

**Aus der Anatomischen Anstalt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. med. R. Putz

**Die biologische Qualität des Transferknochens:
Gibt es Unterschiede in den verschiedenen Spenderregionen?**

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde an der Medizinischen
Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

**Constanze Verena Gnamm
aus München**

2006

**Aus der Anatomischen Anstalt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. med. R. Putz

**Die biologische Qualität des Transferknochens:
Gibt es Unterschiede in den verschiedenen Spenderregionen?**

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde an der Medizinischen
Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

**Constanze Verena Gnamm
aus München**

2006

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

Berichterstatter: Univ. Prof. Dr. med. K.-U. Benner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Mehl
Prof. Dr. P. Müller

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2006

**All jenen
gewidmet, die sich nach ihrem Tod der medizinischen Forschung zur
Verfügung stellen.**

**Ohne diese Menschen wäre auch die vorliegende Arbeit nicht möglich
gewesen.**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
3. Material und Methoden	12
3.1. Material	12
3.1.1. Vitales Knochenmark	12
3.1.1.1. Lokalisation der Knochenmarkentnahme	13
3.1.1.2. Knochenentnahmetechnik zur Gewinnung eines kortiko-spongiösen Knochenblocks aus der Retromolarregion	13
3.1.1.3. Knochenentnahmetechnik zur Gewinnung eines kortiko-spongiösen Knochenblocks aus der Mentalregion	14
3.1.2. Formaldehydfixiertes Knochenmark	14
3.1.2.4. Lokalisation der Knochenmarkentnahme	15
3.1.2.5. Knochenentnahmetechnik zur Gewinnung eines kortiko-spongiösen Knochenblocks aus der Retromolarregion und aus dem Mentalbereich von Humanpräparaten	15
3.2. Methode	18
3.2.3. Anfertigung der Ausstrichpräparate von vitalem Gewebe	18
3.2.4. Färbung der Vitalpräparate	19
3.2.5. Anfertigung der Ausstrichpräparate und Färbung des formaldehydfixierten Knochens.....	19
3.2.6. Herstellung von histologischen Schnittpräparaten des formaldehydfixierten Knochens.....	19
3.2.7. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des formaldehydfixierten Knochens.....	20

3.2.8. Mikrocomputertomographie des formaldehydfixierten Knochens	22
3.3. Ausstrichuntersuchungen mit mikroskopischer Differenzierungstechnik und fotografischer Darstellung der Vitalpräparate	22
3.4. Untersuchung der Schnittpräparate unter dem Lichtmikroskop mit fotografischer Darstellung	23
3.5. Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.....	23
3.6. Auswertung der Mikrocomputertomographieaufnahmen	23
4. Ergebnisse	24
4.7. Histologische Untersuchung der Ausstriche der Vital- und Humanpräparate	24
4.8. Vergleichende Untersuchung der histologischen Schnittpräparate, der Rasterelektronenmikroskopaufnahmen und der Mikrocomputertomographien an Proben von Humanpräparaten.....	37
5. Diskussion	47
6. Zusammenfassung	53
7. Literaturverzeichnis.....	56

1. Einleitung

In der zahnärztlichen Chirurgie wird die autogene Knochentransplantation zur Rehabilitation und Rekonstruktion ungenügender Alveolarkammformen als präimplantologische operative Maßnahme durchgeführt. Die Alveolarkammdefekte resultieren meist aus entzündlichen Prozessen, insuffizienten prothetischen Versorgung, Traumata, sowie unsachgemäßen Zahnentfernungen. Die Wiederherstellung eines zerstörten Knochenareals vor einer Implantation ist eine *conditio sine qua non*. Versäumt man diese Vorbereitung, können bei einer mangelhaften Kieferkammarchitektur ästhetisch unbefriedigende Ergebnisse und funktionelle Nachteile für den Patienten entstehen.

Autogener Knochen ist zweifelsohne das beste Material um einen Knochenaufbau durchzuführen. Aus biologischer und immunologischer Sicht ist die Verwendung autogenen Knochens, bei Einhaltung der notwendigen Hygiene, unbedenklich. Außer der begrenzten Verfügbarkeit ist der einzige offensichtliche Nachteil, die Notwendigkeit eines weiteren operativen Eingriffs und die damit verbundene zusätzliche Belastung des Patienten.

Alternativen zum autogenen Knochen, im Zuge der Alveolarkammrekonstruktion, sind verschiedene Knochenaufbaumaterialien (KAM). Diese KAM sind jedoch nur in der Lage Hartgewebsregenerate zu bilden, da ihnen nachweislich osteogenetische und osteoinduktive Eigenschaften fehlen, sofern sie nicht mit Wachstumsfaktoren kombiniert werden. Die Verwendung von autogenem Knochen gilt als der so genannte Goldstandard bei der Rekonstruktion verloren gegangener Knochengeometrien.

Die Bereiche, die operationstechnisch einfach zu erreichen sind und ein geringes Verletzungsrisiko für anatomisch wichtige Strukturen beinhalten, kommen als intraorale Spenderareale in Frage. Die Symphysen- und die Retromolarregion des Unterkiefers werden in der Regel als Entnahmestellen bevorzugt. Diese Areale bieten meistens genügend Knochenvolumen, um auch größere Knochendefekte aufzufüllen. Das Entnahmegebiet wird üblicherweise unter Berücksichtigung der Defektgröße und dem daraus resultierenden erforderlichen Ergänzungsvolumen ausgesucht.

Zweifelsohne wäre es aber auch sinnvoll, die Spenderregion nach der zellulären Komposition des Knochens auszuwählen. In diesem Fall ergibt sich die Qualität

weniger aus der Dichte des Knochens, als viel mehr aus Art und Menge der Zellen im Endost bzw. im mit entnommenen Knochenmark.

Ob sich das Knochenmark der unterschiedlichen Kiefersegmente in seiner, für die Osteogenität relevanten, zellulären Ausstattung unterscheidet ist wissenschaftlich nicht geklärt. Für die Knochenheilung ist unbedingt die Anwesenheit von knochenbildenden Zellen erforderlich. Das Heilungspotential von Knochendefekten korreliert vermutlich mit der vorhandenen Anzahl dieser Zellen. Wissenschaftliche Untersuchungen zeigen, dass eine Möglichkeit zur Verbesserung der Defektheilung ein therapeutisch erhöhtes Angebot knochenbildender Zellen sein kann (Marx und Morales 1988, Marx et al. 1998).

Während der Literaturrecherche fand sich seltsamerweise keine Studie über das osteogene Potential des Knochengewebes der verschiedenen Spenderareale. Jedoch existiert eine Vielzahl von Studien über vergleichende Entnahme- und Transplantationstechniken, Untersuchungen bezüglich des Dimensionsverhaltens und des Heilungsverlaufes der Transplantate, sowie Langzeitbeobachtungen der Osteoplastiken. Einige klinische Fallstudien liefern histologische Studien zur zellulären Beschaffenheit des Transplantationsgewebes (Matsumoto et al.). Kritische Bewertungen der Knochentransplantate fehlen jedoch.

Dies ist umso erstaunlicher wenn man berücksichtigt, dass signifikante involutive Altersveränderungen der Mandibula nachgewiesen werden konnten (Ricci et al. 1990, Amano et al. 1995). Mit magnetresonanztomografischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das so genannte rote Knochenmark des Unterkiefers einen dynamischen, primär irreversiblen Umbauprozess durchläuft. Das hämatopoetische Zellsystem wird ab der Geburt sukzessive und nach einem gewissen Schema von distal nach proximal in das so genannte gelbe Knochenmark mit einem circa achtzig prozentigen Fettanteil umgewandelt (Babyn et al. 1998). Dieser Vorgang dauert meistens bis zur vierten Lebensdekade.

Die zelluläre Komponente des Unterkieferknochenmarks wurde bei der Verwendung autogener Knochentransplantate bisher kaum berücksichtigt. Ein solcher Faktor könnte aber ebenfalls einen Einfluss auf die Resultate eines autogenen Knochentransfers ausüben. Daher schien es sinnvoll, bei der Bewertung des Spenderknochens nicht nur auf dessen kompakte und spongiöse Anteile, sondern auch auf die Komposition des mit ihm transferierten Knochenmarks, inklusive

Endosts, zu achten. Vielleicht böte sich damit sogar die Möglichkeit, den Begriff „Qualität“ im Zusammenhang mit dem Spenderknochen neu zu definieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die feingewebliche Komposition des Knochenmarks aus zwei verschiedenen orofazialen Spenderregionen, dem Retromolar- und dem Symphysenbereich des Unterkiefers, zu studieren und miteinander zu vergleichen.

2. Literaturübersicht

Die Transplantation von Knochen ist ein multitraumatisierender Eingriff, der eine Vielzahl von Gewebereaktionen und zelluläre Mechanismen in den betroffenen Arealen und vermutlich auch in weiter entfernten Körperbereichen induziert. Es wurden die Entnahmeregionen des Unterkiefers betrachtet und analysiert, die auf Grund ihrer quantitativen Vorzüge von den Chirurgen gezielt ausgewählt werden. Die Selektion des Knochenareals sollte meines Erachtens jedoch unter weiteren speziellen Kriterien erfolgen. Die physiologischen Eigenschaften und die Beschaffenheit des zellulären Mikrokosmos des Knochens sind wichtige Merkmale für die Qualität eines Transplantates und den reproduzierbaren Erfolg der chirurgischen Maßnahmen.

Da der Körper auch altersbedingten physiologischen Veränderungen unterliegt, müssen diese dynamischen Prozesse in die Auswahlkriterien einfließen. Bezüglich des Unterkiefers scheint es jedenfalls altersbedingte Veränderungen des Knochenmarks zu geben, die durchaus die Entscheidung für die eine, oder andere Entnahmeregion, beeinflussen könnten.

Bei einem chirurgischen Eingriff tangiert man unterschiedliche zelluläre Funktionsbereiche. Einerseits das stromale beziehungsweise mesenchymale Zellsystem als Lieferant der Osteoblasten, Fibroblasten und Fettzellen, andererseits das hämatopoetische System, das die Räume innerhalb des Knochenmarkstroma ausfüllt und einen wesentlichen Einfluss auf das skelettale System ausübt. Man ist abhängig von den Interaktionen dieser verschiedenen Zellsysteme, die den Regenerationsprozess maßgeblich steuern und für den langfristigen Erfolg der Eingriffe eine wesentliche Komponente darstellen.

Eine Begleiterscheinung unserer chirurgischen Maßnahmen ist immer ein minimaler Blutverlust. Die entsprechende systemische Antwort des Organismus ist für den

Heilungsprozess eventuell von großer Bedeutung und sollte zur Diskussion gestellt werden.

Eine detaillierte Analyse sämtlicher Phasen des chirurgischen Vorgehens und der damit provozierten zellulären und systemischen Reaktionen ist die Voraussetzung für einen reproduzierbaren Erfolg. Es wird im Folgenden die aktuelle wissenschaftliche Meinung zu dieser Thematik zitiert, unter der besonderen Gewichtung der Histologie und der mikroskopischen Anatomie.

Das Knochenmark besteht aus retikulärem Bindegewebe und füllt die Räume zwischen den Knochenbälkchen der Spongiosa und die röhrenförmigen Räume der großen Extremitätenknochen aus. Es umfasst ca. 5% des Körpergewichts. Das retikuläre Bindegewebe des Knochenmarks besteht aus Fettzellen und Fibroblasten, die Kollagen vom Typ 3 produzieren können. Die blassen, fibroblastischen Retikulumzellen bilden retikuläre Fasern und Wachstumsfaktoren für die Blutzellbildung. Viele dieser Fibroblasten liegen in der Nähe der Wände der Blutsinus, deren Endothelzellen Zytokine und andere Faktoren zur Regulation der Hämatopoese produzieren.

Bei Neugeborenen bildet das gesamte Knochenmark Blutzellen. Beim Erwachsenen ist die Blutzellbildung nur noch auf bestimmte Bereiche beschränkt wie Wirbel, Rippen, Sternum, Ilium, proximale Enden von Humerus und Femur, sowie in einem sehr geringen Ausmaß auf den Unterkiefer. Es werden zweierlei Funktionszustände des Knochenmarks unterschieden, die offensichtlich bei Bedarf ineinander übergehen können. Einerseits existiert das rote oder hämatopoetische Knochenmark, das seine rote Farbe der Präsenz der hämoglobinhaltigen Erythrozyten und deren Vorläuferzellen zu verdanken hat und aktiver Bestandteil der Hämatopoese ist und andererseits das gelbe Knochenmark mit geringer hämatopoetischer Aktivität und einem hohen Anteil an Fettzellen. Die chemische Zusammensetzung des roten und des gelben Knochenmarks unterscheidet sich deutlich. Rotes Knochenmark enthält circa 40% Wasser, 40% Fett und 20% Proteine. Gelbes Knochenmark dagegen enthält wesentlich weniger Wasser (15%) und weniger Proteine (5%), aber mit achtzig Prozent eine große Menge Fett (Vogler et al. 1988). Das Knochenmark durchläuft nach der Geburt einen extremen Umwandlungsprozess. Innerhalb der ersten zwei Lebensdekaden verdoppelt sich der Fettgehalt des Knochenmarks. Dieser Umwandlungsprozess stabilisiert sich ab der Mitte der dritten Lebensdekade. Der wesentliche Anteil der hämatopoetischen

Aktivität des Knochens reduziert sich dann auf wenige Bereiche. In Korrelation zum Alter schreitet der Umwandlungsprozess allmählich fort, mit dem Resultat eines weiter steigenden Fettgehalts. Die Dynamik der Umwandlung des roten und gelben Knochenmarks wurde speziell im Unterkiefer ausführlich untersucht. Der Grund für das intensive Interesse an diesen Studien ist primär die Tatsache, dass die häufigen Knochenmarkerkrankungen, wie Osteomyelitiden und maligne Tumorerkrankungen (z.B.: multiple Myelome) im Unterkiefer auftreten und entsprechende Kenntnisse über das Verteilungsmuster des Knochenmarks eventuell helfen könnten, mehr über die Knochenmarkerkrankungen zu erfahren. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der Magnetresonanztomografie durchgeführt. Der Unterkiefer wurde in anatomische Regionen unterteilt, die Messergebnisse interpretiert und statistisch ausgewertet. Die besondere Bedeutung dieses Verfahrens liegt unter anderem darin, dass unterschiedliche Gewebe dargestellt werden können, die sich nicht in ihrer Dichte bzw. ihren Absorptionseigenschaften gegenüber ionisierender Strahlung (z.B.: Knochen, Weichteilgewebe), sondern in ihrer Protonendichte und in deren chemischer Bindung unterscheiden, z.B. Weichteilgewebe ähnlicher Dichte. Die Magnetresonanzuntersuchungen über altersbedingte Veränderungen der Knochenmarkstruktur von Amano et al. (1995) zeigen im Körper der Mandibula eine vollkommene Umwandlung des roten Knochenmarks in gelbes Knochenmark bis zu Beginn der dritten Lebensdekade hauptsächlich in der Mentalregion und der Körperregion des Unterkiefers. In einigen proximalen Unterkieferregionen enthält das Knochenmark noch einen geringen Anteil hämatopoetischen Knochenmarks. Kaneda et al. untersuchten 1996 das Knochenmark des Unterkiefers ebenfalls mit Hilfe der Magnetresonanztomografie und fanden einen sukzessiven, altersabhängigen Umbau des roten Knochenmarks in gelbes Fettmark. Sie untersuchten 73 Probanden und kamen zu einem tendenziell vergleichbaren Ergebnis, jedoch mit einigen interessanten Unterschieden. In der als Spenderareal prädestinierten anterioren Unterkieferregion wurde bei den 26-30jährigen noch rotes Knochenmark nachgewiesen. Die über 30jährigen hatten jedoch kein hämatopoetisches Knochenmark im anterioren Unterkiefer mehr vorzuweisen. (Die Ausnahme war ein Proband, der im aufsteigenden Ast und im Kondylus Restareale roten Knochenmarks vorweisen konnte).

Grundsätzlich gilt die Annahme, je mehr osteogene Zellen durch das Transplantat in die Defektregion übertragen werden, umso besser wird die Defektheilung funktionieren.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Kaneda et. al. und Amano et. al. müssen zwangsläufig die Frage nach der Funktion und Bedeutung der Fettzellen im Knochenmarkstroma und deren Relevanz für die intraorale Knochentransplantation aufwerfen. Es ist zu eruieren, ob die Verfettung des Knochenmarks dessen osteogene Potenz relativiert.

Die physiologische Rolle der Fettzelle im Knochenmark ist äußerst vielfältig (Gimble et. al. 1996). Fettzellen füllen Hohlräume im Knochenmark aus, die nicht für die aktive Hämatopoese verwendet werden. Im Bedarfsfall können diese Bereiche unmittelbar für die Erythropoese herangezogen werden (Tavassoli 1984 und 1989).

Fettzellen dienen darüber hinaus als Speicherorte für Bestandteile, die den Stoffwechsel beeinflussen. Sie sind ein Energielieferant für die Hämatopoese und die Lymphopoese. Ihre Energie wird benötigt für die homöostatische Kontrolle der Temperatur im Knochenmark. Mit diesen Eigenschaften steuert die Fettzelle auch indirekt den gesamten Stoffwechsel des Organismus. Fettzellen und Vorläuferstufen der Fettzellen regulieren die Lymphopoese und Hämatopoese. Das Verhältnis von Fibroblasten zu Fettzellen innerhalb des Stroma induziert einen Mechanismus, der die Proliferation der Zellen innerhalb der Blutzelllinien beeinflusst.

Vorläuferzellen der Fettzellen sind Teile des Zellspektrums des Knochenmarks. In Anwesenheit entsprechender Zytokine können sie weiter differenzieren zu Fettzellen, Knochenzellen und Knorpelzellen. Diese Fähigkeit der Vorläuferzellen, hat für die intraorale Knochenentnahme und Transplantation eine fundamentale Bedeutung. Das Heilungspotential des Knochentransplantates und seiner Empfängerregion wurde in der Wissenschaft bisher immer mit der Anzahl der vorhandenen Knochenzellen oder deren Vorläuferzellen im Transplantationsbereich begründet.

Das osteogene Potential der im Knochenmark existenten Fettzellen wurde in der Diskussion über das Heilungsvermögen intraoraler Knochentransplantate nicht berücksichtigt. Benett et. al. haben 1991 nachgewiesen, dass Fettzellen, die aus dem Knochenmark von Kaninchen separiert wurden, osteogenes Potential haben. Diese Untersuchung sollte das Verhältnis der unterschiedlichen Zelllinien der Bindegewebs-, Fett- und Knochenzellen verdeutlichen. Es konnte gezeigt werden, dass jede dieser Zellen in der Lage war, Knochengewebe zu bilden. Die Ergebnisse

deuten auch darauf hin, dass Zellen, die sich bereits weiter zu Fettzellen differenziert haben, in der Lage sind, eine Rückdifferenzierung auf eine proliferative Ebene zu ermöglichen. Von diesem Zellstadium aus können sie anschließend die osteogene Zelllinie beschreiten und Knochengewebe bilden. Der Auslöser dieser Studie war die in den wissenschaftlichen Arbeiten von Owen (1988), sowie Owen und Friedenstein (1988) formulierte Existenz eines stromalen Zellsystems im Knochen und Knochenmark, das sich histologisch vom hämatopoetischen und endothelialen Zellsystem deutlich unterscheidet. Dieses Zellsystem ist nach Owen aufgrund seiner Stammzellen befähigt, Fibroblasten, Fettzellen, Retikulumzellen und osteogene Zelllinien zu entwickeln.

Die Variabilität bestimmter Knochenmarkszellen und besonders der Fettzellen wird vom Organismus unter bestimmten und intensiven Gewebsbelastungen selektiv genutzt. In diesen Situationen wird das gelbe Fettmark kompensatorisch in rotes Knochenmark zurückverwandelt. Dieses Phänomen wird hauptsächlich bei chronischer Anämie, Entzündungen, neoplastischen Erkrankungen und Metastasierungen beobachtet (Vogler et. al. 1988, Ricci et. al. 1990). Für den umgekehrten Vorgang, der anfangs besprochenen Umwandlung von rotem in gelbes Knochenmark, gibt es bis jetzt noch keine schlüssige Erklärung. Es wird vermutet, dass dieser Prozess durch Veränderungen der Temperatur, des Sauerstoffdrucks und der Gefäßversorgung ausgelöst wird (Vogler et. al. 1988). Die Erkenntnis, dass Entzündungen einen Rückdifferenzierungsvorgang der bereits mutierten Fettzellen des Knochenmarks auslösen können, sollte in die Thematik der Knochentransplantation einbezogen werden. Da durch die operativen Manipulationen am transplantierten Knochen, als auch im Empfängerareal, multiple Entzündungsreize gesetzt werden, kommt es zu einer Aktivierung der physiologischen Reparatursmechanismen. Es wäre denkbar, dass innerhalb dieser Abläufe auch eine Differenzierung ortsständiger Fettzellen in osteogene Fettzellen stattfindet, die wiederum die Knochenheilung beeinflussen.

Die Fettzelle ist eine Stromazelle des Knochenmarks. Vermutlich sind Fettzellen letztendlich auch an der Knochenheilung beteiligt. Die Forderung, bei der Knochentransplantation nicht ausschließlich auf die Anzahl der überlebenden Osteozyten zu reflektieren, sondern ebenso auf das Überleben aller Stromazellen, die sich im Empfänger- und Spendeareal befinden, ist durchaus begründet. Studien von Anklesaria et. al. 1987 und Anklesaria et. al. 1989 haben durch

Mausexperimente bewiesen, dass die Transplantation von Stromazellen die Rückkehr der Hämatopoese, nach Knochenmarkentfernung, beschleunigt.

Eine optimale Einheilung der Knochentransplantate im Empfängerbereich ist direkt mit der Osteogenese verknüpft. Die Entwicklung und die Interaktionen der verschiedenen Zelllinien, die letztendlich die Osteogenese bewirken, werden mittlerweile nicht mehr so eindeutig interpretiert. Stammzellen, primitive Osteoprogenitorzellen und mesenchymale Vorläuferzellen regulieren den Ersatz der Osteoblasten beim ständigen Knochenumbau und der Knochenheilung. Die Mechanismen dieser komplexen Zelldifferenzierungen sind offensichtlich noch weitgehend unerforscht. Die bisherigen Erkenntnisse sind von der Wissenschaft in eine künstliche Hierarchie verschiedener Zellentwicklungsstufen übertragen worden, die als Modellüberlegung den Verlauf einer Osteogenese zu erklären versucht. Durch diese Einteilungen ist es eventuell möglich, die unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Zellen und ihrer Entwicklungslinien zu beschreiben, aber sie täuschen auch vor, dass es festgelegte Differenzierungswege gibt. Neuere Forschungen scheinen jedoch zu bestätigen, dass sich die Zellen in Entwicklungsprozessen befinden, die dynamisch sind und nicht einem vorher festgelegten Entwicklungsschema folgen. Mesenchymale Stammzellen sind pluripotente Zellen und besitzen die Fähigkeit, verschiedene Zelllinien zu erzeugen. Es ist bisher nicht bekannt, ob diese Zellen wiederum von anderen Vorläuferzellen gesteuert werden. Die Osteoprogenitorzellen werden unter anderem in die knochenbildende Zelllinie übergeben. Sie sind verantwortlich für die Anzahl der zu bildenden Osteoblasten und proliferieren durch Einwirkung mitogener Wachstumsfaktoren.

