

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. – Prof. Dr. Dieter Drescher

Volumetrische Analyse der parodontalen Mikrostruktur unter antiresorptiver
Therapie
eine experimentelle Studie im Kaninchenmodell

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Joel Rockhoff

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Kathrin Becker

Zweitgutachter: Prof. Alfons Hugger

Für Jenny.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Becker, K., Kerberger, R., Brunello, G., Rockhoff, J., Rauch, N., Schwarz, F. (2022). Volumetric analysis of the periodontal microstructure under antiresorptive therapy: an experimental study in rabbits. *Clinical Oral Investigations*, (26) 5359-5368.

Zusammenfassung

Antiresorptiv wirkende Medikamente werden heutzutage für viele verschiedene Indikationen eingesetzt. Zur Behandlung von Erkrankungen, die den Knochenstoffwechsel betreffen wie Osteoporose, Morbus Paget, das Mama- oder Prostata Karzinom und das Multiple Myelom, dienen diese als Standardmedikation. Eine schwere Nebenwirkung bildet dabei die Medikamenten-assoziierte Kiefernekrose, bei welcher es zum Absterben von Knochenarealen im Kiefer kommt.

Ziel dieser Arbeit war die volumetrische Analyse von mikrostrukturellen Veränderungen im Bereich des zahntragenden Knochens und des Parodontalspalts unter antiresorptiver Therapie. Dazu wurden Micro-CT Scans von insgesamt neun Kaninchen angefertigt, welche vorher entweder in die Kontrollgruppe ($n_{Za}=4$) oder Testgruppe ($Za=5$) eingeteilt wurden. Die Kaninchen der Testgruppe wurden mit intravenösen Aminobisphosphonaten (Zolendronsäure) behandelt. Es folgte eine Datenerhebung zum Durchmesser des Parodontalspalts (P.Th) sowohl für den letzten Prämolaren des Ober- und Unterkiefers, als auch des zweiten Molaren des Ober- und Unterkiefers. Zur Beurteilung der Knochenmikrostruktur wurden das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen (BV/TV), die Mineralisierungsdichte des Knochens (BMD), die Anzahl der trabekulären Verbindungen (Tb.N), der Durchmesser der trabekulären Verbindungen (Tb.Th), die Knochenoberfläche (BS) sowie das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen (BS/BV) betrachtet. Die statistische Auswertung wurde mit der Software R durchgeführt.

Es konnte festgestellt werden, dass der Durchmesser des Parodontalspalts unter Einfluss von Bisphosphonaten signifikant größer war ($P=0,010$). Für die volumetrische Auswertung der Knochenmikromorphometrie ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppe.

Daraus ergibt sich, dass eine intravenöse Zolendronsäureadministration mit einer Erweiterung des Parodontalspalts einherzugehen scheint.

Summary

Antiresorptiv drugs are used for the treatment of several indications and pathologies such as osteoporosis, Morbus Paget, mama or prostate carcinoma and multiple myeloma. A severe side effect of this treatment is the medication related osteonecrosis of the jaw, which leads to dead areals of bone.

The aim of this study was to volumetrically asses the microstructural changes in the periodontal gap as well as the teeth surrounding bone under intravenous bisphosphonat administration. MicroCt Scans of nine rabbits which were randomly allocated either to the test group (Za=5) or the control group (nZa=4) were performed. The rabbits of the test group were treated with intravenous administration of zolendronic acid. The parameters of the periodontal thickness (P.Th) for the last premolar of the upper and lower jaw as well as for the second molar were evaluated. The micromorphometrical analyses included the evaluation of the ratio of bone volume to tissue volume (BV/TV), the bone mineral density (BMD), the trabecular number (Tb.N), the trabecular thickness (Tb.Th), the bone surface (BS) and the ratio of bone surface and bone volume (BS/BV).

Significant effects ($P=0,010$) of the periodontal thickness were detected whereas no significant differences for any of the other parameters could be noted between the test group and the control group.

The study shows that the intravenous administration of zolendronic acid seems to be associated with a widening of the periodontal gap.

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BMD	Bone Mineral Density
BPONJ	Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw
BS	Bone Surface
BV	Bone Volume
CT	Computertomographie
Ct.Ar	Cortical Bone Area
Ct.Th	Average Cortical Thickness
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
FPP	Farnesylpyrophosphat
FPPS	Farnesylpyrophosphatsynthetase
GGPP	Geranylgeraniol-Pyrophosphat
IL-36	Interleukin 36
IPL	Image Processing Language
Micro-CT	Micro Computertomographie
MRONJ	Medication-related osteonecrosis of the jaw
MRT	Magnetresonanztomographie
nZA	non Zolendronic Acid
P.Th	Periodontal Thickness
ROI	Region of Interest
Tb.N	Trabecular Number
Tb.Sp	Trabecular Separation
Tb.Th	Trabecular Thickness

Tt.Ar	Total Cross-Sectional Area
TV	Tissue Volume
VOI	Volume of Interest
ZA	Zolendronic Acid

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Antiresorptive Therapie	1
1.1.1	Bisphosphonate und ihre Anwendungsgebiete.....	1
1.1.2	Wirkung von Bisphosphonaten im Knochenstoffwechsel.....	3
1.1.3	Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose.....	5
1.1.3.1	Pathogenese und Risikofaktoren	6
1.1.3.2	Therapieoptionen	7
1.1.3.3	Aktueller Forschungsstand.....	8
1.2	Möglichkeiten der bildgebenden Diagnostik	9
1.2.1	Aufbau und Funktion eines Micro-CT	9
1.2.2	Knochenmikromorphometrie.....	11
1.3	Die Rolle der tierexperimentellen Forschung	12
1.4	Fragestellungen	13
1.5	Ziele dieser Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Versuchstiere und Tierversuchsgenehmigung	15
2.2	Studiendesign	15
2.3	Bildverarbeitung und Analyse.....	17
2.4	Auswertung	18
2.5	Statistische Auswertung	20
3	Ergebnisse.....	21
3.1	Parodontalspalt	21
3.2	Knochenmikrostruktur	23
4	Diskussion	28
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	35

1 Einleitung

1.1 Antiresorptive Therapie

Unter antiresorptiv wirkenden Medikamenten versteht man solche Medikamentengruppen, welche über verschiedene Signalwege in den Knochenstoffwechsel eingreifen und dort zu einer Hemmung der Knochenresorption führen. Anwendung finden diese Medikamente zur Behandlung von Erkrankungen, bei denen eine erhöhte osteoklastische Aktivität herrscht, es also zu einem verstärkten Abbau des Knochens durch knochenabbauende Zellen kommt [1]. Ein typischer Vertreter dieser Gruppe sind die sogenannten Bisphosphonate. Diese Analoge des Pyrophosphats binden an der Knochenoberfläche, werden dort von den Osteoklasten verstoffwechselt und leiten deren Zelltod ein. Dadurch kommt es zu einer Verringerung des Knochenabbaus [2]. Bisphosphonate finden seit 1969 klinische Anwendung und wurden seitdem stetig weiterentwickelt [3]. Aufgrund der festen Bindung an die Knochenoberfläche und des Einbaus in die Knochenstruktur haben Bisphosphonate eine Halbwertszeit von mehreren Jahren. Im Knochen eingebaute Bisphosphonat Moleküle werden bei Knochenumwandlung durch die Osteoklasten wieder freigesetzt und reaktiviert [4].

Neben der Gruppe des Bisphosphonate gibt es eine weitere Medikamentengruppe, welche Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nimmt, die sogenannten monoklonalen Antikörper (Beispielsweise Denosumab). Diese greifen in die Differenzierung und Aktivierungskaskade der Osteoklasten ein und verhindern, dass diese durch Cytokine (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) differenziert, beziehungsweise aktiviert werden können [5]. Im Gegensatz zu den Bisphosphonaten haben monoklonale Antikörper aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkungsmechanismen Halbwertszeiten von nur wenigen Wochen [5].

1.1.1 Bisphosphonate und ihre Anwendungsgebiete

Bisphosphonate wurden zum ersten Mal vor knapp einem Jahrhundert synthetisiert und sind seit ihrem ersten klinischen Einsatz vor rund 50 Jahren die führende Medikamentengruppe zur Behandlung verschiedener Erkrankungen, welche mit

erhöhter Knochenresorption einhergehen. Dazu zählen Morbus Paget, Osteoporose, das Prostata- und Mamakarzinom sowie das Multiple Myelom [4]. Man versteht unter Bisphosphonaten eine Stoffgruppe, welche strukturell vergleichbar mit dem im menschlichen Körper vorkommenden Pyrophosphat ist. Der Unterschied liegt hier im zentralen Atom. Während beim Pyrophosphat eine P-O-P Bindung mit einem zentralen Sauerstoffatom vorliegt, handelt es sich im Fall der Bisphosphonate um ein zentrales Kohlenstoffatom (P-C-P). Durch diesen Austausch ändern sich die Eigenschaften der Medikamente und sie erlangen Resistenz gegen enzymatische Spaltung und Hitze. Zusätzlich zu den beiden Bindungen an die Phosphatgruppen besitzt das zentrale Kohlenstoffatom zwei weitere Bindungsstellen, welche als R1 und R2 beschrieben werden. Verschiedene Bisphosphonate besitzen dabei unterschiedliche R1 und R2 Gruppen. Durch Austausch dieser Gruppen können also verschiedene Bisphosphonate, welche sich je nach Seitenkette in ihrer Wirkungsintensität unterscheiden, synthetisiert werden [6]. R1 verstärkt dabei die Bindung an die Knochenoberfläche [7], während über den Austausch der R2 Gruppe das Ausmaß der antiresorptiven Potenz beeinflusst werden kann [6, 8].

Bisphosphonate können anhand ihrer molekularen Struktur in drei verschiedene Generationen eingeteilt werden. Dabei steigt die Wirkungspotenz der Substanz mit der Generation.

1. Bisphosphonate ohne Stickstoffanteil: Non-Amino Bisphosphonate.
Dazu zählen Etidronat, Clodronat und Tiludronat.
2. Bisphosphonate mit Stickstoffanteil: Aminobisphosphonate
Dazu zählen Alendronat, Pamidronat und Neridronat.
3. Bisphosphonate mit Stickstoffanteil, an welchem eine weitere Substitution stattfindet.
Dazu zählen u.a. Ibandronat, Risedronat und Zolendronat [9].

Bisphosphonate können sowohl oral als auch intravenös verabreicht werden. Bei oralen Bisphosphonaten ist die intestinale Resorption mit Werten zwischen <1% bis 10% sehr gering. Polarität und Ladungseigenschaften des Moleküls spielen hierbei eine wichtige Rolle und erschweren die Resorption. Der Großteil der verabreichten Dosis wird unverändert wieder ausgeschieden [9]. Des Weiteren resultiert eine

unmittelbar einhergehende Nahrungsaufnahme in einer noch geringeren Resorptionsrate [10].

Porras et al. haben im Vergleich dazu zusammengefasst, dass bei intravenöser Verabreichung von beispielsweise Alendronat 40% - 60% der Dosis im Körper verbleiben [11].

1.1.2 Wirkung von Bisphosphonaten im Knochenstoffwechsel

Als Analoga des anorganischen Pyrophosphates haben Bisphosphonate ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität zur Knochenoberfläche [12]. Dort binden sie an Hydroxylapatitkristalle, welche besonders an Stellen, mit einer hohen Knochenumwandlungsrate verfügbar sind [3]. Insgesamt binden Bisphosphonate besser im spongiösen als im kortikalen Knochen [13].

Die Wirkung der gebundenen Bisphosphonate entfaltet sich vor allem bei erneuter Knochenumwandlung durch die Osteoklasten. So werden die Bisphosphonate von den knochenabbauenden Zellen durch den Prozess der Endozytose aufgenommen und es kommt über verschiedene Signalwege wie in Abb.1 gezeigt zur Apoptose, also zum Zelltod, der Osteoklasten [14]. Bisphosphonate der ersten Generation, also ohne gebundenen Stickstoffrest am zentralen Kohlenstoffatom, werden dabei im Cytosol des Osteoklasten zu einem Analogon des Adenosin Triphosphates (ATP) verstoffwechselt. Dieses Analogon unterbindet die Funktion des Osteoklasten und leitet dessen Apoptose ein [15]. Währenddessen führen Aminobisphosphonate zu einer kompetitiven Hemmung des Enzyms Farnesylpyrophosphatsynthase (FPPS), ein wichtiger Bestandteil des Mevalonatweges. Dies führt zu einer Reduktion des Farnesylpyrophosphates (FPP) und ebenfalls zur Reduktion des Geranylgeraniol-Pyrophosphates (GGPP), wodurch wiederum eine verminderte Prenylierung von bestimmten Signaltransduktionsproteinen entsteht. Diese verminderte Prenylierung von Ras, Rha und Rho führt schlussendlich zu einem Verlust der Osteoklastenfunktion und später zur Apoptose [16]. Durch diese Initiierung des Zelltodes des Osteoklasten kommt es zur Hemmung des Knochenabbaus.

