

Aus der

Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und  
Kieferheilkunde (Department) Tübingen

**Untersuchung der oralen Gewebetoxizität durch  
Antiresorptiva innerhalb der Medikamentenassoziierten  
Kiefernekrose (MRONJ) im Real-time Modell**

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

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

**vorgelegt von**

**Liebaug-Steiner, Linda**

**2024**

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. Dr. S. Hoefert
2. Berichterstatter:	Professor Dr. A. Nüssler
Tag der Disputation:	14.12.2023

Für meinen Opa Rudi

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	9
1. Einleitung .....	11
1.1. Einführung.....	11
1.2. Medikamente der Tumor- und Osteoporosetherapie.....	13
1.2.1. Bisphosphonat Zoledronat.....	13
1.2.2. RANKL-Inhibitor Denosumab.....	14
1.2.3. Gezielte Krebstherapeutika (“Targeted Cancer Therapies”).....	15
1.2.3.1. Bevacizumab.....	15
1.2.3.2. Sunitinib .....	16
1.2.3.3. Sorafenib.....	16
1.2.3.4. Rapamycin .....	16
1.3. Medikamenten-assoziierte Kiefernekrose .....	17
1.3.1. Definitionen (ONJ, BRONJ, ARONJ und MRONJ) .....	17
1.3.2. Ätiologiemodelle .....	19
1.4. Zelllinien .....	21
1.5. Echtzeit-Überwachung und -Analyse der Zellen .....	22
1.6. Fragestellung der Arbeit .....	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1. Verwendete Medikamente.....	25
2.1.1. Antiresorptiva.....	25
2.1.1.1. Zoledronat.....	25
2.1.1.2. Denosumab.....	25
2.1.2. Gezielte Krebstherapeutika (“Targeted Therapies”).....	26
2.1.2.1. Bevacizumab.....	26

2.1.2.2.	Sunitinib .....	26
2.1.2.3.	Sorafenib.....	26
2.1.2.4.	Rapamycin .....	27
2.2.	Zelllinien .....	27
2.2.1.	Humane Gingivafibroblasten .....	27
2.2.2.	THP-1 Zelllinie .....	28
2.3.	Versuchsablauf .....	30
2.3.1.	xCelligence-Versuche (E-plates, Eview-plates) .....	32
2.3.2.	xCelligence-Versuche (E-plates, Eview-plates) mit THP-1-Zellen	33
2.3.3.	Ko-Kultivierung (24-well-Platten) .....	34
2.3.4.	Ko-Kultivierung (24-well-Platten) mit THP-1-Zellen .....	34
2.3.5.	Indirekter Scratch.....	35
2.4.	EZ4U- Assay .....	36
2.5.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	37
2.6.	Histologie .....	37
2.6.1.	Hämalaun-Färbungen.....	37
2.6.2.	LIVE/DEAD-Färbungen .....	38
2.7.	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	38
2.7.1.	xCelligence® System.....	39
2.8.	Statistische Auswertung .....	39
2.9.	Fehlermanagement .....	40
3.	Ergebnisse .....	41
3.1.	xCelligence-Versuche (E-plates, Eview-plates).....	41
3.1.1.	Basisversuchsversuchsansatz.....	42
3.1.2.	LPS-Versuchsansatz .....	44
3.1.3.	LPS/THP-1-Versuchsansatz .....	46

3.1.4.	Analyse der Neigung der Kurvenverläufe .....	48
3.1.5.	Zusammenfassung xCelligence-Ergebnisse.....	52
3.2.	Indirektes Scratch.....	53
3.3.	EZ4U- Assay .....	59
3.4.	ELISA.....	61
3.4.1.	VEGF .....	61
3.4.1.1.	VEGF nach 60 Stunden Versuchszeit .....	61
3.4.1.2.	VEGF nach 120 Stunden Versuchszeit .....	64
3.4.2.	IL-6 .....	66
3.4.2.1.	IL-6 nach 60 Stunden Versuchszeit .....	66
3.4.2.2.	IL-6 nach 120 Stunden Versuchszeit .....	69
3.4.3.	IL-1 $\beta$ .....	71
3.4.3.1.	IL-1 $\beta$ nach 60 Stunden Versuchszeit .....	71
3.4.3.2.	IL-1 $\beta$ nach 120 Stunden Versuchszeit .....	73
3.4.4.	IL-8 .....	75
3.4.4.1.	IL-8 nach 60 Stunden Versuchszeit .....	75
3.4.4.2.	IL-8 nach 120 Stunden Versuchszeit .....	78
3.4.5.	TNF- $\alpha$ .....	80
3.4.5.1.	TNF- $\alpha$ nach 60 Stunden Versuchszeit .....	80
3.4.5.2.	Nach 120 Stunden Versuchszeit .....	81
3.4.6.	RANKL.....	81
3.4.7.	OPG.....	82
3.4.8.	Zusammenfassung ELISA-Ergebnisse .....	85
3.5.	Färbungen.....	86
3.5.1.	Hämalaun .....	86
3.5.1.1.	Nach 60 Stunden Versuchszeit .....	86

3.5.1.2.	Nach 120 Stunden Versuchszeit.....	90
3.5.2.	LIVE/DEAD.....	96
3.5.2.1.	Hohe Dosen Antiresorptiva .....	96
3.5.2.2.	Kombinationstherapie der Antiresorptiva mit den Targeted Therapies.....	100
3.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	104
4.	Diskussion.....	105
4.1.	MRONJ durch Antiresorptiva.....	105
4.2.	MRONJ durch Kombinationsbehandlung von AR mit TCT .....	110
4.3.	Schädigung von HGF Zellen .....	114
4.3.1.	Zellveränderungen durch die Medikamente und deren Kombinationen .....	114
4.3.2.	Zellveränderungen durch Endotoxinexposition .....	119
4.3.3.	Zellveränderungen durch immunologische Stimulation mittels THP-1-Zellen .....	121
4.3.4.	Methodenkritik .....	122
4.4.	Die Bedeutung der HGF-Zellen innerhalb der Gesamtätiologie .....	124
4.5.	Graphische Darstellung des Gesamtätiologiemodells .....	127
4.6.	Empfehlungen für die klinische Praxis.....	128
4.7.	Schlussfolgerung.....	128
5.	Zusammenfassung.....	130
I.	Literaturverzeichnis .....	132
II.	Erklärungen zum Eigenanteil .....	149
III.	Veröffentlichungen.....	150
IV.	Danksagung .....	151
Anlage 1	.....	153
ELISA-Versuchsaufbau	.....	153

I. VEGF .....	153
II. IL-6.....	154
III. IL-1 $\beta$ .....	154
IV. IL-8.....	155
V. TNF.....	156
VI. RANKL.....	157
VII. OPG.....	158
Anlage 2 .....	160
Gesamtübersicht Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	160



## Abkürzungsverzeichnis

AR	Antiresorptiva
ARONJ	Antiresorptiva-assoziierte Kiefernekrose
BP	Bisphosphonate
BRONJ	Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose
CI	Zellindex
DMSO	Dimethylsulfoxid
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FLT3	fetale Leber-Tyrosinkinase Rezeptor
GIST	Gastrointestinale Stromatumore
HGF	Humane Gingiva Fibroblasten
Ig2G	Immunglobulin-2G-Antikörper
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IMS	Immune Modifying Substances
iv	intravenös
L/D	Live/Dead (-Färbung)
LPS	Lipopolysaccharide
MRONJ	Medication related osteonecrosis of the jaw / Medikamentenassoziierte Kiefernekrose
mTOR	mammalian target of Rapamycin
ONJ	osteonecrosis of the jaw / Kiefernekrose
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGFR $\alpha$	platelet-derived growth factor receptor $\alpha$
PDGFR $\beta$	platelet-derived growth factor receptor $\beta$
P/S	Penicillin/ Streptomycin
RANK	receptor activator of NK-kb

RANKL	receptor activator of NK-kb ligand
rpm	rounds per minute
RPMI-Medium <sup>β</sup>	RPMI-Medium ohne Zugabe von β-Mercaptoethanol
R <sub>t0</sub>	Widerstand zum Zeitpunkt T <sub>0</sub>
R <sub>tn</sub>	Widerstand gemessen zum Zeitpunkt T <sub>n</sub>
RTCA	Real-Time Cell Analysis
SaOS-2-Zellen	Zelllinie mit Ursprung des humanen primären osteogenen Sarkoms
spp	Spezies
SRE	skeletal related events
TNF	Tumornekrosefaktor
TCT	Targeted Cancer Therapies
TT	Targeted Therapies
TTO	time to onset
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGF-A	vascular endothelial growth factor- A
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
z.A.	zur Analyse
Z <sub>0</sub>	Hintergrundmessung zu Beginn des Experiments
Z <sub>i</sub>	Impedanz an einem einzelnen Versuchspunkt

# 1. Einleitung

## 1.1. Einführung

Als „wachsende Epidemie“ beschrieb erstmals Robert Marx im Jahre 2003 die Kiefernekrose (Osteonecrosis of the Jaw, ONJ) bedingt durch die Gabe von Bisphosphonaten, u.a. zur Therapie der Hyperkalzämie beim multiplen Myelom und metastasierten Mammakarzinom sowie zur Therapie der Osteoporose. In einer der ersten Publikationen wurden in 36 Fällen unter Behandlung mit den Bisphosphonaten (BP) Pamidronat und Zoledronat schmerzhaft Knochensexpositionen an Mandibula oder Maxilla und teilweise auch an beiden Knochenabschnitten diagnostiziert. Marx wies mit dieser Erkenntnis erstmalig auf diese ernsthafte Nebenwirkung bei der Gabe von Bisphosphonaten (BP) hin (Marx, 2003). In den vergangenen zwei Jahrzehnten zeigte sich, dass nicht nur BP ein derartiges Erkrankungsbild auslösen können, sondern ebenso andere antiresorptive Medikamente, wie der monoklonale Antikörper Denosumab und antiangiogen wirkende Therapien, wie die Tyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib und Sorafenib, der VEGF-Inhibitor Bevacizumab und die mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus (Ruggiero et al., 2014, Beuselinck et al., 2012). Die Definition der ONJ wurde daher 2014 um diese Medikamentengruppen erweitert: seither wird das Erkrankungsbild als „Medikamenten-assoziierte Kiefernekrose“ (MRONJ) bezeichnet, wobei die letztgenannten Medikamente aktuell wieder als Co-Risikofaktoren deeskaliert wurden (Ruggiero et al., 2014, Ruggiero et al., 2022).

Grundlage für die Themenstellung und die labormedizinischen Zell-Untersuchungen der hier vorgelegten Arbeit waren u.a. Ergebnisse einer Studie von Lescaille et al. (2014), die unter Kombinationstherapie mit Antiresorptiva (AR) die Wirkung von Bevacizumab auf den Schweregrad der Osteonekrose des Kiefers in einer Kohorte von Krebspatienten untersuchte. Es wurden zwei Gruppen von Krebspatienten behandelt, von denen 32 Patienten als alleinige Gabe Zoledronat erhielten und 10 Patienten zudem in Kombination mit dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab behandelt wurden. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die Läsionen der Kiefernekrosen verursacht durch die

Kombination beider Medikamentengruppen ausgeprägter erscheinen. Es ließ sich beobachten, dass die ONJ frühzeitiger auftrat und eine Tendenz zur häufiger multilokulären Ausprägung zu verzeichnen war. Insbesondere das zu ca. 70% höhere Risiko der spontanen Ausbildung einer Kiefernekrose, also ohne externe Stimuli wie Zahnextraktionen oder Druckstellen durch Prothesensättel, fiel hierbei auf (Lescaille et al., 2014).

Andere Fälle von MRONJ wurden durch eine Kombination aus AR und den Immunsuppressiva Everolimus, Temsirolimus sowie dem Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib beschrieben (Hoefert and Eufinger, 2010, Fusco et al., 2016, Abel Mahedi Mohamed et al., 2018). Weitere Fallberichte zeigen sogar auf, dass derartige Kiefernekrosen auch unter alleinigen „targeted cancer therapies“ (TCT) auftraten. So beschreibt Bettini et al. (2012), dass eine ONJ unter ausschließlicher Bevacizumab-Therapie aufgetreten war und auch Santos-Silva et al. (2013) berichten von acht Fällen, bei denen ONJ im Zusammenhang mit Bevacizumab auftrat. Garuti et al. haben 2016 den ersten Fall einer ONJ bei einem zirrhatischen Patienten unter einer Sorafenib-Therapie, die nicht mit Bisphosphonaten kombiniert wurde, beschrieben (Garuti et al., 2016).

Doch obwohl MRONJ als schwerwiegende Komplikation seit vielen Jahren bekannt ist, ist die Ätiologie noch immer Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Verschiedene pathophysiologische Vorgänge wie u.a. die Inhibition des Knochenumbaus, entzündliche Prozesse, eine verzögerte Angiogenese, mangelnde Immunabwehrkräfte sowie die Weichgewebstoxizität werden hierbei diskutiert (Chang et al., 2018). Klinische, aber auch labormedizinische Forschung sind daher essenziell zur Aufklärung der Ätiopathogenese, um die ablaufenden Mechanismen besser verstehen zu können und darauf aufbauend in der Zukunft bessere Therapieansätze entwickeln zu können. In dieser experimentellen Arbeit sollen nun erstmals die Auswirkungen auf das Weichgewebe unter Kombinationstherapien von Antiresorptiva mit zielgerichteten Krebstherapeutika an humanen Gingivafibroblasten untersucht werden.

## **1.2. Medikamente der Tumor- und Osteoporosetherapie**

### **1.2.1. Bisphosphonat Zoledronat**

Bisphosphonate greifen in den Knochenstoffwechsel ein und hemmen durch die Inhibition der Osteoklasten die Knochenresorption (Luckman et al., 1998, Cheer and Noble, 2001). Anwendungsgebiete sind insbesondere die Behandlung von Knochenstoffwechselstörungen und Hyperkalzämien, wobei BP als etablierte und bewährte Medikamente für Patienten mit multiplen Myelomen, ossärer Metastasierung solider Tumore, Osteoporose und des Morbus Paget gelten (K.A. Grötz, 2012, Rodan and Fleisch, 1996). Ursprünglich Diphosphonate genannt, wurden Bisphosphonate erstmals 1969 vorgestellt (Francis et al., 1969). Dabei beschrieben Francis et al. die Eigenschaft der Inhibition der Kristallisation von Kalziumphosphat. Als Hauptmechanismus wurde hier die Chemisorption des Hydroxylapatits genannt. Bisphosphonate lassen sich generell als Analoga der Pyrophosphate beschreiben, wobei das zentrale Sauerstoffatom in der P-O-P-Struktur durch ein Kohlenstoffatom ersetzt wird, so dass ein geminales Bisphosphonat (P-C-P) entsteht (Bartl et al., 2007).

Je nach Indikation werden die BP im jährlichen (Osteoporose) bis hin zum monatlichen Rhythmus (onkologische Therapie) verabreicht (Schiegnitz et al., 2018). Nach oraler Gabe werden Bisphosphonate zu lediglich 1-3% ins Blut aufgenommen, transportiert und schließlich im Knochen gespeichert, bei intravenöser Applikation werden hingegen bis zu 99% resorbiert (McLeod et al., 2012, Schiegnitz et al., 2018, Kumar and Sinha, 2013). Durch ihre Struktur können die Bisphosphonate sich dort mit Kalzium verbinden und lagern sich somit an die Resorptionslakunen der Knochenoberflächen an. Die Ausscheidung des nicht aufgenommenen Substrates erfolgt über die Niere (Bartl et al., 2007). Die wohl bedeutendste Aufgabe besteht in der Inhibition der Knochenresorption, wie schon 1969 von Fleisch et al. in Tierversuchen dargestellt (Fleisch et al., 1969). Als besonders effizient und wirkungsvoll gilt hierbei die Therapie mit Zoledronat (Major et al., 2001, Rosen et al., 2003), einem stickstoffhaltigen Bisphosphonat der 3. Generation, welches die Farnesylpyrophosphat-Synthase hemmt und damit den Mevalonatweg, dessen Endprodukt eine wesentliche Signalkomponente bei vielen Krebsarten ist, blockiert (Kavanagh, 2006, Lipton,

2008). Der klinische Nutzen ist vor allem für Patienten mit soliden Tumoren und Knochenmetastasen seit vielen Jahren unbestritten, so dass sie als effiziente Medikamente in der Therapie diverser maligner und benigner Knochenstoffwechselerkrankungen unverzichtbar sind (Rosen et al., 2003).

Jedoch können sie auch schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen, deren Prophylaxe und Therapie ebenfalls Beachtung finden muss. Neben kurzfristig auftretenden Nebenwirkungen, wie gastrointestinalen Beschwerden (Greenspan et al., 2002), zählen hierzu auch Langzeitnebenwirkungen, wie die Nekrose von Mandibula und Maxilla (Marx, 2003, Kennel and Drake, 2009).

Allerdings greifen sie nicht nur in den Knochenumbau ein, sondern interagieren auch mit anderen Zellgruppen, wie z.B. den Bindegewebszellen. In Vitro-Studien haben in klinisch relevanten Konzentrationen bereits eine apoptotische Wirkung auf Gingivafibroblasten gezeigt (Yuan et al., 2019, Scheper et al., 2009a).

### **1.2.2. RANKL-Inhibitor Denosumab**

Der RANKL-Inhibitor Denosumab ist ein von der Food and Drug Administration im Jahr 2010 erstmals zugelassenes Medikament zur Behandlung von Osteoporose bei postmenopausalen Frauen mit hohem Frakturrisiko und speziell zur Vorbeugung von skelettbezogenen Ereignissen (skeletal related events, SRE) bei Patienten mit Knochenmetastasen solider Tumoren (Malan et al., 2012, O'Halloran et al., 2014, Abrahamsen and Teng, 2005). Denosumab ist ein humaner monoklonaler Immunglobulin-2G (Ig2G)-Antikörper, der direkt am RANK-Ligand (receptor activator of NK-kb ligand) ansetzt und damit die Bindung zu RANK blockiert (Bartl, 2015, Malan et al., 2012). Somit werden die physiologischen Wirkungen von Osteoprotegerin, einem weiteren Mitglied der Tumornekrosefaktor-Familie, nachgeahmt, welches die Differenzierung von Osteoklasten verhindert und ihre Apoptose fördert, so dass die Knochenresorption in der Folge gehemmt wird (Sivolella et al., 2013, Bekker et al., 2004). Im Vergleich zu Zoledronat wird Denosumab je nach therapeutischer Notwendigkeit monatlich oder halbjährig subkutan injiziert, sodass Patienten keine intravenöse Verabreichungsform erfahren müssen (Henry et al., 2011).

### **1.2.3. Gezielte Krebstherapeutika („Targeted Cancer Therapies“)**

Durch experimentelle und klinische Forschung erweitert sich das Behandlungsspektrum für Osteoporose sowie maligne Erkrankungen wie Tumorprozesse stetig. Therapeutische Fortschritte wurden durch die Entwicklung der zielgerichteten Krebstherapeutika, den sogenannten „Targeted Cancer Therapies“ (TCT), erreicht. Diese Therapien sind vornehmlich antiangiogener Natur und in der Behandlung von gastrointestinalen Tumoren, Nierenzellkarzinomen, neuroendokrinen Tumoren und anderen bösartigen Erkrankungen wesentlich (Ruggiero et al., 2014). Zu diesen Substanzen gehören die nachfolgend beschriebenen Wirkstoffgruppen des VEGF-Inhibitors Bevacizumab, die Tyrosinkinaseinhibitoren Sunitinib und Sorafenib sowie der mTOR-Inhibitor Rapamycin.

#### **1.2.3.1. Bevacizumab**

Als erster klinisch verfügbarer Angiogenesehemmer wird Bevacizumab vorwiegend als Krebstherapeutikum zur Behandlung von Dickdarm-, metastasiertem Brust-, nicht-kleinzelligem Lungen-, Nieren- und Gebärmutterhalskrebs sowie Eierstock- und Eileiterkrebs eingesetzt (Foekens et al., 2001, Seto et al., 2006, Des Guetz et al., 2006, Santos-Silva et al., 2013). Weitere Anwendungsgebiete finden sich beispielsweise in der Inhibition der Blutgefäßproliferation in der Retina bei der Behandlung der Makula-Degeneration (Santos-Silva et al., 2013, Rosenfeld, 2006).

Es handelt sich um einen rekombinanten humanisierten Antikörper der Klasse IgG, der durch seine spezifische Struktur in der Lage ist, selektiv an die Endothelwachstumsfaktoren, die zirkulierenden, löslichen vascular endothelial growth factor-(VEGF-A)-Isoformen, zu binden (Bressler, 2009). Durch die Bindung an VEGF-A verhindert Bevacizumab die Interaktion von VEGF-A mit VEGFR und hemmt dadurch die Aktivierung von VEGF-Signalwegen, die die Neovaskularisierung fördern (Garcia et al., 2020, Bettini et al., 2012). In-vivo-Studien haben gezeigt, dass Bevacizumab das Gefäßwachstum hemmt, die Rückbildung neu gebildeter Gefäße induziert und das Gefäßsystem normalisiert, um die Verabreichung zytotoxischer Chemotherapie zu erleichtern, und zudem auch direkte Auswirkungen auf Tumorzellen hat (Ferrara et al., 2004, Garcia et

al., 2020). Da die Angiogenese einen wesentlichen Schritt auch in der Wundheilung einnimmt, greift das Medikament somit auch bei einer entzündungsbedingten Wundheilung ein, welche bei der MRONJ eine entscheidende Rolle spielt (Gordon et al., 2009).

#### **1.2.3.2. Sunitinib**

Bei Sunitinib handelt es sich um einen Tyrosinkinase-Inhibitor, der die Aktivität verschiedener Wachstumsfaktoren blockiert. Zu diesen zählen die Endothelwachstumsfaktoren VEGFR-1 und VEGFR-2, der fetale Leber-Tyrosinkinase Rezeptor (FLT3), die Rezeptor-Tyrosinkinase c-KIT sowie der Platelet-Derived Growth Factor Receptor  $\alpha$  und  $-\beta$  (PDGFR $\alpha$ , and PDGFR $\beta$ ) (Mendel et al., 2003). Dadurch wird sowohl die Zellproliferation als auch die Angiogenese inhibiert (Mendel et al., 2003, Abrams et al., 2003).

Als Krebstherapeutikum findet es Anwendung beim Nierenzellkarzinom (Beuselinck et al., 2012), beim Pankreaskrebs (Liu and Kunz, 2017) und meist als Second-Line-Therapie bei Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) (Hsu et al., 2017, Goodman et al., 2007).

#### **1.2.3.3. Sorafenib**

Als Multikinase-Inhibitor wirkt Sorafenib auf die Tumorzellproliferation und -angiogenese, indem es die Endothelwachstumsfaktoren VEGFR 1, 2 und 3, den platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  (PDGFR $\beta$ ), die FMS-like Tyrosinkinase 3 (FLT3), das c-Kit Protein und die RET-Rezeptor-Tyrosinkinasen hemmt (Escudier et al., 2007, Liu et al., 2006). Es wird daher für die Behandlung des Leberzell-, Nierenzell- und des Diffusen Schilddrüsenkarzinoms eingesetzt (Escudier et al., 2007, Cheng et al., 2009).

#### **1.2.3.4. Rapamycin**

Rapamycin (auch bekannt unter seinem Gattungsnamen Sirolimus) ist ein Naturprodukt, das ursprünglich aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde (Sehgal et al., 1975). Es handelt sich dabei um ein macrozyklisches Lacton und besitzt als mTOR-Inhibitor immunsuppressive Eigenschaften (Abraham and Wiederrecht, 1996). Durch Bindung an FKBP-12 wird die Aktivierung des mammalian target of Rapamycin (mTOR) gehemmt, so dass nach der Inhibition



der Antikörperproduktion und Zytokinstimulation die Inhibition der T-Lymphozyten-Aktivierung und -Proliferation folgt (Seto, 2012, National Cancer Institute, 2019, Shamji et al., 2003). Es weist außerdem eine antibakterielle Aktivität und antimykotische (Anti-Candida) Wirkung auf (Seto, 2012). Auch hemmt Rapamycin das Wachstum einer Reihe von Tumorzelllinien, wie z.B. vom Mamma-, Kolon- und Melanokarzinom (Douros and Suffness, 1981). Folglich wurden Rapamycin-Analoga wie Temsirolimus als Chemotherapeutika gegen solide Tumorarten entwickelt (Seto, 2012).

### **1.3. Medikamenten-assoziierte Kiefernekrose**

#### **1.3.1. Definitionen (ONJ, BRONJ, ARONJ und MRONJ)**

Das Auftreten einer Kiefernekrose (osteonecrosis of the jaw, ONJ) verursacht durch BP wurde erstmals von Robert Marx im Jahr 2003 beschrieben und als Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose, engl. „bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ)“ definiert. Eine BRONJ liegt vor, wenn die folgende Trias zutrifft (Marx, 2003, Ruggiero et al., 2004, Ruggiero et al., 2009b):

- mehr als 8 Wochen freiliegender Kieferknochen
- BP-Medikamente in der Anamnese und
- keine Kopf-Hals-Radiatio in der Anamnese.

Fast ein Jahrzehnt später wurden auch unter Therapie des monoklonalen Antikörpers Denosumab derartige Kiefernekrosen diagnostiziert (Malan et al., 2012). BP bilden mit Denosumab gemeinsam die Medikamentengruppe der Antiresorptiva. Damit wurde die Definition der ONJ als aseptische Nekrose der Mandibula oder Maxilla, die als spezifische Begleiterscheinung bei der Gabe von Bisphosphonaten oder Denosumab auftritt, als Antiresorptiva-assoziierte Kiefernekrose („antiresorptive related osteonecrosis of the jaw“, ARONJ) erweitert (Beuselinck et al., 2012).

Nach der American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) lassen sich folgende Stadien bei der ARONJ definieren (Ruggiero et al., 2014):  
Stadium 0: keine klinischen Anzeichen für nekrotischen Knochen aber unspezifische Symptomatik und/oder radiologische Hinweise

Stadium 1: Exponierter oder sondierbarer, nekrotischer Knochen bei asymptomatischen Patienten ohne Anzeichen einer Infektion

Stadium 2: Exponierter oder sondierbarer, nekrotischer Knochen bei symptomatischen Patienten (Schmerzen, Rötung) mit Anzeichen einer Infektion

Stadium 3: Exponierter oder sondierbarer, nekrotischer Knochen bei symptomatischen Patienten (Schmerzen, Rötung) mit Anzeichen einer Infektion und einem oder mehreren der folgenden Symptome:

- Exponierter, nekrotischer Knochen, der sich auf benachbarte Regionen (z.B. Kieferhöhle, Jochbein und Unterkieferbasis) ausbreitet
- Pathologische Frakturen
- Extraorale Fisteln
- Mund-Antrum-Verbindungen

Anhand der pharmakologischen Eigenschaften, Indikationen und der zu erwartenden Dosen der AR bietet sich eine Einteilung eines vermuteten Risikoprofils (niedrig, mittel, hoch) an, welche in der S3-Leitlinie zur ARONJ auf Basis zugrundeliegender Daten zu Ereignisraten, Inzidenzen und Prävalenzen wie folgt festgehalten wurde (Schiegnitz et al., 2018):

Niedriges Risikoprofil (0 - 0.5%): Patienten mit Osteoporose und BP-Medikation (oral oder i.v. in der jeweiligen Dosis) oder Denosumab-Medikation (60 mg alle 6 Monate s.c.)

Mittleres Risikoprofil (bis zu 1%): Patienten mit zusätzlichen Risikofaktoren oder Therapie mit AR im Anwendungsgebiet Prävention skelettbezogener Komplikationen bei Tumorerkrankungen und i.v.-BP-Medikation

Hohes Risikoprofil (1 – 21%): bei therapeutischen onkologischen Indikationen (z.B. Knochenmetastasen) und monatlicher i.v.-BP-Medikation oder monatlicher s.c. Denosumab-Medikation (120 mg)

Die TCT sind ebenfalls mit der Entwicklung von ONJ in Verbindung gebracht worden. Zu diesen Substanzen gehören die unter *Gezielte Krebstherapeutika* (*“Targeted Cancer Therapies”*) beschriebenen Tyrosinkinaseinhibitoren (Sunitinib, Sorafenib), der VEGF-Inhibitor Bevacizumab und der mTOR-Inhibitor

Rapamycin. Es traten gehäuft Fallberichte auf, die auf einen Zusammenhang zwischen Antiresorptiva und den TCT bei der Entstehung einer Kiefernekrose verweisen (Fusco et al., 2016, Khan et al., 2015, Beuselinck et al., 2012, Sivolella et al., 2013). Mit dieser Erkenntnis erweiterte sich wiederum die Definition der ONJ zur „Medikamenten-assoziierten Kiefernekrose“ („medication-related osteonecrosis of the jaw“, MRONJ), welche bis heute etabliert ist und folgende Charakteristika beinhaltet (Ruggiero et al., 2014, Ruggiero et al., 2022):

- Aktuelle oder frühere Behandlung mit antiresorptiver Therapie allein oder in Kombination mit Immunmodulatoren oder antiangiogenen Medikamenten
- Freigelegter Knochen oder Knochen, der durch eine intra- oder extraorale Fistel im Kiefer-Gesichtsbereich sondiert werden kann, die länger als 8 Wochen besteht
- Keine Strahlentherapie im Kieferbereich oder offensichtliche Metastasen im Kieferbereich in der Vorgeschichte.

### **1.3.2. Ätiologiemodelle**

Auch wenn die ersten ONJ-Fallberichte bereits vor fast zwei Jahrzehnten erschienen, ist die Ätiopathogenese der MRONJ noch immer nicht vollständig geklärt. Es bestehen verschiedene Hypothesen zu den pathologischen Vorgängen, die im Folgenden skizziert werden sollen.

Allen voran steht die eigentliche Aufgabe der AR, nämlich die Unterdrückung des Knochenumbaus als Wirkmechanismus im Fokus. Osteoklastendifferenzierung und -funktion werden durch AR stark eingeschränkt, womit auch eine erhöhte Apoptose der Zielzellen einhergeht, die wiederum einen verringerten Knochenumbau und -resorption zur Folge haben (Baron et al., 2011, Russell et al., 2008). Eine Ursache dafür, dass die Nekrosen ortsspezifisch im Bereich von Mandibula und Maxilla auftreten, könnte die im Vergleich zum Beckenknochen bis zu 20-fach höhere Knochenumbaurate im Bereich des Alveolarknochens sein (Garetto et al., 1995, Han et al., 1997, Kim et al., 2010). Dadurch wird zudem eine erhöhte Akkumulation der Medikamente im Vergleich zu anderen Knochen angenommen (Ruggiero et al., 2009a). Die Anhäufung von BPs in den Knochen lässt ferner auf eine direkt toxische Wirkung für das orale Epithel schließen,

welches daher anfälliger für bakterielle Invasionen und entzündliche Prozesse ist (Reid et al., 2007). Diese Weichgewebstoxizität wird ebenfalls als Ursache für die Entstehung der MRONJ diskutiert (Chang et al., 2018). Während für Zoledronat eine zytotoxische Wirkung auf humane Gingivafibroblasten und Alveolarosteoblasten nachgewiesen ist, ist dies für Denosumab umstritten und für die TCT bislang noch nicht hinreichend untersucht (Yuan et al., 2019, Anita et al., 2016).

Des Weiteren wird als mögliche Ursache der MRONJ die Inhibition der Angiogenese diskutiert. Dem Bisphosphonat Zoledronat wurden antiangiogene Eigenschaften zugeordnet (Wood et al., 2002), wohingegen Denosumab als weiteres Antiresorptivum wenig bis keine antiangiogenen Eigenschaften aufweist (On et al., 2021). Da eine Unterbrechung der Blutzufuhr pathognomonisch zu einer Osteonekrose führt, ist diese Hypothese naheliegend, die genauen pathologischen Vorgänge sind hierbei allerdings noch ungeklärt (On et al., 2021). Es wird vermutet, dass durch Hemmung der Angiogenese wiederum der Knochenumbau verzögert und die Fähigkeit zur Knochenregeneration nach Schädigung beeinträchtigt wird, womit auch die Anfälligkeit für eine Superinfektion steigt (Pimolbutr et al., 2018, Chang et al., 2018). Diese erhöhte Vulnerabilität für Infektionen erscheint in der Mundhöhle allein durch die anatomische Besonderheit der Nähe des Alveolarknochens zum oralen Epithel gegeben (Mawardi et al., 2011). Dies führt zu der weiteren Hypothese, dass Entzündungen und bakterielle Infektionen eine wesentliche Rolle in der Entstehung der MRONJ spielen (Marx et al., 2005). Biofilme aus mikrobiellen Organismen sind häufig mit ONJ-Läsionen assoziiert und histopathologisch nachgewiesen, ebenso wie klassische Entzündungszellen (Sedghizadeh et al., 2009, Hansen et al., 2006).

Der pathologische Mechanismus des Erkrankungsbildes ist trotz zahlreicher Untersuchungen und daraus resultierender Hypothesen bisher allerdings noch immer nicht vollständig geklärt. Zu der Ätiopathogenese der ONJ unter Einfluss von antiangiogenen Medikamenten wie den TCT sind überdies weniger Daten verfügbar.

#### **1.4. Zelllinien**

Fibroblasten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs. Die Besonderheit bei gingivalen und mukoperiostalen Fibroblasten (wie auch anderen Fibroblasten im Kopf) liegt darin, dass sie während der Entwicklung aus dem von der Neuralleiste stammenden Ektomesenchym entstehen und nicht aus dem primären Mesoderm, wie die meisten anderen Fibroblasten im Körper (Chiquet et al., 2015). Außerdem sind sie mit dem (entodermalen) Schleimhautepithel assoziiert und nicht mit der (ektodermalen) Epidermis, wie die Fibroblasten der Haut. Zu den Aufgaben der Gingivafibroblasten gehört neben der Proliferation, die Abdichtungsfunktion, sowie spezifisch im Bereich der Mundhöhle die Interaktion zwischen Zahn und Parodont. Da bei MRONJ von einer geschwächten Immunlage auszugehen ist, ist es naheliegend, orale Zellen zu erforschen, denen immunmodulatorische Eigenschaften nachgesagt werden. Fibroblasten erfüllen diese Aufgabe auf vielfältige Weise: sie bestimmen verschiedene Arten der epithelialen Differenzierung, sezernieren Faktoren, die die Angiogenese fördern, und definieren für sich und andere Bindegewebszellen eine eigene Nische in der extrazellulären Matrix. Darüber hinaus können sie zu einer schnellen und narbenfreien Wundheilung in der Gingiva beitragen (Hakkinen et al., 2014).

Essenziell für die Wundheilung sind die Zellen des angeborenen Immunsystems, wie die Monozyten und Makrophagen. Ihre Hauptaufgaben sind die Erkennung fremder Krankheitserreger wie Bakterien, Pilzen und Viren durch Interaktion ihrer Oberflächenstrukturen, die Proliferation, die Produktion von entzündungsfördernden Chemokinen und Zytokinen und die Phagozytose zum Verschlucken und Verdauen von Krankheitserregern (Si-Tahar et al., 2009). Die THP-1-Zelllinie wurde aus dem peripheren Blut eines einjährigen männlichen Patienten isoliert, der eine akute monozytäre Leukämie hat (Tsuchiya et al., 1980). Diese Zelllinie wird häufig zur Untersuchung von Immunreaktionen verwendet, da sich die Zellen nicht nur im monozytären, sondern auch im makrophagenähnlichen Zustand befinden (Daigneault et al., 2010, Schwende et al., 1996, Chanput et al., 2014). Als etabliertes 2D-Modell zur Simulation immunologischer Umstände ist die THP-1-Zelllinie bereits mit Gingivafibroblasten untersucht worden (Hoefert et al., 2016b).

## 1.5. Echtzeit-Überwachung und -Analyse der Zellen

Für die Untersuchungen wurde eine Methode gewählt, die eine Echtzeit-Überwachung der Zellen ermöglicht. Es handelt sich hierbei um das xCelligence® Real-Time Cell Analysis RTCA DP Instrument der Firma ACEA Biosciences, welches sich bereits in Vorversuchen (Yuan et al., 2019) und der Literatur etabliert (Hamidi et al., 2017, Mandel et al., 2013, Urcan et al., 2010) hat. Das Gerät besteht aus drei Komponenten: ein Laptop mit vorinstallierter Software und einem mobilen Schnittstellenreplikator sowie dem RTCA DP Analysator selbst. Die elektronische Impedanz lässt sich über Sensorelektroden messen.



*Abbildung 1 xCelligence® Real-Time Cell Analysis RTCA DP Instrument der Firma ACEA Biosciences Inc. Der RTCA DP Analysator besitzt drei Steckplätze für die E-Plates. Auf dem Monitor des Laptops ist die Software mit Ausschnitten aus den zugehörigen Wachstumskurven.*

In die Steckplätze des RTCA DP Analysators werden die sogenannten E-Plates platziert. Sie ähneln in ihrem Aufbau den gewöhnlichen 16-Well Kammerobjektträgerplatten. Die Besonderheit liegt darin, dass sie am Boden mit Goldelektroden versehen sind, welche 70-80% des Well-Bodens erfassen. Diese ermöglichen die Messung und Beobachtung der adhärent wachsenden Zellen via Impedanz über einen definierten Zeitraum.

Hierbei wird der dimensionslose Parameter des Zellindexes ( $CI$ ) erhoben (ACEA Biosciences, 2013):

$$CI = \frac{(Z_i - Z_0)}{15\Omega}$$

$Z_i$  : Impedanz an einem einzelnen Versuchspunkt

$Z_0$  : Hintergrundmessung zu Beginn des Experiments

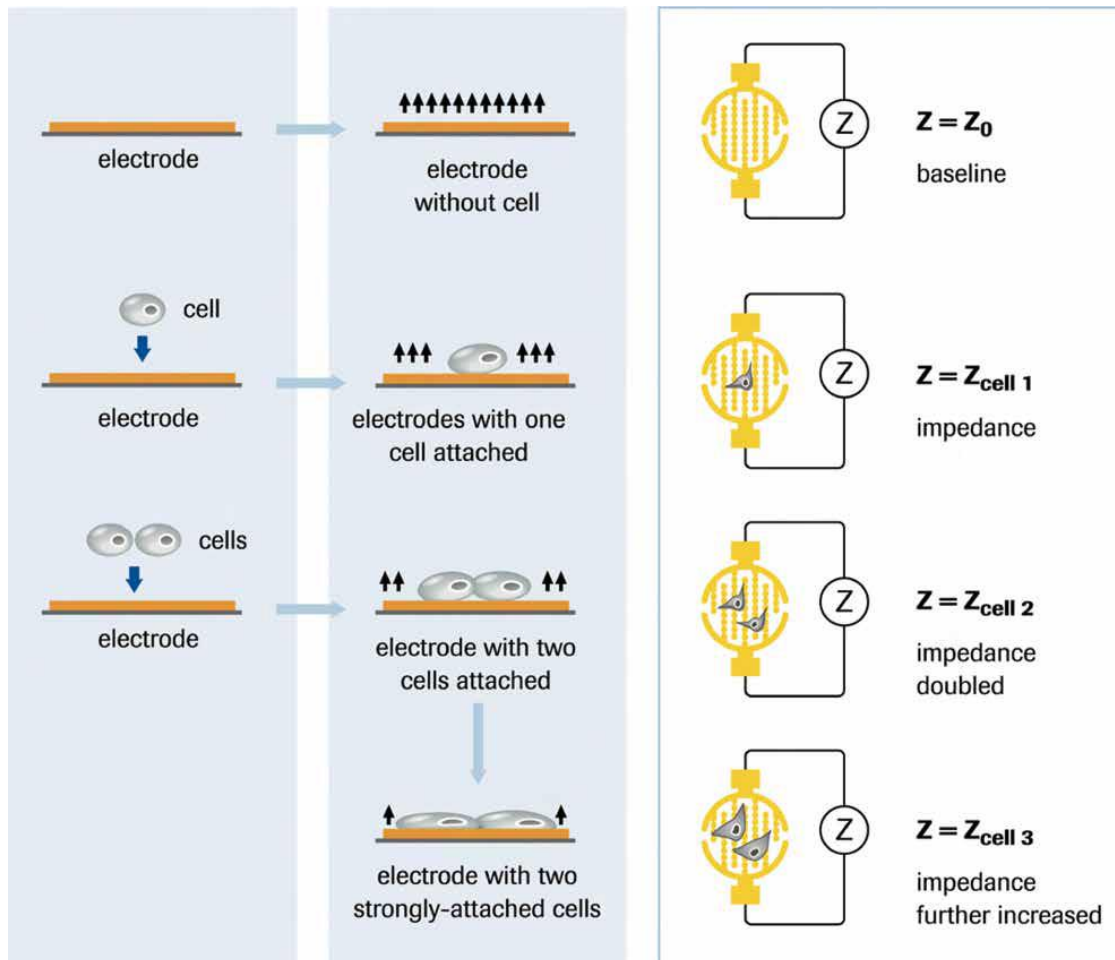


Abbildung 2 Funktionsweise der Impedanz-Zellanalytik des xCelligence Systems: Die Ableitung des Zellindex ( $CI$ ) definiert sich über  $CI = (Z_i - Z_0)/15\Omega$  (ACEA Biosciences, 2013)

Das Nährmedium der Zellen wirkt dabei als eine elektrisch leitende Lösung, die durch das Anlegen eines elektrischen Potentials an die Goldelektroden zur Generierung eines Stromkreislaufes führt. Dieser hängt damit stark von der Wechselwirkung der Elektroden mit der Lösung ab, so dass anhaftende Zellen den Elektronenfluss behindern. Eine messbar gesteigerte Impedanz ist die Folge, die sowohl Veränderungen aufgrund der Zellzahl aber auch der Anhaftung der

Zellen an den Well-Boden widerspiegelt. Dadurch lassen sich während experimenteller Echtzeitversuche mit adhärent wachsenden Zellkulturen markierungsfrei Rückschlüsse auf deren Zellproliferation und Bindungsqualität zu.

### **1.6. Fragestellung der Arbeit**

In dieser experimentellen Arbeit sollen mittels In-vitro-Untersuchungen zugrundeliegende Mechanismen der Entstehung einer MRONJ bei Kombinationstherapien von Zoledronat oder Denosumab mit Bevacizumab, Sorafenib, Sunitinib und Rapamycin dosisabhängig an humanen Gingivafibroblasten (HGF) analysiert werden. Ziel ist es, zu prüfen, ob ein additives Risiko der Kombinationstherapie für die Entwicklung von Kiefernekrosen besteht sowie Risikokonzentrationen zu erfassen, die eine Relevanz für die therapeutische Anwendung haben könnten. Die Zellviabilität wird mit einem HGF-Echtzeit-Viabilitätsmodell in einer Zellkultur untersucht, welches bereits in Voruntersuchungen etabliert wurde (Yuan et al., 2019, Chiquet et al., 2015). Der immunologische Einfluss auf HGF-Zellen soll zusätzlich simuliert werden, um der Frage nachzugehen, ob die Exposition gegenüber bakteriellen Toxinen wie LPS (Fitzsimmons et al., 2018) und die Co-Kultur mit THP-1-Zellen in einem Mini-Immunologie-Modell (Chanput et al., 2014) das Risiko zusätzlich erhöht. Die Bestimmung der Interleukine und Zytokine, die von humanen Gingivafibroblasten produziert werden, soll durch Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISAs) der Überstände der Zellkulturen zu bestimmten Zeitpunkten erfolgen und Aufschluss über das Reaktionsverhalten der HGF-Zellen geben. Gemessen werden dabei die Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 sowie die Signalmoleküle Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ).



## **2. Material und Methoden**

Die experimentellen Untersuchungen wurden gefördert durch das IZKF Promotionskolleg, Tübingen, und der AO Foundation, Projektnummer „AOCMF-16-06R Reinert“.

### **2.1. Verwendete Medikamente**

#### **2.1.1. Antiresorptiva**

##### **2.1.1.1. Zoledronat**

Aus der Gruppe der Bisphosphonate wurde für die Versuche Zoledronat (Sequoia Research Products Ltd, Pangbourne, GB) verwendet.

In Vorbereitung wurde der Wirkstoff in 20µl Eppendorf Tubes aliquotiert und bei -20°C tiefgekühlt gelagert. Vor den einzelnen Versuchen wurde die Lösung aufgetaut und mit dem verwendeten Medium verdünnt, um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten. Entsprechend der pharmakokinetischen Voruntersuchungen wurde eine Plasmakonzentration von 0,5-50µM vermutet und getestet (Yuan et al., 2019, Scheper et al., 2009a, Komatsu et al., 2016). Für die Versuche wurde dieses Spektrum mit den Konzentrationen von 50µM, 5µM und 0,5µM abgestuft.

##### **2.1.1.2. Denosumab**

Der monoklonale Antikörper Denosumab (Amgen GmbH, München, DE) wurde aus der Injektionslösung in der Fertigspritze gewonnen.

Denosumab wurde in einer Konzentration von 60µg/ml in 40µl Aliquotes gekühlt aufbewahrt. Vor den einzelnen Versuchen wurde die Lösung jeweils mit dem verwendeten Medium verdünnt, um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten. Entsprechend der pharmakokinetischen Voruntersuchungen wurde eine Plasmakonzentration von 3-40µg/ml angenommen (Bekker et al., 2004, Yuan et al., 2019). Für die Versuche wurde dieses Spektrum mit den Konzentrationen von 40µg/ml, 10µg/ml und 3µg/ml abgestuft.

## **2.1.2. Gezielte Krebstherapeutika (“Targeted Therapies”)**

### **2.1.2.1. Bevacizumab**

AVASTIN Vials 100mg/4ml (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, DE) enthält den Wirkstoff Bevacizumab. Für die Versuche wurde die den Patienten durch eine Infusionslösung intravenös verabreichte Flüssigkeit verwendet. Avastin wurde in 20µl Aliquots gekühlt gelagert. Vor den einzelnen Versuchen wurde die Lösung mit dem verwendeten Medium verdünnt, um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten. Entsprechend der pharmakokinetischen Voruntersuchungen wurde eine Plasmakonzentration von 20-80µg/ml angenommen (Videira et al., 2011). Für die Versuche wurde dieses Spektrum mit den Konzentrationen von 80µg/ml und 20µg/ml abgestuft.

### **2.1.2.2. Sunitinib**

Für die Versuchsreihen wurde der Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, US) verwendet. Dieser liegt als Hartkapsel vor und wird vom Patienten oral eingenommen. Für die Verwendung im Labor wurde die Hartkapsel in Wasser aufgelöst und zu je 20µl in Eppendorf Tubes aliquotiert und bei -20°C tiefgekühlt gelagert. Vor den einzelnen Versuchen wurde die Lösung aufgetaut und mit dem verwendeten Medium verdünnt, um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten. Entsprechend der pharmakokinetischen Voruntersuchungen wurde eine Plasmakonzentration von 50-100ng/ml angenommen (Faivre et al., 2006, Mendel et al., 2003). Für die Versuche wurde dieses Spektrum mit den Konzentrationen von 100ng/ml und 50ng/ml abgestuft.

### **2.1.2.3. Sorafenib**

Das Medikament Nexavar® beinhaltet den Wirkstoff Sorafenib (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, US). Nexavar liegt als Festsubstanz in Pulverform vor. In Vorbereitung für die Versuchsreihen wurde 1,25 mg des Pulvers in 0,5ml Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst und in 20µl Aliquotes bei -20°C gelagert. Vor den einzelnen Versuchen wurde die Lösung jeweils aufgetaut und mit dem verwendeten Medium verdünnt, um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten. Entsprechend der pharmakokinetischen Voruntersuchungen wurde eine Plasmakonzentration von 0,5-5µg/ml angenommen (Fucile et al., 2015). Für

die Versuche wurde dieses Spektrum mit den Konzentrationen von 5µg/ml und 0,5µg/ml abgestuft.

#### **2.1.2.4. Rapamycin**

Rapamycin ist unter dem Synonym Sirolimus und unter dem Handelsnamen Rapamune<sup>®</sup> (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, US) bekannt. Es handelt sich dabei um ein makrozyklisches Lacton, welches aus *Streptomyces hygroscopicus* gewonnen wird. Rapamycin liegt als Festsubstanz in Pulverform vor.

In Vorbereitung für die Versuchsreihen wurde 1mg des Pulvers in 1ml Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst und in 50µl Aliquotes bei -20°C gelagert. Vor den einzelnen Versuchen wurde die Lösung jeweils aufgetaut und mit dem verwendeten Medium verdünnt, um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten. Entsprechend der pharmakokinetischen Voruntersuchungen wurde eine Plasmakonzentration von 5-100ng/ml angenommen (Mehrabi et al., 2006). Für die Versuche wurde dieses Spektrum mit den Konzentrationen von 100ng/ml und 5ng/ml abgestuft.

## **2.2. Zelllinien**

### **2.2.1. Humane Gingivafibroblasten**

Bei den in den Versuchen verwendeten Zellen handelte es sich um Humane Gingivafibroblasten (provitro AG, Berlin, DE). Die Verarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben unter sterilen Bedingungen:

Das Kryo-Röhrchen wurde im Wasserbad (Mettler GmbH + Co. KG, Schwabach, DE) erwärmt und mit 10ml HGF-Medium in einem 15ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE) vermischt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit geschlossenem Deckel für 7min bei 250 x g zentrifugiert (Eppendorf Zentrifugen GmbH, Leipzig, DE). Der Überstand wurde unter sterilen Bedingungen abgesaugt, das übrig gebliebene Zellpellet mit 10ml HGF-Medium resuspendiert und anschließend in eine Zellkulturflasche (Corning<sup>®</sup> Life Sciences, Corning, US) überführt.

Die Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus, Hanau, DE) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Konzentration inkubiert. Nach 24h erfolgte der erste Medienwechsel, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen.

Die Medienwechsel erfolgten im 2-3-tägigen Rhythmus (Montag, Mittwoch und Freitag). Bei einer Konfluenz von ca. 85% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und anschließend mit Phosphat-Puffer-Lösung (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, DE) gespült, um Medienreste zu entfernen. Nach Absaugen des PBS, erfolgte die Zugabe von 2ml Trypsin/EDTA (Lonza, Verviers, BE). Nach 10min Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Trypsin durch die Zugabe von 3ml Medium inaktiviert. Die Zellzahl wurde mittels der Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop ermittelt. Dazu wurden 20µl der Zellsuspension mit 20µl Trypan-Blau (0,9%) gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Die übrige Zellsuspension wurde mit 1400rpm bei 8°C für 7min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand wieder abgesaugt und das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert und je nach Zellzahl in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Für die Versuchsreihen wurden lediglich die Zellen der Passagen 4-8 verwendet, um eine Veränderung der Zellstruktur durch häufiges Passagieren zu vermeiden. Das Nährmedium für die Zellen (Provitro AG, Berlin, DE) besteht aus Basalmedium, welchem nach Herstellerangaben mit einem Anteil von 10% Fetales Kälberserum (FCS) und von 1% Antibiotika zugesetzt ist. Das Medium wurde vor Gebrauch in benötigter Menge im Wasserbad erwärmt.

### **2.2.2. THP-1 Zelllinie**

Die humane THP-1- Zelllinie (ATCC®, Manassas, US) entstammt dem peripheren Blut eines einjährigen Kleinkindes mit akuter monozytärer Leukämie.

Das Kryo-Röhrchen wurde im Wasserbad (Mettler GmbH + Co. KG, Schwabach, DE) erwärmt und unter sterilen Bedingungen mit 8ml RPMI-Medium in ein 15ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE) überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit geschlossenem Deckel für 7min bei 250 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde unter sterilen Bedingungen vorsichtig abgesaugt, das übrig gebliebene Zellpellet mit 10ml RPMI-Medium resuspendiert und anschließend in eine Zellkulturflasche (Corning® Life Sciences, Corning, US)

pipettiert. Die Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus, Hanau, DE) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Konzentration inkubiert. Alle 2-3 Tage wurde frisches Nährmedium zu der Zellsuspension hinzugegeben und alle 5 Tage wurden die Zellen umgesetzt, spätestens bei einer Zellzahl von 8x10<sup>5</sup> Zellen/ml. Hier wurde die Zellsuspension in der Zellkulturflasche durch mehrfaches Aufziehen mit einer Pipette gemischt, entnommen und in ein 15ml Röhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde mit 1400rpm bei 8°C für 7min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in neuem RPMI-Medium aufgelöst und je nach Zellzahl in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellkultur wurde in der Regel zwischen Passage 20 und 25 verwendet.

Die Zellzahlbestimmung fand, wie bei den HGF-Zellen beschrieben, mit Hilfe der Neubauerzählkammer statt.

Als Nährmedium wurde RPMI-1640 Medium (ATCC<sup>®</sup>, Manassas, US) mit einem Zusatz von 0,05mM β-Mercaptoethanol, 10% FCS sowie je 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) und Fungizone verwendet.

Beim Aussäen der THP-1-Zellen in Co-Kultur mit den HGF-Zellen wurde auf die Zugabe von β-Mercaptoethanol im RPMI-Medium verzichtet, um die HGF-Zellen nicht zu schädigen (RPMI-Medium<sup>β</sup>).

Das Medium wurde vor der Zugabe zu den Zellkulturen in benötigter Menge stets im Wasserbad erwärmt.

## 2.3. Versuchsablauf

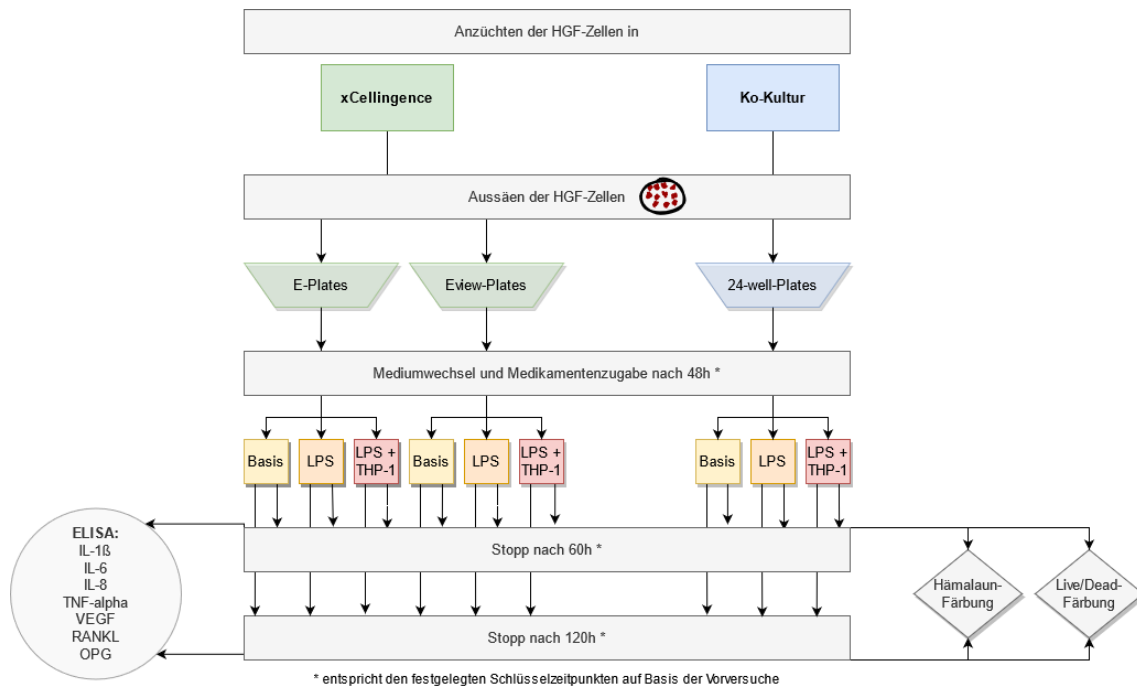


Abbildung 3 Flussdiagramm zur Übersichtsdarstellung des Hauptversuchsablaufes der xCelligence-Versuche mit Ko-Kultivierung und anschließender Färbungen (L/D und Hämalaun) sowie Zytokinmessungen der Mediumüberstände.

Eine schematische Darstellung des Hauptversuchsablaufes ist der Abbildung 3 zu entnehmen. Mit Hilfe des xCelligence-Gerätes wurden Zelladhäsionskurven der HGF-Zellen ermittelt, wodurch die Dosis-Wirkung-Beziehung unterschiedlicher Medikamente und deren Kombinationen dargestellt werden konnte (Basis-Versuchsansatz). In einem weiteren Versuchsansatz (LPS-Versuchsansatz) erfolgte die zusätzliche Stimulation und damit die Stresssimulation der HGF-Zellen durch Zugabe von Lipopolysacchariden (InvivoGen, San Diego, US) sowie in einem dritten Versuchsansatz (LPS + THP-1-Versuchsansatz) die immunologische Stresssimulation durch zusätzliche Ko-Stimulation mit THP-1-Zellen. Die Kurvenverläufe der HGF-Zellen wurden anschließend ausgewertet: zum einen wurde durch Summation der gemessenen Zellindices pro Kurvenverlauf die Zellviabilität der HGF-Zellen abgebildet und mit den Kontrollkurven verglichen, zum anderen erfolgte die Berechnung der Änderungsrate des Zellindex für die HGF-Zellen (Slope, Steigung) über einen definierten Zeitpunkt. Zur Generierung eines vermehrten Überstandes und für

Färbungen wurde zusätzlich eine Ko-Kultivierung in 24-well-Platten vorgenommen.

