

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Universität Hamburg

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Max Heiland

From bench to application: Current practices in tissue engineering and its realisation at maxillofacial units in Germany, Austria and Switzerland

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Ahmed El-Moawen
aus Rotenburg/Wümme

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.2.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Max Heiland

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Wolfgang Lehmann

~~Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:~~

Für Tristan Nour



From bench to application: Current practices in tissue engineering and its realisation at maxillofacial units in Germany, Austria and Switzerland

Ralf Smeets^{a,*,1}, Ahmed El-Moawen^{a,1}, Ole Jung^a, Henning Hanken^a, Philip Hartjen^a, Max Heiland^a, Katinka Kansy^b, Frank Kloss^c, Andreas Kolk^d

^a Department of Oral and Maxillofacial Surgery (Head: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Max Heiland), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

^b Department of Oral and Maxillofacial Surgery (Head: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jürgen Hoffmann), University Hospital Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 672, 69120 Heidelberg, Germany

^c Doctor's Office, Kärntner Straße 62, 9900 Lienz, Austria

^d Department of Oral and Maxillofacial Surgery (Head: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Klaus Dietrich Wolff), Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Ismaninger Straße 22, 81675 München, Germany

article info

Article history:

Paper received 19 June 2013

Accepted 8 January 2014

Keywords:

Tissue engineering

Scaffolds

Bone substitute materials

DÖSAK

abstract

Over the last 20 years, the highly interdisciplinary field of tissue engineering (TE) has become an established subspecialty in research facilities all over the world. Numerous methods and protocols are available for various research intentions and aims, but there are no data indicating which of these methods and resources are generally used. This study is an overview of the resources and methods that are commonly applied in TE research in general, and in the field of oral and maxillofacial surgery (OMFS) in Germany, Austria and Switzerland.

The DÖSAK collaborative group for TE developed a detailed questionnaire and collected information from participating university hospitals in these three countries. We evaluated the availability of research facilities, in vitro realisation and in vivo designs for animal studies in these departments.

11 units who replied, out of 35 we contacted, conducted research on bone regeneration in interdisciplinary research facilities. 10 departments used xenogenic and alloplastic scaffolds for in vitro and in vivo applications. In this case, the most commonly utilised trademarks were Bio-Oss[®] and CERASORB[®].

9 units used osteoblasts (73%) and 10 proliferation assays in vitro, whereas rats served as the standard animal model for histology/immunohistochemistry in 6. All research units were interested in establishing a platform for research exchange and communication.

This study shows that tissue engineering is well established and highly accepted in most participating university hospitals and research facilities. The presented data, together with data published in a foregoing paper will help arrange more readily available standardised procedures for further investigations.

© 2014 European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tissue engineering (TE) techniques can be used to produce regenerative soft and hard tissues for almost all clinical applications. The aim of TE technologies is to replace or compensate for

lost or damaged tissue and potentially provide fully functional organ replacements.

The field of TE can be seen as one of the most important interdisciplinary research areas in 21st century clinical medicine, with enormous potential for growth (Bertram et al., 2012; Fischer et al., 2011; Lysaght and Reyes, 2001; Lysaght and Hazlehurst, 2004; Lysaght et al., 2008).

Generally, TE research requires four conceptual abutments: cells, scaffolds, cell medium and proteins (e.g. growth factors) (Fig. 1). However, given the provision of these materials, TE research still requires large investments of time and finances.

* Corresponding author. Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany. Tel.: þ49 040 7410 54001; fax: þ49 040 7410 55467.

E-mail address: r.smeets@uke.de (R. Smeets).

¹ Both authors contributed equally to this work.

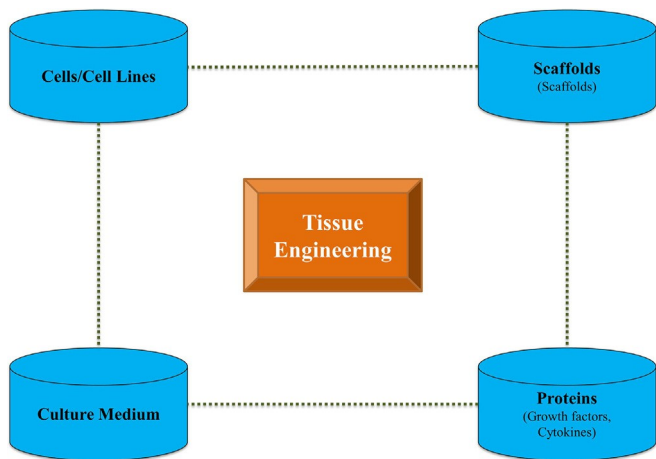


Fig. 1. The four pillars of TE.

Although numerous research articles and reviews describe specialised and general concepts in this field, information regarding fundamental research methods and research intentions of hospitals, laboratory groups and scientists is unavailable. Such information is a prerequisite for efficient interdisciplinary research platforms (Bertram et al., 2012; Chen et al., 2012; Fischer et al., 2011; Kolk et al., 2012; Payne et al., 2013; Sivayoham et al., 2013; Sterodimas et al., 2010; Susarla et al., 2011; Wood and Mealey, 2012).

The purpose of this study was to evaluate current practices and general TE research methods in the field of oral and maxillofacial surgery (OMFS) in Germany, Austria and Switzerland.

2. Materials and methods

We distributed our questionnaires to 35 university hospitals selected from the German, Austrian and Swiss Association of Oral and Maxillofacial Surgeons database of oral and maxillofacial hospital units.

The standardised multiple-choice questionnaire was developed by the DÖSAK collaborative group for TE to characterise TE research. Multiple choices were allowed as indicated above the table bars, and 17 questions were used to assess general information, in vitro realisation and in vivo realisation as follows:

- General information: main research interests, experimental systems used, number and types of laboratories used, relative importance to daily research, scaffolds/carriers used, preferred alloplastic materials and their manufacturers, and customary alloplastic scaffolds used.
- In vitro realisation: preferred cells/cell lines, types and purposes of tests for cell behaviours. As usual in a scientific context, the term “cell lines” was used for osteoblasts, endothelial cells, odontoblasts, gingival fibroblasts, keratinocytes, adipocytes and osteoclasts. In contrast “cells” only stands for mesenchymal stem cells (MSC).
- In vivo realisation: established animal models, transgenic animals, analytical methods and technologies and in vivo histology, use of Technovit preparations for immunohistochemical examinations, interest in a platform for interchange and communication.