Olmsted – Davis et. al. haben 2003 in ihrer Studie nachgewiesen, dass parallel zu den bekannten Zellkaskaden der Osteogenese eine hämatopoetische Ur-Stammzelle existiert, die in der Lage ist, auch als Vorläuferzelle der Osteoblasten zu agieren. Die Autoren bezeichneten diese Zellart als so genannte Nebenpopulation. Es wurde mittels differenzierter Untersuchungsmethoden sichergestellt, dass sich die Fähigkeiten dieser Zellen streng an hämatopoetischen Repopulationsmustern orientieren. Um festzustellen, ob diese Ur-Stammzelle eine Zelle innerhalb der osteoblastischen Reihe sein könnte, wurden bekannte in vitro und in vivo Verfahren angewandt. Einerseits wurde eine Differenzierung von den mesenchymalen Vorläuferzellen zu Osteoblasten im klonogenisierenden Medium nachgewiesen, andererseits wurde eine Fülle von gemarkerten Osteoblasten, nach Transplantation

der Zellen in die bestrahlte Maus, gefunden. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass eine Entwicklungslinie der Osteoprogenitorzellen mit Ur-Stammzellen, die im Knochenmark ansässig sind, beginnen könnte.

Taichmann et. al. haben 1996 in Laborversuchen gezeigt, dass Osteoblasten ihrerseits einen Einfluss auf die Vorläuferzellen der Hämatopoese haben. Grundsätzlich wird darüber diskutiert, dass Osteoblasten neben ihrem eigentlichen Bestimmungsort auch im Knochenmark lokalisiert sein können. Diese Hypothese basiert auf der Annahme, Osteoblasten könnten vermutlich Zytokine produzieren, die einen Einfluss auf hämatopoetische Zellen haben (Taichmann et. al. 1998, Marusic et. al. 1993, Ohsuki et. al. 1993, Ohsuki et. al. 1992). Die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen findet im Knochenmark in unmittelbarer Nähe der Osteoblasten statt. Ergänzend ist zu erwähnen, dass Osteoblasten einen gemeinsamen Vorläufer mit den Knochenmarkstromazellen haben (Cheng et. al. 1994 und Gronthos et. al. 1994). Ungeachtet dieser bemerkenswerten Wechselbeziehung ist überraschend wenig bekannt über die genauen zellulären und molekularen Wirkungen der Osteoblasten auf ihre Umgebung im Knochenmark. In ihrer Studie untersuchten Taichmann et. al. 1998 die Proliferationsfähigkeit und Morphologie von gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen nach in vitro Kultur mit Osteoblasten. Die Ergebnisse zeigten, dass Osteoblasten den Erhalt von unreifen hämatopoetischen Phänotypen unterstützen. Um die Vielfältigkeit zu erweitern und um die Komplexität der Zusammenhänge der Zellfunktionen darzustellen möchte ich eine Studie zitieren, die eine Querverbindung des hämatopoetischen und des mesenchymalen Systems auf einer weit differenzierten Zellebene beschreibt. Untersuchungen von Takahashi et. al. zeigten 1991, dass Osteoblasten möglicherweise die Vermehrung, die Entwicklung und die Aktivität von Vorläuferzellen der Osteoklasten induzieren können. Über die präzisen Zusammenhänge, wie eigentlich Osteoblasten die osteoklastischen Vorläuferzellen regulieren, ist nichts bekannt. Offensichtlich ist jedoch, dass Interaktionen von Osteoblasten mit hämatopoetischen Vorläuferzellen stattfinden, die wiederum die Produktion von Osteoklasten aufbauen können. Marks et al. (1993) verdeutlichten in Versuchen, dass hämatopoetische Vorläuferzellen in Gegenwart von Osteoblasten in einkernige Präosteoklasten differenzieren können, mit der Fähigkeit Knochen zu resorbieren. Durch diese Hinweise wird die Hypothese gestützt, dass die Bildung und Aktivierung von Osteoklasten durch Osteoblasten induziert wird (Owens et al. 1996).

Der klinische Nutzen, mit Osteoprogenitorzellen aus dem Knochenmark die Osteogenese stimulieren zu können, soll im Folgenden anhand von Literaturquellen diskutiert werden.

Die Tatsache, dass Knochenmark Knochen induzieren kann ist seit mehr als hundert Jahren bekannt (Goujon, 1869), aber erst seit einiger Zeit wird die klinische Relevanz dieser Erkenntnisse intensiver betrachtet (Bruder et al. 1997, Burwell et al. 1994, Garg et al. 1993, Healey et al. 1990). Die Vielseitigkeit der Knochenmarkstransplantate konnte glücklicherweise bei zahlreichen hämatopoetischen Erkrankungen nachgewiesen werden (Armitage 1994, Thomas 1994). Beim Studium der Mechanismen der Knochenmarkstransplantate wurde deutlich, dass die Blutproduktion ein die Hämatopoese induzierendes Mikrogefüge verlangt, mit der Fähigkeit, täglich vierhundert Millionen rote und zehn Millionen weiße Zellen zu bilden. Das stromale System, so wie die Knochen trabekel und andere stromale Zellen im Knochenmark wirken unterstützend (Beresford 1989, Friedenstein et al. 1987, Owen 1988). Das mesenchymale und das hämatopoetische System sind wechselseitig abhängig. Osteoblasten setzen unter anderem monozyten- und granulozytenstimulierende Faktoren frei, die eine Beschleunigung der Blutzellproduktion bewirken. Umgekehrt entlassen das monozytäre und das osteoklastische System Faktoren, die zur Stimulierung der Osteogenese beitragen und wichtig sind für die trabekulären und kortikalen Strukturen. Burwell 1994, Urist 1994 und andere haben die Theorie der Knochenmark basierten Osteogenese aufgestellt, die sich auf knocheninduzierende Faktoren und das reaktive Stammzellsystem stützt. Connolly et al. begannen 1985 die Bedeutung der Knochenmarkosteogenese mittels Tierexperimenten bei Pseudarthrosen und Heilungsproblemen nach Frakturen zu untersuchen. Dieses Thema war die Grundlage weiterer Studien (Beck et al. 1997, Conolly 1985, Lippiello et al. 1992). Es ist zweifelhaft, ob ohne diese Tierversuche die gewonnenen Erkenntnisse über die Vorteile der Knochenmarkstransplantation in den klinischen Alltag integriert hätten werden können. In der Orthopädie wurde von Connolly 1995 erstmals eine Knochenmarkinjektion am Menschen beschrieben. Das Ziel war eine Verbesserung der Knochenheilung nach einer Fraktur der Tibia. Die gesammelten Erfahrungen von 1986 bis 1995 über den Nutzen der Knochenmarkstransplantate wurden 1998 von Connolly veröffentlicht. Dieser Bericht dokumentiert die Erkenntnisse aus Behandlungen von mehr als hundert Patienten. Das Resultat zeigte, dass über

achtzig Prozent der Patienten auf die Knochenmarkszuführung mit einer stark verbesserten Knochenheilung reagierten, zwanzig Prozent dagegen nicht. Bei weiteren in vitro Untersuchungen wurde bewiesen, dass die Fähigkeit des Knochenmarks, Osteoprogenitorzellen zu bilden von Individuum zu Individuum sehr stark variiert, besonders beim Vergleich älterer und jüngerer Patienten (Majors et al. 1997, Strates et al. 1988). Die Möglichkeit, osteoblastenähnliche Zellen im Kulturmedium zu bilden, kann beeinflusst werden von der Technik der Knochenmarkpräparation, durch die An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und besonders durch fehlendes Blut. Lippiello et al. (1992) fanden einen steigenden koloniestimulierenden Effekt bei einem Verlust von einem Prozent Blut. Dieses Erkenntnis deckt sich mit der Tatsache, dass ein Blutverlust einen zeitlich begrenzten Anstieg von Erythropoetin auslöst. Erythropoetin ist in der Lage, einen Anstieg der Blutzellproduktion zu induzieren. Forschungsarbeiten von Beck et al. (1997) und Lippiello et al. (1992) zeigten auch, dass der Organismus auf Blutverlust und Knochenmarkentfernung mit einem Anstieg von osteogenen Aminosäureverbindungen reagiert. Es scheint also ein knochenstimulierendes Peptid zu geben, vergleichbar mit dem Erythropoetin, dass die Produktion der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark stimuliert.

Verletzungen und minimale Destruktionen von Knochenbereichen initiieren im Körper physiologische Abläufe, um mittels reparativer Maßnahmen den Ausgangszustand der Gewebe wieder herzustellen. Einhorn et al. (1988) haben die Hypothese untersucht, dass die Verletzung eines Knochens in anderen, weit entfernten Skelettknochen eine osteogene Reaktion hervorruft. Die Wissenschaftler wollten in ihrer Studie die Evidenz und die Reproduzierbarkeit dieser Annahmen überprüfen. Bei vierundachtzig männlichen Sprague-Dawley Ratten wurde in das Knochenmark des Oberschenkels ein Nagel implantiert. Es wurde damit artifiziell eine sogenannte geschlossene Fraktur produziert. Die osteogene Antwort wurde mit histomorphometrischen Analyseverfahren gemessen. Das Einbringen des Nagels in das Oberschenkelknochenmark führte zu einem signifikanten und reproduzierbaren Anstieg der Mineralisation in beiden Tibia-Knochen. Die Intensität war außergewöhnlich stark. Die größte Stimulation lag annähernd dreihundertfünfzig Prozent über der Kontrollgruppe. Die Basiswerte wurden teilweise erst wieder nach drei Wochen erreicht. Eine alleinige Verletzung der Kortikalis ohne eine gleichzeitige Traumatisierung des Knochenmarks führte allerdings nicht zu dieser Reaktion. Auch

eine zusätzliche Verletzung des Oberschenkelknochens neben dem Einbringen des Nagels führte keineswegs zu einer weiteren Steigerung der osteogenen Reaktion. Die unterschiedliche Höhe der Mineralanlagerungen war nicht altersbedingt. Da in den analysierten Unterschenkelknochen keine Resorptionsvorgänge beobachtet werden konnten, wurde die Zunahme der Mineralisationsanlagerungen als osteogene Antwort auf die künstlich provozierte, geschlossene Fraktur interpretiert. Eine andere verblüffende Beobachtung der Untersuchungsergebnisse zeigte, dass die Dauer der osteogenen Antwort von ungefähr neunzehn Tagen mit der Dauer der Frakturheilung bei der Ratte übereinstimmt. Die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse führte zu der Frage, ob bei der Knochenheilung entweder die Veränderung der Stoffwechselintensität einen deutlichen Einfluss hatte oder die Adaptationsfähigkeit des Knochens auf die implantierten Nägel. Die Vorstellung, dass nach Knochenfrakturen autokrine Faktoren freigesetzt werden, die den Heilungseffekt stimulieren, ist nicht neu. Diese besonderen Fähigkeiten werden den knochenstimulierenden Proteinen, den Wachstumsfaktoren und den Prostaglandinen unterstellt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Die histologischen Untersuchungen wurden an Knochenmarkausstrichen von vitalem und formaldehydfixiertem Gewebe, an histologischen Schnitten und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt. Außerdem wurde eine Mikrocomputertomografie der Knochenblöcke angefertigt.

3.1.1. Vitales Knochenmark

Im Rahmen einer oralchirurgischen Operation wurde bei insgesamt sieben Patienten Knochenmarkgewebe entnommen (Details siehe Tabelle 1).

Die Entnahme des zu untersuchenden Gewebes wurde ausschließlich im Zusammenhang mit einer medizinisch indizierten Maßnahme durchgeführt (Knochentransplantat, Implantat) und im Sinne eines Überschussmaterials für die Anfertigung von Ausstrichpräparaten verwendet. Die Indikation für die Knochenentnahme ergab sich immer durch ein insuffizientes Knochenlager im

Bereich später geplanter Implantation. Die Nutzung vitalen Gewebes für die Studie unterlag einer strengen Indikation. Der wissenschaftlichen Weiterverarbeitung kam nur Material zu Gute, welches während der Operation nicht verwertet werden konnte. Die Patienten wurden über die anschließende Nutzung des überschüssigen Gewebes ausführlich informiert und stimmten der weiteren Verwendung ausdrücklich zu. Die Studie wurde in nicht anonymisierter Form durchgeführt.

**Tabelle I: Herkunft des Untersuchungsmaterials für die Vitalstudien
(R.r. = Regio retromolaris, R.m. = Regio mentalis)**

Nr.	Patient	Alter	Geschlecht	Entnahmestelle		Therapie
1	E.S.	41	weibl.	R.r.	R.m.	Knochentransplantat
2	D.G.	54	weibl.	R.r.	R.m.	Knochentransplantat
3	H.S.	34	männl.	R.r.	R.m.	Knochentransplantat
4	H.P.	68	männl.	R.r.	R.m.	Knochentransplantat
5	G.S.	67	männl.	R.r.	R.m.	Knochentransplantat
6	I.L.	61	weibl.	R.r.	R.m.	Knochentransplantat
7	H.H.	48	männl.	-	R.m.	Knochentransplantat

3.1.1.1. Lokalisation der Knochenmarkentnahme

Die verschiedenen Entnahmestellen des Knochenmarkgewebes am Unterkiefer mussten präzise beschrieben werden, da die Topographie der Spenderareale von wesentlicher Bedeutung für die histologische Vergleichsanalyse war. Die Entnahmestellen mussten identisch sein, wobei die retromolare Knochenentnahme nur distal des zweiten Molaren erfolgen durfte. Die Entnahme am Kinn wurde im apikalen Bereich bezahnter Areale durchgeführt.

3.1.1.2. Knochenentnahmetechnik zur Gewinnung eines kortiko-spongösen Knochenblocks aus der Retromolarregion

Nach Leitungsanästhesie des Nervus alveolaris inferior und des Nervus buccalis erfolgte eine trapezförmige Inzision distal und lateral des zweiten Molaren zur Bildung eines Mukoperiostlappens. Die Denudierung des Knochens wurde äußerst schonend durchgeführt, um die Blutversorgung des betroffenen Gewebes nicht zu traumatisieren. Die Präparation nach den Prinzipien der Knochendeckelmethode nach Khoury fand hier Anwendung.

Von Vorteil bei dieser Methode ist die atraumatische Präparation durch die Verwendung von Mikrosägen mit einer Dicke von 0,3 Millimeter und einer Eindringtiefe von 3,5 Millimeter. Der minimale Knochenverlust und die geringe thermische Belastung vermeiden ein ausgedehntes Absterben vitaler Zellen. Die kraniale horizontale Schnitfführung zur Gewinnung eines rechteckigen kortiko-spongiösen Knochenblocks wurde immer in den Bereich der Linea obliqua externa gelegt, die mesiale vertikale Schnitfführung auf der Höhe des zweiten Molaren. Die Größe der rechteckigen Knochenblöcke variierte zwischen 1,5 x 1 und 2 x 1 Zentimeter. An der Innenseite der mobilisierten Blöcke war immer ausreichend spongiöser Knochen vorhanden. Mit einer Lukaskürette konnte meistens noch zusätzlich spongiöser Knochen aus dem Defektbereich gewonnen werden.

3.1.1.3. Knochenentnahmetechnik zur Gewinnung eines kortiko-spongiösen Knochenblocks aus der Mentalregion

Im Mentalbereich entstand ein Mukoperiostlappen nachdem das Vestibulum und der angrenzende Mundboden anästhesiert wurden. Die kraniale Inzision führte unterhalb der Mukogingivallinie von regio 33 bis regio 43 und wurde dort jeweils durch vertikale Entlastungsschnitte ergänzt, die im Vestibulum endeten. Der Lappen wurde bis an den Unterkieferrand präpariert. Die kraniale Begrenzung des Knochenblocks wurde in ausreichendem Abstand zu den Wurzelspitzen der Frontzähne markiert. Mittels eines Trepanbohrers mit einem Durchmesser von 5mm wurden anschließend 2-3 kortiko-spongiöse Knochenzylinder entnommen. Da in der Kinnregion in der Regel eine dickere Kortikalis vorliegt, die von den Mikrosägen aufgrund ihres Durchmessers nicht immer bis in den Spongiosabereich durchtrennt werden kann, musste die Entnahmetechnik im Vergleich zur Retromolarregion gewechselt werden. Unter Verwendung einer Lukaskürette konnten weitere kleine Knochenteile und Spongiosa entnommen werden.

3.1.2. Formaldehydfixiertes Knochenmark

Von insgesamt sieben humanen Unterkieferpräparaten (Details s. Tabelle II), die aus dem Makroskopischen Präparierkurs für Studenten der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität aus dem Jahr 2003/2004 stammten, wurden die Retromolar- und Mentalregion der Unterkiefer von Weichgewebe befreit. Die Humanpräparate waren durch eine Fixierlösung mit 5%

Formalin chemisch konserviert. Das durchschnittliche Lebensalter betrug 77,5 Jahre. Eine Selektion nach Geschlecht wurde nicht durchgeführt.

Tabelle II: Herkunft des Untersuchungsmaterials für die Studie am formaldehydfixierten Knochenmark (R.r. = Regio retromolaris, R.m. = Regio mentalis)

Nr.	Entnahmestelle Knochenmark	
1	R.r.	R.m.
2	R.r.	R.m.
3	R.r.	R.m.
4	R.r.	R.m.
5	R.r.	R.m.
6	R.r.	R.m.
7	R.r.	R.m.

3.1.2.4. Lokalisation der Knochenmarkentnahme

Bei den Unterkiefern der Humanpräparate wurden, analog der Lokalisation der in vivo Knochenmarkentnahme, die gleichen Bereiche für die verschiedenen Gewebeproben ausgewählt. Die Gewebeentnahme aus dem Retromolarbereich und aus der Kinnregion erfolgte konsekutiv.

3.1.2.5. Knochenentnahmetechnik zur Gewinnung eines kortiko-spongiösen Knochenblocks aus der Retromolarregion und aus dem Mentalbereich von Humanpräparaten

Die Trepanation des Knochens zur Gewinnung eines kortiko-spongiösen Knochenspans der vorhandenen Humanpräparate, erfolgte mit einem Trepanfräser und einem Lindemannfräser. Die Bohrungen wurden mit Wasserkühlung (+3°C) und einer maximalen Umdrehung von 1000 U/min durchgeführt. Diese durften eine Mindestdiefe von fünf Millimetern nicht unterschreiten, um sicher zu stellen, dass bei der Trepanation die Spongiosa erreicht werden konnte. Die einzelnen Bohrungen wurden in einem Abstand von einem Millimeter angelegt. Anschließend wurden die Knochenbrücken zersägt, so dass man mit einem kleinen Raspatorium einige kortiko-spongiöse Knochenblöcke mit einer Kantenlänge von durchschnittlich 5 x 5 Millimeter mobilisieren konnte.

Durch Entfernung des Knochendeckels entstand ein guter Zugang zum Knochenmark.

Mit einer Lukaskürette konnte das jeweilige Knochenmark problemlos entnommen und für die weitere histologische Aufbereitung zu Ausstrichpräparaten, in Eppendorf-Kapseln eingefüllt werden.

Die kortiko-spongiösen Knochenblöcke wurden für die Herstellung der Schnittpräparate und der Rasterelektronenmikroskopaufnahmen (REM-Aufnahmen) verwendet, außerdem für weitere Untersuchungen im Mikrocomputertomographen.



Abbildung 1: Entnahme eines kortiko-spongiösen Knochenblocks aus der Retromolarregion am Humanpräparat

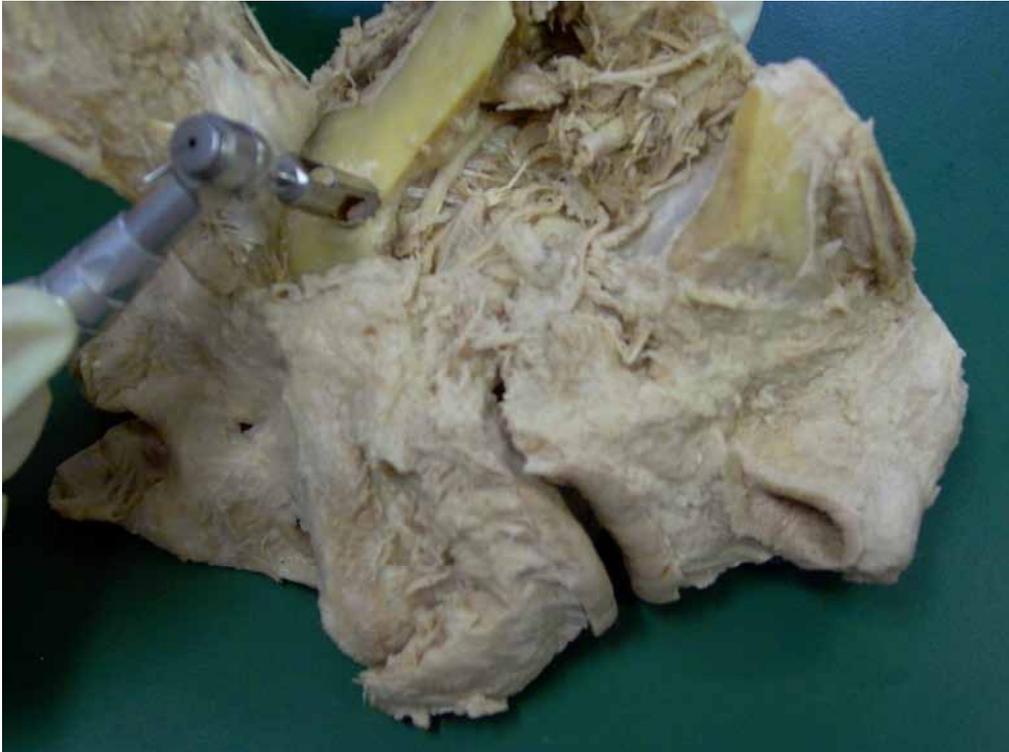


Abbildung 2: Freigelegte Retromolarregion und Entnahme eines kortiko-spongiösen Knochenblocks am Humanpräparat

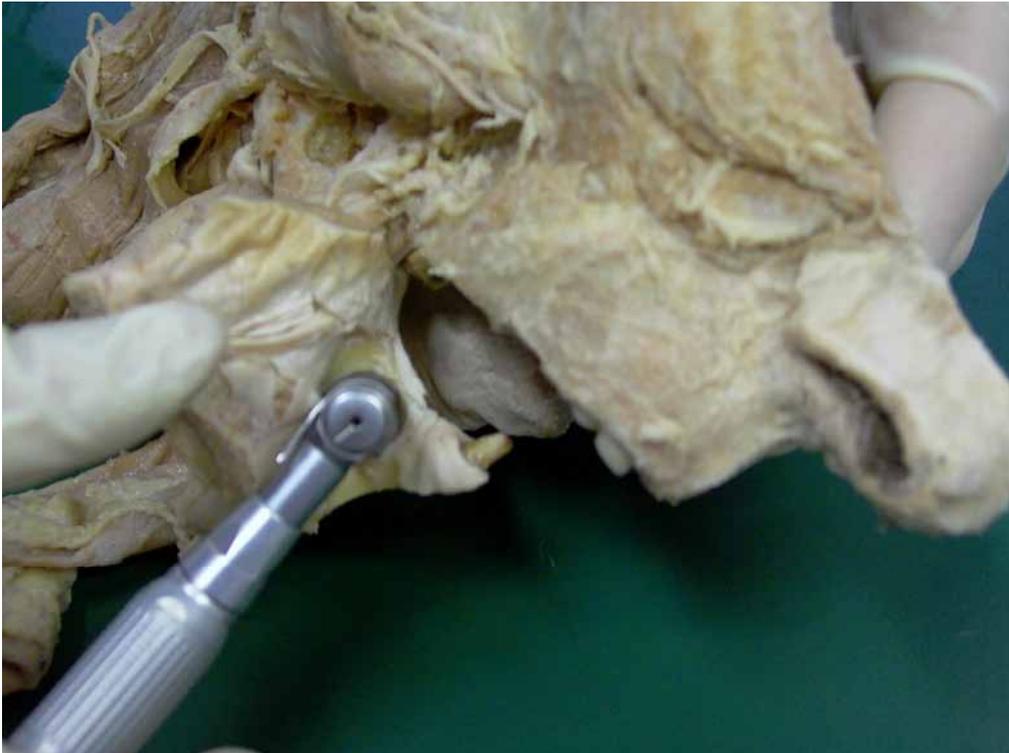


Abbildung 3: Entnahme eines kortiko-spongiösen Knochenblocks aus der Mentalregion am Humanpräparat



Abbildung 4: Aufsicht auf die Mentalregion nach Entnahme eines kortiko-spongiösen Knochenblocks am Humanpräparat

3.2. Methode

3.2.3. Anfertigung der Ausstrichpräparate von vitalem Gewebe

Die Größe und Form der kortiko-spongiösen Knochenblöcke mussten immer, entsprechend dem Anforderungsprofil der Empfängerregion angepasst werden. Durch die Trimmung des Knochentransplantates entstanden viele kleine Knochenchips, die gemeinsam mit den, direkt aus der Tiefe des Spenderareals, geernteten Spongiosachips immer keine komplett verwertbare Knochenmenge ergab. Die durchschnittliche Größe der Knochenstückchen betrug 1,5 x 1,5 mm. Die Übergänge zum ortsständigen Knochen wurden mit Spongiosachips aufgefüllt, nachdem der angepasste Knochenblock in der Empfängerregion fixiert war. Der Defektbereich wurde insgesamt leicht überdimensioniert ergänzt, um dem postoperativen Volumenverlust durch Resorption entgegenzuwirken. Die restlichen Spongiosateilchen, die nicht benötigt wurden, konnten für die Anfertigung der

Ausstrichpräparate verwendet werden. Die in etwas Defektblut getränkten und verteilten Knochenmarkstückchen wurden mit einigen Tropfen 3,8 prozentiger gepufferter Natriumcitratlösung versetzt. Dieses Gemisch wurde auf einem Objektträger platziert und mit einem Ausstrichgläschen ausgebreitet. Danach erfolgte die Lufttrocknung des Ausstrichpräparates.

