

Der Einfluss des Zahndurchbruchs auf die Knochenentwicklung im Bereich der Zahnanlagen der Unterkiefer-Molaren der Maus

Eine Finite-Elemente-Analyse

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Junliang Chen

aus Luzhou / China

2019

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Peter Bourauel

Gutachter: Prof. Dr. med. Werner Götz

Tag der Mündlichen Prüfung: 06. 05. 2019

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik, Propädeutik
und Werkstoffwissenschaften

Direktor: Prof. Dr. med. dent. H. Stark

– Oralmedizinische Technologie –

Prof. Dr. rer. nat. C. Bourauel

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Deutsche Zusammenfassung	4
1.1 Einleitung	4
1.2 Material und Methoden	5
1.3 Ergebnisse	6
1.4 Diskussion	6
1.5 Schlussfolgerungen	9
1.6 Literaturverzeichnis	9
2. Veröffentlichung	11
Abstract	13
Introduction	15
Materials and Methods	18
Results	19
Discussion	21
Conclusions	26
References	27
Figure Legends	33
Note	38
3. Danksagung	39

1. Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Schädigungen des Alveolarknochens sind häufig Folge von okklusalem Druck, Entzündungen oder Erkrankungen. Ein detailliertes Verständnis der Entwicklung des Alveolarknochens kann helfen, die Regeneration desselben zu optimieren. In der vorliegenden Arbeit werden biomechanische Mechanismen untersucht, die den Knochenumbau im Verlauf der Embryonalentwicklung steuern. Die Entwicklung des Alveolarknochens ist in dieser Phase eng mit dem Zahndurchbruch verknüpft. Während des Zahndurchbruchs wird der Zahnfollikel um den Zahnkeim als eine der Hauptquellen der Entwicklung parodontaler Strukturen einschließlich des Alveolarknochens angesehen (Wise und King, 2008). Der Zahnfollikel dient nicht nur als Quelle für parodontales Gewebe, sondern überträgt auch die Kräfte vom Zahn auf den Alveolarknochen, wodurch die Knochenentwicklung induziert werden kann (Kjaer, 2014).

Die Bildung der Schnittstelle zwischen Zahn und Knochen ist ein Schwerpunkt der aktuellen Forschung. Aus biochemischer und mechanischer Sicht kann die aktive Wechselwirkung zwischen diesen ähnlichen Geweben aus ihrer unmittelbaren Nähe zueinander hergeleitet werden: Die knöcherne Einkapselung von Zahnanlagen als räumliches Hindernis kann als einer der morphogenetischen Faktoren angesehen werden (Radlanski, 2018).

Allgemein akzeptiert ist, dass Knochen eine funktionelle mechanische Stimulation benötigt, um seine Struktur aufrechtzuerhalten. Die funktionelle Anpassung des Alveolarknochens an die aufgebrachten Belastungen und Kräfte ist wichtig für die Knochenbildung (Field et al., 2008). Die Kräfte, die von Zahnentwicklung und -durchbruch ausgehen, werden vom Mesenchym auf den Zahnfollikel übertragen und induzieren Expansionskräfte. Es ist noch weitgehend ungeklärt, in welcher Art und Weise Dehnungskräfte von Zähnen in den Alveolarknochen übertragen werden. Interessant ist dabei insbesondere die Verknüpfung der Belastungsverteilungen mit den biologischen Reaktionen, wie z.B. dem Knochenumbau. Dabei ist davon auszugehen, dass die Knochendeformation mit der Knochenbelastung in Wechselwirkung steht und dies als biologische Reaktion auf die Veränderung des Gleichgewichtszustands in der Umgebung anzusehen ist. Obwohl der Mechanismus, der Knochenumbau und -aufbau durch mechanische Beanspruchung antreibt, noch nicht vollständig geklärt ist, ist ein phänomenologischer Zusam-

menhang zwischen Kraffteinwirkung und Knochenreaktion offensichtlich (Torcasio et al., 2014).

Eine direkte Dehnungsmessung im In-vivo-Experiment ist ganz offensichtlich nicht möglich. Insofern muss auf indirekte, theoretische Methoden zurückgegriffen werden. Hier bieten sich die Finite-Elemente-Methoden (FEM) an, um biomechanische Reaktionen in Alveolarknochenmodellen vorherzusagen. Die FEM wird seit nunmehr über 40 Jahren erfolgreich für Simulationen biomechanischer Systeme eingesetzt (Prochor und Sajewicz, 2018). Die Bildung des Alveolarknochens, in dem sich zunächst die Zahnanlage und später die Zahnwurzeln befinden, kann als Modell für allgemeine Fragen der Alveolarknochenentwicklung dienen. Ziel dieser Arbeit war es, die potentiellen Wechselwirkungen zwischen dem Zahndurchbruch und der Alveolarknochenbildung mit Hilfe der Finite-Elemente-Methode zu untersuchen und durch Vergleich mit histologischen Untersuchungen zu ermitteln, ob die expandierenden Zahnanlagen Scherspannungen induzieren, die zur Alveolarknochenbildung führen können.

1.2 Material und Methoden

3D-Modellentwicklung aus histologischen Schnittbildserien.

In einer vorangegangenen Studie (Radlanski et al., 2015) wurden von 38 Köpfen von Mäusen (C57 Bl/6J) in verschiedenen Stadien (E - embryonale Tage 13, 14, 15, 16, 17 und 18 und P - postnatale Tage 0, 4, 6, 8, 10, 14, 18 und 20) histologische Serienschnitte hergestellt. Für jedes Stadium wurden 3D-Rekonstruktionen angefertigt, um die Morphogenese im Bereich der Zahnanlagen der Unterkiefer-Molaren mit dem sie umgebenden Knochen zu untersuchen. Die 3D-Daten der Schnittserien wurden in dieser Arbeit in 3-Matic Research 9.0 (Materialise NV, Leuven, Belgien) importiert. Danach wurden Knochen, Dentin, Schmelz und Zahnfollikel um die Zahnanlagen herum identifiziert, segmentiert und zunächst in 3D-Oberflächenmodelle konvertiert. Nach Importierung der Oberflächenmodelle in das FE-Softwarepaket MSC.Marc/Mentat 2010 (MSC.Software, Santa Ana, Kalifornien, USA) erfolgte die Konvertierung in FE-Modelle mit Hilfe von 4-Knoten-Tetraeder-Elementen.

Eigenschaften des Finite-Elemente-Modells.

Materialeigenschaften der relevanten anatomischen Strukturen wurden aus in der Literatur angegebenen Werten abgeleitet (Sarrafpour et al., 2013). Materialparameter von

embryonalen Knochen-, Dentin-, Zahnschmelz- und Zahnfollikelstrukturen wurden von 1% bis 100% der entsprechenden bekannten Literaturwerte für den Menschen variiert, da diese bislang für embryonale Entwicklungsstadien insbesondere bei der Maus grundsätzlich unbekannt sind, und es wurde eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt, um den Einfluss der Parametervariation auf die Ergebnisse der Knochenbelastungen zu ermitteln.

Randbedingungen und Belastungen.

Auf die äußere Oberfläche der Zahnfollikel wurden Spannungen im Bereich von 0,1 N/mm² bis 5,0 N/mm² (Burn-Murdoch, 1981) aufgebracht. Die Ergebnisse wurden in Form von mechanischen Spannungen und Verzerrungen dokumentiert und mit den histologischen Ergebnissen aus der Arbeit von Radlanksi et al. (2015) verglichen. Als feste Randbedingungen wurden alle äußeren Knoten des Netzes entlang einer Linie des basalen Aspekts des Alveolarknochens in allen drei Raumebenen fixiert.