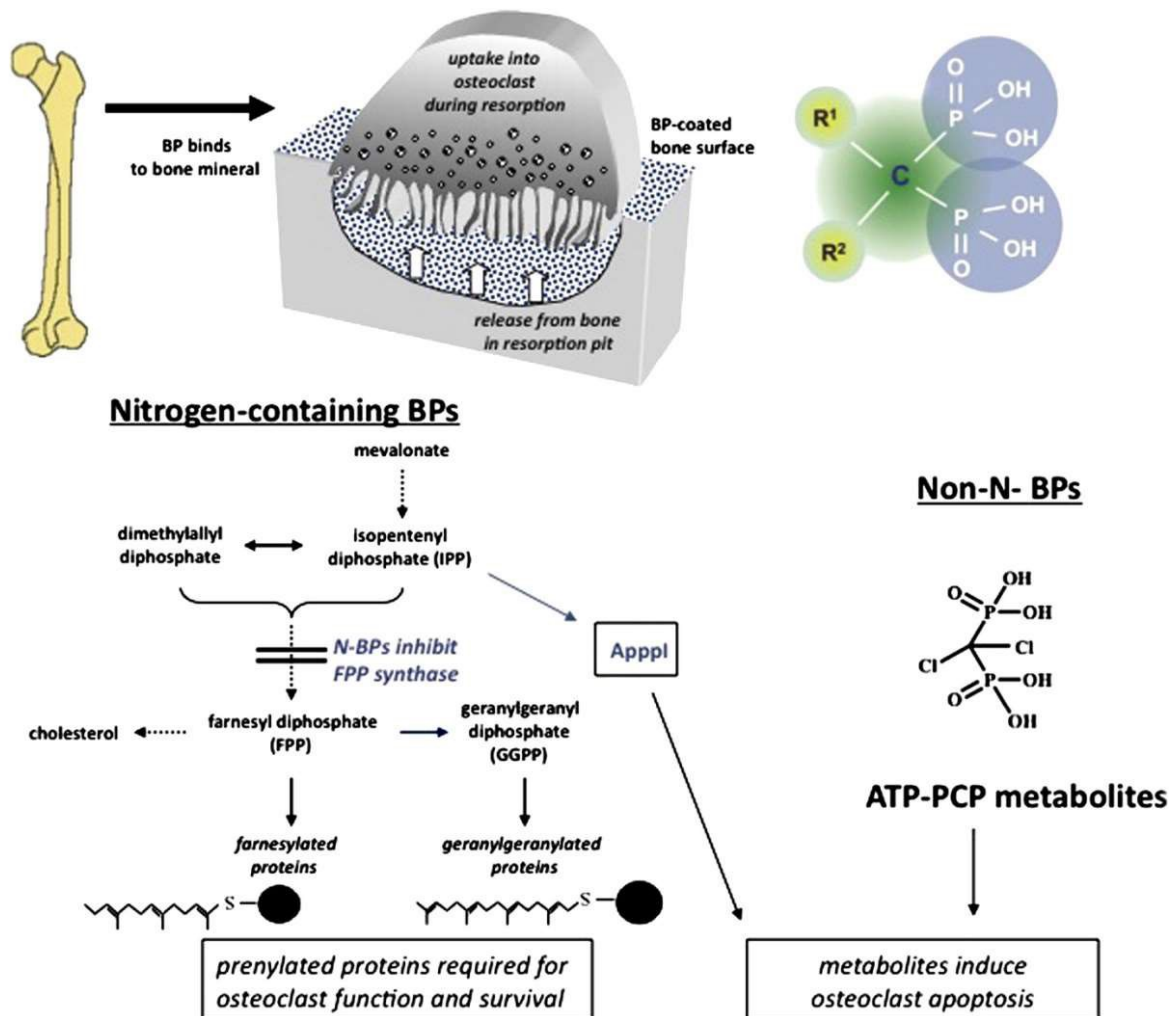


Abb. 1: "The cellular and biochemical mechanisms of action of bisphosphonates" nach Russel et al., BONE 2011 [17]

Zusätzlich zur Hemmung des Knochenabbaus durch die eingeleitete Apoptose der Osteoklasten wird seit einigen Jahren davon ausgegangen, dass Bisphosphonate auch einen maßgeblichen Effekt auf die knochenaufbauenden Zellen, die Osteoblasten und Osteozyten, haben. Es konnte nachgewiesen werden, dass Bisphosphonate die Lebensdauer von Osteoblasten und Osteozyten verlängern und somit positiv auf den Knochenstoffwechsel wirken können [18]. Dies hängt jedoch auch von der Konzentration und Art des jeweils verwendeten Bisphosphonates ab. Maruotti et al. haben in einem Review zusammengefasst, dass kleinere Konzentrationen dabei eher einen fördernden Einfluss auf die Osteoblasten haben, während höhere Bisphosphonatkonzentrationen wiederum zur einer Verminderung der Aktivität führen [19].

1.1.3 Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose

Die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose (BPONJ) wurde erstmals im Jahr 2003 beschrieben [20]. Es handelt sich dabei um eine ernsthafte Komplikation der Therapie mit den antiresorptiv wirkenden Bisphosphonaten. Da Kiefernekrosen aber im Laufe der Jahre nicht nur bei Bisphosphonaten sondern allgemein im Zusammenhang mit antiresorptiv wirkenden Medikamenten auftraten, wird in der Terminologie nun von einer Medikamenten-assoziierten Kiefernekrose (MRONJ) gesprochen [21]. Um klinisch differenzieren zu können, ob es sich um eine MRONJ oder andere heilungsverzögernde Zustände handelt, hat die *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* in einem Positionspapier folgende Kriterien definiert:

Demnach handelt sich um eine MRONJ, wenn alle folgenden Punkte zutreffen:

1. Aktuell oder in der Vergangenheit erfolgte Therapie mit Bisphosphonaten
2. Freiliegende Knochenoberfläche oder über Fistelgänge sondierbarer Knochen über einen Zeitraum von über acht Wochen.
3. Keine zuvor durchgeführte Strahlentherapie [21].

Klinisch manifestiert sich eine MRONJ in der Regel als eine nicht heilende Wunde nach Zahnextraktion oder sonstiger oraler Operation, doch auch spontane Ausprägungen, ohne vorherige traumatische Eingriffe sind möglich. Freiliegender Knochen ist dabei das Leitsymptom [22, 23].

Der Schweregrad einer MRONJ kann in vier Stadien (0-3) eingeteilt werden:

Stadium 0: Kein klinisch vorhandener nekrotischer Knochen, aber unspezifische Befunde wie veränderte Röntgenbilder und Symptomatik

Stadium 1: Exponierter und nekrotischer Knochen oder sondierbare Fisteln bei Patienten ohne weitere Symptomatik und keinen Anhaltspunkt auf Infektionsgeschehen

Stadium 2: Exponierter und nekrotischer Knochen oder sondierbare Fisteln in Zusammenhang mit einer Infektion, welche durch Schmerzen und Rötung im Bereich des freiliegenden Knochens bestätigt wird

Stadium 3: Exponierter und nekrotischer Knochen oder sondierbare Fisteln in Zusammenhang mit einer Infektion und beispielsweise nekrotischer und freiliegender Knochen über den Bereich des Alveolarkamms hinaus, extraorale Fistelung, Mund-Antrum Verbindungen o.ä. [21].

1.1.3.1 Pathogenese und Risikofaktoren

Trotz der Tatsache, dass die Dokumentation des ersten Falls einer Medikamenten assoziierten Kiefernekrose mittlerweile fast 20 Jahre zurückliegt, ist die genaue Pathogenese weiter nicht gänzlich geklärt. Es existieren verschiedene Theorien darüber, wie und vor allem warum diese Art der Knochennekrose ausschließlich im Bereich des Kiefers auftritt.

Die *American Association of Oral and Maxofacial Surgeons* fasst in ihrem Positionspapier von 2022 folgende Hypothesen zusammen:

Mögliche Ursachen für die Manifestation einer MRONJ können sein:

- Die Unterdrückung der Knochenremodelation
- Entzündungen oder Infektionen
- Behinderung der Angiogenese
- Immunologische Dysfunktionen
- Genetische Prädispositionen

Dabei muss berücksichtigt werden, dass die MRONJ vermutlich eine multifaktoriell bedingte Erkrankung ist und sich nach Ausbruch mehr als nur eine der oben genannten Hypothesen als zutreffend erweist [24].

Es gibt Hinweise darauf, dass bestimmte Faktoren einen Ausbruch der Medikamenten-assoziierten Kiefernekrose fördern. Diese können in systemische und lokale Faktoren unterteilt werden.

Die wichtigsten systemischen Faktoren bilden Art, Dauer und Dosierung des verabreichten antiresorptiv wirkenden Medikaments [24].

Zu den lokalen Faktoren zählen Traumata durch dentoalveoläre Eingriffe. Dabei wird gerade die Zahnextraktion unter hochdosierter intravenöser Bisphosphonattherapie bei Krebspatienten als prädisponierender Faktor für die

Entstehung einer MRONJ angesehen [25]. Auch das Tragen einer Zahnprothese kann das Risiko der Entstehung einer MRONJ verdoppeln [26]. Grundsätzlich kann eine MRONJ sowohl im Ober- als auch im Unterkiefer entstehen. Eine Studie von Saad et al. zeigte jedoch, dass ungefähr 75% der Fälle im Unterkiefer manifestiert sind [27]. Weitere MRONJ begünstigende Zustände sind im Kieferbereich bestehende Entzündungen, insbesondere die Parodontitis [28]. Dabei konnten Kim et al. zeigen, dass insbesondere das proinflammatorische Cytokin IL-36 eine wichtige Rolle für die Entwicklung einer MRONJ spielt, da dieses in den untersuchten Läsionen im Mäusemodell überexprimiert wird [29].

1.1.3.2 Therapieoptionen

Therapeutisch kann die MRONJ sowohl konservativ als auch operativ behandelt werden. Ziel der Behandlung ist in beiden Fällen die Heilung der Wunde und die Verbesserung der Lebensqualität. Eine mögliche Übersicht darüber, welche Form der Therapie wann gewählt werden sollte, stellt die *American Association of Oral and Maxofacial Surgeons* in ihrer Leitlinie von 2022 zur Verfügung. Dabei wird eine mögliche konservative Behandlung grundsätzlich für alle Krankheitsstadien empfohlen. Das Kosten/Nutzen Verhältnis, die patientenindividuelle Fähigkeit der Wundpflege, das Risiko eines operativen Eingriffs und die funktionelle Rehabilitation nach einem operativen Vorgehen sollte dabei in die Entscheidungsfindung miteinbezogen werden [24]. Für ein mögliches nicht chirurgisches Vorgehen mit optimierter Mundhygiene, der regelmäßigen Wundpflege mittels Chlorhexidin bei Stadium 1 Patienten und der zusätzlichen Gabe von Analgetika und Antibiotika für Patienten mit infizierten Wunden in Stadium 2 und 3 konnten D. Hadaya et al. 2018 in 71% der Fälle eine Wundheilung erzielen [30]. O. Ristow et al. hingegen beschreiben in ihrer retrospektiven Studie von 2019 bei vergleichbarer medikamentöser Therapie eine Wunddeckung in nur 8,7% der Fälle.

Im Gegensatz zu der uneinheitlichen Studienlage der nicht chirurgischen Therapie, ist die operative Behandlungsstrategie mit hohen Erfolgsraten verbunden [31-35]. Bei Patienten, welche aus gesundheitlichen Gründen nicht in der Lage sind, eine optimale Mundhygiene und Wundpflege zu gewährleisten oder bei denen die

medikamentöse Behandlung nicht die gewünschte Verbesserung der Situation ergibt, sollte dementsprechend frühzeitig eine operative Vorgehensweise in Betracht gezogen werden. Bei der klassischen operativen Therapie der MRONJ werden die nekrotischen Gewebe und Knochenanteile soweit reseziert, bis der Knochen wieder vital und durchblutet ist. Danach werden alle überstehenden Knochenkanten geglättet. Der für eine gute Abheilung der Wunde wichtige dichte Wundverschluss kann über die spannungsfreie Naht eines Mukoperiostlappens erfolgen [33].

Aufgrund einer zur Zeit nicht ausreichenden Studienlage werden zusätzliche Therapien, wie beispielsweise die hyperbare Sauerstofftherapie, nicht empfohlen [24].

