

Marcus Stoetzer¹, Valeh Mirzabayli², Andreas Kampmann², Juliane Lemound², Nils-Claudius Gellrich², Constantin von See³

Auswirkung eines piezogesteuerten Periostpräparationsinstrumentes auf die Expression von BMP-2 und VEGF-A₁₆₅ unter begleitender Bisphosphonattherapie an der Ratte



Oberfeldarzt Dr. Marcus Stoetzer

(Foto: privat)

Effect of a piezo-controlled periosteum dissection instrument on the release of BMP-2 and VEGF-A₁₆₅ under bisphosphonate therapy in rats

Warum Sie diesen Beitrag lesen sollten? / Why should you read this article?

In dieser Arbeit wird dargelegt, dass sich ein positiver Effekt auf die Expression BMP-2 und VEGF-A₁₆₅ unter piezogesteuerten Periostdissektion zeigt.

This paper sets out that by the application of piezo technology takes place a positive influence on the release of BMP-2 and VEGF-A₁₆₅.

Einleitung: Das Periost spielt eine wesentliche Rolle bei der Knochenregeneration. Die Piezotechnologie ist besonders schonend bei chirurgischen Eingriffen am Knochen. Bei Patienten mit einer begleitenden Therapie mit Bisphosphonaten, kommt es leider oftmals zu den Bisphosphonat-assoziierten Nekrosen des Kiefers, wenn ein chirurgischer Eingriff am Kiefer notwendig ist. Dabei ist der Mechanismus der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose bis heute noch nicht hinreichend geklärt. Inwieweit die piezogesteuerte Periostdissektion die Faktoren BMP-2 und VEGF-A₁₆₅ beeinflusst, soll in dieser Studie geklärt werden.

Material und Methode: Adulte Lewis-Ratten wurden randomisiert in 5 Gruppen eingeteilt. Zwei Gruppen wurden mit Zolendronsäure über 6 Wochen angereichert, die anderen 3 Gruppen erhielten keine Zolendronsäure. Nach den 6 Wochen wurde im Oberkiefer ein Defekt gesetzt und dieser mittels eines Mukoperiostlappens, entweder konventionell

Introduction: The periosteum plays an essential role in bone regeneration. Piezoelectric is especially gentle during surgical interventions on the bone. Unfortunately very often patients with an accompanying therapy of bisphosphonates develop a bisphosphonate-related necrosis of the jaw if a surgical intervention on the jaw is necessary. Besides, the mechanism of the bisphosphonate-related necrosis has – to this day – not been researched well enough. To what extent piezoelectric periosteal separation influences the factors BMP-2 and VEGF-A₁₆₅, should be researched/clarified in this study.

Material and method: Adult Lewis rats were randomly divided into 5 groups. Two groups were fortified with zoledronate for more than 6 weeks, the other 3 groups received no zoledronate at all. After 6 weeks a defect was put in the upper jaw and was preserved by means of a gingiva flap, either conventionally with the raspatorium or by means of

¹ Sanitätsunterstützungszentrum Wilhelmshaven, Sanitätsversorgungszentrum Seedorf, Seedorf

² Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Hannover

³ Danube Private Universität, Abteilung für orale Chirurgie, Krems, Österreich

Peer-reviewed article: eingereicht: 26.03.2016, revidierte Fassung akzeptiert: 25.11.2016

DOI.org/10.3238/dzz.2018.4902

mit dem Raspatorium oder mittels der Piezotechnologie präpariert, verschlossen. Nach 4 Wochen erfolgte die Bestimmung des BMP-2 und VEGF-A₁₆₅ mittels der qRT-PCR.

Ergebnisse und Schlussfolgerung: Die qRT-PCR Auswertung zeigt, dass die BMP-2-Expression in den Gruppen Piezoinstrument mit Bisphosphonaten, Raspatorium mit und ohne Bisphosphonate und in der Kontrollgruppe annähernd vergleichbar sind. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich in der Gruppe Piezoinstrument ohne Bisphosphonate. Betrachtet man die Freisetzung von VEGF-A₁₆₅, so zeigt sich, dass die Kontrollgruppe vergleichbar mit den Gruppen Raspatorium und Piezoinstrument mit Bisphosphonaten ist. Ein signifikanter Unterschied besteht in der Gruppe Piezoinstrument ohne Bisphosphonate mit dem höchsten Ausschlag. Eine etwas höhere Freisetzung an VEGF-A₁₆₅ zeigt sich in der Gruppe Raspatorium ohne Bisphosphonate. Die Ergebnisse zeigen, dass sich zwar unter der Therapie mit Bisphosphonaten kein Periostpräparationsinstrument durchsetzen konnte; hier gibt es keinen Vorteil, allerdings konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung der Faktoren BMP-2 und VEGF-A₁₆₅ in der Anwendung der Piezotechnologie deutlich gesteigert wird. Dieses könnte einen positiven Effekt bei ausgedehnten Eingriffen bewirken, sei es bei der Augmentation oder bei ausgedehnten Rekonstruktionen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.

(Dtsch Zahnärztl Z 2018; 73: 29–37)

Schlüsselwörter: piezogesteuert; Periostdissektion; Kiefernekrose; BMP-2; VEGF-A₁₆₅

the piezoelectric, and then closed. After 4 weeks BMP-2 and VEGF-A₁₆₅ were identified by means of the qRT-PCR.

Results and conclusion: The qRT-PCR evaluation shows that the BMP-2 expression is roughly comparable in the groups piezo with bisphosphonates, raspatorium with and without bisphosphonates and in the control group. A significant difference appears in the group piezo without bisphosphonates. If one looks at the emission of VEGF-A₁₆₅, it appears that the control group is comparable with the groups raspatorium and piezo with bisphosphonates. A significant difference exists in the group piezo without bisphosphonates with the highest rate. A little higher emission of VEGF-A₁₆₅, appears in the group raspatorium without bisphosphonates. The results show that during the therapy with bisphosphonates no instrument was better than the other. There is no obvious advantage here. But it was shown that the liberation of the factors BMP-2 and VEGF-A₁₆₅ was significantly increased in the use of piezo. This could have a positive effect during vast interventions, be it with the augmentation or with vast reconstructions in the oral and maxillo-facial surgery.