1.3 Ergebnisse

Als wichtigstes Ergebnis für die weitere biomechanische Analyse zeigte sich, dass in allen Entwicklungsstadien die Orte höchster Scherspannungen und die Verteilung der Scherspannungen bei einer Variation der Materialparameter der Hartgewebe stabil blieben. Die Analyse der Scherspannungen zeigte, dass die Scherspannung in allen Fällen hauptsächlich an der Außenseite des Alveolarknochens lagen und sich die höchste Scherspannung (0,3 MPa bei einer expandierenden Spannung von 5,0 N/mm² auf dem Follikel) an der Oberseite des Alveolarknochens befand.

Der Vergleich der histologisch bestimmten Wachstumsregionen mit der Verteilung der Scherspannungen aus den numerischen Modellen zeigte eine sehr gute Übereinstimmung. Die numerischen Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Appositionsregionen als auch die Scherspannungsbereiche in den nahezu gleichen Regionen lagen, und zwar um die Zahnfollikel herum und an der Außenseite des Alveolarknochens.

1.4 Diskussion

Der Alveolarknochen ist ein äußerst aktives Gewebe und gehört zu den aktivsten Teilen des menschlichen Knochens. Gemäß einer Hypothese von Blechschmidt (1948; 2004) findet Knochenbildung im Embryo in den Regionen statt, in denen das Bindegewebe

belastet wird. Zu dieser Annahme gelangte er nach sorgfältigen Studien histologischer Serienschnitte verschiedener Entwicklungsstadien menschlicher Embryonen. Er postulierte weiterhin, dass die Knochenbildung durch Scherkräfte ausgelöst würde (Bleichschmidt, 1948; 2004). Daher wurden in dieser Arbeit die Verteilungen der Scherspannungen im Knochen im Bereich der Zahnanlagen der Unterkiefer-Molaren der Maus in verschiedenen Embryonal- und Postnatalstadien analysiert. Dafür wurden in numerischen Modellen nach außen gerichtete Kräfte in Form von Oberflächenspannungen auf den Zahnfollikel aufgegeben, die die von den durchbrechenden Zähnen erzeugten Kräfte simulierten. Der Vergleich von histologisch bestimmten Wachstumsregionen mit der Verteilung der Scherspannungen, die im numerischen Modell berechnet wurden, zeigte für jede Entwicklungsstufe eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen experimentellen und numerischen Ergebnissen.

Dieses Ergebnis zeigt eine enge Korrelation zwischen Scherspannungen und dem Umbau des Alveolarknochens im Verlauf des Kieferwachstums. Es indiziert, dass während des Prozesses der Volumenzunahme und des Zahndurchbruchs die Scherspannung, welche durch die Ausdehnung der Zahnwurzeln entsteht, zur Bildung des Alveolarknochens führen könnte.

Die Untersuchung des Zahndurchbruchs ist eine anspruchsvolle Aufgabe, vor allem, weil dieser extrem langsam abläuft und die Zähne bis zum Eintritt in die Mundhöhle unzugänglich sind (Li et al., 2016). Infolgedessen sind weder der Durchbruchmechanismus noch die beteiligten Stimuli beim Durchbruch vollständig verstanden. In der Studie von Radlanksi et al. (2016) konnte gezeigt werden, dass sich um den durchbrechenden und in Entwicklung befindlichen Zahn neuer Knochen bildet. Dieser Knochen wird so in gebildet, dass er in Regionen verlagert wird, in denen es vorher kein Gewebe gab und in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass er sich in Regionen bildet, in denen Scherkräfte berechnet werden können, die von dem expandierenden Zahnfollikel ausgehen. Im Stadium der Zahnentwicklung wird der Alveolarknochen aufgrund des Zahnwechsels kontinuierlich stimuliert. In mehreren Arbeiten wurde geäußert, dass die mechanische Stimulation des Zahndurchbruchs zu einer Remodellierung des Alveolarknochens führt (z.B. Kjaer, 2014; Sarrafpour et al., 2013). Bislang ist es jedoch schwer zu sagen, wie und warum die Alveolarknochenentwicklung entlang der Richtung des Zahndurchs verläuft (Wang und Feng, 2017). Nach unserem Kenntnisstand wurden in diesem Kontext

zum ersten Mal biomechanische Methoden angewandt, um die Knochenentwicklung um Zahnanlagen zu untersuchen und aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Die Steifigkeiten der an diesem Prozess beteiligten Materialien sind bislang weitestgehend unbekannt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine sogenannte Sensitivity-Analyse durchgeführt. Hierbei werden Materialparameter oder Geometrien der Modelle systematisch variiert und deren Einfluss auf die Ergebnisse in Form von Spannungen und Verzerrungen analysiert. Ausgehend von den bekannten Elastizitätsmoduln der beteiligten Strukturen für ausgewachsene Menschen (Sarrafpour et al., 2013) wurden die Materialparameter von Knochen, Dentin, Zahnschmelz und Zahnfollikel von 1 bis 100 % der Ausgangswerte variiert. Es wurde festgestellt, dass sowohl die Lage der Maximalwerte als auch das Verteilungsmuster der Scherspannungen stabil blieben. Selbstverständlich änderte sich der Maximalwert der Scherspannungen bei Variation der Materialparameter.

In den durchgeführten Simulationen wurde der Wert der expandierenden Oberflächenspannungen auf den Zahnfollikeln von $0,1 \text{ N/mm}^2$ bis $5,0 \text{ N/mm}^2$ variiert und die Ergebnisse wurden mit den histologischen Ergebnissen verglichen. Offensichtlich blieben auch hier die Verteilungen der Scherspannungen bei verschiedenen Oberflächenbelastungen unverändert, wobei die Maximalwerte der Spannungen variierten. Daraus kann geschlossen werden, dass bei Bestimmung der Materialeigenschaften der relevanten anatomischen Strukturen die exakte Größe der Ausdehnungskraft durch Anwendung der Mechanostat-Theorie (Frost, 2003) hergeleitet werden könnte.

Eine detaillierte Analyse der Biomechanik des Knochens in der Umgebung der Zahnkeime kann hilfreich sein, die biomechanischen Reaktionen, die auf eine Remodellierung des Alveolarknochens hindeuten, vollständig zu verstehen. Die Fähigkeit des Knochens, sich an eine Änderung der Belastungen anzupassen, ist eine der entscheidenden Eigenschaften des Knochens und die biologische Reaktion auf mechanische Beanspruchungen beruht hauptsächlich auf einer Verformung von Gewebe und Zellen. Es ist bekannt, dass der Alveolarknochen mit dem Zahnkeim zeitlich und räumlich eng verknüpft ist (Radlanski et al., 2016). Während des Zahndurchbruchs wurde der Zahnfollikel als das aktive Gewebe bei der Regulierung der Knochenresorption und als Weg durch den Knochen beschrieben (Tuncer et al., 2017). Der genaue biomechanische Mechanismus des Zahndurchbruchs, der schließlich zur Knochenentwicklung in diesem Bereich führt,

bleibt jedoch weiterhin unklar. Es wurde angenommen, dass Scherkräfte den entscheidenden Stimulus für die Knochenbildung während der Embryonalentwicklung (Blechschildt, 1948; 2004) und beim Knochenumbau (Frost, 2003) darstellen. Der Vergleich zwischen den Regionen des neu gebildeten Knochens und den in den numerischen Modellen ermittelten Scherspannungen ist ein starkes Indiz dafür, dass die Blechschildt-sche Hypothese tatsächlich zutrifft.