Nach Ablauf der xCelligence-Versuchsansätze und zu definierten Zeitpunkten für die Färbungen wurden die Überstände des Mediums abpipettiert und eingefroren. Die Überstände wurden für ELISA-Untersuchungen der Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 sowie Zytokine TNF-alpha, VEGF, RANKL und OPG verwendet. Ergänzend wurden ein Indirektes Scratch-Assay sowie ein EZ4U-Test vorgenommen.

*Tabelle 1 Versuchsansätze mit Kontrollen sowie unterschiedlichen Konzentrationen der verwendeten Medikamente*

<b>Medikation</b>	<b>Konz. 1</b>	<b>Konz. 2</b>	<b>Konz. 3</b>
Kontrolle			
Zoledronat	50 $\mu$ M	5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M
Denosumab	40 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	3 $\mu$ g/ml
Zoledronat + Denosumab		5 $\mu$ M + 10 $\mu$ g/ml	0.5 $\mu$ M + 3 $\mu$ g/ml
Zoledronat + Sunitinib		5 $\mu$ M + 100 ng/ml	0.5 $\mu$ M + 50 ng/ml
Zoledronat + Sorafenib		5 $\mu$ M + 5 $\mu$ g/ml	0.5 $\mu$ M + 0.5 $\mu$ g/ml
Zoledronat + Bevacizumab		5 $\mu$ M + 80 $\mu$ g/ml	0.5 $\mu$ M + 20 $\mu$ g/ml
Zoledronat + Sirolimus		5 $\mu$ M + 100 ng/ml	0.5 $\mu$ M + 5 ng/ml
Denosumab + Bevacizumab		10 $\mu$ g/ml + 80 $\mu$ g/ml	3 $\mu$ g/ml + 20 $\mu$ g/ml
LPS Kontrolle			
LPS Zoledronat	50 $\mu$ M	5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M
LPS Denosumab	40 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	3 $\mu$ g/ml
LPS Zoledronat + Denosumab		5 $\mu$ M + 10 $\mu$ g/ml	0.5 $\mu$ M + 3 $\mu$ g/ml
LPS Zoledronat + Sunitinib		5 $\mu$ M + 100 ng/ml	0.5 $\mu$ M + 50 ng/ml
LPS Zoledronat + Sorafenib		5 $\mu$ M + 5 $\mu$ g/ml	0.5 $\mu$ M + 0.5 $\mu$ g/ml
LPS Zoledronat + Bevacizumab		5 $\mu$ M + 80 $\mu$ g/ml	0.5 $\mu$ M + 20 $\mu$ g/ml
LPS Zoledronat + Sirolimus		5 $\mu$ M + 100 ng/ml	0.5 $\mu$ M + 5 ng/ml
LPS Denosumab + Bevacizumab		10 $\mu$ g/ml + 80 $\mu$ g/ml	3 $\mu$ g/ml + 20 $\mu$ g/ml
THP-1 LPS Kontrolle			
THP-1 LPS Zoledronat	50 $\mu$ M	5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M
THP-1 LPS Denosumab	40 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	3 $\mu$ g/ml
THP-1 LPS Zoledronat + Denosumab		5 $\mu$ M + 10 $\mu$ g/ml	0.5 $\mu$ M + 3 $\mu$ g/ml
THP-1 LPS Zoledronat + Sunitinib		5 $\mu$ M + 100 ng/ml	0.5 $\mu$ M + 50 ng/ml
THP-1 LPS Zoledronat + Bevacizumab		5 $\mu$ M + 80 $\mu$ g/ml	0.5 $\mu$ M + 20 $\mu$ g/ml

### **2.3.1. xCelligence-Versuche (E-plates, Eview-plates)**

Um die gezüchteten HGF-Zellen aus den Kulturflaschen in die E-Plates auszusäen, wurde zunächst das Medium aus den Flaschen abgesaugt und diese anschließend mit jeweils 5ml PBS gespült. Nach Zugabe von 2ml Trypsin folgte eine zehninminütige Inkubationszeit. Mit jeweils 3ml Medium wurde die Trypsinaktivität gestoppt und die Zellsuspension gut gemischt in ein Röhrchen gegeben. Zur Zellzählung wurden 20µl dieser Suspension entnommen und mit Hilfe der Neubauerzählkammer gezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 7min bei 1400rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem HGF-Medium aufgenommen, so dass in 50µl Medium ca. 4000 Zellen enthalten waren.

In die E-plates wurden je 50µl der Zellsuspension pipettiert. Nach einer Wartezeit von 30-60min konnten die E-Plates in das RTCA-Gerät platziert und die Messung nach Programmieren des Step 2 (1000 Sweeps, alle 15min) gestartet werden.

Nach ca. 48 Stunden erfolgte die Zugabe der Medikamente, die in Form eines Medienwechsels ablief. Die Medikamente wurden nach Bedarf in HGF-Medium verdünnt. Jede hergestellte Lösung wurde hierfür mittels Vortex gut gemischt. Anschließend wurden die Messungen der RTCA-Software pausiert, so dass die E-Plates einzeln aus dem RTCA-Gerät entnommen werden konnten. Das Medium in den Wells wurde abpipettiert und 150µl frisches Medium mit dem Medikamentenzusatz in gewünschter Konzentration zugegeben. Als Kontrolle liefen bei jedem E-Plate zwei Wells ohne Medikamentenzusätze mit. Nach Medienzugabe konnten die E-Plates in das RTCA-Gerät gesetzt und die Messungen fortgesetzt werden. Die Zelladhäsion wurde über weitere 72- 100 Stunden gemessen.

Die Eview-plates wurden jeweils nach 40, 60 oder 120 Stunden gestoppt, fixiert und mit Hämalun oder LIVE/DEAD gefärbt.

Zur Demonstration einer Referenzkurve des induzierten Zelltodes der HGF-Zellen im xCelligence wurde zudem ein kontrollierter Zelltod generiert. Es wurden beim Medienwechsel nach 48 Stunden nachweislich zytotoxische Mittel beigefügt. Es handelte sich um vier unterschiedliche Substanzen, die zu einem forcierten Absterben der HGF-Zellen geführt haben: Kupfersulfat (Merck KGaA,



Darmstadt, DE), das Aminoglykosid-Antibiotikum G418-BC (Biochrom GmbH, Berlin, DE), das Nukleosid-Antibiotikum Puromycin (MerckKGa, Darmstadt, DE) und Lithocholsäure (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, DE).

### **2.3.2. xCelligence-Versuche (E-plates, Eview-plates) mit THP-1-Zellen**

Um die gezüchteten HGF-Zellen aus den Kulturflaschen in die E -Plates auszusäen, wurde zunächst das Medium aus den Flaschen abgesaugt und diese anschließend mit jeweils 5ml PBS gespült. Nach Zugabe von 2ml Trypsin folgte eine zehnminütige Inkubationszeit. Mit jeweils 3ml Medium wurde die Trypsinaktivität gestoppt und die Zellsuspension gut gemischt in ein BlueCap gegeben. Zur Zellzählung wurden 20 $\mu$ l dieser Suspension entnommen und mit Hilfe der Neubauerzählkammer gezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 7min bei 1400rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem RPMI-Medium ohne Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol (RPMI-Medium <sup>$\beta$</sup> ) aufgenommen, so dass in 50 $\mu$ l ca. 4000 Zellen enthalten waren.

In die E-Plates wurden jeweils 50 $\mu$ l der Zellsuspension pipettiert. Nach einer Wartezeit von 30-60min wurden die E-Plates in das RTCA-Gerät gesetzt und die Messung nach Programmieren des Step 2 (1000 Sweeps, alle 15min) gestartet. Nach ca. 48 Stunden erfolgte bei diesem Versuchsablauf nicht nur die Zugabe der Medikamente in Form eines Medienwechsels, sondern auch die Zugabe der THP-1-Zellen. Hierzu wurden wiederum zuvor die Medikamente nach Bedarf in RPMI-Medium <sup>$\beta$</sup>  verdünnt, bis die gewünschten Konzentrationen erreicht wurden. Jede Lösung wurde mittels Vortex gut gemischt.

Die THP-1-Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt und den Flaschen entnommen. Sie wurden daraufhin unter gleichen Bedingungen wie die HGF-Zellen gezählt und zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurde frisches RPMI-Medium ohne Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol (RPMI-Medium <sup>$\beta$</sup> ) hinzugefügt, so dass 75 $\mu$ l ca. 40000 Zellen enthielten.

Anschließend wurden die Messungen der RTCA-Software pausiert, so dass die E-plates einzeln aus dem RTCA-Gerät entnommen werden konnten. Das Medium in den Wells wurde mit Hilfe einer 200 $\mu$ l-Pipette abpipettiert und zunächst 75 $\mu$ l frisches Medium mit dem Medikamentenzusatz in doppelter Konzentration hinzugeben. In jedes Well wurde zusätzlich 75 $\mu$ l der THP-1-

Zellsuspension zugefügt. Zur räumlichen Trennung der THP-1-Zellen von den HGF-Zellen wurden Inserts (E-plate Inserts, ACEA Biosciences Inc.) verwendet. Als Kontrolle liefen bei jedem E-Plate zwei Wells ohne Medikamentenzusatz mit. Nach Medien- und Zellzugabe konnten die E-plates wieder in das RTCA-Gerät gesetzt und die Messungen fortgesetzt werden. Die Zelladhäsion wurde über weitere 72-100 Stunden gemessen.

Die Eview-plates wurden jeweils nach 40, 60 oder 120 Stunden gestoppt und mit Hämalaun oder LIVE/DEAD gefärbt.

### ***2.3.3. Ko-Kultivierung (24-well-Platten)***

Für eine bessere histologische Darstellung wurden HGF-Zellen parallel zu den E- und Eview-Plates in 24-Well-Platten kultiviert und nach 48 Stunden mit Medikamenten versetzt. Nach zuvor definierten Zeitpunkten (40, 60 und 120 Stunden) wurden diese dann mit LIVE/DEAD oder Hämalaun gefärbt.

Die Ernte der HGF-Zellen aus den Zellkulturflaschen erfolgte hier wie bereits in 2.3.1. beschrieben.

Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem HGF-Medium aufgenommen, so dass in 300µl ca. 25000 Zellen enthalten waren. Die Zellsuspension wurde in die betreffenden Wells verteilt und diese daraufhin jeweils auf 600µl mit HGF-Medium aufgefüllt.

Nach ca. 48 Stunden erfolgte die Zugabe der Medikamente, die in Form eines Medienwechsels ablief. Es wurden zuvor die Medikamente nach Bedarf in HGF-Medium verdünnt, bis die gewünschten Konzentrationen erreicht wurden. Jede Lösung wurde mittels Vortex gut gemischt.

Das Medium in den 24-Well-Platten wurde abgesaugt und 600µl frisches Medium mit dem Medikamentenzusatz in gewünschter Konzentration hinzugeben. Als Kontrolle liefen bei jeder 24-Well-Platte zwei Wells ohne Medikamentenzusatz mit. Nach Medienzugabe wurden die Platten wieder im Brutschrank inkubiert.

In der Folge wurden sie nach 40, 60 oder 120 Stunden gefärbt und fotografiert.

### ***2.3.4. Ko-Kultivierung (24-well-Platten) mit THP-1-Zellen***

Auch für diesen Versuch wurden die gezüchteten HGF-Zellen aus den Kulturflaschen in 24-Well-Platten ausgesät (siehe 2.3.1.).

Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet nun in frischem RPMI-Medium ohne Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol (RPMI-Medium <sup>$\beta$</sup> ) aufgenommen, so dass in 30 $\mu$ l ca. 25000 Zellen enthalten waren. Die Zellsuspension wurde in die betreffenden Wells verteilt und diese daraufhin jeweils auf 600 $\mu$ l mit RPMI-Medium <sup>$\beta$</sup>  aufgefüllt.

Nach ca. 48 Stunden erfolgte die Zugabe der Medikamente in Form eines Medienwechsels mit der Zugabe von THP-1-Zellen. Die Medikamente wurden nach Bedarf in RPMI-Medium <sup>$\beta$</sup>  verdünnt, bis die gewünschten Konzentrationen erreicht wurden. Jede Lösung wurde mittels Vortex gut gemischt.

Die THP-1-Zellen wurden den Flaschen entnommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Sie wurden daraufhin unter gleichen Bedingungen wie die HGF-Zellen gezählt und zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurde frisches RPMI-Medium ohne Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol (RPMI-Medium <sup>$\beta$</sup> ) hinzugefügt, so dass 150 $\mu$ l ca. 200000 Zellen enthielten.

Das Medium in den 24-well-Platten wurde zunächst abgesaugt und 300 $\mu$ l frisches Medium mit dem Medikamentenzusatz in gewünschter Konzentration hinzugeben. Anschließend wurden Inserts (ThinCert™ Inserts für 24-well-Platten (Art.-Nr. 662641), Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE Bio-One) in die einzelnen Wells eingesetzt, in die 150 $\mu$ l der Zellsuspension pipettiert wurde und nachfolgend 150 $\mu$ l der jeweiligen Medikamentenlösung. Bei jeder 24-well-Platte haben ein bis zwei Wells ohne Zusätze von Medikamenten als Kontrolle fungiert.

Nach Medienzugabe wurden die Platten wieder im Brutschrank platziert.

In der Folge wurden sie nach 40, 60 oder 120 Stunden gefärbt und fotografiert.

### **2.3.5. Indirekter Scratch**

Der indirekte Scratch simuliert eine offene Wunde und zeigt damit die Migration sowie Fähigkeit zur Wundheilung unter Medikamenteneinfluss.

Für diesen Versuch wurden sowohl Eview-Plates als auch 24-Well-Platten kultiviert. Das Vorgehen der Verifikation der Eview-Plates ist, wie in Kapitel 2.3.1. beschrieben, durchgeführt worden.

Bei diesem Versuch wurden die Medikamentenlösungen nun direkt bei der Kultivierung der Zellen hinzugegeben. Hierfür wurden zuvor die Medikamente

nach Bedarf in HGF-Medium verdünnt, bis die gewünschten Konzentrationen erreicht wurden. Jede Lösung wurde mittels Vortex gut gemischt.

Um die HGF-Zellen aus den Kulturflaschen in die Eview-Plates und die 24-Well-Platten auszusäen, wurde zunächst das Medium aus den Flaschen abgesaugt und diese anschließend mit 5ml PBS gespült. Nach Zugabe von 2ml Trypsin folgte eine zehnmünütige Inkubationszeit. Mit jeweils 3ml Medium wurde die Trypsinaktivität gestoppt und die Zellsuspension gut gemischt in ein BlueCap gegeben. Zur Zellzählung wurden 20 $\mu$ l dieser Suspension entnommen und mit Hilfe der Neubauerzählkammer gezählt. Anschließend wurde sie für 7min bei 1400rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen, so dass in 50 $\mu$ l ca. 4000 Zellen enthalten waren.

In das Eview-Plate wurden dann jeweils 50 $\mu$ l der Zellsuspension pipettiert und in die 24-Well-Platten jeweils 300 $\mu$ l. Im Anschluss wurde direkt zur Zellsuspension bei den Eview-Plate-Wells 50 $\mu$ l der dreifachen Medikamentenkonzentration und bei den 24-Well-Platten jeweils 300 $\mu$ l der doppelten Medikamentenkonzentration pipettiert, sodass die gewünschten Konzentrationen erreicht werden konnten.

Die 24-Well-Platte wurde direkt in den Brutschrank gestellt, die Eview-Plate wurde erst nach einer Wartezeit von 30-60min in das RTCA-Gerät eingesteckt und die Messung nach Programmieren des Step 2 (1000 Sweeps, alle 15min) gestartet. Nach 40 Stunden wurden die Zellen fixiert, gefärbt und fotografiert.

#### **2.4. EZ4U- Assay**

Der EZ4U-Test (Biomedica Medizinprodukte GmbH, Wien, AT) ist ein Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest zur Feststellung der Viabilität der Zellen, der eine Vereinigung des Thymidintests und der MTT-Methode darstellt.

Tetrazoliumsalze, die im Substrat des Assays enthalten sind, werden durch die Mitochondrien der lebenden Zellen in das intensiv gefärbte Formazan-Derivat umgewandelt. Die Extinktion ist anschließend in einem Photometer (Bio-Tek ELx 800) messbar.

Das Test-Kit enthält Substrat, welches mit 2,5ml Aktivator gelöst und auf 37°C erwärmt werden muss.

Die HGF-Zellen wurden in einer 96-Well-Platte angezüchtet. Nach 48 Stunden erfolgte ein Medienwechsel mit Zugabe der unterschiedlichen Medikamentenkombination.

Nach weiteren 12 Stunden Inkubation der Zellen unter Medikamenteneinfluss wurde der Test durchgeführt. In einem Verhältnis von 1:11 wurde Medium mit der zuvor angefertigten Substratlösung gemischt (20ml HGF-Medium und 2 ml Substratlösung). Anschließend wurde in jedes Well jeweils 220µl der Substrat-Medium-Suspension pipettiert. Nach 4 Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurde die Extinktion bei 450nm (620nm als Referenz) gemessen. Der Leerwert (Substrat) wurde von den Messwerten abgezogen.

## **2.5. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Zur Bestimmung der Interleukine und Zytokine wurden Enzym-Immunoassay's (EIA, oder engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)) der Zellkulturüberstände angefertigt. Gemessen wurden dabei die Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 sowie die Signalmoleküle VEGF, TNF, RANKL und OPG.

Grundsätzlich wurde dabei nach den Herstellervorgaben und -protokollen der jeweiligen ELISA-Kits vorgegangen (R&D Systems, Inc., Minneapolis, US sowie Boster Biological Technology, Pleasanton, US). Aufgrund der großen Anzahl der unterschiedlichen Medikamentenkombinationen war es notwendig die ELISA-Versuche pro Interleukin bzw. Signalmolekül in zwei Versuchsansätzen aufzuteilen.

Der detaillierte Versuchsablauf ist der Anlage zu entnehmen.

## **2.6. Histologie**

### **2.6.1. Hämalaun-Färbungen**

Zur Darstellung der Zellkerne und -morphologie wurden die Eview-Plates und 24-Well-Platten nach zuvor definierten Stoppzeiten (40, 60 und 120 Stunden) mit Hämalaun eingefärbt.

Die xCelligence-Messungen mit den Eview-Plates wurden gestoppt und die Platten aus dem RTCA-Gerät entnommen. Alle Überstände wurden daraufhin

sorgfältig abpipettiert und nach Zentrifugation bei -80°C für weitere Versuche eingefroren.

Die Wells wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Formaldehyd (Fischer Otto GmbH&Co. KG, Saarbrücken, DE) für fünf Minuten fixiert. Nach Absaugen des Formaldehyds wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und daraufhin für eine Minute Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt, DE) auf die Zellen gegeben. Abschließend wurde mit Leitungswasser ca. 5 Minuten gebläut, wobei ein- bis zweimal das Wasser gewechselt wurde.

Die gefärbten Zellen wurden daraufhin direkt fotografiert.

### **2.6.2. LIVE/DEAD-Färbungen**

Für diese Färbung wurde das LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US) verwendet. Es ist eine fluoreszierende Färbung, die lebende Zellen im Fluoreszenzmikroskop grün (Live Green, 488/515nm Emission) und absterbende oder bereits tote Zellen rot (Dead Red, 570/602nm Emission) darstellt.

Die Well-Platten wurden für die Färbung zunächst mit PBS gewaschen. In eine 24-Well-Platte wurden anschließend 100µl der Farblösung pro Well pipettiert, in eine Eview-Plate 50µl der Farblösung pro Well. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur waren die Zellen im Fluoreszenzmikroskop darstellbar. Beim Umgang mit der Farblösung wurde stets darauf geachtet, so abgedunkelt wie möglich zu arbeiten.

Bei jeder Färbung liefen zudem Positivkontrollen mit. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Kontroll-Wells mit eiskaltem Ethanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, DE) fixiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurde daraufhin die Farblösung aufgetragen.

## **2.7. Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Eine Gesamtübersicht der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien ist der Anlage zu entnehmen.

### **2.7.1. xCelligence® System**

Für die Impedanz-basierte Zellanalytik wurde das xCelligence® Real-Time Cell Analysis (RTCA) DP Instrument (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, US) verwendet. Zusammen mit den xCelligence E-Plates und xCelligence E-View-Plates (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, US) als 16-Well Kammerobjektträgerplatten bei einem Gesamtvolumen von je  $270\mu\text{l} \pm 10\mu\text{l}$  ermöglicht das System die kontinuierliche Messung der Zelladhäsion alle 15 Minuten bei 20mV. Hierbei wird der dimensionslose Parameter des Zellindex (*CI*) erhoben (ACEA Biosciences, 2013):

$$CI = \frac{(Z_i - Z_0)}{15\Omega}$$

$Z_i$ : Impedanz an einem einzelnen Versuchspunkt

$Z_0$ : Hintergrundmessungen zu Beginn des Experiments

Die hierfür erforderlichen Hintergrundmessungen ( $Z_0$ ) wurden zwei Mal durchgeführt.

In den Grafiken und Auswertungen wird zumeist der Normalisierte Zellindex (NCI) verwendet. Dieser entspricht dem Zellindex zu einem definierten Zeitpunkt dividiert durch den Zellindex zum Normalisierungszeitpunkt.

Die Zellzugabe erfolgte mit einer Konfluenz von ca. 4000 HGF-Zellen pro Well. Für die Versuche mit der Ko-Stimulation mit den THP-1-Zellen wurden spezielle E-Plate Insert 16 (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, US) verwendet.

## **2.8. Statistische Auswertung**

Für die xCelligence-Versuche wurden im Auswertungszeitraum von 72 Stunden ab Medienwechsel die normalisierten Werte der Zellindizes addiert. Anschließend wurden die Summen pro Versuch von Kontrollen und Medikamenten- sowie LPS- und THP-1-Zusatz addiert. In einem 2-stichproben-t-Test (unter der Annahme gleicher Varianz) miteinander verglichen. p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Für die Analyse der Neigung der Kurvenverläufe wurden die berechneten Slope-Werte des xCelligence-Systems der unterschiedlichen Versuchsansätze in

einem 2-stichproben-t-Test (unter Annahme gleicher Varianz) miteinander verglichen. p-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Für die ELISA-Versuche wurden im Auswertungszeitraum nach 12 Stunden (60 Stunden Gesamtinkubation) und 72 Stunden (120 Stunden Gesamtinkubation) die Überstände der Zellkultur abpipettiert und stickstoffgekühlt gelagert. Überstände von vier Zellkulturansätzen wurden gemischt und die Messung der Extinktion erfolgte mit Doppelwerten, so dass der Mittelwert erhoben wurde. Diese wurden in einem 2-stichproben-t-Test (unter Annahme gleicher Varianz) miteinander verglichen. p-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet.

## **2.9. Fehlermanagement**

Vor jeder Inbetriebnahme des xCelligence Systems wurden die einzelnen Komponenten nach Herstellerangaben geprüft. Bei Fehlermeldungen oder Normabweichungen nach Prüfung mit der RTCA-Resistorplatte wurden fehlerhafte Kontaktpins ausgetauscht oder mit dem RTCA-Reinigungssatz gesäubert.

In die E-plates wurde jeweils 50 $\mu$ l blasenfreies Medium gegeben und anschließend für 30 Minuten gleichmäßig temperiert. Danach folgte eine Hintergrund-Messung des xCelligence-System mit einem Sweep pro Minute. Die gemessenen Werte wurden auf der Zellindexseite mit den Normwerten abgeglichen und bei Fehlermeldungen, entsprechende Wells aus der Wertung genommen. Wells, die während den Messungen vor dem Medikamentenwechsel und der Medikamentenzugabe atypische Kurvenverläufe aufzeigten, wurden ebenfalls nicht gewertet.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. xCelligence-Versuche (E-plates, Eview-plates)

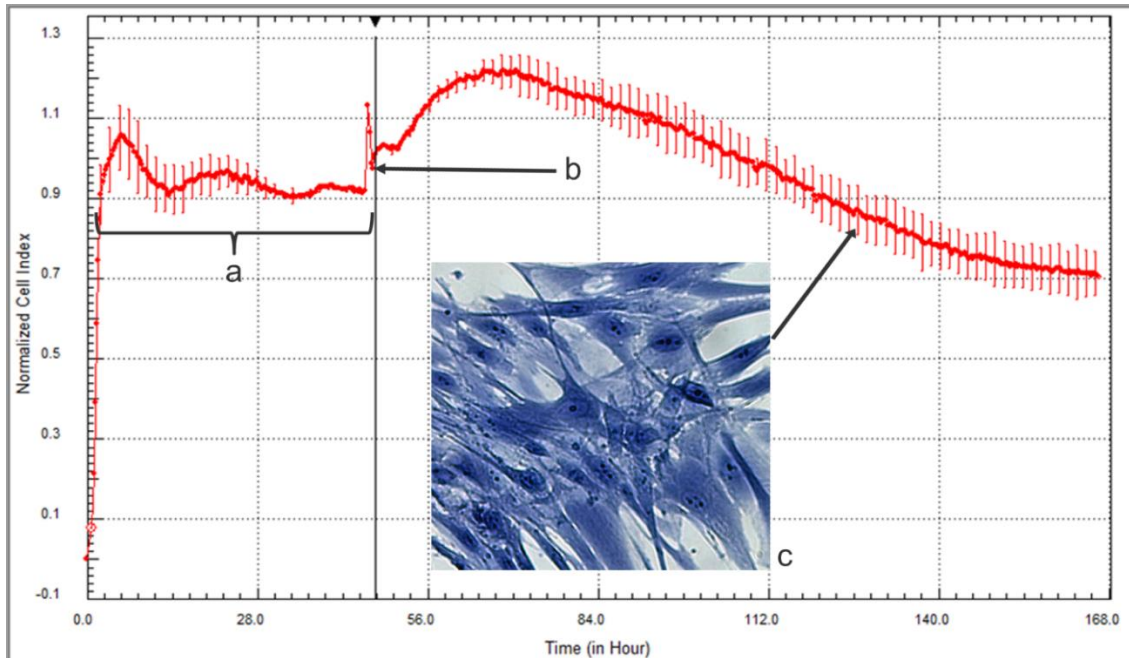


Abbildung 4 xCelligence-Kurve eines Kontrollversuchsansatzes mit normalisiertem Zellindex. (a) beschreibt eine stabile Zellphase mit Monolayer und (b) den Mediumwechsel 46 Stunden. Das eingefügte Bild (c) zeigt ein histomorphologisches Bild von Kontroll-HGF-Zellen

Abbildung 4 zeigt beispielhaft den Kontrollversuchsansatz mit normalisiertem Zellindex. Die HGF haften nach Aussäen (Zeitpunkt 0.0) langsam an dem Wellboden, vermehren sich dort im Sinne des regelhaften Zellzyklus und bilden einen Monolayer aus, wodurch ein leicht wellenförmiger Kurvenverlauf entsteht. Ein Mediumwechsel, der ungefähr zu Stunde 48 durchgeführt wurde, resultiert durch die manuelle Manipulation in einem kleinen Peak im Kurvenverlauf. Als reproduzierbares Fixum wird für die Auswertung der niedrigste Punkt nach dem Peak verwendet, um den Zellindex zu normalisieren. Der Anstieg des Kurvenverlaufes entspricht einer erhöhten Impedanzmessung, die mit einer vermehrten Anhaftung der Zellen durch eine erhöhte Zellzahl und als Zeichen von vitalen Zellen einer effektiveren Adhäsion der Zellen mit dem Wellboden einhergeht. Der Abfall der Kurve circa ab Stunde 120 ist bedingt dadurch, dass im Anschluss kein weiterer Mediumwechsel erfolgt.

Im Folgenden sind für eine bessere Übersicht die Abbildungen der Versuchsansätze ab dem Zeitpunkt des Mediumwechsels dargestellt.

### 3.1.1. Basisversuchsversuchsansatz

Tabelle 2 Statistische Signifikanz der Einzelauswertungen der Summen pro Versuchsansatz der Basisversuche durch die Software JMP. Markierte (\*) Konzentrationen zeigen eine signifikant reduzierte HGF-Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0.05$ )

Medikation	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3
Zoledronat	<b>50 <math>\mu\text{M}</math> *</b>	5 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$
Denosumab	40 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$
Zoledronat + Denosumab		<b>5 <math>\mu\text{M}</math> + 10 <math>\mu\text{g/ml}</math> *</b>	0.5 $\mu\text{M}$ + 3 $\mu\text{g/ml}$
Zoledronat + Sunitinib		<b>5 <math>\mu\text{M}</math> + 100 <math>\text{ng/ml}</math> *</b>	0.5 $\mu\text{M}$ + 50 $\text{ng/ml}$
Zoledronat + Sorafenib		<b>5 <math>\mu\text{M}</math> + 5 <math>\mu\text{g/ml}</math> *</b>	<b>0.5 <math>\mu\text{M}</math> + 0.5 <math>\mu\text{g/ml}</math> *</b>
Zoledronat + Bevacizumab		<b>5 <math>\mu\text{M}</math> + 80 <math>\mu\text{g/ml}</math> *</b>	<b>0.5 <math>\mu\text{M}</math> + 20 <math>\mu\text{g/ml}</math> *</b>
Zoledronat + Sirolimus		<b>5 <math>\mu\text{M}</math> + 100 <math>\text{ng/ml}</math> *</b>	<b>0.5 <math>\mu\text{M}</math> + 5 <math>\text{ng/ml}</math> *</b>
Denosumab + Bevacizumab		10 $\mu\text{g/ml}$ + 80 $\mu\text{g/ml}$	<b>3 <math>\mu\text{g/ml}</math> + 20 <math>\mu\text{g/ml}</math> *</b>

In den Basisversuchen zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe unter dem Einfluss einer hohen Zoledronatkonzentration, unter Kombinationsgabe von Zoledronat mit Denosumab sowie mit Sunitinib in mittlerer Konzentration, von Zoledronat mit Sorafenib, Bevacizumab sowie Sirolimus in mittleren und niedrigen Konzentrationen, von Denosumab mit Bevacizumab in niedriger Konzentration ( $p < 0.05$ ) eine signifikant reduzierte Viabilität der HGF-Zellen.

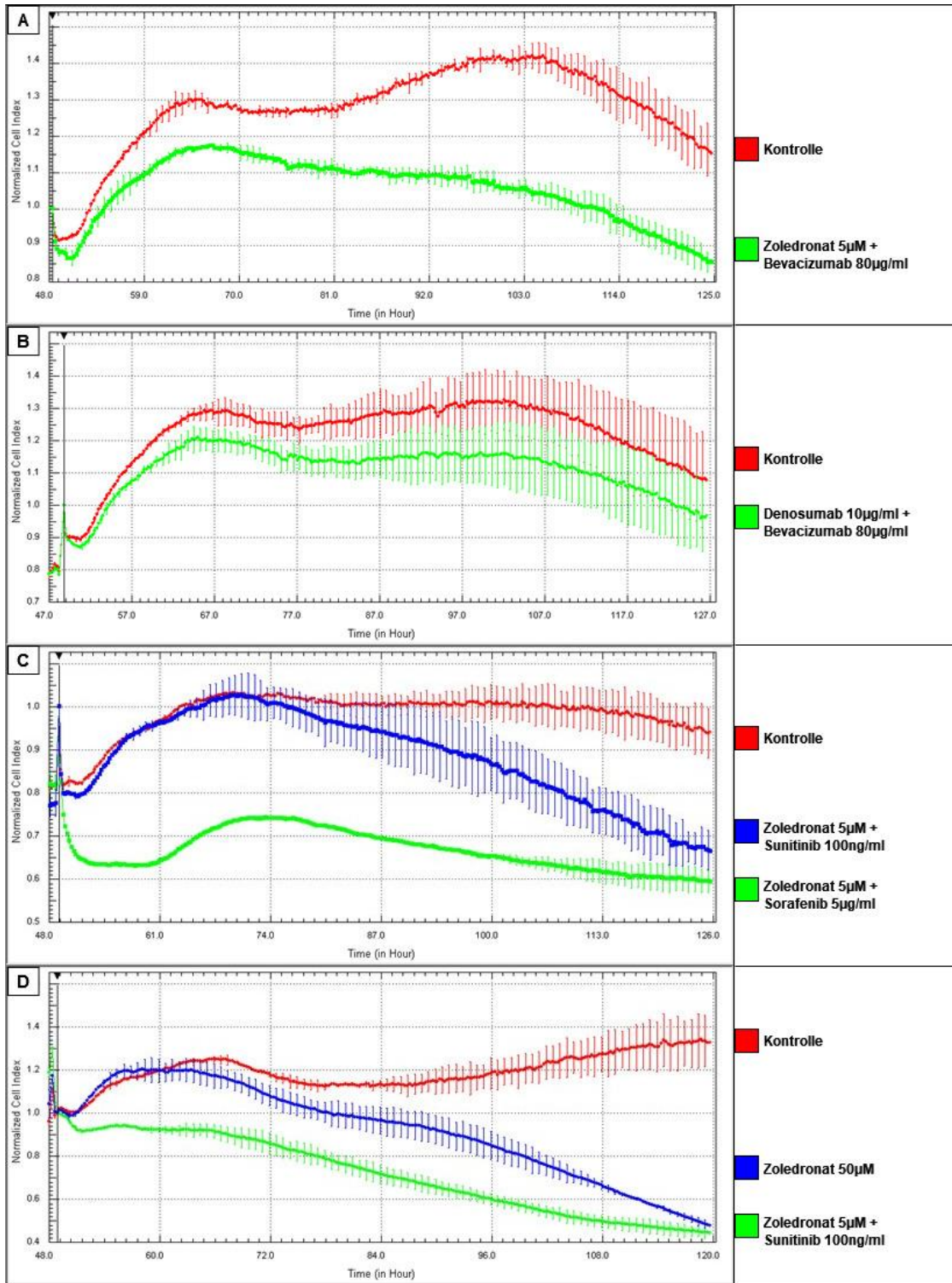


Abbildung 5 Echtzeitüberwachung der Adhärenz von HGF-Zellen nach Konfluenz und Exposition durch Antiresorptiva und TCT in verschiedenen Konzentrationen. Die Zellkurve beschreibt die Mittelwerte der Zellimpedanz und die Standardabweichung nach dem Medienwechsel (Zeitpunkt 48h nach Aussaat der Zellen) bis 120/125 Stunden nach Aussaat der Zellen, abgebildeter Beobachtungszeitraum sind demnach 72-77 Stunden. Abgebildet sind die Adhärenzkurven der Kontrollen (rot) und

(A) Zoledronat 5 $\mu$ M + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (grün)  
 (B) Denosumab 10 $\mu$ g/ml + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (grün)  
 (C) Zoledronat 5 $\mu$ M + Sorafenib 5 $\mu$ g/ml (grün), Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml (blau)  
 (D) Zoledronat 50 $\mu$ M (blau), Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml (grün).

### 3.1.2. LPS-Versuchsansatz

Tabelle 3 Statistische Signifikanz der Einzelauswertungen der Summen pro Versuchsansatz der Versuche mit Ko-Stimulation durch LPS durch die Software JMP. Markierte (\*) Konzentrationen zeigen eine signifikant reduzierte HGF-Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle

Medikation	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3
LPS Zoledronat	<b>50 µM *</b>	5 µM	0.5 µM
LPS Denosumab	40 µg/ml	10 µg/ml	3 µg/ml
LPS Zoledronat + Denosumab		<b>5 µM + 10 µg/ml *</b>	0.5 µM + 3 µg/ml
LPS Zoledronat + Sunitinib		<b>5 µM + 100 ng/ml *</b>	0.5 µM + 50 ng/ml
LPS Zoledronat + Sorafenib		<b>5 µM + 5 µg/ml *</b>	<b>0.5 µM + 0.5 µg/ml *</b>
LPS Zoledronat + Bevacizumab		<b>5 µM + 80 µg/ml *</b>	<b>0.5 µM + 20 µg/ml *</b>
LPS Zoledronat + Sirolimus		<b>5 µM + 100 ng/ml *</b>	0.5 µM + 5 ng/ml
LPS Denosumab + Bevacizumab		<b>10 µg/ml + 80 µg/ml *</b>	3 µg/ml + 20 µg/ml

In den Versuchen mit Ko-Stimulation durch LPS zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant reduzierte Viabilität der HGF-Zellen unter Einfluss von hoher Zoledronatkonzentration, unter Kombinationsgabe von Zoledronat mit Denosumab, Sunitinib, Sirolimus sowie Denosumab mit Bevacizumab in mittlerer Konzentration, von Zoledronat mit Sorafenib sowie Bevacizumab in mittleren und niedrigen Konzentrationen ( $p < 0.05$ ).



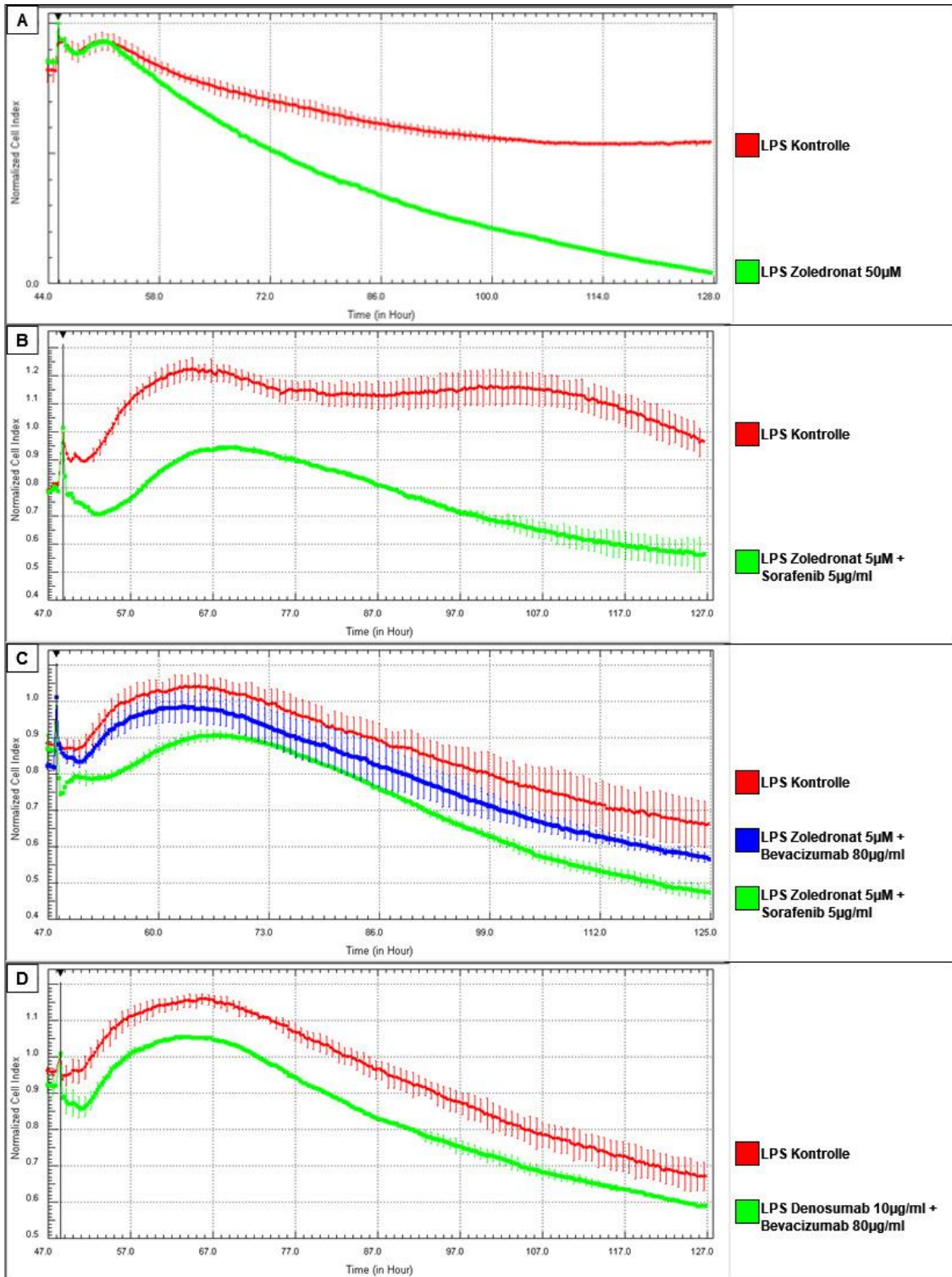


Abbildung 6 Echtzeitüberwachung der Adhärenz von HGF-Zellen nach Konfluenz und Exposition durch Antiresorptiva und TCT in verschiedenen Konzentrationen unter Ko-Stimulation durch LPS. Die Zellkurve beschreibt die Mittelwerte der Zellimpedanz und die Standardabweichung nach dem Medienwechsel (Zeitpunkt 48h nach Aussat der Zellen) bis 120/127 Stunden nach Aussat der Zellen, abgebildeter Beobachtungszeitraum sind demnach 72-77 Stunden. Abgebildet sind die Adhärenzkurven der LPS Kontrollen (rot) und  
 (A) LPS Zoledronat 50µM (grün)  
 (B) LPS Zoledronat 5µM + Sorafenib 5µg/ml (grün)

(C) LPS Zoledronat 5µM + Sorafenib 5µg/ml (grün), LPS Zoledronat 5µM + Bevacizumab 80µg/ml (blau)  
 (D) LPS Denosumab 10µg/ml + Bevacizumab 80µg/ml (grün)

### 3.1.3. LPS/THP-1-Versuchsansatz

Tabelle 4 Statistische Signifikanz der Einzelauswertungen der Summen pro Versuchsansatz der Versuche mit Ko-Stimulation durch LPS und Ko-Kultivierung von THP-1-Zellen durch die Software JMP. Markierte (\*) Konzentrationen zeigen eine signifikant reduzierte HGF-Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle

Medikation	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3
THP-1 LPS Zoledronat	50 µM *	5 µM *	0.5 µM *
THP-1 LPS Denosumab	40 µg/ml *	10 µg/ml *	3 µg/ml *
THP-1 LPS Zoledronat + Denosumab		5 µM + 10 µg/ml *	0.5 µM + 3 µg/ml *
THP-1 LPS Zoledronat + Sunitinib		5 µM + 100 ng/ml *	0.5 µM + 50 ng/ml *
THP-1 LPS Zoledronat + Bevacizumab		5 µM + 80 µg/ml *	0.5 µM + 20 µg/ml *

In den Versuchen mit Ko-Stimulation durch LPS und THP-1-Zellen zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS+THP-1-Zellen eine signifikant reduzierte Viabilität der HGF-Zellen unter Einfluss aller Medikamentenkombinationen ( $p < 0.05$ ). Besonders auffällig sind auch hier hohe Konzentrationen von Zoledronat sowie die Kombinationen von den AR mit Sunitinib und Bevacizumab (s. Abb. 7).

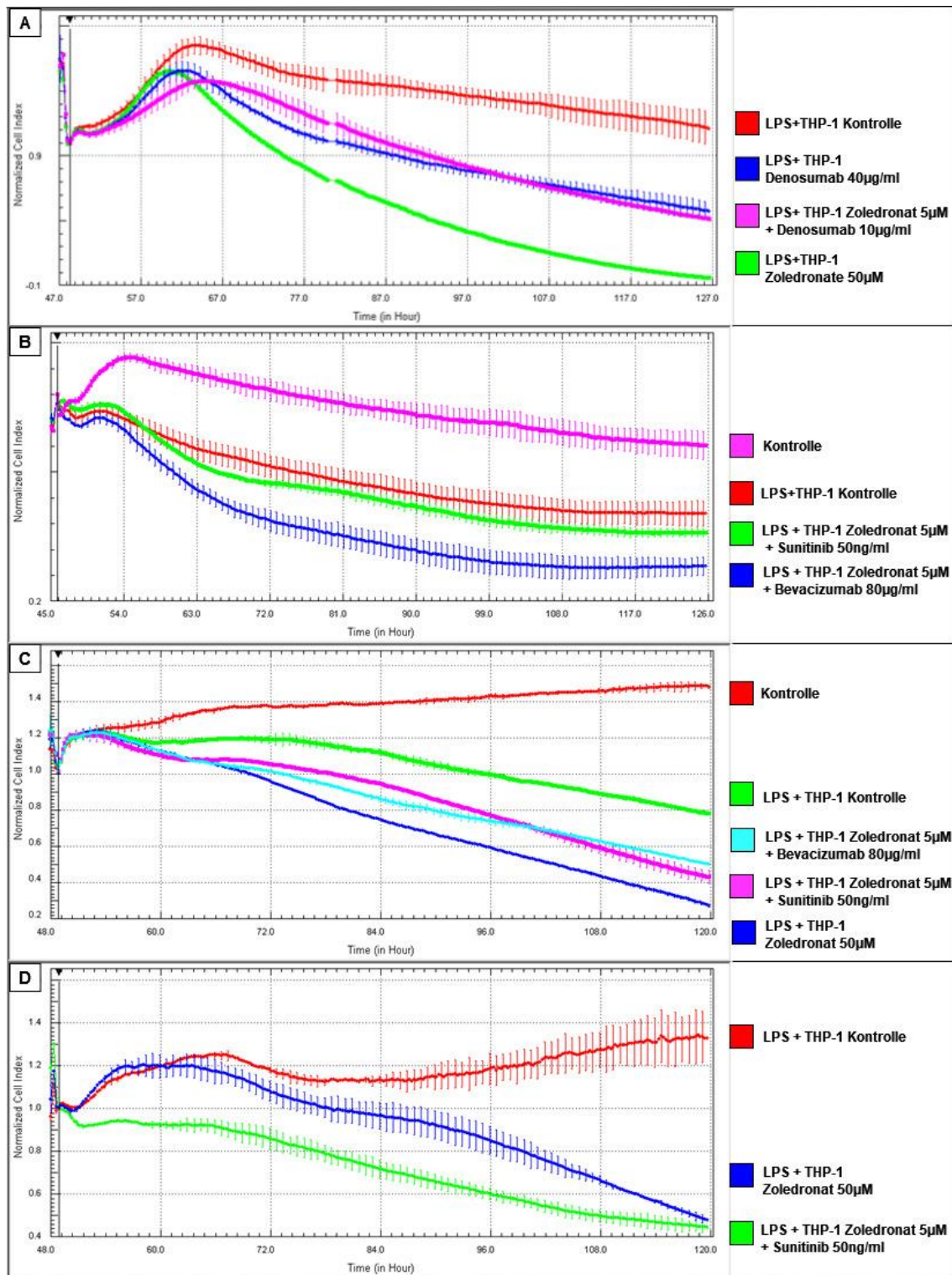


Abbildung 7 Echtzeitüberwachung der Adhärenz von HGF-Zellen nach Konfluenz und Exposition durch Antiresorptiva und targeted therapies in verschiedenen Konzentrationen unter Ko-Stimulation durch LPS und THP-1-Zellen. Die Zellkurve beschreibt die Mittelwerte der Zellimpedanz und die Standardabweichung nach dem Medienwechsel (Zeitpunkt 48h nach Aussat der Zellen) bis 120/127 Stunden nach Aussat der Zellen, abgebildeter Beobachtungszeitraum sind demnach 72-77 Stunden. Abgebildet sind die Adhärenzkurven

(A) LPS+THP-1 Kontrolle (rot), LPS+THP-1 Zoledronat 50µM (grün), LPS+THP-1 Denosumab 40µg/ml (blau), LPS+THP-1 Zoledronat 5µM + Denosumab 10µg/ml (pink)

(B) Kontrolle (pink), LPS+THP-1 Kontrolle (rot), LPS+ THP-1 Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml (grün), LPS+THP-1 Zoledronat 5 $\mu$ M + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (blau)  
(C) Kontrolle (rot), LPS+THP-1 Kontrolle (grün), LPS+THP-1 Zoledronat 50 $\mu$ M (blau), LPS+THP-1 Zoledronat 5 $\mu$ M + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (hellblau), LPS+ THP-1 Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml (pink)  
(D) LPS+THP-1 Kontrolle (rot), LPS+THP-1 Zoledronat 50 $\mu$ M (blau), LPS+ THP-1 Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml (grün)

#### **3.1.4. Analyse der Neigung der Kurvenverläufe**

Beurteilung der Zellviabilität mittels der Untersuchung der xCelligence-Kurvenverläufe hinsichtlich ihrer Neigung (slope).

Vergleicht man die Kontrollen der Versuchsansätze Basis (Abb. 8), LPS (Abb. 9) und LPS/THP-1 (Abb. 10) zeigt sich eine statistisch signifikante Differenz zwischen der Kontrolle des Basisversuchs und der Kontrolle unter Einfluss von LPS/THP-1 ( $p < 0.05$ ).



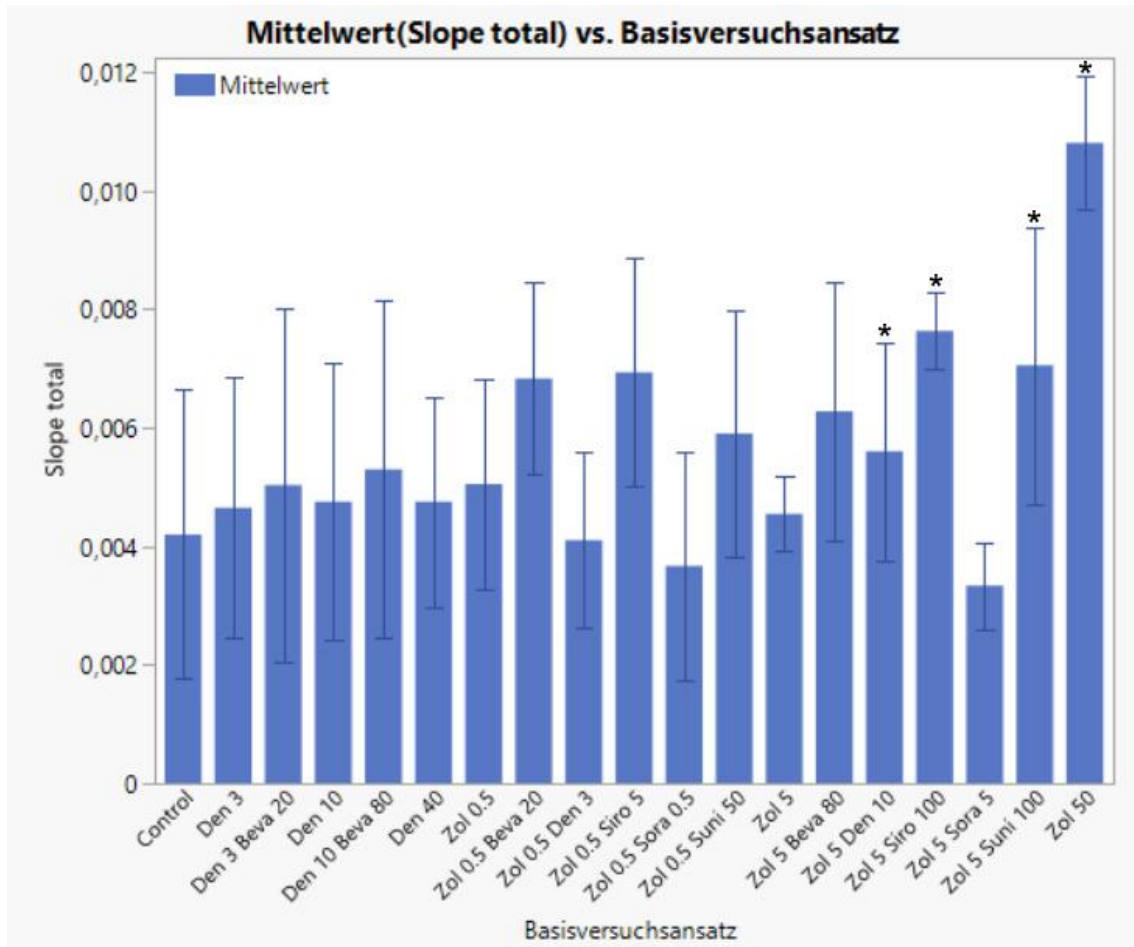


Abbildung 8 Mittelwerte „Slope“ (Steigung des xCelligence-Kurvenverlaufs) des Basisversuchsansatzes einschließlich aller untersuchter Medikamentenkombinationen: Zoledronat 50  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  (Zol 50 / 5 / 0.5); Denosumab 40  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 3  $\mu\text{g/ml}$  (Den 40 / 10 / 3); Kombination von Zoledronat 5 $\mu\text{M}$  + Denosumab 10 $\mu\text{g/ml}$  (Zol 5 Den 10) sowie Zoledronat 0.5  $\mu\text{M}$  + Denosumab 3  $\mu\text{g/ml}$  (Zol 0.5 Den 3), Kombination von Zoledronat 5 $\mu\text{M}$  + Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) sowie Zoledronat 0.5  $\mu\text{M}$  + Sunitinib 50ng/ml (Zol 0.5 Suni 50), Kombination von Zoledronat 5 $\mu\text{M}$  + Sorafenib 5 $\mu\text{g/ml}$  (Zol 5 Sora 5) sowie Zoledronat 0.5  $\mu\text{M}$  + Sorafenib 0.5 $\mu\text{g/ml}$  (Zol 0.5 Sora 0.5); Kombination von Zoledronat 5 $\mu\text{M}$  + Bevacizumab 80 $\mu\text{g/ml}$  (Zol 5 Beva 80) sowie Zoledronat 0.5  $\mu\text{M}$  + Bevacizumab 20  $\mu\text{g/ml}$  (Zol 0.5 Beva 20); Kombination von Zoledronat 5 $\mu\text{M}$  + Sirolimus 100ng/ml (Zol 5 Siro 100) sowie Zoledronat 0.5  $\mu\text{M}$  + Sirolimus 5ng/ml (Zol 0.5 Siro 5); Kombination von Denosumab 10 $\mu\text{g/ml}$  + Bevacizumab 80 $\mu\text{g/ml}$  (Den 10 Beva 80) sowie Denosumab 3  $\mu\text{g/ml}$  + Bevacizumab 20 $\mu\text{g/ml}$  (Den 3 Beva 20); Std.-Abweichung angegeben. \* entspricht signifikanten Werten,  $p < 0.05$ .

Innerhalb des Basisversuchs zeigt sich eine statistisch signifikante Differenz der Steigung zur Kontrolle für hohe Konzentration Zoledronat sowie für die Medikamentenkombinationen von Zoledronat und Sirolimus in mittlerer und niedriger Konzentration und Zoledronat und Sunitinib in mittlerer Konzentration ( $p < 0.05$ ) (Liebaug, 2019).

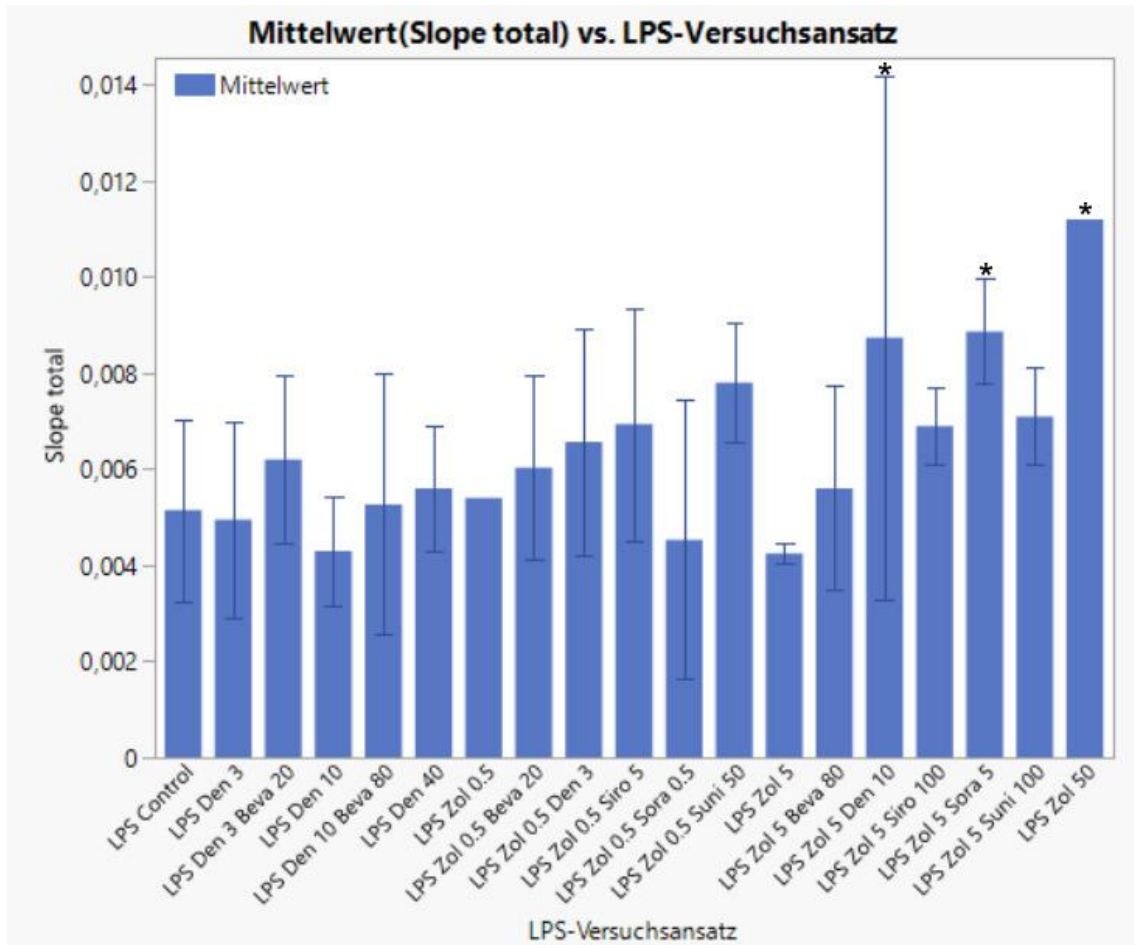


Abbildung 9 Mittelwerte „Slope“ (Neigung des xCelligence-Kurvenverlaufs) des LPS-Versuchsansatzes einschließlich aller untersuchter Medikamentenkombinationen je mit zusätzlicher Endotoxinexposition durch LPS: Zoledronat 50  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M (Zol 50 / 5 / 0.5); Denosumab 40  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 3  $\mu$ g/ml (Den 40 / 10 / 3); Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10) sowie Zoledronat 0.5  $\mu$ M + Denosumab 3  $\mu$ g/ml (Zol 0.5 Den 3), Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Siro 100) sowie Zoledronat 0.5  $\mu$ M + Sunitinib 50ng/ml (Zol 0.5 Siro 50), Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Sorafenib 5 $\mu$ g/ml (Zol 5 Sora 5) sowie Zoledronat 0.5  $\mu$ M + Sorafenib 0.5 $\mu$ g/ml (Zol 0.5 Sora 0.5); Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80) sowie Zoledronat 0.5  $\mu$ M + Bevacizumab 20  $\mu$ g/ml (Zol 0.5 Beva 20); Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Sirolimus 100ng/ml (Zol 5 Siro 100) sowie Zoledronat 0.5  $\mu$ M + Sirolimus 5ng/ml (Zol 0.5 Siro 5); Kombination von Denosumab 10 $\mu$ g/ml + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Den 10 Beva 80) sowie Denosumab 3  $\mu$ g/ml + Bevacizumab 20 $\mu$ g/ml (Den 3 Beva 20); Std.-Abweichung angegeben. \* entspricht signifikanten Werten,  $p < 0.05$ .

