

Aus der Abteilung für Handchirurgie, Plastische Chirurgie und Ästhetische Chirurgie,
Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Riccardo E. Giunta

***In vitro* Evaluation von Adipose tissue-derived
Stem Cells und dezellularisiertem porcinem
Nasenseptumknorpel zur Regeneration des
Nasenseptumknorpels**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Constanze Kuhlmann
aus Wiesbaden

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Thilo L. Schenck

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christoph Reichel
Prof. Dr. Thomas Hernandez-Richter
Prof. Dr. Mark Jakob

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Paul S. Wiggerhauser

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2022

Meiner Mutter gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Vorfeld in Fachzeitschriften oder auf Kongressen veröffentlicht. Eine Auflistung aller in Zusammenhang mit dieser Arbeit entstandenen Publikationen ist im Anhang unter 7.2 „Bisher veröffentlichte Teilaspekte dieser Arbeit“ gelistet.

Zusammenfassung

Der Verlust des Nasenseptumknorpels (NSK) stellt die plastisch-rekonstruktive Rhinochirurgie vor große Herausforderungen. Die Rekonstruktion erfordert die autologe Transplantation von Ohr- oder Rippenknorpel, diese ist jedoch mit mechanischen und kosmetischen Komplikationen assoziiert. Ein künstlich hergestelltes Knorpelersatzmaterial, das die biologischen und biomechanischen Anforderungen erfüllt, könnte eine potentielle therapeutische Alternative darstellen. Xenogene dezellularisierte Extrazellulärmatrix (EZM)-Verbindungen haben sich in vorherigen Studien als mögliche Alternativen für Tissue Engineering Applikationen qualifiziert. In Verbindung mit humanen Chondrozyten als Zellquelle, zeigte das Material großes regeneratives Potential. Allerdings ist die Verwendung von Chondrozyten durch die geringe Verfügbarkeit und schwere Zugänglichkeit limitiert. Adipose tissue-derived Stem Cells (ASCs) sind adulte Stammzellen, die aus Fettgewebe isoliert werden können. Aufgrund dessen stehen sie in großen Mengen zur Verfügung und qualifizieren sich durch ihre Stammzeleigenschaften als alternative Zellquelle für den artifiziellen Knorpelersatz mit dezellularisiertem porcinem Nasenseptumknorpel (dpNSK). Ziel dieser Arbeit war es dpNSK mit ASCs zu besiedeln und die Zell-Matrix Interaktionen im Hinblick auf die Eignung als Knorpelersatzmaterial zu evaluieren.

Dafür wurden zuerst ASCs aus humanem Fettgewebe isoliert und die Stammzeleigenschaften (Multipotenz und klonogenes Potential) demonstriert, sowie die typischen Oberflächenmarker (CD29, CD105, CD44, CD13, CD90, CD45, CD235a und CD31) in der Durchflusszytometrie analysiert. Anschließend wurden ASCs auf dpNSK-Stanzbiopsien ausgesät und mit einem kommerziell erhältlichem Nährmedium chondrogen induziert. Parallel dazu wurde eine Kontrollgruppe unter identischen Bedingungen in Standardkulturmedium kultiviert. Der Begriff „Interaktion“ wurde auf die Zelladhäsion, -distribution, -vitalität, -proliferation, -invasion und -differenzierung festgelegt und mit biochemischen Assays (alamarBlue, PicoGreen, DMMB) und histologischen Färbungen (Live-Dead, DAPI/ Phalloidin, Alcian Blau/ Kernechtrot) evaluiert. Da dpNSK als EZM-Verbindung die histologische Organisation von humanem NSK aufweist, konnten innerhalb des Scaffolds verschiedene Zonen identifiziert werden, die sich durch die 3D-Struktur und Zusammensetzung der EZM-Inhaltsstoffe unterscheiden. Ausgehend von den verschiedenen Phänotypen der Chondrozyten im nativen Knorpel konnten drei Zonen identifiziert werden: Die superfizielle Proliferationszone, die intermediäre Transitzone und die zentrale Hypertrophiezone. Um den Einfluss der EZM-Zone auf das Stammzellschicksal zu untersuchen wurden in einem weiteren Teil dieser Arbeit ASCs direkt auf der superfiziellen oder zentralen Zone von dpNSK kultiviert und chondrogen induziert. Anschließend wurden die Zeleigenschaften auf den beiden Zonen anhand der oben aufgeführten Methoden und auf der Ebene der Genexpression mittels qPCR untersucht und verglichen.

Im Experiment konnte dpNSK als ein geeignetes Habitat für ASCs identifiziert werden, das die metabolische Aktivität der Stammzellen unterstützt und Zellteilung ermöglicht. Unter der Stimulation mit chondrogenen Wachstumsfaktoren wurde zudem eine signifikante chondrogene Differenzierung innerhalb des Scaffolds beobachtet. Die ASCs zeigten somit vergleichbare Eigenschaften auf dpNSK wie humane nasale Chondrozyten in vorherigen Studien und stellen eine alternative Zellquelle, oder einen möglichen Partner für eine Co-Kultur für die zellbasierte Knorpelregeneration des NSK dar. Allerdings ist eine Erhöhung der Matrixporosität notwendig, um die Zellinvasion in tiefere Schichten des Scaffolds zu verbessern und eine Durchwanderung zu erreichen.

Bei der direkten Besiedlung der verschiedenen dpNSK-Zonen konnte eine höhere Proliferation und die Elevation früher Chondrogenese- und Faserknorpelmarker (COL1A, COL2A1, ITGA10, ITGA11) bei ASCs auf der superfiziellen Zone beobachtet werden. ASCs, die auf der zentralen Zone kultiviert wurden, zeichneten sich durch eine statistisch signifikant höhere GAG-Produktion und die Hochregulierung von Hypertrophie markern (MMP13, COLX) aus. Zudem konnte durch die direkte Besiedlung der zentralen Zone die Zellinvasion deutlich verbessert werden. Die verschiedenen EZM-Zonen modulierten somit die Stammzellaktivität von ASCs auf dpNSK und die Zellen adaptierten einige zonen-spezifische Zellmerkmale von nativen Chondrozyten.

Die Erkenntnis, dass das Schicksal der ASCs durch die zonale 3D-Architektur und die Zusammensetzung der EZM-Makromoleküle des Scaffolds in unterschiedliche Richtungen beeinflusst werden kann, ist von hoher Relevanz für weitere Tissue Engineering Applikationen, insbesondere für moderne 3D-Druckverfahren. Weitere Studien sind notwendig, um die ausschlaggebenden Faktoren in der Matrixorganisation zu identifizieren, um so langfristig gesehen den Herstellungsprozess eines biomimetischen und histologisch-organisierten Knorpelersatzmaterials zu optimieren.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	5
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	10
TABELLENVERZEICHNIS	10
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	11
1. EINLEITUNG	14
1.1. FORM UND FUNKTION DER NASE	14
1.2. DER VERLUST DES NASENSEPTUMKNORPELS UND REKONSTRUKTIVE MAßNAHMEN	15
1.3. KNORPEL: EINTEILUNG, AUFBAU UND ENTWICKLUNG	16
1.4. DER NASENSEPTUMKNORPEL: MIKROSKOPISCH UND MAKROSKOPISCH	18
1.4.1. ZELLULÄRE BESTANDTEILE DES NASENSEPTUMKNORPELS.....	18
1.4.2. EXTRAZELLULÄRE BESTANDTEILE DES NASENSEPTUMKNORPELS	19
1.4.3. BIOMECHANIK DES NASENSEPTUMKNORPELS	20
1.5. ZELL-MATRIX INTERAKTIONEN	21
1.6. TISSUE ENGINEERING	22
1.6.1. CHONDROGENES TISSUE ENGINEERING	22
1.6.2. ZELLEN	23
1.6.2.1. Chondrozyten	23
1.6.2.2. Mesenchymale Stammzellen (MSCs).....	23
1.6.2.3. Adipose tissue-derived Stem Cells (ASCs).....	25
1.6.3. SCAFFOLD	26
1.6.3.1. Dezellularisierter porciner Nasenseptumknorpel (dpNSK).....	28
2. FRAGESTELLUNG	30
2.1. KLINISCHER BEZUG	30
2.2. TEIL I: NACHWEIS DER STAMMZELLIDENTITÄT	30
2.3. TEIL II: <i>IN VITRO</i> EVALUATION VON dpNSK UND ASCs ALS POTENTIELLES KNORPELERSATZMATERIAL ...	31
2.4. TEIL III: EINFLUSS DER EZM-ZONEN AUF DAS ZELLSCHICKSAL VON ASCs	32
3. MATERIAL UND METHODEN	33
3.1. ISOLATION DER ASCs	33
3.1.1. DEMOGRAPHIE DER SPENDER	33
3.1.2. DIE ENZYMATISCHE ISOLATION.....	34
3.1.3. KULTIVIERUNG UND LAGERUNG	35
3.2. NACHWEIS DER ASC IDENTITÄT	36
3.2.1. COLONY FORMING UNIT (CFU) ASSAY.....	36
3.2.2. DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)	36
3.2.3. NACHWEIS DER MULTIPOTENZ	37

3.2.3.1.	Adipogene Differenzierung und Quantifizierung.....	37
3.2.3.2.	Osteogene Differenzierung und Quantifizierung.....	38
3.2.3.3.	Chondrogene Differenzierung und Quantifizierung	39
3.3.	DEZELLULARISierter PORCINER NASENSEPTUMKNORPEL (DPNSK)	41
3.3.1.	DER DEZELLULARISIERUNGSPROZESS.....	42
3.3.2.	DER STERILISATIONSPROZESS.....	42
3.4.	DIE BESIEDLUNG UND KULTIVIERUNG VON DPNSK	43
3.5.	VITALITÄTS- UND PROLIFERATIONSASSAYS.....	44
3.5.1.	LIVE-DEAD ASSAY.....	44
3.5.2.	ALAMARBLUE ASSAY	45
3.5.2.1.	Indirekte Ermittlung der Cell Seeding Efficiency (CSE)	46
3.5.3.	PICOGREEN ASSAY	46
3.6.	FLUORESCENZ-HISTOLOGIE MIT DAPI UND PHALLOIDIN	47
3.7.	CHONDROGENE INDUKTION DER ASCs AUF DPNSK	49
3.8.1.	DIMETHYL-METHYLENBLAU (DMMB) ASSAY	49
3.8.2.	HISTOLOGIE: ALCIAN BLAU UND KERNECHTROT FÄRBUNG	50
3.8.3.	GENEXPRESSION.....	50
3.8.3.1.	RNA Extraktion.....	51
3.8.3.2.	Herstellung der cDNA	52
3.8.3.3.	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	53
3.9.	STATISTISCHE AUSWERTUNG	54
3.10.	ERSTELLUNG DER GRAFIKEN	54
4.	<u>ERGEBNISSE.....</u>	55
4.1.	TEIL I: NACHWEIS DER STAMMZELLIDENTITÄT	55
4.1.1.	KLONOGENES POTENTIAL.....	55
4.1.2.	BESTIMMUNG DER OBERFLÄCHENMARKER (FACS)	55
4.1.3.	MULTIPOTENZ DER ASCs.....	56
4.1.3.1.	Chondrogene Differenzierung in einer Monolayer Zellkultur.....	57
4.2.	TEIL II: <i>IN VITRO</i> EVALUATION VON DPNSK UND ASCs ALS POTENTIELLES KNORPELERSATZMATERIAL ...	58
4.2.1.	REZELLULARISIERUNG, VITALITÄT UND PROLIFERATION VON ASCs AUF DPNSK.....	58
4.2.2.	ZELLINVASION VON DPNSK	59
4.2.3.	BILDUNG EINER KNORPELTYPISCHEN MATRIX VON ASCs AUF DPNSK	61
4.3.	TEIL III: EINFLUSS DER EZM-ZONEN AUF DAS ZELLSCHICKSAL VON ASCs.....	62
4.3.1.	REZELLULARISIERUNG DER VERSCHIEDENEN DPNSK-ZONEN	62
4.3.1.1.	Ermittlung der Cell Seeding Efficiency (CSE) für die dpNSK-Zonen.....	62
4.3.2.	EINFLUSS DER DPNSK-ZONE AUF DIE ASC VITALITÄT UND PROLIFERATION.....	63
4.3.3.	EINFLUSS DER DPNSK-ZONE AUF DIE ZELLINVASION	64
4.3.4.	EINFLUSS DER DPNSK-ZONE AUF DIE SGAG-PRODUKTION VON ASCs.....	65
4.3.5.	EINFLUSS DER DPNSK-ZONE AUF DIE GENEXPRESSION VON ASCs.....	66
5.	<u>DISKUSSION.....</u>	68
5.1.	TEIL I: NACHWEIS DER STAMMZELLIDENTITÄT	68
5.1.1.	EIGNUNG FÜR CHONDROGENES TISSUE ENGINEERING.....	68
5.1.2.	FAZIT	69
5.2.	TEIL II: <i>IN VITRO</i> EVALUATION VON DPNSK UND ASCs ALS POTENTIELLES KNORPELERSATZMATERIAL ...	69
5.2.1.	REZELLULARISIERUNG , VITALITÄT UND PROLIFERATION VON ASCs AUF DPNSK	69

5.2.2.	ZELLINVASION VON DPNSK	71
5.2.3.	CHONDROGENESE DER ASCs AUF DPNSK	73
5.2.4.	ZUSAMMENFASSENDE BEURTEILUNG VON DPNSK UND ASCs ALS POTENTIELLES KNORPELERSATZMATERIAL	74
5.2.4.1.	Fazit.....	74
5.2.4.2.	Ausblick und Limitierungen	74
5.3.	TEIL III: EINFLUSS DER EZM-ZONEN AUF DAS ZELLSCHICKSAL VON ASCs	75
5.3.1.	REZELLULARISIERUNG DER DPNSK-ZONEN	75
5.3.2.	EINFLUSS DER DPNSK-ZONE AUF DIE ZELLPROLIFERATION	76
5.3.3.	EINFLUSS DER DPNSK-ZONE AUF DIE ASC INVASION	76
5.3.4.	EINFLUSS DER DPNSK-ZONE AUF DIE CHONDROGENESE VON ASCs.....	77
5.3.5.	ZUSAMMENFASSENDE BEURTEILUNG DER ZONEN-SPEZIFISCHEN INTERAKTIONEN ZWISCHEN DPNSK UND ASCs.....	79
5.3.5.1.	Fazit: Die superfizielle Zone von dpNSK.....	79
5.3.5.2.	Fazit: Die zentrale Zone von dpNSK	80
5.3.5.3.	Einfluss der Größe und Morphologie der Poren	81
5.3.5.4.	Einfluss der EZM-Zusammensetzung	82
5.3.5.5.	Ausblick und Limitierungen	83
6.	<u>SCHLUSSFOLGERUNG.....</u>	85
7.	<u>ANHANG.....</u>	87
7.1.	LITERATURVERZEICHNIS	87
7.2.	BISHER VERÖFFENTLICHTE TEILASPEKTE DIESER ARBEIT	104
7.2.1.	FACHZEITSCHRIFTEN.....	104
7.2.2.	KONGRESSVORTRÄGE.....	104
7.2.3.	POSTERVORTRÄGE.....	105
7.3.	DANKSAGUNG.....	106
7.4.	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	107

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1) DAS KNORPELGERÜST DER NASE.....	14
ABBILDUNG 2) KOMPLIKATIONEN BEI EINER AUTOLOGEN KNORPELTRANSPLANTATION.	16
ABBILDUNG 3) REKONSTRUKTION DES FLÜGEL- UND SEPTUMKNORPELS MIT AURICULARKNORPEL.....	16
ABBILDUNG 4) QUERSCHNITT DURCH EINE HUMANE NASENSCHEIDEWAND.....	20
ABBILDUNG 5) DER TISSUE ENGINEERING PROZESS VON NASENKNORPEL.....	23
ABBILDUNG 6) THEORETISCHER VERSUCHSAUFBAU VON TEIL II UND III.....	31
ABBILDUNG 7) DAS WASSERSTRAHL-ASSISTIERTES BODY-JET SYSTEM.....	33
ABBILDUNG 8) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES DPNSK.	41
ABBILDUNG 9) MIKROSKOPISCHE UND MAKROSKOPISCHE DARSTELLUNG VON DPNSK.	43
ABBILDUNG 10) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BESIEDLUNG VON DPNSK FÜR TEIL II.....	44
ABBILDUNG 11) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BESIEDLUNG DER DPNSK-ZONEN FÜR TEIL III.	44
ABBILDUNG 12) QUANTIFIZIERUNG DER ZELLINVASION IN DPNSK MIT DER SOFTWARE IMAGE J.....	48
ABBILDUNG 13) AUFTRENNUNG DER PHASEN NACH DER QIAZOL UND CHLOROFORM ANWENDUNG.....	52
ABBILDUNG 14) PLASTIK-ADHÄRENTE ASCS IN PASSAGE 1.....	55
ABBILDUNG 15) ANALYSE DER OBERFLÄCHENMARKER DER ASCS IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE.	56
ABBILDUNG 16) NACHWEIS DER MULTIPOTENZ VON ASCS.	57
ABBILDUNG 17) CHONDROGENE DIFFERENZIERUNG VON ASCS IN DER MONOLAYER-KULTUR.....	58
ABBILDUNG 18) REZELLULARISIERUNG UND PROLIFERATION VON ASCS AUF DPNSK.	59
ABBILDUNG 19) DARSTELLUNG DER ZELLINVASION MITTELS FUORESZENZFÄRBUNG.....	60
ABBILDUNG 20) GAG-PRODUKTION AUF DEM SCAFFOLD.	61
ABBILDUNG 21) BESIEDLUNG DER SUPERFIZIELLEN UND ZENTRALEN ZONE.	62
ABBILDUNG 22) BERECHNUNG DER CSE FÜR DIE DPNSK-ZONEN.	63
ABBILDUNG 23) EINFLUSS DER DPNSK ZONE AUF DIE ZELLVITALITÄT UND -PROLIFERATION.	64
ABBILDUNG 24) INVASION DER EZM-ZONEN.	65
ABBILDUNG 25) VERGLEICH DER GAG-PRODUKTION AUF DEN DPNSK-ZONEN.	66
ABBILDUNG 26) RELATIVE VERÄNDERUNGEN IN DER GENEXPRESSION AUF DEN DPNSK-ZONEN.	67
ABBILDUNG 27) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EVENTSEQUENZ DIE DIE CHONDROGENESE VON MSCs ZU TERMINAL DIFFERENZIIERTEN CHONDROZYTEN BEGLEITET.	77

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1) UNTERTEILUNG UND LOKALISATION VON KNORPEL.....	17
TABELLE 2) STAMMZELLPOTENZEN.....	24
TABELLE 3) UNTERSCHIEDE UND GEMEINSAMKEITEN VON ASCS UND BMMSCs.	26
TABELLE 4) ÜBERSICHT DER ASC SPENDER.	33
TABELLE 5) VERGLEICH DER CHONDROGENEN DIFFERENZIERUNGSMETHODEN	41
TABELLE 6) ÜBERSICHT DER PRIMER FÜR DIE qPCR.....	53
TABELLE 7) VERGLEICH DER GENEXPRESSION VON ZELLEN AUF DER SUPERFIZIELLEN (OS) UND DER ZENTRALEN ZONE (IS)...	67

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACAN	Aggrecan
COL10A1	Kollagen Typ X, alpha I
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
ASC	Adipose tissue-derived Stem cell
BMI	Body-Mass-Index
bmMSC	Bone-marrow-derived Mesenchymal Stem Cell
Bzw.	Beziehungsweise
C	Celsius
CAD	Computer assisted design
CAM	Computer assisted manufacturing
cDNA	Complementary DNA
CFU	Colony forming unit
Ch	Chondrozyt
COL1A1	Kollagen Typ I, alpha I
COL2A1	Kollagen Typ II, alpha I
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CSE	Cell Seeding Efficiency
Ct	Cycle threshold
D	Donor (Spender)
D.h.	Das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEZM	Dezellularisierte Extrazellulärmatrix
DFG	Deutsche Forschungsgesellschaft
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMMB	Dimethyl-Methylenblau
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Dezellularisierungsprozess
dpNSK	Dezellularisierter porciner Nasenseptumknorpel
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Et al.	Und andere
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence assisted cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Fluorescein Diacetat
GAG	Glykosaminoglykan

H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
hCh	Humaner Chondrozyt
HCV	Hepatitis C Virus
HE	Hematoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HKG	Housekeeping Gen
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IBMX	3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin
IS	Inside (Innenseite)
ITGA10	Integrin alpha 10
ITGA11	Integrin alpha 11
Konz.	Konzentration
MKI67	Marker Of Proliferation Ki-67
MMA	Mitochondriale metabolische Aktivität
MMP13	Matrix Metalloproteinase 13
MSC	Mesenchymal Stem Cell
NMHT	Nicht-Melanom Hauttumore
ns	Nicht signifikant
NSK	Nasenseptumknorpel
O ₂	Sauerstoff
OS	Outside (Außenseite)
PBS	Phosphat buffered saline
PCL	Polycaprolacton
pCO ₂	Partialdruck Kohlenstoffdioxid
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PG	Proteoglykan
PI	Propidiumiodid
PPARG	Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma
PrPsc	Prion Protein Scrapie
PZM	Perizellulärmatrix
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskop
RFU	Relative fluorescence unit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RSV	Respiratory-Syncytical-Virus

RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
sGAG	Sulfatiertes Glykosaminoglykan
SOX9	SRY-related HMG-box gene 9
SVF	Stromal vascular fraction
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U.a.	Unter anderem
USA	United States of America
vs.	versus
z.B.	Zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Form und Funktion der Nase

Die menschliche Nase gehört funktionell zu den oberen Atemwegen und spielt eine wichtige Rolle in der Physiologie der Atmung. Durch ihre zentrale Position ist sie zudem eine wichtige anatomische Landmarke in der Gesichtsästhetik und häufig die erste Struktur die dem Gegenüber ins Auge fällt [1,2].

Anatomisch kann man die Nase in die Innere (Nasus internus) und Äußere Nase (Nasus externus) einteilen. Die Basis bildet das knöcherne Nasenskelett das sich aus sieben Schädelknochen (Os nasale, Os ethmoidale, Os lacrimale, Maxilla, Os frontale, Os palatinum, Vomer) zusammensetzt [2,3].

Die äußere Nase wird zusätzlich durch den flexiblen Nasenknorpel gebildet. Dabei unterscheidet man zwischen den paarigen Flügelknorpeln (Cartilago alaris major), den Dreiecksknorpeln (Cartilago nasi lateralis), den Sesamknorpeln (Cartilago alaris minor) und dem einzelnen Septumknorpel (Cartilago septi nasi) (Abb. 1). Dem Knorpel kommt dabei eine formgebende und schutzspendende Funktion zu [2]. Durch die Flexibilität des Knorpels reduziert sich das Verletzungsrisiko der Nase.

Der hyaline Septumknorpel separiert zusammen mit dem knöchernen Teil des Nasenseptums (Vomer und Lamina perpendicularis des Os ethmoidale) die Nasenhöhle vertikal in zwei Räume. Durch diese zentrale Position ist er von erheblicher Bedeutung für die Formgebung der Nase und die Offenhaltung der nasalen Atemwege [4].

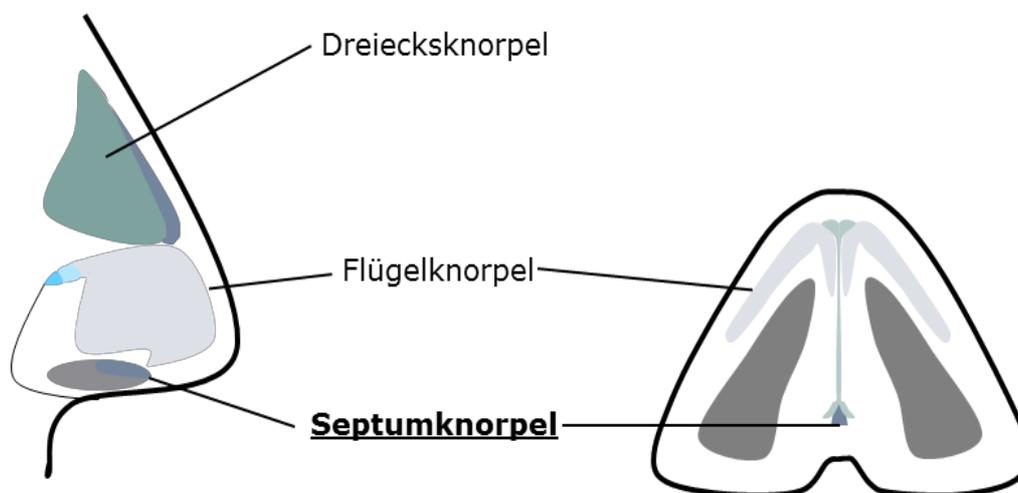


Abbildung 1) Das Knorpelgerüst der Nase.

1.2. Der Verlust des Nasenseptumknorpels und Rekonstruktive Maßnahmen

Durch die Lage der Nase als „Sonnenterrasse“ ist diese besonders für die Entstehung von Nicht-Melanom Hauttumoren (NMHT) prädestiniert. NMHT sind die häufigste Krebsform der weißen Bevölkerung weltweit [5]. Die Inzidenz ist trotz erhöhter präventiver Bemühungen nach wie vor steigend [6–9]. Die Tumorexizision kann bei fortgeschrittenem Befund zu einem partiellen oder totalen Verlust des Nasenseptumknorpels führen [10]. Weiterhin können Traumata der Schädelbasis und nasale Deformierungen (u.a. Septumdeviationen) je nach Ausprägung des Befundes eine Rekonstruktion des Knorpels erforderlich machen. Seltener Ursachen für die Destruktion des Septums sind Autoimmunerkrankungen (Sattelnase bei Granulomatose mit Polyangiitis), Infektionen (u.a. bei der Tertiären Syphilis) und die nasale Inhalation toxischer Substanzen (z.B. Kokain) [11–15].

Der therapeutische Goldstandard zur Rekonstruktion des Nasenseptumknorpels ist die autologe Knorpeltransplantation von Ohr- oder Rippenknorpel. Bei einer simultanen Destruktion des Haut-Weichteilmantels (z.B. durch NMHT) wird dieser Eingriff in der Regel mit einer Nasolabial- oder Stirnlappenplastik (Abb. 3) kombiniert [10]. Neben den allgemeinen Komplikationen einer Rhinoplastik, wie Infektionen, Wundheilungsstörungen und Schmerzen, sind auch Hebedefekte an der Knorpelentnahmestelle möglich [16]. Bei der Entnahme von Rippenknorpel kann dies zu Thoraxdeformitäten mit funktionellen Problemen, wie einem Pneumothorax führen [17]. Außerdem können im Verlauf ästhetisch unbefriedigende Ergebnisse, zum Beispiel durch die Verbiegung des Knorpels entstehen (Abb. 2) [18]. All diese Komplikationen können Revisionseingriffe nach sich ziehen, die die Komplikationsrate und Krankenhausverweildauer erhöhen.

Ein funktionelles Knorpelersatzmaterial könnte eine potentielle Alternative zu einem autologen Knorpeltransplantat darstellen. Synthetika wie Gore-Tex und Silikone konnten die biologischen und biomechanischen Anforderungen an solch ein Material bislang nicht erfüllen - bei der Verwendung wurden Entzündungen, Abstoßungsreaktionen und Verformungen beobachtet [18–20]. Zellbasierte Therapien, die auf die Anregung körpereigener Regenerations- und Reparaturprozesse setzen, stellen eine vielversprechende Möglichkeit zur Umgehung solcher Komplikationen dar.

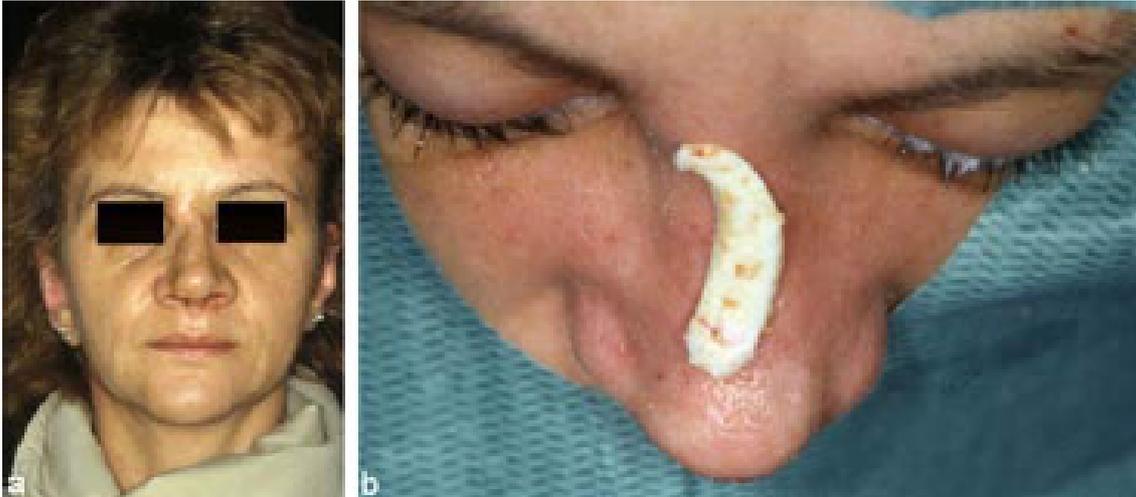


Abbildung 2) Komplikationen bei einer autologen Knorpeltransplantation.
 Bild a zeigt eine Schiefnase durch verbogenen Rippenknorpel 8 Wochen nach der Operation.
 Bild b zeigt den Knorpel nach seiner Entfernung.
Grafiken aus Rettinger G. Risiken und Komplikationen der Rhinoplastik; Laryngo-Rhino-Otologie 2007; 86.:40-54; Mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlags.

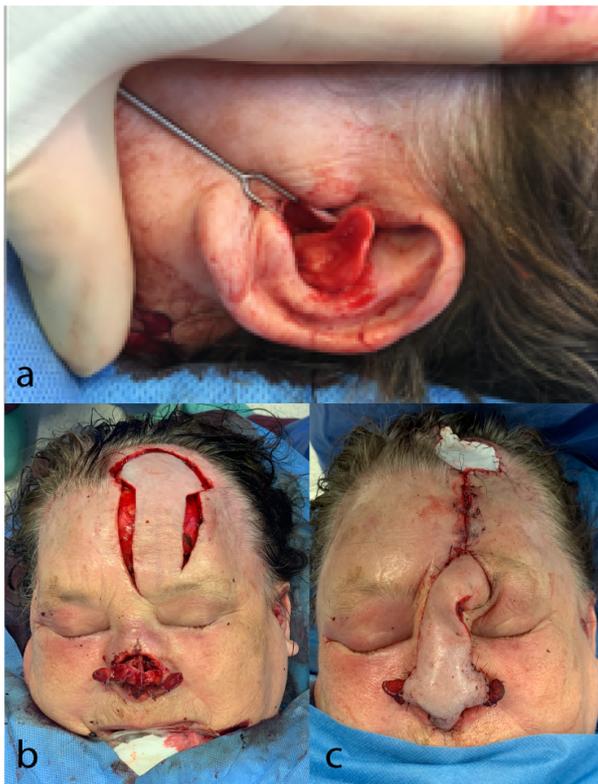


Abbildung 3) Rekonstruktion des Flügel- und Septumknorpels mit Auricularknorpel. Diese intraoperativen Aufnahmen zeigen die Entnahme des Auricularknorpels aus dem linken Ohr (a) der Patientin. Anschließend wurde der Knorpel passend zugeschnitten und mit lokalen Nähten fixiert (b). Über dieses Knorpelgerüst wurde anschließend eine paramediane Stirnlappenplastik (c) zur Deckung des Haut-Weichteildefektes gelegt und eingenäht. Die Durchtrennung des Lappenstils und ästhetische Anpassung erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt, nach sorgfältiger Prüfung der Vitalität der Lappenplastik.

1.3. Knorpel: Einteilung, Aufbau und Entwicklung

Knorpelgewebe ist eine spezialisierte Form des Bindegewebes und somit mesenchymaler Herkunft. Man unterscheidet je nach der Zusammensetzung des

Knorpels zwischen hyalinen, elastischen und Faserknorpel. Hyaliner Knorpel findet sich an den Gelenkflächen aller Diarthrosen in Form des Gelenkknorpels. Alle weiteren Lokalisationen sind in der Tab. 1 aufgeführt [21].

	Hyaliner Knorpel	Elastischer Knorpel	Faserknorpel
Vorkommen	Gelenkknorpel Nasenknorpel Trachea Rippenknorpel Präformiertes Skelett während der chondralen Osteogenese	Ohrmuschel Äußerer Gehörgang Eustachische Röhre Epiglottis Cartilago corniculata Kleine Bronchien Ligamentum flavum	Menisci Bandscheiben Symphysis pubica Labrum acetabulare Labrum glenoidale Übergangsweise bei der sekundären Knochenheilung
Funktion	Druckelastisch	Druck- und Biegeelastisch	Druckfest
Perichondrium	Ja	Ja	Nein
Kollagen	Vor Allem Kollagen Typ II	Vor Allem Kollagen Typ II + Elastische Fasern	Vor allem Kollagen Typ I + Kollagen Typ II
Besonderheiten in der Komposition	Gelenkknorpel hat kein Perichondrium	Besonders Zellreich und von elastischen Fasern durchzogen	Zellarm, Entwicklung aus straffem Bindegewebe, in dem sich die Fibroblasten unter Druck- und Zugbelastung zu Chondrozyten differenzieren

Tabelle 1) Unterteilung und Lokalisation von Knorpel.

Knorpelgewebe besteht aus Chondrozyten und deren Vorläuferzellen den Chondroblasten, sowie der von den Zellen sezernierten Extrazellulärmatrix (EZM). Die direkt an die Chondrozyten angrenzende Matrix wird auch als Perizellulärmatrix (PZM) bezeichnet [22]. Knorpel wird von einem Perichondrium umgeben, das sich aus einer äußeren bindegewebigen Faserschicht (Stratum fibrosum) und einer inneren zellreichen Schicht (Stratum chondrogenicum oder Stratum cellare) besteht. Das Stratum chondrogenicum ist dabei der Ausgangsort der Regeneration und beherbergt undifferenzierte mesenchymale Stammzellen die sich zu Chondroblasten differenzieren können [23]. Da Knorpel kapillarfrei ist, erfolgt die Ernährung der Chondrozyten über Diffusion von dem durchbluteten Perichondrium ausgehend [24]. Aufgrund dessen besitzt Knorpelgewebe, im Gegensatz zu den meisten anderen Geweben mesenchymalen Ursprunges, eine schlechte intrinsische Spontanheilungskapazität [25–27]. Chondrogenes Wachstum erfolgt entweder appositionell aus dem peripheren Perichondrium, oder interstitiell durch die Vermehrung der Zellen und ihrer interzellulären Substanz.

Chondrozyten liegen von einer Kapsel umgeben in einer Knorpelhöhle. Der Zusammenschluss aus Chondrozyt und umgebender PZM wird als Chondron bezeichnet [28–30]. Umgeben werden diese Chondrone von dem stark basophilen Knorpelhof, mit einem deutlich erhöhten Gehalt an Chondroitinsulfat. Ein einzelnes Chondron und der umgebende Knorpelhof wird als Territorium bezeichnet. Die Substanz zwischen den einzelnen Territorien, wird demnach als interterritoriale Substanz bezeichnet.