1.5 Schlussfolgerungen

In dieser Studie wurden die Bereiche neu gebildeten Knochens um sich ausdehnende Zahnkeime im Alveolarknochen mit möglichen Kräften, die aus FE-Modellen berechnet wurden, verglichen. Die aus Datensätzen histologischer 3D-Rekonstruktionen abgeleiteten Modelle wurden genutzt, um entsprechende Scherspannungen um die Zahnkeime zu ermitteln. In den vorangegangenen histologischen Untersuchungen wurde neu gebildeter Knochen in den gleichen Regionen gefunden, in denen die berechneten Scherspannungen am höchsten waren. Die Ergebnisse dieser Studie liefern einen deutlichen Hinweis darauf, dass die These von Blechschildt, dass Knochen unter dem Einfluss von Scherkräften entsteht, die von benachbarten Geweben ausgeübt werden, korrekt ist. Dies ist einer der Schlüssel zum Verständnis der Mechanismen der Alveolarknochenbildung und -entwicklung.

1.6 Literaturverzeichnis

Blechschildt E. Mechanische Genwirkungen. Göttingen: Musterschildt, 1948

Blechschildt E. The Ontogenetic Basis of Human Anatomy: The Biodynamic Approach to Development from Conception to Adulthood. Berkely: North Atlantic Books, 2004

Burn-Murdoch RA. The effect of applied forces on the eruption of rat maxillary incisors. Arch Oral Biol 1981; 26, 939-943

Field C, Li Q, Li W, Swain M. Influence of tooth removal on mandibular bone response to mastication. Arch Oral Biol 2008; 53, 1129-1137

Frost HM. Bone's mechanostat: a 2003 update. Anat Rec A: Discov Mol Cell Evol Biol 2003; 275, 1081-1101

Kjaer I. Mechanism of human tooth eruption: review article including a new theory for future studies on the eruption process. Scientifica (Cairo) 2014; 4, 341905

- Li LL, Liu PH, Xie XH, Ma S, Liu C, Chen L, Qin CL. Loss of epithelial FAM20A in mice causes amelogenesis imperfecta, tooth eruption delay and gingival overgrowth. *Int J Oral Sci* 2016; 8, 98-109
- Prochor P, Sajewicz E. A comparative analysis of internal bone remodeling concepts in a novel implant for direct skeletal attachment of limb prosthesis evaluation: A finite element analysis. *Proc Inst Mech Eng H* 2018; 232, 289-298
- Radlanski RJ, Renz H, Zimmermann CA, Mey R, Matalova E. Morphogenesis of the compartmentalizing bone around the molar primordia in the mouse mandible during dental developmental stages between lamina, bell-stage, and root formation (E13-P20). *Ann Anat* 2015; 200, 1-14
- Radlanski RJ, Renz H, Zimmermann CA, Schuster FP, Voigt A, Heikinheimo K. Chondral ossification centers next to dental primordia in the human mandible: A study of the prenatal development ranging between 68 to 270 mm CRL. *Ann Anat* 2016; 208, 49-57
- Radlanski, RJ. *Oral Structure and Biology*. Quintessence Publishing, Chicago. 2018
- Sarrafpour B, Swain M, Li Q, Zoellner H. Tooth eruption results from bone remodelling driven by bite forces sensed by soft tissue dental follicles: a finite element analysis. *PLoS One* 2013; 8, e58803
- Torcasio A, Jähn K, van Guyse M, Spaepen P, Tami AE, vander Sloten J, Stoddart MJ, van Lenthe GH. Trabecular bone adaptation to low-magnitude high-frequency loading in microgravity. *PLoS One* 2014; 9, e93527
- Tuncer I, Delilbasi C, Deniz E, Soluk Tekkesin M, Olgac V, Sencift K. Effects of pamidronate administration on tooth eruption and mandibular growth in new born rats. *J Istanbul Univ Fac Dent* 2017; 51, 8-14
- Wang J, Feng JQ. Signaling pathways critical for tooth root formation. *J Dent Res* 2017; 96, 1221-1228
- Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *Dent Res* 2008; 87, 414-434

2. Veröffentlichung

Numerical investigations of bone remodelling around the mouse
mandibular molar primordia

Junliang Chen, Yun He, Ludger Keilig, Susanne Reimann, Istabrak Hasan, Joachim
Weinhold, Ralf Radlanski, Christoph BouraueI

Ann Anat. 2018 Dec 30;222:146-152.

doi: 10.1016/j.aanat.2018.12.009. [Epub ahead of print]

Impact Factor²⁰¹⁷: 1.852

Numerical Investigations of Bone Remodelling Around the Mouse Mandibular Molar Primordia

Junliang Chen^{1,2}, Yun He^{1,2, *}, Ludger Keilig^{2,3}, Susanne Reimann², Istabrak

Hasan^{2,3},

Joachim Weinhold⁴, Ralf Radlanski⁵, Christoph Bouraue²

¹ Orofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou, China

² Endowed Chair of Oral Technology, University of Bonn, Bonn, Germany

³ Department of Prosthetic Dentistry, Preclinical Education and Materials Science, Dental School, University of Bonn, Bonn, Germany

⁴ Technische Universität Berlin, Faculty II - Mathematics and Natural Sciences, Institute of Mathematics, 3D Lab

⁵ Department of Craniofacial Developmental Biology, Center for Dental and Craniofacial Sciences, Charité - Free University of Berlin, Germany

*Corresponding author

Dr. Yun He.

Abstract:

The formation of the alveolar bone, which houses the dental primordia, and later the roots of tooth, may serve as a model to approach general questions of alveolar bone formation. In this respect, this study aimed to investigate the potential interactions between the alveolar bone formation and tooth eruption by using finite element (FE) methods, and to figure out whether the expanding tooth systems induce shear stresses that lead to alveolar bone formation. 3D geometric surface models were generated from the 3D histological data of the heads of mice (C57 Bl/6J) ranging from stages embryonic (E) to postnatal (P) stages E15 to P20 using the reconstruction software 3-Matic. Bone, dentin, enamel and dental follicle around the primordia were generated and converted into 3D FE models. Models were imported into the FE software package MSC.Marc/Mentat. As material parameters of embryonic dentine, pulp, enamel, dental follicle, and bony structures basically are unknown, these were varied from 1% to 100% of the corresponding known material parameters for humans and a sensitivity analysis was performed. Surface loads were applied to the out surface of dental follicle ranging from 0.1 to 5.0 N/mm². The validity of the model was analysed by comparing the activity pattern of the alveolar bone as determined in the histological study with the loading pattern from the numerical analysis. The results show that when varying the surface loads, the distribution of shear stresses remained same, and while varying the material properties of the hard tissues, the location of highest shear stresses remained stable. Comparison of the histologically determined growth regions with the distribution

of shear stresses computed in the numerical model showed a very close agreement. The results provide a strong proof to support Blechschmidt's hypothesis that the bone in general is created under the influence of shear forces.

Key words: bone remodelling; primordia; stress; finite element analysis

1. Introduction

The degradation of the alveolar bone over time is a common clinical finding in most human adults (Abuhashish et al., 2017; Lee et al., 2013), and subclinical chronic inflammation is one of the most common conditions resulting in the loosening and/or loss of teeth due to the loss of alveolar bone (Iqbal et al., 2017; Minamizato et al., 2018; Ozaki et al., 2017). Therefore, maintaining the height and shape of the alveolar bone is critical for dental health. However, the restoration of the alveolar bone has been a challenge in periodontal regenerative therapy for years (Ou et al., 2015). The challenge is not only the regeneration of the alveolar bone, but also its formation. The alveolar bone is prone to damage by occlusal pressure, inflammation, and disease, and detailed understanding of alveolar bone development is necessary to improve the treatment involving periodontal tissue regeneration.

