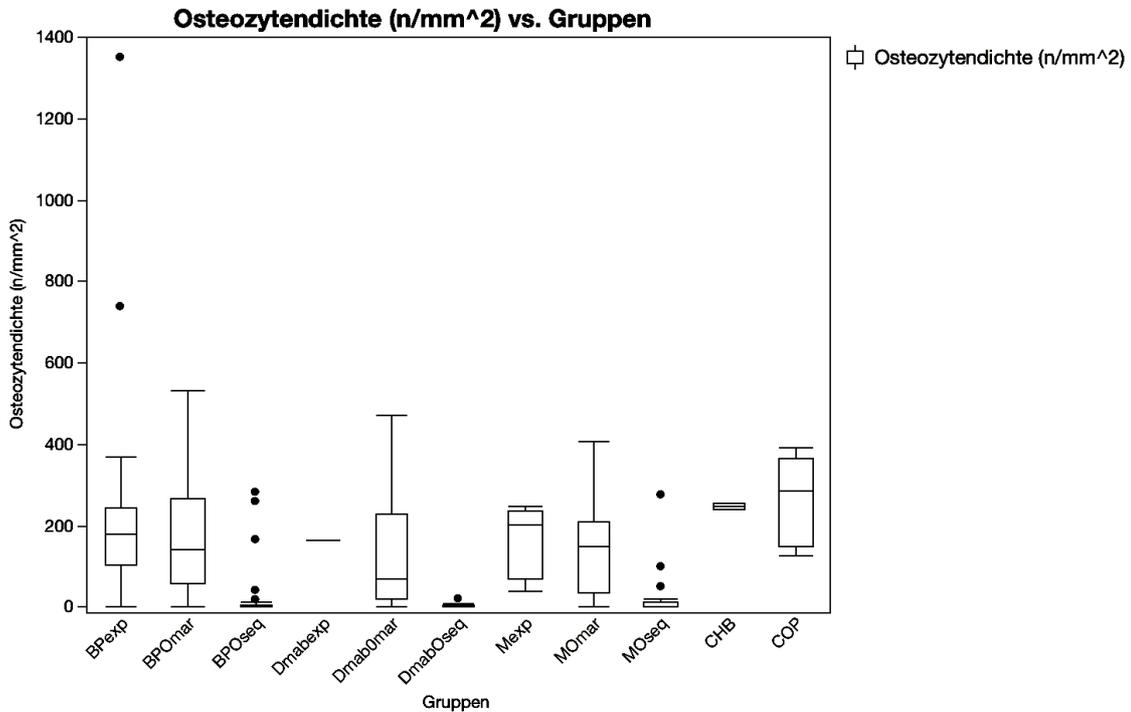


Abbildung 30: Box-Plot der Osteozytendichte nach Gruppen

Ergebnisse

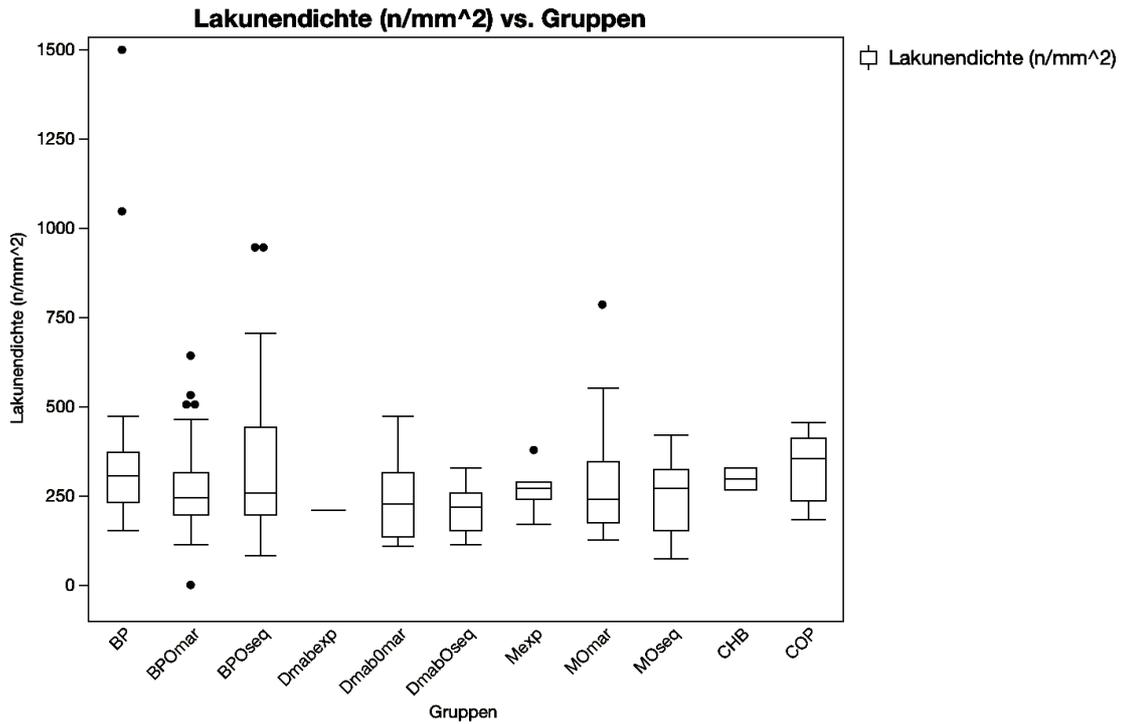


Abbildung 31: Box-Plot der Lakunendichte nach Gruppen.

Die Kittliniendichten der Gruppen blieben ebenfalls konstant und zeigten keine signifikanten Veränderungen. Siehe Abbildung 32:

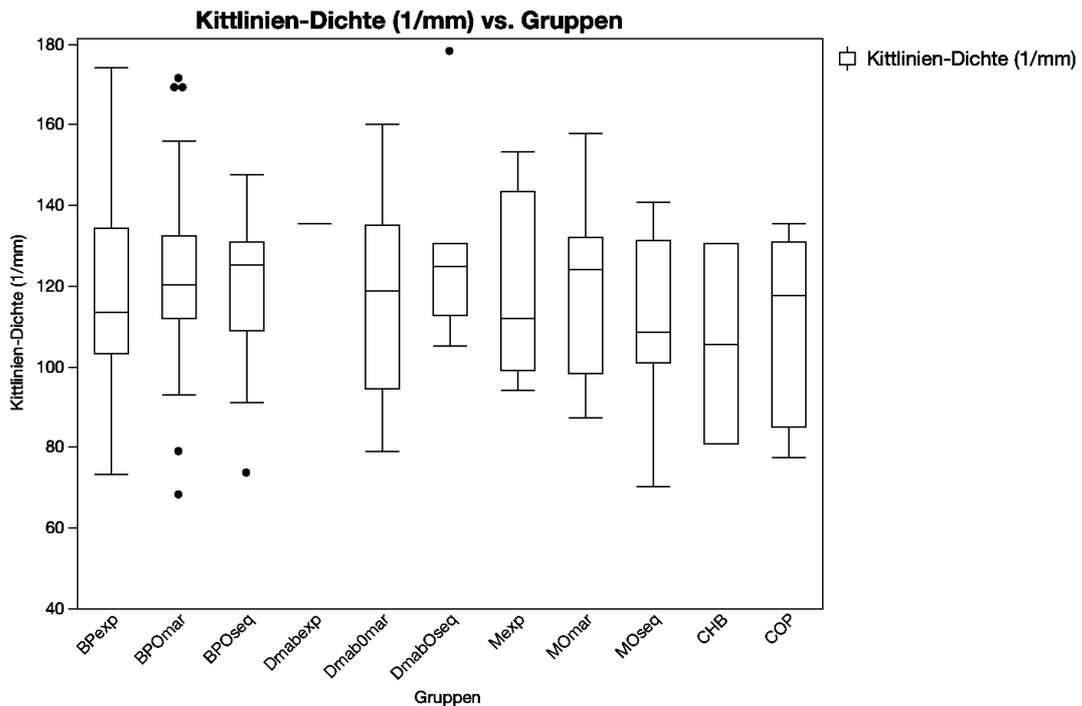


Abbildung 32: Box-Plot der Kittliniendichte nach Gruppen.

4.3.2 RANKL- und OPG-Färbung

In der Immunhistologie zeigten sich in der RANKL-Färbung von der BP_{exp}- über BPO_{mar}- zur BPO_{seq}-Gruppe progressiv steigende Werte ($p < 0,05$). Von DmabO_{mar}- zu DmabO_{seq}-Gruppe sistierte RANKL, während von der MO_{mar}- zur MO_{seq}-Gruppe die Werte wieder stiegen ($p < 0,05$). In der OPG-Färbung zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Gruppen. Getestet wurde mittels Chi-Quadrat Test. Siehe Abbildung 33, 34 und 35:

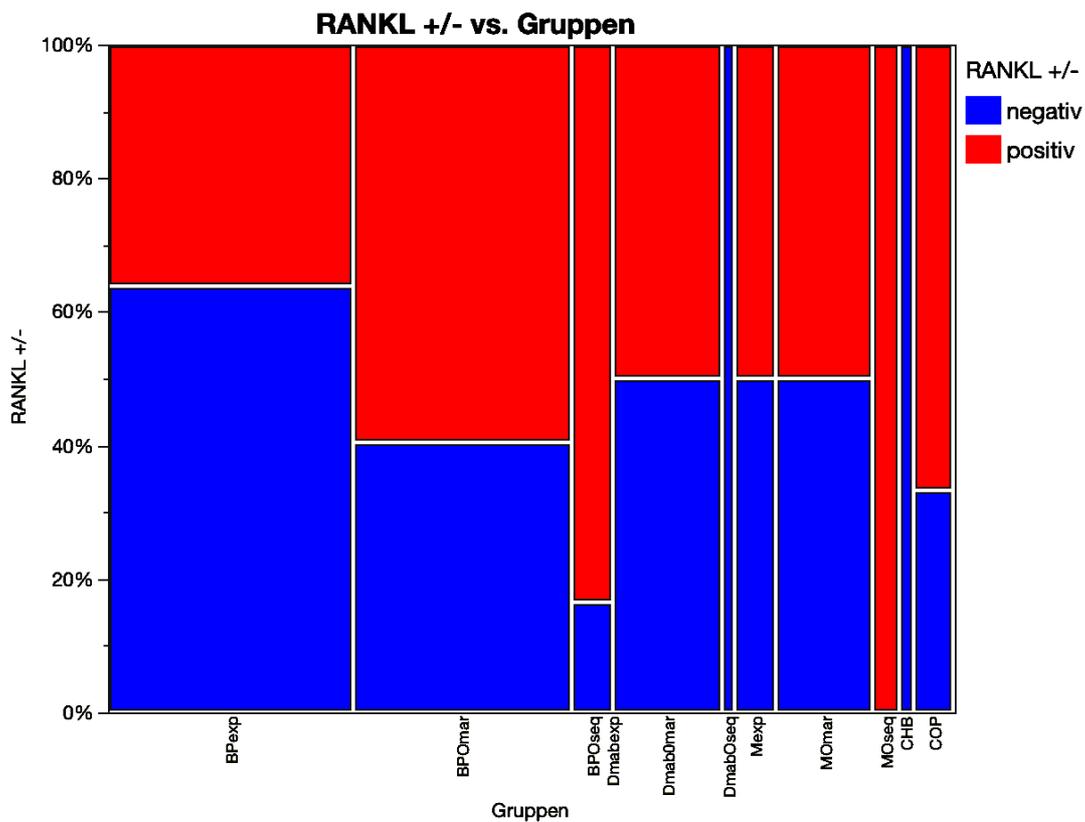
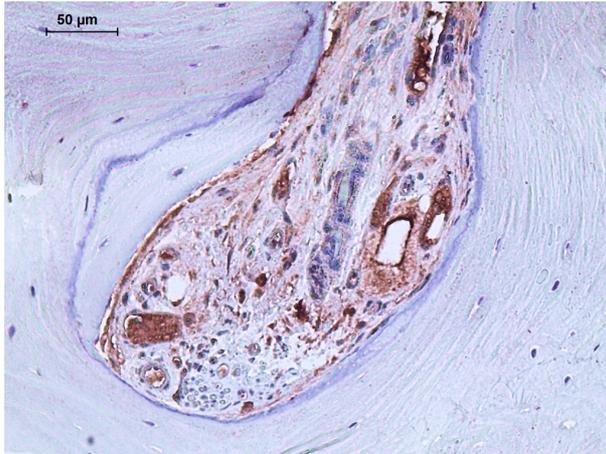
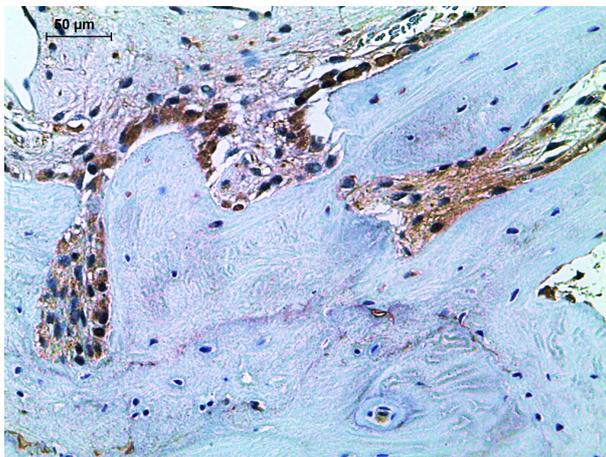


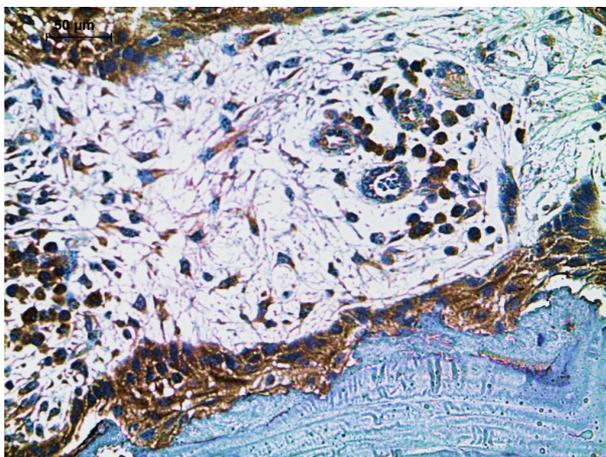
Abbildung 33: Mosaik-Darstellung der RANKL-Immunhistologie nach Gruppen.



a)



b)



c)

Abbildung 34: Exemplarisch, grafische Darstellung in 20-facher Vergrößerung von immunhistologischen RANKL-Färbungen von Referenzproben der BP-Linie. Die ROI's sind die Zellverbände direkt am Knochen. Hier handelt es sich bei den braun gefärbten Zellen um Osteoblasten. Von a) nach c) lässt sich eine deutliche Zunahme der Färbungsintensität und Zahl der gefärbten Zellen erkennen: a) BP_{exp} (Allred-score: 4); b) BPO_{mar} (Allred-score: 6); c) BPO_{seq} (Allred-score: 7).