The survey questionnaire was mailed to executive staff members of each department during the 16 months between January 2010 and April 2011.

2.1. Data analysis

The central goal was a free cross-sectional baseline study of the research situation in the field of TE within the affiliated countries to obtain only descriptive data. As standard in any form of study with detection character quantitative data were coded in accordance to SPSS, numerically evaluated and then transferred to further graphical processing. Graphical presentation were generated using Graphpad Prism 6 (GraphPad Software Inc., 2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037, USA).

3. Results

A total of 11 university hospitals completed the questionnaire (response rate, 31.4%). The numbers of answers per item constituted the ratio of all participating hospitals ($n = 11$).

3.1. General information

The main research interest was bone regeneration (10), followed by skin transplantation (3), mucosal transplantation (2), teeth regeneration (2) and nerve regeneration (1). No interest in muscle or other tissue regeneration was registered (Table 1). The numbers of research areas studied in single departments varied from 0 ($n = 1$) to 5 ($n = 7$), with most hospitals concentrating on one research area ($n = 7$; Table 1).

Eight hospitals used in vitro and in vivo systems for their experiments, two used only in vitro systems, and one university used neither systems, corresponding with 10 using in vitro systems, and 9 using in vivo systems.

Most units used interdisciplinary research facilities (8) and/or their own laboratories (6), whereas four used external amenities. Two hospitals used all kinds of research facilities (2), three used only two types of research facilities and five primarily used interdisciplinary laboratories.

When asked to rate percentage importance of tissue engineering in daily research routines, 3 hospitals answered 50e70%, another 3 indicated 10e20% and the other three hospitals answered 70e90%, 30e50% and 0e10%, respectively (Fig. 2).

The majority of university hospitals (8) used alloplastic and xenogenic scaffolds for tissue engineering research, whereas 6 used autologous materials and 1 used allogeneic supplies (Table 2). When working with alloplastic materials, 6 used ceramics and 2 worked with plastics, textiles and other materials. Out of these, 5 were self-manufactured and 9 were purchased.

Among marketed materials, 6 units preferred Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Switzerland) and CERASORB® (curasan AG, Kleinstostheim, Germany) scaffolds, and 5 used other carrier systems.

3.2. In vitro realisation

Preferences for cell lines were 9 for osteoblasts, 5 for endothelial cells and odontoblasts and 4 for mesenchymal stem cells. Other cell lines included gingival fibroblasts (2), keratinocytes (2), adipocytes

Table 1
Main research interests.

	Number of answers	Percentage ratio in all hospitals	Number of research areas	Number of hospitals
Bone regeneration	9	82	5	1
Nerve regeneration	1	9	3	1
Skin transplants	3	27	2	1
Mucosal transplants	2	18	1	7
Muscle regeneration	0	0	0	1
Teeth regeneration	2	18		
Others	0	0		

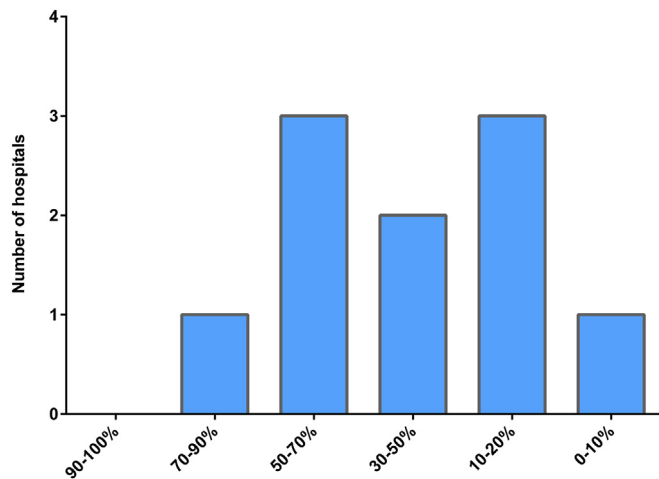


Fig. 2. Perceived importance of TE in routine university research.

Table 2
Commonly used scaffolds and carriers.

	Number of answers	Percentage ratio in all hospitals	Number of different scaffolds used	Number of hospitals
Autologous	6	55	4	1
Xenogenic	7	64	3	2
Alloplastic	7	64	2	4
Allogenic	1	9	1	3
Others	0	0	0	1

(2) and osteoclasts (1) (Fig. 3). Most hospitals used proliferation (9%, e. g. XTT, BrdU, Cell Titer-Blue), cytotoxicity (4, e.g. LDH) and other (5) assays as preliminary tests for in vivo experiments (6), material characterisation (5), cytotoxicity (3) and cell-based therapeutic investigations (3; Fig. 4).

3.3. In vivo realisation

The majority of interviewed university hospitals used rats (6) and pigs (3) as established standard animal models. Bovines (2),

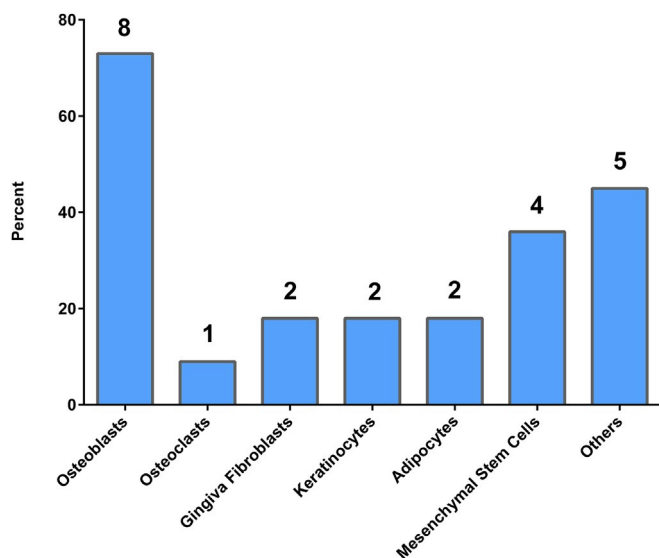


Fig. 3. Preferred cells and cell lines (the term "cell lines" was used for osteoblasts, endothelial cells and odontoblasts as well as for other cell lines like gingival fibroblasts, keratinocytes, adipocytes and osteoclasts. Respectively, the term "cells" was used for mesenchymal stem cells).