1.1.3.3 Aktueller Forschungsstand

Die Wissenschaft gewinnt stetig neue Einsichten in den Wirkmechanismus von Bisphosphonaten und anderen antiresorptiv wirkenden Medikamenten. Auch Hypothesen zur Entstehung von Kiefernekrosen und mögliche Therapieoptionen werden regelmäßig aktualisiert. Die genaue Pathologie hinter der Manifestation einer MRONJ ist aber auch knapp 20 Jahre nach erster wissenschaftlichen Beschreibung nicht gänzlich geklärt. Generell wird heute von einer multifaktoriellen Ätiologie ausgegangen, ohne vollkommende Sicherheit zu haben, welche Faktorenkombination genau zum Ausbruch einer MRONJ führt [36]. Daher wird zurzeit ein großer Fokus auf die Prävention von Kiefernekrosen durch optimales orales Management und Vermeidung von weiteren lokalen Risikofaktoren gelegt [24]. Die weitere mikrozelluläre Erforschung der MRONJ zugrundeliegenden Pathologie sollte weiterhin höchste Priorität haben. Die derzeitig vorliegenden Daten über volumetrische Auswertungen des Knochens beschäftigen sich fast ausschließlich mit aktiven MRONJ Läsionen [37, 38]. Grundlegende volumetrische Versuchsansätze zur mikromorphometrischen Analyse der regulären Veränderungen des Knochens unter Bisphosphonattherapie vor Ausbruch einer Nekrose sind derzeit nur vereinzelt durchgeführt worden und sollten für die Sicherung valider Daten vertieft werden.

1.2 Möglichkeiten der bildgebenden Diagnostik

Um Bereiche des Körpers zu untersuchen, welche ohne invasiven Eingriff nicht zugänglich wären, werden in allen Bereichen der modernen Medizin verschiedenste Methoden zur bildgebenden Diagnostik zu Hilfe gezogen. Klassische bildgebende Verfahren sind beispielsweise die Magnetresonanztomographie (MRT), die Computertomographie (CT), die Szintigrafie, die Sonografie und das klassische Röntgengerät [39]. Dabei hängt die Wahl des jeweiligen Verfahrens von der Indikation und dem zu untersuchenden Gewebe ab. Während das klassische Röntgen und die Computertomographie insbesondere Hartgewebe sehr gut darstellen und auf Basis von Röntgenstrahlung arbeiten, können mithilfe der Sonografie Weichgewebe sehr gut untersucht werden. Das Standardverfahren in der Osteologie bildete bis zuletzt die Histomorphometrie. Mittels dieser können Veränderungen im Knochengewebe untersucht und analysiert werden. Dazu werden Knochenpräparate fixiert, histologische Dünnschnitte hergestellt, die Region of Interest (ROI) definiert, digitalisiert und mittels geeigneter Software ausgewertet. Dabei handelt es sich um eine reine zweidimensionale Auswertung [40]. Ein neueres Verfahren, welches insbesondere in der Knochenforschung zum Einsatz kommt, beinhaltet volumetrische Analysen mittels Mikro-Computertomographie (Mikro-CT). Dieses Verfahren erweitert die bildgebenden Verfahren in der Osteologie und wird nun neben der zweidimensionalen klassischen Histomorphometrie zur dreidimensionalen Auswertung und Analyse definierter Knochenbereiche angewendet [41].

1.2.1 Aufbau und Funktion eines Micro-CT

In den 1980er Jahren stellten Feldkamp et al. zum ersten Mal das Micro-CT für die Auswertung von Knochen vor [42]. Zugrunde liegt der heute noch genutzten Technologie der von Feldkamp et al. implementierte Algorithmus zur dreidimensionalen Rekonstruktion aus zweidimensionalen Datensätzen bei Verwendung von Konus förmiger Strahlung. Dies bildet einen Unterschied zur bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten Rekonstruktion aus Fächer förmiger Strahlung [43]. Ursprünglich war dieses System entwickelt worden, um kleine Risse in keramischen Materialien zu entdecken. Es handelt sich dabei um ein Gerät, welches

wie die herkömmliche Computertomographie auf Basis von Röntgenstrahlen arbeitet. Im Gegensatz dazu rotieren bei der Nutzung des Mikro-CT nicht Strahlenquelle und Strahlendetektor um das Objekt herum, sondern das Objekt selber wird kontrolliert rotiert [42]. Eine Ausnahme bildet dabei eine Form des Mikro-CT, welche auch lebendige Kleintiere scannen, also in vivo Scans anfertigen kann. Bei dieser Art Mikro-CT rotieren Tubus und Detektor um eine zentrale Achse, während sich das Tier stationär auf einer Vorrichtung dazwischen befindet [44]. Mittlerweile bildet das Mikro-CT den neuen „Goldstandard“ in der Forschung für die dreidimensionale Auswertung von Knochenarealen von Mäusen und anderen Kleintieren und hat damit die klassische Histomorphometrie abgelöst [45]. Die Genauigkeit des Mikro-CT wurde dabei in zahlreichen Vergleichsstudien belegt [41, 46, 47]. Buxsein et al. beschreibt dabei relevante Vorteile des Mikro-CT im Vergleich zur Histomorphometrie:

1. Es können direkte dreidimensionale Messungen der trabekulären Morphologie gemacht werden.
2. Es kann im Vergleich zur Histomorphometrie ein wesentlich größerer Bereich analysiert werden.
3. Die Messungen können mithilfe der Mikro-CT wesentlich schneller erfolgen als mit der Histomorphometrie.
4. Die Anwendung der Mikro-CT zur Auswertung des Knochens ist nicht destruktiv und die gescannte Probe bleibt erhalten.
5. Es ist möglich, mithilfe von Mikro-CT Scans die Knochenmineralisation zu quantifizieren, indem die Abschwächung der Röntgenstrahlung im Versuchsobjekt mit standardisierten Hydroxylapatitwerten verglichen wird [45].

Mithilfe des Mikro-CT kann also der definierte Knochenbereich in seiner Mikrostruktur ausgewertet und analysiert werden. Nach Anwendung des Mikro-CT erhält man einen dreidimensionalen Datensatz bestehend aus sogenannten Voxeln. Je kleiner das einzelne Voxel, desto höher die Auflösung des Scans. Um kleinere Voxel bei gleichbleibender Auflösung zu generieren, ist in der Regel eine längere Belichtungszeit oder ein Anpassen des Rekonstruktionsalgorithmus von Nöten.

Dementsprechend sollten die Indikation und die Aussagekraft der erhobenen Werte vorher abgewogen werden. [45]

1.2.2 Knochenmikromorphometrie

Die Knochenmikromorphometrie beschreibt die Betrachtung und Analyse der zuvor per Histomorphometrie oder im Micro-CT erhobenen Daten zur Auswertung der Knochenmikrostruktur. Grundsätzlich liegen zwei unterschiedliche Knochentypen vor, sogenannter kompakter und spongiöser Knochen. Dabei wird die Kompakta auch als Knochenrinde bezeichnet und beschreibt den sehr dichten äußeren Knochenbereich, während die Spongiosa ein durch Knochentrabekel verbundenes und mit Knochenmark gefüllten Hohlräumen durchsetztes Netzwerk darstellt. Dabei verbindet der Knochen die Eigenschaften einer starken Belastbarkeit und Elastizität bei gleichzeitig niedrigem Gewicht. Kleinste Änderungen in der Verbundenheit dieses Systems können sich negativ auf die Knochenqualität auswirken [9]. Mithilfe der Knochenmikromorphometrie können eben jene Bereiche analysiert und mit anderen Daten verglichen werden. Dabei können verschiedene Parameter erhoben werden. Im ersten Schritt zählt dazu die Erhebung des Knochenvolumens (BV) und des Gesamtvolumens (TV) eines zuvor definierten Bereichs [48]. Für die weitere Analyse spongiösen Knochens empfehlen Bouxsein et al. außerdem die Erhebung des Verhältnisses von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen (BV/TV), die Knochenoberfläche (BS) und das Verhältnis von Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen (BS/TV). Weiter kann das das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen (BS/BV) ermittelt werden. Auf Basis der dreidimensionalen Auswertung kann außerdem die durchschnittliche Dicke der Trabekel (Tb.Th), die durchschnittliche Anzahl der Trabekel (Tb.N) und der durchschnittliche Abstand der Trabekel (Tb.Sp) bestimmt werden [45]. Zur Auswertung der kortikalen Knochenanteile können unter anderem der Querschnittsbereich (Tt.Ar), die kortikale Knochenfläche (Ct.Ar), die kortikale Dicke (Ct.Th) und der kortikale Knochenanteil (Tt.Ar/Ct.Ar) bestimmt werden. Neben der Auswertung der Knochenmorphologie und Vernetzung kann anhand der Strahlungsdämpfung auch eine Aussage über den Hydroxylapatitanteil des Knochens und damit über den Mineralisierungsgrad getroffen werden (BMD) [45]. Dabei können durch Auswertung der verschiedenen

Parameter unterschiedliche Aussagen über Qualität und Quantität der Knochenmikrostruktur getroffen werden.

1.3 Die Rolle der tierexperimentellen Forschung

Definiert wird der Tierversuch im Tierschutzgesetz als „Eingriff oder Behandlung zu Versuchszwecken 1. an Tieren, wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden verbunden sein können [...]“ [49]. Im Jahr 2020 wurden in Deutschland laut Bundesinstitut für Risikobewertung rund 1,9 Millionen Kopffüßer und Wirbeltiere in der tierexperimentellen Forschung eingesetzt [50]. Auch in der modernen biomedizinischen Forschung kann nicht auf Tierversuche verzichtet werden [51]. Nichtsdestotrotz sollte die Indikation zur Forschung am Tier zum Wohle des Tierschutzes sehr eng gestellt werden. Die 3R Prinzipien, also *Replace*, *Reduce*, *Refine*, dienen hier als ethische Orientierung [52]. *Replace* beschreibt dabei, dass, wenn möglich, Versuchstiere durch alternative Forschungsmethoden ersetzt werden sollten. *Reduce* steht für die Reduzierung der Versuchstieranzahl auf ein Minimum und *Refine* setzt Maßstäbe für die Verfeinerung der Versuche. Bei der Verfeinerung der Versuche geht es darum, den Schmerz und die Belastung der Versuchstiere so weit wie möglich zu reduzieren, beispielsweise durch den Einsatz von Analgetika und Anästhetika [51]. Grundsätzlich dienen Tierversuche auch in der modernen Medizin weiterhin hauptsächlich der Grundlagenforschung. Eine Übertragung auf den Menschen, andere Tiere oder Pflanzen, also ein translationaler Versuchsansatz, wurde beispielsweise im Jahr 2020 nur bei 244.572 von 1.899.880 Tieren angestrebt [50]. Dies entspricht nur etwa 12,9 %. Dahingegen machte die Grundlagenforschung einen Anteil von 57,7 % aus. Laut der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sind Tierversuche ethisch nur dann vertretbar, wenn kein anderer Versuchsaufbau ohne Tiere möglich ist und die zu erwartende wissenschaftliche Bereicherung dies rechtfertigt [53]. Dazu muss vor Beantragung einer Tierversuchsgenehmigung ausführlich der aktuelle Forschungsstand ermittelt werden. Ebenso muss eine Prüfung des angestrebten Versuchsaufbaus in Hinsicht auf mögliche Aussagekraft und Beeinträchtigung der Tiere sowie die richtige Tierauswahl erfolgen. Nach eben jener Einordnung der Versuchsplanung in die 3 R Prinzipien, kann eine Person, welche die Sachkunde zur Durchführung von Tierversuchen besitzt, einen Tierversuchsantrag stellen [54]. Dieser aufwendige

Prozess dient zur Qualitätssicherung der Versuche und gleichzeitig zum Schutze der verwendeten Tiere.

1.4 Fragestellungen

Obwohl die Wissenschaft schon große Fortschritte in der Erforschung und Analyse der Effekte von antiresorptiv wirkenden Medikamenten gemacht hat, sind dennoch weitere Studien und Untersuchungen nötig, um den Einfluss der Bisphosphonate auf den Knochen, die Pathophysiologie der Kiefernekrose und weitere valide Therapieoptionen zu evaluieren. Gerade der Einfluss antiresorptiv wirkender Medikamente auf die Knochenmikrostruktur und die parodontalen Strukturen der Kiefer ist bislang wenig erforscht.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war der weitere Erkenntnisgewinn darüber, wie sich hochdosierte, intravenös verabreichte Bisphosphonate auf die Knochenmikrostruktur im zahntragenden Bereich und auf den Parodontalspalt im Tiermodell an Kaninchen auswirken. Dafür sollten der zahntragende Knochen und der Parodontalspalt mittels Mikro-CT untersucht und analysiert werden. Die Hypothese dabei lautete, dass hochdosierte Bisphosphonate einen Einfluss auf die Knochenmikrostruktur und die Dicke des Parodontalspalts haben.

In Bezug auf den Parodontalspalt sollte folgende Fragestellung analysiert werden:

Welchen Einfluss haben Bisphosphonate auf die durchschnittliche Dicke des Parodontalspalts?

