

Aus der Abteilung für Hand-, Plastische
und Ästhetische Chirurgie
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Riccardo Giunta



Bioaktivierung von 3D gedruckten Implantaten zur Anwendung in der kraniofazialen Rekonstruktion

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

vorgelegt von
Jana Carina Blum

aus
Ulm

Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Berichterstatter: Prof. Dr. Thilo Ludwig Schenck

Mitberichterstatter: PD Dr. Dr. Gerson Mast
Prof. Dr. Dr. Florian Probst
PD Dr. Felicitas Mayinger

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Paul Severin Wiggerhauser

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2023

Meiner lieben Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Vorfeld in Fachzeitschriften oder auf Kongressen publiziert. Eine Auflistung aller in Zusammenhang mit dieser Arbeit entstandenen Publikationen ist im Anhang unter 7.2. "Publikationen" gelistet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Klinische Relevanz der Kraniofazialen Rekonstruktion	1
1.2. Aktuelle Behandlungsstrategien.....	1
1.3. Tissue Engineering	3
1.3.1. Adipose Derived Stem Cells.....	3
1.3.2. Biomaterialien	9
2. Experimentelle Fragestellung	13
3. Material	14
3.1. Geräte	14
3.2. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	15
3.3. Zellkulturmedien.....	17
4. Methoden	18
4.1. Allgemeine Methoden	18
4.1.1. Isolation der Stammzellen.....	18
4.1.2. Kultivierung	19
4.2. Teil 1: Einfluss der Gewebegewinnung auf hASCs.....	20
4.2.1. Experimentelle Herangehensweise.....	20
4.2.2. Wachstumskinetik	20
4.2.3. Quantifizierung der DNA mittels PicoGreen Assay	21
4.2.4. Colony Forming Units (CFU) Assay	23
4.2.5. Multipotenz	23
4.3. Teil 2: Vergleich von kommerziellen und eigenproduzierten PCL-Scaffolds.....	26
4.3.1. Experimentelle Herangehensweise.....	26
4.3.2. Herstellung der Scaffolds.....	26
4.3.3. Sterilisation und Seeding der Scaffolds	26
4.3.4. Auflichtmikroskopie.....	27
4.3.5. Zytotoxizitätsassay mittels AlamarBlue	27
4.3.6. Vitalität und Seedingeffizienz.....	28
4.3.7. Biochemische Assays	28
4.4. Teil 3: Untersuchung verschiedener PCL-Scaffold Konfigurationen	29
4.4.1. Experimentelle Herangehensweise.....	29
4.4.2. Scaffold-Konfigurationen.....	29
4.4.3. Seedingeffizienz und Proliferation	30
4.5. Teil 4: Herstellung und Untersuchung der Bioaktivität von chondrogen bzw. osteogen aktivierten PCL Scaffolds	31

4.5.1.	Experimentelle Herangehensweise.....	31
4.5.2.	Aussaat und Produktion von ECM auf PCL.....	32
4.5.3.	Dezellularisation.....	33
4.5.4.	Rezellularisation.....	33
4.5.5.	Adhäsion und Vitalität.....	33
4.5.6.	Histologie.....	34
4.5.7.	Probenvorbereitung und Biochemische Analyse.....	34
4.5.8.	Genexpressionsanalyse.....	36
4.6.	Statistische Analyse.....	38
5.	Ergebnisse.....	39
5.1.	Teil 1: Einfluss der Gewebegewinnung auf hASCs.....	39
5.1.1.	Vergleich der Stammzellen von Gewebestück mit Liposuktion.....	39
5.1.2.	Vergleich der Stammzellen von superfiziell und tiefem Fettgewebe.....	40
5.2.	Teil 2: Vergleich von kommerziellen und eigenproduzierten PCL-Scaffolds.....	41
5.2.1.	Bioaktivierung von PCL-Gerüsten.....	41
5.2.2.	Chondrogene Differenzierung auf den PCL-Gerüsten.....	44
5.3.	Teil 3: Untersuchung verschiedener PCL-Scaffold-Konfigurationen.....	44
5.4.	Teil 4: Herstellung und Untersuchung der Bioaktivität von chondrogen bzw. osteogen aktivierten PCL Scaffolds.....	46
5.4.1.	Part A: Herstellung von aktiviertem chondrogenen bzw. osteogenen PCL Scaffolds ...	46
5.4.2.	Part B: Untersuchung des Einflusses von aktiviertem PCL Scaffolds auf hASCs.....	48
6.	Diskussion.....	53
6.1.	Teil 1: Einfluss der Gewebegewinnung auf hASCs.....	53
6.2.	Teil 2: Vergleich von kommerziellen und eigenproduzierten PCL-Scaffolds.....	55
6.3.	Teil 3: Untersuchung verschiedener PCL-Scaffold Konfigurationen.....	57
6.4.	Teil 4: Herstellung und Untersuchung der Bioaktivität von chondrogen bzw. osteogen aktivierten PCL Scaffolds.....	58
7.	Anhang.....	62
7.1.	Literaturverzeichnis.....	62
7.2.	Publikationen.....	69
7.3.	Danksagung.....	71
7.4.	Affidavit.....	72
7.5.	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Zusammenfassung

Der kraniofaziale Bereich stellt durch seine hochkomplexe Anatomie eine große Herausforderung in der rekonstruktiven Chirurgie dar. Tissue Engineering könnte ein neuer vielversprechender Ansatz in der Behandlung kraniofazialer Defekte sein. Unter Tissue Engineering versteht man ein interdisziplinäres Forschungsfeld, welches durch Kombination von Zellen, Biomaterialien (Scaffolds) und physikalischen und biochemischen Signalen (z.B. Wachstumsfaktoren) gewebeähnliche Strukturen schafft. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Bioaktivierung von Poly- ϵ -Caprolacton (PCL) zur Anwendung in der Knochen- und Knorpelregeneration zu optimieren.

Ein essentieller Faktor der Bioaktivierung von Scaffolds sind die Stammzellen. Die humanen Adipose Tissue Derived Stem Cells (hASCs) bieten aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit und ihres Auftretens in hoher Konzentration viele Vorteile. In dem ersten Teil der Arbeit sollte herausgefunden werden, inwiefern die Technik der Gewebegewinnung einen Einfluss auf die Qualität der hASCs hat. Dafür wurde die Fähigkeit der Koloniebildung, Proliferations- und Differenzierungskapazität untersucht. Aus allen Gewebepräparaten konnten erfolgreich hASCs isoliert werden und der Nachweis der Multipotenz erbracht werden. Es zeigte sich, dass die Stammzellen aus einem Gewebestück signifikant mehr Kolonien bilden und tendenziell ein schnelleres Wachstum haben als die Stammzellen aus einem Lipoaspirat, die tendenziell in der adipogenen und osteogenen Differenzierung überlegen waren. Wir stellten zudem die Hypothese auf, dass die Eigenschaften der Stammzellen innerhalb des subkutanen Fettgewebes variieren könnten. Daher wurden die hASCs aus der superfiziellen und tiefen Fettschicht miteinander verglichen. Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Proliferation und Koloniebildfähigkeit. Jedoch differenzierten die hASCs aus der tiefen Fettschicht tendenziell besser adipogen und osteogen.

Im Tissue Engineering stellt das Gerüst neben den Stammzellen einen entscheidenden Faktor dar. Hier ist PCL aufgrund seiner FDA Zulassung, der biologischen Abbaubarkeit und der Langzeitstabilität eines der vielversprechendsten Materialien. Des Weiteren kann PCL im 3D Druck angewendet werden und ermöglicht somit die patientenindividuelle Herstellung von Implantaten. Diese ist in der kommerziellen Produktion jedoch mit hohen Kosten verbunden. Daher wurde ein PCL Scaffold mit einem preisgünstigeren 3D Drucker in Eigenproduktion hergestellt und mit einem kommerziell erworbenen PCL Scaffold verglichen. Dabei wurde die

Vitalität der hASCs mittels Lebend/Totfärbung eruiert und ein Zytotoxizitätsassay mit Alamar blue durchgeführt. Außerdem wurde die Proliferation der hASCs durch den PicoGreen Assay und die chondrogene Differenzierung von hASCs durch den DMMB Assay untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass beide Scaffolds ein geeignetes Gerüst für die Zellproliferation von hASCs und deren chondrogene Differenzierung bieten, jedoch das eigenproduzierte dem kommerziellen Scaffold noch unterlegen ist.

Durch die Verwendung des PCLs im 3D Druck bietet sich die Möglichkeit Scaffolds in verschiedensten Konfigurationen zu drucken. Die wesentlichen Parameter, die modifiziert werden können sind die Filamentdicke, Porenform und Porengröße. In diesem Teil der Arbeit wurde versucht herauszufinden, welche Konfiguration das optimale Gerüst für eine gute Zelladhäsion und Zellproliferation bietet und somit die Grundlage für ein erfolgreiches Tissue Engineering ist. Dabei wurden drei verschiedene Porengrößen (300 µm, 350 µm, 450 µm) und drei Porenformen (viereckig, dreieckig und sternförmig) variiert und miteinander verglichen. Mittels Alamar Blue Assay konnte festgestellt werden, dass mit einer höheren Porengröße die Anzahl der auf dem Scaffold befindlichen Zellen signifikant abnimmt und es zu einem deutlichen Zellverlust im Seedingprozess kommt. Für die weiteren Versuche mit PCL-Gerüsten wurde fortan die Konfiguration 300 µm Porengröße und eine viereckige Porenform verwendet, da auf diesen das Zellwachstum tendenziell am besten war.

PCL bietet sehr gute mechanische Eigenschaften, jedoch ist die Bioaktivierung bislang noch nicht zufriedenstellend. Bezüglich der Stabilität sind natürliche Biomaterialien dem PCL unterlegen, bieten aber eine bessere Mikroumgebung für die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Daher wurde im vierten Teil versucht, die Vorteile von natürlichen und synthetischen Biomaterialien zu kombinieren. Es wurden sowohl eine chondrogene als auch osteogene Extrazellulärmatrix von hASCs auf 3D-gedruckten PCL-Scaffolds produziert und anschließend dezellularisiert, um zellfreie funktionalisierte PCL-Gerüste mit den Bezeichnungen augmentiert chondrogenes PCL (acPCL) und augmentiert osteogenes PCL (aoPCL) zu erzeugen. Bei der Dezellularisierung wurden die Zellkerne entfernt, was zu einer signifikanten Verringerung des DNA-Gehalts führte, während die Extrazellulärmatrix weitestgehend erhalten blieb. Anschließend wurde die Bioaktivierung und die Wirkung der ac/aoPCL-Gerüste auf die Proliferation, Differenzierung und Genexpression von hASCs untersucht. Es zeigte sich, dass die aktivierten PCL Scaffolds nicht toxisch für hASCs sind und

eine gute Adhäsion der Zellen ermöglichen. Die biochemische Analyse und Genexpressionsanalyse ergab, dass die chondrogen aktivierten PCL Scaffolds die Knorpelbildung verbessern, jedoch nicht induzieren kann. Das aoPCL zeigte einen noch größeren Einfluss auf die Differenzierung von hASCs. Im Kontrollmedium waren sie in der Lage, die Stammzellen allein zur Kalziumproduktion zu stimulieren. Zudem waren alle für die Osteogenese relevanten Gene auf aoPCL signifikant stärker exprimiert als auf unmodifiziertem PCL. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die chondrogene und osteogene Aktivierung die Regenerationsfähigkeit von hASCs auf PCL Scaffolds verbessert werden kann. Die aoPCL Scaffolds scheinen eine Differenzierung der hASCs ohne weitere induzierende Faktoren möglich zu machen. Daher könnten künstliche dezellularisierte Extrazellulärmatrix Scaffolds eine interessante neue Technik zur Bioaktivierung künstlicher, 3D-gedruckter Scaffolds werden mit den bekannten Vorteilen wie bei natürlichem dezellulisiertem Gewebe, jedoch ohne die Notwendigkeit einer natürlichen Gewebequelle.

In dieser Doktorarbeit wurden die Eigenschaften und die Qualität von hASCs und dem Biomaterial PCL untersucht, um ein optimales Zusammenspiel dieser Komponenten zu erzielen. Die Ergebnisse zeigen, dass dieses Zusammenspiel sowohl bei den chondrogen augmentierten PCL Scaffolds als auch besonders bei den osteogen augmentierten PCL Scaffolds erfolgreich war. Beide Scaffolds besitzen ein hohes Potential für die Anwendung im Tissue Engineering und können in der Zukunft für die Therapie von kraniofazialen Defekten von großer Relevanz sein.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau des subkutanen Gewebes	5
Abbildung 1.2: Multipotenz von mesenchymalen Stammzellen	6
Abbildung 4.1: Ablauf der Stammzellisolation	19
Abbildung 4.2: Visualisierung der Scaffold-Architektur in der Auflichtmikroskopie	29
Abbildung 4.3: Konzentrationskurve für die Zellzahlbestimmung mittels AlamarBlue	30
Abbildung 4.4: schematischer Versuchsaufbau von Teil 4	32
Abbildung 5.1: Vergleich der Eigenschaften der hASCs aus Gewebestück und BodyJet®	40
Abbildung 5.2: Vergleich der Eigenschaften der hASCs aus den Fettschichten.	41
Abbildung 5.3: Veranschaulichung der Architektur der Scaffoldvarianten und Verteilung der hASCs auf EP-PCL und KMZ-PCL	42
Abbildung 5.4: Zytotoxizitätsassay mittels Alamar Blue	42
Abbildung 5.5: Ermittlung der dsDNA-Menge auf KMZ-PCL und EP-PCL	43
Abbildung 5.6: chondrogene Differenzierung von hASCs auf EP-PCL und KMZ-PCL.	44
Abbildung 5.7: Verteilung der Zellen nach dem Seeding auf den Scaffold und im Well..	45
Abbildung 5.8: Zellwachstum der hASCs auf den verschiedenen Scaffoldkonfigurationen.	46
Abbildung 5.9: Histologische Darstellung des Dezellularisierungsprozesses von acPCL und aoPCL	47
Abbildung 5.10: Analyse der ECM vor und nach dem Dezellularisierungsprozess	48
Abbildung 5.11: Darstellung der Scaffoldgeometrie und Ermittlung der Proliferation der hASCs	49
Abbildung 5.12: Analyse der von hASC produzierten ECM auf ac/aoPCL und uPCL	51
Abbildung 5.13: Relatives Genexpressionsprofil von hASCs ao/ac PCL und uPCL	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	14
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	17
Tabelle 3: Zusammensetzung der Zellkulturmedien	17
Tabelle 4: Zusammensetzung der Reagenzlösungen für den DMMB-Assay.....	25
Tabelle 5: Primer Sequenzen.....	38

Abkürzungsverzeichnis

β-TCP	β-Trikalziumphosphat
bzw.	beziehungsweise
DAT	Deep adipose Tissue (tiefe Fettschicht)
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
dECM	dezellularisierte Extrazelluläre Matrix
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (eng. Desoxyribonucleic acid)
engl	englisch
Et al.	und andere
Etc.	et cetera
ECM	Extrazelluläre Matrix
FDA	Food and Drug Administration
GAG	Glykosaminoglykan
HA	Hydroxylapatit
hASC	humane Adipose Tissue Derived Stem Cell
HCL	Salzsäure
iPSCs	Induzierte pluripotente Stammzellen
lat.	lateinisch
Min	Minuten
MSC	Mesenchymale Stammzellen
ng	Nanogramm
ms	Millisekunden
PBS	phosphate buffered saline
P/S	Penicillin-Streptomycin
PCL	Poly-ε-Caprolacton
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKA	Proteinkinase A

RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAT	Superficial adipose Tissue (superfizielle Fettschicht)
s.o.	siehe oben
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SVF	Stromale Vaskuläre Fraction
TE	Tissue Engineering
USA	United States of America
vgl.	vergleiche
vs.	Versus
µg	Mikrogramm
z.B	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Klinische Relevanz der Kraniofazialen Rekonstruktion

Die Anatomie des kraniofazialen Bereichs ist hochkomplex und individuell. Sie besitzt sowohl eine entscheidende funktionelle als auch ästhetische Bedeutung und ist das wichtigste Erkennungsmerkmal des Menschen [1, 2]. Zu den häufigsten Deformitäten im Kopf- und Gesichtsbereich zählt die Lippen-, Kiefer- Gaumenspalten und die angeborene Fehlbildung der Ohrmuschel, die Mikrotie. Die Prävalenz der Mikrotie zeigt hohe regionale Unterschiede und reicht von 1 bis 10 pro 10.000 Geburten weltweit [3]. Des Weiteren treten in den USA posttraumatische Defekte (200.000 pro Jahr) und Defekte nach Tumorentfernung (28.000 neue Patienten pro Jahr) auf [4]. Die Behandlung dieser meist komplexen kraniofazialen Krankheitsbilder stellt eine erhebliche wirtschaftliche Belastung dar [5]. Die Therapie mittels adäquater kraniofazialer Rekonstruktion ist von großer Bedeutung, da Deformitäten dramatische Auswirkungen auf die Funktion der Gesichtsanatomie haben können [1, 6]. Sie können die Lebensqualität der Patienten deutlich einschränken und zu psychosozialen Problemen führen [7, 8]. Die Ohrmuschel und die äußere Nase werden hauptsächlich von Knorpel gestützt, einem avaskulären Gewebe mit geringem Regenerationspotential, daher können Traumata zu dauerhaften Deformierungen führen [9, 10]. Aurikuläre, nasale und Mundhöhlendefekte gehören aufgrund ihrer komplexen dreidimensionalen Anatomie zu den am technisch anspruchsvollsten zu rekonstruierenden Strukturen in der plastischen Gesichtschirurgie [11, 12]. Da das anatomische Gerüst sowohl aus Knochen als auch Knorpel besteht, sind beide Gewebe in der kraniofazialen Rekonstruktion erforderlich [13].