Alveolar bone development is closely related to tooth eruption. During tooth eruption, the dental follicle around the tooth germ is considered as one of the main sources of periodontal structures, including alveolar bone (Wise et al., 2008). The dental follicle not only serves as a source of periodontal tissue, but also transmits the forces from tooth to the alveolar bone which may induce the bone development (Kjaer, 2014). The formation of the tooth-bone-interface (Alfaqeeh et al., 2013; Fleischmannova et al., 2010; Lungová et al., 2011) has become the focus of current research. From the biochemical and mechanical point of view, the active interaction between the related tissues may be well

expected from their close proximity: Bony encapsulation of dental primordia, as a spatial impediment, may be seen as one of the morphogenetic factors (Oralová et al., 2014; Radlanski, 2018).

The functional adaptation of alveolar bone to applied loading signifies an important component in researching the bone formation (Field et al., 2008). The mode in which expanding forces of teeth are transferred into the alveolar bone justifies the need to clarify the distributions of stress and relate them to biological responses such as the bone remodelling. Bone deformation is studied by the ability of the bone to sustain strain, which is a biological reaction to changes in the environment. Although the mechanism, how the mechanical strain drives bone remodelling, is still not very clear, a phenomenological relationship between force and bone reaction is obvious (Rungsiyakull et al., 2011; Sarrafpour et al., 2012; Torcasio et al., 2014).

Nowadays, the finite element method (FEM) plays an important role in solving engineering problems in many fields of science. The FEM can successfully be applied in simulations of biomechanical systems (Martinez et al., 2017; Pahr et al., 2016; Prochor et al., 2018). The very dynamic temporal change in bone structure by healing and bone remodelling cannot directly be detected, neither by experimental methods nor using standard finite element methods. There is a paucity of studies on the morphological and biomechanical level dealing with the structural formation of alveolar bone and the tooth eruption. The formation of the alveolar bone, which houses the dental primordia, and later the roots of

tooth, may serve as a model to approach general questions of alveolar bone formation. In this respect, this study aimed to investigate the potential interactions between the alveolar bone formation and tooth eruption by using finite element methods, and to figure out whether the expanding tooth systems induce shear stresses that lead to alveolar bone formation.

2. Material and methods

In a previous study (Radlanski et al., 2015), 38 heads of mice (C57 Bl/6J) at embryonic (E) days 13, 14, 15, 16, 17, and 18 and postnatal (P) days 0, 4, 6, 8, 10, 14, 10 and 20 were used to prepare histological serial sections. For each stage, 3D reconstructions were made to study the morphogenesis of the mandibular molar primordia concomitantly with their surrounding bone.

3D data of specimens were imported into 3-Matic research 9.0 (Materialise NV, Leuven, Belgium). Thereafter, bone, dentin, enamel and dental follicle around the primordia were generated respectively and converted into 3D FE models using 4-noded tetrahedral elements, i.e. linear Lagrangian elements. Models were imported into the FE software package MSC.Marc/Mentat 2010 (MSC.Software, Santa Ana, CA, USA, Figure 1). Material properties of the relevant anatomical structures were taken from the literature (Sarrafpour et al., 2013). As material parameters of embryonic bone, dentin, enamel and dental follicle structures basically are unknown, these were varied from 1% to 100% of the corresponding known material parameters (Table 1) and a sensitivity analysis was performed. Surface loads were applied to the surface of dental follicle (Figure 2) ranging from 0.1 N/mm² to 5.0 N/mm² (Burn-Murdoch, 1981) and the results were compared with the histological results.

3. Results

The contours of the shear stresses developed in every relative stiffness scenario are shown in Figure 3. For each development stage the location of highest shear stresses and distribution of shear stress remained stable under variation of the material properties of the hard tissues. Taking the model of bone in developmental stage E16 as an example, Figure 3 shows that the highest shear stress increased from $4.5e-3$ to $5.5e-2$ with the relative stiffness of hard tissue increasing from 1% to 100%. However, the location of highest shear stresses and distribution of shear stress remained stable. The shear stress analysis showed that in all the cases the shear stresses were mainly distributed on the outer side of the alveolar bone and the highest shear stress was located nearby at the top of the alveolar bone.

For each development stage, the distribution of shear stresses remained the same while the value of the surface loads varied (Figure 4). Taking the model of bone in development stage E16 as an example, the surface of dental follicle was applied 50 different surface loads from 0.1 N/mm^2 to 5.0 N/mm^2 . Models with surface loads of 0.1 N/mm^2 , 0.5 N/mm^2 , 1.0 N/mm^2 , 5.0 N/mm^2 are displayed in Figure 4, and the values of highest shear stress were $4.5e-3$, $2.5e-2$, $5.0e-2$ and $3.0e-1$, respectively. Moreover, the distribution of shear stresses in all models remained the same. The shear stresses were mainly distributed on the outer side of the alveolar bone.

Comparison of the histologically determined growth regions with the distribution

of shear stresses computed in the numerical models showed a very close agreement between experimental and numerical results (Figure 5, 6). The marginal ridges of the dental crypts and the outer side of the alveolar bone showed bone apposition in the 3D reconstruction from histological serial sections and the bottom of the dental crypts were characterised by resorption in the previous study (Radlanski et al., 2016). The numerical results indicated that, both the apposition regions and the shear stress areas were distributed almost at the same regions, the marginal ridges of the dental crypts and the outer side of the alveolar bone.

4. Discussion

Blechsmidt (1948, 2004) has put forward a hypothesis that bone formation in the embryo is found in regions, where the connective tissue undergoes detracting. He arrived at this assumption after meticulous studies of histological serial sections of different developmental stages of human embryos (Blechsmidt 1960). Due to technical obstacles, this hypothesis cannot easily be tested in living specimens, but there are hints and obvious findings that detracting can be derived from cellular shape next to newly formed bone. Although, "signalling" did predominate explanations (Mina 2001), of how form is being created, mechanics play a role (Ingber 2005), or at least, a combination of both (de la Fuente et al., 2005; Radlanski et al., 2006; Papachristou et al., 2009). The tooth-bone-interface is an interesting location to study bone formation and bone shape.

Thus we analysed the distribution of shear stresses in the bone around the mouse mandibular molar primordia under expanding forces of emerging teeth. For each development stages, comparison of the histologically determined growth regions with the distribution of shear stresses computed in the numerical model showed a very close agreement between experimental and numerical results (Figure 5). This fully demonstrates the close correlation between shear stresses and the alveolar bone remodelling. It indicates that during the process of volume increase and tooth eruption, the shear stress produced from expanding dental primordia may lead to the formation of

alveolar bone.

With this study we could not experimentally test the hypothesis, if bone is being formed from connective tissue under the influence of detraction forces, as formulated by Blechschmidt (2004). However, we could show the formation of new bone around the developmental dental primordial. In a way, this is similar: Bone is being formed in regions, where it has not been before in previous stages, and it forms in regions where we could calculate shearing forces originating from the expanding dental primordial.

We know from bone remodelling that alveolar bone is linked with the condition of teeth. Especially, at the stage of dental development, the alveolar bone is continuously stimulated due to the constant change of teeth. Most scientists suggest that the mechanical stimulation of tooth eruption causes the remodelling of alveolar bone (Wise et al., 2008; Sarrafpour et al., 2013; Kjaer, 2014). However, until now it remains elusive, how and why the alveolar bone remodelling moves teeth along their eruptive path (Rakian et al., 2013; Lamani et al., 2015; Wang and Feng, 2017). To the best of our knowledge, this is the first time that biomechanical methods were used to study bone remodelling around the primordia and achieved gratifying results.