In Bezug auf die Knochenmikrostruktur sollte folgende Fragestellung analysiert werden:

Welchen Einfluss haben hochdosierte Bisphosphonate auf die Knochenmikrostruktur im Hinblick auf das Knochenvolumen, die Knochendichte, die trabekulären Verbindungen und den Mineralgehalt des Knochens?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Tierversuchsgenehmigung

Diese Arbeit repräsentiert eine Studie mit veränderter Forschungsfrage, welche auf einer vorangegangenen und veröffentlichten Mikro-CT Studie basiert [55]. Hierfür wurden im Rahmen der 3R Prinzipien die gleichen Scans derselben Tiere unter oben genannter Forschungsfrage neu analysiert. Für die Ausgangsstudie wurden Micro-CT Scans von insgesamt zehn ausgewachsenen, weiblichen Kaninchen angefertigt (Covance Research Products Inc., Denver, USA) [55]. Aufgrund der unterschiedlichen Studienfragen konnten Scans von insgesamt neun Kaninchen (n=9) für die aktuelle Studie miteinbezogen werden [56]. Die Kaninchen waren zu Beginn der Experimente sechs Monate alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von 2.237 ± 519 Gramm. Während dieser Zeit wurden die Kaninchen in angemessen großen Käfigen (5.400 cm², Höhe 60 cm) und standardmäßigen Temperatur- und Lichtbedingungen gehalten. Wasser und spezielles Futter standen uneingeschränkt zur Verfügung. Das Studienprotokoll wurde von der örtlichen Behörde unter folgendem Aktenzeichen genehmigt: 84-02.04.2015.A151 (Landesamt für Natur und Verbraucherschutz, Recklinghausen, Germany). Weiterhin wurde nach den ARRIVE Guidelines 2.0 aktueller Bericht erstattet.

2.2 Studiendesign

Im vorliegenden Fall wurde ein einfach verblindetes Studiendesign gewählt. Die neun Versuchstiere wurden hierzu zufällig in zwei Gruppen eingeteilt. Die Testgruppe (ZA; n=5) wurde im Alter von frühestens sechs Monaten intravenös mit 50 µg/kg Körpergewicht des Aminobisphosphonats Zolendronsäure (Zolendronat, 4mg/ 5ml, Teva, Harlem, Netherlands) behandelt. Die verbliebenen Kaninchen (nZA; n=4) dienten als Kontrollgruppe.

Für die Studie wurden nach der Tötung der Tiere mit einer Überdosis des Barbiturats Pentobarbital (600mg/kg) die Ober- und Unterkiefer entnommen und in der Hälfte geteilt. Im Anschluss wurden alle Proben für zehn Tage in eine zehn prozentige neutrale Formalinlösung eingelegt. Die Proben wurden dann dehydriert

und in Methylmethacrylat (MMA) fixiert (Technovit 9100 NEU, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany). Micro-CT Scans des Ober- und Unterkieferalveolarknochens konnten nach Trimmung der Proben angefertigt werden. Untersucht wurden definierte Bereiche des zahntragenden Knochens, wie auch der Parodontalspalte des zweiten Prämolaren im Unterkiefer, des dritten Prämolaren im Oberkiefer und der Parodontalspalt des zweiten Molaren.

Tabelle 1 fasst die Parameter, nach denen die Bereiche analysiert wurden, zusammen.

Bezeichnung	Einheit	Beschreibung
P.Th	mm ³	Mittlere Dicke des PA Spaltes
BV/TV	%	Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen
BMD	mgHA/mm ³	Knochenmineralisierungsdichte
Tb.Th	mm	Trabekuläre Dicke
Tb.N	1/mm	Knöcherne Verbindungen pro mm
BS	mm ²	Die als Knochen segmentierte Oberfläche
BS/BV	mm ² /mm ³	Verhältnis von Knochenoberfläche und Knochenvolumen

Tabelle 1: **Übersicht der erhobenen Parameter inklusive der zugehörigen Messeinheit (mm³; %; mgHA/mm³; mm; 1/mm; mm²; mm²/mm³)**

Dabei sollten die Parodontalspalte in Bezug auf die mittlere Dicke (P.Th) in mm³ analysiert werden.

Der Bereich des zahntragenden Knochens sollte auf das Verhältnis von Knochenvolumen zum Gesamtvolumen (Bone Volume/ Tissue Volume; BV/TV), welches die reine Knochenmenge im Interessensbereich repräsentiert, sowie die Knochenmineralisierungsdichte (Bone Mineral Density; BMD) als Durchschnittsmenge des Hydroxylapatites im als Knochen segmentierten Gewebe in der Einheit mgHA/mm³, analysiert werden. Weiter wurden Daten zur trabekulären

Dicke der Knochenstruktur (Tb.Th) in mm, die Anzahl der knöchernen Verbindungen (Tb.N) (1/mm), die Knochenoberfläche (BS) in mm², welche die als Knochen segmentierte Oberfläche darstellt und schlussendlich das Verhältnis zwischen Knochenoberfläche und Knochenvolumen (BS/BV) in 1/mm erhoben.

2.3 Bildverarbeitung und Analyse

Die Scans wurden mit einem Mikro-CT Gerät der Firma Scanco Medical AG (Viva CT 80, Scanco Medical AG, Brüttisellen, Switzerland) bei 70 kVp, 114 µA und einer Belichtungszeit von 786 ms erstellt. Sie wurden bei einer Voxelgröße von 16,1 µm rekonstruiert.

Ausgeschlossen wurden Proben, welche den zuvor definierten Bereich von Interesse nicht vollständig abbildeten und somit zu nicht repräsentativen Resultaten geführt hätten.

Insgesamt konnten 30 Scans für den Parodontalspalt und 21 Scans für die Untersuchung der Knochenmikrostruktur im zahntragenden Bereich verwendet werden.

Für die Untersuchung des Parodontalspalts ergab sich dabei folgende Verteilung:

Unterkiefer ZA=6 / nZA=8

Oberkiefer ZA=8 / nZA=8

Für die Untersuchung der Knochenmikrostruktur ergab sich dabei folgende Verteilung:

Unterkiefer ZA=3 / nZA=7

Oberkiefer ZA=4 / nZA=7

2.4 Auswertung

Auswertung Parodontalspalt

Der auszuwertende Bereich des Parodontalspalts wurde apikal durch eine klar definierbare Lamina Dura und einen geschlossenen Apex, also einer in seiner Kontinuität nicht unterbrochenen Zahnoberfläche, begrenzt. Koronal wurde bis zu dem Punkt ausgewertet, an dem der Zahn zuletzt vollständig von intaktem Knochen umgeben ist. In sagittaler Ausdehnung wurde der Bereich zum einen von der Zahnoberfläche, zum anderen von der Lamina Dura begrenzt. Diese Proben wurden nun mit dem Auswertungsprogramm *uct-evaluation* der Firma Scanco Medical AG (Brüttisellen, Schweiz) analysiert. Dabei wurde das Volume of Interest (VOI) zunächst auf jeder zehnten Schichtebene nach den oben genannten Kriterien händisch und leicht überkonturiert vom Autor markiert (Abb.2 A) und dann durch die Software, wie in Abb. 2 dargestellt, miteinander verbunden. Die dadurch auf jeder Schichtebene markierten Bereiche konnten im Anschluss durch ein von Robert Kerberger (Poliklinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum Düsseldorf) programmiertes Skript in der Image Processing Language (IPL) exakt auf den Interessensbereich angepasst werden und somit der Parodontalspalt in jeder Schicht genau definiert werden (Abb. 2 B und C).

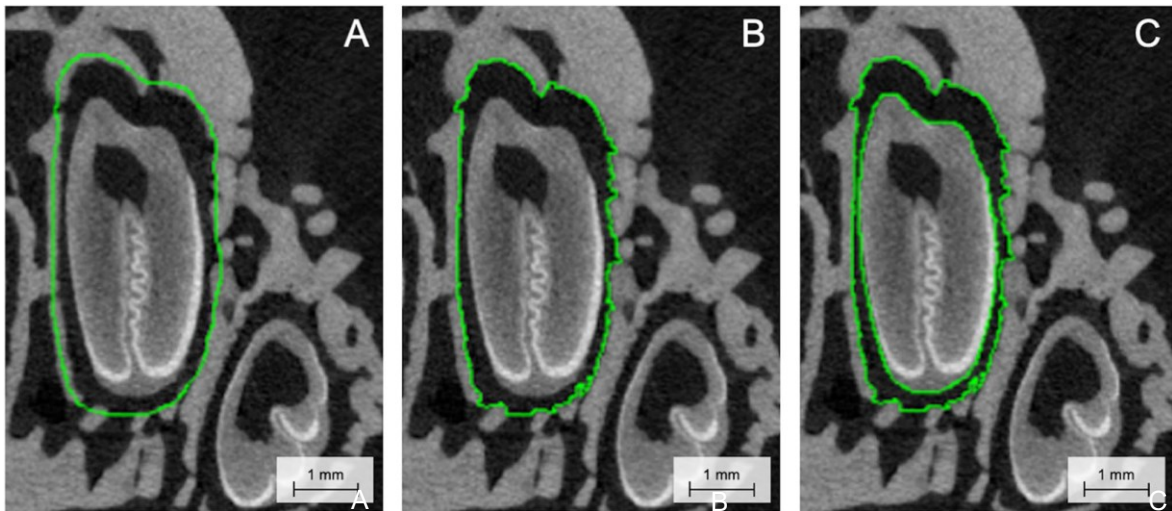


Abb. 2: “Definition of the volume of interest (VOI), i.e., the periodontal space, which was achieved by a combination of manual pre-drawing and automated correction through an in-house script in IPL-language. A Oversized pre-marking of the periodontal space depicted at the 2nd molar (M). B Automatically corrected outer margin of the periodontal space. C Automatically corrected inner margin of the periodontal space within the VOI” nach Becker et al. [56]

Die äußere Kontur des jeweils betrachteten Zahnes musste nicht extra markiert werden, sondern wurde durch das Skript erkannt. Der nun markierte dreidimensionale Bereich wurde anschließend wie in Abb. 3 gezeigt, durch ein weiteres Skript hinsichtlich der durchschnittlichen Dicke analysiert.

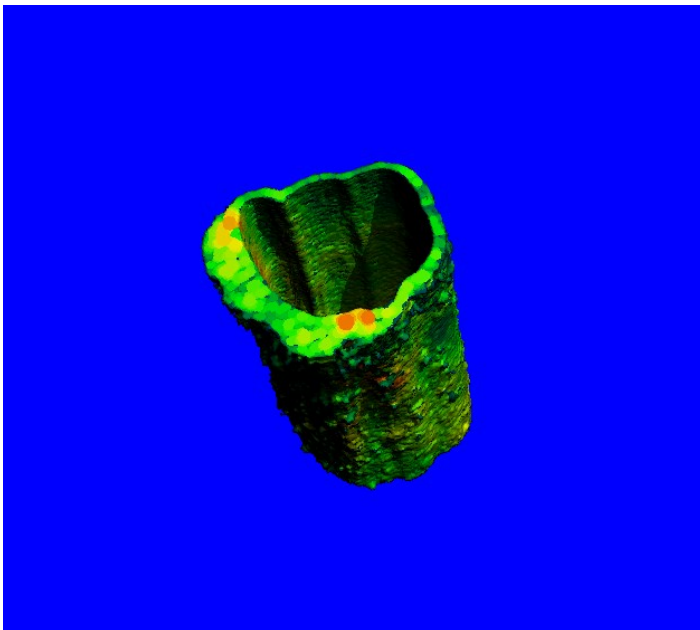


Abb. 3: Dreidimensionale Darstellung des Parodontalspalts im VOI

Auswertung Knochenmikrostruktur

Der auszuwertende Bereich des zahntragenden Knochens wurde in orovestibulärer Ausdehnung durch eine intakte Knochenstruktur begrenzt. Aufgrund der angrenzenden knöchernen Strukturen im Oberkiefer, wurde hier sehr genau darauf geachtet, händisch die gleichen Bereiche zu markieren. In sagittaler Ausdehnung verläuft die Begrenzung des Interessensbereichs mesial des Prämolaren und distal des Molaren. Scans, bei denen diese Kriterien nicht einheitlich erfüllt werden konnten, mussten von der Studie ausgeschlossen werden. Daher konnten in diesem Fall 21 Scans analysiert werden. Grundsätzlich verlief die Auswertung der Proben vergleichbar mit der Auswertung des Parodontalspalts. Die Proben wurden mit dem Auswertungsprogramm *uct-evaluation* der Firma Scanco Medical analysiert. Dafür wurde der zahntragende Knochenbereich auf jeder zehnten Schichtebene leicht überkonturiert eingezeichnet und im Anschluss verbunden, sodass der Bereich auf jeder Schicht markiert war. Im Anschluss wurde erneut durch ein von Robert Kerberger (Poliklinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum Düsseldorf) programmiertes Skript in der Image Processing Language (IPL) die Kontur exakt angepasst. Dabei wurden u.a. die jeweils enthaltenen Parodontalspalte und Zähne vom entsprechenden Interessensbereich subtrahiert. Der dadurch entstandene Bereich wurde nach oben genannten Kriterien ausgewertet.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gesammelten Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm R [57]. Um die einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen, wurden Gemischte Lineare Modelle mit dem Softwarepaket *lme4* berechnet [58]. Dabei wurden die Tiere als zufällige Effekte und die Kiefer, Zähne sowie die Zugehörigkeit zur Test- bzw. Kontrollgruppe als feste Effekte modelliert. Mithilfe von Plots wurden die Voraussetzungen zur Nutzung der gemischt linearen Modelle validiert. Durch den Vergleich der Modelle mit und ohne dem zum analysierenden, festen Effekt per Varianz-Analyse (Analysis of Variance, ANOVA) wurden die p-Werte ermittelt. Als signifikant galt ein Wert $< 0,05$.