1.2. Aktuelle Behandlungsstrategien

Gegenwärtige Optionen zur Behandlung der kraniofazialen Defekte umfassen lokale Gewebeumlagerungen und freie mikrochirurgische Gewebetransfers wie freie Fibulalappen für kranio-maxillofaziale Defekte [5]. Diese sollten den nativen Stoffen in ihren Eigenschaften möglichst nahekommen, damit sowohl die Funktionalität als auch die Ästhetik wiederhergestellt werden kann [14].

Einleitung

Bislang stellen autogene (körpereigene) Transplantate wie Rippenknorpel den Goldstandard in der Ohrmuschel- und Nasenrekonstruktion dar [15]. Dabei wird der autogene Knorpel anschließend mit einem vaskularisierten fasziokutanen Lappen bedeckt, um die Ernährung des übertragenen Knorpels zu gewährleisten und eine Weichgewebedeckung zu ermöglichen [16, 17]. Die Weichgewebedeckung kann nicht nur zu ausgedehnten Hämatomen und Wundheilungsstörungen führen, sondern auch mehrere Operationen zur Volumenreduktion des Transplantats erforderlich machen, welche die Gefahr einer Deformierung des empfindlichen Ohrkonstrukts bergen [18]. Darüber hinaus besteht die Ohrmuschel aus elastischem Knorpel. Der zur Rekonstruktion verwendete Rippenknorpel ist jedoch hyaliner Knorpel und weist daher andere mechanische Eigenschaften als der Ohrknorpel auf [19]. Die Rekonstruktion muss auch den vielen Belastungen des täglichen Lebens wie beispielsweise dem Tragen von Brillen der Kopfaufgabe beim nächtlichen Schlaf standhalten. Gleichzeitig kann ein zu steifes Transplantat dem Patienten Unbehagen bereiten [10].

Die kraniofaziale Knochenrekonstruktion spielt eine entscheidende Rolle für die Stützung der Weichgewebe und bestimmt daher das Erscheinungsbild des Gesichts. Zudem ermöglicht das knöchernerne Gerüst die Verankerung von Zähnen [20]. Die knöchernen Defektbereiche werden meistens mittels autogener Knochen vom Beckenkamm oder der Fibula rekonstruiert [15, 21, 22]. Eigengewebe besitzt den Vorteil, dass es vitales Gewebe ist und durch die autogene Transplantation keine immunologische Reaktion ausgelöst wird [23]. Autogene Transplantationen gehen aber auch mit negativen Aspekten einher. Einer der größten Nachteile ist die erhöhte Morbidität der Entnahmestelle. An der Spenderstelle kann es zu Deformierungen, Infektionen und speziell bei der Entnahme von Rippenknorpel zum Pneumothorax kommen [10, 24, 25]. Es können eine verlängerte postoperative Heilungszeit, vermehrte postoperative Schmerzen und anhaltende Gefühlsstörungen an der Spenderstelle auftreten [5, 13, 27]. Eine weitere Limitation der autogenen Rekonstruktion ist die begrenzte Verfügbarkeit des Spendergewebes [18, 26]. Gleichzeitig verlängert sich die Operation durch die Gewebegewinnung und erhöht somit die allgemeinen Operationsrisiken [13]. Daher ist die chirurgische Rekonstruktion bei Patienten mit einer erhöhten Komorbidität wie einem schlechten lokalen Gewebe aufgrund von Bestrahlung oder bei älteren Patienten nicht empfehlenswert [10]. Zudem stellt die anatomische Rekonstruktion eine chirurgische Herausforderung dar und erfordert die Expertise eines erfahrenen Chirurgen, um sowohl ein ästhetisch als auch funktionell optimales Ergebnis zu erzielen [28-30]. Gelingt dies, besteht

Einleitung

weiterhin die Gefahr von späteren Deformierungen, welche das ästhetische und funktionelle Ergebnis verschlechtern können [27, 31-33].

Ein weiterer Behandlungsansatz ist die Verwendung von künstlichen Implantaten. Diese bieten einerseits den Vorteil einer kleineren Operation und einer guten ästhetischen Rekonstruktion, sind jedoch anfällig für Infektionen und können durch ihre fehlende Bioaktivität nicht die Eigenschaften eines vitalen Gewebes imitieren. Hinzu kommen störende Degradationsprozesse und fehlendes Sensibilitätsverhalten [2, 34].

1.3. Tissue Engineering

Aufgrund der Limitationen der bisherigen Behandlungsoptionen hat das Tissue Engineering an Bedeutung gewonnen und könnte eine vielversprechende Alternative sein [35, 36]. Unter Tissue Engineering versteht man ein interdisziplinäres Forschungsfeld, welches durch Kombination von Zellen, Biomaterialien (Scaffolds) und physikalischen und biochemischen Signalen (z.B. Wachstumsfaktoren) gewebeähnliche Strukturen schafft [37, 38]. Das Ziel ist es biologisch aktiviertes Ersatzmaterial zu generieren, das dem körpereigenen natürlichen Gewebe so nahe wie möglich kommt und somit die Struktur und Funktion von geschädigtem Gewebe wiederherstellen oder ersetzen kann [14]. Dies könnte vor allem für die Anwendung in der kraniofazialen Chirurgie ein Gewinn sein, denn hier gibt es hohe Anforderungen an diese Materialien. Vitale Konstrukte, die eine Langzeitstabilität aufweisen und somit den Formerhalt sicherstellen, sind gefordert [39].

1.3.1. Adipose Derived Stem Cells

Ein essentieller Teil des Tissue Engineering ist die Bioaktivierung und Funktionalisierung der Scaffolds durch Zellen, denn diese ermöglichen die Herstellung von vitalem Gewebe. Zum Einsatz kommen meist Stammzellen oder differenzierte Zellen. Die differenzierten Zellen haben den Nachteil einer meist geringen Anzahl an verfügbaren Zellen und ein geringeres Proliferationspotential in-vitro [40]. In diesem Bereich sind die Stammzellen überlegen. Sie können in eine Vielzahl an Zellphänotypen differenzieren und auch die Vaskularisierung von Scaffolds unterstützen [41]. Zur Prävention von Abstoßungsreaktionen ist es von Vorteil patienteneigene (autogene) Zellen zu verwenden.

1.3.1.1 Aufbau von Fettgewebe

Fettgewebe kommt im menschlichen Körper ubiquitär vor und wird in zwei Haupttypen, weißes und braunes Fettgewebe, unterschieden [42, 43]. Braunes Fettgewebe ist vermehrt bei Säuglingen und nur rudimentär bei Erwachsenen zu finden. Es dient insbesondere zur Wärmeproduktion [44]. Beim Adulten findet man hauptsächlich weißes Fettgewebe, welches auch als Bau- und Speicherfett bezeichnet wird. Es dient als Energiespeicher in Hungerperioden, zur Wärmeisolation sowie subkutan und an Gelenken als Polsterung [42, 43]. Das weiße Fettgewebe wird außerdem in Bezug auf dessen Lage in subkutanes und viszerales Fett eingeteilt, die in ihren pathophysiologischen Eigenschaften variieren, z.B. in Bezug auf Insulinresistenz, Entwicklung von Entzündungen und Lipolyse [45, 46]. Das weiße Fettgewebe ist hochkomplex und beinhaltet über reife Fettzellen hinaus, viele verschiedene Zellpopulationen, die als sogenannte Stromale Vaskuläre Fraktion (SVF) zusammengefasst werden. Die SVF umfasst Präadipozyten, vaskuläre glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, verschiedene Blutzellen und humane Adipose Derived Stem Cells (hASCs) [47]. Die Dichte der Stammzellen variiert innerhalb des Fettgewebes je nach Ort des entnommenen Fettgewebes und ist im viszeralen Fett deutlich niedriger [48, 49]. In-vitro Versuche haben gezeigt, dass Stammzellen aus dem subkutanen Fett ein höheres Proliferations- und Differenzierungspotential besitzen [50]. In der rekonstruktiven Chirurgie richtet sich der Fokus vor allem auf das weiße, subkutane Fett, das eine komplexe Faszienarchitektur ausweist [51]. Innerhalb des subkutanen Fettgewebes lassen sich durch eine membranartige Schicht, die Scarpa Faszie, eine superfizielle und tiefe Fettschicht (SAT und DAT) identifizieren [52, 53]. Direkt unter der Haut befindet sich die SAT, die aus senkrecht zur Haut gerichteten faserigen Septen mit dichten kleinen Fettläppchen besteht. Im Gegensatz dazu liegt die DAT unter der Scarpa Faszie und besteht aus großen Fettläppchen, die locker in vertikalen und schrägen fibrösen Septen eingebettet sind [54-56]. Die subkutanen Fettschichten sind je nach Körperbereich unterschiedlich stark ausgeprägt [57].

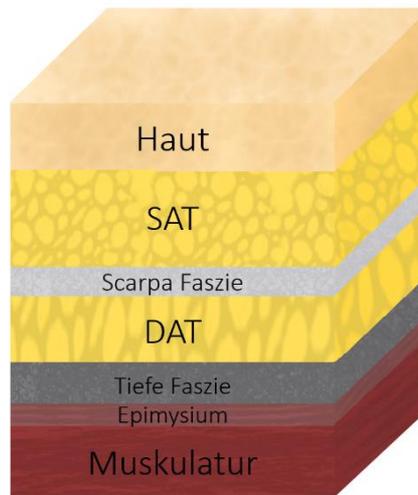


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau des subkutanen Gewebes und der Faszienorganisation (modifiziert von [58])

1.3.1.2 Stammzellen

Definitionsgemäß ist eine Stammzelle eine undifferenzierte Zelle mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, koloniebildendem Potential und Differenzierung in multiple Zelllinien [59, 60]. Die Zellteilung von Stammzellen wird in verschiedene Arten unterteilt, die durch unterschiedliche Signale induziert wird. Die symmetrische Zellteilung führt zum Entstehen von zwei identischen Tochterzellen. Bei der asymmetrischen Teilung hingegen entsteht eine Stammzelle und eine Progenitorzelle, die sich terminal differenzieren kann [61]. Stammzellen können anhand ihrer Herkunft in vier große Gruppen eingeteilt werden: embryonale, fetale, adulte und unipotente Stammzellen. Diese besitzen ein unterschiedliches Differenzierungspotential. Embryonale Stammzellen sind totipotent, das heißt sie können sich in alle embryonalen und extraembryonalen Zellen entwickeln. Fetale Stammzellen werden zu den Pluripotenten gezählt und besitzen die Fähigkeit sich in Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) zu differenzieren. Adulte Stammzellen, zu welchen auch die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) zählen, sind in der Lage sich in Gewebe eines einzelnen Keimblatts zu entwickeln und sind somit multipotent. Unipotente Stammzellen können sich selbst erneuern und sich in alle Zellen einer bestimmten Zelllinie entwickeln [62].

Einleitung

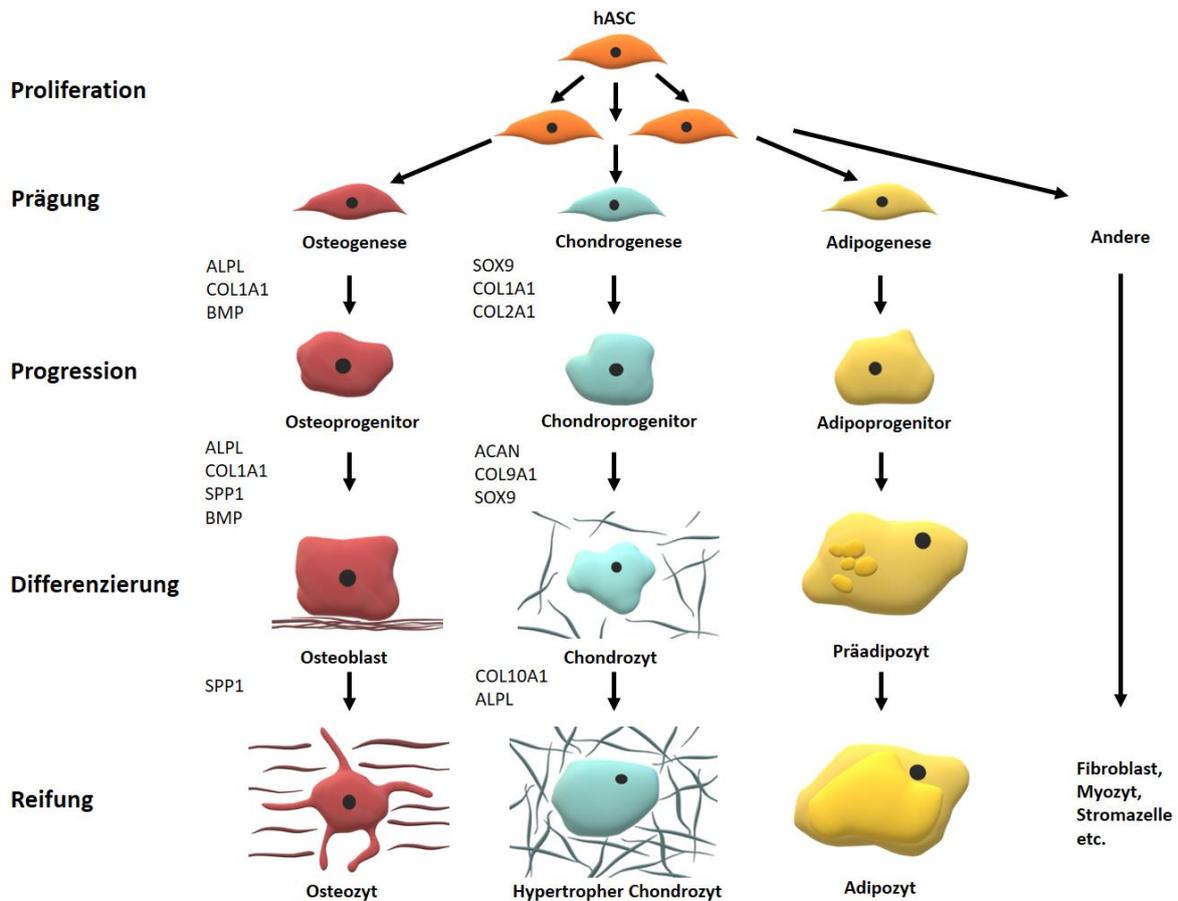


Abbildung 1.2: Multipotenz von mesenchymalen Stammzellen am Beispiel von hASCs. Die Differenzierung in spezifisches Gewebe wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert (modifiziert von [63])

MSCs können aus einer Vielzahl von Geweben wie Nabelschnurblut, Skelettmuskulatur, Knochenmark und peripherem Blut gewonnen werden [64-67]. Zusätzlich können aus der SVF des Fettgewebes Stammzellen mit der Qualität von MSCs isoliert werden. Diese werden als Adipose Derived Stem Cells (ASCs) bezeichnet. Die aus der SVF isolierten hASC können anschließend über ihre Eigenschaft der Plastik-Adhärenz von der heterogenen Zellpopulation der SVF getrennt werden [68]. Sie haben ein hohes Potential zur Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten [69, 70].

Des Weiteren können sie parakrine Wachstumsfaktoren absondern und somit die Geweberegeneration einleiten [71]. Im Tissue Engineering erweisen sich humane Adipose Derived Stem Cells (hASCs) als vorteilhaft aufgrund der leichten Zugänglichkeit im Fettgewebe ohne signifikante Morbidität der Spenderstelle. Die Fettgewebsgewinnung kann beispielsweise durch eine Fettabsaugung stattfinden. In den USA werden jährlich über 200.000 Liposuktionen durchgeführt und dabei zwischen 100 ml und 3 Liter Fettgewebe abgesaugt und routinemäßig entsorgt [72, 73]. Ein weiterer Vorteil ist die Multipotenz und

ihr Vorliegen in deutlich höherer Konzentration im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark [23, 40, 74, 75].

1.3.1.3 Verwendung und Einflussfaktoren von hASCs

Durch die oben genannten Vorteile der hASCs besitzen diese ein großes Potential für den Einsatz in der regenerativen Medizin. Daher werden gegenwärtig eine große Anzahl an in-vitro und in-vivo Versuchen mit den hASCs in verschiedensten Indikationen getestet. So wurde beispielsweise im Tierversuch gezeigt, dass hASCs die Wundheilung verbessern und die Narbenbildung optimieren sowie mit einer verringerten Narbengröße und einer erhöhten Flexibilität der Narbe einhergehen [71, 76]. Des Weiteren wurden immunsupprimierende Eigenschaften der Stammzellen nachgewiesen, die zu Fortschritten in der Behandlung der „Graft vs. Host-Disease“ verhelfen [77, 78].