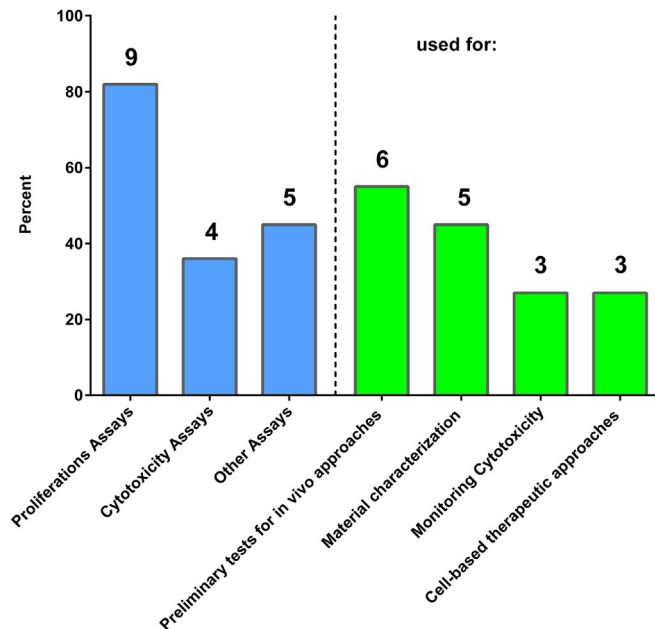


Fig. 4. Assays and their utilisation.

rabbits (2), mice (2), beagles (9%) and goats (9%) were used to a much lesser extent (Table 3). Only 3 research projects used transgenic animals.

Most university hospitals used histology (9), immunohistochemistry (9) and X-ray micro-computed tomography (7) for evaluation of in vivo experiments. Polymerase chain reaction (PCR) was applied in 4, micro-radiography in 2, in situ hybridisation in 1 and other methods in 3 of research units (Fig. 5). For histological assessments, the majority of hospitals used paraffin wax (6) followed by methyl methacrylate (4) and Technovit® 9100 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany; 4) (Fig. 5). Few hospitals successfully implemented Technovit® 9100 as a standard alternative to paraffin wax for combined immunohistochemical evaluations, histomorphometry and polychrome labelling of bone (73e27%; Fig. 5).

All participating university hospitals indicated enthusiasm for improved communication of knowledge as well as exchange of techniques and experiences.

4. Discussion

This is the first study that has investigated the research in the field of TE in 11 university clinics of different countries. Generally this survey demonstrates that TE research is already widely accepted in the affiliated departments of OMFS in Germany, Austria and Switzerland. There are no other data obtainable from the

Table 3
Established animal models.

	Number of answers	Percentage ratio in all hospitals	Number of applied animal models	Number of hospitals
Sheep	2	18	4	1
Pigs	3	27	3	3
Beagles	1	9	2	1
Rabbits	2	18	1	2
Rats	6	55	0	4
Mice	2	18		
Others	1	9		

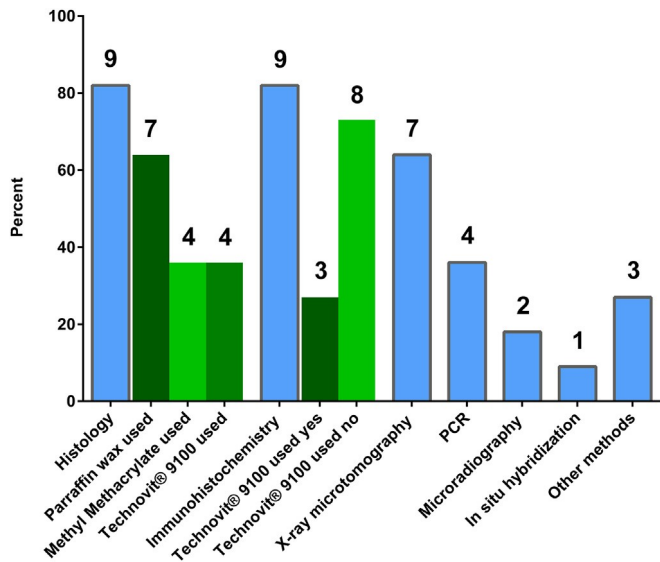


Fig. 5. Evaluation methods of in vivo experiments.

literature, so one major drawback of this study is the fact that, due to the survey method and the lack of comparable studies, no statistical analysis in addition to the data description could be performed. The moderate investigation response rate may reflect the relative youth of this research within the field of OMFS and its high demand for resources that only university hospitals can provide.

Due to the variety of research opportunities, a large number of decentralised departments focus on bone regeneration, often using osteoblasts and osteoblast-like cell lines. Bone replacement materials are frequently required for fracture treatments, resections, implants, jaw augmentations and other procedures in OMFS clinical practice but other clinical disciplines may have additional areas of interest that are relevant to their daily clinical routines.

With regard to patient morbidity and limited availability, most hospitals used xenogenic and alloplastic carriers for research purposes. These materials have both advantages and disadvantages since only a few products approach equivalence to autologous transplants (Kolk et al., 2012; Oortgiesen et al., 2012; Payne et al., 2013; Rokkanen, 1991; Schliephake et al., 2009; Takagi et al., 2001). However, because TE research often requires similar products for comparisons, scientists can benefit from the industrialised and good manufacturing practices of xenogenic and alloplastic products, as indicated by the frequent use of Bio-Oss® and CERASORB®. The relatively high value of self-manufactured alloplastic materials indicates advanced and standardised levels of research among facilities.

The frequent use of proliferation assays as preliminary tests prior to in vivo experiments can be seen as representative of normal practice. The relatively infrequent use of cytotoxicity assays is surprising given the DIN EN ISO 10993 requirement of both proliferation and cytotoxicity assays.

Since large university hospitals and affiliated research institutions were interviewed, we suspect all data from in vivo experiments to be representative of general tissue engineering practices in laboratories of all disciplines. Indeed, cost-benefit analyses indicate that the increased use of rats is possible. The use of histology and immunohistochemistry must also be viewed in this context.

The questionnaire revealed two relatively new but important research areas that are specially affiliated with OMFS and other oncological specialties but are underrepresented: animal models

for analysing the consequences of radiotherapy such as osteoradionecrosis and a standardised model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. Some studies suggest approaches to this vacant field of study, but it remains unknown whether these clinical conditions can be fully addressed (Ding et al., 2011; Fenner et al., 2010; Li et al., 2009; Ogawa et al., 2011; Sun et al., 2011; Zhang et al., 2010).