3.2.4. Färbung der Vitalpräparate

In der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Georg- August- Universität Göttingen erfolgte die Färbung der Ausstrichpräparate. Die erste Beschichtung der Ausstriche wurde mit May- Grünwald- Lösung (Eosin-Methylenblau) durchgeführt. Ein Phosphatpuffer wurde hinzugegeben. Diese Mischung wurde nach 3 Minuten abgegossen. Zur Gegenfärbung der Präparate folgte eine erneute Überschichtung mit einer verdünnten Giemsa-Lösung (Azur-Eosin).

3.2.5. Anfertigung der Ausstrichpräparate und Färbung des formaldehydfixierten Knochens

Zur Färbung des Knochenmarks wurde die Stammlösung Brilliantkresylblau der Firma Merck KGaA (Darmstadt) verwendet. Diese wurde im Verhältnis 1:80 mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Die Menge des verfügbaren Knochenmarks war individuell sehr unterschiedlich, so dass die Füllmengen der Eppendorf-Kapseln zwischen 10 und 30 Prozent variierten. Nach circa 30 Minuten und guter Durchmischung konnten die Ausstriche hergestellt werden.

Es wurde ein stecknadelgroßer Tropfen des angefärbten Knochenmarks an den Rand eines entfetteten Objektträgers gebracht. Ein zweiter Objektträger wurde in einem Winkel von etwa 30° aufgesetzt und ohne Druckausübung locker und flach über den ersten Objektträger geführt. Anschließend wurden die Ausstriche sorgfältig an der Luft getrocknet. Parallel dazu konnten auch einige Quetschpräparate hergestellt werden. Einige Markbröckel wurden auf einem Objektträger platziert und mit einem zweiten bedeckt. Beide Gläser wurden unter leichtem Druck gegeneinander verschoben und dann getrennt.

3.2.6. Herstellung von histologischen Schnittpräparaten des formaldehydfixierten Knochens

Die formaldehydfixierten kortiko-spongiösen Knochenblöcke wurden im histologischen Labor der Anatomischen Anstalt der LMU München in

Methylmethacrylat eingebettet. Zuvor mussten die Blöcke zwei Stunden lang fließend gewässert werden, um danach, circa 14 Tage lang, schrittweise in aufsteigender Alkoholreihe entwässert zu werden (50%/70%/80%/90%/100% Ethanol).

Danach erfolgte wiederholt eine Entfettung mit Aceton für circa 8 Tage und nochmals mit einem Aceton-Methanol-Gemisch für circa 2-3 Tage. Abschließend wurden die Präparate 3 Tage lang in Methanol gelegt. Dann erst wurden sie in Methylmethacrylat pur unter Vakuum eingebettet. Auch dieser Vorgang musste 3-4 mal, alle 2-3 Tage, wiederholt werden, bis ein Methylmethacrylat-Gemisch bei 25°C im Brutschrank zur Aushärtung gelangte.

Das Methylmethacrylat-Gemisch bestand aus:

- 900 ml Methylmethacrylat (Merck 800590)
- 90 ml Phtalsäuredibutylester (Merck 800919)
- 15 g Alpha-Alpha-Azo-Iso-Butyronitril (Merck 12431)

Aus den gehärteten Methylmethacrylat-Blöcken wurden mit dem Mikrotom circa 8µm dünne Schnitte der Präparate hergestellt. Diese wurden mit Alkohol gesäubert, auf Objektträger gezogen und angetrocknet. Die Färbung erfolgte mit May-Grünwald-Lösung. Zur Gegenfärbung brachte man Giemsa-Lösung auf, um eine panoptische Färbung nach Pappenheim zu erhalten.

3.2.7. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des formaldehydfixierten Knochens

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der formaldehydfixierten Knochenblöcke wurden ebenfalls in der Anatomischen Anstalt der LMU München hergestellt.

Das in 4-prozentigem Formalin fixierte Gewebe wurde zuerst kurz in Aqua dest. gespült, um danach mit einer aufsteigenden Acetonreihe, angefangen mit 25% über 50%, 75%, 85%, 95% bis 100%, bei 30°C, entwässert zu werden.

Aceton besitzt in diesem Fall gegenüber Alkohol einen Vorteil: Es verbindet sich beim „Critical point drying“ (CPD) besser mit flüssigem CO₂ als Alkohol, außerdem treten während der Trocknung mit Aceton generell weniger Oberflächenspannungen auf.

Der Vorgang des CPD ist deshalb so wichtig, weil die Proben später im Rasterelektronenmikroskop (REM) absolut trocken sein müssen, da der auftreffende Elektronenstrahl nicht abgelenkt bzw. gestreut werden darf. Außerdem würde die in den Proben enthaltene Flüssigkeit im Vakuum des REM explosionsartig verdampfen und somit die Strukturen des Präparates zerstören.

Während dieser speziellen Trocknung wird der kritische Punkt von CO₂ sozusagen „umfahren“, um Beeinträchtigungen der Probenstrukturen, durch auftretende Oberflächenspannungen bei der Trocknung, wie dies bei der Lufttrocknung passiert, zu vermeiden, indem man keine Phasengrenze (hier flüssig zu gasförmig) überschreitet.

Der Critical-Point-Wert (CP) ist der Punkt, an dem bei einer bestimmten Temperatur und einem bestimmten Druck einer reinen Substanz, der Unterschied zwischen zwei gleichzeitig vorliegenden Phasen verschwindet. Beide liegen gleichwertig nebeneinander vor.

Diese kritische Temperatur ist der höchste Wert, bei der das betreffende Gas, durch einen bestimmten Druck, noch verflüssigt werden kann, bzw. ist die höchste Temperatur bei der eine flüssige Phase noch möglich ist. Jede höhere Temperatur lässt nur noch den gasförmigen Zustand zu.

Eine Probe kann also getrocknet werden, indem man die Temperatur über ihren kritischen Wert erhöht und den Druck dann langsam vermindert. Es wird dabei die Phasengrenze Gas-Flüssigkeit nicht durchlaufen und es entstehen keine Struktur deformierenden Oberflächenspannungen.

Die in Aceton liegenden Präparate gelangten also zur CP-Trocknung in ein entsprechendes Gerät, den CPD030 (Baltec).

Vor dem Trockenvorgang musste das Aceton vollständig gegen flüssiges CO₂ ausgetauscht werden. Die Druckkammer wurde mit flüssigem CO₂ gefüllt. Das Aceton-CO₂-Gemisch wurde langsam soweit wieder abgelassen, dass es die Probe gerade noch bedeckte. Dann wurde erneut mit CO₂ aufgefüllt und abgelassen, bis nach mehrmaliger Wiederholung, das Aceton vollständig gegen CO₂ ausgetauscht war. Die Kammer wurde nochmals zu $\frac{3}{4}$ mit CO₂ aufgefüllt und langsam über die kritische Temperatur von 31,3°C erwärmt.

Durch die Erwärmung steigt der Druck an. Der kritische Punkt für CO₂ liegt bei 31,3°C und 73,83 bar. Oberhalb von 31,3°C geht CO₂ ohne Phasengrenzenüberschreitung in Gasform über. Der Druck wurde danach langsam

wieder abgelassen. Die Probe war trocken. Um die Proben an ihrer Oberfläche leitfähig zu machen, wurden sie im Vakuum mit Gold „besputtert“, auch kalte Kathodenentladung genannt und so mit einer gleichmäßig dünnen Metallschicht belegt.

Mit Hilfe spezieller Objektträger aus Aluminium, mit einem Durchmesser von 10mm, auf denen die Proben mit einer doppelseitigen, leitfähigen Klebefolie befestigt waren, konnten sie in den Strahlengang des REM (JSM-35CF Jeol) geschoben werden.

Die entstandenen Bilder wurden fotografiert und die Negative in den PC gescannt.

3.2.8. Mikrocomputertomographie des formaldehydfixierten Knochens

In einem Mikro-CT der Firma Scanco Medical (Schweiz), Modell μ CT 20, wurden die fixierten, kortiko-spongiösen Knochenblöcke, mit einer durchschnittlichen Grösse von 5 x 5 x 5 mm, zusätzlich untersucht.

Mit diesem Gerät war es möglich die Proben sehr genau, bezüglich der Qualität und Quantität des trabekulären Knochens und der Hohlräume zu analysieren und mittels dreidimensionaler Bilder darzustellen. Die Auflösung betrug 15 μ m.

Die Proben mussten hierbei nicht speziell aufbereitet werden, sondern konnten sofort in ein Röhrchen entsprechender Grösse gegeben werden und im Gerät gescannt werden. Am Bildschirm des angeschlossenen PCs war es möglich die verschiedenen Schnittvarianten auszuwählen. (spiralförmiges Scannen, Multislice-Methode)

3.3. Ausstrichuntersuchungen mit mikroskopischer Differenzierungstechnik und fotografischer Darstellung der Vitalpräparate

Die getrockneten Ausstriche wurden nach dem Auffinden des geeigneten Bereichs mit einem Ölimmersionsobjektiv mäanderförmig durchgemustert. Die Differenzierung erfolgte, ausgehend von der kleinsten bis zur größten Vergrößerung, so dass die verschiedensten Zellen bzw. Zellnester, soweit die Auflösung es erlaubte, fotografiert und ihrer Herkunft nach zugeordnet werden konnten. Qualitative Veränderungen und das Auftreten atypischer Zellen wurden bei der Auswertung der Präparate berücksichtigt.

Die Fotografien zur Dokumentation der relevanten Untersuchungsergebnisse wurden mit einer über dem Mikroskop montierten Digitalspiegelreflexkamera erstellt. Die Fotos wurden daraufhin am PC mit verschiedenen Bildbearbeitungsprogrammen bearbeitet und beschriftet (AxioVision, Adobe Photoshop 2.0, MS Powerpoint 2003).

3.4. Untersuchung der Schnittpräparate unter dem Lichtmikroskop mit fotografischer Darstellung

Die gefärbten Schnitte wurden anfangs mit der kleinsten Vergrößerung eines Ölimmersionsobjektivs in der Übersicht betrachtet. Schon hier ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen Retromolar- und Mentalregion feststellen. In den weiteren Vergrößerungen bestätigte sich der erste Eindruck.

Die verschiedenen auffälligen Bereiche wurden auch hier mäanderförmig durchgemustert, um die einzelnen Zelltypen in den unterschiedlichen Vergrößerungen differenzieren und zuordnen zu können.

Die Fotografien entstanden ebenfalls mit der Digitalspiegelreflexkamera Fuji S3 Pro, die über dem Mikroskop installiert war. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte, genau wie die der Ausstrichpräparate, am PC.

3.5. Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen

Die Negative der REM-Aufnahmen wurden, um ausgewertet werden zu können, in den PC eingescannt und konnten mit einem Bearbeitungsprogramm einer digitalen Kamera (Arcsoft Photoimpression) ins Positiv gesetzt werden, außerdem wurden die Bildqualität, die Grauwerte und die Auflösung optimiert.

3.6. Auswertung der Mikrocomputertomographieaufnahmen

Die Auswertung der verschiedenen Schnitte erfolgte über die gemessenen Parameter, mit denen sich das Verhältnis von trabekulären Strukturen, Hohlräumen und kompakten Strukturen genau bemessen ließ. Besonders interessant waren das Verhältnis von TV (Totales Volumen) zu OV (Objekt Volumen), außerdem die Werte der Connectivity density (Menge der trabekulären Verbindungen), der trabekulären Separation (Knochenmarksraum) und der trabekulären Dicke und Dichte. Die Schichtdicke betrug 0,0340 mm bei allen Aufnahmen. Anhand der morphometrischen Werte konnten die Schnitte verglichen werden.

4. Ergebnisse

4.7. Histologische Untersuchung der Ausstriche der Vital- und Humanpräparate

Die Durchmusterung der Ausstrichpräparate nach osteogenen Zellen oder auch Zellcluster erlaubt eine Bewertung des untersuchten Knochenmarks. Der Nachweis osteoanaboler Zellstrukturen ermöglicht eine Interpretation der osteogenen Potenz des Gewebes. Bei unseren Untersuchungen wurden bei den Vitalpräparaten, als auch bei den Humanpräparaten, ähnliche Tendenzen gefunden. Die Retromolarregionen beider Versuchsgruppen wiesen in den meisten Fällen osteogene Zellen oder Zellcluster auf. Die Mentalregionen beider Versuchsgruppen präsentierten in keinem der untersuchten Fälle osteogene Zellen. Hier dominierten Fettzellen das Bild. Eine Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse ist in den Tabellen III und IV dargestellt.

Tabelle III: Vitalstudie Anzahl der osteogenen Zellen oder Zellcluster nach Durchmusterung der Ausstrichpräparate

Patient	Alter	Geschlecht	Entnahmestelle: Regio retromolaris Anzahl der osteogenen Zellen/Zellcluster	Entnahmestelle: Regio mentalis Anzahl der osteogenen Zellen/Zellcluster
1	41	weibl.	2	0
2	54	weibl.	1	0
3	34	männl.	2	0
4	68	männl.	2	0
5	67	männl.	2	0
6	61	weibl.	2	1
7	48	männl.	nicht auswertbar	0

Tabelle IV: Humanpräparate Anzahl der osteogenen Zellen oder Zellcluster nach Durchmusterung der Ausstrichpräparate

Humanpräparat	Entnahmestelle: Regio retromolaris Anzahl der osteogenen Zellen/Zellcluster	Entnahmestelle: Regio mentalis Anzahl der osteogenen Zellen/Zellcluster
1	nicht auswertbar	nicht auswertbar
2	1	0
3	1	0
4	0	0
5	2	0
6	1	0
7	1	0

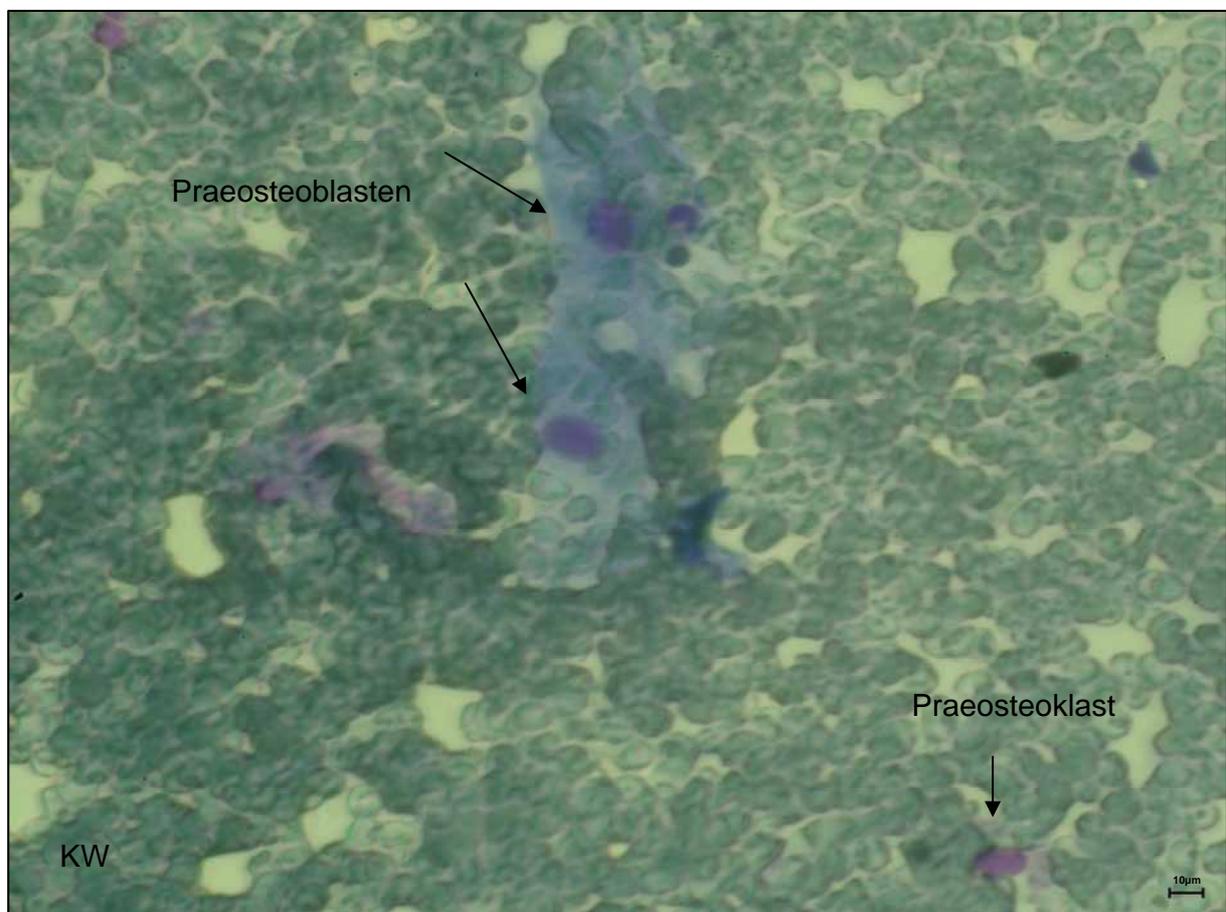


Abbildung 5: Vitalpräparat Patient 1. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 10µm. Vergrößerung= x 40.

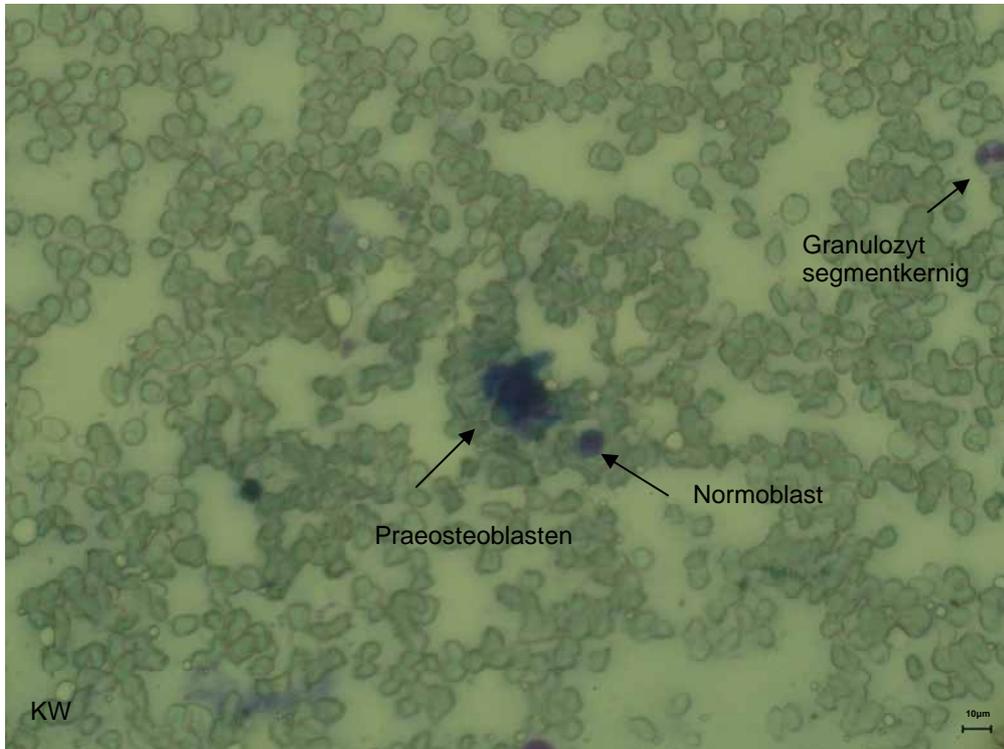


Abbildung 6: Vitalpräparat Patient 1. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 10µm. Vergrößerung= x 40.