Innerhalb des LPS-Versuchsansatzes zeigt sich eine statistisch signifikante Differenz der Neigung zur Kontrolle LPS für die Medikamentenkombinationen von Zoledronat und Sorafenib sowie Zoledronat und Denosumab in mittlerer Konzentration ( $p < 0.05$ ).

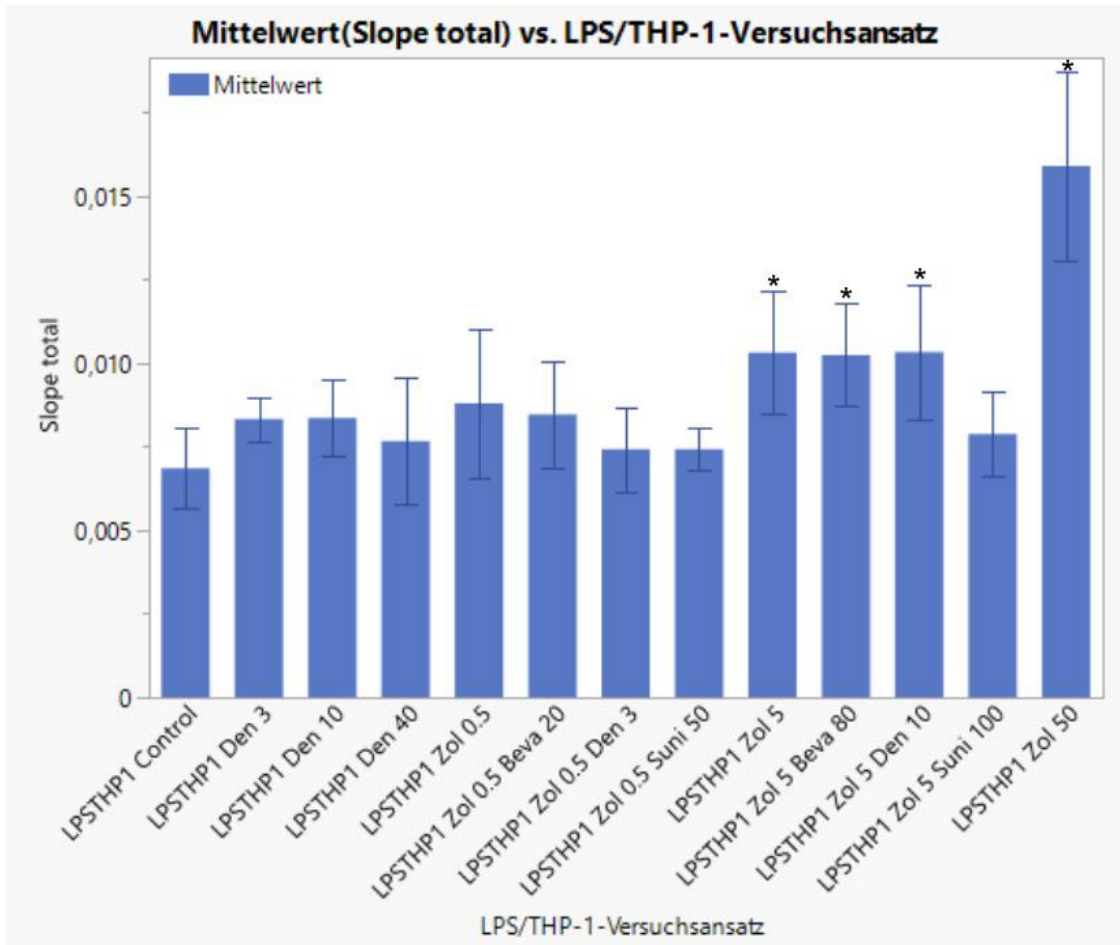


Abbildung 10 Mittelwerte „Slope“ (Neigung des xCelligence-Kurvenverlaufs) des LPS/THP-1-Versuchsansatzes einschließlich aller untersuchter Medikamentenkombinationen je mit zusätzlicher Endotoxinexposition durch LPS sowie Stimulation durch THP-1 Zellen: Zoledronat 50  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M (Zol 50 / 5 / 0,5); Denosumab 40  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 3  $\mu$ g/ml (Den 40 / 10 / 3); Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10) sowie Zoledronat 0,5  $\mu$ M + Denosumab 3  $\mu$ g/ml (Zol 0,5 Den 3), Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suniti 100) sowie Zoledronat 0,5  $\mu$ M + Sunitinib 50ng/ml (Zol 0,5 Suniti 50), Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80) sowie Zoledronat 0,5  $\mu$ M + Bevacizumab 20  $\mu$ g/ml (Zol 0,5 Beva 20); Std.-Abweichung angegeben. \* entspricht signifikanten Werten,  $p < 0,05$ .

Innerhalb des LPS/THP-1-Versuchsansatzes zeigt sich eine statistisch signifikante Differenz der Neigung zur Kontrolle LPS/THP-1 für Zoledronat in hoher und mittlerer Konzentration sowie für die Medikamentenkombinationen von Zoledronat und Bevacizumab sowie Zoledronat und Denosumab in mittlerer Konzentration ( $p < 0,05$ ) (Liebaug, 2019).

### **3.1.5. Zusammenfassung xCelligence-Ergebnisse**

Deckungsgleich in beiden Analysen der xCelligence-Kurvenverläufe der HGF-Zellen ergeben sich statistisch signifikant reduzierte Zellviabilitäten innerhalb des Basisversuchsansatzes unter dem Einfluss von Zoledronat 50µM sowie Zoledronat 5µM + Sunitinib 100ng/ml, Zoledronat 5µM + Sirolimus 100ng/ml und Zoledronat 0.5µM + Sirolimus 5ng/ml;

innerhalb des LPS-Versuchsansatzes unter Zoledronat 5µM + Sorafenib 5µg/ml sowie Zoledronat 5µM + Denosumab 10µg/ml;

innerhalb des LPS/THP-1-Versuchsansatzes unter Zoledronat 5µM, Zoledronat 50µM sowie unter Zoledronat 5µM + Bevacizumab 80µg/ml und Zoledronat 5µM + Denosumab 10µg/ml ( $p < 0.05$ ).

Eine reduzierte Zellviabilität der HGF-Zellen zeigt sich in je einer der Analysen statistisch signifikant unter Einfluss folgender Medikamente und deren Kombinationen:

Im Basisversuch unter Zoledronat 5µM + Denosumab 10µg/ml, Zoledronat 5µM + Sorafenib 5µg/ml, Zoledronat 5µM + Bevacizumab 80µg/ml sowie Denosumab 10µg/ml + Bevacizumab 80µg/ml;

Im LPS-Versuchsansatz unter Zoledronat 50µM sowie unter Zoledronat 5µM + Sunitinib 100µg/ml, Zoledronat 5µM + Sirolimus 100ng/ml, Denosumab 10µg/ml + Bevacizumab 80µg/ml, Zoledronat 5µM + Bevacizumab 80µg/ml und Zoledronat 0.5µM + Bevacizumab 10µg/ml;

Im LPS/THP-1-Versuchsansatz unter allen untersuchten Medikamentenkombinationen ( $p < 0.05$ ).

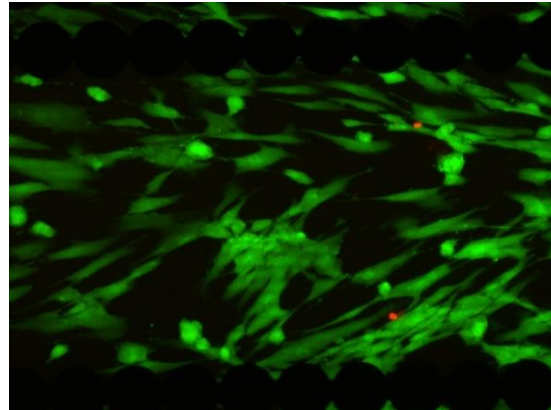
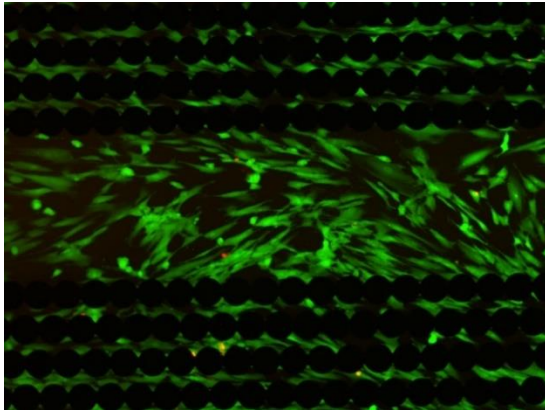
### 3.2. Indirektes Scratch

Tabelle 5 Live/Dead-Färbung der HGF beim Versuch des simulierten indirekten Scratch in Eview-Plates. Basisversuchsansatz unter Exposition von Hohen Dosen Antiresorptiva (Zoledronat 50 $\mu$ M und Denosumab 40 $\mu$ g/ml) sowie unter Kombinationstherapie der Antiresorptiva mit den Targeted Therapies (Zoledronat 5 $\mu$ M mit Sunitinib 100ng/ml und mit Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml) nach 40 Stunden Versuchszeit in 5- und 10-facher Vergrößerung

#### Basisversuchsansatz E-view

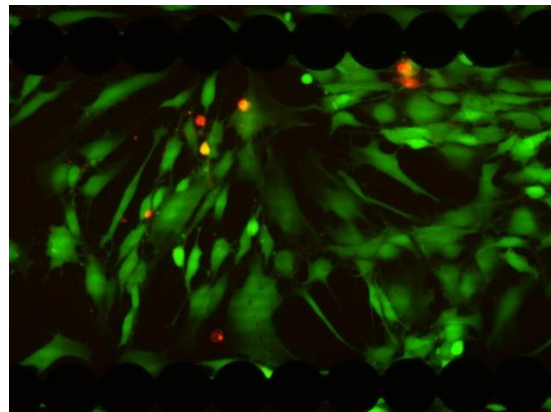
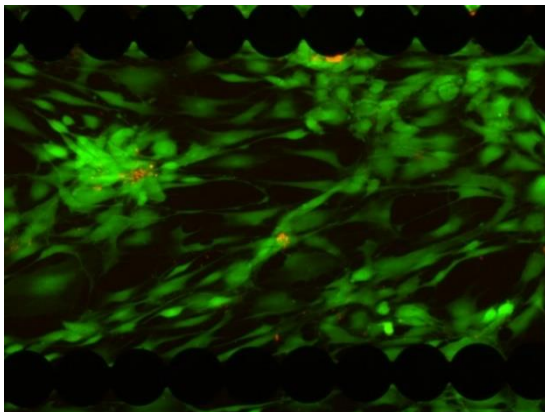
---

##### Kontrolle



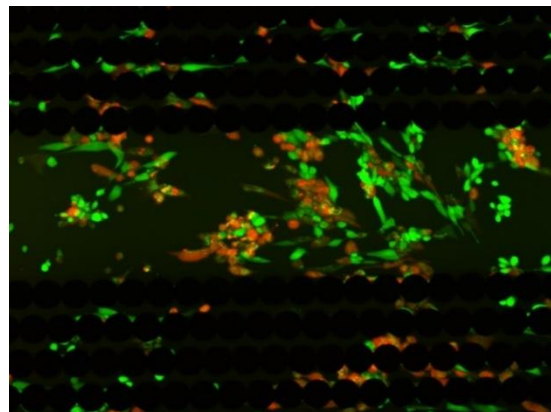
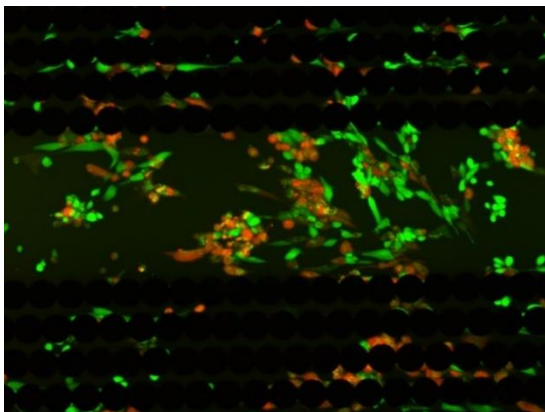
---

##### Zoledronat 50 $\mu$ M



---

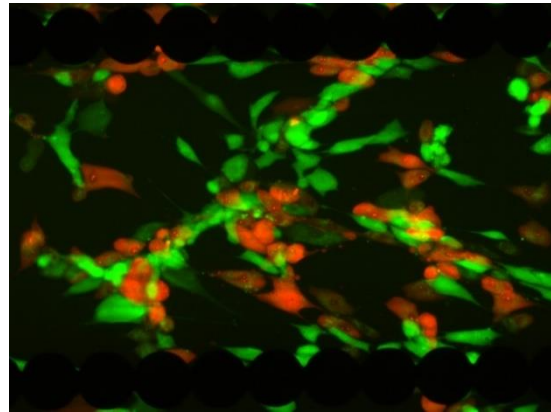
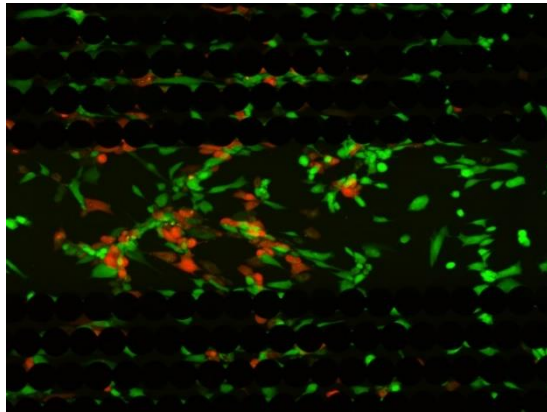
##### Denosumab 40 $\mu$ g/ml





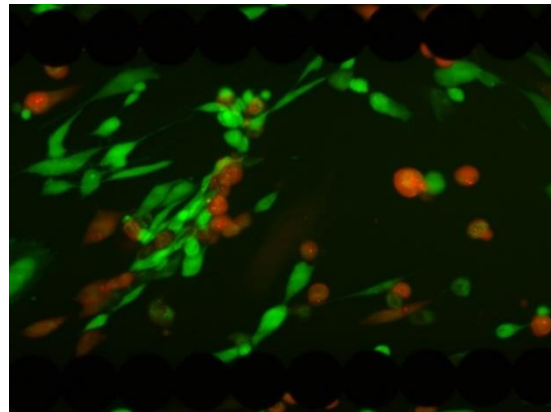
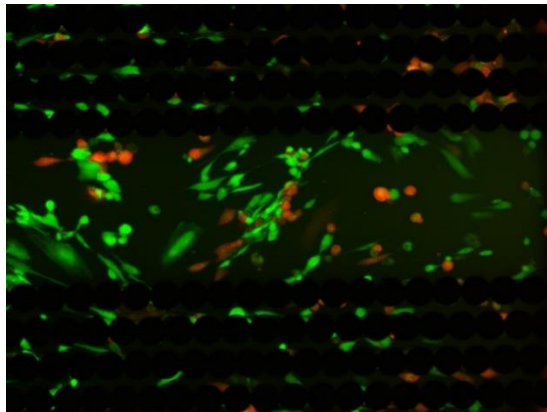
---

**Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml**



---

**Zoledronat 5 $\mu$ M + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml**

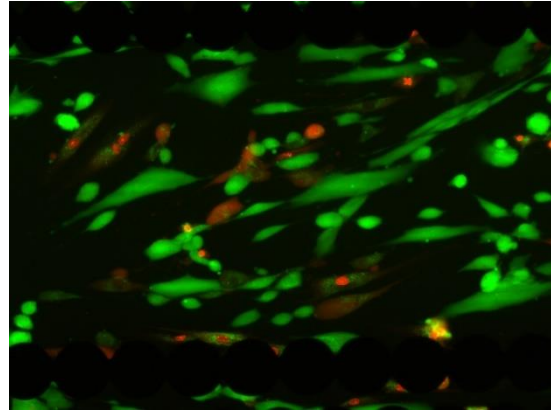
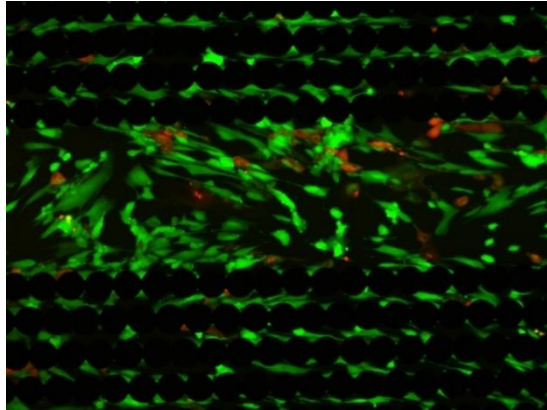


*Tabelle 6 Live/Dead-Färbung der HGF beim Versuch des simulierten indirekten Scratch in Eview-Plates. LPS-Versuchsansatz unter Kombinationstherapie der Antiresorptiva mit den Targeted Therapies (Zoledronat 5µM mit Sunitinib 100ng/ml) sowie unter Einfluss von LPS nach 40 Stunden Versuchszeit in 5- und 10-facher Vergrößerung*

### **LPS-Versuchsansatz E-view**

---

#### **Kontrolle**



---

#### **Zoledronat 5µM + Sunitinib 100ng/ml**

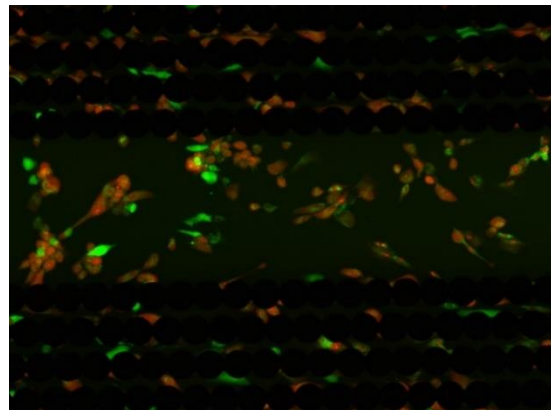
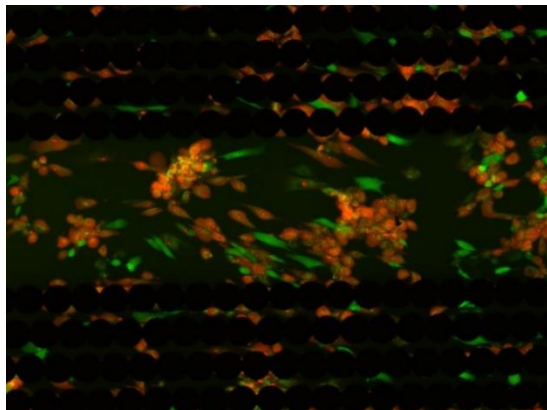
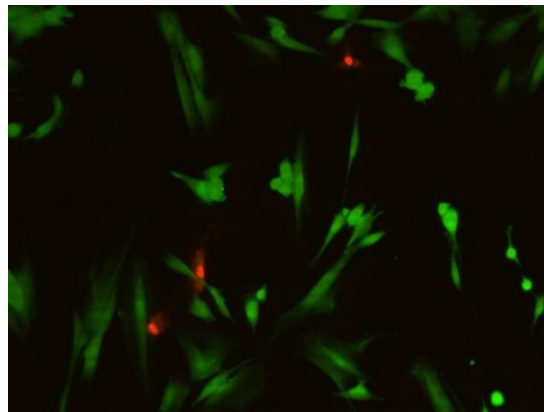
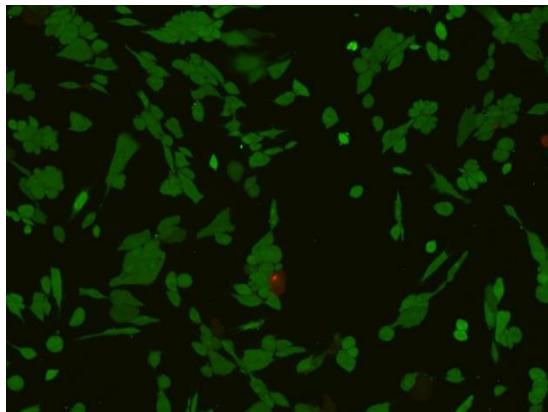


Tabelle 7 Live/Dead-Färbung der HGF beim Versuch des simulierten indirekten Scratch in 24-Well-Platten. Basisversuchsansatz unter Exposition von Hohen Dosen Antiresorptiva (Zoledronat 50 $\mu$ M) sowie unter Kombinationstherapie der Antiresorptiva mit den Targeted Therapies (Zoledronat 5 $\mu$ M mit Sunitinib 100ng/ml und mit Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml) nach 40 Stunden Versuchszeit in 5- und 10-facher Vergrößerung

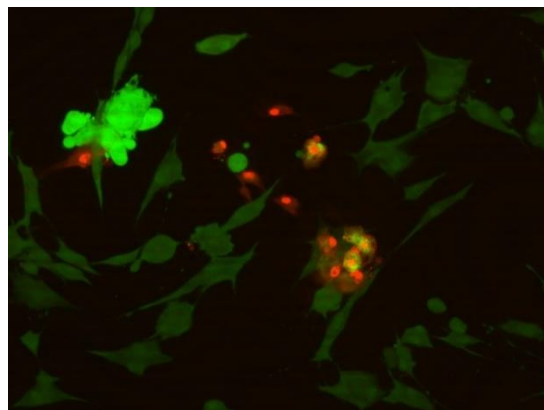
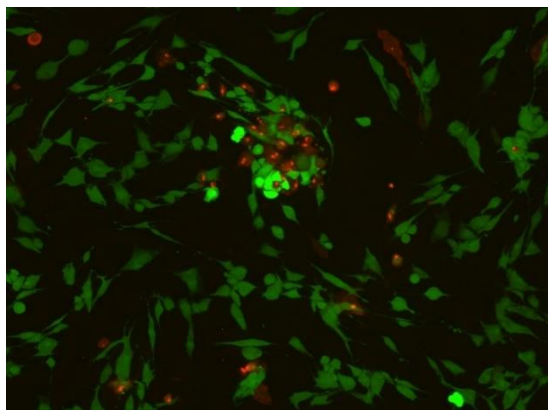
### Basisversuchsansatz 24-Well-Platten

---

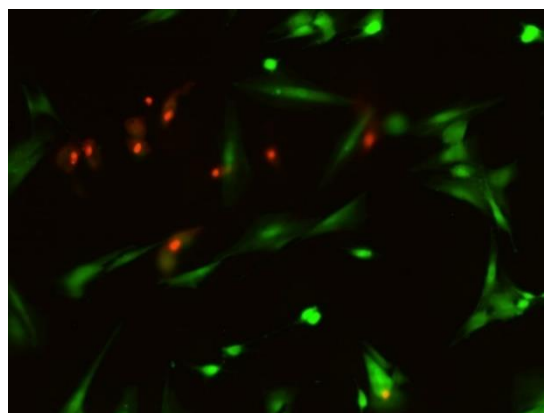
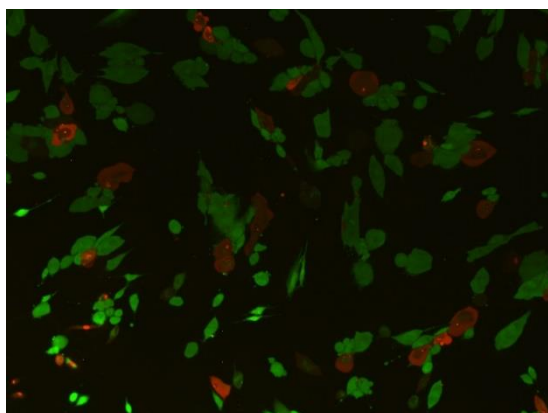
#### Kontrolle



#### Zoledronat 50 $\mu$ M



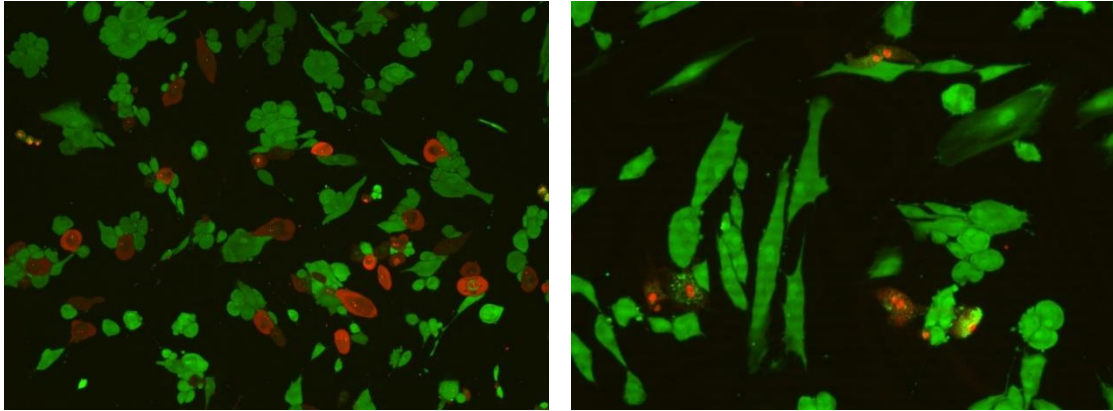
#### Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml





---

### Zoledronat 5µM + Bevacizumab 80µg/ml

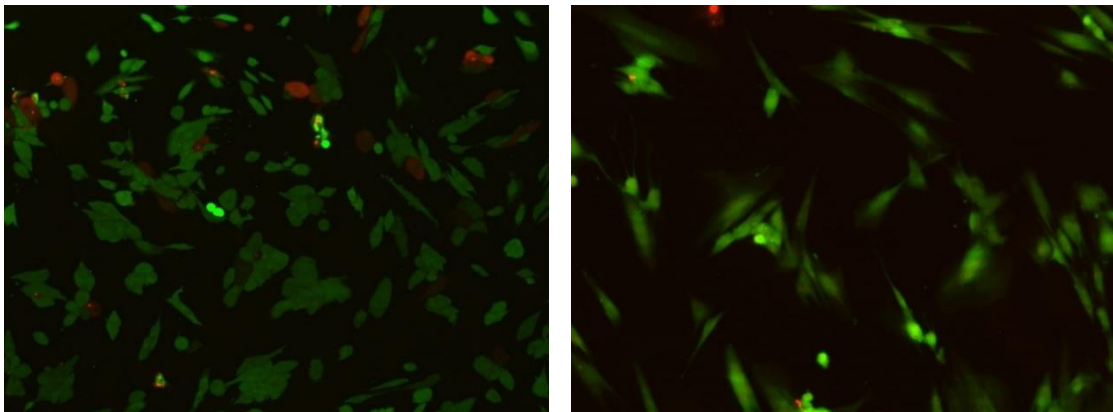


*Tabelle 8 Live/Dead-Färbung der HGF beim Versuch des simulierten indirekten Scratch in 24-Well-Platten. LPS-Versuchsansatz unter Exposition von Hohen Dosen Antiresorptiva (Zoledronat 50µM) und unter Kombinationstherapie der Antiresorptiva mit den Targeted Therapies (Zoledronat 5µM mit Sunitinib 100ng/ml und mit Bevacizumab 80µg/ml) sowie unter Endotoxinexposition nach 40 Stunden Versuchszeit in 5- und 10-facher Vergrößerung*

---

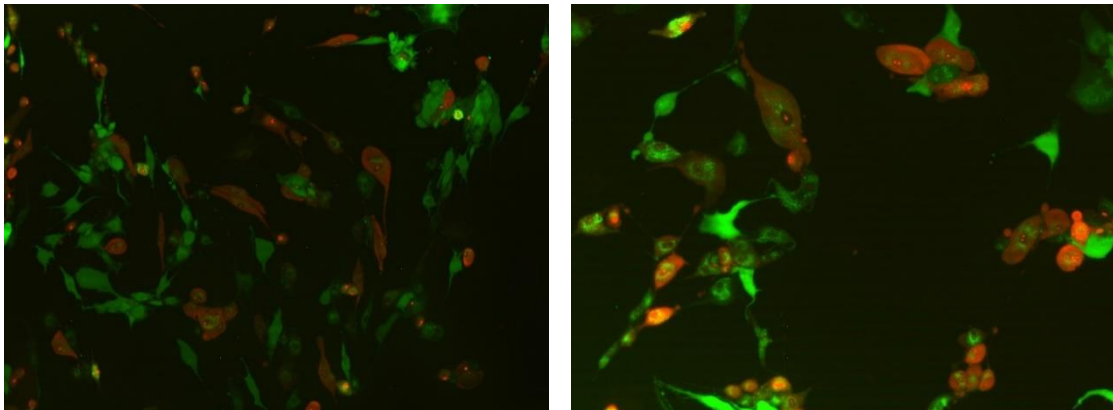
### LPS-Versuchsansatz 24-Well-Platten

#### Kontrolle mit LPS



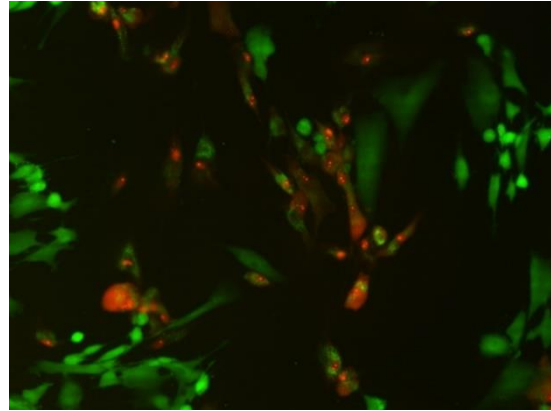
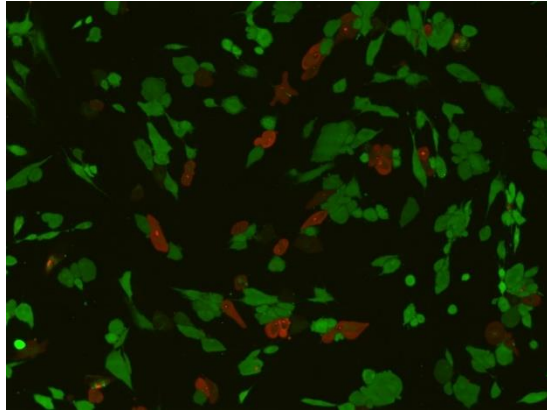
---

#### Zoledronat 50µM



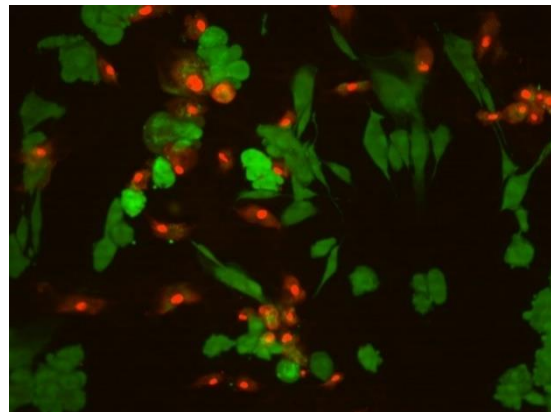
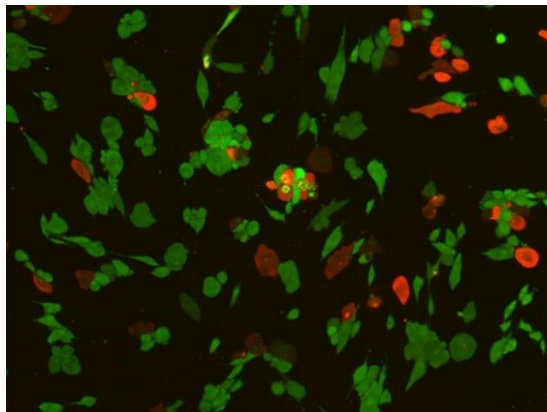
---

**Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml**



---

**Zoledronat 5 $\mu$ M + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml**



Bei diesem simulierten Scratch-Assay wurden die Medikamentenlösungen direkt bei der Kultivierung der Zellen hinzugegeben und nach 40 Stunden Inkubationszeit gefärbt und fotografiert. Unter Einfluss von hohen Konzentrationen der Antiresorptiva zeigte sich eine deutlich verringerte Anzahl lebender Zellen (grün) und auch eine veränderte Zellmorphologie. Das „Abkugeln“ der absterbenden Zellen (rot) wird sichtbar und die Zellform der HGF erscheint nicht wie gewohnt flach mit verzweigten Ausläufern, sondern rund und aufgeworfen. Hohe Konzentrationen von Denosumab haben hierbei auf die Zellen die im Vergleich zur intakten Zellschicht der gesund erscheinenden konfluenten Kontrolle am ausgeprägtesten eine verschlechterte Viabilität. Dies kann vor allem auch unter Kombinationstherapie von Zoledronat mit Sunitinib und Bevacizumab beobachtet werden. Die Wells sind hier weniger dicht besiedelt und Übereinanderlagerungen der Zellen sind sichtbar. Es lässt sich also unter

Einfluss der Medikamente im Vergleich zur Kontrolle auf eine verzögerten Wundheilung schließen.

Dieses Bild verstärkt sich unter zusätzlichem Einfluss von LPS. Unter allen untersuchten Medikamenten und Medikamentenkombinationen zeigen sich vermehrt devitale Zellen und ein inhomogenes Zellbild. Die Kombinationen von Zoledronat mit Sunitinib und Bevacizumab fallen durch eine stark verminderte Zellviabilität besonders auf.

### **3.3. EZ4U- Assay**

Die Extinktionswerte abzüglich des Leerwertes liegen alle in einem Spektrum zwischen 0,55 und 0,8 (Delta OD Corr.). Im Vergleich zwischen den Ansätzen unter Endotoxinexposition durch LPS und ohne diese ist auffällig, dass die Reinkonzentrationen der Antiresorptiva zumeist einen leicht höheren Wert aufweisen als die unter LPS-Einfluss. Genau umgekehrt ist dies für die Kombinationen mit den Targeted Therapies zu beobachten. Unter Kombinationstherapie und zusätzlichem LPS-Einfluss sind die Werte hier leicht erhöht im Vergleich zu den Kombinationstherapien ohne Endotoxinexposition. Statistisch signifikante Abweichungen im Vergleich zur Kontrolle ergaben sich für keine der geprüften Medikamentenkombinationen, sowohl im Basis- also auch im LPS-Versuchsansatz.

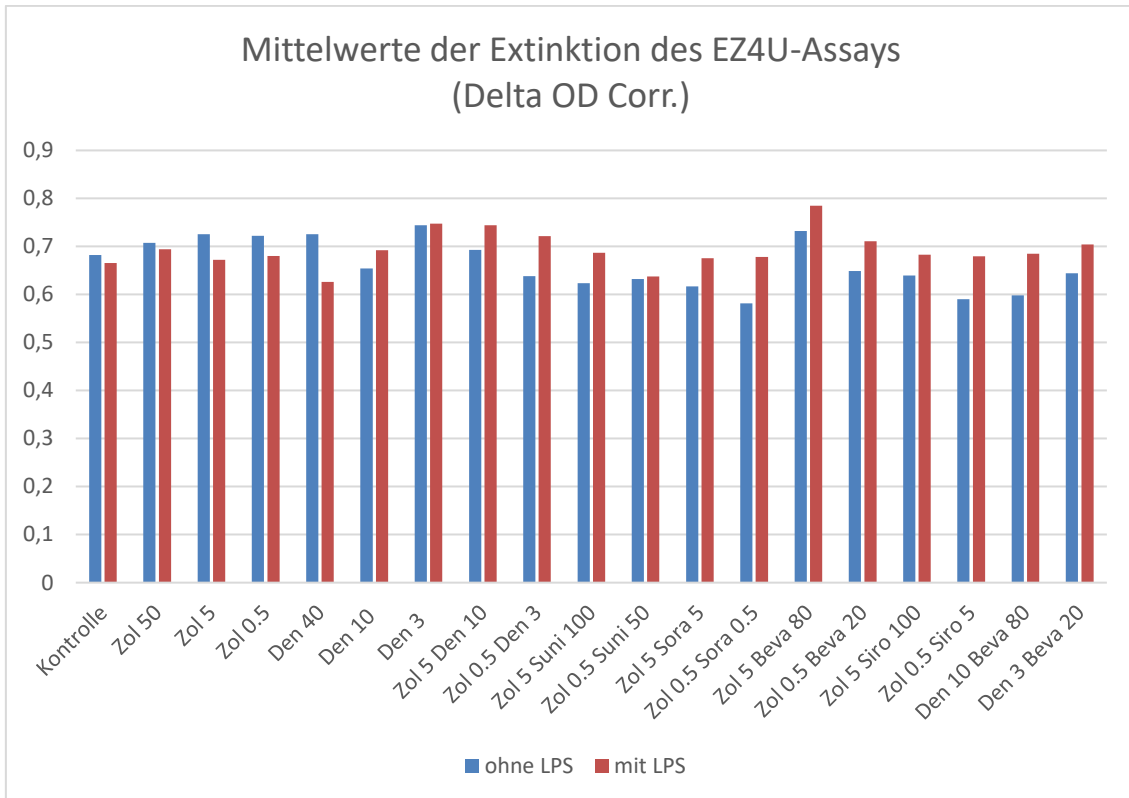


Abbildung 11 Mittelwerte der Extinktion des EZ4U-Assays (Delta OD Corr.) für den Basis- und LPS-Versuchsansatz und alle eingeschlossenen Medikamentenkombinationen (Zoledronat 50  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ ; Denosumab 40  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 3  $\mu\text{g/ml}$ ; Kombination von Zoledronat 5  $\mu\text{M}$  + Denosumab 10  $\mu\text{g/ml}$  sowie Zoledronat 0,5  $\mu\text{M}$  + Denosumab 3  $\mu\text{g/ml}$ , Kombination von Zoledronat 5  $\mu\text{M}$  + Sunitinib 100  $\text{ng/ml}$  sowie Zoledronat 0,5  $\mu\text{M}$  + Sunitinib 50  $\text{ng/ml}$ , Kombination von Zoledronat 5  $\mu\text{M}$  + Sorafenib 5  $\mu\text{g/ml}$  sowie Zoledronat 0,5  $\mu\text{M}$  + Sorafenib 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ; Kombination von Zoledronat 5  $\mu\text{M}$  + Bevacizumab 80  $\mu\text{g/ml}$  sowie Zoledronat 0,5  $\mu\text{M}$  + Bevacizumab 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Kombination von Zoledronat 5  $\mu\text{M}$  + Sirolimus 100  $\text{ng/ml}$  sowie Zoledronat 0,5  $\mu\text{M}$  + Sirolimus 5  $\text{ng/ml}$ ; Kombination von Denosumab 10  $\mu\text{g/ml}$  + Bevacizumab 80  $\mu\text{g/ml}$  sowie Denosumab 3  $\mu\text{g/ml}$  + Bevacizumab 20  $\mu\text{g/ml}$ ). Für den Basisversuchsansatz blau und für den LPS-Versuchsansatz rot dargestellt.

### 3.4. ELISA

#### 3.4.1. VEGF

##### 3.4.1.1. VEGF nach 60 Stunden Versuchszeit

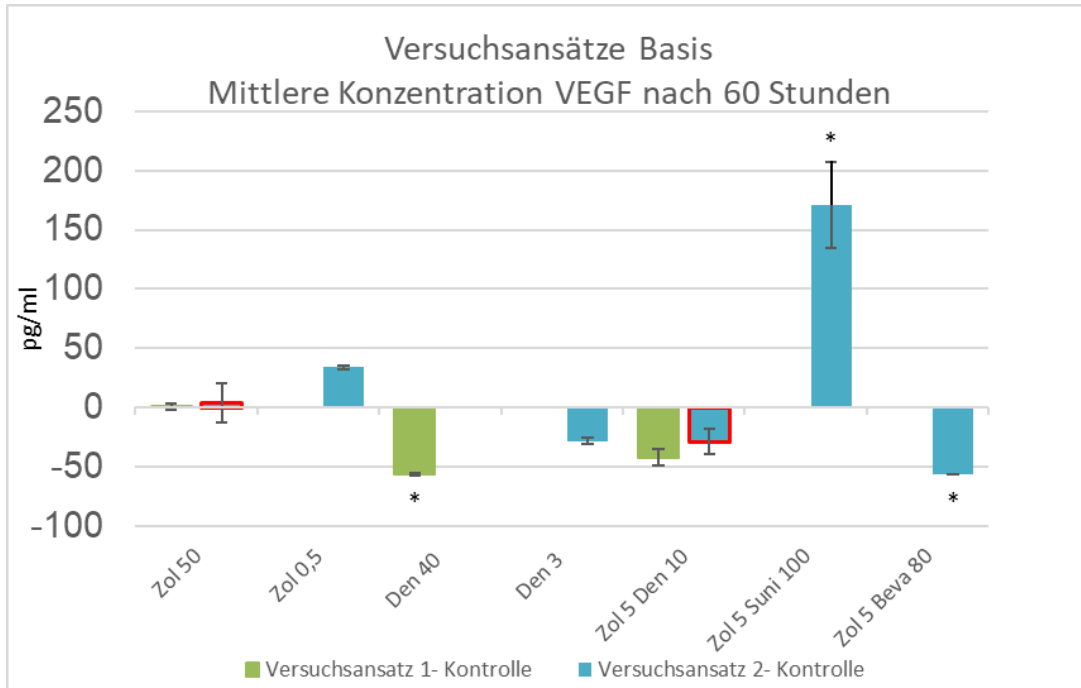


Abbildung 12 ELISA VEGF- Mittelwerte der Versuchsansätze Basis im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 60 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

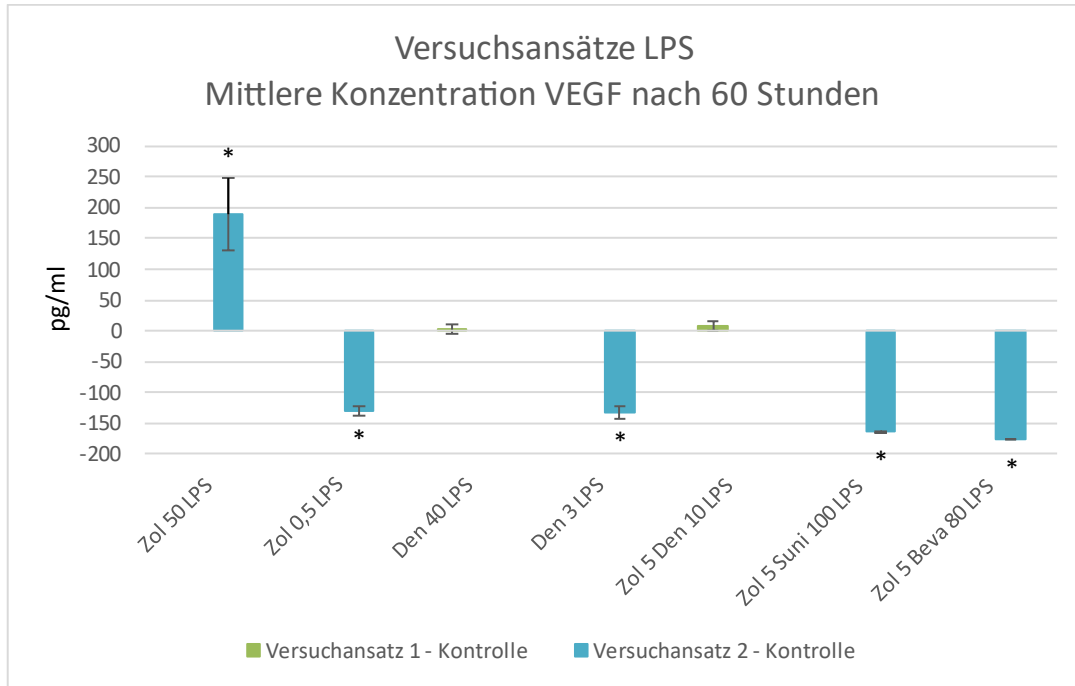


Abbildung 13 ELISA VEGF- Mittelwerte der Versuchsansätze LPS im Vergleich zur Kontrolle (Versuchansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 60 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

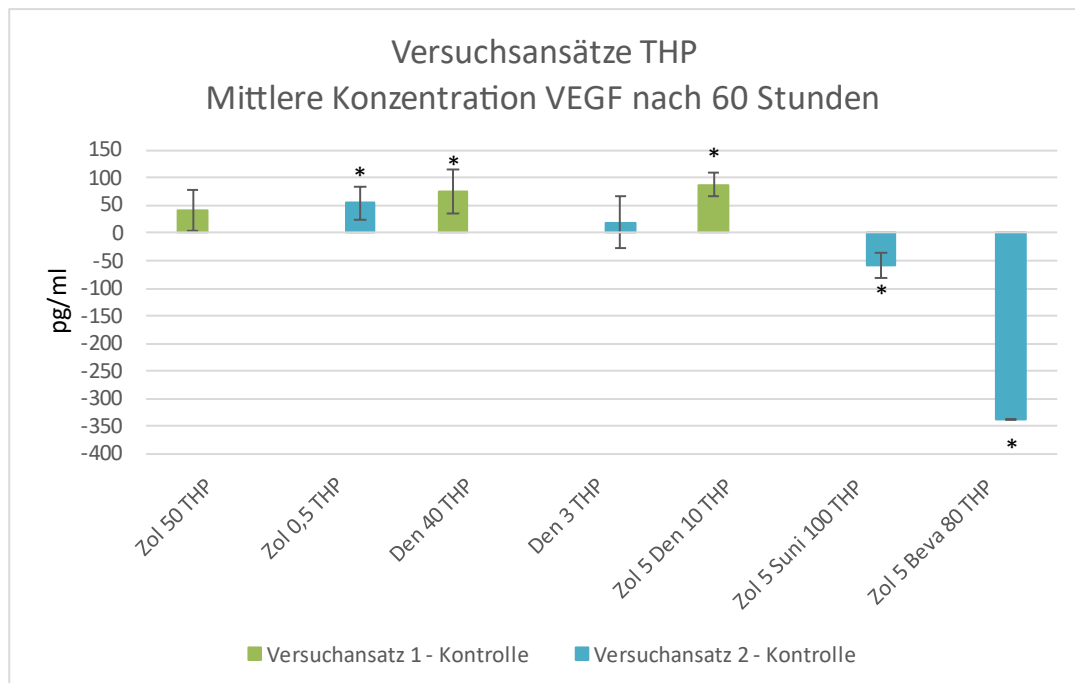


Abbildung 14 ELISA VEGF- Mittelwerte der Versuchsansätze LPS+THP-1 im Vergleich zur Kontrolle (Versuchansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 60 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml

*(Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).*

Bei den Grundlagenversuchen ist nach 60 Stunden Versuchszeit unter der Kombination von Zoledronat mit Bevacizumab keine Konzentration von VEGF messbar und damit ist dieser Wert im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringer. Die Konzentration VEGF unter dem Einfluss von hochdosiertem Denosumab ist ebenfalls signifikant reduziert. Hingegen ergibt sich im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant erhöhte Konzentration VEGF unter dem Einfluss der Kombinationstherapie von Zoledronat mit Sunitinib.

Auch bei den Versuchsansätzen unter Endotoxinexposition lässt sich unter Einfluss von Bevacizumab keine VEGF-Konzentration messen, somit ist der Wert im Vergleich zur Kontrolle LPS signifikant verringert ist. Unter Einfluss von niedrigdosiertem Zoledronat sowie Denosumab und der Kombinationstherapie von Zoledronat mit Sunitinib zeigen sich ebenfalls signifikant reduzierte VEGF-Konzentrationen. Demgegenüber zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle LPS eine signifikant erhöhte Konzentration VEGF unter dem Einfluss von hochdosiertem Zoledronat.

Unter weiterer Exposition der THP-1-Zellen ist eine bis zu 6-fach höhere Konzentration VEGF im Vergleich zu den Kontrollen der Grundlagenversuche messbar. Unter dem Einfluss von Bevacizumab lassen sich auch in Kombination mit der THP-1-Zellkultur keine Konzentrationen von VEGF erfassen, der Wert ist damit im Vergleich zur Kontrolle THP wie auch bei den Versuchsansätzen Basis und LPS signifikant reduziert. Unter Einfluss der Kombinationstherapie von Zoledronat mit Sunitinib zeigt sich eine ebenfalls signifikant reduzierte VEGF-Konzentration. Demgegenüber stehen im Vergleich zur Kontrolle THP signifikant erhöhte Konzentrationen von VEGF unter dem Einfluss von niedrigdosiertem Zoledronat, hochdosiertem Denosumab sowie der Kombinationstherapie Zoledronat mit Denosumab.

### 3.4.1.2. VEGF nach 120 Stunden Versuchszeit

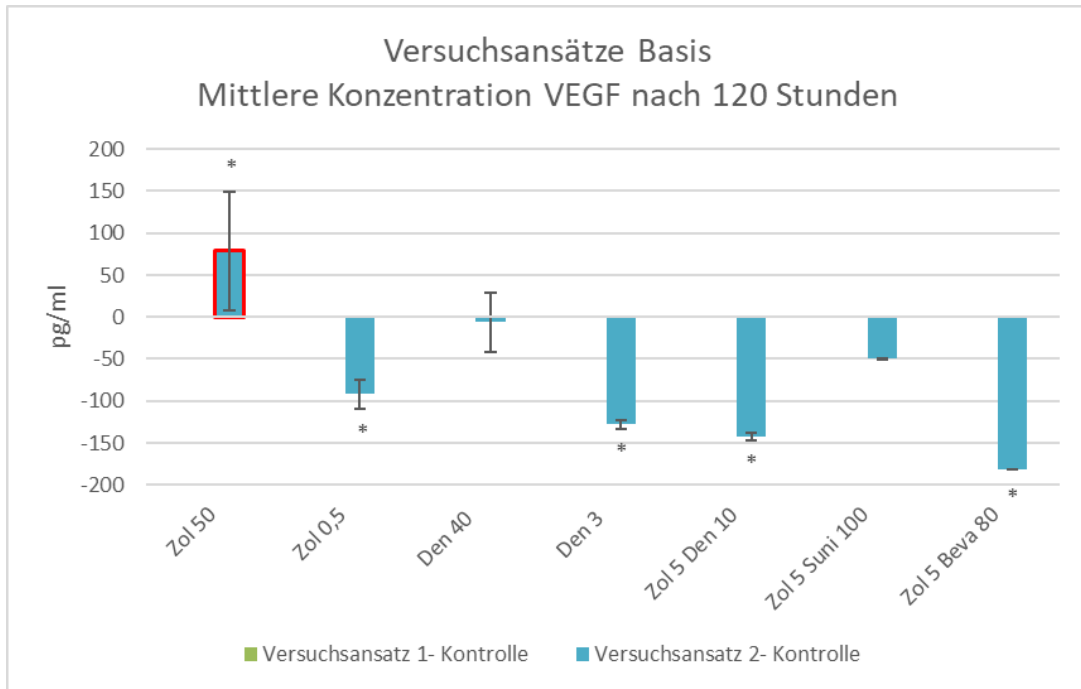


Abbildung 15 ELISA VEGF- Mittelwerte der Versuchsansätze Basis im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

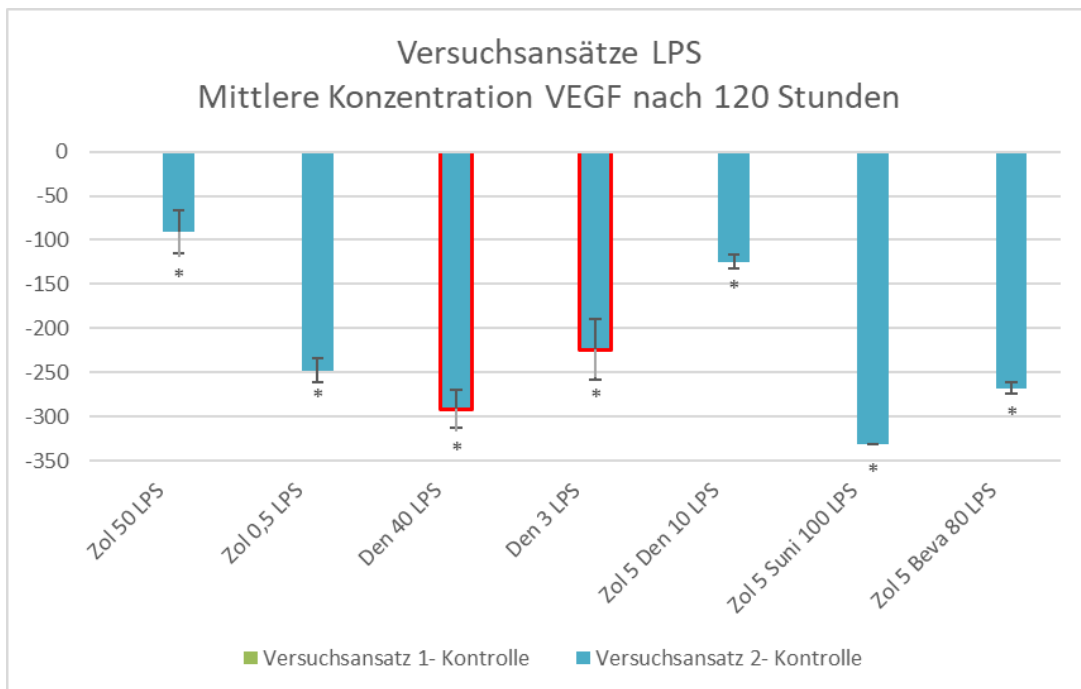


Abbildung 16 ELISA VEGF- Mittelwerte der Versuchsansätze LPS im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung.



Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

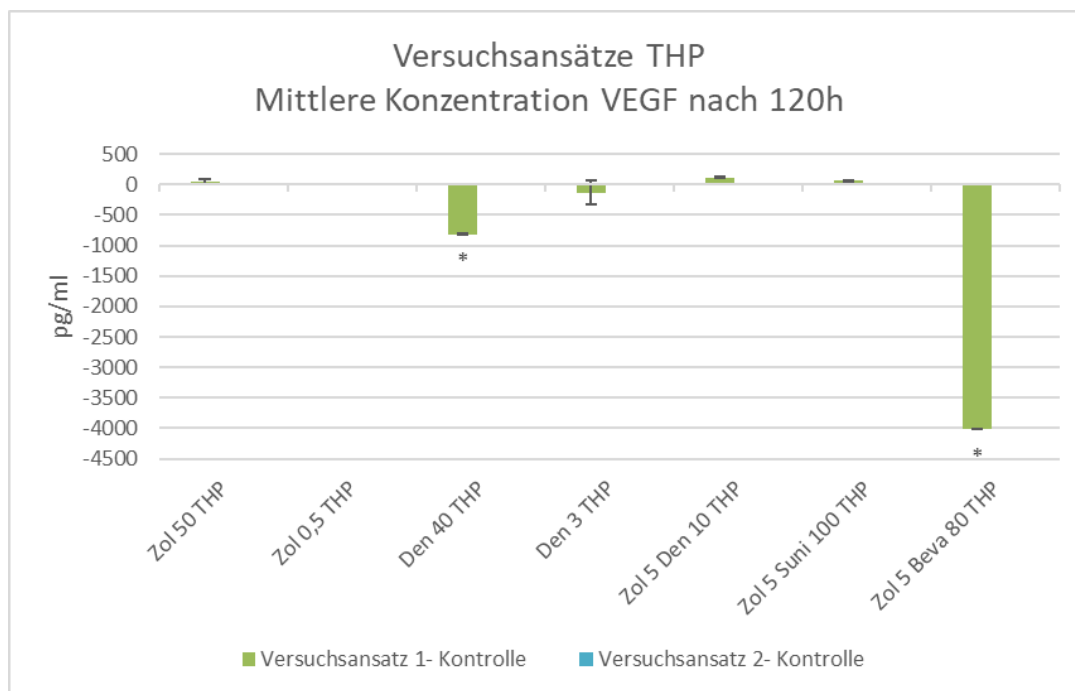


Abbildung 17 ELISA VEGF- Mittelwerte der Versuchsansätze LPS+THP-1 im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

Nach einer Versuchszeit von 120 Stunden ist bei Versuchsansätzen mit dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab sowohl im Basisversuch als auch unter Endotoxin- und zusätzlicher THP-1-Exposition keine Konzentrationen von VEGF in den Überständen der Zellkulturen messbar. Die Werte im Vergleich zur Kontrolle sind jeweils signifikant reduziert.