Since this study is the first of its kind, broader and more international surveys are necessary to compare this current data with those of other disciplines. In this context, only surveys with similar patterns, but different emphasis, are available (Mehrkens et al., 2012; Mücke et al., 2011).

The enthusiasm for establishing a communication platform indicates a large demand for tools that facilitate exchange of knowledge and methods. These would provide professional and financial benefits to all facilities involved.

5. Conclusion

This survey indicates commonly used methods and materials for general in vitro and in vivo approaches in the context of TE, and for specialised OMFS units. Although relatively new, this research field is established and expandable in many university hospitals, but the number and variety of answers to this questionnaire demonstrate the need for a central communication platform for TE facilities and laboratories. This would allow translational regenerative medicine to be reported, established and coordinated through such transfer and necessary research on this topic could be performed. It should encourage a larger number of clinics to participate in bigger surveys to generate more representative data via a valid statistical analysis.

Conflict of interest statement

The authors declare independence from any organisations; companies or people that could have influenced the conclusions of this article, and hence, have no conflicts of interest to declare.

References

- Bertram TA, Tentoff E, Johnson PC, Tawil B, van Dyke M, Hellman KB: Hurdles in tissue engineering/regenerative medicine product commercialization: a pilot survey of governmental funding agencies and the financial industry. *Tissue Eng Part A* 18: 2187e2194, 2012
- Chen F, Zhao Y, Jin Y, Shi S: Prospects for translational regenerative medicine. *Biotechnol Adv* 30: 658e672, 2012
- Ding S, Peng H, Fang H, Zhou J, Wang Z: Pulsed electromagnetic fields stimulation prevents steroid-induced osteonecrosis in rats. *BMC Musculoskelet Disord* 12: 215, 2011
- Fenner M, Park J, Schulz N, Amann K, Grabenbauer GG, Fahrig A, et al: Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J Craniomaxillofac Surg* 38: 47e53, 2010
- Fischer J, Kolk A, Wolfart S, Pautke C, Warnke P, Plank C, et al: Future of local bone regeneration e protein versus gene therapy. *J Craniomaxillofac Surg* 39: 54e64, 2011
- Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, et al: Current trends and future perspectives of bone substitute materials e from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg* 40: 706e718, 2012
- Li Y, Han R, Geng C, Wang Y, Wei L: A new osteonecrosis animal model of the femoral head induced by microwave heating and repaired with tissue engineered bone. *Int Orthop* 33: 573e580, 2009
- Lysaght MJ, Jaklenc A, Deweerd E: Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics. *Tissue Eng Part A* 14: 305e315, 2008
- Lysaght MJ, Hazlehurst AL: Tissue engineering: the end of the beginning. *Tissue Eng Part A* 10: 309e320, 2004
- Lysaght MJ, Reyes J: The growth of tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 7: 485e493, 2001
- Mehrkens A, Müller AM, Valderrabano V, Schären S, Vavken P: Tissue engineering approaches to degenerative disc disease e a meta-analysis of controlled animal trials. *Osteoarthritis Cartilage*: 1316e1325, 2012
- Mücke T, Müller AA, Kansy K, Hallermann W, Kerkmann H, Schuck N, et al: Microsurgical reconstruction of the head and neck e current practice of maxillofacial units in Germany, Austria, and Switzerland. *J Craniomaxillofac Surg*: 449e452, 2011

- Ogawa T, Ishii T, Mishima H, Nishino T, Watanabe A, Ochiai N: Is low-intensity pulsed ultrasound effective for revitalizing a severely necrotic small bone? An experimental rabbit model. *Ultrasound Med Biol* 37: 2028e2036, 2011
- Oortgiesen DAW, Plachokova AS, Geenen C, Meijer GJ, Walboomers XF, van den Beucken JJP, et al: Alkaline phosphatase immobilization onto Bio-Gide® and Bio-Oss® for periodontal and bone regeneration. *J Clin Periodontol* 39: 546e555, 2012
- Payne KF, Balasundaram I, Deb S, Di Silvio L, Fan KF: Tissue engineering technology and its possible applications in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2013
- Rokkanen PU: Absorbable materials in orthopaedic surgery. *Ann Med* 23: 109e115, 1991
- Schliephake H, Zghoul N, Jäger V, van Griensven M, Zeichen J, Gelinsky M, et al: Effect of seeding technique and scaffold material on bone formation in tissue-engineered constructs. *J Biomed Mater Res A* 90: 429e437, 2009
- Sivayoham E, Saunders R, Derby B, Woolford T: Current concepts and advances in the application of tissue engineering in otorhinolaryngology and head and neck surgery. *J Laryngol Otol* 127: 114e120, 2013
- Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I: Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63: 1886e1892, 2010
- Sun W, Li Z, Yang Y, Shi Z, Wang B, Liu B, et al: Experimental study on phase-contrast imaging with synchrotron hard x-ray for repairing osteonecrosis of the femoral head. *Orthopedics* 34: 530e534, 2011
- Susarla SM, Swanson E, Gordon CR: Craniomaxillofacial reconstruction using allo-transplantation and tissue engineering. *Ann Plast Surg* 67: 655e661, 2011
- Takagi S, Chow LC, Markovic M, Friedman CD, Costantino PD: Morphological and phase characterizations of retrieved calcium phosphate cement implants. *J Biomed Mater Res* 58: 36e41, 2001
- Wood RA, Mealey BL: Histologic comparison of healing after tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus demineralized freeze-dried bone allograft. *J Periodontol* 83: 329e336, 2012
- Zhang WB, Zheng LW, Chua D, Cheung LK: Bone regeneration after radiotherapy in an animal model. *J Oral Maxillofac Surg* 68: 2802e2809, 2010

Zusammenfassende Darstellung der Publikation

Einleitung

Verfahren des Tissue Engineerings (TE) können verwendet werden, um regeneratives Weich- und Hartgewebe für fast alle klinischen Anwendungen herzustellen. Ziel der TE-Technologien ist der Ersatz oder die Reparatur verlorengegangenen oder beschädigten Gewebes und potenziell der vollfunktionsfähige Organersatz.

Das Gebiet des TEs kann als einer der wichtigsten interdisziplinären Forschungsbereiche der klinischen Medizin des 21. Jahrhunderts betrachtet werden und hat ein großes Wachstumspotenzial.

