5. Diskussion

5.1. Diskussion von Material, Methode und Technik

5.1.1. Auswahl der Schnittserien

Da menschliches embryologisches und fetales Studienmaterial rar ist, ist diese Studie als ein kleiner begrenzter Beitrag der morphologischen Entwicklung anzusehen. Jedes der neun untersuchten Embryonen ist ein Momentbild des kontinuierlichen Entwicklungsprozesses. Für allgemein gültige Aussagen müßte eine größere Anzahl einzelner Schnittserien in selben Entwicklungsstadien untersucht werden.

5.1.2. Alter und Körpergröße der Embryonen

Das genaue Alter der Studienobjekte ist in der embryologischen Forschung aus verständlichen Gründen schwer zu bestimmen. Daher versuchen einzelne Autoren den Reifegrad und das Alter auf indirektem Weg, anhand verschiedener Messungen, zu ermitteln.
Das am häufigsten verwendete Maß, welches auch in der vorliegenden Arbeit für die Bestimmung von Alter und Größe herangezogen wurde, ist die Scheitel-Steiß-Länge (SSL). Diese Methode findet vielfältige Anwendung (HINRICHSEN 1990) und bietet daher den Vorteil des Vergleichs mit anderen Studien.
Allerdings ist zu beachten, dass die individuelle Krümmung der Embryonen, die in unseren Untersuchungen miteinbezogen wurde, oft nicht berücksichtigt wird
(K. L. MOORE 1977, HINRICHSEN 1990).
Um Meßfehler möglichst klein zu halten, sollte laut GOODMANN u. STERN (1972) und MONTAGNON (1987), neben der Scheitel-Steiß-Länge zusätzlich das Alter in Tagen nach Konzeption genannt werden. Dies ist unserer Ansicht nach in praxi wohl kaum durchführbar.

O`RAHILLY und GARDNER (1978) verwendeten die Einteilung der Carnegie Stadien, die sich nach äußeren Formmerkmalen richtet. DEUTSCH et al. (1981) bestimmten das embryologische Alter anhand der Länge des Femurs, der Mandibula und der Kronenlänge der ersten oberen Inzisivi. Auch röntgenologische Altersbestimmungen wurden anhand der Anzahl verknöcherter Hand- und Fußknochen durchgeführt (KJAER 1974). Da bei dem vorliegendem Studienmaterial in den meisten Fällen der Rumpf vom Kopf abgesetzt war, konnten diese Möglichkeiten der Einteilung im Nachhinein nicht mehr angewendet werden.
Durch die Vielzahl verschiedener Methoden, die nicht miteinander kompatibel sind, ist es schwierig das Alter der Embryonen zu vergleichen. Trotz gleichen Alters kann die Körpergröße in den ersten Wochen stark voneinander abweichen (STARCK 1975). Genauso korreliert auch der Reifegrad der Entwicklung nicht immer mit der Scheitel-Steiß-Länge (MONGINI 1987, TAKENOCHITA 1987).
Abweichende Angaben über das Auftreten erster Ossifikationszentren in dieser Studie (z.B. Maxilla) müssen unter diesen Aspekten entsprechend bewertet werden.
In der vorliegenden Studie wurden erste Ossifikationszentren bei einer SSL von 19 mm entdeckt.

5.1.3. 3D-Technik

Unter der Verwendung von 3D-Rekonstruktionstechniken ist es möglich einen zeitlich umschriebenen Wachstumsprozess anatomischer Objekte auch räumlich darzustellen. Missverständliche oder fehlerhafte Ergebnisse durch 2D-Darstellungen können somit verhindert werden (WILLIAMS 1923, RADLANSKI 1995). Da Entwicklung und Wachstum räumlich und zeitlich definierte Vorgänge sind, ist die Methoden der 3D-Darstellung zwingend erforderlich und liefert präzisere Ergebnisse als einzelne histologische Schnitte in der 2D-Ebene.
Es sind verschiedene Techniken der 3D-Rekonstruktion möglich. BORN (1883) rekonstruierte seine Objekte anhand von Wachsplatten. Diese Methode wurde durch BLECHSCHMIDT (1960) modifiziert.