Seit die hASCs an Aufmerksamkeit gewonnen haben, wurden in vielen Studien Einflussfaktoren auf die Zellausbeute und das regenerative Potential untersucht [79]. Unter regenerativem Potential versteht man die Vitalität, die Proliferationsfähigkeit und das Potential in verschiedene Zelllinien zu differenzieren [80]. So zeigte sich, dass der Anteil an Stammzellen in der SVF stark von Person zu Person variiert und von verschiedenen Spenderfaktoren abhängt [81]. Dabei ist die Studienlage nicht immer eindeutig. Die Mehrzahl der Studien zeigte, dass die Stammzellen von älteren Spendern in der Proliferation, Zellausbeute und in der adipogenen wie auch der osteogenen Differenzierung jüngeren Spendern unterlegen sind [82-84]. Der Einfluss des BMIs wird in der Literatur kontrovers diskutiert [82, 85-87].

1.3.1.4 Extrazellulärmatrix von Knorpel und Knochen

Die Extrazellulärmatrix (ECM) ist ein komplexes gewebespezifisches biomolekulares Netzwerk, welches von Zellen sezerniert wird [88]. Die ECM des Knochens wird aus einer organischen und einer anorganischen Komponente zusammengesetzt. Kollagen Typ I ist Hauptbestandteil der organischen Komponente und verleiht dem Gewebe Elastizität. Die anorganische Phase besteht größtenteils aus Kalziumphosphat und Hydroxylapatit und ist für die Festigkeit verantwortlich. Zudem besteht das Knochengewebe aus vier Zelltypen, die verschiedene Funktionen im Knochenstoffwechsel besitzen. Osteoblasten und Osteozyten sind für den Knochenauf- und umbau zuständig. Osteoklasten hingegen dienen vor allem dem Abbau von

Einleitung

Knochengewebe. Zudem findet man im Knochen wenige undifferenzierte Osteoprogenitorzellen.

Die ECM des Knorpels wird von Chondroblasten und Chondrozyten gebildet. Die Zusammensetzung des Knorpels und somit die Eigenschaften unterscheiden sich in den verschiedenen Knorpeltypen: hyaliner Knorpel, elastischer Knorpel und Faserknorpel. Der Faserknorpel besteht aus einer Mischung von Kollagen Typ I und II, während hyaliner Knorpel hauptsächlich aus Kollagen Typ II besteht. Elastischer Knorpel enthält zusätzlich viele elastische Fasern. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der ECM sind Proteoglykane. Diese bestehen aus mehreren Ketten von Glykosaminoglykanen. Das am häufigsten vorkommende Proteoglykan, das Aggrecan verleiht dem Knorpel durch seine hohe Wasserbindungsfähigkeit die Elastizität. Weitere wichtige Proteoglykane bzw. Glykosaminoglykane sind Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Hyaluron [8].

1.3.1.5 Einfluss der ECM auf hASCs

In der Geweberegeneration und im Tissue Engineering ist die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen für die Osteogenese, Chondrogenese, Adipogenese, Myogenese, Neurogenese oder Angiogenese ein entscheidender Schritt und kann durch eine Vielzahl an Mechanismen gesteuert werden [89]. Zu diesen zählen nicht nur der Einfluss von Differenzierungsfaktoren, sondern auch die Extrazellulärmatrix [90]. Die ECM dient als mechanische und strukturelle Stütze und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Zellproliferation und Migration [91]. Darüber hinaus besitzt die ECM die Fähigkeit, die Zelldifferenzierung durch Beeinflussung mechanischer und chemischer Signalwege zu steuern [92, 93]. Die Matrixelastizität kann alleine, ohne Zugabe von Differenzierungsfaktoren, das Differenzierungspotential von Stammzellen steuern. Das Gehirn nachahmende, weiche Matrices können eine neurogene Differenzierung von MSCs bewirken. Die Differenzierung in osteogene Zellen kann durch steifere Matrices, die den Knochen nachahmen, induziert werden [94]. Außerdem wurde festgestellt, dass die Zellproliferation und Zelladhäsion durch die Elastizität der Matrix beeinflusst wird [95, 96].

Einleitung

1.3.2. Biomaterialien

Als Biomaterialien werden natürliche oder synthetische Stoffe bezeichnet, die in einem lebenden System einen Teil des Gewebes ergänzen bzw. ersetzen können [97, 98]. Die biokompatiblen Trägermaterialien werden auch als Scaffolds (engl. Gerüst) bezeichnet. Sie sollen als artifizielle Matrix die biologische Makro- und Mikroumgebung zur Optimierung der Geweberegeneration imitieren und somit ermöglichen, einen dreidimensionalen Komplex zu erzeugen. Die Scaffolds sollen eine gute Zelladhäsion, -proliferation, -migration und -differenzierung bieten. Ihre Architektur, wie Porenbeschaffenheit und Oberflächentopographie, kann einen Einfluss auf die Zellen haben [99]. Des Weiteren gibt es viele Anforderungen an die Eigenschaften des Konstrukts, wie ausreichende mechanische Stabilität, Formbeständigkeit und biologische Abbaubarkeit. Für den Einsatz in der regenerativen Medizin wurden bereits eine Vielzahl von verschiedenen natürlichen und synthetischen Biomaterialien getestet [39, 100].

1.3.2.1 Natürliche Materialien

Natürliche Materialien sowohl von anderen Menschen (allogen) als auch von einer anderen Spezies (xenogen) finden große Verwendung im Tissue Engineering. Sie besitzen den Vorteil einer biologischen Zusammensetzung und Darstellung einer natürlichen Umgebung [101]. Die klinische Anwendung, vor allem der xenogenen Transplantate beim Menschen, stellt jedoch aufgrund ihrer Immunogenität und der Gefahr einer Infektionsübertragung eine Herausforderung dar [102, 103]. Daher müssen diese im Idealfall von allen nativen Zellen und DNA befreit werden, um eine Abstoßungsreaktion zu vermeiden. Gleichzeitig sollten die wesentlichen funktionellen und strukturellen Eigenschaften beibehalten werden, da diese zur Förderung der Differenzierung von Stammzellen in verschiedene Zelllinien beitragen können [104-107]. Zur Dezellularisierung und somit zur Herstellung einer dezellulierten Extrazellulärmatrix (dECM) wurden verschiedene enzymatische, chemische und physikalische Ansätze verfolgt. Dabei haben mehrere Studien gezeigt, dass eine effektive Dezellularisierung mit Natriumdesoxycholat und DNase möglich ist, während die ECM aufrechterhalten bleibt [93, 102, 108]. So wurde bereits Nasenknorpel vom Schwein erfolgreich dezelluliert, wobei die dreidimensionale Kollagenstruktur und deren Eigenschaften erhalten werden konnte. Die dabei gewonnene dECM konnte bereits die chondrogene Differenzierung von Stammzellen induzieren [104, 109]. Dennoch ist die Immunreaktion des Empfängers eine entscheidende

Einleitung

Barriere für die Anwendung xenogener Scaffolds. Es können dadurch Entzündungen an den zur Rekonstruktion verwendeten Transplantaten entstehen, die sowohl die Ästhetik als auch die Funktion einschränken. Beispielsweise besitzt das häufig in der Orthopädie und Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie verwendete Bio-Oss[®], das aus bovinem Hydroxylapatit hergestellt wird, eine sehr gute Biokompatibilität, jedoch lediglich eine osteokonduktive und keine osteoinduktive Wirkung [110-112]. Das heißt es kann die Stammzellen nicht zur Differenzierung in Osteoblasten stimulieren, sondern dient lediglich zur Orientierung von Blutgefäßen hin zum ossären Defekt oder begünstigt die Neuformierung von Knochen auf seiner Oberfläche. Natürliche Polymere wie Chitosan, Hyaluronsäure und Kollagen bieten auch eine hohe Biokompatibilität, da sie meist einzelne Komponenten der ECM sind. Zum Beispiel durch Elektrosponnen kann eine 3D-Struktur aus natürlichen Biomaterialien hergestellt werden, die aber meist eine unzureichende mechanische Festigkeit aufweist [113, 114].

Obwohl die bisherige Studienlage vielversprechend ist, ist die Anwendbarkeit von natürlichen Materialien im Tissue Engineering von harten Geweben wie Knorpel und Knochen trotz der hohen Bioaktivierbarkeit durch seine unzureichenden mechanischen Eigenschaften und Langzeitstabilität eingeschränkt [115].

1.3.2.2 Synthetische Materialien

Synthetisch hergestellte Scaffolds erhalten in der Tissue-Engineering-Forschung immer mehr Aufmerksamkeit, aufgrund der unbefriedigenden mechanischen Eigenschaften von natürlichen Gerüsten [39]. Synthetische Materialien sind künstlich hergestellte Fremdmaterialien, die beispielsweise aus Trikalziumphosphaten, Metallen, Keramiken, Biogläsern oder Kunststoff-Polymeren bestehen. Der Vorteil der synthetischen Materialien besteht in der erhöhten biomechanischen Stabilität. Sie sind aber meist im Vergleich zu Knochen zu steif [113]. Im Idealfall sollte das Fremdmaterial mit der Zeit vom Körper abgebaut werden und die entstehenden Zwischenräume durch die Geweberegeneration aufgefüllt werden. Dabei entscheidend ist der Synergismus zwischen dem Abbauprozess des Fremdmaterials und der Geweberegeneration durch Zellen. Zunächst wird unreifes, noch wenig belastbares Gewebe neugebildet. Tritt der Abbau zu früh ein oder er erfolgt in einer zu hohen Geschwindigkeit, ist die biomechanische Stabilität gefährdet und es kann langfristig zur Deformierung des Konstrukts kommen [99, 116]. Außerdem kann der Abbauprozess

Einleitung

(Degradation) das bereits regenerierte Gewebe wieder zerstören. Des Weiteren ist die Biokompatibilität des synthetischen Materials von großer Bedeutung. Weder das Material noch die Abbauprodukte sollten eine Immun- bzw. Fremdkörperreaktion auslösen.

Metalle wie Titan weisen eine hohe Stabilität auf, jedoch findet nur eine mäßige Gewebeintegration in den Knochen statt und sie bergen das Risiko einer Toxizität durch Freisetzung von Metallionen. Keramiken finden ebenfalls häufig Verwendung im Tissue Engineering. Dies sind biologisch abbaubare Polymere die beispielsweise aus Hydroxylapatit oder β -Tricalciumphosphat bestehen. Sie besitzen eine hohe Biokompatibilität und Bioaktivität, jedoch werden sie im Verlauf spröde, besitzen eine geringe Bruchfestigkeit und die Abbaugeschwindigkeit ist nur schwer vorhersehbar [113, 117].

Eine weitere wichtige Voraussetzung des Ersatzmaterials ist die angemessene Porosität, welche die Zellanheftung und Zellmigration beeinflusst. Bei zu kleiner Porengröße und verminderter Poreninterkonnektivität ist die Oxygenierung und der Stoffaustausch innerhalb des Konstrukts eingeschränkt. Mit zunehmender Porengröße vermindert sich jedoch die mechanische Belastbarkeit [99, 118]. Synthetische Polymere wie Polymilchsäure (PLA), Polyglykolsäure (PGA) und Poly- ϵ -Caprolacton (PCL) bieten hier eine große Vielseitigkeit an Porengröße, Porosität, Abbaugeschwindigkeit und mechanischen Eigenschaften. Beim biologischen Abbau dieser Polymere entsteht Glykolsäure und Milchsäure, die natürlich im menschlichen Körper vorkommen. PCL beispielsweise hat eine zufriedenstellende Langzeitstabilität aufgrund des langsamen und kontrollierten Abbauprozesses. Zudem hat es bereits eine FDA-Zulassung zur Anwendung im Menschen und PCL lässt sich im 3D-Druck verwenden. Somit ist die Herstellung von individuell geformten 3D-Gerüsten möglich. Vor allem in der kraniofazialen Rekonstruktion ist dies ein Vorteil, da komplexe geometrische Gerüste benötigt werden. PCL weist eine sehr gute Biokompatibilität auf. In vielen Forschungsprojekten wurde die Herstellung von Knochen- und Knorpelgewebe mit Stammzellen auf PCL untersucht. Bislang reicht reines PCL noch nicht aus, um eine zufriedenstellende osteogene und chondrogene Differenzierung der Zellen und Geweberegeneration zu erreichen [119-123]. Zusätzlich ist die klinische Anwendbarkeit, aufgrund hoher Kosten kommerzieller Anbieter für die präzisen 3D PCL-Gerüste, limitierend [124].

1.3.2.3 Kombination synthetischer und natürlicher Biomaterialien

In vielen Studien wurde der Ansatz verfolgt durch die Kombination von natürlichen und synthetischen Biomaterialien die Vorteile beider Stoffgruppen zu nutzen, um einen Scaffold mit guter mechanischer (Langzeit-)Stabilität herzustellen, der gleichzeitig die natürliche Umgebung bestmöglich imitiert. In einer Reihe von Studien wurde PCL bereits mit verschiedenen differenzierungsinduzierenden Substanzen wie Wachstumsfaktoren, Antikörpern und ECM-Bestandteilen beschichtet. Zum Beispiel wurde Chondroitinsulfat zur Verbesserung der chondrogenen Differenzierung und Kalziumphosphat für die Förderung der Osteogenese verwendet [8, 12, 107, 125, 126]. Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Bioaktivität ist eine dezellularisierte Extrazellulärmatrix (dECM), die von Zellen direkt auf PCL synthetisiert wurde. Im Vergleich zur Beschichtung mit einzelnen ECM-Proteinen, gilt die dECM aufgrund der Erhaltung aller Komponenten der ECM und der vollständigeren Mikrostruktur als überlegen [127, 128]. Dabei ist die Dezellularisierung entscheidend. Hier ist die Herausforderung, die Entfernung des Zellmaterials zu maximieren und gleichzeitig möglichst wenig Schäden an der ECM zu verursachen [8]. Von Zellen synthetisierte dECM bietet darüber hinaus den Vorteil, dass diese im Gegensatz zu autogenen und xenogenen Transplantaten nahezu unbegrenzt verfügbar sind [129, 130]. Um ein optimales Scaffold für die kraniofaziale Rekonstruktion zu generieren ist daher die Verbesserung der Bioaktivität von PCL und der anschließenden Funktionalität der Rekonstruktion möglicherweise ein entscheidender Schritt.

2. Experimentelle Fragestellung

Um im Tissue Engineering ein künstliches Material optimal biologisch zu aktivieren erfordert es ein gutes Zusammenspiel von Stammzellen und Biomaterialien. Dabei kommt es auf die Qualität der Stammzellen und die Eigenschaften des Biomaterials an. Als Biomaterial wurde PCL gewählt. Diese Arbeit wurde in vier Teile gegliedert und sowohl Spenderfaktoren als auch Einflüsse des PCLs auf humane Adipose Derived Stem Cells untersucht.

Teil 1: In der Literatur wurden bereits viele Faktoren beschrieben, die einen Einfluss auf die Koloniebildung, Proliferation- und Differenzierungskapazität von hASCs haben [84, 86, 131]. Wir stellten die Hypothese auf, dass die Qualität von hASCs aus der superfiziellen bzw. tiefen Fettschicht variiert und die Technik der Gewebegewinnung ebenfalls einen Einfluss hat.

Teil 2: Poly- ϵ -Caprolacton ist ein sehr vielversprechendes Biomaterial für die Anwendung im Tissue Engineering [33]. Kommerziell erworbenes PCL ist meist sehr kostspielig. Daher wurde ein kostengünstigeres PCL Scaffold selbst hergestellt. Wir stellten die Hypothese auf, dass das eigenproduzierte PCL Scaffold eine ähnliche Bioaktivierbarkeit wie kommerzielles PCL erreichen kann.

Teil 3: Durch die 3D Druckbarkeit von PCL, lassen sich Scaffolds in zahlreichen Porenkonfigurationen herstellen [132]. Ziel dieses Abschnitts war es herauszufinden, welche Scaffoldkonfiguration die optimale Bedingung für die Proliferation von hASCs bietet.

Teil 4: Die Bioaktivität von PCL ist bisher noch nicht zufriedenstellend [5]. Die Idee dieses Teils der Arbeit war es die Vorteile natürlicher und synthetischer Biomaterialien zu kombinieren. Wir stellten die Hypothese auf, dass eine von Zellen synthetisierte und anschließend dezellularisierte ECM auf PCL eine geeignetere Mikroumgebung für hASCs bieten und somit die Proliferation, Lebensfähigkeit und die Differenzierung von hASCs zu Knorpel- und Knochengewebe verbessern oder sogar induzieren könnte.