3 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Analyse des Parodontalspalts und der Knochenmikrostruktur vorgestellt.

3.1 Parodontalspalt

Beim Vergleich der Dicke des Parodontalspalts der Testgruppe (ZA) und der Kontrollgruppe (nZA), siehe Tabelle 2, Abb. 5 sowie Abb. 6, zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,010$) mit höheren P.Th Werten in der Testgruppe. Die durchschnittlichen P.TH Werte der beiden Gruppen unterscheiden sich ebenfalls signifikant im Vergleich zwischen Prämolaren und Molaren ($p=0,034$) mit höheren Werten im Bereich der Prämolaren. Vergleicht man die Werte für den jeweiligen Kiefer, so ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppe im Oberkiefer ($0,017$) mit höheren Werten in der Testgruppe. Im Unterkiefer konnte eine tendenzielle Erhöhung der P.Th Werte ($p=0,066$) in der Testgruppe dokumentiert werden. In Abb. 4 und 5 werden die Ergebnisse aus Tabelle 2 grafisch verdeutlicht. Dabei zeigt sich in Abb. 4 im Boxplot ein deutlich höherer Wert im Bereich der Testgruppe. In Abb. 5 wird per Farbkodierung veranschaulicht, in welchen Bereichen die Dicke des Parodontalspalts sich im Vergleich zur Testgruppe verändert hat.

Para- meter	Werte	Za			nZa		
		Gesamt (OK+ UK)	OK	UK	Gesamt (OK+UK)	OK	UK
P.Th [mm ³]	Mittelwert	0,234	0,253	0,208	0,204	0,223	0,186
	SD	0,032	0,023	0,023	0,032	0,028	0,025
	Median	0,234	0,245	0,208	0,211	0,219	0,182
	95% CI	0,229 – 0,239	0,255 – 0,260	0,199 – 0,217	0,2 – 0,209	0,214 – 0,231	0,179 – 0,193

Tabelle 2: Ergebnisübersicht des durchschnittlichen Durchmessers des Parodontalspalts (P.Th) in mm³ im Vergleich von Testgruppe (ZA) und Kontrollgruppe (nZA)

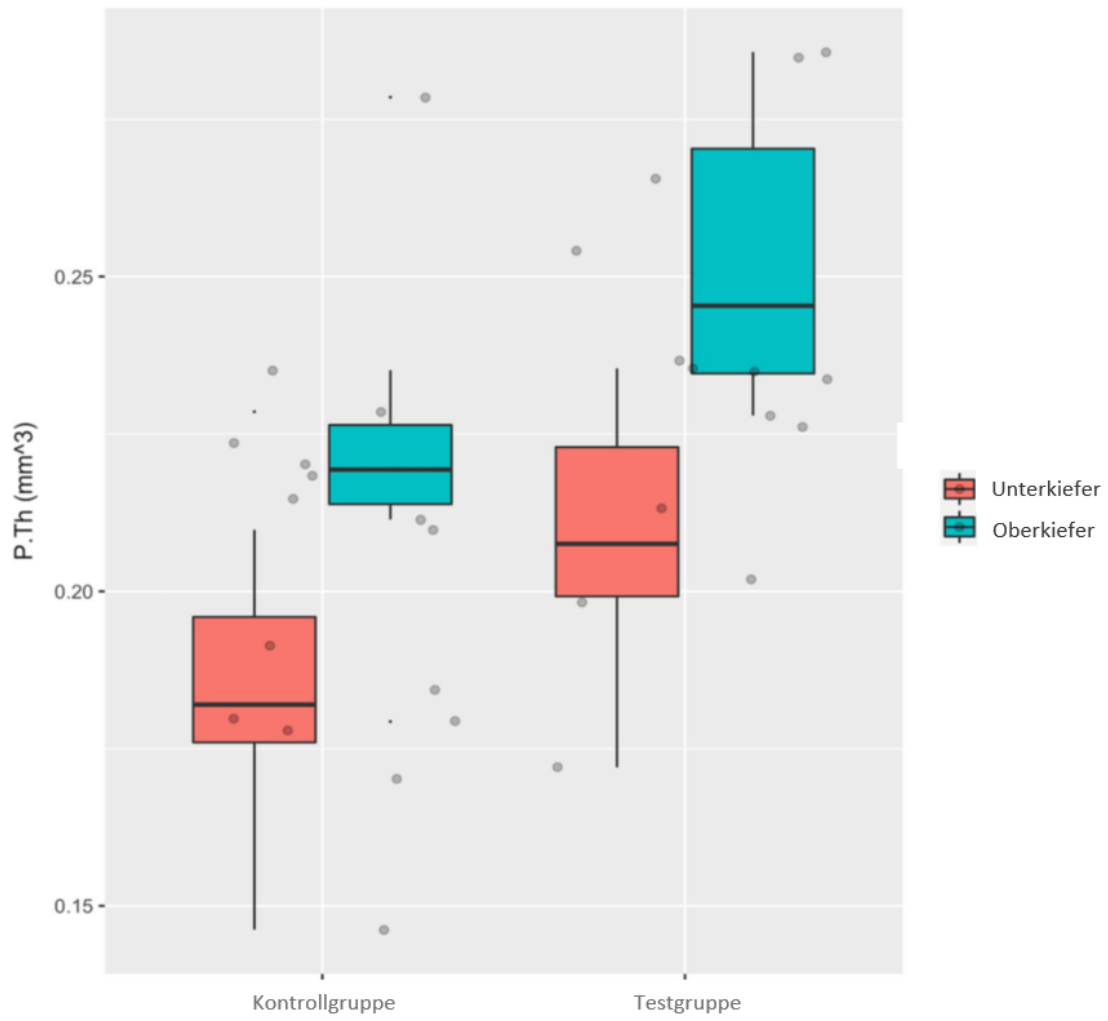


Abb. 4: P.Th Werte der Test- und Kontrollgruppe für Ober- und Unterkiefer

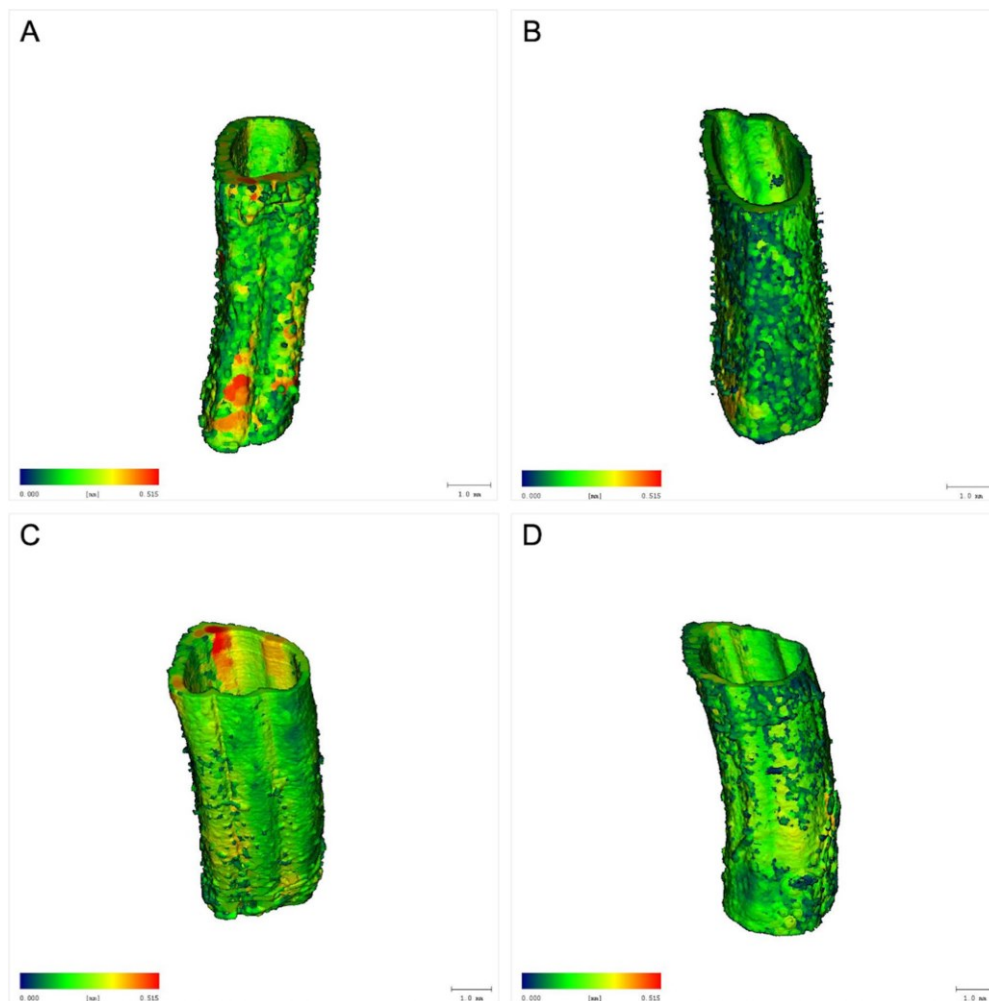


Abb. 5: “Color-coded representation of mean P.Th of the periodontal space. Regions of high thickness are marked in red, whereas low thickness is marked in blue. A Upper jaw (test group). B Upper jaw (control group). C Lower jaw (test group). D Lower jaw (control group)” nach Becker et al. [56]

3.2 Knochenmikrostruktur

Beim Vergleich von BV/TV zwischen Ober- und Unterkiefer konnten, wie aus Abb. 6 und Tabelle 3 hervorgeht, signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) mit höheren Werten im Bereich des Unterkiefers festgestellt werden. Allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei Gegenüberstellung von Test- und Kontrollgruppe ($p = 0,956$). Auch bei Betrachtung der Werte von Test- und Kontrollgruppe nur für den Oberkiefer ($p = 0,690$) und nur für den Unterkiefer ($p = 0,706$) konnte in beiden Fällen keine Signifikanz dokumentiert werden.

Im Falle von BMD konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Oberkiefer und Unterkiefer mit höheren Werten im Bereich des Unterkiefers dokumentiert werden ($p < 0,001$). Beim Vergleich von Test- und Kontrollgruppe wurde jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt ($p = 0,986$). Auch bei alleiniger Betrachtung der einzelnen Gruppen im Oberkiefer ($p = 0,868$), bzw. im Unterkiefer ($p = 0,792$) wurde keine Signifikanz festgestellt.

Bei Betrachtung von Tb.Th ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Oberkiefer und Unterkiefer ($p < 0,001$) mit höheren Werten im Unterkiefer. Es konnte keine Signifikanz zwischen Test- und Kontrollgruppe festgestellt werden ($p = 0,235$). Für die alleinige Betrachtung der Subgruppen konnte im Oberkiefer kein signifikanter Unterschied, aber eine Tendenz ($p = 0,085$) zwischen Test- und Kontrollgruppe mit tendenziell höheren Werten in der Testgruppe dokumentiert werden. Für die alleinige Betrachtung der Unterkiefersubgruppe konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden ($p = 0,871$).

Tb.N unterschied sich signifikant im Vergleich von Ober- und Unterkiefer ($p = 0,024$) mit höheren Werten im Oberkiefer. Jedoch konnten für die Betrachtung von Test- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede dokumentiert werden. Bei alleiniger Betrachtung von Test- und Kontrollgruppe für den Oberkiefer ($p = 0,236$) und für den Unterkiefer ($p = 0,427$) konnten keine signifikanten Unterschiede der trabekulären Verbindungen festgestellt werden.

In der Auswertung der Werte von BS konnten signifikante Unterschiede zwischen Ober- und Unterkiefer ($p = 0,030$) mit höheren Werten im Unterkiefer dokumentiert werden. Für den Vergleich von Kontroll- und Testgruppe ergab sich jedoch keine Signifikanz ($p = 0,463$). Ebenso konnte bei einzelner Auswertung der Messwerte für den Oberkiefer ($p = 0,924$) bzw. für den Unterkiefer ($p = 0,359$) keine Signifikanz festgestellt werden.