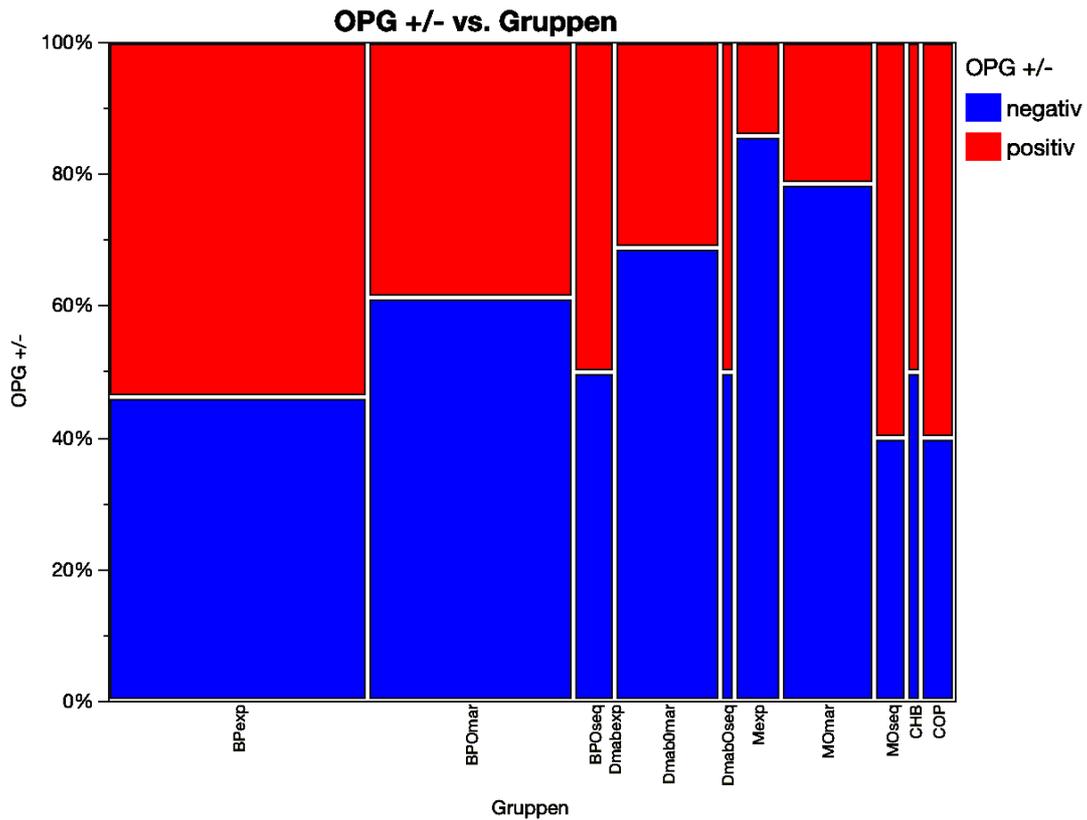


Abbildung 35: Mosaik-Darstellung der OPG-Immunhistologie nach Gruppen.

4.3.3 Osteoklastendichte

Die Osteoklastendichte in der TRAP-Färbung nahm in der BP-Linie von der BP_{exp}- über die BPO_{mar}- zur BPO_{seq}-Gruppe progressiv zu ($p < 0,05$). Analog dazu verhielt sich die M-Linie von M_{exp}- über die MO_{mar}- zur MO_{seq}-Gruppe ($p < 0,05$). Getestet wurde ebenfalls mittels Chi-Quadrat Test. Siehe Abbildung 36 und 37:

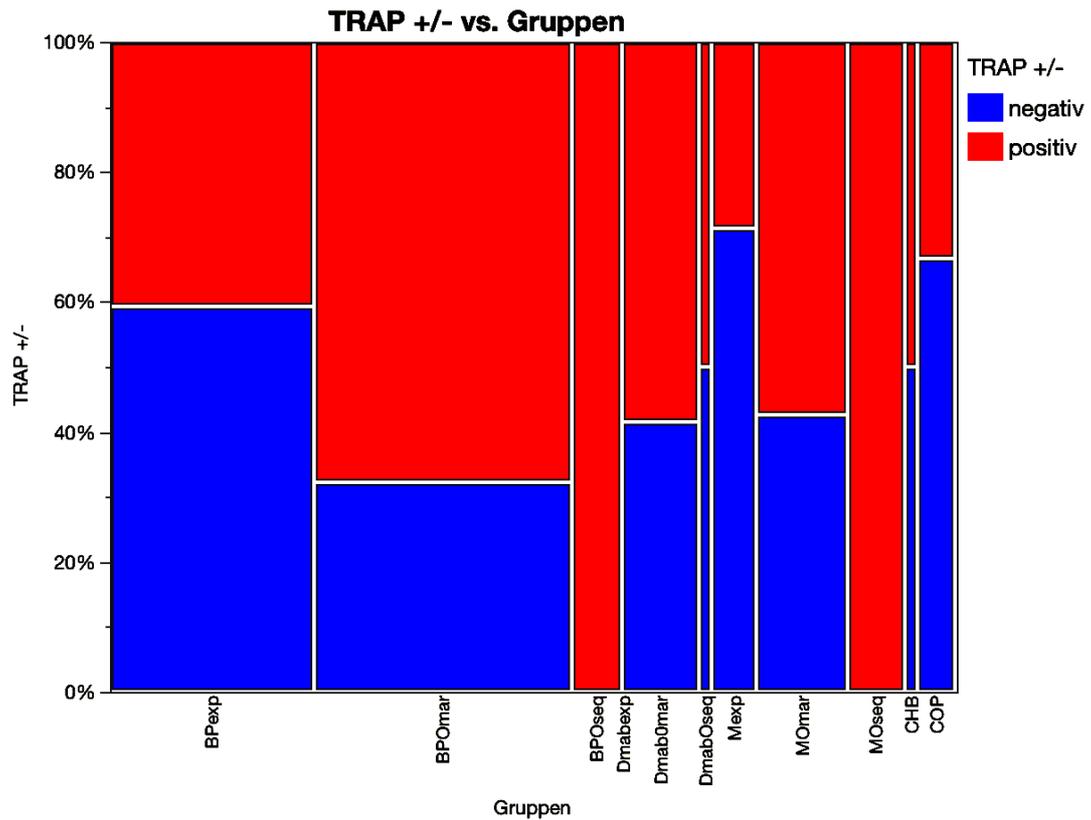


Abbildung 36: Mosaik-Darstellung der TRAP-Immunhistologie nach Gruppen.

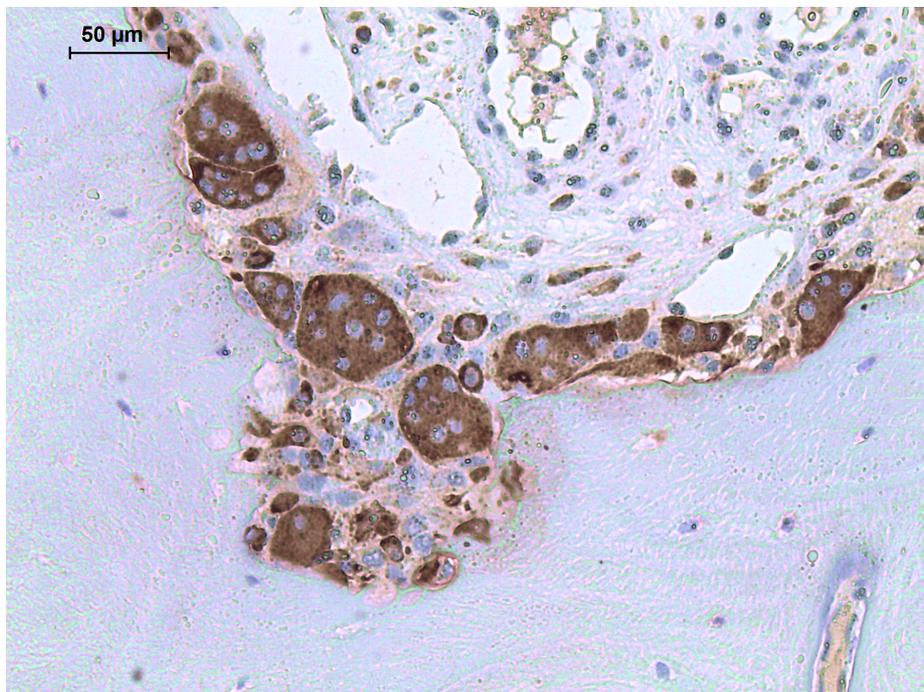


Abbildung 37: Exemplarisch, grafische Darstellung einer immunhistologischen TRAP-Färbung einer Referenzprobe der BPO_{mar}-Gruppe in 20-facher Vergrößerung. Die Osteoklasten (mehrkernige Riesenzellen) zeigen eine ausgeprägte Färbung sowie hohe Dichte.

4.4 Ergebnisse der NB-Linien (Nebenanalyse)

4.4.1 NB-Linien Micro-CT Analyse

Die BV/TV der MO_{NB} -Gruppe zeigten sich im Median im Vergleich zur BPO_{NB} -Gruppe mehr als doppelt so groß ($p < 0,05$). Getestet wurde mittels Tukey-Tests. Siehe Abbildung 38:

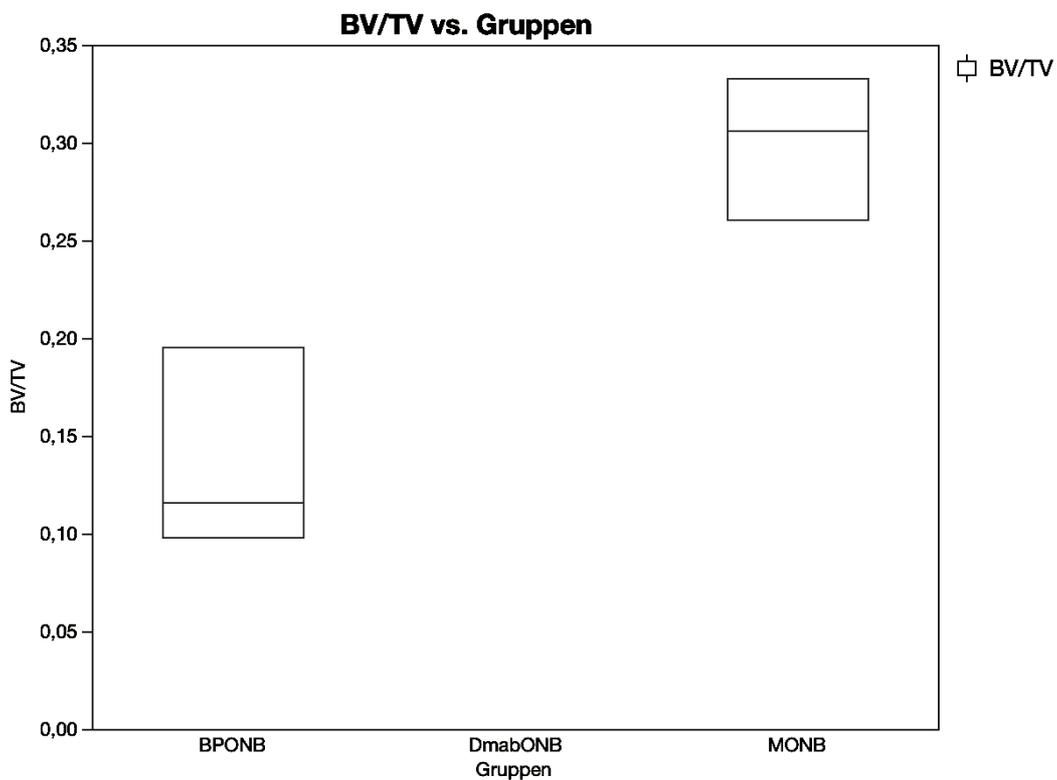


Abbildung 38: Box-Plot der BV/TV nach der BPO_{NB} - und MO_{NB} -Gruppe

Im Folgenden sollen zur Vollständigkeit die Ergebnisse der restlichen μ -CT-Analyse der NB-Linie aufgeführt werden (siehe Abbildung 39). Hierbei kam es zu keinen signifikanten Unterschieden. Getestet wurde mittels Tukey-Tests.