Material

3. Material

3.1. Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Sitz
3D Drucker	Ultimaker2+	Ultimaker	Geldermalsen, Niederlande
Bildbearbeitung	Image J	Open source Programm	
Brutschrank	HERAcell vios 160i	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Einkanal-Pipetten	Research® plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Färbegerät	Tissue Tek® Prisma™	Sakura	Alphen aan den Rijn, Niederlande
Feinwaage	ADB 200-4	Kern & Sohn	Balingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axio Observer	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	HERAfreeze HLE Series	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
kleine Zentrifuge	HERAEUS Fresco 17	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Linearshaker	KS 130 C S000	IKA®-Werke	Staufen, Deutschland
Magnetrührer	RCT 360 W	IKA®-Werke	Staufen, Deutschland
Mikroskop	Primovert	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Mikrotom	Microm HM 340E	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Mikrotom	Microm HM 340E	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
pH-Meter	inoLab® ph 720	WTW	Weilheim, Deutschland
Photometer	INFINITE M PLEX	Tecan Group	Männedorf, Schweiz
Pipettus	Easypet 3	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Real-Time-Thermocycler	qTOWER3G	Analytik Jena	Jena, Deutschland
Spectrophotometer	NanoPhotometer	Implen	München, Deutschland
Stepper	Multipipette M4	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Sterile Werkbank	SAFE 2020	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Thermocycler	T Professional Basic	Biometra, Analytik Jena	Jena, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tissue Lyser	Tissue Lyser LT	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Vortexer	Reax top	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Wärmeschrank	UM 200	Memmert	Büchenbach, Deutschland
Wasserbad	Precision GP 05	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Zellzählgerät	Countess II FL	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Zentrifuge	HERAEUS Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

Tabelle 1: Geräte

Material

3.2. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Sitz
1,9-DIMETHYL-METHYLENE BLUE	341088	Sigma Aldrich,	Steinheim, Deutschland
12-Well Platte (Nunclon™ Delta Surface)	150628	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
24-Well Platte (Nunclon™ Delta Surface)	142475	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
48-Well Platte (Nunclon™ Delta Surface)???	150687	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
6-Well Platte (Nunclon™ Delta Surface)	140675	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
7 mm Kugeln	69990	Qiagen	Hilden, Deutschland
96-Well Platte durchsichtig	156545	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
99% Propanol	100977	Merck Millipore,	Burlington, USA
Aktivkohle	C4386	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
AlamarBlue	DAL1025	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Alcian blau	3082.2	Carl Roth	Steinheim, Deutschland
Alizarin Red S	A5533	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ameisensäure	4724.3	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Amphotericin B	A2612	Biochrom	Berlin, Deutschland
Aqua DEPC	T143.1	Carl Roth	Steinheim, Deutschland
BODIPY 493/503 ,	D3922	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
chirurgische Schere	33823	Lohmann & Rauscher	Neuwied, Deutschland
Chondroitin Sulfat	5197.1	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Collagenase, typ 2	LS004176	Worthington	Lakewood, USA
CoolCell Box LX	BCS-405	BioCision	San Rafael, USA
Countess Chamber Slides	C10228	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Cryoröhrchen steril 2ml	430659	Corning	Corning, USA
DAPI	D1306	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas	D4263-1VL	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DEPC-behandeltes Wasser	T143.1	Carl Roth	Steinheim, Deutschland
DMEM High glucose 500ml	11971-025	Gibco by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
DMEM High glucose ohne phenolrot	21063-29	Gibco by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
DMSO	D2650	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DNeasy Blood and Tissue Kit	69504	Qiagen	Hilden, Deutschland
Essigsäure 100%	V20102.292	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70%	T913.3	Carl Roth	Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut	1009861000	Merck Millipore	Burlington, USA

Material

FBS South America / Brazil	INV10270-106	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Fluorescein diacetate	F7378	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Formaldehyd 4%	LOT130919	Microcos	Garching, Deutschland
GiemsaStain Solution	32884	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Guanidin Hydrochlorid 99,7%	0035.2	Carl Roth	Steinheim, Deutschland
Hydroxyproline Assay Kit	MAK008	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
innuMIX qPCR DSGreen Standard	012-18	Analytik Jena	Jena, Deutschland
innuPREP RNA Mini Kit 2.0	845-KS-2040050	Analytik Jena	Jena, Deutschland
Isopropanol	I 9516	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
LoBind 1,5 ml Reaktionsgefäß	0030 108.051	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Methanol 99,9%	P717.2	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natrium Acetat	S2889	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid 0,9%	B315265	Fresenius Kabi	Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
Natriumdesoxycholat	D6750-10G	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid	106482	Merck Millipore	Darmstadt, Germany
NuclearFastRed	N3020	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Oil Red O	O0625	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Papierfilter	516-0809	VWR	Radnor, USA
PBS Biochrom L1825 ohne Ca+Mg 500ml	L1825	Biochrom	Berlin, Deutschland
PCR Platte	2110317	VWR	Radnor, USA
Penicillin/Streptomycin	A2213	Biochrom	Berlin, Deutschland
Pipettenspitzen	Tip-Box Nbiocert	Brand	Wertheim, Deutschland
Propanol	100997	Merck Millipore	Darmstadt, Germany
Propidium iodid	P4864	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Proteinase K	P2308	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Quant IT PicoGreen dsDNA reagent	P7581	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
QuantiChrom Calcium Assay Kit	DICA-500	Bioassay Systems	Cambridge, Vereinigtes Königreich
RNAlater	160027967	Qiagen	Hilden, Deutschland
Roti®-Mount Aqua	2848.1	Carl Roth	Steinheim, Deutschland
Roti®-Mount FluorCare	HP19.1	Carl Roth	Steinheim, Deutschland
Salzsäure 25%	X897.1	Carl Roth	Steinheim, Deutschland
schwarze 96-Well Platte	NUNC-137101	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
serologische (Stripetten) 10ml	Pipetten 4488	Corning	Corning, USA
serologische (Stripetten) 25ml	Pipetten 170357	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
serologische (Stripetten) 2ml	Pipetten 170354	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

Material

serologische (Stripetten) 50ml	Pipetten	768180	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
serologische (Stripetten) 5ml	Pipetten	4487	Corning	Corning, USA
Skalpell		200130020	pfm medical ag	Köln, Germany
Splitterpinzette		34039	Lohmann & Rauscher	Neuwied, Deutschland
StemMACs AdipoDiff Media		130-091-677	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
StemMACs ChondroDiff Media		130-091-679	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
StemMACs OsteoDiff Media		130-091-678	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
TE buffer (1x) pH 8.0 10mM Tris, 0,1mM EDTA		A8569,0500	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Transcriptor First Strand		4379012001	Roche	Basel, Schweiz
Trypanblau		CN76.1	Carl Roth	Steinheim, Deutschland
Trypsin		L2143	Biochrom	Berlin, Deutschland
Tube 15 ml		430791	Corning	Corning, USA
Tube 50 ml		430829	Corning	Corning, USA
Zellfilter Porengröße 70µm		352350	Falcon by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Zellkulturflaschen		EasyFlask	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

3.3. Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium:	DMEM (Gibco by Thermo Fisher Scientific) +10% FBS (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)
Adipogenes Differenzierungsmedium	StemMACs AdipoDiff Media (Miltenyi Biotec)
Chondrogenes Differenzierungsmedium:	StemMACs ChondroDiff Media (Miltenyi Biotec)
Osteogenes Differenzierungsmedium:	StemMACs OsteoDiff Media (Miltenyi Biotec)
Jeweilige Antibiotikazusätze:	
	Teil 1: 1% Penicillin/Streptomycin und 0,4% Amphotericin B; Teil 2-4: 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Amphotericin B

Tabelle 3: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

4. Methoden

4.1. Allgemeine Methoden

4.1.1. Isolation der Stammzellen

Stammzellen aus menschlichem Fettgewebe (human Adipose Derived Stem Cells, hASCs) wurden von Patienten gewonnen, die sich einer Fettabsaugung oder einer Bauchstraffung in der Abteilung für Hand-, Plastische und Ästhetische Chirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität unterzogen haben. Alle Patienten gaben vor den Operationen nach vorheriger Aufklärung eine schriftliche Einwilligung zur wissenschaftlichen Verwendung der Gewebeproben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der LMU München mit der Registrierungsnummer 17-046 genehmigt. Die Gewebeproben wurden direkt aus dem Operationssaal gekühlt in das Zellkulturlabor transportiert und dort wurden die hASCs isoliert. Die Durchführung erfolgte unter sterilen Bedingungen in der sterilen Werkbank. Wenn es sich um Lipoaspirat bei den Proben handelte, wurden 30 ml der Fettpartikel mithilfe einer 50 ml serologischen Pipette (Corning) in ein 50 ml Tube (Corning) übertragen. Handelte es sich um Gewebestücke, wurde das oberflächliche von dem tiefen Fettkompartiment, welches durch die Scarpa Faszie begrenzt ist, unter Verwendung von Pinzette (Lohmann & Rauscher) und chirurgischem Skalpell (pfm medical) voneinander getrennt. Die Fettstücke wurden noch mit einer chirurgischen Schere (Lohmann & Rauscher) zerkleinert und in ein 50 ml Tube übertragen. Dieses wurde ebenfalls maximal bis zur 30 ml Markierung befüllt. Die beschriebenen Schritte fanden alle unter sterilen Bedingungen statt. Die Isolation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Wiggenhauser bzw. Schantz und Ng.[133]. Zu jeder Fettprobe wurden 15 ml 0,15 % Kollagenase II Lösung hinzugegeben. Diese wurde durch Lösen von 0,15 g Kollagenase II (Worthington) in 100 ml PBS (Biochrom) hergestellt. Die Tubes wurden für 30 min im Wasserbad bei +37 °C inkubiert. Um ein Trennen der Fettpartikel von der Kollagenase II Lösung zu verhindern und somit die Wirkung zu optimieren, wurden die Tubes alle 10 min 5-mal geschüttelt. Zum Stoppen der Enzymreaktion wurden 5 ml Kulturmedium pro Tube hinzugegeben und anschließend für 10 min bei 1200 g zentrifugiert. Dadurch wurde die Suspension in 3 Phasen (Fett, Flüssigkeit (FL), Stromale Vaskuläre Fraktion (SVF)) aufgetrennt. Die oberen beiden Schichten (Fett, Flüssigkeit) wurden durch Absaugen mit einer 50 ml Stripette bis auf 1 ml Flüssigkeit verworfen, um ein Aufwirbeln der Zellen in

Methoden

der SVF zu verhindern. Die SVF wurde in 3 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch einen Zellfilter (Thermo Fisher Scientific) gereinigt. Dieser wurde mit 3 ml Kulturmedium nachgespült, um evtl. hängengebliebene Zellen zusätzlich gewinnen zu können. Abschließend wurden die Zellen in einer T-175 Zellkulturflasche (Thermo Fisher Scientific) in 20 ml Kulturmedium ausgesät.

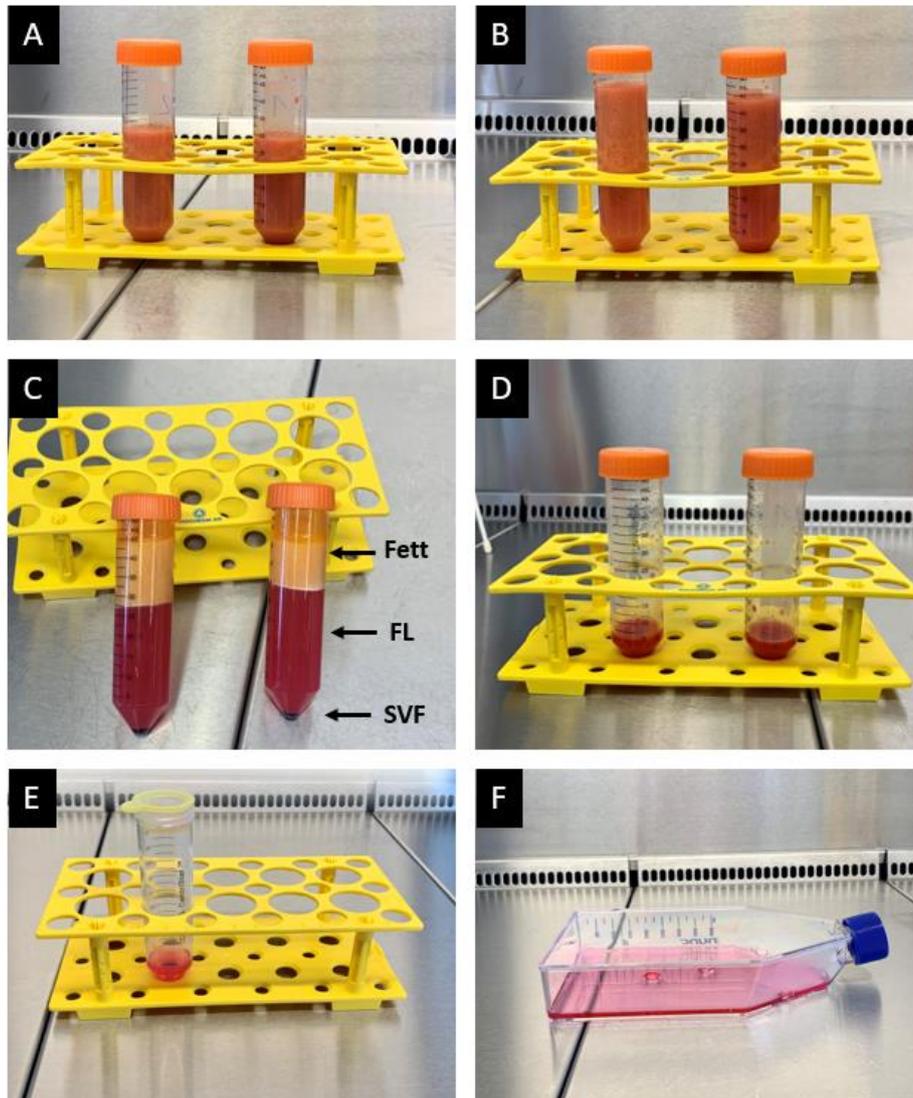


Abbildung 4.1: Ablauf der Stammzellisolation: (A) Fettgewebe im Tube, (B) Emulsion mit Kollagenase, (C) Phasen nach Zentrifugation, (D) Verwerfen des Überstands, (E) Zellfilter (F) Aussaat in Kulturflasche

4.1.2. Kultivierung

Die hASCs wurden in T-175 Zellkulturflaschen (Thermo Fisher Scientific) im Inkubator (Thermo Fisher Scientific) bei +37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und 2-mal wöchentlich, das Medium gewechselt. Bei Erreichen einer Konfluenz von circa 80 % wurden die Zellen entweder

Methoden

passagiert für den Versuch oder für die spätere Verwendung eingefroren. Hierfür wurden die Zellen mit 20 ml PBS (Biochrom) gespült. Die Zellen wurden mit 10 ml Trypsin (Biochrom) für 5 min bei +37 °C im Brutschrank gelöst. Zum vollständigen Lösen der Zellen wurde das Trypsin anschließend mehrmals auf- und abpipettiert. In einem Tube (Corning) wurden 10 ml Kulturmedium zum Stoppen des Trypsins vorgelegt und die Trypsin-Zellsuspension hinzugegeben. Um alle Zellen aus der Flasche zu entfernen, wurde diese erneut mit Kulturmedium gespült und in dem Tube gesammelt. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nun wurde das Zellpellet entweder in der entsprechenden Konzentration für den Folgenden Versuch in Kulturmedium resuspendiert oder eingefroren. Für das Einfrieren wurde das Zellpellet in circa 3 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe eines automatischen Zellzählgeräts bestimmt. Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (Carl Roth) gemischt und 10 µl auf das Chamber Slide (Thermo Fisher Scientific) gegeben. Die Zellsuspension wurde erneut für 5 min bei 500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Cryomedium (90 % FBS (Thermo Fisher Scientific)) und 10 % DMSO (Sigma-Aldrich)) resuspendiert. Je 1 ml wurde in Cryoröhrchen (Corning) gegeben und in der CoolCell-Box (BioCision) bei - 80 °C eingefroren.

4.2. Teil 1: Einfluss der Gewebegewinnung auf hASCs

4.2.1. Experimentelle Herangehensweise

Für den 1. Teil wurden humane Adipose Derived Stem Cells von verschiedenen Spendern aus der gleichen Region isoliert (n=5 bzw. n=8). Anschließend wurden die Zellen mit den unten beschriebenen Experimenten auf ihre Vitalität, Proliferation, Koloniebildung und Differenzierungskapazität getestet. Alle Versuche wurden in Triplikaten und in Passage 0 der Zellen durchgeführt.