Bei den Grundlagenversuchen zeigen sich nach 120 Stunden zudem signifikant reduzierte Konzentrationen von VEGF unter dem Einfluss von niedrigdosiertem Zoledronat sowie Denosumab und der Kombinationstherapie von Zoledronat mit Denosumab. Eine signifikant höhere VEGF-Konzentration zeigt sich hingegen unter Einfluss von hochdosiertem Zoledronat.

Unter Endotoxinexposition ist eine doppelt so hohe VEGF-Konzentration der Kontrolle im Vergleich zur Kontrolle der Grundlagenversuche auffällig.

Innerhalb des Versuchsansatzes LPS weisen alle Medikamente und deren Kombinationen eine signifikant geringere Konzentration VEGF im Vergleich zur

Kontrolle LPS auf, insbesondere unter dem Einfluss von hochdosiertem Denosumab und der Kombination von Zoledronat und Sunitinib. An dieser Stelle sind jedoch erhöhte Variationskoeffizienten der Werte unter dem Einfluss von Denosumab anzumerken.

Unter weiterer Exposition durch die THP-1-Zellkultur ist eine mehr als 8-fach erhöhte Konzentration von VEGF der Kontrolle im Vergleich zur Kontrolle der Grundlagenversuche messbar. Neben einen signifikant reduzierten Wert unter Einfluss von Zoledronat und Bevacizumab ergibt sich zudem unter Einfluss von hochdosiertem Denosumab eine signifikant reduzierte Konzentration von VEGF im Vergleich zur Kontrolle THP-1.

### 3.4.2. IL-6

#### 3.4.2.1. IL-6 nach 60 Stunden Versuchszeit

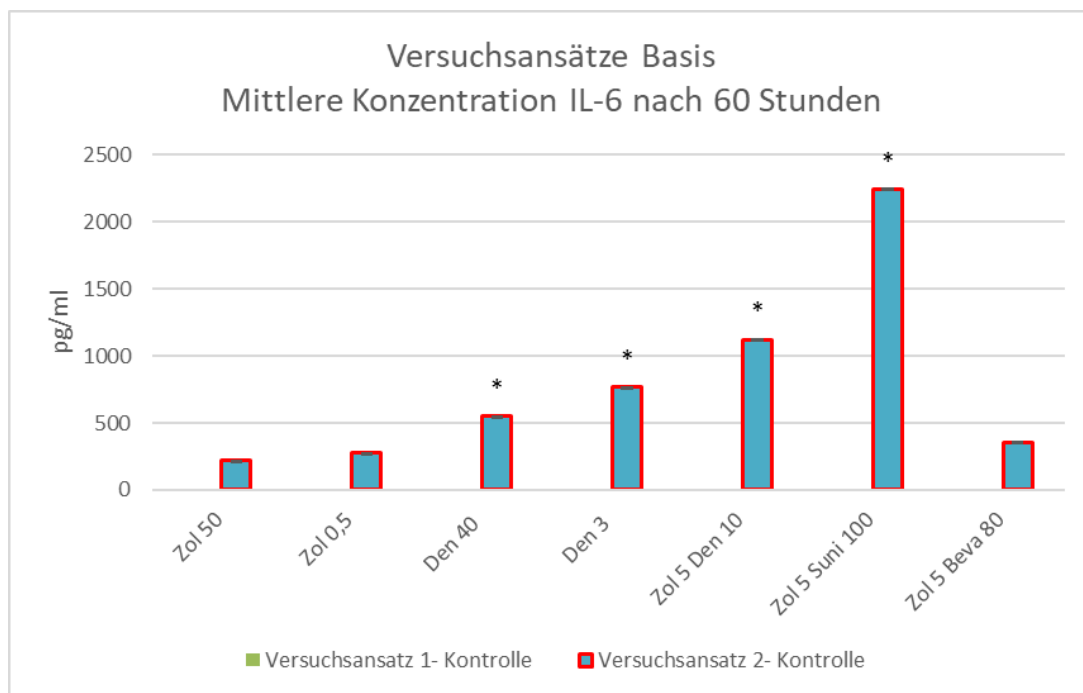


Abbildung 18 ELISA IL-6- Mittelwerte der Versuchsansätze Basis im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 60 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

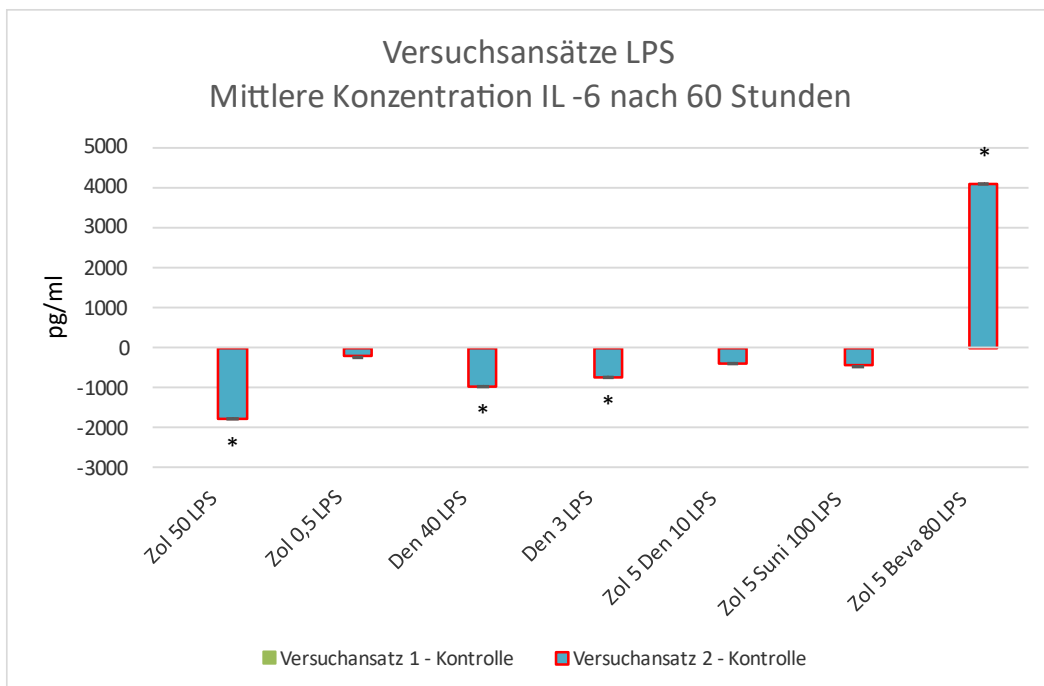


Abbildung 19 ELISA IL-6- Mittelwerte der Versuchsansätze LPS im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 60 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

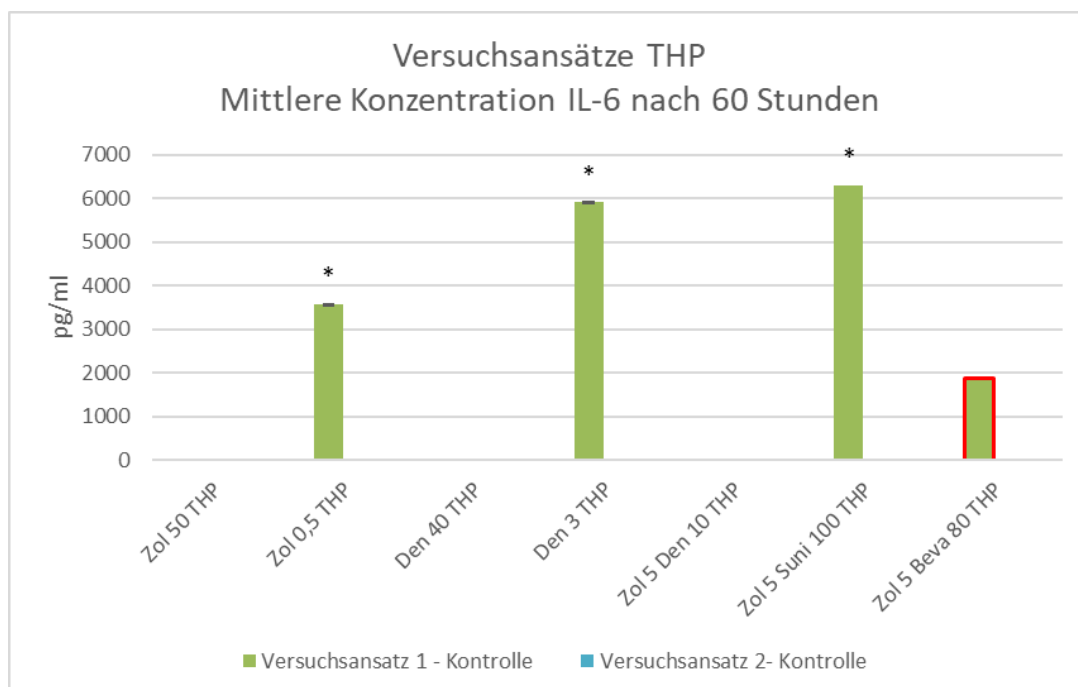


Abbildung 20 ELISA IL-6- Mittelwerte der Versuchsansätze LPS+THP-1 im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 60 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

*(Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).*

Bei den Grundlagenversuchen haben die Werte der Kontrollgruppen einen erhöhten Variationskoeffizienten, welcher sich somit auf alle mit den Kontrollen verglichenen Werte überträgt. Es zeigen sich signifikant erhöhte Konzentrationen von Interleukin 6 (IL-6) unter Einfluss von niedrig- und hochdosiertem Denosumab sowie unter Kombinationstherapie von Zoledronat mit Denosumab, Zoledronat mit Bevacizumab und Zoledronat mit Sunitinib. Letztere sticht mit einer um 6-fach erhöhten Konzentration des IL-6 im Vergleich zur Kontrolle besonders heraus.

Unter Endotoxinexposition zeigen sich generalisiert höhere Konzentrationen von IL-6 im Vergleich zum Basisversuch. Unter Einfluss von hochdosiertem Zoledronat sowie hoch- und niedrigdosiertem Denosumab zeigen sich allerdings signifikant geringe Konzentration von IL-6 im Verhältnis zu den Kontrollen. Vergleichsweise stark weicht die Konzentration IL-6 unter der Medikamentenkombination von Zoledronat und Bevacizumab auf, welche signifikant höher ist im Vergleich zur Kontrolle.

Das Konzentrationslevel IL-6 des Kontrollversuchsansatzes unter weiterem Einfluss der THP-1-Zellkultur ist im Verhältnis zu der unter Endotoxinexposition nicht wesentlich verändert. Hingegen fallen signifikant höhere Konzentrationen IL-6 unter Einfluss von niedrig dosiertem Zoledronat, Denosumab sowie unter Medikamentenkombination von Zoledronat mit Sunitinib auf.

### 3.4.2.2. IL-6 nach 120 Stunden Versuchszeit

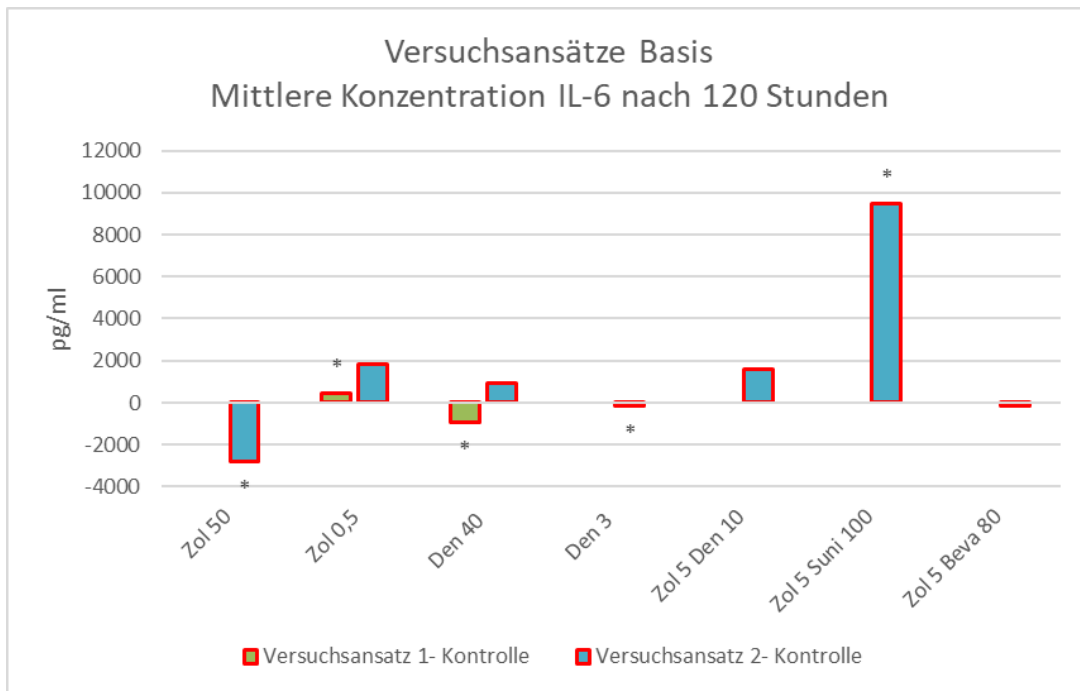


Abbildung 21 ELISA IL-6- Mittelwerte der Versuchsansätze Basis im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

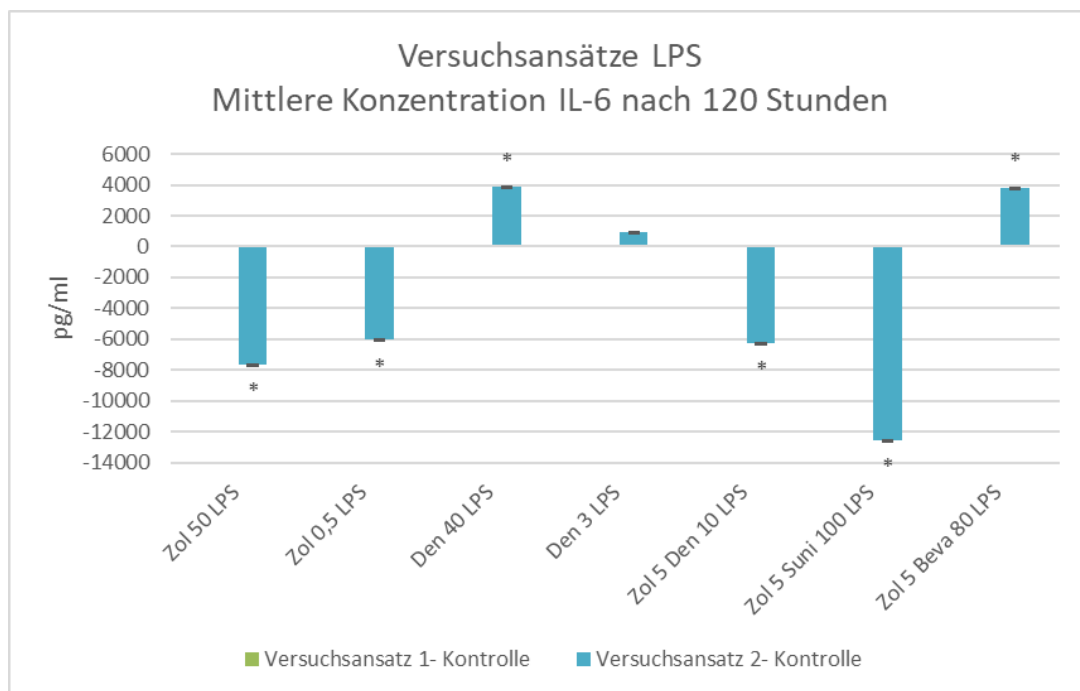


Abbildung 22 ELISA IL-6- Mittelwerte der Versuchsansätze LPS im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung.

Zoledronat 50 $\mu$ M (Zol 50), Zoledronat 0,5 $\mu$ M (Zol 0,5), Denosumab 40 $\mu$ g/ml (Den 40), Denosumab 3 $\mu$ g/ml (Den 3), Zoledronat 5 $\mu$ M und Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5 $\mu$ M+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80).

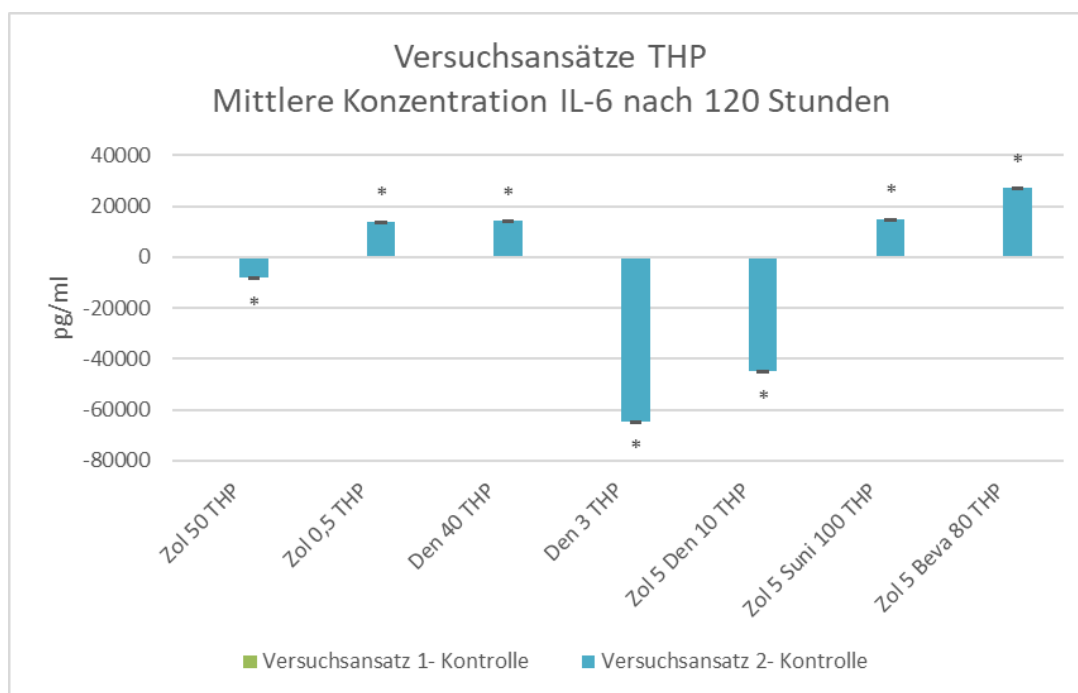


Abbildung 23 ELISA IL-6- Mittelwerte der Versuchsansätze LPS+THP-1 im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50 $\mu$ M (Zol 50), Zoledronat 0,5 $\mu$ M (Zol 0,5), Denosumab 40 $\mu$ g/ml (Den 40), Denosumab 3 $\mu$ g/ml (Den 3), Zoledronat 5 $\mu$ M und Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5 $\mu$ M+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80).

Bei den Grundlagenversuchen haben die Werte der Kontrollgruppen einen erhöhten Variationskoeffizienten, welcher sich auf alle mit den Kontrollen verglichenen Werte überträgt. Nach 120 Stunden ist bei den Grundlagenversuchen eine mehr als dreifach erhöhte und damit signifikante Konzentration IL-6 für die Kombination von Zoledronat mit Sunitinib im Vergleich zur Kontrolle messbar. Zudem ist auch eine signifikant erhöhte Konzentration IL-6 unter dem Einfluss von niedrig dosiertem Zoledronat auffällig. Unter hochdosiertem Zoledronat sowie Denosumab ergeben sich signifikant geringere Konzentrationen von IL-6.

Bei einem Vergleich der Kontrollgruppen ist unter Endotoxinexposition eine um das 5-fach gesteigerte Konzentration von IL-6 messbar.

Die Kombination von Zoledronat mit Sunitinib mit LPS weist entgegen dem Grundlagenversuch eine signifikant verringerte Konzentration IL-6 zur Kontrollgruppe LPS auf (Liebaug, 2019). Ebenso unter Einfluss von hoch und

niedrig dosiertem Zoledronat sowie unter der Kombinationstherapie von Zoledronat mit Denosumab fallen signifikant niedrigere Konzentrationen IL-6 auf. Unter hochdosiertem Denosumab und auch unter der Kombinationstherapie von Zoledronat mit Bevacizumab fallen signifikant erhöhte Konzentrationen IL-6 auf. Die zusätzliche Exposition der THP-1-Zellkultur zeigt erneut einen fast 5-fachen Anstieg der IL-6-Konzentration im Vergleich zu den Versuchen unter Endotoxineinfluss und damit einem 10-fachen Anstieg im Vergleich zu den Grundlagenversuchen.

Es zeigen sich signifikant verringerte Konzentrationen IL-6 unter Einfluss von hochdosiertem Zoledronat, niedrigdosiertem Denosumab sowie der Kombinationstherapie von Zoledronat und Denosumab. Signifikant erhöhte Konzentrationen fallen hingegen unter Einfluss von niedrigdosiertem Zoledronat, hochdosiertem Denosumab sowie den Kombinationstherapien von Zoledronat mit Sunitinib sowie Bevacizumab auf.

### 3.4.3. IL-1 $\beta$

#### 3.4.3.1. IL-1 $\beta$ nach 60 Stunden Versuchszeit

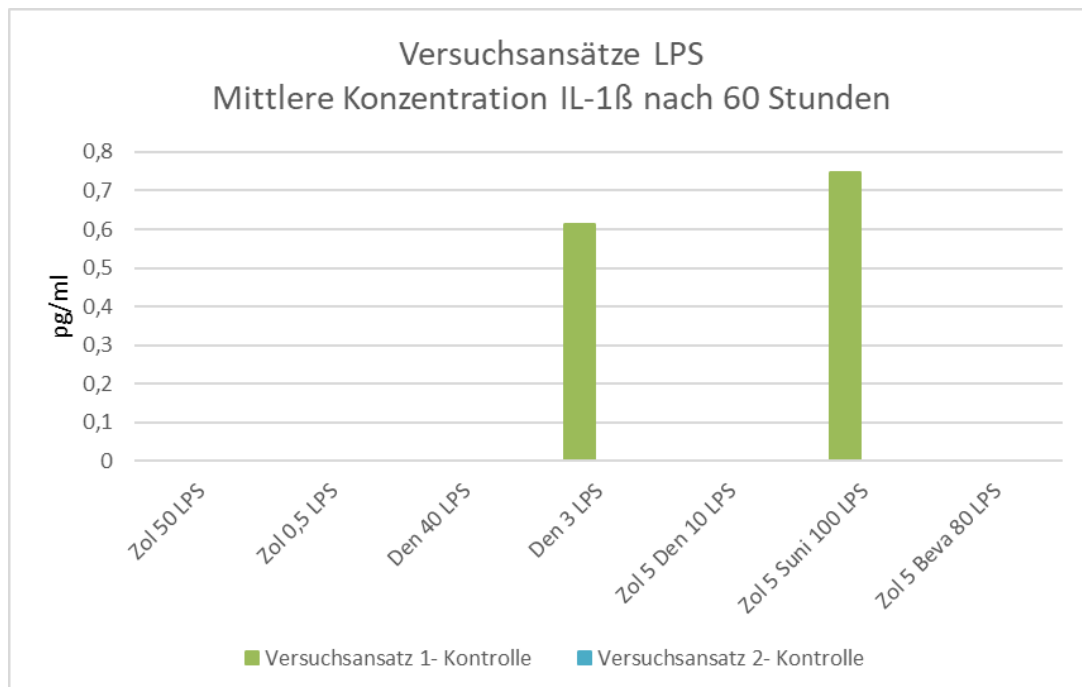


Abbildung 24 ELISA IL-1 $\beta$ - Mittelwerte der Versuchsansätze LPS im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 60 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50 $\mu$ M (Zol 50), Zoledronat 0,5 $\mu$ M (Zol 0,5), Denosumab 40 $\mu$ g/ml (Den 40), Denosumab 3 $\mu$ g/ml

(Den 3), Zoledronat 5 $\mu$ M und Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5 $\mu$ M+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80).

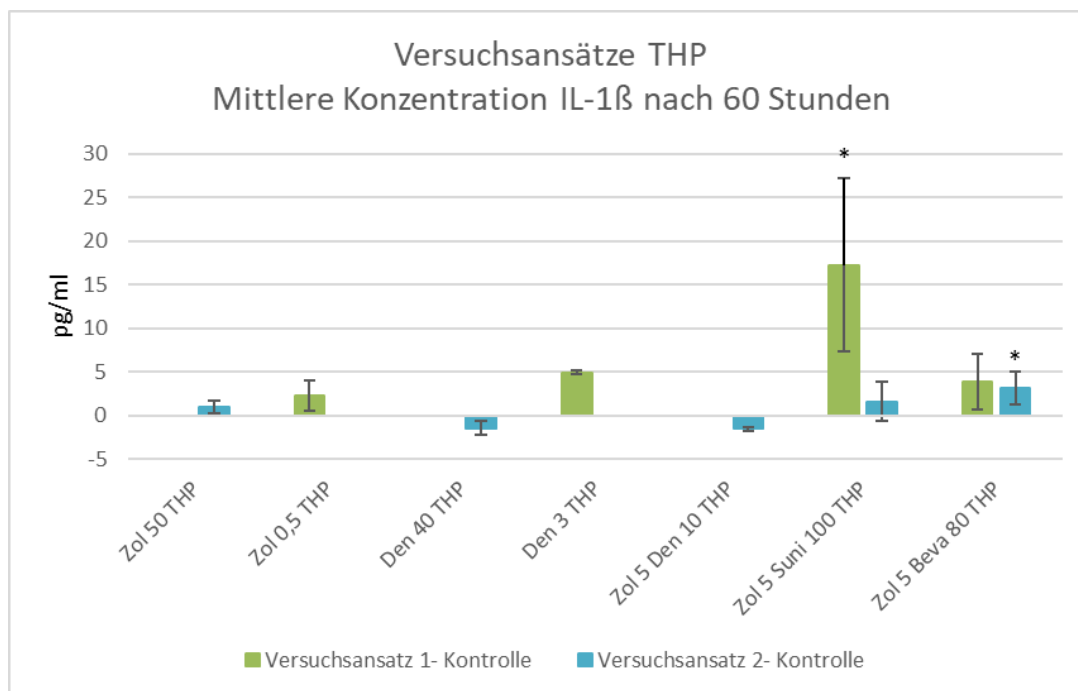


Abbildung 25 ELISA IL-1 $\beta$ - Mittelwerte der Versuchsansätze LPS+THP-1 im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 60 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50 $\mu$ M (Zol 50), Zoledronat 0,5 $\mu$ M (Zol 0,5), Denosumab 40 $\mu$ g/ml (Den 40), Denosumab 3 $\mu$ g/ml (Den 3), Zoledronat 5 $\mu$ M und Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5 $\mu$ M+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80).

Die Konzentration von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ist nach 60 Stunden Versuchszeit bei den Grundlagenversuchsansätzen und auch bei den meisten Ansätzen unter Endotoxinexposition nicht messbar, da sie zu gering bzw. der ELISA-Test nicht sensitiv genug ist.

Lediglich bei den Kombinationen unter Einfluss der THP-1-Zellkultur konnten vollständige Messwerte erhoben werden. Hierbei sind signifikant erhöhte Konzentrationen IL-1 $\beta$  unter dem Einfluss der Kombinationstherapie von Zoledronat mit Sunitinib sowie mit Bevacizumab messbar.



### 3.4.3.2. IL-1 $\beta$ nach 120 Stunden Versuchszeit

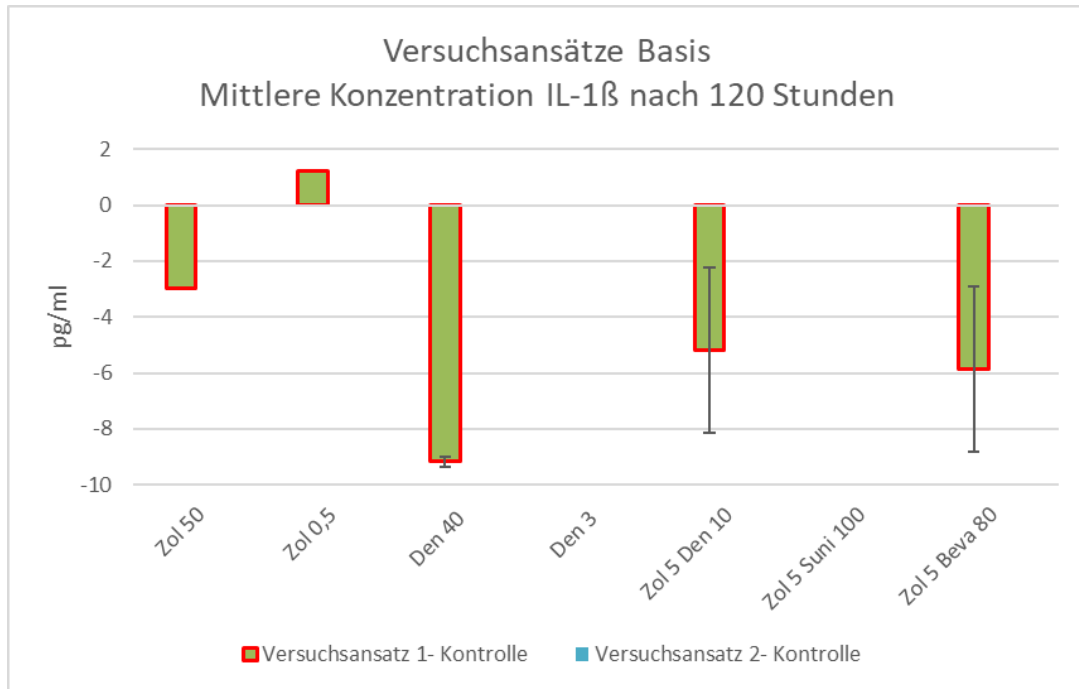


Abbildung 26 ELISA IL-1 $\beta$ - Mittelwerte der Versuchsansätze Basis im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50 $\mu$ M (Zol 50), Zoledronat 0,5 $\mu$ M (Zol 0,5), Denosumab 40 $\mu$ g/ml (Den 40), Denosumab 3 $\mu$ g/ml (Den 3), Zoledronat 5 $\mu$ M und Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5 $\mu$ M+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80).

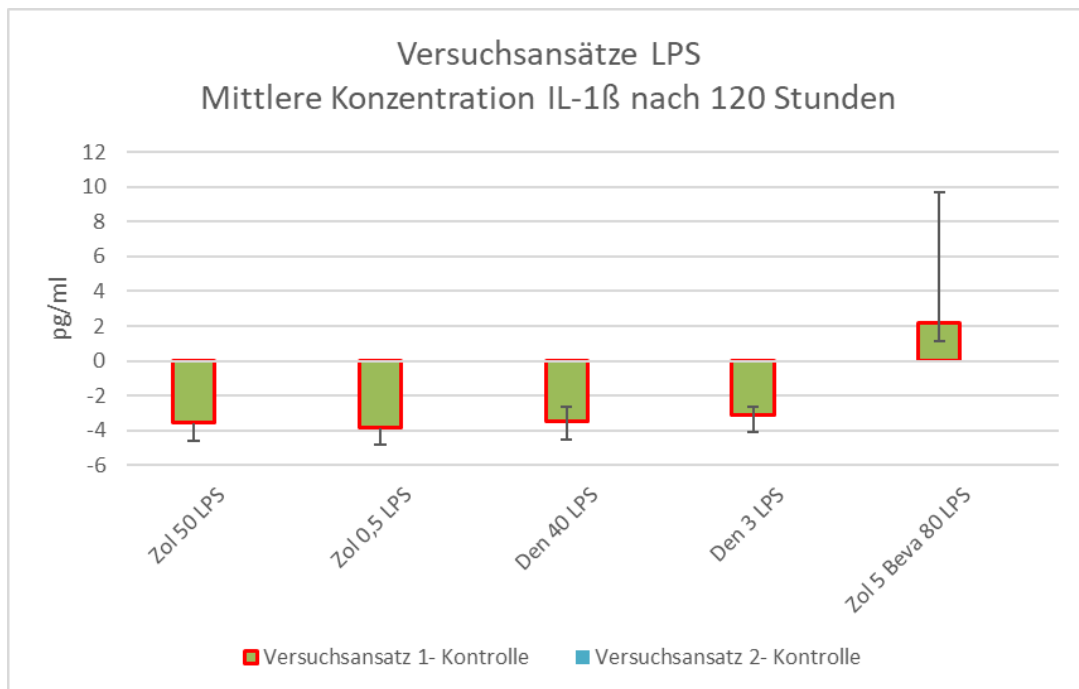


Abbildung 27 ELISA IL-1 $\beta$ - Mittelwerte der Versuchsansätze LPS im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung.

Zoledronat 50 $\mu$ M (Zol 50), Zoledronat 0,5 $\mu$ M (Zol 0,5), Denosumab 40 $\mu$ g/ml (Den 40), Denosumab 3 $\mu$ g/ml (Den 3), Zoledronat 5 $\mu$ M und Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5 $\mu$ M+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80).

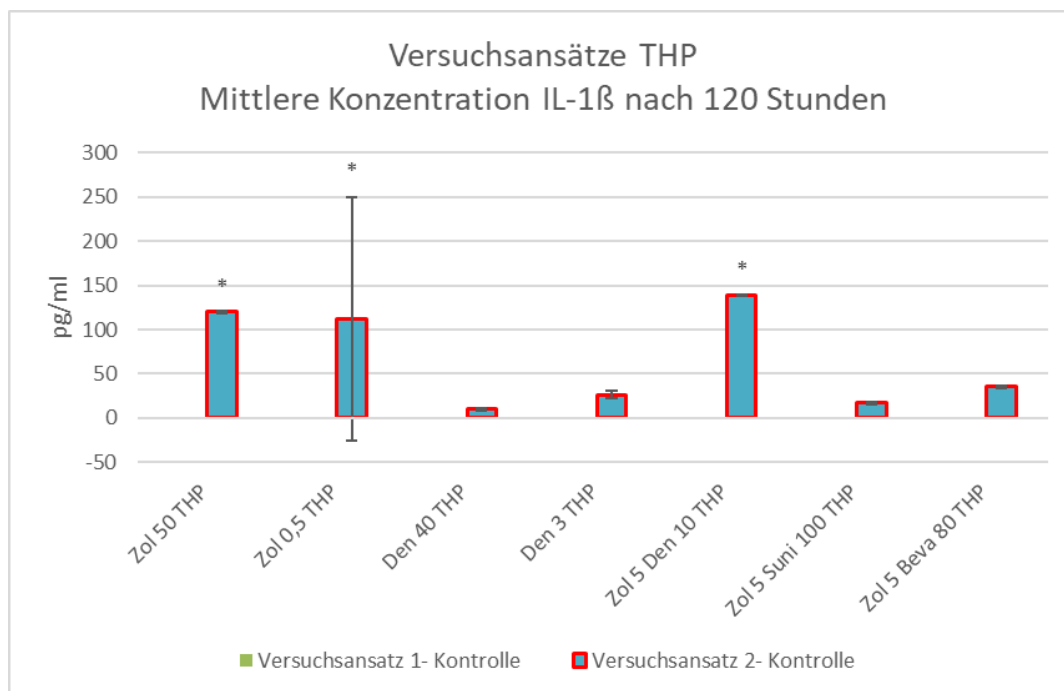


Abbildung 28 ELISA IL-1 $\beta$ - Mittelwerte der Versuchsansätze LPS+THP-1 im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50 $\mu$ M (Zol 50), Zoledronat 0,5 $\mu$ M (Zol 0,5), Denosumab 40 $\mu$ g/ml (Den 40), Denosumab 3 $\mu$ g/ml (Den 3), Zoledronat 5 $\mu$ M und Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5 $\mu$ M+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80).

Ebenso nach 120 Stunden Versuchszeit ist die Messung der Konzentrationen IL-1 $\beta$  bei den Grundlagenversuchsansätzen und unter Endotoxinexposition aufgrund der geringen Konzentration bzw. der mangelnden Sensitivität des ELISA-Kits kaum zu erfassen.

Aussagekräftig sind hierbei die Messungen der Konzentration von IL-1 $\beta$  unter Einfluss der THP-1-Zellkulturen, wobei durch einen erhöhten Variationskoeffizienten bei der Kontrollgruppe die Messwerte ebenso kritisch beurteilt werden müssen. Eine signifikant erhöhte IL-1 $\beta$ -Konzentration ist unter dem Einfluss von hoch- und niedrigdosiertem Zoledronat sowie der Kombination von Zoledronat mit Denosumab messbar.

### 3.4.4. IL-8

#### 3.4.4.1. IL-8 nach 60 Stunden Versuchszeit

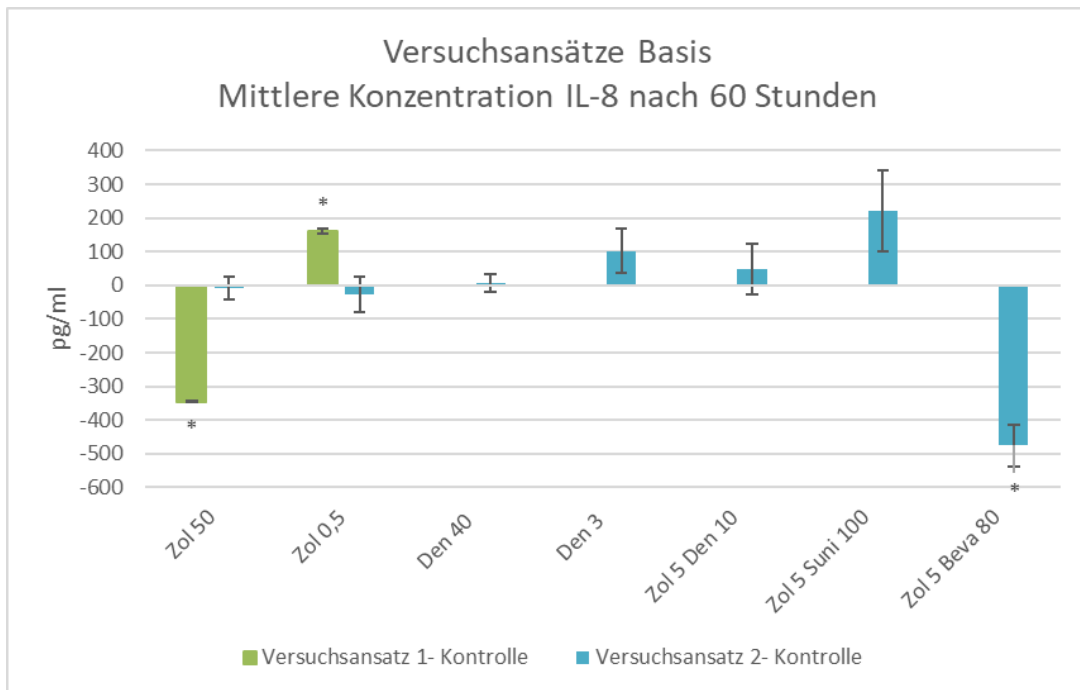


Abbildung 29 ELISA IL-8- Mittelwerte der Versuchsansätze Basis im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 60 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suniti 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

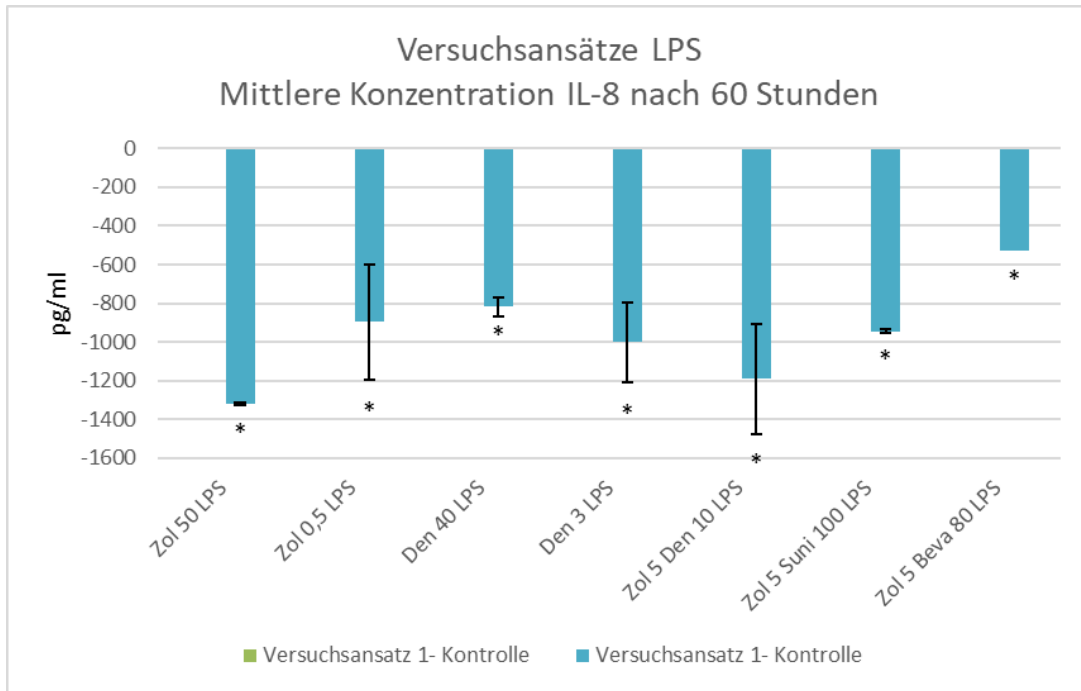


Abbildung 30 ELISA IL-8- Mittelwerte der Versuchsansätze LPS im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 60 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

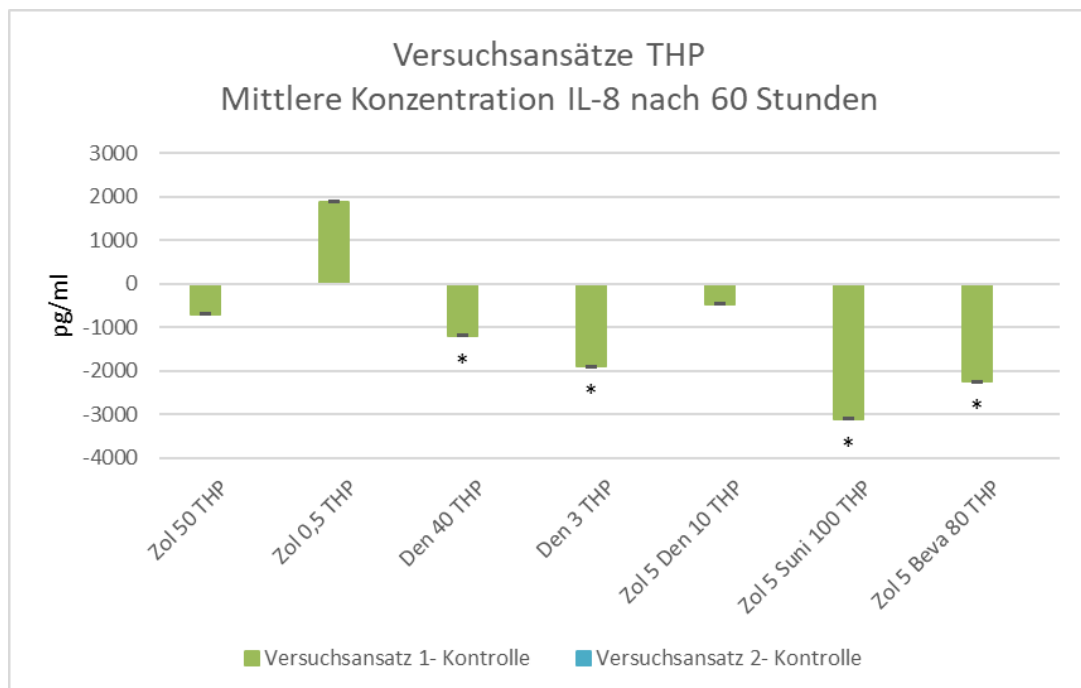


Abbildung 31 ELISA IL-8- Mittelwerte der Versuchsansätze LPS+THP-1 im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 60 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

*(Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).*

Bei den Grundlagenversuchsansätzen nach 60 Stunden zeigen sich signifikant verringerte Konzentrationen von Interleukin-8 (IL-8) unter dem Einfluss von hochdosiertem Zoledronat sowie der Kombination von Zoledronat mit Bevacizumab. Unter dem Einfluss von niedrigdosiertem Zoledronat zeigen sich hingegen signifikant erhöhte IL-8-Konzentration.

Unter Endotoxinexposition in Form von LPS erhöht sich die gemessene Konzentration von IL-8 im Vergleich zur Kontrolle der Grundlagenversuche um das Dreifache. Alle Versuchsansätze unter Endotoxinexposition weisen im Vergleich zur Kontrolle LPS eine signifikant geringere IL-8-Konzentration auf, insbesondere unter dem Einfluss von hochdosiertem Zoledronat und der Kombination von Zoledronat und Denosumab.

Der Einfluss von THP-1-Zellkulturen lässt die Konzentration von IL-8 im Vergleich zur Kontrolle des Grundlagenansatzes fast um das 6-Fache, im Vergleich zur Kontrolle unter Endotoxinexposition um das Doppelte erhöhen.

Im Vergleich zur Kontrolle unter THP-1-Zell-Einfluss sinkt die Konzentration von IL-8 signifikant unter dem Einfluss von hoch- und niedrigdosiertem Denosumab sowie den Kombinationen von Zoledronat mit Sunitinib und Zoledronat mit Bevacizumab.

### 3.4.4.2. IL-8 nach 120 Stunden Versuchszeit

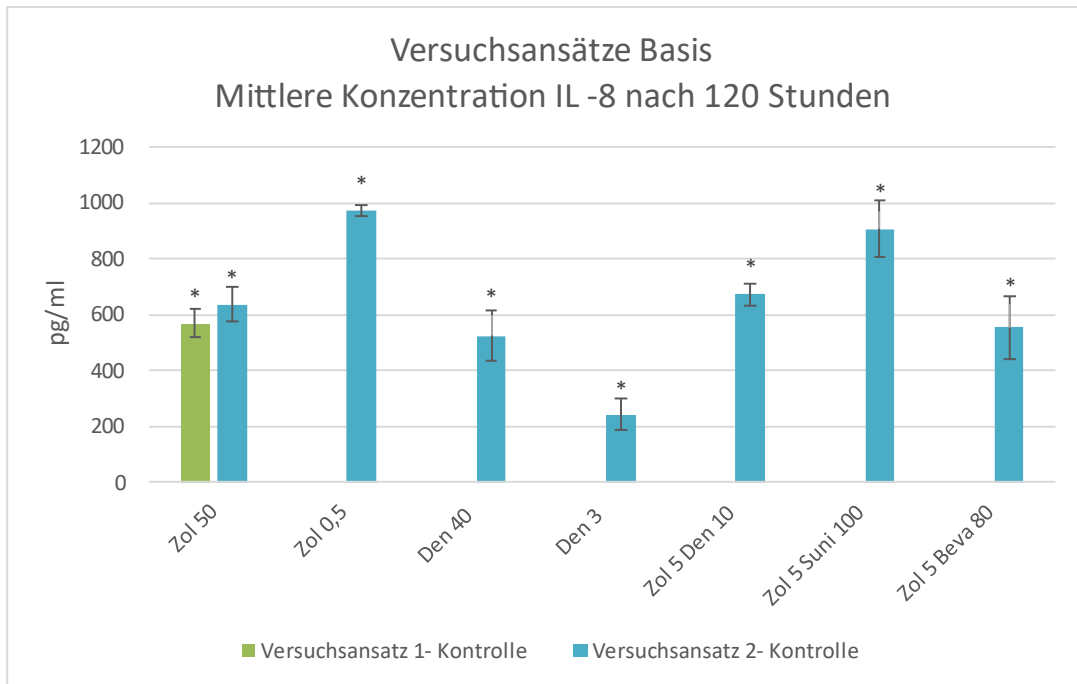


Abbildung 32 ELISA IL-8- Mittelwerte der Versuchsansätze Basis im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

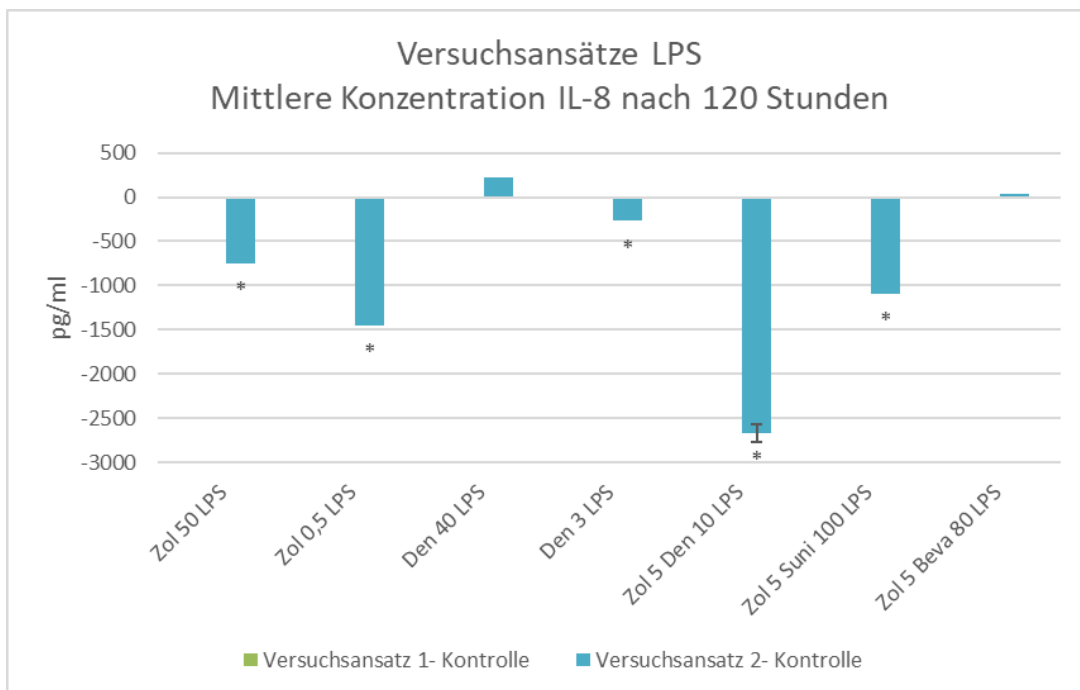


Abbildung 33 ELISA IL-8- Mittelwerte der Versuchsansätze LPS im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung.

Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

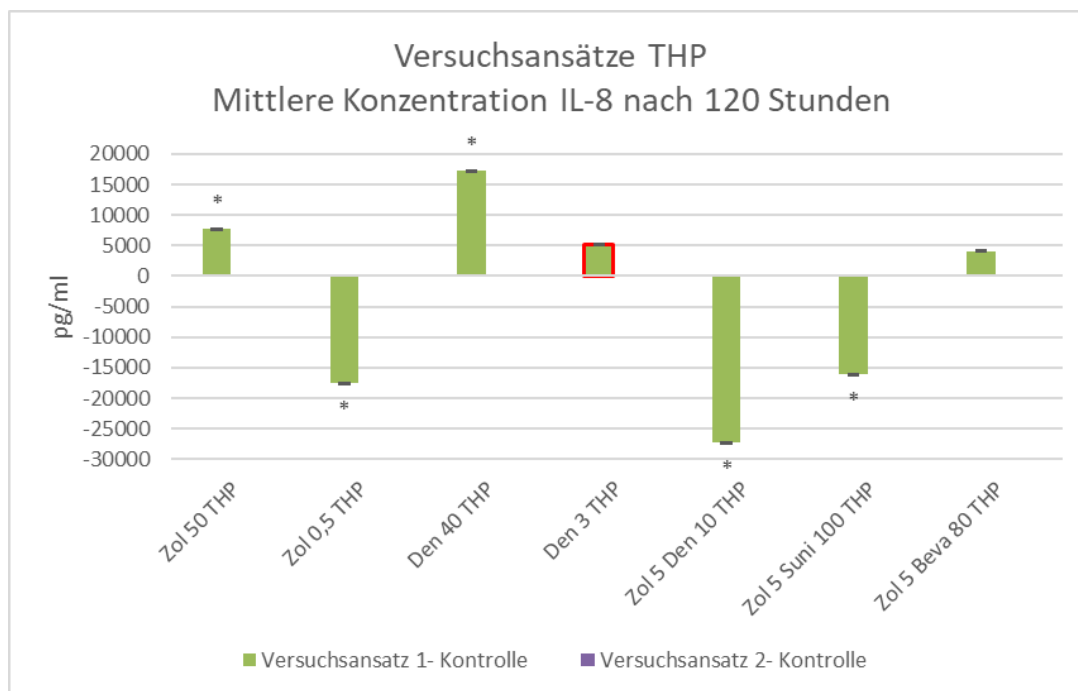


Abbildung 34 ELISA IL-8- Mittelwerte der Versuchsansätze LPS+THP-1 im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

Für die Grundlagenversuche ergeben sich im Vergleich zur Kontrolle unter Einfluss aller Medikamente bzw. deren Kombinationen signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-8, insbesondere für den Ansatz mit niedrig dosiertem Zoledronat sowie der Medikamentenkombination von Zoledronat und Sunitinib. Unter Endotoxinexposition ist ein Anstieg der IL-8-Konzentration um das 6,5-fache im Vergleich zur Kontrolle der Basisversuche zu verzeichnen.

Auffällig sind innerhalb des Versuchsansatzes LPS eine signifikant geringere Konzentration IL-8 unter Einfluss von hoch- und niedrigdosiertem Zoledronat, niedrigdosiertem Denosumab und Kombinationen von Zoledronat mit Denosumab sowie Sunitinib.

Ein Anstieg der Konzentration von IL-8 um mehr als das 70-fache im Vergleich zu den Basisversuchen und um knapp das 11-fache im Vergleich der LPS-Versuchsansätze zeigt sich unter der Exposition der THP-1-Zellkultur.

Innerhalb dieser Gruppe zeigen sich im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte IL-8-Konzentrationen unter dem Einfluss von hochdosiertem Zoledronat und Denosumab. Signifikant niedrige Konzentrationen IL-8 zeichnen sich dagegen unter Einfluss von niedrigdosiertem Zoledronat sowie unter Medikamentenkombinationen von Zoledronat mit Denosumab sowie mit Sunitinib ab.

### 3.4.5. TNF- $\alpha$

#### 3.4.5.1. TNF- $\alpha$ nach 60 Stunden Versuchszeit

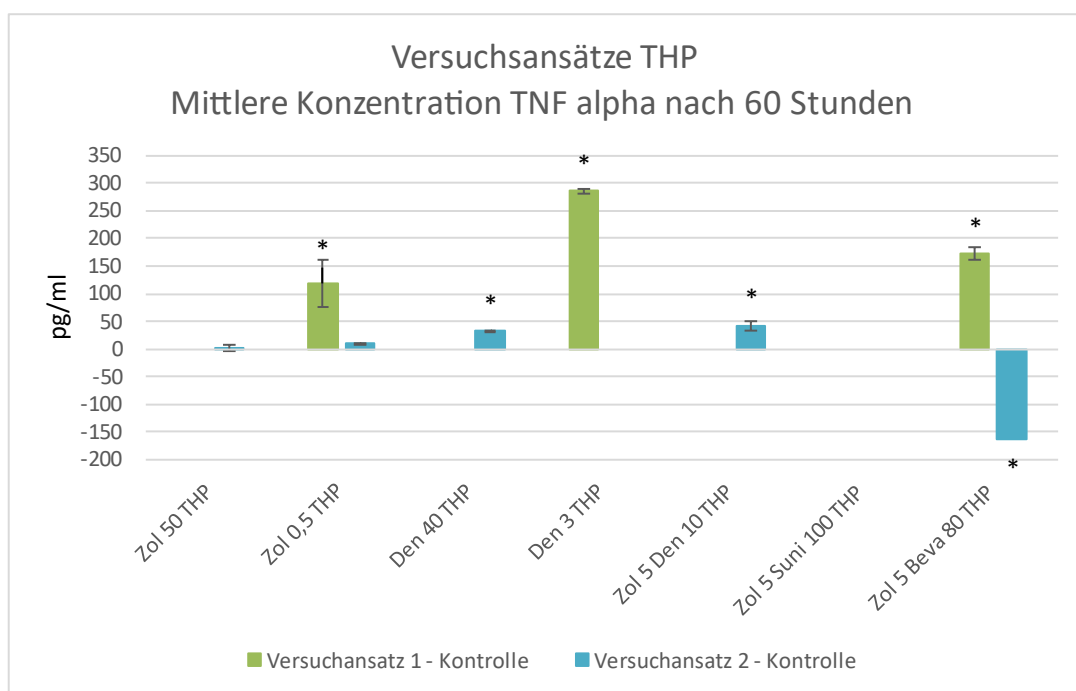


Abbildung 35 ELISA TNF- $\alpha$ -Mittelwerte der Versuchsansätze LPS+THP-1 im Vergleich zur Kontrolle (Versuchansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 60 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50 $\mu$ M (Zol 50), Zoledronat 0,5 $\mu$ M (Zol 0,5), Denosumab 40 $\mu$ g/ml (Den 40), Denosumab 3 $\mu$ g/ml (Den 3), Zoledronat 5 $\mu$ M und Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5 $\mu$ M+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80).