Keywords: piezoelectric-driven; separation of the periosteum; osteonecrosis of the jaw; BMP-2; VEGF-A₁₆₅

1. Einleitung

Der Kieferknochen ist nicht vergleichbar mit den anderen Knochen im Körper. Verglichen mit anderen Knochen des Skeletts, verlaufen entzündliche Prozesse hier beschwerlicher. Aufgrund der geringeren Durchblutung des Unterkiefers im Vergleich zum Oberkiefer, die auf die Versorgung durch eine funktionelle Endarterie (Arteria alveolaris inferior) zurückzuführen ist [12], ebenso der starken kortikalen Knochenschicht, haben Medikamente ein verändertes Anreicherungspotenzial im Knochen. Auch begleitende Grunderkrankungen, beispielsweise ein Diabetes mellitus, wirken sich negativ auf den Knochenstoffwechsel und damit auch auf Vorgänge der Knochenheilung aus [1, 8, 18, 19]. Insbesondere Bisphosphonate hemmen den Metabolismus im Kieferknochen. Dieses führt bei Patienten, welche Bisphosphonate nehmen und bei denen ein kieferchirurgischer Eingriff, wie die Zahnentfernung erfolgt, zu Nekrosen des Kiefers. Bisphosphonate werden oftmals als Chemotherapeutikum bei ossär

metastasierenden Tumoren eingesetzt. Dabei weisen sie eine über Jahre dauernde Wirkung im Körper auf. Dennoch haben auch diese Patienten einen Anspruch auf eine Versorgung mit dentalen Implantaten und ggf. auf präimplantologische Eingriffe im Vorfeld, sei es zur oralen Rehabilitation oder zur ästhetischen Rehabilitation.

Eine besondere Beachtung sollte hier das Periost erfahren, da es viele regulatorische Mechanismen enthält, welche einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nehmen können.

1.1 Die Rolle des Periostes

Das Periost ist eine dem Knochen außen direkt aufliegende bindegewebige Schicht. Es besteht aus mehreren Schichten Kollagenfasern und elastischen Fasern, zwischen denen Nervenfasern und Blutgefäße verlaufen. Weiterhin befinden sich im Periost die für die Knochenneubildung verantwortlichen Osteoblasten und deren Vorläuferzellen. Das Periost wird strukturell in mehrere Schichten unterschieden: die innen ge-

legene zellreiche Schicht (Stratum osteogenicum, Kambium) mit einem feinen Netz aus Kapillaren und sensiblen Nerven sowie die äußere kollagenreiche Schicht (Stratum fibrosum), in der die elastischen Fasern verlaufen [26, 28, 29]. Das Stratum osteogenicum enthält mesenchymale Knochenstammzellen, Osteoprogenitorzellen sowie Präosteoblasten, welche sich während des gesamten Lebens zu aktiven Osteoblasten ausdifferenzieren können. Gemeinsam mit den Osteoklasten sind diese Zellen für den stetigen Knochenumbau sowie für Knochenheilungsprozesse verantwortlich [5, 26, 34, 43]. Im Periost verlaufen die Arteriae nutritiae, welche die Ernährung der Zellen des Stratum osteogenicum sichern. Die Arteriae periostales verlaufen in Volkmann- und Havers-Kanälen frei durch die Kompakta des Knochens und sorgen so für dessen Versorgung [29, 41]. Das Periost übernimmt somit die Aufgabe, den von ihm bedeckten Knochen sowie dessen Knochenmark mit Blut und Nährstoffen zu versorgen [29]. Die periostalen Blutgefäße machen hierbei 70–80 % des arteriellen

Angebotes und 90–100 % des venösen Rückstroms innerhalb des Knochens aus [7, 13]. Welche Bedeutung der Blutversorgung durch das Periost zukommt, wird besonders bei einer Unterbrechung deutlich. Wachstumsstörungen und Nekrosen können dabei die Folge sein [44, 45]. Die elastischen Fasern des Stratum fibrosum, welche als Sharpey-Fasern in die Substantia compacta des Knochens einstrahlen, stellen gemeinsam über Hemidesmosomen eine feste Verbindung zwischen Periost und Knochen her [41]. Durch diese direkte Verbindung erfüllt das Periost eine weitere Funktion als Ansatzpunkt für Bänder und Sehnen [31, 34, 41]. Eine mechanische Ablösung des Periostes führt zu einer Unterbrechung der Blutversorgung des Knochens. Des Weiteren werden bei einer mechanischen Ablösung des Periostes die der Substantia compacta direkt anliegenden Zellen teilweise zerstört. Da es sich bei diesen Zellen um Osteoprogenitorzellen, Präosteoblasten sowie ausdifferenzierte Osteoblasten handelt, die für die Knochenmodulation die entscheidende Rolle spielen, sind Frakturheilung sowie der Knochenmetabolismus beeinträchtigt. Nach ausgedehnten Ablösungen des Periostes, z.B. durch ossäre Erkrankungen, periostperforierende Abszesse und andere, erfolgt eine narbige Abheilung des Periostes. Diese Narbe hat im Vergleich zum Periost eine deutlich eingeschränkte Fähigkeit zur Knochenmodulation, da die für diesen Prozess wichtigen Zellen, die mesenchymalen Knochenstammzellen, Osteoprogenitorzellen sowie Präosteoblasten, nur eingeschränkt in der narbigen Abheilung erhalten werden können und damit nicht voll zur Verfügung stehen [17, 44, 45].

Eine schonende Operationsmethode stellt der Einsatz der Piezotechnik dar. Dass die Piezochirurgie für den Knochen schonend ist, wurde in diversen Studien nachgewiesen [14]. Eine Erweiterung stellte der Einsatz von piezoelektrisch gesteuerten Periostdissektionsinstrumenten dar.

1.2 Die Piezotechnologie

Das Einsatzgebiet von piezoelektrischen Instrumenten umfasst die Hartgewebeschirurgie, die Parodontalchirurgie, die Entfernung von impaktierten Zähnen, die Anwendung in der apikalen Chirurgie [6, 37] sowie in der Knochenexpan-

sion [39, 40] zur Osteotomie der Segmente.

Unter dem „Piezo-Effekt“ versteht man die physikalischen Wechselwirkungen in kristallinen Festkörpern. Er beschreibt die im Nanometerbereich liegende Deformation eines entsprechenden Kristalls beim Anlegen eines elektrischen Feldes. Dieser dynamische Effekt kann genutzt werden, um die longitudinale, beziehungsweise transversale Bewegung des Ferroelektrikums in eine chirurgische Schneidleistung zu transferieren. Verschiedene Frequenzeinstellungen der Piezoinstrumente erlauben ein variables Vorgehen, angepasst an unterschiedliche Knochenstärken.

Piezoinstrumente werden unter ständiger Kühlung mit steriler physiologischer Kochsalzlösung eingesetzt, weshalb eine thermische Traumatisierung bei korrekter Handhabung ausgeschlossen werden kann und die mechanische Energie über eine suffiziente Hartgewebsdurchtrennung abgeleitet wird [24]. Die Gefahr einer bakteriellen Kontamination wird wiederum durch den Effekt der Kavitation der Spülflüssigkeit minimiert. Die Ultraschallfrequenz des Piezogerätes bewirkt einen laminaren Flüssigkeitsstrom, der das Kühlmedium selbst bei dicken Kortikalisschichten und tiefen Osteotomiespalten bis zum Ort des Knochenabtrages transportiert und damit Hitzeschäden vermeidet. Durch das Zusammenspiel von Kühlmittelzuführung und den dreidimensionalen Ultraschallschwingungen wird das Blut stets von der Arbeitsspitze weggespült. Auf diese Weise wird intraoperativ eine nahezu blutfreie Sicht ermöglicht. Diese sogenannte Kavitationswirkung der Ultraschallchirurgie ist ein Vorteil gegenüber oszillierenden Sägen, die den Blutfilm lediglich im Schnitt hin- und herbewegen. Postoperativ ist die Gefahr einer Wundinfektion durch die herabgesetzte thermische Beeinträchtigung und durch die veränderte Wirkung der Spülflüssigkeit im Rahmen der piezogesteuerten Präparation vermindert [24, 32, 33].

Der Vorteil dieser Instrumente im Vergleich zu der konventionellen, mechanischen Präparation des Periostes wurde deutlich durch die Arbeit von Stoetzer et al. [35], beschrieben. Bisher liegen also Studien vor, welche zum einen zeigen, dass bei der Bearbeitung des Knochens der Einsatz von piezoelektri-

schen Instrumenten im Vergleich zu den konventionellen rotierenden Instrumenten einen deutlichen Vorteil in Richtung der Piezotechnik besitzt [20] und zum anderen, dass diese Ergebnisse auch auf die Periostpräparation übertragbar sind.

Inwieweit dieser Effekt auch die Freisetzung spezifischer Signalmoleküle des Knochens beeinflusst, ist bisher noch nicht untersucht worden. Daher soll mit der vorliegenden Studie der Einfluss eines neuen piezogesteuerten Instrumentes im Vergleich zur Periostpräparation mit einem konventionellen Raspatorium auf das BMP-2 und den VEGF-A₁₆₅ untersucht werden.

1.3 Signaltransduktion am Periost

Am lebenden Organismus sind bestimmte Wachstumsfaktoren, Polypeptide, als Signalüberträger zwischen den Zellen zuständig. Damit die Wachstumsfaktoren ihre spezifische Wirkung auf die Zielzelle ausüben können, müssen sie an zellmembrangebundene spezielle Rezeptoren migrieren und sich binden. In dieser Arbeit wurden der Vascular Endothelial Growth Factor-A₁₆₅ (VEGF-A₁₆₅) und das Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) untersucht. VEGF-A₁₆₅ entfaltet seine Wirkung vor allem in der Vaskulogenese als auch in der Angiogenese. Das Protein, das von Blutplättchen, Monozyten [36], Chondrozyten, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten [38] exprimiert wird, bindet sowohl an VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1) als auch an VEGFR-2. Durch die Bindung an den Rezeptor wird die Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten und Osteoklasten erhöht [4] und zusätzlich die Formation neuer Blutgefäße stimuliert, indem die Proliferation, Migration und Permeabilität der Endothelzellen aktiviert [23] wird. Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) sind eine Gruppe von 15 verschiedenen Signalmolekülen, welche nach der Bindung an spezifische Rezeptoren die Expression von Transkriptionsfaktoren induzieren [15, 16]. Während der Entwicklung des Körpers sind BMP vor allem an der Modellierung des embryonalen Skelettes beteiligt. Im adulten Körper sorgen sie bei der Frakturheilung für eine osteoinduktive und osteokonduktive Aktivität der pluripotenten Stammzellen [3].



Abbildung 1 Foto des Piezoinstrumentes
Figure 1 Picture of the piezoelectric device
(Abb. 1–3; Tab. 1–4: M. Stoetzer)

1.4 Hypothese

Die piezogesteuerte Periostdissektion führt zu einer gesteigerten Freisetzung von BMP-2 und VEGF-A₁₆₅ bei Ratten, welche zuvor mit Zolendronsäure behandelt wurden.

2. Material und Methode

Im Vorfeld der Studie wurde der Tierversuch bei der zuständigen Behörde (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) angezeigt und genehmigt (Az:13/1137). 130 adulte weibliche Lewis-Ratten mit einem Gewicht um die 300 g wurden randomisiert in 5 Gruppen (n = 10 Tiere für die Kontrollgruppe; n = 30 Tiere für die anderen Gruppen) eingeteilt, die randomisiert auf die Gruppen, Raspatorium, Piezoinstrument und Kontrollgruppe, verteilt wurden. 30 Tiere sind für die PCR notwendig, da bei der Probenentnahme nur geringe Mengen an RNA anfallen, sodass die Anzahl der zu untersuchenden Tiere entsprechend in der Größe angepasst wurde. Bei der Kontrollgruppe kann eine größere Probenentnahme erfolgen. Zwei Gruppen (Raspatorium und Piezoinstrument) wurden mit 1,05 µg/kg KG Zolendronsäure intraperitoneal pro Woche über 6 Wochen angereichert, die anderen 3 Gruppen (Raspatorium, Piezoinstrument und Kontrolle) erhielten keine Zolendronsäure. Um die Rate an potenziellen Nebenwirkungen aufgrund der Applikation von Zolendronsäure am Tier möglichst klein zu halten, wurde die Dosis bewusst niedrig gewählt, aber der Zeitraum über

den die Applikation erfolgte, entsprechend lang gewählt [27]. Die Kontrollgruppe wurde nicht operiert. Die übrigen 4 Gruppen wurden alle nach dem gleichen Protokoll in Narkose operiert (Ketamin-Xylazin-Narkose [Ketavet, Pfizer, 75 mg/kg KG; Xylazin, Vetpharm, 25 mg/kg KG] intraperitoneal). Es wurde mit einer diamantierten Kugel ein Defekt transgingival in der Größe von 2 × 2 mm im Oberkiefer, 5 mm hinter den Schneidezähnen gesetzt und dieser dann mittels einer lokalen Lappenplastik verschlossen. Der Mukogingivallappen wurde entweder mit dem Raspatorium (Arbeitsfläche 4 × 4 mm) oder mit einem piezoelektrischen Ansatz, nach lateral vom Defekt angebrachter Entlastungsschnitte, präpariert (Abb. 1). Beide Instrumente zeigten dabei eine vergleichbare Arbeitsfläche. Der Wundverschluss erfolgte konventionell mittels Naht (Ethicon-Vicryl, Stärke 4,0, Johnson und Johnson, Neuss, Deutschland). Postoperativ erfolgten eine Analgesie und eine Beobachtung über 4 Wochen. Nach 4 Wochen wurden die Tiere euthanasiert und aus dem zuvor operierten Bereich eine Knochenprobe mittels eines 3 mm Trepanbohrers (Ustomed Instrumente, Tuttlingen) zur Untersuchung gewonnen. Da eine vollständige ossäre Regeneration des Defektes 12 Wochen dauert, konnte der Defekt eindeutig lokalisiert werden. Der Zeitraum von 4 Wochen hat sich in anderen Studien bewährt [21]. Die Ermittlung der Expression der Signalmoleküle erfolgte mittels qRT-PCR-Nachweis und anschließender statistischer Auswertung mit SPSS (SPSS Statistics 23; IBM Deutschland) im Rahmen einer ANOVA.