4.2.2. Wachstumskinetik

Die Bestimmung der Zellverdopplungszeit (dt) erfolgte durch die Aussaat von 2000 Zellen (N_0) pro cm^2 in T-25 Flaschen (Thermo Fisher Scientific) in Kulturmedium. Anschließend erfolgte an den Tagen 2, 4 und 7 (N) die standardisierte Zellzahlbestimmung. Dazu wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin (Biochrom) von der Zellkulturflasche gelöst und 2-mal mit 4 ml PBS (Biochrom)

Methoden

abgespült. Die gesamten Flüssigkeiten wurden in einem 15 ml Tube (Corning) gesammelt und für 5 min bei 500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. 10 µl der Zellsuspension wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, in welchem 10 µl des Farbstoffs Trypanblau (Carl Roth) vorgelegt waren. 10 µl der Suspension wurde nach ausreichendem Vortexen auf die Zählkammer (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) pipettiert und in den Automated Cell Counter™ II (Thermo Fisher Scientific) gegeben. Die Verdopplungszeit wurde anhand der nachfolgenden Formel berechnet.

$$dt(d) = \frac{\log 2 \times t(h)}{\log N - \log N_0} : 24$$

4.2.3. Quantifizierung der DNA mittels PicoGreen Assay

Um den DNA-Gehalt und somit indirekt die Proliferation zu bestimmen, wurde ein Pico Green Assay durchgeführt. Dafür wurden für jede Zelllinie 25.000 Zellen / Well in eine 12 Well Platte ausgesät. Nach 1, 7 und 14 Tagen, in denen 2-mal wöchentlich ein Mediumwechsel erfolgte, wurden die Zellen gesammelt. Dafür wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit PBS (Biochrom) gespült und die Flüssigkeiten in einem Tube gesammelt. Anschließend wurden 0,5 ml Trypsin in jedes Well verabreicht und für 5 min bei +37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Wells wurden mehrmals mit einer manuellen 1000 µl Pipette gespült und die Zellsuspension in einem 2 ml Eppendorf Reagenzgefäß gesammelt. Um alle Zellen aus dem Well zu sammeln, wurden 1,5 ml der vorher gesammelten Flüssigkeit aus dem Tube entnommen und das Well nachgespült. Diese Flüssigkeit wurde ebenfalls in das 2 ml Gefäß gegeben. Abschließend wurden die Zellsuspension für 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Bis zur Durchführung des Assays wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

Der im Assay verwendete Farbstoff bindet an die doppelsträngige DNA. Um dies zu ermöglichen, mussten an Tag 1 des Assays, die Zellen zuerst aufgeschlossen werden. Dafür wurden die Proben aufgetaut und 100 µl Proteinase K (Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend mit einer 7 mm Stahlkugel (Qiagen) in den Tissue Lyser für 10 min bei 50 Hz gegeben. Danach wurden weitere 900 µl der Proteinase K Arbeitslösung hinzugegeben und die Proben über Nacht bei +56 °C und 1000 rpm zum weiteren Ausschluss in den Thermomixer gegeben. An Tag 2 des Assays wurde der Aufschluss durch Proteinase K bei -20 °C für 20 min gestoppt und anschließend die Proben für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Danach wurden 75 µl der Probe mit 225 µl TE-Puffer (AppliChem) verdünnt. Zur Messung

Methoden

wurden 100 µl Probenlösung bzw. DNA-Standardlösung und 100 µl des 200-fach verdünnten Quant-IT PicoGreen dsDNA Reagent (Thermo Fisher Scientific) in eine schwarze 96-well Platte (Thermo Fisher Scientific) pipettiert. Nach 5-minütiger lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenz bei einer Extinktion von 504 nm und 550 nm Emission gemessen.

4.2.3.1 DNA-Isolation als Standardkurve

Zur Erstellung einer DNA-Standardkurve für den PicoGreen Assay wurde DNA aus hASCs isoliert. Hierfür wurde das DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen verwendet und die Isolation anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die dafür vorgesehenen Zellen wurden aus der T-75 Flask (Thermo Fisher Scientific) abtrypsiniert, für 5 min bei 600 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS (Biochrom) resuspendiert. Für die Lyse der Zellen wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl Buffer AL hinzugegeben und nach dem Vortexen für 10 min bei +56 °C und 500 rpm im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Zur DNA-Fixierung wurden 200 µl 100% Ethanol hinzugefügt und sofort gevortext, bis eine homogene Lösung entstand. Die Suspension wurde nun auf den Filter in einem DNeasy mini Zentrifugenröhrchen übertragen und bei 8.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Filter wurde in ein neues Sammelröhrchen übertragen, 500 µl Buffer AW1 auf den Filter pipettiert und bei 8.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 500 µl Buffer AW2 und einer Zentrifugation von 3 min bei 14.000 rpm wiederholt. Dabei muss sichergestellt werden, dass der Filter trocken ist und kein Ethanol verblieben ist, da dieses zu einer Interferenz bei dem folgenden Schritt der Eluierung führen könnte. Nun wurde der Filter in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß platziert und 200 µl Buffer AE darauf pipettiert und für 1 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde nun für 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert und die Elution für eine größere Ausbeute erneut auf den Filter gegeben und zentrifugiert. Abschließend wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe des Spektrophotometers (Implen) bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte mit 1 µl Buffer AE. Anschließend wurde in 1 µl der DNA-Suspension die Konzentration der doppelsträngigen DNA gemessen. Eine Ratio von 1,8 für DNA wurde erwartet.

Methoden

4.2.4. Colony Forming Units (CFU) Assay

Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit der hASCs wurden in Triplikaten 250 Zellen je P100 Petrischale ausgesät und in 10 ml Kulturmedium kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte 2-mal wöchentlich für 14 Tage. Die Zellen wurden mit PBS (Biochrom) gewaschen und mit 10 ml Methanol (Carl Roth) für 30 min bei -20 °C fixiert. Nachfolgend wurde der Alkohol durch 10 ml 0,02 % Giemsa Arbeitslösung (Sigma-Aldrich in dH₂O) ersetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit dH₂O gewaschen und die CFU-Effizienz bestimmt. Dafür wurden unter dem Mikroskop alle Kolonien mit >50 Zellen gezählt und in dieser Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl Kolonien}}{\text{Anzahl ausgesäte Zellen}} \times 100 \% = \text{CFU Effizienz in \%}.$$

4.2.5. Multipotenz

Zur Analyse der Differenzierungskapazität wurden je 50.000 hASCs pro Well in eine 6-well Platte (Thermo Fisher Scientific) ausgesät und kultiviert. Pro Zelllinie wurde für jede der 3 Differenzierungen eine eigene Platte gewählt und dort in Triplikaten mit Kontrolle kultiviert. Diese wurden 7 Tage in Kulturmedium kultiviert und anschließend durch Austausch des Kulturmediums in den Induktionsgruppen mit dem jeweiligen Differenzierungsmedium die Differenzierung gestartet. Ein Mediumwechsel aller Medien erfolgte regelmäßig 2-mal pro Woche. Die entsprechende Quantifizierung wurde bei der adipogenen und osteogenen Differenzierung nach 14 Tagen im Induktionsmedium und bei der chondrogenen Differenzierung nach 21 Tagen durchgeführt

4.2.5.1 Adipogene Quantifizierung mit BODIPY

Die Zellen wurden mit 4 %igem Formaldehyd (Microcos) für 30 min bei RT fixiert und anschließend mit PBS (Biochrom) gewaschen. Zur Herstellung der BODIPY 493/503 (Thermo Fisher Scientific) Färbelösung wurde die Stocklösung mit 10 mg/ml BODIPY in absolutem Ethanol (Merck Millipore) im Verhältnis 1:4000 mit PBS (Biochrom) verdünnt. Die Färbelösung wurde für 15 min bei +37 °C im Well inkubiert, sodass der Farbstoff die Lipide der Zellen anfärben konnte. Nun wurde der Zellrasen 3 mal mit PBS (Biochrom) gereinigt und abschließend mit 1 ml PBS (Biochrom) für die Mikroskopie beschichtet.

Methoden

Für die Quantifizierung wurden von jedem Well 4 Bilder bei immer gleichen Einstellungen aufgenommen. Dazu wurde das 5x Objektiv, GFP Fluoreszenzkanal (509 nm), eine Belichtungszeit von 65.000 ms und im Histogramm ein Schwarzwert von 1000 und für Weiß 9000 eingestellt. Die Bilder wurden im „.tif“-Format gespeichert und mit dem Bildverarbeitungsprogramm FIJI Image J, (V.1.52i) ausgewertet. Dafür wurde ein Schwellenwert von min. = 20 und max. = 255 eingestellt und der Bildtyp auf 8 bit gestellt. Die Eigenschaften des Bildes wurden auf Pixel mit der Abmessung von 1.01 für alle Dimensionen eingestellt. Für die Messung wurde das Plugin MeasureStack.ijm verwendet. Die prozentual gefärbte Fläche wurde mit dieser Formel berechnet:

$$\frac{\text{gefärbte Pixel}}{\text{Gesamtpixelzahl}} \times 100 \% = \% \text{ der gefärbten Fläche}$$

4.2.5.2 Chondrogene Quantifizierung mit DMMB-Assay

Die Chondrogenese wurde durch Bestimmung des Glykosaminoglykan(GAG)-Gehalts mittels Dimethylmethylenblau(DMMB)-Assay quantifiziert. Die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin (Biochrom) gelöst und in 1 ml Eppendorf Reaktionsgefäße gesammelt. Diese wurden für 5 min bei 500 g abzentrifugiert und der Überstand mit einer manuellen 1000 µl Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) entfernt. Bis zur Durchführung des Tests wurde das Zellpellet im Eppendorf Reaktionsgefäß bei -20 °C eingefroren. Zuerst wurden die Zellen in einer 125 µg/µl Proteinase K (Sigma-Aldrich) Lösung im Tissue Lyser (Thermo Fisher Scientific) mit einer 7 mm Kugel (Quiagen) für 20 min bei 50 Hz homogenisiert und anschließend über Nacht bei +56 °C im Thermomixer verdaut. Zum Stoppen des Enzyms wurden die Proben 20 min bei -20 °C gestellt und anschließend für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. In einem Eppendorf Reaktionsgefäß wurden 500 µl der DMMB-Lösung (siehe Tabelle 4) vorgelegt und 50 µl der Probe hinzugegeben. Die Proben wurden für 30 min bei 600 rpm auf den Schüttler gestellt und danach für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, um die entstandenen DMMB-GAG-Komplexe von der Flüssigkeit zu trennen. Der Überstand wurde mit einer 1000 µl Eppendorf Pipette verworfen und die Komplexe wurden mit 500 µl Dekomplexationslösung (siehe Tabelle 4) gelöst. Zum vollständigen Dekomplexieren wurden die Proben für 3 min bei 1400 rpm auf den Schüttler gegeben. Ebenso wurde mit einer selbst hergestellten Chondroitin Sulfat (Carl Roth) Standardkurve verfahren. Abschließend wurden 150 µl der Proben in Duplikaten auf eine durchsichtige 96-Well Platte (Thermo Fisher Scientific) gegeben. Diese

Methoden

wurden im Plattenreader (Tecan) bei 656 nm gemessen und die Menge der GAGs anhand der Konzentrationsreihe berechnet.

DMMB-Lösung		Dekomplexationslösung	
1,9-DIMETHYL-METHYLENE BLUE	4 mg	Natrium acetat	450 ml
Ethanol	12,5 ml	99% Propanol	50ml
10% Propanol	50 ml	Guanidin hydrochlorid	191,0g
Guanidin hydrochlorid	4.7765 g	Einstellen des pH auf 6.8 mit 0.5 M Ameisensäure	
Natrium Acetat	0,5 g		
Ameisensäure	0,5 ml		

Tabelle 4: Zusammensetzung der Reagenzlösungen für den DMMB-Assay

4.2.5.3 Osteogene Quantifizierung mit Alizarin Red

Zur Quantifizierung der osteogenen Differenzierung wurde eine Färbung mit Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) gewählt. Diese färbt Calcium rot an. Die Zellen wurden wie in 4.2.5.1. mit Formaldehyd 4% (Microcos) fixiert und mit dH₂O gespült. 2 g Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) wurde in 100 ml dH₂O gelöst und mit 10 % Essigsäure (Carl Roth in dH₂O) ein pH von 4,1-4,3 eingestellt. Zur Vermeidung von Farbklumpen wurde die Lösung durch einen Papierfilter (VWR) filtriert, bevor sie auf den Zellrasen gegeben wurde. Nach 1,5 h Färbezeit wurde die Farblösung entfernt und der Zellrasen erneut mit dH₂O gereinigt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des Farbstoffs mittels Plattenreader. Dafür wurde eine Lyse der Zellen mit 1 ml Lysepuffer für 15 min bei 270 rpm auf einem Schüttler (IKA-Werke) durchgeführt. Der Lysepuffer bestand aus 70 % dH₂O, 20 % Methanol (Carl Roth) und 10 % Essigsäure (Carl Roth in dH₂O). Anschließend wurden 100 µl jeder Probe mit einer manuellen Pipette in eine durchsichtige 96-Well Platte überführt und bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm im Plattenreader gemessen.

4.3. Teil 2: Vergleich von kommerziellen und eigenproduzierten PCL-Scaffolds

4.3.1. Experimentelle Herangehensweise

Im 2. Teil der Arbeit wurde die Bioaktivierbarkeit von eigenproduzierten(EP)-PCL Scaffolds und kommerziellen(KMZ)-PCL Scaffolds untersucht. Dafür wurden hASCs isoliert und auf die Scaffolds ausgesät. Anschließend wurden sowohl Färbungen zur Beurteilung der Vitalität und Verteilung als auch biochemische Assays zur Untersuchung der Proliferation und chondrogenen Differenzierung durchgeführt.

4.3.2. Herstellung der Scaffolds

Die kommerziellen PCL-Gerüste wurden von der Bellaseno GmbH (Leipzig, Deutschland) erworben und dort einer Plasmabehandlung unterzogen. Diese hatten eine zylindrische Form mit einer Höhe von 1 mm und einem Durchmesser von 5 mm. Die Poren hatten eine quadratische Form mit einer Größe von 300 µm.

Die aus der Eigenproduktion stammenden PCL Gerüste wurden im Ultimaker 2+ (Ultimaker) 3D Drucker im eigenen Labor hergestellt. Diese hatten ebenfalls eine zylindrische Form mit einem Durchmesser von 5 mm und Höhe von 1 mm. Die EP-Scaffolds wurden mit Natriumhydroxid (Merck Millipore) behandelt, um die Hydrophilie zu erhöhen. Dafür wurden diese in 70 % Ethanol (Carl Roth) für 30 min inkubiert. Nun wurden die EP-Scaffolds in eine 24-Well Platte übertragen und in jedes Well 1 ml 5 M Natriumhydroxid (Merck Millipore) pipettiert. Diese wurde auf dem Linearshaker in den Brutschrank gestellt, um sie für 5 h bei +37 °C zu inkubieren. Abschließend wurden die Scaffolds in ein neues Well übertragen und 5-mal mit PBS (Biochrom) gewaschen.

4.3.3. Sterilisation und Seeding der Scaffolds

Bevor die PCL-Gerüste mit Zellen besiedelt werden konnten, mussten alle Scaffolds sterilisiert werden. Dafür wurden diese in eine 48-Well Platte (Thermo Fisher Scientific) platziert und 200 µl 70 % Ethanol, welcher aus 7 ml absolutem Ethanol (Merck Millipore) und 3 ml DEPC-behandeltem Wasser (Carl Roth) unter sterilen Bedingungen hergestellt wurde, in jedes Well mit dem Stepper (Eppendorf) hinzugefügt. Diese Platte wurde mit offenem Deckel unter die sterile Zellkulturbank platziert und für 3 h getrocknet. Dabei wurde für 1 h das UV-Licht

Methoden

angeschaltet. Nach diesen 3 h wurde der Deckel der Platte aufgesetzt und die Platte auf den Deckel gestellt, damit diese nun von der anderen Seite mit UV-Licht 1 h bestrahlt werden konnten. Die Sterilisierten Scaffolds wurden nun auf eine 24-Well Platte mit einer sterilen Pinzette (Lohmann & Rauscher) übertragen. Die abtrypsinisierten Zellen wurden, wie in 4.1.2 beschrieben, gezählt und eine Konzentration von 1×10^7 hASCs/ml im Kulturmedium hergestellt. Nun wurde mit einer manuellen 100 μ l Pipette (Eppendorf) ein 25 μ l Tropfen, ohne berühren des Gerüsts, auf das Scaffold gegeben. Die Zellkulturplatte wurde vorsichtig zur Adhäsion der hASCs, für 4 h in den Brutschrank mit +37 °C und 5 % CO₂ gestellt. Abschließend wurden 2 ml Kulturmedium mit einer 5 ml serologischen Pipette vorsichtig über die Wellwand in jede Vertiefung pipettiert.

4.3.4. Auflichtmikroskopie

Um die Struktur der Scaffolds besser darstellen zu können wurde das Durchlichtmikroskop (Zeiss) zu einem Auflichtmikroskop umfunktioniert. Dafür wurde das Scaffold auf einen Objektträger gelegt, mit einer externen Lichtquelle mit einem Einfallswinkel von 45° bestrahlt und die Bilder bei einer 5-fachen Vergrößerung mit der Mikroskopkamera aufgenommen.

4.3.5. Zytotoxizitätsassay

Um zu untersuchen, ob die PCL-Scaffolds einen zytotoxischen Effekt auf die hASCs haben wurden 20.000 hASCs pro Well in zwei 12-Well Platten ausgesät. In einer weiteren Platten wurden je 3 kommerzielle als auch eigenproduzierte PCL-Scaffolds in 1 ml Kulturmedium platziert. Außerdem wurde eine Konzentrationsreihe von Kulturmedium mit 10 %, 5 %, 0 % DMSO (Sigma-Aldrich) in Kulturmedium erstellt und ebenfalls je 1 ml in Triplikaten in eine weitere 12-Wellplatte pipettiert. Diese Zytotoxmedien wurden für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde von den hASCs das Medium entfernt und die verschiedenen Zytotoxmedien zu den Zellen pipettiert. Die hASCs wurden nun für 24 h im Brutschrank bei +37 °C und 5 % CO₂ mit den verschiedenen Medien inkubiert. Abschließend wurde zur Ermittlung der Vitalität der Zellen ein Resazurin basierter Assay mittels AlamarBlue Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt, welcher die metabolische Aktivität der Zellen widerspiegelt. Somit wurde indirekt ein zytotoxischer Effekt auf die Zellen untersucht. Die jeweiligen Zytotoxmedien wurden durch 1 ml AlamarBlue Arbeitslösung bestehend aus 10 % AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific) in 90 % DMEM ohne Phenolrot

Methoden

(Thermo Fisher Scientific) ersetzt und für 3 h bei +37 °C und 5 % CO₂ lichtgeschützt im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden 100 µl pro Well entnommen und auf eine schwarze 96-Well Platte (Thermo Fisher Scientific) gegeben. Abschließend wurde die Fluoreszenz im Plattenreader (Tecan) bei 590 nm Emission und 560 nm Extinktion gemessen.