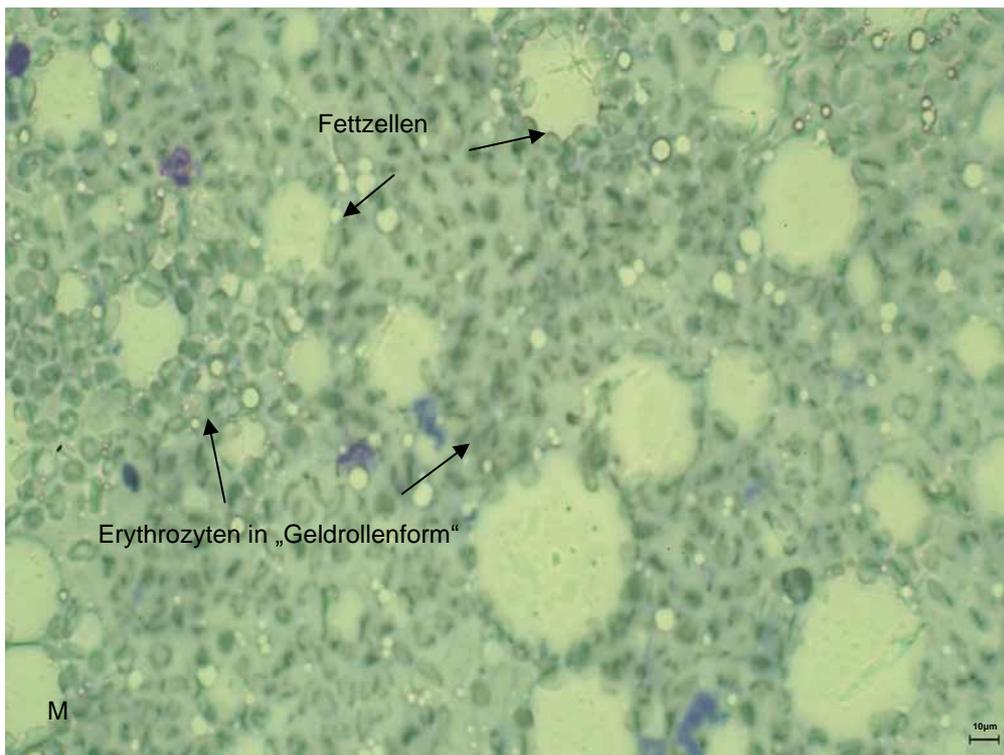


Abbildung 7: Vitalpräparat Patient 1. Knochenmark aus der Mentalregion. Maßstab 10µm. Vergrößerung = x 40.

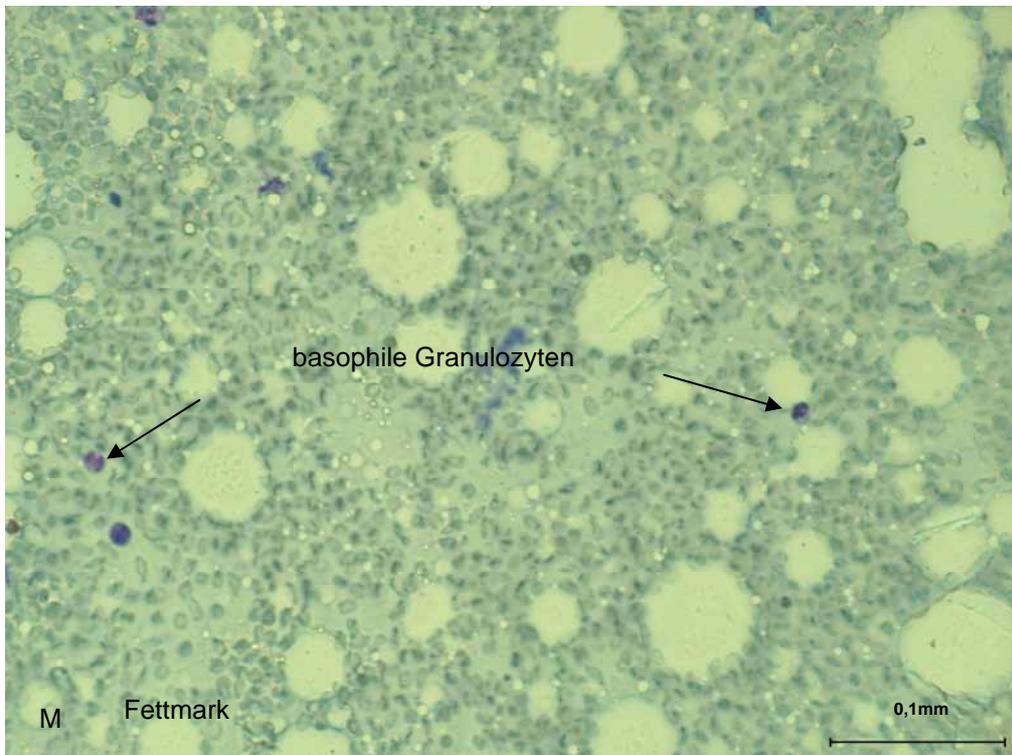


Abbildung 8: Vitalpräparat Patient 1. Knochenmark aus der Mentalregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 25.



Abbildung 9: Vitalpräparat Patient 3. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 10 µm. Vergrößerung = x 100.

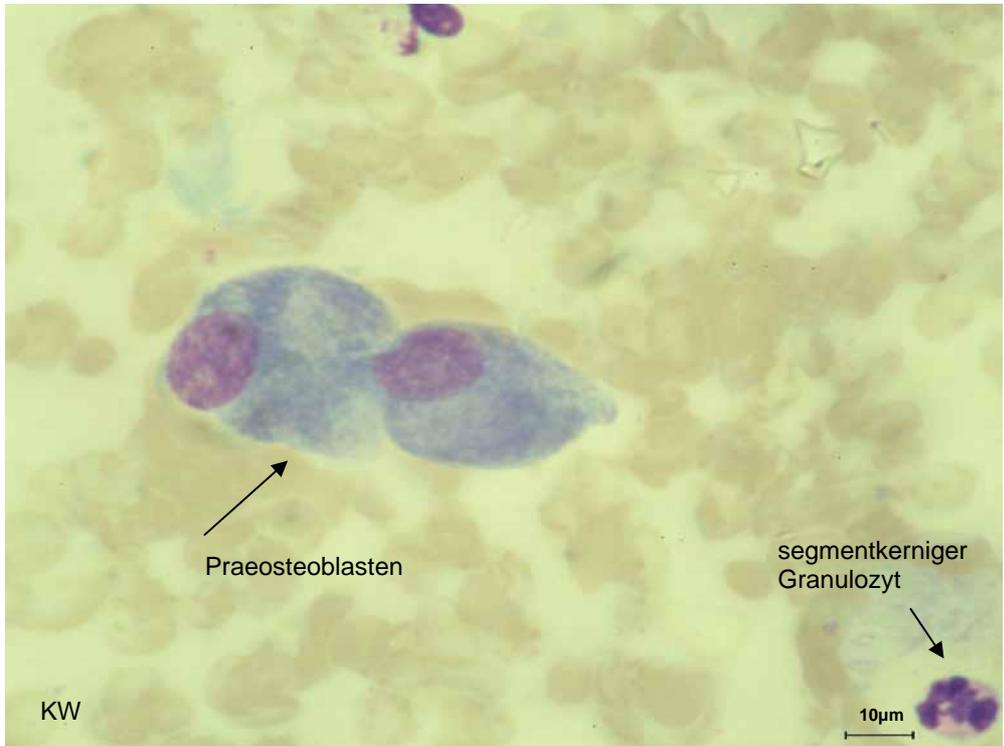


Abbildung 10: Vitalpräparat Patient 3. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 10 µm. Vergrößerung = x 100.

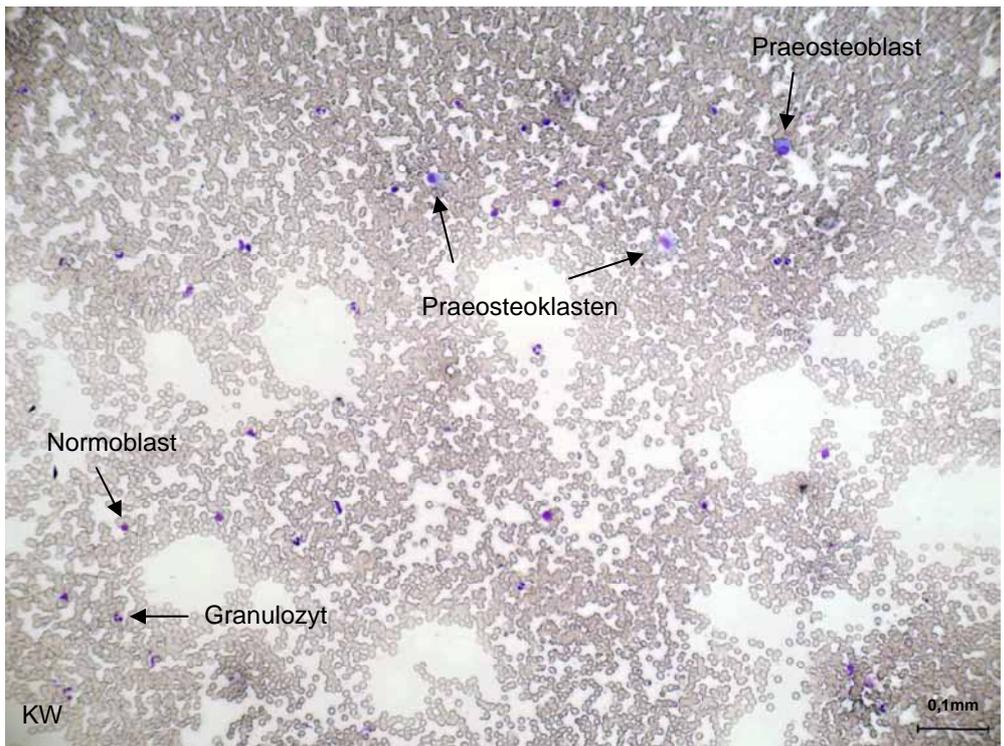


Abbildung 11: Vitalpräparat Patient 3. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 10.

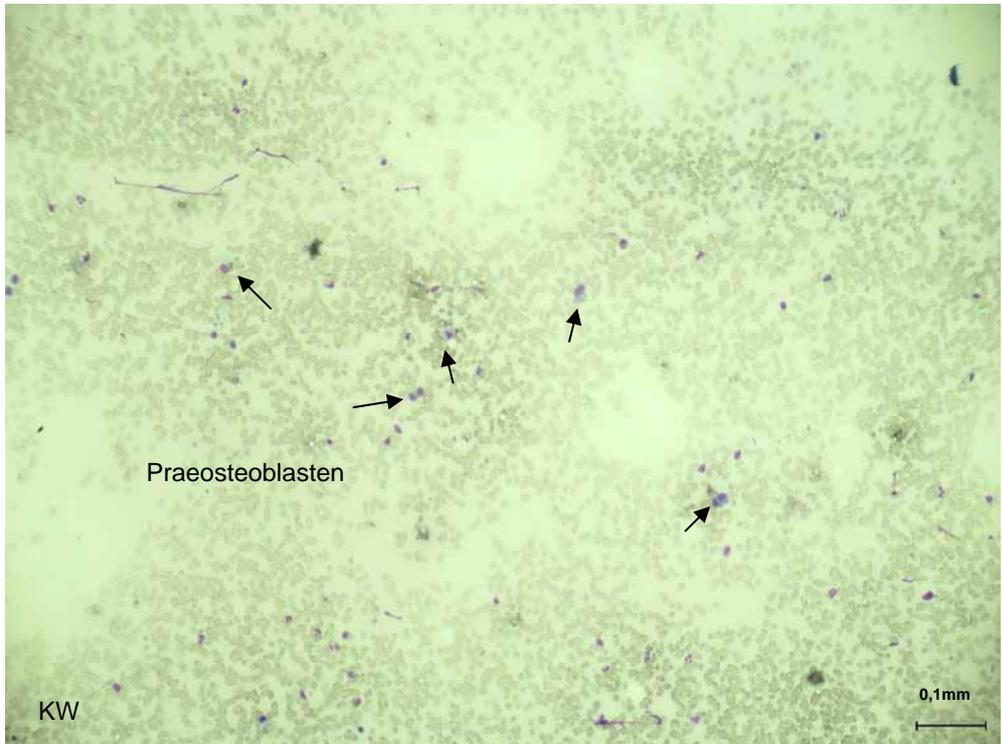


Abbildung 12: Vitalpräparat Patient 3. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 10.

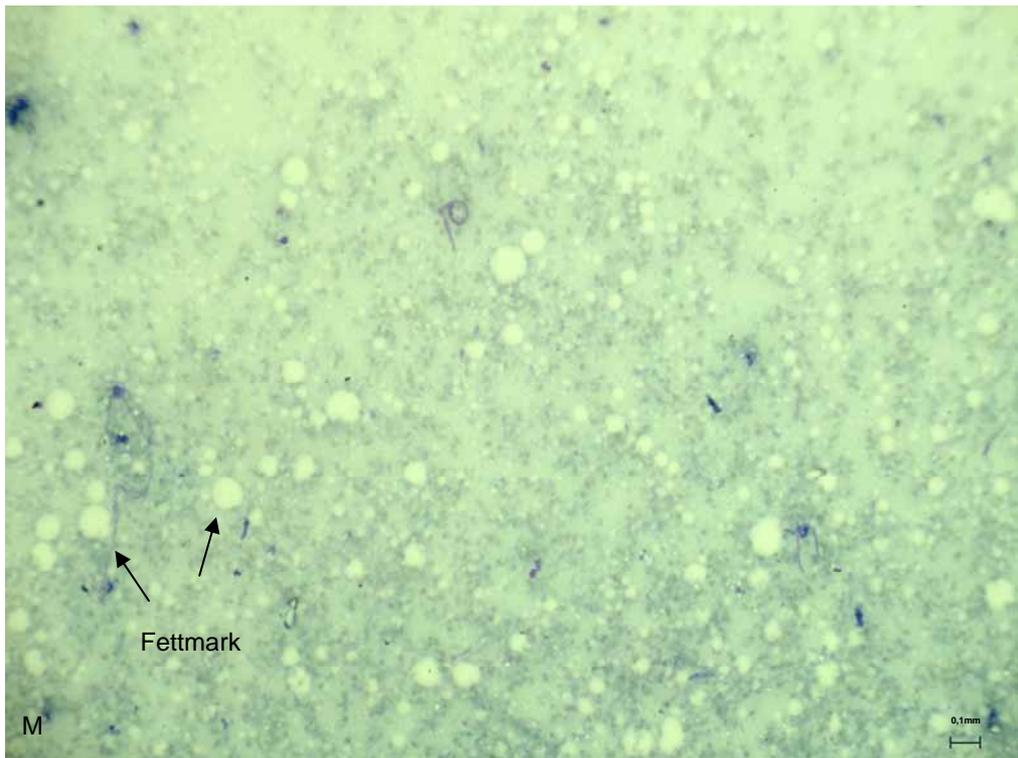


Abbildung 13: Vitalpräparat Patient 3. Knochenmark aus der Mentalregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 4.

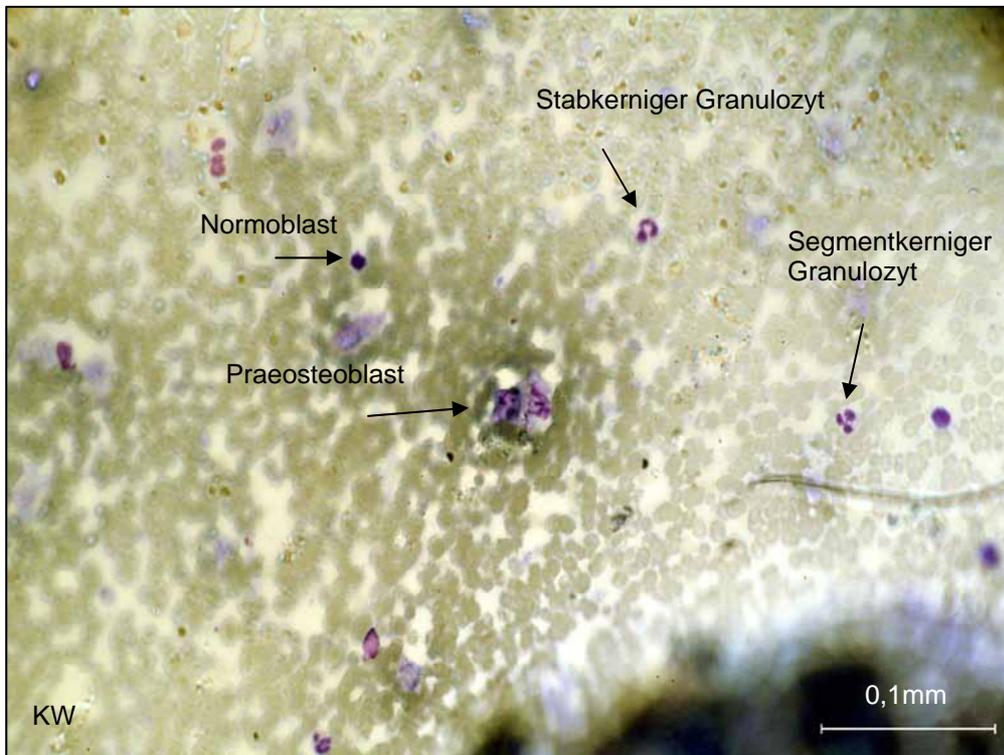


Abbildung 14: Vitalpräparat Patient 4. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 25.

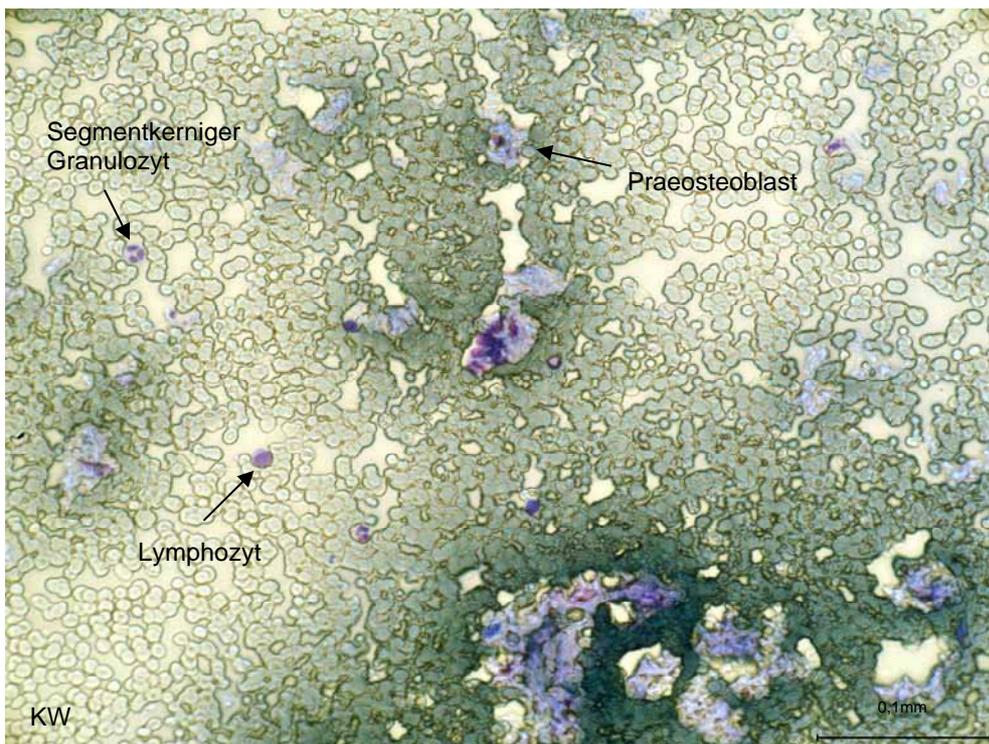


Abbildung 15: Vitalpräparat Patient 4. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 25.

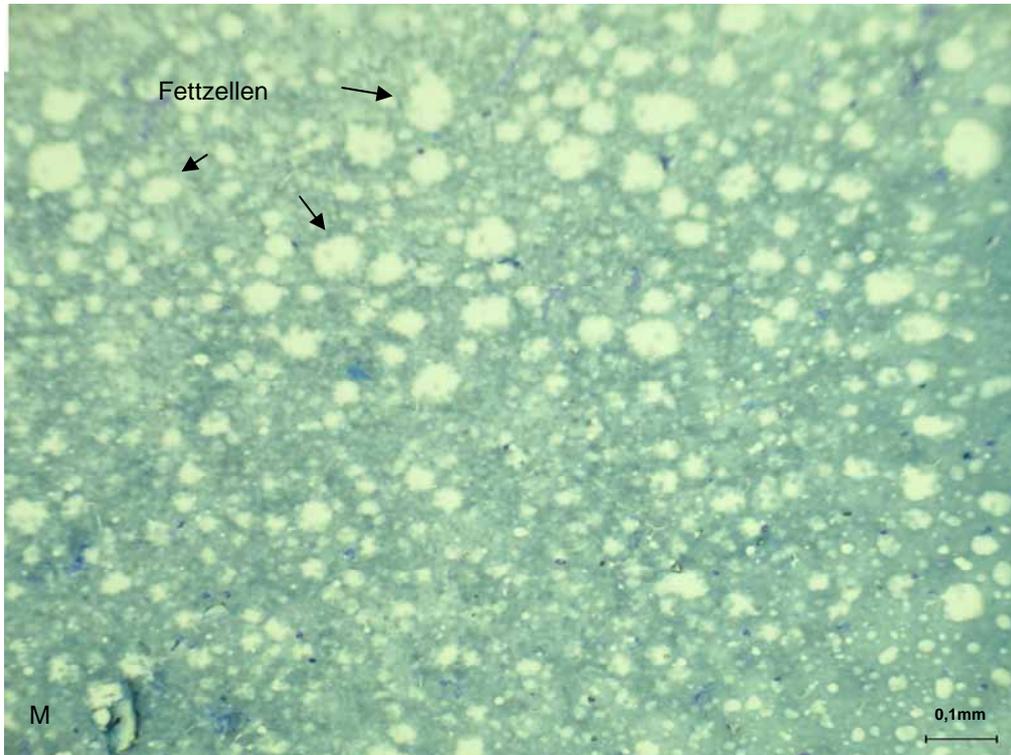


Abbildung 16: Vitalpräparat Patient 4. Knochenmark aus der Mentalregion. Maßstab 0,1mm. Vergrößerung = x 10.

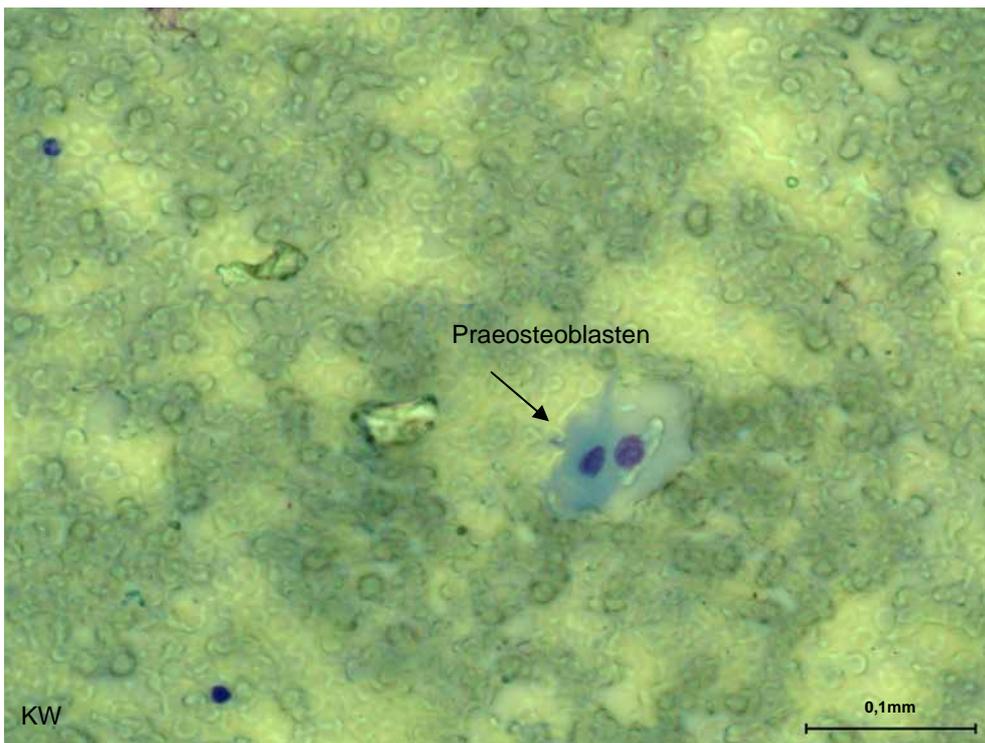


Abbildung 17: Vitalpräparat Patient 5. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 25.