Heute werden computergestützte 3D-Programme zur Rekonstruktion histologischer Schnittserien angewandt (RADLANSKI und JÄGER 1992, LANGE 1999).
In der vorliegenden Studie wurden die Rekonstruktionen mit dem Programm Analysis© (SIS, Münster, Germany) erstellt. Virtuelle Rekonstruktionen mit zeitgemäßen, leistungsfähigen Rechnern sind im Ergebnis mit 3D-Modellen vergleichbar. Dennoch können durch die computergestützte Wiedergabe einzelne anatomische Strukturen zugunsten einer genaueren Betrachtung entfernt oder transparent gemacht und nach anatomischen Regeln virtuell geschnitten werden. Das Foramen infraorbitale, das sich beim Embryo der SSL 250 mm vollständig zeigt, ist nur durch „Entfernung“ des Gefäßnervenkomplexes gut zu erkennen.
Die 3D- Rekonstruktionstechnik dient als vorteilhafte Methode, einen anschaulichen Einblick in den komplexen Entwicklungsprozeß des craniofazialen Systems zu liefern. Abstände, Zusammenhänge oder auch Wechselwirkungen benachbarter Strukturen, welche bei den rekonstruierten Embryonen der SSL 25 mm und 117 mm zu erkennen sind, werden durch diese Methode besser beurteilbar.
Eine automatische Rekonstruktion gescannter histologischer Schnitte ist durch deren Komplexität und durch die Schwierigkeit der Unterscheidung einzelner Gewebsarten bisher noch nicht möglich bzw. sehr ungenau.
In der kranialen Ansicht des Embryos der SSL 25 mm zeigt sich ein auffällig paralleler Verlauf der knorpeligen Nasenkapsel, der Maxilla und des Nervus infraorbitalis. Eine Abhängigkeit dieser drei Strukturen ist zu vermuten. Betrachtet man sich im Gegensatz dazu nur einzelne histologische Schnitte, so ist diese räumlich parallele Anordnung der Strukturen nicht zu erfassen.
Ebenso ist bei dem Embryo der SSL 117 mm zu erkennen, dass sich die Knochenstruktur der Maxilla an jenen Bereichen wo sie an benachbarte Strukturen angrenzt sehr kompakt zeigt. Im Gegensatz dazu wirken die anderen „freien“ Knochenflächen zerklüftet und sind mit vielen Knochenvorsprüngen versehen.
Für die Zukunft liefern morphologische Studien wie diese ein Grundgerüst, auf das weitere molekularbiologische Studien aufgebaut werden können.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Entwicklung der Maxilla

Einer der ersten ossifizierenden und kalzifizierenden Knochen des menschlichen Körpers ist die Maxilla (CARLSON 1984). Der Zeitpunkt des ersten Ossifikationszentrums wird bei den Autoren unterschiedlich angegeben. Diese Angaben hängen mit der Individualität der einzelnen Embryonen zusammen. Einige nennen das Ende der 6. Woche als Zeitpunkt der ersten Verknöcherung (W.J. MOORE 1974, CARLSON 1984, ENLOW 1989, SCHRÖDER 1987, KJAER 1989a), andere den Anfang der 7. Woche (SPERBER 1989, BOLLOBAS 1984, LANGE 1999). Zweites entspricht etwa einer SSL von 19 mm und stimmt mit dem Ergebnis unserer Studie überein.