Die offizielle Definition des TEs ist von der National Science Foundation (NSF) sehr allgemein definiert als „Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes, sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebeersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktion“. Ziel des TEs ist die Regeneration des körpereigenen Gewebes. Dabei werden unterschiedliche Ansätze verfolgt, die alle unter den Begriff TE gefasst werden:

- Die Züchtung von funktionellen Geweben für den Ersatz von Geweben, Organen und Organfunktionen, teils mit Wirkstoffen und/oder Zellträgerstrukturen,
- die Unterstützung von defekten Geweben, Organen zur Vermeidung einer Verschlechterung und/oder eines Ausfalls,
- die Züchtung von Zelllinien,
- die Züchtung auf räumlichen Strukturen.
- Die Erforschung der Zellinteraktion und der Gewebebildung und darauf aufbauende Optimierung von Implantaten und Prothesen und
- die Reduktion von Tierversuchen.

Im Allgemeinen erfordert die TE-Forschung vier konzeptionelle Stützen: Zellen, Gerüste,

Zellkulturmedium und Proteine (z. B. Wachstumsfaktoren) (Abb. 1). Aber auch wenn diese Materialien zur Verfügung stehen, erfordert die TE-Forschung immer noch große Investitionen an Zeit und finanziellen Mitteln.

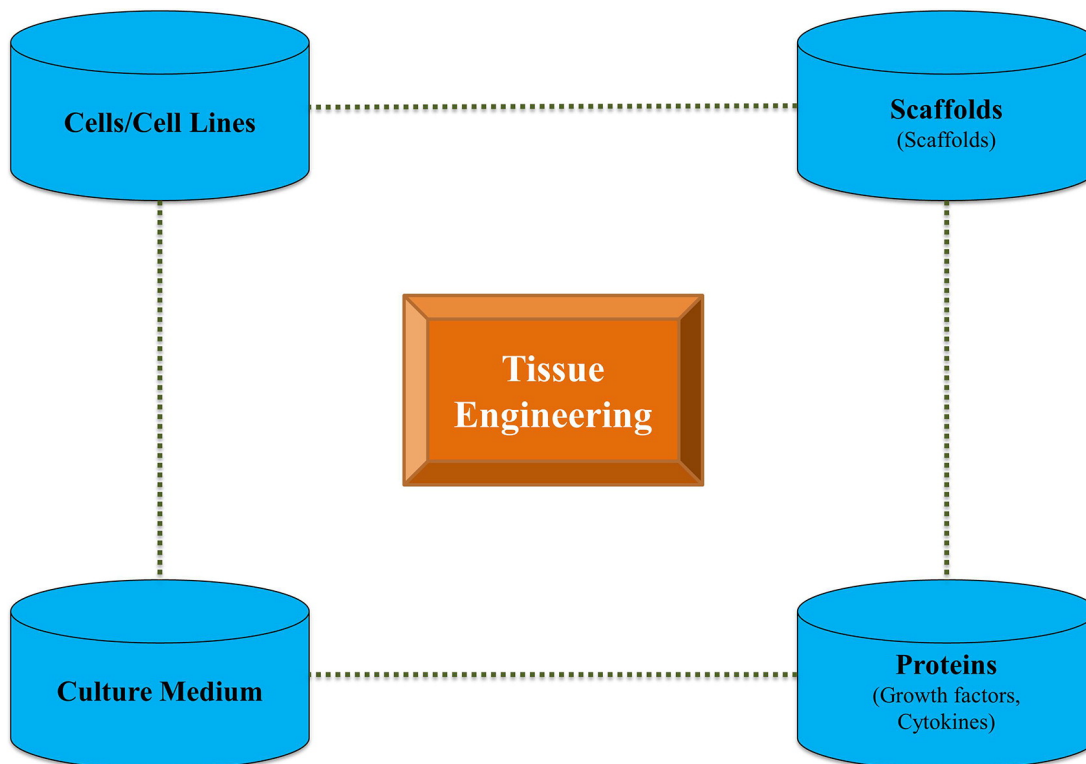


Abb. 1: Die vier Säulen des TEs.

Obwohl zahlreiche Forschungsartikel und -berichte spezialisierte und allgemeine Konzepte in diesem Gebiet beschreiben, sind Informationen über grundlegende Forschungsmethoden und Forschungsvorhaben von Kliniken, Laborgemeinschaften und Wissenschaftlern nicht verfügbar. Solche Informationen sind eine Voraussetzung für effiziente interdisziplinäre Forschungsplattformen. Zweck dieser Studie war die Bewertung gegenwärtiger Praktiken und allgemeiner TE-Forschungsmethoden im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (MKGC) in Deutschland, Österreich und der Schweiz.

Materialien und Methoden

Spezielle Fragebögen wurden an 35 Universitätskliniken mit Krankenhausabteilungen für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie verschickt, die wir aus der Datenbank des Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen Arbeitskreises der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen ausgewählt hatten.

Der standardisierte Multiple-Choice-Fragebogen wurde von der DÖSAK-Arbeitsgruppe für TE entwickelt, um die TE-Forschung zu charakterisieren. Wie über den Tabellenbalken angegeben, waren Mehrfachnennungen zulässig, und es wurden 17 Fragen zur Bewertung allgemeiner Informationen, In-vitro-Untersuchungen und In-vivo-Untersuchungen wie folgt eingesetzt:

- Allgemeine Informationen: wichtigste Forschungsinteressen, verwendete Versuchssysteme, Anzahl und Art der verwendeten Laboratorien, relative Bedeutung für die tägliche Forschung, verwendete Gerüste/Träger, bevorzugte alloplastische Materialien und deren Hersteller sowie üblicherweise verwendete alloplastische Gerüste.
- In-vitro-Untersuchungen: bevorzugte Zellen/Zelllinien, Art und Zweck von Tests für Zellverhalten. Wie im wissenschaftlichen Kontext üblich, wurde der Begriff „Zelllinie“ für Osteoblasten, Endothelzellen, Odontoblasten, gingivale Fibroblasten, Keratinozyten, Adipozyten und Osteoklasten verwendet. Demgegenüber steht „Zellen“ nur für mesenchymale Stammzellen (MSC).
- In-vivo-Untersuchungen: etablierte Tiermodelle, transgene Tiere, Analysemethoden und -technologien und In-vivo-Histologie, Verwendung von Technovit-Präparaten für immunhistochemische Untersuchungen, Interesse an einer Austausch- und Kommunikationsplattform.