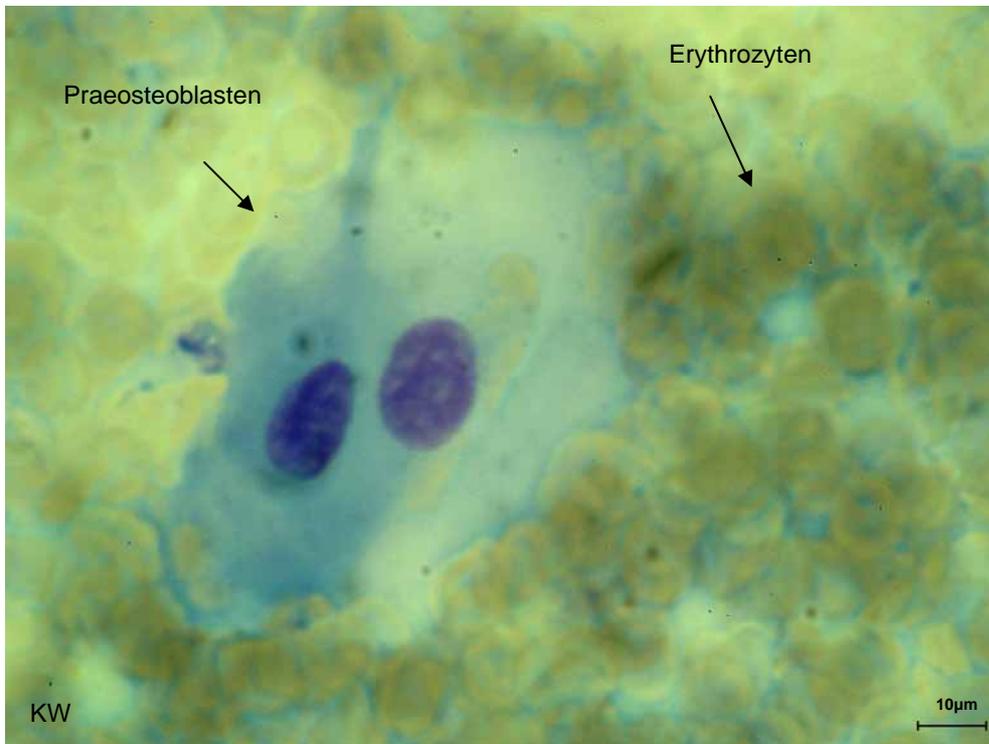


Abbildung 18: Vitalpräparat Patient 5. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 10 µm. Vergrößerung = x 100.

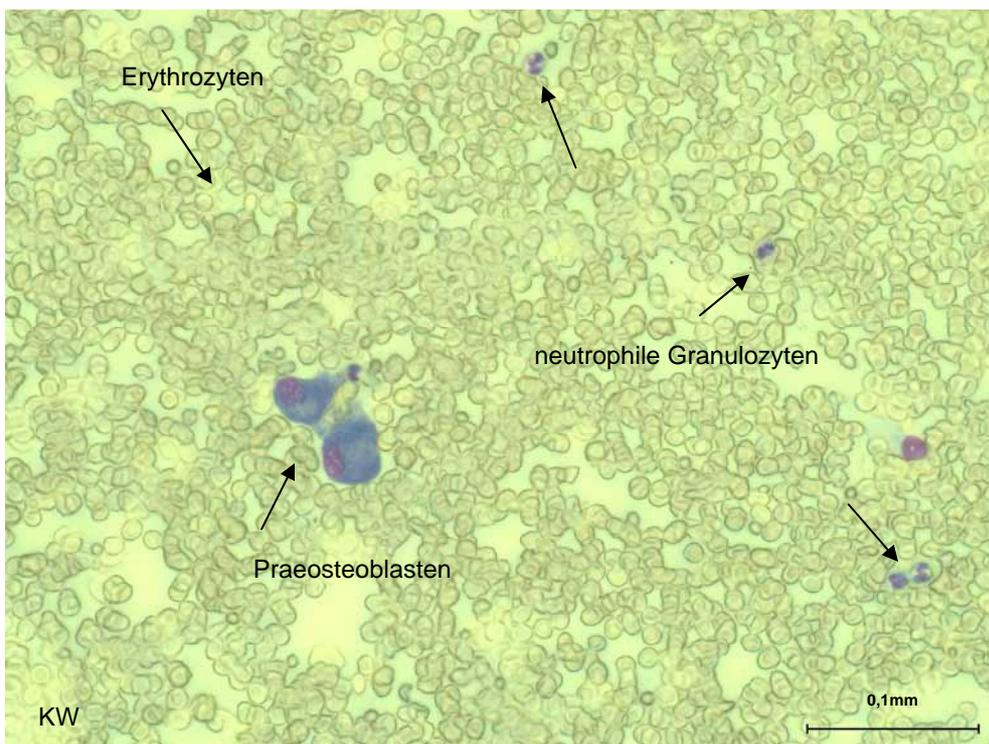


Abbildung 19: Vitalpräparat Patient 5. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 25.

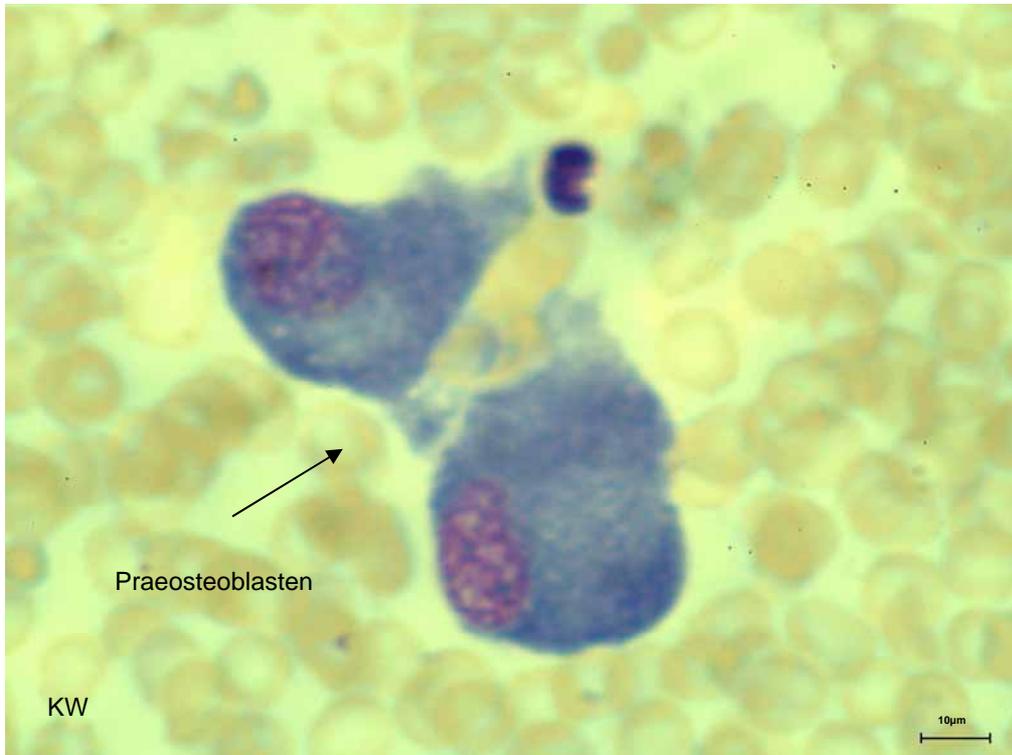


Abbildung 20: Vitalpräparat Patient 5. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 10 µm. Vergrößerung = x 100.

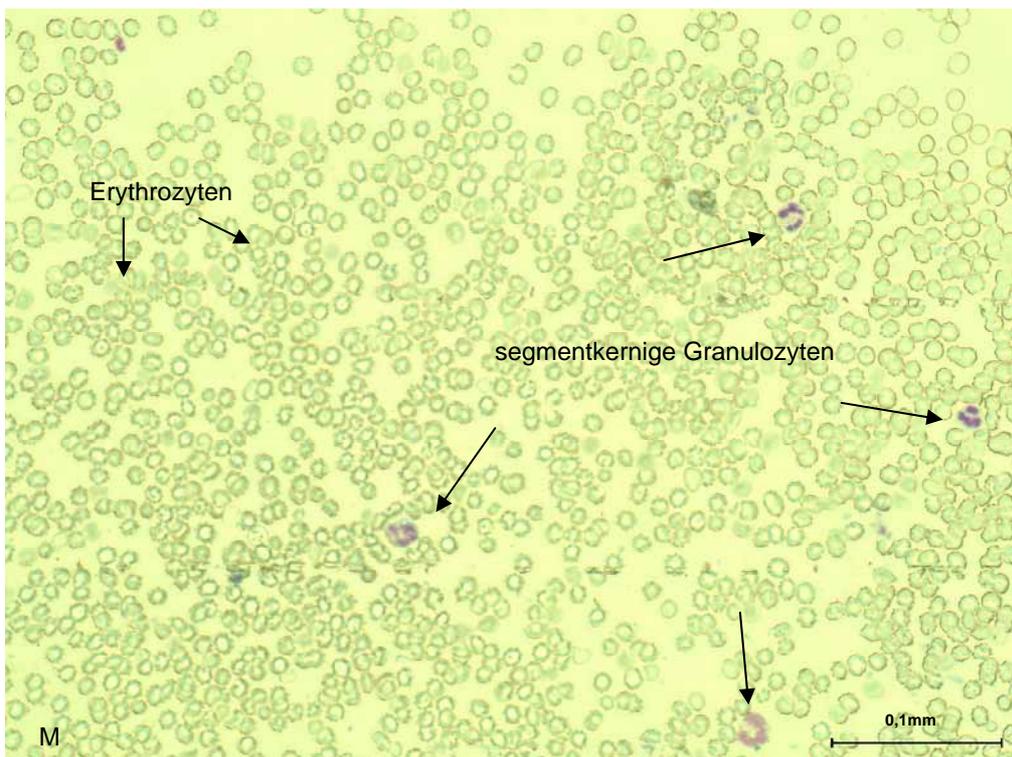


Abbildung 21: Vitalpräparat Patient 5. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 25.

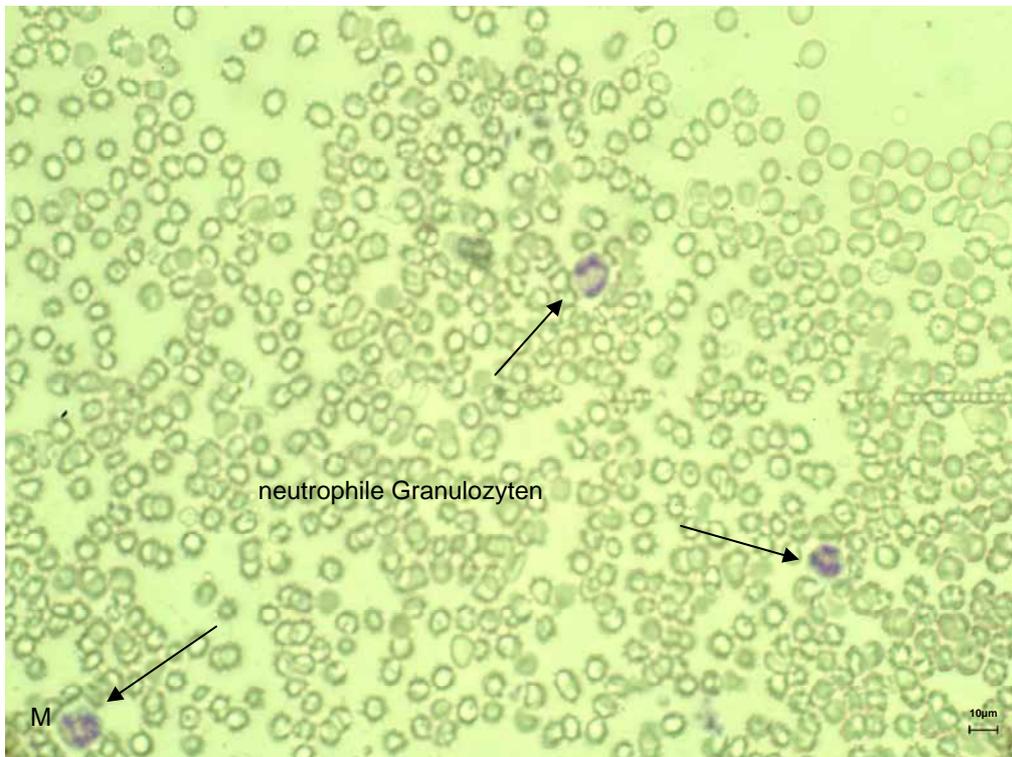


Abbildung 22: Vitalpräparat Patient 5. Knochenmark aus der Mentalregion. Maßstab 10 µm. Vergrößerung = x 40.

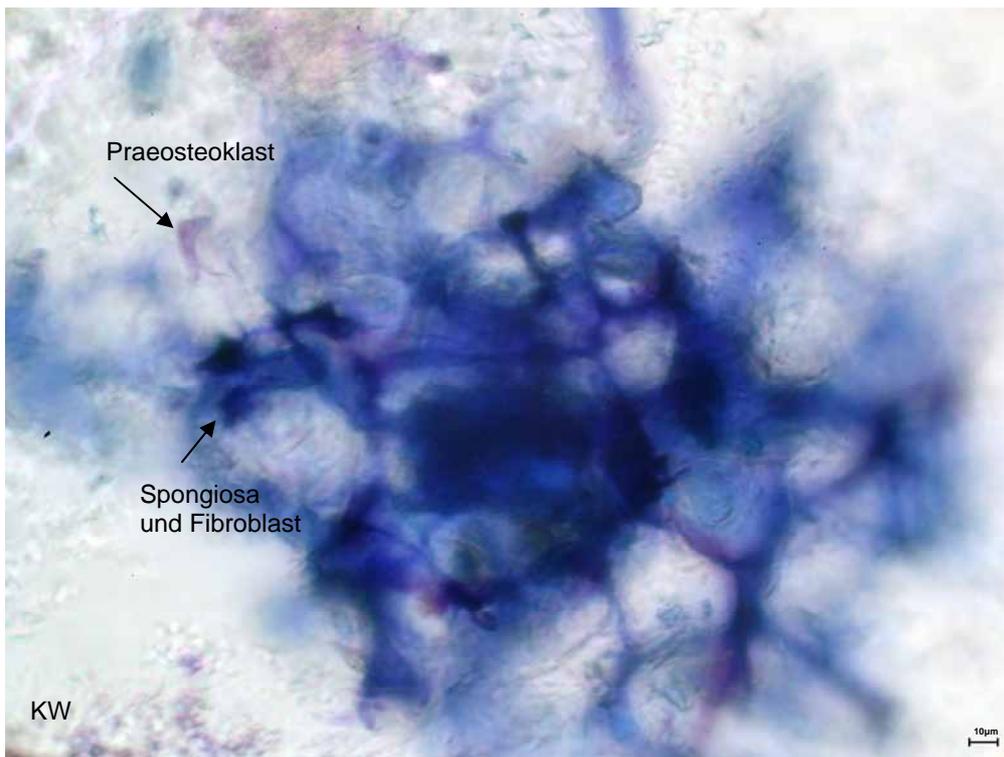


Abbildung 23: Humanpräparat 6. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 10 µm. Vergrößerung = x 40.

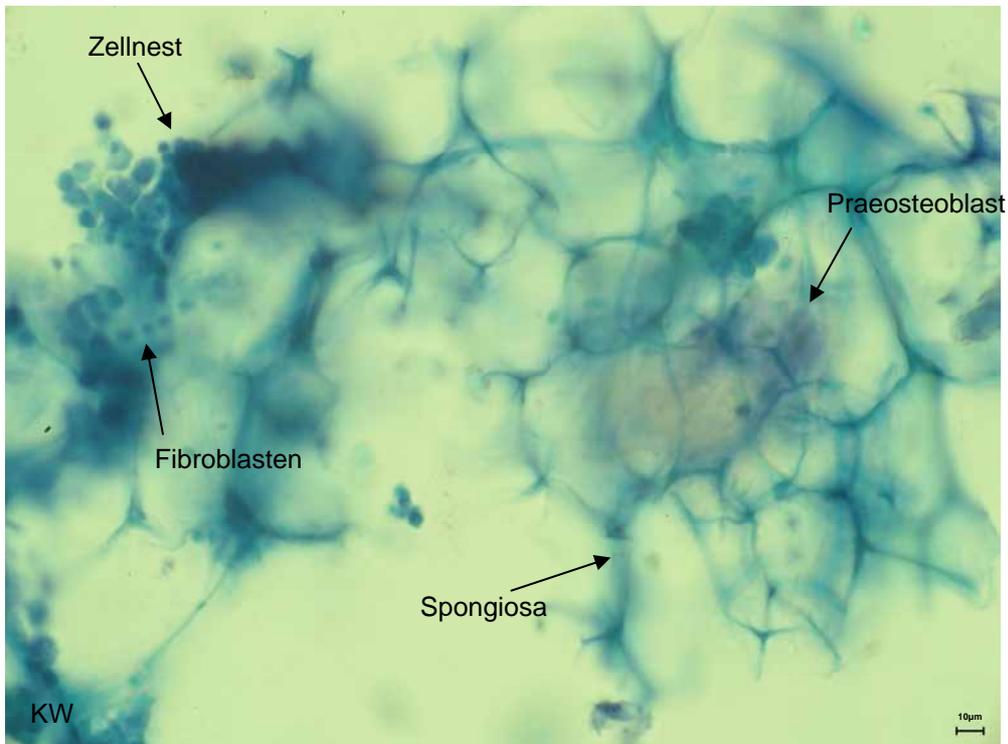


Abbildung 24: Humanpräparat 5. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 10 µm. Vergrößerung = x 40.

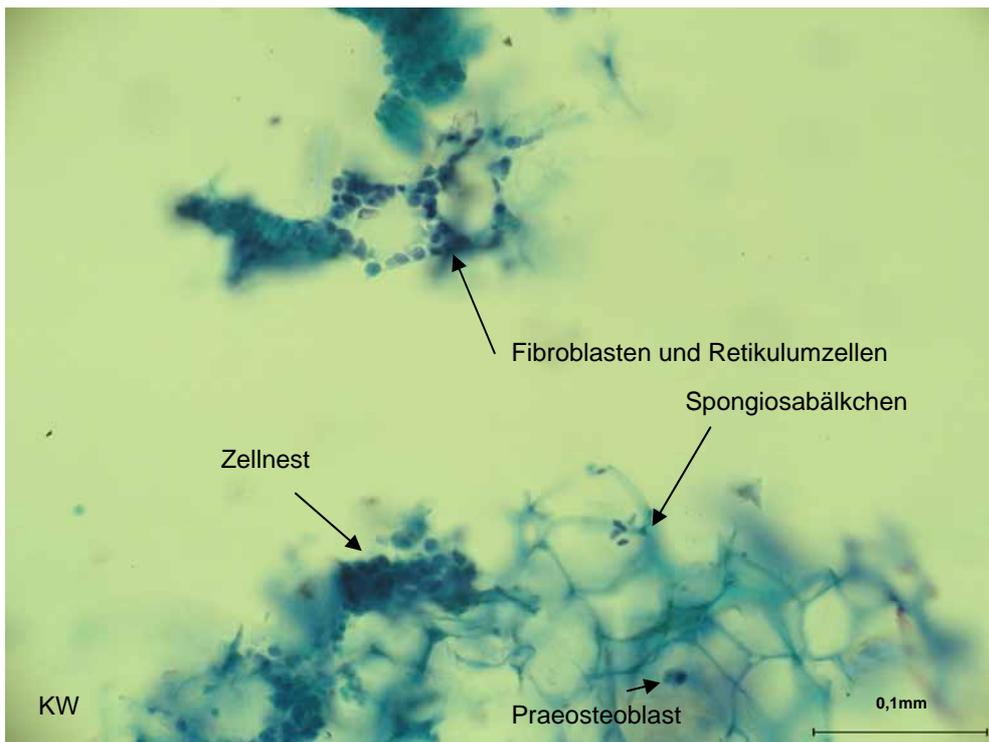


Abbildung 25: Humanpräparat 5. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 25.

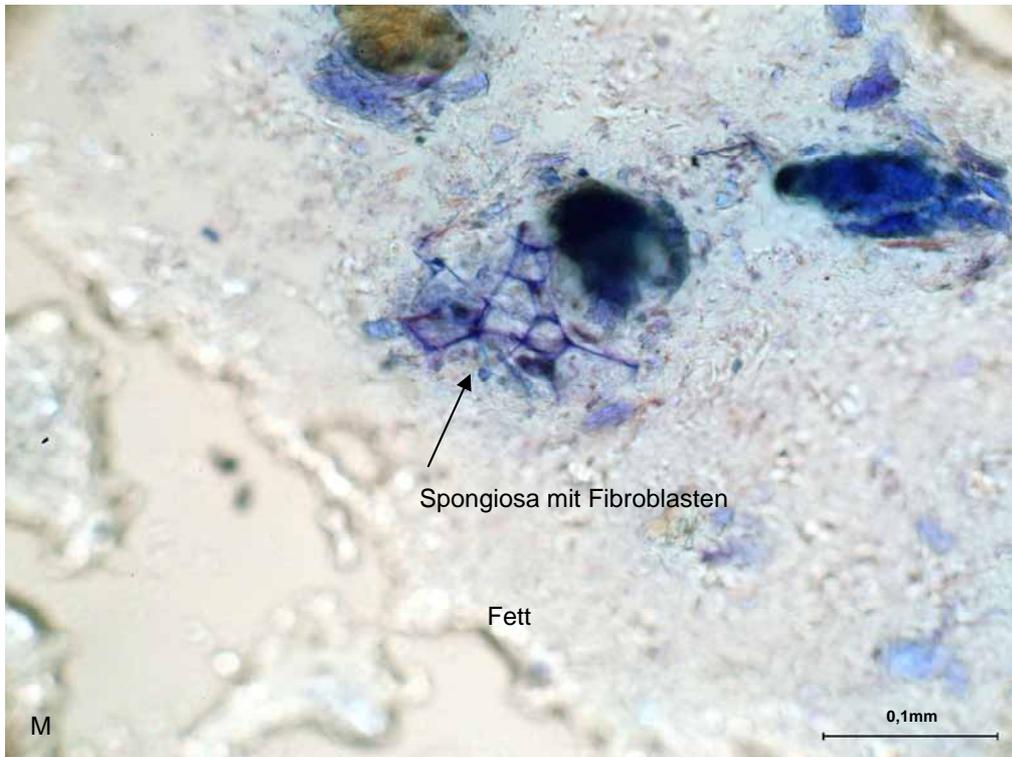


Abbildung 26: Humanpräparat 9. Knochenmark aus der Mentalregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 25.