Die Messung der Konzentration des Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) zeigt für die Grundlagenversuche und die Versuchsansätze unter Endotoxinexposition nach 60 Stunden aufgrund mangelnder Sensitivität des ELISA-Tests bzw. zu geringer Konzentration von TNF- $\alpha$  keine Ergebnisse.

Unter Einfluss der THP-1-Zellkultur zeigen sich im Verhältnis zum Kontrollansatz signifikant erhöhte Konzentrationen TNF- $\alpha$  für die Ansätze unter gering dosiertem Zoledronat, niedrig- und hochdosiertem Denosumab sowie unter



Kombinationsgabe von Zoledronat mit Denosumab. Unter dem Einfluss von Zoledronat und Bevacizumab zeigte sich beim Versuchsansatz 1 eine ebenso signifikante Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen, beim 2. Versuchsansatz hingegen eine signifikant niedrigere Konzentration.

### 3.4.5.2. Nach 120 Stunden Versuchszeit

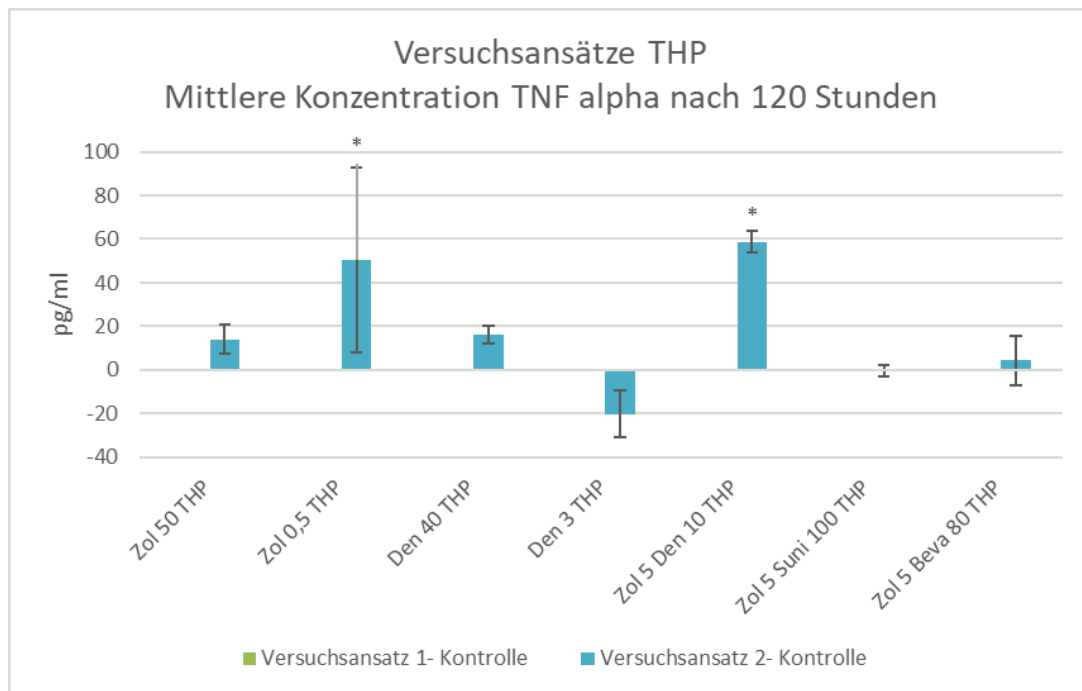


Abbildung 36 ELISA TNF- $\alpha$ -Mittelwerte der Versuchsansätze LPS+THP-1 im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50 $\mu$ M (Zol 50), Zoledronat 0,5 $\mu$ M (Zol 0,5), Denosumab 40 $\mu$ g/ml (Den 40), Denosumab 3 $\mu$ g/ml (Den 3), Zoledronat 5 $\mu$ M und Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5 $\mu$ M+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80).

Auch nach 120 Stunden zeigen sich lediglich Messergebnisse für die Versuchsansätze unter Endotoxin- und THP-1-Co-Kulturexposition. Im Vergleich zu der Messung nach 60 Stunden sind die Konzentrationen generell vermindert. Die Konzentrationen von TNF- $\alpha$  sind unter Einfluss von niedrigdosiertem Zoledronat im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht, ebenso unter der Medikamentenkombination von Zoledronat mit Denosumab.

### 3.4.6. RANKL

Die Messung des Proteins RANKL führte zu keinen Ergebnissen, da die Menge im Versuchsansatz nicht detektiert werden konnte, respektive zu gering war.

Damit waren weder für Kontrollgruppen noch für die unterschiedlichen Versuchsansätze Konzentrationen messbar.

### 3.4.7. OPG

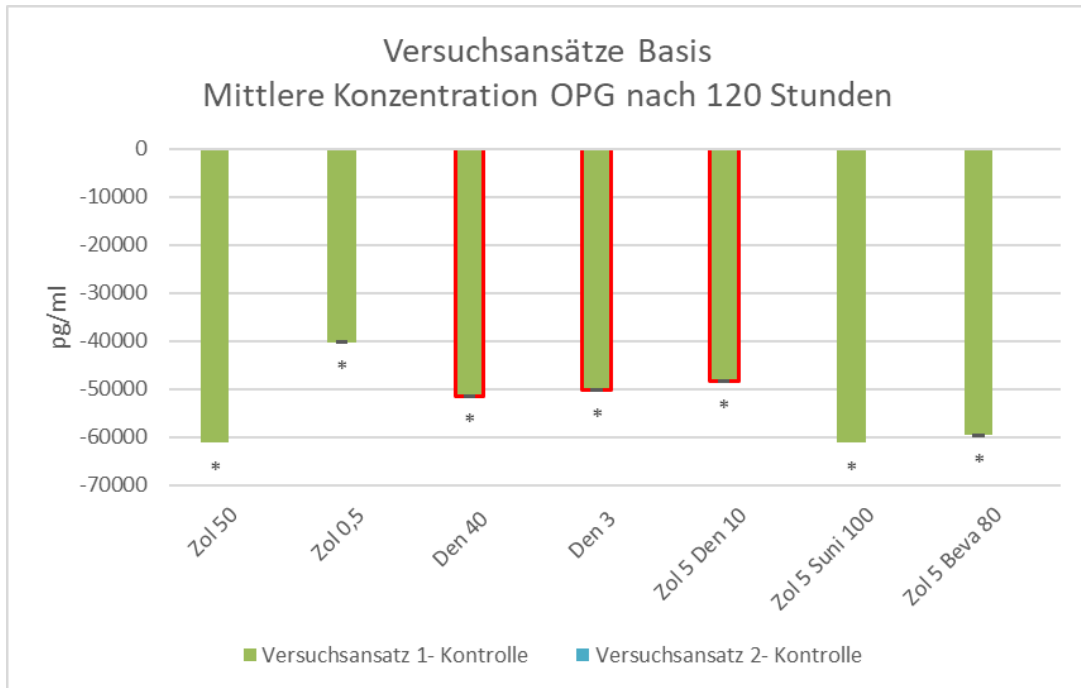


Abbildung 37 ELISA OPG-Mittelwerte der Versuchsansätze Basis im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

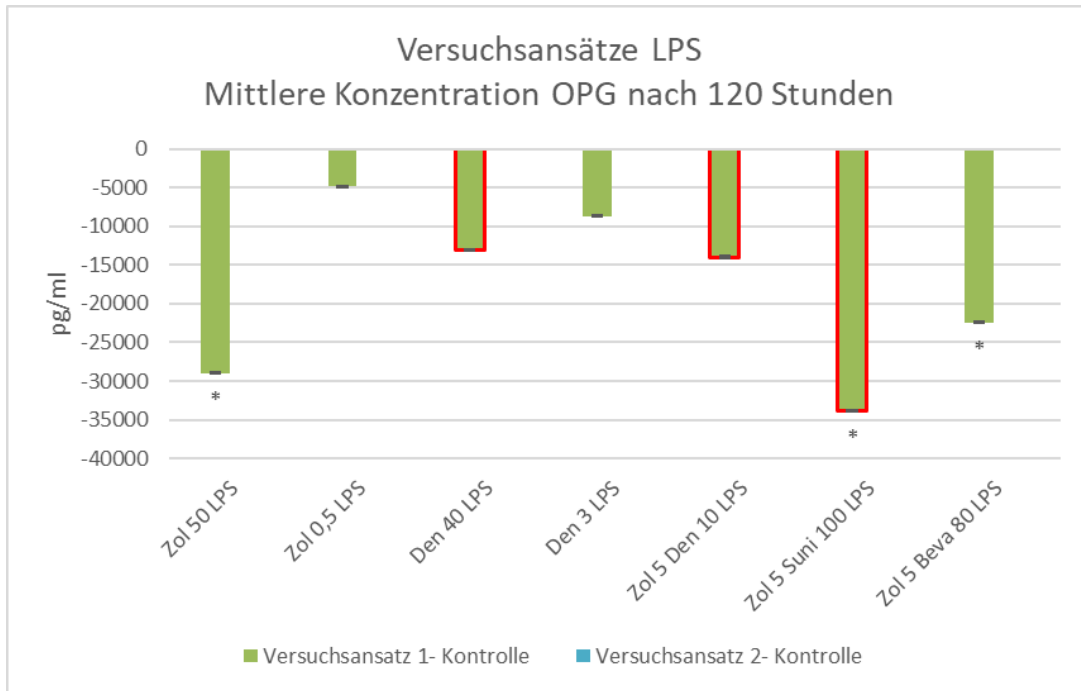


Abbildung 38 ELISA OPG-Mittelwerte der Versuchsansätze LPS im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

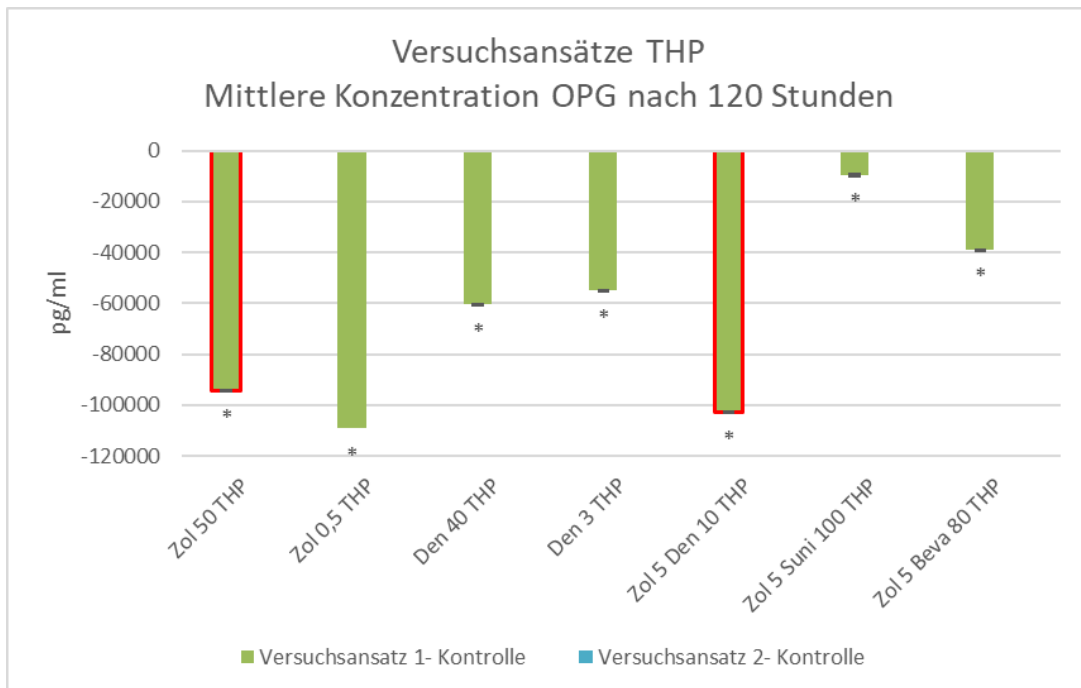


Abbildung 39 ELISA OPG-Mittelwerte der Versuchsansätze LPS+THP-1 im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsansatz 1 – Kontrolle = grün; Versuchsansatz 2 – Kontrolle = blau) nach 120 Stunden in pg/ml. Zur Kontrolle signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet, erhöhte CV-Werte mit einer roten Umrandung. Zoledronat 50µM (Zol 50), Zoledronat 0,5µM (Zol 0,5), Denosumab 40µg/ml (Den 40), Denosumab 3µg/ml (Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).

*(Den 3), Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml (Zol 5 Den 10), Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100) und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml (Zol 5 Beva 80).*

Bei der Messung von Osteoprotegerin (OPG) konnten für die Versuchsansätze nach 60 Stunden aufgrund der geringen Konzentration von OPG bzw. der mangelnden Sensitivität des ELISA-Kits keine Konzentrationen ermittelt werden. Nach 120 Stunden hingegen waren bei den unterschiedlichen Versuchsansätzen Konzentrationen OPG messbar.

Auffällig ist hierbei, dass beim Grundlagenversuch unter dem Einfluss der unterschiedlichen Medikamente bzw. unter der Kombination derer die Konzentration von OPG im Vergleich zur Kontrolle signifikant deutlich verringert ist. Dies gilt insbesondere unter dem Einfluss von hochdosiertem Zoledronat und unter der Kombination von Zoledronat mit Sunitinib sowie mit Bevacizumab.

Unter Endotoxinexposition zeichnet sich eine ähnliche Tendenz ab. Insgesamt ist bei allen Ansätzen mit LPS allerdings eine etwas niedrigere Konzentration im Verhältnis zu den Kontrollen messbar. Signifikant geringere Konzentrationen OPG im Vergleich zur Kontrolle mit LPS sind unter dem Einfluss von hochdosiertem Zoledronat und Medikamentenkombinationen von Zoledronat mit Sunitinib sowie mit Bevacizumab messbar.

Zudem ist unter Exposition von THP-1-Zellen eine gesteigerte Konzentration von OPG um fast das Doppelte im Vergleich zu den Grundlagenversuchen festzustellen.

Insgesamt zeigen sich innerhalb des Versuchsansatzes im Vergleich zur THP-Kontrolle unter dem Einfluss der unterschiedlichen Medikamente bzw. derer Kombinationen signifikant verringerte Konzentrationen OPG. Insbesondere gilt dies unter dem Einfluss von niedrig- und hochdosiertem Zoledronat sowie der Kombination von Zoledronat mit Denosumab. Anzumerken ist allerdings ein erhöhter Variationskoeffizient für die letzten beiden Werte.

### 3.4.8. Zusammenfassung ELISA-Ergebnisse

Tabelle 9 Übersicht der signifikant erhöhten (grün) und reduzierten (rot) Konzentrationswerte der ELISA-Messungen der Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, VEGF, TNF-alpha, OPG) der untersuchten Medikamentenkombinationen (Zoledronat 50  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M (Zol 50 / 5 / 0.5); Denosumab 40  $\mu$ g/ml, 3  $\mu$ g/ml (Den 40 / 3); Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10), Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100), Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80) je im Basis-, LPS- und THP-1-Versuchsansatz nach 60 Stunden Versuchszeit.

NACH 60 STUNDEN VERSUCHSZEIT											
Medikation	BASIS			LPS			LPS + THP-1				
	IL-6	IL-8	VEGF	IL-6	IL-8	VEGF	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$	VEGF
Zol 50 $\mu$ M	n.a.	↘	n.a.	↘	↘	↗	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Zol 0.5 $\mu$ M	n.a.	↗	n.a.	n.a.	↘	↘	n.a.	↗	n.a.	↗	↗
Den 40 $\mu$ g/ml	↗	n.a.	↘	↘	↘	n.a.	n.a.	n.a.	↘	↗	↗
Den 3 $\mu$ g/ml	↗	n.a.	n.a.	↘	↘	↘	n.a.	↗	↘	↗	n.a.
Zol 5 $\mu$ M + Den 10 $\mu$ g/ml	↗	n.a.	n.a.	n.a.	↘	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	↗	↗
Zol 5 $\mu$ M + Suni 100ng/ml	↗	n.a.	↗	n.a.	↘	↘	↗	↗	↘	n.a.	↘
Zol 5 $\mu$ M + Beva 80 $\mu$ g/ml	n.a.	n.a.	↘	↗	↘	↘	↗	n.a.	↘	↗	↘

Tabelle 10 Übersicht der signifikant erhöhten (grün) und reduzierten (rot) Konzentrationswerte der ELISA-Messungen der Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, VEGF, TNF-alpha, OPG) der untersuchten Medikamentenkombinationen (Zoledronat 50  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M (Zol 50 / 5 / 0.5); Denosumab 40  $\mu$ g/ml, 3  $\mu$ g/ml (Den 40 / 3); Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Denosumab 10 $\mu$ g/ml (Zol 5 Den 10), Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml (Zol 5 Suni 100), Kombination von Zoledronat 5 $\mu$ M + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml (Zol 5 Beva 80) je im Basis-, LPS- und THP-1-Versuchsansatz nach 120 Stunden Versuchszeit.

NACH 120 STUNDEN VERSUCHSZEIT																
Medikation	BASIS					LPS					LPS + THP-1					
	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	VEGF	OPG	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	VEGF	OPG	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$	VEGF	OPG
Zol 50 $\mu$ M	n.a.	↘	↗	↗	↘	n.a.	↘	↘	↘	↘	↗	↘	↗	n.a.	n.a.	↘
Zol 0.5 $\mu$ M	n.a.	↗	↗	↗	↘	n.a.	↘	↘	↘	n.a.	↗	↘	↗	↗	n.a.	↘
Den 40 $\mu$ g/ml	n.a.	↘	↗	n.a.	↘	n.a.	↗	n.a.	↘	n.a.	n.a.	↗	↗	n.a.	↘	↘
Den 3 $\mu$ g/ml	n.a.	↘	↗	↘	↘	n.a.	n.a.	↘	↘	n.a.	n.a.	↘	↗	n.a.	n.a.	↘
Zol 5 $\mu$ M + Den 10 $\mu$ g/ml	n.a.	n.a.	↗	↘	↘	n.a.	↘	↘	↘	n.a.	↗	↘	↗	↗	n.a.	↘
Zol 5 $\mu$ M + Suni 100ng/ml	n.a.	↗	↗	n.a.	↘	n.a.	↘	↘	↘	↘	n.a.	↗	↘	n.a.	n.a.	↘
Zol 5 $\mu$ M + Beva 80 $\mu$ g/ml	n.a.	n.a.	↗	↘	↘	n.a.	↗	n.a.	↘	↘	n.a.	↗	n.a.	n.a.	↘	↘

Eine Übersicht der signifikant erhöhten (grün) und reduzierten (rot) Konzentrationswerte der Zytokinmessungen unter den jeweiligen Medikamenten/-kombinationen im Vergleich zur Kontrolle des entsprechenden Versuchsansatzes ist den Tabellen 9 und 10 zu entnehmen. Messungen von RANKL (gesamt), OPG (nach 60 Stunden), IL-1 $\beta$  (nach 60 Stunden im Basis- und LPS-Versuchsansatz) sowie TNF- $\alpha$  (nach 60 und 120 Stunden im Basis- und LPS-Versuchsansatz) sind übersichtshalber nicht schematisch aufgeführt, da aufgrund zu geringer Sensitivitäten der ELISA-Kits in diesen Untersuchungen keine Messwerte ermittelt werden konnten.

## 3.5. Färbungen

### 3.5.1. Hämalan

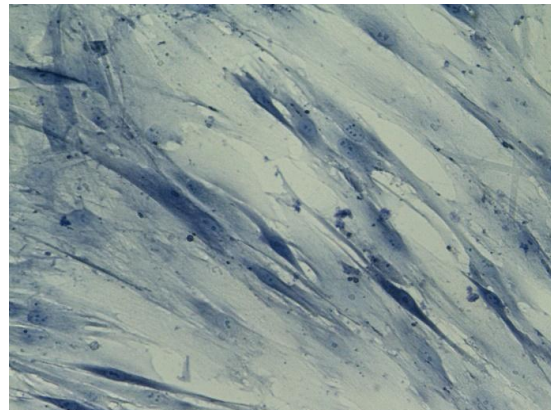
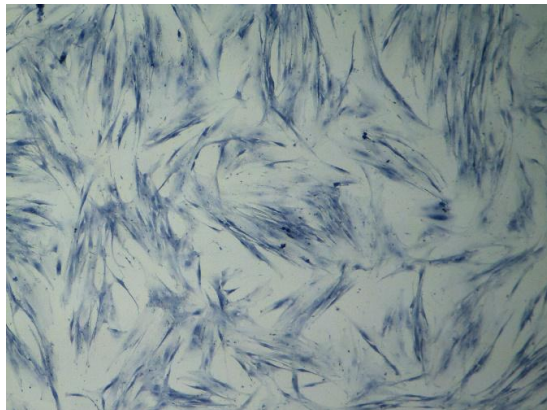
#### 3.5.1.1. Nach 60 Stunden Versuchszeit

Tabelle 11 Hämalanfärbungen der HGF im Basisversuchsansatz zu Stunde 60. Abgebildet sind Aufnahmen der folgenden Versuchsansätze je in 4-facher und 20-facher Vergrößerung: Kontrolle, Denosumab 40µg/ml.

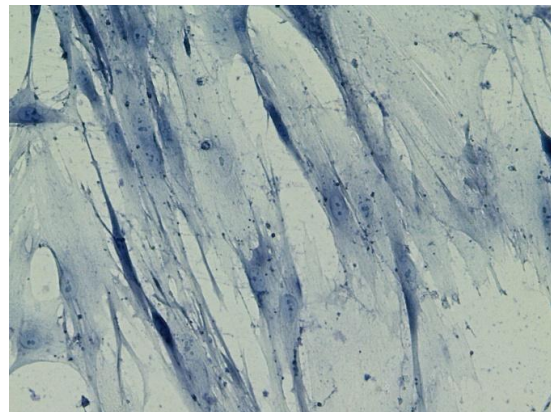
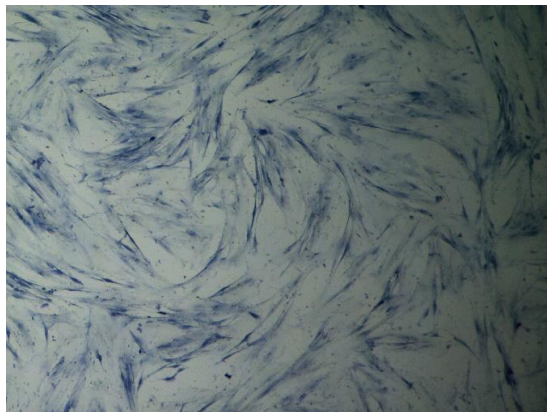
#### Basisversuchsansatz

---

##### Kontrolle



##### Denosumab 40µg/ml



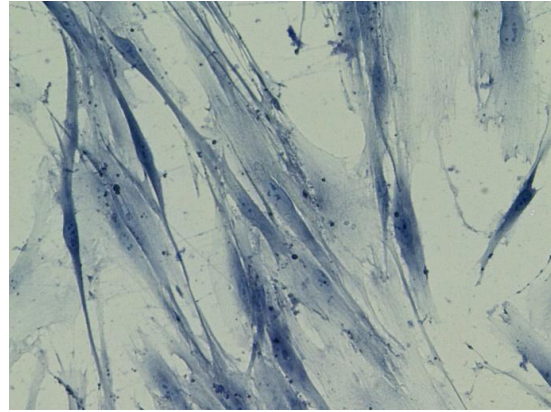
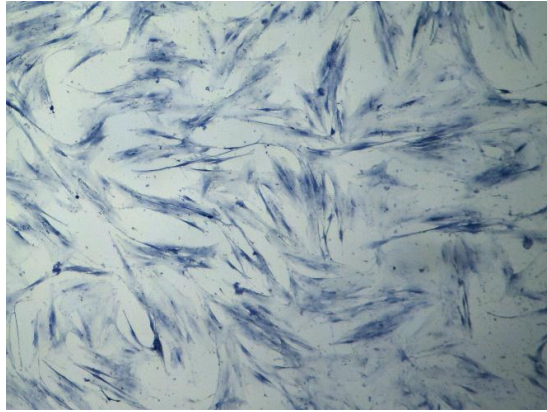


*Tabelle 12 Hämaunfärbungen der HGF im LPS-Versuchsansatz mit Ko-Stimulation durch Endotoxinexposition zu Stunde 60. Abgebildet sind Aufnahmen der folgenden Versuchsansätze je in 4-facher und 20-facher Vergrößerung: Kontrolle, Denosumab 40µg/ml.*

## **LPS-Versuchsansatz**

---

### **Kontrolle**



### **Denosumab 40µg/ml**

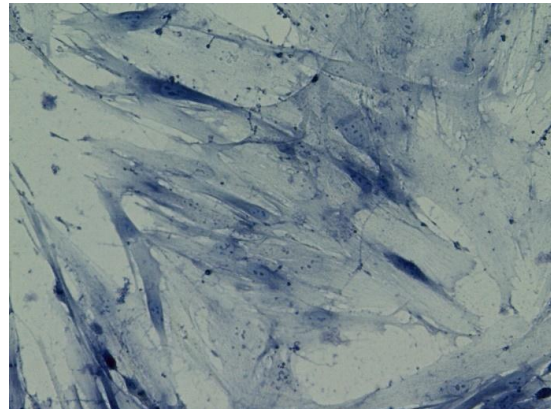
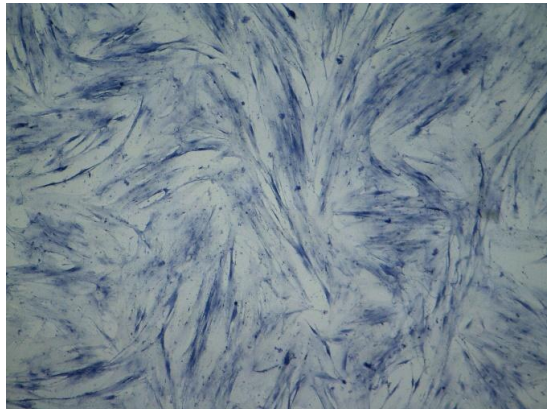
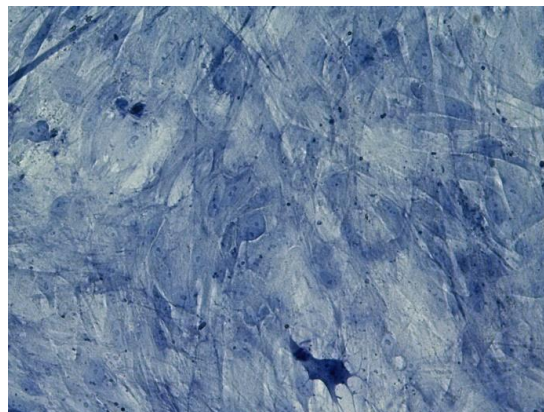
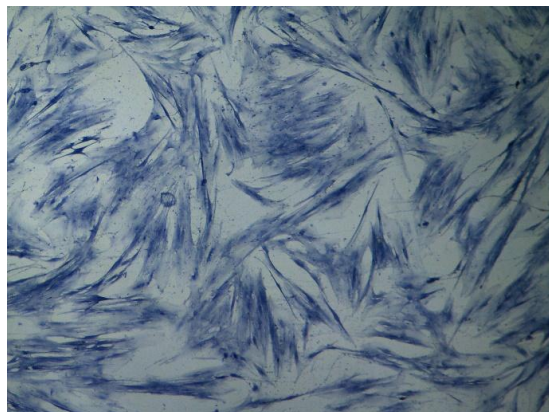


Tabelle 13 Hämalanfärbungen der HGF im LPS/THP-1-Versuchsansatz mit Ko-Stimulation durch Endotoxinexposition sowie THP-1-Zellen zu Stunde 60. Abgebildet sind Aufnahmen der folgenden Versuchsansätze je in 4-facher und 20-facher Vergrößerung: Kontrolle, Zoledronat 50µM, Denosumab 40µg/ml, Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml.

### LPS/THP-1-Versuchsansatz

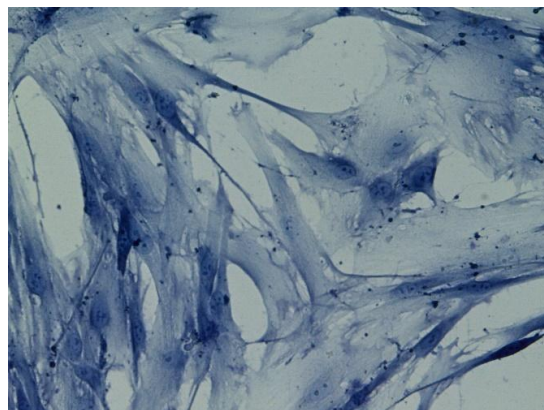
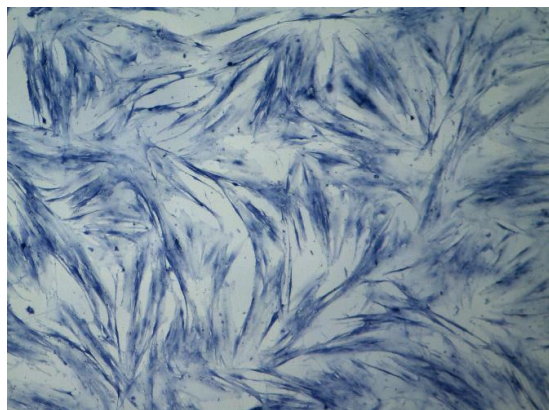
---

#### Kontrolle



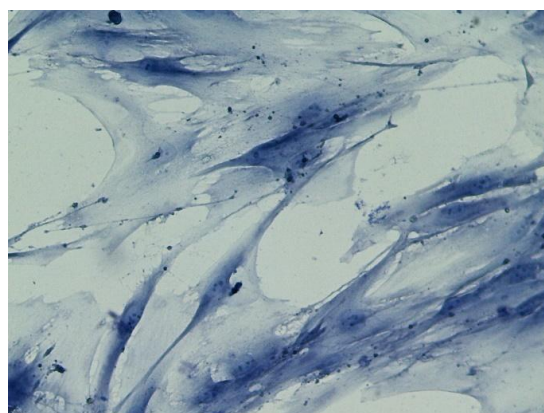
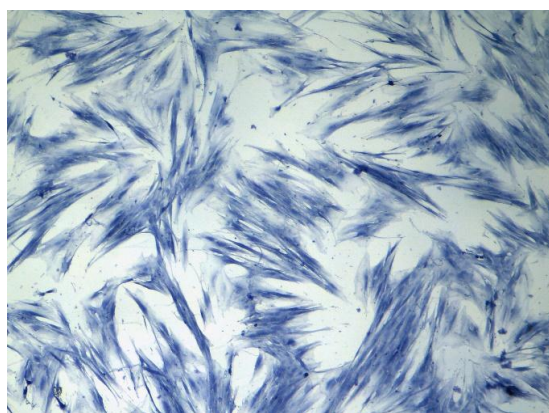
---

#### Zoledronat 5µM + Bevacizumab 80µg/ml



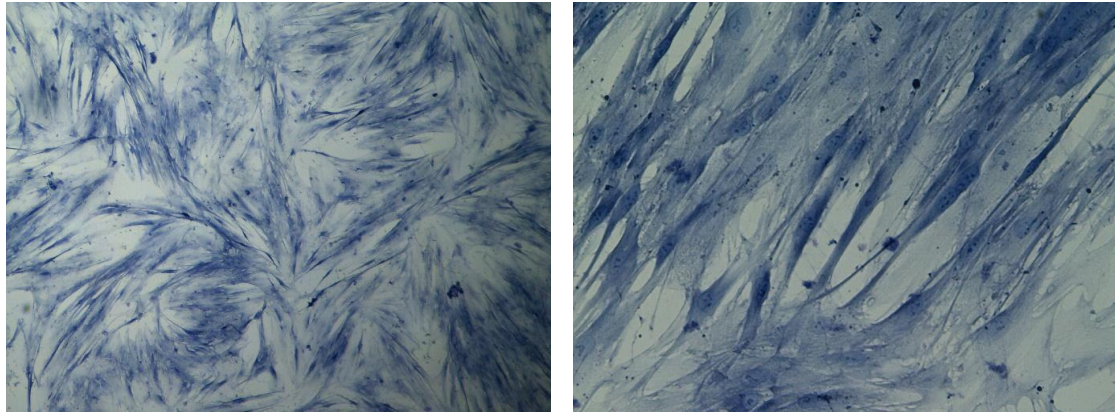
---

#### Zoledronat 5µM + Sunitinib 100ng/ml

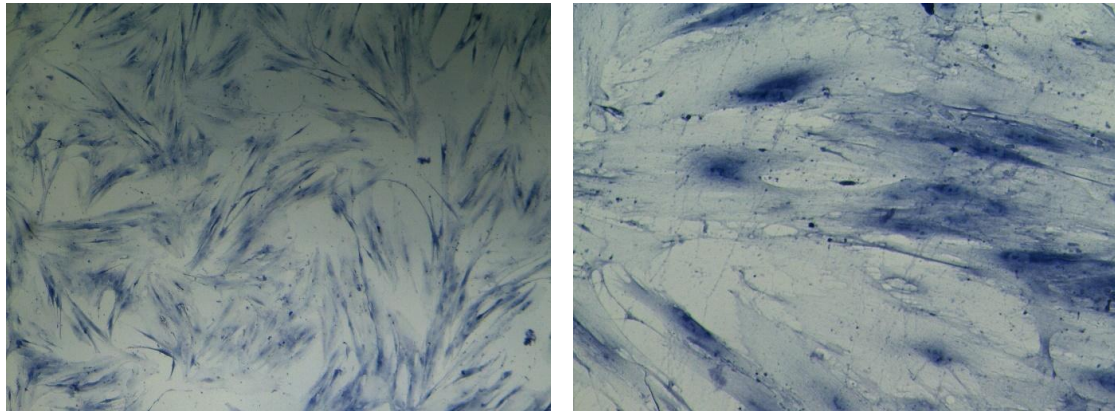




---

**Zoledronat 50 $\mu$ M**

---

**Denosumab 40 $\mu$ g/ml**

In der Hämalaunfärbung des Basisversuchsansatzes zeigen sich keine morphologischen Veränderungen der HGF im Vergleich zur Kontrolle. Unter Endotoxinexposition durch LPS erscheint die Kontrolle mit LPS im Vergleich zur Kontrolle des Basisversuchsansatzes lückenhafter, unter Einfluss von Denosumab werden allerdings keine wesentlichen Unterschiede sichtbar.

Unter zusätzlicher Exposition von THP-1-Zellen zeigt sich für die hohen Dosen AR sowie die Wirkstoffkombination von Zoledronat mit Sunitinib Übereinanderlagerungen der HGF. Zellen, die mit Zoledronat mit Bevacizumab exponiert waren, weisen eine verringerte Anzahl Nucleoli auf und solche, die mit Zoledronat und Sunitinib exponiert waren, eine vermehrte Vesikelbildung.



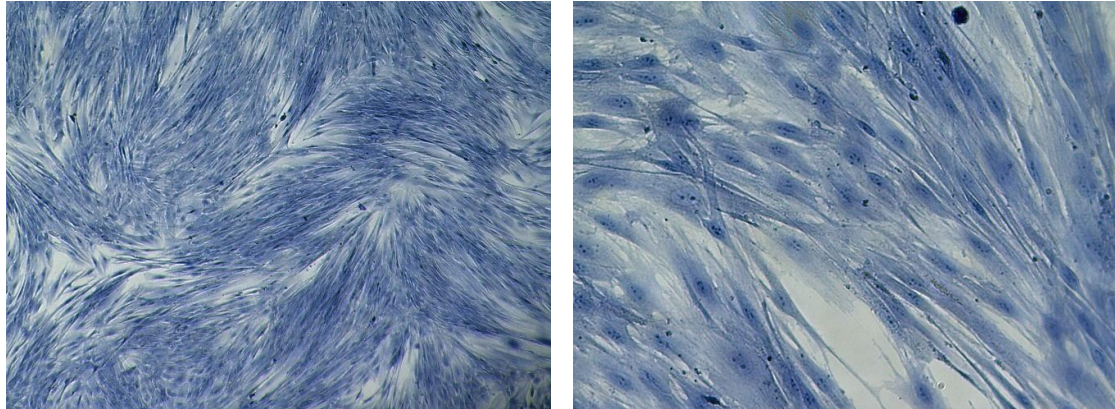
### 3.5.1.2. Nach 120 Stunden Versuchszeit

Tabelle 14 Hämalanfärbungen der HGF im Basisversuchsansatz zu Stunde 120. Abgebildet sind Aufnahmen der folgenden Versuchsansätze je in 4-facher und 20-facher Vergrößerung: Kontrolle, Zoledronat 50 $\mu$ M, Denosumab 40 $\mu$ g/ml, Zoledronat 5 $\mu$ M+ Sunitinib 100ng/ml und Zoledronat + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml.

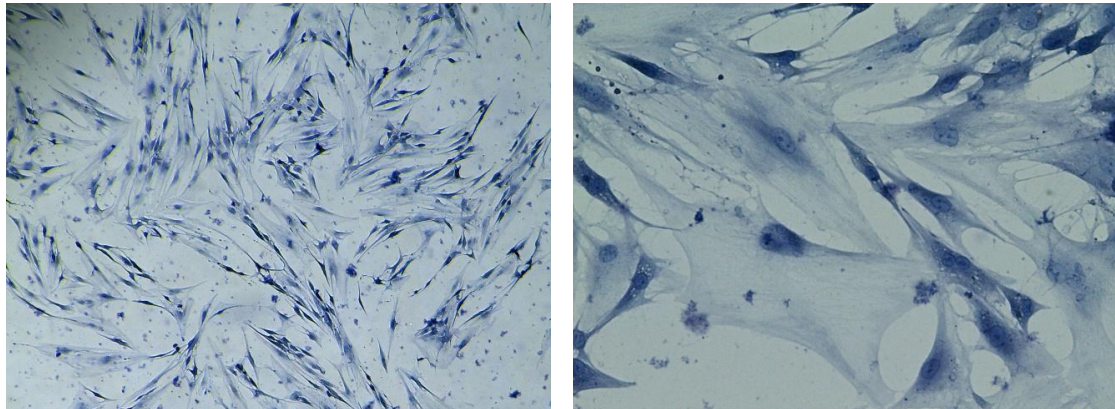
#### Basisversuchsansatz

---

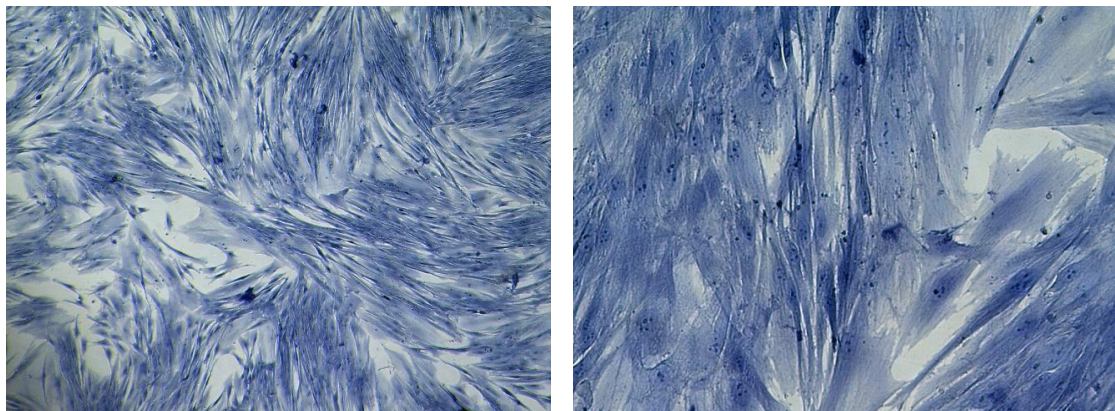
##### Kontrolle



##### Zoledronat 50 $\mu$ M



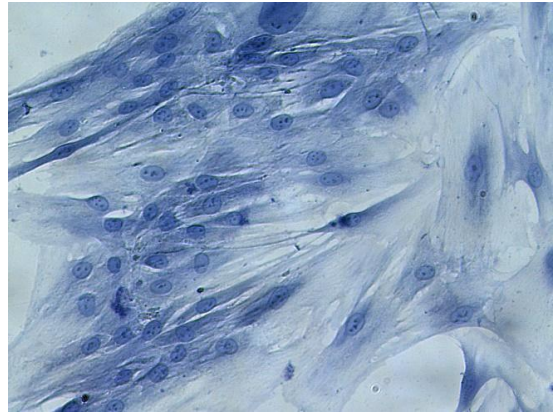
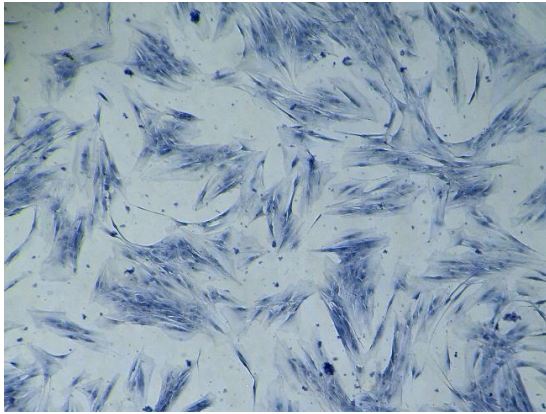
##### Denosumab 40 $\mu$ g/ml





---

**Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml**



---

**Zoledronat 5 $\mu$ M + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml**

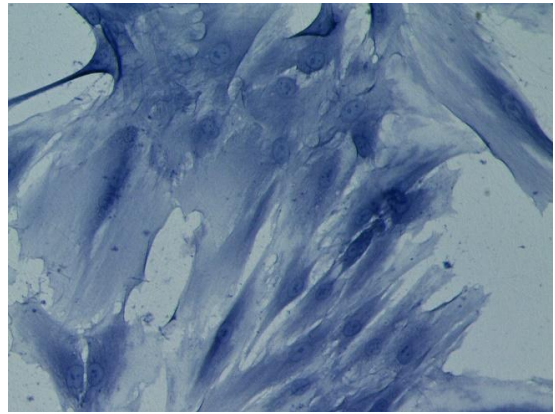
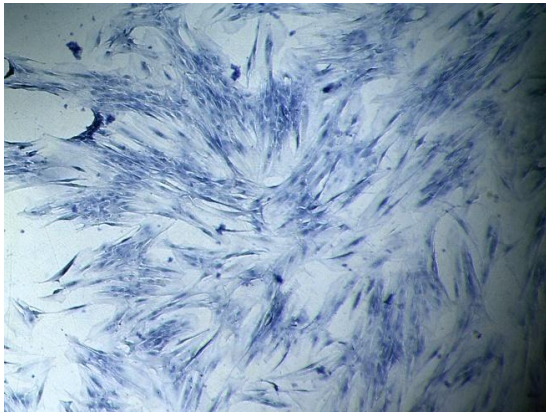


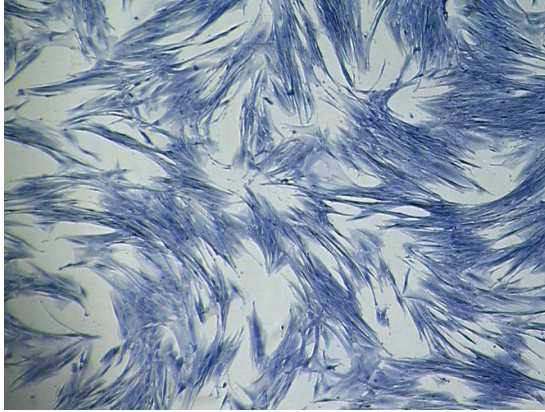


Tabelle 15 Hämalaufärbungen der HGF im LPS-Versuchsansatz mit Ko-Stimulation durch Endotoxinexposition zu Stunde 120. Abgebildet sind Aufnahmen der folgenden Versuchsansätze je in 4-facher und 20-facher Vergrößerung: Kontrolle, Zoledronat 50µM, Denosumab 40µg/ml, Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml.

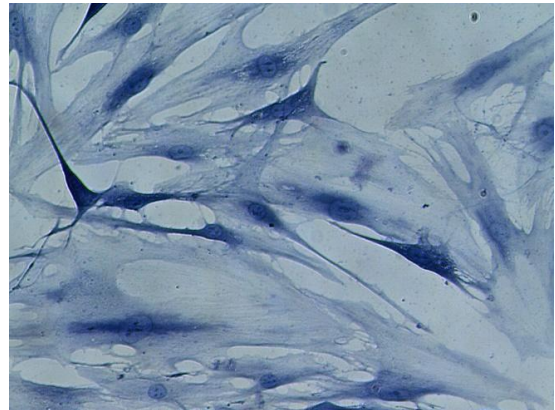
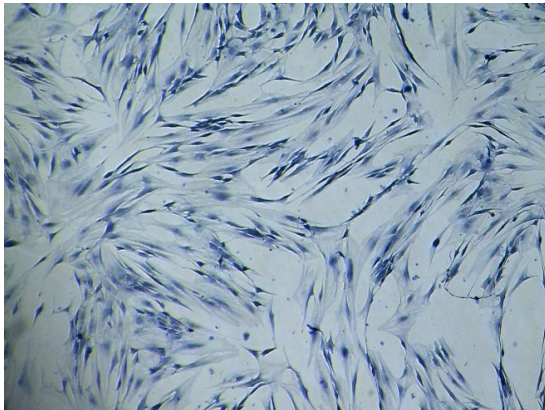
## LPS-Versuchsansatz

---

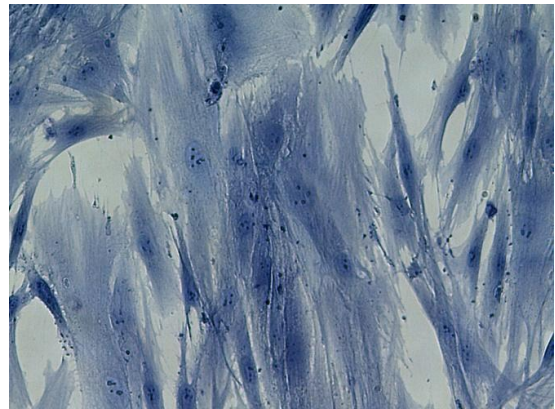
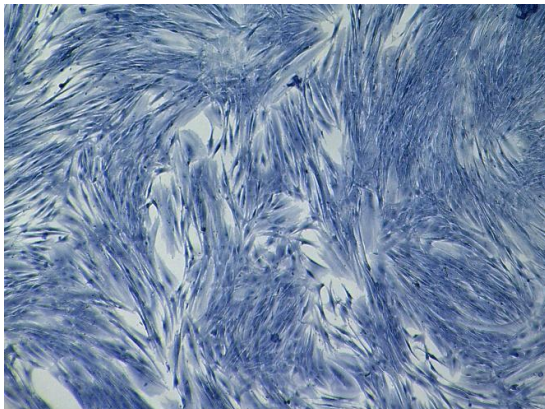
### Kontrolle



### Zoledronat 50µM



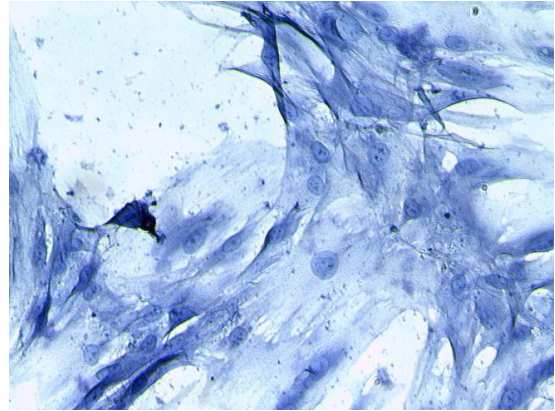
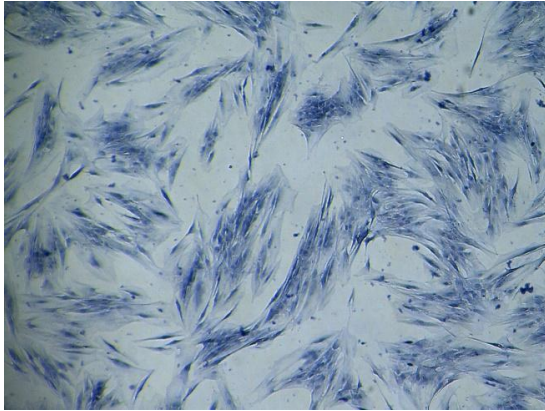
### Denosumab 40µg/ml





---

**Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml**



---

**Zoledronat 5 $\mu$ M + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml**

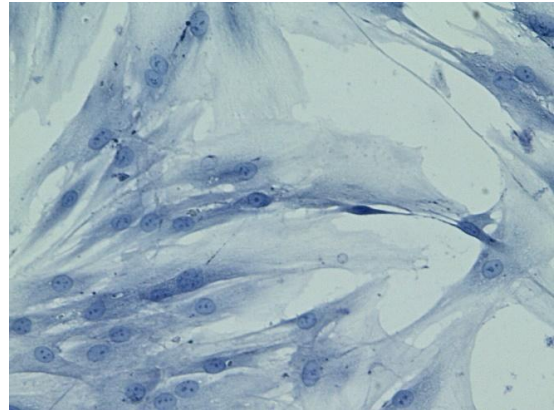
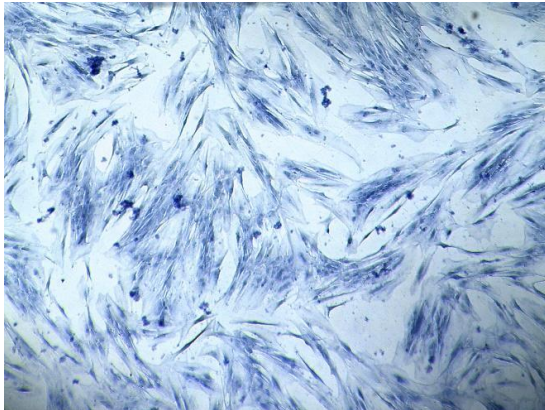


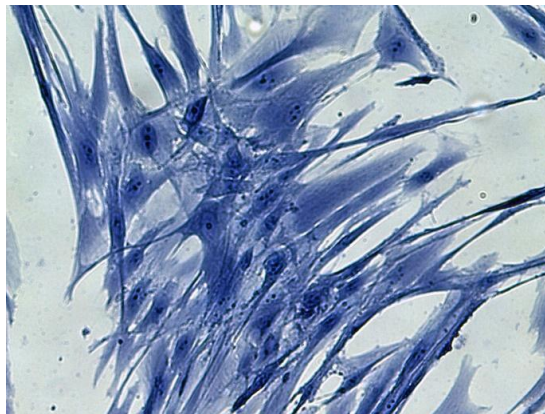
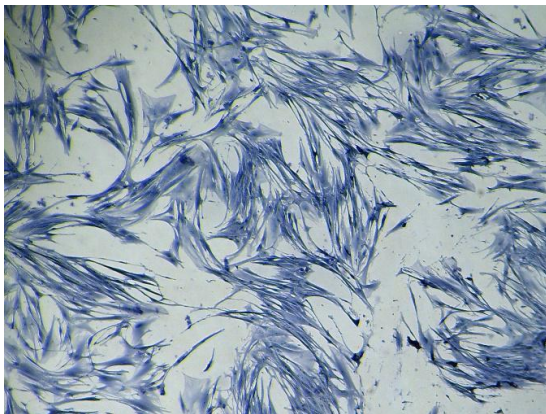


Tabelle 16 Hämalanfärbungen der HGF im LPS/THP-1-Versuchsansatz mit Ko-Stimulation durch Endotoxinexposition sowie THP-1-Zellen zu Stunde 120. Abgebildet sind Aufnahmen der folgenden Versuchsansätze je in 4-facher und 20-facher Vergrößerung: Kontrolle, Zoledronat 50µM, Denosumab 40µg/ml, Zoledronat 5µM+ Sunitinib 100ng/ml und Zoledronat + Bevacizumab 80µg/ml.

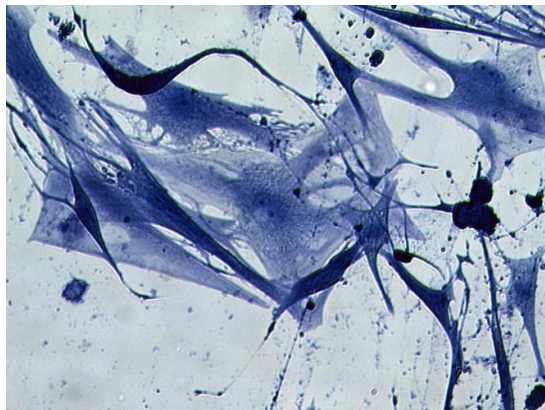
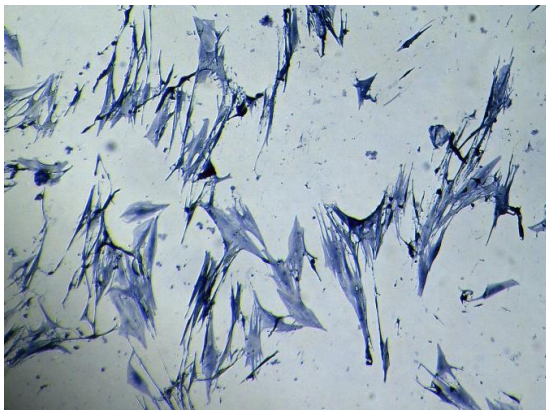
### LPS/THP-1-Versuchsansatz

---

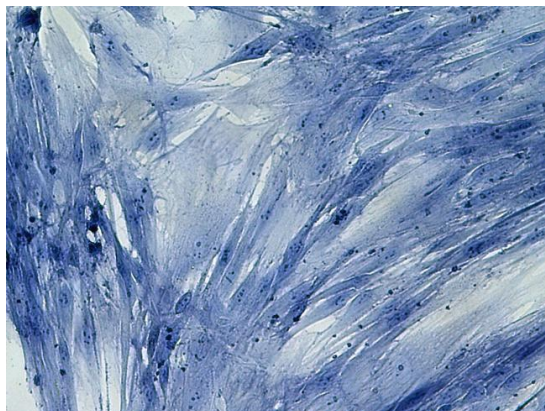
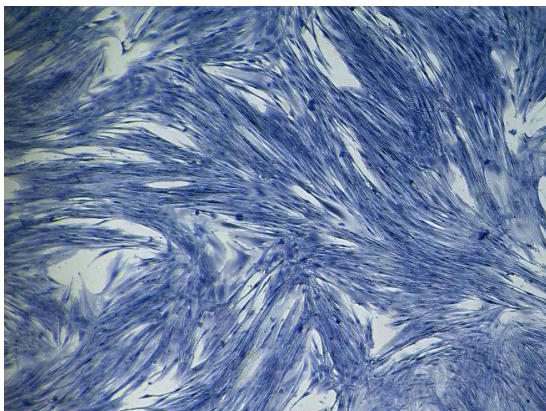
#### Kontrolle



#### Zoledronat 50µM



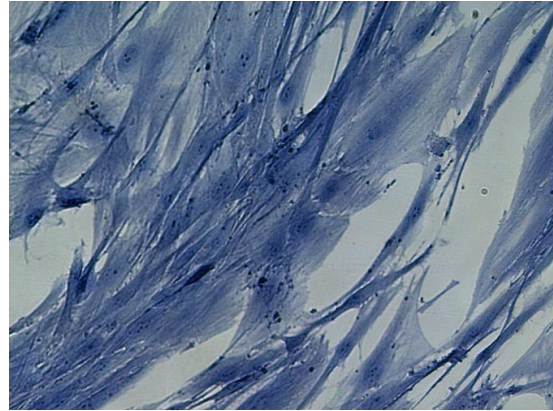
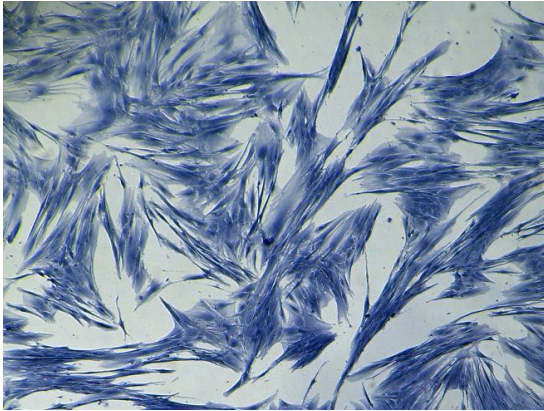
#### Denosumab 40µg/ml





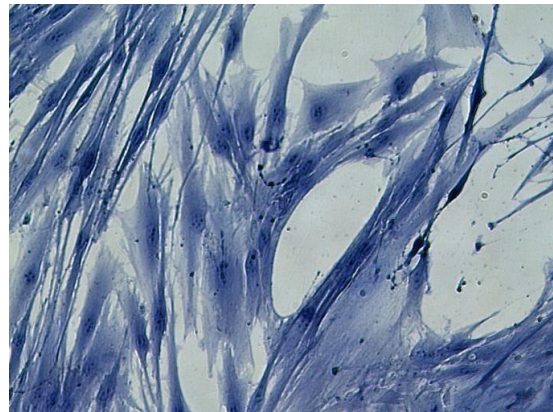
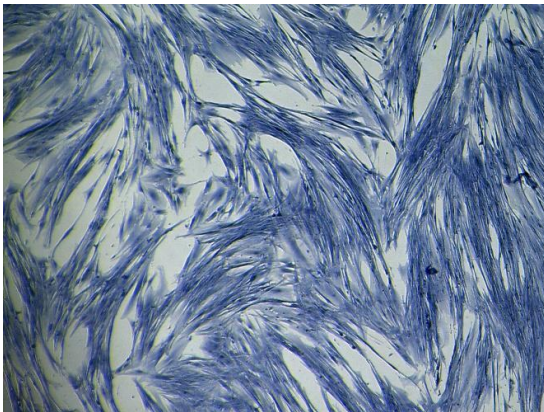
---

**Zoledronat 5 $\mu$ M + Sunitinib 100ng/ml**



---

**Zoledronat 5 $\mu$ M + Bevacizumab 80 $\mu$ g/ml**



In der Hämalaun-Färbung sind nach 120 Stunden deutliche Unterschiede im Zellbild zwischen den Wirkstoffkombinationen und denen der Kontrollen sichtbar. Während sich bei der Kontrolle im Basisversuch ein dichter, kompakter und gleichmäßiger Zellrasen zeigt, ist dieser unter Zugabe der Wirkstoffkombinationen weniger dicht besiedelt. Unter Zoledronat mit Sunitinib oder Bevacizumab lassen sich lokale Anhäufungen der Zellen erkennen. Unter Sunitinib sind teils überdimensionierte Zellkerne sichtbar und unter Bevacizumab sind die Zellkerne nur undeutlich abgrenzbar.