4.3.6. Vitalität und Seedingeffizienz

Zur Eruiierung der Vitalität und der Seedingeffizienz wurde eine Lebend/Totfärbung an Tag 1 und Tag 7 nach der Aussaat durchgeführt. Dafür wurden beide Scaffoldvarianten zuerst mit PBS (Biochrom) gewaschen und für 5 min auf eine 24-Well-Platte (Thermo Fisher Scientific) mit 1 ml 8 µg/ml Fluoresceindiacetat (FDA, Sigma Aldrich) Lebendfärbung gegeben. Danach wurden diese mit einer Pinzette in ein neues Well übertragen und dort für 5 sek. mit 1 ml 20 µg/ml Propidiumiodidlösung (PI, Sigma Aldrich) angefärbt, um die toten Zellen darzustellen. Beide Färbelösungen wurden in serumfreien DMEM ohne Phenolrot (Thermo Fisher Scientific) hergestellt. Abschließend wurden die Scaffolds mit PBS (Biochrom) gespült, um Farbreste zu entfernen. Die Proben wurden in ein neues Well übertragen und mit 1 ml PBS (Biochrom) beschichtet, um digitale Z-Stapel-Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) anzufertigen. Diese wurden mit einem Bildverarbeitungsprogramm (FIHI Image J) zu einem 3D-Bild rekonstruiert.

4.3.7. Biochemische Assays

Für die biochemischen Assays wurden die hASCs auf beiden Scaffoldvarianten für 7 Tage im Kulturmedium inkubiert. Dabei wurde das Medium 2-mal getauscht. Anschließend wurden die Scaffolds mit einer sterilen Pinzette (Lohmann & Rauscher) in ein neues Well übertragen. Dort wurde in der Induktionsgruppe chondrogenes Differenzierungsmedium (Miltenyi Biotec) vorgelegt und in der Kontrollgruppe Kulturmedium. Diese wurden nun 21 Tage inkubiert und das Medium regelmäßig alle 3-4 Tage gewechselt. Anschließend wurde zur Quantifizierung der Proliferation die DNA-Menge mit einem PicoGreen Assay wie in 4.2.3 durchgeführt. Zur Eruiierung der chondrogenen Differenzierung wurde ein DMMB-Assay, wie in 4.2.5.2 beschrieben, verwendet.

4.4. Teil 3: Untersuchung verschiedener PCL-Scaffold Konfigurationen

4.4.1. Experimentelle Herangehensweise

In Teil 3 dieser Arbeit wurden verschiedene Konfigurationen der kommerziell erworbenen Poly- ϵ -Caprolacton Scaffolds mit hASCs besiedelt und die Seedingeffizienz und die Proliferation der Zellen untersucht.

4.4.2. Scaffold-Konfigurationen

Die Scaffolds wurden kommerziell bei Bellaseno (Leipzig) erworben. Diese hatten eine zylindrische Form mit 1 mm Höhe und einem Durchmesser von 5 mm. Die Filamentdicke betrug bei allen Konfigurationen 150 μm . Die Poren hatten 3 verschiedene Formen: viereckig (SQR), dreieckig (TRI) und sternförmig (STR). Jede Porenform gab es mit 300 μm , 350 μm und 400 μm Durchmesser. Diese sind in Abbildung 4.2 in Auflichtmikroskopiebildern, welche wie in 4.3.4 beschrieben angefertigt wurden, dargestellt.

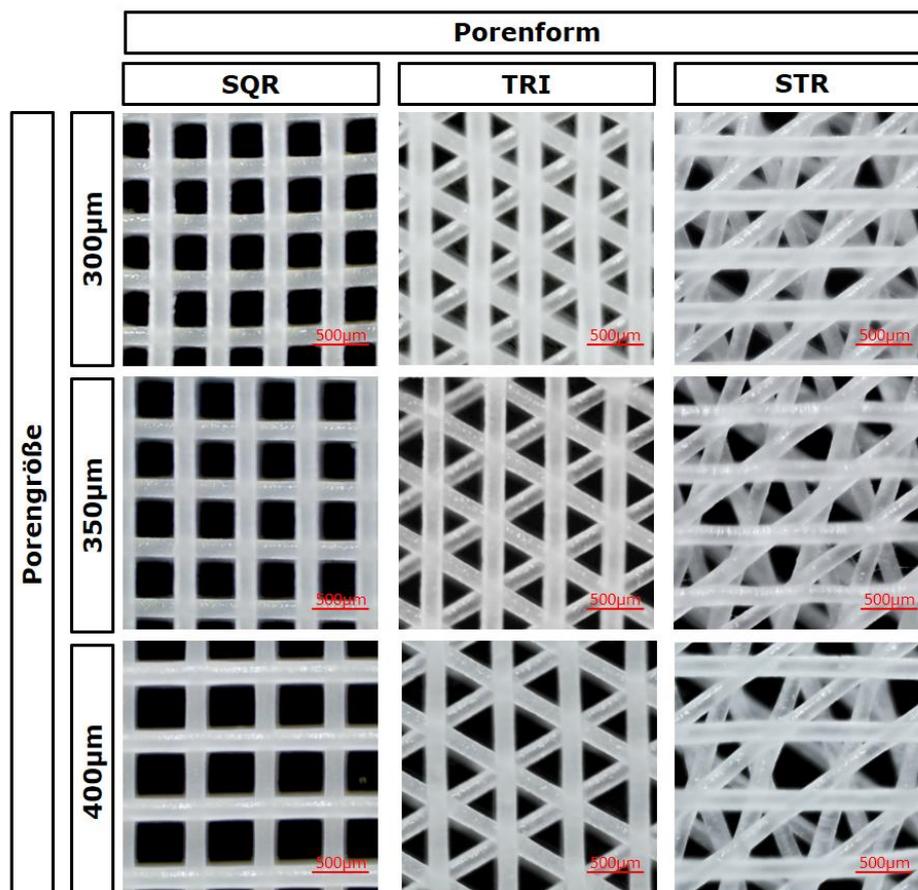


Abbildung 4.2: Visualisierung der Scaffold-Architektur in der Auflichtmikroskopie: Dargestellt sind die neun verschiedenen Scaffoldkonfigurationen. Deutlich wird die unterschiedliche Geometrie und Größe der Poren und der akkurate 3D-Druck.

Methoden

4.4.3. Seedingeffizienz und Proliferation

Die Scaffolds wurden, wie in 4.3.3 beschrieben, mit 250.000 Zellen pro Scaffold in einer 24-Well Kulturplatte (Thermo Fisher Scientific) besiedelt. Nach einem Tag Kultivierung wurden die zellbeladenen PCL-Gerüste mit einer sterilen Pinzette (Lohmann & Rauscher) in ein neues Well übertragen. Anschließend wurde ein AlamarBlue von dem Seedingwell und dem Scaffold durchgeführt. Zu jedem Well wurde 1 ml AlamarBlue-Farblösung hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit von 2 h im Plattenreader (Tecan) gemessen. Dieses Assay wurde nach 3 und 7 Tagen Kultivierungsdauer wiederholt.

Zur genaueren Bestimmung der Zellzahl auf den Scaffolds wurde eine Konzentrationsreihe mit 15.625, 31.250, 62.500, 125.000, 250.000 und 500.000 Zellen pro Well erstellt und nach 4 h Adhäsion der AlamarBlue, wie oben beschreiben, durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

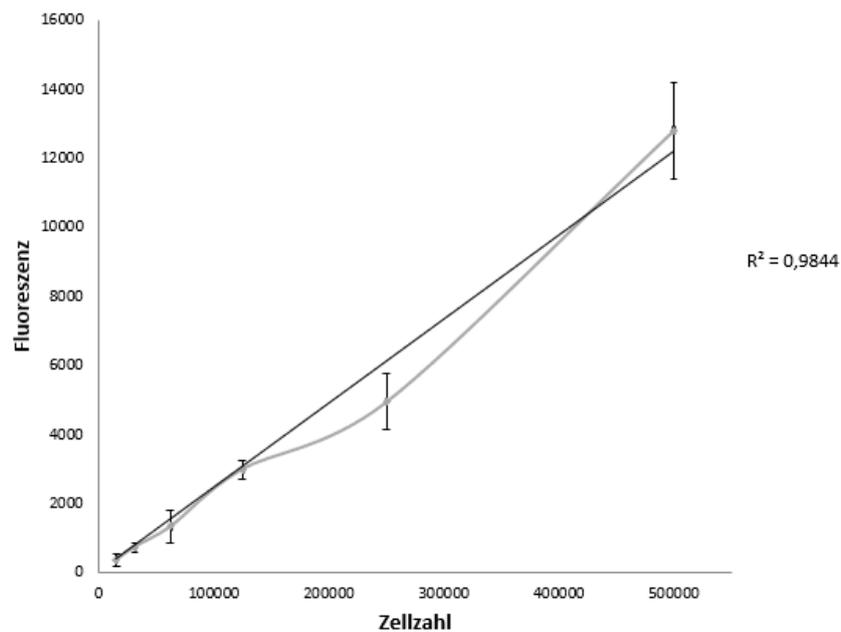


Abbildung 4.3: Konzentrationskurve für die Zellzahlbestimmung mittels AlamarBlue

4.5. Teil 4: Herstellung und Untersuchung der Bioaktivität von chondrogen bzw. osteogen aktivierten kommerziellen PCL Scaffolds

4.5.1. Experimentelle Herangehensweise

Im letzten Abschnitt der Arbeit ging es darum, eine knorpelartige bzw. knöcherne dezellularisierte Extrazellulärmatrix durch hASCs auf 3D-gedruckten PCL Gerüsten herzustellen und deren Einfluss auf hASCs zu untersuchen. Der Versuchsaufbau wurde zum besseren Verständnis in Abbildung 4.4 skizziert. In Part A wurde aktiviertes PCL hergestellt, indem hASCs auf den Scaffold ausgesät und sowohl in osteogene und chondrogene Richtung differenziert wurden. Nach anschließender Dezellularisation entstanden die aktivierten osteogenen/chondrogenen PCL Scaffolds (ao/acPCL). Histologische und biochemische Tests wurden durchgeführt, um die Auswirkungen der Dezellularisation auf die von den Zellen synthetisierte ECM zu messen. In Part B wurden die ao/acPCL-Scaffolds erneut mit hASCs besiedelt und im Kulturmedium bzw. Differenzierungsmedium kultiviert. Die Auswirkung der aktivierten PCL-Scaffolds auf hASCs wurde in-vitro durch Histologie, biochemische Assays und Genexpressionsanalyse analysiert und mit unmodifizierten PCL Scaffolds (uPCL) verglichen.

Methoden

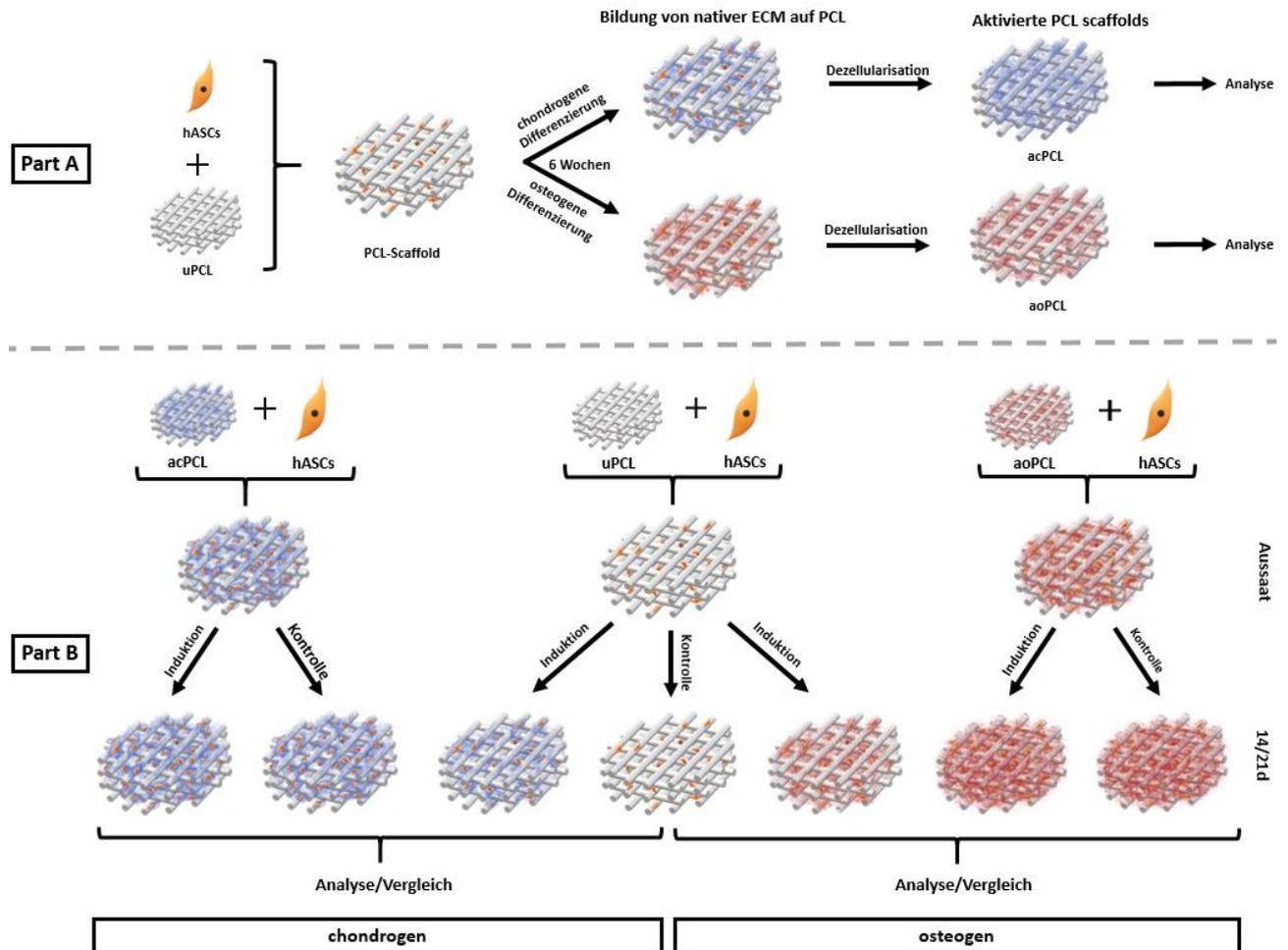


Abbildung 4.4: schematischer Versuchsaufbau: Part A Herstellung von chondrogen bzw. osteogen aktivierten PCL Scaffolds. Part B Untersuchung der Bioaktivierbarkeit der aktivierten PCL Scaffolds in-vitro (modifiziert aus [134])

4.5.2. Aussaat und Produktion von ECM auf PCL

Die kommerziell erworbenen PCL Scaffolds (300 µm Pore und viereckige Porenform) wurden wie in 4.3.3 beschrieben sterilisiert und besiedelt. Auf das Scaffold wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen / Scaffold in einem 25 µl Kulturmedium-Tropfen ausgesät. Nach 4-stündiger Adhäsion bei +37 °C und 5 % CO₂ wurden in das Well vorsichtig 2 ml Kulturmedium hinzu pipettiert. Die Zellen wurden für 7 Tage kultiviert. Dabei wurde das Medium einmal gewechselt. Anschließend wurden die Scaffolds mit einer Pinzette in ein neues Well übertragen, in der Induktionsgruppe chondrogenes bzw. osteogenes Differenzierungsmedium mit 1 % P/S und 1 % Amphotericin B und in der Kontrollgruppe Kulturmedium hinzugefügt. Nach 7 Tagen Kultivierung und Proliferation wurden die Gerüste in eine neue Vertiefung transferiert, um nicht-adhäsive Zellen zu entfernen. Die hASCs wurden für 6 Wochen kultiviert und das Medium 2-3-mal wöchentlich gewechselt.