Für BS/BV ergaben sich zwischen Ober- und Unterkiefer signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) mit höheren Werten im Bereich des Oberkiefers. Beim Vergleich von Kontroll- und Testgruppe konnte kein signifikanter Unterschied dokumentiert werden ($p = 0,287$). Auch bei alleiniger Betrachtung der Werte von Oberkiefer ($p = 0,492$) bzw. Unterkiefer ($p = 0,466$) von Kontroll- und Testgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

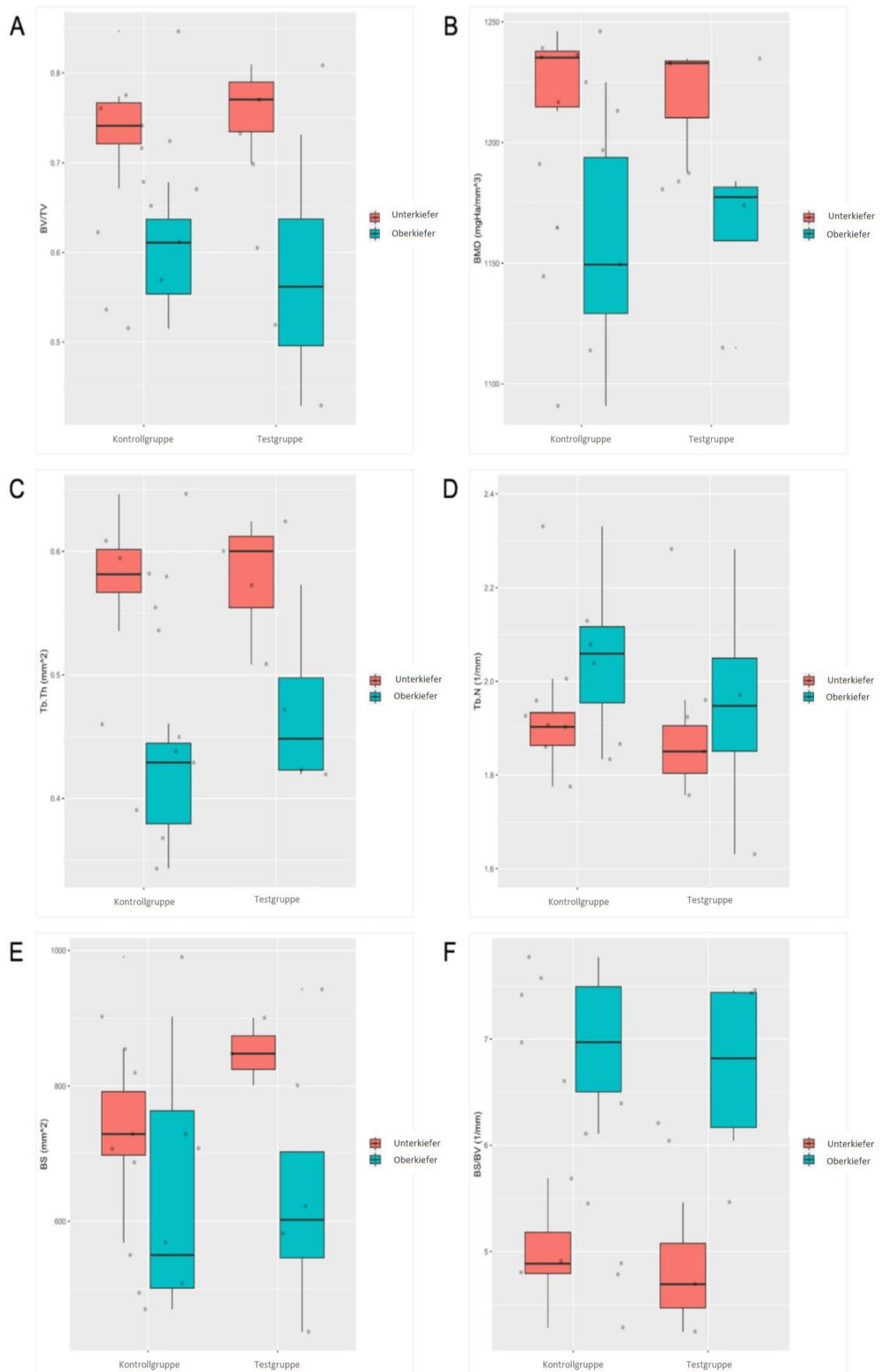


Abb. 6: Übersicht der Ergebnisse der Auswertung der Knochenmikrostruktur im Boxplot. A BV/TV. B BMD. C Tb.Th. D Tb.N. E BS. F BS/BV

Parameter	Werte	Gesamt (Za+nZa)		Za			nZa		
		OK	UK	Gesamt (UK + OK)	OK	UK	Gesamt (UK + OK)	OK	UK
BV/TV [mm ³]	Mittelwert	0,588	0,751	0,652	0,571	0,760	0,673	0,598	0,748
	SD	0,086	0,052	0,140	0,129	0,056	0,095	0,060	0,055
	Median	0,606	0,750	0,699	0,562	0,770	0,675	0,611	0,741
	95% CI	0,571 – 0,605	0,740 – 0,763	0,603 – 0,700	0,460 – 0,682	0,559 – 0,960	0,658 – 0,688	0,565 – 0,631	0,714 – 0,781
BMD [mgHA/mm ³]	Mittelwert	1160,469	1220,603	1186,976	1163,431	1218,169	1190,169	1158,777	1221,560
	SD	41,234	26,055	40,376	32,564	26,702	49,788	47,900	27,876
	Median	1174,065	1233,778	1184,047	1177,347	1232,878	1204,820	1149,424	1235,127
	95% CI	1152,117 – 1168,822	1214,709 – 1226,497	1172,862 – 1201,090	1163,320 – 1163,542	1218,169 – 1218,570	1182,486 – 1196,851	1158,744 – 1158,810	1221,527 – 1221,593
Tb.Th [mm]	Mittelwert	0,434	0,583	0,517	0,472	0,578	0,499	0,411	0,586
	SD	0,060	0,041	0,083	0,071	0,061	0,010	0,045	0,036
	Median	0,429	0,588	0,508	0,448	0,600	0,498	0,429	0,581
	95% CI	0,421 – 0,446	0,574 – 0,593	0,488 – 0,546	0,361 – 0,583	0,377 – 0,778	0,483 – 0,514	0,378 – 0,445	0,552 – 0,619
Tb.N [1/mm]	Mittelwert	2,068	1,884	1,911	1,952	1,856	2,015	2,134	1,897
	SD	0,265	0,080	0,204	0,267	0,102	0,221	0,260	0,074
	Median	2,039	1,884	1,924	1,948	1,850	1,943	2,080	1,903
	95% CI	2,015 – 2,122	1,866 – 1,902	1,840 – 1,982	1,841 – 2,064	1,655 – 2,056	1,981 – 2,050	2,101 – 2,168	1,863 – 1,930

BS [mm²]	<i>Mittelwert</i>	639,474	781,378	733,183	645,926	849,527	693,979	635,787	752,171
	<i>SD</i>	178,096	121,595	188,038	213,033	49,683	160,865	173,577	134,305
	<i>Median</i>	582,060	764,810	800,904	602,223	847,472	707,267	549,922	728,672
	<i>95% CI</i>	603,399 – 675,548	753,872 – 808,885	667,453 – 798,913	645,814 – 646,037	849,326 – 849,727	669,156 – 718,803	635,753 – 635,820	752,138 – 752,2050
BS/BV [1/mm]	<i>Mittelwert</i>	6,908	4,921	5,935	6,785	4,801	5,975	6,978	4,973
	<i>SD</i>	0,652	0,485	1,242	0,764	0,616	1,169	0,633	0,465
	<i>Median</i>	6,971	4,843	6,047	6,819	4,692	5,899	6,971	4,886
	<i>95% CI</i>	6,776 – 7,040	4,811 – 5,031	5,500 – 6,369	6,674 – 6,896	4,600 – 5,001	5,795 – 6,156	6,945 – 7,011	4,939 – 5,006

Tabelle 3: **Ergebnisübersicht der Knochenmikrostruktur (BV/TV in mm³, BMD in mgHA/mm³, Tb.Th in mm, Tb.N in 1/mm, BS in mm², BS/BV in 1/mm) zwischen Testgruppe (ZA) und Kontrollgruppe (nZA)**

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war es, die volumetrischen Veränderungen des Parodontalspalts und der Knochenmikrostruktur unter Einfluss des antiresorptiv wirkenden Medikaments Zolendronsäure mit Hilfe des Mikro-CT in einem Tiermodell zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden Ober- und Unterkieferscans von insgesamt neun Kaninchen, von denen zuvor fünf Tiere mit hochdosierter Zolendronsäure intravenös behandelt wurden, in Hinblick auf mikromorphometrische und volumetrische Veränderungen analysiert. Dafür wurden repräsentative VOIs gewählt, welche anhand von etablierten Maßen zur Analyse der Kieferknochenmikrostruktur definiert wurden [41, 45, 59, 60]. Diese VOIs wurden dann im Hinblick auf Veränderungen der durchschnittlichen Dicke des Parodontalspalts (P.Th), des Verhältnisses von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen (BV/TV), der Knochenmineralisierungsdichte (BMD), der trabekulären Dicke der Knochenstruktur (Tb.Th), der Anzahl der trabekulären Verbindungen (Tb.N), der Knochenoberfläche (BS) und des Verhältnisses von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen (BS/BV) ausgewertet. Verglichen wurden dabei Ober- und Unterkiefer, Test- und Kontrollgruppe aller Proben, Test- und Kontrollgruppe isoliert für den Oberkiefer sowie isoliert für den Unterkiefer, ebenso wie regionale Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Zähnen bei der Analyse der P.Th Werte.

Bei der Auswertung des Parodontalspalts konnte beobachtet werden, dass sich im Vergleich von Testgruppe (ZA) zu Kontrollgruppe (nZa) signifikant höhere P.Th Werte im Bereich der Testgruppe zeigten. Des Weiteren zeigte sich, dass sich die durchschnittlichen P.Th Werte zwischen Prämolaren und Molaren in beiden Gruppen mit höheren Werten im Bereich der Prämolaren signifikant unterschieden. Bei der Analyse der einzelnen Kiefer konnten im Oberkiefer signifikant höhere P.Th Werte im Bereich der Testgruppe gemessen werden, während sich beim Vergleich der Unterkieferwerte keine Signifikanz zeigte [56].

Interessanterweise entspricht eine Verbreiterung des Parodontalspalts trotz erhobener Signifikanz nur teilweise dem Ergebnis einer vorangegangenen tierexperimentellen Studie, welche periapikale Entzündungen von Mäusen unter Zolendronsäure Administration analysierte [61]. Dort konnten an untersuchten Molaren im Bereich der Wurzeln und der Furkationsbereiche ebenfalls große

lytische Bereiche dokumentiert werden. Diese Bereiche unterschieden sich jedoch zwischen Test- und Kontrollgruppe dadurch, dass bei den mit Zolendronsäure behandelten Tieren ein geringerer Knochenverlust zu beobachten war. Auch wurde in dieser Studie der Parodontalspalt im Bereich der Furkation des ersten Molaren untersucht. Dabei zeigten sich bei allen Tieren Erweiterungen des Parodontalspalts, bei den mit Zolendronsäure behandelten Tieren allerdings signifikant weniger.

Ein Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die vorliegende Studie kann die unterschiedlich hohe verabreichte Dosis der antiresorptiven Medikamente sein. In vorliegendem Fall wurden die Kaninchen mit 50 µg/kg Körpergewicht Zolendronsäure behandelt, de Molon et al. verwendeten 200 µg/kg. Es ist also möglich, dass hier eine höhere Dosis zu stärkeren, beziehungsweise veränderten Effekten geführt haben könnte. Weiter wurde aber der Parodontalspalt nur im Bereich der Furkation des ersten Molaren untersucht, eine volumetrische Auswertung eines großflächigen Bereiches des Parodontalspalts fand in oben genannter Studie nicht statt. Daher bleibt es fraglich, ob nicht eine genauere Auswertung bzw. die Auswertung an mehr als einer Stelle des Parodontalspaltes durch Molon et al. auch zu anderen Ergebnissen geführt hätte.

Eine weitere deskriptive Micro-CT Studie, welche an mit Zolendronsäure behandelten Mäusen (200 µg/kg; 2x pro Woche) durchgeführt wurde, beschreibt einen unveränderten Parodontalspalt an gesunden Molaren, wohingegen an infizierten Molaren Zeichen des Verlustes von Alveolarknochen und Verdickung des Parodontalspalts dokumentiert wurde [62]. Die unterschiedliche Gabe sowie Dosis der Medikation (intravenös vs intraperitoneal) erklärt möglicherweise den Befund eines unveränderten Parodontalspaltes in der oben genannten Studie. Weiter sollte beachtet werden, dass eine volumetrische Auswertung, wie sie in der vorliegenden Studie durchgeführt wurde, eine genauere Bewertung des VOIs zulässt, als eine rein deskriptive Auswertung, wie in der Studie von Soundia et al. [62]. Im Gegensatz zur Studie von Soundia et al. gab es in der vorliegenden Untersuchung keine Subgruppe infizierter Zähne. Allerdings war Ziel der vorliegenden Studie nicht die Untersuchung des Einflusses antiresorptiv wirkender Medikamente im infiziertem Knochen, sondern die volumetrische Analyse der parodontalen Mikrostruktur unter Bisphosphonat Therapie.

Für die Analyse der Knochenmikrostruktur wurden die VOIs nach oben genannten Kriterien analysiert. Dabei konnten in allen Parametern signifikante Unterschiede zwischen Ober- und Unterkiefer erhoben werden. Beim Vergleich von Test- und Kontrollgruppe konnte jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden. Auch im Vergleich der einzelnen Subgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Lediglich bei der Messung von Tb.Th, also der trabekulären Dicke, konnte im Bereich des Oberkiefers ein tendenziell höherer Wert für die Testgruppe erhoben werden ($p=0,085$). Der Vergleich der Tb.Th Werte im Unterkiefer zeigte keine Tendenz ($p=0,871$).

Dennoch steht der Befund einer tendenziellen Erhöhung der Tb.Th Werte in Assoziation mit einer Zolendronsäure Administration im Einklang mit den Ergebnissen zweier früherer Micro-CT Studien, welche an Ratten durchgeführt wurden [63, 64]. Dabei wurden bei da Silva et al. in der Testgruppe nach dreiwöchiger Medikamentengabe ($66 \mu\text{g/kg}$; 3x pro Woche) erhöhte Tb.Th Durchschnittswerte gemessen. Nach Extraktion der Zähne stieg Tb.Th weiter an [63]. Auch eine weitere an Ratten durchgeführte Studie von Soares et al. mit mikromorphometrischer Auswertung bestätigt eine Verdickung der trabekulären Struktur [64]. Hochdosierte Bisphosphonat Applikation scheint also mit einer Verdickung der einzelnen Trabekel einherzugehen. Dies könnte zusätzlich zu der bereits nachgewiesenen endothelial bedingten antiangiogenetischen Wirkung von Bisphosphonaten zu vaskulären Engpässen im Knochen und damit einhergehend zur Entstehung von Osteonekrosen führen [65].

Der Vergleich der Anzahl trabekulärer Verbindungen in Test- und Kontrollgruppe ergab keine signifikanten Unterschiede. Dies stimmt ebenfalls mit der Studie von Soares et al. überein, auch hier konnten keine Signifikanz zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren beobachtet werden [64]. Eine hochdosierte antiresorptive Therapie scheint also keine Neubildung von Knochentrabekeln zu initiieren, sondern wie oben beschrieben vermehrt mit einer volumetrischen Zunahme der bestehenden Trabekel einherzugehen.

Weiter konnten in den zuvor beschriebenen Studien entgegen den hier ermittelten Ergebnissen außerdem signifikante Veränderungen der BV/TV, also des Verhältnisses zwischen Knochenoberfläche zur Gesamtoberfläche des

untersuchten Bereiches, gemessen werden. Dabei konnten Soares et al. sowohl im Bereich zwischen distaler und mesialer Wurzel des ersten Molaren als auch im Bereich des periapikalen Knochens signifikant höhere BV/TV Werte beobachten [64].

Die Unterschiede beider genannter Studien in Bezug auf die vorliegende Studie, vor allem im Hinblick auf die veränderten BV/TV Werte, können verschiedene Gründe haben. Die Spezies der Versuchstiere, die Dauer der Anwendung, die Dosis der Zolendronsäure und die individuelle Lokalisation des VOIs können Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben. Erwiesenermaßen sind die verabreichten Dosen an Zolendronsäure hoch genug gewesen, um den Beginn einer MRONJ sowohl in Nagetieren [63, 66] als auch in Kaninchen [67] zu initiieren. Erste strukturelle Veränderung der Knochenmikromorphometrie konnten dabei bereits nach dreiwöchiger Verabreichung beobachtet werden.

Bei Betrachtung der Knochenmineralisierungsdichte konnten in vorliegender Studie keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dieser Befund stimmt mit der Beobachtung von Vilarinho et al. überein. Hier konnte zwar eine Erhöhung von BMD über die Zeit dokumentiert werden, jedoch sowohl in behandelten als auch in unbehandelten Versuchstieren [63]. Im Gegensatz dazu beschreibt Vermeer et al. in einer 2016 veröffentlichten Studie, bei welcher Mäuse bis zu sechs Monate lang mit Bisphosphonaten behandelt wurden, eine signifikante Erhöhung der BMD [68].

Für das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen (BS/BV) sowie die reine Knochenoberfläche (BS) konnten in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Testgruppe ermittelt werden. Auch in der Literatur gibt es keine Hinweise auf Veränderungen in diesen Parametern, welche mit Bisphosphonatmedikation einhergehen. Somit gibt es zur Zeit keinen Anhaltspunkt für einen Einfluss von Bisphosphonaten auf das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen.

Limitationen

Die größte Limitation der vorliegenden Studie ist mit Sicherheit die geringe Probenzahl. Dennoch gilt: Dass die gleichen Präparate im Sinne einer Micro-CT Studie erneut für andere Fragestellungen analysiert werden können, bietet einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zur Analyse mittels Histomorphometrie [45]. Dies liegt daran, dass in der Histomorphometrie die Schnittrichtung und Färbung maßgeblich die Auswertung vorgeben und nach der Fragestellung ausgewählt werden. Gleichzeitig wird allerdings die Samplegröße der neuen Studie durch die vergangene weiter beeinflusst. Eine veränderte Forschungsfrage in der aktuellen Studie führt daher wie bereits beschrieben zum Ausschluss von Samples, welche in diesem Kontext aufgrund ihrer Morphologie oder Trimmung das VOI nicht komplett abbildeten. So konnten nicht alle Micro-CT Scans der vorangegangenen Studie von Schwarz et al. auch für die aktuelle Untersuchung genutzt und analysiert werden [55]. Dementsprechend konnte keine Power Kalkulation durchgeführt werden, da die oben genannte Originalstudie andere wissenschaftliche Fragen verfolgte.

Obwohl die Allgemeingültigkeit und Aussagekraft der erhobenen Ergebnisse der vorliegenden Studie im Licht der geringen Anzahl an Versuchstieren an Bedeutung verlieren könnte, sollte dennoch berücksichtigt werden, dass gerade im Hinblick auf das 3R Prinzip mit dem Ziel der Reduzierung von Versuchstieren und die aktuell noch spärliche wissenschaftliche Datenlage volumetrischer Auswertungen von Veränderungen der Knochenmikromorphometrie bei Bisphosphonatadministration [52], die vorliegende Studie durchaus relevante Ergebnisse liefert. Dies zeigt, dass auch eine klein angelegte, sich am 3R Prinzip orientierende Studie einen relevanten Beitrag zur modernen Wissenschaft beitragen kann. Daher können Informationen aus dieser Studie für zukünftige Forschungsprojekte einen bedeutenden Maßstab zur Probenanzahl liefern.

Ausblick

Da Zolendronsäure erwiesenermaßen einen schädlichen Einfluss auf die Mikrozirkulation des Parodonts hat [69], könnte in zukünftigen Studien beobachtet werden, ob und wie Zolendronsäure-induzierte volumetrische Veränderungen des Parodontalspalts mit vaskulären Veränderungen desselben Gebietes einhergehen. Kontrasterweiternde Micro-CT Bildgebung in Kombination mit histologischen Untersuchungen könnten ergänzende Informationen liefern, um die medikamenten-induzierte Veränderungen der parodontalen Mikrozirkulation besser zu verstehen.

Die Gründe für die in der vorliegenden Studie dokumentierten erhöhten P.Th Werte sowie deren klinische Relevanz, sollten in zukünftigen Studien weiter untersucht werden. Diese Veränderungen könnten aufgrund einer möglichen Verdichtung durch die nachgewiesene Erhöhung der Tb.Th Werte des restlichen Knochens gleichzeitig mit einer verminderten Knochenelastizität einhergehen, welche durch eine Erweiterung des parodontalen Spaltes kompensiert wird. Der mögliche Verlust der Elastizität des Knochens während und nach einer Bisphosphonattherapie wird durch eine Studie von Kim et al. untermauert. In dieser tierexperimentellen Studie wurden 24 Ratten untersucht, von denen 19 mit Zolendronsäure behandelt wurden. Es konnte dabei herausgefunden werden, dass es aufgrund der bisphosphonat-induzierten Hemmung der Knochenumwandlung zu vermehrten Mikrobrüchen im Knochen kommt [70].

Da Zolendronsäure regelmäßig zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt wird, wäre es ebenfalls interessant sowohl gesunde als auch an Osteoporose erkrankte Versuchstiere zu untersuchen, um herauszuarbeiten, bis zu welchem Grad die Veränderungen der Knochenstruktur der zugrundeliegenden Erkrankung in Kombination mit dem Medikament geschuldet sind oder als Nebenwirkung des Medikaments verursacht werden [71-74].

Auch für den Bereich der Kieferorthopädie könnten weitere Forschungen dazu von großer Relevanz sein, denn gerade in diesem Fachbereich konnte innerhalb der letzten zehn Jahre eine stetige Steigerung der Behandlungsfälle in allen Altersgruppen dokumentiert werden [75, 76]. Diese Steigerung in Kombination mit dem weiten Indikationsgebiet von antiresorptiven Medikamenten erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass auch Patienten unter antiresorptiver Therapie,

insbesondere bei niedriger Dosis den Wunsch nach kieferorthopädischer Behandlung haben. Von enormer Wichtigkeit ist hier für eine erfolgreiche Therapie ein gutes Verständnis über den Einfluss der Medikation auf potentielle Zahnbewegungen. Offen ist weiter, ob es einen Dosis-abhängigen Zusammenhang zwischen antiresorptiver Medikation und P.Th gibt. Diese Fragestellung war nicht Bestandteil der aktuellen Studie und bedarf weiterer Forschung.

Zusammenfassung

In dieser Studie wurde im Kaninchenmodell mittels volumetrischer Auswertung der Einfluss von hochdosierten Bisphosphonaten auf den gesunden Parodontalspalt und den zahntragenden Knochen untersucht.

Dabei konnte unter Berücksichtigung der vorhandenen Limitationen gezeigt werden, dass die intravenöse Administration von antiresorptiv wirkenden Medikamenten, in diesem Fall Zolendronsäure, hauptsächlich mit einer Erhöhung von P.Th an Prämolaren und Molaren gekoppelt zu sein scheint. Tendenzielle Effekte der Medikation konnten mikromorphometrisch durch eine Erhöhung der trabekulären Dicke nachgewiesen werden. Dieser Nachweis stimmt mit der aktuellen Studienlage überein und gibt Hinweis darauf, dass ein stärkerer knöcherner Verbund entsteht [56].

Bei kritischer Betrachtung der vorliegenden Studie und Vergleich mit aktuellen Publikationen mit ähnlicher Fragestellung wird deutlich, dass weitere Forschung notwendig ist, um die mikromorphometrischen Prozesse und Veränderungen, welche unter antiresorptiver Therapie stattfinden, besser zu verstehen. Die vorliegende Studie trägt einen Teil dazu bei, die nach wie vor übersichtliche Studienlage in diesem Bereich zu erweitern und liefert trotz geringer Probenzahl plausible Ergebnisse.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Francesco Saverio De Ponte, *Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw: A Multidisciplinary Approach*. 2011, 1 ed.: Springer Milano. 181.
2. Papapoulos, S.E., *Bisphosphonates: how do they work?* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2008. **22**(5): p. 831-47.
3. Fleisch, H., R.G. Russell, and M.D. Francis, *Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo*. Science, 1969. **165**(3899): p. 1262-4.
4. Cremers, S., et al., *Pharmacology of bisphosphonates*. Br J Clin Pharmacol, 2019. **85**(6): p. 1052-1062.
5. Baron, R., S. Ferrari, and R.G. Russell, *Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects*. Bone, 2011. **48**(4): p. 677-92.
6. Russell, R.G., et al., *Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy*. Osteoporos Int, 2008. **19**(6): p. 733-59.
7. Van Beek, E., et al., *Dissociation of binding and antiresorptive properties of hydroxybisphosphonates by substitution of the hydroxyl with an amino group*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(10): p. 1492-7.
8. van Beek, E., et al., *Structural requirements for bisphosphonate actions in vitro*. J Bone Miner Res, 1994. **9**(12): p. 1875-82.
9. Reiner Bartl, E.T., Christoph Bart, *Bisphosphonat-Manual*. 2006: Springer Berlin, Heidelberg. 299.
10. Lin, J.H., I.W. Chen, and F.A. deLuna, *On the absorption of alendronate in rats*. J Pharm Sci, 1994. **83**(12): p. 1741-6.
11. Porras, A.G., S.D. Holland, and B.J. Gertz, *Pharmacokinetics of alendronate*. Clin Pharmacokinet, 1999. **36**(5): p. 315-28.
12. Russell, R.G., et al., *The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats*. Calcif Tissue Res, 1970. **6**(3): p. 183-96.
13. Weiss, H.M., et al., *Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(10): p. 2043-9.
14. Rogers, M.J., et al., *Inhibition of growth of Dictyostelium discoideum amoebae by bisphosphonate drugs is dependent on cellular uptake*. Pharm Res, 1997. **14**(5): p. 625-30.
15. Frith, J.C., et al., *The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(9): p. 2201-10.