Im LPS-Versuchsansatz sind bereits in der Kontrolle LPS mehr Lücken im Zellrasen und eine weniger deutliche Zellabgrenzung sichtbar. Unter Einfluss der Medikamente zeigt sich eine eindeutige Lückenbildung und auch eine verminderte Zahl der Nucleoli in den einzelnen Zellen.

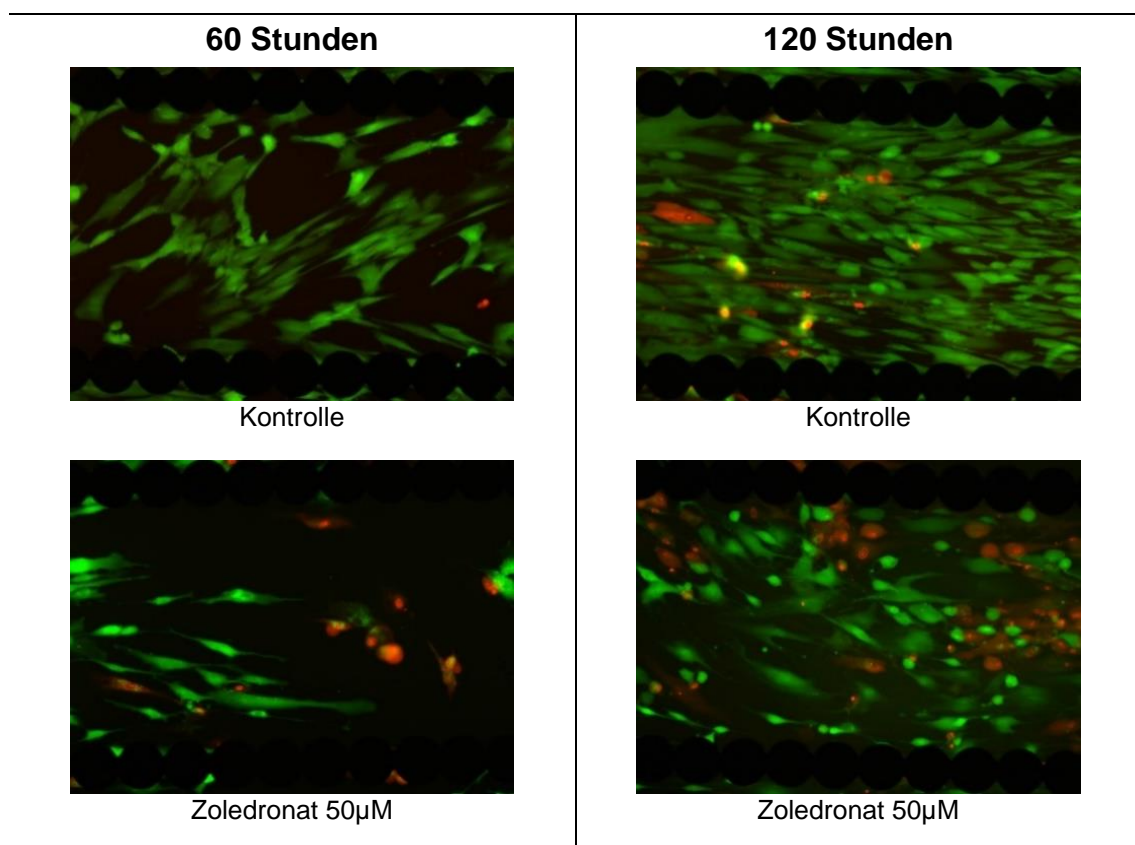
Unter zusätzlichem Einfluss von THP-1-Zellen zeigt sich bereits in der Kontrolle ein gänzlich verändertes Zellbild im Vergleich zur Kontrolle der Basisversuche.

Die Anhaftung der Zellen am Wellboden erscheint weniger stabil durch eine deutliche Verschmälerung der Zellausläufer. Zudem überlappen sich die Fibroblasten teilweise. Wie auch in den Versuchsansätzen Basis und LPS zeigt sich der Zellrasen unter Einfluss der Medikamentenkombinationen vergleichsweise lückenhaft und die Übereinanderlagerungen sind noch stärker erkennbar. Auch hier zeigt sich zudem eine reduzierte Anzahl Nucleoli unter Einfluss von Bevacizumab.

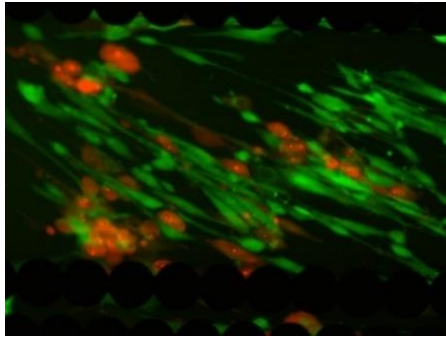
### 3.5.2. LIVE/DEAD

#### 3.5.2.1. Hohe Dosen Antiresorptiva

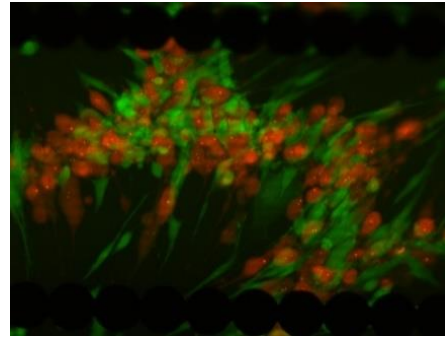
Tabelle 17 Live/Dead-Färbung der HGF im Basisversuchsansatz unter Exposition von hohen Dosen Antiresorptiva (Zoledronat 50µM und Denosumab 40µg/ml) nach 60 und 120 Stunden Versuchszeit in 10-facher Vergrößerung.







Denosumab 40µg/ml

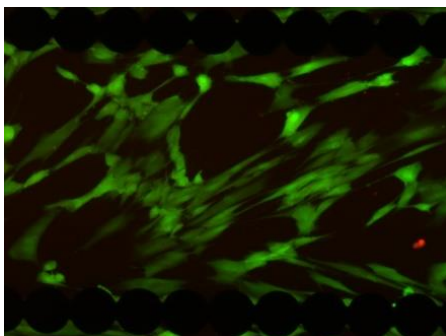


Denosumab 40µg/ml

In den LIVE/DEAD-Färbungen zeigen sich deutliche Unterschiede im Zellbild zwischen den Medikamentenkombinationen und den der Kontrollen je zu Stunde 60 und zu Stunde 120. Wie bereits durch Voruntersuchungen vermutet (Yuan et al., 2019) zeigten hohe Konzentrationen der Bisphosphonate, wie Zoledronat 50µM, eine deutlich verringerte Anzahl lebender Zellen (grün) und auch eine veränderte Zellmorphologie. Das „Abkugeln“ der absterbenden Zellen (rot) wird sichtbar und die Zellform der HGF erscheint schmaler. Ähnliche Beobachtungen lassen sich bei dem monoklonalen Antikörper Denosumab erkennen, wobei der Zellrasen zu Stunde 120 zudem gedrungen und aufgrund der übereinanderliegenden Zellen ungeordnet erscheint.

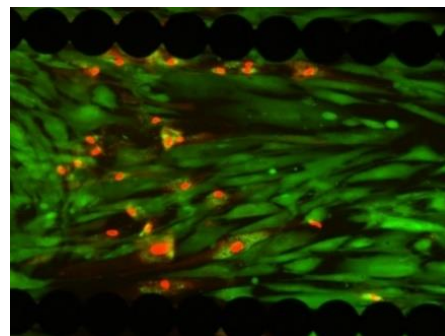
*Tabelle 18 Live/Dead-Färbung der HGF im LPS-Versuchsansatz unter Exposition von hohen Dosen Antiresorptiva (Zoledronat 50µM und Denosumab 40µg/ml) und Endotoxinexposition durch LPS nach 60 und 120 Stunden Versuchszeit in 10-facher Vergrößerung.*

### 60 Stunden

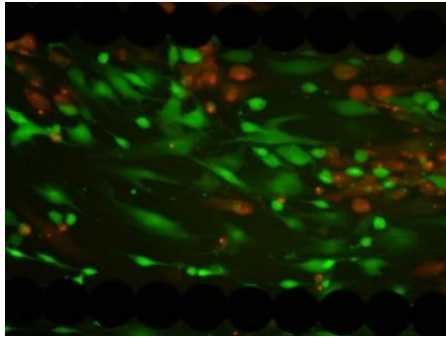


Kontrolle mit LPS

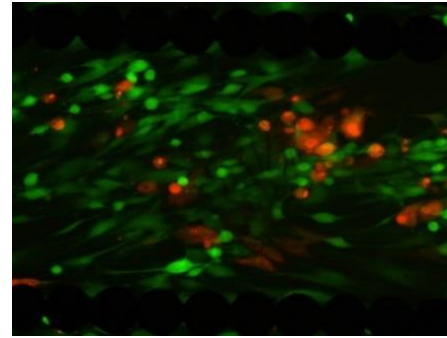
### 120 Stunden



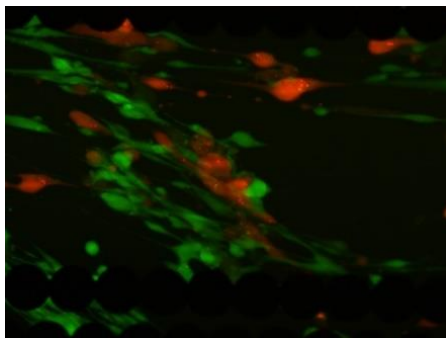
Kontrolle mit LPS



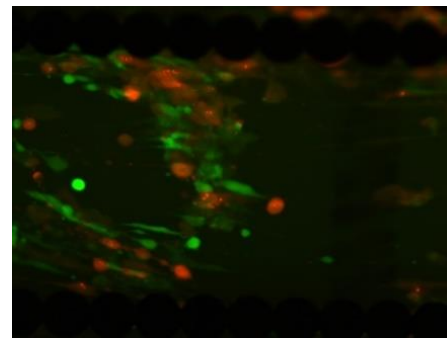
Zoledronat 50µM mit LPS



Zoledronat 50µM mit LPS



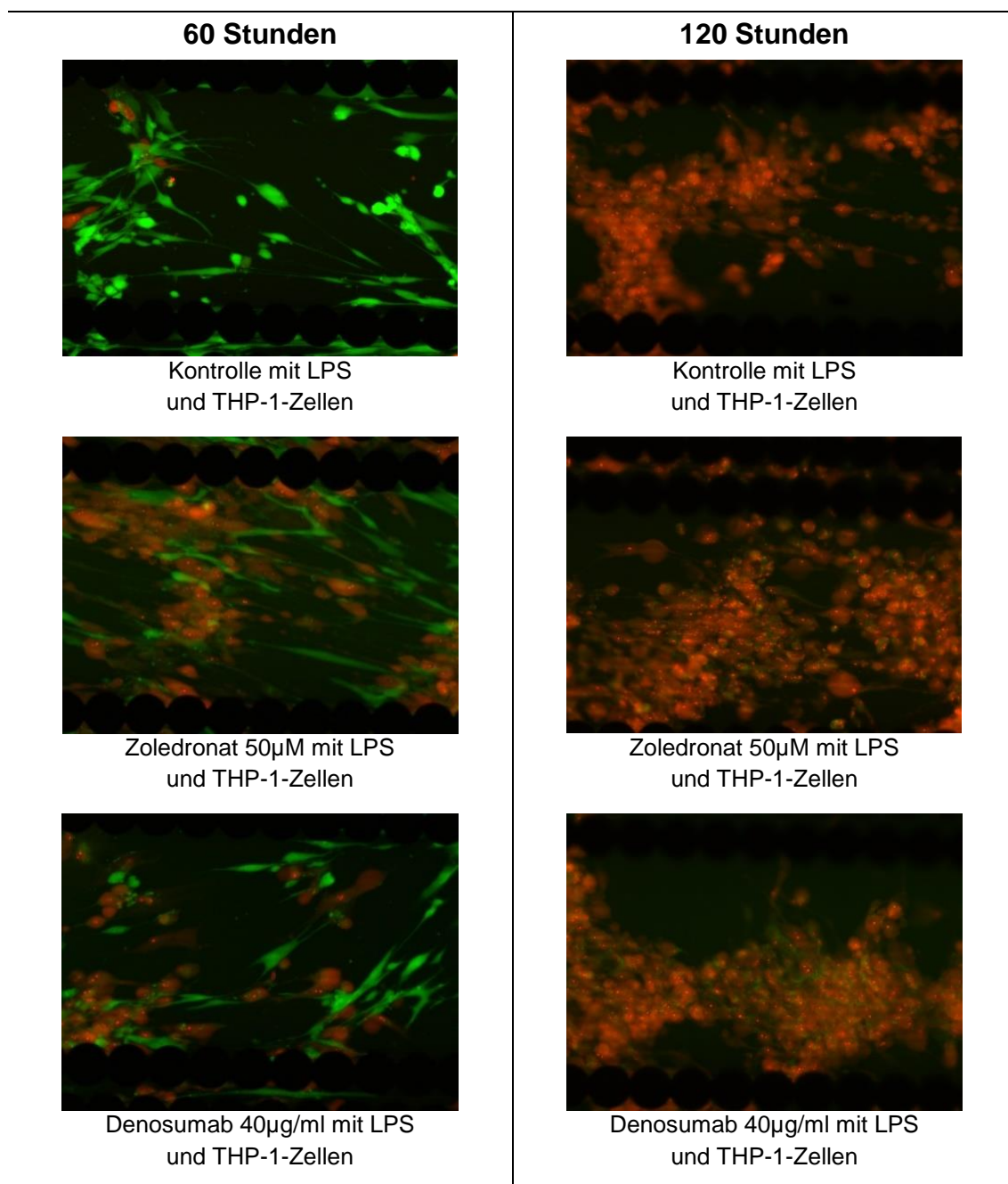
Denosumab 40µg/ml mit LPS



Denosumab 40µg/ml mit LPS

Unter Einfluss der Endotoxinexposition durch die Lipopolysaccharide verstärken sich diese Beobachtungen. Die schmale Form der Zellen in Kombination mit hohen Antiresorptivadosen scheint eine verminderte Anhaftung an den Boden und damit das verfrühte Absterben der HGF als Folge zu haben.

Tabelle 19 Live/Dead-Färbung der HGF im LPS/THP-1-Versuchsansatz unter Exposition von hohen Dosen Antiresorptiva (Zoledronat 50µM und Denosumab 40µg/ml) und Endotoxin- sowie THP-1-Exposition nach 60 und 120 Stunden Versuchszeit in 10-facher Vergrößerung.

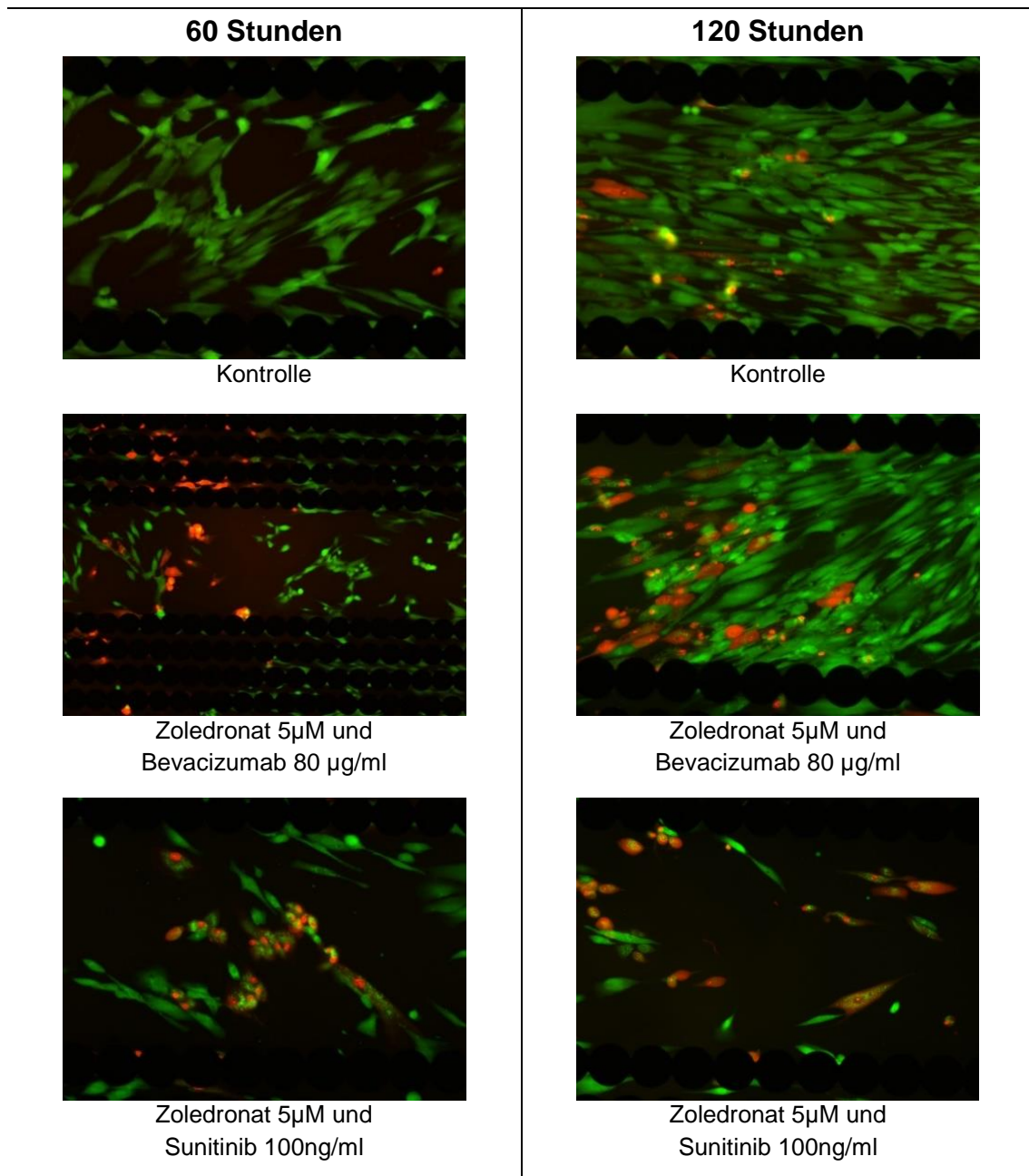


Setzt man die Zellen einer zusätzlichen immunologischen Stimulation durch Zugabe von THP-1- Zellen aus, erscheinen Wachstum und Morphologie der Zellen grundsätzlich verändert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe lösen sich aber unter AR-Exposition deutlich früher Fibroblasten ab, was zu Stunde 60 bereits sichtbar ist. Nach 120 Stunden ist dann zwar eine deutliche Vermehrung der

Zellen zu erkennen, doch sind die Zellen sowohl in der Kontrolle als auch unter den hohen AR-Dosen nicht mehr vital. Der Zellrasen wirkt ungeordnet und sind lokal angehäuft.

### 3.5.2.2. Kombinationstherapie der Antiresorptiva mit den Targeted Therapies

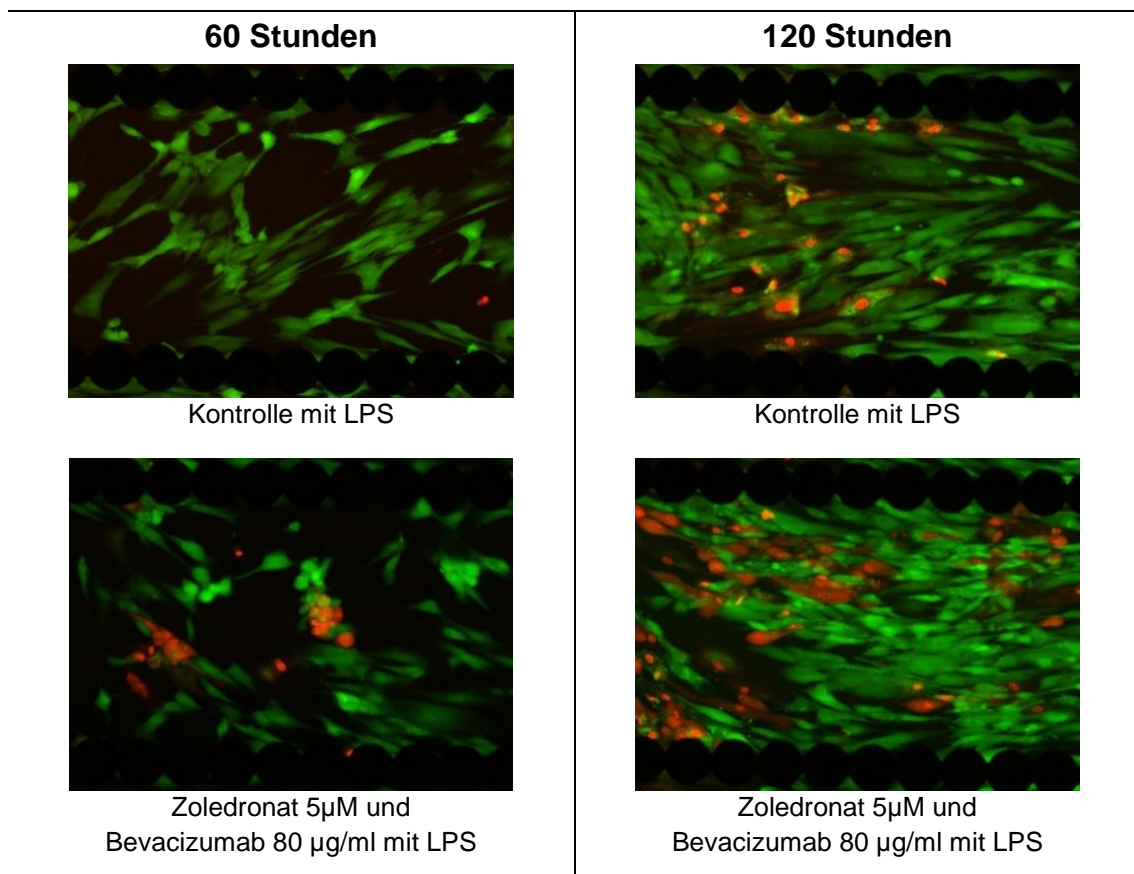
Tabelle 20 Live/Dead-Färbung der HGF im Basisversuchsansatz unter Exposition von Kombinationstherapie der Antiresorptiva mit den Targeted Therapies (Zoledronat 5µM mit Sunitinib 100ng/ml und mit Bevacizumab 80µg/ml) nach 60 und 120 Stunden Versuchszeit in 10-facher Vergrößerung, Eview-Plates.

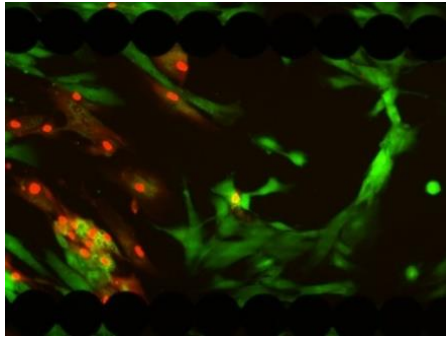




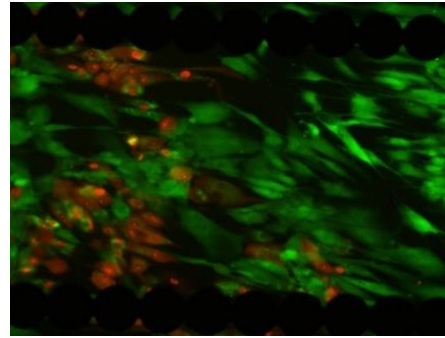
Die Kombination von den Antiresorptiva mit den TCT hat bei niedrigeren Konzentrationen ebenfalls einen ausgeprägten Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Im Basisversuchsansatz zeigt sich in der Kontrolle das Bild eines intakten und kompakten Zellrasens vitaler Fibroblasten, nur vereinzelt sind tote Zellen erkennbar. Unter Einfluss von Zoledronat und Sunitinib ist eine ausgeprägte Lückenbildung sichtbar. Die Zellen haben ihre adhärente Verbindung zum Wellboden fast vollständig verloren und das Verhältnis der noch verbliebenen Zellen von devitalen zu vitalen Fibroblasten hat sich drastisch erhöht. Ein ähnliches Bild zeigt sich unter Einfluss von Zoledronat mit Bevacizumab, jedoch etwas weniger ausgeprägt.

*Tabelle 21 Live/Dead-Färbung der HGF im LPS-Versuchsansatz unter Exposition von Kombinationstherapie der Antiresorptiva mit den Targeted Therapies (Zoledronat 5µM mit Sunitinib 100ng/ml und mit Bevacizumab 80µg/ml) sowie unter Endotoxinexposition nach 60 und 120 Stunden Versuchszeit in 10-facher Vergrößerung, Eview-Plates.*





Zoledronat 5µM und  
Sunitinib 100ng/ml mit LPS

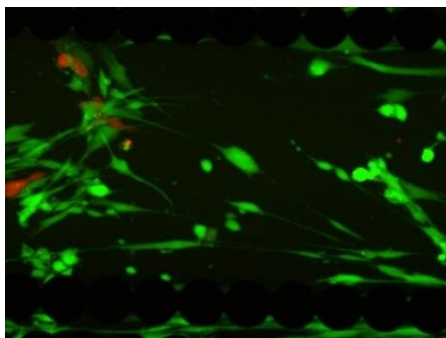


Zoledronat 5µM und  
Sunitinib 100ng/ml mit LPS

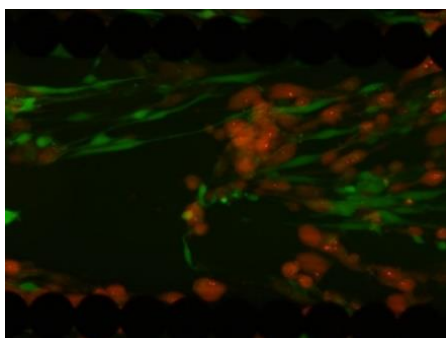
Im LPS-Versuchsansatz sind bereits in der Kontrolle sichtbar mehr devitale Zellen zu verzeichnen, der Zellrasen ist allerdings noch intakt und konfluent. Unter Zugabe der Medikamentenkombinationen zeigt sich dieser hingegen aufgelöst. Vor allem unter Einfluss von Sunitinib stellt sich erneut ein starkes Missverhältnis von devitalen zu vitalen Zellen dar.

*Tabelle 22 Live/Dead-Färbung der HGF im LPS/THP-1-Versuchsansatz unter Exposition von Kombinationstherapie der Antiresorptiva mit den Targeted Therapies (Zoledronat 5µM mit Sunitinib 100ng/ml und mit Bevacizumab 80µg/ml) sowie unter Endotoxin- und THP-1-Exposition nach 60 und 120 Stunden Versuchszeit in 10-facher Vergrößerung, Eview-Plates.*

### 60 Stunden

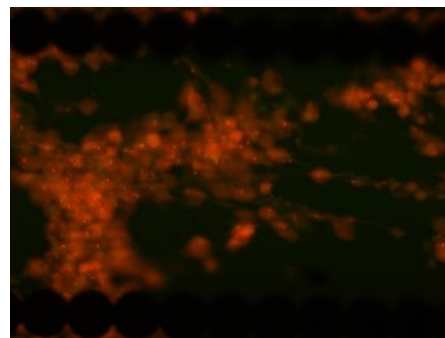


Kontrolle mit LPS + THP-1

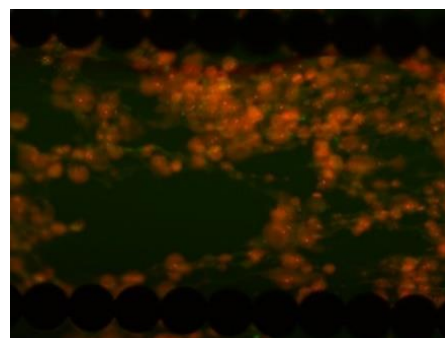


Zoledronat 5µM und  
Bevacizumab 80 µg/ml mit LPS + THP-1

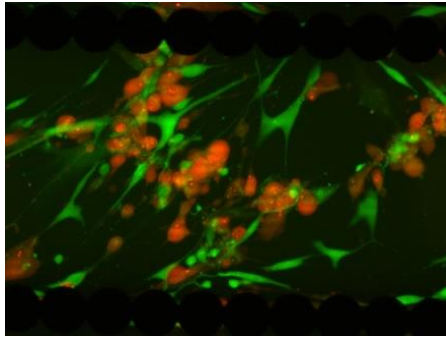
### 120 Stunden



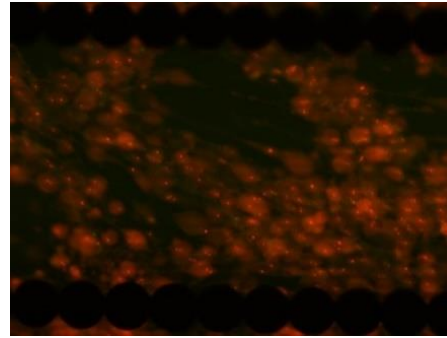
Kontrolle mit LPS + THP-1



Zoledronat 5µM und  
Bevacizumab 80 µg/ml mit LPS + THP-1



Zoledronat 5 $\mu$ M und  
Sunitinib 100ng/ml mit LPS + THP-1



Zoledronat 5 $\mu$ M und  
Sunitinib 100ng/ml mit LPS + THP-1

Im THP-1+LPS-Versuchsansatz erscheint schon der Zellrasen der Kontrolle ungeordnet, lückenhaft und übereinandergelagert. Dieses Bild verstärkt sich massiv unter Einfluss der Medikamentenzusätze. Die Zellviabilität ist nach 120 Stunden Versuchszeit stark beeinträchtigt und ein vermehrter Zelltod sichtbar.

### **3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse**

Die in vitro-Untersuchungen zeigen eine signifikant reduzierte Überlebensrate der HGF-Zellen unter hoher Konzentration BP (Zol), Kombinationstherapie von AR (Zol + Den) sowie unter Kombinationstherapie von AR mit TCT's (SOR, SUN, BEV, SIRO) auf. Bei zusätzlicher bakterieller Reizung mittels LPS lässt sich diese unter hoher Konzentration BP (Zol), Kombinationstherapie von AR (Zol + Den) sowie unter Kombinationstherapie von AR mit TCT's (SOR, SUN, BEV, SIRO) beobachten. Im Mini-Immunologie-Modell mit LPS und THP-1-Zellen stellt sich eine signifikant reduzierte Überlebensrate der HGF-Zellen unter allen medikamentösen Versuchsansätzen heraus ( $p < 0.05$ ).

Die histologischen Färbungen (Hämalaun und L/D) belegen die Toxizität der untersuchten Wirkstoffkombinationen ( $p < 0.05$ ), welche zu zellmorphologischen Veränderungen der HGF-Zellen, wie Veränderungen des Zellkerns und einer Vermehrung der Nukleoli, sowie zu einer verringerten Zellzahl führen.

Im simulierten indirekten Scratch kommt es zu Anhaftungsstörungen der HGF-Zellen und damit zu einer verringerten Überlebensrate der Zellen. Dies gilt insbesondere unter zusätzlichem Einfluss durch LPS.

In der Zytokinanalyse finden sich in allen drei Versuchsansätzen unter Einfluss der Medikamente und deren Kombinationen signifikant erniedrigte Konzentrationen OPG, vor allem im Basis- und LPS/THP-1-Versuchsansatz. Die Expression von VEGF ist unter Einfluss von Medikamentenkombinationen mit Bevacizumab verringert.



## **4. Diskussion**

Die Medikamenten-assoziierte Kiefernekrose ist eine klinisch relevante Nebenwirkung, die durch die Gabe von Antiresorptiva und durch zielgerichtete Krebstherapeutika wie Tyrosinkinase-, VEGF- und mTOR-Inhibitoren als Co-Risikofaktoren verursacht wird (Ruggiero et al., 2014, Abel Mahedi Mohamed et al., 2018, Ruggiero et al., 2022). Die MRONJ kann bei der alleinigen Verabreichung der jeweiligen Medikamente auftreten (Estilo et al., 2008, Garuti et al., 2016, Erovigni et al., 2016), allerdings wird die Mehrzahl der Patienten häufig in sequenzieller Verabreichung verschiedener antiresorptiver und antiangiogener Medikamente therapiert (Beuselinck et al., 2012, van Cann et al., 2018, Abel Mahedi Mohamed et al., 2018, Brunello et al., 2009). Aufgrund der Wirkungsweise von AR sowie der Halbwertszeiten von BP muss von einer Akkumulation der Einzelwirkstoffwirkungen im Gewebe ausgegangen werden (Malan et al., 2012, Basso et al., 2013, Reid et al., 2007). Dementsprechend wird bei einer Kombinationstherapie von AR mit zielgerichteten Krebstherapien eine Anreicherung von Medikamenten u.a. auch in Gewebezellen wie Gingivafibroblasten angenommen. Es ist jedoch unklar, inwieweit die Kombinationstherapien eine Erhöhung des MRONJ-Risikos bewirken. Denkbar wäre hier eine Steigung von toxischen Wirkungen auf Gewebezellen, wie z.B. Fibroblasten. Dies sind die ersten Studien, in der die Auswirkungen einer Kombinationstherapie von Antiresorptiva mit zielgerichteten Krebstherapien an humanen Gingivafibroblasten auf das orale Weichgewebe dezidiert untersucht wurden.

### **4.1. MRONJ durch Antiresorptiva**

MRONJ konnte in Fallberichten unter allen therapeutisch verwendeten AR nachgewiesen werden (Khan et al., 2017, Ruggiero et al., 2009b, Ruggiero et al., 2022). Unter den Bisphosphonaten wird das Aminobisphosphonat Zoledronat, ein BP der 3. Generation, als hocheffektiv angesehen (Fleisch, 1997, Tanaka et al., 2013) birgt jedoch das Risiko einer BRONJ (Marx, 2003), deren Ätiopathogenese noch in der Diskussion ist. Hierbei ist davon auszugehen, dass es sich um eine multifaktorielle Entwicklung des Krankheitsbildes handelt (On et

al., 2021). Die Weichgewebstoxizität ist einer der Ätiologiefaktoren, die für die Pathologie der MRONJ diskutiert werden. Wie eingangs erläutert erscheint allein die direkte Lagebeziehung von Mandibula und Maxilla zu Epithel- und Bindegewebe prädisponierender Faktor zu sein, da eine weitere Barriere durch Muskulatur- und Fettgewebe fehlt (Mawardi et al., 2011). Entzündliche Prozesse und Mikroeinrisse gehen meist mit einer Destruktion des Epithels einher. Über die Lamina propria des Epithels besteht dann zum Periost (=Mukoperiost) im Bereich des harten Gaumens und der Gingiva sowie über das Desmodont zum Alveolarknochen eine direkte Verbindung zwischen den Gewebearten, was wiederum den Stoffaustausch begünstigen kann. Neben dieser anatomischen Besonderheit sind bereits Auswirkungen der AR auf orale Weichgewebszellen untersucht und beschrieben worden, was im Folgenden detailliert analysiert und mit den vorliegenden Ergebnissen verglichen wird.

In den durchgeführten xCelligence-Basisversuchen zeigte sich eine deutlich signifikant reduzierte Überlebensrate der HGF-Zellen unter hoher Konzentration BP (Zoledronat 50 $\mu$ M) sowie unter Kombinationstherapie der AR (Zoledronat 5 $\mu$ M+Denosumab 10 $\mu$ g/ml) in Monoexposition. Dies deckt sich mit vielen weiteren in vitro-Untersuchungen an oralen Gewebszellen, bei denen eine dosisabhängige Wirkung auf Apoptose und Zellproliferation oraler Zellen festgestellt wurde (Anitua et al., 2016, Yuan et al., 2019, Simon et al., 2010, Basso et al., 2013, Scheper et al., 2009a). Differente Angaben finden sich zu Konzentrationen, die sich zytotoxisch auswirken. In der hier vorgelegten Studie haben im Basisversuch lediglich hohe Konzentrationen von Zoledronat einen signifikant negativen Einfluss auf die HGF, wohingegen mittlere und niedrige Konzentrationen Zoledronat (5 u. 0.5 $\mu$ M) eine tendenziell reduzierte Viabilität bewirken. Dies deckt sich mit Vorversuchen, bei denen die Auswirkungen von AR in verschiedenen Konzentrationen auf HGF untersucht wurden (Yuan et al., 2019). Untersuchungen von Simon et al. und Acil et al. berichten hingegen bereits bei einer Konzentration über 1 $\mu$ M Zoledronat von einer starken zytotoxischen Wirkung auf humane Gingivafibroblasten, Osteoblasten und SaOS-2-Zellen mit Verminderung der Zellproliferation und Kollagenproduktion (Acil et al., 2012, Simon et al., 2010). Ferner werden von Anitua et al. zytotoxische Wirkungen von

Zoledronat ab 10µM auf humane Zahnfleischfibroblasten und ab 25µM für humane Alveolarosteoblasten beschrieben (Anitua et al., 2016).

In Speichel- und Knochenproben von Patienten mit bestehendem BRONJ wurden BP-Werte zwischen 0,4 und 4,6µM nachgewiesen, während Patienten, die eine iv-Infusion mit BP erhielten und keine BRONJ entwickelten, Speichelwerte zwischen 0,4 und 5µM aufwiesen (Scheper et al., 2009b). Entsprechend ist die Annahme einer Zoledronatkonzentration von 5µM in oralen Gewebezellen bei onkologisch therapierten Patienten durchaus realistisch.

Oftmals stellen Kliniker die Therapie ihrer Patienten von Bisphosphonaten auf den monoklonalen RANKL-Antikörper Denosumab um, im Falle einer Krankheitsprogression oder da er zahlreiche Vorteile bietet, wie z.B. die subkutane statt intravenöser Verabreichung, die effektivere Prävention skelettbezogener Ereignisse und die nicht notwendige Dosisanpassung im Falle einer Niereninsuffizienz (Limonés et al., 2020, Loyson et al., 2018). Zudem kann durch die biologischen Wirkungsweisen von BP und die lange Halbwertszeit der BP von bis zu 10 Jahren eine Anreicherung in den Geweben angenommen werden, so dass von einer Akkumulation der Einzelwirkstoffe auszugehen ist (Malan et al., 2012, Basso et al., 2013, Reid et al., 2007, Ravosa et al., 2011). Daher wurde in dieser Studie eine Kombinationstherapie von Zoledronat und Denosumab simuliert. In dem Basisversuchsansatz ergab sich eine signifikant reduzierte HGF-Überlebensrate unter Zoledronat 5µM und Denosumab 10µg/ml. Dieses Ergebnis ist kongruent mit den Vorversuchen (Yuan et al., 2019). Auch Fusco et al. berichten von 23 Fällen, bei denen eine MRONJ unter Kombinationsbehandlung von Zoledronat und Denosumab aufgetreten ist (Fusco et al., 2021). Es wird zudem diskutiert, ob eine ONJ unter Kombinationsbehandlung frühzeitiger auftritt (Yarom et al., 2018).

Wie auch in den vorangegangenen Studien ist in diesen xCelligence-Untersuchungen keine signifikant verminderte HGF-Viabilität unter alleinigem Einfluss von Denosumab in allen Konzentrationen festgestellt worden (Yuan et al., 2019). Dies könnte auf die geringere toxische Wirkung von Denosumab auf die Gingivafibroblasten im Vergleich zu Zoledronat zurückzuführen sein, die auf dem unterschiedlichen Wirkmechanismus beruht (Chang et al., 2018, Malan et

al., 2012). Dennoch sind, wie auch in den Vorversuchen, histologische Auffälligkeiten der Zellen im simulierten Scratch Assay sichtbar, die für eine verzögerte Wundheilung der Zellen unter Einfluss von Denosumab sprechen (Yuan, 2018). Über orale Weichgewebstoxizität wurde bei Denosumab bisher nicht berichtet (Ruggiero et al., 2014, Ruggiero et al., 2022). Toriumi et al. haben Denosumab allerdings als identischen Risikofaktor für die Entwicklung einer MRONJ definiert wie das BP Zoledronat (Toriumi et al., 2020) und auch Saad et al. berichteten, dass die Inzidenz von MRONJ nach der Verabreichung von Denosumab bei bösartigen Knochentumoren etwa gleich hoch oder höher ist als nach der BP-Behandlung (Saad et al., 2012). In einer Meta-Analyse von Limones et al. wurde sogar ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung einer MRONJ unter Therapie von Denosumab im Vergleich zu Zoledronat nach 1-3 Jahren Behandlung festgestellt (Limones et al., 2020). Auch Ikesue et al. zeigten nach multivariater Analyse ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung einer MRONJ durch Denosumab (Inzidenz 9,6%) im Vergleich zu Zoledronat (Inzidenz 4,8%) (Ikesue et al., 2022). Diese differenten Ergebnisse könnten auf unterschiedliche Mechanismen der Entstehung einer ONJ durch BP bzw. Denosumab zurückzuführen sein, die bereits in verschiedenen Studien diskutiert wurden (Yuan et al., 2019, Fusco et al., 2021, Loyson et al., 2018). Zudem zeigen Untersuchungen, dass sich die ONJ unter Denosumab häufig spontan, also ohne zahnärztliche Eingriffe oder andere Risikofaktoren, entwickelt (Yarom et al., 2018). Bei kürzerer Halbwertszeit von Denosumab und alleiniger Gabe scheint es weniger zytotoxische Wirkungen auf HGF zu geben, dennoch ist bei seiner Auswirkung auf die MRONJ vermutlich die gleiche Vorsicht geboten wie bei den BPs (Toriumi et al., 2020). Dies gilt vor allem im Hinblick auf den erwarteten zunehmenden Einsatz von Denosumab und vermehrte Medikamentenumstellungen bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren aufgrund des beschriebenen günstigeren Profils im Vergleich zu Zoledronat (Zheng et al., 2017, Hortobagyi et al., 2019).

Mikrobielle Biofilme wurden in ONJ-Läsionen bereits vor über 10 Jahren nachgewiesen. Hansen et al. beschrieben *Actinomyces*-Kolonien in

Knochenproben von BP-behandelten Patienten und Sedghizadeh et. al. fanden in Proben von ONJ-Patienten neben Pilzorganismen eine überaus große Vielfalt an bakteriellen Organismen (Sedghizadeh et al., 2009, Hansen et al., 2007). Aktuelle Untersuchungen bestätigen bakterielle Besiedlungen bei Knochenläsionen der MRONJ, insbesondere Actinomyces-assoziierte Läsionen, die ein breites Spektrum an klinischen Erscheinungsformen aufweisen (Cerrato et al., 2021). Zirk et al. konnten in MRONJ-Knochenläsionen und dazugehörigen Weichgewebeproben Actinomyces in submukösen Proben oder im nekrotischen Knochen wesentlich häufiger nachweisen als am Boden der Läsionen. Dadurch lässt sich unter anderem vermuten, dass die Infektion mit Actinomyces-Spezies (spp.) möglicherweise nicht regelhaft den gesunden Knochen erreicht und von den oralen Weichgeweben ausgeht. Sie fanden in den untersuchten MRONJ-Läsionen auch Streptococcus spp., Prevotella spp., Veillonella spp. und Parvimonas micra (Zirk et al., 2019). Dies deckt sich mit früheren Untersuchungen, in denen die Besiedlung von opportunistischen Krankheitserregern wie Parvimonas, Peptostreptococcus, Fusobacterium, Eubacterium, Dialister und Gemella beschrieben wurde (Pushalkar et al., 2014). Neben gram-positiven finden sich auch gram-negative Bakterien in den Knochenläsionen, die in ihrer Zellmembran die Lipopolysaccharide (LPS) enthalten. Dieses makromolekulare Glykolipid kann vom angeborenen Immunsystem erkannt werden, so dass eine Kaskade in Gang gesetzt wird, die eine entsprechende Immunantwort mit Ausschüttung von Zytokinen wie IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  zur Folge hat (Sondhi et al., 2019, Van Amersfoort et al., 2003). Humane Gingivafibroblasten reagieren nachweislich auf das Endotoxin und Untersuchungen mit dieser Zellgruppe in Kombination mit LPS-Stimulation als bakteriellen Reiz, wie sie in den vorgelegten Untersuchungen stattgefunden haben, sind bereits seit vielen Jahren etabliert (Steffen et al., 2000). In den durchgeführten Versuchsansätzen mit LPS bestätigten sich die Ergebnisse aus dem Basisversuchsansatz und es zeigten sich signifikant reduzierte Überlebensraten der HGF-Zellen unter hoher Zoledronatkonzentration (50 $\mu$ M) sowie unter Einfluss der Kombinationstherapie von AR. Die eingeschränkte Zellviabilität der HGF stellte sich unter Einfluss von LPS noch eindrücklicher dar

als im Basisversuch. Dies bestätigt vorangegangene Untersuchungen (Yuan et al., 2019), in denen die Toxizität der AR insbesondere unter Zugabe von LPS beobachtet werden konnte.

Deutlich sind die verringerte Zellüberlebensfähigkeit und die erkennbaren Veränderungen der Zellstruktur der HGFs unter den untersuchten Medikamenten und ihrer Kombinationen mit zusätzlichem Einfluss von THP-1-Zellen im Vergleich zur THP-1-Kontrolle. Alle untersuchten Konzentrationen von Zoledronat, Denosumab sowie deren Kombination in hoher und geringer Konzentration ergaben eine statistisch signifikant verringerte Zellviabilität in den xCelligence-Versuchen und bestätigen Ergebnisse aus vorangegangenen Studien, in denen ebenso im Vergleich zu Untersuchungen ohne LPS- und THP-1-Stimulation auch geringe Konzentrationen der AR zu einem früheren Absterben der HGF-Zellen geführt hat (Yuan, 2018). Der gewählte Versuchsaufbau mit LPS und THP-1 simuliert den Einfluss von Medikamentenkombinationen auf HGFs und spiegelt gleichzeitig zumindest teilweise die natürliche Struktur der Weichteilbarriere in der Mundhöhle wider. In dieser Studie wurde ein bereits etabliertes 2D-Modell (Qin, 2012, Sakamoto et al., 2001, Yuan, 2018) zur Simulation immunologischer Bedingungen mit THP-1-Zellen verwendet. THP-1-Zellen werden in In-vitro-Experimenten häufig als in einem Aktivierungszustand befindlich beschrieben (Gordon, 2003, Taylor et al., 2005, Goerdts and Orfanos, 1999), der durch Stimulation mit Entzündungsaktivatoren, wie z. B. LPS oder proinflammatorischen Zytokinen, angeregt werden kann (Sharif et al., 2007, Smiderle, Chanput et al., 2012). Dies wiederum führt zu einer veränderten Expression mehrerer entzündungsrelevanter Chemokine und Zytokine sowie zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Infolgedessen wird ein Genexpressionsprogramm ausgelöst, das zur Aktivierung von Entzündung, Zellproliferation, Differenzierung, Migration und Zellüberleben führt (Chanput et al., 2010, Sharif et al., 2007).

#### **4.2. MRONJ durch Kombinationsbehandlung von AR mit TCT**

Kumulative Dosen intravenös und oral verabreichter antiresorptiver und antiangiogener Medikamenten können zur Entstehung einer MRONJ beitragen

(Yao et al., 2022). Durch die lange Halbwertszeit von Zoledronat in oralen Zellen von bis zu 10 Jahren, ist auch eine größere zeitliche Differenz bei der Gabe dieser Medikamente zu bedenken (Ravosa et al., 2011). Die in diesen Untersuchungen durchgeführten Versuche haben diese Hypothesen aufgegriffen, und eine Kombinationstherapie von AR mit zielgerichteten Krebstherapeutika simuliert.

Es konnte gezeigt werden, dass selbst niedrigere Konzentrationen von AR in Kombination mit TCT zu zellulären Veränderungen der HGF führen. Die Kombination von Zoledronat 5µM mit den zielgerichteten Krebstherapien (Sunitinib, Sorafenib, Bevacizumab, Sirolimus) reduzierte die Zellviabilität der HGFs signifikant, was sich in den abfallenden Kurven der xCelligence-Studien und in der L/D- und Hämalaun-Färbung widerspiegelte. Durch die Simulation oraler Bakterienbedingungen im LPS-Versuchsansatz scheint dies verstärkt zu sein und die zusätzliche Simulation einer oralen Infektion im THP-1-Versuchsansatz intensiviert diesen Effekt abermals. Dies ist klinisch relevant, da aufgrund der sequenziellen Verabreichung von Arzneimitteln niedrigere Plasmakonzentrationen angenommen werden können. Das Risiko, eine MRONJ zu entwickeln, könnte daher auch nach einer kürzeren Verabreichung von BP steigen, wenn anschließend andere antiangiogene Medikamente therapeutisch eingesetzt werden. Eine erhöhte Inzidenz von ONJ bei Kombinationstherapie von Knochenresorptionsinhibitoren und VEGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren wurde auch in der Übersichtsstudie von van Cann et al. nachgewiesen, in der nach Kaplan-Meier-Schätzungen die Zeit bis zum Auftreten einer MRONJ bei simultan behandelten Patienten signifikant kürzer war als unter BP allein und diese Patienten ein 5- bis 10-fach höheres Risiko für die Entwicklung einer MRONJ haben (van Cann et al., 2018). Eine multizentrische Querschnittsstudie von Fung et al. bestätigen die Hypothese, dass die Zeit bis zum Einsetzen der MRONJ (time to onset, TTO) bei onkologischen Patienten unter Kombinationstherapie von Zoledronat und antiangiogenen Wirkstoffen im Vergleich zur alleinigen BP-Therapie verkürzt ist (Fung et al., 2017). Demgegenüber steht ein aktueller prospektiver Bericht von 59 onkologischen Fällen von Yanni et al., die keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der TTO unter Kombination von antiresorptiv- und antiangiogen-

behandelten Patienten und denen rein antiresorptiv-behandelter Patienten feststellen konnten (Yanni et al., 2022). Grundsätzlich muss angemerkt werden, dass Daten zur TTO im Allgemeinen kontrovers zu betrachten sind, da sich die retrospektiven Angaben auf unterschiedliche Patientengruppen und -größen beziehen, die Medikamenteneinnahme der Patienten hinsichtlich der Indikation stark variieren kann und die Untersuchungen in der Regel eine Heterogenität der Datenerfassung aufweisen (Barasch et al., 2011, Fusco et al., 2021, Fleisher et al., 2013). Aktuelle klinische Beobachtungen und die Analyse verschiedener Fallberichte von Aminoshariae et al. zeigen eine Entwicklung von MRONJ unter Bevacizumab, Aflibercept und Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Sunitinib eindeutig auf (Aminoshariae et al., 2022). Die gleichzeitige Verwendung von antiangiogenen Wirkstoffen wurde auch in der kürzlich veröffentlichten Untersuchung von Ikesue et al. signifikant mit der Entwicklung von MRONJ bei Krebspatienten verbunden (Ikesue et al., 2022).

Im Vergleich der beiden beschriebenen Patientengruppen zeigte die Studie von Ghidini et al. erstmals auf, dass durch die Kombinationstherapie mit neuen Krebsmedikamenten eine neue Patientengruppe von MRONJ betroffen ist (Ghidini et al., 2017): Onkologische Patienten, die antiangiogene Medikamente in Verbindung mit BP oder antiangiogene Medikamente allein erhalten haben, waren hauptsächlich männlich. Im Vergleich dazu waren onkologische Patienten, die einer reinen BP-Therapie unterlagen, vornehmlich weiblich. Suryani et al. bestätigen dies in einer aktuellen Meta-Analyse, in der unter nicht-antiresorptiven Medikamenten mehrheitlich männliche Patienten von der MRONJ betroffen waren (Suryani et al., 2022). In der Tat sind bisweilen prozentual mehr Frauen von einer MRONJ betroffen, was in Studien mehrfach dargelegt wurde (Fung et al., 2017, Fusco et al., 2021). Eine Änderung des bisherigen Risikoprofils geht konsequenterweise aus der erweiterten Indikation der Medikamente hervor, da die TCT ein erweitertes Behandlungsspektrum, wie zum Beispiel für Nierenzell-, Lungen- oder Pankreaskarzinome aufweisen (Escudier et al., 2007, Eskens and Sleijfer, 2008, Beuselinck et al., 2012). Daraus lässt sich ableiten, dass unter anderem Männer mit Nierenzellkarzinomen, die mit antiresorptiv-antiangiogenen Medikamenten behandelt werden, einen wachsenden Anteil der Risikopatienten



ausmachen werden (Ghidini et al., 2017). Grundsätzlich haben Patienten mit malignen Grunderkrankungen bereits unter alleiniger AR-Therapie ein höheres Risiko, eine MRONJ zu entwickeln als bei der Therapie von Osteoporose-Patienten, was vor allem in den höheren Medikamentendosen bei onkologisch therapierten Patienten begründet liegt (Hallmer et al., 2018, Bone et al., 2017). Folgerichtig besteht bei Patienten mit malignen Erkrankungen ein höheres Risiko für das Auftreten einer MRONJ, wenn sie Bisphosphonate, antiresorptive oder antiangiogene Medikamente erhalten (Yao et al., 2022).

Des Weiteren wiesen Fallberichte vermehrt auf eine spontane Entwicklung der ONJ unter Kombinationsbehandlung hin (Lescaille et al., 2014, Christodoulou et al., 2009). Ghidini et al. bestätigen dies in ihrer multizentrischen Studie (Ghidini et al., 2017), wengleich der aktuelle Bericht von Yanni et al. aus dem Jahr 2022 eine vergleichbare Inzidenz der spontanen MRONJ bei Patienten unter alleiniger AR-Therapie und denen unter Kombinationsbehandlung aufzeigte (Yanni et al., 2022). Im Allgemeinen gelten dennoch dentoalveoläre Operationen als der häufigste identifizierbare prädisponierende Faktor für die Entwicklung einer MRONJ (Ruggiero et al., 2022). Mehrere Studien berichten, dass bei Patienten mit MRONJ die Zahnextraktion als prädisponierendes Ereignis genannt wird, und zwar in 62- 82 % (Saad et al., 2012, Hallmer et al., 2018, Aljohani et al., 2017). Auch in einer ersten Untersuchung, die sich auf MRONJ-Patienten bezieht, die mit nicht-antiresorptiv Medikamenten behandelt wurden, sind invasive Eingriffe der häufigste Auslöser für eine MRONJ (Sacco et al., 2022).