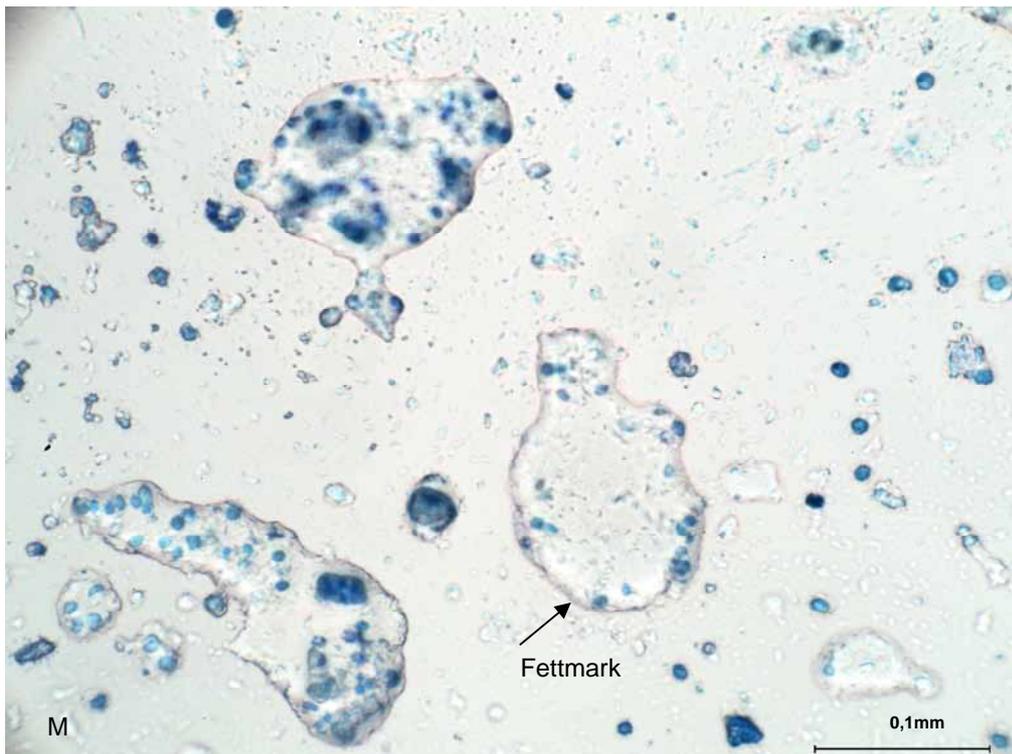


Abbildung 27: Humanpräparat 6. Knochenmark aus der Mentalregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 25.

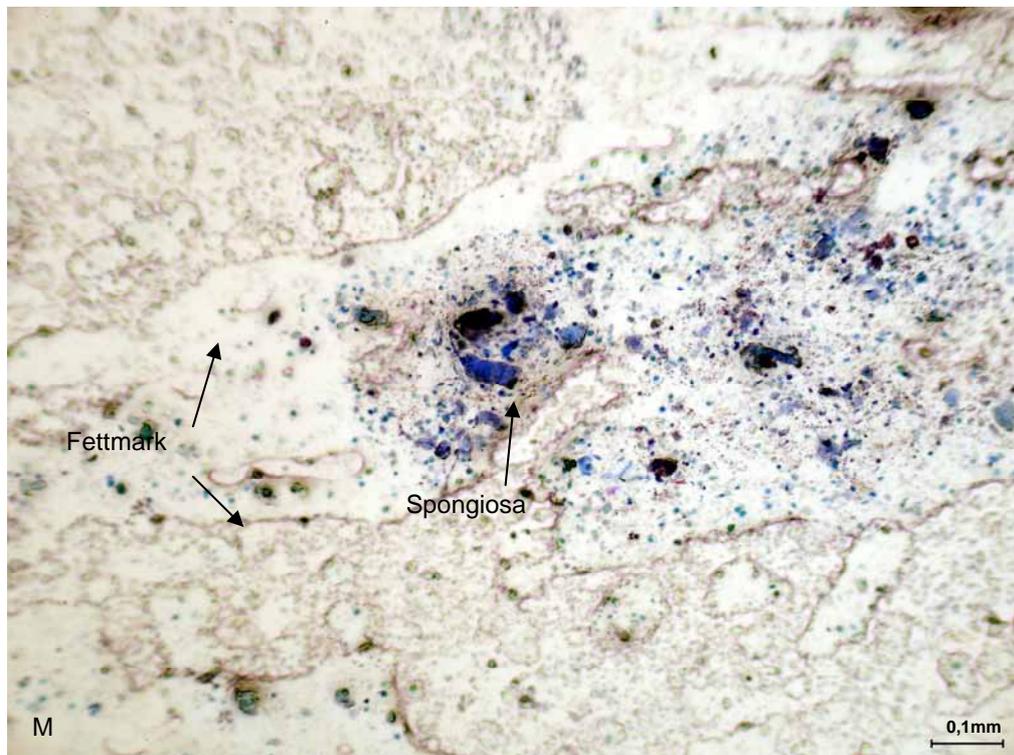


Abbildung 28: Humanpräparat 5. Knochenmark aus der Mentalregion.
Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 10.

4.8. Vergleichende Untersuchung der histologischen Schnittpräparate, der Rasterelektronenmikroskopaufnahmen und der Mikrocomputertomographien an Proben von Humanpräparaten

Bei den Schnittpräparaten der Retromolar- und der Mentalregion waren, auch bei kleinster Vergrößerung, bereits auffällige Unterschiede zu sehen, was sich bei weiterer Vergrößerung noch bestätigte.

Während in der Mentalregion überwiegend Fettzellen zwischen den vereinzelt Spongiosabälkchen nachweisbar waren, dagegen kaum osteogene Zellen, nicht einmal größere Anhäufungen von verschiedenen Knochenmarkszellen, ergab sich für die Retromolarregion ein völlig anderes Bild.

Hier überwogen die Anhäufungen von Knochenmarkszellen mit enthalten sind osteogene Zellen, Zellen des blutbildenden Systems, Zellen der Granulopoese und der Anteil der Spongiosa, der in der Mentalregion eher gering ausfiel. Die Rasterelektronenmikroskopaufnahmen bestätigten diese Ergebnisse. Die Retromolarregion mit ihrem ausgeprägten Spongiosanetz und die Mentalregion mit einem überwiegenden Anteil von Fettzellen waren hier deutlich sichtbar. Die

Mikrocomputertomographien ließen aufgrund der gemessenen Werte dieselben Unterschiede erkennen. Gerade die Connectivity density ist im Mentalbereich durchschnittlich doppelt so hoch wie im Retromolarbereich. Die trabekuläre Separation im Mentalbereich fällt dagegen niedriger aus.

Tabelle V : Humanschnittpräparate Anzahl der osteogenen Zellen oder Zellcluster nach Durchmusterung der Schnittpräparate

Humanpräparate	Entnahmestelle Retromolarregion Anzahl osteogener Zellcluster	Entnahmestelle Mentalregion Anzahl osteogener Zellcluster
1	4	1
2	3	1
3	3	0
4	4	0
5	6	1

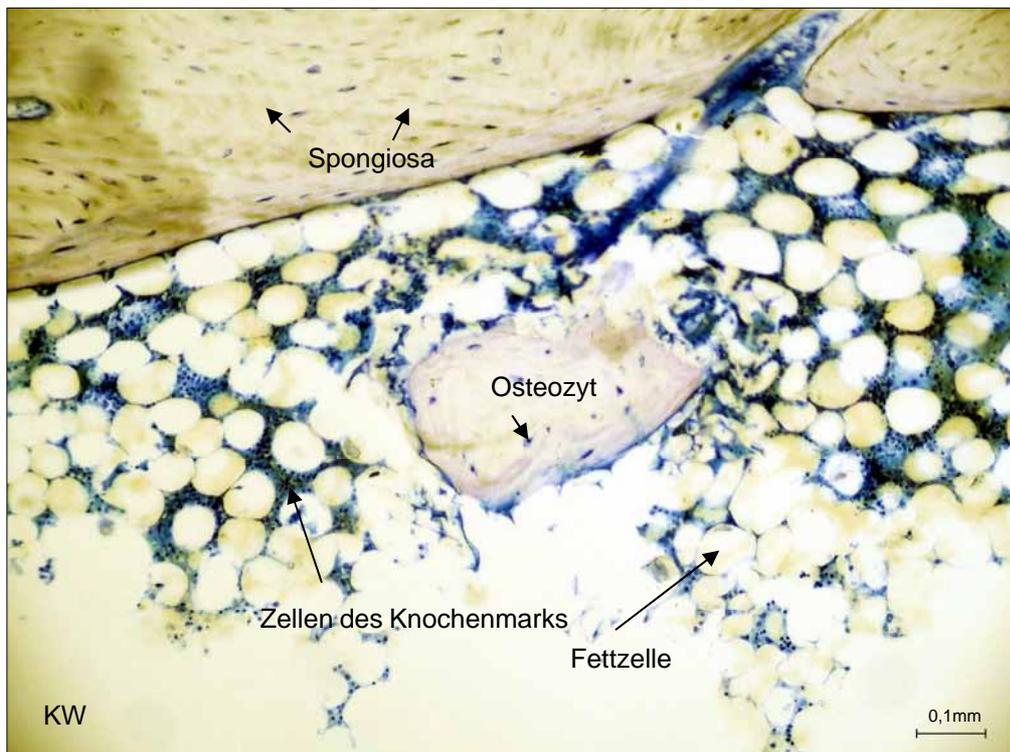


Abbildung 29: Humanschnittpräparat 1. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 10.

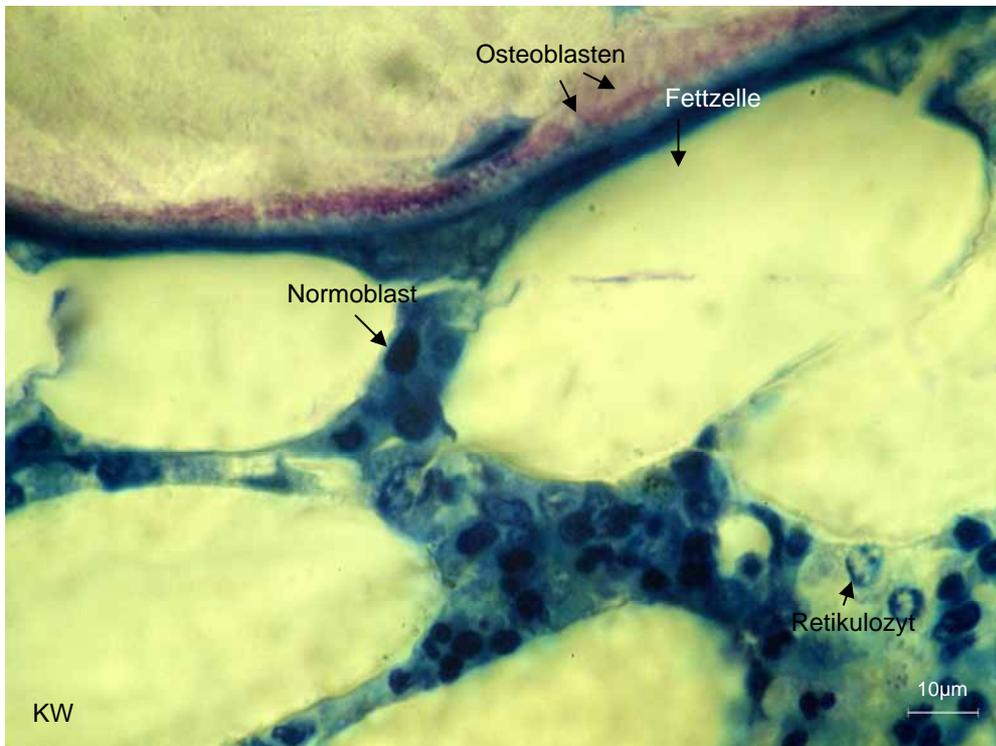


Abbildung 30: Humanschnittpräparat 1. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 10 µm. Vergrößerung = x 100.

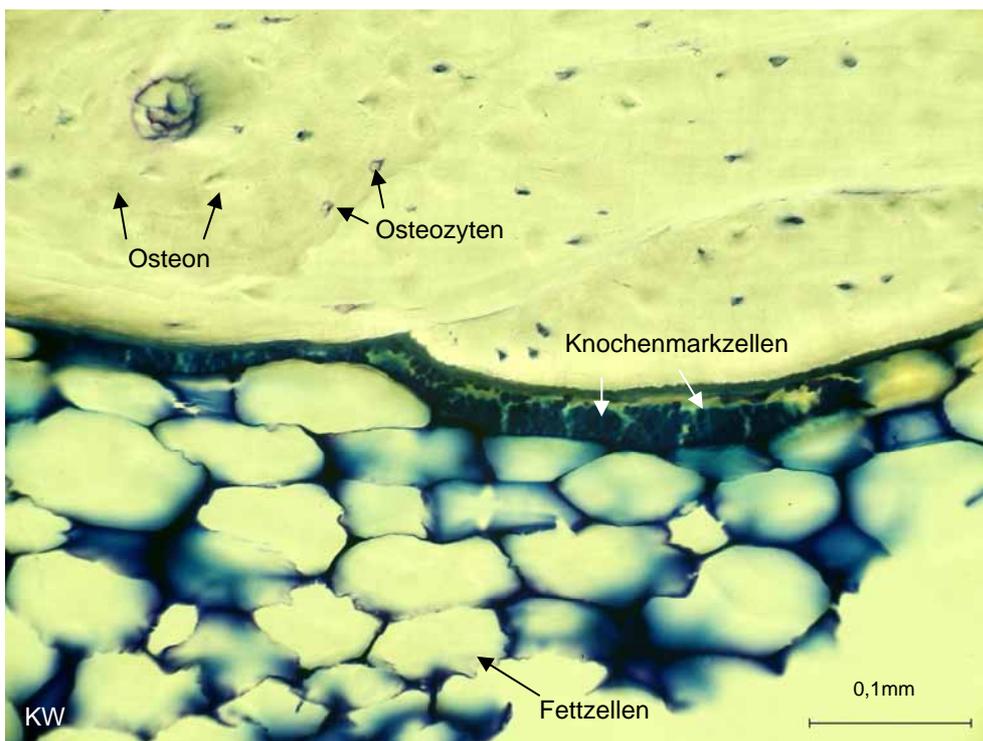


Abbildung 31: Humanschnittpräparat 3. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 0.1 mm. Vergrößerung = x 25.

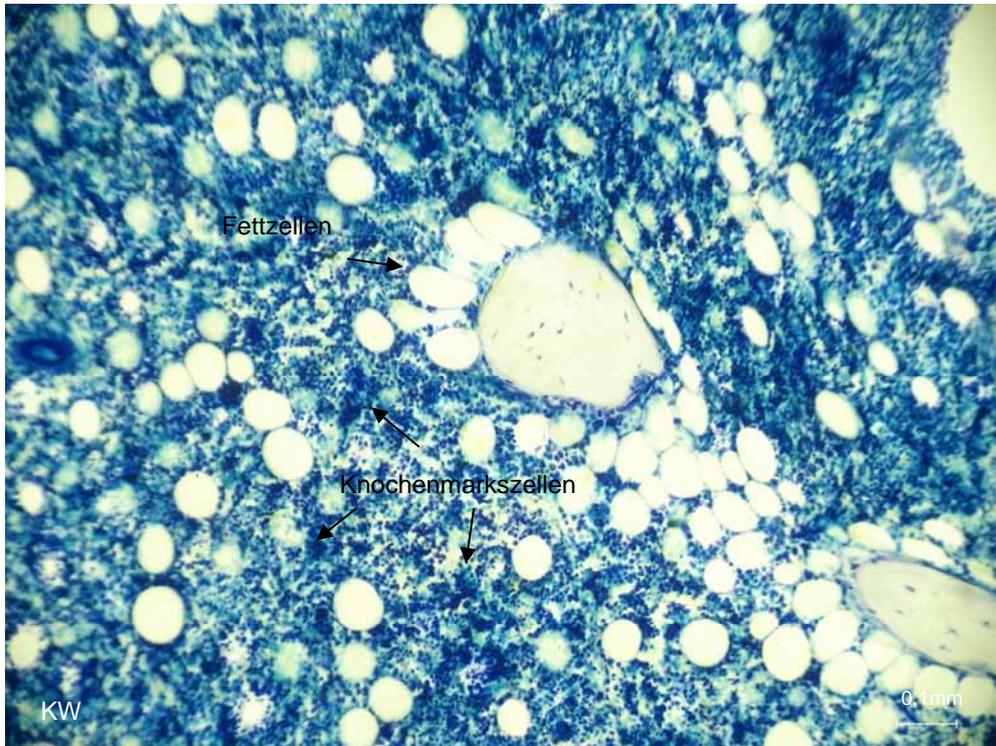


Abbildung 32: Humanschnittpräparat 5. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 10.

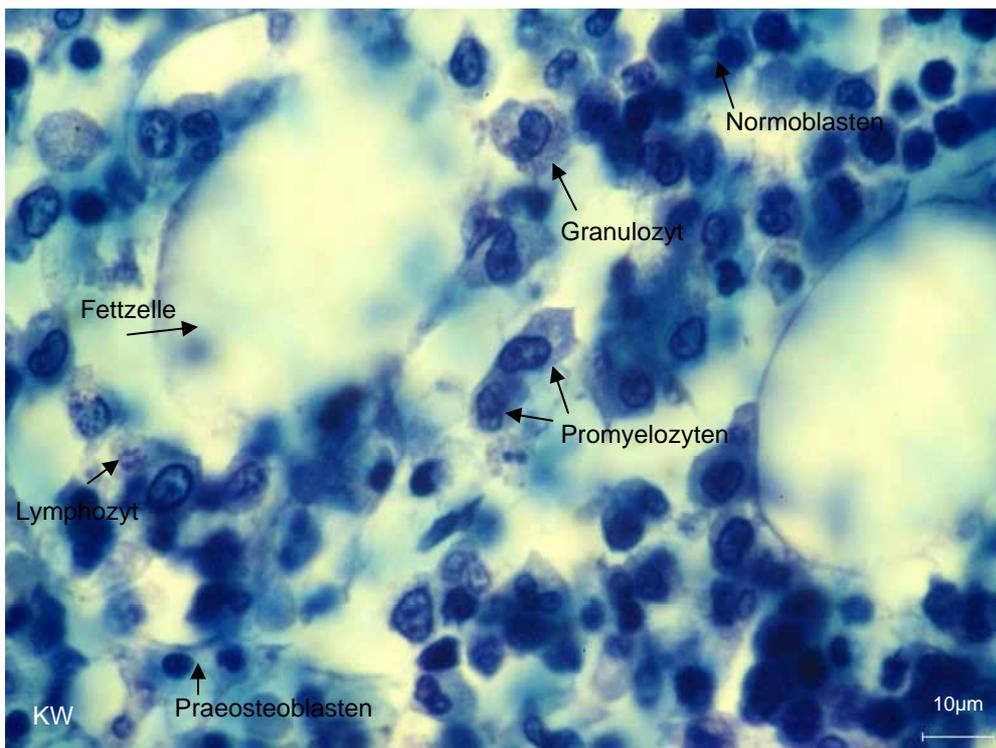


Abbildung 33: Humanschnittpräparat 5. Knochenmark aus der Retromolarregion. Maßstab 10 µm. Vergrößerung = x 100.

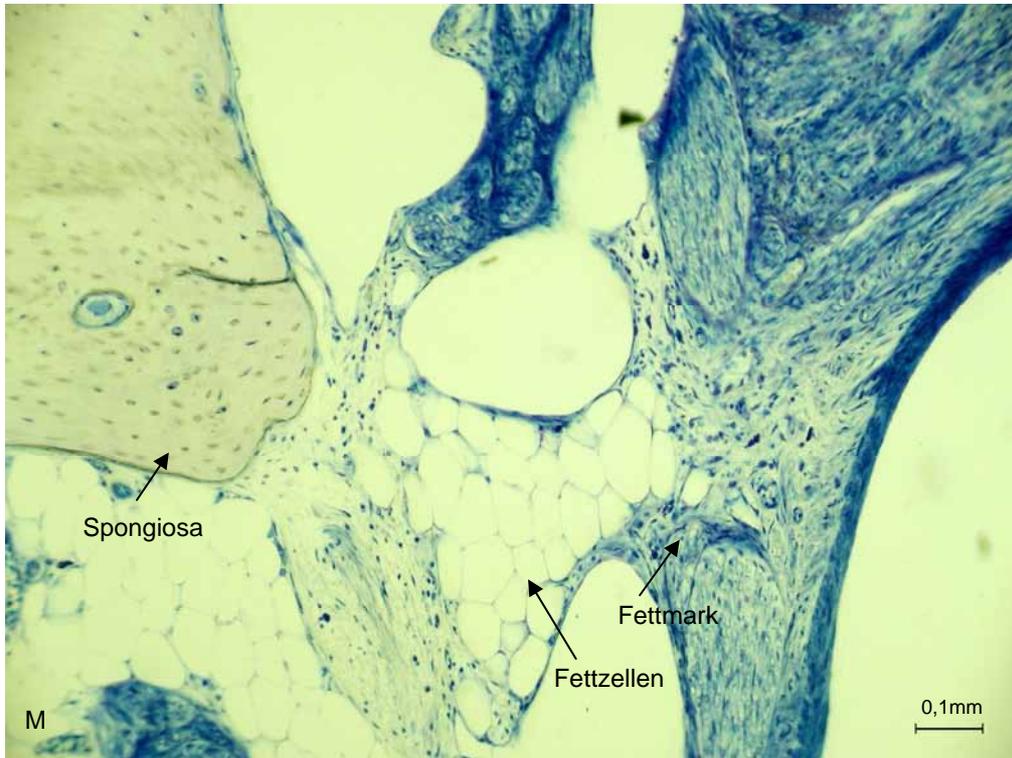


Abbildung 34: Humanschnittpräparat 1. Knochenmark aus der Mentalregion. Maßstab 0,1 mm. Vergrößerung = x 10.