In this study, the material properties of the relevant anatomical structures in the FE models were taken from the literature as far as possible. However, there is no material data available for bone, enamel and dentin at the development stages. It may be assumed that they show higher elasticity in this state than the

corresponding adult tissue. Therefore the stiffness of these materials was varied to a relative stiffness of 1%, 5%, 10%, 25%, 50% and 100% of respective adult values and the influence of relative stiffness on distribution of stress was analysed. It is found that although the highest value of shear stresses changed from 4.5×10^{-3} to 5.5×10^{-2} , the location of the maximum values remained stable and the distribution of shear stresses also remained stable in the stage E16 under 0.1 N/mm^2 surface loads (Figure 2). The results were also the same in other developmental stages.

As the exact size of the expanding force from dental primordial is unknown, we refer to an eruptive force of $0.1\text{-}1.1 \text{ N/mm}^2$, which has been measured for the continuously growing rodent incisor by Burn-Murdoch (1981). In our simulations, the value of the surface loads applied on the surface of dental follicle was varied from 0.1 N/mm^2 to 5.0 N/mm^2 and the results were compared with the histological results. Obviously, the distribution of shear stresses remained the same under different surface loads, just the values of the stresses varied. Thus it may be concluded that if the material properties of the relevant anatomical structures are determined, the exact size of the expanding force could be derived by applying the mechanostat theory. This suggests that an effective strain below 0.0008 or above 0.02 will enable the bone to resorb or turnover, respectively (Lerebours and Buenzli, 2016; Mahnama et al., 2013). This could lead to more accurate 3D FE models and respective simulation results.

The shear stress profiles within the bone around mouse mandibular molar upon expanding force of dental primordia were evaluated in varying stiffness values of hard tissue and varying surface loads models, respectively. A detailed analysis into the biomechanics of the bone around the dental primordia as a result of tooth eruption force can be useful to gain insight to fully understand the biomechanical responses that are indicative of alveolar bone remodelling. Establishing relationships between tooth eruptive forces and resulting change in bone morphology around the primordia can considerably supplement clinical procedures in restorative alveolar bone therapy.

The morphology and microstructure of bone are largely influenced by mechanical load. The ability of bone to adapt to function load change is very important, and the biological response to mechanical stress is mainly based on tissue and cell deformation. It is maintained that alveolar bone is tooth-germ-related (Radlanski et al., 2016). During tooth eruption, the dental follicle has been described as the active tissue in regulating bone resorption and creating a path through the bone (Fontanetti et al., 2013; Tuncer et al., 2017; Wise et al., 2005; Wise et al., 2006;). However, the exact biomechanical mechanism of tooth eruption, which eventually leads to bone remodelling, remains unclear.

It was assumed that shearing forces may be a trigger for bone formation during embryonic development (Blechs Schmidt, 1948, 2004) and during bone remodelling (Frost, 2003; Klein-Nulend et al., 2005; Proffit et al., 2006). The

comparison between the regions of newly formed bone and the calculated presence of shearing forces, as we have done in this study, may be seen as a strong hint. The putative forces, however, which may be exercised by the expanding primordia, have not yet been elucidated, and to what degree this shearing force might induce cellular differentiation processes needs further clarification.

5. Conclusion

The results of this research provide a strong hint to support Blechschmidt's hypothesis that bone is being created under the influence of shear forces, which is exercised from neighboring tissue. In this study, we compared the regions of newly formed bone around expanding dental primordia with possible forces calculated from FE-models obtained from the data sets of the histological 3D-reconstruction. We found newly formed bone in the same regions, where calculated shearing forces were highest.

It is one of the keys to understand the mechanisms of the alveolar bone formation and remodelling and might contribute to the regenerative treatment of alveolar bone atrophy in clinical practice.

In future research, we will clarify the size of the expanding force from the dental primordia and determine the material properties of the relevant anatomical structures, enabling the generation of more accurate numerical models with more reliable results, even more consistent with the available histological data.

References

Abuhashish HM, Khairy DA, Abdelsalam MM, Alsayyah A, Ahmed MM, Al-Rejaie SS. 2018. In-vivo assessment of the osteo-protective effects of eugenol in alveolar bone tissues. *Biomed Pharmacother.* 97, 1303-1310.

Alfaqeeh SA, Gaete M, Tucker AS. 2013. Interactions of the tooth and bone during development. *J Dent Res.* 92, 1129-1135.

Blechschildt E. 1948. *Mechanische Genwirkungen.* Musterschildt, Göttingen.

Blechschildt E. 1960. *The Stages of Human Development before Birth.* Karger, Basel.

Blechschildt E. 2004. *The Ontogenetic Basis of Human Anatomy: The Biodynamic Approach to Development from Conception to Adulthood.* Edited by Freeman B. North Atlantic Books, Berkely.

Burn-Murdoch RA. 1981. The effect of applied forces on the eruption of rat maxillary incisors. *Arch Oral Biol.* 26, 939–943.

Field C, Li Q, Li W, Swain M. 2008. Influence of tooth removal on mandibular bone response to mastication. *Arch Oral Biol.* 53, 1129-1137.

Fleischmannova J, Matalova E, Sharpe PT, Misek I, Radlanski RJ. 2010. Formation of the tooth-bone interface. *J Dent Res.* 89, 108-115.

Fontanetti PA, De Lucca RC, Mandalunis PM, Vermouth NT. 2013. Impairment of rat tooth eruption in pups born to mothers exposed to chronic stress during pregnancy. *Arch Oral Biol.* 58, 1643-1651.

Frost HM. 2003. Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A: Discov Mol Cell Evol Biol.* 275, 1081-1101.

de la Fuente L, Helms JA. Head, shoulders, knees, and toes. *Dev Biol* 15, 294-306.

Ingber DE. 2005. Mechanical control of tissue growth: Function follows form. *PNAS* 102, 11571-11572.

Iqbal H, Ali M, Zeeshan R, Mutahir Z, Iqbal F, Nawaz MAH, Shahzadi L, Chaudhry AA, Yar M, Luan S, Khan AF, Rehman IU. 2017. Chitosan/hydroxyapatite(HA)/hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) spongy scaffolds-synthesis and evaluation as potential alveolar bone substitutes. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 160, 553-563.

Kjaer I. 2014. Mechanism of human tooth eruption: review article including a new theory for future studies on the eruption process. *Scientifica (Cairo).* 2014, 341905.

Klein-Nulend J, Bacabac RG, Mullender MG. 2005. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris).* 53, 576–580.

Lamani E, Gluhak-Heinrich J, MacDougall M. 2015. NFI-C2 temporal-spatial expression and cellular localization pattern during tooth formation. *Dev Growth Differ.* 57, 625-638.

Lee JY, Kim YK, Yi YJ, Choi JH. 2013. Clinical evaluation of ridge augmentation using autogenous tooth bone graft material: case series study. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 39, 156-160.

Lerebours C, Buenzli PR. 2016. Towards a cell-based mechanostat theory of bone: the need to account for osteocyte desensitisation and osteocyte replacement. *J Biomech.* 49, 2600-2606.

Lungová V, Radlanski RJ, Tucker AS, Renz H, Míček, Matalová E. 2011. Tooth-bone morphogenesis during postnatal stages of mouse first molar development. *J Anat.* 218, 699-716.

Mahnama A, Tafazzoli-Shadpour M, Geramipناه F, Mehdi Dehghan M. 2013. Verification of the mechanostat theory in mandible remodeling after tooth extraction: animal study and numerical modeling. *J Mech Behav Biomed Mater.* 20, 354-362.