Während der Entwicklung des Menschen wird zunächst ein Primordialskelett aus Knorpel geformt, das dann durch das Einwandern von Blutgefäßen und Osteoblasten zu Knochen umgebaut wird. Diesen Prozess bezeichnet man als chondrale (indirekte) Osteogenese [31].

1.4. Der Nasenseptumknorpel: Mikroskopisch und Makroskopisch

Der durchschnittliche Nasenseptumknorpel in der weißen Bevölkerung ist $2,6 (\pm 0,3)$ cm hoch und $3,1 (\pm 0,4)$ cm lang. Die Breite des Septumknorpels variiert stark. An der breitesten Stelle ist dieser im Durchschnitt $2,7 (\pm 0,1)$ mm breit. Der intermediäre Wert beträgt $2,0 (\pm 0,2)$ mm und der Wert an der schmalsten Stelle beträgt $1,2 (\pm 0,1)$ mm [4].

Der Nasenseptumknorpel ist ein hyaliner Knorpel, der sich aus Chondrozyten und der umgebenden Extrazellulärmatrix (EZM) zusammensetzt. Im Folgenden wird im Einzelnen auf die zellulären und extrazellulären Bestandteile eingegangen.

1.4.1. Zelluläre Bestandteile des Nasenseptumknorpels

Popko et al. konnte mithilfe einer Mallory-Cason Färbung nachweisen, dass sich die Chondrozyten Größe und Verteilung innerhalb des Septumknorpels in verschiedene Zonen gliedert [32]. Dabei konnten drei unterschiedliche Zonen identifiziert werden, wobei zwischen den Zonen ein fließender Übergang stattfindet.

In der peripheren Zone finden sich zahlreiche, kleine, flache und parallel zur Oberfläche angeordnete Zellen. Da die Regeneration von peripher nach zentral erfolgt, handelt es sich hierbei um jüngere Zellen [32]. Die Intermediäre Zone zeichnet sich durch weniger zahlreiche, ovaloide Zellen aus, die sich eher senkrecht zur Oberfläche orientieren. In der zentralen Zone findet sich nur vereinzelt Chondrozyten. Diese sind rund, hypertroph und in Gruppen angeordnet (Abb. 4) [32,33].

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass die Zelldichte von peripher nach zentral abnimmt und sich die Chondrozyten mit zunehmendem Alter von einem flachen

zu einem runden Phänotyp entwickeln. Während dieser Entwicklung drehen sich die Chondrozyten um circa 90° von einer transversalen in eine sagittale Ausrichtung [32]. Eine biochemische Analyse des humanen Nasenseptumknorpels mit 33 Patienten ergab eine durchschnittliche Zahl von 24,9 Millionen Chondrozyten pro Gram feuchten Knorpel [34].

Eine Besonderheit der nasalen Chondrozyten ist, dass sie im Vergleich zu artikulären Chondrozyten ca. viermal schneller proliferieren und eine EZM mit signifikant höherer Konzentration an Kollagen Typ II und Glykosaminoglykanen (GAG) produzieren [35].

1.4.2. Extrazelluläre Bestandteile des Nasenseptumknorpels

Die EZM des Nasenseptumknorpels wird von den Chondrozyten gebildet [36]. Sie besteht durchschnittlich aus 77,7 % Wasser [34]. Die festen Bestandteile werden hauptsächlich aus Strukturproteinen wie Kollagen Typ II (7,7 % des Gesamtgewichtes) und Proteoglykanen (PG), wie Chondroitin-4-Sulfat, gebildet [34,37]. Die PG setzen sich dabei aus sulfatierten GAG (sGAG) und einem Proteingerüst zusammen. Die sGAG machen ein Gesamtgewicht von 2,9 % aus [34]. Aggrecan macht den größten Anteil der PG aus und bildet mit Hyaluronsäure große Aggregate. Die Kollagenfibrillen sind in diesen Aggregaten vernetzt und werden durch diese stabilisiert. Somit spielen die PG eine wichtige Rolle für die mechanische Integrität des Nasenseptumknorpels [37].

Bei der Zusammensetzung der EZM des Septumknorpels konnten Popko et al. zonale Unterschiede feststellen. Dabei fällt auf, dass der Kollagen Typ II Anteil peripher vergleichsweise höher und homogener ausfällt [32]. Zudem findet sich eine perilacunäre Anreicherung des Kollagen Typ II in der zentralen Zone [33]. Kollagen Typ I kommt typischerweise im hyalinen Knorpel nicht vor, lässt sich aber im umgebenden Perichondrium nachweisen. Des Weiterem konnte durch eine Herovici Färbung zwischen jungem und altem Kollagen differenziert werden. Ähnlich wie bei den Chondrozyten nimmt auch das Alter des Kollagens im Septumknorpel von peripher nach zentral zu [32]. De facto sind somit die peripheren, jüngeren Chondrozyten von jungem Kollagen Typ II umgeben, das sich in der Färbung hellblau darstellt, vice versa verhält es sich mit den älteren Chondrozyten, deren umgebende Matrix sich rötlich anfärbt.

Wiggenhauser et al. konnte durch eine Alcian Blau Färbung die Verteilung der GAG im humanen Nasenseptumknorpel demonstrieren (Abb. 4) [33]. Alcian Blau färbt GAG bei niedrigem pH-Wert cyan-blau [38]. Hierbei fällt eine ähnliche Verteilung der GAG wie von Kollagen Typ II auf: Beide EZM-Komponenten zeigen ein homogenes Muster in der peripheren und intermediären Zone und eine heterogene, intensivere und palisadenartig organisierte Verteilung in der zentralen Zone [33]. In immunhistochemischen Färbungen auf das Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) zeigte sich ebenfalls eine

ähnliche Anordnung wie in der Alcian Blau Färbung. Zudem war eine perizelluläre Anreicherung von COMP zu beobachten [33]. COMP ist ein nicht-kollagenes Matrixprotein aus der Gruppe der Thrombospondine und als solches für Zell-Matrix und Zell-Zell Interaktionen mitverantwortlich [39,40]. In einer weiteren immunohistochemischen Färbung auf Matrilin-3, einem weiteren nicht-kollagenem EZM-Protein, zeigte sich ein diffuses Verteilungsmuster im Querschnitt des Nasenseptumknorpels mit erhöhter immunoreaktiven Aktivität in der superfiziellen-interterritorialen und perizellulären Zone. Matrilin-3 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Formierung des komplexen Zell-Matrix Netzwerkes [41,42].

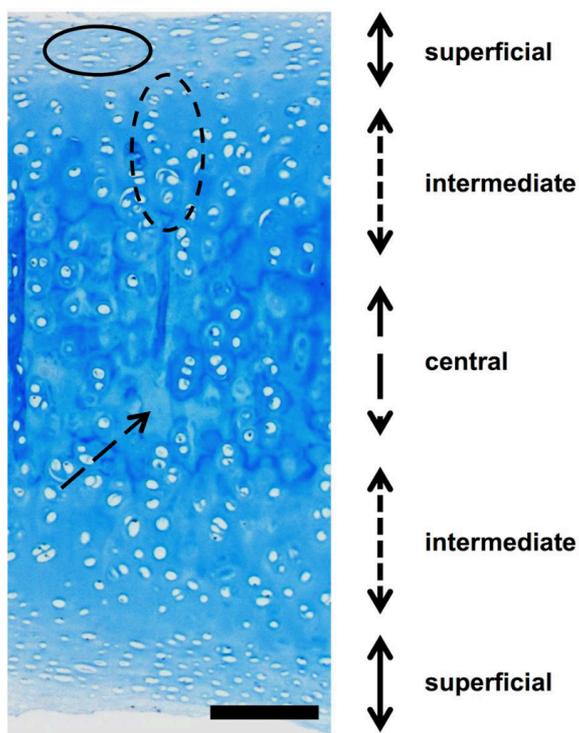


Abbildung 4) Querschnitt durch eine humane Nasenscheidewand.

In der Alcian Blau Färbung zeigen sich deutliche Unterschiede in der histologischen Organisation der Zonen. Es wird folgendes dargestellt: Säule aus hypertrophierenden Chondrozyten (Ellipse), flache regenerative Zellen parallel zur Oberfläche (Ellipse gestrichelt), zellulose zentrale EZM mit versprengten hypertrophen Chondrozyten (Pfeil) (Balken = 200 μm).

Grafik aus Wiggerhauser *et al.* *The distribution patterns of COMP and matrilin-3 in septal, alar and triangular cartilages of the human nose; Histochemistry and Cell Biology (2018) 150:291–30.* Mit freundlicher Genehmigung von Springer-Nature.

1.4.3. Biomechanik des Nasenseptumknorpels

Bei der Biomechanik des Nasenseptumknorpels ist von einer Anisotropie auszugehen. Diese wird hauptsächlich durch die inhomogene Ausrichtung und Zusammensetzung der extrazellulären Bestandteile des Knorpels in den verschiedenen Zonen gebildet [43]. Der Elastizitätskoeffizient und die Permeabilität des Nasenseptumknorpels sind Abhängig von der Höhe der Kompression und der Kraftausrichtung (horizontal vs. vertikal) auf den Knorpel. Die Arbeitsgruppe von Wiggerhauser *et al.* konnte eine Permeabilität von $1,5 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ bis $0,6 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ und einen Elastizitätskoeffizienten (E-Modul) von 0,49 MPa bis 0,77 MPa in einer Studie mit Nasenseptumknorpel von 10 Spendern berechnen [43].

1.5. Zell-Matrix Interaktionen

EZM ist eine dynamische Umgebung die einerseits von den Zellen gebildet wird und andererseits durch ihre biochemischen, biophysischen und biomechanischen Eigenschaften dazu in der Lage ist das Zellverhalten zu beeinflussen [44]. Es findet also eine permanente Kommunikation zwischen Zellen und Matrix statt.

Unter biochemischen Einflüssen wird die direkte oder indirekte Interaktion über Oberflächenrezeptoren und Wachstumsfaktoren verstanden [45]. Physikalische Einflüsse bezeichnen die Porosität, Rigidität, Löslichkeit und Topographie der EZM. Diese sind in der Lage Teilung, Migration und Polarität von Zellen zu beeinflussen [44,46]. Mechanotransduktion über Matrixsteifheit und äußere Kräfte werden als biomechanische Einflüsse zusammengefasst [47,48].

Zell-Matrix Interaktionen finden in allen Geweben des Körpers statt und spielen in der Embryologie eine entscheidende Rolle [47]. Die Hauptinteraktion vermittelt dabei die direkt an die Zellen angrenzende PZM und ihre Inhaltsstoffe [29,49].

Knorpelgewebe stellt hierbei keine Ausnahme dar: Vorherige Studien konnten zeigen, dass Chondrozyten in einer 2D Umgebung anfangen zu dedifferenzieren und einen fibroblastenartigen Phänotyp annehmen. Diese Veränderungen werden von einer Herunterregulierung von knorpelspezifischen Genen (Kollagen Typ II, Aggrecan) und der EZM Sekretion begleitet. Fibroblasten-typische Marker wie Kollagen Typ I werden dabei hochreguliert [50–52]. Dieser Prozess kann in dreidimensionaler Kultivierung wieder umgekehrt werden [53]. Dies ist ein Beispiel für biophysische Interaktion zwischen den Chondrozyten und der EZM.

Pathologische Veränderungen des Knorpels, wie sie bei Arthritis und Arthrose vorkommen, eignen sich gut zur Demonstration von biochemischen und biomechanischen Zell-Matrix Interaktionen: Beispielsweise konnte ein Zusammenhang zwischen pathologisch veränderter Hyaluronsäure und Knorpeldegeneration bei Arthritis hergestellt werden [30,54]. In physiologischen Verhältnissen wird Hyaluronsäure an der inneren Zellmembran der Chondrozyten produziert und anschließend in die EZM freigesetzt. Dort kommt es zur Interaktion mit TLR-4 und CD44 Rezeptoren, die die Zellhomöostase gewährleisten. In pathologischen Verhältnissen wird die Hyaluronsäure von hydrolytischen Enzymen und reaktiven Sauerstoffspezies zu kleinen Fragmenten degradiert. Diese kleinen Hyaluronfragmente interagieren wiederum mit TLR-4 und CD44 und aktivieren über andere Signalwege NF- κ B, das im Zellkern die Transkription weiterer schädigender Mediatoren initiiert [54]. NF- κ B gilt als kritischer Faktor für die Entstehungen von rheumatoider Arthritis und Arthrose [55]. Giulak *et al.* bezeichnet Arthrose als Krankheit der PZM, deren Pathologie zu einer Veränderung der Chondrozyten Morphologie führt [56].

Neben den biochemischen tragen auch biomechanische Zell-Matrix Interaktionen zur Entstehung von Arthrose bei [57]. Folkman *et al.* konnte zeigen, dass die Zellform ein potenter Regulator für das Zellwachstum und die Physiologie ist, eine Verformung durch physikalische Kräfte kann also zu einer Änderung des Zellverhaltens führen [58]. Solche Stimuli spielen in der Embryologie und in der Stammzellendifferenzierung eine große Rolle. Donald Ingber identifizierte 1991 Integrine, als hauptverantwortliche Mediatoren der Mechanotransduktion [59]. Integrine sind Transmembranproteine die neben der Zell-Matrix Interaktion auch für Zell-Zell Interaktion von Bedeutung sind [60,61].

1.6. Tissue Engineering

Tissue Engineering bezeichnet ein interdisziplinäres Feld, das Prinzipien der Naturwissenschaften und des Ingenieurwesen verbindet und das Ziel hat ein biologisches Substitut herzustellen, welches verletztes Gewebe oder ganze Organe wiederherstellt, ersetzt oder verbessert [62].

Für den Herstellungsprozess werden klassischerweise Zellen mit einem Gerüst (Scaffold) und spezifischen Wachstumsfaktoren kombiniert, um so das gewünschte Gewebe zu kreieren und zu vervielfältigen [63,64].

In den letzten 30 Jahren konnten in verschiedensten medizinischen Bereichen Fortschritte in diesem Forschungsfeld verzeichnet werden: Neben verschiedenen erfolgreichen Ansätzen im Tissue Engineering von Blutgefäßen, konnte im Jahr 1999 die erste De Novo Rekonstruktion einer Säugetier-Harnblase erfolgreich durchgeführt werden [65,66]. Somit wurde das erste funktionelle Organ durch Tissue Engineering im Labor hergestellt.

1.6.1. Chondrogenes Tissue Engineering

Auch das chondrogene Tissue Engineering folgt dem Prinzip, dass Zellen und ein biologisch und biomechanisch geeignetes Gerüst miteinander kombiniert werden (Abb. 5) [25,63]. Im Gegensatz zu vaskularisierten Geweben oder Organen, hat Knorpel jedoch den Vorteil, dass er über Diffusion aus der Peripherie ernährt wird [24]. Dieser Umstand vereinfacht die Komplexität des Engineering Prozesses erheblich. Dies bedeutet allerdings auch, dass in der späteren klinischen Anwendung, das fertige Konstrukt von einem gut vaskularisierten Gewebe umgeben sein muss, um die Ernährung und das Überleben zu gewährleisten [67]. Zusätzlich ist die lymphatische und nervöse Versorgung von Knorpel limitiert, daher wird von einem immunologischen Vorteil bei der Knorpeltransplantation im Vergleich zu anderen Körpergeweben ausgegangen [68].

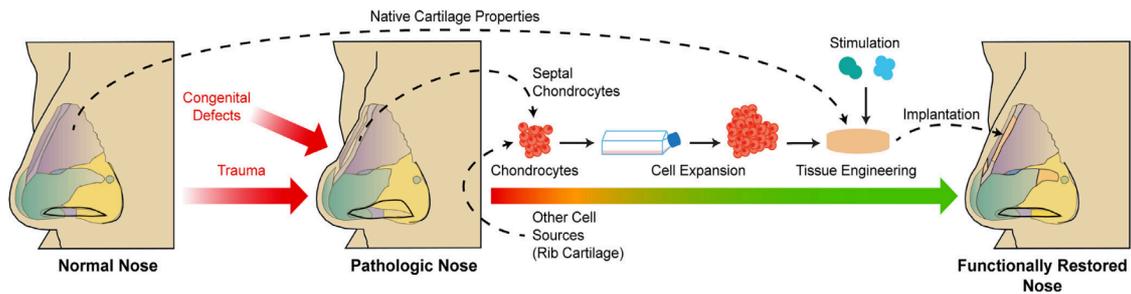


Abbildung 5) Der Tissue Engineering Prozess von Nasenknorpel.

Grafik aus Lavernia et al. *Towards tissue-engineering of nasal cartilages*; *Acta biomaterialia* 88 (2019): 42-56. Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.

Bereits 1992 wurden erste grundsätzliche Erkenntnisse im chondrogenen Tissue Engineering gewonnen: Buschmann *et al.* konnte zeigen das Chondrozyten eine knorpelartige EZM in einem Agarose Gel bilden können [36]. Seitdem wurden viele verschiedene Studien mit unterschiedlichsten Zellen und Materialien publiziert [68–70].

Im Folgenden soll genauer auf die verschiedenen Zellquellen und Scaffold-Materialien eingegangen werden, die beim Tissue Engineering von Knorpel Verwendung finden:

1.6.2. Zellen

Neben dem Scaffold ist eine geeignete Zellquelle die absolute Grundvoraussetzung für erfolgreiches Tissue Engineering [71]. Die Zellen müssen vital, leicht verfügbar, manipulierbar, nicht immunogen und tumorgen sein. Für chondrogenes Tissue Engineering werden in der Regel entweder Mesenchymale Stammzellen (MSCs) oder Chondrozyten verwendet [71].

1.6.2.1. Chondrozyten

Humane Chondrozyten können aus Knorpelgewebe mit verschiedenen Methoden isoliert werden. Dazu zählen die mechanische und die enzymatische Isolation [72,73]. Allerdings ist Knorpelgewebe nur begrenzt verfügbar und nicht leicht zugänglich, dies limitiert den Einsatz von Chondrozyten in der Regenerativen Medizin [67].

1.6.2.2. Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen (klonogenes Potential) und sich unter bestimmten Bedingungen in spezialisierte Zellen entwickeln können [74,75].

Innerhalb dieser Definition kann genauer zwischen den unterschiedlichen Stammzellpotenzen differenziert werden. Diese sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Potenz	Fähigkeit
Totipotent	Bildung eines vollständigen Organismus
Pluripotent	Bildung verschiedener Zellen aller drei Keimblätter
Multipotent	Bildung verschiedener Zellen eines Keimblattes

Tabelle 2) Stammzellpotenzen.

Im Wesentlichen kann man die Stammzellen in zwei große Gruppen unterteilen. Die embryonalen und die postnatalen (adulten) Stammzellen. Die embryonale Stammzelle bezeichnet eine pluripotente Stammzelle, die der inneren Zellmasse der Blastocyste entstammt und zur Differenzierung von Zelltypen aller drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) befähigt ist [76,77].

Die adulte Stammzelle hingegen wird aus postnatalen Gewebe gewonnen. Im Jahr 1963 konnten Till und McCulloch *et al.* erstmals die Präsenz einer Zelle mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung im Knochenmark von Mäusen beschreiben und postulierten diese Zellgruppe als regenerative Stammzellen [77,78]. Heute bezeichnen wir diese Zellen als Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) [77]. 1968 gelang Friedenstein *et al.* die Entdeckung der MSCs ebenfalls im Knochenmark [79].

MSCs sind Vorläuferzellen des Bindegewebes, die sich häufig teilen und deren Nachkommen sich in verschiedene Formen des Bindegewebes entwickeln können [80,81]. Diese Zellpopulation gilt somit als multipotent [82]. In den letzten Jahren konnten allerdings durch verschiedene Autoren demonstriert werden, dass MSCs auch Tendenzen dazu zeigen sich in Zelllinien die aus dem Endoderm (u.a. Hepatozyten) und Ektoderm (u.a. Neurone, Schwannzellen, Oligodendrozyten) entstammen, zu differenzieren [83,84]. Die Neuronen und Gliazellen zeigten allerdings nicht alle Eigenschaften von reifen Zellen [85]. Somit wird teilweise von einer Pluripotenz dieser Zellpopulation ausgegangen, allerdings ist diese Frage noch nicht abschließend geklärt [77,86,87].

Als gesichert gilt, dass MSCs in Osteozyten, Adipozyten, Chondrozyten, Myozyten und Tenozyten differenzieren können [88–92].

Seit ihrer initialen Entdeckung im Jahr 1968 konnten MSCs auch in verschiedenen anderen Geweben des postnatalen Organismus gefunden und daraus isoliert werden. Dazu zählen das Fettgewebe, Blut, Amnion Flüssigkeit, Haut, Knochenmark, Periost,

Plazenta, Infrapatellarer Fettkörper, Muskel, Nabelschnur-Synovia und der Trabekelknochen [86,92–97].

MSCs als Stammzellen des adulten Organismus, haben die Funktion das Gewebe zu erneuern und bei Verletzung zu regenerieren [98,99]. Des Weiteren werden den Zellen immunmodulatorische und sekretorische Fähigkeiten zugeschrieben [100,101].

In der Literatur sind meistens die MSCs aus dem Knochenmark (bmMSCs) gemeint, wenn von MSCs gesprochen wird. Allerdings hat sich in den letzten Jahren der Forschungsfokus zunehmend auf die MSC die aus Fettgewebe isoliert werden, die Adipose tissue-derived Stem Cells (ASCs) verlagert.

1.6.2.3. Adipose tissue-derived Stem Cells (ASCs)

Im Jahr 2001 konnte Zuk *et al.* erstmal eine Stammzellpopulation im Fettgewebe identifizieren und erfolgreich daraus isolieren [82,94]. Die sogenannten ASCs sind Zellen mit der Qualität einer MSC und sind innerhalb des Fettgewebes in einem speziellen Mikrohabitat zu finden, der sogenannten Stammzell-Nische [102]. Dort liegen sie in einem „Standby-Modus“ vor, bis sie durch äußere Einflüsse, über Zell-Matrix Interaktionen zur Proliferation oder Differenzierung angeregt werden [102–104].

ASCs sind im Gegensatz zu vielen anderen Formen der MSCs, besonders leicht verfügbar, denn die Entnahme über eine Liposuktion erfordert in der Regel nur eine lokale Anästhesie [105,106]. Des Weiteren stehen ASCs als Bestandteil des Fettgewebes in großer Menge zur Verfügung.

Die minimalen Kriterien zur Definition wurden von der „*International Federation of Adipose Therapeutics and International Society for Cellular Therapy*“ folgendermaßen festgelegt und hier vereinfacht dargestellt:

Die isolierten Zellen müssen

- 1) plastikadhärent sein
- 2) die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen
- 3) multipotentes Differenzierungspotential (adipogen, osteogen und chondrogen) aufweisen
- 4) spezifische Oberflächenmarker exprimieren:
 - a. > 80 % positiv für: CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105
 - b. < 2 % positiv für: CD31, CD45, CD235a [107,108].

ASCs und bmMSCs haben viele Gemeinsamkeiten und weisen ähnliche regenerative Eigenschaften auf [109]. Ein vereinfachter Vergleich ist in Tabelle 3 dargestellt.

	bmMSCs	ASCs	Referenz
Phänotyp in 2D	Fibroblastenartig	Fibroblastenartig	[110,111]
Chondrogenes Differenzierungsverhalten	+++	++	[110]
Adipogenes Differenzierungsverhalten	+++	+++	[110]
Osteogenes Differenzierungsverhalten	+++	++	[110]
Kumulative Populationsverdopplungszeit	13,7 ± 0,5 h	17,2 ± 0,3 h	[110]
Aufwand der Isolation	Mittel	Einfach	[109,112]

Tabelle 3) Unterschiede und Gemeinsamkeiten von ASCs und bmMSCs.

ASCs werden klassischerweise mittels einer Kollagenase aus dem Lipoaspirat des Patienten als zellulärer Bestandteilen der Stromal Vascular Fraction (SVF) isoliert [80,107]. Die SVF enthält neben den ASCs auch Populationen von Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Perizyten und verschiedene Immunzellen [113]. Durch die Plastik-adhärenz der ASCs und die spezifischen Oberflächenmarker kann man diese nach einigen Tagen in Kultur von den restlichen Zellen der SVF separieren [113,114].

ASC-Eigenschaften können durch verschiedene Charakteristika des Spenders (Alter, Geschlecht, BMI), sowie durch die Entnahmestelle und Verarbeitung des Fettgewebes beeinflusst werden [115–120]. Daher ist eine genaue Charakterisierung des Patientenkollektives und eine weitestgehend identische Methodik essentiell für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [121].

Dank ihrer Eigenschaften als Stammzellen und Immunmodulatoren sowie der einfachen Zugänglichkeit und hohen Bioverfügbarkeit eignen sich die Fettgewebstammzellen hervorragend für verschiedene Applikationen in der Regenerativen Medizin, wozu auch das Tissue Engineering von mesenchymalen Gewebe zählt [122].

1.6.3. Scaffold

Die Anforderungen an ein Scaffold beim Tissue Engineering sind hoch: Das Material muss zum einen ein stabiles Gerüst für die verwendeten Zellen anbieten. Zum anderen muss es Zellinvasion, -adhäsion, -proliferation und gegebenenfalls Zelldifferenzierung zulassen und darf keinesfalls toxisch sein [63,123]. Darüber hinaus muss das Scaffold auch die natürlichen biomechanischen Anforderungen an das zu imitierende Gewebe erfüllen. Beispielsweise sollte ein hyaliner Knorpel, der durch Tissue Engineering hergestellt wurde genauso druckelastisch und formstabil sein wie ein nativer Knorpel. Die Anforderungen an den Nasenseptumknorpel unterscheiden sich dabei von denen an den Gelenkknorpel: Das Septum muss die Form der Nase in der Sagittalebene

gewährleisten und die Atemwege offenhalten, es ist das wichtigste Stützelement der Nase [124]. Allerdings muss das Septum nicht so hohen Druck- und Gewichtsbelastungen wie der Gelenkknorpel standhalten [125].

Grundsätzlich kann zwischen zwei großen Materialgruppen unterschieden werden, die sich als potentiell geeignetes Scaffold eignen: Zum einen gibt es die biologischen EZM-Verbindungen und zum anderen die künstlichen Polymer-Verbindungen [67].

Die biologischen Scaffolds werden durch die Dezellularisierung und Sterilisation von xenogenen oder humanen Knorpel gewonnen. Diese Materialien haben den großen Vorteil, dass sie dem nativen Gewebe in ihrer Komposition, ihrer Anatomie und ihren biologischen und biomechanischen Eigenschaften gleichen [67,68,126]. Dies wird auch als Biomimikry bezeichnet [127]. Vorherige Studien konnten demonstrieren, dass das Biomimikry effizient die Remodellierung des Gewebes beeinflussen kann, anstatt zur Entstehung von Narbengewebe zu führen [128,129].

Trotz des immunologischen Vorteils von Knorpelgewebe, kann dennoch ein diskordantes Xenograft eine potentielle Gefahr der Antikörper vermittelten hyperakuten und chronischen Abstoßungsreaktion für den Patienten bedeuten. Diese Immunreaktionen werden über natürliche polyklonale Antikörper (anti-Gal) im humanen Serum vermittelt, die an spezifische Säugetier Kohlenhydrate α -Gal (Gala1-3Galb1-4GlcNac-R) die auf porcinen und bovinen Geweben exprimiert werden, binden können [68,130]. Dazu kommt das Risiko, dass xenogene und allogene Transplantate Infektionen und Mutationen zwischen den Arten, beziehungsweise Individuen übertragen können. Dieses Risiko kann man durch gezielte genetische Modulation der Spender Spezies oder Sterilisierungsprozesse des Transplantates reduzieren [68].

Künstliche Materialien, wie zum Beispiel Polycaprolacton (PCL) haben den Vorteil, dass sie für 3D-Druck Verfahren verwendet werden können [67]. Dadurch können diese Scaffolds leicht mit Computer-assisted design/ Computer-assisted manufacturing (CAD/CAM) personalisiert werden. Dabei werden 3D-Scans oder radiologische Bildgebung wie CT- oder MRT-Bilder ausgewertet und ein patientenindividueller Implantat-Entwurf erstellt (CAD). Anschließend wird das Implantat mittels 3D-Druck produziert (CAM) [67]. Eine Schwierigkeit bei Kunststoffen ist, dass diese Zelladhäsion, Vitalität, Proliferation und Zelldifferenzierung gewährleisten und von dem Körper als Fremdmaterial akzeptiert werden müssen. In diesem Zusammenhang sind auch resorbierbare Materialien interessant [131]. Allerdings konnte bisher kein geeignetes künstliches Material identifiziert werden, das alle Anforderungen zufriedenstellend erfüllt [67].

1.6.3.1. *Dezellularisierter porciner Nasenseptumknorpel (dpNSK)*

Im Jahr 2010 meldeten die Autoren Breiter, Körber und Schwarz ein Patent für die Herstellung einer dezellularisierten porcinen Knorpelmatrix vom Nasenseptumknorpel an [132]. Die Entwicklung und Herstellung dieses xenogenen Scaffolds erfolgte um ein Bioimplantat zu generieren, das eine geeignete Knorpelersatzmatrix darstellt und eines Tages als eine Alternative zur autologen Knorpeltransplantation mit Auricular- oder Rippenknorpel dienen kann [68].

Die Dezellularisierungs- und Sterilisationsprozess ist unter 3.1.1. genauer beschrieben. Ziel der Autoren war es durch die Sterilisation sicherzustellen, dass kein Risiko der Übertragung von Infektionen und Krankheiten zwischen den Arten besteht. Die Dezellularisierung erfolgte, um die Immunogenität des Transplantates zu eliminieren und so Antikörper vermittelte Reaktionen auszuschließen. Gleichzeitig sollten die biomechanische Integrität, Möglichkeit der Rezellularisierung und chondrogenen Eigenschaften der dpNSK erhalten bleiben [68,133].

Die Autoren konnten zeigen, dass durch die Verarbeitung alle Chondrozyten, Mikroorganismen und Funghi aus dem Scaffold entfernt werden konnten [68]. Dies inkludiert die Destruktion des Kohlenhydratkomplexes α -Gal (Gala1-3Galb1-4GlcNac-R) auf der Oberfläche der Zellen innerhalb des Xenotransplantates. Zudem wurde dabei die totale Matrixporosität signifikant erhöht, was primär auf die Reduktion von GAG zurückzuführen ist. Die Form und Größe des Scaffolds konnten durch die intakte Kollagenstruktur erhalten werden [68]. Die anschließende *in vitro* 3D-Kultur konnte demonstrieren, dass humane Chondrozyten Scaffold-adhärenz und vital waren und marginal vom Rand des Scaffolds nach zentral migrierten. Dabei konnte auch die erneute Bildung einer GAG-haltigen chondrogenen Matrix durch die Zellen beobachtet werden. Somit wurde ein zytotoxischer Effekt durch die Dezellularisierung ausgeschlossen und dpNSK konnte als geeignetes Habitat für humane Chondrozyten identifiziert werden [68]. Die Interaktionen zwischen dpNSK und humanen Chondrozyten wurden in einer weiteren Publikation mit immunhistochemischen Färbungen und einer Analyse der Genexpression untersucht. Außerdem wurde die mechanische Stabilität des Zell-Matrix Konstruktes ausgewertet [134]. Hier konnte demonstriert werden, dass die humanen Chondrozyten, nach einer Dedifferenzierung in der 2D-Kultur, in 3D wieder beginnen zu redifferenzieren, was nach 14 Tagen von einem Anstieg der Aggrecan und Kollagen Typ II Synthese, also der Bildung einer knorpeltypischen Matrix begleitet wurde. Dies konnte auch in der immunhistochemischen Färbung dargestellt werden [134].

In einer weiteren Publikation wurden die *in vitro* und *in vivo* Effekte von dpNSK auf die Regeneration von Nasenseptumknorpel nochmals genauer evaluiert [69]. Dafür wurde im Rattenmodell die Eignung des Scaffolds sich in Knorpeldefekte zu integrieren und die Nasenseptumperforation zu verhindern, untersucht. Die unbesiedelten und mit

Chondrozyten besiedelten dpNSK zeigte dabei eine vergleichbare Fähigkeit im Bezug auf die Septumstabilität wie nativer Knorpel. Histologische und immunhistologische Untersuchungen konnten zeigen, dass das implantierte Scaffold geringfügige Makrophagen und Lymphozyten Infiltration förderte, aber keine starke inflammatorische Reaktion induzierte. Elsaesser *et al.* schlussfolgerten aus diesen Ergebnissen, dass dpNSK eine sichere xenogene Kollagenmatrix darstellt, die eine ausreichende Biokompatibilität für Tissue Engineering Applikationen aufweist und *in vivo* (in einem Ratten-Modell) integrative Reparaturmechanismen fördert [69]. Die Langzeit-Effekte dieser Ergebnisse wurden im Jahr 2019 in einem Kaninchen-Modell überprüft und von derselben Arbeitsgruppe publiziert [70]. Hier konnte eine stabile und verlässliche Septumrekonstruktion erreicht werden und Biokompatibilität des dpNSK demonstriert werden. Die mit Chondrozyten besiedelten Scaffolds zeigten dabei bessere Ergebnisse bezüglich der Langzeit-Stabilität als Unbesiedelte [70].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass dpNSK als natürliche Extrazellulärmatrix-Verbindung, ein potentielles biokompatibles Scaffold für Tissue Engineering Applikationen in der rekonstruktiven Rhinochirurgie darstellt. Die Autoren bewerteten die Besiedlung von dpNSK mit humanen Chondrozyten als erfolgreich und die Zellen waren adhärent, proliferierten, migrierten und bildeten Bestandteile einer Knorpel-EZM [68,134]. Zudem zeigte das Scaffold *in vivo* eine gute Biokompatibilität und die Fähigkeit integrative Reparaturmechanismen zu fördern [69,70].

2. Fragestellung

2.1. Klinischer Bezug

Der Nasenseptumknorpel ist eine unverzichtbare anatomische Struktur für die Form und Funktion der Nase. Eine Destruktion des Septums erfordert die Transplantation von autologem Knorpel als rekonstruktive Maßnahme. Dies ist jedoch mit mechanischen und kosmetischen Komplikationen assoziiert. Ein künstlich hergestelltes Knorpelersatzmaterial würde dem Patienten eine Alternative anbieten, die keinen zusätzlichen Hebedefekt kreiert.

DpNSK ist eine EZM-Verbindung, die in vorherigen Studien in Verbindung mit humanen nasalen Chondrozyten großes Potential als Knorpelersatzmaterial für den Nasenseptumknorpel gezeigt hat [68–70]. Die Verwendung von humanen Chondrozyten ist jedoch durch die geringe Verfügbarkeit und die aufwendige Isolation limitiert. Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe, sogenannte ASCs besitzen die Fähigkeit zur Chondrogenese, stehen in großen Mengen zur Verfügung und können minimal-invasiv durch eine Liposuktion gewonnen werden [135]. Diese Eigenschaften machen ASCs zu einer potentiellen alternativen Zellquelle für Tissue Engineering Applikation mit dpNSK. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit die Eignung von ASCs in Verbindung mit dpNSK für das Tissue Engineering von Nasenseptumknorpel untersucht werden. Diese Zell-Matrix Kombination bietet einen potenziellen Vorteil im Vergleich zu den bisher in der Literatur publizierten Herangehensweisen zum Einsatz von dpNSK für die Regeneration des NSK.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Ziele und Hypothesen dieser Arbeit in drei Teile eingeteilt. Diese sind im Folgenden dargestellt:

2.2. Teil I: Nachweis der Stammzellidentität

Der erste Teil dieser Arbeit hat das Ziel, die Identität der aus humanem Fettgewebe isolierten Zellpopulation als ASCs zu demonstrieren und die Fähigkeiten der Zellen im Hinblick auf den Nutzen für chondrogene Tissue Engineering Applikationen von NSK zu evaluieren. Vor diesem Hintergrund wurden die folgenden Teilfragen formuliert:

1. Kann die Identität der isolierten Zellpopulation als ASCs bestätigt werden?
2. Zeigen ASCs Potential für chondrogenes Tissue Engineering?

2.3. Teil II: *In vitro* Evaluation von dpNSK und ASCs als potentielles Knorpelersatzmaterial

Für diesen Teil der Arbeit sollen erstmalig die Interaktionen zwischen ASCs und dpNSK im Hinblick auf die Eignung als Knorpelersatzmaterial *in vitro* evaluiert werden. Dafür erfolgt die Besiedlung von dpNSK mit der isolierten Zellpopulation aus Teil I und die Stimulation mit chondrogenen Wachstumsfaktoren. Aufbauend auf den vorherigen Studien mit dpNSK und humanen nasalen Chondrozyten wurden folgende Teilfragen formuliert:

1. Ist die Rezellularisierung von dpNSK mit ASCs möglich und sind die Zellen auf dem Scaffold adhären (Zelladhärenz und Zelldistribution)?
2. Sind ASCs auf dpNSK vital und metabolisch aktiv (Biokompatibilität)?
3. Proliferieren ASCs auf dpNSK (Proliferation)?
4. Sind ASCs in der Lage in tiefere Zonen von dpNSK zu migrieren (Zellinvasion)?
5. Ist die chondrogene Differenzierung von ASCs auf dpNSK möglich und können die Zellen Bestandteile einer knorpeltypischen Matrix produzieren (Differenzierung)?

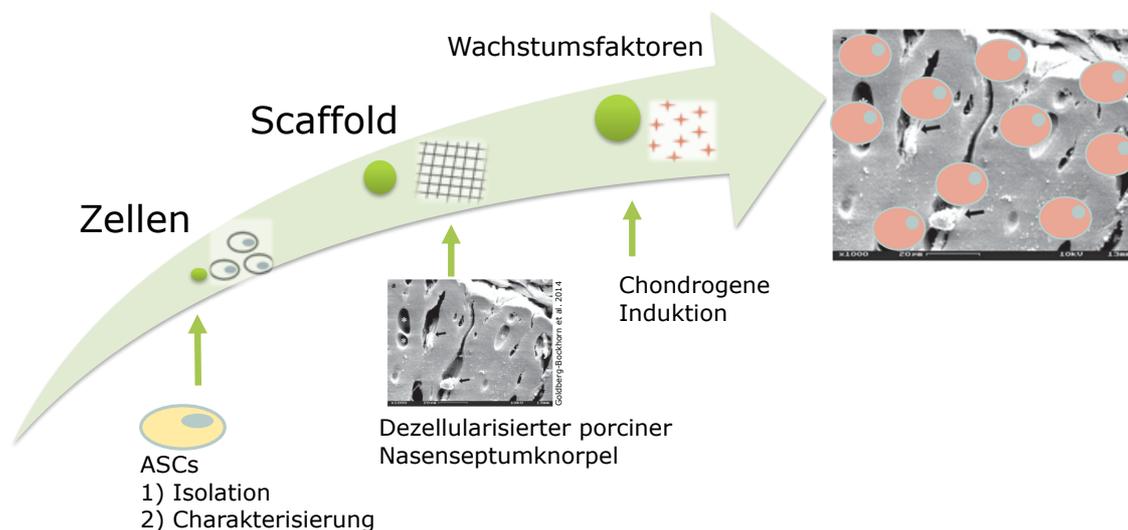


Abbildung 6) Theoretischer Versuchsaufbau von Teil II und III.

Zuerst werden ASCs aus Fettgewebe isoliert und charakterisiert. Anschließend wird dpNSK mit ASCs besiedelt und kultiviert. Unter dem Einfluss von chondrogenen Wachstumsfaktoren soll die chondrogene Differenzierung der ASCs induziert werden. *REM-Aufnahme aus Goldberg-Bockhorn et al. Physikalische Charakterisierung dezellularisierter Knorpelmatrix zur Anwendung in der Rhinochirurgie; Laryngo-Rhino-Otologie 2014; 93: 756–763. Mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlags.*

2.4. Teil III: Einfluss der EZM-Zonen auf das Zellschicksal von ASCs

Die genaue histologische und biomechanische Auswertung von humanem und xenogenem Nasenseptumknorpel in vorherigen Studien, konnte verschiedene Zonen identifizieren: Die superfizielle, die intermediäre und die zentrale Zone. Diese unterscheiden sich durch die Morphologie der Chondrozyten, die EZM-Komposition und die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels [32–34]. Bei der Analyse der unterschiedlichen Zonen fällt auf, dass die nasalen Chondrozyten der superfiziellen Zone einen proliferativen Phänotyp exprimieren: sie sind klein, zahlreich und umgeben von jungem Kollagen Typ II. Die intermediäre Zone stellt eine Übergangszone dar und die nasalen Chondrozyten der zentralen Zone exprimieren einen hypertrophen und kugelförmigen Phänotyp mit dichten GAG Anreicherungen in ihrer perizellulären Umgebung.

Die Arbeitsgruppe um Breiter, Körber und Schwarz konnte zudem einen schonenden Dezellularisierungsprozess entwickeln, bei dem die natürliche 3D-Struktur und EZM-Komposition des Nasenseptumknorpels größtenteils erhalten werden kann. Die natürliche Heterogenität und Anisotropie der Zonen ist somit auch im dpNSK abgebildet [68,134]. Aufgrund der wechselseitigen Interaktionen zwischen Zellen und der Matrix ist eine zonen-spezifische Beeinflussung des Zellschicksals durch die EZM nach der Besiedlung mit ASCs naheliegend. Ausgehend von dem Phänotyp der Chondrozyten im nativen Nasenseptumknorpel wurden daher die folgenden Teilfragen formuliert:

1. Weisen ASCs bei der Kultivierung auf der superfiziellen Zone von dpNSK eine höhere Proliferationsrate als auf der zentralen Zone auf?
2. Weisen ASCs bei der Kultivierung auf der zentralen Zone von dpNSK eine höhere Hypertrophie auf und produzieren größere Mengen einer knorpeltypischen Matrix?

3. Material und Methoden

3.1. Isolation der ASCs

3.1.1. Demographie der Spender

Die verwendeten Stammzellen wurden aus den Aspiraten von Liposuktionen gewonnen, die im Zeitraum vom 22.03.2017 - 10.03.2018 in der Abteilung für Handchirurgie, Plastische- und Ästhetische Chirurgie am Klinikum der Universität München durchgeführt wurden. Ein positives Votum der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München liegt vor (Registriernummer 17-046). Alle Patienten haben schriftlich in die Prozedur eingewilligt und wurden negativ auf HIV, Hepatitis B und C getestet. Alle Daten wurden anonymisiert behandelt. Die gewonnenen Proben wurden am Operationstag im Zellkulturlabor verarbeitet und die Stammzellen nach dem unten aufgeführten Protokoll isoliert. Die Probengröße lag im Bereich zwischen 10 und 30 ml und wurde durch eine wasserstrahl-assistierte („waterjet-assisted“) Liposuktionssystem (Body-Jet evo, Human med, Deutschland) gewonnen.



Abbildung 7) Das wasserstrahl-assistierte Body-Jet System.

Eine Übersicht der Spender ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Spenderkürzel	Geschlecht	Entnahmestelle	Alter (Jahre)	Raucher
D1	weiblich	Abdomen	64	Nein
D4	weiblich	Abdomen	55	Nein
D7	weiblich	Abdomen	59	Nein
D10	weiblich	Abdomen	52	Nein
D11	weiblich	Abdomen	44	Nein

Tabelle 4) Übersicht der ASC Spender.

3.1.2. Die enzymatische Isolation

Geräte und Standartzubehör für die Zellkultur	
Thermo Scientific Safe 2020 Sicherheitswerkbank der Klasse II	Thermo Fisher Scientific, USA
HERAcell 240i Inkubator	Thermo Fisher Scientific, USA
Heraeus Megafuge 40R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, USA
Three-Dimensional Shaker TL 10	Edmund Bühler, Deutschland
Neubauer Kammer	Brand, Deutschland
Primovert Mikroskop	Zeiss, Deutschland
Kryoröhrchen (Cryovials)	Thermo Fischer Scientific, USA
T-175 Flask	Thermo Fisher Scientific, USA
50 ml Falcon	Sarstedt AG & Co., Deutschland
15 ml Falcon	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Steriflip Filter System	Milipore, Deutschland
70 µl Zellsieb	Corning, USA
Pipetten (10 -1000 µl)	Eppendorf, Deutschland

Chemikalien	
Kollagenase Typ II (275 U/mg)	Worthington, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high-glucose	Life Technologies Corporation, USA
Fetal bovine serum (FBS)	Life Technologies Corporation, USA
100 Units/ml Penicillin and 100 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep) Lösung	Biochrom, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	Life Technologies Corporation, USA
Trypsin 0,05 %/ 0,02 % EDTA in PBS Lösung	Biochrom, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Deutschland

Lösungen und Medien für die Isolation, Kultivierung und Lagerung in flüssigen Stickstoff	
Kollagenase Typ II Lösung	DMEM-high glucose 1 mg/ml Kollagenase Typ II Pulver 1 % Pen/ Strep Lösung
Kulturmedium	89 % DMEM-high glucose 10 % FBS 1 % Pen/Strep Lösung
Gefriermedium	70 % Kulturmedium 20 % FBS 10 % DMSO

Zur Isolation wurden die Proben unter sterilen Bedingungen auf 50 ml Falcons aufgeteilt, wobei jedes Falcon mit 10 ml befüllt wurde. Anschließend wurde das Aspirat im Verhältnis 1:1 mit einer vorher vorbereiteten und auf Körpertemperatur erwärmten und sterifiltrierten Kollagenase II Lösung auf einem 3D-Shaker für 10 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Probe gevortext und zehnmals mit einer 25 ml Pipette titriert. Nach kurzem Abwarten bildeten sich 2 Phasen in der Emulsion. Der hellere, fettig erscheinende Überstand wurde vorsichtig vom flüssigerem, blutigem Unterstand

abgesaugt und in ein neues Falcon überführt. Die bisherigen Arbeitsschritte werden mit dem Überstand 2-5 Mal wiederholt, wobei jedes Mal der neue Unterstand gesammelt wurde. Der gesammelte Unterstand wird anschließend durch ein Zellsieb filtriert und die Kollagenase Reaktion durch die Zugabe von 10 ml Kulturmedium gestoppt. Anschließend wird der Falcon bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Unter Berücksichtigung der entstandenen Pellets wird die Flüssigkeit in dem Falcon abgesaugt und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und in einer T-175 Flask ausgesät.

3.1.3. Kultivierung und Lagerung

Die ASCs wurden in einem humifizierten Brutschrank (21 % O₂, 5 % CO₂ und 37 °C) inkubiert und die Probe am Folgetag der Isolation, zum Entfernen verbliebener Erythrozyten, mehrfach mit PBS gewaschen. Des Weiterem wurde das Medium alle 3-4 Tage gewechselt und das Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop fotografisch dokumentiert. Bei dem Erreichen von mindestens 80 % Konfluenz wurden die Proben trypsinisiert und eingefroren oder im Verhältnis 1:1 in eine neue Flask gesplittet. Dabei wurde zuerst die alte T-175 Flask mit PBS gewaschen und 1 Minute bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss wurden 4 ml der Trypsinlösung hinzugefügt und die Flask für 5 Minuten im Brutschrank platziert. Nachdem das Ablösen von mindestens 90 % der Zellen unter dem Mikroskop bestätigt wurde, wurde die Trypsin Reaktion mit der doppelten Menge Medium gestoppt und der gesamte Inhalt der Flask in einen Falcon Tube überführt. Dabei wurden jedes Mal 50 µl der Zellsuspension unter dem Mikroskop mittels einer Neubauer Kammer gezählt. Es wurden immer 4 Quadranten auf beiden Seiten der Kammer (A-H) ausgezählt und die Gesamtzellzahl nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{[(A+B+C+D+E+F+G+H)]}{8} \times 10^4$$

Der Falcon wurde derweil bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Medium aus dem Falcon, in Rücksichtnahme auf das Pellet abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet in Gefriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen im Stickstofftank eingefroren und die Zellzahl dokumentiert. Diese Zellen wurden dann als Passage 1 bezeichnet.

Wenn die ASCs für Experimente benötigt wurden, wurden die Kryoröhrchen zügig aus dem Stickstofftank geholt und im 37 °C warmen Wasserbad bis zur Verflüssigung des Inhaltes gelagert. Anschließend wurde der Inhalt des Röhrchens sofort in einer Flask ausgesät und das Medium am nächsten Tag gewechselt, um die letzten Reste des zytotoxischen DMSO zu entfernen.

3.2. Nachweis der ASC Identität

3.2.1. Colony Forming Unit (CFU) Assay

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
Zeiss Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Deutschland
Petrischale 100 x 15 cm	Greiner, Deutschland
Chemikalien	
Giemsa Färbung	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	Carl Roth, Deutschland

Zur Evaluierung des klonogenen Potentials der ASC erfolgte ein CFU-Assay, nach einem modifizierten Protokoll von Alberton *et al.* [136]. Dafür wurden Zellen der Passage 1 verwendet und mit einer Konzentration von 10 Zellen/ pro cm² (= 600 Zellen) in einer Petrischale ausgesät. Nach 10 Tagen erfolgte die Visualisierung der Zellen mittels einer Giemsa Färbung. Dafür wurden zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend mit 10 ml Methanol für 30 Minuten bei - 20 °C fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit der Giemsa Färbelösung (0,02 % Giemsa Färbung in dH₂O) für 30 Minuten bei RT und die abschließende Waschung mit destilliertem Wasser.

Dann wurden die Kolonien gezählt, wobei jede Kolonie mindestens 8 Zellen beinhalten musste, um als Kolonie angesehen zu werden. Die CFU-Effizienz wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$CFU\text{-Effizienz (\%)} = \frac{\text{Anzahl Kolonien}}{\text{Anzahl ausgesäte Zellen}} \times 100$$

3.2.2. Durchflusszytometrie (FACS)

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
LSR Fortessa Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Chemikalien	
FACS Buffer	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA
Human TruStain FcX™ (Fc Receptor Blocking Solution)	BioLegend, USA
Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (1:1000)	eBioscience, Deutschland

Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
Pacific Blue™ anti-human CD44	BJ18	Maus IgG1, k	BioLegend, USA
Brilliant Violet 711™ anti-human CD13	WM15	Maus IgG1, k	BioLegend, USA

Brilliant Violet 785™ anti-human CD90	5E10	Maus IgG1, k	BioLegend, USA
FITC anti-human CD29	TS2/16	Maus IgG1, k	eBioscience, Deutschland
PerCP anti-human CD45	2D1	Maus IgG1, k	BioLegend, USA
PE anti-human CD235a	HI264	Maus IgG2a, k	BioLegend, USA
PE-Cy7 anti-human CD31	WM59	Maus IgG1, k	BioLegend, USA
APC anti-human CD105	SN6h	Maus IgG1, k	BioLegend, USA

Zur Bestimmung der ASC-typischen Oberflächenmarker erfolgte das Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). Dafür wurden 5×10^5 primäre Zellen mit Trypsin geerntet und für 5 Minuten bei RT mit dem supplementierten FACS Buffer (2 % FBS und 2 mM EDTA) und einem Fc- Rezeptor-Blocker inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem „Viability Dye“ und den primären konjugierten Antikörpern, beziehungsweise der Isotypen Kontrolle. Nach 20 Minuten bei 4 °C wurden die Zellen gewaschen und in der Durchflusszytometrie analysiert. Die Datenanalyse erfolgte mit der FlowJo V10.6.1 Software (BD Biosciences, Deutschland).

3.2.3. Nachweis der Multipotenz

Zum Nachweis der Multipotenz der ASCs wurden die Zellen mit 5 verschiedenen Spendern jeweils osteogen, adipogen und chondrogen differenziert. Dafür wurden jeweils 5×10^4 Zellen pro Well in einer 6 Well Platte ausgesät, wobei 3 Wells mit dem spezifischen Differenzierungsmedium versetzt wurden und 3 Wells mit Kontrollmedium befüllt wurden. Die Induktion erfolgte bei Erreichen von 80 % Zellkonfluenz in den Wells. Differenzierungs- und Kontrollmedium wurden regelmäßig (alle 3-4 Tage) erneuert. Bei allen drei Differenzierungen erhielt die Kontrollgruppe Standard-Kulturmedium. Der Nachweis der Multipotenz erfolgte nach 21 Tagen durch eine gewebespezifische Färbung. Zusätzlich wurde die chondrogene Differenzierung zusätzlich in einer Pellet-Kultur durchgeführt. Im Folgenden wird im Einzelnen auf die verschiedenen Differenzierungen und Färbungen eingegangen:

3.2.3.1. Adipogene Differenzierung und Quantifizierung

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
6-Well Platte	Thermo Fisher Scientific, USA
Fluoreszenz Mikroskop Axio Observer KMAT	Zeiss, Deutschland
Chemikalien	
Dexamethason	Sigma-Aldrich, USA
Indomethacin	Sigma-Aldrich, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, USA
3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, USA
Formaldehydlösung 4%	Microcos, Deutschland

BODI-PY 493/503	Thermo Fisher Scientific, USA
-----------------	-------------------------------

Medien und Färbungen für die Adipogene Differenzierung	
Induktionsmedium (Tag 1-5)	Kulturmedium + 0,1 mg/ml Insulin 1 µM Dexamethason 0,2 mM Indomethacin 1 mM IBMX
Erhaltungsmedium (Tag 6-7)	Kulturmedium + 0,1 mg/ml Insulin

Die adipogene Differenzierung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Saller *et al.* [137]. Bei Erreichen von 80% Konfluenz innerhalb der einzelnen Wells konnte die adipogene Differenzierung der ASCs induziert werden. Dazu wurden die Zellen mit dem adipogenen Induktionsmedium versetzt. Nach 5 Tagen Induktionsmedium wurde für 2 Tage auf ein Erhaltungsmedium umgestellt. Dieser Rhythmus wurde bis zum Tag 21 fortgesetzt.

Anschließend wurden die Adipozyten mithilfe einer lipophilen BODI-PY Färbung unter dem Fluoreszenz Mikroskop dargestellt. Dazu wurden die Wells 2x für jeweils 2 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit Formaldehydlösung für 25 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurde wieder 3x mit PBS gewaschen und dann bei 37 °C für 15 Minuten mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODI-PY (1:2500 in PBS) in dunkler Umgebung bei Körpertemperatur inkubiert. Nach abschließendem erneutem Waschen mit PBS wurden Bilder unter dem Fluoreszenz Mikroskop aufgenommen.

Zur Quantifizierung wurde mittels der Open Source Software Image J (Version 1.51n (Java 1.8.0_66 // 64-bit) der prozentuale Anteil der gefärbten Fettvakuolen im Verhältnis zur Gesamtfläche des Bildes mit dem Macro „Measure Stack“ (<https://imagej.nih.gov/ij/macros/MeasureStack.txt>) berechnet. Dafür wurden in jedem Well 6 Bilder bei gleichbleibender Belichtungszeit aufgenommen [138].

3.2.3.2. Osteogene Differenzierung und Quantifizierung

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Deutschland
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Deutschland
Zellschaber 2-Posit. Klinge 25	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Tecan SAFIRE II	Tecan Group, Schweiz
Chemikalien	
Dexamethason	Sigma-Aldrich, USA
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, USA
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, USA
Alizarin S Red	Sigma-Aldrich, USA
Essigsäure	Sigma-Aldrich, USA

Ammonium Hydroxid	Sigma-Aldrich, USA
-------------------	--------------------

Medien und Färbungen für die osteogene Differenzierung	
Osteogenes Differenzierungsmedium	Kulturmedium + 100 nM Dexamethason 10mM β -Glycerolphosphate 50 μ M Ascorbinsäure

Nach Abschluss der osteogenen Differenzierung erfolgte die gewebespezifische Färbung mit dem Farbstoff Alizarin S Rot [117,137]. Die Wells wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten bei RT mit 4 % Formaldehyd fixiert. Nach zweifachem Waschen mit dH₂O wurden 40 mM Alizarin S Rot (mit Essigsäure auf pH 4,1 justiert) für 20 Minuten zur Färbung in die Wells hinzugefügt. Abschließend wurde erneut mit dH₂O gewaschen und die Wells bei RT getrocknet. Alizarin Rot färbt die Calcium Derivate an und dient daher als Nachweis für die erfolgreiche osteogene Differenzierung.

Um den Erfolg der Differenzierung zu quantifizieren wurde die getrocknete Färbung für 30 Minuten mit 10 % Essigsäure aufgelöst und mit einem Zellschaber aus dem Well entfernt und in einem hitzestabilen Reaktionsgefäß für 10 Minuten bei 85 °C in einem Thermomixer inkubiert. Darauffolgend wurden die Proben für 15 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Zuletzt wurde der pH mit 10 % Ammoniumhydroxid neutralisiert und die Proben bei 405 nm Wellenlänge mit einem Tecan-Reader gemessen.

3.2.3.3. Chondrogene Differenzierung und Quantifizierung

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
V-Boden Polypropylen Platte	Corning, USA
CT 4 22 Zentrifuge	Jouan, Thermo Fisher Scientific, USA
Hypoxie Multi Gas Inkubator	Sanyo, Japan
CryoStar™ NX50 Cryostat (Kryotom)	Thermo Fisher Scientific, USA
Tissue-Tek Cryomold® eckig (15x 15 x 5 mm)	Sakura Finetek, Die Niederlande
Chemikalien	
StemMACS ChondroDiff Medium	Miltenyi Biotech, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich, USA
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, USA
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich, USA
ITS+ 3 (Insulin, Transferrin und Selenit)	Sigma-Aldrich, USA
Bone Morphogenetic Protein 6 (BMP-6)	R&D systems, USA
Transforming growth factor, beta 3 (TGF- β 3)	R&D systems, USA
Saccharose	Merck, Deutschland
Cryomold	Sakura Finetek, Die Niederlande
Tissue-Tek O.C.T Compound	Sakura Finetek, Die Niederlande
Paraformaldehyd (PFA) 4 %	Sigma-Aldrich, USA
Safranin-Orange	Sigma-Aldrich, USA

Alcian-Blau	Carl Roth, Deutschland
Kernechtrot	Carl Roth, Deutschland
Hämatoxylin-Eosin-Färbung	Carl Roth, Deutschland
HCL (Salzsäure)	Carl Roth, Deutschland
Menzel Objektträger	Thermo Fisher Scientific, USA
Roti-Mount-Aqua	Roth, Deutschland

Für den Nachweis der chondrogenen Differenzierung wurden verschiedene Methoden und Differenzierungsmedien getestet, um später unter optimalen Voraussetzungen auf dem Scaffold differenzieren zu können. Zum einen wurden zwei verschiedene Medien in einer 2D Kultur getestet und gegen eine Differenzierung in einer 3D Pellet Kultur verglichen.

Die chondrogene Differenzierung in der 3D-Kultur erfolgte nach einem Protokoll von Alberton *et al.* [117,139]. Dafür wurden die ASCs in einer Monolayer Zellkultur für 5 Tage in Hypoxie präkonditioniert. Anschließend wurden je $2,5 \times 10^5$ Zellen/ Well in eine 96-Well Polypropylen Platte mit V-förmigen Boden passagiert. Diese wurde für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert, dies führte zur Formierung eines Pellets. Die ASCs wurden für 28 Tage in Hypoxie (2 % O₂, 5 %, CO₂ 5 %, 37 °C) kultiviert und anschließend mit PBS gewaschen und dann für 2 h mit 4 % PFA bei RT fixiert. Danach wurde das Pellet erneut dreifach mit PBS gewaschen und für 4 h in Saccharose Lösung (30 % in PBS) eingelegt. Anschließend erfolgte die Einbettung in Tissue-Tek O.C.T Compound und die Lagerung bei - 80 °C. Die Pellets wurden mit dem Kryotom geschnitten und mit 0,1 % Safranin Orange (in dH₂O) gefärbt. Die Quantifizierung der Differenzierung der 3D Kultur erfolgte analog zur adipogenen Quantifizierung mit der Software Image J und dem Macro „Measure Stack“. Dafür wurde der Anteil der Safranin O positiven Areale von der Gesamtfläche der Pellets berechnet.

In der 2D Kultur wurden die 5×10^4 Zellen analog zu der adipogenen und osteogenen Differenzierung ausgesät und mit einem industriell erzeugten „Ready-to-use“ Medium differenziert. Anschließend erfolgte die Färbung mit Alcian Blau/ Kernechtrot bzw. Safranin Orange. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Die chondrogenen Differenzierungsmethoden im Vergleich		
	Monolayer-Kultur	Pellet-Kultur
Platte	6-Well	96-Well mit V-Boden
Zellzahl	5×10^4 /Well	$2,5 \times 10^5$ /Well
Aussaht	Monolayer	Pellet
Differenzierungsmedium	StemMACS Medium	ChondroDiff Kontrollmedium + 20 µg/ml TGF-β3 + 100 µg/ml BMP-6
Kontrollmedium	Kulturmedium	DMEM high-glucose 10 µM Dexamethason 1 mM Natrium Pyruvat

		0,195 mM Ascorbinsäure-2-phosphat 1% ITS+3 (Insulin, Transferrin und Selenit)
Dauer	21 Tage	28 Tage
Präkonditionierung	Keine	5 Tage in Hypoxie
O ₂ -Gehalt	Normoxie	Hypoxie
Mediumwechsel	2x pro Woche	3 x pro Woche
Fixierung	15 min. in 4 % PFA	2 h in 4 % PFA 4 h in 20 % Saccharose Fixierung in Tissue-Tek O.C.T Compound und Anfertigung von 8 µm Schnitten mit dem Kryotom
Färbung	<p>Alcian Blau und Kernechtrot:</p> <ol style="list-style-type: none"> I. Mit dH₂O waschen II. Alcian Blau (1 g in 100 ml 3 % Essigsäure) für 30 min. III. Mit PBS waschen IV. 30 min. Kernechtrot <p>Safranin-Orange:</p> <ol style="list-style-type: none"> I. Mit PBS waschen II. 10 min. 1 % Safranin-Orange (in dH₂O) 	<p>Safranin-Orange:</p> <ol style="list-style-type: none"> I. Mit PBS waschen II. 5 min. mit 0,1 % Safranin-Orange (in dH₂O) färben III. Fixieren mit Roti-Mount-Aqua

Tabelle 5) Vergleich der chondrogenen Differenzierungsmethoden

3.3. Dezellularisierter porciner Nasenseptumknorpel (dpNSK)

Als Scaffold wurde dezellularisierter Nasenseptumknorpel vom Schwein der Rasse Deutsches Edelschwein (*Sus scrofa domestica*) verwendet. Die Schweine waren im Durchschnitt 6-8 Monate alt und 110-130 kg schwer. Aus dem steril geernteten Knorpel wurden mittels Stanzbiopsie Zylinder mit einem Durchmesser von 5,5 mm und einer Höhe von 1,5 mm angefertigt [68].

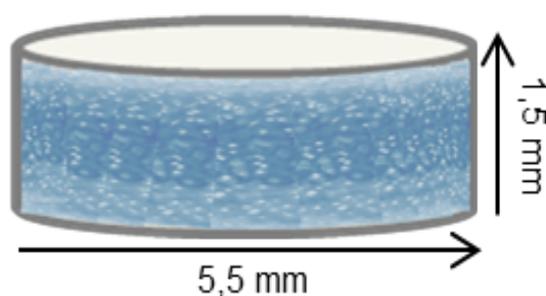


Abbildung 8) Schematische Darstellung des dpNSK.

3.3.1. Der Dezellularisierungsprozess

Der Dezellularisierungsprozess (DP) wurde in freundlicher Vorarbeit, nach patentierten Protokoll am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt [132].

Während des DP wurde der Knorpel mit Natriumhydroxid (NaOH) behandelt, um das Prion Protein Scrapie (PrPsc), das Humane Immundefizienz Virus (HIV), Hepatitis A Virus (HAV), Hepatitis B Virus (HBV), Hepatitis C Virus (HCV), sowie RNA und DNA zu zerstören. Der zusätzliche Einsatz von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gewährleistete die Inaktivierung und Entfernung von Mikroorganismen, wie Pilzen, Sporen und Hefen und war unterstützend viruzid (Herpes Simplex Virus Typ I, Respiratory-Syncytical-Virus (RSV), Vacciniavirus). Um den Gehalt an nicht kollagenen Produkten, wie GAG zu reduzieren, wurde das Scaffold zusätzlich in eine Guanidin Hydrochlorid Lösung mit Natrium Acetat Puffer für 96 Stunden inkubiert [68].

3.3.2. Der Sterilisationsprozess

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
24 Well Platte	Thermo Fisher Scientific, USA
Chemikalien	
Ethanol 99,8 %	Sigma Aldrich, USA

Um die Sterilität der Scaffolds zu gewährleisten, wurden diese vor den Experimenten erneut sterilisiert. Dafür wurde jedes Scaffold einzeln in 1 ml 70 % Ethanol für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das flüssige Ethanol entfernt und die Well Platte für 1 Stunde bei offenem Deckel unter der eingeschalteten Sicherheitswerkbank stehen gelassen, um das restliche Ethanol zu verdunsten. Die fertigen Scaffolds wurden trocken und in der Dunkelheit gelagert.

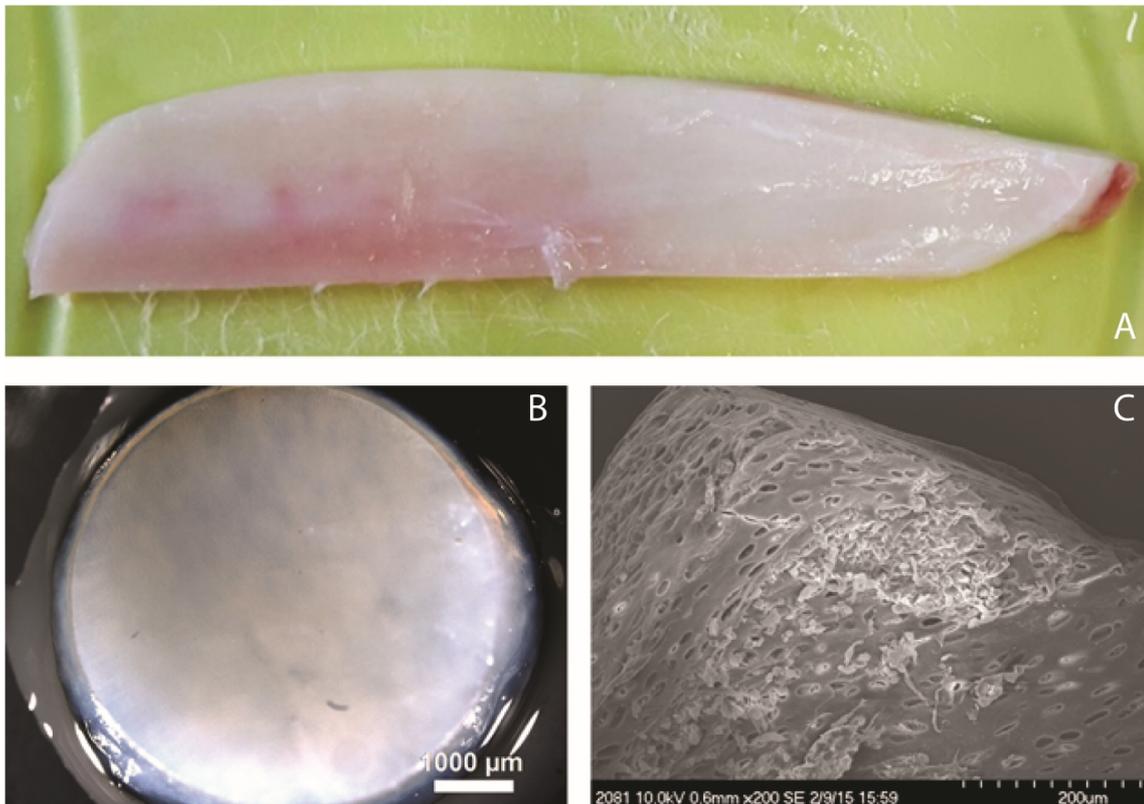


Abbildung 9) Mikroskopische und Makroskopische Darstellung von dpNSK.

A zeigt explantierten pNSK aus denen die Zylinder-großen Stanzbiopsien (B – in der mikroskopischen Darstellung) gewonnen werden. C zeigt den Knorpel nach dem DP unter dem Rasterelektronenmikroskop.

Grafik aus Kuhlmann et al. Experimental approach to nasal septal cartilage regeneration with adipose tissue derived stem cells and decellularized porcine septal cartilage; Xenotransplantation. 2021;28:e12660. Mit freundlicher Genehmigung von Blackwell-Publishing.

3.4. Die Besiedlung und Kultivierung von dpNSK

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
12-Well Platte	Thermo Fisher Scientific, USA
Einwegskalpell No. 20	FEATHER, Japan
Chemikalien	
Agarose	Biozym LE, Deutschland

Vor der Besiedlung wurden die dpNSK-Scaffolds für 2 h in Kulturmedium rehydriert. Die einzelnen Scaffolds wurden dann auf eine mit 0,27 % Agarose beschichteten 12-Well Platte überführt. Für die Versuchsreihen bei denen gezielt die verschiedenen Interaktionen zwischen den Zonen von dpNSK und ASCs untersucht werden sollten, wurden die Scaffolds mit einem Skalpell längs halbiert und mit der zu besiedelten Oberfläche nach oben in der Well-Platte platziert. Die Zellen wurden in 50 µl Medium konzentriert und direkt auf dpNSK bzw. die dpNSK-Zone pipettiert. Im Anschluss wurde das Well mit 1 ml Kulturmedium vorsichtig über den Rand befüllt.

Die Scaffolds wurden in 1 ml Kulturmedium in einer 12 Well-Platte kultiviert und bei 21 % O₂, 5 % CO₂ und 37 °C im Inkubator gelagert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

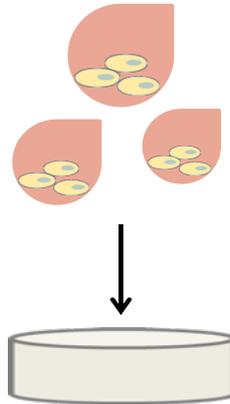


Abbildung 10) Schematische Darstellung der Besiedlung von dpNSK für Teil II.

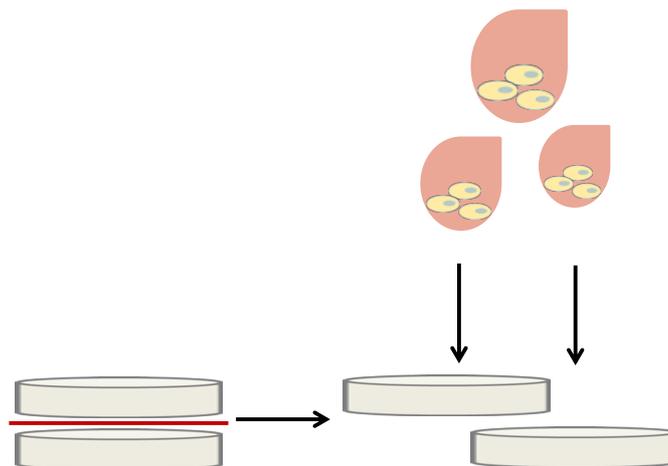


Abbildung 11) Schematische Darstellung der Besiedlung der dpNSK-Zonen für Teil III. Die Scaffolds wurden längs halbiert und die Zellen in 50 µl Kulturmedium direkt auf die zentrale oder die superfizielle Zone pipettiert.

3.5. Vitalitäts- und Proliferationsassays

3.5.1. Live-Dead Assay

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
Sieblöffel 15 mm Ø	Carl Roth, Deutschland
Chemikalien	

Propidiumiodid Lösung	Sigma Aldrich, USA
Fluorescein Diacetat	Sigma Aldrich, USA
Aceton	Merck, Deutschland

Zur Evaluation des Erfolges der Besiedlungsmethode wurden die dpNSK-Zonen mit 5×10^4 , 10^5 und $2,5 \times 10^5$ ASCs besiedelt und 4 h später im Live-Dead Assay gefärbt. Dabei wurden das zytotoxische Propidiumiodid (PI), für die Darstellung der toten Zellen und Fluorescein Diacetat (FDA) für die vitalen Zellen verwendet. PI kann nur die perforierte Zellmembran passieren und eignet sich daher sehr gut für die Identifikation von apoptotischen Zellen [140]. FDA ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher durch intrazelluläre Esterasen aktiviert wird und zur intrazellulären Akkumulation intakte Zellmembranen benötigt. Dadurch ist es ein geeigneter Marker der Zellvitalität [140,141]. Die Scaffolds wurden zuerst mit einem Sieb-Löffel für 30 Sekunden in FDA (5 mg/ml in Aceton) und anschließend für 5 Sekunden in PI getaucht. Danach wurden die Scaffolds in PBS gewaschen und anschließend unter dem Fluoreszenz Mikroskop fotografiert.

Um die Zelldistribution und Vitalität über den zeitlichen Verlauf zu beurteilen, erfolgte die Besiedlung von dpNSK mit 5×10^4 ASCs und ein Live-Dead Assay nach 1, 7 und 14 Tagen in Kultur. Als Kontrolle diente eine Monolayer-Zellkultur, für die 5×10^4 Zellen in einer 6-Well Platte ausgesät wurden.

3.5.2. AlamarBlue Assay

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
Tecan SAFIRE II	Tecan Group, Schweiz
Black-bottom 96 Well Platte	Corning, USA
Chemikalien	
alamarBlue Cell Viability Reagent	Thermo Fisher Scientific, USA

Zum Nachweis der mitochondrialen metabolischen Aktivität (MMA) der Zellen auf dem Scaffold wurde ein Resazurin basiertes alamarBlue Assay durchgeführt. Resazurin wird in den Mitochondrien der Zellen zu Resorufin reduziert. Zytotoxische Substanzen reduzieren die metabolische Aktivität und das Redoxpotential der Zellen und verlangsamen somit die Verstoffwechslung des Farbstoffes. Somit können Resazurin Assays zur Quantifizierung der Zellvitalität angewendet werden [142].

Zur Durchführung des Assays wurde dpNSK (Teil II), bzw. die dpNSK-Zonen (Teil III) mit 5×10^4 ASCs besiedelt und kultiviert. Parallel dazu wurden zum Vergleich mit einer Monolayer-Kultur 5×10^4 Zellen in 2D ausgesät. Für den alamarBlue Assay wurde das Kulturmedium für 8 Stunden mit alamarBlue Arbeitslösung (1:10 verdünnt in Kulturmedium) ersetzt. Dazu wurden die Scaffolds vorsichtig in eine frische 12 Well Plate

überführt um mögliche Messfehler durch plastik-adhärenente ASCs zu vermeiden. Anschließend wurde das AB Medium entfernt und 100 µl in Duplikaten in eine schwarze 96 Well Plate pipettiert und die Fluoreszenz Emission bei 590 nm Wellenlänge im Tecan Reader gemessen. Für die Ergebniskalkulation wurde der Blank (alamarBlue Arbeitslösung mit einem unbesiedelten Scaffold) subtrahiert.

3.5.2.1. Indirekte Ermittlung der Cell Seeding Efficiency (CSE)

Zur indirekten Ermittlung der Zahl der Zellen auf dpNSK wurden definierte Zellkonzentrationen in 2D ausgesät und die Relativen Fluorescence Units (RFU) im alamarBlue Assay nach 24 h gemessen. Anschließend wurde aus den Ergebnissen eine lineare Regressionsgerade berechnet und die in 3D gemessenen Werte nach x (Zellzahl) aufgelöst. So konnte indirekt über die Höhe der Resazurin zu Resorufin Umsetzung der Zellen in 2D, das Äquivalent der Zellen auf dem Scaffold ermittelt werden und daraus die CSE für die beiden dpNSK-Zonen berechnet werden. Die CSE gilt als Maß für den Erfolg der Scaffold-Besiedlung und errechnet sich folgendermaßen [143]:

$$CSE (\%) = \frac{\text{Zellen auf dem Scaffold}}{\text{Anzahl der ausgesäten Zellen}}$$

3.5.3. PicoGreen Assay

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
Tecan infinite 200Pro	Tecan Group, Schweiz
Tissue Lyser	Quiagen, Niederlande
7 mm Stahlkugeln	Quiagen, Niederlande
Zentrifuge (5415 C)	Eppendorf, Deutschland
2 ml Safe Seal Reaktionsgefäß	Eppendorf, Deutschland
1,5 ml Safe Seal Reaktionsgefäß	Eppendorf, Deutschland
ThermoMixer® C	Eppendorf, Deutschland
Chemikalien	
Proteinase K	AppliChem, Deutschland
EDTA 0,5 M pH 8	Invitrogen by Thermo Fisher, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) -HCL 1 M pH 7,5	Invitrogen by Thermo Fisher, USA
Quant IT PicoGreen dsDNA Reagenz	Invitrogen by Thermo Fisher, USA

Das PicoGreen Assay wurde zur quantitativen Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA (dsDNA) in den Proben durchgeführt [144]. DpNSK wurde mit 10^5 Zellen besiedelt und nach 1, 28 und 42 Tagen in Kultur geerntet. Für Teil III dieser Arbeit wurden die dpNSK-Zonen ebenfalls mit 10^5 ASCs besiedelt und nach Tag 1, 14 und 28 in Kultur geerntet.

Nach Beendigung der Zellkultur wurde das Scaffold vorsichtig mit einer sterilen Pinzette in ein 2 ml Safe-Seal Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung bei - 80 °C bis zum Beginn der Experimente. Dafür wurde 100 µl Proteinase K Arbeitslösung (50 µg/ml Proteinase K in 0,1 M K₂HPO₄) in das Reaktionsgefäß hinzugefügt und der dpNSK für 20 Minuten bei 50 Hz im Tissue Lyser mit einer 7 mm Stahlkugel homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat mit weiteren 400 µl Proteinase K Arbeitslösung aufgefüllt und für 16 Stunden bei 56 °C und 700 rpm im Thermomixer über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben für 20 Minuten bei - 20 °C gelagert um die Proteinase K Reaktion zu stoppen. Nach dem Auftauen der Proben erfolgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 6000 rpm. 75 µl Aliquots wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 225 µl TE-Puffer (10 mmol/L Tris- HCl und 1 mmol/L EDTA Puffer) hinzugegeben. 100 µl der PicoGreen Arbeitslösung wurden hinzugefügt und die Probe bei einer Extinktions-Wellenlänge von $\lambda = 504$ nm und Emissions-Wellenlänge von $\lambda = 550$ nm im Tecan Reader gemessen. Anschließend wurde der DNA Gehalt der Proben durch eine Standardkurve mit definierten Werten errechnet.

3.6. Fluoreszenz-Histologie mit DAPI und Phalloidin

Instrumente und Chemikalien	
Chemikalien	
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (D1306)	Invitrogen by Thermo Fisher, USA
Alexa Fluor™ 488 Phalloidin (A12379)	Invitrogen by Thermo Fisher, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich, USA
Fluoroshield™ Histology Mounting Medium	Sigma-Aldrich, USA

Um die Invasion der Zellen in das Innere des Scaffolds zu visualisieren wurden mit Hilfe des Kryotoms 14 µm dicke Querschnitte der Scaffolds angefertigt und diese anschließend mit den Fluoreszenzfarbstoffen DAPI und Phalloidin gefärbt. DAPI färbt die DNA im Zellkern an. Phalloidin ist eines der Toxine des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) und hat eine sehr hohe Affinität zu filamentösen Aktin. Daher eignet es sich gut für die Darstellung des Zytoskeletts.

Für diesen Versuch wurden dpNSK (Teil II) bzw. die dpNSK-Zonen (Teil III) mit 10⁵ Zellen besiedelt und nach der Kultivierung direkt mit PFA und Saccharose (siehe 3.2.3.3.) fixiert und bei - 20 °C eingefroren. Die Objektträger wurden für 5 Minuten mit PBS + 0,1 % Triton gewaschen und anschließend in DAPI in der Dunkelheit für 30 Sekunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger erneut mit PBS gewaschen und 50 µl Phalloidin (1:400 in PBS verdünnt) auf die Oberfläche der Scaffolds pipettiert. Die Objektträger wurden für 20 Minuten in eine Dunkelkammer überführt, erneut mit PBS gewaschen und mit Fluoroshield™ fixiert. Anschließend wurden die Präparate mit dem Fluoreszenz Mikroskop mikroskopiert.

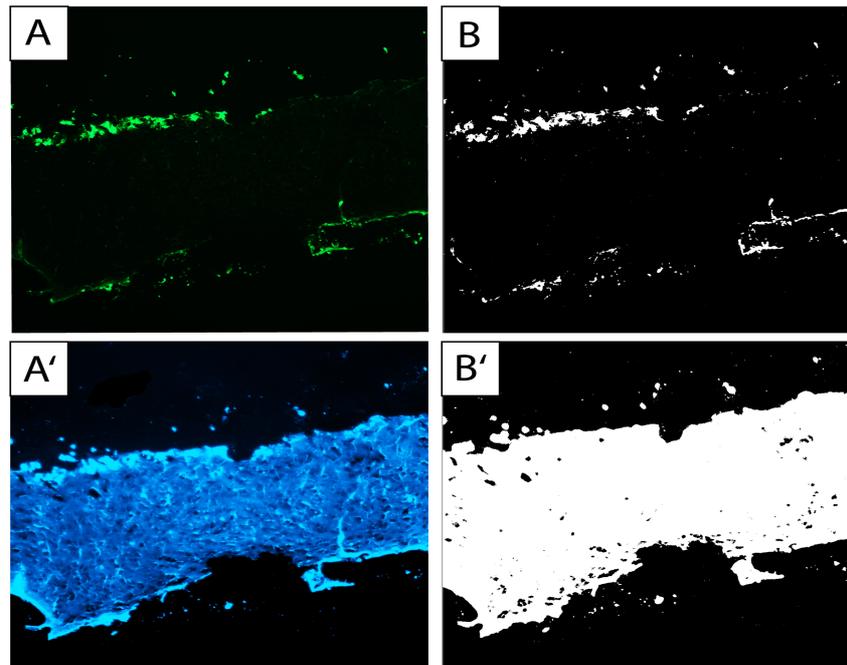


Abbildung 12) Quantifizierung der Zellinvasion in dpNSK mit der Software Image J. Der zell-besiedelte Anteil wurde mittels Phalloidin Färbung angefärbt (A) und mit Image J (B) einheitlich quantifiziert. Zur Berechnung des Gesamtquerschnittes wurde der DAPI-Channel während der Fluoreszenzmikroskopie überbelichtet (B) und die Fläche mit „Measure Stack“ (B') berechnet. Anschließend wurden die beiden Flächen zueinander ins Verhältnis gesetzt und so der prozentuale Anteil der zell-besiedelten Fläche vom Gesamtquerschnitt für die verschiedenen Messzeitpunkte ermittelt.

Für die Objektivierung der Zellinvasion wurde der Teil der Fläche, die mit Zellen besiedelt war (positiver Nachweis von Cytoskelett mit Phalloidin), mit der open-source Software Image J bei einem einheitlichen Threshold (Schwellenwert) mit dem Macro „Measure Stack“ quantifiziert. Es wurde ein minimaler Threshold von 30 und ein maximaler Threshold von 255 gewählt. Der DAPI Kanal wurde in der Software Zen (Zeiss, Deutschland) einheitlich überbelichtet, umso mithilfe der Autofluoreszenz des dpNSK dessen gesamte Querschnittsfläche analog zur Zell-besiedelten Fläche mittels „Measure Stack“ zu berechnen. Dafür wurden die folgenden Einzelschritte in in der Software Image J ausgeführt:

- 1) File → Import → Image sequence (Bild Auswahl)
- 2) Image → Properties → Unit of length μm ; Pixel width/length/depth 1.01; ✓ bei "Global"
- 3) Image → Type → 8 bit
- 4) Image → Adjust → Threshold 30-255; ✓ bei "dark background" → set
- 5) Plugins → Macros → Install → "Measure Stack"

Die beiden Flächen wurden anschließend zueinander ins Verhältnis gesetzt, um den prozentualen Anteil der von Zellen-besiedelten-Fläche an dem Gesamtquerschnitt von dpNSK zu berechnen.

3.7. Chondrogene Induktion der ASCs auf dpNSK

Die Scaffolds der Induktionsgruppe wurde nach 7 Tagen in Kultur mit dem StemMACs ChondroDiff Medium induziert. Parallel dazu wurde eine Kontrollgruppe analog in Standard-Kulturmedium kultiviert. Der Wechsel des Mediums erfolgte alle 3 Tage.

3.8.1. Dimethyl-Methylenblau (DMMB) Assay

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
Linearer Schüttler (IKA KS 130)	IKA, Deutschland
Tecan Reader Infinite M Plex	Tecan, Schweiz
Transparente 96 Well Platte	Corning, USA
Chemikalien	
Chondroitinsulfat	Carl Roth, Deutschland
Ethanol absolut 99,5 %	Merck, Deutschland
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth, Deutschland
Ameisensäure 98 %	Carl Roth, Deutschland
1,9 Dimethyl-Methylenblau (DMMB)	Sigma Aldrich, USA
Natriumformiat	Sigma Aldrich, USA
1-Propanol for analysis	Merck, Deutschland

Lösungen für das DMMB Assay	
Dekomplexierungslösung	Auflösen von Guanidinhydrochlorid (Finale Konzentration 4M) in 50 mM Natriumacetatpuffer mit 10 % Propanol (mit 0,5 M Ameisensäure auf pH 6.8 titriert)
DMMB Lösung	16 mg DMMB in 25 ml Ethanol auflösen und filtrieren; 100 ml 1M Guanidinhydrochlorid, 1 g Natriumformiat, 1 ml 98% Ameisensäure hinzufügen und dann mit dH ₂ O auf 500 ml Gesamtvolumen auffüllen.

Zur spektrophotometrischen Bestimmung des GAG-Gehaltes der Xenografts wurde ein Dimethyl-Methylenblau (DMMB) Assay nach einem Protokoll von Barbosa *et al.* durchgeführt [68,145]. Die Besiedlung für beide Teilbereiche dieser Arbeit erfolgte analog zum PicoGreen Assay (siehe 3.5.3.). Die ersten Arbeitsschritte des DMMB-Assay beinhalteten eine Proteinase K Digestion die identisch zum PicoGreen Assay durchgeführt wurde. Nach dem Auftauen der Reaktionsgefäße wurden diese für 5 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde eine Kalibrationsgerade mit definierten Chondroitinsulfat Werten erstellt. Von dem Überstand der Proben wurden 50 µl in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 500 µl DMMB Lösung hinzugefügt. Alle Proben wurden dann für 45 Minuten auf einem Schüttler, der das Drehen der Reaktionsgefäße um die eigene Achse ermöglichte, bei

600 rpm unter Lichtschutz geschüttelt. Danach wurde der Überstand mit einer 1000 µl Pipette zügig abgesaugt, sodass die entstandenen Komplexe an der Gefäßwand intakt blieben. Den Proben wurde schließlich 500 µl Dekomplexierungslösung hinzugeben und die Komplexe unter starkem Schütteln (1300 rpm für 3 Minuten) von der Wand des Reaktionsgefäßes gelöst. Anschließend wurde die Konzentration der Proben photospektrometrisch bei 656 nm Wellenlänge bestimmt und der GAG Gehalt anhand der Kalibrationsgerade ermittelt. Die GAG-Konzentration wurde aus GAG-Gehalt/Scaffold-Nassgewicht berechnet und die GAG-Konzentration eines leeren Scaffolds subtrahiert (= Δ GAG).

3.8.2. Histologie: Alcian Blau und Kernechtrot Färbung

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
Mikroskop	Mikroskop Axiovert S100, Zeiss, Germany
Chemikalien	
Alcian Blau	Carl Roth, Deutschland
Essigsäure Absolut	Merck, Deutschland
Kernechtrot	Carl Roth, Deutschland

Die chondrogene Differenzierung von ASCs soll im Idealfall zu der Formation einer typischen chondrogenen Extrazellulärmatrix führen. Charakteristisch für die chondrogene Matrix ist das Proteoglykan Aggrecan. Alcian Blau färbt Aggrecan bei niedrigem pH-Wert (< 2,5) cyan-blau [38]. Daher kann die Alcian Blau Färbung als Indikator für eine chondrogene Differenzierung eingesetzt werden. Die Herstellung der 14 µm Gefrierschnitte erfolgte wie in 3.4.3.3. beschrieben.

Für die Färbung wurden die Objektträger erst bei 37 °C im Inkubator aufgetaut und anschließend in dH₂O hydriert. Dann wurden die Slides für 3 Minuten in 3 % Essigsäure und anschließend für 30 Minuten bei RT in Alcian Blau Lösung (1 % Alcian Blau in 3 % Essigsäure) gelegt. Danach wurde für 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Als nächstes wurden die Proben wieder kurz durch dH₂O geronnen und für 5 Minuten mit Kernechtrot gefärbt. Als Letztes wurde wieder mit fließendem Leitungswasser gewaschen und die Slides mit einem Objektträger Deckel fixiert und direkt unter Durchlicht mikroskopiert.

3.8.3. Genexpression

Die quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (qPCR) ist eine Methode der Molekularbiologie, die als Verfielfältigungsmethode von Nukleinsäuren auf dem Prinzip der klassischen PCR basiert und zusätzlich die Quantifizierung der DNA in Echtzeit ermöglicht [146,147].

Für die Versuchsreihe wurden die dpNSK-Zonen gezielt mit $2,5 \times 10^5$ Zellen besiedelt und die quantitative Expression der in Tabelle 6 (s.u.) dargestellten Gene nach 28 Tagen in Kultur ausgewertet. Kurz zusammengefasst erfolgte dafür zuerst die Extraktion der RNA aus den ASCs. Die isolierte RNA wurde anschließend mittels einer Reversen Transkriptase in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA wird im Anschluss als Ausgangsprodukt für die PCR verwendet. Die molekularbiologischen Einzelschritte sind im folgenden ausführlich dargestellt:

3.8.3.1. RNA Extraktion

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
Tissue Lyser LT	Quiagen, Die Niederlande
7 mm Stahlkugel	Quiagen, Die Niederlande
Zentrifuge (5415 C)	Eppendorf, Deutschland
NanoDrop Lite	Thermo Fisher Scientific, USA
RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit	Quiagen, Die Niederlande
DNA LoBind Tubes, 1,5 ml	Eppendorf, Deutschland
Chemikalien	
Quizol	Quiagen, Die Niederlande
Chloroform	Sigma Aldrich, USA

Nach 28 Tagen in der Zellkultur wurden die Scaffolds vorsichtig in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu Beginn der RNA Extraktion wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

Die Isolation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit der Firma Quiagen [148]. QIAzol ist eine Variante des Stoffes Trizol, der Guanidiniumthiocyanat beinhaltet, der gleichzeitig RNasen inaktiviert und die Lyse der Zellen fördert. Dieses Protokoll ist an die Single Step Isolationsmethode nach Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi angelehnt [149].

Zum Start jeder Isolation wurde eine sterile 7 mm Stahlkugel und 1 ml QIAzol in jedes Reaktionsgefäß hinzugefügt und die Proben 3 x 2 Minuten bei 50 Hz lysiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 5 Minuten bei RT auf der Sicherheitswerkbank stehen gelassen, um die Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu fördern. Dann wurde die Suspension in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 200 μl Chloroform hinzugefügt. Die Homogenisate wurden für 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt und danach wieder für 3 Minuten auf der Sicherheitswerkbank stehen gelassen. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugierung bildeten sich pro Probe 3 Phasen: Oben, eine farblose, wässrige Phase die die RNA beinhaltet. In der Mitte eine weißliche Interphase mit der DNA und unten eine rote, organische Phase mit den Proteinen (Abb. 13). Die wässrige Phase (ca. 600 μl) wurde vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit derselben Menge 70 % Ethanol aufgefüllt und gründlich gevortext. Im nächsten Schritt

wurden 700 µl der Probe in die Säulen des RNEasy Lipid Tissue Mini Kit überführt und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Prozedere mit der restlichen Probe wiederholt. Anschließend wurden die Arbeitsschritte des RNeasy® Lipid Tissue Mini Kits, inklusive der DNA Verdauung genau befolgt und die RNA am Ende in 40 µl RNA freiem Wasser gewonnen.

Die RNA Konzentration und der Verunreinigungsgrad wurde mittels eines NanoDrop Messgerätes spektralphotometrisch ermittelt. Zur Qualitätsanalyse wurde der Quotient aus OD 260 und OD 280 verwendet, der die Verunreinigung der Probe mit genomischer DNA oder Proteinen anzeigt.

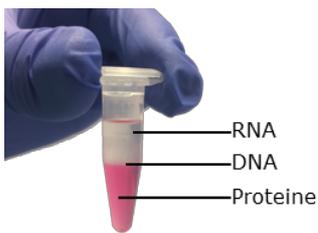


Abbildung 13) Auftrennung der Phasen nach der QIAzol und Chloroform Anwendung.

3.8.3.2. Herstellung der cDNA

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
TProfessional Basic Thermocycler	Biometra, Deutschland
PCR 8er SoftStrips 0,2 ml	Biozym, Deutschland
Eppendorf Xplorer® Elektronische Pipette	Eppendorf, Deutschland
Chemikalien	
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Hoffmann La-Roche, Schweiz
RNase AWAY®	Merck, Deutschland

Für die Synthese der cDNA wurde der Arbeitsplatz vorher gründlich mit RNase AWAY® gereinigt. Die cDNA Synthese erfolgte nach dem Protokoll des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Roche (Manual Version 7, Seite 12: *“Procedure B: cDNA Synthesis with anchored-oligo(dT)₁₈ primer and random hexamer primer”*).

Zuerst wurden die Proben und Reagenzien des cDNA Synthese Kits bei RT aufgetaut, gründlich gevortext, zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Dann wurde der Template-Primer Mix für die erste Reaktion gemäß der Angaben des Herstellers vorbereitet. Zur Minimierung der Evaporation erfolgte die Denaturierung des Template Primer Mix für 10 Minuten bei 65 °C im Thermocycler und die sofortige Kühlung der Proben auf Eis. Anschließend wurde der Reverse Transkriptase-Mix hinzugefügt.

Die Reaktionsgefäße wurden kurz zentrifugiert und die Probe am Boden des Gefäßes gesammelt und in dem Thermocycler nach dem folgenden Programm inkubiert: 10 min.

bei 65 °C, 10 min. bei 4 °C, 10 min. bei 25 °C, 60 min. bei 50 °C, 5 min. bei 85 °C und 30 min. bei 4 °C. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und bei - 20 °C bis zum Beginn der PCR gelagert.

3.8.3.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Instrumente und Chemikalien	
Instrumente	
qTower3 G Touch	Analytik Jena, Deutschland
Realtime-PCR-Platte 96 Well	VWR International, USA
Optically Clear Adhesive Seal Sheets	Thermo Scientific, USA
SafeSeal-Tips 2,5µl für qPCR	Biozym, Deutschland
Chemikalien	
Primer (alle)	Eurofins Genomics, Deutschland
innuMIX qPCR DSGreen Standard qPCR Kit	Analytik Jena, Deutschland

Gen	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer	Länge	RefSeq
ACAN	cctccccttcacgtgtaaaa	gctccgcttctgtagtctgc	64	NM_001135.3
COL10A1	caccttctgactgctcatc	ggcagcatattctcagatgga	104	NM_000493.3
COL1A1	ggattccctggacctaag	ggaacacctcgctctcca	63	NM_000088.3
COL2A1	gtgaacctggtgtctctggtc	tttccaggttttccagcttc	94	NM_001844.4
HPRT1	tgaccttgattatttgcatacc	cgagcaagacgttcagtctc	102	NM_000194.3
ITGA10	cttttctcgcacgtggt	gctccattccagtcataggc	70	NM_001004439.1
ITGA11	cttttctcgcacgtggt	gctccattccagtcataggc	69	NM_001004439.1
MKI67	ccaacaaaagaaagtctctgg	tgatggttgaggctgttctc	78	NM_001145966.1
MMP13	ccagtctccaggagaaaca	aaaaacagctccgcatcaac	85	NM_002427.3
PPARG	tgacaggaaagacaacagacaaa	gaggactcagggtggttcag	126	NM_001330615.1
SOX9	gtaccgcacttgacaac	tctcgtctcgttcagaagtc	74	NM_000346.3

Tabelle 6) Übersicht der Primer für die qPCR.

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des qPCR Kits der Firma Analytik Jena [150]. Für die PCR wurden die cDNA Proben und die Reagenzien des qPCR Kits bei RT aufgetaut und kurz gevortext. Die Reagenzien wurden nach dem folgenden Schema gemäß Herstellerangaben pipettiert:

Reagenz	Volumen
2x innuMIX qPCR DSGreen Standard	10 µl
Vorwärts Primer	1 µl (0,4 µM)
Rückwärts Primer	1 µl (0,4 µM)
H ₂ O	3 µl (15 µM)
cDNA Probe	5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Anschließend wurde die PCR nach den folgenden Einstellungen im qTower durchgeführt:

Runde	Zyklen	Profil	Temperatur (°C)	Retentionszeit (sek.)
1	1	Initiale Denaturierung	95	120
2	40	Denaturierung	95	30
		Annealing und Detektion	60	60

HPRT1 wurde als Housekeeping-Gene (HKG) verwendet. H₂O diente als Negativkontrolle. Zur Auswertung wurde die relative Genexpression berechnet und somit die Expression eines Zielgenes mit der eines nicht regulierten und ubiquitären HKG normalisiert ($\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{HKG}}$). Cycle threshold (Ct) Werte entsprechen der Anzahl der nötigen PCR Zyklen, die erforderlich sind, um ein konstantes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am Ct befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA [151]. Anschließend erfolgte die Berechnung von $\Delta\Delta Ct$ durch Abzug des ΔCt der Kontrollgruppe ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Behandlung}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$). Der relative Unterschied in der Expression einer Probe (Fold Change) ergibt sich dann aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [147,151].

3.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Diagramme erfolgte mit dem Programm GraphPrad Prism 8.1.1. für Mac (Kalifornien, USA). Die qPCR wurde in Duplikaten durchgeführt, ansonsten wurden alle Versuchsreihen in Triplikaten umgesetzt. Bei den Ergebnissen erfolgte die Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung (SD). Ein p -Wert von 0,05 und niedriger wurde als statistisch signifikant angesehen. Ein p -Wert von 0,01 und niedriger wurde als statistisch sehr signifikant und ein p -Wert von 0,001 und niedriger als statistisch hoch signifikant angesehen.

Nach der Testung auf die Normalverteilung mit einem Shapiro-Wilk-Test, erfolgte entweder ein Mann-Whitney-U (keine Gauß'sche Verteilung) oder ein ungepaarter t -test (Gauß'sche Verteilung). Ergänzend wurde bei zwei oder mehr Gruppenvariablen eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Bei signifikanten Ergebnissen wurde ein Šidák-Test als Post-hoc Verfahren verwendet.

3.10. Erstellung der Grafiken

Die Erstellung der Grafiken erfolgte mit Adobe Illustrator 2020, einem Programm der Creative Cloud von Adobe Inc. (USA) und Microsoft PowerPoint (Microsoft Corporation, USA).

4. Ergebnisse

4.1. Teil I: Nachweis der Stammzellidentität

Nach der Isolation der Zellen aus den Lipoaspiraten der Patienten und mehreren Tagen in einer Monolayer-Zellkultur zeigte sich der typische plastik-adhärenente und spindelförmige fibroblastenartige Phänotyp der ASCs (Abb. 14). Es folgte ein CFU-Assay um das klonogene Potential der Zellen zu demonstrieren und die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung zum Nachweis der Multipotenz. Ergänzend wurden die ASC-typischen Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie bestimmt, um so eine Aussage über die Homogenität der isolierten Zellpopulation treffen zu können.

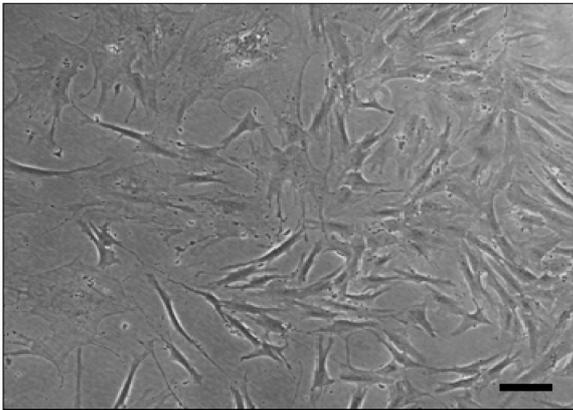


Abbildung 14) Plastik-adhärenente ASCs in Passage 1. (Balken = 200 μm).

4.1.1. Klonogenes Potential

Im CFU-Assay konnte demonstriert werden, dass die Zellen in der Lage sind Kolonien zu bilden und sich selber zu erneuern ($n = 3$). Durchschnittlich lag die Zahl der gebildeten Kolonien bei $60,3 (\pm 8,5 \text{ SD})$. Die durchschnittliche CFU-Effizienz lag somit bei $10,06 \% (\pm 1,3 \text{ SD})$.

4.1.2. Bestimmung der Oberflächenmarker (FACS)

Die isolierten Zellen zeigten eine homogene Expression der primär positiven (CD29, CD105, CD44, CD13 und CD90) und primär negativen (CD45, CD235a und CD31) ASC-Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie (Abb. 15). Somit präsentierte die isolierte Zellpopulation ein typisches homogenes Oberflächenmarkerprofil von ASCs [107].

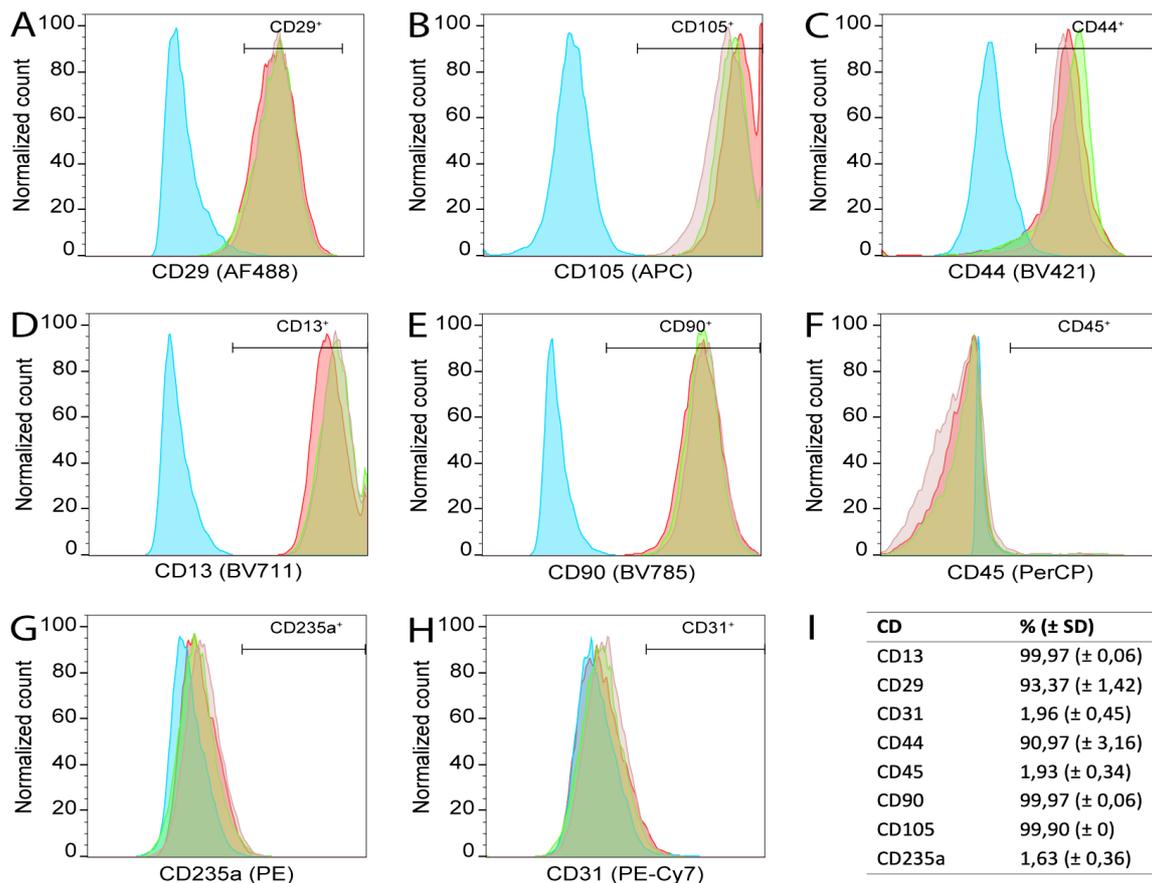


Abbildung 15) Analyse der Oberflächenmarker der ASCs in der Durchflusszytometrie.

Über 90 % der Zellen exprimierten die primär positiven Oberflächenmarker (A-E) von ASCs. Die primär negativen Marker CD90, CD45 und CD235a wurden von weniger als 2 % der Zellen exprimiert (F-H). Dies deutet auf einen hohen Grad an Homogenität der isolierten Zellpopulation hin. Jedes Histogramm enthält eine negative Isotypen-spezifische Antikörper Kontrolle (blau) und Zellen von drei Spendern (rot = D1, grün = D4, violett = D7). Die Tabelle (I) zeigt den prozentuale Anteil (\pm SD) der positiv gefärbten Zellen für den untersuchten Cluster of Differentiation (CD) Antikörper (n = 3).

4.1.3. Multipotenz der ASCs

Zur Demonstration der Multipotenz von ASCs erfolgte die trilineare Differenzierung in die drei klassischen mesenchymalen Gewebe und die anschließende gewebespezifische Färbung.

Bei der adipogenen Differenzierung konnte in der Induktionsgruppe eine deutliche Entwicklung von intrazellulären Lipidvakuolen nach 21 Tagen unter adipogenem Stimulationsmedium beobachtet werden. Hier fand sich in der Quantifizierung ein statistisch hoch signifikanter Unterschied ($p = 0,0007$) zur Kontrollgruppe. Unter der Stimulation mit osteogenem Induktionsmedium konnten nach 21 Tagen in der Alizarin Rot Färbung deutliche Mineralablagerungen dargestellt werden. Die Kontrollgruppe unter dem Einfluss von normalem Zellkulturmedium zeigte keine solcher Ablagerungen ($p = 0,0079$). Die chondrogene Differenzierung in der 3D Pellet-Kultur zeigte deutliche

Effekte der Wachstumsfaktoren TGF- β 3 und BMP-6. In der Induktionsgruppe stellten sich deutlich Safranin Orange positive Areale im Pellet ein. Durchschnittlich waren 70,6 % (\pm 1,2 SD) des Pellet Gesamtquerschnittes der Induktionsgruppe positiv für Safranin Orange, das PG orangefarben einfärbt, der Unterschied zur Kontrollgruppe war ebenfalls statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$).

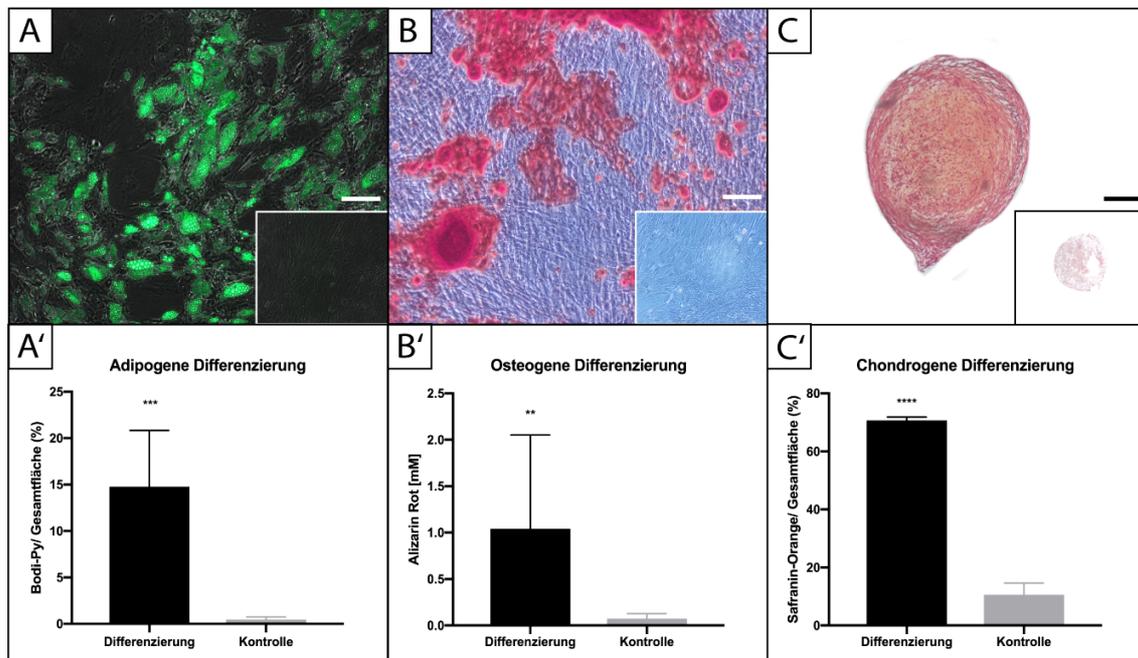


Abbildung 16) Nachweis der Multipotenz von ASCs.

Repräsentative Bilder der adipogenen (BODI-PY) (A), osteogenen (Alizarin Rot) (B) und chondrogenen Differenzierungs- (Safranin Orange) (C) und Kontrollgruppe (A-C unten rechts) in der jeweiligen gewebespezifischeren Färbung (in Klammern). Die Quantifizierung (A'-C') der Ergebnisse zeigte für alle Differenzierungen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen (Balken = 200 μ m) ($n = 5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Mittelwert \pm SD).

4.1.3.1. Chondrogene Differenzierung in einer Monolayer Zellkultur

Ergänzend zu der 3D-Pellet Kultur (Abb. 16) erfolgte als Vorversuch für die Scaffold-Kultur die chondrogene Differenzierung der ASCs im Monolayer. Die Induktion erfolgte mit einem kommerziell erhältlichem chondrogenem Nährmedium über den Verlauf von 21 Tagen. In den knorpel-spezifischen Färbungen zeigte sich ein deutlicher Effekt des Differenzierungsmediums in der Induktionsgruppe (Abb. 17).

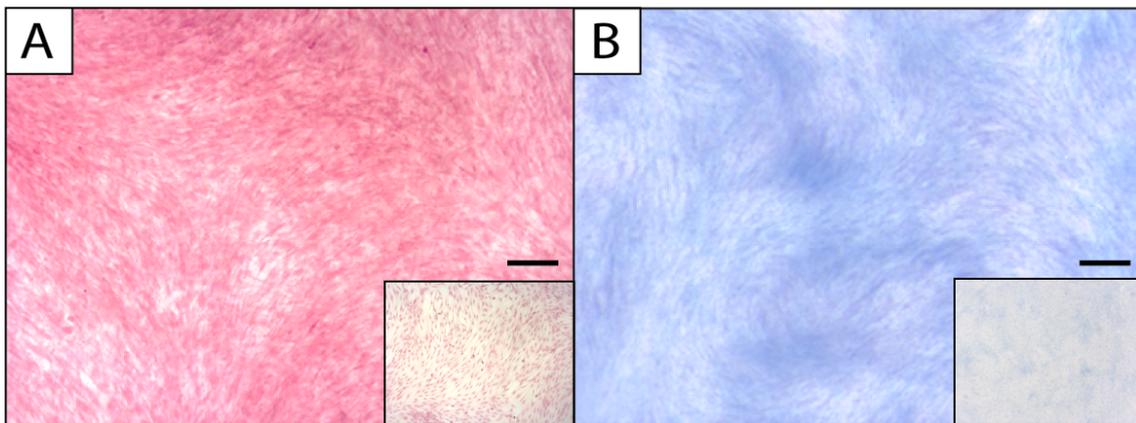


Abbildung 17) Chondrogene Differenzierung von ASCs in der Monolayer-Kultur. Mikroskopisch und makroskopisch zeigte sich eine intensivere Farbstoffaufnahme der Zellen der Differenzierungs- (A) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (jeweils unten rechts) in der Safranin-Orange Färbung (A) und Alcian Blau + Kernechtrot Färbung (B) (Balken = 200 µm) (n = 3).

4.2. Teil II: *In vitro* Evaluation von dpNSK und ASCs als potentiell Knorpelersatzmaterial

4.2.1. Rezellularisierung, Vitalität und Proliferation von ASCs auf dpNSK

Nach der Rezellularisierung von dpNSK mit ASCs wurde der Erfolg und die Zelladhärenz mit einer fluoreszenzmikroskopischen Live-Dead Färbung evaluiert. Hier zeigten sich die Zellen vital und auf der Oberfläche von dpNSK adhärenz. Zur längerfristigen Beurteilung der ASC Vitalität und Identifikation möglicher zytotoxischer Effekte wurde die Live-Dead Färbung ergänzend an den Tagen 7 und 14 durchgeführt. Hier zeigten sich kontinuierlich vitale ASCs auf dpNSK und eine quantitative Zunahme der Zellkonfluenz über den Verlauf der Beobachtungsperiode. Die Distribution und Vitalität der Zellen in der 3D-Kultur war vergleichbar mit der parallel durchgeführten Monolayer (2D) Kontrolle. In beiden Kultursystemen waren apoptotische Zellen nur vereinzelt sichtbar. Parallel dazu konnte eine zeitliche Zunahme der relativen MMA der ASCs auf dpNSK und im Monolayer durch das Resazurin basierte alamarBlue Assay gemessen werden. Hierdurch sind Rückschlüsse auf die Vitalität und Proliferation der ASCs auf dpNSK möglich und toxische Effekte als unwahrscheinlich einzustufen.

Zur Quantifizierung der Zellproliferation erfolgte die Bestimmung des DNA-Gehaltes auf dpNSK nach 1,28 und 42 Tagen in Kultur mit dem dsDNA-Quantifizierungsassay PicoGreen. Hier zeigte sich eine zeitliche Zunahme des absoluten Zell-DNA-Gehaltes in ng auf dem Scaffold.

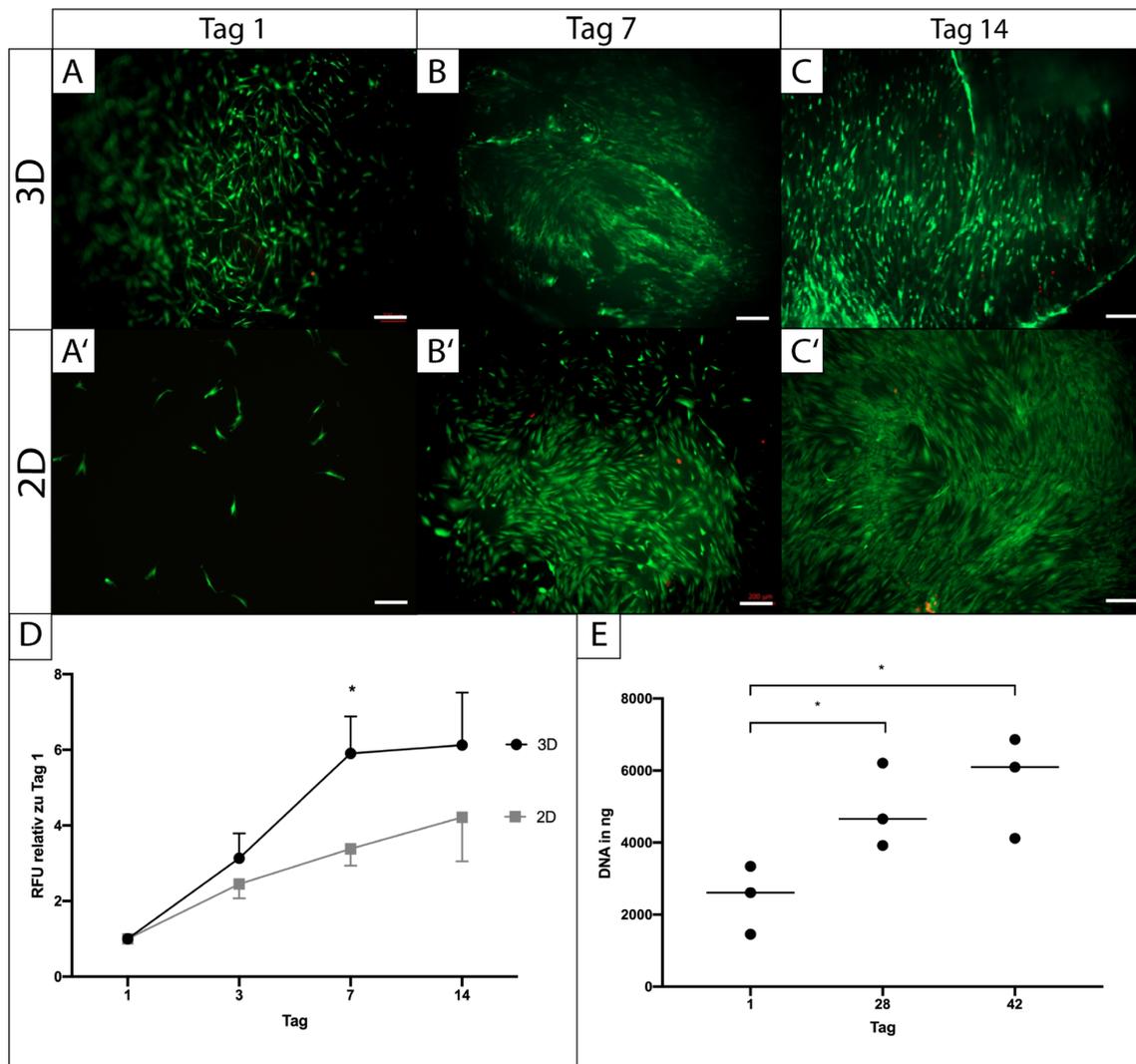


Abbildung 18) Rezellularisierung und Proliferation von ASCs auf dpNSK.

Live-Dead Assay der ASCs auf dpNSK (A-C) und in der Monolayer Kontrolle (A'-C') (Balken = 200 μm) (n = 3). Das alamarBlue Assay (D) zeigte die Resazurin Metabolisierung (in RFU) der ASCs über den Verlauf von 14 Tagen auf dpNSK (3D) und in 2D in Relation zu Tag 1 (n = 5). Im PicoGreen Assay (E) wurde der Gehalt an Zell-DNA (in ng) in dpNSK nach 1, 28 und 42 Tagen bestimmt (n = 3; * $p < 0,05$; Mittelwert \pm SD).

4.2.2. Zellinvasion von dpNSK

Zur genaueren Visualisierung der Zelldistribution und -invasion von dpNSK wurden histologische Querschnitte erstellt und mittels Fluoreszenzfärbung (DAPI/ Phalloidin) nach 1, 7, 14 und 28 Tagen in Kultur analysiert (Abb. 19).

Die Histologie zeigte eine marginale ASC-Invasion von dpNSK. Die Zellen wuchsen um das Scaffold herum und okkupierten initial nicht besiedelte Oberflächen. Die Infiltration von tieferen Ebenen des dpNSK fand nur vereinzelt statt. Der Großteil der Zellen verblieb an der Scaffold-Oberfläche oder in der superfiziellen Zone. Zudem kam es hier zu einer Bildung von dreidimensionalen Zellhaufen (siehe 4.3.3.).

Zur Quantifizierung der Zellinvasion wurde der prozentuale Gehalt der Phalloidin positiven Fläche von dem Gesamtquerschnitt berechnet. Der Anteil der von Zellen okkupierten Areale am Gesamtquerschnitt von dpNSK nahm über die Zeit statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$) zu. Nach 28 Tagen in Kultur waren 20,84 % ($\pm 2,85$ SD) des Gesamtquerschnittes von dpNSK mit ASCs besiedelt.

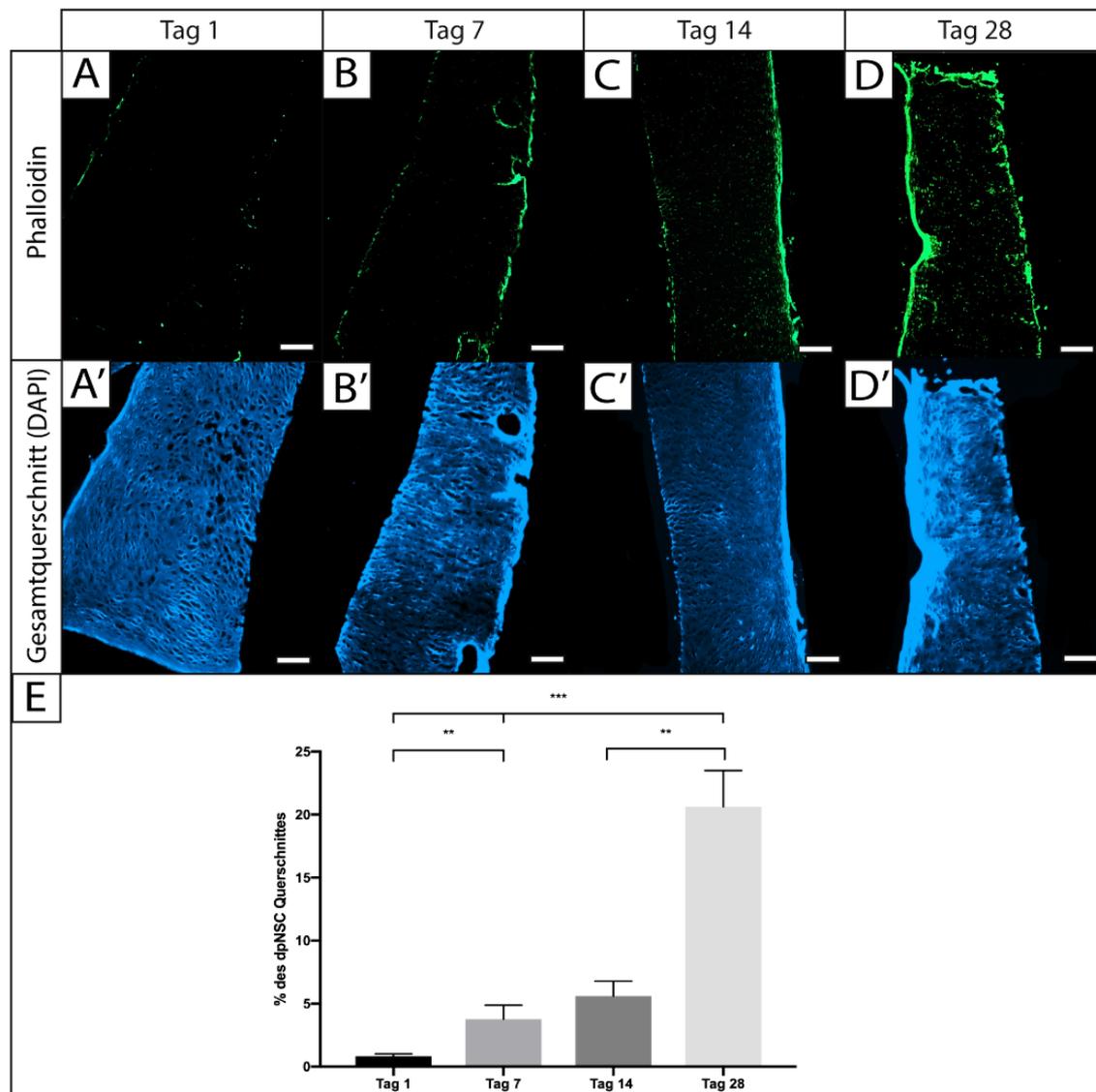


Abbildung 19) Darstellung der Zellinvasion mittels Fluoreszenzfärbung.

Die Phalloidin Färbung bindet an das Aktin-Skelett der ASCs und färbt dieses leuchtend grün an (A-D). Der DAPI-Chanel wurde standardisiert überbelichtet um den Gesamtquerschnitt von dpNSK zu berechnen (A'-D'). Anschließend wurde der Anteil der Phalloidin positiven Fläche ins prozentuale Verhältnis des Gesamtquerschnittes gesetzt, um so die Zellinvasion zu berechnen (E). Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede der von ASCs okkupierten Fläche zwischen Tag 1 (A) und Tag (7) ($p = 0,0097$), sowie Tag 14 (C) und Tag 28 (D) ($p = 0,0011$). Zudem fand sich übergreifend ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen Tag 1 und Tag 28 ($p = 0,0031$). ($n = 3$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mittelwert \pm SD).

4.2.3. Bildung einer knorpeltypischen Matrix von ASCs auf dpNSK

Proteoglykane wie Aggrecan und sGAG (u.a. Chondroitin Sulfat) sind neben Kollagen Typ II die Hauptbestandteile von Knorpel-EZM. Durch den DP des dpNSK wird der Anteil der sGAG signifikant reduziert [59,137]. Ein Anstieg der sGAG Konzentration innerhalb des Scaffolds kann als Produktion einer knorpeltypischen Matrix der ASCs gewertet werden. Zu diesem Zweck wurde das Scaffold lysiert und der sGAG Gehalt in μg im DMMB-Assay zu verschiedenen Messzeitpunkten quantifiziert. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und Induktionsgruppe nach 28 ($p = 0,022$) und 42 Tagen ($p = 0,003$) in der 3D-Kultur. Unter der Stimulation mit chondrogenen Wachstumsfaktoren kam es zudem zu einer zeitlich signifikanten ($p = 0,033$) Zunahme der sGAG-Konzentration in der Induktionsgruppe. In der Kontrollgruppe zeigte sich keine zeitliche Dynamik der sGAG Konzentration.

Die Alcian Blau Färbung, die GAG cyan blau anfärbt wurde an denselben Messzeitpunkten durchgeführt. Unter dem Einfluss von chondrogenen Induktionsmedium kam es zu der Bildung eines stabilen und Farbstoff-positiven Zellrasens auf der dpNSK Oberfläche (Abb. 20).

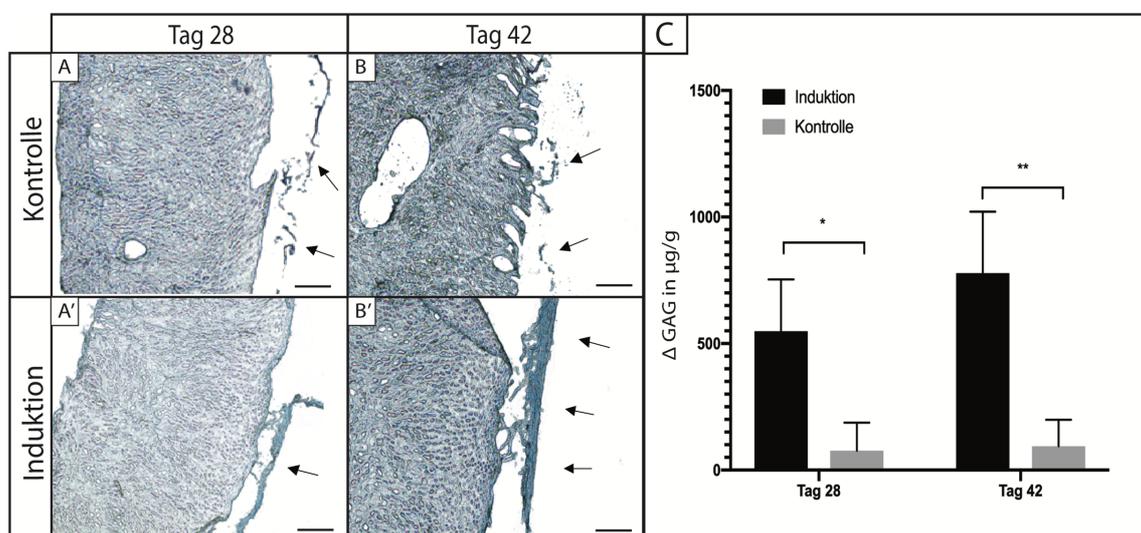


Abbildung 20) GAG-Produktion auf dem Scaffold.

Nach 28 und 42 Tagen in Kultur erfolgte die Färbung der GAG mit Alcian Blau (A-B) (Balken = 200 μm). Hier zeigte sich die Bildung eines stabilen Zellrasens an der Scaffold Oberfläche in der Induktionsgruppe (A'-B') (Pfeile). Dieser nahm den Farbstoff zudem deutlicher auf als die Kontrollgruppe (A-B), bei der sich nur vereinzelte und instabile Zellansammlungen auf der Oberfläche darstellten. ($n = 3$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Mittelwert \pm SD).

4.3. Teil III: Einfluss der EZM-Zonen auf das Zellschicksal von ASCs

4.3.1. Rezellularisierung der verschiedenen dpNSK-Zonen

Für den dritten Teil dieser Arbeit wurde das Scaffold längs halbiert und die zentrale und superfizielle Zone von dpNSK mit einer statischen Besiedlungsmethode durch gezielte Oberflächen-Besiedlung mit verschiedenen Zellkonzentrationen rezellularisiert. Zur Kontrolle der gezielten Rezellularisierung wurde ein Live-Dead Assay nach 4 h durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopische Evaluation der verschiedenen histologischen Zonen zeigte, dass die Vitalität, Adhärenz und Distribution der Zellen weder von der EZM-Zone noch von der verwendeten Zellkonzentrationen beeinflusst wurden (Abb. 21).

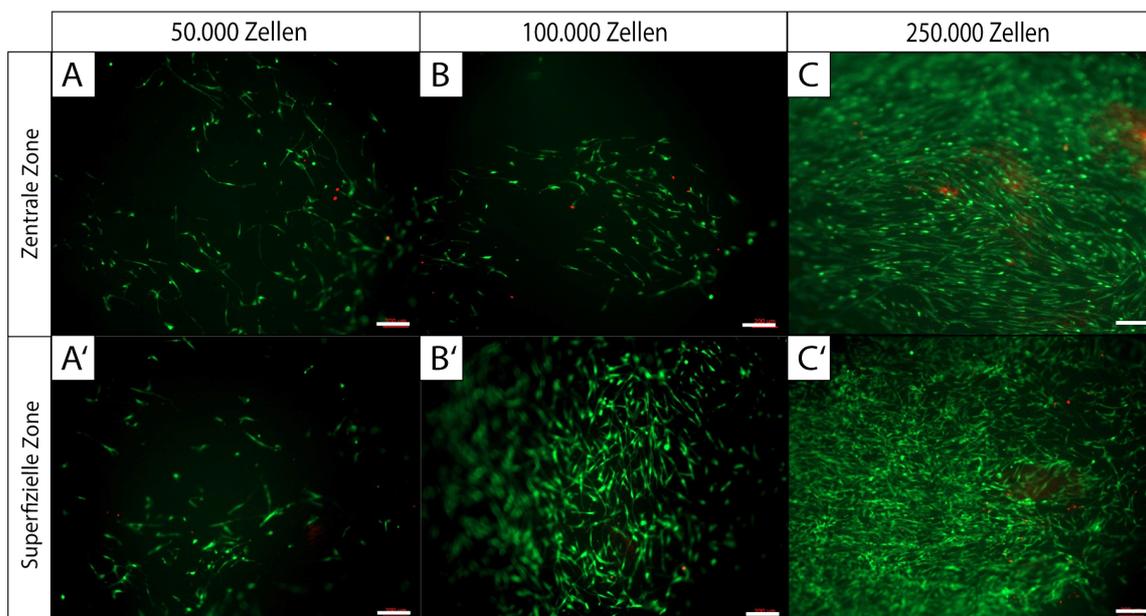


Abbildung 21) Besiedlung der superfiziellen und zentralen Zone.

Die Zellvitalität und Distribution auf der zentralen Zone (A-C) war vergleichbar mit der auf der superfiziellen Zone (A'-C') und wurde nicht durch die verwendeten Zellkonzentrationen beeinflusst. Die vitalen Zellen wurden durch die Fluoreszenz-Färbung mit FDA in Grün dargestellt, während die apoptotischen Zellen durch PI in Rot visualisiert wurden (Balken = 200 µm) (n = 3).

4.3.1.1. Ermittlung der Cell Seeding Efficiency (CSE) für die dpNSK-Zonen

Die CSE für die beiden dpNSK-Zonen unterschied sich statistisch nicht signifikant. ($p = 0,511$) errechnete CSE für die zentrale Zone von dpNSK betrug 50,49 % ($\pm 18,7$ SD) und für die superfizielle Zone 39,93 % ($\pm 28,3$ SD). Somit kann von einer vergleichbaren Ausgangssituation für die folgenden Experimente ausgegangen werden.

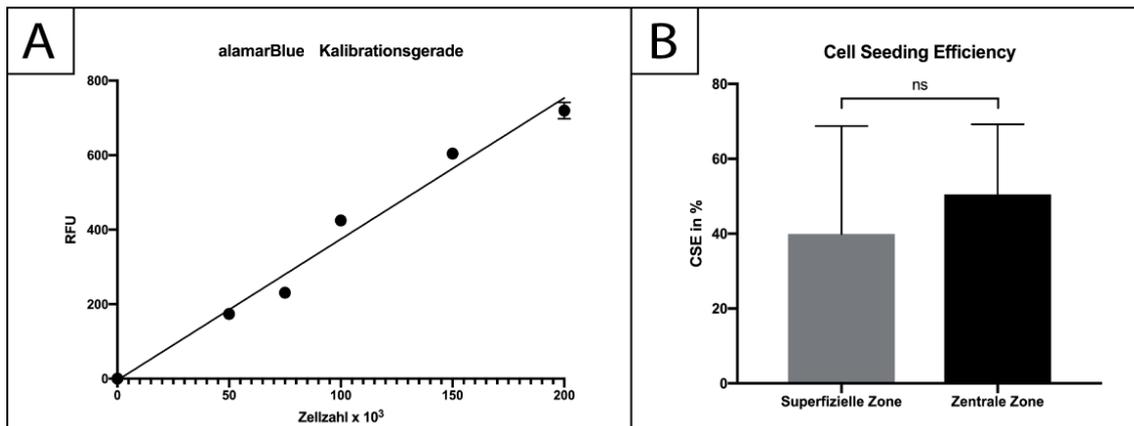


Abbildung 22) Berechnung der CSE für die dpNSK-Zonen.

Die CSE für die beiden Scaffold-Zonen wurde indirekt durch eine Kalibrationsgerade ($r^2 = 0,977$) aus der RFU aus dem alamarBlue Assay von definierten ASC-Konzentrationen in einer Monolayer Kultur berechnet (A). Der Unterschied zwischen der CSE der superfiziellen und der zentralen Zone von dpNSK (B) war statistisch nicht signifikant (ns) ($n = 5$; Mittelwert \pm SD).

4.3.2. Einfluss der dpNSK-Zone auf die ASC Vitalität und Proliferation

Analog zu Teil II erfolgte die Evaluierung der Zellvitalität und -proliferation auf den verschiedenen dpNSK-Zonen mittels alamarBlue und PicoGreen Assays.

Das Vitalitätsassay zeigte einen relativen Anstieg der MMA der ASCs auf beiden Zonen während der Beobachtungsperiode. Die metabolische Aktivität der Zellen auf der superfiziellen und der zentralen Zone unterschied sich statistisch nicht signifikant. Tendenziell war die Resazurin Umsetzung bei den ASCs die auf der superfiziellen Zone von dpNSK kultiviert wurden größer.

Im PicoGreen Assay zeigte einen relativen Anstieg der ASC-DNA auf beiden dpNSK-Zonen über den Faktor Zeit. An den Tagen 14 ($p = 0,0481$) und 28 ($p = 0,0297$) war der relative DNA-Gehalt auf der superfiziellen Zone größer als auf der zentralen Zone von dpNSK.

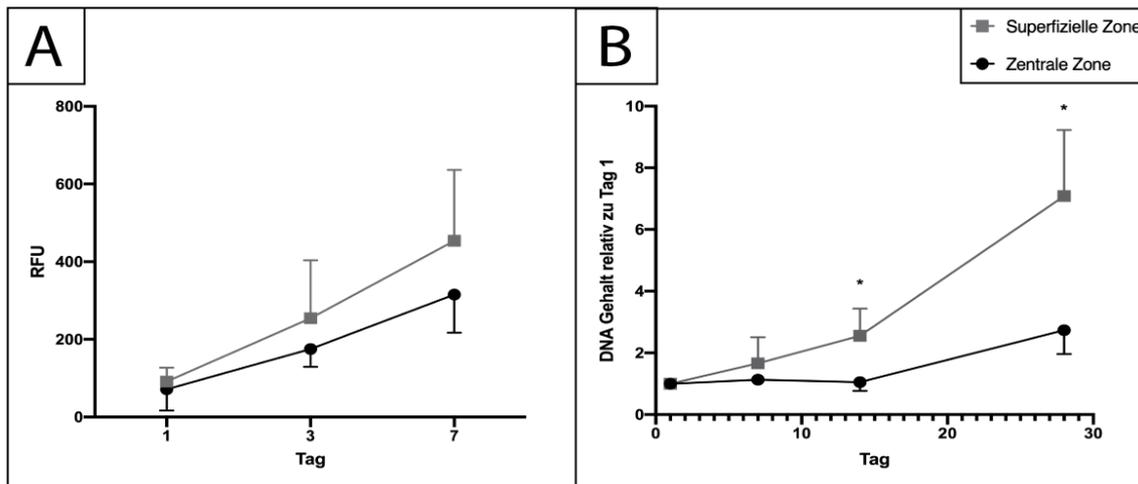


Abbildung 23) Einfluss der dpNSK Zone auf die Zellvitalität und -proliferation. Das alamarBlue Assay (A) zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den RFUs der ASCs auf der superfiziellen und der zentralen Zone von dpNSK (n = 5). Auf der superfiziellen Zone von dpNSK war die Zell-DNA (PicoGreen Assay – B) an Tag 14 und 28 statistisch signifikant größer als auf der zentralen Zone (n = 3; * $p < 0,05$; Mittelwert \pm SD).

4.3.3. Einfluss der dpNSK-Zone auf die Zellinvasion

Ausgehend von den besiedelten Oberflächen wurde die ASC-Invasion in tiefere Schichten fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Dafür wurden nach 28 Tagen in Kultur histologische Querschnitte angefertigt und mit DAPI und Phalloidin gefärbt.

Analog zu 4.2.2. konnte bei der Kultivierung auf der superfiziellen dpNSK-Zone die Ausbildung von Zellhaufen auf der Oberfläche des Scaffolds beobachtet werden. Die Invasion fand von der superfiziellen Oberfläche ausgehend nur marginal nach zentral statt und beschränkte sich größtenteils auf die besiedelte Zone.

Bei der direkten Besiedlung und Kultivierung auf der zentralen Zone zeigte sich eine deutliche effizientere Zellinfiltration in tiefere Schichten der EZM. Von dieser Zone ausgehend konnte eine Invasion der ASCs bis hin zu oberflächlichen Schichten der intermediären Zone von dpNSK beobachtet werden.

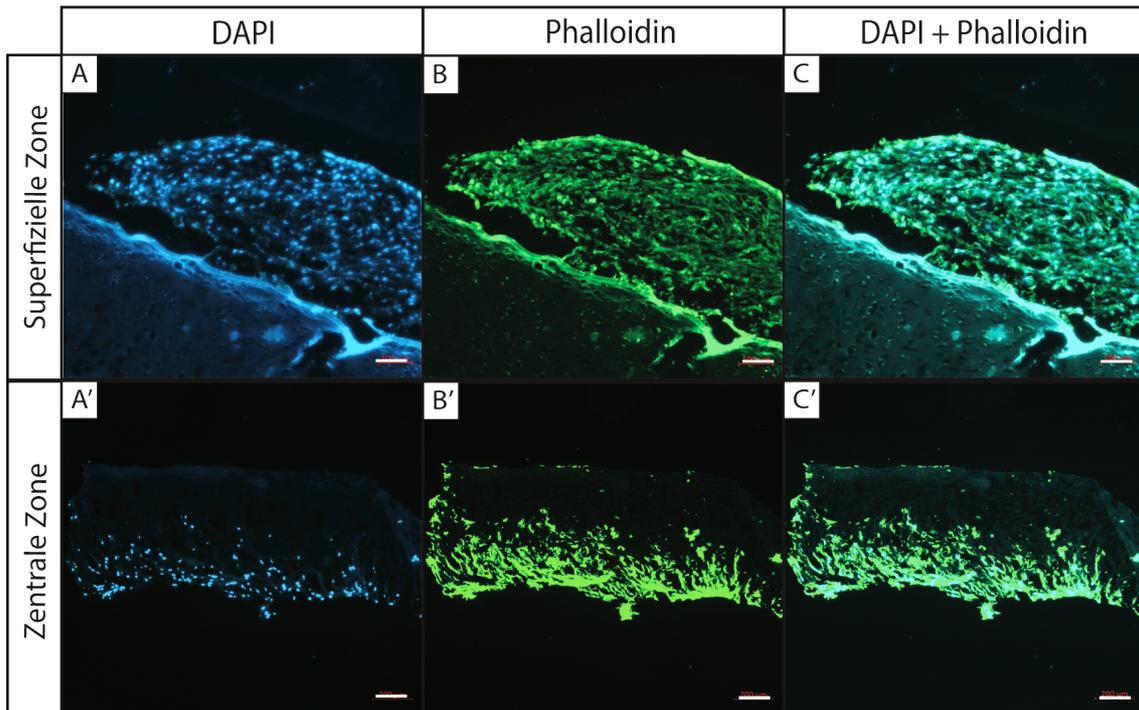


Abbildung 24) Invasion der EZM-Zonen.

Die dpNSK-Zonen wurden besiedelt und für 28 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte die Ernte für die DAPI/ Phalloidin Fluoreszenz Färbung. DAPI (blau) bindet an den Zellkern, während Phalloidin (grün) an das Aktin-Skelett der ASCs bindet. In A-C sind repräsentative Bilder der ASCs die auf der superfiziellen Zone von dpNSK kultiviert wurden dargestellt (Balken = 200 μm). A'-C' zeigt die Invasion der Zellen ausgehend von der zentralen Zone (Balken = 100 μm) (n = 3).

4.3.4. Einfluss der dpNSK-Zone auf die sGAG-Produktion von ASCs

Unter dem Einfluss von chondrogenen Differenzierungsmedium (Induktion an Tag 7 nach der Rezellularisierung) kam es in dem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen zu einer signifikanten Akkumulation von sGAG auf beiden dpNSK-Zonen.

Nach 4 Wochen in Kultur war der mittels DMMB-Assay gemessene sGAG-Gehalt auf der zentralen Zone von dpNSK im Vergleich zu der superfiziellen Zone statistisch signifikant ($p = 0,0105$) höher. In der Kontrollgruppe, die mit Standardmedium kultiviert wurde, konnte keine signifikante Zunahme der sGAG Konzentration beobachtet werden. Hier blieb die sGAG-Konzentration während der Beobachtungsperiode auf konstant basalen Leveln.

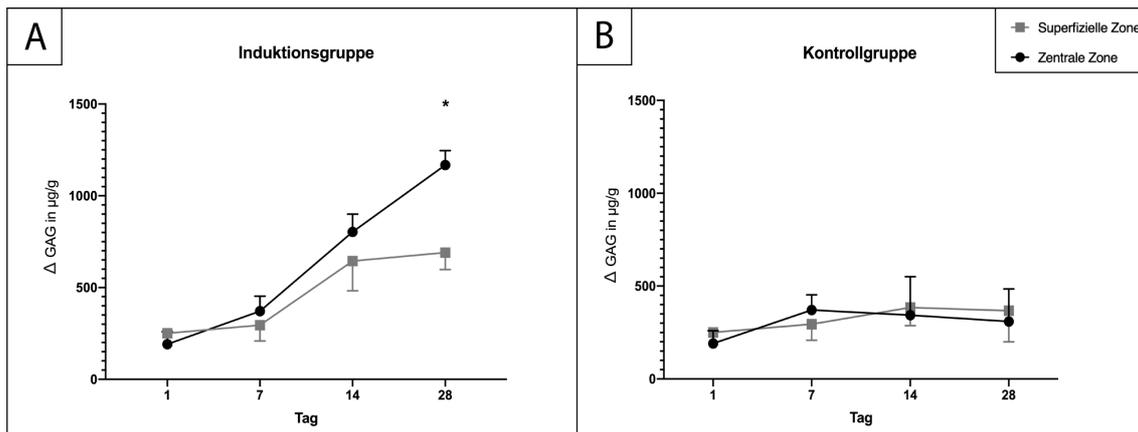


Abbildung 25) Vergleich der GAG-Produktion auf den dpNSK-Zonen.

In der Induktionsgruppe (A) kam es zu einer zeitlich signifikanten Zunahme ($p < 0,0001$) der GAG Konzentration. Zudem war die GAG Produktion von ASCs die auf der zentralen Zone von dpNSK ausgesät wurden, an Tag 28 signifikant ($p = 0,0105$) höher, als auf der superfiziellen Zone. In der Kontrollgruppe (B) zeigte sich eine konstante GAG Konzentration auf beiden Zonen von dpNSK, ohne eine zeitliche Dynamik. ($n = 3$; * $p < 0,05$; Mittelwert \pm SD).

4.3.5. Einfluss der dpNSK-Zone auf die Genexpression von ASCs

Bei der Analyse der quantitativen Genexpression fanden sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den ASCs auf der superfiziellen und der zentralen Zone bei sechs verschiedenen Genen (Tab. 7).

Die qPCR zeigte eine Hochregulierung verschiedener chondrogener Marker bei ASCs auf beiden Zonen von dpNSK. Dabei wurden frühe chondrogene Differenzierungsmarker (COL1A1 und COLA1) deutlich stärker in Zellen auf der superfiziellen Zone exprimiert. Hier ließ sich eine circa 20-Fold höhere Genexpression im Vergleich zu der zentralen Zone von dpNSK beobachten. Weitere frühe bis mittelspäte chondrogene Differenzierungsmarker (ACAN, SOX9) wurden tendenziell deutlicher von ASCs, die auf der superfiziellen Zone von dpNSK kultiviert wurden, exprimiert. Hier war jedoch der Unterschied zur zentralen Zone statistisch nicht signifikant.

Zudem ließ sich eine deutlichere Expression des Proliferationsmarkers MKI-67 (Ki-67) und der Integrine (ITGA10 und ITGA11) auf der superfiziellen Zone von dpNSK beobachten. Diese Unterschiede waren statistisch sehr signifikant.

Der Hypertrophiemarker MMP13, wurde stärker von ASCs auf der zentralen Zone exprimiert ($p < 0,001$). COLX, ein weiterer Hypertrophiemarker war bei ASCs aus beiden Zonen hochreguliert und unterschied sich nicht signifikant zwischen diesen.

Die Expression des Adipogenese Markers PPARG blieb auf basalen Leveln.

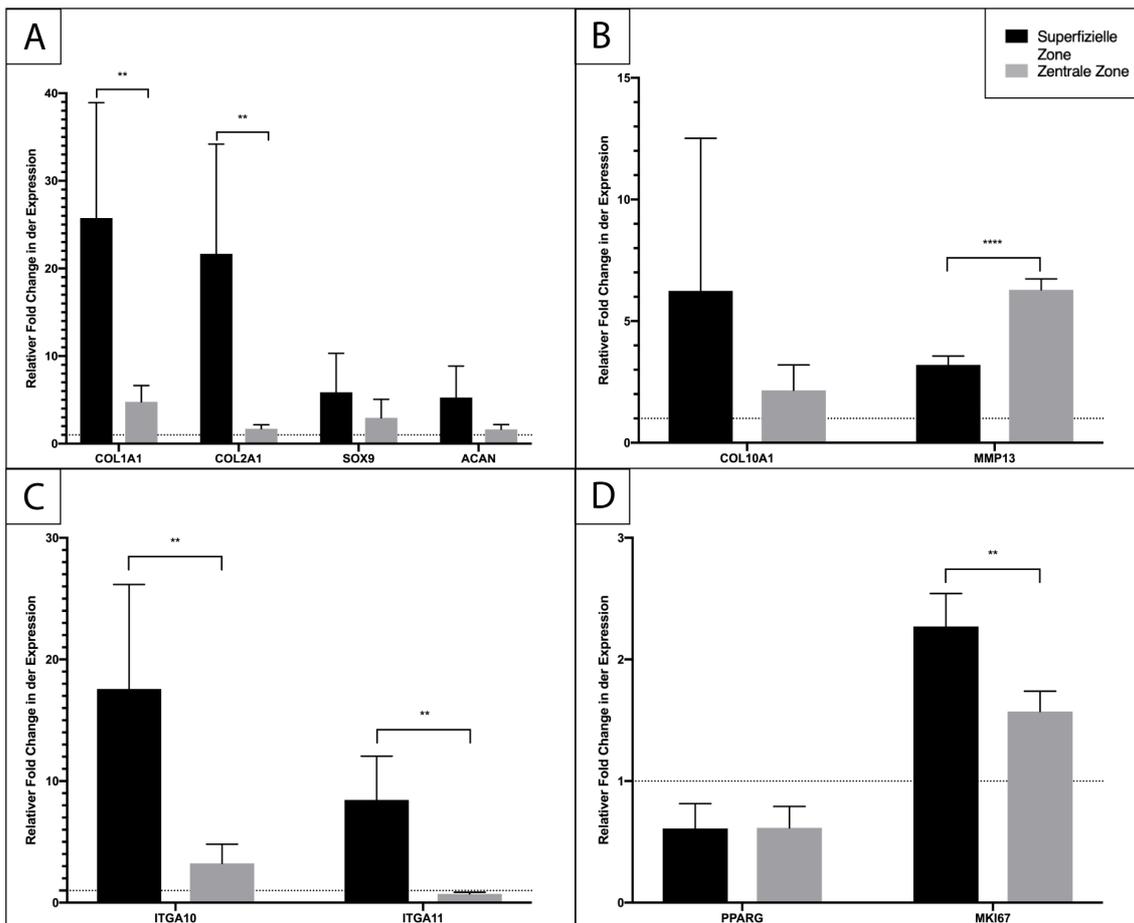


Abbildung 26) Relative Veränderungen in der Genexpression auf den dpNSK-Zonen.

Die unterschiedlichen Gene sind in folgende Gruppen sortiert: Frühe chondrogene Differenzierungsmarker (A), Hypertrophie Marker (B), Integrine (C) und die übrigen Gene (D), die den Proliferationsmarker MKI67 und den Adipogenese Marker PPARG umfassen. Es wurden multiple signifikante Unterschiede zwischen den ASCs auf der zentralen und der superfiziellen Zone nach 28 Tagen in Kultur identifiziert (n = 5; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Mittelwert \pm SD).

Gen	Zone	p-Wert	Signifikanzniveau
ACAN	OS > IS	0,0562	ns
COL10A1	OS > IS	0,1883	ns
COL1A1	OS > IS	0,0078	**
COL2A1	OS > IS	0,0074	**
ITGA10	OS > IS	0,0063	**
ITGA11	OS > IS	0,0014	**
MKI67	OS > IS	0,0011	**
MMP13	IS > OS	< 0,0001	****
PPARG	OS > IS	0,9615	ns
SOX9	OS > IS	0,2244	ns

Tabelle 7) Vergleich der Genexpression von Zellen auf der superfiziellen (OS) und der zentralen Zone (IS).

5. Diskussion

5.1. Teil I: Nachweis der Stammzellidentität

Die isolierten Zellen zeigten sich plastik-adhären (Abb. 14) und besaßen klonogenes Potential. Zudem konnten die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung der Zellen demonstriert werden, somit sind diese als multipotent anzusehen (Abb. 16). Darüber hinaus exprimierten die isolierten Zellen ein typisches homogenes Oberflächenmarkerprofil (Abb. 15) und konnten somit von weiteren zellulären Bestandteilen der SVF unterschieden werden. Mit diesen Eigenschaften erfüllen sie Definitionskriterien der „*Federation of Adipose Therapeutics and International Society for Cellular Therapy*“ und können demnach als ASCs identifiziert werden [107].

5.1.1. Eignung für chondrogenes Tissue Engineering

Eine Herausforderung im chondrogenen Tissue Engineering ist die limitierte Verfügbarkeit und aufwendige Isolierbarkeit von differenzierten (nasalen) Chondrozyten. Stammzellen und Vorläuferzellen stellen ebenfalls eine Option dar, allerdings muss diese mögliche alternative Zellquelle in reichlicher Quantität zur Verfügung stehen (Millionen bis Milliarden Zellen) (1), durch eine minimal invasive Prozedur zu gewinnen sein (2), sicher und effektiv in einen autologen oder allogenen Empfänger transplantiert werden können (3) und in regulierbarer und reproduzierbarer Art und Weise zur chondrogenen Differenzierung in der Lage sein (4) [67,152].

Durch die enzymatische Isolation war es möglich mehrere Millionen ASCs aus wenigen Millilitern eines Lipoaspirates (1), das durch eine minimal-invasiv durchgeführte Liposuktion gewonnen wurde zu isolieren (2). Die Einfachheit des Isolierprozesses der ASCs konnte als Bestandteil dieser Arbeit demonstriert werden. Dies stellt den größten Vorteil der Zellen gegenüber differenzierten Chondrozyten dar, da diese nur durch ein deutlich invasiveres chirurgisches Vorgehen geerntet werden können und einen vergleichsweise komplexen Isolierprozess durchlaufen müssen [73,153]. Darüber hinaus konnten ASCs in vorherigen Studien kein tumorigenes Potential nachgewiesen werden (3) [154–156].

Die chondrogene Differenzierung (4) von ASCs wird *in vitro* durch Mitglieder der Transforming Growth Factor (TGF) Familie und Bone Morphogenic Proteine (BMP) induziert und kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden: dazu gehören die Monolayer, Pellet und Scaffold Kultur [139,157–160].

Die 3D-Pellet Kultur ist dabei die „klassische“ Methode bei der die größten Mengen an knorpeltypischer EZM produziert werden können [158,161]. Dies ist auf die

dreidimensionale Umgebung und damit einhergehende suffizientere Zell-Zell Kommunikation zurückzuführen [158]. Wie in Abb. 16 demonstriert, konnte durch TGF- β 3 und BMP-6 Stimulation ein stabiles 3D-Pellet hergestellt werden, dass sich deutlich positiv für Proteoglykane in der histologischen Färbung darstellte. Obwohl die 2D- und 3D-Differenzierung in unterschiedlichen Phänotypen münden, kann jedoch auch die Monolayer Differenzierung als effizienter und reproduzierbarer Nachweis von Chondrogenese *in vitro* (Abb. 17) herangezogen werden [158,162].

Bei beiden Kultursystemen konnte eine deutliche Formierung von knorpeltypischer EZM festgestellt werden, die mittels histologischer Färbungen (Alcian Blau, Safranin Orange) nachgewiesen werden konnten und sich in der Quantifizierung statistisch signifikant von den Kontrollgruppen unterschieden. Das demonstrierte regulierbare und reproduzierbare chondrogene Differenzierungspotential (4) macht humane ASCs somit zu einer vielversprechenden Alternative zu differenzierten nasalen Chondrozyten.

5.1.2. Fazit

Bezugnehmend auf die zwei Teilfragen von Teil I dieser Arbeit kann festgehalten werden, dass die Isolation und Identifikation der ASCs aus dem Lipoaspirat als erfolgreich zu bewerten ist (1). Die demonstrierte Fähigkeit zur chondrogenen Differenzierung in Verbindung mit den Stammzell-Eigenschaften qualifizieren ASCs als eine vielversprechende alternative Zellquelle zu Chondrozyten für chondrogene Tissue Engineering Applikationen von Nasenseptumknorpel (2).

5.2. Teil II: *In vitro* Evaluation von dpNSK und ASCs als potentiellles Knorpelersatzmaterial

5.2.1. Rezellularisierung, Vitalität und Proliferation von ASCs auf dpNSK

DpNSK ist eine EZM-Verbindung die in der Vergangenheit großes chondrogenes Regenerationspotential gezeigt hat [19,68,69]. Die Herstellung eines Scaffolds durch die Dezellularisierung von nativen Knorpelgewebe hat den großen Vorteil, dass die Zusammensetzung der Matrix idealerweise nicht verändert wird und somit einen sehr hohen Grad an Biomimikry aufweist [127,163].

Jedoch finden bei der Dezellularisierung von Biomaterialien zytotoxische Substanzen oder Bestrahlung (z.B. γ -Strahlung) Verwendung. Dies ist notwendig, um eine suffiziente Entfernung der nativen Zellen zu erreichen und Pathogene und Immunogene vollständig zu eliminieren [164]. Für die Dezellularisierung von pNSK wurde zytotoxisches Natriumhydroxid (NaOH) angewendet, um PrP^{Sc} zu inaktivieren und die

komplette Zerstörung von Zelloberflächenstrukturen wie α -Gal zu gewährleisten, die ansonsten potentielle Immunreaktionen initiieren könnten [68,164,165]. Daher muss bei der Rezellularisierung von dpNSK zuerst sichergestellt werden, dass mögliche verbliebene Spuren zytotoxischer Substanzen nicht den Metabolismus der verwendeten Zellquelle supprimieren oder inhibieren. Schwarz *et al.* hat in einer vorherigen Studie dpNSK mit humanen nasalen Chondrozyten und L929 Zellen besiedelt und die Vitalität dieser Zellpopulationen evaluiert [68]. Diese zeigten sich uneingeschränkt vital und die Abwesenheit von zytotoxischen Komponenten konnte gemäß der International Organization for Standardization (ISO) Leitlinie (Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity) festgestellt werden [68]. Allerdings wurden bislang noch keine zytotoxischen und antiproliferativen Effekte von dpNSK auf ASCs untersucht.

Der Erfolg der Rezellularisierung von dpNSK mit ASCs wurde mit einer Live-Dead Färbung visualisiert (Abb. 18). Diese Färbung ist zum einen geeignet, um die Zell-Distribution darzustellen, zum anderen differenziert sie zwischen vitalen und apoptotischen Zellen [140]. ASCs zeigten sich auf der Oberfläche des Scaffolds adhärent und vital. Über den Beobachtungszeitraum wurde eine deutliche Zunahme der vitalen Zellkonfluenz und ein Ausbreiten des Zellrasens auf initial nicht besiedelte Oberflächen des Scaffolds sichtbar. In dieser Hinsicht zeigten die ASCs vergleichbares Verhalten wie humane Chondrozyten in vorherigen Studien, die innerhalb von 7 Tagen die gesamte dpNSK-Oberfläche okkupierten und eine dichte Zellschicht auf der besiedelten Zone formten [68].

Parallel zu der Live-Dead Färbung wurde die mitochondriale metabolische Aktivität (MMA) als Indikator für den Zellmetabolismus mithilfe eines Resazurin-basierten Assay evaluiert [166]. Resazurin ist ein bläulicher Redox-Farbstoff der von den Mitochondrien der Zellen zu dem pinken Resorufin irreversibel reduziert wird und somit proportional zur aeroben Atmung ist [166,167]. Je nach Zellmetabolismus und -zahl ist die Umsetzung unterschiedlich stark ausgeprägt und die optische Dichte der verschiedenen Farbnuancen kann bestimmt werden. Das Assay wird herangezogen, um mögliche zytotoxische oder metabolische Effekte zu erfassen und indirekt eine Aussage über die Zellproliferation zu gewinnen [142]. Das Ergebnis des Resazurin Assay zeigte eine signifikante Zunahme der MMA der ASCs über den Verlauf von 14 Tagen auf dem Scaffold und in der Monolayer Kontrolle. Da der Metabolismus der ASCs in 2D und in 3D vergleichbar während der Beobachtungsperiode anstieg, sind zytotoxische Effekte von dpNSK als unwahrscheinlich einzustufen. Zudem ist dies als erster Hinweis für Zellproliferation auf dem Scaffold zu werten. Tendenziell war der relative Anstieg der MMA bei ASCs die in 3D kultiviert wurden vergleichsweise größer als in der Kontrollkultur (Abb. 18). Vorherige Studien konnten ähnliche prometabolische Effekte auf Zellen von Kollagen-basierten Scaffolds beobachten. Dies wird im Tissue Engineering als „Bioaktivierung“ zusammengefasst [32,168].

Zur längerfristigen Beurteilung der Zellproliferation auf dpNSK wurde ergänzend ein dsDNA-Quantifizierungsassay durchgeführt und der DNA-Gehalt auf dem Scaffold an verschiedenen Messzeitpunkten über den Verlauf von 42 Tagen quantifiziert. Zellproliferation ist ein integraler Bestandteil von erfolgreicher Geweberegeneration. Ein für Tissue Engineering geeignetes und biokompatibles Scaffold muss daher die Teilung und die metabolische Aktivität von Zellen ermöglichen und unterstützen [123]. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Zunahme des Zell-DNA-Gehaltes auf dpNSK über den Verlauf der Zeit und somit eine Zellproliferation (Abb. 18). Auch hier zeigt sich studienübergreifend ein vergleichbares Verhalten von ASCs und Chondrozyten bei der Kultivierung auf dpNSK [134].

Zusammenfassend können sowohl kurzfristige, als auch langfristige zytotoxischer Effekte von dpNSK auf ASCs als unwahrscheinlich eingestuft werden und das Scaffold als ein geeignetes Habitat für ASCs identifiziert werden. DpNSK ermöglicht mindestens vergleichbare Zellproliferation wie eine Monolayer Zellkultur und es gibt Hinweise auf mögliche bioaktivierende Effekte des Scaffolds. Die metabolische Aktivität und das Proliferationsverhalten von ASCs auf dpNSK sind vergleichbar mit dem von humanen nasalen Chondrozyten und L929 Zellen.

5.2.2. Zellinvasion von dpNSK

Matrix Porosität ist ein wichtiger Faktor für den Erfolg von Tissue Engineering [169]. Die Zellen sind bei der Kultivierung eines Scaffolds auf ein ausreichend großes Porennetzwerk angewiesen um in tiefere Schichten einzuwandern [170]. Dies bezeichnet man als Invasion oder Migration der Zellen. Später ist das Porennetzwerk für die Zellernährung und die Entfernung von metabolischen Abfallprodukten von essentieller Bedeutung [169]. Zur Beurteilung von Zell-Matrix Interaktionen ist eine ausreichende Zellinvasion in das Innere der Matrix eine Grundvoraussetzung. Nur so kann eine suffiziente dreidimensionale Interaktion zwischen den beiden Komponenten stattfinden.

Die Evaluation der Zellinvasion erfolgte über die histologische Darstellung des dpNSK Querschnittes und durch die Fluoreszenzfärbung der Zellkerne (DAPI) und Aktinfilamente (Phalloidin). Zur Quantifizierung wurde der von Zellen okkupierte Anteil am Gesamtquerschnitt des dpNSK berechnet. Um die Objektivität und Reliabilität der Methodik zu gewährleisten, wurde eine identische Belichtungszeit bei der Erstellung der Aufnahmen gewählt und derselbe Threshold zur Selektion der von Zellen okkupierten Areale innerhalb des Makro „Measure Stack“ von Image J angewendet. Ebenso erfolgte die standardisierte Überbelichtung des DAPI-Channels um den Gesamtquerschnitt des Scaffolds zu berechnen. Diese automatisierte bildbasierte Analyse ist von einer modernen und objektivierten Methode zur histologischen Quantifizierung von Fettgewebe abgeleitet, welche die Autorin im Jahr 2020 mit publiziert hat [138].

Die Quantifizierung der Invasion in den intakten dpNSK ergab eine signifikante Zunahme der von Zellen besetzten Anteile am Scaffold-Querschnitt mit zunehmender Zeit in der Zellkultur (Abb. 19). Allerdings wird hier ein Nachteil der Methodik deutlich: bei der Auswertung wird nicht die Invasionstiefe der Zellen berücksichtigt, sondern nur deren Anteil am dpNSK Gesamtquerschnitt. Dies wird auch bei der genauen Betrachtung der histologischen Bilder deutlich: obwohl ein vereinzelt Vordringen der Zellen bis zur intermediären Zone zu beobachten ist, verbleibt die Mehrzahl der ASCs an der Oberfläche und in der superfiziellen Zone.

Die oberflächliche Porengröße von dpNSK beträgt 20-30 μm [68,171]. Damit befindet sich die Porengröße eigentlich in der gewünschten Größenordnung für eine dreidimensionale Chondrozyten-Kultur, die 15-50 μm umfassen sollte [69,134,172,173]. Für die ideale Porengröße von ASCs existieren bislang nur spärlich Daten. Wu *et al.* konnte demonstrieren, dass die Invasion von humanen ASCs in ein Gelatine Scaffold mit 70 μm großen Mikrobblasen als Poren erfolgreich war [174]. Die meisten Studien verwendet jedoch deutlich porösere Scaffolds, insbesondere eine Porengröße zwischen 100-400 μm hat sich als Standard von Kunststoffcaffolds (z.B. Polycaprolacton) für ASCs bewährt [174–176]. Somit ist anzunehmen, dass insbesondere die Porosität der superfiziellen Zone von dpNSK erhöht werden muss, um ein Vordringen von ASCs in das Scaffold Zentrum zu gewährleisten.

Allerdings zeigt ein genauer Blick auf die histologischen Bilder vorheriger Studien mit dpNSK und humanen Chondrozyten, dass auch hier keine effiziente Zellinvasion in zentrale Matrixzonen stattgefunden hat. Selbst nach einem Kultivierungszeitraum von 6 Wochen lässt sich nur ein Vordringen der Zellen bis in die Intermediäre Zone verzeichnen. Zudem konnte ebenfalls die Bildung einer dichten Zellschicht auf der Oberfläche des Scaffolds beobachtet werden [68,69,134].

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Zellmigration stellt die dynamische Kultivierung in experimentellen Bioreaktoren dar. Princz *et al.* entwickelte einen gläsernen Bioreaktor, der automatisierten Mediumwechsel, Gasaustausch und Temperaturkontrolle ermöglicht [177]. Im Vergleich zu der statischen Zellkultur konnte die dynamische Kultivierung von dpNSK, die Invasion von humanen Chondrozyten in tiefere EZM-Schichten verbessern [177,178]. An dieser Stelle ist noch zu prüfen, ob sich diese Ergebnisse auch auf humane ASCs übertragen lassen.

Zusammenfassend, ist die Invasion von dpNSK durch Chondrozyten und ASCs vergleichbar. Beide Zellarten migrieren vereinzelt bis in die intermediäre Zone, aber die große Mehrheit der Zellen verbleibt in der superfiziellen Zone oder an der Oberfläche. Um eine effizientere Durchwanderung des Scaffolds und das Vordringen in die zentrale Zone von außen zu ermöglichen, sollte die Porosität von dpNSK für zukünftige Experimente erhöht und dynamische Zellkultur-Systeme berücksichtigt werden.

5.2.3. Chondrogenese der ASCs auf dpNSK

Um die Regeneration von Knorpeldefekten zu ermöglichen, ist die Produktion einer knorpeltypischen Matrix durch die verwendete Zellquelle essentiell. Chondrozyten haben den Vorteil, dass sie bereits differenziert sind und dies gewährleisten [67,134]. Die reproduzierbare Fähigkeit zur chondrogenen Differenzierung von ASCs konnte zum Nachweis der Multipotenz bereits erfolgreich demonstriert werden (siehe 5.1.). Zur Evaluation der Chondrogenese von ASCs auf dpNSK, erfolgte eine Alcian Blau Färbung und die Quantifizierung der sGAG Menge im DMMB Assay.

Chondrogenes Induktionsmediums konnte hierbei als der Schlüsselfaktor für die Chondrogenese von ASCs auf dpNSK identifiziert werden. Die produzierte Menge an GAG unterschied sich signifikant zwischen der Induktions- und der Kontrollgruppe nach 28 und 42 Tagen in Kultur (Abb. 20). Zudem ließ sich eine Zunahme der sGAG Konzentration über den Verlauf der Zeit in der supplementierten Gruppe nachweisen. Eine alleinige Induktion zur Chondrogenese, nur durch die Interaktion der ASCs mit der EZM, hat nicht stattgefunden: Der GAG Gehalt in der Kontrollgruppe zeigte keine zeitliche Dynamik und blieb vergleichsweise niedrig. Somit ist ein Differenzierungsmedium notwendig, um die Chondrogenese von ASCs auf dpNSK zu induzieren. Allerdings lässt sich unter dem Induktionsmedium eine suffiziente sGAG Produktion erzielen, die vergleichbar mit der von humanen Chondrozyten aus vorherigen Studien war [68,134].

Die histologische Darstellung und Färbung der sGAG mit Alcian Blau zeigt die Formierung einer stabilen und dichten Zellschicht auf der Oberfläche von dpNSK in der Induktionsgruppe (Abb. 20). Diese färbte sich positiv für GAG. In der Kontrollgruppe kam es nicht zu der Bildung dieser Zellschicht, sondern nur zu vereinzelt lockeren Zellhaufen mit deutlich geringerer Intensität in der Alcian Blau Färbung. Somit kann hier die Problematik der limitierten Zellinvasion wieder aufgegriffen werden (siehe 5.2.2.). Die Ergebnisse mit humanen Chondrozyten von Schwarz *et al.* zeigten ein ähnliches Muster [134]. Auch hier kam es zu der Bildung einer Zellschicht an der Oberfläche mit dezenter GAG und Aggrecan Produktion in der superfiziellen Zone. Mit zunehmender Zeit in Kultur kam es zu einem weiteren Vordringen in das Scaffold Zentrum, wobei dieses in den bisherigen Studien nicht erreicht wurde [68,134]. An dieser Stelle fehlen noch Langzeitversuche über einen Zeitraum von mindestens 8 Wochen, um zu untersuchen, ob so eine suffizientere Durchwanderung und gleichmäßigere Verteilung von Zellen und der von ihnen produzierten knorpelspezifischen EZM-Bestandteilen erzielt werden kann. Allerdings war auch bei der Kultivierung von dpNSK mit Chondrozyten ein Differenzierungsmedium notwendig um die Bildung einer knorpeltypischen Matrix zu induzieren [134].

Somit scheinen ASCs auf dpNSK vergleichbare Fähigkeiten zur Bildung von Neoknorpel zu besitzen wie humane Chondrozyten. Beide Zellquellen sind in der Lage signifikante

Mengen an GAG in die Matrix von dpNSK zu synthetisieren, dafür benötigen sie jedoch die Supplementierung von chondrogenen Wachstumsfaktoren.

5.2.4. Zusammenfassende Beurteilung von dpNSK und ASCs als potentielles Knorpelersatzmaterial

5.2.4.1. Fazit

Bezugnehmend auf die fünf Teilfragen von Teil II der vorliegenden Arbeit kann festgehalten werden, dass die Besiedlung von dpNSK mit ASCs möglich ist und die Zellen auf dem Scaffold adhärent (1) und metabolisch aktiv (2) sind. ASCs proliferieren nach der Besiedlung auf dpNSK (3) und migrieren in die Matrix des Scaffolds (4). Allerdings war die Zellinvasion auf die superfizielle Zone von dpNSK begrenzt und eine Durchwanderung des Scaffolds konnte in der Beobachtungsperiode nicht erreicht werden. Zudem produzierten die ASCs, die auf dpNSK kultiviert wurden, Bestandteile einer knorpeltypischen Matrix (5) unter der Stimulation mit chondrogenen Wachstumsfaktoren.

Aufgrund der limitierten Zellinvasion wird die Empfehlung ausgesprochen, die Porosität des Scaffolds zu erhöhen, um so ein Eindringen der Zellen in tiefere Matrix Zonen zu ermöglichen.

5.2.4.2. Ausblick und Limitierungen

Zusammenfassend stellt dpNSK ein biokompatibles Habitat für ASCs dar, das großes Potential für die Regeneration von nasalen Knorpeldefekten besitzt. Die verwendeten ASCs zeigten vergleichbare Interaktionen mit dpNSK wie humane nasale Chondrozyten in vorherigen *in vitro* Studien und qualifizieren sich somit als potentielle alternative Zellquelle für Tissue Engineering Applikationen mit dpNSK [68,70,134].

Die Vorteile von ASCs gegenüber Chondrozyten zeichnen sich durch die einfache Isolierbarkeit und nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit der Stammzellen aus [67]. Die Fähigkeiten dieser Zellpopulation konnten für diese Arbeit umfangreich demonstriert werden. ASCs stellen zudem einen geeigneten Partner für eine Co-Kultur mit humanen Chondrozyten dar [179,180]. Shi *et al.* konnte demonstrieren, dass solch eine Co-Kultur die Proliferation und Fähigkeit zur chondrogenen Differenzierung von ASCs verbessert [181]. Diese Methode hat bereits Einzug in chondrogene Tissue Engineering Applikationen gefunden: Eine Co-Kultur aus MSCs und humanen Chondrozyten konnte in einem Hydrogel Scaffold eine vergleichbare Menge an knorpeltypischer Matrix produzieren wie eine reine Chondrozyten Kultur. Dafür war bereits ein Verhältnis von 80:20 (MSCs : Chondrozyten) ausreichend [182]. Somit könnte durch die Addition von

ASCs die Menge des Knorpels, der für die Isolation von humanen Chondrozyten benötigt wird, reduziert werden.

Unabhängig von der verwendeten Zellquelle sind jedoch die Erhöhung der Matrixporosität und die anschließende Re-Evaluierung der Biomechanik und chirurgischen Handhabung als folgerichtiger nächster Schritt zu betrachten.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit umfassen nur die Ergebnisse aus einer *in vitro* Zellkultur. Ergänzende *in vivo* Studien sind notwendig um die klinische Eignung und Langzeit-Stabilität von ASC-besiedeltem-dpNSK als Knorpelersatzmaterial für die rekonstruktive Rhinochirurgie zu beurteilen.

5.3. Teil III: Einfluss der EZM-Zonen auf das Zellschicksal von ASCs

5.3.1. Rezellularisierung der dpNSK-Zonen

Für den dritten Teil dieser Arbeit erfolgte die gezielte Rezellularisierung der superfiziellen und der zentralen histologischen Zone von dpNSK. Um eine objektive Ausgangssituation für die Anschlussexperimente zu gewährleisten, wurde die direkte Besiedlung der Zonen fluoreszenzhistologisch kontrolliert. Hier konnte die Präzision der Rezellularisierungsmethode bestätigt werden. Die Zellen zeigten sich nahezu ausschließlich auf der Zone auf die sie pipettiert wurden und nur vereinzelt an anderen dpNSK-Oberflächen. Zudem wurde die Zellvitalität, -distribution und adhärenz nicht von der besiedelten Zone und der Besiedlungszahl beeinflusst.

Als Erfolgsmaß für die Rezellularisierung wird häufig die Cell Seeding Efficiency (CSE) im Tissue Engineering verwendet [143]. Diese bezeichnet den prozentualen Anteil der Zellen auf dem Scaffold an den Zellen, die initial ausgesät wurden [143,183,184]. Die Höhe der CSE ist abhängig vom Messzeitpunkt, Zelltyp und Material des Scaffolds. Die CSE kann über verschiedene Methoden ermittelt werden, was die studienübergreifende Vergleichbarkeit erschwert [184]. Jedoch kann sie als gutes Vergleichsmaß bei identischer Methodik zum Vergleich zwischen verschiedenen Scaffold-Zonen herangezogen werden. Für diese Arbeit wurde die CSE indirekt über die metabolische Aktivität der ASCs ermittelt. Hier zeigten sich nicht signifikante Unterschiede zwischen den dpNSK-Zonen (Abb. 21). Der Vergleich der Zellvitalität und CSE zwischen den beiden Zonen des dpNSK ist von Bedeutung für die Interpretation der weiteren Ergebnisse. Da keine signifikanten Unterschiede beim Besiedlungserfolg zwischen den EZM-Zonen ermittelt werden konnten, kann von einer vergleichbaren Ausgangssituation der ASCs auf den verschiedenen Zonen ausgegangen werden. Eine Verzerrung der Folgeergebnisse durch eine unterschiedliche Rezellularisierung der Zonen ist somit als unwahrscheinlich einzustufen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Rezellularisierung von beiden dpNSK-Zonen mit ASCs als erfolgreich und vergleichbar zu betrachten ist. Die kurzfristige Zellvitalität, -adhärenz und -distribution wird nicht von den Matrixzonen beeinflusst.

5.3.2. Einfluss der dpNSK-Zone auf die Zellproliferation

Während die Rezellularisierung und Zellvitalität nicht signifikant von der Matrixzone beeinflusst wurden, zeigten sich Unterschieden beim Proliferationsverhalten der ASCs auf den verschiedenen Lokalisationen: die Proliferation der ASCs auf der superfiziellen Zone von dpNSK war nach 14 und 28 Tagen signifikant größer als die der Zellen auf der zentralen Zone (Abb. 23). Begleitet wurde dieser Umstand von einer deutlich signifikanteren Hochregulierung des genetischen Proliferationsmarkers Ki-67 (MKI67) der ASCs an Tag 28 (Abb. 26) [185]. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die superfizielle Zone von dpNSK der primäre Ort von Zellproliferation ist, während die Zellen auf der zentralen Zone zwar proliferieren, allerdings in einem signifikant geringeren Ausmaß [186,187]. Diese Unterschiede im Zellverhalten werden vor allem mit zunehmender Zeit in Kultur (beginnend ab Tag 14) sichtbar.

Die erhöhte Zellteilung und die signifikant stärker ausgeprägte Hochregulierung von Ki-67 in ASCs auf der superfiziellen Zone des Scaffolds geben erste Hinweise darauf, dass die Stammzellen zonen-spezifische Merkmale von den dezellularisierten Chondrozyten durch Interaktionen mit deren PZM übernehmen.

5.3.3. Einfluss der dpNSK-Zone auf die ASC Invasion

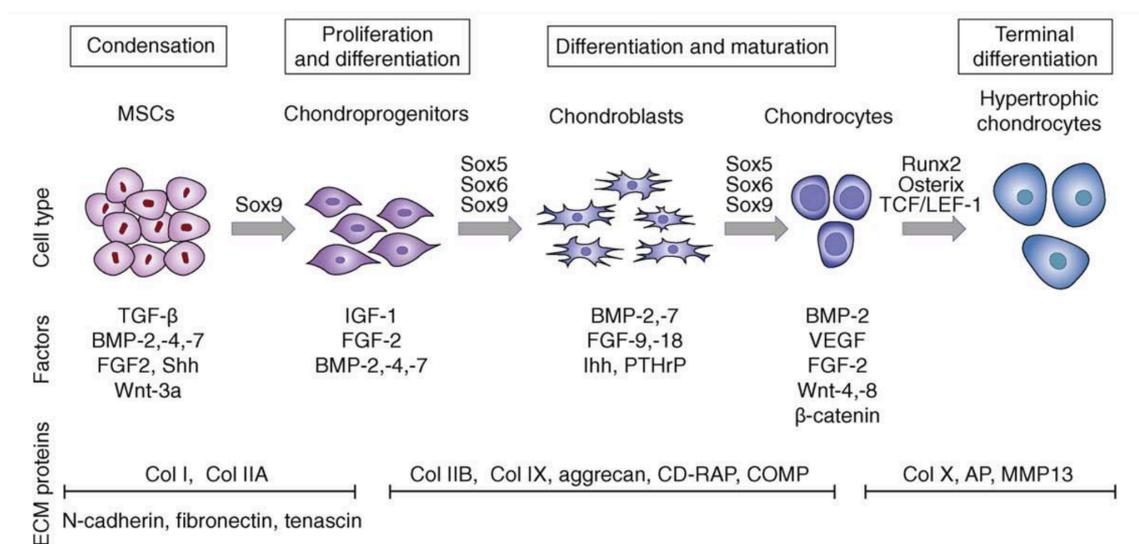
Durch die direkte Rezellularisierung der zentralen Zone von dpNSK konnte die Invasion der ASCs deutlich verbessert werden. Wie in Abb. 24 dargestellt, wanderten die ASCs vom dpNSK Zentrum ausgehend bis zu tieferen Schichten der superfiziellen Zone über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen ein. Zudem war die Zellinvasion deutlich gleichmäßiger ausgeprägt und es kann von einer homogenen Durchwanderung des Scaffolds gesprochen werden. Zudem wird in Abb. 24 das Dilemma der superfiziellen Zone visuell erneut deutlich: die ASCs bildeten häufig einen dreidimensionalen Zellhaufen auf der Oberfläche des Scaffolds anstatt in tiefere Schichten vorzudringen. Die ASCs exprimierten somit ein infiltrierendes Wachstumsmuster bei der Kultivierung auf der zentralen Zone, während bei der Kultivierung auf der superfiziellen Zone ein appositionelles Wachstumsmuster auf der Oberfläche von dpNSK zu beobachten war [188].

Die Porengröße der zentralen Zone ist deutlich größer als die der superfiziellen Zone und beträgt, wenn man diese vom Maßstab der Histologie aus vorherigen Studien abschätzt

circa 40-70 μm [134]. Diese Porengröße erscheint somit ausreichend, um eine suffiziente Invasion von ASCs in dpNSK zu ermöglichen.

5.3.4. Einfluss der dpNSK-Zone auf die Chondrogenese von ASCs

Die Chondrogenese von Stammzellen wie MSCs oder ASCs läuft über verschiedene Zwischenschritte ab und ist von Veränderungen des Phäno- und Genotypus, sowie der Produktion der EZM Proteine der Zellen geprägt (Abb. 27) [25]. Zuerst kondensieren die Stammzellen zu Chondroprogenitoren, diese Veränderung stellt eine Hybrid Situation aus Proliferation und Differenzierung dar. Anschließend differenzieren die Zellen über Chondroblasten zu reifen Chondrozyten. Die Anfangsstadien werden von der EZM-Sekretion von Kollagen Typ I (COL I) und Kollagen Typ II (COL IIA) begleitet, die COL II Synthese wird mit zunehmender Differenzierungsstufe von der Aggrecan (ACAN) und COMP Produktion ergänzt [25,189]. Integrin $\alpha 10$ (ITGA10) konnte ebenfalls als Marker, der während der frühen bis mittel-späten Chondrogenese von ASCs exprimiert wird, identifiziert werden [190]. Im terminalen Differenzierungsstadium nehmen die Chondrozyten einen hypertrophen Phänotyp an und die Matrixproteine Kollagen Typ X (COL X), Alkalische Phosphatase (AP) und der Matrix Metallopeptidase 13 (MMP 13) stehen im Vordergrund. Diese werden auch als „Hypertrophiemarker“ bezeichnet [189]. Der chondrogene Transkriptionsfaktor SRY-related high-mobility group box gene-9 (Sox9) begleitet die Schritte von der MSC zum Chondrozyten und wird primär während der frühen Chondrogenese von Stammzellen exprimiert [25,189].



TRENDS in Biotechnology

Abbildung 27) Schematische Darstellung der Eventsequenz die die Chondrogenese von MSCs zu terminal differenzierten Chondrozyten begleitet.

Grafik aus Vinatier et al.; *Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors*; Trends in biotechnology. 27, 307–314 (2009). Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.

Nach 28 Tagen in der 3D Kultur und unter chondrogener Induktion, wurden die frühen Chondrogenese Marker COL I, COL II und ITGA10 statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$) von ASCs exprimiert, die auf der superfiziellen Zone von dpNSK ausgesät wurden (Abb. 26). Hier war zudem die ACAN und SOX9 Expression in den Zellen auf dieser Zone tendenziell deutlicher hochreguliert als auf der zentralen Zone, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Zudem zeigte sich im DMMB Assay eine zeitlich signifikante Zunahme der sGAG Produktion der ASCs, die auf der superfiziellen Zone von dpNSK kultiviert wurden. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Zellen auf dieser Zone chondrogen differenzieren und eine knorpeltypische Matrix produzieren. Die signifikantere Hochregulierung der frühen chondrogenen Differenzierungsmarker von den ASCs an dieser Lokalisation lassen die Schlussfolgerung zu, dass sich die Zellen in dem Differenzierungsstadium von Chondroprogenitoren bis hin zu Chondroblasten befinden. Vorherige Studien konnten jedoch zeigen, dass die Hochregulierung von COL I auch auf Faserknorpel-Formierung oder Dedifferenzierung von Zellen in einen Fibroblasten-artigen Phänotyp hindeutet [50,191]. Zudem war das Integrin $\alpha 11$ (ITGA11) in der genetischen Expression der ASCs auf der superfiziellen Zone deutlich hochreguliert. ITGA11 konnte in vorherigen Studien besonders bei dedifferenzierten Chondrozyten in einer Monolayer Zellkultur nachgewiesen werden [190]. Die Elevation von diesen beiden Marker, sowie den frühen chondrogenen Differenzierungsmarkern auf multiple Level des Fold Changes weisen auf eine Heterogenität des Schicksals der ASCs auf der superfiziellen Zone hin.

Die ASCs auf der zentralen Zone von dpNSK zeichneten sich besonders durch eine Hochregulierung der Hypertrophiemarker MMP 13 und COL X aus. Besonders MMP 13 wurde statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$) von den Zellen auf dieser Seite des Scaffoldes gebildet. Zudem war die sGAG Produktion auf dieser Zone nach 28 Tagen in Kultur signifikant höher, im Vergleich zu den ASCs auf der superfiziellen Zone. Dies spricht für eine weiter fortgeschrittene Chondrogenese der ASCs zu terminal differenzierten Chondrozyten die sich durch eine hohe Sekretion von EZM-Bestandteilen auszeichnet [25,32].

Die beiden Zonen von dpNSK führen somit zu verschiedenen chondrogenen Differenzierungsstadien von ASCs. Während die Zellen auf der zentralen Zone terminale und hypertrophe chondrogene Differenzierungsmarker exprimierten, sind die ASCs auf der superfiziellen Zone in einem früheren Stadium. Die Hochregulierung von Dedifferenzierungs- und Fibroblastenmarkern der ASCs auf dieser Zone deutet zudem auf die Ausbildung von fibrösem Gewebe hin.

5.3.5. Zusammenfassende Beurteilung der zonen-spezifischen Interaktionen zwischen dpNSK und ASCs

Im Folgenden sollen die Interaktionen zwischen den ASCs und der jeweiligen Zone von dpNSK anhand der Teilfragen zu diesem Abschnitt der Arbeit faktorenübergreifend zusammengefasst und evaluiert werden.

Die beiden Zonen des Scaffolds unterscheiden sich durch die Morphologie und Größe der Poren, sowie durch die Zusammensetzung der EZM-Inhaltsstoffe [32–34]. Daher soll der Einfluss dieser Parameter auf das Schicksal und die Entwicklung der ASCs anhand der aktuellen Fachliteratur beurteilt werden.

5.3.5.1. Fazit: Die superfizielle Zone von dpNSK

Zusammenfassend konnte bei ASCs die auf der superfiziellen Zone von dpNSK kultiviert wurden, eine erhöhte Zellproliferation und Hochregulierung der Proliferationsmarkers Ki-67 beobachtet werden. Zudem waren die Zellen in der Lage knorpeltypische EZM-Bestandteile in den dpNSK zu sezernieren und exprimierten frühe bis mittelspäte chondrogene Differenzierungsmarker. Jedoch kam es auch zu einer deutlichen Hochregulierung von COL I und ITGA11, was auf eine Dedifferenzierung in Richtung eines Fibroblasten-artigen Phänotypus hindeutet [50].

Die histologische Darstellung des dpNSK Querschnittes, kann eine Erklärung für die Heterogenität der Zellpopulation anbieten: Hier zeigte sich ein dreidimensionaler Zellhaufen auf der superfiziellen Oberfläche von dpNSK mit limitierter Zellmigration. Somit kann aufgrund der eingeschränkten Porosität dieser Zone nur ein Teil der ASCs direkt mit der EZM interagieren. Da eine zweidimensionale Umgebung Chondrozyten zu einer Dedifferenzierung anregt, was von einem Verlust des Phänotypus begleitet wird (Hochregulierung von ITGA11), während eine 3D-Umgebung die Chondrogenese unterstützt (Hochregulierung der chondrogenen Marker), bietet die Heterogenität der Interaktionspartner der Zellen eine Erklärung für die gleichzeitige Heterogenität des Zellschicksals an. Die chondrogene Differenzierung ist im Anfangsstadium eine Hybrid Situation aus Zellproliferation und Differenzierung, der korrelierende Phänotyp dazu ist der Chondroprogenitor [25,192]. Die genetische Expression, das Proliferationsverhalten und die sGAG Produktion geben Hinweise darauf das sich die induzierten ASCs auf dieser Zone in dem Hybrid Status befinden und einen Phänotyp und das Verhalten von Chondroprogenitoren bis Chondroblasten annehmen. Somit befinden sie sich in einem frühen Stadium der Chondrogenese [25].

Die Chondrozyten der superfiziellen Zone von NSK zeichnen sich durch ähnliche Verhaltensmuster aus. Sie sind zahlreich, flach und parallel zur Oberfläche angeordnet [32,34]. Dieser Phänotyp deutet auf Zellproliferation hin und man geht davon aus das

die Chondrozyten mit zunehmender Tiefe des NSK fortschreitend differenzieren und schließlich im Zentrum terminal hypertrophieren.

ASCs adaptieren somit scheinbar einige Eigenschaften der Chondrozyten der superfiziellen Zone durch die Interaktion mit deren ehemaliger Nische [193]. Allerdings muss die Porosität dieser Zone erhöht werden, um die Kontaktfläche zu vergrößern (siehe 5.2.2.). Die superfizielle Zone von dpNSK kann somit im Vergleich zu der zentralen Zone, als Ort der Zellproliferation identifiziert werden. Allerdings sind weitere Studien notwendig um die beobachtete Zellpopulation und deren Entwicklung weiterführend zu klassifizieren (u.a. FACS-Analyse, weitere histologische Färbungen, PCR mit größerer Spenderzahl).

Abschließend kann die erste Teilfrage verifiziert werden: ASCs weisen bei der Besiedlung und Kultivierung auf der superfiziellen Zone von dpNSK eine höhere Proliferationsrate auf als auf der zentralen Zone (1).

5.3.5.2. Fazit: Die zentrale Zone von dpNSK

Die ASCs die auf der zentralen Zone von dpNSK kultiviert wurden, proliferierten geringer als die ASCs auf der superfiziellen Zone. Zudem produzierten sie unter dem Einfluss von Induktionsmedium signifikant mehr sGAG nach 28 Tagen in Kultur, was von einer Hochregulierung der terminalen chondrogenen Differenzierungsmarkern begleitet wurde. Zudem konnte von dieser Zone ausgehend eine suffiziente Zellinvasion und somit Zell-Matrix Interaktion erreicht werden.

Die Chondrozyten der zentralen Zone von NSK zeichnen sich durch einen großen und runden Phänotyp aus, der auf eine terminale chondrogene Differenzierung hindeutet und große Mengen an GAG in die Matrix sezerniert [32–34]. Die Entwicklung der ASCs an dieser Lokalisation impliziert, dass die Stammzellen zonen-spezifische Eigenschaften von nasalen Chondrozyten durch die Interaktion mit der PZM der nativen Zellen adaptieren. Die zentrale Zone von dpNSK fördert somit die chondrogene Differenzierung von ASCs und unterstützt die Ausbildung eines hypertrophen Phänotypus. Allerdings sind auch hier weitere Untersuchungen notwendig um das Schicksal der ASCs genauer zu klassifizieren und Zell-Matrix Interaktionswege weiter nachzuvollziehen.

Zusammenfassend kann die zweite Teilfrage ebenfalls verifiziert werden: ASCs weisen bei der Besiedlung und Kultivierung auf der zentralen Zone von dpNSK eine höhere Hypertrophie auf und produzieren größere Mengen einer knorpeltypischen Matrix als auf der superfiziellen Zone (2).

5.3.5.3. Einfluss der Größe und Morphologie der Poren

Die Zellform ist ein wichtiger Mediator für die Differenzierung von Stammzellen [58,194]. Die Porengröße und Morphologie eines Scaffolds kann somit in Form von biomechanischer Zell-Matrix Interaktion gezielt die Form von Zellen beeinflussen und zur Expression bestimmter Phänotypen beitragen [195].

Dies wird besonders bei der Entwicklung von MSCs zu Chondrozyten anschaulich: Während der Chondrogenese kondensieren die Zellen zu spindelförmigen Chondroprogenitoren und reifen über Chondroblasten zu Chondrozyten (siehe Abb. 27). Währenddessen verändert sich die Form der Zellen und wird runder und hypertropher. Ein runder und hypertropher Phänotyp ist somit an den Differenzierungsstatus der Zellen gekoppelt und eine Voraussetzung für die erfolgreiche chondrogene Differenzierung von Stammzellen, wie ASCs [196]. Dieser Umstand wird deutlich wenn man berücksichtigt, dass Chondrozyten in einer Monolayer Zellkultur dedifferenzieren und einen Fibroblasten-artigen Phänotyp ausbilden [197,198]. Dieser Prozess wird durch eine Herunterregulierung der chondrogenen Marker Aggrecan und Kollagen Typ II begleitet und kann bei der Kultivierung in einer dreidimensionalen Umgebung, die eine kugelförmige Morphologie der Zellen zulässt, wieder rückgängig gemacht werden [199,200]. Dies bezeichnet man als Redifferenzierung von Zellen.

Besonders der Rundungsgrad der Zellen scheint somit für das Erlangen und Beibehalten eines Chondrozyten-typischen Phänotypus entscheidend und kann durch die Porenmorphologie eines Scaffolds gezielt beeinflusst werden. Zanetti *et al.* entdeckte im Jahr 1984, dass Cytochalasin D, ein Inhibitor der Polymerisation von Aktin, zur Redifferenzierung von dedifferenzierten Chondrozyten führt [200,201]. Dies ist auf eine Unterbrechung des Aktin Zytoskelettes zurückzuführen und wird von einer Hochregulierung der chondrogenen Marker (Kollagen Typ II, Aggrecan) begleitet. Die Form und Spannung des Zytoskelettes kann also gezielt die Entwicklung von Stammzellen beeinflussen [194,195]. Die Rho A/ Rho A Kinase (ROCK) vermittelte Signalkaskade, wurde als molekularer Mechanismus hinter diesem Phänomen identifiziert [194,202,203].

Eine runde Porengröße kann somit durch eine mechanostrukturelle Beeinflussung des Zytoskelettes von Stammzellen zur Chondrogenese beitragen. Oh *et al.* konnte dies anschaulich in einer Studie mit Porengröße-Gradienten-Scaffolds demonstrieren: eine runde Porengröße ermöglichte die beste Umgebung zur chondrogenen Differenzierung von ASCs in einem PCL-Scaffold [175,204].

Die größere und vor allem rundere Form der Poren in der zentralen Zone von dpNSK, bietet somit eine plausible Erklärung für die erhöhte Produktion einer knorpeltypischen Matrix und der Hochregulierung von Hypertrophie und terminalen chondrogenen

Differenzierungsmarkern der ASCs in dieser Lokalisation. Naheliegender ist, dass dies auf Rho A/ ROCK vermittelte Veränderung des Aktin Zytoskelettes zurückzuführen ist, wobei der molekulare Hintergrund in Folgestudien noch genauer untersucht werden muss.

5.3.5.4. Einfluss der EZM-Zusammensetzung

Die Zusammensetzung der EZM-Komposition ist ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen den Zonen des NSK. Da die Matrixkomposition während des Dezellularisierungsprozesses des Scaffolds nur minimal verändert wird, kann somit von einem höheren Gehalt an Kollagen Typ II in der superfiziellen Zone von dpNSK ausgegangen werden [32,68,134]. Zudem ist das Alter des Kollagen an dieser Stelle am jüngsten und nimmt mit tieferen Matrixschichten zu [32]. Die Frage ist somit, inwiefern Kollagen Typ II und weitere EZM Bestandteile (u.a. COMP, Matrilin-3, GAGs) das Verhalten von Stammzellen beeinflussen und dirigieren können. Dabei muss jedoch zwischen der 3D-Struktur der Inhaltsstoffe und den Inhaltsstoffen selbst differenziert werden.

Dies lässt sich anschaulich an dem Beispiel von Composite-Scaffolds darstellen. Sogenannte Composite-Scaffolds sind Hybridmaterialien die klassischerweise eine Kombination aus nativer EZM und einem Kunststoff darstellen [179]. Die EZM wird zerkleinert und in das Kunststoffgerüst eingebracht. Somit geht der Großteil der dreidimensionalen EZM-Struktur verloren und man erhofft sich von den EZM-Inhaltsstoffen (Proteine, Wachstumsfaktoren und andere Morphogene) eine Optimierung des Tissue Engineering Prozesses [163,179].

Wiggenhauser *et al.* konnte in einer vorherigen Studie zeigen, dass ein Composite-Scaffold aus PCL und zerkleinertem dpNSK eine höhere GAG Produktion von Chondrozyten unterstützen, als die beiden Scaffold-Komponenten jeweils für sich genommen. Zudem konnte in dem PCL/dpNSK Scaffold die Ossifikation des Konstruktes im Vergleich zu reinen PCL Scaffolds reduziert werden [163]. Dies spricht für einen positiven Effekt der EZM-Inhaltsstoffe auf die Chondrogenese und das Schicksal von Zellen. Allerdings wurde bei der Herstellung dieser Composite-Scaffold die dpNSK-Struktur nicht vollständig zerstört, ein begleitender Effekt der Porengröße und Morphologie kann somit nicht vollständig ausgeschlossen werden [163].

Zudem konnte Lu *et al.* demonstrieren, dass regulatorische Veränderungen der ASCs auf Kollagen Typ II Scaffolds in Richtung Chondrogenese von einer *Rock2* Herunterregulierung begleitet wurden, was mit einer Rundung der Zellform assoziiert ist [203]. Dies impliziert das das wichtigste Signal, das zu Veränderungen in der Zellmorphologie und somit zur Differenzierung führt, die 3D-Struktur der EZM-Bestandteile und nicht die Bestandteile an sich sind.

Zusammengefasst sind sowohl die 3D-Struktur, als auch die einzelnen Inhaltsstoffe der EZM Teil des komplexen Interaktionsnetzwerkes zwischen Zellen und Matrix. Die runde

Porenmorphologie der zentralen Zone scheint jedoch der wichtigste Stimulator für die fortgeschrittene Chondrogenese von ASCs an dieser Lokation von dpNSK zu sein.

5.3.5.5. *Ausblick und Limitierungen*

Es existieren viele verschiedene und vielversprechende Ansätze, die die Herstellung eines Knorpelersatzmaterials, durch die Kombination eines Scaffoldes und einer Zellquelle zum Ziel haben [127]. Jedoch wird die zonale Struktur des zu imitierenden Gewebes fast immer vernachlässigt [205].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben erste Hinweise darauf, das Stammzell-Eigenschaften gezielt durch Matrixzonen des NSK beeinflusst werden können und das Zellschicksal nach der Rezellularisierung einen unterschiedlichen zonen-spezifischen Verlauf nimmt. Die Adaptation von Chondrozyteneigenschaften der ASCs durch die Interaktion mit einer bestimmten PZM, könnte gezielt dazu genutzt werden um zukünftige Tissue Engineering Prozesse zu optimieren. So ist die EZM der zentralen Zone von dpNSK mehr dazu geeignet eine effizientere Chondrogenese von ASCs anzuregen, während die superfizielle Zone primär die Zellproliferation unterstützt.

Eine Scaffold-Materialgruppe mit großem klinischen Potential, die von diesen Erkenntnissen profitieren kann, ist die Gruppe der Hydrogele. Hydrogele können aus EZM-Verbindungen hergestellt werden und aufgrund ihrer Gelstruktur per Injektion an die gewünschte Lokalisation in den Körper eingebracht werden ohne die Tatsache, dass eine Operation notwendig wird [63,206,207]. Zwar waren erste Experimente zur Herstellung eines Hydrogels aus dpNSK noch nicht erfolgreich, allerdings ist es Burns *et al.* gelungen aus Artikular- und Aurikularknorpel vom Schwein und Haischädelknorpel ein Hydrogel herzustellen, das die Chondrogenese von MSCs ohne die Supplementierung weiterer Wachstumsfaktoren unterstützt hat [163,208]. Die Herstellung von Hydrogelen aus den unterschiedlichen Matrixzonen von dpNSK könnte somit potentiell als Modulator von Stammzeleigenschaften Verwendung finden dessen Funktion auf den EZM-Inhaltsstoffen beruht.

Zudem gibt es die Möglichkeit, die Unterschiede in der 3D-Struktur (Porengröße und Morphologie) der Zonen mittels Biofabrikationstechniken auf künstliche Polymerverbindungen zu übertragen. Die Schicht-für-Schicht („Layer-by-Layer“) Technik von Fused-Deposition-Modelling-basierten 3D-Druckern ermöglicht die Herstellung von physischen Gradienten, zu der die Porengröße und Substratsteifheit zählen [209,210]. Dies kann als Werkzeug verwendet werden, um das Gerüst des nativen Gewebes suffizienter zu imitieren und so das Schicksal der eingesäten Zellquelle gezielt zu beeinflussen [175,209].

Eine Verbindung dieser beiden Techniken könnte in Zukunft zur Herstellung eines Composite-Scaffold beitragen, das sich aus einem Kunststoffmaterial mit Porengrößengradienten und einer zonen-spezifischen Hydrogel Beschichtung zusammensetzt. Mit dieser Methode könnte ein sehr hoher Grad an Biomimikry erreicht werden und eine zielgerichtete Regeneration von Knorpelgewebe ermöglicht werden. Allerdings sind vorerst weitere *in vitro* und *in vivo* Studien notwendig, um die Handhabung und Durchführbarkeit eines solchen Projektes zu evaluieren.

6. Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es, dpNSK mit humanen ASCs zu kultivieren und die Interaktionen zwischen Zellen und Matrix im Hinblick auf die Eignung als potentielles Knorpelersatzmaterial *in vitro* zu evaluieren. Zudem wurden die verschiedenen histologische Zonen des dpNSK gezielt besiedelt und zonen-spezifischen Interaktionen zwischen deren Matrix und den Stammzellen untersucht. Nach bestem Wissen und Gewissen wurden diese Fragestellungen nie zuvor bearbeitet.

DpNSK konnte als geeignetes Habitat für ASCs identifiziert werden, das *in vitro* Potential zur Knorpelregeneration des NSK gezeigt hat. Die Stammzellen zeigten dabei vergleichbare Eigenschaften wie humane Chondrozyten in vorherigen Studien und stellen somit eine potentielle alternative Zellquelle oder einen möglichen Partner für eine Co-Kultur für chondrogene Tissue Engineering Applikationen mit dezellularisierten EZM-Verbindungen dar. Allerdings ist eine Erhöhung der Porosität von dpNSK notwendig, um eine effizientere Migration der Zellen in tiefere Zonen des Scaffolds zu ermöglichen.

Zudem konnte demonstriert werden, dass das Schicksal der ASCs durch die zonale 3D-Architektur und die Zusammensetzung der EZM-Makromoleküle des Scaffolds in unterschiedliche Richtungen beeinflusst werden kann. Weitere Studien sind notwendig, um die ausschlaggebenden Faktoren in der Matrixorganisation zu identifizieren, um so langfristig gesehen den Herstellungsprozess eines biomimetischen Knorpelersatzmaterials zu verbessern.

Zusammenfassend konnten aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit folgende neue Erkenntnisse gewonnen werden:

- Die Besiedlung von dpNSK mit ASCs ist möglich und das Scaffold stellt ein biokompatibles Habitat für ASCs dar, das Zelladhäsion und -proliferation ermöglicht.
- Die Porengröße der superfiziellen Zone von dpNSK ist zu klein um eine suffiziente Invasion von ASCs in tiefere Schichten zu ermöglichen. Um eine bessere Durchwanderung des Scaffolds zu gewährleisten, muss die Porosität dieser Zone erhöht werden.
- Unter der Stimulation mit chondrogenen Wachstumsfaktoren produzieren ASCs auf dpNSK Bestandteile einer Knorpelmatrix.
- Die superfizielle Zone von dpNSK unterstützt die Proliferation von ASCs stärker als die zentrale Zone.
- Die Besiedlung der zentralen Zone von dpNSK ermöglicht eine suffizientere Zellinvasion von dpNSK im Vergleich zu der superfiziellen Zone.

- Unter der Stimulation mit chondrogenen Wachstumsfaktoren unterstützt die zentrale Zone von dpNSK die Hypertrophie und Produktion von Knorpelmatrix-Bestandteilen von ASCs stärker als die superfizielle Zone.
- ASCs adaptieren einige zonen-spezifische Zelleigenschaften des NSK, durch die Interaktion mit der dezellularisierten EZM von Chondrozyten.

Weitere *in vivo* Studien sind notwendig um die Eignung von ASCs/dpNSK, als Knorpelersatzmaterial für die plastisch-rekonstruktive Rhinochirurgie zu beurteilen. Bis dahin stellt dpNSK ein interessantes Modell dar, um die komplexe Natur von Zell-Matrix Interaktionen intensiver zu untersuchen.

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

- 1 DeRosa J. Does the Nose Have a Function beyond Breathing? *Facial Plast Surg* 2016; 32: 9–16
- 2 Patel RG. Nasal Anatomy and Function. *Facial Plast Surg* 2017; 33: 3–8
- 3 Oneal RM, Beil RJ. Surgical Anatomy of the Nose. *Clin Plast Surg* 2010; 37: 191–211 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cps.2009.12.011>
- 4 Mowlavi A.; Masouem S.; Kalkanis J.; Guyuron B. Septal Cartilage Defined : Implications for Nasal Dynamics and Rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117: 2171–2174
- 5 Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2012; 166: 1069–1080
- 6 Devine C, Srinivasan B, Sayan A, Ilankovan V. Epidemiology of basal cell carcinoma : a 10-year comparative study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2018; 56: 101–106 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2017.11.018>
- 7 Dennis P. Kim, Kylee J.B. Kus ER. Basal cell carcinoma review. *Hematol Oncol Clin North Am* 2019; 33: 13–24
- 8 Lai V, Hons M, Cranwell W, Hons M, Hons B, Sinclair R. Epidemiology of skin cancer in the mature patient. *Clin Dermatol* 2018; 36: 167–176 Im Internet: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.10.008>
- 9 Demers AA, Nugent Z, Mihalcioiu C, Wiseman MC, Kliwer E V. Trends of nonmelanoma skin cancer from 1960 through 2000 in a Canadian population. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 320–328
- 10 Mendez BM, Thornton JF. Current basal and squamous cell skin cancer management. *Plast Reconstr Surg* 2018; 142: 373E-387E
- 11 Vogt PM, Gohritz A, Haubitz M, Steiert A. Reconstruction of Nasal Deformity in Wegener ' s Granulomatosis : Contraindication or Benefit ? *Aesthetic Plast Surg* 2011; 35: 156–161
- 12 Hofmann SMLVM, Iii GSH, Albers DJMAE. Saddle nose deformity and septal perforation in granulomatosis with polyangiitis. *Aesthetic Plast Surg* 2018; 43: 291–299
- 13 Prasad, Bipin Kishore; Mokamati S. Archives of Otolaryngology and Rhinology Tertiary Nasal Syphilis : Rare But Still a Reality. *Arch Otolaryngol Rhinol* 2016; 2: 13–15

- 14 Walker A, Joshi DA, Orl-hns F, Souza AD, Oto F, Orl-hns F. Care of the Cocaine User with Nasal Deformity. *Facial Plast Surg* 2017; 1: 411–418
- 15 Trimarchi M, Miluzio A, Sc M, Nicolai P, Morassi ML, Bussi M, Marchisio PC. Massive apoptosis erodes nasal mucosa of cocaine abusers. *Am J Rhinol Allergy* 2006; 20: 160–164
- 16 Rohrich RJ, Ahmad J. A Practical Approach to Rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg* 2016; 137: 725e–746e
- 17 Ohara K, Nakamura K, Ohta E. Chest wall deformities and thoracic scoliosis after costal cartilage graft harvesting. *Plast Reconstr Surg* 1997;
- 18 Rettinger G. Risiken und Komplikationen der Rhinoplastik. *Laryngo-Rhino-Otologie* 2007; 86: 40–54
- 19 Goldberg-Bockhorn E, Schwarz S, Elsässer A, Seitz A, Körber L, Dürselen L, Ignatius A, Feldmann EM, Scheithauer M, Breiter R, Rotter N. Physikalische Charakterisierung dezellularisierter Knorpelmatrix zur Anwendung in der Rhinochirurgie. *Laryngorhinootologie* 2014; 93: 756–763
- 20 Jang TY, Choi JY, Jung DH, Park HJ, Lim SC. Histologic study of Gore-Tex removed after rhinoplasty. *Laryngoscope* 2009; 119: 620–627
- 21 Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie (4. Auflage). Thieme Verlag 2012
- 22 Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol* 2014; 39: 25–32 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.009>
- 23 Duynstee MLG, Verwoerd-Verhoef HL, Verwoerd CDA, Van Osch GJVM. The dual role of perichondrium in cartilage wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2002; 110: 1073–1079
- 24 Maroudas A BP. Permeability of articular cartilage. *Nature*. *Nature* 1968; 219: 1260–1261
- 25 Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noël D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 2009; 27: 307–314
- 26 Muttigi MS, Kim BJ, Choi B, Yoshie A, Kumar H, Han I, Park H, Lee SH. Matrilin-3 codelivery with adipose-derived mesenchymal stem cells promotes articular cartilage regeneration in a rat osteochondral defect model. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12: 667–675
- 27 Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc* 2010; 18: 419–433
- 28 Benninghoff A. Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen Zur Funktion. Zweiter Teil: der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. 1925; 2: 783–862

- 29 Alexopoulos LG, Setton LA, Guilak F. The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage. *Acta Biomater* 2005; 1: 317–325
- 30 Gao Y, Liu S, Huang J, Guo W, Chen J, Zhang L, Zhao B, Peng J, Wang A, Wang Y, Xu W, Lu S, Yuan M, Guo Q. The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 1–8
- 31 Neskey D, Eloy JA, Casiano RR. Nasal, Septal, and Turbinate Anatomy and Embryology. *Otolaryngol Clin North Am* 2009; 42: 193–205 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otc.2009.01.008>
- 32 Popko M, Bleys RLAW, De Groot JW, Huizing EH. Histological structure of the nasal cartilages and their perichondrial envelope. I. The septal and lobular cartilage. *Rhinology* 2007; 45: 148–152
- 33 Wigganhauser PS, Schwarz S, Rotter N. The distribution patterns of COMP and matrilin-3 in septal, alar and triangular cartilages of the human nose. *Histochem Cell Biol* 2018; 150: 291–300 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-018-1672-y>
- 34 Homicz MR, McGowan KB, Lottman LM, Beh G, Sah RL, Watson D. A compositional analysis of human nasal septal cartilage. *Arch Facial Plast Surg* 2003; 5: 53–58
- 35 Kafienah W, Jakob M, Démarteanu O, Frazer A, Barker MD, Martin I, Hollander AP. Three-Dimensional Tissue Engineering of Hyaline Cartilage: Comparison of Adult Nasal and Articular Chondrocytes. *Tissue Eng* 2002;
- 36 Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Kimura JH, Hunziker EB. Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *J Orthop Res* 1992; 10: 745–758
- 37 Üstünel I, Çaylı S, Güney K, Çelik-özenci Ç, Tanrıöver G, Zeliha S. Immunohistochemical distribution patterns nasal cartilage. 2003; 105: 109–114
- 38 Tas J. The Alcian blue and combined Alcian blue--Safranin O staining of glycosaminoglycans studied in a model system and in mast cells. *Histochem J* 1977; 9: 205–230
- 39 Marti C, Neidhart M, Gerber T, Hauser N, Michel BA, Häuselmann HJ. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP): Die rolle eines nichtkollagenen knorpel-matrix-proteins als marker der krankheitsaktivitat und gelenkerstörung bei patienten mit rheumatoider arthritis und arthrose. *Z Rheumatol* 1999; 58: 79–87
- 40 Posey KL, Coustry F, Hecht JT. Cartilage oligomeric matrix protein: COMPopathies and beyond. *Matrix Biol* 2018; 71–72: 161–173 Im Internet: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.023>
- 41 Klatt AR, Klinger G, Paul-Klausch B, Kühn G, Renno JH, Wagener R, Paulsson M, Schmidt J, Malchau G, Wielckens K. Matrilin-3 activates the expression of osteoarthritis-associated genes in primary human chondrocytes. *FEBS Lett* 2009; 583: 3611–3617 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.035>

- 42 Nicolae C, Ko YP, Miosge N, Niehoff A, Studer D, Enggist L, Hunziker EB, Paulsson M, Wagener R, Aszodi A. Abnormal collagen fibrils in cartilage of matrilin-1/matrilin-3-deficient mice. *J Biol Chem* 2007; 282: 22163–22175
- 43 Wigganhauser PS, Schwarz S, Freutel M, Koerber L, Wolf N, Dürselen L, Rotter N. Differences between human septal and alar cartilage with respect to biomechanical features and biochemical composition. *J Mech Behav Biomed Mater* 2019; 96: 236–243 Im Internet: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.04.048>
- 44 Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2014; 1840: 2506–2519 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.010>
- 45 Hynes RO. Extracellular matrix: not just pretty fibrils Richard. *Science* (80-) 2009; 326: 1216–1219
- 46 Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 2012; 196: 395–406
- 47 Mammoto T, Ingber DE. Mechanical control of tissue and organ development. *Development* 2010; 137: 1407–1420
- 48 Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 2006; 126: 677–689
- 49 Khoshgoftar M, Torzilli PA, Maher SA. Influence of the pericellular and extracellular matrix structural properties on chondrocyte mechanics. *J Orthop Res* 2018; 36: 721–729
- 50 Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vécsei V, Schlegel J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthr Cartil* 2002; 10: 62–70
- 51 Schwarz RI. Collagen I and the fibroblast: High protein expression requires a new paradigm of post-transcriptional, feedback regulation. *Biochem Biophys Reports* 2015; 3: 38–44 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.07.007>
- 52 Caron MMJ, Emans PJ, Coolsen MME, Voss L, Surtel DAM, Cremers A, van Rhijn LW, Welting TJM. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: Comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthr Cartil* 2012; 20: 1170–1178 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.016>
- 53 von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977; 267: 531–532
- 54 Avenoso A, D'Ascola A, Scuruchi M, Mandraffino G, Calatroni A, Saitta A, Campo S, Campo GM. Hyaluronan in the experimental injury of the cartilage: biochemical action and protective effects. *Inflamm Res* 2018; 67: 5–20

- 55 Roman-Blas JA, Jimenez SA. NF- κ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthr Cartil* 2006; 14: 839–848
- 56 Guilak F, Nims RJ, Dicks A, Wu CL, Meulenbelt I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biol* 2018; 71–72: 40–50 Im Internet: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.05.008>
- 57 Guilak F, Nims RJ, Dicks A, Wu CL, Meulenbelt I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biol* 2018; 71–72: 40–50
- 58 Folkman J, Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature* 1978; 273: 345–349
- 59 Ingber D. Integrins As mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3: 841–848
- 60 Paschos, Nikolaos K; Brown, Wendy E; Eswaramoorthy, Rajalakshmanan; Hu, Jerry C; Athanasiou KA. Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. *J Tissue Eng Regen Med* 2015; 9: 488–503
- 61 Stupack DG, Cheresh DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002; 115: 3729–3738 Im Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235283>
- 62 Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science* (80-) 1993; 260
- 63 Rotter N, Bücheler M, Haisch A, Wollenberg B, Lang S. Cartilage tissue engineering using resorbable scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1: 411–416
- 64 Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. In: *Journal of Pediatric Surgery*. 2016
- 65 Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006; 367: 1241–1246
- 66 Atala A, Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 149–155
- 67 Wigganhauser PS, Schantz JT, Rotter N. Cartilage engineering in reconstructive surgery: Auricular, nasal and tracheal engineering from a surgical perspective. *Regen Med* 2017; 12: 303–314
- 68 Schwarz S, Koerber L, Elsaesser AF, Goldberg-Bockhorn E, Seitz AM, Dürselen L, Ignatius A, Walther P, Breiter R, Rotter N. Decellularized Cartilage Matrix as a Novel Biomatrix for Cartilage Tissue-Engineering Applications. *Tissue Eng Part A* 2012; 18: 2195–2209 Im Internet: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2011.0705>
- 69 Elsaesser AF, Bermueller C, Schwarz S, Koerber L, Breiter R, Rotter N. *In Vitro* Cytotoxicity and *In Vivo* Effects of a Decellularized Xenogeneic Collagen Scaffold in Nasal Cartilage Repair. *Tissue Eng Part A* 2014; 20: 1668–1678 Im Internet: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2013.0365>

- 70 von Bomhard A, Elsaesser A, Riepl R, Pippich K, Faust J, Schwarz S, Koerber L, Breiter R, Rotter N. Cartilage regeneration using decellularized cartilage matrix: Long-term comparison of subcutaneous and intranasal placement in a rabbit model. *J Cranio-Maxillofacial Surg* 2019; 47: 682–694 Im Internet: <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2019.01.010>
- 71 Ahmed T, Hincke MT. *Stem Cells and Cancer Stem Cells, Volume 10. Stem Cells Cancer Stem Cells, Vol 10* 2013;
- 72 Manning WK, Bonner WM. Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1967; 10: 235–239
- 73 Vedicherla S, Buckley CT. Rapid Chondrocyte Isolation for Tissue Engineering Applications: The Effect of Enzyme Concentration and Temporal Exposure on the Matrix Forming Capacity of Nasal Derived Chondrocytes. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 1–12
- 74 Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkwicz A. Adult stem cells: Hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol* 2015; 62: 329–337
- 75 Weissman IL. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157–168
- 76 Damdimopoulou P, Rodin S, Stenfelt S, Antonsson L, Tryggvason K, Hovatta O. Human embryonic stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2016; 31: 2–12 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.08.010>
- 77 Zuk PA. The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead. *Mol Biol Cell* 2010; 21: 1783–1787
- 78 Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963; 197: 452–454
- 79 Friedenstein AJ, Petrakova K V, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6: 230–247
- 80 Brown SA, Levi B, Lequex C, Wong VW, Mojallal A, Longaker MT. Basic science review on adipose tissue for clinicians. *Plast Reconstr Surg* 2010; 126: 1936–1946
- 81 Gugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E. Mesenchymal stem cells: A potential therapeutic approach for amyotrophic lateral sclerosis? *Stem Cells Int* 2019; 2019
- 82 Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279–4295
- 83 Puglisi MA, Saulnier N, Piscaglia AC, Tondi P, Agnes S, Gasbarrini A. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and hepatic differentiation: Old concepts and future perspectives. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15: 355–364
- 84 Cvoro A, Bajic A, Zhang A, Simon M, Golic I, Sieglaff DH, Maletic-Savatic M, Korac

- A, Webb P. Ligand independent and subtype-selective actions of thyroid hormone receptors in human adipose derived stem cells. *PLoS One* 2016; 11: 1–27
- 85 Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R, Storch A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 4411–4422
- 86 Suva D, Garavaglia G, Menetrey J, Chapuis B, Hoffmeyer P, Bernheim L, Kindler V. Non-Hematopoietic Human Bone Marrow Contains Long-Lasting, Pluripotential Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Physiol* 2004; 198: 110–118
- 87 Alt EU, Winnier G, Haenel A, Rothoerl R, Solakoglu O, Alt C, Schmitz C. Towards a Comprehensive Understanding of UA-ADRCs (Uncultured, Autologous, Fresh, Unmodified, Adipose Derived Regenerative Cells, Isolated at Point of Care) in Regenerative Medicine. *Cells* 2020; 9
- 88 Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64: 278–294
- 89 Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997; 6: 125–134
- 90 Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998; 16: 406–413
- 91 Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* (80-) 1998; 279: 1528–1530
- 92 Giai Via A, Frizziero A, Oliva F. Biological properties of mesenchymal stem cells from different sources. *Muscles Ligaments Tendons J* 2012; 2: 154–162
- 93 Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Ichinose S, Shinomiya K, Muneta T. Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates. *Blood* 2004; 104: 2728–2735
- 94 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211–228
- 95 Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2007; 327: 449–462
- 96 De Bari C, Dell’Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1928–1942

- 97 Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294–1301
- 98 Öksüz S, Ülkür E, Öncül O, Köse GT, Küçükodac Z, Urhan M. The effect of subcutaneous mesenchymal stem cell injection on stasis zone and apoptosis in an experimental burn model. *Plast Reconstr Surg* 2013; 131: 463–471
- 99 Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008; 103: 1204–1219
- 100 English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2013; 91: 19–26
- 101 Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005; 129: 118–129
- 102 Jones DL, Wagers AJ. No place like home: Anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 11–21
- 103 Guneta V, Zhou Z, Tan NS, Sugii S, Wong MTC, Choong C. Recellularization of decellularized adipose tissue-derived stem cells: Role of the cell-secreted extracellular matrix in cellular differentiation. *Biomater Sci* 2018; 6: 168–178
- 104 Brizzi MF, Tarone G, Defilippi P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr Opin Cell Biol* 2012; 24: 645–651 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2012.07.001>
- 105 Chia CT, Neinstein RM, Theodorou SJ. Evidence-Based Medicine: Liposuction. *Plast Reconstr Surg* 2017; 139: 267e-274e
- 106 Housman TS, Lawrence N, Mellen BG, George MN, San Filippo J, Cerveny KA, DeMarco M, Feldman SR, Fleischer AB. The safety of liposuction: Results of a national survey. *Dermatologic Surg* 2002; 28: 971–978
- 107 Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. Cytotherapy 2013; 15: 641–648 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>
- 108 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;
- 109 Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 2724–2752

- 110 Li CY, Wu XY, Tong JB, Yang XX, Zhao JL, Zheng QF, Zhao G Bin, Ma ZJ. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6 Im Internet: ???
- 111 Nakao M, Inanaga D, Nagase K, Kanazawa H. Characteristic differences of cell sheets composed of mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Regen Ther* 2019; 11: 34–40 Im Internet: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.01.002>
- 112 Mazini L, Rochette L, Amine M, Malka G. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). : 1–30
- 113 Wankhade UD, Shen M, Kolhe R, Fulzele S. Advances in Adipose-Derived Stem Cells Isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 1–9
- 114 Huang SJ, Fu RH, Shyu WC, Liu SP, Jong GP, Chiu YW, Wu HS, Tsou YA, Cheng CW, Lin SZ. Adipose-derived stem cells: Isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell Transplant* 2013; 22: 701–709
- 115 Strong AL, Cederna PS, Rubin JP, Coleman SR, Levi B. The Current state of fat grafting: A review of harvesting, processing, and injection techniques. *Plast Reconstr Surg* 2015; 136: 897–912
- 116 Varghese J, Griffin M, Mosahebi A, Butler P. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8: 45
- 117 Taha S, Saller MM, Haas E, Farkas Z, Aszodi A, Giunta R, Volkmer E. Adipose-derived stem/progenitor cells from lipoaspirates: A comparison between the Lipivage200-5 liposuction system and the Body-Jet liposuction system. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg* 2019; 1–10
- 118 Wahl EA, Schenck TL, Machens HG, Egaña JT. Acute stimulation of mesenchymal stem cells with cigarette smoke extract affects their migration, differentiation, and paracrine potential. *Sci Rep* 2016; 6: 1–9 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1038/srep22957>
- 119 Frazier TP, Gimble JM, Devay JW, Tucker HA, Chiu ES, Rowan BG. Body mass index affects proliferation and osteogenic differentiation of human subcutaneous adipose tissue-derived stem cells. *BMC Cell Biol* 2013; 14
- 120 Ma N, Qiao C, Zhang W, Luo H, Zhang X, Liu D, Zang S, Zhang L, Bai J. Original Research: Adipose-derived stem cells from younger donors, but not aging donors, inspire the host self-healing capability through its secreta. *Exp Biol Med* 2017; 242: 68–79
- 121 Kuhlmann C, Schenck TL, Haas EM, Giunta R, Wiggerhauser PS. Eine aktuelle Übersicht über die Einflussfaktoren der Stammzellspender auf das regenerative Potential von Fettgewebstammzellen. *Handchirurgie · Mikrochirurgie · Plast Chir* 2020; 52: 521–532 Im Internet: <http://www.thieme->

- connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-1250-7878
- 122 Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2016; 64: 443–454
- 123 Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomater Silver Jubil Compend* 2006; 21: 175–189
- 124 Westreich RW, Courtland H-W, Nasser P, Jepsen K, Lawson W. Defining Nasal Cartilage Elasticity. *Arch Facial Plast Surg* 2007; 9: 264–270
- 125 Griffin MF, Premakumar Y, Seifalian AM, Szarko M, Butler PEM. Biomechanical Characterisation of the Human nasal cartilages; Implications for Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng* 2016; 44: 3460–3467
- 126 Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mater Res* 1997; 34: 211–220 *Im Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9029301>*
- 127 Lavernia L, Brown WE, Wong BJF, Hu JC, Athanasiou KA. Acta Biomaterialia Toward tissue-engineering of nasal cartilages. *Acta Biomater* 2019; 88: 42–56 *Im Internet: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.025>*
- 128 Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *CELL Dev Biol* 2002; 13: 377–383
- 129 Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol* 2004; 12: 367–377
- 130 Stone KR, Ayala G, Goldstein J, Hurst R, Walgenbach A, Galili U. Porcine cartilage transplants in the cynomolgus monkey. III. Transplantation of α -galactosidase-treated porcine cartilage. *Transplantation* 1998; 65: 1577–1583
- 131 Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 1994; 15: 451–456
- 132 Breiter R, Körber L SS. Collagen implant. Patent Application WO/2010/108945. 2010;
- 133 Gonçalves AC, Griffiths LG, Anthony R V, Orton EC. Decellularization of bovine pericardium for tissue-engineering by targeted removal of xenoantigens. *J Heart Valve Dis* 2005; 14: 212–217
- 134 Schwarz S, Elsaesser AF, Koerber L, Goldberg-Bockhorn E, Seitz AM, Bermueller C, Dürselen L, Ignatius A, Breiter R, Rotter N. Processed xenogenic cartilage as innovative biomatrix for cartilage tissue engineering: Effects on chondrocyte differentiation and function. *J Tissue Eng Regen Med* 2015; 9
- 135 Si Z, Wang X, Sun C, Kang Y, Xu J, Wang X, Hui Y. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomed Pharmacother* 2019; 114: 108765 *Im Internet:*

- <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108765>
- 136 Alberton P, Popov C, Prägert M, Kohler J, Shukunami C, Schieker M, Docheva D. Conversion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into tendon progenitor cells by ectopic expression of scleraxis. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 846–858
- 137 Saller MM, Prall WC, Docheva D, Schönitzer V, Popov T, Anz D, Clausen-Schaumann H, Mutschler W, Volkmer E, Schieker M, Polzer H. Increased stemness and migration of human mesenchymal stem cells in hypoxia is associated with altered integrin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 423: 379–385 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.134>
- 138 Wiggerhauser PS, Kuhlmann C, Blum J, Giunta RE, Schenck T. Influence of software parameters on measurements in automatized image-based analysis of fat tissue histology. *Acta Histochem* 2020; 122: 151537 Im Internet: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151537>
- 139 Alberton P, Dex S, Popov C, Shukunami C, Schieker M, Docheva D. Loss of Tenomodulin Results in Reduced Self-Renewal and Augmented Senescence of Tendon Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells Dev* 2015; 24: 597–609 Im Internet: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2014.0314>
- 140 Boyd V, Cholewa OM, Papas KK. Limitations in the Use of Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide (FDA/PI) and Cell Permeable Nucleic Acid Stains for Viability Measurements of Isolated Islets of Langerhans. *Curr Trends Biotechnol Pharm* 2008; 2: 66–84 Im Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814586>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2931281>
- 141 Gray DW, Morris PJ. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. *Stain Technol* 1987; 62: 373–381
- 142 Bonnier F, Keating ME, Wróbel TP, Majzner K, Baranska M, Garcia-Munoz A, Blanco A, Byrne HJ. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol Vitro* 2015; 29: 124–131 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.014>
- 143 Nasrollahzadeh N, Applegate LA, Pioletti DP. Development of an Effective Cell Seeding Technique: Simulation, Implementation, and Analysis of Contributing Factors. *Tissue Eng Part C Methods* 2017; 23: 485–496
- 144 McGowan KB, Kurtis MS, Lottman LM, Watson D, Sah RL. Biochemical quantification of DNA in human articular and septal cartilage using PicoGreen® and Hoechst 33258. *Osteoarthr Cartil* 2002; 10: 580–587
- 145 Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefière V, Caruelle JP, Martelly I, Papy-García D. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* 2003; 13: 647–653
- 146 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome*

- Res 1996; 6: 986–994
- 147 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001; 25: 402–408
- 148 RNeasy Lipid Tissue Mini Handbook - QIAGEN. Im Internet: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=7f13ac1a-841d-4e9b-b39d-42fe71b3d585&lang=en> (Zuletzt angerufen am 10.09.2020)
- 149 Chomzynski, P.; Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–159 Im Internet: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269787699999>
- 150 innuMIX qPCR DSGreen Standard - Analytik Jena. Im Internet: https://www.analytik-jena.fr/fileadmin/content/pdf_life_science/Manual/Manual_innuMIX_qPC_DSGreen_Standard_web_en.pdf (Zuletzt angerufen am 10.10.2020)
- 151 Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung Michael. *Biospektrum* 2004; 01/04: 92–95
- 152 Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3: 705–713 Im Internet: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.3.5.705>
- 153 Mumme M, Barbero A, Miot S, Wixmerten A, Feliciano S, Wolf F, Asnaghi AM, Baumhoer D, Bieri O, Kretzschmar M, Pagenstert G, Haug M, Schaefer DJ, Martin I, Jakob M. Nasal chondrocyte-based engineered autologous cartilage tissue for repair of articular cartilage defects: an observational first-in-human trial. *Lancet* 2016; 388: 1985–1994 Im Internet: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31658-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31658-0)
- 154 Trojahn Kølle SF, Oliveri RS, Glovinski PV, Elberg JJ, Fischer-Nielsen A, Drzewiecki KT. Importance of mesenchymal stem cells in autologous fat grafting: A systematic review of existing studies. *J Plast Surg Hand Surg* 2012; 46: 59–68
- 155 Maclsaac ZM, Shang H, Agrawal H, Yang N, Parker A, Katz AJ. Long-term in-vivo tumorigenic assessment of human culture-expanded adipose stromal/stem cells. *Exp Cell Res* 2012; 318: 416–423
- 156 Vilalta M, Décano IR, Bagó J, Gould D, Santos M, García-Arranz M, Ayats R, Fuster C, Chernajovsky Y, García-Olmo D, Rubio N, Blanco J. Biodistribution, long-term survival, and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplanted in nude mice by high sensitivity non-invasive bioluminescence imaging. *Stem Cells Dev* 2008; 17: 993–1003
- 157 Kemmis CM, Vahdati A, Weiss HE, Wagner DR. Bone morphogenetic protein 6 drives both osteogenesis and chondrogenesis in murine adipose-derived mesenchymal cells depending on culture conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 401: 20–25 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.135>

- 158 Ruhl T, Beier JP. Quantification of chondrogenic differentiation in monolayer cultures of mesenchymal stromal cells. *Anal Biochem* 2019; 582: 3–8
- 159 Yu DA, Han J, Kim BS. Stimulation of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int J Stem Cells* 2012; 5: 16–22
- 160 Liou JJ, Rothrauff BB, Alexander PG, Tuan RS. Effect of Platelet-Rich Plasma on Chondrogenic Differentiation of Adipose- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng - Part A* 2018; 24: 1432–1443
- 161 Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: Influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnol Bioeng* 2006; 93: 1152–1163
- 162 Zhang L, Su P, Xu C, Yang J, Yu W, Huang D. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: A comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol Lett* 2010; 32: 1339–1346
- 163 Wiggenhauser PS, Schwarz S, Koerber L, Hoffmann TK, Rotter N. Addition of decellularized extracellular matrix of porcine nasal cartilage improves cartilage regenerative capacities of PCL-based scaffolds in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 2019; 30: 1–10 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-019-6323-x>
- 164 Friess W. Collagen - Biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; 45: 113–136
- 165 Ernst DR, Race RE. Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *J Virol Methods* 1993; 41: 193–201
- 166 Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)* 2012; 12: 12347–12360
- 167 Twigg RS. Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. *Nature* 1945; 155: 401–402 Im Internet: <https://doi.org/10.1038/155401a0>
- 168 Rowland CR, Colucci LA, Guilak F. Fabrication of anatomically-shaped cartilage constructs using decellularized cartilage-derived matrix scaffolds. *Biomaterials* 2016; 91: 57–72 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.012>
- 169 Loh QL, Choong C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Eng Part B Rev* 2013; 19: 485–502
- 170 Ashworth JC, Mehr M, Buxton PG, Best SM, Cameron RE. Cell Invasion in Collagen Scaffold Architectures Characterized by Percolation Theory. *Adv Healthc Mater* 2015; 4: 1317–1321
- 171 Ibsirlioglu T, Elçin AE, Elçin YM. Decellularized biological scaffold and stem cells from autologous human adipose tissue for cartilage tissue engineering. *Methods*

- 2019; 0–1 Im Internet: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.04.020>
- 172 Aigner T, Stöve J. Collagens - Major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 1569–1593
- 173 Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Young G, Shortkroff S, Louie LK, Sledge CB, Yannas I V., Spector M. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials* 1997; 18: 769–776
- 174 Wu KH, Mei C, Lin CW, Yang KC, Yu J. The influence of bubble size on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells in gelatin microbubble scaffolds. *J Mater Chem B* 2017; 6: 125–132
- 175 Oh SH, Kim TH, Im G II, Lee JH. Investigation of Pore Size Effect on Chondrogenic Differentiation of Adipose Stem Cells Using a Pore Size Gradient Scaffold - Biomacromolecules (ACS Publications). *Am Chem Soc* 2010; 11: 1948–1955
- 176 Zhang ZZ, Jiang D, Ding JX, Wang SJ, Zhang L, Zhang JY, Qi YS, Chen XS, Yu JK. Role of scaffold mean pore size in meniscus regeneration. *Acta Biomater* 2016; 43: 314–326 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.07.050>
- 177 Princz S, Wenzel U, Tritschler H, Schwarz S, Dettmann C, Rotter N, Hessling M. Automated bioreactor system for cartilage tissue engineering of human primary nasal septal chondrocytes. *Biomed Tech* 2017; 62: 481–486
- 178 Goldberg-Bockhorn E, Wenzel U, Theodoraki M, Döscher J, Riepl R, Wigand MC, Brunner C, Heßling M, Hoffmann TK, Kern J, Rotter N. Enhanced cellular migration and prolonged chondrogenic differentiation in decellularized cartilage scaffolds under dynamic culture conditions. *J Tissue Eng Regen Med* 2021;
- 179 Levorson EJ, Hu O, Mountziaris PM, Kasper FK, Mikos AG. Cell-derived polymer/extracellular matrix composite scaffolds for cartilage regeneration, part 2: Construct devitalization and determination of chondroinductive capacity. *Tissue Eng - Part C Methods* 2014; 20: 358–372
- 180 Lee JS, Im G II. Influence of chondrocytes on the chondrogenic differentiation of adipose stem cells. *Tissue Eng - Part A* 2010; 16: 3569–3577
- 181 Shi J, Liang J, Guo B, Zhang Y, Hui Q, Chang P, Tao K. Adipose-Derived Stem Cells Cocultured with Chondrocytes Promote the Proliferation of Chondrocytes. *Stem Cells Int* 2017; 2017: 1–17
- 182 Pleumeekers MM, Nimeskern L, Koevoet WLM, Karperien M, Stok KS, Van Osch GJVM. Cartilage Regeneration in the Head and Neck Area: Combination of Ear or Nasal Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells Improves Cartilage Production. *Plast Reconstr Surg* 2015; 136: 762e-774e
- 183 Repository QUTD. This is the accepted version of this journal article: Melchels, Ferry P.W. and Velders, Aldrik H. and Feijen, Jan and Grijpma, Dirk W. (2010). 2010; 43

- 184 Thevenot P, Nair A, Dey J, Yang J, Tang L. Method to Analyze Three-Dimensional Cell Distribution and Infiltration in Degradable Scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods* 2008; 14: 319–331
- 185 Miller I, Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, Spencer SL. Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Rep* 2018; 24: 1105-1112.e5 Im Internet: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.110>
- 186 Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci* 2008; 121: 255–264
- 187 Watt FM, Huck WTS. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14: 467–473
- 188 Hayes AJ, MacPherson S, Morrison H, Dowthwaite G, Archer CW. The development of articular cartilage: Evidence for an appositional growth mechanism. *Anat Embryol (Berl)* 2001; 204: 469–479
- 189 Zhang Y, Tang CL, Chen WJ, Zhang Q, Wang SL. Dynamic compression combined with exogenous SOX-9 promotes chondrogenesis of adipose-derived mesenchymal stem cells in PLGA scaffold. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19: 2671–2678
- 190 Gouttenoire J, Bougault C, Aubert-Foucher E, Perrier E, Ronzière MC, Sandell L, Lundgren-Akerlund E, Mallein-Gerin F. BMP-2 and TGF- β 1 differentially control expression of type II procollagen and α 10 and α 11 integrins in mouse chondrocytes. *Eur J Cell Biol* 2010; 89: 307–314
- 191 Nguyen B V., Wang Q, Kuiper NJ, El Haj AJ, Thomas CR, Zhang Z. Strain-dependent viscoelastic behaviour and rupture force of single chondrocytes and chondrons under compression. *Biotechnol Lett* 2009; 31: 803–809
- 192 Vinod E, Kachroo U, Amirtham SM, Ramasamy B, Sathishkumar S. Comparative analysis of fresh chondrocytes, cultured chondrocytes and chondroprogenitors derived from human articular cartilage. *Acta Histochem* 2020; 122: 151462 Im Internet: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.151462>
- 193 Singh P, Schwarzbauer JE. Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis. *J Cell Sci* 2012; 125: 3703–3712 Im Internet: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.095786>
- 194 Mcbeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. 04 Dev Cell Chen CS Cell Shape, Cytoskeletal tension and RhoA regulate stem cell lineage commitment.pdf. 2004; 6: 483–495
- 195 McBride SH, Knothe Tate ML. Modulation of Stem Cell Shape and Fate A: The Role of Density and Seeding Protocol on Nucleus Shape and Gene Expression. *Tissue Eng Part A* 2008; 14: 1561–1572
- 196 Glowacki J, Trepman E, Folkman J. Cell Shape and Phenotypic Expression in Chondrocytes. *Exp Biol Med* 2013; 172: 93–98

- 197 Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S. The Loss of Phenotypic Traits By Differentiated Cells in Vitro, I. Dedifferentiation of Cartilage Cells. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 46: 1533–1542
- 198 Wuest SL, Calìò M, Wernas T, Tanner S, Giger-Lange C, Wyss F, Ille F, Gantenbein B, Egli M. Influence of mechanical unloading on articular chondrocyte dedifferentiation. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 1–18
- 199 Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; 30: 215–224
- 200 Benya PD, Padilla SR. Dihydrocytochalasin B enhances transforming growth factor- β -induced reexpression of the differentiated chondrocyte phenotype without stimulation of collagen synthesis. *Exp Cell Res* 1993; 204: 268–277
- 201 Zanetti NC, Solursh M. Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 1984; 99: 115–123
- 202 Haudenschild DR, Chen J, Pang N, Lotz MK, D’Lima DD. Rho kinase-dependent activation of SOX9 in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 191–200
- 203 Lu Z, Doulabi BZ, Huang C, Bank RA, Helder MN. Collagen type II enhances chondrogenesis in adipose tissue-derived stem cells by affecting cell shape. *Tissue Eng - Part A* 2010; 16: 81–90
- 204 Im GI, Ko JY, Lee JH. Chondrogenesis of adipose stem cells in a porous polymer scaffold: Influence of the pore size. *Cell Transplant* 2012; 21: 2397–2405
- 205 Nguyen LH, Kudva AK, Guckert NL, Linse KD, Roy K. Unique biomaterial compositions direct bone marrow stem cells into specific chondrocytic phenotypes corresponding to the various zones of articular cartilage. *Biomaterials* 2011; 32: 1327–1338 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.009>
- 206 Burnsed OA, Schwartz Z, Marchand KO, Hyzy SL, Olivares-Navarrete R, Boyan BD. Hydrogels derived from cartilage matrices promote induction of human mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation. *Acta Biomater* 2016; 43: 139–149 Im Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.07.034>
- 207 Gupta N, Cruz MA, Nasser P, Rosenberg JD, Iatridis JC. Fibrin-Genipin Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering in Nasal Reconstruction. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2019; 128: 640–646
- 208 Burnsed OA, Schwartz Z, Marchand KO, Hyzy SL, Olivares-Navarrete R, Boyan BD. Hydrogels derived from cartilage matrices promote induction of human mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation. *Acta Biomater* 2016; 43: 139–149
- 209 Daly AC, Freeman FE, Gonzalez-Fernandez T, Critchley SE, Nulty J, Kelly DJ. 3D Bioprinting for Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater* 2017; 6: 1–20

- ²¹⁰ Lee JS, Hong JM, Jung JW, Shim JH, Oh JH, Cho DW. 3D printing of composite tissue with complex shape applied to ear regeneration. *Biofabrication* 2014; 6

7.2. Bisher veröffentlichte Teilaspekte dieser Arbeit

7.2.1. Fachzeitschriften

- Kuhlmann C, Schenck TL, Tluczynski K, Aszodi A, Metzger P, Giunta R, Wiggenhauser PS. Experimental approach to nasal septal cartilage regeneration with adipose tissue-derived stem cells and decellularized porcine septal cartilage. Xenotransplantation. 2020 Dec 21:e12660. doi: 10.1111/xen.12660.
- Kuhlmann C, Schenck TL, Aszodi A, Giunta RE, Wiggenhauser PS. Zone-Dependent Architecture and Biochemical Composition of Decellularized Porcine Nasal Cartilage Modulate the Activity of Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Cartilage Regeneration. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 9917. <https://doi.org/10.3390/ijms22189917>

7.2.2. Kongressvorträge

- Kuhlmann C, Schenck TL, Aszodi A, Giunta RE, Wiggenhauser PS. „Interaktionen von Adipose tissue-derived Stem Cells und dezelluliertem Nasenseptumknorpel“. 2021. Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie (DAM) – Wissenschaftsakademie, Erlangen (Online)
- Kuhlmann C, Schenck TL, Aszodi A, Giunta RE, Wiggenhauser PS. „Evaluation der Zell-Matrix-Interaktionen von xenogenem Nasenseptumknorpel und Adipose tissue-derived Stem Cells“. 2019. 50. Jahrestagung der DGPRÄC, Hamburg
- Wiggenhauser PS, Kuhlmann C, Aszodi A, Körber L, Giunta RE, Schenck TL. „Die Beeinflussung der Aktivität von Fettgewebstammzellen in Abhängigkeit unterschiedlicher Zonen der extrazellulären Matrix im Nasenseptumknorpel“. 2019. 50. Jahrestagung der DGPRÄC, Hamburg
- Kuhlmann C, Schenck TL, Aszodi A, Giunta RE, Wiggenhauser PS. „Nasal septal cartilage regeneration with adipose tissue derived stem cells (ASCs) and decellularized porcine nasal septal cartilage (dpNSC)“. 2019. 11th European Plastic Surgery Research Council, München
- Kuhlmann C, Schenck TL, Aszodi A, Giunta RE, Wiggenhauser PS. „Evaluation of decellularized porcine nasal septal cartilage (dpNSC) as a scaffold for adipose tissue derived stem cells (ASCs)“. 2019. 23. Chirurgische Forschungstage, Aachen
- Wiggenhauser PS, Kuhlmann C, Schwarz S, Rotter N, Giunta RE, Schenck TL. „Anforderungen der Anatomie an xenogene Biomaterialien für die Nasenrekonstruktion“. 2019. 136. Kongress Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, München

7.2.3. Postervorträge

- Kuhlmann C, Schenck TL, Aszodi A, Körber L, Giunta RE, Wiggenhauser PS. „Interaktion von ASCs mit dezellularisierter Extrazellulärmatrix vom Nasenseptumknorpel“. 2018. 49. Jahrestagung der DGPRÄC, Bochum

7.3. Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen nicht zustande gekommen.

In erster Linie gilt mein Dank dem Ideenschöpfer und Betreuer dieses Projektes Dr. med. Paul Severin Wiggerhauser, für die Überlassung und Finanzierung dieses Themas und die tatkräftige Unterstützung und Beratung bei der Umsetzung der Fragestellung.

Ein ebenso großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. med. univ. Thilo Ludwig Schenck der die Weichen für die Realisierung dieses Projektes gestellt hat und meinen wissenschaftlichen und klinischen Werdegang stets gefördert hat.

Darüber hinaus möchte ich dem Team des ExperiMed, an dieser Stelle sei besonders PD Dr. rer. nat. Attila Aszodi erwähnt, für die Förderung dieses Projektes und die Unterstützung beim Erlernen der Labortechniken danken. In diesem Kontext gilt mein Dank auch Frau Alexandra Birt aus dem Labor der Plastischen Chirurgie, die mich bei der Umsetzung der PCR und Planung der FACS-Analyse tatkräftig mit ihrer großen Erfahrung und Expertise unterstützt hat. Zudem gilt mein Dank Philipp Metzger und der iFlow Core Facility der LMU für die Durchführung der FACS-Analyse und die Hilfe bei der Dateninterpretation.

Außerdem danke ich dem Chefarzt Univ.-Prof. Dr. med. Riccardo E. Giunta für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Abteilung umzusetzen und die wissenschaftliche Unterstützung dieser Experimente.

Mein größter Dank gilt zudem den Patientinnen, die zugestimmt haben, ihre Gewebeproben der Wissenschaft zur Verfügung zu stellen, und somit diese und weitere Arbeiten ermöglicht haben.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich mit Ihrem Rat fortwährend unterstützt haben und die mir immer zur Seite standen, ein großes Dankeschön aussprechen. Ohne Euch wäre die Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

7.4. Eidesstattliche Versicherung

KUHLMANN, CONSTANZE

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„*In vitro* Evaluation von Adipose tissue-derived Stem Cells und dezellularisiertem porcinem Nasenseptumknorpel zur Regeneration des Nasenseptumknorpels“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, der 17. Februar 2022

Ort, Datum

gez. Constanze Kuhlmann