Ergebnisse

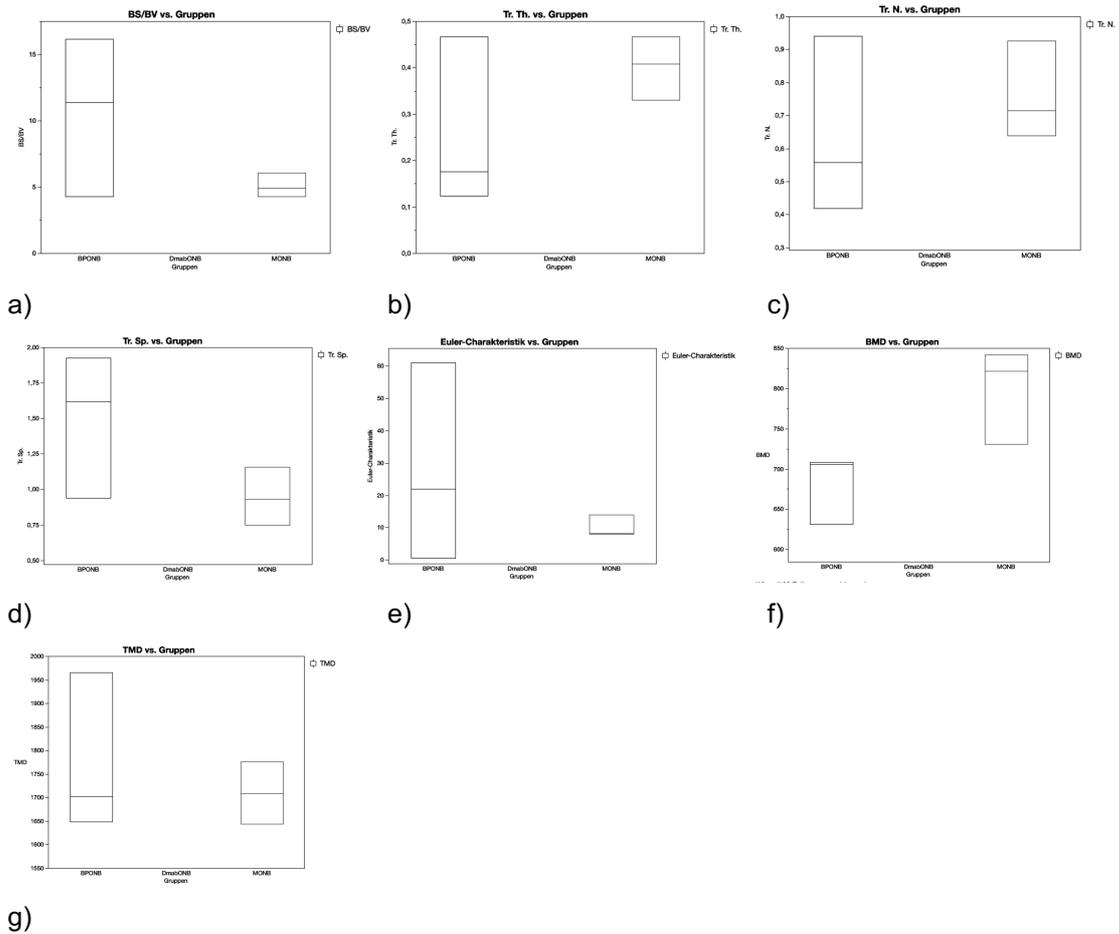
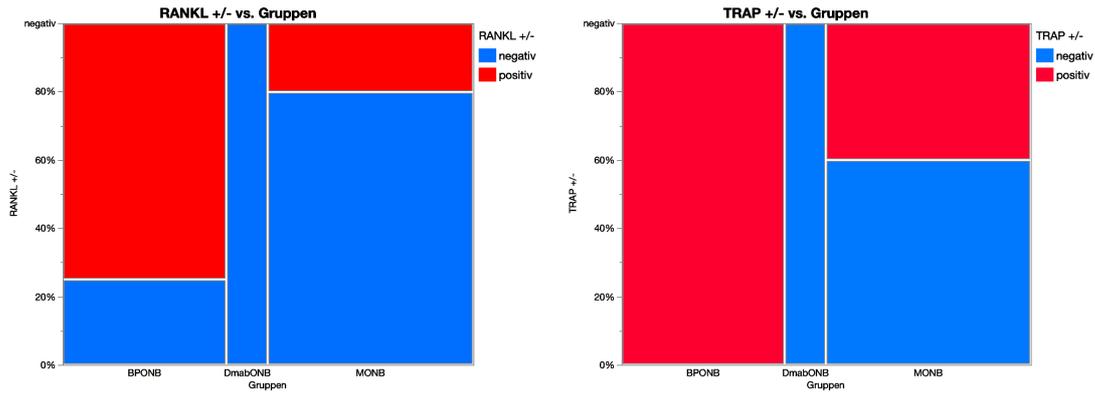


Abbildung 39: Box-Plots der Ergebnisse der NB-Linien Analyse nach den Parametern: a) BS/BV, b) Tr. Th., c) Tr. N., c) Tr. Sp., d) Euler-Charakteristik, e) BMD, f) BMD und g) TMD

4.4.2 NB-Linien (Immun-)Histologie Analyse

In den immunhistologischen Färbungen konnte im Fischer-Test eine signifikante Erhöhung, sowohl von RANKL ($p < 0,2$), als auch TRAP ($p < 0,05$) von der BPO_{NB}-Gruppe im Vergleich zur MO_{NB}-Gruppe nachgewiesen werden. Siehe Abbildung 40:

Ergebnisse

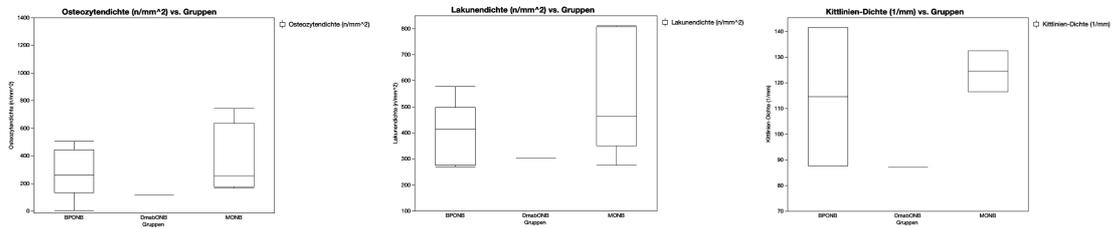


a)

b)

Abbildung 40: Mosaik-Darstellung der Ergebnisse der NB-Linie für die RANKL-(links) und TRAP-(rechts)Färbung.

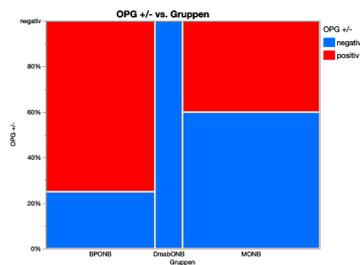
Die restliche (immun-)histologische Analyse der NB-Linie zeigte für die Osteozyten-, Lakunen- und Kittliniendichte im Tukey-Test keine signifikanten Unterschiede. Für die OPG-Färbung zeigten sich im Fischer-Test ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Siehe Abbildung 41 und 42:



a)

b)

c)



d)

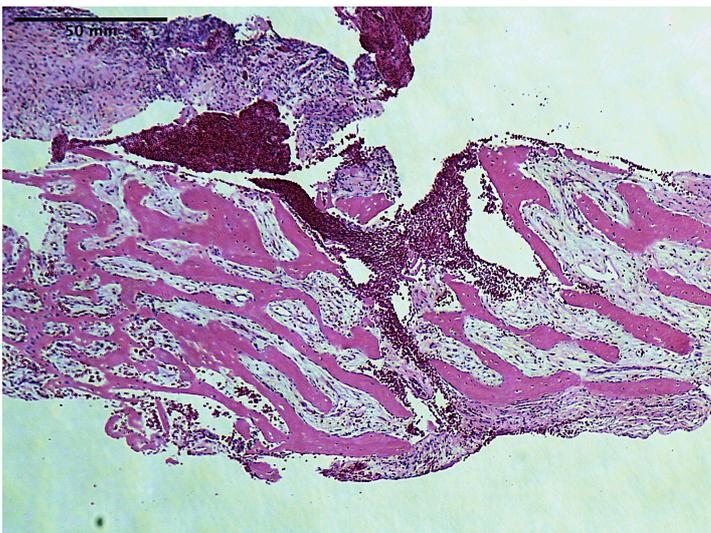
Abbildung 41: Ergebnisse in Form von Box-Plots (a, b, c) und Mosaik-Darstellung (d) der NB-Linien Analyse nach den Parametern a) Osteozytendichte, b) Lakunendichte, c) Kittliniendichte und d) OPG-Färbung.



a)



b)



c)

Abbildung 42: Grafische Darstellung von HE-Färbungen von Referenzproben der NB-Linie in 4-facher Vergrößerung. a) BPO_{NB}-Gruppe, b) Dmab_{NB}-Gruppe, c) MO_{NB}-Gruppe.

5 Diskussion

Nach dem aktuellen Wissen des Autors ist diese Studie die Erste, welche die Mikroarchitektur und (Immun-)Histologie von Kieferknochen antiresorptiv-behandelter Patienten (insbesondere Kombinationen von Denosumab und Bisphosphonaten), in Abhängigkeit des Knochenzustandes (vital und nekrotisch sowie Randgebiet der Nekrose) evaluiert.

Trotz der gängigen Auffassung, dass Antiresorptiva die Knochenmasse erhöhen [97-99], wird in dieser Studie angenommen, dass sie nicht die trabekuläre Mikroarchitektur im Kiefer verbessern. Der Arbeitshypothese folgend führen sie zu einer unorganisierten Knochenbildung und im Fall des Kieferknochens zu einem erhöhten Risiko der Unterversorgung des Knochens, Mikrofrakturen und einem einfacheren Zugang für Pathogene.

Die Auswirkungen der Antiresorptiva auf Osteoblasten und Osteoklasten wurden bereits beschrieben; ihre Rolle während des Auftretens der MRONJ ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Die Effekte von Bisphosphonaten auf Osteozyten wurden hingegen bisher nur vereinzelt beschrieben und kontrovers diskutiert [51-53, 100]; ob Denosumab einen Einfluss auf Osteozyten hat, ist nach aktuellem Wissensstand des Autors nicht bekannt. Eine bereits beschriebene Zytotoxizität der BPs würde das Auftreten einer MRONJ fördern [100]. Auch die lamellare Struktur der Knochenmatrix könnte durch Matrix-Bildungsstörung negativ beeinflusst werden und damit die kanalikuläre Versorgung der Osteozyten kompromittieren. Der Eingriff in die Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten durch die Antiresorptiva könnte im Falle des Kieferknochens das empfindliche regulatorische System der Zellen überfordern und o.g. strukturelle Effekte zur Folge haben.

5.1 Diskussion von Material und Methode

5.1.1 Allgemein

Die herausragende Stärke dieser Studie ist die Vielzahl an untersuchten Knochenproben (210) in Abhängigkeit der Extraktionsregionen. Hiermit konnten nicht nur Unterschiede zwischen der Ausgangssituation zum Antiresorptiva-exponierten Knochen untersucht werden, sondern, mit den Randschnitten, auch der Weg bis hin zur Nekrose selbst. Auch die Möglichkeit, Denosumab für sich alleinstehend zu untersuchen, ist eine seltene und sinnvolle Komponente der Studie. Obgleich zu kritisieren ist, dass von der Dmab_{exp}-Gruppe nur ein Präparat vorhanden ist, so ist aufgrund der Seltenheit „alleinig Denosumab behandelte Patienten“ trotzdem eine ungefähre Einordnung möglich. Es ist zudem zu kritisieren, dass 1% der Patienten eine Radiochemotherapie mit Xofigo® erhalten haben. Da die ermittelten Werte für diese Proben jedoch im Referenzbereich der Gruppen liegen und das Ergebnis nicht beeinflusst haben, wurden sie trotzdem eingeschlossen.

5.1.2 Micro-CT

Mit dem ausgewählten Freeware-Programm war es möglich, in kurzer Zeit sehr viele histomorphometrische Parameter zu sammeln, welche einen guten Überblick über die Knochenarchitektur liefern.

Als wichtigste Limitation bzgl. der Micro-CTs stellte sich die Inkongruenz der Knochenproben dar. Femurköpfe beispielsweise sind in ihrer Morphologie homogen und bieten die Möglichkeit einer leicht standardisierbaren Analyse. Die Größen- und Lokalisationsunterschiede der Kieferknochenproben erlauben dies nicht in diesem Rahmen. Ferner wurde in der Studie ein konventionelles μ -CT statt einer quantitativen Variante verwendet; dies erlaubt nur relative Messungen der BMD und TMD. Für weitere Analysen wären ebenfalls die Parameter SMI (structural model index) und TBPf (trabecular bone pattern factor) [101, 102]

interessant gewesen, für diese Parameter sind allerdings kommerzielle Programme notwendig. Es wird angenommen, dass hierfür weitere Analysen der Mechanik der trabekulären Struktur unter Belastung sinnvoller wäre, denn dies würde zeigen, ob all diese Parameter am Ende einen tatsächlichen Einfluss auf die mechanische Knochenqualität haben. Untersucht werden könnte dies, indem digitale 3D-Modelle von Referenzkieferknochenproben nach einer geeigneten Finite-Elemente-Methode analysiert werden.

5.1.3 Histologie

Bezüglich der Osteozytendichte war es wichtig, nicht nur die Osteozytendichte alleinstehend zu berechnen, denn das Fehlen von Osteozyten definiert einen Sequester. Hierfür war es relevanter, die Lakunendichte heranzuziehen. Diese sollte, unter der Annahme, dass die Lakunen einmal gefüllt waren, eine Aussage über die Osteozytendichte in vivo liefern, bevor die Nekrose auftrat. Damit wurde der Fehler durch die Nekrose umgangen. Jedoch erlaubte dies keinen Rückschluss auf eine Kausalität bzw. Reihenfolge, d.h. warum die Osteozyten in der Nekrose abgestorben sind. Hierfür wäre es beispielsweise wegweisend, wenn man die Antiresorptivkonzentration im Sequester messen könnte.

Schwierigkeiten der Histologie ergaben sich in der Berechnung der Kittliniendichte. Die Kittlinien werden in der Histologie nur 2-dimensional abgebildet, allerdings ist ihre wahre Dichte abhängig von der Position und Schnittführung durch den dreidimensionalen Kanal. Obwohl immer die höchste Dichte gemessen wurde, was den Fehler minimiert, könnten die Messungen durch diese Faktoren trotzdem beeinflusst worden sein. Für die Immunhistologie wurde eine semi-quantitative Auswertung gewählt, aufgrund der Tatsache, dass die bakterielle Flora des Mundes viele Artefakte hervorbrachte. Diese machten eine computergestützte, automatische Analyse nicht möglich. Dem gewählten Score-System könnte es deshalb an Genauigkeit mangeln. Auf der anderen Seite bietet das semi-quantitative Verfahren die Möglichkeit, jedes einzelne Bild zu begutachten und für sich zu evaluieren. Damit können beispielsweise nur Osteoklasten mitgerechnet werden, welche sich auch wirklich unmittelbar in der

Nähe des Knochens befinden. Hierdurch wird wiederum eine höhere Genauigkeit erzielt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 MRONJ Lokalisation

Das Verhältnis des MRONJ-Auftretens zwischen Mandibula und Maxilla im Patientenkollektiv, welches einer Operation und der Teilnahme an der Studie zugestimmt hat, beträgt beinahe 2:1, nahezu unabhängig der antiresorptiven Therapie. Dies entspricht dem Verhältnis, welches andere Autoren beschreiben und ist dahingehend repräsentativ. [80, 103]. Da vor allem Seitenzahngebiete betroffen sind, stimmt auch diese Komponente im Patientenkollektiv mit den üblichen klinischen Hauptlokalisationen überein [104]. Jedoch zeigten die Untersuchungen der Studie, dass auch die Regionen um die unteren Schneidezähne stark betroffen sind. Die Tatsache, dass MRONJ vornehmlich die Mandibula betrifft, wird hauptsächlich durch die lokale Anatomie begründet, nämlich durch den Umstand, dass die Maxilla eine multiple Blutversorgung erhält, wohingegen die Mandibula ein Endarterien-System (letzte Wiese) besitzt. Dies könnte spezifisch das MRONJ Auftreten im Frontzahnbereich erklären. Es wäre jedoch auch möglich, dass die Kräfte, welche während des Kauens auftreten, eine maßgebliche Rolle spielen. Die höchsten Kräfte während des Kauens treten im Kauzentrum auf, gefolgt von den Inzisiven während des Abbeißen [105]. Diese Druck- und Stress-Hotspots könnten die MRONJ in diesen Regionen auslösen.

5.2.2 Micro-CT Analyse

Die Qualität eines Knochens ist nicht nur definiert durch die Quantität der Knochenmasse und den Grad der Mineralisation; sie entspricht vielmehr einem

komplexen Zusammenspiel von vielen Qualitätsparametern. Erstmals wurde dies vom National Institute for Health (NIH) im Jahr 2001 erklärt [106] und ein Jahr später nach der makroskopischen und biomechanischen Auffassung von Turner bestätigt. Er beschreibt, dass sich die „bone fragility“ (Fragilität) nicht nur aus einer verminderten Knochenstärke ergibt, sondern aus dem Zusammenspiel von „strength“ (Belastungsfähigkeit), „brittleness“ (Sprödigkeit) und „work to failure“ (Verschleiß) [107].

5.2.3 Bone-Volume-Density (BV/TV)

Bezüglich der Knochenmenge zeigte in der BV/TV-Analyse vor allem die M_{exp} -Gruppe Zeichen eines gesteigerten Knochenvolumens. Vergleicht man d) C_{OP} -Gruppe und g) M_{exp} -Gruppe in Abbildung 29, ist das gesteigerte Knochenvolumen der M_{exp} -Gruppe gut erkennbar. In einer Studie von Vilarinho et al. mit Bisphosphonat-behandelten Ratten zeigen sich vergleichbare Ergebnisse in der BV/TV [108]. Die Tatsache, dass Sequester-Gruppen im Vergleich zu ihren Expositions-Gruppen keine erhöhte BV/TV zeigen, lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass durch Bakterien während entzündlichen Prozessen Knochen resorbieren und deshalb die BV/TV wieder reduzieren. Knochenresorption durch Bakterien wurden bereits durch viele Studien bestätigt [109-111].

Da andere quantitative Parameter, wie BMD und TMD, keine Unterschiede aufwiesen wird bezugnehmend auf die Aussagen des NIH angenommen, dass die Mikroarchitektur eine entscheidende Rolle spielen könnte.

5.2.4 Bone-Surface-Density (BS/BV) und Trabekel-Parameter

Im Hinblick auf die Porosität, repräsentiert durch BS/BV, hat Turner beschrieben, dass selbst geringfügige Erhöhung der Porosität zu einem überproportionalen Verlust der Knochenstabilität führt [107]. Eine Erhöhung der Porosität konnte, wenn auch mit geringer Signifikanz, in der BP-Linie, im Vergleich von der BP_{exp} -Gruppe mit der BPO_{seq} -Gruppe, festgestellt werden. Bedeutend wird dies später

im Hinblick auf die Euler-Charakteristik. Unabhängig der Porosität ist die Stabilität der individuellen Trabekel für sich allein ebenfalls wichtig. Der Einfluss der Tr. Th. in die mechanische Stabilität des Trabekels, wird durch den „physikalischen Knick“ (genauer das Euler'sche Theorem, siehe Euler-Charakteristik) repräsentiert. Hierbei ist das Flächenträgheitsmoment proportional zur Kraft, welche für den Knick benötigt wird [112]. Obwohl keine signifikanten Unterschiede in der Tr. Th. innerhalb der Linien (Sequester im Vergleich zu exponierten Gruppen) gefunden werden konnten, zeigt Abbildung 29, dass die Trabekel der exponierten Gruppen, über die Randgruppen, zu den Sequestern und im Vergleich zu der C_{OP}-Gruppe dicker werden. Besonders in der BP-Linie ist dies gut zu beobachten. Ein Grund, warum dies in den Messwerten nicht repräsentiert wird, könnten Resorptionsprozesse in den Rand- und Sequester-Gruppen sein. Diese bilden kleine, dünne „Pseudo- Trabekel“ (siehe Abbildung 29 b) und c)), welche die eigentlichen, dicken Trabekel in der Messung maskieren könnten.

5.2.5 Euler-Charakteristik

Die Trabekel-Konnektivität, repräsentiert durch die Euler-Charakteristik, spielt eine Schlüsselrolle für die Gesamtstabilität des Knochens. Je mehr Trabekel sich gemeinsam gegen ihre Belastung ausrichten, desto besser kann der Knochen Stabilität gewährleisten. Eine verringerte Konnektivität erhöht die Länge der nicht unterstützten Trabekelstrecke. Dieser Effekt verdoppelt sich bei Beachtung der Tatsache, dass pro Konnektivitätsverlust immer zwei Trabekel betroffen sind [113]. Um dies weiter auszuführen: Das Euler'sche Theorem beschreibt, dass die Stabilität einer Säule antiproportional zum Quadrat ihrer effektiven Länge ist [112, 113] (siehe Abbildung 43). Dies bedeutet in einem praktischen Beispiel, dass bei einer Verlängerung der effektiven Länge, die Kraft, die die Säule standhalten kann, nur noch ein Viertel beträgt.

$$\text{Euler-Knick: } F = \frac{\pi^2 EI}{L^2}$$

Abbildung 43: Grafische Darstellung des Euler'schen Theorems/Euler-Knicks. Demzufolge wird bei doppelter (effektiver) Länge nur $\frac{1}{4}$ der Kraft zum Knick benötigt. F = Knick-Kraft, L = effektive Länge, E = Elastizitätsmodul, I = axiales Flächenträgheitsmoment.

Wie Guo und Kim zeigten, hat dieser Konnektivitätsverlust einen viel größeren Einfluss auf die Knochenstabilität als ein gleicher Verlust an Knochenmasse durch Ausdünnung der Trabekel [113, 114]. In der Studie zeigte die BPO_{seq}-Gruppe eine etwa doppelt so hohe Euler-Charakteristik im Vergleich zur BP_{exp}-Gruppe, was einen massiven Konnektivitätsverlust der BPO_{seq}-Gruppe anzeigt. Dieser Konnektivitätsverlust könnte als Mikrofrakturen interpretiert werden. Sollte dies zutreffen, fördern diese Mikrofrakturen, wie beschrieben, das Fortschreiten und die Vermehrung weiterer Mikrofrakturen. Dieser Mikroschaden führt fortan zu einem Stabilitätsverlust des Knochens. Auch andere Autoren berichten über einen Anstieg von Mikrofrakturen und verringerten mechanischen Eigenschaften des Knochens [115-117]. Diese werden meistens auf eine Unterdrückung des physiologischen Knochenremodelings zurückgeführt [116, 117].

5.2.6 Mineralisation

Betrachtet man den Grad der Mineralisation der Knochenmatrix und seine Auswirkung auf die Stabilität des Knochens, muss beachtet werden, dass die Stabilität der Knochenmatrixsubstanz von einer Balance aus Elastizität, Steifigkeit und Sprödigkeit abhängt. Je höher der Mineralisationsgrad, desto steifer, jedoch auch spröder, wird der Knochen [113]. Diesbezüglich soll das Augenmerk auf die TMD gelegt werden, denn hiermit wird ausschließlich der Mineralisationsgrad des Knochengewebes gemessen. Da alle Gruppen nahezu gleiche TMD-Werte besitzen, konnte nicht nachgewiesen werden, dass der Grad der Mineralisation der Knochenmatrix durch antiresorptive Therapie beeinflusst wird. Andere Autoren wie Metzler et al. kamen zu anderen Ergebnissen. Sie

konnten einen signifikanten Unterschied der BMD von BRONJ-Patienten, in vergleichbaren Extraktionsregionen, mit Hilfe von digitaler Volumentomographie herausarbeiten [118]. Ebenfalls zeigte Fluoridierung allgemein einen massiven Einfluss auf den Grad der Mineralisation von Knochen, wie Untersuchungen von Riggs et al. belegen [119].

5.2.7 Osteozyten- und Lakunendichte

In einer Studie aus dem Jahr 2012 konnten Açil et al. direkte zytotoxische Effekte von Bisphosphonaten auf Osteoblasten in vitro nachweisen [53], zudem eine stark verminderte Kollagenproduktion von Fibroblasten. Allgemein ist bekannt, dass das Vorhandensein von Osteozyten für eine gesunde und widerstandsfähige Knochenmatrix notwendig ist [120]. Es wird ebenfalls davon ausgegangen, dass Osteozyten Einfluss auf den Grad der Mineralisation und die Reparatur von Mikrofrakturen haben [121]. In der Studie konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den Expositions-Gruppen und der COP- bzw. CHB-Gruppe festgestellt werden. Olivera et al. sind beim Vergleich der Osteozyten-Dichte in menschlichem Kieferknochen von BP-behandelten Patienten mit Osteoporose-Patienten zu ähnlichen Resultaten gekommen [122]. Auch wenn die Sequester-Gruppen eine signifikante Verringerung der Osteozytendichte, bis hin zur Nichtnachweisbarkeit aufwiesen, so ist dies im Grunde nur ein Beweis des Sequesters selbst. Aus diesem Grund ist die Lakunendichte bedeutsam. Sie gibt, unter der Annahme, dass die Lakunen mit Osteozyten gefüllt waren, die Osteozyten-Dichte an, bevor eine Nekrose auftrat. Hierbei waren keine Unterschiede zu detektieren. Jedoch lässt dies nun immer noch nicht auf eine Kausalität schließen, da nicht geklärt werden kann, aus welchem Grund die Osteozyten im Sequester-Gebiet untergegangen sind. Dem könnten lokal höhere BP-Konzentrationen, Entzündungsprozesse oder andere Effekte zugrunde liegen. Dieser Umstand wäre erklärbar, wenn man die lokalen BP-Konzentrationen messen könnte. Wenn hierbei Konzentrationen erreicht werden würden, wie sie von Açil et al. verwendet wurden [100], so könnte auch eine Kausalität in vivo hergestellt und direkte zytotoxische Effekte nachgewiesen

werden. Da Bisphosphonate über Jahre hinweg im Knochen verbleiben, könnten diese Konzentrationen auch in vivo erreicht werden.

Eine Wirkung von Denosumab auf Osteocyten ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht beschrieben worden.

5.2.8 Kittliniendichte

Kim et al. haben in einer Studie herausgefunden, dass sich in BRONJ-Knochen multiple, dicke und irreguläre „reversal lines“ zwischen unreifen Geflechtknochen bilden. Zudem war der Knochen mäßig mineralisiert. Sie nehmen an, dass diese reversal lines die physiologischen Mikrokanalikuli zwischen den Osteozyten und Haver'schen Kanälen unterbrechen, dadurch Kommunikation und Nährstofftransport hemmen und folgend zur Nekrose führen [123]. Mit der Kittliniendichte sollte in unserer Studie herausgefunden werden, ob sich die Matrixstruktur des Knochens bezüglich der Kittliniendichte unter antiresorptiver Therapie verändert, da dies vor allem eine veränderte Osteoblastenaktivität anzeigen würde. Die hohe Standardabweichung in allen Gruppen weist darauf hin, dass selbst innerhalb der Gruppen große Unterschiede herrschen. Unterschiede zwischen den Gruppen konnten jedoch nicht gefunden werden. In unserer Studie hat dies darauf hingedeutet, dass eine antiresorptive Therapie wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Dichte der Kittlinien hat.

5.2.9 RANKL- und OPG-Färbung

Kostenuik et al. beschreibt das Verhältnis von RANKL und OPG als mögliche optimale Determinante für Knochenresorption. Des Weiteren beschreiben sie, dass eine RANKL-Hemmung keinen Effekt auf Osteoblasten hat [124].

Die RANKL-Ergebnisse in dieser Studie hingen stark davon ab, ob die antiresorptive Therapie mittels Bisphosphonaten oder Denosumab durchgeführt wurde. Während die RANKL-Expression in der BP-Linie zum Sequester stark gestiegen ist, ist sie in der Dmab-Linie zum Sequester bis auf die Nichtnachweisbarkeit gefallen. Als Analogon von OPG, würde man dieses

Ergebnis auch von Denosumab erwarten. OPG schien unabhängig von der antiresorptiven Therapie nicht beeinflusst gewesen zu sein.

Konsensuell zu Kostenuik et. al. haben Bagan et al. versucht, RANKL und OPG als Serummarker klinisch für MRONJ-Stadien zu implementieren; dies misslang jedoch durch schlechtes Ansprechen und nicht ausreichende Korrelation der Marker in Anwendung auf die MRONJ-Stadien [125].

5.2.10 TRAP-Färbung (Osteoklastendichte)

Die RANKL-Ergebnisse scheinen mit den TRAP-Ergebnissen zu korrelieren. Die TRAP-Färbung wurde in der Studie dazu genutzt, um Aussagen über die Dichte der Osteoklasten zu treffen. Die BP-Linie sowie die M-Linie zeigten, dass eine Erhöhung der RANKL-Expression mit einer Erhöhung der TRAP-Expression einhergeht und folglich mit einer erhöhten Osteoklastendichte. Obwohl diese Studie keinen Zusammenhang zwischen einer Denosumab-Therapie mit einer verminderten Osteoklastendichte herstellen konnte, so hat eine andere Studie bereits gezeigt, dass erhöhte OPG Serumspiegel zu einer verminderten Osteoklastendichte führen [126]. In Bezug auf BP-Therapien zeigte eine Studie von Gross et al., dass eine BP-Therapie die Anzahl an TRAP/DC-STAMP-positiven Osteoklasten erhöht. Dieser Anstieg, vor allem im Sequesterrand und den Sequestern, konnte in der Studie ebenfalls detektiert werden. Sie fanden ebenfalls heraus, dass der Durchmesser und die Anzahl der Nuclei in den Osteoklasten zunehmen; auch dies ist während der Analyse der Bilder in dieser Studie aufgefallen. Jedoch kann man ebenfalls davon ausgehen, dass diese Effekte sowohl von Bisphosphonaten als auch durch Entzündungsprozesse des Knochens selbst hervorgerufen werden können [127]. In einer Studie von Wehrhan et al. wird dieses Problem ebenfalls beschrieben. Sie ermitteln für die Osteoklastendichte, im Vergleich zu den Resultaten dieser Studie, vergleichbare Ergebnisse in BRONJ-Knochen. Zudem forderten sie eine Osteoklastendichtemessung in AR-exponiertem Kieferknochen ohne MRONJ [128]. Hiermit wird in dieser Studie mit den Gruppen der Exponierten nachgekommen. Es kann daher berichtet werden, dass keine signifikanten

Unterschiede der Osteoklastendichte zwischen den exponierten-Gruppen und der C_{OP}/C_{HB} -Gruppe festgestellt werden konnten, jedoch von der BP_{exp} -Gruppe zur BPO_{seq} -Gruppe. Es bleibt abschließend unklar, ob die Osteoklasten trotz erhöhter gemessener Dichte im Sequester tatsächlich aktiv ihre Funktion im Kiefer erfüllen, denn die Hauptfunktion von Bisphosphonaten ist die Hemmung der Osteoklastenfunktion. Eine Möglichkeit dies zu untersuchen wäre es, die ruffled border der Osteoklasten beispielsweise elektronenmikroskopisch genauer zu betrachten. Durch Bisphosphonate wird die ruffled border teilweise oder komplett aufgelöst und dadurch können Osteoklasten nicht mehr am Knochen andocken und resorbieren. Wie bereits beschrieben dient die ruffled border als aktive Resorptionsseite der Osteoklasten und ist Voraussetzung dafür, dass Osteoklasten Knochen resorbieren können [30]. Würden die Osteoklasten nun also zwar vermehrt, jedoch aber ohne Ausbildung einer ruffled border akkumulieren, wäre dies ein Zeichen für eine Akkumulation funktionsloser Osteoklasten. Eine generelle Akkumulation von möglichen funktionslosen Osteoklasten unter BP-Therapie wurde bereits beschrieben [129].

5.3 Diskussion der NB-Proben

5.3.1 Allgemeine Diskussion der NB-Linie

Aufgrund der geringen Probenanzahl und der anders zu wertenden Knochenqualität im Vergleich zu allen anderen Gruppen wurden die Ergebnisse der NB-Linie im Rahmen einer Nebenanalyse gesondert betrachtet. Die $D_{mabO_{NB}}$ -Probe konnte aufgrund ihrer geringen Größe nicht in die μ -CT Analyse miteinbezogen werden.

Nach Baron et. al muss man bei gescheitertem Knochenaufbau zwischen einer gestörten BMU (basic multicellular unit) und einer fehlendem BMU differenzieren. Sind die BMUs gestört oder fehlen gar komplett, kann im Verhältnis zur

Resorption nicht ausreichend Knochenmatrix nachproduziert werden [130]. Um überhaupt eine Grundlage für den Knochenaufbau zu schaffen, ist nach Delaissé et al. ein bestimmter Schwellwert der Zelldichte zu überschreiten. Danach richtet sich, ob der Knochen weiter resorbiert, erodiert, aber nicht resorbiert oder neu aufgebaut wird [131]. In einer Studie konnten sie zeigen, dass die Knochenneubildung unter Bisphosphonattherapie gehemmt wird. Dabei konnte in Alendronat-exponiertem Knochen im Vergleich zu osteoporotischem Knochen eine vermehrt erodierte Knochenoberfläche bei gleichzeitig lokal verringerter Zelldichte beobachtet werden. Dies führte zu einer verringerten Knochenformations-Aktivierungsfrequenz. Sie kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass Bisphosphonate zwar die Knochenresorption inhibieren, jedoch paradoxerweise nicht die erodierte Oberfläche des Knochens verringern und sich damit negativ auf die Knochenqualität auswirken können [132].

Es ist damit davon auszugehen, dass nach den o. g. Untersuchungen von Delaissé et. al. im Fall der NB-Linie ausreichende äußere Bedingungen vorlagen, wie bspw. ein Mindestmaß der Zelldichte, welche eine Neubildung des Knochens überhaupt erst möglich gemacht hat. Die Neubildung von Knochen ist nicht selbstverständlich. Eine Studie von Adachi et. al. zeigt deutlich, dass nach Zahnextraktion unter Bisphosphonattherapie der Knochenaufbau langsamer stattfindet [133].

5.3.2 Diskussion der mikro-CT Analyse und (Immun-)histologie der NB-Linie

Deskriptiv zeigten die Proben der NB-Linie tendenziell eine feine, schwammartige Trabekelstruktur. Dies ließ sich in zwei Proben der BPO_{NB} -Gruppe beobachten. Diese Gruppe zeigte jedoch auch eine hohe Standardabweichung. In der NB-Linie zeigte sich kongruent zur Mar-Linie eine Erhöhung der BV/TV der MO_{NB} -Gruppe im Vergleich zur BPO_{NB} -Gruppe. Auch hier könnte ein kumulativer Effekt der Antiresorptiva und ihren unterschiedlichen Wirkmechanismen zum Tragen kommen. Vergleichbare morphometrische

Untersuchungen von neu gebildetem Kieferknochen nach MRONJ gibt es nach aktueller Literaturrecherche nicht.

Die beobachtete Erhöhung sowohl von RANK, als auch TRAP in den immunhistologischen Färbungen der BPO_{NB}-Gruppe im Vergleich zur MO_{NB}-Gruppe und die negativen Werte für die DmabO_{NB} weisen darauf hin, dass es abhängig der Antiresorptiva deutliche Unterschiede in Bezug auf Osteoblasten und Osteoklasten gibt. Auch wenn es nur eine DmabO_{NB}-Probe gibt, soll sie als Referenz dienen. Nach Delaissé et. al. werden die Osteoklasten durch die umgebenden Osteoblasten gesteuert, diese wiederum passen ihre Aktivität ihrer Zelldichte an. Bei einer geringen Zelldichte wird u.a. vermehrt RANKL produziert, was zu einem Anstieg der Osteoblasten und damit zu einem verstärkten Knochenabbau führt. Bei einer hohen Osteoblastendichte wird weniger RANKL, dafür aber mehr OPG produziert. Dies führt zu einer geringeren Osteoklastenaktivität mit vermehrtem Knochenaufbau [131]. Daher könnten aus den Ergebnissen der NB-Linien interpretiert werden, dass bei neu aufgebautem Kieferknochen unter BP-Therapie tendenziell noch eine starke resorptive Komponente vorhanden ist, während sie unter Dmab-Therapie weniger stark ausgeprägt ist. Ein histomorphometrisches Korrelat konnte sich zwar leider nicht direkt mit der DmabO_{NB}-Gruppe nachweisen, aber das vergrößerte BV/TV der MO_{NB}-Gruppe könnte hierfür ein Hinweis sein.

Zukünftige Untersuchungen könnten sich generell damit befassen, unter welchen antiresorptiven Therapien nicht nur seltener MRONJ auftritt, sondern unter welcher Therapie eine Knochenregeneration häufiger zustande kommt, respektive eine bessere Eigenheilungstendenz erwirkt werden könnte.

5.4 Einfluss der Studienergebnisse in die aktuellen MRONJ-Theorien

Die Studienergebnisse dieser μ -CT-Analyse unterstützen den theoretischen Aspekt der Überossifikation des Kieferknochens durch die antiresorptive Therapie, ähnlich wie in den Beobachtungen bei Osteopetrose-Patienten [28]. Dies zeigt sich v.a. in den Ergebnissen der BV/TV. Die Studie lässt vermuten, dass Trabekelknochen ein gewisses Verhältnis aus Knochen und umliegendem Weichgewebe benötigt. Zum einen, um Stabilität zu sichern und zum anderen, um zu gewährleisten, dass der Knochen immer noch mit Nährstoffen versorgt werden kann. Durch die antiresorptive Therapie könnte dieses Verhältnis verschoben worden sein. Eine Überossifikation könnte das Weichgewebsvolumen verringern und dabei die Blutversorgung reduzieren. Des Weiteren würde der Knochen Raum einnehmen, der physiologisch für Blutgefäße notwendig wäre. Ferner erhöht sich die Diffusionstrecke der Nährstoffe durch die Knochenmatrix. Damit könnten Anteile des Knochens, die weiter innen liegen, unterversorgt werden. Die oben genannten Faktoren unterstützen damit die Theorie einer avaskulären Nekrose [66].

Die Ergebnisse der Euler-Charakteristik (Konnektivität) unterstützen vorausgegangene Untersuchungen über Mikrofrakturen im MRONJ [134]. Ferner haben präklinische Tierstudien bereits gezeigt, dass es unter antiresorptiver Therapie zu einer Häufung an Mikrofrakturen auch in anderen Knochen außer dem Kiefer kommt [135, 136]. In ihrer „Inside-outside“- Theorie beschreiben Lombard et al., dass durch Kauen und lokaler Entzündungsreaktion hervorgerufene Mikrofrakturen im Kieferknochen, zusammen mit pathogener Mundflora und immun-modulatorischen Effekten von Bisphosphonaten, zu einer ausgedehnten Entzündungsreaktion und konsekutiv zur Knochennekrose führen. Antiresorptiva-induzierte Hemmung der Osteoklasten führt anschließend zum Fehlen des physiologischen Knochenremodelings und fortan zur fehlenden Reparatur des Knochens. Eine Knochennekrose kann zur Freilegung des Knochens führen, was die Biofilmbildung verstärkt, weitere Entzündung hervorruft und zu fortschreitender Nekrose führt, ergo einen *circulus vitiosus*

bildet [80]. Zudem nimmt Kim et al. an, dass es, durch Kavitation von Mikrofrakturen und dem tiefen Eindringen von Bakterien, zur Hemmung von Knochen, Gefäßen und Bindegewebe kommt. Dem folgt eine verringerte Stabilität des Knochens, die Unterbindung der Blutzufuhr und darauffolgend die Nekrose des Knochens [137].

Demzufolge angenommen, dass die Behandlung mit Antiresorptiva lediglich die Knochenmasse und Osteoporose von Beginn an mit einer geringeren trabekulären Konnektivität einhergeht [138], muss bedacht werden, dass die trabekuläre Geometrie nur bis zu einem gewissen Punkt erhalten werden kann. Dieser Punkt könnte erreicht sein, sobald weitere Mikrofrakturen während der Antiresorptiva-Behandlung auftreten. Die Studie bestätigt dahingehend die Ergebnisse von Nyman et al.. Sie kamen bei theoretischen Untersuchungen der BV/TV und Mikrofrakturen zum selben Ergebnis. Eine erhöhte Anzahl an Mikrofrakturen trotz erhöhten Knochenvolumens wurde beobachtet. Sie fügten hinzu, dass die Akkumulation von Mikrofrakturen nur durch das Zulassen von einem gewissen Maß an bone remodeling eingeschränkt werden kann [117]. Wie bereits gezeigt, hat lediglich erhöhte Knochenmasse weniger positiven Effekt als geometrische Verbesserungen der Trabekelstruktur [113, 114]. Dies kann im Fall der multiaxialen Stressbelastung des Kiefers zu einem geschwächten Knochen führen.

Zytotoxische Effekte von Bisphosphonaten wurden in der Literatur bereits umfangreich diskutiert [139, 140]. Da diese Effekte unter bestimmten Konzentrationen in-vitro bereits nachgewiesen wurden, wäre dies theoretisch auch in-vivo möglich. [53]. In Anbetracht der Ergebnisse der Osteozyten- und Lakunendichte kann folgendes angenommen werden: Sollte die Sequesterbildung durch das Absterben von Osteozyten hervorgerufen werden, müsste eine entsprechende BP-Konzentration lokal im Knochen vorliegen. Die bereits erwähnte Akkumulation von Bisphosphonaten könnte solche Konzentrationen hervorbringen. Nur eine Konzentrationsmessung in-vivo kann hierüber Aufschluss geben.

Für den Einfluss der Studienergebnisse der immunhistologischen Untersuchung sind Bisphosphonate und Denosumab separat zu betrachten. Während die BP-

Linie einen Anstieg von RANKL und konsekutiv Osteoklasten (TRAP) zum Sequester aufwies, zeigte die D_{mab} -Linie genau gegenteilige Ergebnisse. Während in-vitro kein Zusammenhang von Bisphosphonaten und der RANKL-Expression nachgewiesen wurde [141], zeigte die Analyse in-vivo, dass es zum Sequester zu einem Anstieg der RANKL-Expression und damit auch zum Anstieg der Osteoklasten kam. Da dieser Anstieg ebenfalls in der M-Linie, nicht aber in der D_{mab} -Linie zu verzeichnen war, wird davon ausgegangen, dass Entzündungsprozesse dafür allein nicht verantwortlich sein können, sondern es als direkter Effekt von Bisphosphonaten zu werten ist. Ob die Osteoklasten dann tatsächlich ihrer Funktion nachkommen, bleibt im Anbetracht des Wirkmechanismus der Bisphosphonate fraglich. Es wäre möglich, dass die Akkumulation der Osteoklasten als Reaktion des Körpers auf eine geringe Osteoklastenwirkung ausgelöst wird, nach Akkumulation diese dann aber wieder in ihrer Wirkung inhibiert werden.

Den erwartungsgemäß gegenteiligen Ergebnissen der D_{mab} -Linie für RANKL und die Osteoklastendichte könnten wiederum andere Prozesse zugrunde liegen. RANKL besitzt, neben den umfänglichen pro-osteoklastischen Wirkungen, nachweislich eine bedeutsame pro-inflammatorische Komponente und spielt eine Rolle für die Erhaltung von Monozyten [139]. Das Fehlen dieser Komponenten könnte zum einen initial zu einem gestörten bone-remodeling und später, bei der Auseinandersetzung mit Pathogenen, zu einer gestörten Immunabwehr führen.

Im Kontext der MRONJ-Ätiologietheorie könnten die AR-abhängigen Ergebnisse der RANKL- und TRAP-Färbung vermuten lassen, dass bekannte Risikofaktoren wie bspw. immunmodulatorische Effekte, Überossifikation etc. abhängig der AR-Therapie in unterschiedlichem Maß an der Entwicklung einer MRONJ mitwirken. Zusammengefasst bestätigt diese Studie Komponenten der bisher umfassendsten MRONJ-Ätiologietheorie nach Lombard et. al. [80] (siehe Abbildung 10) und liefert zudem eine Erklärung für die mechanische Vulnerabilität sowie einen Nachweis der Insuffizienz des bone-remodelings im Kieferknochen unter AR-Therapie.

5.5 Zusammenfassendes MRONJ-Pathoätiologiemodell

Auf Grundlage des bisherigen Ätiologiemodells nach Lombard et. al. [80] und ergänzt mit Ergebnissen und Schlussfolgerungen dieser Studie könnten ein zusammenfassendes Ätiologiemodell daher wie folgt aussehen (siehe Abbildung 44):

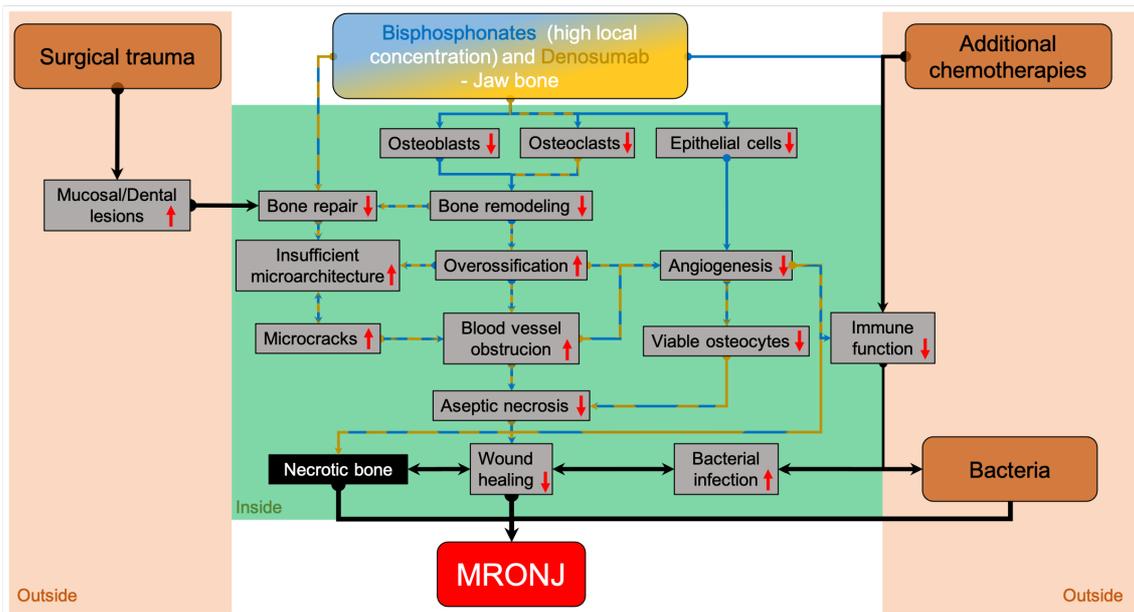


Abbildung 44: Schematische Darstellung eines zusammenfassenden Ätiologiemodells der MRONJ.

6 Zusammenfassung

Die Medikamenten-assoziierte Kieferosteonekrose (MRONJ) ist eine schwerwiegende Nebenwirkung im Rahmen von Therapien mit Antiresorptiva (AR) wie Bisphosphonate (BP's) und Denosumab (D_{mab}). Obwohl bereits einige Risikofaktoren beschrieben wurden, konnte die Ätiologie der MRONJ noch nicht vollständig beschrieben werden. Das primäre Ziel der AR-Therapie besteht zwar in der Festigung des Knochens, jedoch wird auch eine Überossifikation sowie Akkumulation von Mikrofrakturen diskutiert. In-vitro Studien beschreiben zudem zytotoxische und immunmodulatorische Wirkungen der AR's. Das Ziel dieser Studie ist einerseits mittels μ -CT die Mikroarchitektur menschlicher Kieferknochenproben von Patienten unter AR-Therapie ohne und mit MRONJ zu analysieren sowie andererseits, diese Proben durch histologische Untersuchungen auf Aspekte der Zellzusammensetzung zu untersuchen.

Menschliche Kieferknochenproben von AR-therapierten Patienten wurden in 11 Gruppen nach der AR-Therapie mit Bisphosphonaten (BP), Denosumab (D_{mab}), beides (M) und Kontrollgruppen (C) eingeteilt. Subgruppen richteten sich nach der klinischen Lokalisation entsprechend: AR-exponierter, vitaler Kieferknochen (BP_{exp} , $D_{\text{mab}}_{\text{exp}}$, M_{exp}), Sequesterrand (BPO_{mar} , $D_{\text{mab}}O_{\text{mar}}$, MO_{mar}), Sequester (BPO_{seq} , $D_{\text{mab}}O_{\text{seq}}$, MO_{seq}). Gesunder Kieferknochen (C_{HB}) und osteoporotischer Kieferknochen (C_{OP}) repräsentierten die Kontrollgruppen. Die Proben wurden einerseits in relativen Einheiten mittels μ -CT morphometrisch nach Knochenvolumenanteil (BV/TV), Knochenoberflächendichte (BS/BV), Trabekeldicke (Tr.Th.), Trabekelanzahl (Tr.N.), Trabekelabstand (Tr.Sp.), Euler-Charakteristik für Trabekelkonnektivität, Knochenmineraldichte (BMD) und Gewebemineraldichte (TMD) und andererseits (immun-)histologisch nach Osteozyten-, Lakunen- und Kittliniendichte sowie RANKL-, OPG- und TRAP-Färbung analysiert.

210 Knochenproben von 108 Patienten wurden analysiert. Die BV/TV der M_{exp} (Mittelwert: 0.46 ± 0.27) war signifikant höher im Vergleich zur C_{OP} -Gruppe (Mittelwert: 0.14 ± 0.05 ; $p < 0,05$). Die Tr.Th. unterschied sich signifikant zwischen

der BP_{exp} - (Mittelwert: 0.32 ± 0.15) und der M_{exp} -Gruppe (Mittelwert: 0.57 ± 0.20 ; $p < 0,05$) sowie zwischen der BPO_{seq} - (Mittelwert: 0.25 ± 0.10) und der MO_{seq} -Gruppe (Mittelwert: 0.39 ± 0.18 ; $p = p < 0,05$). In 3D Rekonstruktionen konnten Anzeichen für verdickte Trabekel und unorganisierte trabekuläre Mikroarchitektur der AR-exponierten- im Vergleich zu Sequester-Gruppen beobachtet werden. Allerdings zeigten BS/BV, Tr.N. und Tr.Sp. keine signifikanten Unterschiede. Die Euler-Charakteristik der BPO_{seq} - (Median: 7.46) ergab erhöhte Werte im Vergleich zur BP_{exp} -Gruppe (Median: 14.97; $p < 0,05$). BMD und TMD waren in allen Gruppen ähnlich. Die Untersuchungen der Osteozyten-, Lakunen- und Kittliniendichte ergaben keine signifikanten Unterschiede. Die RANKL- und TRAP-Färbungen der BP/MO_{exp} - über BPO/MO_{mar} - zur BPO/MO_{seq} -Gruppe zeigten progressiv steigende Werte ($p < 0,05$), während sie von $DmabO_{mar}$ - zu $DmabO_{seq}$ -Gruppe sistierten. In der OPG-Färbung waren keine signifikanten Unterschiede detektierbar.

Die Ergebnisse liefern Hinweise für eine gesteigerte Knochenmasse bei gleichzeitig mechanisch kompromittierter Mikroarchitektur einiger AR-Gruppen verglichen mit osteoporotischem Kieferknochen. Trotz erhöhter Knochenmasse zeigen einige MRONJ-Proben nach der Euler-Charakteristik eine geminderte Konnektivität verglichen mit den AR-exponierten Knochen. Dies liefert Hinweise für extensive Ossifikation mit insuffizient gesteigerter Knochenmasse und reduzierter mechanischer Stabilität durch Konnektivitätsverlust. Zudem weisen die Ergebnisse auf ein erhöhtes Risiko für Mikrofrakturen hin. Ab bestimmten Grenzwerten könnte der Knochen unterversorgt werden, was zu mikroarchitektonischer Instabilität führen könnte und konsekutiv die Anfälligkeit des Kieferknochens für MRONJ steigert. Die Ergebnisse der (Immun)histologie zeigen, dass die Osteoklastendichte einerseits abhängig der Probenlokation zum Sequester und andererseits vom AR abhängig ist. Im Kontext der Ätiologie könnten damit bekannte Risikofaktoren wie bspw. immunmodulatorische Effekte, Überossifikation etc. abhängig der AR-Therapie unterschiedliche Anteile an der Entwicklung einer MRONJ haben.

7 Liste der Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurde bereits in der folgenden Publikation im Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery (Impact Factor: 1,77) veröffentlicht:

R. Schoenhof, A. Munz, A. ElAyouti, H. Boesmueller, G. Blumenstock, S. Reinert, S. Hoefert, *Microarchitecture of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ); a retrospective micro-CT and morphometric analysis*. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2021.02.018>

8 Literaturverzeichnis

1. Schünke, M., E. Schulte, and U. Schuhmacher, *Prometheus - Lernatlas der Anatomie*. 3. ed. 2011: Georg Thieme Verlag. 14.
2. Clarke, B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3 Suppl 3**: p. S131-9.
3. Taichman, R.S., *Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2631-9.
4. Seubert B., v.G.M., Rosado Balmayor E., *Das Organ Knochen – Histologie und Zellmechanismen*. Knochendefekte und Pseudarthrosen, 2017. **Springer, Berlin, Heidelberg**.
5. Watts, E. *Normal Bone Metabolism*. Available from: <https://www.orthobullets.com/basic-science/9012/normal-bone-metabolism>.
6. Chung, I.H., et al., *Stem cell property of postmigratory cranial neural crest cells and their utility in alveolar bone regeneration and tooth development*. Stem Cells, 2009. **27**(4): p. 866-77.
7. Blin-Wakkach, C., et al., *Endogenous Msx1 antisense transcript: in vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7336-41.
8. Roybal, P.G., et al., *Inactivation of Msx1 and Msx2 in neural crest reveals an unexpected role in suppressing heterotopic bone formation in the head*. Dev Biol, 2010. **343**(1-2): p. 28-39.
9. Orestes-Cardoso, S., et al., *Msx1 is a regulator of bone formation during development and postnatal growth: in vivo investigations in a transgenic mouse model*. Connect Tissue Res, 2002. **43**(2-3): p. 153-60.
10. Raggatt, L.J. and N.C. Partridge, *Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling*. J Biol Chem, 2010. **285**(33): p. 25103-8.
11. Hauge, E.M., et al., *Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(9): p. 1575-82.
12. Rehfeld A., N.M., Karnov K. , *Bone Tissue*. In: *Compendium of Histology*. 2017. **Springer, Cham**.
13. Li, X., et al., *Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 33098-106.
14. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**(2): p. 165-76.
15. Ma, Y.L., et al., *Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation*. Endocrinology, 2001. **142**(9): p. 4047-54.
16. Insogna, K.L., et al., *Colony-stimulating factor-1 induces cytoskeletal reorganization and c-src-dependent tyrosine phosphorylation of selected*

- cellular proteins in rodent osteoclasts*. J Clin Invest, 1997. **100**(10): p. 2476-85.
17. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 337-42.
 18. Mehl, B. and e. al, *Korrelieren biochemische Knochenstoffwechselmarker mit einer histologisch gesicherten High- bzw. Low-Turnover-Osteoporose?* Medizinische Klinik © Urban & Vogel, München, 2002. **2002;97:588–94 (Nr. 10)**: p. 588-589.
 19. *Oral Health and Bone Disease* National Institutes of Health Osteoporosis and Related Bone Diseases, 2016: p. 1-2.
 20. (BfO), B.f.O.e.V. *Daten und Fakten*. Available from: <https://www.osteoporose-deutschland.de/osteoporose/daten-und-fakten/>.
 21. Hadji P, K.S., Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, and L.R. Verheyen F, *The epidemiology of osteoporosis—Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data*. . Deutsches Ärzteblatt Int, 2013. **110**(4): **52–7**.
 22. (IOF), I.O.F. *Key Statistics for Europe*.
 23. Body, J.J., et al., *Health resource utilization associated with skeletal-related events: results from a retrospective European study*. Eur J Health Econ, 2016. **17**(6): p. 711-21.
 24. Teitelbaum, S.L., *Osteoclasts: what do they do and how do they do it?* Am J Pathol, 2007. **170**(2): p. 427-35.
 25. Stark, Z. and R. Savarirayan, *Osteopetrosis*. Orphanet J Rare Dis, 2009. **4**: p. 5.
 26. Edelson, J.G., et al., *Pycnodysostosis. Orthopedic aspects with a description of 14 new cases*. Clin Orthop Relat Res, 1992(280): p. 263-76.
 27. Muto, T., et al., *Pycnodysostosis. Report of a case and review of the Japanese literature, with emphasis on oral and maxillofacial findings*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1991. **72**(4): p. 449-55.
 28. Vance, M.A., *Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates: a comparison with white phosphorus, radium, and osteopetrosis*. Clin Toxicol (Phila), 2007. **45**(7): p. 753-62.
 29. Schneider D. and K.P. W., *Die Osteomyelitis des Kiefers*. Dens, 2016. **1/2016**: p. 24-29.
 30. Bartl, R., E. von Tresckow, and C. Bartl, *Bisphosphonat-Manual*. Springer, 2006.
 31. Menschutkin, N., *Ueber die Enwirkung des Chloracetyls auf phosphorige Säuren*. Ann Chem Pharm 133, 1865: p. 317-320.
 32. Fleisch, H., *[Introduction to bisphosphonates. History and functional mechanisms]*. Orthopade, 2007. **36**(2): p. 103-4, 106-9.
 33. Fleisch, H., R. RGG, and S.e.a. Bisaz, *The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution of calcium phosphate in vitro and vivo*. Calcif Tissue Res 2(Supple): 10-10A, 1968.
 34. Fleisch, H. and W. Neuman, *Mechanism of calcification: role of collagen, polyphosphates and phosphatase*. Am J Physiol 200, 1961: p. 1296-1300.
 35. Fleisch, H. and S. Bisaz, *Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate*. Nature 195, 1962: p. 991.

36. Fleisch, H., R. Russel, and F. Straumann, *Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis*. Nature 212, 1966: p. 901-903.
37. Jung, A., S. Bisaz, and H. Fleisch, *The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals*. Calcif Tissue Res 11, 1973: p. 269-280.
38. o.V. *Possible Fracture Risk With Osteoporosis Drugs*. 2010; Available from: <https://www.fda.gov/forconsumers/consumerupdates/ucm229127.htm>.
39. Dougall, W.C., et al., *RANK is essential for osteoclast and lymph node development*. Genes Dev, 1999. **13**(18): p. 2412-24.
40. Hsu, H., et al., *Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3540-5.
41. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo*. Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 435-48.
42. Goessl, C., et al., *The development of denosumab for the treatment of diseases of bone loss and cancer-induced bone destruction*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1263**: p. 29-40.
43. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997. **89**(2): p. 309-19.
44. o.V. *Prolia(R) (Denosumab) Granted Marketing Authorization in the European Union*. 2010; Available from: <http://investors.amgen.com/phoenix.zhtml?c=61656&p=irol-newsArticle&ID=1432232>.
45. Scriba, G.K., *[Bisphosphonates in review]*. Pharm Unserer Zeit, 2000. **29**(1): p. 50-6.
46. o.V. *Drugbank: Denosumab*. 2017; Available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06643>.
47. Bartl R., B.C., *Bisphosphonates (BPs)*. The Osteoporosis Manual, Springer, Cham. , 2019.
48. Herdegen, T.e.a., *Kurzlehrbuch Pharmakologie*. 2014.
49. Koch, F.P., et al., *The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and Collagen gene expression in vitro*. Head Face Med, 2010. **6**: p. 12.
50. Maruotti, N., et al., *Bisphosphonates: effects on osteoblast*. Eur J Clin Pharmacol, 2012. **68**(7): p. 1013-8.
51. Plotkin, L.I., et al., *Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts in vivo*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(11): p. 1712-21.
52. Plotkin, L.I., et al., *Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin*. J Clin Invest, 1999. **104**(10): p. 1363-74.
53. Acil, Y., et al., *The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells*. J Craniomaxillofac Surg, 2012. **40**(8): p. e229-35.
54. Ito, M., et al., *Comparison of cytotoxic effects of bisphosphonates in vitro and in vivo*. Calcif Tissue Int, 1998. **63**(2): p. 143-7.

55. Hanley, D.A., et al., *Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes*. Int J Clin Pract, 2012. **66**(12): p. 1139-46.
56. Baron, R., S. Ferrari, and R.G. Russell, *Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects*. Bone, 2011. **48**(4): p. 677-92.
57. Masche, U. *Denosumab*. 2011; Available from: https://www.infomed.ch/pk_template.php?pkid=787#lit.
58. Burkiewicz, J.S., S.L. Scarpace, and S.P. Bruce, *Denosumab in osteoporosis and oncology*. Ann Pharmacother, 2009. **43**(9): p. 1445-55.
59. Geusens, P., *Emerging treatments for postmenopausal osteoporosis - focus on denosumab*. Clin Interv Aging, 2009. **4**: p. 241-50.
60. R.McClung, M., *Chapter 83 - Denosumab for the Treatment of Osteoporosis*. Osteoporosis (Fourth Edition), 2013: p. 1923-1934.
61. Kennel, K.A. and M.T. Drake, *Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management*. Mayo Clin Proc, 2009. **84**(7): p. 632-7; quiz 638.
62. Hildebrand, G.K. and A. Kasi, *Denosumab*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
63. Khan, A.A., et al., *Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(1): p. 3-23.
64. Svejda, B., et al., *Positionspapier zur medikamentösen Osteonekrose des Kiefers (MRONJ)*. Stomatologie, 2015.
65. Schiegnitz EA-N, B.H., S; Otto, S; Pautke, C; Ristow, O; Voss, P; Grötz, K. *S3-Leitlinie Antiresorptivaassoziierte Kiefernekrosen (AR-ONJ)*. 2018; Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007-091l_S3_Antiresorptiva-assoziierte-Kiefernekrosen-AR-ONJ_2018-12.pdf.
66. Marx, R.E., *Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic*. J Oral Maxillofac Surg, 2003. **61**(9): p. 1115-7.
67. Hoefert, S., Eufinger, H. *Mögliche unerwünschte Wirkungen von Bisphosphonaten im Kieferbereich*. Ungewöhnliches im Praxisalltag 2004; Available from: <https://www.zm-online.de/archiv/2004/19/zahnmedizin/moegliche-unerwuenschte-wirkungen-von-bisphosphonaten-im-kieferbereich/>.
68. Favus, M.J., *Diabetes and the risk of osteonecrosis of the jaw*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 817-8.
69. Woo, S.B., J.W. Hellstein, and J.R. Kalmar, *Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws*. Ann Intern Med, 2006. **144**(10): p. 753-61.
70. Schwenzer, N. and M. Ehrenfeld, *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*. 2001.
71. Ruggiero, S.L. and N. Kohn, *Disease Stage and Mode of Therapy Are Important Determinants of Treatment Outcomes for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw*. J Oral Maxillofac Surg, 2015. **73**(12 Suppl): p. S94-S100.

72. Ruggiero, S.L., et al., *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update*. J Oral Maxillofac Surg, 2014. **72**(10): p. 1938-56.
73. Boquete-Castro, A., et al., *Denosumab and osteonecrosis of the jaw. A systematic analysis of events reported in clinical trials*. Clin Oral Implants Res, 2016. **27**(3): p. 367-75.
74. Gupta, S., et al., *Bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw*. Natl J Maxillofac Surg, 2013. **4**(2): p. 151-8.
75. K. A. Grötz, J.-U. Piesold, and B. Al-Nawas, *Klasse: S3 Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose (BP-ONJ) und andere Medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen*. AWNF-Register Nr. 007/091, 2012.
76. Pecherstorfer, M., et al., *Effect of first treatment with aminobisphosphonates pamidronate and ibandronate on circulating lymphocyte subpopulations*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(1): p. 147-54.
77. Rogers, T.L. and I. Holen, *Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 177.
78. Zhao, R., *Immune regulation of osteoclast function in postmenopausal osteoporosis: a critical interdisciplinary perspective*. Int J Med Sci, 2012. **9**(9): p. 825-32.
79. Bamias, A., et al., *Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors*. J Clin Oncol, 2005. **23**(34): p. 8580-7.
80. Lombard, T., et al., *Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: New Insights into Molecular Mechanisms and Cellular Therapeutic Approaches*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 8768162.
81. Lam, D.K., et al., *A review of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws and its management*. J Can Dent Assoc, 2007. **73**(5): p. 417-22.
82. Kyle, R.A., et al., *American Society of Clinical Oncology 2007 clinical practice guideline update on the role of bisphosphonates in multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2007. **25**(17): p. 2464-72.
83. Zavras, A.I. and S. Zhu, *Bisphosphonates are associated with increased risk for jaw surgery in medical claims data: is it osteonecrosis?* J Oral Maxillofac Surg, 2006. **64**(6): p. 917-23.
84. AAOMS, *Position Paper - Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw-2014 Update*. 2014.
85. Fischer, A.H., et al., *Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections*. CSH Protoc, 2008. **2008**: p. pdb prot4986.
86. Sridharan, G. and A.A. Shankar, *Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility*. J Oral Maxillofac Pathol, 2012. **16**(2): p. 251-5.
87. Baharuddin, N.A., et al., *Localization of RANK, RANKL and osteoprotegerin during healing of surgically created periodontal defects in sheep*. J Periodontal Res, 2015. **50**(2): p. 211-9.
88. Edsall, S.C. and T.A. Franz-Odenaal, *A quick whole-mount staining protocol for bone deposition and resorption*. Zebrafish, 2010. **7**(3): p. 275-80.
89. Hoefert, S. and H. Eufinger, *Relevance of a prolonged preoperative antibiotic regime in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw*. J Oral Maxillofac Surg, 2011. **69**(2): p. 362-80.

90. Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, A.A.o.O. and S. Maxillofacial, *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws*. J Oral Maxillofac Surg, 2007. **65**(3): p. 369-76.
91. Ruggiero, S.L., et al., *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update*. J Oral Maxillofac Surg, 2009. **67**(5 Suppl): p. 2-12.
92. o.V. *MicroView - Parallax Innovations*. 2017; Available from: <http://www.parallax-innovations.com/microview.html>.
93. o.V. *MicroView Sourceforge*. 2015; Available from: <https://sourceforge.net/projects/microview/>.
94. Lang, G., *Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2013: Springer-Verlag/Wien.
95. o.V. *Toluidine Blue Staining Protocol for Mast Cells*. o. J.; Available from: http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/toluidine_blue.htm.
96. Allred, D.C., et al., *Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis*. Mod Pathol, 1998. **11**(2): p. 155-68.
97. Thorp, B.H., et al., *The effect of a bisphosphonate on bone volume and eggshell structure in the hen*. Avian Pathol, 1993. **22**(4): p. 671-82.
98. Hu, J.H., et al., *Effects of short-term alendronate treatment on the three-dimensional microstructural, physical, and mechanical properties of dog trabecular bone*. Bone, 2002. **31**(5): p. 591-7.
99. Borah, B., et al., *Risedronate preserves trabecular architecture and increases bone strength in vertebra of ovariectomized minipigs as measured by three-dimensional microcomputed tomography*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(7): p. 1139-47.
100. Allen, M.R. and D.B. Burr, *Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment*. J Oral Maxillofac Surg, 2008. **66**(5): p. 987-94.
101. Hildebrand, T. and P. Ruegsegger, *Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index*. Comput Methods Biomech Biomed Engin, 1997. **1**(1): p. 15-23.
102. Hahn, M., et al., *Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture*. Bone, 1992. **13**(4): p. 327-30.
103. Rosella, D., et al., *Medication-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and practical guidelines*. J Int Soc Prev Community Dent, 2016. **6**(2): p. 97-104.
104. Marx, R.E., et al., *Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment*. J Oral Maxillofac Surg, 2005. **63**(11): p. 1567-75.
105. *The Power of the Human Jaw*. Scientific American, 1911. **493**.
106. NIH, *NIH Consensus Development Panel in Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy*. JAMA 2001.
107. Turner, C.H., *Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality*. Osteoporos Int, 2002. **13**(2): p. 97-104.

108. Vilarinho, J.L.P., et al., *Early bony changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats: A longitudinal in vivo study*. Arch Oral Biol, 2017. **82**: p. 79-85.
109. Nair, S.P., et al., *Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions*. Infect Immun, 1996. **64**(7): p. 2371-80.
110. Zubery, Y., et al., *Bone resorption caused by three periodontal pathogens in vivo in mice is mediated in part by prostaglandin*. Infect Immun, 1998. **66**(9): p. 4158-62.
111. Frank, R.M. and J.C. Voegel, *Bacterial bone resorption in advanced cases of human periodontitis*. J Periodontal Res, 1978. **13**(3): p. 251-61.
112. Timoshenko, S. and J.M. Gere, *Theory of elastic stability*. 2009: p. 46-158.
113. Davison, K.S., et al., *Bone strength: the whole is greater than the sum of its parts*. Semin Arthritis Rheum, 2006. **36**(1): p. 22-31.
114. Guo, X.E. and C.H. Kim, *Mechanical consequence of trabecular bone loss and its treatment: a three-dimensional model simulation*. Bone, 2002. **30**(2): p. 404-11.
115. Kaczmarczyk-Sedlak, I., *The effects of pamidronate on mechanical properties, growth and structural changes in rat bones*. Acta Pol Pharm, 1995. **52**(6): p. 509-13.
116. Mashiba, T., et al., *Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(4): p. 613-20.
117. Nyman, J.S., et al., *A theoretical analysis of long-term bisphosphonate effects on trabecular bone volume and microdamage*. Bone, 2004. **35**(1): p. 296-305.
118. Philipp Metzler, W.Z.-T.L., et al., *Bone mineral density measurements performed by cone-beam computed tomography in the bisphosphonate-related osteonecrosis-affected jaw*. Oral Radiology, 2012. **28**(2): p. 101–108.
119. Riggs, B.L., et al., *Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis*. N Engl J Med, 1990. **322**(12): p. 802-9.
120. Bonewald, L.F. and M.L. Johnson, *Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling*. Bone, 2008. **42**(4): p. 606-15.
121. Ma, Y.L., et al., *Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae*. J Biomech, 2008. **41**(6): p. 1324-32.
122. Oliveira, P.S., et al., *Influence of osteoporosis on the osteocyte density of human mandibular bone samples: a controlled histological human study*. Clin Oral Implants Res, 2016. **27**(3): p. 325-8.
123. Kim, S.M., et al., *Histochemical observation of bony reversal lines in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2017. **123**(2): p. 220-228.
124. Kostenuik, P.J., *Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength*. Curr Opin Pharmacol, 2005. **5**(6): p. 618-25.
125. Bagan, L., et al., *Serum levels of RANKL and OPG, and the RANKL/OPG ratio in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Are they useful*

- biomarkers for the advanced stages of osteonecrosis?* Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2017. **22**(5): p. e542-e547.
126. Capparelli, C., et al., *Sustained antiresorptive effects after a single treatment with human recombinant osteoprotegerin (OPG): a pharmacodynamic and pharmacokinetic analysis in rats.* J Bone Miner Res, 2003. **18**(5): p. 852-8.
127. Gross, C., et al., *Osteoclast profile of medication-related osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy: a comparison with osteoradionecrosis and osteomyelitis.* J Transl Med, 2017. **15**(1): p. 128.
128. Wehrhan, F., et al., *Macrophage and osteoclast polarization in bisphosphonate associated necrosis and osteoradionecrosis.* J Craniomaxillofac Surg, 2017. **45**(6): p. 944-953.
129. Reszka, A.A. and G.A. Rodan, *Bisphosphonate mechanism of action.* Curr Rheumatol Rep, 2003. **5**(1): p. 65-74.
130. R.Baron, A.V., R. Lang, *Estimation of trabecular bone resorption by histomorphometry; evidence for a prolonged reversal phase with normal resorption in post-menopausal osteoporosis and coupled increase in primary hyperparathyroidism.* Clin. Disord. Bone Miner. Metab., 1983: p. 191-195.
131. Delaisse, J.M., et al., *Re-thinking the bone remodeling cycle mechanism and the origin of bone loss.* Bone, 2020. **141**: p. 115628.
132. Jensen, P.R., et al., *Bisphosphonates impair the onset of bone formation at remodeling sites.* Bone, 2021. **145**: p. 115850.
133. Adachi, N., et al., *Preventive effect of fluvastatin on the development of medication-related osteonecrosis of the jaw.* Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 5620.
134. Hoefert, S., et al., *Importance of microcracks in etiology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a possible pathogenetic model of symptomatic and non-symptomatic osteonecrosis of the jaw based on scanning electron microscopy findings.* Clin Oral Investig, 2010. **14**(3): p. 271-84.
135. Allen, M.R. and D.B. Burr, *Bisphosphonate effects on bone turnover, microdamage, and mechanical properties: what we think we know and what we know that we don't know.* Bone, 2011. **49**(1): p. 56-65.
136. Mashiba, T., et al., *Effects of suppressed bone remodeling by minodronic acid and alendronate on bone mass, microdamage accumulation, collagen crosslinks and bone mechanical properties in the lumbar vertebra of ovariectomized cynomolgus monkeys.* Bone, 2017. **97**: p. 184-191.
137. Kim, J.W., et al., *Role of microcracks in the pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw.* Clin Oral Investig, 2016. **20**(8): p. 2251-2258.
138. Sozen, T., L. Ozisik, and N.C. Basaran, *An overview and management of osteoporosis.* Eur J Rheumatol, 2017. **4**(1): p. 46-56.
139. Wat, W.Z.M., *Current Controversies on the Pathogenesis of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw.* Dent J (Basel), 2016. **4**(4).
140. Landesberg, R., et al., *Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates.* J Oral Maxillofac Surg, 2008. **66**(5): p. 839-47.

141. Kim, Y.H., G.S. Kim, and B. Jeong-Hwa, *Inhibitory action of bisphosphonates on bone resorption does not involve the regulation of RANKL and OPG expression*. *Exp Mol Med*, 2002. **34**(2): p. 145-51.

9 Abbildungsverzeichnis

9.1 Abbildungen

Abbildung 1:	Aufgaben und Funktion des Organs Knochen	11
Abbildung 2:	Schritte der Knochengewebe-Remodellierung	13
Abbildung 3:	Darstellung des Aufbaus eines Osteons	13
Abbildung 4:	Chemische Struktur Pyrophosphat und Bisphosphonat	20
Abbildung 5:	Beeinflussung des Osteoklastenstoffwechsels durch Bisphosphonate	23
Abbildung 6:	Wirkmechanismus von Bisphosphonaten und Denosumab	26
Abbildung 7:	Pharmakokinetik und -dynamik von Denosumab	27
Abbildung 8:	MRONJ-Stadien I-III	32
Abbildung 9:	Hämatopoetische Stammzellendifferenzierung	34
Abbildung 10:	Flowchart der inside-outside MRONJ-Ätiologietheorie nach Lombard et. al.	35
Abbildung 11:	Schema der Probenlokalisierung in Bezug auf den Sequester in Abhängigkeit der Histologie	42
Abbildung 12:	Exemplarische Darstellung von TRAP-Färbungen	54
Abbildung 13:	Verteilung der Proben nach den unterschiedlichen Gruppen	57
Abbildung 14:	Verteilung der Knochenproben nach Geschlecht	57
Abbildung 15:	Verteilung der Knochenproben in Abhängigkeit des Patientenalters	58
Abbildung 16:	Verteilung der Proben nach der Grunderkrankung	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 17:	Verteilung der Dmab-Proben der Patienten nach Dosis und Verabreichungsintervallen	59
Abbildung 18:	Verteilung der AR-Proben nach AR-Kombinationen	60
Abbildung 19:	Verteilung der AR-Proben nach zusätzlichen medikamentösen Therapien	60
Abbildung 20:	Schematische Heatmap der Sequester-Entstehungsregionen	61
Abbildung 21:	BV/TV nach Gruppen	62
Abbildung 22:	BS/BV nach Gruppen	63
Abbildung 23:	Tr. Th. nach Gruppen	64
Abbildung 24:	Tr. N. nach Gruppen	64
Abbildung 25:	Tr. Sp. nach Gruppen	65
Abbildung 26:	Euler-Charakteristik nach Gruppen	66
Abbildung 27:	BMD nach Gruppen	67
Abbildung 28:	TMD nach Gruppen	67
Abbildung 29:	Exemplarische 3D-Bilder würfelförmiger Ausschnitte von Referenzproben der unterschiedlichen Gruppen	68
Abbildung 30:	Osteozytendichte nach Gruppen	69
Abbildung 31:	Lakunendichte nach Gruppen	70
Abbildung 32:	Kittliniendichte nach Gruppen	70
Abbildung 33:	RANKL-Immunhistologie nach Gruppen	71
Abbildung 34:	Immunhistologische RANKL-Färbungen von Referenzproben der BP-Linie	72
Abbildung 35:	OPG-Immunhistologie nach Gruppen	73
Abbildung 36:	TRAP-Immunhistologie nach Gruppen	74
Abbildung 37:	Immunhistologische TRAP-Färbung einer Referenzprobe der BPO _{mar} -Gruppe	74

Abbildung 38:	BV/TV nach der BPO_{NB} - und MO_{NB} -Gruppe	75
Abbildung 39:	Ergebnisse der NB-Linien Analyse nach den Parametern: BS/BV, Tr. Th., Tr. N., Tr. Sp., Euler-Charakteristik, BMD, BMD und TMD	76
Abbildung 40:	Ergebnisse der NB-Linie für die RANKL- und TRAP-Färbung	77
Abbildung 41:	Ergebnisse der NB-Linien Analyse nach den Parametern: Osteozytendichte, Lakunendichte, Kittliniendichte und OPG-Färbung	77
Abbildung 42:	HE-Färbung von Referenzproben der NB-Linie	78
Abbildung 43:	Das Euler'sche Theorem	85
Abbildung 44:	Zusammenfassendes Ätiologiemodell der MRONJ	95

9.2 Tabellen

Tabelle 1:	Übersicht über die verschiedenen Bisphosphonate	21
Tabelle 2:	Klinische Stadien-Einteilung der MRONJ nach der AAOMS	31
Tabelle 3:	Abkürzungen und Bezeichnungen/Erklärungen der Gruppen	56
Tabelle 4:	Kennwerte der in den Ergebnissen dargestellten Box-Plots	62

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung meines Doktorvaters PD Dr. med. Dr. med. dent. Sebastian Hoefert (OA MKG-Chirurgie Tübingen) durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Dr. med. dent. Sebastian Hoefert. Die Qualitätssicherung der histologischen Auswertung erfolgte durch PD Dr. Hans Bösmüller (OA Pathologisches Institut Tübingen).

Von Frau Anna Yuan, Ph.D. wurden bereits vorab 68 Proben μ -CT's in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. dent. Ashraf ElAyouti (OA Klinik für Zahnerhaltung Tübingen) angefertigt und von 120 Proben histologische Bilder erstellt.

Frau Anna Yuan, Ph.D. hat diese im Rahmen ihrer Ph.D.-Arbeit angefertigt und uns freundlicherweise für unsere Fragestellung zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen μ -CT's von 73 Präparaten wurden von mir in Zusammenarbeit mit PD Dr. Ashraf ElAyouti erstellt. Alle übrigen histologischen Bilder von 90 Präparaten wurden von mir, nach Einarbeitung durch Frau Adelheid Munz (MTA MKG-Chirurgie Labor Tübingen) erstellt.

Sämtliche Analysen aller μ -CT's und aller histologischen Bilder wurden von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Gunnar Blumenstock (OA Institut für Biometrie klinische Epidemiologie Tübingen).

Erklärung zum Eigenanteil

Ich versichere, das Manuskript selbständig (unter Anleitung von PD Dr. med Dr. med. dent. Sebastian Hoefert) verfasst zu haben und keine weiteren, als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 16.10.2021

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'R. Schönhof', written in a cursive style.

Rouven Jan Michael Schönhof

11 Danksagung

"No one can realize how substantial the air is, until he feels its supporting power beneath him. It inspires confidence at once." - Otto Lilienthal

Beginnen möchte ich mit meinem Dank an Frau Adelheid Munz (MTA). Ausnahmslose Sorgfalt und Genauigkeit, Engagement, kritisches Hinterfragen und viel Spaß an der Arbeit zeichnen dich aus. Dir verdanke ich gelernt zu haben, wie Laborarbeit ordentlich durchgeführt wird und dabei Spaß macht.

Herzlichen Dank an Frau Anna Yuan (Ph.D.), die freundlicherweise Teile ihrer Forschung für mich zur Verfügung stellte, um mich mit meinem Projekt daran arbeiten zu lassen.

Herrn PD Dr. Hans Bösmüller danke ich herzlich für die Sicherung der Qualität der histologischen Auswertung.

Bei Herrn Dr. Gunnar Blumenstock möchte ich mich herzlich für die immer sehr freundliche Unterstützung bei der Erarbeitung der Statistik bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich zudem bei Herr PD Dr. Ashraf ElAyouti für das Scannen der Proben, der wissenschaftlichen Unterstützung und dafür, dass ich in deinem Labor immer willkommen bin.

Meinem großen Bruder Raoul Schönhof (M.Sc., LL.B.), meiner Schwägerin (und Schwester im Herzen) Lisa Schönhof (M.Sc.), meinem Vater Georg Schönhof (Dipl.-Ing), meiner Mutter Maria Schönhof (MTA) für die Liebe, die Unterstützung und das immer da sein - Danke.

Abschließend geht mein größter Dank an meinen Doktorvater, Mentor und Flugkapitän in den Turbulenzen der Forschung und Klinik PD Dr. Dr. Sebastian Hoefert und an meine Doktormutter Dr. Claudia Hoefert. Euch verdanke ich nicht nur diese Promotionsarbeit, sondern mit euch habe ich einen neuen Teil Familie gewonnen. Ihr seid immer für mich da und dafür bin ich euch wirklich sehr dankbar. Obrigado por sempre ser meu arco-íris depois da tempestade.