In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich das erste Ossifikationszentrum kaudal des Nervus infraorbitalis in der Region des späteren Milcheckzahns und ersten Milchmolaren. Dieses Ergebnis der Lage korreliert mit denen von MALL (1906), SCHRÖDER (1987), SPERBER (1989) und SPERBER (1990). Auffällig ist, dass weitere Ossifikationszentren der Maxilla auch nahe am Ausbreitungsgebiet des schon bestehenden Nervus trigeminus liegen. KJAER (1990) weist auf einen engen Zusammenhang der Ossifikationszentren mit bestehenden Nervenästen und später auftretenden Foramina hin („Neuroosteologie“). Da unserer Studie nur eine Teilregion des Oberkiefers wiedergibt, kann diese Aussage nur bezüglich des Foramen infraorbitale bestätigt werden.

Die vier vorliegenden 3D-Rekonstruktionen zeigen ein charakteristisches räumliches Verhältnis von Knochen und Nerven und lassen ein Zusammenspiel dieser beiden Gewebsarten tatsächlich vermuten. Dadurch stellt sich die Frage, ob der Nervenverlauf die Formgebung des Knochens beeinflusst. Wenn dies der Fall ist kann vermutet werden, dass die Nervenzellen Botenstoffe aussenden und die Knochenbildung dadurch in bestimmter Weise lenken. Um eine klare Erkenntnis bezüglich dieser Vorgänge zu erlangen wird deutlich, wie wichtig es ist, Untersuchungen der Morphologie und der Molekularbiologie zusammenzuführen.

5.2.2 Entwicklung des Foramen infraorbitale

Die Entwicklung des Foramen infraorbitale ist in der Literatur bisher nur wenig beschrieben. Die meisten Studien befassen sich mit den anatomischen Grundlagen des Foramen infraorbitale beim Erwachsenen (GRUBER 1874, POIRER u. CHARPY 1899, KADANOFF 1970, CANAN et al. 1999, AZIZ 2000, CUTRIGHT 2003). Die embryonale Entwicklung wurde hierbei nicht betrachtet.

Studien, die sich mit der Foramenbildung im speziellen auseinandersetzen, sind die von W. J. MOORE (1974), SCHWARTZ (1980), BOLLOBAS (1984) und KJAER (1990). Diese Untersuchungen basieren, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, auf anatomischen oder röntgenologischen Befunden und nicht auf der Basis der 3D-Rekonstruktion. Zwar dokumentieren die jeweiligen Autoren das zeitliche Auftreten des Foramen infraorbitale, dessen Formbildung wurde jedoch nicht untersucht. Auch LANGE (1999), welche die Entwicklung der Maxilla beschreibt, spricht beiläufig von einem Foramen infraorbitale bei der SSL von 25 mm. Nach unseren Untersuchungen ist das Foramen zu diesem Zeitpunkt jedoch nur andeutungsweise zu verzeichnen.

Deshalb ist das Ziel dieser Studie, detaillierte Information über den morphologischen Entwicklungsprozess des Foramen und seiner angrenzenden Gewebsarten zu erhalten.

Wenn, wie zu vermuten ist, die Gestaltbildung und die Formgebung des Knochens unter dem Einfluss lokal benachbarter Gewebsarten steht, stellt das Foramen infraorbitale mit seinem Inhalt (Nerven, Blutgefäße und Bindegewebe) eine geeignete Region dar, diese Wechselwirkungen unter dem Aspekt der Morphologie zu untersuchen.

In der vorliegenden Studie zeigten sich die ersten Anzeichen eines Foramen infraorbitale in Form einer trichterförmigen Einziehung des Knochens bei einem Embryo der SSL von 25 mm. Andere Autoren (SCHWARTZ 1980, BOLLOBAS 1984) konnten diesen frühen Zeitpunkt, aufgrund ausschließlich fetalen Studienmaterials, nicht ermitteln. Das Foramen infraorbitale entwickelt sich kontinuierlich in Form einer Rinne, die sich von kaudal um den Nervus infraorbitalis schließt und sich nach posterior als Canalis infraorbitalis fortsetzt. Dieser Vorgang der Knochenausdehnung von anterior nach posterior ist im Studienverlauf anhand der dreidimensionalen