16. Kavanagh, K.L., et al., *The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7829-34.
17. Russell, R.G., *Bisphosphonates: the first 40 years*. Bone, 2011. **49**(1): p. 2-19.
18. Bellido T, Plotkin LI. *Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability*. Bone. 2011 Jul; **49**(1):p. 50-5.
19. Maruotti, N., et al., *Bisphosphonates: effects on osteoblast*. Eur J Clin Pharmacol, 2012. **68**(7): p. 1013-8.
20. Marx, R.E., *Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic*. J Oral Maxillofac Surg, 2003. **61**(9): p. 1115-7.
21. Ruggiero, S.L., et al., *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update*. J Oral Maxillofac Surg, 2014. **72**(10): p. 1938-56.
22. Eleutherakis-Papaïakovou, E. and A. Bamias, *Antiresorptive treatment-associated ONJ*. Eur J Cancer Care (Engl), 2017. **26**(6).
23. Merigo, E., et al., *Jaw bone necrosis without previous dental extractions associated with the use of bisphosphonates (pamidronate and zoledronate): a four-case report*. J Oral Pathol Med, 2005. **34**(10): p. 613-7.
24. Ruggiero, S.L., et al., *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022 Update*. J Oral Maxillofac Surg, 2022. **80**(5): p. 920-943.
25. Gaudin, E., et al., *Occurrence and risk indicators of medication-related osteonecrosis of the jaw after dental extraction: a systematic review and meta-analysis*. J Clin Periodontol, 2015. **42**(10): p. 922-32.
26. Vahtsevanos, K., et al., *Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw*. J Clin Oncol, 2009. **27**(32): p. 5356-62.
27. Saad, F., et al., *Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases*. Ann Oncol, 2012. **23**(5): p. 1341-1347.
28. McGowan, K., T. McGowan, and S. Ivanovski, *Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: A systematic review*. Oral Dis, 2018. **24**(4): p. 527-536.
29. Kim, S., et al., *IL-36 Induces Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw-Like Lesions in Mice by Inhibiting TGF- β -Mediated Collagen Expression*. Journal of Bone and Mineral Research, 2017. **32**(2): p. 309-318.
30. Hadaya, D., et al., *Nonsurgical Management of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws Using Local Wound Care*. J Oral Maxillofac Surg, 2018. **76**(11): p. 2332-2339.

31. Carlson, E.R. and J.D. Basile, *The role of surgical resection in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws*. J Oral Maxillofac Surg, 2009. **67**(5 Suppl): p. 85-95.
32. Stanton, D.C. and E. Balasanian, *Outcome of surgical management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: review of 33 surgical cases*. J Oral Maxillofac Surg, 2009. **67**(5): p. 943-50.
33. Wilde, F., et al., *The role of surgical therapy in the management of intravenous bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011. **111**(2): p. 153-63.
34. Nisi, M., et al., *Conservative surgical treatment of medication related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) lesions in patients affected by osteoporosis exposed to oral bisphosphonates: 24 months follow-up*. J Craniomaxillofac Surg, 2018. **46**(7): p. 1153-1158.
35. El-Rabbany, M., et al., *Surgical Therapy in Patients With Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw Is Associated With Disease Resolution and Improved Quality of Life: A Prospective Cohort Study*. J Oral Maxillofac Surg, 2022. **80**(6): p. 1084-1093.
36. He L, Sun X, Liu Z, Qiu Y, Niu Y. *Pathogenesis and multidisciplinary management of medication-related osteonecrosis of the jaw*. Int J Oral Sci. 2020 Oct 21;12(1):30.
37. Zirk, M., et al., *Volumetric analysis of MRONJ lesions by semiautomatic segmentation of CBCT images*. Oral Maxillofac Surg, 2019. **23**(4): p. 465-472.
38. Lentzen, M.P., et al., *Bisphosphonate application and volumetric effects on MRONJ lesions*. J Craniomaxillofac Surg, 2021. **49**(6): p. 501-507.
39. Dössel, O., *Bildgebende Verfahren in der Medizin*. 2. Auflage, Springer Vieweg Berlin, Heidelberg.2016 XXX, 513 Seiten.
40. Varela, A. and J. Jolette, *Bone Toolbox: Biomarkers, Imaging Tools, Biomechanics, and Histomorphometry*. Toxicol Pathol, 2018. **46**(5): p. 511-529.
41. Dias, D.R., et al., *Agreement between Histomorphometry and Microcomputed Tomography to Assess Bone Microarchitecture of Dental Implant Sites*. Clin Implant Dent Relat Res, 2015. **17**(4): p. 732-41.
42. Feldkamp, L.A., et al., *The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography*. J Bone Miner Res, 1989. **4**(1): p. 3-11.
43. L. A. Feldkamp, L. C. Davis, and J. W. Kress, "Practical cone-beam algorithm," J. Opt. Soc. Am. A **1**, 612-619 (1984).
44. Badea, C.T., et al., *In vivo small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography*. Phys Med Biol, 2008. **53**(19): p. R319-50.
45. Bouxsein, M.L., et al., *Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(7): p. 1468-86.

46. Müller, R., et al., *Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography*. Bone, 1998. **23**(1): p. 59-66.
47. Uchiyama, T., et al., *A morphometric comparison of trabecular structure of human ilium between microcomputed tomography and conventional histomorphometry*. Calcif Tissue Int, 1997. **61**(6): p. 493-8.
48. Parfitt, A.M., et al., *Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee*. J Bone Miner Res, 1987. **2**(6): p. 595-610.
49. §7 Abs. 1 Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 105 des Gesetzes vom 10. August 2021 (BGBl. I S. 3436) geändert worden ist
50. Bundesinstitut für Risikobewertung, *Zahlen zu den im Jahr 2020 verwendeten Versuchstieren*, Bericht vom 16.12.2021: <https://www.bfr.bund.de/wissenschaftsbericht/zahlen-zu-den-im-jahr-2020-verwendeten-versuchstieren/>: letzter Zugriff 28.11.2022
51. *Tierversuche in der Forschung*. 2016: Senatskommission für tierexperimentelle Forschung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
52. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Medical Journal of Australia, 1960. **1**(13): p. 500-500.
53. *Tierversuche in der Forschung: Das 3R-Prinzip und die Aussagekraft wissenschaftlicher Forschung*. 2019, Deutsche Forschungsgemeinschaft: https://www.dfg.de/dfg_profil/gremien/senat/tierexperimentelle_forschung/publikationen/index.html: letzter Zugriff 01.04.2025
54. Schlüter, K.D., *Tierversuche: Übertragbarkeit auf den Menschen und ihre Durchführbarkeit*. Zeitschrift für Herz-,Thorax- und Gefäßchirurgie, 2019. **33**(1): p. 67-71.
55. Schwarz, F., et al., *Influence of ridge preservation procedures on extraction socket healing under antiresorptive therapy: An experimental study in rabbits*. Clin Implant Dent Relat Res, 2020. **22**(4): p. 477-485.
56. Becker, K., et al., *Volumetric analysis of the periodontal microstructure under antiresorptive therapy: an experimental study in rabbits*. Clin Oral Investig, 2022. **26**(8): p. 5359-5368.
57. *R Core Team (2021) R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. . 2021.
58. Bates, D., et al., *Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4*. Journal of Statistical Software, 2015. **67**(1): p. 1 - 48.
59. Parvini, P., et al., *Microstructural volumetric analysis of vertical alveolar ridge augmentation using autogenous tooth roots*. Clin Implant Dent Relat Res, 2020. **22**(5): p. 647-653.
60. Becker, K., et al., *Biomechanical, micro-computed tomographic and immunohistochemical analysis of early osseous integration at titanium*

- implants placed following lateral ridge augmentation using extracted tooth roots. Clin Oral Implants Res, 2017. 28(3): p. 334-340.*
61. de Molon, R.S., et al., *Spontaneous osteonecrosis of the jaws in the maxilla of mice on antiresorptive treatment: a novel ONJ mouse model. Bone, 2014. 68: p. 11-9.*
 62. Soundia, A., et al., *Osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice after extraction of teeth with periradicular disease. Bone, 2016. 90: p. 133-41.*
 63. Vilarinho, J.L.P., et al., *Early bony changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats: A longitudinal in vivo study. Arch Oral Biol, 2017. 82: p. 79-85.*
 64. Soares, M.Q.S., et al., *Zoledronic Acid Induces Site-Specific Structural Changes and Decreases Vascular Area in the Alveolar Bone. J Oral Maxillofac Surg, 2018. 76(9): p. 1893-1901.*
 65. Wood, J., et al., *Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 302(3): p. 1055-61.*
 66. Kuroshima, S., et al., *Medication-related osteonecrosis of the jaw-like lesions in rodents: A comprehensive systematic review and meta-analysis. Gerodontology, 2019. 36(4): p. 313-324.*
 67. Kim, I., et al., *The effect of systemically administered bisphosphonates on bony healing after tooth extraction and osseointegration of dental implants in the rabbit maxilla. Int J Oral Maxillofac Implants, 2013. 28(5): p. 1194-200.*
 68. Vermeer, J., et al., *Bone-site-specific responses to zoledronic acid. Oral Dis, 2017. 23(1): p. 126-133.*
 69. Kosach, G.A., et al., *Influence of the cumulative effect of zoledronic acid on periodontal microcirculation in rats. Oral Maxillofac Surg, 2021. 25(4): p. 487-494.*
 70. Kim, J.W., et al., *Role of microcracks in the pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Clin Oral Investig, 2016. 20(8): p. 2251-2258.*
 71. Mardas, N., et al., *Guided bone regeneration in osteoporotic conditions following treatment with zoledronic acid. Clin Oral Implants Res, 2017. 28(3): p. 362-371.*
 72. Mardas, N., et al., *The role of strontium ranelate and guided bone regeneration in osteoporotic and healthy conditions. J Periodontal Res, 2021. 56(2): p. 330-338.*
 73. Duarte, P.M., et al., *Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. J Periodontal Res, 2006. 41(6): p. 541-6.*
 74. Viera-Negrón, Y.E., et al., *Effect of ovariectomy and alendronate on implant osseointegration in rat maxillary bone. J Oral Implantol, 2008. 34(2): p. 76-82.*
 75. *Abgerechnete Behandlungsfälle und Bema-Punkte, KZBV Jahrbuch 2022. p.70-71*

76. Seeling S, P.F., *Inanspruchnahme kieferorthopädischer Behandlung durch Kinder und Jugendliche in Deutschland – Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends*. Journal of Health Monitoring, 2018. **3/4**: p. 78-85.

Danksagung

Ich möchte die Möglichkeit nutzen, an dieser Stelle den Personen zu danken, ohne die die Vollendung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Zu allererst gilt mein Dank Frau Professor Kathrin Becker, die mir dieses Projekt anvertraut hat, mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und die mir trotz aller Widerstände geholfen hat, eine sinnvolle Arbeit zu erstellen.

Herrn Professor Schwarz danke ich für die Möglichkeit, die Scans aus der Grundstudie für diese Arbeit erneut nutzen und analysieren zu dürfen. Danke auch für Ihre Expertise und Ihre wertvollen Anregungen.

Viele Stunden hat Robert Kerberger mit mir zusammen im Doktorandenraum der Poliklinik für Kieferorthopädie verbracht, hat mit mir zusammen Problemstellungen gelöst, Skripte geschrieben und Daten analysiert. Vielen Dank für all die Zeit, die du in mich und in diese Arbeit investiert hast.

Ich danke meinen großartigen Eltern, die mir beigebracht haben an mich zu glauben und nicht müde geworden sind, mich zu ermutigen, mich zu unterstützen und für mich zu beten. Ich kann in Worten gar nicht sagen, wie dankbar ich euch bin.

Zuletzt möchte ich diesen Teil nicht abschließen, ohne meiner wundervollen Frau Jenny zu danken. Danke für all deine Unterstützung und deine Rücksichtnahme. Danke für all die Motivation, für deine Ratschläge, dein Verständnis und all die Hilfe, die ich von dir bekommen habe. Ohne dich wäre ich nicht, wo ich heute bin. Dafür bin ich dir unendlich dankbar.