Der Erhebungsfragebogen wurde innerhalb von 16 Monaten, zwischen Januar 2010 und April 2011, an leitende Mitarbeiter der einzelnen Abteilungen geschickt.

Ergebnisse

Insgesamt füllten elf Universitätskliniken den Fragebogen aus (Rücklaufquote 31,4%). Die Anzahl der Antworten pro Stück stellte die Kennzahl aller teilnehmenden Kliniken dar ($n = 11$). Das größte Forschungsinteresse galt der Knochenregeneration (10), gefolgt von Hauttransplantation (3), Schleimhauttransplantation (2), Zahnregeneration (2) und Nervenregeneration (1). Ein Interesse an Muskel- oder anderer Geweberegeneration wurde nicht festgestellt. Die Anzahl der Forschungsgebiete, die in einzelnen Abteilungen belegt wurden, schwankte zwischen 0 ($n = 1$) und 5 ($n = 1$), wobei sich die meisten Kliniken auf ein Forschungsgebiet konzentrierten ($n = 7$).

Die meisten Abteilungen verwendeten interdisziplinäre Forschungsanlagen (8) und/oder

eigene Laboratorien (6), während vier externe Ausstattungen verwendeten. Zwei Kliniken verwendeten alle Arten von Forschungsanlagen (2), drei verwendeten lediglich zwei Arten von Forschungsanlagen und fünf verwendeten vorrangig interdisziplinäre Laboratorien. Auf die Frage nach der Bewertung der Wichtigkeit des Tissue Engineerings im täglichen Forschungsablauf in Prozent gaben drei Kliniken 50-70% an, weitere drei gaben 10-20% an und die verbleibenden drei Kliniken beantworteten die Frage jeweils mit 70-90%, 30-50% und 0-10%

Die Mehrheit der befragten Universitätskliniken (8) verwendete alloplastische und xenogene Gerüste für TE Erforschung, während sechs autologe Materialien verwendeten und eine allogene verwendete. Wenn alloplastische Gerüste verwendet wurden, arbeiteten sechs mit Keramik und zwei mit Plastik, Textilien und anderen Materialien. Von diesen wurden fünf selbst hergestellt und neun wurden gekauft.

Als Präferenzen für Zelllinien bei den In-vitro-Untersuchungen wurden von neun Osteoblasten, von fünf Endothelzellen und Odontoblasten und von vier mesenchymale Stammzellen genannt. Weitere Zelllinien beinhalteten gingivale Fibroblasten (2), Keratinozyten (2), Adipozyten (2) und Osteoklasten (1) Die meisten Kliniken verwendeten Proliferations- (9%, z. B. XTT, BrdU, Cell Titer-Blue), Zytotoxizitäts- (4, z. B. LDH) und andere (5) Assays als Vorversuche für In-vivo-Experimente (6), Materialcharakterisierung (5), Zytotoxizität (3) und therapeutische Untersuchungen auf Zellbasis (3).

Die Mehrheit der befragten Universitätskliniken verwendeten für In-vivo-Untersuchungen Ratten (6) und Schweine (3) als bewährte Standard-Tiermodelle. Rinder (2), Kaninchen (2), Mäuse (2), Beagle (9%) und Ziegen (9%) wurden erheblich seltener verwendet. Nur drei Forschungsprojekte verwendeten transgene Tiere.

Die meisten Universitätskrankenhäuser verwendeten Histologie (9), Immunhistochemie (9) und Computertomographie (7) für die Auswertung der In-vivo-Versuche. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in vier, micro Röntgenographie bei zwei, *In-situ*-Hybridisation in einer und andere Methoden in drei der Forschungseinheiten angewandt. Für die histologischen Beurteilungen verwendete die Mehrheit der Krankenhäuser Paraffin (6), das von Methylmethacrylat (4) und Technovit ® 9100 gefolgt wurde, (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland; 4). Wenige Krankenhäuser führten Technovit ® 9100 erfolgreich als eine Standardalternative zu Paraffin für kombinierte immunhistochemische Auswertungen, histomorphometrische und polychrome Kennzeichnung des Knochens durch (73-27-%).

Alle teilnehmenden Universitätskliniken zeigten sich begeistert von der Aussicht auf eine verbesserte Wissensübertragung und einen Austausch von Techniken und Erfahrungen.

Diskussion

Dies ist die erste Studie, die die Forschung im Gebiet des TEs in elf Universitätskliniken verschiedener Länder untersucht hat. Generell zeigt diese Umfrage, dass TE-Forschung in den angeschlossenen Abteilungen der MKG in Deutschland, Österreich und der Schweiz bereits weitgehend akzeptiert ist. Aus der Literatur sind keine weiteren Daten zu bekommen, daher ist einer der großen Nachteile dieser Studie die Tatsache, dass aufgrund der Umfragemethode und des Mangels an vergleichbaren Studien keine statistische Analyse zusätzlich zur Datenbeschreibung durchgeführt werden konnte. Die mäßige Rücklaufquote der Untersuchung mag der relativen Neuartigkeit dieses Forschungsgebiets innerhalb des Gebiets der MKGC und dem hohen Bedarf an Ressourcen, den nur Universitätskliniken aufbringen können, geschuldet sein.

Aufgrund der Vielfalt der Forschungsmöglichkeiten konzentrieren sich viele der dezentralisierten Abteilungen auf die Knochenregeneration, häufig unter Verwendung von Osteoblasten und osteoblastähnlichen Zelllinien. Materialien für die Knochenregeneration werden häufig bei der Behandlung von Frakturen, bei Resektionen, Implantaten, Kieferaugmentationen und anderen Verfahren der klinischen Praxis der MKGC benötigt; andere klinische Disziplinen könnten jedoch weitere Interessengebiete haben, die für ihre klinischen Abläufe relevant sind.

Mit Blick auf die Patientenmorbidity und die beschränkte Verfügbarkeit verwendeten die meisten Kliniken xenogene und alloplastische Träger für Forschungszwecke. Diese Materialien haben sowohl Vor- als auch Nachteile, da nur wenige Produkte einer Gleichwertigkeit mit autologen Transplantaten nahekommen. Da die TE-Forschung jedoch häufig ähnliche Produkte für Vergleiche benötigt, können die Wissenschaftler von der industrialisierten und guten Herstellungspraxis xenogener und alloplastischer Produkte profitieren, wie die häufige Verwendung von Bio-Oss® und CERASORB® zeigt. Der relativ hohe Wert selbst hergestellter alloplastischer Materialien deutet auf einen fortschrittlichen und standardisierten Grad der Forschung inmitten der Einrichtungen hin.