### **4.3. Schädigung von HGF Zellen**

Zur Analyse der Weichgewebstoxizität unter Medikamenteneinfluss sollen im Folgenden die Zellveränderungen in Bezug auf Apoptose, Adhäsions- und Migrationsverhalten beschrieben und mit Erkenntnissen aus der Literatur verglichen werden. Zudem werden Zellveränderungen unter zusätzlichem Einfluss von Endotoxin- und immunologischer Stimulation durch THP-1-Zellen zusammenhängend analysiert. Abschließend werden die Limitationen der Studien und entsprechende Lösungsansätze diskutiert.

#### ***4.3.1. Zellveränderungen durch die Medikamente und deren Kombinationen***

Nach ersten Erkenntnissen von Scheper et al. wurden umfassend Untersuchungen zur Toxizität von AR an oralen Zellen durchgeführt und die toxische Wirkung, vor allem von Bisphosphonaten, wurde nachgewiesen, wobei die Debatte über die als toxisch anzusehenden Konzentrationen anhält (Scheper et al., 2009a, Ravosa et al., 2011, Acil et al., 2012, Yuan et al., 2019). Für die Medikamentenkombination von AR mit TCT sind bislang keine Daten in der aktuellen Literatur verfügbar und zu In vitro-Untersuchungen der TCT an oralen Zellen ist die Datenlage sehr begrenzt. Diese Studie beschreibt erstmals Veränderungen von HGF unter dem Einfluss dieser Kombinationstherapien. Zu diesen zählt eine reduzierte Zellviabilität, die in den xCelligence-Untersuchungen gemessen wurde. Die verringerte Lebensfähigkeit der Zellen zeigte sich durch die steileren Kurvenabfälle und war im Basisversuchsansatz neben Zoledronat 50µM vor allem für die Kombination von Zoledronat 5µM mit Sunitinib 100ng/ml bzw. Sirolimus 100ng/ml deutlich erkennbar.

Die Zellviabilität kann durch eine Verringerung der Zellzahl negativ beeinflusst werden, die auch hier angenommen werden kann. Ursächlich kommt die Apoptose in Frage. Apoptotische Veränderungen der HGF in den histologischen Untersuchungen untermauern diese These. Apoptose kann als Reaktion auf externe Auslöser auftreten, wie die Hemmung des Mevalonat-Stoffwechsels z.B. durch BP (Coxon et al., 2004). Typische morphologische Veränderungen dieser Reaktion sind zunächst die Pyknose, darauf folgt eine Verdichtung des Chromatins und eine Fragmentation des Zellkernes, auch Karyorhexis

bezeichnet (Fabian et al., 2005). Die Untersuchungen ergaben diese Auffälligkeiten unter Zoledronat 50 $\mu$ M und unter der Kombination von Zoledronat mit Sunitinib und Bevacizumab, bei denen vor allem überdimensionierte Zellkerne und deren Fragmentation dargestellt werden konnten. Live/Dead-Färbungen demonstrierten zudem eine Zunahme der devitalen Zellen unter Einfluss von AR und TCT sowie unter hohen Zoledronatkonzentrationen. Für Zoledronat ab 30 $\mu$ M sind diese zytotoxischen Wirkungsweisen bereits vielfach bewiesen (Zafar et al., 2014, Cozin et al., 2011, Yuan et al., 2019) und Jung et al. zeigte sogar eine fünffach erhöhte Apoptoserate von Gingivafibroblasten unter Zoledronat 50 $\mu$ M im Vergleich zur Kontrollgruppe (Jung et al., 2018). Erste Hinweise zu zytotoxischen Auswirkungen auf orale Zellen durch TK-Inhibitoren wurden im Zusammenhang mit der Stomatitis-Forschung an oralen Keratinozyten festgestellt: Fukada et. al berichteten, dass Sunitinib die Zellschädigung und Apoptose in oralen Keratinozyten durch p38-Aktivierung und STAT3-Downregulation fördert (Fukada et al., 2022). Die Toxizität von Sunitinib und Sorafenib wurde auch für andere humane Keratinozyten durch eine Verringerung der Apoptose-Suppressoren über die Hemmung der STAT3-Aktivität dargestellt (Yamamoto et al., 2014). Durchflusszytometrische Analysen und MTT-Tests von McMullen et al. an adulten Ratten-Herzfibroblasten ergaben, dass die Apoptose mit steigenden Sunitinib-Konzentrationen zunahm, wobei ein offensichtlicher Zellverlust bereits bei 10 $\mu$ M Sunitinib zu beobachten war (McMullen et al., 2020). Ferner konnten Knochenanalysen zeigen, dass eine gezielte Sunitinib-Chemotherapie negative Auswirkungen auf die Osseointegration von Titanimplantaten hatte (Al-Jandan et al., 2018). Hierbei waren die Osseointegrationsparameter, einschließlich des Verhältnisses von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen und des prozentualen Knochen-Implantat-Kontakts, in der Sunitinib-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Ähnliche Ergebnisse erzielte die gleiche Arbeitsgruppe unter dem Einfluss des VEGF-Inhibitors Bevacizumab (Al-Jandan, 2019). Unter Sirolimus zeigte eine Analyse an Mausembryofibroblasten eine Verringerung der Zellzahl um bis zu 50% auf und bestätigt damit auch den Einfluss von mTOR-Inhibitoren auf die Zellviabilität (Wagner et al., 2022). Diese Erkenntnisse lassen Rückschlüsse auf

negative Einflüsse der TCT auf weitere Fibroblastenarten, hautbildende Zellen sowie orale Zellen, wie die Osteozyten und Osteoklasten, zu und stehen in Kongruenz mit den gewonnenen Ergebnissen. Erstmals konnte in dieser Studie aufgezeigt werden, dass auch geringere Konzentrationen Zoledronat (5 $\mu$ M) in Kombination mit Sunitinib und Bevacizumab zu apoptotischen Veränderungen in HGF führen und auch die Kombination mit Sirolimus zu einer verringerten Zellzahl führt.

Ein vermindertes Adhäsionsverhalten der HGF könnte ebenfalls zu einer reduzierten Impedanzmessung bei den xCelligence-Versuchen und damit zu einer reduzierten Zellviabilität führen. Hierbei ist davon auszugehen, dass die Zellen unter Medikamenteneinfluss nicht mehr in der Lage sind, Prozesse zur notwendigen Adhäsion regelrecht auszuführen. Bei Verabreichung von Zoledronat an orale Gingivafibroblasten wurden in vitro bereits eine Verringerung der Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix, einschließlich der Kollagene I, II und III, festgestellt (Simon et al., 2010). Ebenso wurde nachgewiesen, dass Zoledronat durch die Wirkung auf den Mevalonatweg die Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase, die wesentlich in der Organisation des Zytoskeletts ist, in verschiedenen Zelltypen in vitro verringert (Wu et al., 2009, Bezzi et al., 2003). Dies bekräftigt die Theorie eines Zusammenhangs zwischen BP und einer verringerter zellulärer Adhäsion (Bullock et al., 2021). Cozin et al. wiesen mit Färbungen eindrücklich nach, dass F-Actin-Bündel im Zytoskelett der Zellen unter BP-Behandlung reduziert waren und somit Zoledronat in 30 $\mu$ M-Konzentrationen die Adhäsion von Fibroblasten verringert (Cozin et al., 2011). Die festgestellten Anhaftungsstörungen der HGF-Zellen unter Medikamentenzugabe im durchgeführten simulierten Scratch-Assay und die damit einhergehende verringerte Überlebensrate der Zellen bestätigen diese These. Am ausgeprägtesten zeigte sich eine verschlechterte Viabilität der HGF für Denosumab 40 $\mu$ g/ml. Dies könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, dass sich Denosumab vor allem im Adhäsionsprozess negativ auf die Zellen auswirkt, aber keine signifikante direkte zytotoxische Wirkung hat, die zu einer Apoptose der Fibroblasten führen könnte. Die deutlich verringerte Anzahl lebender Zellen, die

veränderte, runde, aufgeworfene Zellmorphologie und das „Abkugeln“ der absterbenden Zellen konnte hingegen allgemein unter hohen Konzentrationen AR dargestellt werden. Auch unter Kombinationstherapie von Zoledronat mit Sunitinib und Bevacizumab stellte sich im Scratch-Assay eine verschlechterte Viabilität dar, wobei Wells mit diesen Medikamenten weniger dicht besiedelt waren und Übereinanderlagerungen der Zellen sichtbar wurden. Die Adhäsion könnte entsprechend bereits unter geringeren Konzentrationen bei Medikamentenkombinationen negativ beeinflusst und der Zellverbund damit wesentlich beeinträchtigt sein.

Die zellmorphologischen Erkenntnisse, vornehmlich der lückenhafte Zellrasen unter Medikamenteneinfluss im Scratch-Assay, können ebenso auf eine verschlechterte Migrationsfunktion der Zellen hinweisen und damit eine verzögerte Wundheilung in vivo vermuten lassen. Bereits in Voruntersuchungen konnten im Scratch-Assay negative Auswirkungen auf die Wundheilung festgestellt werden. Hierbei wurden allerdings nur AR untersucht, wobei unter Zoledronat 50µM die Migration der HGF am meisten inhibiert war und auch unter Zoledronat mit Denosumab eine Beeinträchtigung der Wundheilung festgestellt werden konnte (Yuan, 2018). Eine verminderte Migration unter BP-Einfluss wurde ebenso bei Untersuchungen an oralen Keratinozyten festgestellt (Pabst et al., 2012, Kobayashi et al., 2010). Bullock et al. kritisieren an derartigen Studien, dass die Schäden durch die Zelltoxizität nicht von denen des Migrationseffektes unterschieden werden können. Um die Auswirkungen der Migration wirklich beurteilen zu können, müsse die Proliferation im Versuchsaufbau verhindert werden, sei es durch subtoxische Konzentrationen oder andere Maßnahmen wie die Behandlung mit Mitomycin C (Bullock et al., 2021). Ihre eigenen Studien an oralen Fibroblasten und Keratinozyten und auch jene von McLeod et al. an oralen Keratinozyten stehen den vorherig genannten Ergebnissen unter Berücksichtigung dieses Aspekts gegenüber: es konnten keine Auswirkungen auf die Migration festgestellt werden (McLeod et al., 2013, Bullock, 2019). Die genannten Optionen gilt es für kommende Projektplanungen mit in Betracht zu

ziehen und ggf. zur Beurteilung der Migration von HGF unter Kombinationsbehandlung weiterführende Untersuchungen durchzuführen.

Auf Grundlage der durchgeführten Experimente und der Literaturrecherche ist zu vermuten, dass in diesen Medikamentenkombinationen verschiedene Mechanismen zur Apoptose und Beeinträchtigung der Funktionsweise der Zellen führen und dadurch ein wechselseitiger Einfluss auf die Zellen besteht. Dies könnte auch das teils inkongruente Bild der Zytokinbildung durch die HGF unter Medikamentenstimulation erklären, da geringe Änderungen der Konzentrationen und Kombinationen zu unterschiedlicher Stimulation oder Hemmung führen könnte.

Konzentrationen des proinflammatorischen Interleukins IL-6 waren erwartungsgemäß unter Einfluss hoher Konzentrationen AR nach 120 Stunden erniedrigt und bestätigen damit vorausgegangene Versuche (Yuan, 2018). Unter Kombination von Zoledronat und Sunitinib ergaben sich allerdings erhöhte IL-6-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle. Auch Mozatti et al. und Bagan et al. berichten von erhöhten IL-6-Werten in der Schleimhaut von BP-behandelten Patienten mit Kiefernekrosen, während andere Analysen keinen signifikanten Unterschied in der Expression von IL-6 feststellen konnten (Mozzati et al., 2013, Bagan et al., 2014, Kemp et al., 2020).

Entgegen den Erwartungen (Tipton et al., 2011, Yuan, 2018) wurde ein reduziertes Level OPG für alle untersuchten Medikamentenstimulationen gemessen wurden, auch für rein AR-ausgesetzte HGFs. OPG, das die Differenzierung von Osteoklasten und damit den Knochenabbau hemmt, wurde zwar auch in anderen Untersuchungen in niedrigeren Konzentrationen unter AR-Therapie verifiziert, dennoch war durch gestiegene RANKL-Werte das RANKL/OPG deutlich erhöht (Mozzati et al., 2013). Die Beurteilung dieses Verhältnisses ist in diesen Untersuchungen nicht möglich, da die Analyse für RANKL keine Werte ergab. Vor allem in Bezug auf die Zellauswirkungen durch Denosumab und Kombinationen mit diesem Wirkstoff wären erweiterte Analysen zum Beispiel mittels PCR für höhere Sensitivitäten sinnvoll.

Ein klare Tendenz zeigt sich allerdings bei der Analyse des Entzündungsmediators IL-8, der im Zellverbund die chemotaktische Stimulation neutrophiler Granulozyten bewirkt (Bickel, 1993): Ein signifikant erhöhtes Level unter allen Medikamentenstimulationen ist auch mit Vorversuchen zu AR kongruent (Yuan, 2018) und kann durch Migration von Neutrophilen als Zeichen der erhöhten Vulnerabilität des Zellverbunds in vivo gedeutet werden.

#### **4.3.2. Zellveränderungen durch Endotoxinexposition**

Unter zusätzlicher Endotoxinexposition verändert sich das Zellbild der HGF's, denn die Zugabe von LPS führte im Vergleich zum Basisversuchsansatz zu einer schnelleren Ablösung der Zellen vom Boden der Wells. In den histologischen Färbungen fällt im Vergleich zum Basisversuchsansatz ein lückenhafter Zellrasen unter LPS auf. Es zeigen sich bereits in der Kontrolle LPS erste Zellveränderungen, wie die Kernpyknose. Eben diese sind, wie auch die Vakuolisierung, typische Zeichen entzündeter Zellen, wie sie u.a. auch bei Parodontitis-Patienten beschrieben wurden (Kang et al., 2016).

Innerhalb des LPS-Versuchsansatzes zeigten sich im xCelligence-Versuch statistisch reduzierte Zellviabilitäten unter Zoledronat 50µM, was sich mit den Ergebnissen der Voruntersuchungen deckt (Yuan, 2018). Doch auch in diesem Versuchsaufbau zeigen sich reduzierte Lebensfähigkeiten unter den getesteten Wirkstoffkombination (s. Kapitel 3.1.5.). Im Verhältnis ergeben sich unter deutlich mehr Medikamentenkombinationen reduzierte Lebensfähigkeiten der HGF im Vergleich zum Basisansatz. In den Hämalaun-Färbungen werden Lückenbildungen im Zellrasen noch deutlicher und es ist eine verminderte Zahl der Nucleoli in den einzelnen Zellen sichtbar. Vorangegangene Beobachtungen aus den Live/Dead-Färbungen verstärken sich ebenso zunehmend unter LPS: Die schmale Form der Zellen in Kombination mit hohen AR-Dosen scheint eine verminderte Anhaftung an den Boden und damit das verfrühte Absterben der HGF als Folge zu haben. Auch die Wundheilungsfähigkeit der HGF ist eingeschränkter im Vergleich zur Kontrolle mit und ohne LPS. Dies lässt vermuten, dass schon bei kleinen oralen Wunden die Migration und Proliferation der Fibroblasten unter Gabe von AR und TCT's gestört sein kann, was zu einem erhöhten Risiko einer MRONJ führen kann.



LPS, das in der Zellwand gramnegativer Bakterien vorkommt, ist ein starker Auslöser von Immunreaktionen (Muratsu et al., 2013). Im Gewebeabbau bei Parodontalerkrankungen spielt es unter anderem durch die Stimulation der Ausschüttung diverser Entzündungsmediatoren eine elementare Rolle (Sismey-Durrant and Hopps, 1991). Gingivafibroblasten, die *P. gingivalis* LPS ausgesetzt waren, produzierten im Vergleich zu unstimulierten Zellen u.a. signifikant mehr IL-6, IL-8 und VEGF (Fitzsimmons et al., 2018). Zudem haben vorangegangene Studien unter Einfluss von AR und LPS eine Erhöhung von IL-8, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ -Expression und eine Reduktion von IL-6 bei HGF festgestellt und damit die Theorie gestützt, dass AR und LPS in den HGF eine immunologische Reaktion auslösen, es zu einer Überstimulation und damit zu einer lokaler Immundysfunktion kommt (Hoefert et al., 2015, Hoefert et al., 2016a, Yuan, 2018). In den hier vorliegenden Ergebnissen finden sich Diskrepanzen hierzu, da sich signifikant reduzierte IL-8 und VEGF-Konzentrationen unter AR- und auch Kombinationsbehandlung ergaben und sich sogar erhöhte Werte für IL-6 unter Denosumab und der Kombination von Zoledronat mit Bevacizumab zeigten. Eine Reduktion von VEGF unter Bevacizumab ist in Anbetracht der Wirkungsweise folgerichtig, könnte für die HGF und den oralen Zellverbund allerdings schwerwiegende Auswirkungen haben. Denn die Hochregulierung der VEGF-vermittelten Angiogenese ist ein entscheidender Schritt der Entzündungsreaktion, auch bei der Wundheilung (Gordon et al., 2009). Ist diese durch die Hemmung entsprechender Mediatoren wie IL-6, IL-8 oder VEGF gestört, steigt folgerichtig die Vulnerabilität der Zellen und eine adäquate Immunreaktion bleibt aus. Diese These wird auch durch Untersuchungen an bereits entzündeten Gingivafibroblasten unterstützt, die in ihrer Fähigkeit beeinträchtigt waren, eine adäquate sekundäre Immunreaktion in Bezug auf die Chemokin-/Zytokinproduktion zu entwickeln (Fitzsimmons et al., 2018). Durch die Exposition der untersuchten Medikamentenkombinationen von AR und TCT könnte dieses Missverhältnis zudem verstärkt sein.

### **4.3.3. Zellveränderungen durch immunologische Stimulation mittels THP-1-Zellen**

Die zusätzliche Stimulation der HGF durch THP-1-Zellen führte zu signifikant steileren Abfällen der Überlebenskurven der HGF und damit zu einer reduzierten Zellviabilität der HGF im Vergleich zum Basis- und LPS-Versuchsansatz, was sich auch in der Hämalaun-Färbung durch verschmälerte Zellausläufer darstellt. Unter Medikamentenstimulation zeigen sich innerhalb des LPS/THP-1-Versuchsansatzes im Vergleich zur Kontrolle LPS+THP-1 reduzierte Zellviabilitäten für alle untersuchten Medikamentenkombinationen, insbesondere für Zoledronat 5µM, Zoledronat 50µM sowie unter Zoledronat 5µM + Bevacizumab 80µg/ml und Zoledronat 5µM + Denosumab 10µg/ml. Histologisch imponieren ungeordnete, lückenhafte Zellrasen, die verstärkt auch von Übereinanderlagerungen der HGF geprägt sind. Dies lässt ein vermindertes Adhäsionsverhalten der HGF auch unter geringeren AR-Dosen bei Kombinationstherapien mit TCT vermuten, was die Entstehung einer MRONJ wiederum begünstigen kann. Live/Dead-Färbungen belegen zudem die ausgeprägte Verschlechterung der Zellviabilität und in den Hämalaunfärbungen zeigen sich verstärkt Zeichen der Apoptose, wie Pyknose und Karyorhexis, neben einer Anhäufung von devitalen Zellen.

Bei der Beurteilung der Zytokinbildung ist grundsätzlich ein Anstieg der gemessenen Konzentrationen zu erwarten gewesen, da eine weitere Zellgruppe, THP-1-Zellen, Botenstoffe exprimiert. Im Vergleich zu den Basis- und LPS-Versuchen ist der Anstieg deutlich erkennbar. Signifikant reduzierte OPG-Werte unter allen untersuchten Medikamentenkombinationen können auf eine gestörte Homöostase des Knochenstoffwechsels hindeuten, wie sie auch in der Literatur beschrieben wurde (Tipton et al., 2011, Kemp et al., 2020). Es konnten erstmals Werte für IL-1β erfasst werden, die unter Zoledronat (50/0.5µM) und der Kombination der AR signifikant erhöht war. Die Expression von IL-6 ist erneut keinem eindeutigen Muster zuzuordnen. Es zeigten sich zwar erhöhte Werte IL-8 unter hoher AR-Konzentration, aber unter Kombination von Zoledronat mit Denosumab oder Sunitinib reduzierte IL-8-Konzentrationen. Erhöhte IL-1β, IL-6 und TNF-alpha-Konzentrationen konnten in der Vergangenheit für LPS-

stimulierte Makrophagenzellen bzw. für HGF und THP-1-Zellen unter Einfluss von Zoledronat nachgewiesen werden (Muratsu et al., 2013, Yuan, 2018). Die Anregung der Produktion von Entzündungsmediatoren durch LPS-induzierte Makrophagen wurde von Kaneko et al. durch den NLRP3-Inflammasom-abhängigen Weg beschrieben (Kaneko et al., 2018). Um sich ein detaillierteres Bild der Expression von diesen relevanten Botenstoffen unter Einfluss von AR und TCT sind weitere Analysen notwendig. Das inkongruente Bild der gemessenen Zytokinkonzentrationen könnte auf eine Immundysfunktion des Zellverbundes unter Einfluss antiresorptiver und antiangiogener Medikamente hindeuten. Unter BP-Einfluss konnte bereits eine dosisabhängig veränderte Migration von THP-1-Makrophagenzellen gezeigt werden, die auch bei niedrigeren Medikamentenkonzentrationen zu einer geänderten immunologischen Reaktion führen kann (Hoefert et al., 2016b).

#### **4.3.4. Methodenkritik**

In Bezug auf die Analyse der histologischen Färbungen ist folgendes anzumerken: Live/Dead-Färbungen sind zur Analyse der Apoptose von Zellkulturen etabliert (Wang et al., 2019). In der hier vorliegenden Studie handelt es sich um eine deskriptive Auswertung dieser Untersuchung, eine quantitative Analyse dieser Färbungen kann ergänzend allerdings sinnvoll sein. Ferner könnten auch andere spezifische Apoptose-Tests, wie z.B. die Messung von Caspase 3/7, durchgeführt werden (Cozin et al., 2011).

Bei den durchgeführten Analysen der Zytokinexpression ist bei einigen Messungen ein erhöhter Variationskoeffizient zu erwähnen, weshalb die Ergebnisse, wenngleich z.B. für IL-6-Konzentrationen statistisch signifikant, kritisch zu beurteilen sind. Dies gilt für die Interpretationen der Zytokinexpressionsanalysen im Allgemeinen, da die erhöhte Variabilität in den Ergebnissen in allen Versuchsansätzen auch auf eine geringe Anzahl der Versuchsanordnungen zurückzuführen sein kann. Eine Wiederholung dieser Analysen zur Kontrolle kann somit empfohlen werden.

Mit dem gewählten „transwell co-culture“-Modell konnte die Zellmigration der HGF getestet und zugleich die parakrine Signalübertragung untersucht werden (Smith et al., 2015, Zhu et al., 2018). Grundsätzlich kann es aber bei dem gewählten Versuchsaufbau durch die vermehrt benötigten Volumina zu einer Einschränkung der Sauerstoffversorgung der HGF kommen.

Außerdem ist anzumerken, dass die Nahrungskonkurrenz unter Zugabe von THP-1-Zellen zu einem generalisiert stärkeren Abfall der Überlebenskurve führen kann und die Apoptose der Zellen generell früher einleiten könnte. Dies könnte auch ein Grund für einen hohen Anteil devitaler HGF in der Kontrolle LPS+THP-1 sein, weshalb auch die Werte der Kontrollgruppen miteinander verglichen wurden. Der Vergleich innerhalb der Versuchsgruppe zeigt allerdings signifikante Unterschiede unter Medikamentenstimulation und ebenso zur Kontrolle des Basisversuchs der HGF-Zellen ohne Zusatz (doppelte Absicherung). Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass dieser Effekt zum Tragen kommt. Ein erneuter Medienwechsel könnte hier ein Lösungsvorschlag für kommende Untersuchungen sein.

Das angewandte „transwell co-culture“-Modell ist ferner dadurch limitiert, dass es keinen direkten Zell-Zell-Kontakt ermöglicht und das Medium auf alle Zellgruppen sorgfältig angepasst werden muss (Zhu et al., 2018) Entsprechend könnte für zukünftige Analysen das Modell der Co-Kultur angepasst oder erweitert werden, z.B. mit 3D-Modellen, wie sie bereits von Zhu et al. für Osteoblasten und -klasten beschrieben sind. Dadurch kann auch eine umfassendere Interaktion zwischen den einzelnen Zellen untersucht werden. Darüber hinaus könnten primäre Zellen anstelle von immortalisierten Zelllinien verwendet werden, da sie in Bezug auf ihre Zellmorphologie und ihr physiologisches Verhalten eher die In vivo-Eigenschaften nachahmen können (Alge et al., 2006). Die Verwendung von In-vitro-Zelllinien kann dennoch sinnvoll sein, da sie es ermöglichen, die Auswirkungen der Kulturdauer und der genetischen Variation, die Einschränkungen durch ethische Fragen, die Zugänglichkeit und Verfügbarkeit von Spendern zu minimieren und gleichzeitig Hinweise auf den ablaufenden Mechanismus liefern (Chanput et al., 2014).

#### **4.4. Die Bedeutung der HGF-Zellen innerhalb der Gesamtätiologie**

Wie eingangs bereits erläutert, gibt es noch keine hinreichende Erklärung der MRONJ-Ätiologie- es wird bisher ein multifaktorielles Geschehen angenommen. Bedingt durch die Wirkungsweise der AR steht hierbei der veränderte Knochenumbau klar im Fokus, weshalb die Zellen der Knochenstrukturen, wie Osteoblasten, -zyten und -klasten, zu Recht häufig untersucht werden (Hofmann et al., 2022, Gkouveris et al., 2022). Auf Grundlage einiger dieser Analysen geht die sogenannte „inside-outside“-Theorie hervor, die auf einer Hemmung der osteoklastischen Aktivität und einer Verringerung des Knochenumsatzes beruht. Durch Mikroschäden im Knochen und die dauerhaften Kaubelastungen auf die Knochen sind eben diese hohen Konzentrationen verschiedener pathogener Keime ausgesetzt (Lombard et al., 2016). Jüngste Studien bestätigen diese These und haben in AR-behandelten Kieferknochen eine erhöhte Knochenmasse mit verringerten mechanischen Stabilitätsmerkmalen nachgewiesen, die eine Schwäche der Mikroarchitektur des Knochens und damit eine Instabilität und erhöhte Vulnerabilität des Knochens verursachen kann (Schoenhof et al., 2021). Dem gegenüber steht die sogenannte „outside-inside“-Theorie: sie besagt, dass eine lokale Immunschwäche ausgehend von den AR in Verbindung mit Läsionen des oralen Epithels zu einer Infektion führt, die sich auf den Knochen ausbreitet und dort die Osteonekrose auslöst (Lombard et al., 2016). Durch die direkte Lagebeziehung des oralen Epithels zu Mandibula und Maxilla kann angenommen werden, dass wechselseitig im Zellverbund Stimuli erfolgen können, so dass ossäre Veränderungen sich auf die umliegenden oralen Weichgewebe auswirken und umgekehrt. Dies lässt auch einen Einfluss beider Theorien zur Pathogenese der MRONJ zu. Beide Theorien führen in der Folge zur Nekrose des Knochens. Grundsätzlich spielt die Infektion bei der Entwicklung der MRONJ eine elementare Rolle, strittig ist, ob diese der Nekrose vorausgeht oder folgt (Khan et al., 2015). Zellen, denen immunmodulatorische Eigenschaften nachgesagt werden, können folglich elementar an der Entstehung einer ONJ beteiligt sein. Da eine Störung der Angiogenese, die ebenfalls die Wundheilung beeinträchtigen kann, diskutiert wird (On et al., 2021), liegen Untersuchungen an

gingivalen Fibroblasten nahe. Diese sind die am häufigsten vorkommenden Zellen des Stromas und durch die Sekretion von Komponenten der extrazellulären Matrix für die Erhaltung und Reparatur des Gewebes essentiell (Um Min Allah et al., 2017). Zum einen sind Fibroblasten in entscheidenden Prozessen der Wundheilung involviert, indem sie u.a. Leukozyten rekrutieren und die Angiogenese fördern, zum anderen können sie auch selbst als Entzündungszellen fungieren (Wei et al., 2021). So tragen sie nachweislich aktiv zur parodontalen Immunantwort bei, um subgingivale Infektionen durch parodontale Erreger zu bekämpfen und spielen im Allgemeinen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Entzündungszellen (Wada et al., 2011).

Die durchgeführten In vitro-Untersuchungen konnten die Bedeutung der HGF in der Entwicklung einer MRONJ unter Medikamentenkombinationen von AR und TCT aufzeigen:

Die festgestellten zellmorphologischen Veränderungen auch unter geringeren Konzentrationen können in der Folge eine gestörte Funktionsweise der HGF durch vermindertes Adhäsions- und Migrationsverhalten sowie veränderte Zytokinexpression auslösen und sogar zur Apoptose führen. Im Zellverbund kann diese Weichgewebstoxizität wiederum zu einer kompromittierten Wundheilungsreaktion und Angiogenese führen. Durch die Simulation oraler Bakterienbedingungen scheint der Effekt auf die HGF verstärkt zu sein und zusätzliche Simulation einer oralen Infektion intensiviert dies in-vitro abermals, so dass ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer MRONJ besonders bei bereits bestehenden Infektionen zum Tragen kommen kann. Hierzu könnten neben der Parodontitis und dentalen Wunden nach Zahnextraktion, auch kleinste orale Wunden, wie Mikroeinrisse der Schleimhaut oder apikale Veränderungen zählen. Diese auch unter niedrigeren Medikamentenkonzentrationen erhöhte Vulnerabilität bei Kombinationsbehandlung könnte ein Erklärungsansatz für einen Verlust der Weichgewebsintegrität und das spontane Auftreten der MRONJ ohne externe Stimuli sein, wie sie in der Literatur beschrieben wurden (Lescaille et al., 2014).

Zum anderen können auch direkte Auswirkungen der TCT auf die HGF bedingt durch die jeweiligen immunmodulatorischen und antiangiogenen

Wirkungsweisen angenommen werden. Eine veränderte Ausschüttung der Zytokine, besonders von VEGF, lässt eine Störung der Angiogenese vermuten. Für AR konnten subklinische Störungen der Gefäßorganisation bereits in vitro nachgewiesen werden (Gkouveris et al., 2019). In Kombination mit TCT könnte sich dies wechselseitig beeinflussen oder gar potenzieren.

Die Ergebnisse liefern somit einen Erklärungsansatz für die Entstehung „spontan“-auftretenden Kiefernekrosen und schließt damit eine Lücke in der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion.



#### 4.5. Graphische Darstellung des Gesamtätiologiemojells

Das folgende Modell zur Gesamtätiologie beruht auf Basis der durchgeführten Untersuchungen und den bisherigen Erkenntnissen der Literatur (Lombard et al., 2016, Chang et al., 2018, On et al., 2021, Aghaloo et al., 2015, Schönhof, 2022), wobei der verminderte Knochenumbau und eine erhöhte Weichgewebstoxizität im Fokus stehen. Die daraus resultierende verminderte Angiogenese und eingeschränkte Wundheilungsreaktion, moduliert durch externe Einflüsse wie bestehende Infektionen und Bakterienbesiedlung, führen in der Folge zu einer Infektion, die sich letztlich klinisch als MRONJ manifestiert.

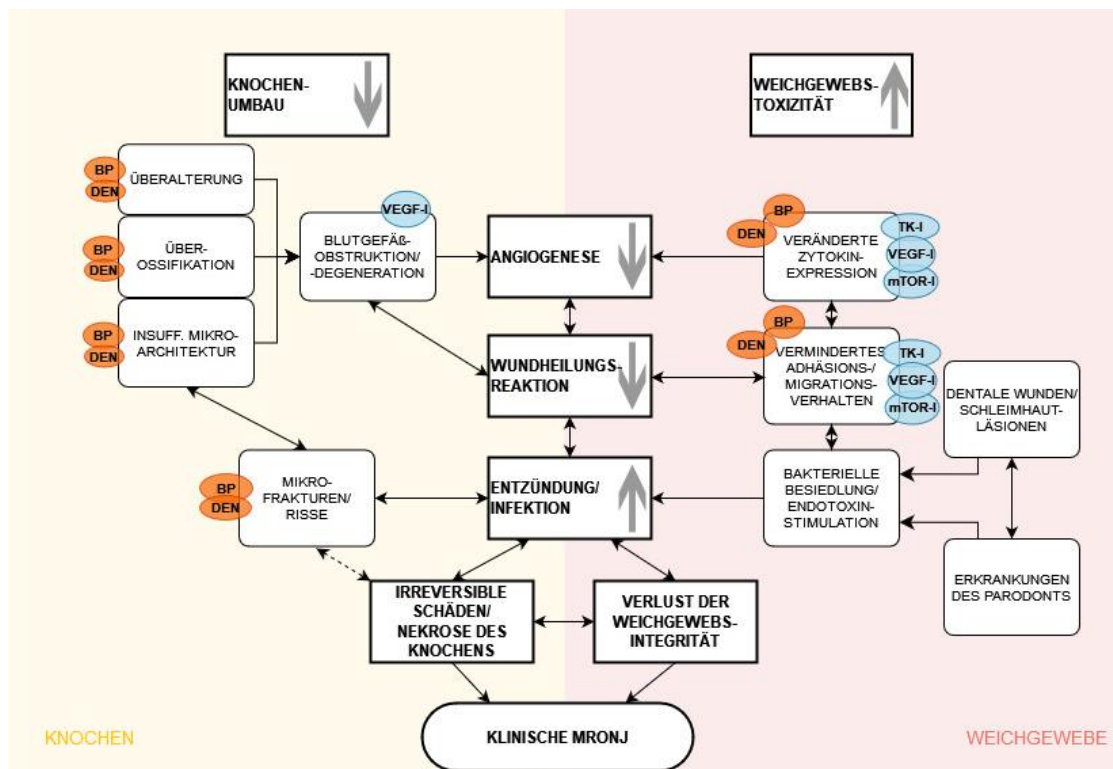


Abbildung 40 Modell zur Ätiopathogenese der MRONJ mit pathophysiologischen Vorgängen im knöchernen Bereich (gelb hinterlegt) sowie im Weichgewebe (rot hinterlegt) auf Basis der vorliegenden Ergebnisse und aktueller Erkenntnisse aus der Literatur (Lombard et al., 2016, Chang et al., 2018, On et al., 2021, Aghaloo et al., 2015, Schönhof, 2022). Der Einfluss der jeweiligen Medikamente ist jeweils in direkter Assoziation gezeigt (orange: Antiresorptiva [BP = Bisphosphonate, DEN = Denosumab], blau: zielgerichtete Krebsmedikamente [VEGF-I = VEGF-Inhibitoren, TK-I = Tyrosinkinase-Inhibitoren, mTOR-I = mTOR-Inhibitoren]).

#### **4.6. Empfehlungen für die klinische Praxis**

Schon bei kleinen oralen Wunden kann die Proliferation der Fibroblasten unter Gabe von AR und TCT's gestört sein, was zu einem erhöhten Risiko einer MRONJ führen kann. Zur Risikominimierung gilt es entsprechend, sofern möglich, bestehende endodontische und parodontale Infektionsherde sowie kariöse Läsionen vor Beginn einer solchen Therapieform zu sanieren und während dieser eine bestmögliche Mundgesundheit zu gewährleisten. Eine zahnärztliche Untersuchung und ggf. Sanierung vor Gabe von TCT's in Kombination mit AR sowie eine regelmäßige zahnärztliche Kontrolle unter Therapie sind daher indiziert. In einem klinisch relevanten Kontext muss daher der Schwerpunkt auf Aufklärung, Prävention und Früherkennung liegen, insbesondere bei Kombinationstherapien von antiresorptiven Medikamenten mit VEGF- und TK-Inhibitoren. Zu Bedenken ist ein ggf. auftretender Shift der Populationen, die von MRONJ unter Kombinationsbehandlung betroffen sind, wie unter Kapitel 4.2. bereits erläutert (Ghidini et al., 2017).

#### **4.7. Schlussfolgerung**

Die vorgestellten experimentellen Daten bestätigen, dass sowohl der Weichteiltoxizität als auch der immunologischen Reaktion eine besondere Rolle in der Ätiopathogenese der MRONJ zugewiesen werden muss. Darüber hinaus können die untersuchten Medikamentenkombinationen zu zellmorphologischen Veränderungen der HGF-Zellen mit Veränderungen des Zellkerns, einer Vermehrung der Nukleoli, einer verminderten Adhäsion und einer reduzierten Lebensfähigkeit der Zellen führen. Dieser Effekt war bei simulierten oralen bakteriellen und infektiösen Bedingungen deutlicher.

Weiterführende Untersuchungen könnten sensitivere Zytokinbestimmungen der HGF mittels PCR zur besseren Beurteilung des Zytokinprofils unter Medikamenteneinfluss sein. Ferner sind 3D-Modelle zur Analyse der Zellen im Zellverbund denkbar, wie sie in der Literatur bereits für ossäre Zellgruppen beschrieben sind (Zhu et al., 2018). Aufbauend auf neuen Erkenntnissen zur Fibroblastenheterogenität und ihrer Pathologie in verschiedenen Geweben bei entzündlichen Erkrankungen (Wei et al., 2021), erscheint auch eine gezieltere Profilierung der gingivalen Fibroblasten im Rahmen der vorherrschenden

immunologischen Prozesse sinnvoll. Demzufolge sind aufbauende Untersuchungen in vitro, aber auch in vivo zum besseren Verständnis der MRONJ-Pathologie obligat. Insbesondere in Anbetracht der häufigen klinischen Fallberichte über ONJ, die durch antiangiogene Therapien allein und vor allem durch Kombinationstherapien von AR mit TCT verursacht wurden, ist es in jedem Fall notwendig, das Bewusstsein für dieses Thema in allen Disziplinen zu schärfen.

## 5. Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit untersucht die Zellviabilität humaner Gingivafibroblasten (HGF) unter Einfluss von Antiresorptiva (AR) und zielgerichteten Krebstherapeutika (targeted cancer therapies, TCT) für die Behandlung ossärer Erkrankungen jeglicher Genese (Tumoren, Knochenmetastasen, Osteoporose und anderen Knochenstoffwechselkrankheiten). Die durch AR ausgelöste Kieferosteonekrose stellt eine schwerwiegende Nebenwirkung dar, die vornehmlich bei der Behandlung onkologischer Patienten auftreten kann. Neuartige Krebstherapien, wie Tyrosinkinase-, VEGF- oder mTOR-Inhibitoren tragen nach aktuellen Untersuchungen zur Entstehung der Kiefernekrose (ONJ) bei oder begünstigen deren Entwicklung, wobei vermehrt ein spontanes Auftreten der Nekrosen berichtet wurde. Unsere Untersuchungen fokussieren die Fragestellung, ob die genannten Wirkstoffgruppen in Kombination mit AR auf orale Zellen ein additives Risiko für die Entwicklung oder die Ausprägung der ONJ darstellen. Um diese Fragestellung aufzuarbeiten, wurde in in-Vitro-Studien der Medikamenteneinfluss an HGF getestet und zudem orale Infektionsbedingungen und Therapiesituationen simuliert, indem diese zusätzlich Lipopolysacchariden (LPS) und THP-1-Zellen ausgesetzt wurden.

Zur Überwachung der adhärent wachsenden Zellen wurde das xCelligence® Real-Time Cell Analysis DP Instrument der Firma Roche und ACEA Biosciences genutzt, mit dessen Impedanz-basiertem System die Überlebenskurven der Zellen unter der Medikation in unterschiedlichen Konzentrationen gemessen wurden. Getestet wurden die Medikamente Zoledronat, Denosumab, Bevacizumab, Sunitinib, Sorafenib sowie Sirolimus.

Durch Zugabe von LPS und THP-1-Zellen wurden Stresssituationen für die HGF simuliert. Die Expression verschiedener Zytokine und Mediatoren, darunter IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , OPG und RANKL, wurde mittels ELISA analysiert. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit LIVE/DEAD- und Hämalaun-Färbung kontrolliert.

Die Versuchsreihen mit dem xCelligence®-System ergaben unter hoher Konzentration von Bisphosphonaten (BP), Kombinationstherapien von AR sowie unter Kombinationstherapie von AR mit den TCT signifikant reduzierte

Überlebensraten der HGF. Die Zugabe von LPS verstärkte den Abfall der Überlebenskurven und im Mini-Immunologie-Modell mit THP-1-Zellen zeigte sich bei allen medikamentösen Versuchsansätzen eine signifikant reduzierte Überlebensrate der HGF-Zellen ( $p < 0.05$ ). Die ausgewerteten histologischen Färbungen belegen die Toxizität der untersuchten Wirkstoffkombinationen, die zu zellmorphologischen Veränderungen der Fibroblasten, wie Pyknose des Zellkerns und einer Vermehrung der Nukleoli, sowie zu einer verringerten Zellzahl führen. Im simulierten indirekten Scratch kam es zu Anhaftungsstörungen der Fibroblasten und damit zu einer verringerten Überlebensrate der Zellen, insbesondere unter zusätzlichem LPS-Einfluss. Die untersuchten Wirkstoffkombinationen führen somit zu zellmorphologischen Veränderungen von HGF, in deren Folge eine verringerte Adhäsion und Migration auftreten und die letztlich zur Apoptose führen können. Dieser Effekt war bei simulierten oralen bakteriellen und infektiösen Bedingungen auch bei niedrigeren Medikamentenkonzentrationen signifikant. Die Zytokinbestimmungen ergaben ein uneinheitliches Bild, das zudem auf eine Immundysfunktion der Zellen unter Einfluss antiresorptiv-antiangiogener Medikamente hindeuten kann.

Diese in-vitro-Ergebnisse liefern erstmals Belege für eine erhöhte Weichgewebstoxizität unter Kombinationstherapie von AR und TCT, die einen Verlust der Weichgewebsintegrität bedingen können und damit auf ein additives Risiko der Entwicklung einer medikamenten-bedingten Kiefernekrose, auch ohne externe Stimuli, hinweisen. Außerdem konnte aufgezeigt werden, dass unter immunologisch-toxischen Stresssituationen, wie u.a. bei einer Parodontitis, diese Effekte noch verstärkt sein können.

In einem klinisch relevanten Kontext, insbesondere bei Kombinationstherapien von antiresorptiven Medikamenten mit VEGF- und TK-Inhibitoren, muss der Schwerpunkt auf Aufklärung, Prävention und Früherkennung liegen, um bestehende Infektionsherde, wenn möglich, vor Medikamentengabe therapieren zu können und um das Auftreten spontaner Kiefernekrosen durch engmaschige Kontrollintervalle frühzeitig erkennen und therapieren zu können.

## I. Literaturverzeichnis

- ABEL MAHEDI MOHAMED, H., NIELSEN, C. E. N. & SCHIODT, M. 2018. Medication related osteonecrosis of the jaws associated with targeted therapy as monotherapy and in combination with antiresorptives. A report of 7 cases from the Copenhagen Cohort. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 125, 157-163.
- ABRAHAM, R. T. & WIEDERRECHT, G. J. 1996. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol*, 14, 483-510.
- ABRAHAMSEN, B. & TENG, A. Y. 2005. Technology evaluation: denosumab, Amgen. *Curr Opin Mol Ther*, 7, 604-10.
- ABRAMS, T. J., LEE, L. B., MURRAY, L. J., PRYER, N. K. & CHERRINGTON, J. M. 2003. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther*, 2, 471-8.
- ACEA BIOSCIENCES, I. 2013. RTCA SP Instrument Operator's Manual. ACEA Biosciences, Inc.
- ACIL, Y., MOLLER, B., NIEHOFF, P., RACHKO, K., GASSLING, V., WILTFANG, J. & SIMON, M. J. 2012. The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Craniomaxillofac Surg*, 40, e229-35.
- AGHALOO, T., HAZBOUN, R. & TETRADIS, S. 2015. Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaws. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 27, 489-96.
- AL-JANDAN, B. 2019. Effect of antiangiogenic targeted chemotherapy on the osseointegration of titanium implants in rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 57, 157-163.
- AL-JANDAN, B., MAREI, H. F., ABUOHASHISH, H., ZAKARIA, O. & AL-MAHALAWY, H. 2018. Effects of sunitinib targeted chemotherapy on the osseointegration of titanium implants. *Biomed Pharmacother*, 100, 433-440.
- ALGE, C. S., HAUCK, S. M., PRIGLINGER, S. G., KAMPIK, A. & UEFFING, M. 2006. Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *J Proteome Res*, 5, 862-78.
- ALJOHANI, S., FLIEFEL, R., IHBE, J., KUHNISCH, J., EHRENFELD, M. & OTTO, S. 2017. What is the effect of anti-resorptive drugs (ARDs) on the development of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in osteoporosis patients: A systematic review. *J Craniomaxillofac Surg*, 45, 1493-1502.
- AMINOSHARIAE, A., DONALDSON, M., HORAN, M., MACKEY, S. A., KULILD, J. C. & BAUR, D. 2022. Emerging antiresorptive medications and their potential implications for dental surgeries. *J Am Dent Assoc*, 153, 649-658.
- ANITUA, E., ZALDUENDO, M., TROYA, M. & ORIVE, G. 2016. PRGF exerts a cytoprotective role in zoledronic acid-treated oral cells. *Clin Oral Investig*, 20, 513-21.
- BAGAN, J., SAEZ, G. T., TORMOS, M. C., HENS, E., TEROL, M. J., BAGAN, L., DIAZ-FERNANDEZ, J. M., LLUCH, A. & CAMPS, C. 2014. Interleukin-6

- concentration changes in plasma and saliva in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis*, 20, 446-52.
- BARASCH, A., CUNHA-CRUZ, J., CURRO, F. A., HUJOEL, P., SUNG, A. H., VENA, D., VOINEA-GRIFFIN, A. E., GROUP, C. C., BEADNELL, S., CRAIG, R. G., DEROUEN, T., DESARANAYAKE, A., GILBERT, A., GILBERT, G. H., GOLDBERG, K., HAULEY, R., HASHIMOTO, M., HOLMES, J., LATZKE, B., LEROUX, B., LINDBLAD, A., RICHMAN, J., SAFFORD, M., SHIP, J., THOMPSON, V. P., WILLIAMS, O. D. & YIN, W. 2011. Risk factors for osteonecrosis of the jaws: a case-control study from the CONDOR dental PBRN. *J Dent Res*, 90, 439-44.
- BARON, R., FERRARI, S. & RUSSELL, R. G. 2011. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone*, 48, 677-92.
- BARTL, R., FRISCH, B., TRESCKOW, E. & BARTL, C. 2007. *Bisphosphonates in medical practice: Actions-Side effects-Indications- Strategies*.
- BARTL, R. V. T., EMMO 2015. Pharmacological Aspects of Antiresorptive Drugs: Bisphosphonates and Denosumab
- BASSO, F. G., PANSANI, T. N., DE OLIVEIRA, C. F., TURRIONI, A. P., SOARES, D. G., HEBLING, J. & COSTA, C. A. 2013. Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. *Braz Dent J*, 24, 551-8.
- BEKKER, P. J., HOLLOWAY, D. L., RASMUSSEN, A. S., MURPHY, R., MARTIN, S. W., LEESE, P. T., HOLMES, G. B., DUNSTAN, C. R. & DEPAOLI, A. M. 2004. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, 19, 1059-66.
- BETTINI, G., BLANDAMURA, S., SAIA, G. & BEDOGNI, A. 2012. Bevacizumab-related osteonecrosis of the mandible is a self-limiting disease process. *BMJ Case Rep*, 2012.
- BEUSELINCK, B., WOLTER, P., KARADIMOU, A., ELAIDI, R., DUMEZ, H., ROGIERS, A., VAN CANN, T., WILLEMS, L., BODY, J. J., BERKERS, J., VAN POPPEL, H., LERUT, E., DEBRUYNE, P., PARIDAENS, R. & SCHOFFSKI, P. 2012. Concomitant oral tyrosine kinase inhibitors and bisphosphonates in advanced renal cell carcinoma with bone metastases. *Br J Cancer*, 107, 1665-71.
- BEZZI, M., HASMIM, M., BIELER, G., DORMOND, O. & RUEGG, C. 2003. Zoledronate sensitizes endothelial cells to tumor necrosis factor-induced programmed cell death: evidence for the suppression of sustained activation of focal adhesion kinase and protein kinase B/Akt. *J Biol Chem*, 278, 43603-14.
- BICKEL, M. 1993. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*, 64, 456-60.
- BONE, H. G., WAGMAN, R. B., BRANDI, M. L., BROWN, J. P., CHAPURLAT, R., CUMMINGS, S. R., CZERWINSKI, E., FAHRLEITNER-PAMMER, A., KENDLER, D. L., LIPPUNER, K., REGINSTER, J. Y., ROUX, C., MALOUF, J., BRADLEY, M. N., DAIZADEH, N. S., WANG, A., DAKIN, P., PANNACCIULLI, N., DEMPSTER, D. W. & PAPAPOULOS, S. 2017. 10 years of denosumab treatment in postmenopausal women with



- osteoporosis: results from the phase 3 randomised FREEDOM trial and open-label extension. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 5, 513-523.
- BRESSLER, S. B. 2009. Introduction: Understanding the role of angiogenesis and antiangiogenic agents in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 116, S1-7.
- BRUNELLO, A., SAIA, G., BEDOGNI, A., SCAGLIONE, D. & BASSO, U. 2009. Worsening of osteonecrosis of the jaw during treatment with sunitinib in a patient with metastatic renal cell carcinoma. *Bone*, 44, 173-5.
- BULLOCK, G. 2019. *Tissue engineering approaches to the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (Ph.D. Thesis)*. The University of Sheffield.
- BULLOCK, G., MILLER, C. A., MCKECHNIE, A. & HEARNDEN, V. 2021. A Review Into the Effects of Pamidronic Acid and Zoledronic Acid on the Oral Mucosa in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Front Oral Health*, 2, 822411.
- CERRATO, A., ZANETTE, G., BOCCUTO, M., ANGELINI, A., VALENTE, M. & BACCI, C. 2021. Actinomyces and MRONJ: A retrospective study and a literature review. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*, 122, 499-504.
- CHANG, J., HAKAM, A. E. & MCCAULEY, L. K. 2018. Current Understanding of the Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaw. *Curr Osteoporos Rep*, 16, 584-595.
- CHANPUT, W., MES, J., VREEBURG, R. A., SAVELKOUL, H. F. & WICHERS, H. J. 2010. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food Funct*, 1, 254-61.
- CHANPUT, W., MES, J. J. & WICHERS, H. J. 2014. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*, 23, 37-45.
- CHANPUT, W., REITSMA, M., KLEINJANS, L., MES, J. J., SAVELKOUL, H. F. & WICHERS, H. J. 2012. beta-Glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages. *Mol Nutr Food Res*, 56, 822-33.
- CHEER, S. M. & NOBLE, S. 2001. Zoledronic acid. *Drugs*, 61, 799-805; discussion 806.
- CHENG, A. L., KANG, Y. K., CHEN, Z., TSAO, C. J., QIN, S., KIM, J. S., LUO, R., FENG, J., YE, S., YANG, T. S., XU, J., SUN, Y., LIANG, H., LIU, J., WANG, J., TAK, W. Y., PAN, H., BUROCK, K., ZOU, J., VOLIOTIS, D. & GUAN, Z. 2009. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*, 10, 25-34.
- CHIQUET, M., KATSAROS, C. & KLETSAS, D. 2015. Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. *Periodontol 2000*, 68, 21-40.
- CHRISTODOULOU, C., PERVENA, A., KLOUVAS, G., GALANI, E., FALAGAS, M. E., TSAKALOS, G., VISVIKIS, A., NIKOLAKOPOULOU, A., ACHOLOS, V., KARAPANAGIOTIDIS, G., BATZIOU, E. & SKARLOS, D. V. 2009. Combination of Bisphosphonates and Antiangiogenic Factors

- Induces Osteonecrosis of the Jaw More Frequently than Bisphosphonates Alone. *Oncology*, 76, 209-211.
- COXON, J. P., OADES, G. M., KIRBY, R. S. & COLSTON, K. W. 2004. Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU Int*, 94, 164-70.
- COZIN, M., PINKER, B. M., SOLEMANI, K., ZUNIGA, J. M., DADAIAN, S. C., CREMERS, S., LANDEBERG, R. & RAGHAVAN, S. 2011. Novel therapy to reverse the cellular effects of bisphosphonates on primary human oral fibroblasts. *J Oral Maxillofac Surg*, 69, 2564-78.
- DAIGNEAULT, M., PRESTON, J. A., MARRIOTT, H. M., WHYTE, M. K. & DOCKRELL, D. H. 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 5, e8668.
- DES GUETZ, G., UZZAN, B., NICOLAS, P., CUCHERAT, M., MORERE, J. F., BENAMOZIG, R., BREAU, J. L. & PERRET, G. Y. 2006. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer*, 94, 1823-32.
- DOUROS, J. & SUFFNESS, M. 1981. New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat Rev*, 8, 63-87.
- EROVIGNI, F., GAMBINO, A., CABRAS, M., FASCILOLO, A., BIANCHI, S. D., BELLINI, E. & FUSCO, V. 2016. Delayed Diagnosis of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) Associated with Bevacizumab Therapy in Colorectal Cancer Patients: Report of Two Cases. *Dent J (Basel)*, 4.
- ESCUDIER, B., EISEN, T., STADLER, W. M., SZCZYLIK, C., OUDARD, S., SIEBELS, M., NEGRIER, S., CHEVREAU, C., SOLSKA, E., DESAI, A. A., ROLLAND, F., DEMKOW, T., HUTSON, T. E., GORE, M., FREEMAN, S., SCHWARTZ, B., SHAN, M., SIMANTOV, R., BUKOWSKI, R. M. & GROUP, T. S. 2007. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356, 125-34.
- ESKENS, F. A. & SLEIJFER, S. 2008. The use of bevacizumab in colorectal, lung, breast, renal and ovarian cancer: where does it fit? *Eur J Cancer*, 44, 2350-6.
- ESTILO, C. L., FORNIER, M., FAROOKI, A., CARLSON, D., BOHLE, G., 3RD & HURYN, J. M. 2008. Osteonecrosis of the jaw related to bevacizumab. *J Clin Oncol*, 26, 4037-8.
- FABIAN, D., KOPPEL, J. & MADDOX-HYTTEL, P. 2005. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology*, 64, 221-31.
- FAIVRE, S., DELBALDO, C., VERA, K., ROBERT, C., LOZAHIC, S., LASSAU, N., BELLO, C., DEPRIMO, S., BREGA, N., MASSIMINI, G., ARMAND, J. P., SCIGALLA, P. & RAYMOND, E. 2006. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol*, 24, 25-35.
- FERRARA, N., HILLAN, K. J., GERBER, H. P. & NOVOTNY, W. 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 391-400.

- FITZSIMMONS, T. R., GE, S. & BARTOLD, P. M. 2018. Compromised inflammatory cytokine response to *P. gingivalis* LPS by fibroblasts from inflamed human gingiva. *Clin Oral Investig*, 22, 919-927.
- FLEISCH, H. 1997. Mechanisms of action of the bisphosphonates. *Medicina (B Aires)*, 57 Suppl 1, 65-75.
- FLEISCH, H., RUSSELL, R. G. & FRANCIS, M. D. 1969. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science*, 165, 1262-4.
- FLEISHER, K. E., JOLLY, A., VENKATA, U. D., NORMAN, R. G., SAXENA, D. & GLICKMAN, R. S. 2013. Osteonecrosis of the jaw onset times are based on the route of bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg*, 71, 513-9.
- FOEKENS, J. A., PETERS, H. A., GREBENCHTCHIKOV, N., LOOK, M. P., MEIJER-VAN GELDER, M. E., GEURTS-MOESPOT, A., VAN DER KWAST, T. H., SWEEP, C. G. & KLIJN, J. G. 2001. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res*, 61, 5407-14.
- FRANCIS, M. D., RUSSELL, R. G. & FLEISCH, H. 1969. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science*, 165, 1264-6.
- FUCILE, C., MARENCO, S., BAZZICA, M., ZUCCOLI, M. L., LANTIERI, F., ROBBIANO, L., MARINI, V., DI GION, P., PIERI, G., STURA, P., MARTELLI, A., SAVARINO, V., MATTIOLI, F. & PICCIOTTO, A. 2015. Measurement of sorafenib plasma concentration by high-performance liquid chromatography in patients with advanced hepatocellular carcinoma: is it useful the application in clinical practice? A pilot study. *Med Oncol*, 32, 335.
- FUKADA, S., OHTA, K., SAKUMA, M., AKAGI, M., KATO, H., NARUSE, T., NAKAGAWA, T., SHIGEISHI, H., NISHI, H., TAKECHI, M. & AIKAWA, T. 2022. Sunitinib promotes apoptosis via p38 MAPK activation and STAT3 downregulation in oral keratinocytes. *Oral Dis*.
- FUNG, P., BEDOGNI, G., BEDOGNI, A., PETRIE, A., PORTER, S., CAMPISI, G., BAGAN, J., FUSCO, V., SAIA, G., ACHAM, S., MUSTO, P., PETRUCCI, M. T., DIZ, P., COLELLA, G., MIGNOGNA, M. D., PENTENERO, M., ARDUINO, P., LODI, G., MAIORANA, C., MANFREDI, M., HALLBERG, P., WADELIUS, M., TAKAOKA, K., LEUNG, Y. Y., BONACINA, R., SCHIODT, M., LAKATOS, P., TAYLOR, T., DE RIU, G., FAVINI, G., ROGERS, S. N., PIRMOHAMED, M., NICOLETTI, P., CONSORTIUM, G. & FEDELE, S. 2017. Time to onset of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a multicentre retrospective cohort study. *Oral Dis*, 23, 477-483.
- FUSCO, V., CABRAS, M., EROVIGNI, F., DELL'ACQUA, A., ARDUINO, P. G., PENTENERO, M., APPENDINO, P., BASANO, L., FERRERA, F. D., FASCIOLO, A., CAKA, M. & MIGLIARIO, M. 2021. A multicenter observational study on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ) in advanced cancer and myeloma patients of a cancer network in North-Western Italy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 26, e466-e473.