Martinez Choy SE, Lenz J, Schweizerhof K, Schmitter M, Schindler HJ. 2017. Realistic kinetic loading of the jaw system during single chewing cycles: a finite element study. *J Oral Rehabil.* 44, 375-384.

Mina M. 2001. Regulation of mandibular growth and morphogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 12; 276-300.

Minamizato T, Koga T, I T, Nakatani Y, Umebayashi M, Sumita Y, Ikeda T, Asahina I. 2018. Clinical application of autogenous partially demineralized dentin matrix prepared immediately after extraction for alveolar bone regeneration in implant dentistry: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 47, 125-132.

Oralov V, Chlastkov I, Radlanski RJ, Matalov E. 2014. Distribution of BMP6 in the alveolar bone during mouse mandibular molar eruption. *Connect Tissue Res.* 55, 357-366.

Ou M, Zhao Y, Zhang F, Huang X, 2015. Bmp2 and Bmp4 accelerate alveolar bone development. *Connect Tissue Res.* 56, 204-211.

Ozaki Y, Koide M, Furuya Y, Ninomiya T, Yasuda H, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N, Yoshinari N, Udagawa N. 2017. Treatment of OPG-deficient mice with WP9QY, a RANKL-binding peptide, recovers alveolar bone loss by suppressing osteoclastogenesis and enhancing osteoblastogenesis. *PLoS One.* 12, e0184904.

Pahr DH, Zysset PK. 2016. Finite Element-Based Mechanical Assessment of Bone Quality on the Basis of In Vivo Images. *Curr Osteoporos Rep.* 14, 374-385.

Papachristou DJ, Papachroni KK, Papvassiliou GA, Pirttiniemi P, Gorgoulis VG, Basdra EK. 2009. Functional alterations in mechanical loading of condylar cartilage induces changes in bony subcondylar region. *Arch Oral Biol* 54, 1035-1045.

Prochor P, Sajewicz E. 2018. A comparative analysis of internal bone remodeling concepts in a novel implant for direct skeletal attachment of limb prosthesis evaluation: A finite element analysis. *Proc Inst Mech Eng H.* 232, 289-298.

- Proffit WR, van der Linden FP, McNamara J, Radlanski j, Pancherz RJH. 2006. Facial Growth, Dentition and Function. Quintessence Publishing Group, Berlin.
- Radlanski RJ, Renz H. 2006. Genes, Forces, and Forms. Mechanical Aspects During Prenatal Craniofacial Development. *Dev Dyn.* 235, 1219-1229.
- Radlanski RJ, Renz H, Zimmermann CA, Mey R, Matalova E. 2015. Morphogenesis of the compartmentalizing bone around the molar primordia in the mouse mandible during dental developmental stages between lamina, bell-stage, and root formation (E13-P20). *Ann Anat.* 200, 1-14.
- Radlanski RJ, Renz H, Zimmermann CA, Schuster FP, Voigt A, Heikinheimo K. 2016. Chondral ossification centers next to dental primordia in the human mandible: A study of the prenatal development ranging between 68 to 270 mm CRL. *Ann Anat.* 208, 49-57.
- Radlanski, RJ. 2018. Oral Structure And Biology. Quintessence Publishing, Chicago.
- Rakian A, Yang WC, Gluhak-Heinrich J, Cui Y, Harris MA, Villarreal D, Feng JQ, Macdougall M, Harris SE. 2013. Bone morphogenetic protein-2 gene controls tooth root development in coordination with formation of the periodontium. *Int J Oral Sci.* 5, 75-84.
- Rungsiyakull C, Rungsiyakull P, Li Q, Li W, Swain M. 2011. Effects of occlusal inclination and loading on mandibular bone remodeling: a finite element study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 26, 527-537.

Sarrafpour B, Rungsiyakull C, Swain M, Li Q, Zoellner H. 2012. Finite element analysis suggests functional bone strain accounts for continuous post-eruptive emergence of teeth. *Arch Oral Biol.* 57, 1070-1078.

Sarrafpour B, Swain M, Li Q, Zoellner H, 2013. Tooth eruption results from bone remodelling driven by bite forces sensed by soft tissue dental follicles: a finite element analysis. *PLoS One.* 8, e58803.

Torcasio A, Jhn K, van Guyse M, Spaepen P, Tami AE, vander Sloten J, Stoddart MJ, van Lenthe GH. 2014. Trabecular bone adaptation to low-magnitude high-frequency loading in microgravity. *PLoS One.* 9, e93527.

Tuncer I, Delilbasi C, Deniz E, Soluk Tekkesin M, Olgac V, Sencift K. 2017. Effects of pamidronate administration on tooth eruption and mandibular growth in new born rats. *J Istanbul Univ Fac Dent.* 51, 8-14.

Wang J, Feng JQ. 2017. Signaling Pathways Critical for Tooth Root Formation. *J Dent Res.* 96, 1221-1228.

Wise GE, Yao S, Odgren PR, Pan F. 2005. CSF-1 regulation of osteoclastogenesis for tooth eruption. *J Dent Res.* 84, 837-841.

Wise GE, Yao S, Liu D. 2006. Injections of osteoprotegerin and PMA delay tooth eruption. *Clin Anat.* 19, 19-24.

Wise GE, King GJ. 2008. J Mechanisms of Tooth Eruption and Orthodontic Tooth Movement. *Dent Res.* 87, 414-434.

Figure Legends

Fig. 1: Histological section through dental primordium m₁, stage P10, vertical plane, stained H.&E., taken from a continuous series of sections (left) and 3D FE model (right). Histological serial sections were segmented and reconstructed in 3D (Radlanski et al. 2015) and the datasets converted into 3D finite element models by using the software Mimics and MSC.Marc/Mentat. As an example, the transition from a single histological section to the FE finite element model is shown here, using the primordium of m₁ in developmental stage P10

Fig. 2: Expanding of dental primordia loading conditions where the surface of dental follicle is subjected to surface loads of 0.1 to 5.0 N/mm² (red arrows), using model of the dental follicle in development stage E16 as an example.

Fig. 3: Distribution of shear stresses and location of the highest shear stresses remained stable in all models with hard tissue assigned relative stiffness ranging from 1% to 100% of relevant human mechanical properties), using the model of bone in development stage E16 as an example.

Fig. 4: Distribution of shear stress maintains equal ((or similar)) in all models with the surface of the dental follicle with altered surface loads from 0.1 N/mm² to 5.0 N/mm², using the model of bone in development stage E16 as an example.

Fig. 5: 3D reconstruction of the molar region of the right half of the mandible in an anterior and 45° cranial view created from histologic serial sections. Dental

primordia removed, ocre: bone; mandibular bone with superimposed remodelling marks (red for apposition, green for resorption). Marked apposition and resorption areas in the 3D reconstruction relate to histological findings in the serial sections. Here, the model of bone in development stage P10 was used as an example.

Fig. 6: Comparison of histologically determined remodelling regions in 3D reconstruction and distribution of shear stresses in FE models at each development stages. For color codes, refer to Fig. 5.