Die häufige Verwendung von Proliferationsassays als Vorversuch vor In-vivo-Experimenten kann als repräsentativ für die normale Praxis angesehen werden. Die relativ seltene Verwendung von Zytotoxizitätsassays ist angesichts der DIN EN ISO 10993-Vorschrift sowohl für Proliferations- als auch für Zytotoxizitätsassays überraschend.

Da große Universitätskliniken und angeschlossene Forschungsinstitutionen befragt wurden, glauben wir, dass alle Daten aus den In-vivo-Experimenten repräsentativ für allgemeine Tissue Engineering-Verfahren in Laboratorien aller Disziplinen sind. Tatsächlich weisen Kosten-Nutzen-Analysen darauf hin, dass die vermehrte Verwendung von Ratten möglich ist. Der Einsatz von Histologie und Immunhistochemie muss ebenfalls in diesem Kontext gesehen werden.

Der Fragebogen enthüllte zwei relativ neue, jedoch wichtige Forschungsbereiche, die besonders mit der MKGC und anderen onkologischen Fachgebieten verbunden, jedoch unterrepräsentiert sind: Tiermodelle zur Analyse der Folgen der Strahlentherapie, wie etwa Osteoradionekrose, und ein standardisiertes Modell für mit Bisphosphonat in Verbindung stehende Osteonekrose. Einige Studien deuten auf Ansätze für dieses unbesetzte Studienfeld hin; es bleibt jedoch ungewiss, ob diese klinischen Bedingungen vollständig angesprochen werden können.

Da diese Studie die erste ihrer Art ist, sind breiter angelegte und internationalere Umfragen erforderlich, um diese aktuellen Daten mit denen anderer Disziplinen zu vergleichen. In diesem Zusammenhang sind nur Studien mit ähnlichem Muster, jedoch unterschiedlichem Schwerpunkt verfügbar.

Die Begeisterung für die Einrichtung einer Kommunikationsplattform zeigt, dass eine große Nachfrage nach Hilfsmitteln besteht, die den Austausch von Wissen und Verfahren erleichtern. Davon würden alle beteiligten Einrichtungen professionell und finanziell profitieren.

Zusammenfassung und Ausblick

In den vergangenen 20 Jahren ist das stark interdisziplinär geprägte Gebiet des TEs zu einem etablierten Teilgebiet in Forschungseinrichtungen auf der ganzen Welt geworden. Tissue Engineering nimmt eine steigende Rolle im Bereich der Forschung der Kliniken ein. Die Relevanz an den Kliniken korreliert mit der steigenden Zahl der Veröffentlichungen in PubMed (1984 die Erste, ab 1998 erstmals 100 pro Jahr und seit 2003 100 pro Jahr).

Die Mehrzahl der Kliniken arbeitet mit In-vitro-Modellen, und die Gewichtung liegt vor allem auf der Knochenregeneration. Keine Arbeitsgruppe ist im Bereich der Muskelregeneration tätig. Unter den alloplastischen Materialien werden Keramiken in der Forschung bevorzugt. Die am häufigsten verwendeten Knochenersatzmaterialien waren xenogenes Hydroxylapatit (4) und phasenreines β -TCP (2). Die Hälfte der Universitäten setzt selbst entwickelte alloplastische Materialien ein. Unter den Zelllinien werden die Osteoblasten bevorzugt. Die Analyse der

Zellantwort erfolgt am häufigsten durch Proliferationstests (9), Zytotoxizitätstests (4) und DNA-Chiptechnologie (2). Als Tiermodell hat sich die Ratte (6) etabliert. Mit transgenen Tieren wird an drei Universitäten gearbeitet. In-vivo-Versuche werden zumeist durch Histologie, Immunhistochemie und Micro-CT analysiert. Die Histologien erfolgen in Paraffin-Einbettung. 3 Universitäten arbeiten mit Technovit 9100 Neu.

Aktuelle In-vitro/In-vivo-Ansätze und neuartige Scaffolds werden den Bereich des TE noch erweitern. Die Optimierung der Zellinteraktion/Zellnische und die Optimierung der Zellversorgung/Angioneogenese werden diesen Forschungsbereich noch schneller wachsen lassen. Zentrale Bedeutung für das TE werden die Analysen der Zellantwort (u.a. Einfluss der Oberflächenmorphologie, Veränderung 2D zu 3D), der Freisetzungskinetik der Wachstums-/Differenzierungsfaktoren, der Aktivität der Zytokine und die Analyse der Stabilität des Phänotyps der transplantierten Zellen haben.

Es sind zahlreiche Verfahren und Protokolle für verschiedene Forschungsvorhaben und -ziele verfügbar, es gibt jedoch keine Daten darüber, welche bei diesen Methoden und Ressourcen in der Regel verwendet werden. Diese Umfrage stellt die verbreiteten Verfahren und Materialien für allgemeine In-vitro- und In-vivo-Ansätze im Rahmen des TEs und für spezialisierte MKGC-Abteilungen dar. Obwohl noch relativ neu, ist dieses Forschungsgebiet in vielen Universitätskliniken etabliert und ausbaubar. Die Anzahl und Vielfalt der Antworten auf den Fragebogen belegen jedoch den Bedarf für eine zentrale Kommunikationsplattform für TE-Einrichtungen und -Laboratorien. Dies würde ermöglichen, dass translationale Regenerationsmedizin durch einen solchen Transfer bekanntgemacht, etabliert und koordiniert werden kann und nötige Forschung zu diesem Thema durchgeführt werden könnte. Eine größere Anzahl Kliniken sollte sich ermutigt fühlen, an größeren Umfragen teilzunehmen, um mittels einer stichhaltigen statistischen Analyse repräsentativere Daten zu generieren. In den meisten teilnehmenden Universitätskliniken und Forschungseinrichtungen ist TE gut eingeführt und stößt auf große Akzeptanz. Die vorgestellten Daten werden, zusammen mit den in einer vorangegangenen Abhandlung veröffentlichten Daten, dazu beitragen, verfügbare standardisierte Verfahren für weitere Untersuchungen leichter festzulegen.