Rekonstruktionstechnik sehr schön zu erkennen. Beim vorliegenden Embryo der SSL 25 mm liegt das Foramen infraorbitale noch weit posterior und „wandert“, durch die beschriebene Knochenwachstumsrichtung, langsam nach anterior und medial, so dass sich das noch nicht vollständig geschlossene Foramen infraorbitale bei einer SSL von 117 mm auf Höhe des sich entwickelnden ersten Milchmolaren befindet. Etwas später, bei einer SSL von 250 mm, wenn das Foramen in seiner knöchernen Circumferenz vollständig geschlossen ist, liegt es auf der fazialen Seite der Maxilla in Höhe der Anlage des Milcheckzahns.
Solche Befunde werden in keiner der oben aufgeführten Studien beschrieben. Erst durch die dreidimensionale Rekonstruktionstechnik, welche hier angewandt wurde, können sie deutlich dargestellt werden. Die Anlage eines doppelten Foramen infraorbitale, die KADANOFF et al. (1970) und BOLLOBAS (1984) beschreiben, ist in unseren Untersuchungen allerdings nicht zu verzeichnen.

5.2.3. Embryonale Morphogenese anderer knöcherner Foramina

Ebenso untersuchten nur wenige Autoren die Entwicklung eines speziellen knöchernen Foramen vom Anbeginn der ersten Ossiffikationskeime.
Die meisten Autoren (BOLLOBAS 1984, KJAER 1990) beschreiben auch hier nur das erste Auftreten der Foramina des Gesichtsschädels. Die Frage der Formgebung und des Entwicklungsmechanismus stehen dort jedoch nicht im Vordergrund und müssen noch geklärt werden.
Anders verhält es sich mit der Morphogenese des *Foramen mentale*, die von MÜLLER (1995), KLARKOWSKI (2000), RADLANSKI et al. (2002), RADLANSKI et al. (2003) und RADLANSKI et al. (2004) untersucht wurde. Es zeigen sich einige Ähnlichkeiten zwischen der Entwicklung des *Foramen mentale* und der des Foramen infraorbitale. Bei beiden entstehen die ersten Knocheninseln kaudal eines Gefäß-Nerven-Bündels. Der Knochen wächst in Form einer Rinne von kaudal um den Nerv, bis er sich schließlich kranial des Nerven zu einem Foramen zusammenfügt. Im Unterschied zum *Foramen mentale*, welches sich schon bei der SSL von 19 mm als komplett knöchernes Foramen darstellt (RADLANSKI et al. 2002), zeigt sich nach

unseren Untersuchungen ein vollständiges Foramen infraorbitale erst bei einer Größe von 250 mm SSL. Unterbrechungen der kranialen knöchernen Wand können beim *Foramen mentale* bedingt durch die Zahnanlage des ersten Unterkiefermilchmolaren entstehen (RADLANSKI et al. 2002, RADLANSKI et al. 2003 u. RADLANSKI et al. 2004).

Ähnliche Befunde zeigen sich beim Foramen infraorbitale im Bereich nahe der Orbita, was durch die vorliegenden Studie bestätigt wird. Es sind Unterbrechungen des knöchernen Daches nur im Verlauf des Canalis infraorbitalis bei einer SSL von 250 mm zu erkennen. Auch kaudal des Nervus infraorbitalis, wo sich die Zahnanlagen des Oberkiefers in unmittelbarer Nähe befinden, kann die knöcherne Schicht mitunter sehr dünn oder unterbrochen sein. Dieser Befund entspricht der Aussage von W. J. MOORE (1974).

Daraus lässt sich schließen, dass angrenzende Gewebsstrukturen, wie die Zahnanlagen oder die Orbita, auf das Ausmaß der Knochenbildung einwirken und die Knochenbildung sogar lokal verhindern können. Der Wirkungsmechanismus dieser möglichen Interaktion ist allerdings noch unklar.

Solch ein Befund würde auch erklären, warum das *Foramen supraorbitale* beim Erwachsenen oft nur eine zur Orbita offene Incisur darstellt.

Obwohl sich eine ähnliche Entwicklung des *Foramen mentale* und des Foramen infraorbitale zeigt, so ist ihre Form doch unterschiedlich. Es müssen demnach noch andere Faktoren existieren, welche die spezifische Formgebung hervorrufen. Um diese bestimmten Entwicklungsmuster zu untersuchen, könnte ein Vergleich weiterer knöcherner Foramina hilfreich sein.

5.3. Gewebsinteraktionen und molekularbiologische Aspekte

„ To understand why a bone grows at all we need to study it, paradoxically, before it is present and growing" (HALL1982).

Generell ist bekannt, dass Gewebsarten miteinander interagieren (z.B. Knochenresorption durch verdrängende mechanische Prozesse bei Entzündung oder

Tumoren; Interaktionen während der Zelldifferenzierung und -proliferation) (EHRLICH et al. 2002; PAVALKO et al. 2003).
HALL (1982) lieferte anhand verschiedener Versuche mit Mäusen und Hühnern das Ergebnis, dass die Bildung von Knorpel und Knochen abhängig von Zellinteraktionen ist. Die Mesenchymzellen, welche die genetische Information für die knöcherne Bildung der Extremitäten enthalten, entwickeln sich nur entsprechend, wenn sie zuvor mit den Epithelzellen der Extremitäten interagieren.
Ebenso scheint eine starke Wechselwirkung zwischen Nervengewebe und Knochen, so genannte „Innervationsfelder“ (KJAER et al. 1999), zu bestehen, in deren Region erste Mesenchymverdichtungen und danach Ossifikationsfelder entstehen. Diese Ossifikationszentren befinden sich in unmittelbarer Nähe der später entstehenden Foramina mentale, -infraorbitale, -palatinale und -incisivi (KJAER 1990). Dies entspricht, bezüglich dem Foramen infraorbitale, auch dem Ergebnis unserer Studie. Ein Ossifikationsfeld ist im vorliegenden histologischen Schnitt des Embryos der SSL 19 mm kaudal des Nervus infraorbitalis deutlich zu sehen. Auch SPERBER (2001) schreibt über Zusammenhänge von Nervengewebe und Knochenbildung. BLECHSCHMIDT (1960, 1948, 1978) vertritt die Theorie der Detraktionskräfte, die besagt, dass Knochen dort entsteht wo zwei Gewebsarten (z.B. Haut und Knorpel) in entgegengesetzter Richtung wachsen und so Scherkräfte entwickeln.

Spezifische Botenstoffe, die einen großen Teil zur Knochenbildung beitragen, wurden in diversen Studien untersucht. Das Wissen, dass „bone morphogenetic proteins“ (BMP) viele Prozesse der Knochenbildung, Zellproliferation und Zelldifferenzierung beeinflussen, ist bekannt (MEIKLE 2002, ROSSANT und TAM 2002). BMPs gehören zur Familie der „transforming growth factors“ (TGF-ß) und induzieren die Bildung von Knorpel, Knochen und Bindegewebe, die in Verbindung mit dem Skelett stehen (HOGAN 1996, WOZNEY u. ROSEN 1998). Fehlen bestimmter BMPs führt im Tierversuch zu multiplen Knochendefekten oder sogar zum embryonalen Tod (ROSSANT und TAM 2002).
Der BMP Antagonist Noggin hemmt deren Wirkung durch Bindung an spezifische BMP-Rezeptorstellen. WARREN et al. (2003) haben die Nogginexpression in nicht verknöcherten Schädelsuturen postnatal nachgewiesen. Die Unterdrückung von

Noggin durch den Botenstoff Fgf2 (fibroblast growth factor) wiederum, führt zum Syndrom der Craniosynostose. Dies zeigt, wie leicht sich eine Überexpression oder Hemmung solcher Botenstoffe auf die Entwicklung des Knochens auswirkt.
Die Untersuchungen von Fgf8 zeigt den deutlichen Einfluss der „fibroblast growth factors“ auf die craniofaziale Morphogenese. TRUMP et al. (1999) inaktivierten das Protein Fgf8 im Entwicklungsalter der 9. Woche; ein komplettes Fehlen des Proteins zum Zeitpunkt der Befruchtung würde den embryonalen Tod hervorrufen. Im Ergebnis zeigen sich kieferlose Mäuse, mit missgebildetem Meckelschen Knorpel und mit hypoplastischem Gaumen, Keilbein und Jochbein. Fgf8 ist sozusagen ein „lebensnotwendiger“ Botenstoff für die Abkömmlinge des ersten Visceralbogens.
Ein weiteres Protein, dass die Gesichtsentwicklung stark beeinflusst, ist Sonic Hedgehog (Shh). Es kommt vor allem im Epithel und an epithelialen Kontaktflächen vor. Fehlt Shh, so kommt es je nach Zeitpunkt des Fehlens zu unterschiedlichen Missbildungen. Frühzeitiges Fehlen von Shh führt, trotz Entwicklung des ersten Visceralbogens, zur kompletten Fehlentwicklungen der Abkömmlinge des ersten Visceralbogens und beeinträchtigt so das komplette Chondrocranium (CHIANG et al. 1996). Die Folgen eines späteren Fehlens sind noch nicht eindeutig untersucht. Man vermutet eine Rolle bei der zellulären Proliferation der craniofazialen Morphogenese (HU und HELMS 1999).
Schwere Missbildungen treten auch bei fehlender Retinoic Acid (RA), einem aktiven Derivat von Vitamin A auf. RA spielt eine wichtige Rolle bei der korrekten Verschmelzung der Gesichtswülste. Auftretende Missbildungen sind abhängig von der vorhandenen Menge RA. Zu viel RA führt zu Gesichtsspalten und Veränderungen des ersten Visceralbogens, ein Mangel an RA wiederum führt zu Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten (NAPOLI 1999; SCHNEIDER et al. 2001).
Die Entwicklung des Gesichtsschädels bleibt, trotz aufschlussreicher Studien und Identifikation wichtiger molekularer Botenstoffe, ein sehr komplizierter Prozess. Oben genannte Signalstoffe sind nur eine aktuelle Auswahl wichtiger Faktoren, und es besteht kein Zweifel, dass diese ein Grundgerüst für die Entwicklungsforschung geben; aber wie entsteht eine bestimmte Form und was gibt einem Wesen sein individuelles Aussehen?

Um der Lösung dieser Frage näher zu kommen, wurden in der vorliegenden Studie morphologische Veränderung und Gewebsinteraktionen einer ausgewählten Region untersucht. Wenn Klarheit über die Morphologie dieser Region besteht soll, in weiterführenden Studien, die Aktivität bestimmter Wachstumsfaktoren während der Entwicklung untersucht werden. Damit wäre ein weiterer Schritt für die Annäherung von Morphologie und Molekularbiologie getan.

5.4. Ausblick

Die craniofaziale Morphogenese in 3D-Rekonstruktion wiederzugeben, ist eine sehr hilfreiche Methode, morphologische Entwicklungsprozesse und Veränderungen anschaulich darzustellen. Zusätzlich liefert diese Methode auch bessere Möglichkeiten, pathologische Veränderungen beurteilen zu können.
Um das Wissen der Entwicklung der Foramina beim Menschen zu erweitern und genauere Erkenntnisse auf der molekularbiologischen Ebene zu erlangen, sollte als nächstes die Entwicklung des Foramen infraorbitale genauso gründlich bei geeigneten Spezies am Tierversuch studiert werden. Hier könnte man die molekularbiologische Regulation morphogenetischer Prozesse untersuchen, und anschließend, in einem weiteren Schritt, die Ergebnisse auf den menschlichen Entwicklungsprozess übertragen.