Fig. 1

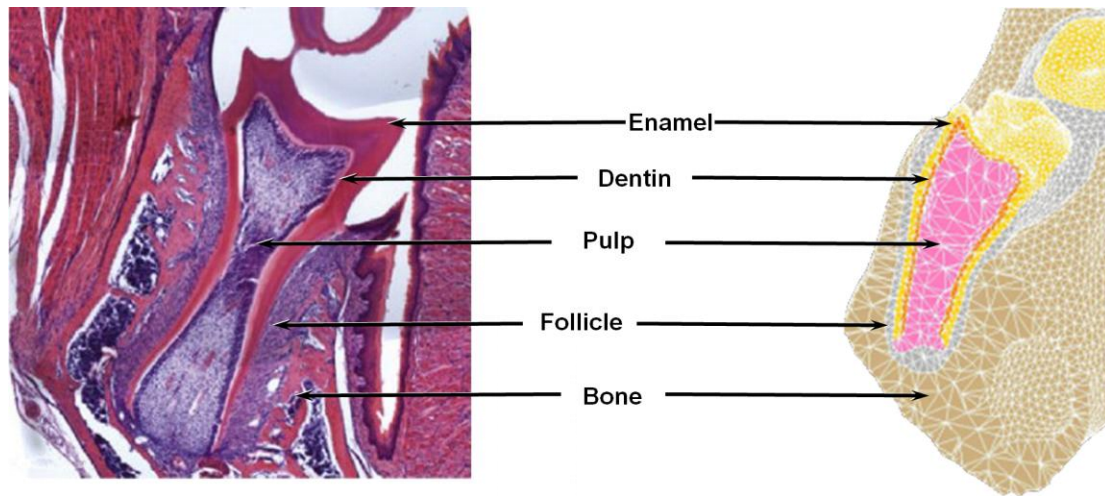


Fig. 2

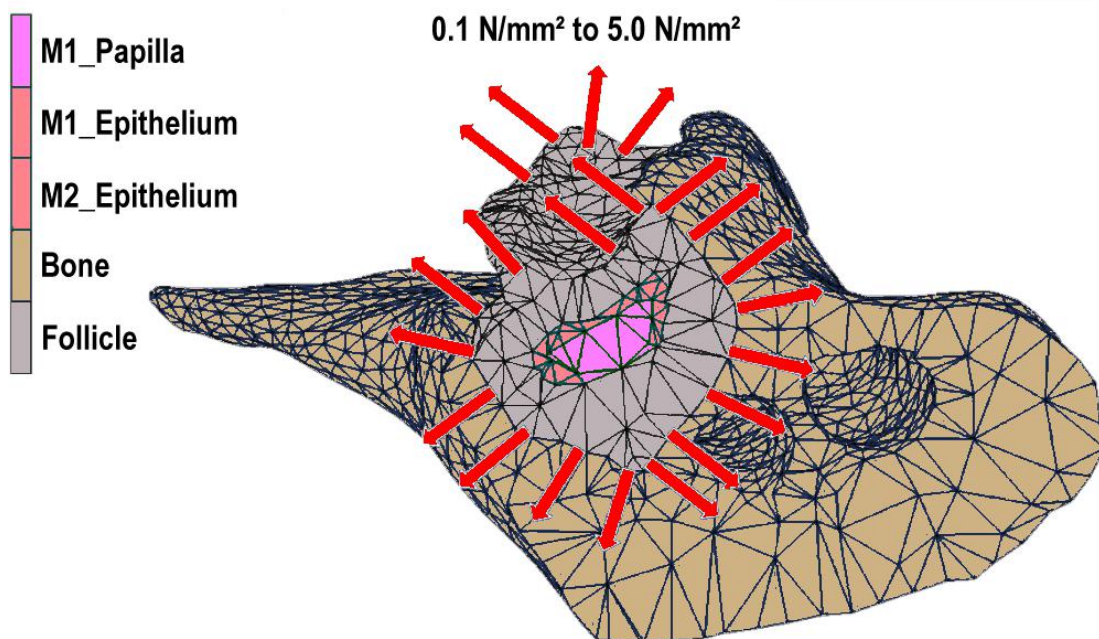


Fig. 3

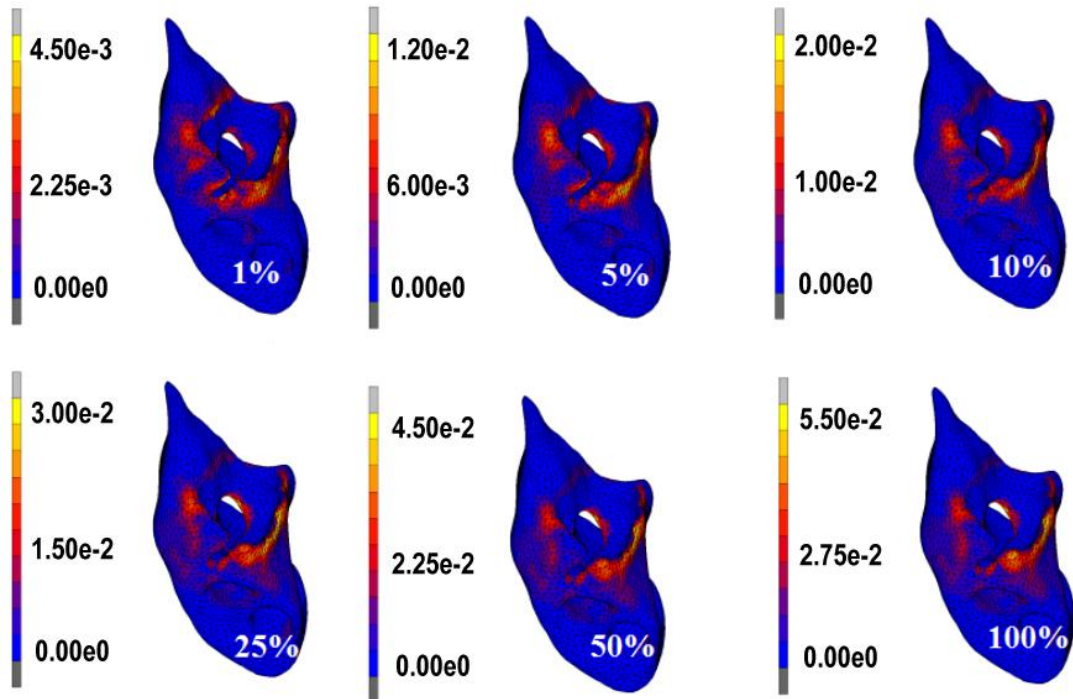


Fig. 4

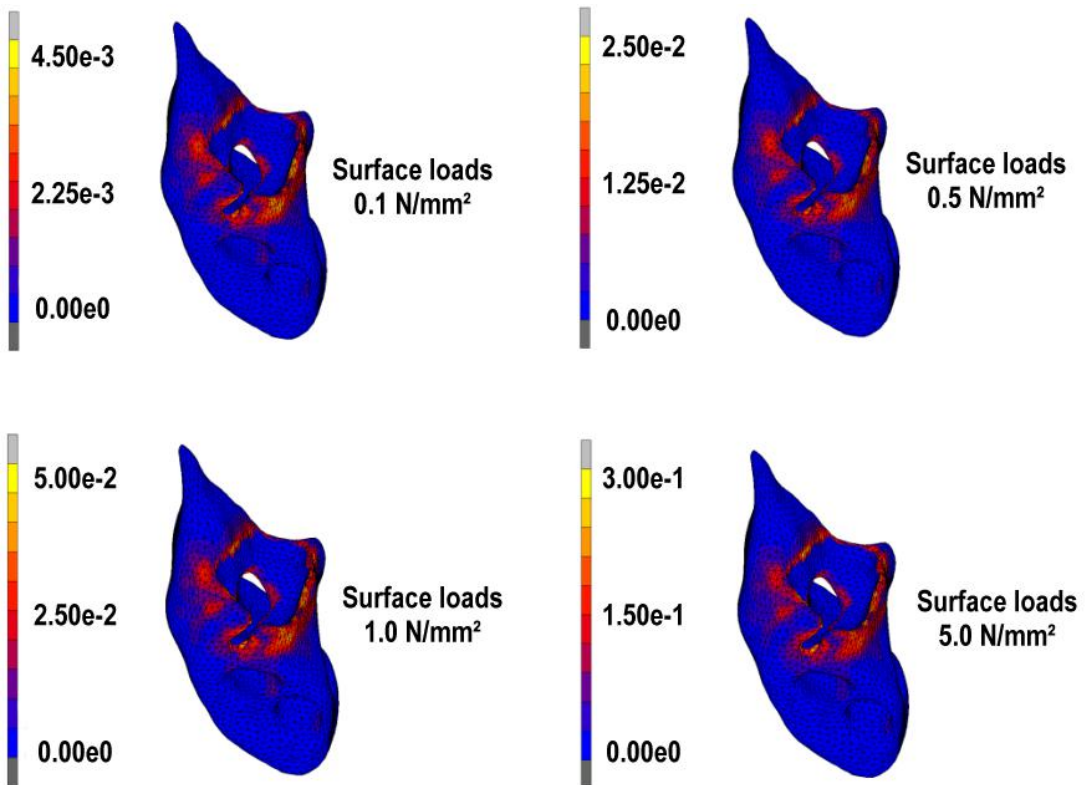


Fig. 5

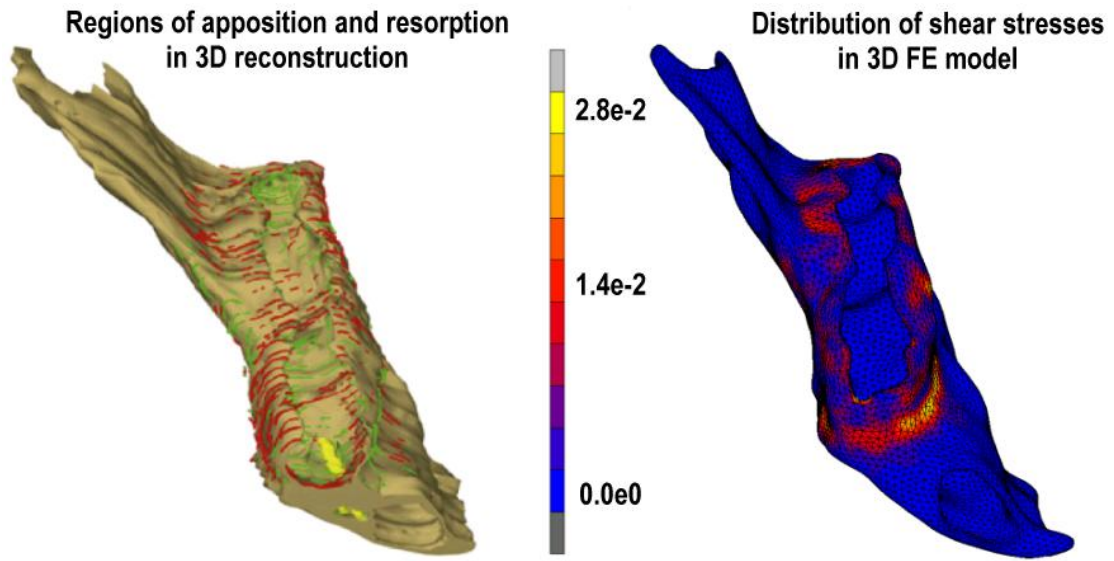
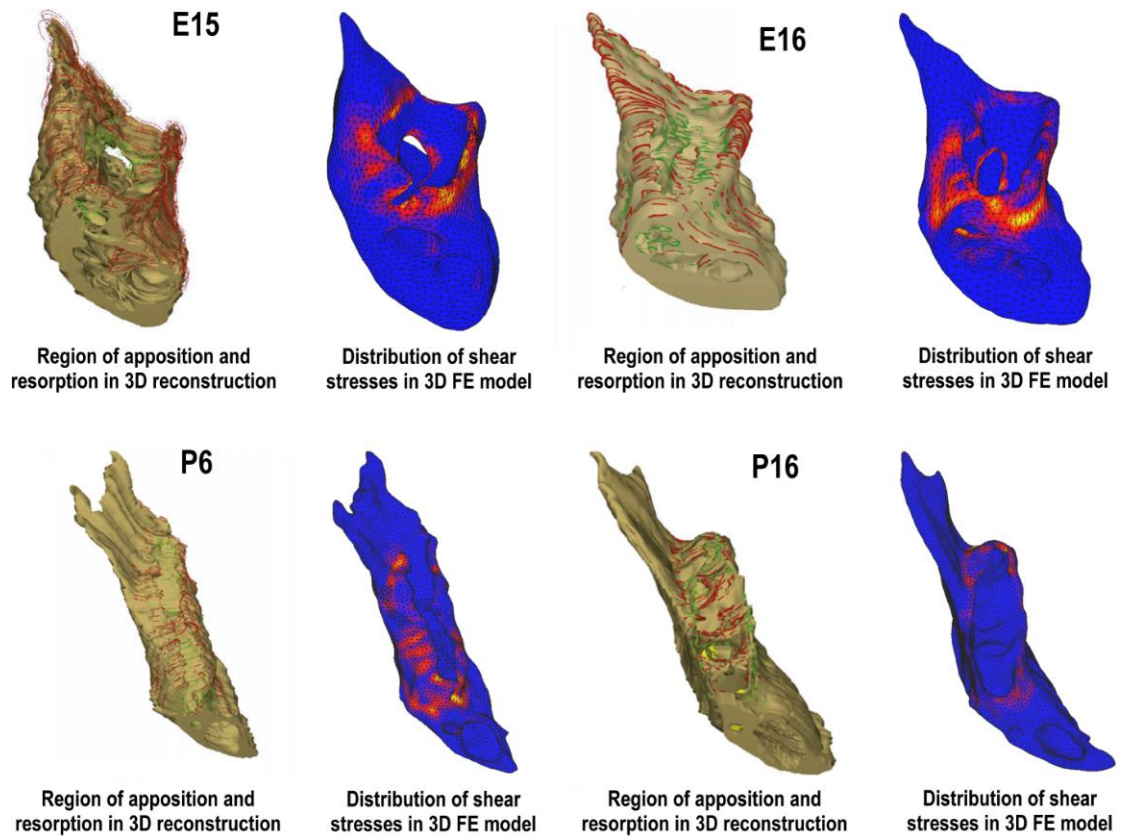


Fig. 6



Note

This is a postprint (final draft post-refereeing) of an article published in

Annals of Anatomy (ISSN: 0940-9602, EISSN: 1618-0402)

The information for the original paper is:

Chen J, He Y, Keilig L, Reimann S, Hasan I, Radlanski R, Bourauel C.

Numerical investigations of bone remodelling around the mouse mandibular molar primordium. *Ann Anat* 2019; 222: 146-152. DOI: 10.1016/j.aanat.2018.

12.009.

3. Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Vorgesetzten Prof. C. Bourauel für seine freundliche Unterstützung, ständige Unterstützung und Flexibilität von Anfang bis Ende dieser Arbeit danken.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Keilig für seine technische Unterstützung und seinen Wissensbeitrag während meines Studiums.

Ich bin Prof. Ralf Radlanski sehr dankbar, dessen Team die Tierversuche durchführte und die 3D-Bilddaten für diese Untersuchung zur Verfügung stellte, die die Grundlage für unsere erfolgreiche Forschung legte und mir beim Modellieren half.

Ich möchte meiner Familie meine tiefste Dankbarkeit aussprechen, die mich in meinem ganzen Leben und bei jeder Entscheidung, die ich treffe, unterstützt.

Nicht zuletzt danke ich der Unterstützung der Kollegen von Oral Technology der Universität Bonn und der finanziellen Unterstützung des China Scholarship Council.