Literaturverzeichnis

Bertram TA, Tentoff E, Johnson PC, Tawil B, van Dyke M, Hellman KB. Hurdles in tissue engineering/regenerative medicine product commercialization: a pilot survey of governmental funding agencies and the financial industry. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:2187–2194

Chen F, Zhao Y, Jin Y, Shi S. Prospects for translational regenerative medicine. *Biotechnol Adv*. 2012;30:658–672

Ding S, Peng H, Fang H, Zhou J, Wang Z. Pulsed electromagnetic fields stimulation prevents steroid-induced osteonecrosis in rats. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:215

Fenner M, Park J, Schulz N, Amann K, Grabenbauer GG, Fahrig A, et al. Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J Craniomaxillofac Surg*. 2010;38:47–53

Fischer J, Kolk A, Wolfart S, Pautke C, Warnke P, Plank C, et al. Future of local bone regeneration – protein versus gene therapy. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011;39:54–64

Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials – from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012;40:706–718

Li Y, Han R, Geng C, Wang Y, Wei L. A new osteonecrosis animal model of the femoral head induced by microwave heating and repaired with tissue engineered bone. *Int Orthop*. 2009;33:573–580

Lysaght MJ, Jaklenec A, Deweerd E. Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics. *Tissue Eng Part A*. 2008;14:305–315

Lysaght MJ, Hazlehurst AL. Tissue engineering: the end of the beginning. *Tissue Eng Part A*. 2004;10:309–320

Lysaght MJ, Reyes J. The growth of tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2001;7:485–493

Mehrkens A, Müller AM, Valderrabano V, Schären S, Vavken P. Tissue engineering approaches to degenerative disc disease – a meta-analysis of controlled animal trials. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;1316–1325

Mücke T, Müller AA, Kansy K, Hallermann W, Kerkmann H, Schuck N, et al. Microsurgical reconstruction of the head and neck – current practice of maxillofacial units in Germany, Austria, and Switzerland. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011;449–452

Ogawa T, Ishii T, Mishima H, Nishino T, Watanabe A, Ochiai N. Is low-intensity pulsed ultrasound effective for revitalizing a severely necrotic small bone? An experimental rabbit model. *Ultrasound Med Biol*. 2011;37:2028–2036

Oortgiesen DAW, Plachokova AS, Geenen C, Meijer GJ, Walboomers XF, van den Beucken JJJP, et al. Alkaline phosphatase immobilization onto Bio-Gide® and Bio-Oss® for periodontal and bone regeneration. *J Clin Periodontol*. 2012;39:546–555

Payne KF, Balasundaram I, Deb S, Di Silvio L, Fan KF. Tissue engineering technology and its possible applications in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013.

Rokkanen PU. Absorbable materials in orthopaedic surgery. *Ann Med*. 1991;23:109–115

Schliephake H, Zghoul N, Jäger V, van Griensven M, Zeichen J, Gelinsky M, et al. Effect of seeding technique and scaffold material on bone formation in tissue-engineered constructs. *J Biomed Mater Res A*. 2009;90:429–437

Sivayoham E, Saunders R, Derby B, Woolford T. Current concepts and advances in the application of tissue engineering in otorhinolaryngology and head and neck surgery. *J Laryngol Otol*. 2013;127:114–120

Smeets R. Der Einsatz neuartiger Zellträger- und Membranstrukturen zur Geweberegeneration und zum Tissue Engineering in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie; Habilitationsschrift der Universität Aachen für das Fach Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Aachen, 2009.

Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63:1886–1892

Sun W, Li Z, Yang Y, Shi Z, Wang B, Liu B, et al. Experimental study on phase-contrast imaging with synchrotron hard x-ray for repairing osteonecrosis of the femoral head. *Orthopedics*. 2011;34:530–534

Susarla SM, Swanson E, Gordon CR. Craniomaxillofacial reconstruction using allotransplantation and tissue engineering. *Ann Plast Surg*. 2011;67:655–661

Takagi S, Chow LC, Markovic M, Friedman CD, Costantino PD. Morphological and phase characterizations of retrieved calcium phosphate cement implants. *J Biomed Mater Res*. 2001;58:36–41

Wood RA, Mealey BL. Histologic comparison of healing after tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus demineralized freeze-dried bone allograft. *J Periodontol*. 2012;83:329–336

Zhang WB, Zheng LW, Chua D, Cheung LK. Bone regeneration after radiotherapy in an animal model. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68:2802–2809

Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Mein Anteil an der vorliegenden Arbeit bestand zunächst in der gemeinschaftlichen Entwicklung der Fragestellungen und Planung mit Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ralf Smeets. Der standardisierte Multiple-Choice-Fragebogen wurde von der DÖSAK-Arbeitsgruppe (Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ralf Smeets, Katinka Kansy, Frank Koss und Andreas Kolk) für TE entwickelt, um die TE-Forschung zu charakterisieren. Nach statistischer Auswertung durch meine Person erfolgte die Interpretation aller jeweils gewonnenen Daten gemeinschaftlich durch die Erstautoren. Die Abbildungen und Diagramme der zugrundeliegenden Publikation wurden von mir erstellt. Das Verfassen des Manuskripts inklusive Beschreibung von Diagrammen und Abbildungen erfolgte durch meine Person und in gemeinschaftlicher Arbeit mit. Die Co-Autoren Dr. Ole Jung, Dr. Henning Hanken und Philip Hartjen unterstützten das Projekt zu gleichen Teilen im Rahmen der Übersetzungsphase.

Danksagung

Ich danke meinen Doktorvätern und Mentoren Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ralf Smeets und Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Max Heiland für ihre Genialität, das Vertrauen, die Unterstützung und die guten Ratschläge in den Jahren am UKE, die diese Arbeit möglich gemacht und meine berufliche Zukunft geebnet haben. Ich werde Euch und der Klinik ewig dankbar und freundschaftlich verbunden bleiben.

Ich danke meinen Freunden innerhalb und außerhalb der Universität für die großartigen Jahre und die Unterstützung, die mir die gemeinsame Zeit gegeben hat.

Ich danke meiner Frau Anna für ihre große Unterstützung und das Verständnis für die vielen Stunden am Computer.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre immerwährende Unterstützung und die weisen Worte in jeder Lebenslage.

Lebenslauf – Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Persönliche Daten

Hochschul- und Schulausbildung

Praktische Tätigkeiten

Referententätigkeit

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: