

Aus der Abteilung für Handchirurgie, Plastische Chirurgie und Ästhetische Chirurgie

Der Ludwig-Maximilians Universität München

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Riccardo E. Giunta

**Anwendungsorientierte Entwicklung von regenerativen
Biomaterialen zur Verwendung als Knorpelersatz in der
Rekonstruktion von komplexen Defekten im Kopf- und Halsbereich**



Kumulative Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Plastische und Ästhetische Chirurgie

Vorgelegt von
Dr. med. Paul Severin Wiggerhauser
München 2023

“Parvus error in principio magnus est in fine.”

Einleitungssatz von De ente et de essentia, Thomas von Aquin, 1252
in Anlehnung an Aristoteles De Caelo über die Prinzipien wissenschaftlichen Arbeitens

Meiner Frau Miglè

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
PUBLIKATIONSLISTE DER KUMULATIVEN HABILITATION	11
EINFÜHRUNG	13
ZIELSETZUNG	17
MATERIAL UND METHODEN	19
CHARAKTERISIERUNG DER ANATOMISCHEN ZIELSTRUKTUREN (PUBLIKATION 1 UND 2)	19
KNORPELREGENERATION DURCH BIOMATERIALIEN UND STAMMZELLEN (PUBLIKATION 3 BIS 6).....	20
KLINISCHES ANWENDUNGSBEISPIEL (PUBLIKATION 7).....	23
ERGEBNISSE DER PUBLIKATIONEN	25
CHARAKTERISIERUNG DER ANATOMISCHEN ZIELSTRUKTUREN	25
<i>Publikation 1</i>	25
<i>Publikation 2</i>	28
KNORPELREGENERATION DURCH BIOMATERIALIEN UND STAMMZELLEN.....	30
<i>Publikation 3</i>	30
<i>Publikation 4</i>	32
<i>Publikation 5</i>	36
<i>Publikation 6</i>	38
KLINISCHES ANWENDUNGSBEISPIEL.....	42
<i>Publikation 7</i>	42
DISKUSSION	45
SCHLUSSFOLGERUNG	55
LITERATURVERZEICHNIS	58
PUBLIKATIONEN DES AUTORS	63
ORIGINALARBEITEN ALS ERST- ODER LETZTAUTOR.....	63
ORIGINALARBEITEN ALS KOAUTOR	66
KASUISTIKEN	68
ÜBERSICHTSARTIKEL.....	69
BUCHKAPITEL	69
SONSTIGE VERÖFFENTLICHUNGEN	70
DANKSAGUNG	71
ANHANG – WISSENSCHAFTLICHE FAKSIMILE DER ORIGINALARBEITEN ZUR KUMULATIVEN HABILITATION.	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

Abkürzungsverzeichnis

ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol
ACAN,	Gen Aggrecan
acPCL	activated chondrogenic PCL
ALPL	Gen alkalische Phosphatase
aoPCL	activated osteogenic PCL
ASC	Adipose tissue derived stem cell
BMP7	Bone morphogenic protein 7
CAD	Computer assisted design
CAM	Computer assisted manufacturing
COL10A1	Gen Kollagen 10
COL1A1	Gen Kollagen 1
COL2A1	Gen Kollagen 2
COL9A1	Gen Kollagen 9
COMP	Gen Cartilage oligomeric matrix protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Farbstoff
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DMMB	Dimethylmethylenblau Farbstoff
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPNC	Decellularized Porcine Nasal Cartilage
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
GAG	Glykosaminoglykan
HA	Hyaluronic acid
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hOSP	Gen humanes Osteopontin
HPRT1	Gen Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyltransferase
ITGA11	Gen Integrin A11
MATN3	Gen Matrilin-3

PCL

PCR

PLA

qRT

SOX9

SPP1

Polycaprolacton

Polymerase Kettenreaktion

Polylactid acid

quantitative Real Time PCR

Gen SRY-box transcription factor 9

Gen Osteopontin

Publikationsliste der kumulativen Habilitation

1. **Wiggenhauser 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 Sep;150(3):291-300. doi: 10.1007/s00418-018-1672-y. Epub 2018 May 2. PMID: 29721643.
2. **Wiggenhauser 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 Aug;96:236-243. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.04.048. Epub 2019 Apr 26. PMID: 31059899.
3. **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 Oct 26;30(11):121. doi: 10.1007/s10856-019-6323-x. PMID: 31655914.
4. 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.* 2021 Mar;28(2):e12660. doi: 10.1111/xen.12660. Epub 2020 Dec 21. PMID: 33350016.
5. 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 Sep 14;22(18):9917. doi: 10.3390/ijms22189917. PMID: 34576079; PMCID: PMC8470846.
6. Blum JC, Schenck TL, Birt A, Giunta RE, **Wiggenhauser PS**. Artificial decellularized extracellular matrix improves the regenerative capacity of adipose tissue derived stem cells on 3D printed polycaprolactone scaffolds. *J Tissue Eng.* 2021 Jun

28;12:20417314211022242. doi: 10.1177/20417314211022242. PMID: 34262685; PMCID: PMC8246490.

7. Kuhlmann C, Blum JC, Schenck TL, Giunta RE, **Wiggenhauser PS**. Evaluation of the Usability of a Low-Cost 3D Printer in a Tissue Engineering Approach for External Ear Reconstruction. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 28;22(21):11667. doi: 10.3390/ijms222111667. PMID: 34769096; PMCID: PMC8584065.

Die im Folgenden dargestellten Abbildungen sind den oben genannten originalen Publikationen entnommen. Die jeweilige Quelle ist in der Beschreibung der betreffenden Abbildung vermerkt. Die kompletten wissenschaftlichen Faksimiles der originalen Publikationen finden sich im Anhang dieser kumulativen Habilitationsschrift.

Einführung

Die Rekonstruktion von komplexen Defekten im Kopf- und Halsbereich stellt für den plastisch-rekonstruktiven Chirurgen eine große Herausforderung dar. Insbesondere die Rekonstruktion von kraniofazialen Defekten der gesichtsbildenden knorpeligen Anteile von Nase und Ohr sind hierbei entscheidend. Nase und Ohr bestehen aus hyalinem bzw. elastischem Knorpel und tragen durch ihre Form entscheidend zur Wahrnehmung eines Gesichts bei[42]. Teilweise oder komplette Verluste dieser Strukturen können zu entstellenden Defekten für die betroffenen Patienten führen. Diese Gesichtsstrukturen werden daher mit größter Sorgfalt und Mühe rekonstruiert, um die Lebensqualität der Patientinnen und Patienten zu verbessern. Beispiele solcher Defekte sind in Abbildung 1 dargestellt.



Abbildung 1 Defekte nach Resektion von Hauttumoren des Gesichts

Als Ursache dieser Defekte sind angeborene Fehlbildungen, Verletzungen und viel häufiger onkologisch bedingte Verluste der betroffenen Strukturen zu nennen. Jährlich erkranken nach aktuellen Angaben des Robert-Koch-Instituts 21.000 Männer und Frauen in Deutschland an Hauttumoren wie Malignen Melanomen und fast 212.000 an nicht-melanotischen Hauttumoren wie Basalzellkarzinomen[3]. Ein Großteil dieser Krebserkrankungen ist hier im sonnenexponierten Gesicht anzufinden und daher für die hohe Anzahl der kraniofazialen Defekte verantwortlich.

Eine Rekonstruktion dieser Defekte erfolgt aktuell durch komplexe rekonstruktive Maßnahmen mit lokalen oder freien Lappenplastiken. Hierzu zählen beispielsweise Nasolabiallappen oder Stirnlappen zur Rekonstruktion der Nase oder der retroaurikuläre Insellappen oder der temporoparietale Faszienlappen zur Rekonstruktion des Ohres. Größere Hautweichteildefekte benötigen allerdings auch Rekonstruktionen durch freie Lappenplastiken wie etwa einen Radialislappen. Hierdurch können Weichteildefekte verschlossen werden und die oberflächliche Kontur wiederhergestellt werden.

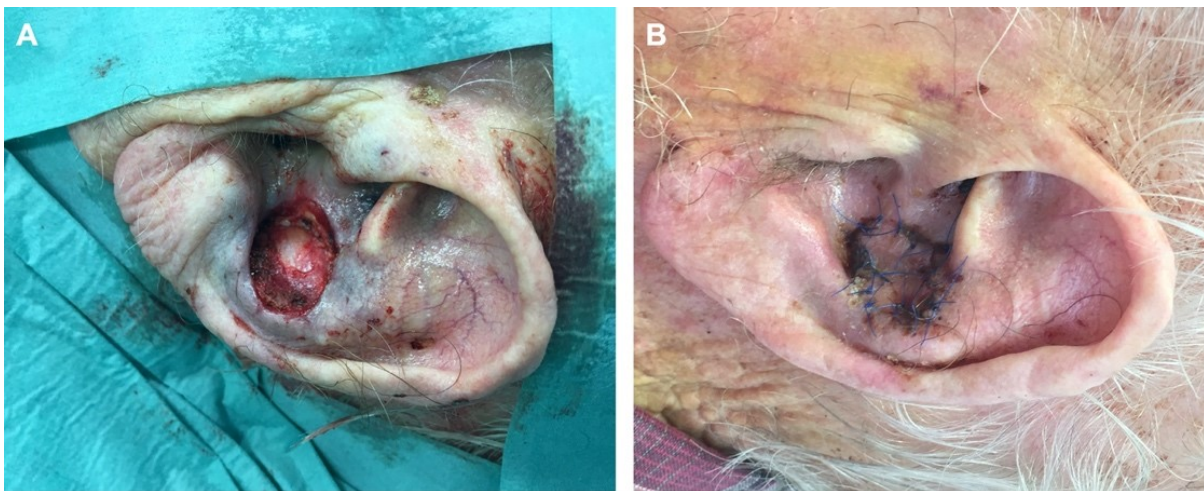


Abbildung 2 zeigt die Rekonstruktion eines Defektes am Ohr mittels retroaurikulärem Insellappen. (A) Ausgangsbefund nach Tumorresektion. (B) Ergebnis eine Woche postoperativ.

Allerdings ist zum Beispiel bei der Nase oft nicht nur die Deckung des Weichteildefekts notwendig, sondern vielmehr auch die Rekonstruktion der formgebenden Strukturen wie des Septumknorpels oder des Flügelknorpels. In diesen Fällen müssen die Eingriffe um aufwändige Prozeduren wie z.B. die Verwendung von Ohr- oder Rippenknorpel erweitert werden. Hierdurch entstehen für den Patienten zusätzliche Risiken wie Hebedefekte an den Rippen, aber auch die Notwendigkeit zu komplexen mehrzeitigen Operationen.

Aufgrund der Komplexität der Eingriffe bei Verwendung von autologen Knorpeltransplantaten und der Risiken durch die Entnahme von autologen Knorpeltransplantaten erhofft man sich durch die regenerative Medizin alternative, schonende Therapieoptionen.

Bereits 1992 konnte erstmalig die künstliche Herstellung von Knorpelmatrix in der Zellkultur gezeigt werden, indem Chondrozyten in Agarose kultiviert wurden[6]. Cima et al. gelang die Transplantation von Zellen auf biologisch abbaubaren Polymeren[8]. Corkhill et al. beschrieben die Notwendigkeit der Nachahmung nativer Gewebeeigenschaften bezüglich

Komprimierbarkeit, Flexibilität und Porosität, um vitalen und funktionellen Knorpel herstellen zu können[9].

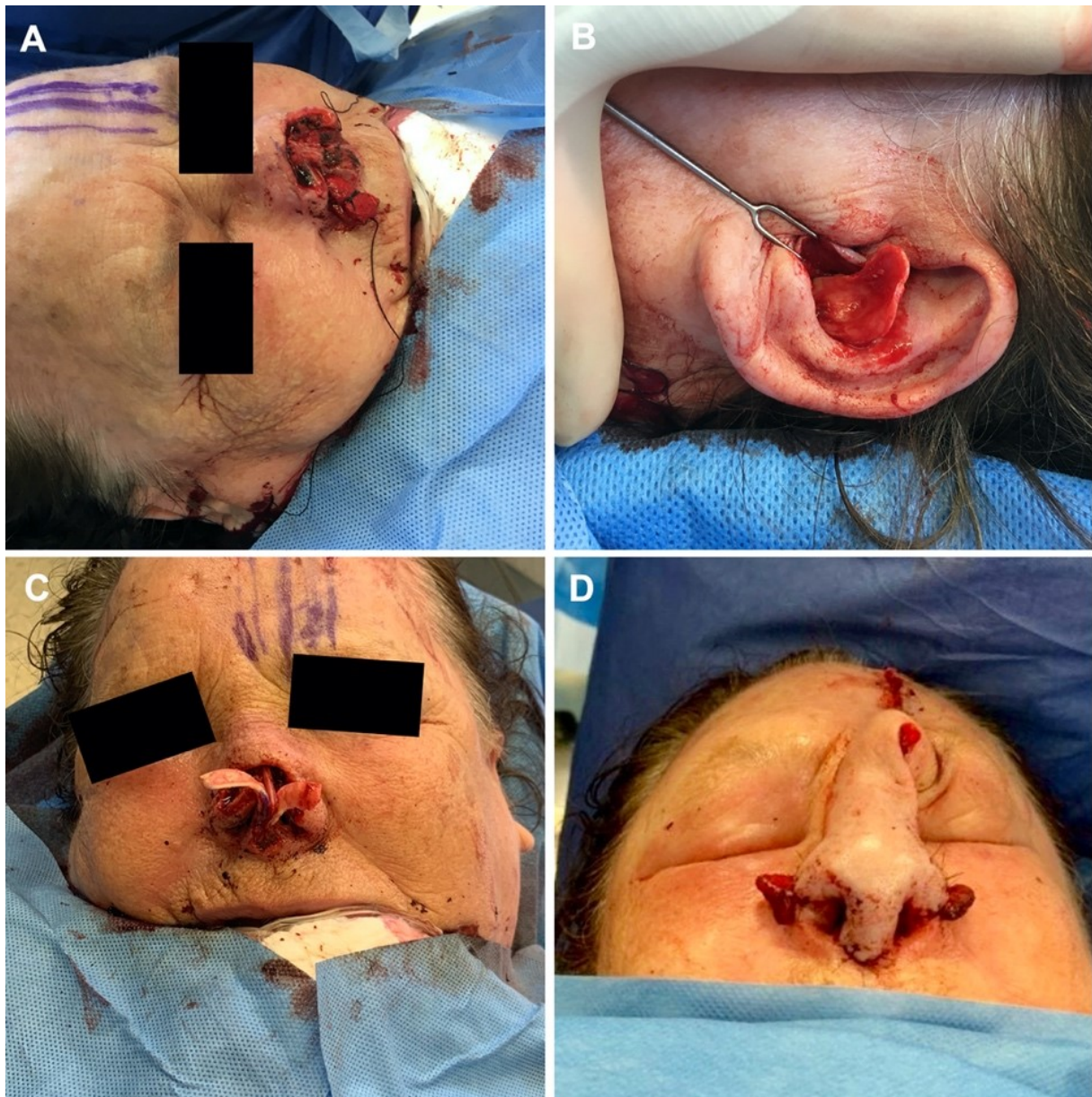


Abbildung 3 zeigt die Rekonstruktion eines komplexen Defekts der Nase nach Tumorresektion: A situs nach R0 Resektion, B Hebung eines autologen Knorpeltransplantats vom Ohr, C Rekonstruktion der Nasenspitze durch autologe Knorpeltransplantate, D Defektdeckung der Weichteile mittels Stirnlappen

Bislang finden sich aber wenige anwendungsorientierte Studien im Kopf-Hals-Bereich, welche sich mit der Wiederherstellung von Knorpeldefekten mittels Zellregeneration befassen[42]. Hierbei spielen zwei wesentliche Faktoren eine Rolle: Zahlreiche Studien behandeln nur grundlegende Tissue Engineering Aspekte oder zeigen nur Ansätze von personalisierter Medizin durch CAD/CAM auf. Zopf et al. veröffentlichten beispielsweise eine Studie zu PCL-

basierten Implantaten, die mittels 3D-Druck in den groben Zügen einer äußeren Nase hergestellt wurden[50]. Das Implantat wurde anschließend Schweinen subkutan implantiert, um damit ein mögliches Rekonstruktionsergebnis zu simulieren. Die innere Struktur (Vestibulum nasi etc.) oder die wesentlichen biomechanischen Komponenten (Septum u.a.) wurden nicht weiter berücksichtigt. Das präsentierte Implantat ermöglicht daher keine funktionelle Rekonstruktion. Weiterhin veröffentlichten Fulco et al. eine klinische Studie zur Tissue-Engineering-basierten Rekonstruktion des Flügelknorpels der Nase[14]. In dieser Studie wurde ein biomechanisch weniger relevantes Element des knorpeligen Nasenskeletts rekonstruiert. Solche Vorgehensweisen stellen nur einen partiell geeigneten Ansatz dar. Außerdem ist die klinische Umsetzung durch die limitierte Verfügbarkeit zugelassener bioaktiver Implantate dramatisch eingeschränkt.

Alternativ zum Tissue Engineering von Septumknorpel in vitro ist die Induktion der Regeneration in vivo. Rotter et al. haben beispielsweise die spontane Regeneration von Septumknorpel in kleinen Stanzdefekten der Nasenscheidewand im Rattenmodell beschrieben[11, 12]. Andere Studien haben bereits früher das Potential des Perichondriums zur Regeneration von autologem Knorpelgewebe demonstriert[18]. Inwiefern die Regeneration durch das Perichondrium bzw. durch mögliche Stammzellen im periseptalen Bereich möglich ist, wurde bislang noch nicht ausreichend geklärt. Zudem haben diverse Studien neben den Stammzellen auch den Einfluss der extrazellulären Matrix auf den Regenerationsprozess zahlreicher Gewebe beschrieben[1, 7, 23, 26, 39-41]. Bezüglich der Nasenscheidewand existieren allerdings noch keine belastbaren Daten.

Zielsetzung

In dieser Arbeit soll ausgehend vom klinischen Problem der Knorpeldefekte in der kraniofazialen Rekonstruktion ein neuartiger Therapieansatz in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie aufgezeigt werden. Durch die im Folgenden dargestellten Arbeitsschritte sollen zuerst die anatomischen Zielstrukturen multimodal charakterisiert, anschließend sollen Möglichkeiten zur Knorpelrekonstruktion (reines Polycaprolakton (PCL), natürliche dezellularisierte Matrix, optimiertes PCL) evaluiert und zum Schluss soll anhand eines klinischen Anwendungsbeispiels die Machbarkeit von patientenindividuellen Implantaten beurteilt werden.

1. Charakterisierung der anatomischen Zielstrukturen
 - a. Histomorphologische Beschreibung des Knorpels der menschlichen Nase bezüglich des Aufbaus und der möglichen Unterschiede unterschiedlicher anatomischer Untereinheiten der Nase
 - b. Biochemische und biomechanische Analyse der Eigenschaften des Knorpels der menschlichen Nase mit speziellem Fokus auf unterschiedlichen anatomischen Untereinheiten der Nase
2. Knorpelregeneration durch Biomaterialien und Stammzellen
 - a. Optimierung von PCL-basierten Implantaten für die Knorpelregeneration
 - i. Herstellung von neuartigen Composite Scaffolds aus PCL und DECM zur Verbesserung der Knorpelregeneration auf PCL-Implantaten
 - b. Verbesserung des Verständnisses der Biologie des Septumknorpels der menschlichen Nase
 - i. Übertragung eines Tissue Engineering Modells mit humanen Chondrozyten und dezellularisiertem Septumknorpel (DECM) vom Schwein auf ein klinisch praktikables Modell mit humanen Adipose Tissue derived Stem Cells (ASCs).
 - ii. Charakterisierung des Einflusses der DECM auf humane ASCs mit besonderem Fokus auf unterschiedliche anatomische Zonen des Septumknorpels

- c. Entwicklung von neuartigen aktivierten PCL Scaffolds durch artifizielle extrazelluläre Matrix basierend auf den Erkenntnissen über den Einfluss von DECM auf ASCs sowie der Regenerationsfähigkeit der ASCs
3. Klinisches Anwendungsbeispiel
- a. Evaluation eines low-cost 3D-Druckers bezüglich der klinischen Einsatzfähigkeit für die Herstellung von chirurgischen Implantaten und Modellen für die kraniofaziale Rekonstruktion

Material und Methoden

Charakterisierung der anatomischen Zielstrukturen (Publikation 1 und 2)

Die Charakterisierung der anatomischen Zielstrukturen wurde mit humanen fresh-frozen Präparaten durchgeführt, die von Körperspendern stammten und direkt nach dem Auftauen präpariert wurden. Insgesamt wurden 3 Spender für die histologischen und 10 Spender für die biochemischen bzw. biomechanischen Untersuchungen verwendet. Die Präparation erfolgte sorgfältig mit Operationsinstrumentarium. Hierbei wurde penibel darauf geachtet, den Weichteilmantel ohne Verletzung der knorpeligen Strukturen zu entfernen. Die Präparation erfolgte analog einer offenen Septorhinoplastik. Ein fertiges Präparat ist in der Abbildung 4 dargestellt. Eingezeichnet sind dort die Entnahmestellen für die histologische Auswertung. Es wurden Proben aus dem Septum, dem Flügelknorpel sowie dem Dreiecksknorpel entnommen. Die Analyse erfolgte durch klassische Histologie (HE, Alzianblau) sowie neueste immunhistochemische Untersuchungen (COMP, Matrilin-3).

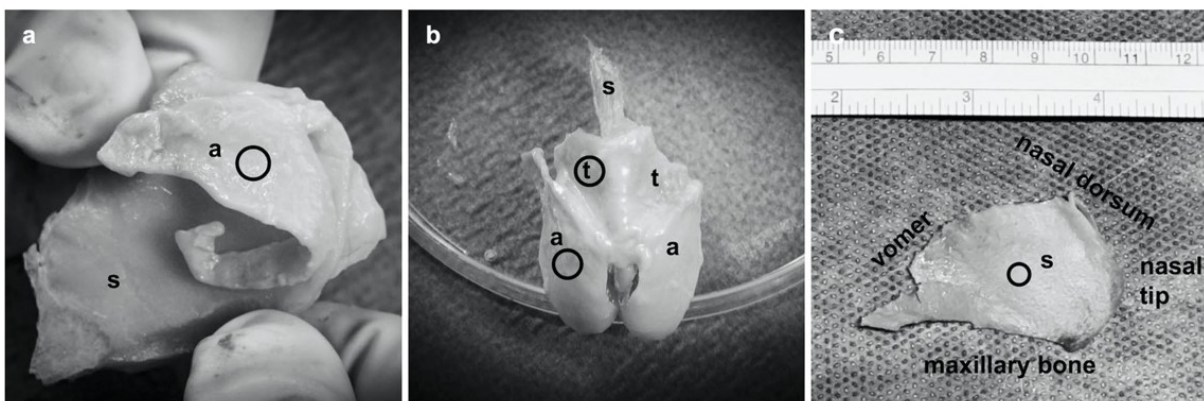


Abbildung 4 zeigt den Knorpel der menschlichen Nase nach minutiöser Dissektion. A von lateral, B von anterior/kranial und C lediglich das weiter prozessierte Septum von lateral im anatomischen Kontext. „s“ für Septum, „a“ für Ala (Flügel), „t“ für Triangulus (Dreieck). Die Kreise bedeuten die Entnahmestellen der histologischen Proben mittels Biopsy-Punch.[43]

Für die biochemischen und biomechanischen Analysen wurden weitere Proben entnommen. Aufgrund der komplexen Anordnung der Entnahmestellen sind diese in Abbildung 5 illustriert. Hierbei wurden hantelförmige Proben für Zugtests, runde Proben für Drucktests und weitere runde Proben für die biochemischen Assays zur Quantifizierung von Zellzahl, Kollagengehalt und Glykosaminoglykangehalt entnommen.

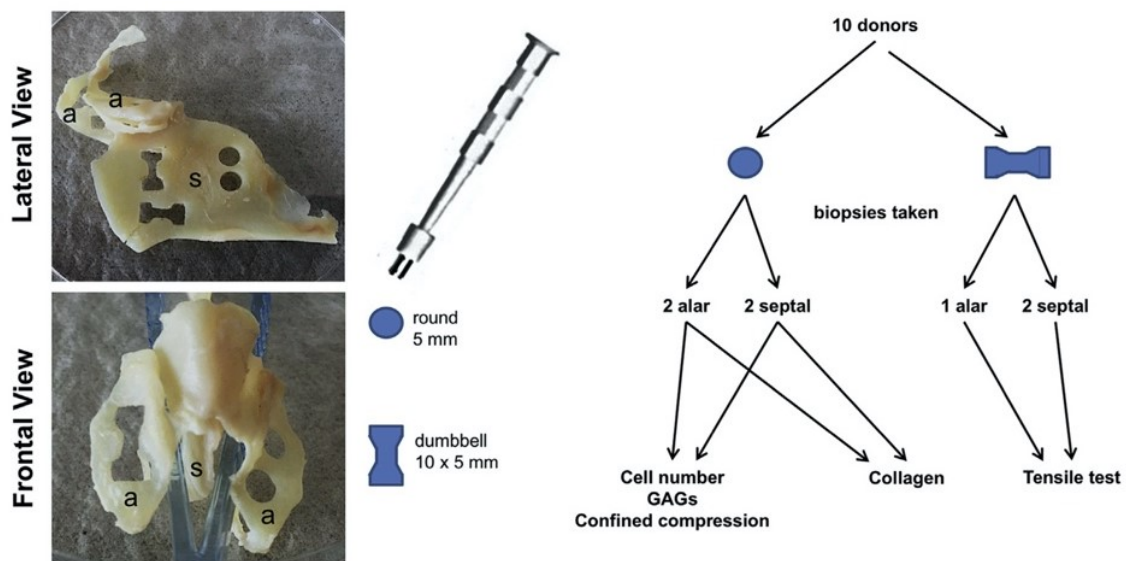


Abbildung 5 zeigt den Knorpel der menschlichen Nase von seitlich und von frontal/kranial. „s“ für Septum, „a“ für Ala (Flügel). Darüber hinaus ist das Schema der weiteren Analyse im Flow Chart dargestellt.[46]

Knorpelregeneration durch Biomaterialien und Stammzellen (Publikation 3 bis 6)

Für die Untersuchung der Knorpelregeneration mit verschiedenen Biomaterialien und Stammzellen wurden unterschiedliche in-vitro-Modelle und Herangehensweisen gewählt. In chronologischer Reihenfolge wurde zuerst ausgehend von einem etablierten Modell zur Regeneration von Knorpel mittels dezellularisiertem Septumknorpel vom Schwein (DPNC) in Verbindung mit humanen chondrozytären Progenitorzellen die Eignung von Polykaprolakton (PCL) basierten Scaffolds untersucht. Grundgedanke hierbei war die Eignung von PCL zum patientenindividuellen 3D-Druck und der spätere Plan mithilfe von 3D Bilddaten spezifische Implantate für die Patienten herstellen zu können.

In diesem ersten in-vitro-Experiment wurden einerseits die Regeneration auf purem PCL beurteilt, aber auch gleichzeitig ein erster Schritt zur Optimierung von PCL durchgeführt. Hierzu wurden als Kontrolle fungierende DPNC-Scaffolds mit Skalpell zerkleinert und anschließend die Poren der PCL-Scaffolds damit befüllt. Dies führte zwar zu einer Verdichtung der PCL-Scaffolds, aber aufgrund der Datenlage der bereits zum DPNC durchgeführten Experimente noch ausreichender Porengröße für die Zellinvasion. Abbildung 6 zeigt die so hergestellten drei Typen von Scaffolds.



Abbildung 6 zeigt in der Auflichtmikroskopie die grobe Morphologie der drei Scaffold-Typen. PCL = Polykaprolakton, DCEM = DPNC. Balken = 1000 µm.[45]

Nach entsprechender Zeit in der Zellkultur erfolgte anschließend die Analyse mittels Rasterelektronenmikroskop, aufwändigen Histoacryl-Schnitten mit Tulidin-Färbung sowie biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen. Für die biochemische Analyse wurden die etablierten PicoGreen- und DMMB-Assays verwendet. Die Veränderung der Genexpression wurde durch eine qRT-PCR mit einem etablierten Gen-Set (COL1A1, COL2A1, COL10A1, COMP, ACAN, hOSP) beurteilt.

In den anschließenden zwei experimentellen Arbeiten wurde nun die Eignung von humanen Adipose tissue derived stem cells (ASCs) zur Regeneration von Knorpel in Verbindung mit DPNC untersucht. Grundgedanke war hierbei die leichter zugängliche und deutlich größere Ressource an ASCs, die aus Lipoaspirat gewonnen werden können, im Vergleich zu humanen Chondroprogenitorzellen, die in den vorhergehenden Experimenten aus humanen Septumknorpel gewonnen wurden. Zuerst wurde in einer Publikation die generelle Eignung von ASCs und DPNC zum Tissue Engineering von Knorpel untersucht. In der folgenden Publikation wurden die Erkenntnisse aus Publikation 1 genutzt und die Wechselwirkungen der unterschiedlichen extrazellulären Matrix (EZM) innerhalb des Septumknorpels auf ASCs untersucht. Wichtig für das Verständnis des zweiten Teilversuchs ist der analoge Aufbau von humanem und porcinem Septumknorpel. Mittels AlzianBlau- und Kollagenfärbung konnte der analoge Aufbau des Septumknorpels in beiden Spezies nachgewiesen werden. Dieser gliedert sich also auch beim Schwein in einen superfiziellen, intermediären und zentralen Anteil. Mit dieser Erkenntnis konnte anschließend die Exposition von ASCs mit unterschiedlicher EZM des Septumknorpels simuliert werden. Hierzu wurden im Modell einerseits die Oberfläche der DPNC (superfizielle Zone) und andererseits die aufgeschnittene Innenseite der DPNC (zentrale Zone) mit ASCs besiedelt.

Die experimentelle Herangehensweise war in diesen Experimenten weitestgehend identisch. Zuerst wurden ASCs aus Lipoaspirat isoliert, kultiviert und anschließend über Differenzierung in drei Gewebe (Fett, Knochen, Knorpel) sowie mittels FACS Analyse identifiziert. Anschließend wurde DPNC durch Beträufeln mit ASCs besiedelt und über mehrere Wochen im Inkubator kultiviert. Die Differenzierung in Knorpel erfolgte in den Versuchsgruppen über ein kommerziell erworbenes Differenzierungsmedium, das zuvor in einer 2D-Kultur getestet worden war. Die Auswertung erfolgte durch etablierte Assays (Live-Dead, AlamarBlue, PicoGreen, DMMB) sowie mittels computerbasierter automatisierter Analyse (ImageJ) von fluoreszenzhistologischen Bildern (DAPI/Phalloidin). Darüber hinaus erfolgte eine molekularbiologische Analyse der Veränderung der Genexpression von ASCs durch die Wechselwirkung mit unterschiedlichen Zonen der EZM von DPNC. Hierfür wurde das bisherige Panel an Genen weiterentwickelt und an die Verwendung von ASCs angepasst. Einerseits wurden nun als House-Keeping-Gen HPRT1 und für die Beurteilung der Genaktivität COL1A1, COL2A1, COL10A1, ACAN, ITGA10, ITGA11, MKI67, MMP13, PPARG, RUNX2 und SOX9 verwendet.

In der letzten Publikation dieses Abschnitts wurden alle bisherigen Erkenntnisse aggregiert und die konzeptuelle Herangehensweise weiterentwickelt. Ziel dieser Arbeit war es nun erneut, das regenerative Potential von PCL zu verbessern. Hierzu sollten die bisher gewonnenen Erkenntnisse und der deutliche Einfluss der EZM auf ASCs verwendet werden. Aus diesem Grund wurde das Konzept der artifiziellen EZM entwickelt, um sogenannte aktivierte PCL-Scaffolds herstellen zu können. Abbildung 7 zeigt den Herstellungsprozess von aktivierten PCL-Scaffolds für chondrogene und osteogene Differenzierung.

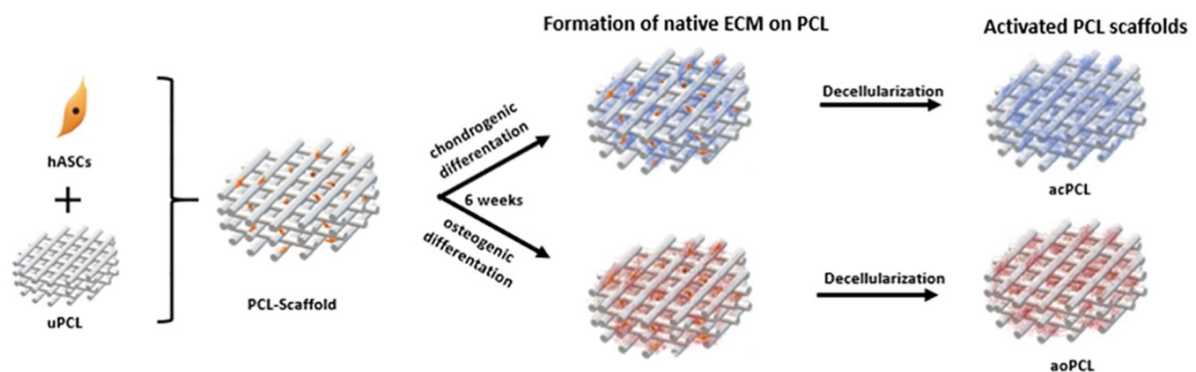


Abbildung 7 zeigt die Herstellung von aktivierten PCL Scaffolds. „acPCL“ aktiviert chondrogenes PCL, „aoPCL“ aktiviert osteogenes PCL.[5]

Die Differenzierung erfolgte mit den bereits zuvor für die osteogene und chondrogene Differenzierung verwendeten Induktionsmedien. Nach sechs Wochen andauernder Differenzierung in der Zellkultur wurden die Zellen chemisch entfernt. Für die Dezellularisierung wurde nach intensiver Literaturrecherche hierfür ein eigenes Protokoll etabliert. Die Effizienz dieses Protokolls ist in den Ergebnissen dieser Publikation dargestellt. Hierdurch wurden sowohl chondrogen (acPCL) als auch osteogen (aoPCL) aktivierte Scaffolds hergestellt.

Im Anschluss erfolgte eine erneute Besiedelung der so aktivierten Scaffolds (acPCL und aoPCL) mit ASCs und deren Differenzierung in die chondrogene und osteogene Richtung. Die Auswertung erfolgte mittels Live-Dead-, PicoGreen-, Hydroxyprolin-, DMMB- und Ca-Assay. Darüber hinaus wurde der Einfluss der mittels artifizieller EZM aktivierten Scaffolds auf die ASCs mittels qRT-PCR untersucht. Hierfür wurde das Gen-Panel für die chondrogene und osteogene Differenzierung angepasst. So wurden GAPDH und HPRT1 als House Keeping Gene bestimmt und für die Versuche die relative Expression von COL1A1, COL2A1, COL9A1, COL10A1, ACAN, SOX9, ITGA11, ALPL und SPP1.

[Klinisches Anwendungsbeispiel \(Publikation 7\)](#)

Zur Beurteilung der klinischen Machbarkeit wurde ein handelsüblicher 3D-Drucker (Ultimaker 2+) verwendet, der sich durch seine niedrigen Anschaffungskosten sowie die offene Plattformarchitektur auszeichnete. Der kostengünstige und raumsparende Drucker wurde ausgewählt, um möglichst eine OP-nahe Inhouse-Produktion des patientenspezifischen Implantats zu simulieren.

Bevor der 3D-Drucker für die Machbarkeitsstudie eingesetzt werden konnte, waren aber Modifikation notwendig, um PCL drucken zu können. Denn eine Verwendung des 3D-Druckers mit PCL war vom Hersteller nicht vorgesehen. In einem ersten Schritt wurde daher der 3D-Drucker durch eine verbesserte Druckdüse (Extrusion Kit) aufgerüstet. Außerdem wurde die Druckgeschwindigkeit und -temperatur modifiziert, damit PCL den richtigen Schmelzpunkt erreichte und in Zusammenspiel mit der Geschwindigkeit des Druckkopfs die gewünschte Druckqualität erbrachte. Als Qualitätsstandards des Drucks wurden hierbei die geometrische Genauigkeit, die repetitive Genauigkeit sowie das Auflösungsvermögen (minimale Druckgröße) definiert. Zur Überprüfung hiervon wurden einfache geometrische Objekte mit

regelmäßiger Binnenstruktur mehrfach in absteigender Größe gedruckt und mittels Lichtmikroskop und elektronischem Messschieber manuell vermessen. Als Referenz zu den aus PCL gedruckten Objekten dienten identisch produzierte Objekte, die aus den Kunststoffen ABS und PLA hergestellt wurden. Sowohl ABS als auch PLA waren vom Hersteller zur Verwendung mit dem Ultimaker 2+ getestet und empfohlen.

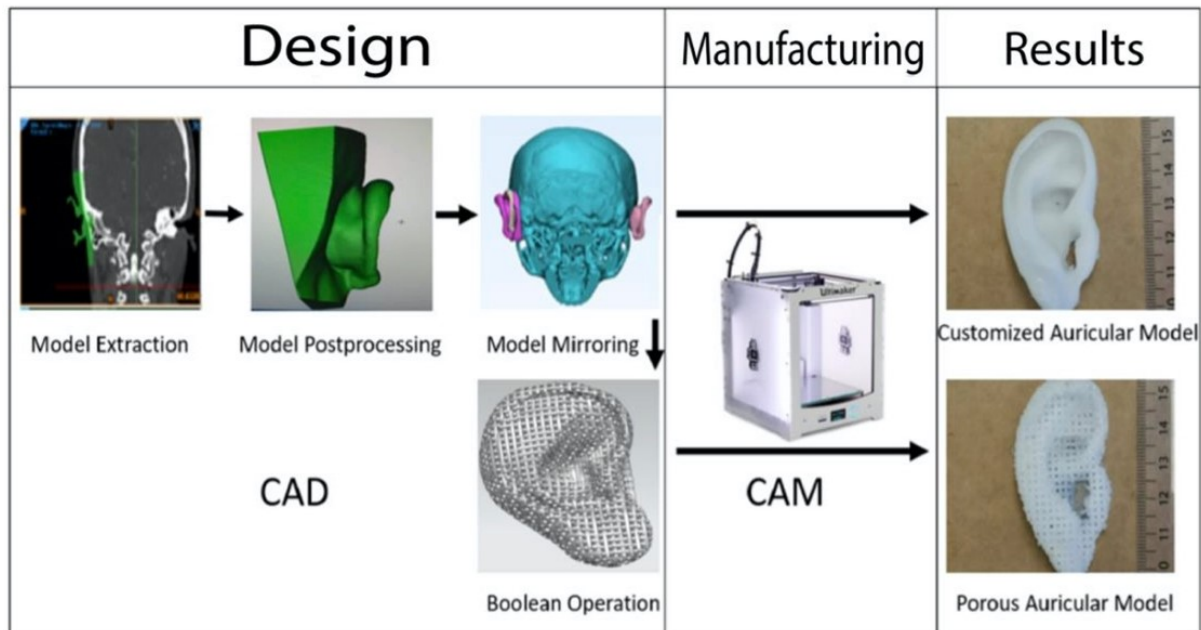


Abbildung 8 zeigt die Zusammenfassung des CAD/CAM Prozesses für die patientenindividuelle Herstellung eines Implantats im kraniofazialen Bereich. Ausgehend vom CT Bilddatensatz wird zuerst ein 3D-Modell des gesunden Ohres (grün) berechnet, das anschließend gespiegelt wird (lila) und weiter prozessiert wird. Der 3D Druck von soliden und porösen Modellen erfolgt über Additive manufacturing (schichtweises Auftragen).[20]

Im Anschluss an die Qualitätskontrolle des 3D Drucks erfolgte die Etablierung eines CAD/CAM Prozesses zur Herstellung von patientenspezifischen Implantaten. Der Workflow des gesamten CAD/CAM Prozesses ist in Abbildung 8 dargestellt. Hierfür wurden ausgehend von anonymen 3D-Bilddaten (CT basierte DICOM Datensätze) dreidimensionale Modelle des fiktiven Patienten berechnet und anschließend über einen CAD-Prozess ein spiegelbildliches Ohr designt. Weitere CAD-Prozesse ermöglichten zudem die Schaffung einer Porosität des Implantats. Abschließend wurden sowohl solides als auch poröses Implantat mit dem modifizierten Ultimaker 2+ aus PCL, ABS und PLA gedruckt und die Modelle manuell mittels elektronischem Messschieber vermessen. Die Ergebnisse wurden zum Schluss mit den Dimensionen des Computermodells verglichen.

Ergebnisse der Publikationen

Charakterisierung der anatomischen Zielstrukturen

Publikation 1

Zur Charakterisierung der anatomischen Zielstrukturen erfolgte zuerst eine histologische Analyse. Hierbei zeigten sich in den verschiedenen Färbungen in allen untersuchten anatomischen Lokalisationen (Flügel-, Dreiecks- und Septumknorpel) ein ähnlicher Aufbau und unterschiedliche Schichten mit spezifischen Anordnungen von Zellen und Bestandteilen der EZM. Besonders gut lässt sich diese in der Alzianblau-Färbung nachvollziehen. Exemplarisch dargestellt ist in Abbildung 4 die Färbung mittels Alzianblau.

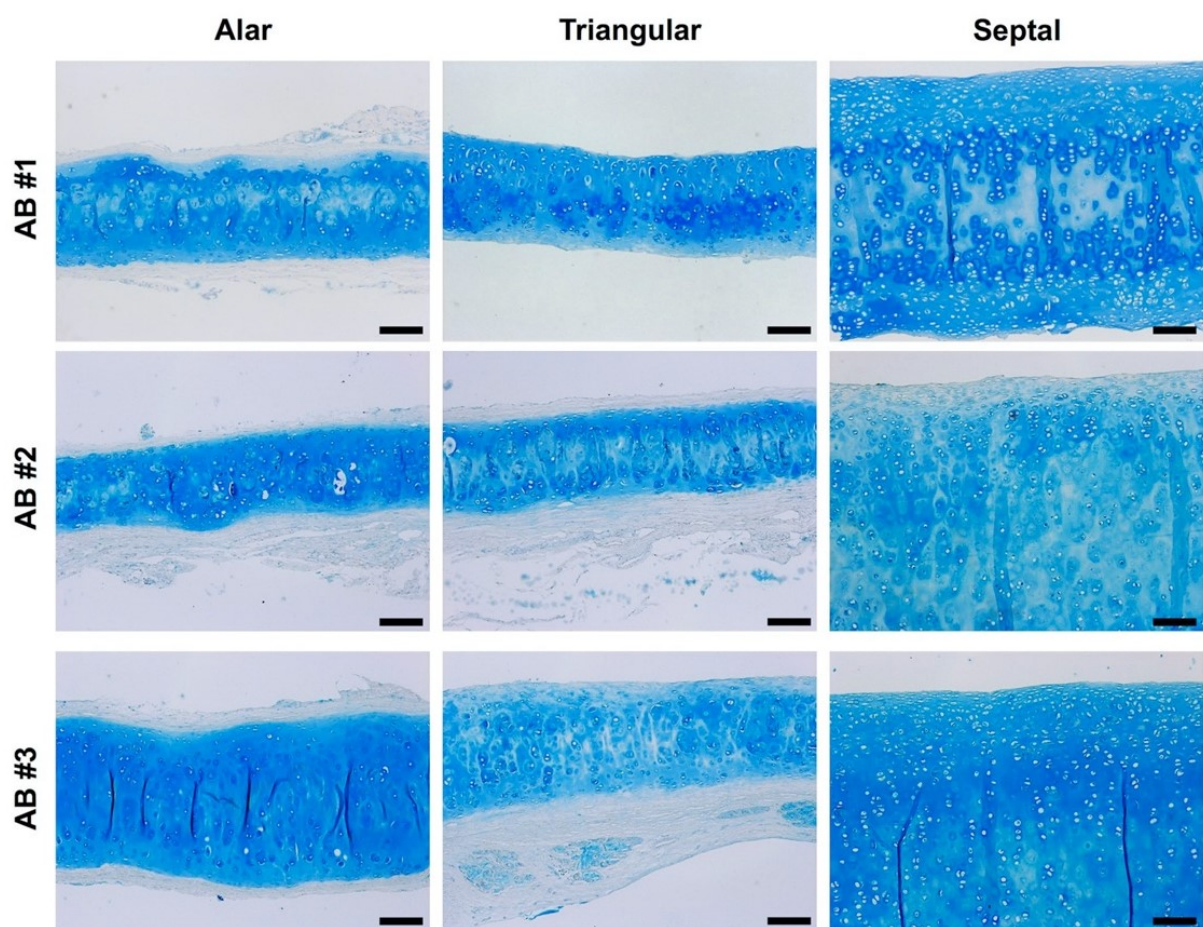


Abbildung 9 zeigt die Alzianblau-(AB)-Färbung von Flügel-, Dreiecks- und Septumknorpel. Hierbei werden sulfatierte Glykosaminoglykane blau dargestellt und dadurch die Organisation des Knorpels der Nase ersichtlich. Die Spender sind mit #1 bis #3 gekennzeichnet. Balken = 200 µm.[43]

Abbildung 10 zeigt die drei typischen Zonen des Knorpels der menschlichen Nase: superfizielle, intermediäre und zentrale Zone. Diese finden sich in allen Lokalisationen der entnommenen Proben, allerdings in unterschiedlicher Ausprägung.

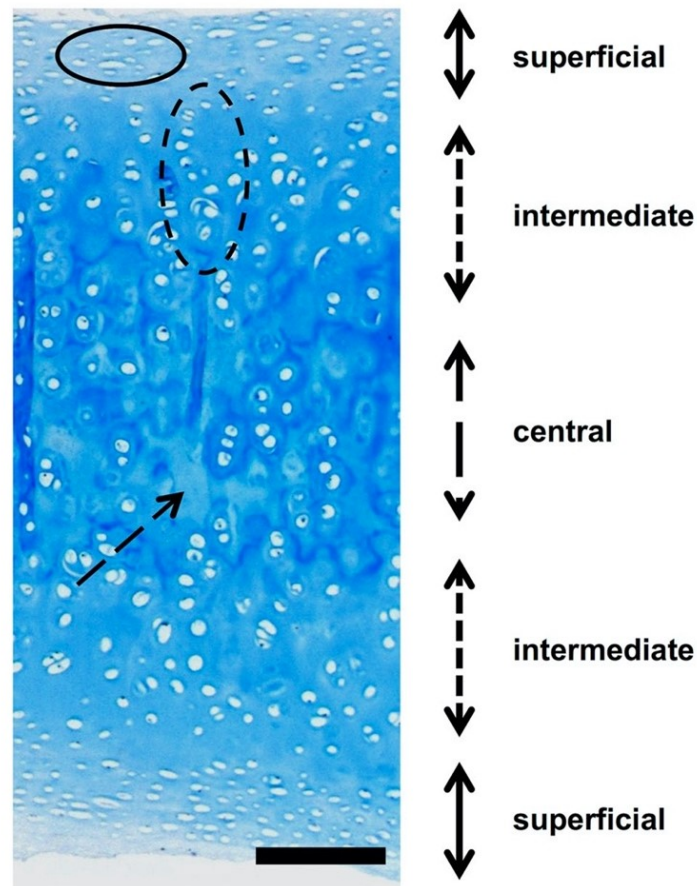


Abbildung 10 zeigt die typische Architektur und zonale Gliederung von Knorpel der menschlichen Nase: superfiziell („superficial“), intermediär („intermediate“) und zentral („central“). Der Balken entspricht 200 μm . [43]

Des Weiteren wurden erstmalig immunhistochemische Färbungen mittels COMP und Matrilin-3-Antikörpern durchgeführt. Abbildung 11 zeigt die Verteilung von COMP und Abbildung 12 die Verteilung von Matrilin-3 in allen anatomischen Lokalisationen bei allen Spendern. Hierbei finden sich die gleichen Verteilungsmuster von COMP in allen Subtypen von Nasenknorpel mit dem stärksten Nachweis in der EZM der intermediären Zone. Matrilin-3 hingegen kann hauptsächlich im Septumknorpel in der superfiziellen Zone perizellulär nachgewiesen werden.

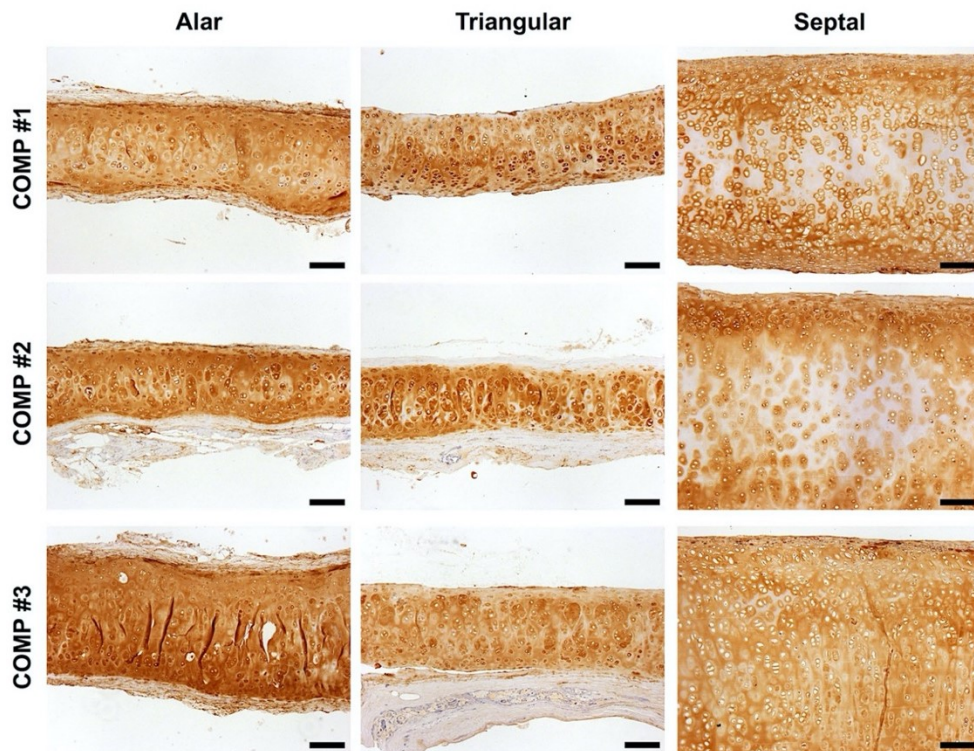


Abbildung 11 zeigt den Nachweis von COMP in der oberflächlichen, der intermediären und spärlich in der zentralen Zone. Die Spender sind mit #1 bis #3 gekennzeichnet. Balken = 200 μm . [43]

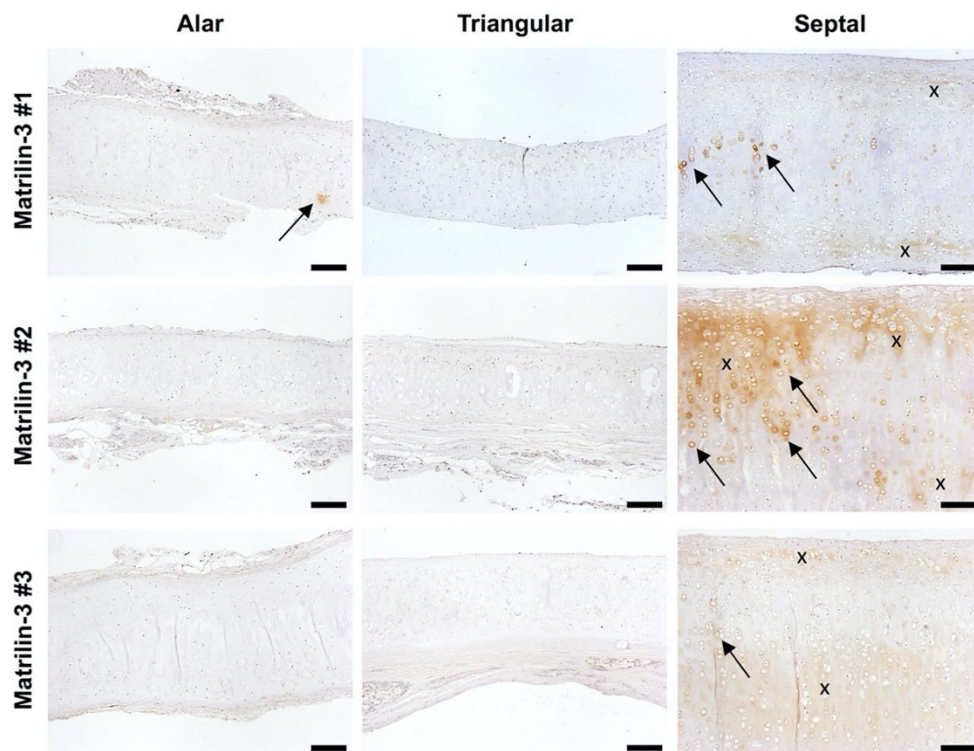


Abbildung 12 zeigt in den unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen ein individuelles Färbemuster für Matrilin-3. Es findet sich nur ein sehr schwacher Nachweis im Flügelknorpel. Im Gegensatz dazu weist der Septumknorpel eine deutliche diffuse Reaktivität in der intermediären Zone sowie perizellulär. Pfeile verdeutlichen fokale, X dagegen diffuse Anfärbungen.

Die Spender sind mit #1 bis #3 gekennzeichnet. Balken = 200 μm . [43]

Nach der histologischen Analyse erfolgte die biochemische und biomechanische Beurteilung des Knorpels der menschlichen Nase. Hierbei wurden aufgrund der notwendigen Probengröße nur Flügel- und Septumknorpel verglichen. Der Dreiecksknorpel war zu klein, um ausreichend Probenmaterial zu generieren.

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse des Drucktests (confined compression setup). Hierbei wurden die Proben einer Kompression von 10, 15, 20 und 25 % zugeführt und die notwendige Kraft hierfür gemessen. Der ermittelte Equilibrium Modulus nahm mit ansteigender Kompression signifikant zu und betrug 0,11 MPa bis 0,20 MPa im Flügelknorpel und 0,49 MPa bis 0,77 MPa im Septumknorpel, womit er hier fast viermal so hoch war. Der Unterschied war mit $p < 0,05$ signifikant.

Des Weiteren konnte aus den Daten die Permeabilität der Proben berechnet werden. Hierbei zeigte sich anhand der anatomischen Lokalisation kein signifikanter Unterschied für die Durchlässigkeit von Wasser. Allerdings nahm in beiden anatomischen Lokalisationen mit zunehmender Kompression die Durchlässigkeit für Wasser (Permeabilität k) ab und erreichte bei 25 % Kompression nur noch knapp 30 % des Maximalwerts. Dieser Zusammenhang war allerdings nur tendenziell und zeigte mit $p = 0,072$ keine Signifikanz. Die Messwerte der Permeabilität k betragen $1,1 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ bis $0,7 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ für den Flügelknorpel und $1,5 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ bis $0,6 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ für den Septumknorpel.

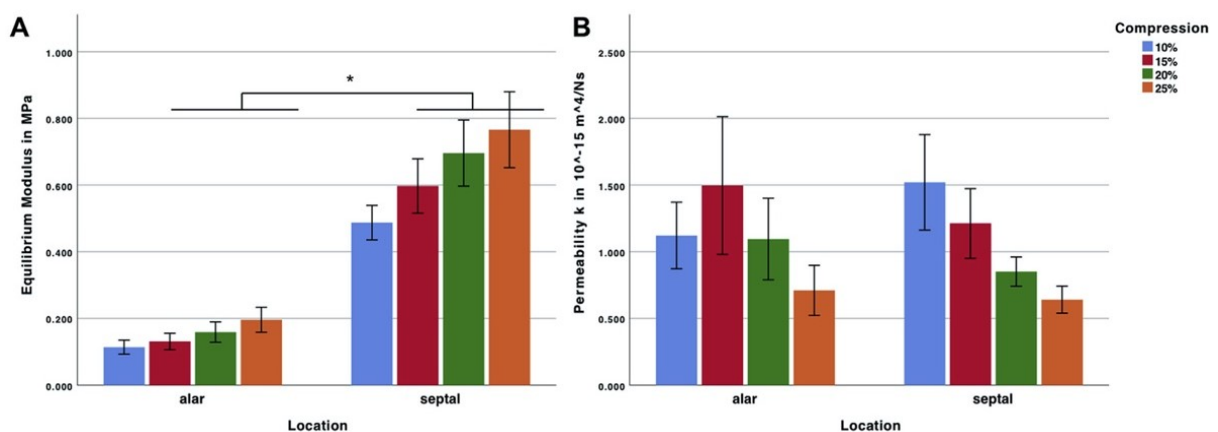


Abbildung 13 zeigt die Balkendiagramme für den Equilibrium Modulus (A) sowie die Permeabilität k (B) als Resultate des Kompressionstests. * $p < 0,05$. [46]

Aufgrund der unterschiedlichen Messwerte in der biomechanischen Testreihe erfolgte eine biochemische Analyse der jeweiligen Proben. Hierbei fand sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Zusammensetzung zwischen Flügel- und Septumknorpel bezüglich Zellzahl (147.000 Zellen/mg vs. 63.000 Zellen/mg) und bezüglich Glykosaminoglykanen (77 $\mu\text{g}/\text{mg}$ vs. 57 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Es bestand kein signifikanter Unterschied im Kollagengehalt (108 $\mu\text{g}/\text{mg}$ vs. 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

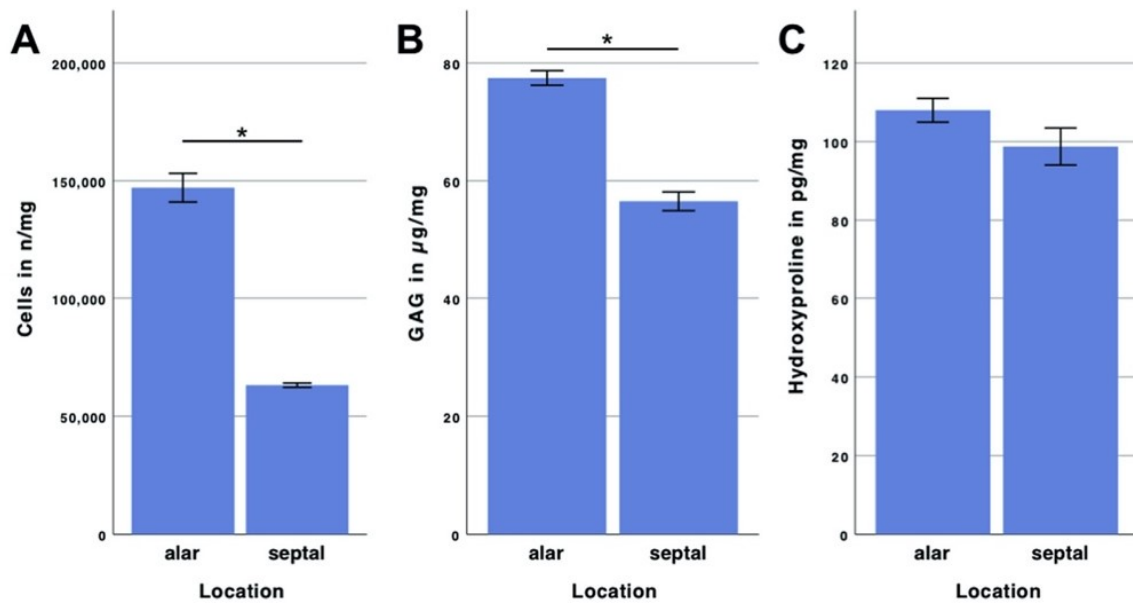


Abbildung 14 Balkendiagramm zeigt die Zellzahl, Glykosaminoglykangehalt und Kollagengehalt in Bezug auf die anatomische Lokalisation. * $p < 0,05$. [46]

Abschließend wurde eine multifaktorielle Regressionsanalyse durchgeführt, um die Einflussfaktoren auf den Equilibrium Modulus zu ermitteln und um den Equilibrium Modulus von menschlichem Nasenknorpel anhand seiner Zusammensetzung vorherzusagen können. Aufgrund mehrerer im Vorfeld durchgeführten Regressionsanalysen und Statistiken wurden der Kompressionsgrad, die Zellzahl und der Glykosaminoglykangehalt ausgewählt. Hiermit konnte ein signifikantes Modell berechnet werden mit $p < 0,001$ ($R = 0,804$, $R^2 = 0,647$). Zur Berechnung wurde ein statistischer Outlier im Flügelknorpel eliminiert und die Zellzahl als ein Vielfaches von 1000 angegeben. Somit ergab sich für den Equilibrium Modulus der menschlichen Nase: $0,013 \times \text{Kompressionslevel in \%} + -0,012 \times \text{Glykosaminoglykangehalt} + -0,002 \times \text{Zellgehalt} + 1,230$. Alle Prädiktionsvariablen waren significant: Kompressionslevel $p < 0,002$, Glykosaminoglykangehalt $p < 0,001$ und Zellgehalt $p < 0,017$.

Die graphische Zusammenfassung dieses Modells ist in einem dreidimensionalen Scatter-Plot in Abbildung 15 dargestellt. Hierbei zeigt Abbildung 15A die Abhängigkeit des Equilibrium Modulus von den zuvor genannten Variablen. Abbildung 15B kann anschließend anhand dieses Modells den Unterschied des Equilibrium Modulus von Flügel- und Septumknorpel graphisch erklären. Hierbei zeigt sich der Unterschied deutlich an der räumlichen Trennung der Messwerte für Flügel- und Septumknorpel im dreidimensionalen Scatter-Plot.

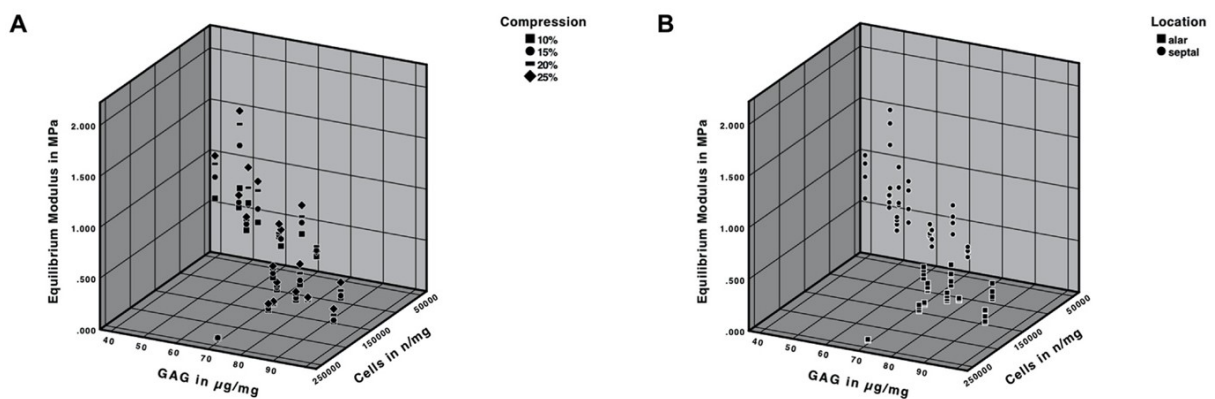


Abbildung 15 zeigt die dreidimensionalen Scatter-Plots für die Korrelation von Glykosaminoglykangehalt und Zellzahl mit dem Equilibrium Modulus. Die Symbole kennzeichnen den Kompressionsgrad (A) bzw. die anatomische Herkunft der Probe (B).[46]

Knorpelregeneration durch Biomaterialien und Stammzellen

Publikation 3

Zur Beurteilung des Regenerationspotentials von 3D druckbarem PCL erfolgte der Vergleich von PCL mit einem etablierten Scaffold zur Knorpelregeneration, der aus DPNC bestand. Des Weiteren wurde eine Kombination beider Scaffolds hergestellt, um das Regenerationspotential von PCL zu verbessern.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der biochemischen Analysen dargestellt. Hier zeigt sich eine signifikante Zunahme der Zellzahl über die Zeit ($p < 0,05$). Allerdings zeigt sich auch ein deutlicher, aber statistisch nicht signifikanter Unterschied einer höheren Zellzahl von PCL bzw. DPNC im Vergleich zu dem neuartigen Scaffold aus PCL und DPNC.

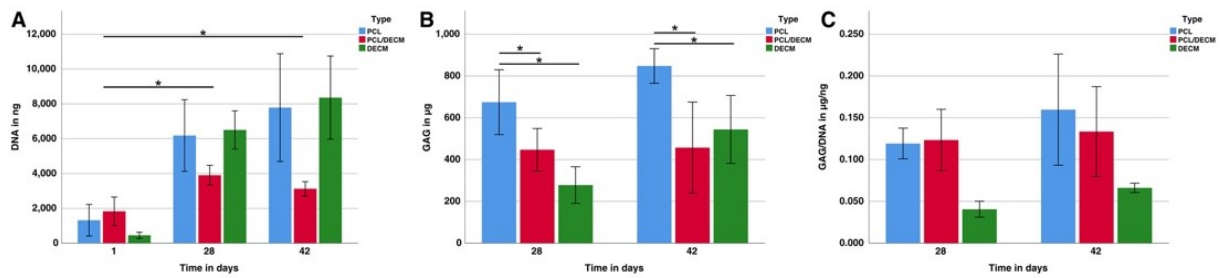


Abbildung 16 Ergebnisse der Biochemischen Assays: PicoGreen (a), DMMB (b), Verhältnis GAG/DANN (c). DECM=DPNC. Sterne markieren Signifikanzen mit $p < 0,05$. Flügel zeigen ± 1 Standardfehler. $N = 3$. [45]

Darüber hinaus war der Glykosaminoglykgehalt nach 28 und 42 Tagen in vitro auf PCL Scaffolds signifikant höher als auf den beiden anderen Scaffolds. Beachtlich ist hierbei das Verhältnis von Glykosaminoglykgehalt zu Zellzahl (DNA). Denn diese ist auf den beiden PCL basierten Scaffolds tendenziell fast doppelt so hoch wie auf den DPNC Scaffolds und zeigt eine gleich große Produktion von EZM auf PCL und PCL/DPNC Scaffolds relativ zur Zellzahl.

Um diese Unterschiede weiter zu beleuchten, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 17 dargestellt. Hierin zeigt sich deutlich, dass die neuartige Kombination aus PCL und DPNC keine Summation der Materialien darstellt. So lässt sich die Genaktivität der humanen Chondroprogenitorzellen auf den PCL/DPNC Scaffolds nicht als bloßer Mittelwert der beiden ursprünglichen Scaffolds berechnen. Beispielsweise ist die Transkription des Kollagen 2 Gens (COL2A1) auf PCL/DPNC Scaffolds im Vergleich zu den beiden anderen Scaffolds deutlich höher. Die Transkription des Kollagen 10 Gens (COL10A1) war hingegen auf dem neuartigen Scaffold genauso hoch wie auf reinem DPNC und signifikant niedriger als auf reinem PCL.

Insgesamt zeigte sich bei reinen PCL Scaffolds eine Genaktivität, welche auf eine Hypertrophie (COL10A1) sowie Ossifikation (hOSP) hindeutet. Demgegenüber stand eine typische chondrogene Genaktivität auf DPNC Scaffolds. Auf den neuartigen PCL/DPNC Scaffolds fand sich eine ähnliche Genaktivität wie auf reinen DPNC Scaffolds und ein signifikanter Unterschied zur reinen PCL Scaffolds.

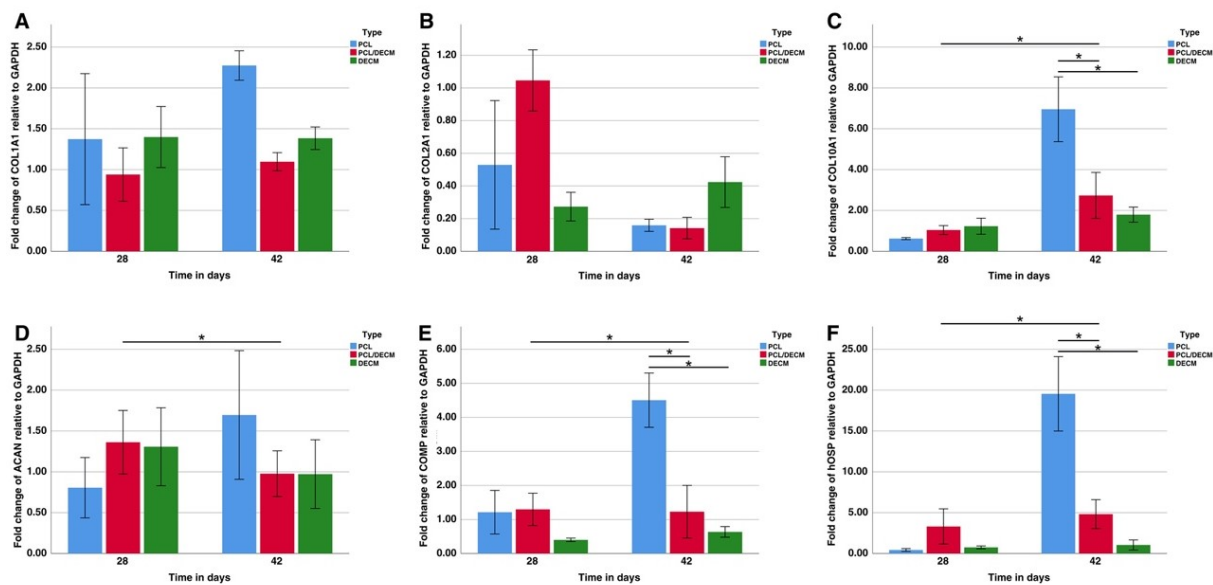


Abbildung 17 Ergebnisse der qRT-PCR: COL1A1 (a), COL2A1 (b), COL10A1 (c), ACAN (d), COMP (e), hOSP (f). GAPDH wurde als Referenzgen gewählt und die relative Expression mittels DDCT-Methode berechnet, wobei Chondrozyten in einer Fibrinmatrix als Kontrollgruppe dienen. * $p < 0,05$. Flügel zeigen ± 1 Standardfehler. $N = 3$. [45]

Publikation 4

Nach einer ersten Evaluation von PCL für die Verwendung bei der Knorpelregeneration von kraniofazialen Defekten erfolgte anschließend die Erprobung von ASCs zur Knorpelregeneration, da diese in höherer Zellzahl zu ernten und kultivieren sind. Aus diesem Grund wurde das zuvor bereits erprobte DPNC verwendet und mit ASCs besiedelt. Hierbei zeigte sich ein regelrechtes Anheften der ASCs, eine konstante Vitalität und eine Proliferation auf den DPNC Scaffolds. Abbildung 18 zeigt Live-Dead-Färbungen über den Verlauf von 14 Tagen. Hierbei zeigt sich bereits am ersten Tag eine homogene Verteilung und gute Vitalität der Zellen. Anschließend proliferieren die Zellen und bilden analog zur 2D-Kultur Aggregate von dichten liegenden Zellen. Der parallel durchgeführte AlamarBlue-Assay zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der mitochondrialen Aktivität und damit auch der Zellzahl auf den Scaffolds.

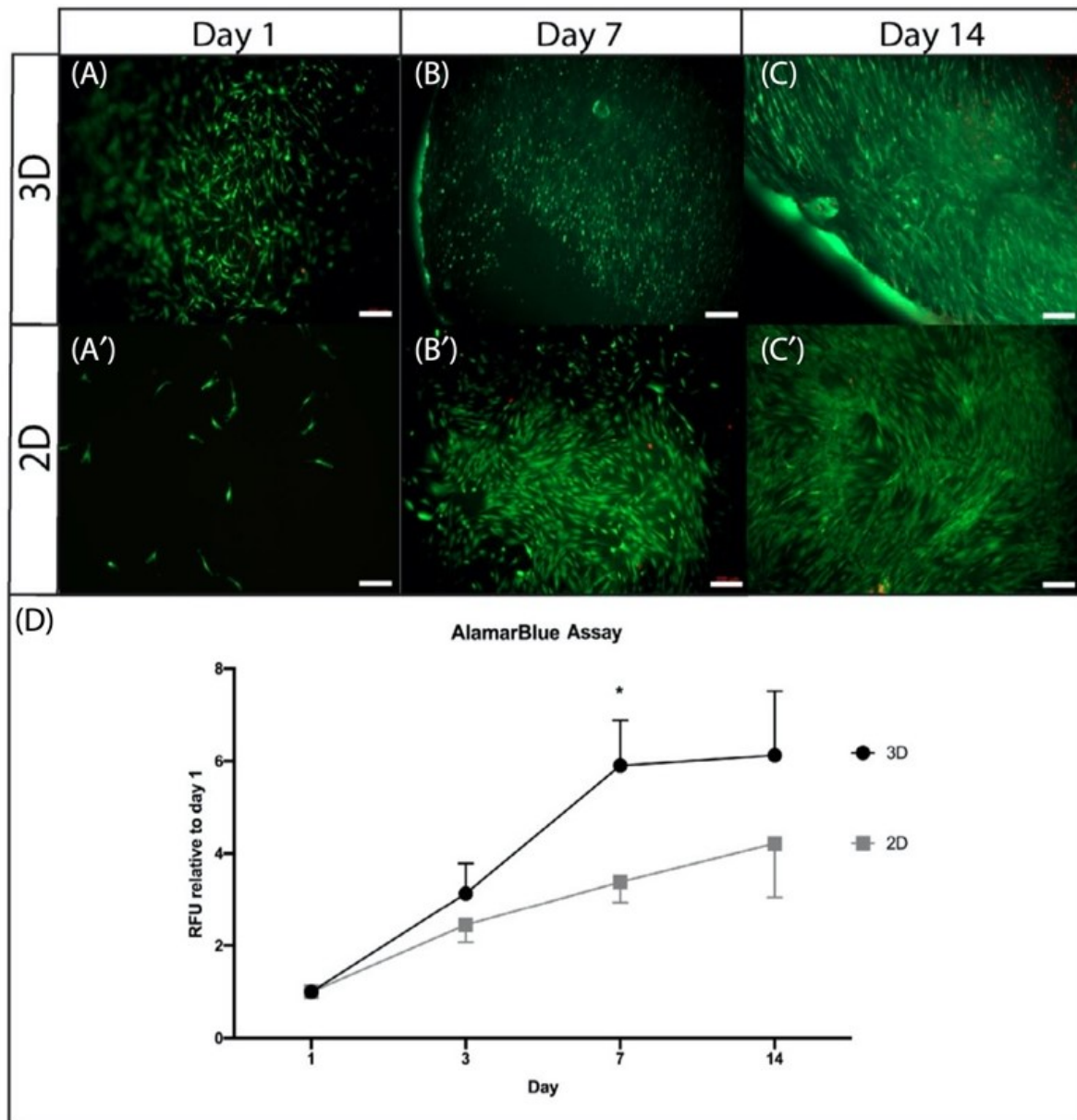


Abbildung 18 mit Live-Dead-Färbungen von ASCs auf DPNC (3D) und als Kontrolle im 2D Well (2D) über einen Zeitraum von 2 Wochen (A bis C'). Balken = 200 μ m. AlamarBlue Assay (D) zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der mitochondrialen Aktivität relativ zu Tag 1 sowohl in 2D als auch in 3D. * $p < 0,05$. $N = 5$. [22]

Anschließend erfolgte die biochemische Analyse der Scaffolds mittels PicoGreen- und DMMB-Assay. Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Produktion von Glykosaminoglykanen auf den DPNC-Scaffolds im Vergleich zu der nicht induzierten Kontrollgruppe nach 28 Tagen ($p < 0,05$) und 42 Tagen ($p < 0,01$). Außerdem verdoppelte sich die Zellzahl im PicoGreen-Assay binnen vier Wochen.

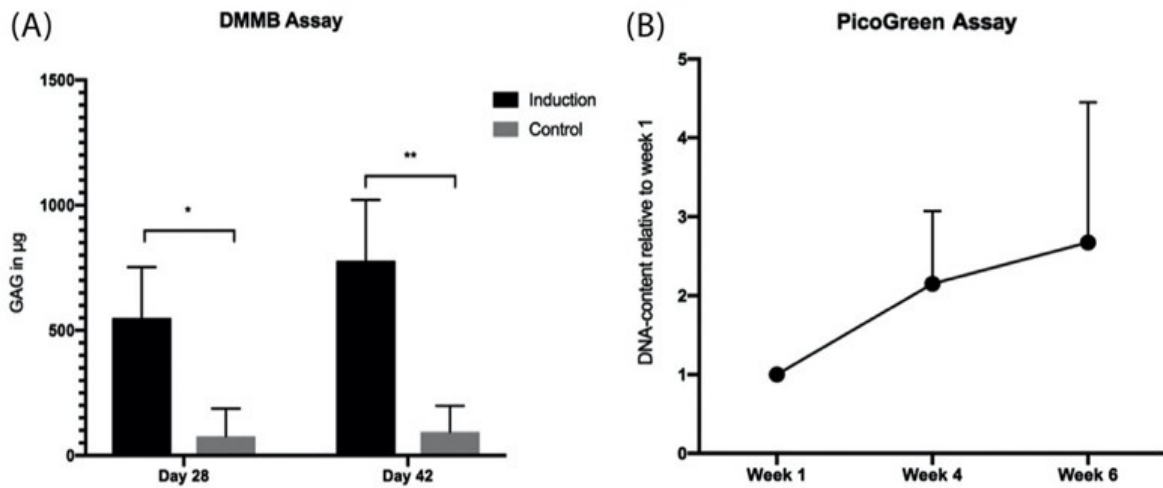


Abbildung 19 zeigt den DMMB-Assay (A) und PicoGreen-Assay (B). GAG Produktion zeigt einen Anstieg über die Zeit und einen signifikanten Unterschied zwischen Induktion und Kontrolle nach 28 Tagen ($p < 0,05$) und 42 Tagen ($p < 0,01$). Die Zellzahl verdoppelte sich binnen zwei Wochen und stieg im Verlauf weiter an. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. $N = 5$. [22]

Im nächsten Versuch wurde die Invasion der Zellen in den DPNC-Scaffold visuell dargestellt und mittels computerbasierter Auswertung quantifiziert. Abbildung 20 visualisiert die vitalen Zellen auf den Scaffolds mittels Phalloidin/DAPI-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Hierbei findet sich ein zunehmender Nachweis von Zellen auf dem Scaffold. Mittels automatisierter Bildanalyse konnten die so gewonnen Bilder quantifiziert werden und ein signifikanter Anstieg der Besiedelung des über die Zeit von 28 Tagen ($p < 0,001$) nachgewiesen werden.

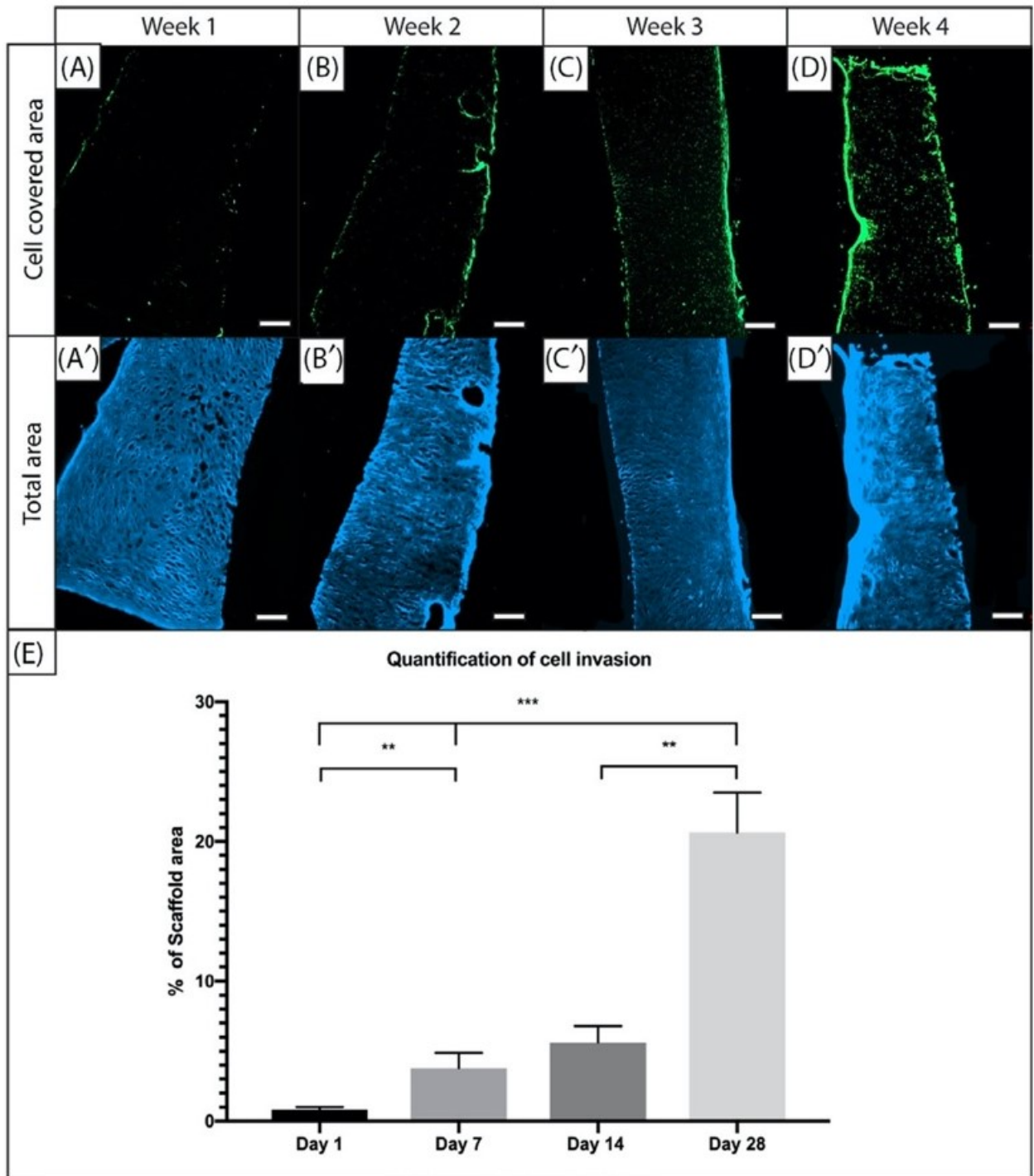


Abbildung 20 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Besiedelung von DPNC Scaffolds mit ASCs über einen Zeitraum von 4 Wochen (A bis D). Zellbesiedelter Anteil des Scaffolds erscheint in der Phalloidin-Färbung grün und in der DAPI-Färbung blau. Zudem zeigt sich die Autofluoreszenz des Scaffolds im Blau-Kanal, die zur Berechnung der Gesamtfläche des Scaffolds im Schnittbild benutzt wurde. Balken = 100 μ m. Die automatisierte Bildanalyse (E) erbrachte einen signifikanten Anstieg der Besiedelung bis zum 28. Tag. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. $N = 3$. [22]

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Knorpelregeneration durch ASCs auf DPNC erfolgte die Bestimmung der Wechselwirkungen der EZM von Knorpel mit ASCs. Hierzu wurde die aus den anatomischen Studien bekannte zonale Gliederung des humanen Nasenknorpels genutzt. Durch Teilung in der Zentralen Zone konnten die ASCs so mit zwei verschiedenen Arten von EZM des Nasenknorpels in Kontakt kommen und der Einfluss der speziellen EZM auf die ASCs beurteilt werden.

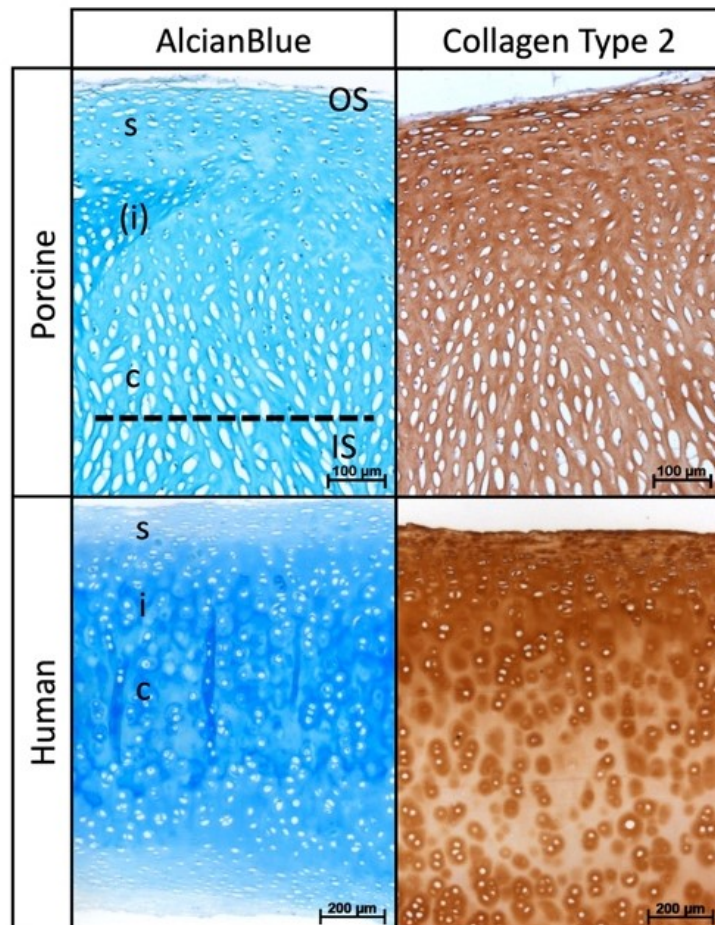


Abbildung 21 zeigt die histologische Organisation von DPNC und humanem Nasenknorpel mit der typischen zonalen Gliederung in superfizielle (s), intermediäre (i) und zentrale (c) Zone. Gestrichelte Linie bedeutet die Teilungslinie des Knorpels um zwei verschiedene Arten von EZM für die ASCs zu exponieren. Durch diese Technik konnten ASCs sowohl mit EZM der superfiziellen Zone (outer surface = OS) als auch der zentralen Zone (inner surface = IS) in Kontakt gebracht werden.[21]

Um dies im Modell durchführen zu können, wurde DPNC gewählt und vor Beginn der analoge Aufbau von porzinem und humanen Nasenknorpel demonstriert. Abbildung 21 zeigt die AlzianBlau- und Kollagen-Typ-2-Färbung von humanem und porzinem Knorpel. Die Gliederung in superfizielle, intermediäre und zentrale Zone ist in beiden Spezies analog zu erkennen.

Nach Besiedelung der Scaffolds mit ASCs sowohl in der superfiziellen Zone als auch in der zentralen Zone erfolgte die Analyse der Zellinvasion mit der zuvor eingesetzten fluoreszenzmikroskopischen Bildgebung. Hierin zeigte sich eine vitale Besiedelung der Scaffolds mit Zellen. Allerdings fand sich ein deutlich unterschiedliches Bild des Zellwachstums in Abhängigkeit von der besiedelten Zone. ASCs, die auf der superfiziellen Zone angesiedelt wurden, zeigten ein Wachstumsmuster wie in der 2D-Kultur mit appositioneller Zellproliferation nach außen um den Scaffold herum, die in größeren mehrschichtigen Zellhaufen mündete. Dies ist deutlich in Abbildung 22 A' bis C' dargestellt. Demgegenüber fand sich eine deutliche Zellinvasion bei ASCs, die auf die zentrale Zone angesiedelt wurden. Hier finden sich ausgehend von der besiedelten Seite des Scaffolds Zelleninvasionen ohne Bildung von Zellhaufen im inneren des Scaffolds. Dargestellt ist dies in Abbildung 22 A bis C.

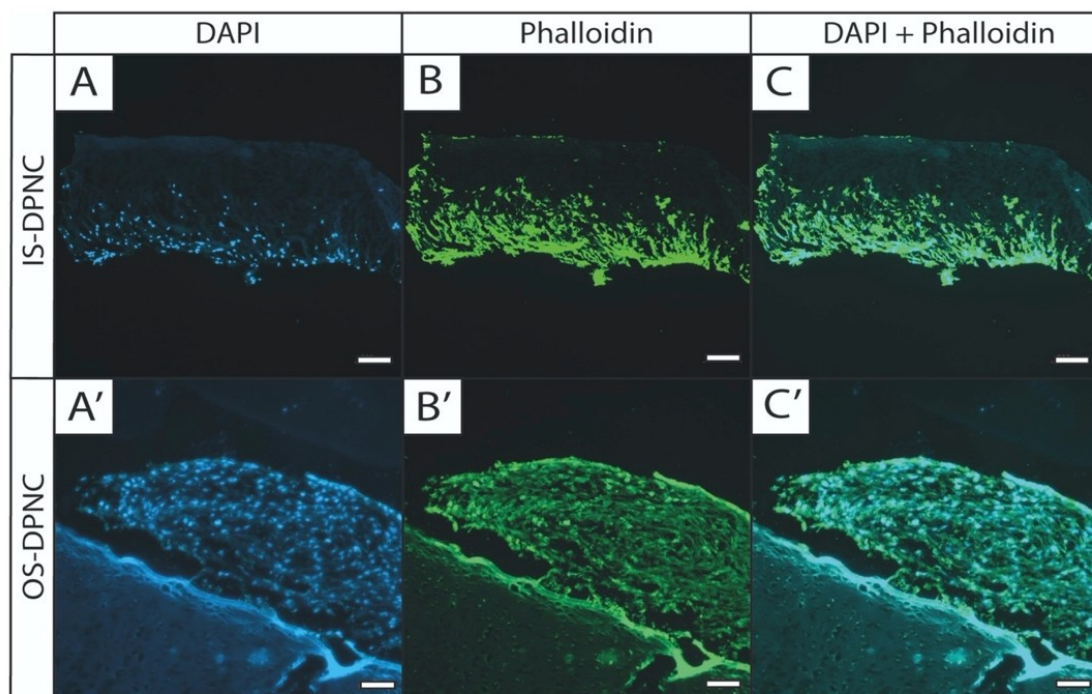


Abbildung 22 fluoreszenzmikroskopische Bildgebung der Zellinvasion von ASCs in der superfiziellen Zone (OS-DPNC) sowie der zentralen Zone (IS-DPNC). Die Scaffolds wurden nach Besiedelung für 28 Tage kultiviert und mittels DAPI (blau, A) und Phalloidin (grün, B) angefärbt. Spalte C bzw. C' zeigt die Fusionsbilder aus DAPI und Phalloidin. ASCs, die auf der zentralen Zone angesiedelt wurden, migrieren deutlich ins Innere des Scaffolds, wohingegen ASCs auf der superfiziellen Zone mehrschichtige Zellhaufen bilden. A bis C Balken = 200 μm . A' bis C' Balken = 100 μm . N = 3. [21]

Neben der morphologischen Veränderung der ASCs durch die Interaktion mit verschiedenen Zonen der EZM von Nasenknorpel wurden auch die Veränderungen der Genexpression gemessen, um so genauere Aussagen zur Interaktion verschiedener EZM mit ASCs treffen zu können. In der durchgeführten qRT-PCR fanden sich signifikante Unterschiede in der Expression zahlreicher Gene zwischen ASCs auf der superfiziellen und der zentralen Zone. Diese sind im Detail in Abbildung 23 dargestellt. Beispielsweise fand sich ein signifikanter Unterschied in der Transkription der Kollagene Typ 1 und Typ 2 (COL1A1 und COL2A1) sowie der Integrine (ITGA10 und ITGA11).

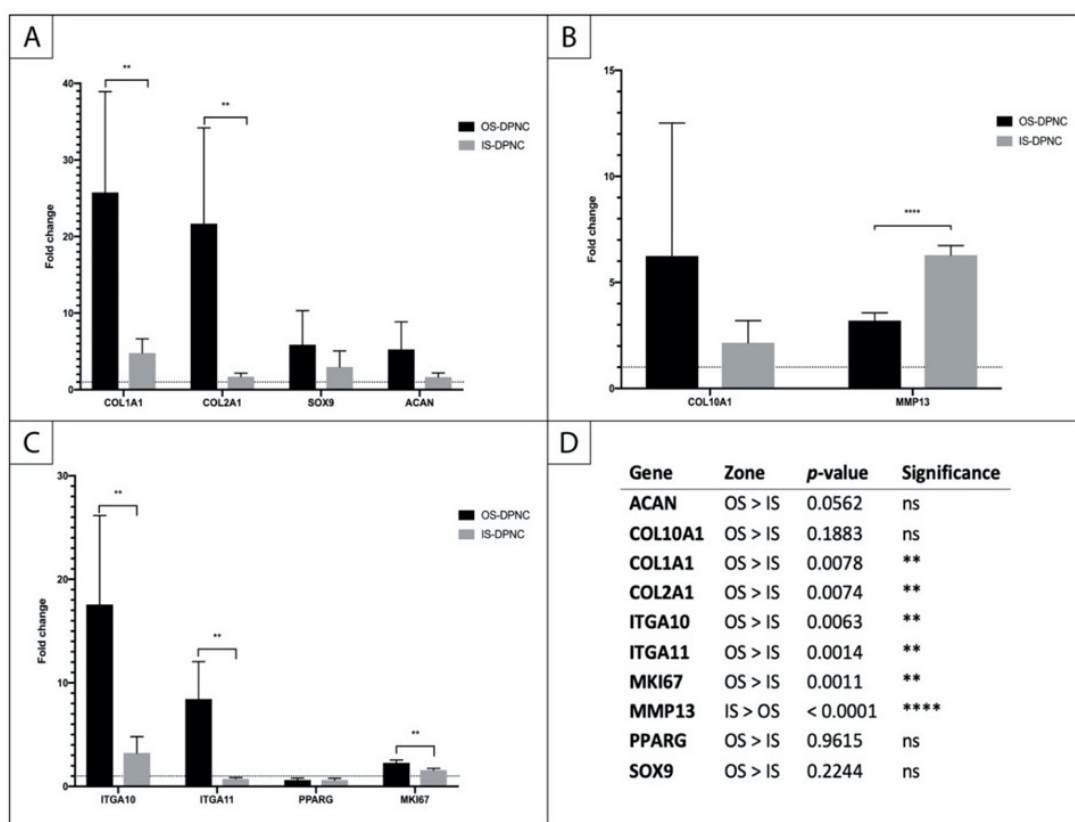


Abbildung 23 zeigt die relative Genexpression von ASCs, welche auf die superfizielle (OS) und zentrale (IS) Zone der DPNC besiedelt wurden. Dargestellt ist die Analyse mittels DDCT Methode für frühe chondrogene Marker (A), Marker chondralen Hypertrophie (B) und für Integrine, Adipogenese- und Proliferationsmarker (C). Feld D zeigt eine Zusammenfassung der statistischen Auswertung. ** $p < 0,01$. **** $p < 0,0001$. Flügel \pm Standardabweichung. $N = 5$. [21]

Publikation 6

Aufgrund des deutlichen Einflusses der chondralen EZM auf die verwendeten ASCs wurde ein neues Konzept zur Verbesserung der Knorpelregeneration mit PCL Scaffolds entwickelt.

Hierfür wurde eine EZM künstlich erzeugt, um so die zu Hypertrophie und Ossifikation tendierenden Einflüsse von PCL (vgl. Publikation 3) zu modulieren.

Hierfür wurden pure PCL-Scaffolds mit ASCs besiedelt und entweder chondrogen oder osteogen differenziert. Nach Kultivation der Scaffolds in der Zellkultur über sechs Wochen erfolgte die chemische Dezellularisierung, so dass die mit chondraler EZM aktivierten (acPCL) und mit osteogener EZM aktivierten (ocPCL) PCL-Scaffolds hergestellt waren. Abbildung 24 zeigt den Erfolg der durchgeführten Dezellularisierung in der biochemischen Analyse der Scaffolds. Sowohl in der chondralen als auch der osteogenen Differenzierung findet sich im PicoGreen-Assay nahezu keine DNA mehr.

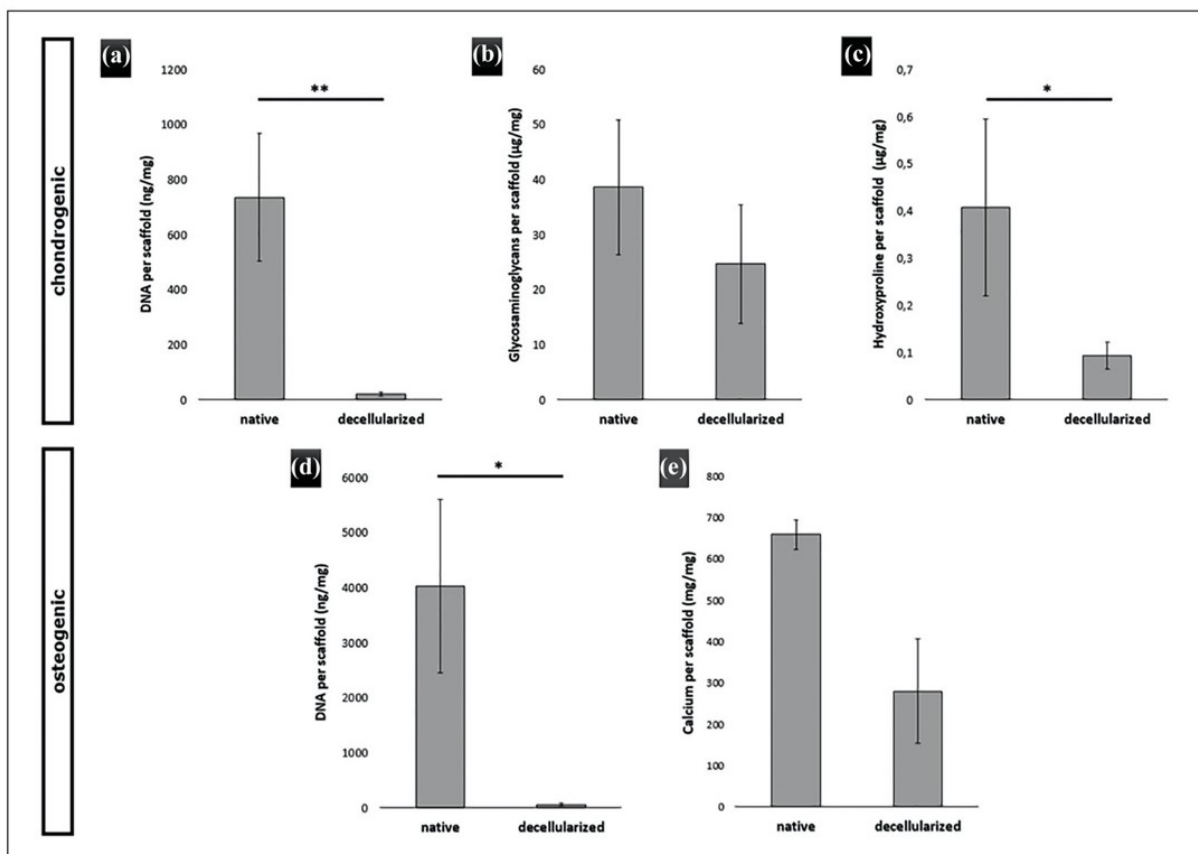


Abbildung 24 zeigt die biochemische Analyse der PCL Scaffolds nach Dezellularisierung für die Herstellung von acPCL (chondrogenic) und von ocPCL (osteogenic). A) und D) zeigen die nahezu vollständige Eradikation von DNA mittels PicoGreen Assay und B), C) sowie E) den Erhalt der EZM mittels DMMG- (Glykosaminoglykan), Hydroxyprolin- (Kollagen) und Calcium-Assay (Calcium). * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$. Flügel \pm Standardabweichung. $N = 3$. [5]

Dies korreliert mit den histologischen Analysen in Abbildung 25, wo sich keine Zellkerne mehr identifizieren lassen. Demgegenüber findet sich sowohl in der biochemischen Analyse als auch

in der Histologie eine persistierende EZM, die von den ASCs während der vorhergehenden sechs Wochen in der Zellkultur produziert wurde.

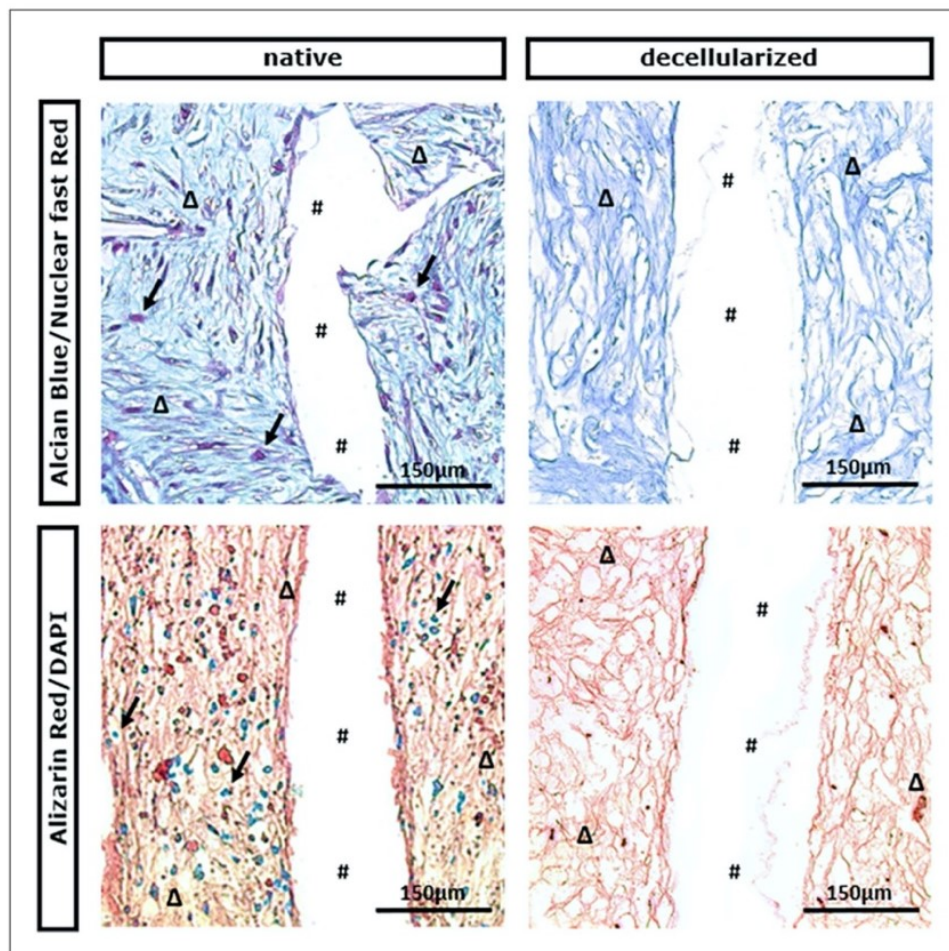


Abbildung 25 zeigt die Histologie der Scaffolds im Herstellungsprozess vor (native) und nach (decellularized) Dezellularisierung. Obere Reihe acPCL und untere Reihe aoPCL. Pfeile = exemplarische Zellkerne; Pfeilspitzen = typische EZM; # = Artefakt durch histologische Prozessierung von PCL im Sinne eines Negativabdrucks. Balken = 150 µm.[5]

Im nächsten Schritt wurden die so aktivierten Scaffolds erneut mit ASCs besiedelt und die Vitalität der Zellen im LiveDead-Assay (Abbildung 26 c und d) bestätigt. Zudem zeigte sich bei der erneuten Induktion eine signifikante Proliferation der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Daher wurde abschließend eine biochemische und molekularbiologische Analyse des Differenzierungsverhaltens der ASCs auf den jeweiligen aktivierten Scaffolds durchgeführt: bei den acPCL fand sich eine signifikant höhere Kollagen-Synthese im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$) und bei den ocPCL eine signifikant höhere Calcium-Einlagerung in die ECM ($p < 0,05$). Des Weiteren fand sich auf den acPCL ein tendenzieller Rückgang der Gene, die eine Knorpelhypertrophie bzw. Ossifikation (COL9A1 und ALPL) kennzeichnen, und

auf den aoPCL ein signifikanter Anstieg ($p < 0,01$) der Gene, die typisch für die Ossifikation (COL1A1, ALPL und SPP1) sind (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28).

Zusammenfassend konnte die Chondrogenese bzw. Osteogenese durch die aktivierten PCL-Scaffolds gezielt moduliert bzw. positiv beeinflusst werden.

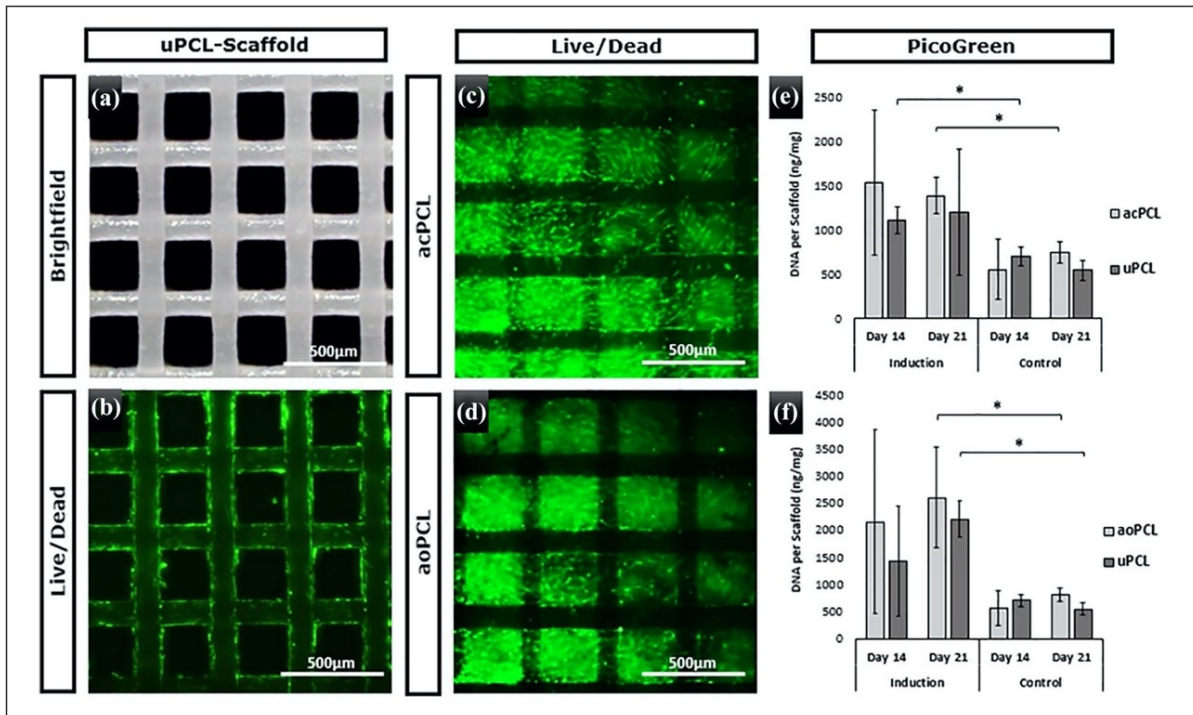


Abbildung 26: Die Scaffold Geometrie von unmodifiziertem uPCL ist im Lichtmikroskop dargestellt (a). Die Zelladhäsion und Vitalität konnte bei uPCL, acPCL und aoPCL im Live/Dead-Staining nach drei Tagen nachgewiesen werden. Es zeigt sich nach 14 und 21 Tagen eine Zellproliferation im PicoGreen-Assay. * $p < 0,05$. Flügel \pm Standardabweichung. $N = 3$. [5]

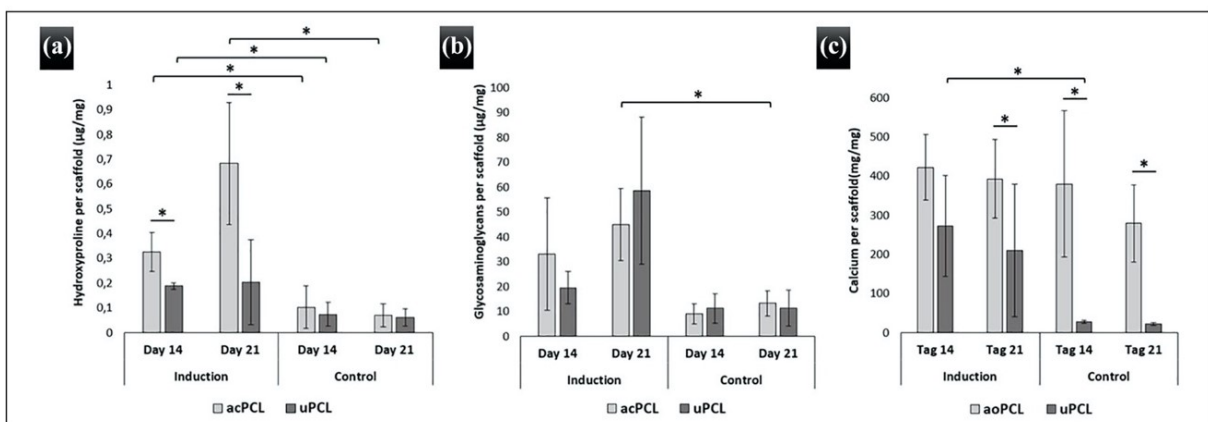


Abbildung 27: biochemische Analyse der EZM, welche von ASCs auf aktiviertem PCL und unmodifiziertem PCL produziert wurde. Hydroxiprolin-Assay (a), DMMB-Assay (b), Calcium-Assay (c). Unmodifiziertes uPCL diente als Kontrollgruppe. * $p < 0,05$. Flügel \pm Standardabweichung. $N = 3$. [5]

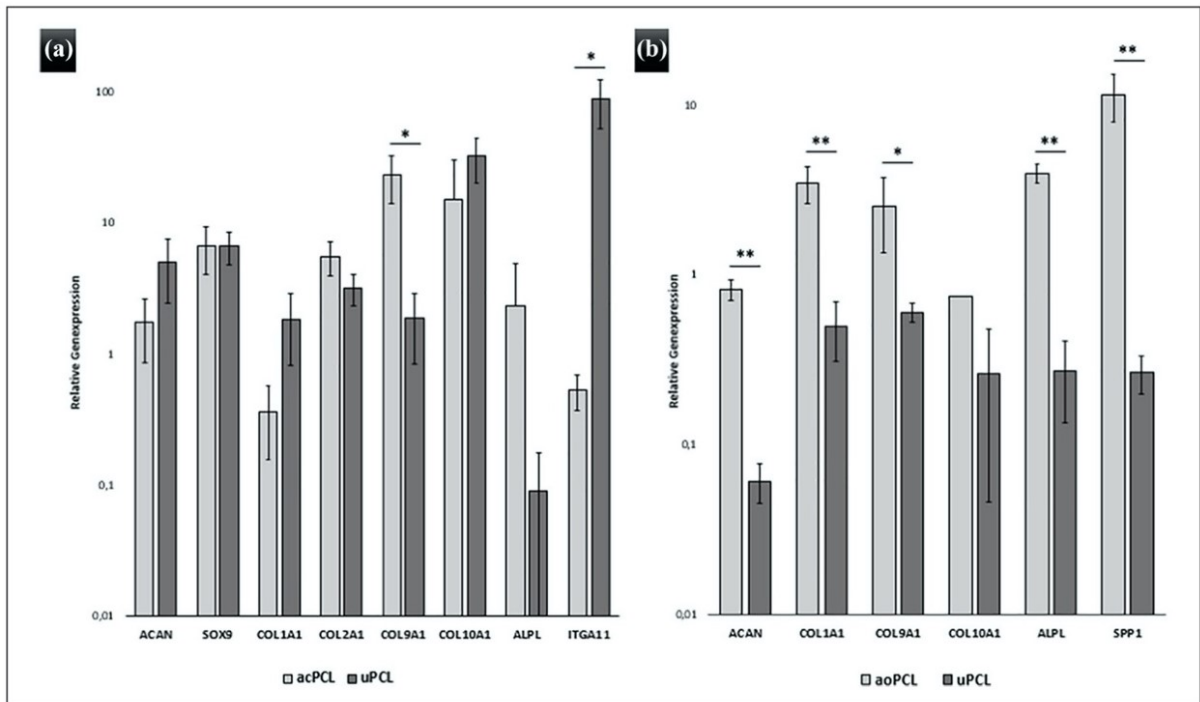


Abbildung 28: Balkendiagramme der relativen Genexpression von ASCs auf acPCL (a) und aoPCL(b). Unbehandelte uPCL Scaffolds dienten als Vergleichsgruppe. Die Auswertung erfolgte nach DDCT-Ansatz relativ zum Housekeeping-Gen-Index und im Verhältnis von differenzierten und undifferenzierten Zellen. Daher zeigen alle Daten die Genexpression unter hormoneller Stimulation der Differenzierung. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$. Flügel \pm Standardabweichung. $N = 3$. [5]

Klinisches Anwendungsbeispiel

Publikation 7

Nach der Optimierung von PCL-basierten Scaffolds in der Zellkultur erfolgte die Translation in ein klinisches Anwendungsbeispiel im Sinne einer Machbarkeitsstudie. Hierfür erfolgte zuerst die Aufrüstung eines 3D-Druckers und die Etablierung eines Druckvorgangs von PCL mit ebendiesem Drucker, um so individuell designte Scaffolds herstellen zu können. Nach entsprechender Modifikation des Druckers konnten so neben dem vom Hersteller zertifizierten Polymeren ABS und PLA auch das gewünschte Polymer PCL zum 3D-Druck eingesetzt werden. Zur Kontrolle der Druckqualität erfolgte anschließend eine serielle Fertigung entsprechender geometrischer Objekte mit allen drei Polymeren. Dabei war die geometrische Genauigkeit, die repetitive Genauigkeit sowie das Auflösungsvermögen

(minimale Druckgröße) bei allen drei Materialien ohne signifikante Unterschiede. Lediglich beim Auflösungsvermögen war der Druck von PCL den anderen Materialien unterlegen (Abbildung 29). Hierbei erreichte der Drucker eine Limitation durch die Qualität der Poren im Scaffold.

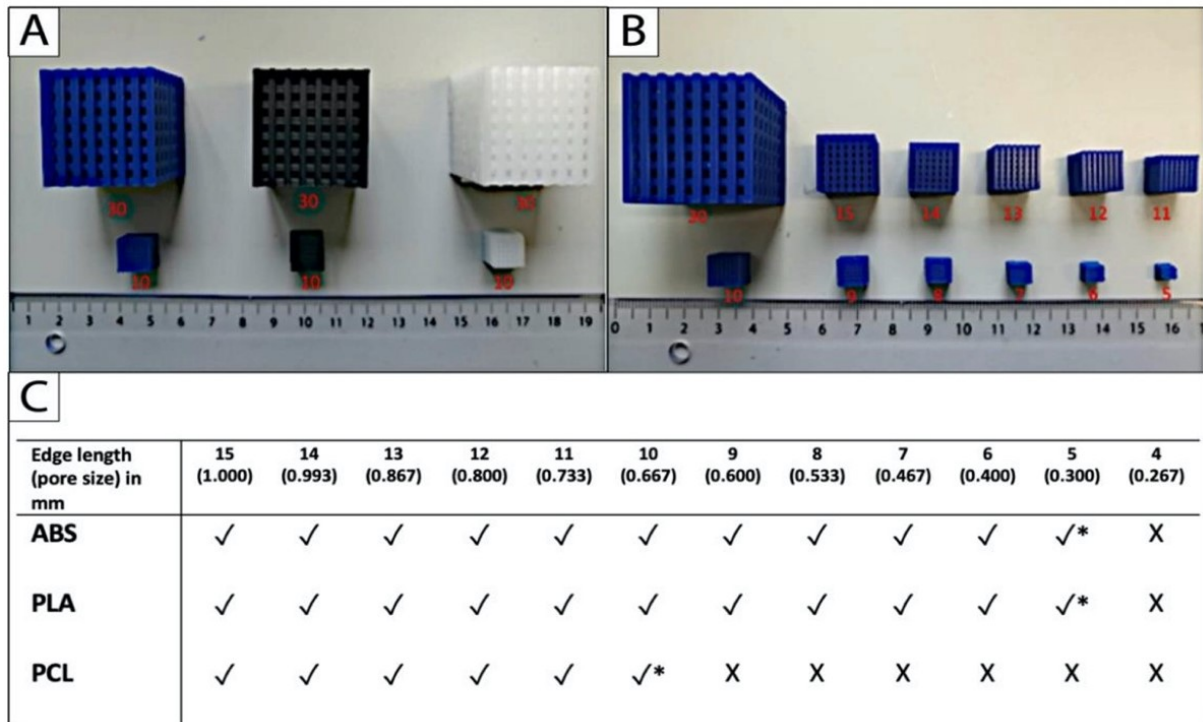


Abbildung 29: Auflösungsvermögen des 3D Druckers (minimale Druckgröße) bei den verwendeten Polymeren ABS (blau), PLA (schwarz) und PCL (weiß). A zeigt die Ausgangsgröße des Objekts (Kantenlänge 30 mm) und die mit allen Materialien erreichte kleinste Größe (Kantenlänge 10 mm) nebeneinandergestellt. B demonstriert anhand von ABS den Downscaling-Prozess (Verkleinerungsprozess) zur Testung der Druckauflösung durch schrittweise Halbierung der Kantenlängen des Würfels. C fasst in einer Tabelle die minimal erreichte Druckgröße (*), den Druckerfolg (x nicht möglich, ✓ möglich) und die entsprechenden Kantengrößen (edge length) sowie Porengrößen (pore size) zusammen. $N = 5$. [20]

Anschließend erfolgte die erfolgreiche Herstellung eines Ohrmodells aus PCL. Hierbei wurde sowohl ein solides Modell als auch ein poröses Modell für einen möglichen regenerativen Einsatz gedruckt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

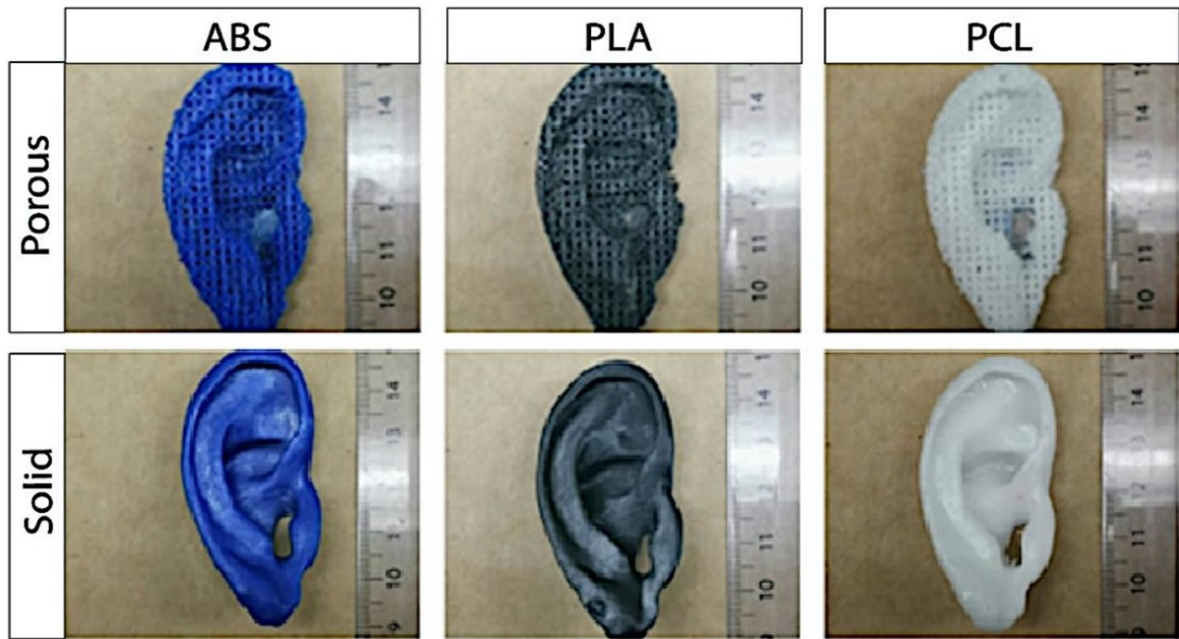


Abbildung 30 zeigt exemplarische Bilder des individuell geplanten und mit dem 3D Drucker hergestellten Ohrmodells sowohl als solides Objekt (solid, untere Reihe) als auch als poröser Scaffold (porous, obere Reihe), der für die Zellkultur verwendet werden kann. ABS blau, PLA schwarz und PCL weiß. [20]

Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, wie der Titel „Anwendungsorientierte Entwicklung von regenerativen Biomaterialien zur Verwendung als Knorpelersatz in der Rekonstruktion von komplexen Defekten im Kopf- und Halsbereich“ widerspiegelt, neue Therapiemöglichkeiten für die Behandlung von komplexen kraniofazialen Knorpeldefekten zu finden. Dies sollte durch die Verbindung von 3D-Druck und bioaktiven Materialien erfolgen. In einem ersten Schritt wurden daher die anatomischen und biomechanischen Grundlagen erforscht. In einem zweiten Schritt wurden die Interaktionen von Stammzellen mit der EZM von natürlichem Nasenknorpel untersucht, um so 3D-druckbare Polymere gezielt biologisch aktivieren zu können. In einem dritten Schritt wurde dann abschließend die Herstellung von 3D-gedruckten Implantaten mit einem kostengünstigen 3D-Drucker evaluiert, um die klinische Einsatzfähigkeit dieser Technologie zu beurteilen.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit (Charakterisierung der anatomischen Zielstrukturen) erfolgte eine umfangreiche Analyse und Charakterisierung des Knorpels der menschlichen Nase. Hierfür wurden zahlreiche Techniken eingesetzt. Hierzu zählten nicht nur biomechanische Methoden wie der Confined-Compression-Drucktest, der sich für den Gelenkknorpel bereits bewährt hatte und neben der Kompressibilität auch die Permeabilität der Proben bestimmen konnte, sondern auch immunhistochemische Methoden, die bislang nur im Gelenkknorpel verwendet wurden, aber durch ihre erstmalige Anwendung im Knorpel der menschlichen Nase neuartige Erkenntnisse gewinnen und ein besseres Verständnis der bislang erforschten histologischen Anatomie ermöglichen konnten.

So zeigte Publikation 1 „The distribution patterns of COMP and matrilin-3 in septal, alar and triangular cartilages of the human nose“ erstmalig die Verteilung von COMP und Matrilin-3 in allen anatomischen Lokalisationen der menschlichen Nase. Hierbei zeichnete sich diese qualitativ besonders durch die Tatsache aus, dass die korrespondierenden Proben jeweils aus demselben Spender stammten und so eine ideale Voraussetzung für einen Vergleich der anatomischen Lokalisationen geboten war. Dies hatte bis dato keine Publikation zu leisten vermocht. So hatten aus der Literatur bekannte Vorarbeiten wie Popko et al. nur die Nasenscheidewand oder den Flügelknorpel untersucht[29]. Popko et al. hatte in seiner Arbeit eine zonale Gliederung der histologischen Architektur der Nasenscheidewand beschrieben. In

Publikation 1 „The distribution patterns of COMP and matrilin-3 in septal, alar and triangular cartilages of the human nose“ konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der gesamte Knorpel der menschlichen Nase einer solchen zonalen Gliederung folgt. So sind Septum, Flügel- und Dreiecksknorpel zonal gegliedert. Allerdings, so die weiteren Erkenntnisse dieser Publikation, sind diese Zonen je nach anatomischer Lokalisation signifikant unterschiedlich ausgeprägt.

Außerdem konnten die weiteren immunhistochemischen Untersuchungen dieser Publikation zeigen, dass die zonale Gliederung nicht nur eine morphologische Beschreibung der histologischen Schnittbilder ist, sondern dieser Gliederung auch eine erkennbare Organisation von Zellen und extrazellulärer Matrix, speziell spezifischer funktioneller Matrixproteine wie COMP und Matilin-3, zugrunde liegt. Beispielsweise zeigt COMP eine Verteilung, die deutlich mit Kollagen Typ 2 korreliert. Aus der Literatur war das Vorkommen von COMP im hyalinen Gelenkknorpel bereits bekannt[10]. Publikation 1 „The distribution patterns of COMP and matrilin-3 in septal, alar and triangular cartilages of the human nose“ konnte den Nachweis von COMP auch für die menschliche Nase erbringen. Nachdem COMP vor allem in Kollagen Typ 2 reichen Anteilen der EZM gefunden wurde, konnte die Vermutung aufgestellt werden, dass COMP an der Organisation des Kollagen-Netzwerks der Nasenscheidewand beteiligt ist und so eine essenzielle Rolle für die biomechanischen Funktion des Nasenknorpels einnimmt. Dies passt gut zu Studien von Smith et. al, die einen Anstieg von COMP in Sehnen und Bändern mit zunehmender biomechanischer Belastung zeigen konnten[38]. Darüber hinaus konnte Zaucke et al. nachweisen, dass COMP an der Differenzierung von Chondrozyten und der Organisation ihrer EZM beteiligt ist. Demgegenüber konnte Matrilin-3, wie erwartet (Matrilin-3 wird im gesunden Knorpel nur in geringen Mengen exprimiert[31]), nur an wenigen Stellen nachgewiesen werden. Allerdings wurden diese insbesondere in den hypertrophen Zonen der Nasenscheidewand gefunden. Aufgrund dieser Befunde und den bisherigen Erkenntnissen der Literatur wurde vermutet, dass Matrilin-3 an dieser Stelle entscheidend für die Mechanosensitivität der Chondrozyten ist und so an der Regulation der Hypertrophie/Ossifikation der Nasenscheidewand beteiligt ist[4, 19].

Die in Publikation 1 „The distribution patterns of COMP and matrilin-3 in septal, alar and triangular cartilages of the human nose“ gefundenen Erkenntnisse wurden in der anschließenden Publikation 2 „Differences between human septal and alar cartilage with respect to biomechanical features and biochemical composition“ weiter beleuchtet. Letztere

konnte zeigen, dass es zwischen Flügel- und Septumknorpel trotz gemeinsamen Bauplans als hyaliner Knorpel mit drei Zonen signifikante Unterschiede gibt. Erstens war die biochemische Zusammensetzung signifikant unterschiedlich in Bezug auf die Zellzahl und wesentliche funktionelle Makromoleküle der EZM und zweitens waren die funktionellen biomechanischen Eigenschaften signifikant unterschiedlich.

Wie bereits für die Histologie erläutert, war eine entscheidende Stärke dieser Publikation die Untersuchung von mehreren korrespondierenden Proben aus demselben Spender. Hierdurch konnten erstmalig verlässliche Vergleichswerte für die biomechanischen Eigenschaften von Flügel- und Septumknorpel gewonnen werden. Die in der Literatur vorhandenen Vergleichswerte, z.B. E-Modul für die Kompressibilität, entstammten bisher meist nur dem Septumknorpel oder selten dem Flügelknorpel. Aufgrund methodischer Unterschiede und Angaben in der Berechnung war daher ein Vergleich der biomechanischen Eigenschaften von Septum- und Flügelknorpel nur sehr eingeschränkt möglich. Mit den in der Publikation 2 „Differences between human septal and alar cartilage with respect to biomechanical features and biochemical composition“ gewonnenen Daten konnte dieser Missstand behoben werden. Diese Studie fand so einen signifikanten Unterschied in den biomechanischen Eigenschaften von Flügel- und Septumknorpel. Die hierin gefundenen Werte der Kompressibilität/Steifigkeit waren den bisher existierenden Werten ähnlich. In dieser Studie wurde bei 25 % Kompression ein Equilibrium-Modulus von 0,77 MPa für die Nasenscheidewand und 0,20 MPa für den Flügelknorpel ermittelt. Rotter et al. hatten beispielweise für die Nasenscheidewand einen Anstieg des Equilibrium-Modulus von 0,035 MPa bei 4 % auf 0,8 MPa bei 25 % gefunden[33]. Dies entsprach nahezu exakt den Werten in dieser Studie. Richmon et al. berichtete einen Equilibrium-Modulus von 0,8 MPa bei 15 % Kompression[32]. Im großen Gegensatz hierzu stehen die Messwerte von Grellmann et al. Diese sind teilweise zehnfach so hoch wie die anderen Messwerte in der Literatur. Die Ursache hierfür bleibt allerdings unklar[16].

Mit der oben dargestellten Methodik war es abschließend sogar möglich, die funktionellen Eigenschaften des Nasenknorpels (Equilibrium-Modulus) anhand von zwei unterschiedlichen Parametern der biochemischen Zusammensetzung vorherzusagen: Zellzahl und Glykosaminoglykgehalt. Das mittels Regressionsanalyse berechnete Modell zeigte eine signifikante Genauigkeit mit $R = 0.804$ und $R^2 = 0.647$. Dies unterscheidet sich vom Gelenknorpel vor allem durch die Einbeziehung der Zellzahl. Die Abhängigkeit des E-Modul vom Glykosaminoglykgehalt wurde für den Gelenknorpel bereits nachgewiesen[32, 33].

Entscheidend für dieses Modell ist die Vorhersage der biomechanischen Eigenschaften nur anhand der biochemischen Parameter ohne Bezug auf die anatomische Lokalisation. Die Erklärung hierfür ist in Abbildung 14 A dargestellt. Die Zellzahl zeigt den größten statistischen Unterschied zwischen Flügel- und Septumknorpel und lässt sich so als biochemischer Parameter anstatt der Angabe der anatomischen Lokalisation verwenden. Dieser Zusammenhang ist im 3D-Scatter Plot in Abbildung 15 B nochmals illustriert.

Im zweiten Abschnitt (Knorpelregeneration durch Biomaterialien und Stammzellen) erfolgte die Optimierung von PCL zur Anwendung in der Knorpelregeneration. Die Anwendung von reinem 3D-gedrucktem PCL war bisher in der Literatur im Wesentlichen für die Knochenregeneration beschrieben worden. Wenige Publikationen zeigten die Verwendung von 3D-gedrucktem PCL für das Tissue Engineering von Fettgewebe[2, 24, 47] oder als formgebendes Implantat z.B. für die Nasenaugmentation im Tiermodell[44]. Gerade letztere Studie hatte die Einschränkungen des Einsatzes von reinem PCL in der Knorpelregeneration gezeigt, da sich hier am ehesten Faserknorpel gebildet hatte. Aufgrund der vorhergehenden Erkenntnisse der obigen Publikationen war allerdings die Herstellung von funktionellem hyalinem Knorpel für den Einsatz in der Nasenchirurgie notwendig.

Daher folgten mehrere Experimente zur Optimierung der Regeneration von Knorpel auf 3D-gedrucktem PCL. Im Vergleich zur Literatur wurde in dieser Arbeit ein neuartiger Ansatz gewählt, der nicht die Kombination von PCL mit anderen Makromolekülen vorsah, sondern ausgehend vom Ansatz der dezellularisierten Matrix die Schaffung von aktiviertem PCL durch natürliche EZM beabsichtigte.

Bereits Publikation 3 „Addition of decellularized extracellular matrix of porcine nasal cartilage improves cartilage regenerative capacities of PCL-based scaffolds in vitro“ konnte die Verbesserung der Knorpelregeneration durch die Kombination von PCL mit natürlicher EZM vom Schweineknorpel nachweisen. Hierbei war insbesondere der interagierende Effekt entscheidend, der über eine reine Summation der beiden Materialien hinausging. Das hierfür eingesetzte EZM Konstrukt (DPNC) vom Schwein war im Vorfeld von Schwarz et. al. entwickelt und mittels humaner Chondrozyten in vitro und in vivo getestet und evaluiert worden[11, 36]. Durch die Kombination von PCL mit DPNC konnte so eine Veränderung der Genaktivität und der EZM Produktion von Chondrozyten erzielt werden. Hierbei zeigte sich vor allem eine Aktivität der Chondrozyten, die mehr der DPNC Versuchsgruppe als der reinen PCL-Gruppe

glich. Entscheidend war hierbei aber, dass der osteogene Effekt von reinem PCL hierdurch signifikant reduziert werden konnte. Diese Erkenntnis ist aber für die weitere Verwendung von PCL zur Herstellung von Implantaten für die Knorpelrekonstruktion von entscheidender Bedeutung. Denn wie die eigene Vorarbeit im Tiermodell[44] bewiesen hatte, zeigen reine PCL Konstrukte bei der perinasalen Implantation eine Bildung von Faserknorpel. Darüber hinaus wurden auch spontane Ossifikationen[35] in PCL beobachtet oder die Ossifikation durch die Kombination mit BMP7[37] oder Hydroxylapatit[13] gezielt ausgelöst. Aus diesem Grund war eine chondrogene Bioaktivierung der Zellen auf 3D-gedruckten Implantaten für die Anwendung in der Rekonstruktion von Knorpeldefekten von entscheidender Bedeutung.

Da die Beobachtungen in Publikation 3 „Addition of decellularized extracellular matrix of porcine nasal cartilage improves cartilage regenerative capacities of PCL-based scaffolds in vitro“ nicht durch eine reine Addition der Materialien erklärt werden konnten, wurden weitere Studien zur Interaktion von Zellen mit der EZM der Nasenscheidewand durchgeführt. Um dieses Phänomen besser studieren zu können, wurde hierfür ein in vitro Modell etabliert. Aufgrund der nachgewiesenen Analogie von menschlichem und humanem Septum konnte die zuvor etablierte DPNC als Modell für das menschliche Septum dienen. Anschließend wurden statt der humanen Chondrozyten multipotente ASCs verwendet, um den Einfluss der DPNC auf die Differenzierung besser beurteilen zu können. In einem ersten Schritt wurde in Publikation 4 „Experimental approach to nasal septal cartilage regeneration with adipose tissue-derived stem cells and decellularized porcine septal cartilage.“ die Möglichkeit zur Knorpelregeneration mit ASCs und DPNC gezeigt. In dieser Studie zeigte sich analog der Studie von Schwarz et al. eine konstante Vitalität, Proliferation und chondrogene Differenzierung der ASCs auf DPNC[36]. Die entscheidenden Parameter waren hierbei der Anstieg der Zellzahl (gemessen anhand des DNA-Gehaltes) und der gebildeten EZM (gemessen anhand der gebildeten GAGs). Außerdem konnte eine signifikant zunehmende Invasion der DPNC durch die ASCs im Laufe der Zellkultur gezeigt werden. Dadurch zeigten ASCs auf der DPNC vergleichbare Eigenschaften der zuvor von Schwarz et al. erprobten Chondrozyten bzw. chondralen Progenitorzellen.

Nach Etablierung des Modells wurde anschließend der zuvor identifizierte schichtweise Aufbau der Nasenscheidewand als Grundlage der weiteren Experimente verwendet. Wie bereits in der ersten Publikation „The distribution patterns of COMP and matrilin-3 in septal, alar and triangular cartilages of the human nose“ gezeigt wurde, findet sich nicht nur ein

wiederkehrender struktureller Aufbau der Nasenscheidewand, sondern auch eine unterschiedliche Aktivität der Chondrozyten innerhalb der Nasenscheidewand. Ausgehend von den Befunden zur Verteilung der spezifischen Matrixproteine (z.B. COMP) wurde die Hypothese aufgestellt, dass Chondrozyten in unterschiedlichen Schichten unterschiedliche zelluläre Aktivitäten aufweisen. Daher wurde in Publikation 5 „Zone-dependent architecture and biochemical composition of decellularized porcine nasal cartilage modulate the activity of adipose tissue-derived stem cells in cartilage regeneration“ der Einfluss der EZM unterschiedlicher Zonen der Nasenscheidewand auf ASCs im zuvor etablierten Modell untersucht. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied der zellulären Aktivität von ASCs nach Besiedelung auf EZM der oberflächlichen bzw. der zentralen Zone. Beispielsweise war die Invasion bei Besiedelung der zentralen Zone vielfach höher im Vergleich zur oberflächlichen Zone. Dies kann einerseits mit der schieren Größe der Poren zusammenhängen aber auch mit der generellen Mikrostruktur der EZM. Wie von diversen Autoren gezeigt werden konnte, zeigen mesenchymale Stammzellen und folglich auch ASCs in Abhängigkeit von ihrer dreidimensionalen Konfiguration unterschiedliches Wachstums- und Differenzierungsverhalten[48]. Diesbezüglich führte beispielsweise eine runde Konfiguration von Chondrozyten zu einer Verstärkung der Chondrogenese, wohingegen eine flache Umgebung der Zellen zu einem deutlichen Rückgang des chondrogenen Potentials führten. In der Studie von Glowacki et al. zeigten Chondrozyten in runder Konfiguration einen Rückgang der Proliferation und einen Anstieg der GAG-Synthese, wohingegen diese in flacher Konfiguration sich gegensätzlich verhielten[15]. Dies entspricht genau den Beobachtungen von Publikation 5 „Zone-dependent architecture and biochemical composition of decellularized porcine nasal cartilage modulate the activity of adipose tissue-derived stem cells in cartilage regeneration“. In dieser sind die Proliferation und GAG Synthese der ASCs in Figure 3 und Figure 4 dargestellt. Hier zeigen sich eine deutlich höhere GAG-Synthese und eine geringere Proliferation in der zentralen Zone und ein umgekehrtes Bild in der superfiziellen Zone. Zusätzlich wird dieser Befund durch die Veränderung der Genaktivität unterstrichen. So zeigt sich z.B. bei ASCs, die auf der flacheren superfiziellen Zone angesiedelt wurden, eine höhere Expression von Ki67 (Proliferationsmarker), und ASCs, die auf der multipel konkav geformten zentralen Zone angesiedelt wurden, eine signifikant höhere Expression von Hypertrophie markern wie MMP13 mit $p < 0,0001$.

Auf Basis dieser Beobachtungen wurden anschließend folgende Schlussfolgerungen gezogen: Erstens ist für die Knorpelregeneration die einfache DPNC, wie sie von Schwarz et al. beschrieben wurde, durch die typische Exposition der superfiziellen Zone (die von Schwarz et al. beschriebene DPNC ermöglicht nur die Besiedelung der superfiziellen Zone) nicht ideal für die Regeneration von hyalinem Knorpel. Zweitens lassen die bisherigen Ergebnisse vermuten, dass die regenerativen Eigenschaften von ASCs anhand der Exposition der Zellen gegenüber unterschiedlicher EZM Bestandteile bzw. durch unterschiedliche dreidimensionale Konfigurationen der EZM moduliert werden können. Als Konsequenz aus diesen Schlussfolgerungen ergibt sich nun ein neues Konzept zur Knorpelregeneration mit 3D-gedruckten PCL-Konstrukten. Ausgehend von reinem PCL sollte durch eine Besiedlung und gezielte Differenzierung der ASCs eine spezifische Ablagerung von dreidimensional konfigurierter EZM auf den PCL Scaffolds erfolgen. Nach entsprechender Dezellularisierung kann so eine Art künstliche DPNC generiert werden, die einer artifiziellen EZM entspricht. In Publikation 6 „Artificial decellularized extracellular matrix improves the regenerative capacity of adipose tissue derived stem cells on 3D printed polycaprolactone scaffolds“ wurden daher reine PCL Scaffolds in dieser Form behandelt und anschließend erneut mittels ASCs besiedelt. Die Herstellung solcher aktivierter PCL Scaffolds konnte in dieser Publikation erstmalig in dieser Form in der internationalen Literatur gezeigt werden. Hierbei war sowohl eine osteogene als auch chondrogene Aktivierung möglich. Aufgrund der generellen Neigung von reinen PCL Scaffolds eine osteogene Differenzierung bzw. chondrale Dedifferenzierung wegen der mikroskopisch planaren Oberfläche der PCL-Struts zu fördern (s.o. Publikation 3), war daher der Effekt für die Verbesserung der Osteogenese deutlicher ausgeprägt. Hierbei zeigte sich bei den osteogen aktivierten PCL Scaffolds bereits eine Erhöhung des Calciumgehalts der Konstrukte in der Kontrollgruppe ohne Differenzierungsmedium (Abbildung 27). Dennoch zeigte sich auf den chondrogen aktivierten PCL Scaffolds eine signifikante Erhöhung der Kollagensynthese und initial eine tendenzielle Erhöhung der GAG-Produktion. Diese Befunde konnten anschließend durch die Veränderung der jeweiligen Genexpression der ASCs in der RT-PCR bestätigt werden. Hier hatte sich eine deutliche Veränderung der Genaktivität der ASCs im Vergleich zu reinen PCL Scaffolds gezeigt. Insbesondere die osteogen aktivierten Scaffolds zeigten eine mehrfach signifikante Erhöhung der osteogenen Differenzierungsmarker (z.B. ALP und SPP1) mit $p < 0,01$. Bei den chondrogen aktivierten Scaffolds zeigte sich dennoch eine deutliche Tendenz zum Expressionsprofil einer

chondrogenen Differenzierung (z.B. COL9 und ACAN) im Vergleich zu reinen PCL Scaffolds. Zusammengefasst konnte in Publikation 6 „Artificial decellularized extracellular matrix improves the regenerative capacity of adipose tissue derived stem cells on 3D printed polycaprolactone scaffolds“ erstmalig demonstriert werden, dass sich 3D-gedruckte PCL-Scaffolds mit einer durch Zellen künstlich hergestellten EZM biologisch aktivieren lassen können und so das Regenerationspotential von ASCs auf diesen Scaffolds gezielt gesteuert werden kann.

In diesem Zusammenhang muss so folgende Frage beantwortet werden: Ist die Konzentration der Makromoleküle und ggf. deren Kombination entscheidend oder ist die dreidimensionale Anordnung der Makromoleküle der EZM für die regenerativen Eigenschaften wichtiger? Denn dies wird zukünftig die weitere Herstellung und Optimierung von PCL-Scaffolds entscheidend prägen, da die aktivierten PCL-Scaffolds einen deutlich anderen Herstellungsprozess durchlaufen als konventionelle PCL-Scaffolds, die auf der Oberfläche mittels einzelner EZM Komponenten beschichtet werden. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse dieser Arbeit, insbesondere von Publikation 5 „Zone-dependent architecture and biochemical composition of decellularized porcine nasal cartilage modulate the activity of adipose tissue-derived stem cells in cartilage regeneration“ und Publikation 6 „Artificial decellularized extracellular matrix improves the regenerative capacity of adipose tissue derived stem cells on 3D printed polycaprolactone scaffolds“ dürfte aber die dreidimensionale Konfiguration einer artifiziell hergestellten EZM einen größeren Einfluss auf das Schicksal der ASCs auf 3D gedruckten PCL Konstrukten ausüben als eine einfache Kombination der reinen PCL Scaffolds mit einzelnen Makromolekülen der chondralen EZM wie z.B. Hyaluronan oder Kollagen 2. Zu diesem Zweck sind weitere Studien notwendig, um zu testen, ob diese neuartigen biologisch aktivierten PCL Scaffolds solchen mit lediglich einzelnen spezifischen EZM Komponenten kombinierten PCL Scaffolds überlegen sind.

Im dritten und letzten Abschnitt (klinisches Anwendungsbeispiel) wurde das bereits zuvor erprobte und optimierte PCL zum 3D-Druck von patientenspezifischen Implantaten verwendet. Die generelle Machbarkeit eines patientenspezifischen Implantats mittels 3D Drucker war in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden[27, 28, 30, 34, 35]. Daher war es Ziel der Publikation 7 „Evaluation of the Usability of a Low-Cost 3D Printer in a Tissue Engineering Approach for External Ear Reconstruction“, einen Work-Flow zu etablieren, um

mit einem kostengünstigen 3D-Drucker (Ultimaker 2+) PCL-Implantate selbstständig herstellen zu können. Daten zur Verwendung eines Low-Cost-Drucker mit PCL fanden sich bis dato keine in der Literatur. Daher musste zuerst eine grundlegende Evaluierung des Druckprozesses durchgeführt werden, bevor der eigentliche klinische Workflow und das Anwendungsbeispiel getestet werden konnten.

Die Daten der eigenen Experimente zeigen hierbei in der Genauigkeit keine Unterschiede zu den vom Hersteller empfohlenen Materialien ABS und PLA. So waren im ersten Teilversuch die Kantenlängen der Würfel in unterschiedlicher Größe bei allen getesteten Materialien ohne signifikante Abweichung und zeigten in der Messung eine gute Korrelation zum 3D-Computermodell. Im Vergleich zu kommerziellen 3D-Druckern, die auch in diversen Studien verwendet wurden, zeigt der hier verwendete Drucker allerdings deutliche Schwächen im Auflösungsvermögen[49]. Ab einer Porengröße von 667 μm ist die Qualität signifikant reduziert und im durchgeführten Test war ab dieser Größe keine konstante Druckqualität mehr zu erreichen.

In der Literatur werden für unterschiedliche Anwendungsbereiche verschiedene optimale Porengrößen empfohlen: z.B. 250 μm für die Herstellung von Knorpelkonstrukten mittels Tissue Engineering[17, 25]. Die vom verbesserten Ultimaker 2+ erreichte Druckauflösung von einer Porengröße von 667 μm reicht an diese Anforderung nicht heran. Allerdings spiegelt die Porengröße nur eine von vielen Eigenschaften von Implantaten für die Knorpelregeneration wider. So könnte zukünftig der Implantate der Nachteil einer zu großen Porengröße durch eine gezielte Bioaktivierung ausgeglichen werden. Gerade die im zweiten Teil dieser Arbeit entwickelte Technik der artifiziellen EZM kann durch ein funktionelles, chondrogenes Mikromilieu zu einer effektiven Bioaktivierung der Implantate führen, so dass eine Knorpelregeneration auch mit Implantaten einer Porengröße von 667 μm problemlos möglich werden kann.

Des Weiteren war der Druck des im klinischen Anwendungsbeispiel modellierten Ohres problemlos möglich. Dies war sowohl als solides Objekt als auch als poröser Scaffold möglich. Die Abweichung der Außendimensionen entsprachen hier im Wesentlichen der Computersimulation. Hierbei sei allerdings erwähnt, dass auch die Porengröße im Scaffold in Ohrform ebenfalls bei 667 μm lag. Aus diesem Grund konnte im klinischen Anwendungsbeispiel zwar die Machbarkeit eines 3D-gedruckten und patientenindividuellen Implantats mittels Low-Cost 3D-Drucker gezeigt werden, allerdings ist die Auflösung und

damit die Qualität des möglichen Implantats kommerziellen Druckern unterlegen. Dies schränkt den patientennahen Einsatz von 3D-gedruckten Implantaten daher aktuell ein und erfordert ein kostenintensives Equipment im Hintergrund. Diese Erschwernis kann die klinische Verbreitung und die Anwendung der hier demonstrierten Behandlungsmöglichkeit von komplexen Knorpeldefekten verkomplizieren und dadurch ihren Einsatz verlangsamen. Diesbezüglich sollten weitere Strategien durch die Politik etabliert werden, um diese Lücke in der Patientenversorgung zu schließen.

Zusammenfassend kann ein Low-Cost-3D-Drucker aktuell zur Herstellung von soliden anatomischen Modellen aber nur bedingt von regenerativen Implantaten empfohlen werden. Denn bei der Herstellung von kleinporigen Implantaten für die Knorpelregeneration für kraniofaziale Defekte sind kommerzielle Hochleistungsdrucker überlegen. Zukünftig könnten aber neuartige Techniken wie die Bioaktivierung Nachteile durch die Porengröße beim preisgünstigen 3D-Druck ausgleichen, so dass vor Ort selbst hergestellte Implantate eine ähnliche Effektivität wie kommerzielle Implantate erreichen könnten.

Schlussfolgerung

In dieser Habilitationsschrift konnten drei wichtige Teilaspekte für die Entwicklung und Umsetzung von neuen Behandlungsmöglichkeiten für komplexe Knorpeldefekte im Kopf- und Halsbereich beleuchtet werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnten neuartige Erkenntnisse zu den anatomischen Grundlagen und zu den biomechanischen Anforderungen von Knorpelersatztransplantaten gewonnen werden. Hierbei haben die histologischen Untersuchungen einen gemeinsamen strukturellen Aufbau aller Knorpel der menschlichen Nase gezeigt. Die gezielte Untersuchung von spezifischen funktionellen Matrixproteinen (Collagen Typ 2, Glykosaminoglykane, COMP und Matrilin-3) haben hierbei zum Verständnis des strukturellen Aufbaus beigetragen. Durch ihre Verteilung und Interaktion mit den Chondrozyten entwickeln sich so die typischen Eigenschaften des Knorpels der menschlichen Nase. Diese Eigenschaften beruhen auf zwei wichtigen Komponenten: erstens Modulation der Zellaktivität (Proliferation, Hypertrophie, etc.) durch die EZM und zweitens Erfüllung der mechanischen Anforderungen an das Knorpelgewebe selbst wiederum durch die von den Chondrozyten gebildete EZM.

Als Konsequenz hieraus finden sich signifikante Unterschiede in der biochemischen Zusammensetzung von Flügel- und Septumknorpel der menschlichen Nase. Hierbei zeigt sich ein signifikant höherer Gehalt an Zellen und Glykosaminoglykanen im Flügelknorpel bei gleichem Kollagengehalt. Diese Unterschiede in der Zusammensetzung finden sich auch in der funktionellen biomechanischen Testung wieder. Hierbei zeigt der Septumknorpel eine vierfach höhere Steifigkeit. Ausgehend von den gewonnenen Daten konnte so ein mathematisches Modell berechnet werden, das die funktionellen Eigenschaften (Equilibrium-Modulus) des Knorpels der menschlichen Nase anhand der biochemischen Parameter (Glykosaminoglykangehalt, Zellzahl) und der applizierten Kompression vorhersagen konnte. Diese Erkenntnis ermöglicht ein individuelles Design eines passenden Knorpeltransplantats mit gewünschter biomechanischer Steifigkeit für jede anatomische Lokalisation durch die Steuerung der oben genannten biochemischen Parameter.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte die Knorpelregeneration mit synthetischem Polymer durch neue Erkenntnisse zur Biologie des Septumknorpels verbessert werden. Bereits in

einem ersten Ansatz durch die Schaffung von Composite-Scaffolds aus PCL zusammen mit dezellularisierter EZM von porcinem Septumknorpel konnte eine Verbesserung des chondrogenen Potentials von PCL erzielt werden. So zeigten Chondrozyten auf PCL/DPNC Composite-Scaffolds eine ähnliche Genaktivität wie auf reiner DPNC. Diesbezüglich ist insbesondere die signifikante Reduktion des osteogenen Potentials von PCL/DPNC im Vergleich zu reinem PCL zu erwähnen. Da dies durch die spezifische Interaktion mit der additiven EZM, aber auch durch die Veränderung der Scaffold-Geometrie durch Hinzugabe der DPNC kommen konnte, wurden anschließend weitere Versuche zur dezellulierten EZM mit ASCs durchgeführt. Diese Experimente konnten einerseits zeigen, dass sich porcine EZM zusammen mit humanen ASCs zur Knorpelregeneration eignen, andererseits aber auch, dass diese Kombination als Modell für die Erforschung der Biologie des humanen Nasenseptumknorpels angewandt werden kann, da die gleichwertige histologische Architektur von humanem und porcinem Nasenseptumknorpel dargelegt wurde. Nach Etablierung dieses Modells war es nun möglich, den unterschiedlichen Einfluss der EZM aus verschiedenen Zonen der Nasenscheidewand auf Stammzellen zu untersuchen. ASCs, die gegenüber der Matrix der superfiziellen Zone exponiert wurden, zeigten in den Experimenten eine proliferative und früh chondrogen differenzierende Genaktivität, wohingegen ASCs, die gegenüber der zentralen Zone exponiert wurden, eine chondrogen hypertrophierende Genaktivität zeigten.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde anschließend versucht, das regenerative Potenzial von PCL Scaffolds gezielt zu steuern, indem eine artifizielle EZM auf den Scaffolds aufgebracht wurde. Die so künstlich hergestellten, chondrogen und osteogen aktivierten PCL Scaffolds zeigten eine signifikante Verbesserung der Differenzierung im Vergleich zu unmodifizierten PCL Scaffolds. Insbesondere osteogen aktivierte PCL Scaffolds zeigten einen Anstieg der Genaktivität für die Osteogenese.

Im dritten und letzten Teil dieser Arbeit erfolgte die Evaluation eines Low-Cost 3D-Druckers für die Herstellung von regenerativen Implantaten für die Verwendung als Knorpelersatz. Für diesen Zweck wurde ein handelsüblicher Drucker aufgerüstet und für die Verwendung von PCL optimiert. Auf diese Weise konnten reproduzierbare und detailgenaue Modelle gedruckt werden. Die Auflösungsgrenze betrug allerdings 667 μm und lag damit deutlich über der empfohlenen Auflösung für den Einsatz als Implantat für die Knorpelregeneration. Dennoch

konnte ein CAD/CAM-Arbeitsprozess etabliert werden, um so ausgehend von 3D-DICOM-Datensätzen solide und genaue anatomische Modelle im Kopf-/Halsbereich zu drucken. Zukünftig kann aber wie z.B. durch die im zweiten Teil dieser Arbeit vorgestellte artifizielle EZM eine Bioaktivierung der Implantate erfolgen, so dass eine Optimierung des Mikromilieus erreicht wird und sich die empfohlene Porengröße für die Knorpelregeneration relativiert. Dadurch würde auch der Einsatz von großporigen Implantaten, welche mit Low-Cost 3D-Druckern hergestellt werden können, für die Knorpelregeneration möglich werden.

Zusammengefasst konnte diese Arbeit neue Erkenntnisse zu den Anforderungen an Biomaterialien, neue Wege für die Knorpelregeneration mit PCL und die Limitationen von kostengünstigen 3D-Druckern für den Einsatz in der Rekonstruktion von komplexen Knorpeldefekten im Kopf-/Halsbereich zeigen.

Literaturverzeichnis

1. Arslan, E., M.O. Guler, and A.B. Tekinay, *Glycosaminoglycan-Mimetic Signals Direct the Osteo/Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in a Three-Dimensional Peptide Nanofiber Extracellular Matrix Mimetic Environment*. *Biomacromolecules*, 2016. **17**(4): p. 1280-91.
2. Bao, W., et al., *Effect of 3D printed polycaprolactone scaffold with a bionic structure on the early stage of fat grafting*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021. **123**: p. 111973.
3. Barnes, B., et al., *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016, Robert Koch-Institut.
4. Belluoccio, D. and B. Trueb, *Matrilin-3 from chicken cartilage*. *FEBS Lett*, 1997. **415**(2): p. 212-6.
5. Blum, J.C., et al., *Artificial decellularized extracellular matrix improves the regenerative capacity of adipose tissue derived stem cells on 3D printed polycaprolactone scaffolds*. *J Tissue Eng*, 2021. **12**: p. 20417314211022242.
6. Buschmann, M.D., et al., *Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix*. *J Orthop Res*, 1992. **10**(6): p. 745-58.
7. Cai, R., et al., *Influence of stepwise chondrogenesis-mimicking 3D extracellular matrix on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. *Biomaterials*, 2015. **52**: p. 199-207.
8. Cima, L.G., et al., *Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates*. *J Biomech Eng*, 1991. **113**(2): p. 143-51.
9. Corkhill, P.H., A.S. Trevett, and B.J. Tighe, *The potential of hydrogels as synthetic articular cartilage*. *Proc Inst Mech Eng H*, 1990. **204**(3): p. 147-55.
10. DiCesare, P.E., et al., *Cartilage oligomeric matrix protein: isolation and characterization from human articular cartilage*. *J Orthop Res*, 1995. **13**(3): p. 422-8.
11. Elsaesser, A.F., et al., *In vitro cytotoxicity and in vivo effects of a decellularized xenogeneic collagen scaffold in nasal cartilage repair*. *Tissue Eng Part A*, 2014. **20**(11-12): p. 1668-78.

12. Elsaesser, A.F., et al., *Characterization of a migrative subpopulation of adult human nasoseptal chondrocytes with progenitor cell features and their potential for in vivo cartilage regeneration strategies*. Cell Biosci, 2016. **6**: p. 11.
13. Endres, M., et al., *Osteogenic induction of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in novel synthetic polymer-hydrogel matrices*. Tissue Eng, 2003. **9**(4): p. 689-702.
14. Fulco, I., et al., *Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumour resection: an observational first-in-human trial*. Lancet, 2014. **384**(9940): p. 337-46.
15. Glowacki, J., E. Trepman, and J. Folkman, *Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes*. Proc Soc Exp Biol Med, 1983. **172**(1): p. 93-8.
16. Grellmann, W., et al., *Determination of strength and deformation behavior of human cartilage for the definition of significant parameters*. J Biomed Mater Res A, 2006. **78**(1): p. 168-74.
17. Gupte, M.J., et al., *Pore size directs bone marrow stromal cell fate and tissue regeneration in nanofibrous macroporous scaffolds by mediating vascularization*. Acta Biomater, 2018. **82**: p. 1-11.
18. Hosokawa, K., et al., *Cartilage formation from perichondrium in a diffusion chamber*. Ann Plast Surg, 1988. **21**(2): p. 140-2.
19. Kanbe, K., et al., *Pericellular matrilins regulate activation of chondrocytes by cyclic load-induced matrix deformation*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(2): p. 318-28.
20. Kuhlmann, C., et al., *Evaluation of the Usability of a Low-Cost 3D Printer in a Tissue Engineering Approach for External Ear Reconstruction*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(21).
21. Kuhlmann, C., et al., *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**(18).
22. Kuhlmann, C., et al., *Experimental approach to nasal septal cartilage regeneration with adipose tissue-derived stem cells and decellularized porcine septal cartilage*. Xenotransplantation, 2021. **28**(2): p. e12660.
23. Lee, S.T., et al., *Engineering integrin signaling for promoting embryonic stem cell self-renewal in a precisely defined niche*. Biomaterials, 2010. **31**(6): p. 1219-26.

24. Lee, T.J., et al., *Volume-stable adipose tissue formation by implantation of human adipose-derived stromal cells using solid free-form fabrication-based polymer scaffolds*. *Ann Plast Surg*, 2013. **70**(1): p. 98-102.
25. Li, S., et al., *Scaffold channel size influences stem cell differentiation pathway in 3-D printed silica hybrid scaffolds for cartilage regeneration*. *Biomater Sci*, 2020. **8**(16): p. 4458-4466.
26. Matsiko, A., J.P. Gleeson, and F.J. O'Brien, *Scaffold mean pore size influences mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and matrix deposition*. *Tissue Eng Part A*, 2015. **21**(3-4): p. 486-97.
27. Melchels, F., et al., *CAD/CAM-assisted breast reconstruction*. *Biofabrication*, 2011. **3**(3): p. 034114.
28. Poh, P.S.P., et al., *Poly lactides in additive biomanufacturing*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. **107**: p. 228-246.
29. Popko, M., et al., *Histological structure of the nasal cartilages and their perichondrial envelope. I. The septal and lobular cartilage*. *Rhinology*, 2007. **45**(2): p. 148-52.
30. Prasopthum, A., K.M. Shakesheff, and J. Yang, *Direct three-dimensional printing of polymeric scaffolds with nanofibrous topography*. *Biofabrication*, 2018. **10**(2): p. 025002.
31. Pullig, O., et al., *Matrilin-3 in human articular cartilage: increased expression in osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. **10**(4): p. 253-63.
32. Richmon, J.D., et al., *Compressive biomechanical properties of human nasal septal cartilage*. *Am J Rhinol*, 2006. **20**(5): p. 496-501.
33. Rotter, N., et al., *Age-related changes in the composition and mechanical properties of human nasal cartilage*. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **403**(1): p. 132-40.
34. Schantz, J.T., et al., *Repair of calvarial defects with customized tissue-engineered bone grafts I. Evaluation of osteogenesis in a three-dimensional culture system*. *Tissue Eng*, 2003. **9 Suppl 1**: p. S113-26.
35. Schantz, J.T., et al., *Repair of calvarial defects with customised tissue-engineered bone grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo*. *Tissue Eng*, 2003. **9 Suppl 1**: p. S127-39.

36. Schwarz, S., et al., *Processed xenogenic cartilage as innovative biomatrix for cartilage tissue engineering: effects on chondrocyte differentiation and function*. J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**(12): p. E239-51.
37. Shafiee, A., et al., *Fetal Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells Enhance Humanization and Bone Formation of BMP7 Loaded Scaffolds*. Biotechnol J, 2017. **12**(12).
38. Smith, R.K., et al., *The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load*. Matrix Biol, 1997. **16**(5): p. 255-71.
39. Tatullo, M., et al., *Mechanical influence of tissue culture plates and extracellular matrix on mesenchymal stem cell behavior: A topical review*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2016. **29**(1): p. 3-8.
40. Walters, N.J. and E. Gentleman, *Evolving insights in cell-matrix interactions: elucidating how non-soluble properties of the extracellular niche direct stem cell fate*. Acta Biomater, 2015. **11**: p. 3-16.
41. Wang, P.Y., H. Thissen, and P. Kingshott, *Modulation of human multipotent and pluripotent stem cells using surface nanotopographies and surface-immobilised bioactive signals: a review*. Acta Biomater, 2016.
42. Wiggenhauser, P.S., J.T. Schantz, and N. Rotter, *Cartilage engineering in reconstructive surgery: auricular, nasal and tracheal engineering from a surgical perspective*. Regen Med, 2017. **12**(3): p. 303-314.
43. Wiggenhauser, P.S., S. Schwarz, and N. Rotter, *The distribution patterns of COMP and matrilin-3 in septal, alar and triangular cartilages of the human nose*. Histochem Cell Biol, 2018. **150**(3): p. 291-300.
44. Wiggenhauser, P.S., et al., *In vivo evaluation of a regenerative approach to nasal dorsum augmentation with a polycaprolactone-based implant*. Eur J Med Res, 2019. **24**(1): p. 6.
45. Wiggenhauser, P.S., et al., *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**(11): p. 121.

46. Wiggengerhauser, P.S., et al., *Differences between human septal and alar cartilage with respect to biomechanical features and biochemical composition*. J Mech Behav Biomed Mater, 2019. **96**: p. 236-243.
47. Wiggengerhauser, P.S., et al., *Engineering of vascularized adipose constructs*. Cell Tissue Res, 2012. **347**(3): p. 747-57.
48. Zanetti, N.C. and M. Solursh, *Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton*. J Cell Biol, 1984. **99**(1 Pt 1): p. 115-23.
49. Zein, I., et al., *Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications*. Biomaterials, 2002. **23**(4): p. 1169-85.
50. Zopf, D.A., et al., *Computer aided-designed, 3-dimensionally printed porous tissue bioscaffolds for craniofacial soft tissue reconstruction*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2015. **152**(1): p. 57-62.

Publikationen des Autors

Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor

1. Kuhlmann C, Blum JC, Schenck TL, Giunta RE, **Wiggenhauser PS**. Evaluation of the Usability of a Low-Cost 3D Printer in a Tissue Engineering Approach for External Ear Reconstruction. Int J Mol Sci. 2021 Oct 28;22(21):11667. doi: 10.3390/ijms222111667. PMID: 34769096; PMCID: PMC8584065.
 - a. IF 5,923 (2020)
 - b. Q1 Biochemistry & Molecular Biology

2. 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 Sep 14;22(18):9917. doi: 10.3390/ijms22189917. PMID: 34576079; PMCID: PMC8470846.
 - a. IF 5,923 (2020)
 - b. Q1 Biochemistry & Molecular Biology

3. Blum JC, Schenck TL, Birt A, Giunta RE, **Wiggenhauser PS**. Artificial decellularized extracellular matrix improves the regenerative capacity of adipose tissue derived stem cells on 3D printed polycaprolactone scaffolds. J Tissue Eng. 2021 Jun 28;12:20417314211022242. doi: 10.1177/20417314211022242. PMID: 34262685; PMCID: PMC8246490.
 - a. IF 7,813 (2020)
 - b. Q1 Cell & Tissue Engineering

4. 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. 2021 Mar;28(2):e12660. doi: 10.1111/xen.12660. Epub 2020 Dec 21. PMID: 33350016.
 - a. IF 3,907
 - b. Q2 Transplantation

5. **Wiggenhauser 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 May;122(4):151537. doi: 10.1016/j.acthis.2020.151537. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32197756.
 - a. IF 2,479
 - b. Q4 Cell Biology

6. **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 Oct 26;30(11):121. doi: 10.1007/s10856-019-6323-x. PMID: 31655914.
 - a. IF 2,489
 - b. Q2 Engineering, Biomedical

7. **Wiggenhauser PS**, Adolph O, Hoffmann TK, Thierauf J, Veit JA. Novel Pulmonary Function Parameter Shifts in High-Grade Upper Airway Stenoses. Ear Nose Throat J. 2019 Aug;98(7):E104-E111. doi: 10.1177/0145561319840870. Epub 2019 May 9. PMID: 31072193.
 - a. IF 0,859
 - b. Q4 Otorhinolaryngology

8. **Wiggenhauser 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 Aug;96:236-243. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.04.048. Epub 2019 Apr 26. PMID: 31059899.

a. IF 3,372

b. Q2 Engineering, Biomedical

9. **Wiggenhauser PS**, Balmayor ER, Rotter N, Schantz JT. In vivo evaluation of a regenerative approach to nasal dorsum augmentation with a polycaprolactone-based implant. *Eur J Med Res*. 2019 Jan 28;24(1):6. doi: 10.1186/s40001-019-0364-y. PMID: 30691516; PMCID: PMC6348657.

a. IF 1,826

b. Q3 Medicine, Research & Experimental

10. **Wiggenhauser 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 Sep;150(3):291-300. doi: 10.1007/s00418-018-1672-y. Epub 2018 May 2. PMID: 29721643.

a. IF 2,640

b. Q2 Microscopy

11. Melchels F, **Wiggenhauser PS**, Warne D, Barry M, Ong FR, Chong WS, Hutmacher DW, Schantz JT. CAD/CAM-assisted breast reconstruction. *Biofabrication*. 2011 Sep;3(3):034114. doi: 10.1088/1758-5082/3/3/034114. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21900731.

a. IF 3,480

b. Q1 Engineering, Biomedical

c. Im Rahmen der Dissertation entstanden, keine kumulative Dissertation

12. **Wiggenhauser PS**, Müller DF, Melchels FP, Egaña JT, Storck K, Mayer H, Leuthner P, Skodacek D, Hopfner U, Machens HG, Staudenmaier R, Schantz JT. Engineering of vascularized adipose constructs. *Cell Tissue Res.* 2012 Mar;347(3):747-57. doi: 10.1007/s00441-011-1226-2. Epub 2011 Aug 18. PMID: 21850493.

- a. IF 3,677
- b. Q2 Cell Biology
- c. Im Rahmen der Dissertation entstanden, keine kumulative Dissertation

Originalarbeiten als Koautor

1. Frank K, Hagen CS, Möllhoff N, **Wiggenhauser PS**, Giunta RE, Ehrl D, Schenck TL. Die Häufigkeit der Durchführung einer Gefäßanastomose ist der entscheidende Faktor auf den Lernerfolg in einer retrospektiven Analyse von 212 Teilnehmern des Münchner Mikrochirurgiekurses [The frequency of performing vascular anastomoses determines the learning curve in a retrospective analysis of 212 participants of the Munich course of microsurgery]. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2021 Apr;53(2):125-129. German. doi: 10.1055/a-1351-0304. Epub 2021 Apr 15. PMID: 33860490.

- a. IF 1,081 (2020)
- b. Q4 Surgery (2020)

2. Wachtel N, **Wiggenhauser PS**, Ahmad N, Giunta RE, Ehrl D. Ökonomische Aspekte der interdisziplinären Plastischen Chirurgie – Veränderung der diagnosebezogenen Fallgruppen (DRG) durch Eingriffe der rekonstruktiven Mikrochirurgie [Economic aspects of interdisciplinary plastic surgery: change in Diagnosis-Related Groups (DRG) due to procedures of reconstructive microsurgery]. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2020 Sep 2. German. doi: 10.1055/a-1230-3914. Epub ahead of print. PMID: 32877947.

- a. IF 1,081
- b. Q4 Surgery

3. Giunta RE, Frank K, Moellhoff N, Braig D, Haas EM, Ahmad N, Hagen CS, **Wiggenhauser PS**, Frick A, Koban K, Wachtel N, Taha S, Ehrl D, Schenck TL. Die COVID-19 Pandemie und ihre Folgen für die Plastische Chirurgie und Handchirurgie [The COVID-19 Pandemia and its consequences for plastic surgery and hand surgery]. Handchir Mikrochir Plast Chir. 2020 Jun;52(3):233-241. German. doi: 10.1055/a-1163-9009. Epub 2020 Apr 28. PMID: 32344444.

a. IF 1,081

b. Q4 Surgery

4. Moellhoff N, Frank K, **Wiggenhauser PS**, Schenck TL, Mayr D, Giunta RE. Aktueller Algorithmus zur Diagnostik und Therapie des Brustimplantat-assoziierten anaplastischen großzelligen Lymphoms [An algorithmic approach for diagnosis and treatment of breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma]. Handchir Mikrochir Plast Chir. 2020 Apr;52(2):67-74. German. doi: 10.1055/a-1111-8841. Epub 2020 Apr 7. PMID: 32259859.

a. IF 1,081

b. Q4 Surgery

5. Thierauf J, **Wiggenhauser PS**, Hoffmann TK, Greve J, Scheithauer M, Veit JA. Anwendung von Vakuum-Wundtherapie bei Spalthaut-Transplantaten im Kopf-Hals-Bereich [Application of vacuum wound therapy with split thickness skin grafts in the head and neck area]. Laryngorhinootologie. 2018 Jul;97(7):474-479. German. doi: 10.1055/a-0606-5166. Epub 2018 May 7. PMID: 29734459.

a. IF 0,853

b. Q4 Otorhinolaryngology

6. Veit JA, Thierauf J, Egner K, **Wiggenhauser PS**, Friedrich D, Greve J, Schuler PJ, Hoffmann TK, Schramm A. Virtuelle Planung bei der epithetischen Orbitaversorgung [Virtual Planning

of Prosthetic Treatment of the Orbit]. Laryngorhinootologie. 2017 Jun;96(6):e1. German. doi: 10.1055/s-0043-114844. Epub 2017 Nov 15. Erratum for: Laryngorhinootologie. 2017 Jun;96(6):374-379. PMID: 29141261.

a. IF 0,922

b. Q4 Otorhinolaryngology

7. Veit JA, Scheckenbach K, Schuler PJ, Laban S, **Wiggenhauser PS**, Thierauf J, Klusmann JP, Hoffmann TK. MicroRNA expression in differentially metastasizing tumors of the head and neck: adenoid cystic versus squamous cell carcinoma. Anticancer Res. 2015 Mar;35(3):1271-7. Erratum in: Anticancer Res. 2015 Dec;35(12):6993. Wiggenhauser, Severin P [corrected to Wiggenhauser, Paul Severin]. PMID: 25750274.

a. IF 1,895

b. Q4 Oncology

Kasuistiken

1. Panzenbeck P, **Wiggenhauser PS**, Volkmer E, Dragu A, Giunta R, Schenck TL. Nekrotisierende Faszitis nach Karpaltunnelspaltung [Necrotizing fasciitis following carpal tunnel release]. Handchir Mikrochir Plast Chir. 2020 Dec 14. German. doi: 10.1055/a-1311-5376. Epub ahead of print. PMID: 33316828.

a. IF 1,081

b. Q4 Surgery

2. **Wiggenhauser PS**, Bischof F, Lindemann J. Symptom Schwindel bei einem bislang gesunden Jugendlichen [Symptom Vertigo in a Previously Healthy Adolescent]. Laryngorhinootologie. 2016 Nov;95(11):783-786. German. doi: 10.1055/s-0042-109612. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27454433.

a. IF 0,732

b. Q4 Otorhinolaryngology

Übersichtsartikel

1. Kuhlmann C, Schenck TL, Haas EM, Giunta R, **Wiggenhauser PS**. Eine aktuelle Übersicht über die Einflussfaktoren der Stammzellspender auf das regenerative Potential von Fettgewebstammzellen [Current review of factors in the stem cell donor that influence the regenerative potential of adipose tissue-derived stem cells]. Handchir Mikrochir Plast Chir. 2020 Dec;52(6):521-532. German. doi: 10.1055/a-1250-7878. Epub 2020 Dec 8. PMID: 33291167.

a. IF 1,081

b. Q4 Surgery

2. **Wiggenhauser PS**, Schantz JT, Rotter N. Cartilage engineering in reconstructive surgery: auricular, nasal and tracheal engineering from a surgical perspective. Regen Med. 2017 Apr;12(3):303-314. doi: 10.2217/rme-2016-0160. Epub 2017 May 19. PMID: 28524733.

a. IF 2,992

b. Q2 Engineering, Biomedical

Buchkapitel

1. **Wiggenhauser PS** und Rubin JP "Adipose Tissue Engineering - Clinical Applications In Breast Surgery". In: JT Schantz und DW Hutmacher (Hg.) A Manual for Current Therapies in Regenerative Medicine. World Scientific, Singapore, 2013
2. Chhaya MP, Melches FPW, **Wiggenhauser PS**, Schantz JT und Hutmacher DW „Breast reconstruction using biofabrication-based tissue engineering strategies“. In: Gabor Forgacs, Wei Sun (Hg.) Biofabrication: Micro- and Nano-fabrication, Printing, Patterning and Assemblies. William Andrew, Norwich New York, 2013

3. **Wiggenhauser PS**, Schantz JT, „Engineering of vascularized adipose constructs“. In: Cao Y (Hg.) Angiogenesis In Adipose Tissue. Springer Verlag, New York, 2013

Sonstige Veröffentlichungen

1. **Wiggenhauser PS**, Hoffmann TK. Comment on: "Cervical Necrotizing Fasciitis- The Value of the Laboratory Risk Indicator for Necrotizing Fasciitis Score as an Indicative Parameter". J Oral Maxillofac Surg. 2016 Jun;74(6):1104-5. doi: 10.1016/j.joms.2015.12.025. Epub 2016 Mar 8. PMID: 26963076.

- a. IF 1,916

- b. Q2 DENTISTRY, ORAL SURGERY & MEDICINE

Danksagung

Danken möchte ich allen Menschen, die mich auf meinem wissenschaftlichen Lebensweg begleitet und unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich nochmals bei meinem verstorbenen Doktorvater PD Dr. med. Jan-Thorsten Schantz bedanken, der mich für sein Forschungsgebiet begeistert und somit den Grundstein für meine weitere Entwicklung gelegt hat. Darüber hinaus danke ich Frau Prof. Nicole Rotter und Herrn Prof. Thomas Hoffmann für Ihre Unterstützung während meiner Zeit an der Uniklinik Ulm, in der ich die Chance bekam, mein eigenes Forschungsthema aufzubauen. Anschließend danke ich Herrn Prof. Riccardo Giunta und Herrn Prof. Thilo Schenck für das Vertrauen und die langjährige Unterstützung beim Aufbau einer grundlagenwissenschaftlichen Arbeitsgruppe und die vielen gemeinsamen Publikationen. Darüber hinaus danke ich den beiden sowie Herrn Prof. Boris Holzapfel für die Übernahme meines Fachmentorats und die konstruktive und kollegiale Hilfe bei meiner Habilitation.

Ein besonderer Dank gilt meinen ehemaligen Doktoranden, Frau Constanze Kuhlmann, Frau Jana Blum und Herrn Chenhao Ma, ohne deren Fleiß und Engagement diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Speziell möchte ich hier auch unserer technischen Assistentin Frau Alexandra Birt danken, die durch ihre tatkräftige Unterstützung die Arbeitsabläufe erleichtert und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Außerdem danke ich meinem Freund Martin Nieroda für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meiner Mutter Luitgard und meiner Frau Migle für Ihre immerwährende Unterstützung bedanken. Diese haben mich nicht nur in zähen Phasen durch aufmunternde Worte im Arbeitsfluss gehalten, sondern auch durch ihre tatkräftige Unterstützung den Rücken freigehalten, damit ich mich meiner wissenschaftlichen Arbeit widmen konnte.