4.5.3. Dezellularisation

Im nächsten Schritt wurden die Scaffolds dezellularisiert. Hierfür wurde eine Kombination von chemischer und enzymatischer Lyse verwendet [135]. Bei diesem Verfahren wurden 2 % Natriumdesoxycholat (Sigma-Aldrich) in dH₂O zum Auflösen der Zellmembran verwendet. Dafür wurden die Scaffolds in eine 24 Well Platte (Thermo Fisher Scientific) gegeben, 500 µl Natriumdesoxycholat (Sigma-Aldrich) hinzugefügt und für 1 h bei RT und 100 rpm auf den Schüttler gegeben. Anschließend wurden die Scaffolds in ein neues Well übertragen und nach dem Waschen mit PBS (Biochrom) enzymatisch verdaut. Hierfür wurde eine 160 U/ml Deoxyribonuclease I (DNase, Sigma-Aldrich)-Lösung in 0,9 % NaCl (Fresenius Kabi) erstellt und für 2h bei +37 °C darin inkubiert. Die Scaffolds wurden dann erneut mit PBS (Biochrom) gewaschen. Um die Dezellularisation effektiver zu machen, wurden sowohl die chemische als auch die enzymatische Lyse wiederholt. Abschließend wurden die Gerüste erneut in Natriumdesoxycholat (Sigma-Aldrich) für 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert, um die DNase zu stoppen. Zum Verhindern einer toxischen Wirkung des Gerüsts auf die hASCs bei erneuter Besiedlung, wurden diese 3-mal mit PBS gewaschen. Bis zur weiteren Analyse wurden die aktivierten PCL-Scaffolds in PBS (Biochrom) mit 1 % P/S (Biochrom) und 1 % Amphotericin B (Biochrom) bei +4 °C gelagert.

4.5.4. Rezellularisation

In Part B wurden die 3 verschiedenen Arten von Scaffolds, acPCL, aoPCL und uPCL miteinander verglichen. Die Gerüste wurden wieder mit hASCs besiedelt, wie zuvor unter 4.5.2. beschrieben. 3 Tage nach der Aussaat wurden die Scaffolds in ein neues Well übertragen und die Induktionsgruppe in chondrogenem bzw. osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert, während die Kontrollgruppe in Standardkulturmedium mit dreimaligem Mediumwechsel pro Woche für 14 bzw. 21 Tage kultiviert wurde.

4.5.5. Adhäsion und Vitalität

Zur Veranschaulichung der Verteilung und der Vitalität der Zellen auf den aktivierten bzw. unmodifizierten PCL Scaffolds wurde eine Lebend-Tot-Fluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Scaffolds an Tag 3 nach der Rezellularisierung zunächst mit PBS (Biochrom) gewaschen. Die Scaffolds wurden wie in 4.3.6. beschrieben, gefärbt und digitale Bilder mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) angefertigt.

4.5.6. Histologie

Eine Histologie der Scaffolds wurde vor und nach der Dezellularisierung durchgeführt, um die extrazelluläre Matrix und die Kerne darzustellen. Dafür wurden die Scaffolds direkt in 4 % Formaldehyd (Microcos) fixiert, automatisch entwässert (Excelsior AS, Thermo Fisher Scientific) und in Paraffinblöcke (EC 350-1, Histo Serve) eingebettet. Mit einem Mikrotom HM 340E (Thermo Fisher Scientific) wurden die Konstrukte in 5 µm dicke Serienschnitte horizontal geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte automatisiert im Tissue-Tek Prisma entparaffiniert.

Die Färbung für die chondrogene extrazelluläre Matrix erfolgte für 1 h unter Verwendung des GAG anfärbenden Alcian Blaus (Carl-Roth). Nach ausgiebigem Spülen mit dH₂O wurden die Schnitte mit Kernechtrot (Sigma-Aldrich) für 4 h gegengefärbt und mit Roti®Mount Aqua (Carl Roth) gedeckelt.

Um die Osteogenese sichtbar zu machen, wurden die Schnitte über Nacht in Alizarinrot S (Sigma-Aldrich) gefärbt. Danach wurden die Proben mit dH₂O gewaschen und die Kerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Thermo Fisher Scientific) durch 10-minütiges Inkubieren sichtbar gemacht. Abschließend wurden die Schnitte mit Roti®Mount FluorCare (Carl Roth) gedeckelt.

4.5.7. Probenvorbereitung und Biochemische Analyse

Zur Probenvorbereitung wurden alle Gerüste in 2 ml Safe-Lock-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Deutschland) mit 300 µl PBS (Biochrom) überführt. Die 3D-Konstrukte wurden mit Hilfe eines Tissue Lysers (Thermo Fisher Scientific) für 20 min bei 50 Hz mit einer 7 mm-Edelstahlkugel (Qiagen) homogenisiert. Die Probe wurde dann 30 Sekunden lang bei 1000 U/min zentrifugiert und 200 µl des Überstandes wurden zur weiteren Verwendung bei -20 °C aliquotiert. Die restlichen 100 µl wurden mit 500 µl 125 µg/ml Proteinase K (Sigma-Aldrich) über Nacht bei +56 °C für die DNA- und Glykosaminoglykan-Assays verdaut. Die enzymatische Aktivität wurde durch Abkühlen der Proben bei - 20 °C für 20 min gestoppt.

Bei allen Assays wurde der Background der entsprechenden Scaffoldvariante abgezogen. Somit wurden bei der uPCL Gruppe unmodifizierte Scaffolds ohne Zellen und bei der ac/aoPCL Gruppe die dezellularisierten Scaffolds verwendet.

Methoden

4.5.7.1 DNA-Gehalt mittels PicoGreen

Ein PicoGreen-Assay wurde verwendet, um den Gehalt an doppelsträngiger DNA zu messen und so Rückschlüsse auf die Zellzahl und Proliferation zu ziehen. Dieser wurde wie in 4.2.3. beschrieben durchgeführt.

4.5.7.2 DMMB Assay

Der Dimethylmethylenblau (DMMB)-Test wurde entsprechend, wie zuvor in 4.2.5.2 beschrieben, zur Quantifizierung von Glykosaminoglykanen (GAGs) in den Proben angewandt.

4.5.7.3 Hydroxyproline Assay

Der neu produzierte Gesamtgehalt an Hydroxyprolin und damit an Kollagen wurde mit einem kolorimetrischen Hydroxyprolin-Bestimmungskit (Sigma-Aldrich) quantifiziert. Dazu wurden 100 µl des Probenüberstandes mit 100 µl 25 %iger Salzsäure (Carl Roth) für 24 h bei +99 °C im Thermomixer (Eppendorf) hydrolysiert. Zum Stoppen der HCL wurden 4 mg Aktivkohle (Sigma-Aldrich) zu jeder Probe gegeben und für 3 min bei 10.000 g abzentrifugiert. 50 µl der Proben wurden in Triplikaten in eine transparente 96-Well Platte (Thermo Fisher Scientific) pipettiert. Diese wurde für 2 h bei +60 °C im Wärmeschrank getrocknet. Der Assay wurde weiter nach Herstelleranweisungen durchgeführt. Dabei wurden 100 µl Solution 1 zu jeder Probe hinzugefügt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Solution 2 hinzugegeben und für 90 min bei +60 °C mit geschlossenem Deckel im Ofen inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen und die Proben wurden gegen Hydroxyprolin-Standards extrapoliert.

4.5.7.4 Kalzium Assay

Der kalorimetrische QuantiChrom™ Kalzium-Assay-Kit (Bioassay Systems) wurde zur Quantifizierung der Kalziummenge verwendet. Dazu wurde Kalzium mit 0,5 N Salzsäure (Carl Roth) bei +4 °C für 24 h extrahiert und dann für 1 min bei 13.500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Assay gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt, indem 5 µl jeder Probe in Triplikaten in eine transparente 96-Well Platte (Thermo Fisher Scientific) pipettiert wurde und in 200 µl des Arbeitsreagenz (100 µl Reagent A + 100 µl Reagent B) für 3 min inkubiert wurde. Abschließend wurde die Absorption bei $\lambda=612$ nm gemessen. Der

Methoden

Gesamtkalziumgehalt wurde anhand einer Standardkurve, wie in den Herstelleranweisungen beschrieben, berechnet.

4.5.8. Genexpressionsanalyse

4.5.8.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Für die Isolierung der RNA wurden die Scaffolds nach 14 Tagen Kultivierung in 100 µl RNAlater (Qiagen) in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß bei -80 °C eingefroren. Zur eigentlichen RNA-Extraktion wurde das innuPREP RNA mini Kit 2.0 (Analytik Jena) verwendet. Die Durchführung wurde gemäß des Herstellerprotokolls „1: RNA Extraktion für Gewebeproben“ durchgeführt. Zuerst wurden die Proben kurz bei +37 °C aufgetaut und 450 µl RL hinzugefügt. Mit Hilfe einer 7 mm Stahlkugel (Qiagen) bei 15 Hz für 30 sec im Tissue Lyser (Thermo Fisher Scientific) homogenisiert. Nach der Homogenisierung wurden die Proben für 3 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand auf einen Filter D in einem Zentrifugenröhrchen übertragen. Dieses wurde anschließend für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat und 1 Volumen 70 % Ethanol (Merck Millipore) wurden auf den Filter R in einem neuen Röhrchen übertragen und für 2 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Der Filter wurde in ein neues Gefäß übertragen, 500 µl Wasch-Lösung HS darauf gegeben und für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 700 µl Wasch-Lösung LS wiederholt und anschließend erneut für 2 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Der Filter enthielt nun die extrahierte RNA und wurde in ein 1,5 ml LoBind Eppendorf Gefäß übertragen, um dort die RNA zu sammeln. Dazu wurden 2-mal 50 µl RNase freies DEPC-behandeltes Wasser (Carl Roth) auf den Filter gegeben und nach 1-minütigem inkubieren bei RT für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert.

Abschließend wurde die Konzentration der gewonnenen RNA im Spektrophotometer (Implen) gemessen. Dabei wurde DEPC-Wasser als Blank verwendet und ein Lidfaktor von 10 eingestellt. Die Ziel Ratio für RNA war 2,0.

4.5.8.2 Reverse Transkription

Da in der RT-PCR nur DNA verwendet werden kann, muss die RNA zuerst durch die reverse Transkriptase (RT) in einen komplementären DNA-Strang umgeschrieben werden. Zur c-DNA Synthese wurde das Transcriptor First Strand cDNA Synthesiskit (Roche) verwendet und anhand der Herstellerinstruktionen durchgeführt. Dafür wurden zu 10 µl der isolierten RNA,

Methoden

1 µl Oligo(dT)- Primer und 2 µl Random-Primer hinzugefügt. Dieser MasterMix1 wurde anschließend zur Denaturierung für 10 min bei +65 °C in den Thermocycler (Biometra) gegeben und danach sofort auf Eis gelegt. Nun wurde der MaserMix 2 pipettiert, bestehend aus 4 µl Puffer, 0,5 µl RNase Inhibitor, 2 µl Desoxynukleotid Mix und 0,5 µl Reverse Transkriptase. Das Reaktionsgemisch wurde ohne Vortexen in den Thermocycler (Biometra) gestellt und das c-DNA-Synthese Programm gestartet, welches mit 10 min bei +25 °C beginnt. Anschließend wurden die Proben für 60 min auf +50 °C erwärmt und für 5 min auf +85 °C erhitzt. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und bei -20 °C gelagert.

4.5.8.3 Real Time PCR

Zum Nachweis der Transkription eines Gens wurde die Real-Time(RT)-Polymerase Kettenreaktion(PCR) durchgeführt. Dafür wurde das InnuMIX DS Green Standard Kit von Analytik Jena verwendet. Dies beinhaltet einen fluoreszierenden Farbstoff, der speziell nur doppelsträngige DNA anfärbt. Für die Durchführung musste zuerst der Reagenzmix, bestehend aus 10 µl InnuMIX DS green, 1 µl Vorwärts Primer, 1 µl Rückwärts Primer, 3 µl DEPC behandeltes Wasser (Carl Roth) und 5 µl der C-DNA Probe, pipettiert werden. Alle für dieses Experiment verwendeten Primer wurden in Tabelle 5 aufgelistet und mit Sigma-Aldrichs OligoArchitect™ Primer-Software entworfen. Der Reagenzmix wurde auf eine PCR Platte (VWR) pipettiert und die PCR im Real-Time-Thermocycler (Analytik Jena) gestartet. Zuerst erfolgte die Denaturierung bei +95 °C für 2 min, gefolgt von der Amplifikation in 50 Zyklen bei +95 °C für 30 s, +60 °C für 1 min, +68 °C für 30 s. Während der RT-PCR wurde kontinuierlich die Fluoreszenz des grünen Farbstoffs detektiert und sobald es zu einer signifikanten Zunahme der Fluoreszenz gegenüber dem Hintergrundrauschen kam, wurde der Schwellenwertzyklus bzw. Ct-Wert bestimmt. Die relative Genexpression eines jeden Gens und Probe wurde auf den entsprechenden Housekeeping Index, bestehend aus dem Durchschnitt von GAPDH und HRPT1, normalisiert. Die weitere Auswertung erfolgte mittels ΔCt -Methode [136]. Das Transkript-Niveau wurde als $w=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ berechnet, wobei $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Induktion} - \Delta\text{Kontrolle}$ berechnet wurde.

Methoden

Gen	Name	Sequenz	
ACAN	aggrecan core protein	Left	5-cctccccttcacgtgtaaaa-3
		Right	5-gctccgcttctgtagtctgc-3
SOX9	transcription factor SOX-9	Left	5-gtaccgcacttgacacaac-3
		Right	5-tctcgctctcgttcagaagtc-3
COL1A1	collagen type I alpha 1 chain	Left	5-gggattccctggacctaag-3
		Right	5-ggaacacctcgctctcca-3
COL2A1	collagen type II alpha 1 chain	Left	5-gtgaacctggtgtctctggtc-3
		Right	5-tttccaggtttccagcttc-3
Col10a1	collagen type X alpha 1 chain	Left	5-caccttctgcactgctcatc-3
		Right	5-ggcagcatattctcagatgga-3
ITGA11	integrin subunit alpha 11	Left	5-ctttctctgcacgtggt-3
		Right	5-gtccattccagtcataggc-3
COL9A1	collagen type IX alpha 1 chain	Left	5-gagcttgccgtgtaggac-3
		Right	5-aaagccaattgtcctctgg-3
ALPL	alkaline phosphatase	Left	5-cctgccttactaactccttagtgc-3
		Right	5-cgttggtgtgagcttctga-3
SPP1	Osteopontin secreted phosphoprotein 1	Left	5-gaggccttggtgtcagc-3
		Right	5-caattctcaggtagtgagtttcc-3
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Left	5-gactaacctcgcgctctg-3
		Right	5-gccaatacgaccaaatcag-3
HPRT1	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1	Left	5-tgaccttgattattttgcatacc-3
		Right	5-cgagcaagacgttcagctcct-3

Tabelle 5: Primer Sequenzen

4.6. Statistische Analyse

Alle Daten der Kontroll- und Experimentalgruppen wurden mit dem ungepaarten t-Test in Excel (Microsoft Office 2016, USA) bzw. der zweiseitigen univariaten ANOVA in SPSS-Software (IBM SPSS Statistics 25, USA) analysiert, wobei die statistische Differenz auf $p < 0,05$ gesetzt wurde. Die Grafiken wurden in PowerPoint 2019 (Microsoft 365 Enterprise, Redmond USA) erstellt und die Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler (SE) angegeben. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1. Teil 1: Einfluss der Gewebegewinnung auf hASCs

5.1.1. Vergleich der Stammzellen von Gewebestück mit Liposuktion

Im 1. Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die hASCs von einem Gewebestück sich von denen, welche durch das BodyJet®-Verfahren gewonnen wurden, unterscheiden. Dafür wurden verschiedene Assays zur Bestimmung der Proliferation, der Fähigkeit Kolonien zu bilden und der Multipotenz durchgeführt. In der Wachstumskinetik waren die Verdopplungszeiten der Zellen aus den beiden Gruppen nahezu identisch. Dennoch präsentierte sich im PicoGreen Assay an Tag 7 und 14 eine tendenziell größere Menge an ds-DNA in der hASC-Gruppe, welche aus dem Gewebestück gewonnen wurde. Dies deutet auf eine höhere Zellzahl hin. Es wurde bei den Gewebestück-Stammzellen eine signifikant höhere Fähigkeit zur Bildung von Kolonien im CFU-Assay beobachtet. In allen drei Differenzierungen war kein signifikanter Unterschied der Multipotenz nachweisbar. Zur Ermittlung der Adipogenese wurde eine Bodipy-Färbung an Tag 14 durchgeführt. Die Quantifizierung der Osteogenese erfolgte mittels Alizarin Red Assay nach 14 Tagen Induktion. Sowohl in der adipogenen als auch osteogenen Differenzierung zeigte sich tendenziell in der BodyJet®-Gruppe eine höhere Produktion von gewebespezifischer ECM. In der chondrogenen Differenzierung wurde in der Gewebestückgruppe insignifikant mehr Glykosaminoglykane im DMMB-Assay an Tag 21 nachgewiesen.