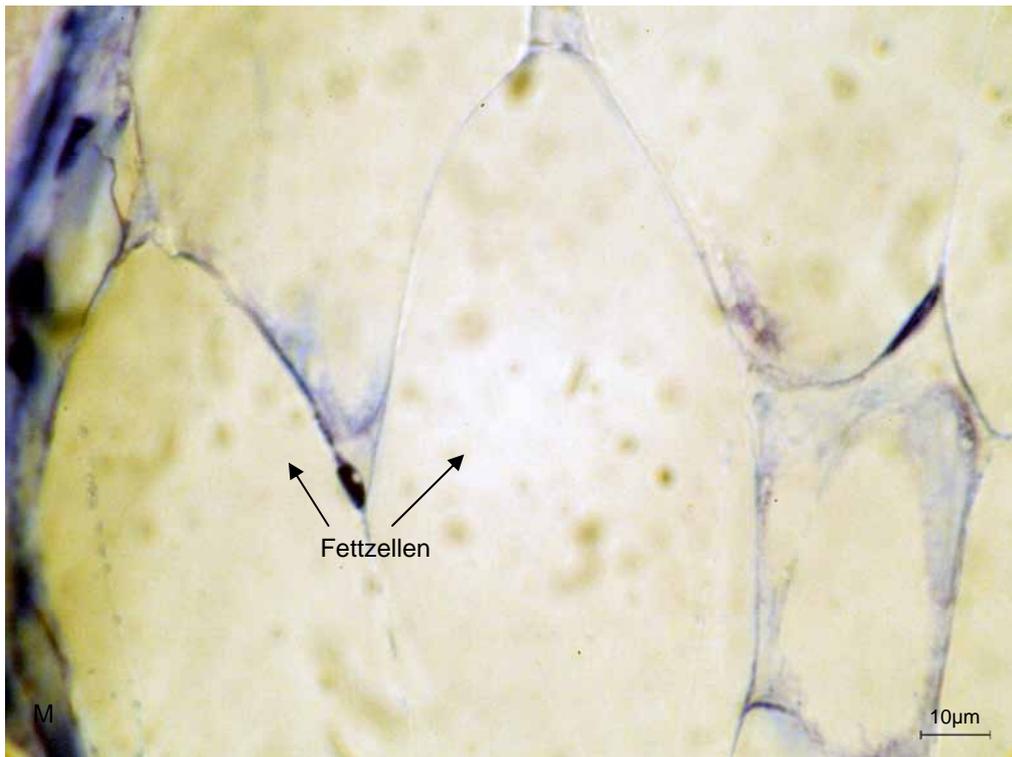
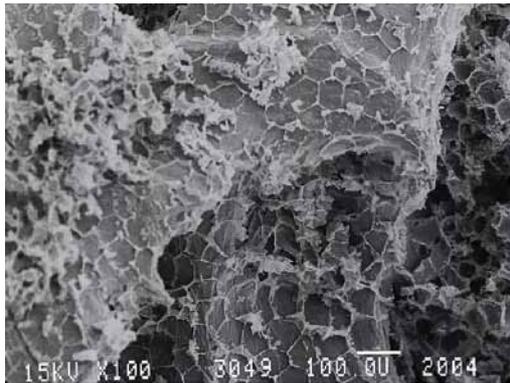


Abbildung 35: Humanschnittpräparat 1. Knochenmark aus der Mentalregion. Maßstab 10 µm. Vergrößerung = x 100.



Abbildung 36 Humanschnittpräparat 5. Knochenmark aus der Mentalregion.
Maßstab 10 µm. Vergrößerung = x 100.

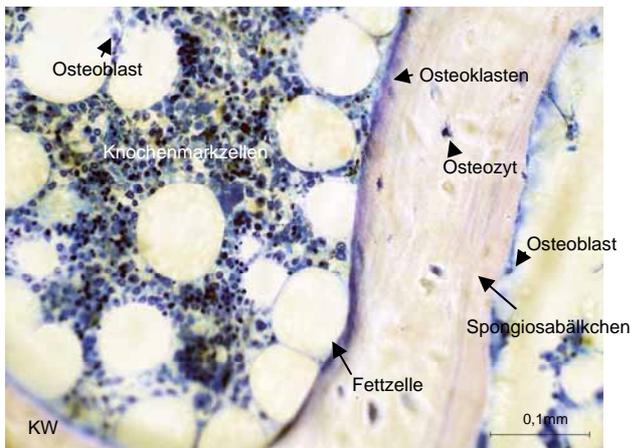
Vergleichende Übersicht der Probenaufnahmen (REM-Aufnahmen, μ CT-Aufnahmen, Aufnahmen der histologischen Schnitte) aus der Retromolar- und Mentalregion:



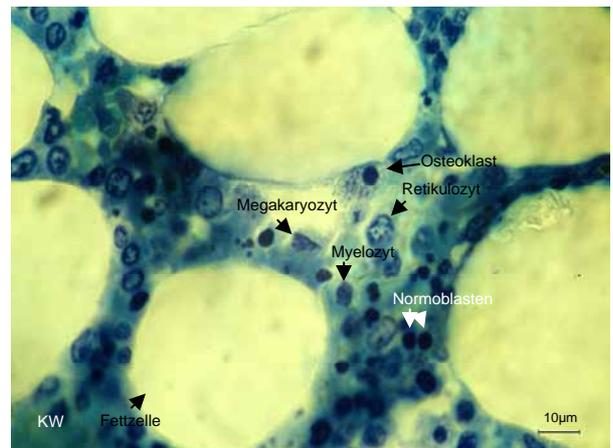
a)



b)



c)



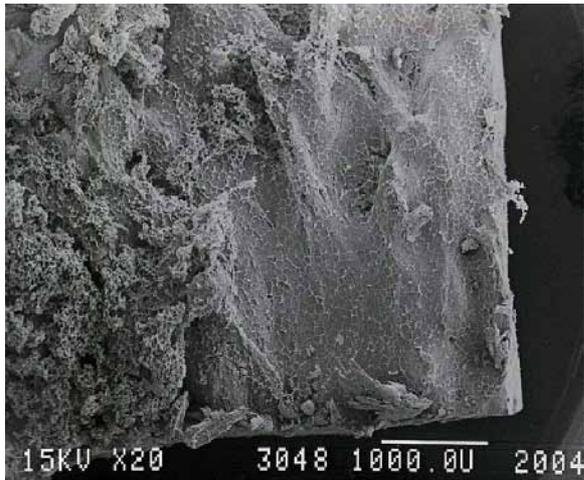
d)

Abbildungen 37 a-d

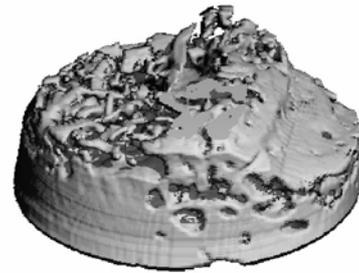
Humanpräparat 1 Retromolarregion

a) REM-Aufnahme

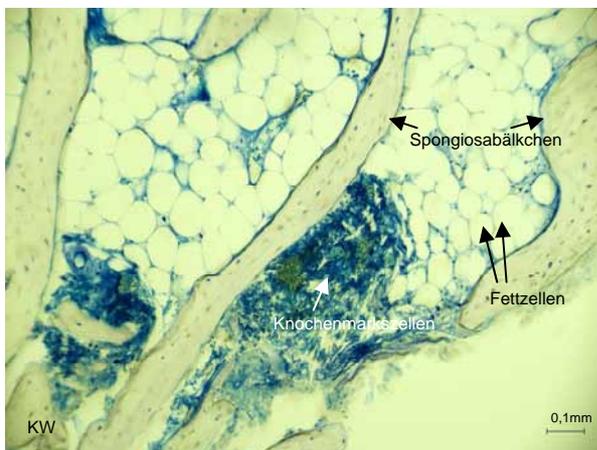
b) μ CT-Aufnahme c) und d) histologische Schnitte (x25, x100)



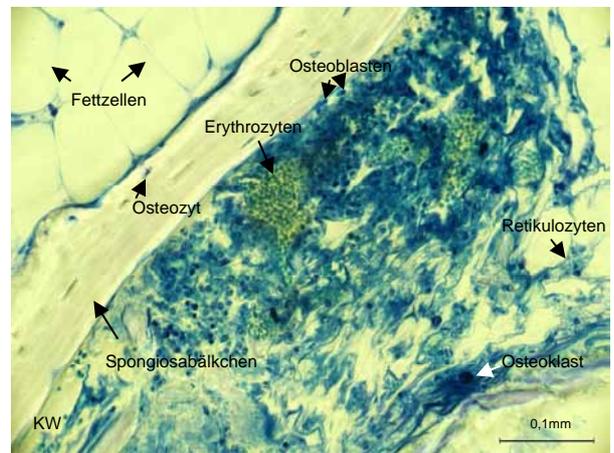
a)



b)



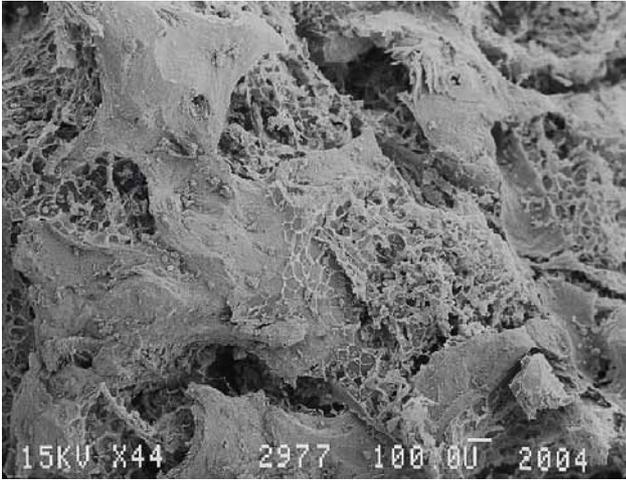
c)



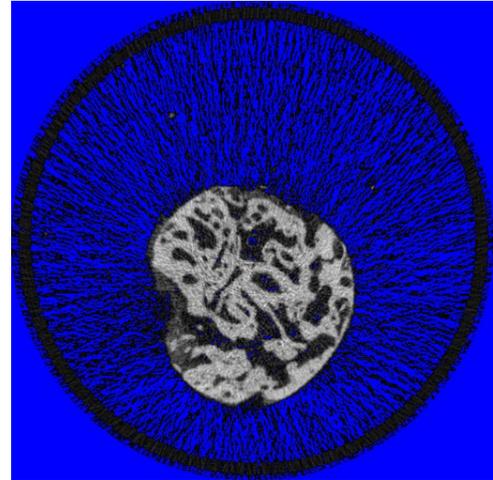
d)

Abbildungen 38 a-d: Humanpräparat 2 Retromolarregion

a) REM-Aufnahme b) μ CT-Aufnahme c) und d) histologische Schnitte (x10, x25)



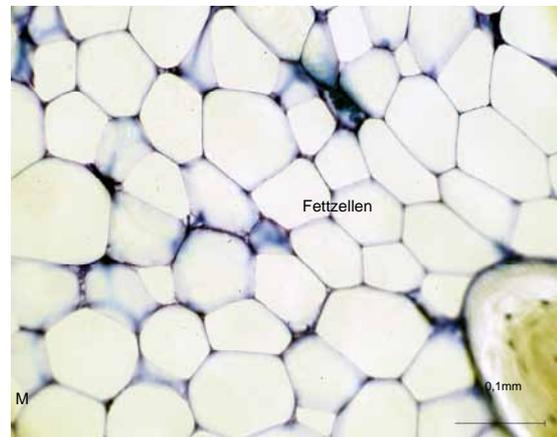
a)



b)



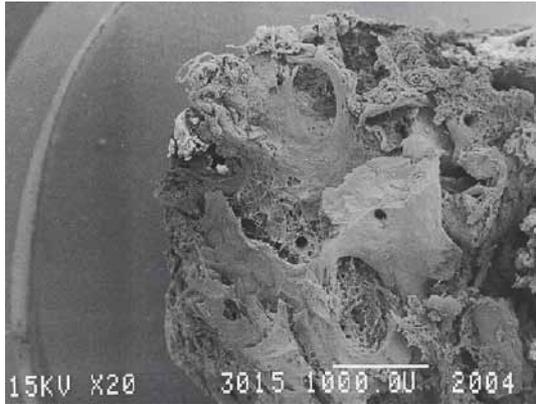
c)



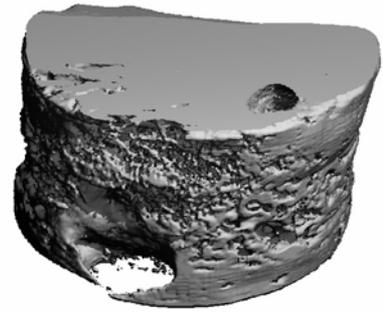
d)

Abbildungen 39 a-d: Humanpräparat 2 Mentalregion

a) REM-Aufnahme b) μ CT-Aufnahme c) und d) histologische Schnitte (x4, x25)



a)



b)



c)



d)

Abbildungen 40 a-d Humanpräparat 4 und 5 Mentalregion
 a) REM-Aufnahme b) μ CT-Aufnahme c) und d) histologische Schritte (x4)

5. Diskussion

Die Verpflanzung von autogenem Knochen wird mit der Perspektive geplant, eine optimale Form- und Körperstruktur der Transplantatregion zu erzielen. Mit der Verschickung von Knochengewebe werden gleichzeitig auch Osteoblasten, deren Vorläuferzellen und andere osteogene Zellen transferiert. Ein wesentlicher Vorteil der Transplantation autogenen Knochens ist die Übertragung vitaler, an der Knochenneubildung beteiligter Zelllinien. Die Spenderareale müssen diese hohen qualitativen Ansprüche erfüllen. Deshalb scheint die Selektion des Knochentransplantats durch den Chirurgen ein sehr wichtiges Kriterium für die optimale Einheilung des Knochens in der Empfängerregion zu sein. Entscheidend ist hierbei, dass nicht nur die kompakten und spongiösen Anteile des Spenderknochens miteinander verglichen werden, sondern auf die Komposition des transferierten Knochenmarks geachtet wird. Die Qualität des transplantierten Knochens ist ausschlaggebend. Was versteht man nun unter Knochenqualität und wie lässt sie sich interpretieren? Man versteht darunter eine gewisse Beschaffenheit des Knochens mit bestimmten Eigenschaften und Funktionen. Ein Transplantatknochen hoher Qualität soll eine hohe osteogene Potenz aufweisen, das heißt, die Fähigkeit neuen Knochen durch osteoblastäre Zellen zu bilden, ist sehr groß. Daher müsste also auch eine hohe Zahl von Präosteoblasten, Osteoblasten und anderer osteogener Zellen transferiert werden, die hauptsächlich im Knochenmark zwischen den Spongiosabälkchen zu finden sind. Es wurde aus diesem Grund in vorliegender Studie gezielt ein Vergleich der osteogenen Potenz der Retromolarregion mit der der Kinnregion angestrebt. Diese Spenderregionen sind am ergiebigsten und die am häufigsten beschriebenen für die intraorale Transplantation. Die ortstypischen Knochenstrukturen und die damit verbundenen biologischen und mechanischen Eigenschaften sind grundlegende Auswahlkriterien für die Transplantation, ebenso der Bedarf an zu verpflanzendem Knochen und die Anatomie des Defektes. Sollten sich die in Frage kommenden Spenderareale jedoch bezüglich ihrer zellulären Zusammensetzung unterscheiden, wären die oben genannten Kriterien zweitrangig. Die Vorzüge eines Knochentransplantates mit der höchsten osteogenen Potenz erscheinen hinsichtlich der Heilungskapazität unübertroffen. Die osteogene Potenz resultiert aus der Existenz von Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen und allen anderen Zellen, die unmittelbar und mittelbar die Osteogenese unterstützen. Außerdem ist die osteogene Potenz abhängig von der Menge der Zellen und

Zelllinien, die direkt oder indirekt an der Osteogenese beteiligt sind. Ob sich nun die zellulären Eigenschaften der am häufigsten gewählten intraoralen Spenderareale diesbezüglich unterscheiden, war die zentrale Frage, die sich uns stellte. Erstaunlicherweise waren in der Literatur zu diesem Thema keinerlei Hinweise zu finden. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass die Spongiosa des Retromolarbereichs sowohl bei den Vitalpräparaten als auch bei den Humanpräparaten in der überwiegenden Zahl der Fälle osteogene Zellen aufwies. Die Ausstriche der Spongiosa der entsprechenden Mentalregionen zeigten jedoch keine osteogenen Zellen. Ebenso verhielt es sich mit den Schnittpräparaten. Auch hier fanden wir hauptsächlich in der Retromolarregion osteogenes Zellmaterial, dagegen in der Kinnregion meist nur Fettzellen.

Eine Erklärung für diese signifikanten Unterschiede findet sich in der äußerst differenzierten Betrachtung der biologischen und strukturellen Einflüsse auf diese beiden weit voneinander entfernten Unterkieferbereiche. Kieferwinkel- und Mentalregion sind Areale, die in der Region verschiedener Spannungssysteme liegen. Die Hauptspannungssysteme liegen im Ramus und in der Basis mandibulae, lokale Spannungssysteme sind an den Muskelansätzen zu finden (Küppers 1971). Der Knochen ist ein relativ stoffwechselaktives Gewebe, wobei die Belastungen, die auf ihn einwirken, im Stützgewebe durch die extrazelluläre Matrix getragen werden. Die Fähigkeit des Gewebes, funktionellen Belastungen standzuhalten, wird dadurch erreicht, dass die Zellen die passende Matrix hinsichtlich Menge, physikalischen Eigenschaften und Orientierung, entsprechend den Anforderungen ausbilden. Angenommen wird, dass bei großer funktioneller Belastung auch die Stoffwechselaktivität des Knochens steigt und eine andere Zellpopulation agiert als in Bereichen niedriger Stoffwechselaktivität. In Anbetracht der hohen Spannungen im Molarenbereich (Küppers 1971) erscheint das Regenerationsvermögen und die Adaptationsfähigkeit des Knochens in diesem Gebiet deutlich ausgeprägter als im Frontzahnggebiet. Die Spannungssysteme ergeben sich aus der Summe unterschiedlicher mechanischer Belastungen. Knochenzellen besitzen die Fähigkeit mechanische Reize zu erkennen und darauf zu reagieren, wobei die mechanische Stimulation des Knochens unterschiedliche Konsequenzen hat. Das daraus resultierende Belastungsprofil wird in der Wissenschaft kontrovers diskutiert. Genauso ungeklärt ist bisher die Frage, ob der Flüssigkeitsabbau, die Gewebespannung oder gezielter Druck einen selektiven Einfluss auf die Zellen

bezüglich ihrer Entwicklung haben. Während der Belastung des Knochens wird Flüssigkeit durch die Osteozytenkanälchen gepresst und es konnte gezeigt werden, dass auf Grund dieses pulsierenden Flüssigkeitsstroms die Osteozyten innerhalb von Minuten stimuliert werden, Signalmoleküle zu produzieren (Ajubi et.al. 1996), die wiederum die Osteoklasten- und Osteoblastenbildung beeinflussen können (Burger und Klein-Nulen 1999). Da die Position der Osteozyten festgelegt ist, wird ihnen im reifen Knochen die Rolle eines Sensors für die mechanische Belastung zugeschrieben. Osteoblasten reagieren unter den gleichen Belastungen deutlich schwächer. Die wesentlichen Mechanismen, die zu einem mechanischen oder physikalischen Reiz der reifen Osteoblasten bzw. der Präosteoblasten führen, wurden noch nicht herausgefiltert (Mullender et al.). Die physikalischen Effekte der mechanischen Stimulation dieser Zellen können sehr unterschiedlich sein. So ist bei einer Frakturheilung einerseits eine absolute Versteifung und Stabilisierung für die Ossifikation notwendig, andererseits spielt eine gewisse Gewebsdeformation bei der Aktivierung der Zellproliferation eine wichtige Rolle. Nur die Interaktion dieser Mechanismen führt zum Knochenaufbau.

Die von uns untersuchten Unterkieferregionen unterscheiden sich gravierend bezüglich der physikalisch-mechanischen Stimulation. Im Gegensatz zur Kinnregion liegt die Retromolarregion in einer Zone größter mechanischer Belastung und damit auch in einem Spannungszentrum (Küppers). Auf Grund dessen wird vermutet, dass in der Retromolarregion das osteogene Potential der Knochenmarkzellen erheblich größer ist als in der Kinnregion.

Involutive Altersmechanismen bewirken eine Veränderung der Zellqualität des Unterkiefers. Mit Hilfe der Magnetresonanztomographie wurde festgestellt, dass sich der Unterkiefer von Geburt an in seiner zellulären Zusammensetzung verändert. Das rote Knochenmark mutiert in gelbes Knochenmark im Sinne einer Verfettung, zuerst im Kinnbereich und zuletzt proximal im Kondylus. Im Bereich des aufsteigenden Astes und des Kieferwinkels verbleiben häufiger einzelne Inseln hämatopoetischen Knochenmarks. Dieses Verteilungsmuster wird etwa mit dem zwanzigsten Lebensjahr, mit gewissen Schwankungsbreiten, erreicht. Mit zunehmendem Alter wird eine progrediente Konvertierung des roten in gelbes Mark oder zumindest eine Zunahme des prozentualen Fettgehaltes des hämatopoetischen Knochenmarks beobachtet. Es stellt sich jetzt die Frage, ob die sogenannte Verfettung der Mandibula einen Einfluss auf die Transplantate und somit auch auf die

Heilungskapazität und Funktion des Knochens im Empfängerareal hat. Die Verfettung in der Kinnregion ist allerdings ab einem Alter von 6 Jahren bereits weitgehend abgeschlossen. In der Retromolarregion findet man dagegen bis zum Ende des dritten Lebensjahrzehntes noch Reste aktiven Knochenmarks (Kaneda et.al. 1996).

Die altersabhängige Verteilung von aktivem und inaktivem Knochenmark und die Progredienz sollten bei der Wahl der Transplantatregion besonders berücksichtigt werden. Die retromolaren Areale des Unterkiefers erscheinen uns wegen der tendenziell geringeren Verfettung und damit höheren Zellaktivität als Transplantatgebiet geeigneter. Die Fähigkeit der Rückdifferenzierung der Fettzellen und die Vermutung, dass die Fettzellen auch an der Knochenheilung beteiligt sind, bedeuten keine qualitative Aufwertung des Kinnknochens im Vergleich zum Retromolarknochen. Der primäre Aspekt bei der Knochenübertragung ist immer noch die Übertragung vitaler Osteozyten.

Maßgeblich für die Heilungskapazität des Transplantates ist der Transfer von Knochenmarkzellen und Knochenmarkstromazellen in die Empfängerregion auf Grund ihrer hohen Osteogenität. Die Erkenntnis, dass sich viele Zellen, die nicht unmittelbar den osteogenen Zelllinien entstammen, an der Knochenheilung beteiligen, sollte das Bewusstsein für eine genauere Betrachtung aller zellulären Interaktionen schärfen.

Der Nachweis einer hämatopoetischen Ur-Stammzelle mit der Fähigkeit Vorläuferzellen der Osteoblasten zu induzieren, den Olmsted-Davis et al. 2003 in ihrer Studie geführt haben, scheint unser klassisches Modell der Zellhierarchien und autonomer Zellsysteme zu widerlegen. Hämatopoetische und mesenchymale Zellreihen sollten demnach nicht mehr stringent voneinander getrennt werden. Gemäß dieser Untersuchung könnte die Ur-Stammzelle im Knochenmark lokalisiert sein und dort eine der Entwicklungslinien der Osteoprogenitorzellen induzieren. Die Ergebnisse von Taichmann et al. 1996 zeigen, dass Osteoblasten einen Einfluss auf die Progenitorzellen der Hämatopoese haben und stützen die Annahme, dass Osteoblasten Signalstoffe mit direkter Wirkung auf hämatopoetische Zellen sezernieren. Olmsted-Davis et al. 2003 und Taichmann et al. 1998, zeigten, dass einige im Knochenmark existente Zellen und Zelllinien knochenbildende Eigenschaften aufweisen. Die hohen Spannungspotentiale und die beschriebene Mechanotransduktion im Retromolarbereich haben vermutlich zusätzlich einen

multiplizierenden Effekt auf die Zellaktivität der Spongiosa und damit wahrscheinlich auch auf die im Knochenmark befindlichen Zellen. Dieser Effekt ist mit den trajektorell ausgerichteten Spongiosaelementen zu erklären, die rein axial auf Druck oder Zug beansprucht werden (Kueppers 1971). Der klinische Nutzen liegt in der hohen osteogenen Potenz der Knochenmarkzellen und der damit verbundenen Heilungskapazität. Die niedrigen Spannungsgrößen im Frontzahnbereich (Kristen 1953) mit den entsprechenden Konsequenzen bezüglich der Zellaktivität favorisieren den Retromolarbereich als Transplantatentnahmestelle.

Bei der Transplantation eines kortiko-spongiösen Knochenblocks überträgt man auch eine osteogene Gewebeschicht, das Endost. Die trabekulären Strukturen der Spongiosa sind von den so genannten „bone lining cells“ besiedelt, die gemeinsam mit wenig Bindegewebe eine äußerst dünne Membran bilden. Die „bone lining cells“ sind besondere Osteozyten. Die Zusammensetzung und die Dicke dieser Gewebeschicht ist homogen, bis auf Regionen mit direktem Kontakt dieser Zellen zum Knochenmarkgewebe. Sie erscheinen in diesen Bereichen einschichtig, gedrängt oder locker arangiert. Bei der mechanischen Zerstörung der Trabekel im Rahmen der Transplantatgewinnung und dem folgenden Reparationsprozess, können sie einen Anstieg der Osteoprogenitorzellen bewirken (Islam und Glomski et al. 1990). Die „bone lining cells“ kommunizieren über ihre Fortsätze mit tiefer gelegenen Osteozyten. Beobachtungen von Islam et al. deuten an, dass das Endost die Osteozyten unterstützt. Experimentelle Studien (Miller et al. 1980) zeigen, dass sich hämatopoetische Stammzellen in unmittelbarer Nähe des Endost konzentrieren. Sie sind für die Stromaregeneration verantwortlich und werden von den Zellen des Endosts gesteuert. Gray und Elves ermittelten bei Tierversuchen die Verteilung der osteogenen Zellen innerhalb der Spongiosa. 60 Prozent der osteogenen Zellen bestehen aus „bone lining cells“ aus dem Endost und den Knochenmarkstromazellen. 30 Prozent enthält das Periost. Bei den freien Zellen war kein signifikantes Verteilungsmuster erkennbar. Offensichtlich ist das Endost eine für die Knochentransplantation sehr wichtige Struktur. Der Operateur sollte bei der Entnahme des kortiko-spongiösen Knochenblocks sicherstellen, dass genügend Spongiosa mobilisiert wird. Falls dies nicht möglich ist, müssten weitere Spongiosachips entnommen und transplantiert werden. Vermutlich bewirken die Spongiosa, das Knochenmarkstroma und das Knochenmark, durch ihre zellulären Anteile, eine verbesserte und schnellere Einheilung der Transplantate. Der Erfolg

einer Transplantation ist abhängig von der präzisen Formulierung des Behandlungszieles. Das ist notwendig, um die Anforderungen an den Spenderknochen zu konkretisieren und um das entsprechende Spendermaterial auswählen zu können. Erfüllt das Transplantat im Empfängerbereich eine Platzhalterfunktion, sind prinzipiell osteokonduktive Eigenschaften ausreichend. Sollte jedoch eine Optimierung der biomechanischen Eigenschaften des Transplantatgebietes als Behandlungsziel angestrebt werden, sind osteoinduktive Funktionen und zusätzlich osteogene Fähigkeiten erforderlich.

Autogene Knochentransplantate haben im Allgemeinen sehr gute osteoinduktive Eigenschaften (Burchhardt 1983). Die biogenen Proteine stimulieren die aus dem Transplantatbett einwandernden Stammzellen oder Stammzellen anderer Osteoprogenitorzellen zu deren Differenzierung in Osteoblasten (Burchhardt 1987). Im Gegensatz dazu wird bei der Osteogenese direkt neuer Knochen gebildet. Dieser Prozess findet statt, wenn lebende Osteoblasten oder Vorläuferzellen mit dem Knochen transplantiert werden (Burwell 1966, Urist 1967). Die vitalen Vorläuferzellen differenzieren zu reifen Osteoblasten und sind in der Lage, eine beträchtliche Menge neuen Knochens zu bilden (Burwell 1966, Goldberg 1972). Demnach wäre es sinnvoll, das Knochengewebe mit den meisten Osteoblasten oder Osteoprogenitorzellen zu transplantieren. Die Spongiosa inklusive Knochenmarkstroma und Knochenmark selbst scheinen solche Gewebe zu sein.

Autogene Knochentransplantate repräsentieren den so genannten Goldstandard der Knochentransplantation. Kortikale und spongiöse Knochentransplantate weisen ähnliche Heilungs- und Inkorporationsprozesse auf (Burchhardt 1985 und 1987). Aus histologischer Sicht gibt es jedoch drei gravierende Unterschiede. Spongiöse Knochentransplantate revaskularisieren schneller und vollständiger als Kortikale. Die Inkorporation der Kortikalis beginnt, im Gegensatz zum spongiösen Knochen, der unmittelbar der schleichenden Substitution unterliegt, mit einer Osteoklastenaktivität (Goldberg 1972). Spongiöse Knochentransplantate scheinen komplett zu regenerieren, während kortikale Transplantate nach dem Abschluss der Heilungsphase aus einer Mischung von nekrotischem und vitalem Gewebe bestehen (Burchhardt 1987).

Bei der intraoralen Verpflanzung avaskulärer Knochentransplantate sollte dies berücksichtigt werden. Um einer optimalen Knochenregeneration im

Empfängerbereich nahe zu kommen, müsste der Chirurg quantitativ mehr Spongiosa als Kompakta transplantieren.

Zusammenfassend folgt, dass der spongiöse Knochen, besonders das Endost und das Knochenmarkstroma, eine hohe Osteogenität besitzen. Besonders die Spongiosa aus dem Retromolarbereich ist für die intraorale Verpflanzung wertvoll, da die auftretenden funktionellen Kräfte und die Mechanoinduktion vermutlich die Zellaktivitäten massiv erhöhen. Die Untersuchungsergebnisse stützen diese Annahme. Wir fanden in den Knochenmarkausstrichen der Retromolarregion einige wenige Osteoprogenitorzellen, obwohl diese prinzipiell sehr selten im Knochenmark zu finden sind (Theml et al. 2002). Die Vorzüge der retromolaren Spongiosa können sich nur dann optimal entfalten, wenn der Transplantationvorgang möglichst schnell erfolgt, da die osteoanabolen Fähigkeiten von der Vitalerhaltung der transferierten Zellen abhängen. Deshalb muß immer zuerst das Transplantationsbett vorbereitet werden, danach erst erfolgt die Entnahme des Knochens. Ist eine unmittelbare Verpflanzung des Autotransplantates nicht möglich, müsste für die Vitalerhaltung der Zellen eine Zwischenlagerung in Eigenblut erfolgen.

6. Zusammenfassung

Die Verstärkung eines Implantatlagers mittels Verpflanzung autogenen Knochens ist ein häufig praktizierter oralchirurgischer Eingriff. Ziel der vorliegenden Studie war es, zwei orofaziale Donatorstellen für autogene Knochen transplantate, den Mentalbereich sowie die Retromolarregion, hinsichtlich ihrer biologischen Wertigkeiten zu untersuchen. Die Frage sollte geklärt werden, ob sich das Knochenmark der unterschiedlichen Kieferabschnitte in seiner für die Osteogenität relevanten zellulären Ausstattung unterscheidet.

Ein wesentlicher Vorteil der autogenen Knochen transplantation ist die Übertragung vitaler, an der Knochenneubildung beteiligter Zelllinien. In der Literatur wird das osteogene Potenzial der im Knochenmark existenten Zellen jedoch unterschiedlich bewertet. Magnetresonanz-Untersuchungen über altersbedingte Veränderungen der Knochenmarkstruktur des Unterkiefers zeigen darüber hinaus eine vollkommene Umwandlung des roten Knochenmarks in gelbes Fettmark mit einem achtzig prozentigen Fettanteil bis zur dritten Lebensdekade. Die bisher postulierte stringente Trennung von hämatopoetischen und osteopoetischen Zelllinien, die eine artifizielle Schematisierung mit tendenziell negativer Bewertung der Osteogenität vorgab, ist

mittlerweile veraltet, da offensichtlich viele Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellkaskaden ablaufen.

Bezüglich der mechanisch-physikalischen Stimulation der Zellen ergeben sich in den von uns untersuchten Unterkieferabschnitten gravierende Unterschiede. Die Retromolarregion liegt, ganz anders als die Kinnregion, in einer Zone größter mechanischer Belastung. Deshalb vermuten wir, dass im Marklager der Retromolarregion eine stärkere osteogene Potenz liegt, als im Mark der Regio mentalis. Die vergleichenden hämatopoetischen Studien wurden sowohl an Knochenmarkausstrichen von vitalem, als auch formaldehydfixiertem Gewebe durchgeführt. Die Vitalstudie umfasste sieben Patienten. Die Entnahme des zu untersuchenden Gewebes wurde ausschließlich im Zusammenhang mit einer medizinisch indizierten Maßnahme durchgeführt und im Sinne eines sogenannten Überschussmaterials für die Anfertigung von Ausstrichpräparaten verwendet. Das formaldehydfixierte Material wurde von insgesamt sieben humanen Unterkieferpräparaten entnommen. Zusätzlich wurden von den kortiko-spongiösen Knochenblöcken des fixierten Knochens, rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen und histologische Schnitte angefertigt. Der histologische Vergleich des Knochenmarks der beiden Spenderbereiche ergab hinsichtlich der osteogenen Wertigkeit einen relevanten Unterschied. Die Auswertung aller histologischen Präparate zeigte, dass das Knochenmark der Retromolarregion in den meisten Fällen osteogene oder hämatopoetische Zellen enthielt. Im Mark der Mentalregion waren nur vereinzelt Vorstufen des weißen und roten Blutbildes erkennbar. Fettzellen dominierten hier das histologische Bild.

Die klinische Bedeutung dieser Erkenntnisse kann folgendermaßen interpretiert werden:

Der Kieferwinkelregion sollte als Entnahmebereich bei Knochentransplantationen möglichst immer der Vorzug gegenüber der Mentalregion gegeben werden, da die osteoanabolen Qualitäten des kortiko-spongiösen Knochenblocks der Retromolarregion, denen der Mentalregion deutlich überlegen sind. Der Transplantationsvorgang sollte möglichst schnell erfolgen, um das Überleben der verpflanzten Zellen zu ermöglichen. Aus diesem Grund ist es nötig, zuerst die Empfängerstelle vorzubereiten und anschließend das autogene Transplantat zu entnehmen. Sollte aus operationstechnischen Gründen eine unmittelbare Verpflanzung nicht möglich sein, so ist eine Zwischenlagerung des Transfermaterials

in Eigenblut notwendig. Diese Maßnahme ist ein wichtiger Beitrag zur Erhaltung der Vitalität der zu übertragenden Zellen.

7. Literaturverzeichnis

1. Ajubi, N.E. et al.: Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes—a cytoskeleton-dependent process. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 62-8(1996)
2. Amano, Y.; Wakabayashi, H. & Kumazaki, T.: MR signal changes in bone marrow of mandible in hematologic disorders. *J Comput Assist Tomogr* 19, 552-4(1995).
3. Anklesaria, P.; Fitzgerald, T.J.; Kase, K.; Ohara, A. & Greenberger, J.S.: Improved hematopoiesis in anemic S1/S1d mice by splenectomy and therapeutic transplantation of a hematopoietic microenvironment. *Blood* 74, 1144-51 (1989).
4. Anklesaria, P. et al.: Engraftment of a clonal bone marrow stromal cell line in vivo stimulates hematopoietic recovery from total body irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7681-5 (1987).
5. Babyn, P.S.; Ranson, M. & McCarville, M.E.: Normal bone marrow: signal characteristics and fatty conversion. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 6, 473-95 (1998).
6. Beck, S.; Lippiello L.; Bloebaum, R.; Connolly J.: Blood loss enhances osseous integration of porous coated implants in the rabbit. *J Histotechnol* 20, 225-228 (1997).
7. Bennet, J.H.; Joyner, C.J.; Triffitt, J.T. & Owen, M.E.: Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 99 (Pt 1), 131-9 (1991).
8. Beresford, J.N.: Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop*, 270-80 (1989).
9. Bruder, S.P.; Jaiswal, N. & Haynesworth, S.E.: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64, 278-94 (1997).
10. Burchardt, H.: The biology of bone graft repair. *Clin Orthop*, 28-42 (1983).
11. Burchardt, H.: Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 18, 187-96 (1987).
12. Burger, E.H. & Klein-Nulen, J.: Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro. *Adv Dent Res* 13, 93-8 (1999).
13. Burwell, R.G.: Studies in the transplantation of bone. 8. Treated composite homograft-autografts of cancellous bone: an analysis of inductive mechanisms in bone transplantation. *JBone Joint Surg Br* 48, 532-66 (1996).

14. Burwell, R.G.: The Burwell Theory on the importance of bone marrow in bone grafting. In Urist, M., O'Connor, B., Burwell, R.G. (eds). Bone Grafts, Derivatives, and Substitutes. Oxford, Butterworth-Heinemann, 103-155 (1994).
15. Cheng, S.L.; Yang, J.W.; Rifas, L.; Zhang, S.F. & Avioli, L.V.: Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134, 277-86 (1994).
16. Connolly, J.F.: Common avoidable problems in nonunions. *Clin Orthop*, 226-35 (1985).
17. Connolly, J.F.: Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop*, 8-18 (1995).
18. Connolly, J.F.: Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop*, S257-66 (1998).
19. Einhorn, T.A. et al.: The osteogenic response to distant skeletal injury. *J Bone Joint Surg Am* 72, 1374-8 (1990).
20. Frick, P.: Blut – und Knochenmarksmorphologie, Einführender Atlas in die morphologische Hämatologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, 19., unveränderte Auflage,(2003).
21. Friedenstein, A.J.; Chailakhyan, R.K. & Gerasimov, U.V.: Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20, 263-72 (1987).
22. Friedenstein, A.J.; Latzinik, N.V.; Gorskaya Yu, F., Luria, E.A. & Moskvina, I.L.: Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells. *Bone Miner* 18, 199-213 (1992).
23. Friedenstein, A.J.; Piatetzky, S. II & Petrakova, K.V.: Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16, 381-90 (1966).
24. Garg, N.K.; Gaur, S. & Sharma, S.: Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta Orthop Scand* 64, 671-2 (1993).
25. Gimble, J.M.; Robinson, C.E.; Wu, X. & Kelly, K.A.: The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* 19, 421-8 (1996).
26. Goldberg, V.M. & Lance, E.M.: Revascularization and accretion in transplantation. Quantitative studies of the role of the allograft barrier. *J Bone Joint Surg Am* 54, 807-16 (1972).
27. Goujon, E.: Recherches experimentales sur les proprietes. *J Anat* 6, 399-412 (1869).

28. Gray, J.C & Elves, M.W.: Donor cells' contribution to osteogenesis in experimental cancellous bone grafts. *Clin Orthop*, 261-71 (1982).
29. Gronthos, S.; Graves, S.E.; Ohta, S. & Simmons, P.J.: The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84, 4164-73 (1994).
30. Healey, J.H.; Zimmerman, P.A.; McDonnell, J.M. & Lane, J.M.. Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and non-union in cancer patients. *Clin Orthop*, 280-5 (1990).
31. Islam, A.; Glomski, C. & Henderson, E.S.: Bone lining (endosteal) cells and hematopoiesis: a light microscopic study of normal and pathologic human bone marrow in plastic-embedded sections. *Anat Rec* 227, 300-6 (1990).
32. Kaneda, T. et al.: Magnetic resonance appearance of bone marrow in the mandible at different ages. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol oral Radiol Endod* 82, 229-33 (1996).
33. Khoury, F.; Hemprich, A.; Sass, T.: Die Anwendung des freien Knochendeckels bei verschiedenen Eingriffen im Unterkiefer. *Dtsch Z Mund-Kiefer-Gesichtschir*, (1985).
34. Kristen, K.: Die Regeneration der Kieferknochen nach Zystenoperation unter Berücksichtigung der Einflüsse der Funktion. *Dtsch zahnaerztl Z* 8, 653-660 (1953).
35. Kühnel, W.: Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 8. überarbeitete Auflage, (1992).
36. Kueppers, K.: Analyse der funktionellen Struktur des menschlichen Unterkiefers. *Ergebn anat Entwickl Gesch* 44, 6-89 (1971).
37. Lippiello, L.; Chavda, D. & Connolly, J.: Colony-forming efficiency response of bone marrow stromal cells to acute blood loss. *J Orthop Res* 10, 145-8 (1992).
38. Leonhardt, H.: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen Bd.3, Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 8. überarbeitete und erweiterte Auflage, (1990).
39. Majors, A.K.; Boehm, C.A.; Nitto, H.; Midura, R.J. & Muschler, G.F.: Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res* 15, 546-57 (1997).

40. Marks, S.C., jr. et al.: The skeletal effects of colony-stimulating factor-1 in toothless (osteopetrotic) rats: persistent metaphyseal sclerosis and the failure to restore subepiphyseal osteoclasts. *Bone* 14, 675-80 (1993).
41. Marusic, A.; Kalinowski, J.F.; Jastrzebski, S. & Lorenzo, J.A.: Production of leukemia inhibitory factor mRNA and protein by malignant and immortalized bone cells. *J Bone Miner Res* 8, 617-24 (1993).
42. Marx, R.E. et al.: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85, 638-46 (1998).
43. Marx, R.E. & Morales, M.J.: Morbidity from bone harvest in major jaw reconstruction: a randomized trial comparing the lateral anterior and posterior approaches to the ilium. *J Oral Maxillofac Surg* 46, 196-203 (1988).
44. Matsumoto, M.A.; Filho, H.N.; Francischone, E. & Consolaro, A.: Microscopic analysis of reconstructed maxillary alveolar ridges using autogenous bone grafts from the chin and iliac crest. *Int J Oral Maxillofac Implants* 17, 507-16 (2002).
45. Miller, S.C.; Bowman, B.M.; Smith, J.M. & Jee, W.S.: Characterization of endosteal bone-lining-cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. *Anat Rec* 198, 163-73 (1980).
46. Mullender, M. et al.: Mechanotransduction of bone cells in vitro: mechanobiology of bone tissue. *Med Biol Eng Comput* 42, 14-21 (2004).
47. Ohtsuki, T. et al.: A proteoglycan form of macrophage colony-stimulating factor that binds to bone-derived collagens and can be extracted from bone matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 190, 215-22 (1993).
48. Ohtsuki, T.; Suzu, S.; Nagata, N. & Motoyoshi, K.: A human osteoblastic cell line, MG-63, produces two molecular types of macrophage-colony-stimulating factor. *Biochem Biophys Acta* 1136, 297-301 (1992).
49. Olmsted-Davis, E.A. et al.: Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15877-82 (2003).
50. Owen, M.: Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10, 63-76 (1988).
51. Owen, M. & Friedenstein, A.J.: Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136, 42-60 (1988).
52. Owens, J.M.; Gallagher, A.C. & Chambers, T.J.: Bone cells required for osteoclastic resorption but not for osteoclastic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 222, 225-9 (1996).

53. Ricci, C. et al.: Normal age-related patterns of cellular and fatty bone marrow distribution in the axial skeleton: MR imaging study. *Radiology* 177, 83-8 (1990).
54. Strates, B.S.; Stock, A.J. & Connolly, J.F.: Skeletal repair in the aged: a preliminary study in rabbits. *Am J Med Sci* 296, 266-9 (1988).
55. Taichman, R.S. & Emerson, S.G.: The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells* 16, 7-15 (1998).
56. Taichman, R.S.; Reilly, M.J. & Emerson, S.G.: Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood* 87, 518-24 (1996).
57. Takahashi, N. et al.: Role of colony-stimulating factors in osteoclast development. *J Bone Miner Res* 6, 977-85 (1991).
58. Tavassoli, M.: Marrow adipose cells and hemopoiesis: an interpretative review. *Exp Hematol* 12, 139-46 (1984).
59. Tavassoli, M.: Fatty involution of marrow and the role of adipose tissue in hemopoiesis. In Tavassoli, M. (ed). *Handbook of the Hemopoietic Microenvironment*, Clifton, NJ; Humana Press, pp 157-187 (1998).
60. Thiel, H.; Diem, H.; Haferlach, T.: *Mikroskopische und klinische Diagnostik für die Praxis*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, Taschenatlas der Hämatologie, (2002).
61. Thomas, E.: The evolution of the scientific foundation of marrow transplantation based on human studies. In Forman, S.; Blume, K.; Thomas, E. (eds). *Bone marrow transplantation*. Boston, Blackwell Scientific, 12-16 (1994).
62. Urist, M.R.; Silverman, B.F.; Buring, K.; Dubuc, F.L. & Rosenberg, J.M.: The bone induction principle. *Clin Orthop* 53, 243-83 (1967).
63. Urist, M.: The search for and the discovery of bone morphogenetic protein (bmp). In Urist M.; O'Conner, B.; Burwell, R.G (eds). *Bone Grafts, Derivatives and Substitutes*. Oxford, Butterworth-Heinemann, 315-362 (1994).
64. Vogler, J.B., 3rd & Murphy, W.A.: Bone marrow imaging, *Radiology* 168, 679-93 (1988).
65. Welsch, Prof. Dr. Dr. Ulrich : *Sobotta/Hammersen Histologie, Farbatlas der Mikroskopischen Anatomie*, Urban & Schwarzenberg, München – Wien – Baltimore, (1994).

Danksagung

Herrn Univ. Prof. Dr. med. R. Putz, Vorstand des Lehrstuhls der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich herzlich für die Bereitstellung der erforderlichen Geräte, Instrumente, Materialien und Räumlichkeiten.

Herrn Univ. Prof. Dr. med. K.-U. Benner möchte ich sehr herzlich danken für die Überlassung des Themas, die bestmögliche Betreuung, die zahlreichen Anregungen und Ratschläge, die große Hilfe bei der Texterstellung und der Herstellung der Fotografien.

Für die unermüdliche Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate und Schnitte danke ich ganz besonders Frau Lippelt.

Herrn Thielke danke ich für die freundliche Einweisung am Rasterelektronenmikroskop und für die Vorbereitung der zu untersuchenden Präparate.

Frau Matsuura gilt mein herzlicher Dank für die Bearbeitung der Mikrocomputertomographien.

Lebenslauf

Constanze Verena Gnamm

Waldhornstr.69
82110 Germering
Tel. 089/81892428 oder 0179/2002547
Email: gnamm@freenet.de



geboren am 26.04.1973 in München
ledig

Schulbildung

1979-1983 Wittelsbacher Grundschule Germering
1983-1992 Max-Born-Gymnasium Germering
Abschluß: Abitur

Studium

Mai 1993- Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
März 1999

April 1999- Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der
Dezember 2000 Technischen Universität Dresden
Abschluß: Staatsexamen

Studienbegleitende Tätigkeit

1993-1996 Aushilfstätigkeit in der Zahnarztpraxis Dr. Klotz, Germering

Berufstätigkeit

01.04.2001- Beschäftigung als Vorbereitungsassistent in der Zahnarztpraxis
28.02.2002 Dr. Manfred Schmid, Mindelheim

01.03.2002- Beschäftigung als Vorbereitungsassistent in der Zahnarztpraxis
31.12.2004 Dr. Peter Klotz, Germering

15.01.2005-
31.03.2005 Beschäftigung als Vorbereitungsassistent in der Zahnarztpraxis
Dr. Hans - Christian Schmoltdt, Germering

seit
01.04.2005 niedergelassen in eigener Praxis, in 82110 Germering,
Landsbergerstrasse 7

Germering, 13.03.2006