2.1 Histologische Aufbereitung und Färbung

Für die Mikroskopie wurden die in Formalin fixierten Gewebeproben in Paraffin eingebettet und in 5 µm feine Schichten mittels eines Mikrotoms geschnitten. Im Anschluss wurden sie mit Hämatoxylin und Eosin entsprechend dem allgemeinen Standard für die Lichtmikroskopie (DM4000B Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) gefärbt.

2.1.2 Histologische Auswertung

Die histologischen Schnitte wurden deskriptiv verglichen und beurteilt. Die

Auswertung erfolgte mithilfe des Lichtmikroskops Leica DM4000 B (Leica Camera AG, Solms, Deutschland). Dabei wurde eine deskriptive Beschreibung vorgenommen:

- Gruppe 1: n = 10 Kontrollgruppe ohne Bisphosphonate
- Gruppe 2: n = 30 Bisphosphonat, plastische Deckung mit dem Piezoinstrument
- Gruppe 3: n = 30 Bisphosphonat, plastische Deckung mit dem Raspatorium
- Gruppe 4: n = 30 kein Bisphosphonat, plastische Deckung mit dem Piezoinstrument
- Gruppe 5: n = 30 kein Bisphosphonat, plastische Deckung mit dem Raspatorium.

2.2 Quantitative PCR-Analyse der BMP-2- und VEGF-A₁₆₅-Expression im Oberkiefer von Ratten

Für die Analyse wurde isolierte RNA zunächst durch reverse Transkription in DNA umgeschrieben und dann spezifisch mittels Realtime-PCR auf die Expression von spezifischen Genen untersucht. Die der Analyse vorausgehende reverse Transkription ist ein Verfahren, bei dem einzelsträngige RNA in *copy DNA* (cDNA) transkribiert wird. Die Reaktion wurde unter Verwendung von Gesamtzell-RNA, einem reversen Transkriptase-Enzym, Random Primern, dNTPs und einem RNase-Inhibitor durchgeführt. Die folgende Realtime-PCR enthielt spezifische Primer, die das entsprechende Gen hochselektiv erkannten und amplifizierten. Die so entstandenen selektiven doppelsträngigen DNA-Moleküle, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) quantifiziert wurden, erlaubten so Rückschlüsse auf das Expressionsniveau des Gens in der entsprechenden Probe.

Für die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR wurde die RNA aus den Rattenknochenproben nach Kryofixierung in flüssigem Stickstoff mit peqGoldRNAPure (peqlab, Erlangen, Deutschland) und mit Roche High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert und gereinigt. Eine Probenmenge von 100 mg wurde extrahiert und final in einem 100 µl Volumen-nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde durch

Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm ermittelt. Nach der Isolation standen für die Kontrollgruppe 3,705 µg RNA, für die Gruppe Raspatorium ohne Bisphosphonat 4,879 µg RNA, Raspatorium mit Bisphosphonat 3,714 µg RNA, für die Gruppe Piezo ohne Bisphosphonat 6,249 µg RNA und für Piezo mit Bisphosphonate 3,826 µg RNA zur Verfügung.

Reste genomischer DNA wurden durch DNase-Verdau entfernt. Zusätzlich wurde die Reinheit der RNA elektrophoretisch in einem 1 %igen denaturierenden Formaldehydgel überprüft.

Für eine RT-Reaktion wurde die RNA mit RNase freier DNase behandelt und zuerst bei 70°C inkubiert, um die RNA-Sekundärstruktur zu denaturieren, und dann schnell auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Applikation des Reaktionsgemischs zu jeder Probe. Die Synthese und Elongation der cDNA während der RT-Reaktion wurde dann bei 37°C innerhalb einer Inkubationszeit von 60 min durchgeführt. Die Reaktion wurde anschließend durch eine Hitzeinaktivierung bei 95°C für 5 min beendet. Alle Reagenzien wurden von Invitrogen bezogen.

Die Reverse Transkription (RT) wurde in einem finalen Reaktionsvolumen von 20 µl mit einer Konzentration von 1 µg Gesamt-RNA durchgeführt. Verwendet wurde eine rekombinante M-MLV reverse Transkriptase und Oligo (dT) Primer (Primer Ltd., Southampton, Großbritannien), die gemäß Herstellerangaben eingesetzt wurden.

2.2.1 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Das Verfahren der Realtime-PCR bietet die Möglichkeit der DNA-Amplifikation in Kombination mit Analyse und Quantifizierung des PCR-Produkts. Durch Zugabe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes, kann die Amplifikation der PCR-Produkte in Echtzeit verfolgt und berechnet werden. Unter idealen Bedingungen erfolgt die Amplifikation der PCR-Produkte exponentiell, sodass die Signalintensität in jedem Zyklus der PCR-Reaktion ansteigt. Die Realtime-PCR wurde unter Verwendung des PrecisionPLUS™ Mastermix (Primer Ltd., Southampton, Großbritannien), einer Primerkonzentration von je 0,3 mM (Endkonzentration) und dem Einsatz von 25 ng cDNA durchgeführt. Für die

Test bei gepaarten Stichproben BMP-2							
		Gepaarte Differenzen					T
		Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	95%-Konfidenzintervall der Differenz		
					Untere	Obere	
Paar 1	Kontroll-RoBP	-0,26500	2,32914	0,82347	-2,21221	1,68221	-0,322
Paar 2	Kontroll-PoBP	-4,12000	2,52305	0,89203	-6,22932	-2,01068	-4,619
Paar 3	RBP-PBP	-0,19500	3,57014	1,26224	-3,17971	2,78971	-0,154
Paar 4	RoBP-PoBP	-3,91778	1,98233	0,66078	-5,44153	-2,39403	-5,929
Paar 5	Kontroll-RBP	0,68125	3,36911	1,19116	-2,13540	3,49790	0,572
Paar 6	Kontroll-PBP	0,48625	3,09782	1,09525	-2,10360	3,07610	0,444

Tabelle 1 ANOVA bei gepaarten Stichproben BMP-2

Table 1 Paired sample of BMP-2

Signifikanz BMP-2			
		df	Sig. (2-seitig)
Paar 1	Kontroll-RoBP	7	0,757
Paar 2	Kontroll-PoBP	7	0,002
Paar 3	RBP-PBP	7	0,882
Paar 4	RoBP-PoBP	8	0,000
Paar 5	Kontroll-RBP	7	0,585
Paar 6	Kontroll-PBP	7	0,670

Tabelle 2 Signifikanz BMP-2

Table 2 Significance BMP-2

Amplifikation der Targetsequenzen wurden folgende Primer für VEGF₁₆₅, BMP-2 und die quantitative Referenz GAPDH (*housekeeping gene*) verwendet:

- VEGF F: 5, GCAGACCAAAGAAAGATAGAACAA 3;
- VEGFR: 5, ACAGTGAACGCTCCAGAT 3,
- die Länge des DNA-Amplifikates beträgt 113 bp
- BMP-2 F: 5, GTCCTTTTCCCCTGGCTGAT 3;
- BMP-2 R: 5, TCTAGGTACAACATGAGATTGC 3,
- die Länge des DNA-Amplifikates beträgt 139 bp
- GAPDH F: 5, AACCTGCCAAGTATGATGACATCA 3;

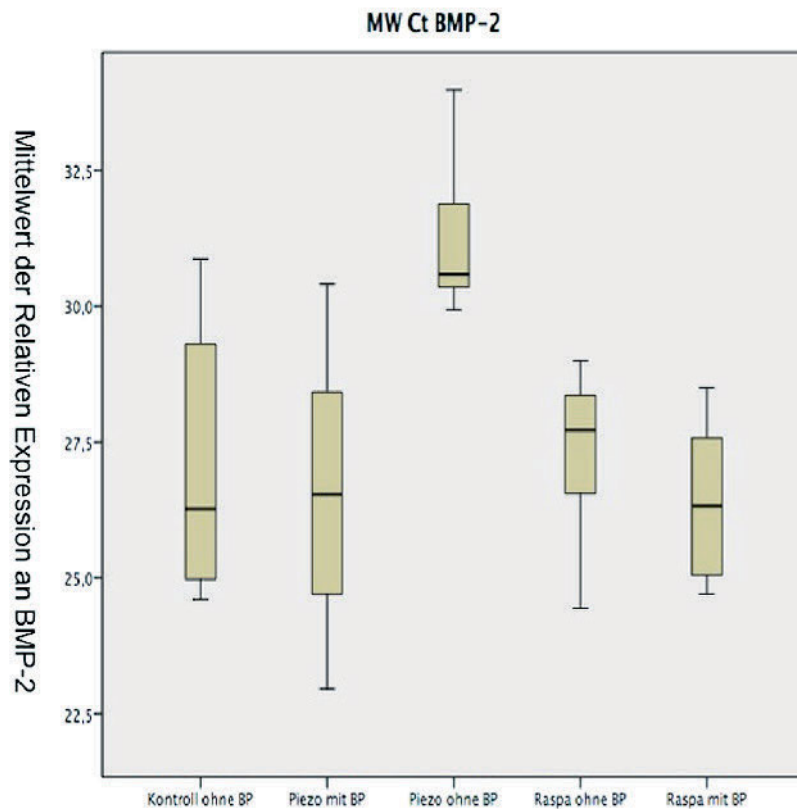
- GAPDH R: 5, TGGTGAAGTCACAGGAGACAACCT 3,
- die Länge des DNA-Amplifikates beträgt 121 bp.

Alle verwendeten Primer wurden durch Primerdesign Ltd (Southampton, Großbritannien) synthetisiert.

Die quantitative PCR wurde unter Verwendung eines LightCycler 480 nm, 1,5, 2.0 (Roche Diagnostics) in 50 Zyklen durchgeführt [42]. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch Schmelzkurven und Elektrophorese bestätigt.

2.2.2 Datenanalyse der quantitativen Realtime-PCR

Es gibt mehrere Methoden, um das Expressionsniveau eines Gens mit Echt-

**Abbildung 2** Ergebnisse BMP-2**Figure 2** Results BMP-2

Test bei gepaarten Stichproben VEGF-A ₁₆₅							
		Gepaarte Differenzen					T
		Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	95%-Konfidenzintervall der Differenz		
					Untere	Obere	
Paar 1	Kontroll-RoBP	1,18500	2,91242	1,02970	-1,24985	3,61985	1,151
Paar 2	Kontroll-PoBP	-1,45500	2,98421	1,05508	-3,94986	1,03986	-1,379
Paar 3	RBP-PBP	-0,20875	2,32297	0,82130	-2,15081	1,73331	-0,254
Paar 4	RoBP-PoBP	-2,48778	2,16360	0,72120	-4,15087	-0,82469	-3,449
Paar 5	Kontroll-RBP	2,55375	3,07244	1,08627	-0,01488	5,12238	2,351
Paar 6	Kontroll-PBP	2,34500	3,24936	1,14882	-0,37153	5,06153	2,041

Tabelle 3 ANOVA bei gepaarten Stichproben VEGF-A₁₆₅**Table 3** Paired sample of VEGF-A₁₆₅

zeit-PCR zu quantifizieren. In einer absoluten Quantifizierung wird die genaue Anzahl der DNA-Moleküle anhand einer Standardkurve berechnet. In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein Näherungsverfahren ver-

wendet, das als relative Quantifizierung bekannt ist. Bei der relativen Quantifizierung nach der $\Delta\Delta Ct$ Methode wird das analysierte Gen anhand der konstanten Expression eines endogenen *housekeeping genes* normalisiert. *House-*

keeping-Gene zeichnen sich durch einen besonders konstanten Expressionslevel aus und beschreiben so das Basisniveau der Genexpression einer Zelle. In Referenz zu dem Expressionslevel des *Housekeeping*-Gens können Veränderungen in der Genregulation und -expression von bestimmten Genen quantitativ berechnet werden (Applied Biosystems; User Bulletin # 2.: Die relative Quantifizierung der Genexpression, PN 4.303.859).

3. Ergebnisse qRT-PCR

Die Ergebnisse für das BMP-2 zeigen, dass die Expression in den Gruppen Kontroll, RoBP, RBP und PBP nicht sehr unterschiedlich waren. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zeigt sich beim Vergleich der Gruppe Kontroll zu PoBP ($p: 0,002$) und PoBP zu RoBP ($p: 0,000$). Lediglich in der Gruppe Piezoinstrument ohne Bisphosphonate (PoBP) zeigte sich ein Unterschied zu den anderen Gruppen (MW 30,67). Die Kontrollgruppe stellte die Tiere dar, welche nicht operiert wurden und nach der Stehzeit analog zu den operierten Tieren euthanasiert und untersucht wurden. Dabei zeigte sich, dass die BMP-2-Expression in den Gruppen Piezoinstrument mit Bisphosphonaten (PBP; MW 26,58), Raspatorium mit (RBP; MW 26,81) und ohne Bisphosphonate (RoBP; MW 27,80) und in der Kontrollgruppe (MW 27,08) annähernd vergleichbar sind. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich in der Gruppe Piezoinstrument ohne Bisphosphonate (Tab. 1, 2; Abb. 2).

Betrachtet man die Freisetzung von VEGF-A₁₆₅, so zeigt sich, dass die Kontrollgruppe (MW 30,30) vergleichbar mit den beiden Instrumentgruppen unter Bisphosphonaten (RBP; MW 28,00/PBP; MW 27,95) ist. Ein signifikanter Unterschied besteht in der Gruppe Piezoinstrument ohne Bisphosphonate (PoBP; MW 31,57) (Tab. 3 u. 4; Abb. 3). Die Gruppe Raspatorium ohne Bisphosphonate (RoBP) ist in der Expression an VEGF-A₁₆₅ vergleichbar mit der Kontrollgruppe (RoBP; MW 29,26/ Kontroll MW 30,29). Die beiden Bisphosphonatgruppen (PBP und RBP) bleiben in der Expression an VEGF-A₁₆₅ sogar unter der Kontrollgruppe (RBP; MW 28,00/PBP; MW 27,95).

Signifikanz VEGF-A ₁₆₅			
		df	Sig. (2-seitig)
Paar 1	Kontroll-RoBP	7	0,288
Paar 2	Kontroll-PoBP	7	0,210
Paar 3	RBP-PBP	7	0,807
Paar 4	RoBP-PoBP	8	0,009
Paar 5	Kontroll-RBP	7	0,051
Paar 6	Kontroll-PBP	7	0,081

Tabelle 4 Signifikanz VEGF-A₁₆₅

Table 4 Significance VEGF-A₁₆₅

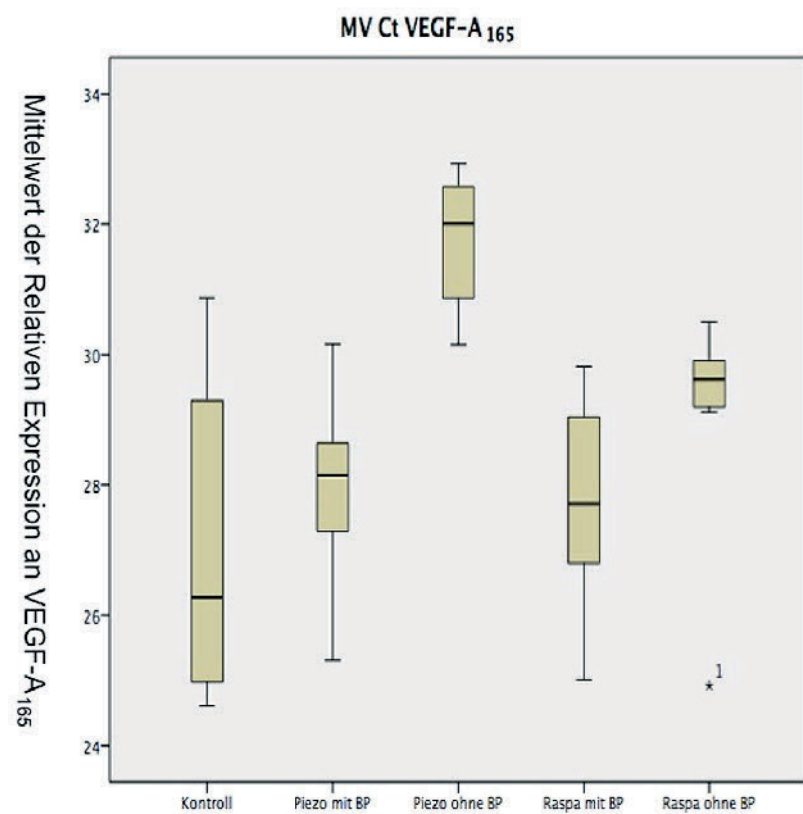


Abbildung 3 Ergebnisse VEGF-A₁₆₅

Figure 3 Results VEGF-A₁₆₅

3.1 Ergebnisse Histologie

Die Auswertung erfolgte in 5-facher Vergrößerung. Dabei zeigte sich im direkten Vergleich, dass in der Anwendung des piezogesteuerten Instrumentes der Defekt im Vergleich zu der Periostpräparation mit dem Raspatorium kleiner war. Weiterhin zeigte sich die Integrität des

knochenbedeckenden Weichgewebes als geordneter (Abb. 4).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass BMP-2 und VEGF-A₁₆₅ am Interface Knochen/Pe-

riost unter Bisphosphonaten eine geringere Expression aufwiesen.

Damit decken sich unsere Ergebnisse nicht mit den Ergebnissen von Im et al. [17], allerdings handelte es sich dabei auch um In-vitro- und nicht In-vivo-Versuche, sodass ein direkter Vergleich schwierig erscheint. Dass durch die Präparation mit dem Piezoinstrument bei den Tieren ohne Bisphosphonate ein signifikanter Unterschied zu der Präparation mit dem Raspatorium besteht, kann mitunter an der Schwingung durch das Piezoinstrument liegen. Einen Zusammenhang zwischen der Piezoschwingung beziehungsweise durch die alleinige Ultraschallschwingung und der Knochenheilung wurde durch Bergonse et al. und Evrigen et al. [2, 9] gezeigt. Somit lässt sich nicht ausschließen, dass auch hier eine gewisse positive Beeinflussung durch die Piezoschwingung erfolgt ist. Dass durch die Periostpräparation die BMP-2-Expression beeinflusst wird, konnte durch die Arbeitsgruppe um Sotobori et al. [33] bestätigt werden, wenn auch nicht die alleinige Periostpräparation im Fokus der Studie stand.

Betrachtet man die Ergebnisse der PCR für die Expression des VEGF-A₁₆₅, so sind die Ergebnisse vergleichbar mit den Ergebnissen für das BMP-2. Auch hier war es so, dass die VEGF-A₁₆₅-Expression am meisten innerhalb der Gruppe „Piezoinstrument ohne Bisphosphonat“ (PoBP) gefunden wurde. Die Gruppen „Raspatorium ohne und mit Bisphosphonat“ (RoBP, RBP), „Piezoinstrument mit Bisphosphonat“ (PBP) und die Kontrollgruppe (Kontroll) unterscheiden sich nur wenig. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Studien von Santini et al. [25, 30], der die Theorie vertritt, dass die VEGF-Produktion unter der Einwirkung von Zolendronat, einem Bisphosphonat, deutlich reduziert wird. Betrachtet man die Ergebnisse der VEGF-A₁₆₅-Expression in den Gruppen ohne Bisphosphonate, so zeigt sich, dass durch die Anwendung der Piezoschwingung mehr VEGF-A₁₆₅ gemessen werden konnte. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Untersuchungen von Esteves et al. [9], die eine vermehrte VEGF-A₁₆₅-Menge bei der Periostdissektion festgestellt haben. VEGF ist für den Erhalt der Endothelzellen verantwortlich. Endothelzellen tragen, wie Osteoblasten, einen spezifischen Rezeptor, der sich in Anlehnung an Ferrara et al. und

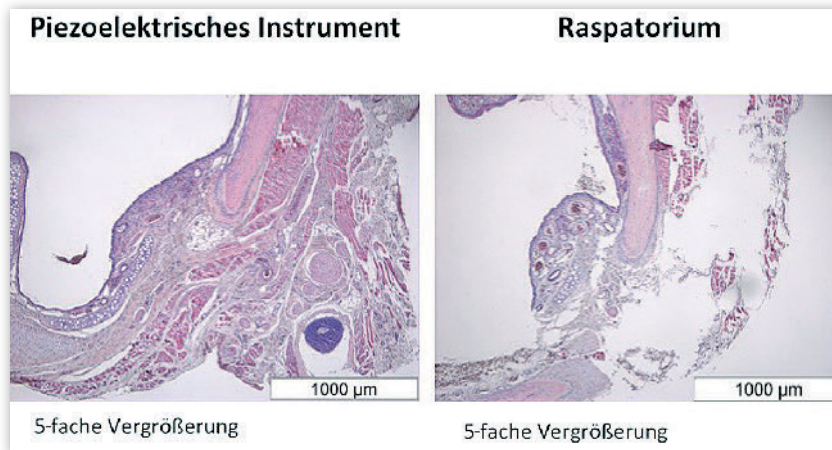


Abbildung 4 Histologische Darstellung des operierten Bereiches

Figure 4 Histological examination of the area of interest

Matos et al. [11, 22] bestimmen lässt. Osteoblasten induzieren die Angiogenese bei der Knochenneubildung. Unsere Ergebnisse entsprechen den Erwartungen für einen gesunden Knochenstoffwechsel, in diesem Fall möglicherweise induziert durch die Piezoschwingung.

In der quantitativen Betrachtung der histologischen Schnitte konnte festgestellt werden, dass der mit dem piezoelektrischen Instrument operierte Bereich sich deutlich homogener darstellte, im Vergleich zu dem mit dem Raspatorium operierten Bereich (Abb. 4). Zu beachten ist dennoch, dass es sich hierbei um keine spezifische Färbung für das BMP-2 und den VEGF-A₁₆₅, sondern lediglich um eine Darstellung der histologischen Situation handelt.

5. Fazit

Die Arbeitshypothese hat sich nicht bestätigt. Unter der Gabe von Bisphosphonaten kommt es zu keiner gesteigerten

Freisetzung von BMP-2 und VEGF-A₁₆₅. Allerdings zeigt sich, dass die Freisetzung von BMP-2 und VEGF-A₁₆₅ ohne begleitende Therapie mit Bisphosphonaten in der Anwendung der piezogesteuerten Periostdissektion deutlich gesteigert ist.

6. Ausblick

Dass die Expression von BMP-2 und VEGF-A₁₆₅ unter Bisphosphonaten vermindert ist, wird weiter untersucht. Hier gilt es die genauen Mechanismen zu verstehen, damit die Inzidenz der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrosen möglicherweise gesenkt werden kann.

Dass durch die Anwendung der Piezotechnologie die Expression von BMP-2 und VEGF-A₁₆₅ ansteigt, ist sehr interessant. Wir vermuten aktuell, dass dieser Effekt eher als eine positive Stimulation, in Anlehnung an die bisher bekannten Studien zum positiven Ein-

fluss der Ultraschallschwingung, zu werten ist und nicht auf einen Reparaturmechanismus zurückzuführen ist. Dass die Anwendung der Piezotechnik auf den Knochen positiv ist, konnten bereits andere Studien belegen [10, 14, 33], weshalb wir hier durchaus einen Zusammenhang sehen. Es bleibt abzuwarten, inwieweit die Piezotechnologie noch weiter eingesetzt werden kann und ob die ersten Daten aus den Studien über den positiven Effekt der Ultraschallschwingung auf die Knochenheilung auf die Piezotechnologie übertragen werden können. Hier sind sicherlich noch weitere Studien notwendig, welche bereits in der Durchführung sind. In einer weiteren Studie konnte mittels spezifischer Knochenfärbung nachgewiesen werden, dass die Piezoschwingung den Knochen wachsen lässt. Die Daten sind gerade in der Endauswertung. D77

Förderung: Die Studie wurde durch die Niedersächsische Krebsgesellschaft gefördert.

Interessenkonflikt: Die Autoren erklären, dass kein Interessenkonflikt im Sinne der Richtlinien des International Committee of Medical Journal Editors besteht.

Korrespondenzadresse

Oberfeldarzt Dr. Marcus Stoetzer
Sanitätsunterstützungszentrum
Wilhelmshaven
Sanitätsversorgungszentrum Seedorf
Twistenberg 120
27404 Seedorf
marcusstoetzer@bundeswehr.org

Literatur

1. Bartl R, von Tresckow E, Bartl C: Bisphosphonat-Manual. Springer Verlag, Berlin, New York, Heidelberg 2006
2. Bergonse Pereira Pedriali MB, Trevisan W Jr. et al.: Bone regeneration in rat femoral defects after osteotomy with surgical ultrasound. *Minerva Stomatol* 2016; 65: 1–10
3. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS et al.: Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 1995; 13: 357–367
4. Carano RA, Filvaroff EH: Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 2003; 8: 980–989
5. Chanavaz M: Anatomy and histophysiology of the periosteum: quantification of the periosteal blood supply to the adjacent bone with 85Sr and gamma spectrometry. *J Oral Implantol* 1995; 21: 214–219
6. Claes LE, Heigele CA: Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *J Biomech* 1999; 32: 255–266
7. Cornelissen AM, Maltha JC, Von den Hoff HW, Kuijpers-Jagtman AM: Palatal mucoperiosteal wound healing in the rat. *Eur J Oral Sci* 1999; 107: 344–351
8. Diel IJ, Fogelman I, Al-Nawas B et al.: Pathophysiology, risk factors and ma-

- agement of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Is there a diverse relationship of amino- and non-aminobisphosphonates? *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64: 198–207
9. Esteves JC, Marcantonio E Jr., de Souza Faloni AP et al.: Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling – histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. *J Transl Med* 2013; 23: 11: 221
 10. Evirgen S, Kamburoglu K: Review on the applications of ultrasonography in dentomaxillofacial region. *World J Radiol* 2016; 8: 50–58
 11. Ferrara N, Alitalo K: Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Na tMed* 1999; 5: 1359–1364
 12. Graber G: Psychomotorik und frontolateraler Bruxismus. *Dtsch Zahnärztl Z* 1980; 35: 592–594
 13. Graumann WS, Sasse D: CompactLehrbuch der gesamten Anatomie: in 4 Bänden. Schattauer, Stuttgart 2004
 14. Gülnahar Y, Hüseyin Köşger H, Tutar Y: A comparison of piezosurgery and conventional surgery by heat shock protein 70 expression. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2013; 42: 508–510
 15. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P: TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465–471
 16. He B, He G, Zheng X, Li L, Li M, Xia H: Inhibitory effect of bone morphogenetic protein-2 on the proliferation of giant cell tumor of bone stromal cells in vitro. *Exp Ther Med* 2016; 11: 309–314
 17. Im G, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS: Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004; 25: 4105–4115
 18. Kasahara T, Imai S, Kojima H et al.: Malfunction of bone marrow-derived osteoclasts and the delay of bone fracture healing in diabetic mice. *Bone* 2010; 47: 617–625
 19. Kayal RA, Alblowi J, McKenzie E et al.: Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. *Bone* 2009; 44: 357–363
 20. Mahaczek-Kordowska A: Development of the mandible and its vascularization in human fetuses in light of morphologic, microangiographic and gnathometric studies. *Ann Acad Med Stetin* 1995; 41: 29–42
 21. Mardas N, Busetti J, de Figueiredo JA, Mezzomo LA, Scarparo RK, Donos N: Guided bone regeneration in osteoporotic conditions following treatment with zoledronic acid. *Clin Oral Implants Res* 2016, Feb 26
 22. Matos FR, Nonaka CF, Miguel MC, Galvão HC, de Souza LB, Freitas Ride A: Immunoeexpression of MMP-9, VEGF, and vWF in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. *J Oral Pathol Med* 2011; 40: 338–344
 23. Matsumoto T, Mugishima H: Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 2006; 13: 130–135
 24. Metzger MC, Bormann KH, Schoen R, Gellrich NC, Schmelzeisen R: Inferior alveolar nerve transposition – an in vitro comparison between piezosurgery and conventional bur use. *J Oral Implantol* 2006; 32: 19–25
 25. Mundy G, Garrett R, Harris S et al.: Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999; 286: 1946–1949
 26. Ortak T, Ozdemir R, Uysal A et al.: Osteogenic capacities of periost grafts, periost flaps and prefabricated periosteal flaps: experimental study. *J Craniofac Surg* 2005; 16: 594–600
 27. Pataki A, Müller K, Green JR, Ma YF, Li QN, Jee WSS: Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during and after treatment. *Anat Rec* 1997; 249: 458–468
 28. Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G et al.: Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2893–2897
 29. Santini D, Vincenzi B, Hannon RA et al.: Changes in bone resorption and vascular endothelial growth factor after a single zoledronic acid infusion in cancer patients with bone metastases from solid tumours. *Oncol Rep* 2006; 15: 1351–1357
 30. Schaser KD, Zhang L, Haas NP, Mittlmeier T, Duda G, Bail HJ: Temporal profile of microvascular disturbances in rat tibial periosteum following closed soft tissue trauma. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 388: 323–330
 31. Schiebler TH, Korf HW: Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. 10th ed., Springer, Berlin 2007
 32. Schlee M, Steigmann M, Bratu E, Garg AK: Piezosurgery: basics and possibilities. *Implant Dent* 2006; 15: 334–340
 33. Sotobori M, Ueki K, Ishihara Y et al.: Bone regeneration by periosteal elevation using conventional orthodontic wire and uHA/PLLA mesh. *J Cranio-maxillofac Surg* 2014; 42: 1742–1714
 34. Squier CA, Ghoneim S, Kremenak CR: Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *J Anat* 1990; 171: 233–239
 35. Stoetzer M, Felgenträger D, Kampmann A et al.: Effects of a new piezoelectric device on periosteal microcirculation after subperiosteal preparation; *Microvascular Research* 2014; 94: 114–118
 36. Street JT, Wang JH, Wu QD, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP: The angiogenic response to skeletal injury is preserved in the elderly. *J Orthop Res* 2001; 19: 1057–1066
 37. Stubinger S, Landes C, Seitz O, Zeilhofer HF, Sader R: Ultrasonic bone cutting in oral surgery: a review of 60 cases. *Ultraschall Med* 2008; 29: 66–71
 38. Uchida S, Sakai A, Kudo H et al.: Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone* 2003; 32: 491–501
 39. Utvag SE, Grundnes O, Reikeraas O: Effects of periosteal stripping on healing of segmental fractures in rats. *J Orthop Trauma* 1996; 10: 279–284
 40. Vercellotti T, De Paoli S, Nevins M: The piezoelectric bony window osteotomy and sinus membrane elevation: introduction of a new technique for simplification of the sinus augmentation procedure. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21: 561–567
 41. Vercellotti T: Technological characteristics and clinical indications of piezoelectric bone surgery. *Minerva Stomatol* 2004; 53: 207–214
 42. Wellmann S, Taube T, Paal K et al.: Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by Light-Cycler technology. *Clin Chem* 2001; 47: 654–660
 43. Welsch U: Lehrbuch Histologie. Elsevier ed., Urban und Fischer, München 2010
 44. Zamarioli A, Maranhao DA, Butzloff MM, Moura PA, Volpon JB, Shimano AC: Anatomic changes in the macroscopic morphology and microarchitecture of denervated long bone tissue after spinal cord injury in rats. *Biomed Res Int* 2014; 853159
 45. Zilles KT, Tillmann BN: Anatomie. www.springer.com/medicine/ (letzter Zugriff am 11.03.2014)