- FUSCO, V., SANTINI, D., ARMENTO, G., TONINI, G. & CAMPISI, G. 2016. Osteonecrosis of jaw beyond antiresorptive (bone-targeted) agents: new horizons in oncology. *Expert Opin Drug Saf*, 15, 925-35.
- GARCIA, J., HURWITZ, H. I., SANDLER, A. B., MILES, D., COLEMAN, R. L., DEURLOO, R. & CHINOT, O. L. 2020. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treatment Reviews*, 86.
- GARETTO, L. P., CHEN, J., PARR, J. A. & ROBERTS, W. E. 1995. Remodeling dynamics of bone supporting rigidly fixed titanium implants: a histomorphometric comparison in four species including humans. *Implant Dent*, 4, 235-43.
- GARUTI, F., CAMELLI, V., SPINARDI, L., BUCCI, L. & TREVISANI, F. 2016. Osteonecrosis of the jaw during sorafenib therapy for hepatocellular carcinoma. *Tumori*, 102.
- GHIDINI, G., MANFREDI, M., GIOVANNACCI, I., MERGONI, G., SARRAJ, A., MUREDDU, M., GIUNTA, G., BONANINI, M., MELETI, M. & VESCOVI, P. 2017. Medication-related osteonecrosis of the jaw: risk factors in patients under bisphosphonate versus patients under antiresorptive-antiangiogenic drugs. *Minerva Stomatol*, 66, 135-140.
- GKOUVERIS, I., HADAYA, D., ELZAKRA, N., SOUNDIA, A., BEZOUGLAIA, O., DRY, S. M., PIRIH, F., AGHALOO, T. & TETRADIS, S. 2022. Inhibition of HMGB1/RAGE Signaling Reduces the Incidence of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ) in Mice. *J Bone Miner Res*, 37, 1775-1786.
- GKOUVERIS, I., HADAYA, D., SOUNDIA, A., BEZOUGLAIA, O., CHAU, Y., DRY, S. M., PIRIH, F. Q., AGHALOO, T. L. & TETRADIS, S. 2019. Vasculature submucosal changes at early stages of osteonecrosis of the jaw (ONJ). *Bone*, 123, 234-245.
- GOERDT, S. & ORFANOS, C. E. 1999. Other Functions, Other Genes: Alternative Activation of Antigen-Presenting Cells. *Immunity*, 10, 137-142.
- GOODMAN, V. L., ROCK, E. P., DAGHER, R., RAMCHANDANI, R. P., ABRAHAM, S., GOBBURU, J. V. S., BOOTH, B. P., VERBOIS, S. L., MORSE, D. E., LIANG, C. Y., CHIDAMBARAM, N., JIANG, J. X., TANG, S., MAHJOOB, K., JUSTICE, R. & PAZDUR, R. 2007. Approval Summary: Sunitinib for the Treatment of Imatinib Refractory or Intolerant Gastrointestinal Stromal Tumors and Advanced Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 13, 1367-1373.
- GORDON, C. R., ROJAVIN, Y., PATEL, M., ZINS, J. E., GRANA, G., KANN, B., SIMONS, R. & ATABEK, U. 2009. A review on bevacizumab and surgical wound healing: an important warning to all surgeons. *Ann Plast Surg*, 62, 707-9.
- GORDON, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 3, 23-35.
- GREENSPAN, S., FIELD-MUNVES, E., TONINO, R., SMITH, M., PETRUSCHKE, R., WANG, L., YATES, J., DE PAPP, A. E. & PALMISANO, J. 2002. Tolerability of once-weekly alendronate in patients with osteoporosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Mayo Clin Proc*, 77, 1044-52.

- HAKKINEN, L., LARJAVA, H. & FOURNIER, B. P. 2014. Distinct phenotype and therapeutic potential of gingival fibroblasts. *Cytotherapy*, 16, 1171-86.
- HALLMER, F., ANDERSSON, G., GÖTRICK, B., WARFVINGE, G., ANDERUD, J. & BJØRNLAND, T. 2018. Prevalence, initiating factor, and treatment outcome of medication-related osteonecrosis of the jaw—a 4-year prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 126, 477-485.
- HAMIDI, H., LILJA, J. & IVASKA, J. 2017. Using xCELLigence RTCA Instrument to Measure Cell Adhesion. *Bio Protoc*, 7.
- HAN, Z. H., PALNITKAR, S., RAO, D. S., NELSON, D. & PARFITT, A. M. 1997. Effects of ethnicity and age or menopause on the remodeling and turnover of iliac bone: implications for mechanisms of bone loss. *J Bone Miner Res*, 12, 498-508.
- HANSEN, T., KUNKEL, M., SPRINGER, E., WALTER, C., WEBER, A., SIEGEL, E. & KIRKPATRICK, C. J. 2007. Actinomycosis of the jaws—histopathological study of 45 patients shows significant involvement in bisphosphonate-associated osteonecrosis and infected osteoradionecrosis. *Virchows Arch*, 451, 1009-17.
- HANSEN, T., KUNKEL, M., WEBER, A. & JAMES KIRKPATRICK, C. 2006. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates - histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. *J Oral Pathol Med*, 35, 155-60.
- HENRY, D. H., COSTA, L., GOLDWASSER, F., HIRSH, V., HUNGRIA, V., PRAUSOVA, J., SCAGLIOTTI, G. V., SLEEBOOM, H., SPENCER, A., VADHAN-RAJ, S., VON MOOS, R., WILLENBACHER, W., WOLL, P. J., WANG, J., JIANG, Q., JUN, S., DANSEY, R. & YEH, H. 2011. Randomized, Double-Blind Study of Denosumab Versus Zoledronic Acid in the Treatment of Bone Metastases in Patients With Advanced Cancer (Excluding Breast and Prostate Cancer) or Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 1125-1132.
- HOEFERT, S. & EUFINGER, H. 2010. Sunitinib may raise the risk of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: presentation of three cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 110, 463-9.
- HOEFERT, S., SADE HOEFERT, C., MUNZ, A., NORTHOFF, H., YUAN, A., REICHENMILLER, K., REINERT, S. & GRIMM, M. 2016a. Altered macrophagic THP-1 cell phagocytosis and migration in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Clin Oral Investig*, 20, 1043-54.
- HOEFERT, S., SADE HOEFERT, C., MUNZ, A., SCHMITZ, I., GRIMM, M., YUAN, A., NORTHOFF, H., REINERT, S. & ALEXANDER, D. 2016b. Effect of bisphosphonates on macrophagic THP-1 cell survival in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 121, 222-32.
- HOEFERT, S., SCHMITZ, I., WEICHERT, F., GASPAR, M. & EUFINGER, H. 2015. Macrophages and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): evidence of local immunosuppression of macrophages in contrast to other infectious jaw diseases. *Clin Oral Investig*, 19, 497-508.
- HOFMANN, E., EGGERS, B., HEIM, N., KRAMER, F. J., NOKHBEHSAIM, M. & GÖTZ, W. 2022. Bevacizumab and sunitinib mediate osteogenic and pro-

- inflammatory molecular changes in primary human alveolar osteoblasts in vitro. *Odontology*.
- HORTOBAGYI, G. N., ZHENG, M. & MOHANLAL, R. 2019. Indirect Evaluation of Bone Saturation with Zoledronic Acid After Long-Term Dosing. *Oncologist*, 24, 178-184.
- HSU, J. T., LE, P. H., KUO, C. F., CHIOU, M. J., KUO, C. J., CHEN, T. H., LIN, C. J., CHEN, J. S., YU, H. P., YE, C. N., JAN, Y. Y. & YE, T. S. 2017. Imatinib dose escalation versus sunitinib as a second-line treatment against advanced gastrointestinal stromal tumors: A nationwide population-based cohort study. *Oncotarget*.
- IKESUE, H., DOI, K., MORIMOTO, M., HIRABATAKE, M., MUROI, N., YAMAMOTO, S., TAKENOBU, T. & HASHIDA, T. 2022. Risk evaluation of denosumab and zoledronic acid for medication-related osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases: a propensity score-matched analysis. *Support Care Cancer*, 30, 2341-2348.
- JUNG, J., PARK, J. S., RIGHESIO, L., PABST, A. M., AL-NAWAS, B., KWON, Y. D. & WALTER, C. 2018. Effects of an oral bisphosphonate and three intravenous bisphosphonates on several cell types in vitro. *Clin Oral Investig*, 22, 2527-2534.
- K.A. GRÖTZ, J.-U. P. U. B. A.-N. 2012. Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose (BP-ONJ) und andere Medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen. AWMF online.
- KANEKO, J., OKINAGA, T., HIKIJI, H., ARIYOSHI, W., YOSHIGA, D., HABU, M., TOMINAGA, K. & NISHIHARA, T. 2018. Zoledronic acid exacerbates inflammation through M1 macrophage polarization. *Inflamm Regen*, 38, 16.
- KANG, W., HU, Z. & GE, S. 2016. Healthy and Inflamed Gingival Fibroblasts Differ in Their Inflammatory Response to Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide. *Inflammation*, 39, 1842-52.
- KAVANAGH, K. L. 2006. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs.
- KEMP, A. P. T., FERREIRA, V. H. C., MOBILE, R. Z., BRANDAO, T. B., SASSI, L. M., ZARPELLON, A., BRAZ-SILVA, P. H. & SCHUSSEL, J. L. 2020. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaw and salivary IL-6 IN cancer patients. *Braz J Otorhinolaryngol*, 88, 683-690.
- KENNEL, K. A. & DRAKE, M. T. 2009. Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management. *Mayo Clin Proc*, 84, 632-7; quiz 638.
- KHAN, A. A., MORRISON, A., HANLEY, D. A., FELSEBERG, D., MCCAULEY, L. K., O'RYAN, F., REID, I. R., RUGGIERO, S. L., TAGUCHI, A., TETRADIS, S., WATTS, N. B., BRANDI, M. L., PETERS, E., GUISE, T., EASTELL, R., CHEUNG, A. M., MORIN, S. N., MASRI, B., COOPER, C., MORGAN, S. L., OBERMAYER-PIETSCH, B., LANGDAHL, B. L., AL DABAGH, R., DAVISON, K. S., KENDLER, D. L., SÁNDOR, G. K., JOSSE, R. G., BHANDARI, M., EL RABBANY, M., PIERROZ, D. D., SULIMANI, R., SAUNDERS, D. P., BROWN, J. P. & COMPSTON, J. 2015. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a

- systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res*, 30, 3-23.
- KHAN, A. A., MORRISON, A., KENDLER, D. L., RIZZOLI, R., HANLEY, D. A., FELSEBERG, D., MCCAULEY, L. K., O'RYAN, F., REID, I. R., RUGGIERO, S. L., TAGUCHI, A., TETRADIS, S., WATTS, N. B., BRANDI, M. L., PETERS, E., GUISE, T., EASTELL, R., CHEUNG, A. M., MORIN, S. N., MASRI, B., COOPER, C., MORGAN, S. L., OBERMAYER-PIETSCH, B., LANGDAHL, B. L., DABAGH, R. A., DAVISON, K. S., SÁNDOR, G. K., JOSSE, R. G., BHANDARI, M., EL RABBANY, M., PIERROZ, D. D., SULIMANI, R., SAUNDERS, D. P., BROWN, J. P. & COMPSTON, J. 2017. Case-Based Review of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and Application of the International Recommendations for Management From the International Task Force on ONJ. *J Clin Densitom*, 20, 8-24.
- KIM, Y.-G., LEE, B.-S., KWON, Y.-D., SUH, J.-H. & JEEN, S.-M. 2010. Study on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): case report and literature review. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 36.
- KOBAYASHI, Y., HIRAGA, T., UEDA, A., WANG, L., MATSUMOTO-NAKANO, M., HATA, K., YATANI, H. & YONEDA, T. 2010. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab*, 28, 165-75.
- KOMATSU, Y., IBI, M., CHOSA, N., KYAKUMOTO, S., KAMO, M., SHIBATA, T., SUGIYAMA, Y. & ISHISAKI, A. 2016. Zoledronic acid suppresses transforming growth factor-beta-induced fibrogenesis by human gingival fibroblasts. *Int J Mol Med*, 38, 139-47.
- KUMAR, V. & SINHA, R. K. 2013. Evolution and etiopathogenesis of bisphosphonates induced osteonecrosis of the jaw. *N Am J Med Sci*, 5, 260-5.
- LESCAILLE, G., COUDERT, A. E., BAAROUN, V., OSTERTAG, A., CHARPENTIER, E., JAVELOT, M. J., TOLEDO, R., GOUDOT, P., AZERAD, J., BERDAL, A., SPANO, J. P., RUHIN, B. & DESCROIX, V. 2014. Clinical study evaluating the effect of bevacizumab on the severity of zoledronic acid-related osteonecrosis of the jaw in cancer patients. *Bone*, 58, 103-7.
- LIEBAUG, L. M., A.; REINERT, S.; HOEFERT, S. 2019. Erhöhtes Risiko einer Medikamentenassoziierten Kiefernekrose (MRONJ). *Zahnärzteblatt Baden-Württemberg*. Dr. Torsten Tomppert, Präsident der Landeszahnärztekammer Baden-Württemberg (LZK BW), und Dr. Ute Maier, Vorsitzende des Vorstands der Kassenzahnärztlichen Vereinigung Baden-Württemberg (KZV BW), für das Informationszentrum Zahngesundheit Baden-Württemberg – eine Einrichtung der LZK BW und KZV BW.
- LIMONES, A., SAEZ-ALCAIDE, L. M., DIAZ-PARRENO, S. A., HELM, A., BORNSTEIN, M. M. & MOLINERO-MOURELLE, P. 2020. Medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) in cancer patients treated with

- denosumab VS. zoledronic acid: A systematic review and meta-analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 25, e326-e336.
- LIPTON, A. 2008. Emerging role of bisphosphonates in the clinic--antitumor activity and prevention of metastasis to bone. *Cancer Treat Rev*, 34 Suppl 1, S25-30.
- LIU, I. H. & KUNZ, P. L. 2017. Biologics in gastrointestinal and pancreatic neuroendocrine tumors. *J Gastrointest Oncol*, 8, 457-465.
- LIU, L., CAO, Y., CHEN, C., ZHANG, X., MCNABOLA, A., WILKIE, D., WILHELM, S., LYNCH, M. & CARTER, C. 2006. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res*, 66, 11851-8.
- LOMBARD, T., NEIRINCKX, V., REGISTER, B., GILON, Y. & WISLET, S. 2016. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: New Insights into Molecular Mechanisms and Cellular Therapeutic Approaches. *Stem Cells Int*, 2016, 8768162.
- LOYSON, T., VAN CANN, T., SCHÖFFSKI, P., CLEMENT, P. M., BECHTER, O., SPRIET, I., COROPCIUC, R., POLITIS, C., VANDEWEYER, R. O., SCHOENAERS, J., DUMEZ, H., BERTELOOT, P., NEVEN, P., NACKAERTS, K., WOEL, A. J. F., PUNIE, K., WILDIERS, H. & BEUSELINCK, B. 2018. Incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated sequentially with bisphosphonates and denosumab. *Acta Clin Belg*, 73, 100-109.
- LUCKMAN, S. P., HUGHES, D. E., COXON, F. P., GRAHAM, R., RUSSELL, G. & ROGERS, M. J. 1998. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res*, 13, 581-9.
- MAJOR, P., LORTHOLARY, A., HON, J., ABDI, E., MILLS, G., MENSSEN, H. D., YUNUS, F., BELL, R., BODY, J., QUEBE-FEHLING, E. & SEAMAN, J. 2001. Zoledronic acid is superior to pamidronate in the treatment of hypercalcemia of malignancy: a pooled analysis of two randomized, controlled clinical trials. *J Clin Oncol*, 19, 558-67.
- MALAN, J., ETTINGER, K., NAUMANN, E. & BEIRNE, O. R. 2012. The relationship of denosumab pharmacology and osteonecrosis of the jaws. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 114, 671-676.
- MANDEL, K., SEIDL, D., RADES, D., LEHNERT, H., GIESELER, F., HASS, R. & UNGEFROREN, H. 2013. Characterization of spontaneous and TGF-beta-induced cell motility of primary human normal and neoplastic mammary cells in vitro using novel real-time technology. *PLoS One*, 8, e56591.
- MARX, R. E. 2003. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*, 61, 1115-7.
- MARX, R. E., SAWATARI, Y., FORTIN, M. & BROUMAND, V. 2005. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*, 63, 1567-75.



- MAWARDI, H., GIRO, G., KAJIYA, M., OHTA, K., ALMAZROOA, S., ALSHWAIMI, E., WOO, S. B., NISHIMURA, I. & KAWAI, T. 2011. A role of oral bacteria in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res*, 90, 1339-45.
- MCLEOD, N. M., BRENNAN, P. A. & RUGGIERO, S. L. 2012. Bisphosphonate osteonecrosis of the jaw: a historical and contemporary review. *Surgeon*, 10, 36-42.
- MCLEOD, N. M. H., MOUTASIM, K. A., BRENNAN, P. A., THOMAS, G. & JENEI, V. 2013. In Vitro Effect of Bisphosphonates on Oral Keratinocytes and Fibroblasts.
- MCMULLEN, C. J., CHALMERS, S., WOOD, R., CUNNINGHAM, M. R. & CURRIE, S. 2020. Sunitinib and Imatinib Display Differential Cardiotoxicity in Adult Rat Cardiac Fibroblasts That Involves a Role for Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II. *Front Cardiovasc Med*, 7, 630480.
- MEHRABI, A., FONOUNI, H., KASHFI, A., SCHMIED, B. M., MORATH, C., SADEGHI, M., SCHEMMER, P., ENCKE, J., SAUER, P., ZEIER, M., WEITZ, J., BUCHLER, M. W. & SCHMIDT, J. 2006. The role and value of sirolimus administration in kidney and liver transplantation. *Clin Transplant*, 20 Suppl 17, 30-43.
- MENDEL, D. B., LAIRD, A. D., XIN, X., LOUIE, S. G., CHRISTENSEN, J. G., LI, G., SCHRECK, R. E., ABRAMS, T. J., NGAI, T. J., LEE, L. B., MURRAY, L. J., CARVER, J., CHAN, E., MOSS, K. G., HAZNEDAR, J. O., SUKBUNTHERNG, J., BLAKE, R. A., SUN, L., TANG, C., MILLER, T., SHIRAZIAN, S., MCMAHON, G. & CHERRINGTON, J. M. 2003. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res*, 9, 327-37.
- MOZZATI, M., MARTINASSO, G., MAGGIORA, M., SCOLETTA, M., ZAMBELLI, M., CAROSSA, S., ORALDI, M., MUZIO, G. & CANUTO, R. A. 2013. Oral mucosa produces cytokines and factors influencing osteoclast activity and endothelial cell proliferation, in patients with osteonecrosis of jaw after treatment with zoledronic acid. *Clin Oral Investig*, 17, 1259-66.
- MURATSU, D., YOSHIGA, D., TAKETOMI, T., ONIMURA, T., SEKI, Y., MATSUMOTO, A. & NAKAMURA, S. 2013. Zoledronic acid enhances lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory reactions through controlled expression of SOCS1 in macrophages. *PLoS One*, 8, e67906.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE, N. 2019. *Sirolimus (Code C1212)* [Online]. NCIthesaurus. Available: [https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C1212](https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C1212) [Accessed].
- O'HALLORAN, M., BOYD, N. M. & SMITH, A. 2014. Denosumab and osteonecrosis of the jaws - the pharmacology, pathogenesis and a report of two cases. *Aust Dent J*, 59, 516-9.
- ON, S. W., CHO, S. W., BYUN, S. H. & YANG, B. E. 2021. Various Therapeutic Methods for the Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the

- Jaw (MRONJ) and Their Limitations: A Narrative Review on New Molecular and Cellular Therapeutic Approaches. *Antioxidants (Basel)*, 10.
- PABST, A. M., ZIEBART, T., KOCH, F. P., TAYLOR, K. Y., AL-NAWAS, B. & WALTER, C. 2012. The influence of bisphosphonates on viability, migration, and apoptosis of human oral keratinocytes--in vitro study. *Clin Oral Investig*, 16, 87-93.
- PIMOLBUTR, K., PORTER, S. & FEDELE, S. 2018. Osteonecrosis of the Jaw Associated with Antiangiogenics in Antiresorptive-Naive Patient: A Comprehensive Review of the Literature. *Biomed Res Int*, 2018, 8071579.
- PUSHALKAR, S., LI, X., KURAGO, Z., RAMANATHAPURAM, L. V., MATSUMURA, S., FLEISHER, K. E., GLICKMAN, R., YAN, W., LI, Y. & SAXENA, D. 2014. Oral microbiota and host innate immune response in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Sci*, 6, 219-26.
- QIN, Z. 2012. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, 221, 2-11.
- RAVOSA, M. J., NING, J., LIU, Y. & STACK, M. S. 2011. Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Arch Oral Biol*, 56, 491-8.
- REID, I. R., BOLLAND, M. J. & GREY, A. B. 2007. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone*, 41, 318-20.
- RODAN, G. A. & FLEISCH, H. A. 1996. Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest*, 97, 2692-6.
- ROSEN, L. S., GORDON, D., TCHEKMEDYIAN, S., YANAGIHARA, R., HIRSH, V., KRZAKOWSKI, M., PAWLICKI, M., DE SOUZA, P., ZHENG, M., URBANOWITZ, G., REITSMA, D. & SEAMAN, J. J. 2003. Zoledronic acid versus placebo in the treatment of skeletal metastases in patients with lung cancer and other solid tumors: a phase III, double-blind, randomized trial--the Zoledronic Acid Lung Cancer and Other Solid Tumors Study Group. *J Clin Oncol*, 21, 3150-7.
- ROSENFELD, P. J. 2006. Intravitreal avastin: the low cost alternative to lucentis? *Am J Ophthalmol*, 142, 141-3.
- RUGGIERO, S. L., CARLSON, E. R. & ASSAEL, L. A. 2009a. Comprehensive review of bisphosphonate therapy: implications for the oral and maxillofacial surgery patient. *J Oral Maxillofac Surg*, 67, 1.
- RUGGIERO, S. L., DODSON, T. B., AGHALOO, T., CARLSON, E. R., WARD, B. B. & KADEMANI, D. 2022. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022 Update. *J Oral Maxillofac Surg*, 80, 920-943.
- RUGGIERO, S. L., DODSON, T. B., ASSAEL, L. A., LANDESBURG, R., MARX, R. E., MEHROTRA, B., AMERICAN ASSOCIATION OF, O. & MAXILLOFACIAL, S. 2009b. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update. *J Oral Maxillofac Surg*, 67, 2-12.
- RUGGIERO, S. L., DODSON, T. B., FANTASIA, J., GOODDAY, R., AGHALOO, T., MEHROTRA, B., O'RYAN, F., AMERICAN ASSOCIATION OF, O. & MAXILLOFACIAL, S. 2014. American Association of Oral and Maxillofacial

- Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg*, 72, 1938-56.
- RUGGIERO, S. L., MEHROTRA, B., ROSENBERG, T. J. & ENGROFF, S. L. 2004. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg*, 62, 527-34.
- RUSSELL, R. G., WATTS, N. B., EBETINO, F. H. & ROGERS, M. J. 2008. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*, 19, 733-59.
- SAAD, F., BROWN, J. E., VAN POZNAK, C., IBRAHIM, T., STEMMER, S. M., STOPECK, A. T., DIEL, I. J., TAKAHASHI, S., SHORE, N., HENRY, D. H., BARRIOS, C. H., FACON, T., SENEAL, F., FIZAZI, K., ZHOU, L., DANIELS, A., CARRIERE, P. & DANSEY, R. 2012. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol*, 23, 1341-1347.
- SACCO, R., WOOLLEY, J., PATEL, G., CALASANS-MAIA, M. D. & YATES, J. 2022. Systematic review of medication related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in patients undergoing only antiangiogenic drug therapy: surgery or conservative therapy? *Br J Oral Maxillofac Surg*, 60, e216-e230.
- SAKAMOTO, H., AIKAWA, M., HILL, C. C., WEISS, D., TAYLOR, W. R., LIBBY, P. & LEE, R. T. 2001. Biomechanical strain induces class a scavenger receptor expression in human monocyte/macrophages and THP-1 cells: a potential mechanism of increased atherosclerosis in hypertension. *Circulation*, 104, 109-14.
- SANTOS-SILVA, A. R., BELIZARIO ROSA, G. A., CASTRO JUNIOR, G., DIAS, R. B., PRADO RIBEIRO, A. C. & BRANDAO, T. B. 2013. Osteonecrosis of the mandible associated with bevacizumab therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 115, e32-6.
- SCHEPER, M. A., BADROS, A., CHAISUPARAT, R., CULLEN, K. J. & MEILLER, T. F. 2009a. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol*, 144, 667-76.
- SCHEPER, M. A., BADROS, A., SALAMA, A. R., WARBURTON, G., CULLEN, K. J., WEIKEL, D. S. & MEILLER, T. F. 2009b. A novel bioassay model to determine clinically significant bisphosphonate levels. *Support Care Cancer*, 17, 1553-7.
- SCHIEGNITZ, E., BILAL AL-NAWAS, B., HOEFERT, S., OTTO, S., PAUTKE, C., RISTOW, O., VOSS, P. & GRÖTZ, K. A. 2018. S3-Leitlinie 007/091: Antiresorptiva-assoziierte Kiefernekrosen (AR-ONJ). AWMF Online.
- SCHOENHOF, R., MUNZ, A., YUAN, A., ELAYOUTI, A., BOESMUELLER, H., BLUMENSTOCK, G., REINERT, S. & HOEFERT, S. 2021. Microarchitecture of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ); a retrospective micro-CT and morphometric analysis. *J Craniomaxillofac Surg*, 49, 508-517.
- SCHÖNHOF, R. 2022. *Medikamenten-assoziierte Kieferosteonekrosen (MRONJ) – eine statische und dynamische (histo)morphometrische*

- Analyse mittels Micro-CT und (Immun-)Histologie.* Dr. med., Eberhard Karls Universität zu Tübingen.
- SCHWENDE, H., FITZKE, E., AMBS, P. & DIETER, P. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol*, 59, 555-61.
- SEDGHIZADEH, P. P., KUMAR, S. K., GORUR, A., SCHAUDINN, C., SHULER, C. F. & COSTERTON, J. W. 2009. Microbial biofilms in osteomyelitis of the jaw and osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy. *J Am Dent Assoc*, 140, 1259-65.
- SEHGAL, S. N., BAKER, H. & VÉZINA, C. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, 28, 727-32.
- SETO, B. 2012. Rapamycin and mTOR: a serendipitous discovery and implications for breast cancer. *Clin Transl Med*, 1, 29.
- SETO, T., HIGASHIYAMA, M., FUNAI, H., IMAMURA, F., UEMATSU, K., SEKI, N., EGUCHI, K., YAMANAKA, T. & ICHINOSE, Y. 2006. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 53, 91-6.
- SHAMJI, A. F., NGHIEM, P. & SCHREIBER, S. L. 2003. Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. *Mol Cell*, 12, 271-80.
- SHARIF, O., BOLSHAKOV, V. N., RAINES, S., NEWHAM, P. & PERKINS, N. D. 2007. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunol*, 8, 1.
- SI-TAHAR, M., TOUQUI, L. & CHIGNARD, M. 2009. Innate immunity and inflammation--two facets of the same anti-infectious reaction. *Clin Exp Immunol*, 156, 194-8.
- SIMON, M. J., NIEHOFF, P., KIMMIG, B., WILTFANG, J. & ACIL, Y. 2010. Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Investig*, 14, 51-8.
- SISMEY-DURRANT, H. J. & HOPPS, R. M. 1991. Effect of lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis on prostaglandin E2 and interleukin-1-beta release from rat periosteal and human gingival fibroblasts in vitro. *Oral Microbiol Immunol*, 6, 378-80.
- SIVOLELLA, S., LUMACHI, F., STELLINI, E. & FAVERO, L. 2013. Denosumab and anti-angiogenic drug-related osteonecrosis of the jaw: an uncommon but potentially severe disease. *Anticancer Res*, 33, 1793-7.
- SMIDERLE, F. Polysaccharides from Agaricus bisporus and Agaricus brasiliensis show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells.
- SMITH, M. P., YOUNG, H., HURLSTONE, A. & WELLBROCK, C. 2015. Differentiation of THP1 Cells into Macrophages for Transwell Co-culture Assay with Melanoma Cells. *Bio Protoc*, 5.
- SONDHI, P., MARUF, M. H. U. & STINE, K. J. 2019. Nanomaterials for Biosensing Lipopolysaccharide. *Biosensors (Basel)*, 10.

- STEFFEN, M. J., HOLT, S. C. & EBERSOLE, J. L. 2000. Porphyromonas gingivalis induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol*, 15, 172-80.
- SURYANI, I. R., AHMADZAI, I., SHUJAAT, S., MA, H. & JACOBS, R. 2022. Non-antiresorptive drugs associated with the development of medication-related osteonecrosis of the jaw: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*, 26, 2269-2279.
- TANAKA, Y., NAGAI, Y., DOHDOH, M., OIZUMI, T., OHKI, A., KUROISHI, T., SUGAWARA, S. & ENDO, Y. 2013. In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-NBP) in tumour cells and periodontal cells. *Arch Oral Biol*, 58, 628-37.
- TAYLOR, P. R., MARTINEZ-POMARES, L., STACEY, M., LIN, H. H., BROWN, G. D. & GORDON, S. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 23, 901-44.
- TIPTON, D. A., SESHUL, B. A. & DABBOUS, M. 2011. Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis: RANKL, osteoprotegerin and interleukin-6. *J Periodontal Res*, 46, 39-47.
- TORIUMI, S., KOBAYASHI, A. & UESAWA, Y. 2020. Comprehensive Study of the Risk Factors for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw Based on the Japanese Adverse Drug Event Report Database. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13.
- TSUCHIYA, S., YAMABE, M., YAMAGUCHI, Y., KOBAYASHI, Y., KONNO, T. & TADA, K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 26, 171-6.
- UM MIN ALLAH, N., BERAHIM, Z., AHMAD, A. & KANNAN, T. P. 2017. Biological Interaction Between Human Gingival Fibroblasts and Vascular Endothelial Cells for Angiogenesis: A Co-culture Perspective. *Tissue Eng Regen Med*, 14, 495-505.
- URCAN, E., HAERTEL, U., STYLLOU, M., HICKEL, R., SCHERTHAN, H. & REICHL, F. X. 2010. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater*, 26, 51-8.
- VAN AMERSFOORT, E. S., VAN BERKEL, T. J. & KUIPER, J. 2003. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev*, 16, 379-414.
- VAN CANN, T., LOYSON, T., VERBIEST, A., CLEMENT, P. M., BECHTER, O., WILLEMS, L., SPRIET, I., COROPCIUC, R., POLITIS, C., VANDEWEYER, R. O., SCHOENAERS, J., DEBRUYNE, P. R., DUMEZ, H., BERTELOOT, P., NEVEN, P., NACKAERTS, K., WOEL, A. J. F., PUNIE, K., WILDIERS, H. & BEUSELINCK, B. 2018. Incidence of medication-related osteonecrosis of the jaw in patients treated with both bone resorption inhibitors and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Support Care Cancer*, 26, 869-878.
- VIDEIRA, P. A., PITEIRA, A. R., CABRAL, M. G., MARTINS, C., CORREIA, M., SEVERINO, P., GOUVEIA, H., CARRASCAL, M., ALMEIDA, J. F., TRINDADE, H. & SANTOS, L. L. 2011. Effects of Bevacizumab on

- Autocrine VEGF Stimulation in Bladder Cancer Cell Lines. *Urologia Internationalis*, 86, 95-101.
- WADA, N., WANG, B., LIN, N. H., LASLETT, A. L., GRONTHOS, S. & BARTOLD, P. M. 2011. Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res*, 46, 438-47.
- WAGNER, G., SIEVERS, L., TIBURCY, M., ZIMMERMANN, W. H., KOLLMAR, O., SCHMALZ, G. & ZIEBOLZ, D. 2022. Impact of Immunosuppressive Drugs on Fibroblasts: An In Vitro Study. *J Clin Med*, 11.
- WANG, Y., PANG, B., ZHANG, R., FU, Y. & PANG, Q. 2019. Ubenimex induces apoptotic and autophagic cell death in rat GH3 and MMQ cells through the ROS/ERK pathway. *Drug Des Devel Ther*, 13, 3217-3228.
- WEI, K., NGUYEN, H. N. & BRENNER, M. B. 2021. Fibroblast pathology in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, 131.
- WOOD, J., BONJEAN, K., RUETZ, S., BELLAHCÈNE, A., DEVY, L., FOIDART, J. M., CASTRONOVO, V. & GREEN, J. R. 2002. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther*, 302, 1055-61.
- WU, L., ZHU, L., SHI, W. H., ZHANG, J., MA, D. & YU, B. 2009. Zoledronate inhibits the proliferation, adhesion and migration of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 602, 124-31.
- YAMAMOTO, K., MIZUMOTO, A., NISHIMURA, K., UDA, A., MUKAI, A., YAMASHITA, K., KUME, M., MAKIMOTO, H., BITO, T., NISHIGORI, C., NAKAGAWA, T., HIRANO, T. & HIRAI, M. 2014. Association of toxicity of sorafenib and sunitinib for human keratinocytes with inhibition of signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3). *PLoS One*, 9, e102110.
- YANNI, A., BOULAND, C., MONTEIRO, R., RODRIGUEZ, A., LOEB, I., JAVADIAN, R. & DEQUANTER, D. 2022. Contribution of Antiangiogenic Agents to the Risk of Medication-related Osteonecrosis of the Jaw in Combination with Antiresorptive Agents: Preliminary Results in a Comparative Prospective Report of 59 Oncologic Cases. *J Int Soc Prev Community Dent*, 12, 564-570.
- YAO, S., DING, X., RONG, G., ZHOU, J. & ZHANG, B. 2022. Association Between Malignant Diseases and Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ): A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Craniofac Surg*.
- YAROM, N., LAZAROVICI, T. S., WHITEFIELD, S., WEISSMAN, T., WASSERZUG, O. & YAHALOM, R. 2018. Rapid onset of osteonecrosis of the jaw in patients switching from bisphosphonates to denosumab. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 125, 27-30.
- YUAN, A. 2018. *Investigation of medication--related osteonecrosis of the jaw by real--time in vitro assays, histologic examination, and radiographic evaluation*. Doctor of Philosophy (PhD).
- YUAN, A., MUNZ, A., REINERT, S. & HOEFERT, S. 2019. Gingival fibroblasts and medication-related osteonecrosis of the jaw: Results by real-time and wound healing in vitro assays. *J Craniomaxillofac Surg*, 47, 1464-1474.

- ZAFAR, S., COATES, D. E., CULLINAN, M. P., DRUMMOND, B. K., MILNE, T. & SEYMOUR, G. J. 2014. Zoledronic acid and geranylgeraniol regulate cellular behaviour and angiogenic gene expression in human gingival fibroblasts. *J Oral Pathol Med*, 43, 711-21.
- ZHENG, G. Z., CHANG, B., LIN, F. X., XIE, D., HU, Q. X., YU, G. Y., DU, S. X. & LI, X. D. 2017. Meta-analysis comparing denosumab and zoledronic acid for treatment of bone metastases in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 26.
- ZHU, S., EHNERT, S., ROUß, M., HÄUSSLING, V., ASPERA-WERZ, R. H., CHEN, T. & NUSSLER, A. K. 2018. From the Clinical Problem to the Basic Research-Co-Culture Models of Osteoblasts and Osteoclasts. *Int J Mol Sci*, 19.
- ZIRK, M., WENZEL, C., BULLER, J., ZOLLER, J. E., ZINSER, M. & PETERS, F. 2019. Microbial diversity in infections of patients with medication-related osteonecrosis of the jaw. *Clin Oral Investig*, 23, 2143-2151.

## II. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Prof. Siegmart Reinert und PD Dr. Dr. Sebastian Hoefert durchgeführt.

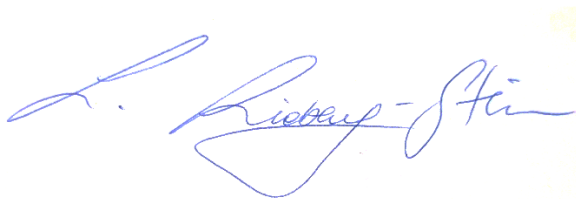
Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Dr. Sebastian Hoefert, Oberarzt der MKG-Chirurgie.

Nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Adelheid Munz, MTA, sowie Dr. Anna Yuan, PhD-Doktorandin, wurden sämtliche Versuche mit beratender Unterstützung durch Adelheid Munz eigenständig von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie (Herr Martin Eichner) durch mich unter der Leitung von PD Dr. Dr. Sebastian Hoefert.

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

Tübingen, den 21.06.2023



Linda Liebaug-Steiner



### **III. Veröffentlichungen**

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Liebaug, L.; Munz, A.; Reinert, S.; Hoefert, S. - Erhöhtes Risiko einer Medikamentenassoziierten Kiefernekrose (MRONJ) – Zahnärzteblatt Baden-Württemberg – 2019 – 03 – 3 Seiten, ab S. 43

#### **IV. Danksagung**

Zuallererst gilt der besondere Dank meinem Doktorvater und Mentor, PD Dr. Dr. Sebastian Hoefert: Dank seines sprühenden Enthusiasmus und der Leidenschaft für diese Thematik hat er mich dazu inspiriert, klinische Forschung zu betreiben. Danke für all die produktiven Gespräche, Impulse und wegweisenden Ideen, für die professionelle und warmherzige Betreuung dieses Promotionsprojektes, und vor allem für das Vertrauen in mich!

Herzlichen Dank an Prof. Siegmar Reinert, der mich die ersten Jahre als Doktorvater begleitete und mich in meinem Dissertationsprojekt und darüber hinaus förderte.

Ich danke Adelheid Munz (MTA), der guten Seele des Labors und schwäbischen Powerfrau: Sie hat mich mit Rat und Tat bei allen Arbeiten im Labor unterstützt und ist dabei nicht müde geworden, jedes Protokoll mehrfach gegenzulesen. Danke für die professionelle und sogleich so herzliche Betreuung!

Vielen Dank an meine Doktorandenvorgängerin Anna Yuan, PhD, für die sachkundige Einführung der experimentellen Versuche und freundschaftliche Begleitung.

Dr. Claudia Sade-Hoefert danke ich für die motivierenden Gespräche und jedweden anderen wertvollen, unterstützenden Beistand.

Danke an das gesamte Team des Laborbaus der Zahnklinik Tübingen und der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie für die Bereitstellung aller Geräte und Materialien zur Durchführung der experimentellen Arbeiten und den konstruktiven Austausch.

Herrn Prof. Dr. Martin Eichner, Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie Tübingen, gilt mein Dank für die Unterstützung bei der statistischen Planung dieser Arbeit.

Ich danke dem IZKF-Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, die sowohl das Projekt als auch mich persönlich als erste Zahnmedizinstudentin des Kollegs förderte.

Ferner gilt mein Dank der AOCMF, die die Studie im Rahmen einer größeren Projektförderung ebenfalls unterstützt hat.

Von Herzen danke ich...

Meinem Mann für die bedingungslose Unterstützung und Liebe während all dieser Zeit und das Vertrauen in mich. Danke, dass du mein Fels in der Brandung warst und bist!

Meiner Mama und meinem lieben Stefan für eure Rückendeckung und vor allem für all die konstruktiven Ratschläge und Hilfestellungen- das ist nicht in Schoko-Kirsch-Kuchen aufzuwiegen! Danke für eure großartige Unterstützung auf allen Ebenen und vor allem dafür, dass ihr mein Leuchtturm in schwierigen Fahrwassern gewesen seid!

Meinen Schwiegereltern, Silvia und Harald, ohne deren Unterstützung jedweder Art diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Meiner ganzen wunderbaren Familie und all meinen Freunden für jedes offene Ohr, jeden Rat, euren Zuspruch und all die Ermutigungen.

## Anlage 1

### ELISA-Versuchsaufbau

#### *I. VEGF*

Human VEGF Quantikine ELISA Kit der Firma R&D Systems.  
Es wurde dabei nach folgendem Herstellerprotokoll vorgegangen:

Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, alle Proben, Standards und Kontrollen in doppelter Ausführung zu untersuchen.

1. Bereiten Sie alle Reagenzien, Standardverdünnungen und Proben wie in der Produktbeilage angegeben vor.
2. Entfernen Sie überschüssige Mikroplattenstreifen aus dem Plattenrahmen, bringen Sie sie in den Folienbeutel mit der Trockenmittelpackung zurück und verschließen Sie sie erneut.
3. Für Proben von Zellkultur-Überständen: Geben Sie 50 µl Assay Diluent in jedes Well.
4. Für Proben von Zellkultur-Überständen: Geben Sie 200µl Standard, Kontrolle oder Probe in jedes Well. Mit einem Plattensiegel abdecken und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Aspirieren Sie jede Vertiefung und waschen Sie sie. Wiederholen Sie den Vorgang zweimal, um insgesamt drei Waschgänge durchzuführen.
6. Geben Sie 200µl Konjugat in jede Vertiefung. Mit einem neuen Plattensiegel abdecken und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Absaugen und dreimal waschen.
8. Geben Sie 200µl Substratlösung in jedes Well.
9. Für Proben von Zellkultur-Überständen: Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Vor Licht schützen.
10. Geben Sie 50µl Stopp-Lösung in jedes Well. Bei 450nm innerhalb von 30 Minuten ablesen. Stellen Sie die Wellenlängenkorrektur auf 540nm oder 570nm ein.

## **II. IL-6**

Human IL-6 Quantikine ELISA Kit der Firma R&D Systems.  
Es wurde dabei nach folgendem Herstellerprotokoll vorgegangen:

Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, alle Proben, Standards und Kontrollen in doppelter Ausführung zu untersuchen.

1. Bereiten Sie alle Reagenzien, Standardverdünnungen und Proben wie in der Produktbeilage angegeben vor.
2. Entfernen Sie überschüssige Mikroplattenstreifen aus dem Plattenrahmen, bringen Sie sie in den Folienbeutel mit der Trockenmittelpackung zurück und verschließen Sie sie erneut.
3. Geben Sie 100µl Assay Diluent in jedes Well.
4. Geben Sie 100µl Standard, Kontrolle oder Probe in jedes Well. Mit einem Plattensiegel abdecken und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Aspirieren Sie jede Vertiefung und waschen Sie sie. Wiederholen Sie den Vorgang dreimal für insgesamt 4 Waschgänge.
6. Geben Sie 200µl Konjugat in jede Vertiefung. Mit einem neuen Plattensiegel abdecken und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Absaugen und viermal waschen.
8. Geben Sie 200µl Substratlösung in jedes Well. Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Vor Licht schützen.
9. Geben Sie 50µl Stopp-Lösung in jedes Well. Bei 450nm innerhalb von 30 Minuten ablesen. Stellen Sie die Wellenlängenkorrektur auf 540nm oder 570nm ein.

## **III. IL-1 $\beta$**

Human IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit der Firma R&D Systems.

Es wurde dabei nach folgendem Herstellerprotokoll vorgegangen:

Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, alle Proben, Standards und Kontrollen in doppelter Ausführung zu untersuchen.

1. Bereiten Sie alle Reagenzien, Standardverdünnungen und Proben wie in der Produktbeilage angegeben vor.
2. Entfernen Sie überschüssige Mikroplattenstreifen aus dem Plattenrahmen, bringen Sie sie in den Folienbeutel mit der Trockenmittelpackung zurück und verschließen Sie sie erneut.
3. Geben Sie 200µl Standard, Kontrolle oder Probe in jedes Well. Mit einem Plattensiegel abdecken und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Aspirieren Sie jede Vertiefung und waschen Sie sie. Wiederholen Sie den Vorgang zweimal, um insgesamt drei Waschgänge durchzuführen.
5. Geben Sie 200µl Konjugat in jede Vertiefung. Für Proben von Zellkultur-Überständen: Mit einem neuen Plattensiegel abdecken und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Absaugen und dreimal waschen.
7. Geben Sie 200µl Substratlösung in jedes Well. Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Vor Licht schützen.
8. Geben Sie 50µl Stopp-Lösung in jedes Well. Bei 450nm innerhalb von 30 Minuten ablesen. Stellen Sie die Wellenlängenkorrektur auf 540nm oder 570nm ein.

#### **IV. IL-8**

Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA Kit der Firma R&D Systems.

Es wurde dabei nach folgendem Herstellerprotokoll vorgegangen:

Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, alle Proben, Standards und Kontrollen in doppelter Ausführung zu untersuchen.

1. Bereiten Sie alle Reagenzien, Standardverdünnungen und Proben wie in der Produktbeilage angegeben vor.
2. Entfernen Sie überschüssige Mikroplattenstreifen aus dem Plattenrahmen, bringen Sie sie in den Folienbeutel mit der Trockenmittelpackung zurück und verschließen Sie sie erneut.
3. Geben Sie 100µl Assay Diluent in jedes Well.
4. Geben Sie 50µl Standard, Kontrolle oder Probe in jedes Well. Mit einem Plattensiegel abdecken und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Aspirieren Sie jede Vertiefung und waschen Sie sie. Wiederholen Sie den Vorgang dreimal für insgesamt 4 Waschgänge.
6. Geben Sie 100µl Konjugat in jede Vertiefung. Mit einem neuen Plattensiegel abdecken und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Absaugen und viermal waschen.
8. Geben Sie 200µl Substratlösung in jedes Well. Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Vor Licht schützen.
9. Geben Sie 50µl Stopp-Lösung in jedes Well. Bei 450nm innerhalb von 30 Minuten ablesen. Stellen Sie die Wellenlängenkorrektur auf 540nm oder 570nm ein.

## **V. TNF**

Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit der Firma R&D Systems.

Es wurde dabei nach folgendem Herstellerprotokoll vorgegangen:

Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, alle Normen, Proben und Kontrollen in doppelter Ausführung zu untersuchen.

1. Bereiten Sie alle Reagenzien, Standardverdünnungen und Proben wie in der Produktbeilage angegeben vor.
2. Entfernen Sie überschüssige Mikroplattenstreifen aus dem Plattenrahmen, bringen Sie sie in den Folienbeutel mit der Trockenmittelpackung zurück und verschließen Sie sie erneut.

3. Fügen Sie 50µl von Assay Diluent RD1F zu jedem Well hinzu.
4. Fügen Sie 200µl von Standard, Probe oder Kontrolle pro Well hinzu. Mit einem Plattensiegel abdecken. Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur.
5. Aspirieren Sie jede Vertiefung und waschen Sie sie. Wiederholen Sie den Vorgang dreimal für insgesamt vier Waschgänge.
6. Fügen Sie 200µl von TNF-α Konjugat zu jedem Well hinzu. Mit einem neuen Plattensiegel abdecken. Für Proben von Zellkultur-Überständen: eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Wiederholen Sie das Absaugen/Waschen wie in Schritt 5.
8. Geben Sie 200µl Substratlösung in jedes Well. Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Vor Licht schützen.
9. Geben Sie 50µl Stopp-Lösung in jedes Well. Bei 450nm innerhalb von 30 Minuten ablesen. Stellen Sie die Wellenlängenkorrektur auf 540nm oder 570nm ein.

## **VI. RANKL**

Human TNFSF11/RANKL PicoKine™ ELISA Kit der Firma Boster Biological Technology.

Es wurde dabei nach folgendem Herstellerprotokoll vorgegangen:

Es wird empfohlen, alle Reagenzien und Materialien vor dem Experiment auf 37°C/Raumtemperatur zu bringen.

1. Bereiten Sie alle Reagenzien, Standardverdünnungen und Proben wie in der Produktbeilage angegeben vor.
2. Entfernen Sie überschüssige Mikroplattenstreifen vom Plattenrahmen und versiegeln Sie diese und bewahren Sie sie in der Originalverpackung auf.
3. Fügen Sie 100µl des Standards, der Proben oder der Kontrolle pro Well hinzu. Mindestens zwei Replikate jeder Norm. Probe oder Kontrolle wird empfohlen.



- Mit dem mitgelieferten Plattensiegel abdecken und 120 Minuten bei RT (oder 90 Minuten bei 37°C) inkubieren.
4. Entfernen Sie den Deckel und entsorgen Sie die Flüssigkeit in den Wells. Fügen Sie 100µl des präparierten 1x biotinylierten Anti-HumanEK0842 TNFSF11-Antikörpers in jedes Well ein. Mit Plattensiegel abdecken und 90 Minuten bei RT (oder 60 Minuten bei 37°C) inkubieren.
  5. Waschen Sie die Platte dreimal mit dem Waschpuffer.
  6. Fügen Sie 100µl des präparierten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes in jede Vertiefung ein. Inkubation über 40 Minuten bei RT (oder 30 Minuten bei 37°C).
  7. Waschen Sie die Platte fünfmal mit dem Waschpuffer.
  8. Fügen Sie 90µl Farbentwicklungsreagenz zu jedem Well hinzu und inkubieren Sie 30 Minuten lang im Dunkeln bei RT (oder 25-30 Minuten bei 37°C).
  9. Fügen Sie 100µl Stopp-Lösung zu jedem Well hinzu. Die Farbe sollte sofort auf gelb wechseln. Innerhalb von 30 Minuten nach Beendigung der Reaktion sollte die Außenabsorption mit einem Mikroplattenleser bei 450 nm abgelesen werden.

## **VII. OPG**

Human OPG PicoKine™ ELISA Kit der Firma Boster Biological Technology.

Es wurde dabei nach folgendem Herstellerprotokoll vorgegangen:

Es wird empfohlen, alle Reagenzien und Materialien vor dem Experiment auf 37°C/Raumtemperatur zu bringen.

1. Bereiten Sie alle Reagenzien, Standardverdünnungen und Proben wie in der Produktbeilage angegeben vor.
2. Entfernen Sie überschüssige Mikroplattenstreifen vom Plattenrahmen und versiegeln Sie diese und bewahren Sie sie in der Originalverpackung auf.

3. Fügen Sie 100µl des Standards, der Proben oder der Kontrolle pro Well hinzu. Es werden mindestens zwei Replikate von jedem Standard, jeder Probe oder Kontrolle empfohlen. Mit dem mitgelieferten Plattensiegel abdecken und 90 Minuten bei 37 °C inkubieren.
4. Fügen Sie 100µl des präparierten 1x biotinylierten Anti-HumanEK0480 TNFRSF11B Antikörpers in jedes Well ein. Mit Plattensiegel abdecken und 60 Minuten bei 37°C inkubieren.
5. Waschen Sie die Platte dreimal mit dem Waschpuffer.
6. Fügen Sie 100µl des vorbereiteten 1x Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes in jede Vertiefung hinzu. Inkubation von 30 Minuten bei 37°C.
7. Waschen Sie die Platte fünfmal mit dem Waschpuffer.
8. Fügen Sie 90µl Farbentwicklungsreagenz zu jedem Well hinzu und inkubieren Sie es im Dunkeln für 25-30 Minuten bei 37°C.
9. Fügen Sie 100µl Stopp-Lösung zu jedem Well hinzu. Die Farbe sollte sofort auf gelb wechseln.  
Innerhalb von 30 Minuten nach Beendigung der Reaktion sollte die Außenabsorption mit einem Mikroplattenleser bei 450nm abgelesen werden.

## Anlage 2

### Gesamtübersicht Geräte und Verbrauchsmaterialien

Allgemeingültige Angabe der Hersteller in folgender Reihenfolge:  
Firmenname, Stadt, Land (nach ISO-Norm 3166).

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Inkubator HERAccl® 150; Eingestellt auf 37°C, 5% CO<sub>2</sub></b>	Heraeus, Hanau, DE
<b>Inverted Microscope DMIL 090-135.001</b>	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
<b>Wasserbad Typ WNB22; Eingestellt auf 35°C</b>	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, DE
<b>Mikroskop DMIL LED 11 090 137 001</b>	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
<b>Mikrotiterplatten-Photometer, BioTek™ ELx800™ Absorbance Microplate Readers</b>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
<b>MSC-Advantage™, biologische Sicherheitswerkbank</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
<b>Multipette® M4</b>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
<b>Pipetten Eppendorf Research® in diversen Größen</b>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
<b>Pipettierhelfer accu-jet® pro</b>	BRAND, Wertheim, DE
<b>xCELLigence® RTCA DP, Real Time Cell Analyzer</b>	ACEA Biosciences, Inc., San Diego, US
<b>Vortex Mixer 7-2020</b>	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
<b>Zentrifuge mit Vortex</b>	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
<b>Zentrifuge 5804R</b>	Eppendorf Zentrifugen GmbH, Leipzig, DE

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
<b>AVASTIN Vials 100mg/4ml</b>	Roche Pharma AG, Grenzach- Wyhlen, DE
<b>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D8537-500ml)</b>	Fa. Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, DE, Co.
<b>E-Plate 16(Art.-Nr.: 2801032), E-Plate VIEW 16 (Art.-Nr.: 2801044), E-Plate Insert 16 (Art.-Nr.: 2801052)</b>	ACEA Biosciences, Inc., San Diego, US
<b>Ethanol absolut zur Analyse, A1613</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
<b>EZ4U - Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay, Cat. No.: BI- 5000</b>	Biomedica Medizinprodukte GmbH, Wien, AT

<b>Fibroblast growth medium, FCS, Cat.-Nr. 201 0401</b>	Provitro AG, Berlin, DE
<b>Formaldehydlösung, 4% gepuffert (Art.-Nr. 27246)</b>	Fischar Otto GmbH&Co. KG, Saarbrücken, DE
<b>G418-BC, 30.000U/ml, Lot 1344D</b>	Biochrom GmbH, Berlin, DE GmbH
<b>Humane Gingivafibroblasten (HFIB-G 121 0412, Cryo)</b>	Provitro AG, Berlin, DE
<b>Human IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit (DLB50)</b>	R&D Systems, Inc., Minneapolis, US
<b>Human IL-6 Quantikine ELISA Kit (D6050)</b>	R&D Systems, Inc., Minneapolis, US
<b>Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA Kit (D8000C)</b>	R&D Systems, Inc., Minneapolis, US
<b>Human OPG PicoKine™ ELISA Kit (EK0480)</b>	Boster Biological Technology, Pleasanton, US
<b>Humane THP-1- Zelllinie (ATCC® TIB-202)</b>	ATCC®, Manassas, US
<b>Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (DTA00C)</b>	R&D Systems, Inc., Minneapolis, US
<b>Human TNFSF11/RANKL PicoKine™ ELISA Kit (EK0842)</b>	Boster Biological Technology, Pleasanton, US
<b>Human VEGF Quantikine ELISA Kit (DVE00)</b>	R&D Systems, Inc., Minneapolis, US
<b>Kupfersulfat, Nr. 2790.0250</b>	Merck KGaA, Darmstadt, DE KGaA
<b>Lithocholsäure, L6250</b>	Fa. Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, DE
<b>LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit (Cat. No. R37601)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
<b>LPS-PG Standard, 1mg</b>	InvivoGen, San Diego, US
<b>Mayers Häkalaunlösung (1092491000)</b>	Merck KGaA, Darmstadt, DE KGaA
<b>Pipetten Research® für 1µl, 2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl Volumen</b>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
<b>Prolia (Denosumab) 60mg (Bestellnr.: 9002270)</b>	Amgen GmbH, München, DE
<b>Puromycin, 10mg/ml (CAS 58-58-2)</b>	InvivoGen, San Diego, US
<b>Röhrchen, 15ml und 50ml (Cellstar® Polypropylene Tube)</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
<b>Rapamycin, (CAS 53123-88-9)</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, US
<b>RPMI-1640 Medium (ATCC® 30-2001™)</b>	ATCC®, Manassas, US
<b>Safe Lock Tubes 0,5ml, 1,5ml, 2ml, 5ml</b>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
<b>Serologische Pipetten für 2ml, 5ml, 10ml, 25ml Volumen</b>	Corning® Life Sciences, Corning, US

<b>Sorafenib 5mg (Bestellnr.: sc-220125)</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, US
<b>Sunitinib Malate 10mg (Bestellnr.: sc-220177)</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, US
<b>ThinCert™ Inserts für 24-well-Platten, Pore 0,4µm (Art.-Nr. 662641)</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
<b>Trypsin EDTA (Lot-Nr. 6MB083)</b>	Lonza, Verviers, BE
<b>Zellkulturflaschen (75cm<sup>2</sup> U-Shaped Canted Neck Cell Culture Flask with Plug Seal Cap, Vented Cap Style, #430641U)</b>	Corning® Life Sciences, Corning, US
<b>Zoledronate disodium (Art.-nr.: SRP01250z)</b>	Sequoia Research Products Ltd, Pangbourne, GB