Ergebnisse

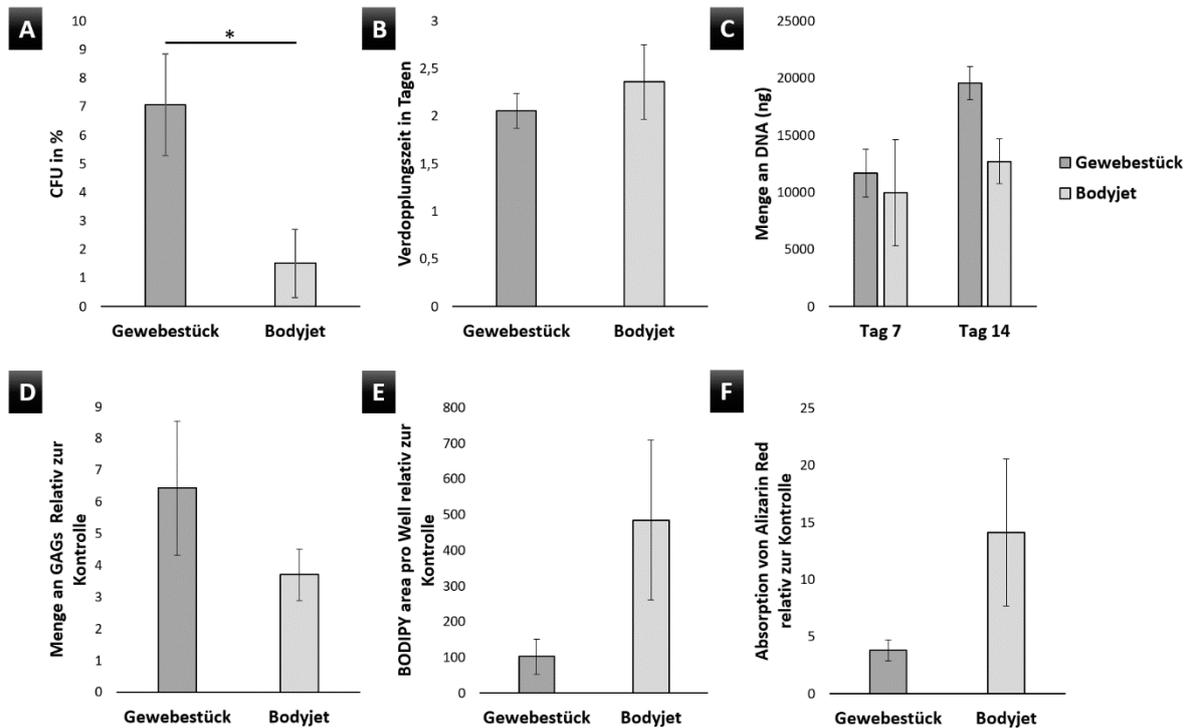


Abbildung 5.1: Vergleich der Eigenschaften der hASCs aus Gewebestück und BodyJet® in der Koloniebildung (A) und Proliferation (B,C). Die untere Reihe zeigt nach 21 Tagen die chondrogene (D) und nach 14 Tagen die adipogene (E) und osteogene (F). Die Daten sind als Mittelwert dargestellt, die Fehlerbalken stehen für den SE, n=8, * = p<0,05.

5.1.2. Vergleich der Stammzellen von superfiziellem und tiefem Fettgewebe

Im Vergleich von hASCs aus superfiziellem und tiefem Fettgewebe konnte sowohl in den Proliferativen- als auch in den Differenzierungsassays kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Die Zellen haben in beiden Gruppen eine ähnliche Verdopplungszeit. Dies konnte durch den PicoGreen Assay bestätigt werden. Hier präsentierte sich weder an Tag 7 noch an Tag 14 ein signifikanter Unterschied in der dsDNA Menge und somit in der Zellzahl. Auch die Effizienz der Koloniebildung der Zellen war in beiden Gruppen nahezu identisch. Zur Bestimmung der chondrogenen Differenzierung wurde an Tag 21 der DMMB-Assay durchgeführt und kein Unterschied in der Menge an produzierten GAGs festgestellt. In der Adipogenese zeigte sich eine tendenziell höhere Lipidbildung in den Zellen, welche aus der tiefen Fettschicht gewonnen wurden. Ein ähnliches Ergebnis zeigte auch die osteogene Differenzierung. Hier wurde eine tendenziell höhere Absorption von Alizarin Red gemessen und somit indirekt mehr Kalzium in der tiefen Gruppe gebildet. Es lässt sich festhalten, dass die Zellen den Kriterien für Stammzellen entsprechen und sich kein wesentlicher Unterschied in der Qualität darstellen lässt.

Ergebnisse

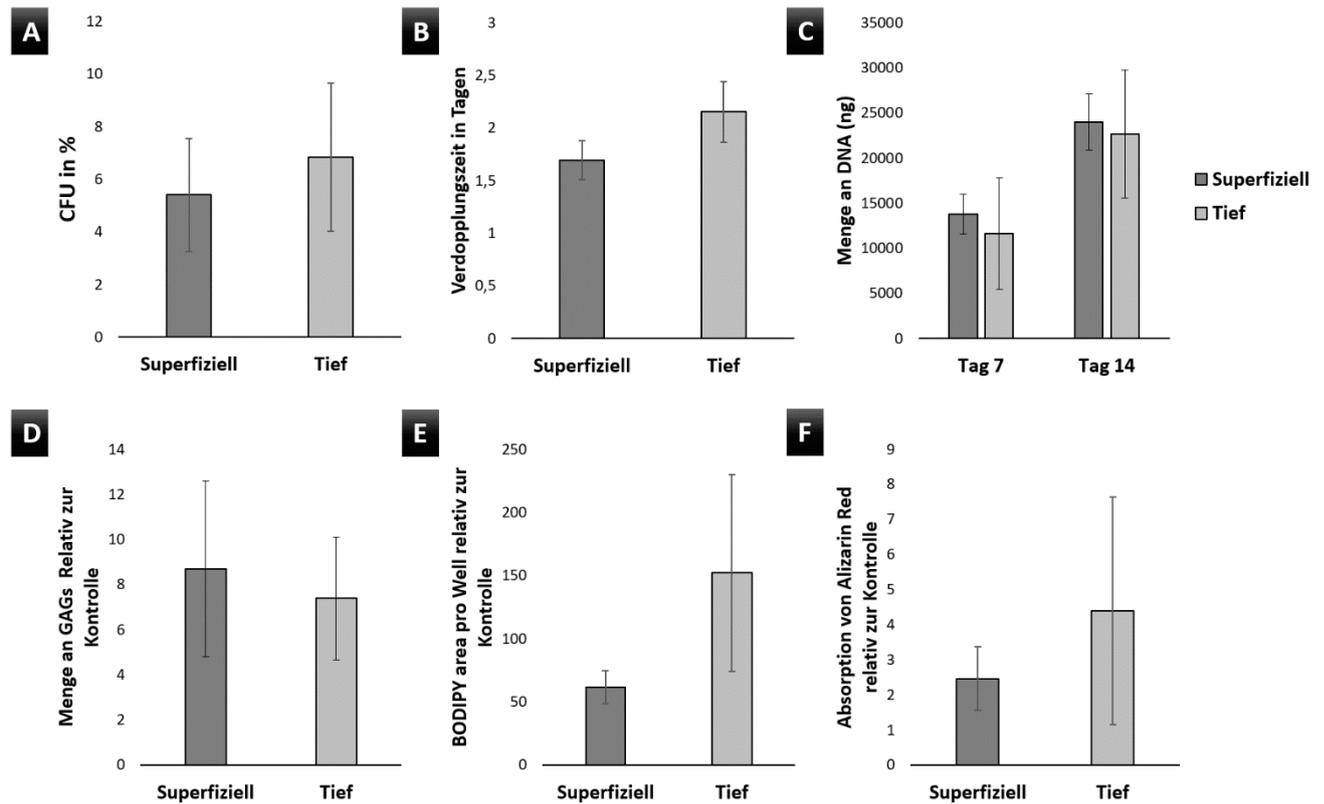


Abbildung 5.2: Vergleich des Potentials zu Koloniebildung (A) und Proliferation (B,C) der hASCs aus der superfiziellen und tiefen Fettschicht. An Tag 21 wurde die chondrogene Differenzierungskapazität (D) untersucht. Die adipogene (E) und osteogene (F) Differenzierungsfähigkeit nach 14 Tagen dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert dargestellt, die Fehlerbalken stehen für den SE, n=5, * = p<0,05.

5.2. Teil 2: Vergleich von kommerziellen und eigenproduzierten PCL-Scaffolds

5.2.1. Bioaktivierung von PCL-Gerüsten

In diesem Teil der Arbeit wurde die Bioaktivierbarkeit von eigenproduzierten (EP) und kommerziell erworbenem PCL untersucht.

Zur Veranschaulichung der Architektur der beiden Konstrukte, stellt Abbildung 5.3 eine Auflichtmikroskopie dar. Hier präsentierte sich eine deutlich größere Filamentdicke und Porengröße im EP-Scaffold, welche dennoch mit einer guten Präzision gedruckt wurden. Sowohl das eigenproduzierte als auch das kommerzielle PCL Scaffold zeigten eine regelmäßige Geometrie mit einer quadratischen Porenform.

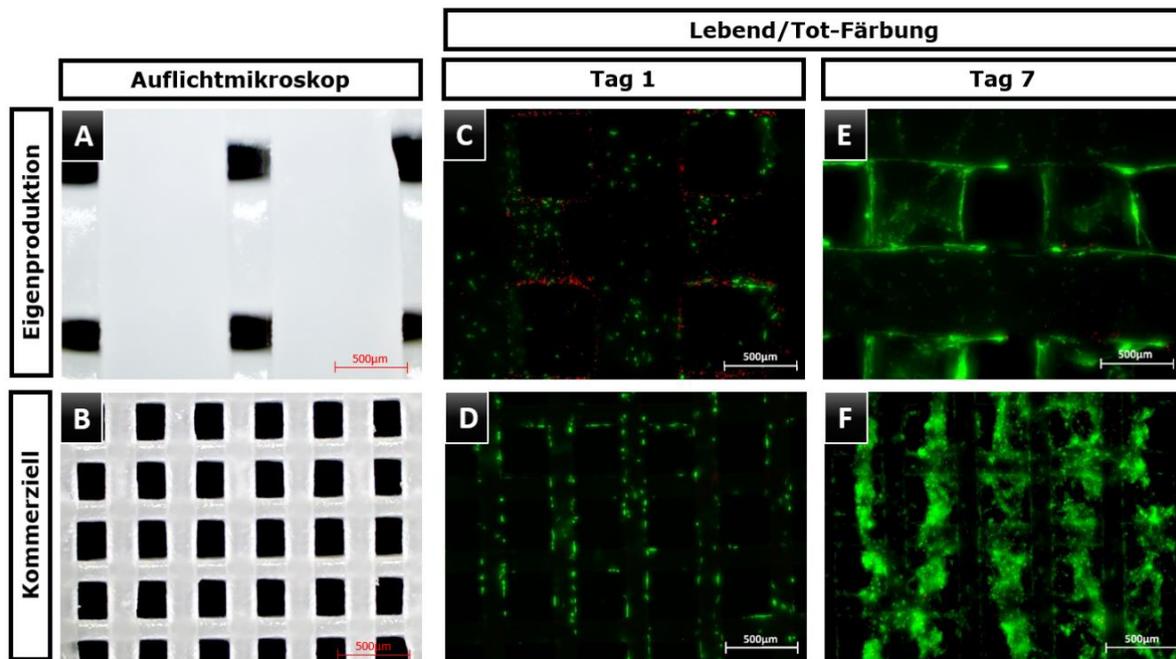


Abbildung 5.3: Veranschaulichung der Architektur der Scaffoldvarianten mittels Auflichtmikroskopie von EP- PCL (A) KMZ- PCL (B). Darstellung der Vitalität und Verteilung von hASCs auf den beiden Scaffoldvarianten an Tag 1 (C,D) und Tag 7 (E,F)

Die Vitalität der hASCs wurde durch eine Lebend/Tot-Färbung der beiden Scaffolds an Tag 1 und Tag 7 eruiert (Abbildung 5.3). Am 1. Tag nach dem Seeding imponierten auf dem kommerziellen PCL tendenziell mehr adhärierte und vitale Zellen. Dazu waren auf dem EP-Scaffold einige rot angefärbte und somit tote Zellen zu erkennen.

Es wurde ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt, um einen schädlichen Effekt der Scaffolds bzw. der Chemikalien, die zum ersten Aufschluss des PCLs verwendet wurden, auszuschließen. Dieser ist in Abbildung 5.4. dargestellt.

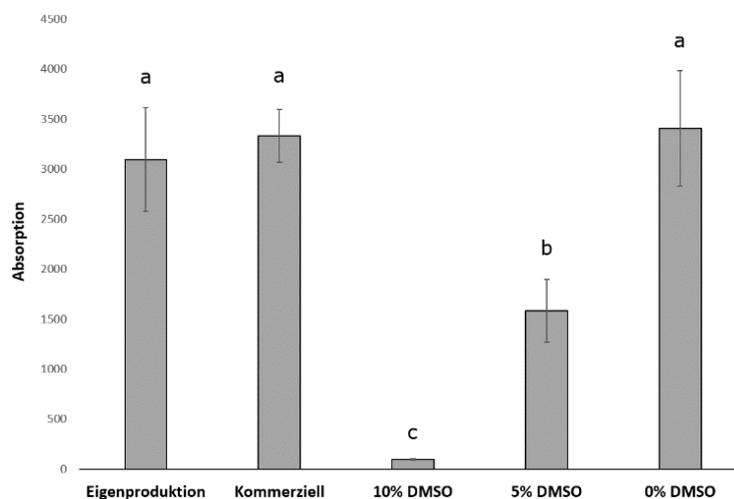


Abbildung 5.4: Zytotoxizitätsassay mittels Alamar Blue: Einfluss der verschiedenen Medien, die mit EP-PCL, KMZ-PCL, 10 % DMSO, 5 % DMSO und 0 % DMSO für 24 inkubiert wurden, auf die Vitalität der hASCs. Die Daten sind als Mittelwert dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die SD, n=3. Statistische Analyse mittels ANOVA

Ergebnisse

Der Zytotoxizitätsassay ergab keinen Anhalt für einen toxischen Effekt auf die hASCs, weder bei den eigenproduzierten noch bei den kommerziellen Scaffolds. Diese Erkenntnis untermauert die Lebend/Tot-Färbung an Tag 7. Hier waren auf dem EP-Scaffold nur noch sehr vereinzelt tote Zellen sichtbar. Dennoch konnten insgesamt weniger grün angefärbte Zellen als auf dem KMZ-PCL dargestellt werden. Des Weiteren füllten die hASCs auf dem KMZ-PCL bereits die Poren aus und erreichten eine hohe Konfluenz, während die Zellen auf dem EP-PCL nur auf den Filamenten adhärirt waren (Abbildung 5.3).

Zur weiteren Untersuchung der Proliferation wurde ein PicoGreen Assay nach 7 bzw. 21 Tagen durchgeführt. Hier zeigte sich an Tag 7 auf dem KMZ-Scaffold tendenziell mehr DNA und ließ somit indirekt auf eine höhere Zellzahl schließen. Dieses Ergebnis bekräftigte die vermutete höhere Zellzahl auf dem KMZ-PCL in der Lebend/Tot-Färbung. Außerdem wurde im PicoGreen Assay ein signifikanter Anstieg der dsDNA-Menge durch das chondrogene Differenzierungsmedium in beiden Scaffold Gruppen, sowohl im Vergleich zu Tag 7 als auch zur Kontrolle, festgestellt. Wie aus Abbildung 5.5 zu entnehmen ist, befand sich auf dem KMZ-Scaffold nach 21 Tagen der chondrogenen Differenzierung signifikant mehr dsDNA als auf dem EP-PCL.

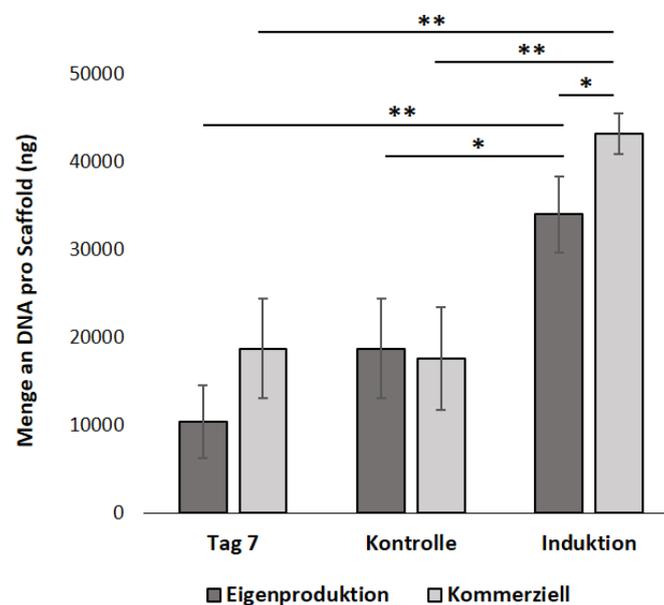


Abbildung 5.5: Ermittlung der dsDNA-Menge auf kommerziellen und eigenproduzierten PCL Scaffolds mittels PicoGreen Assay an Tag 7 und nach 21 Tagen. Dabei stellt die Kontrolle die Menge an sdDNA im Kulturmedium und die Induktion im chondrogenen Differenzierungsmedium nach 21 Tagen dar. Die Daten sind als Mittelwert dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die SD, $n=3$, * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$.

Ergebnisse

5.2.2. Chondrogene Differenzierung auf den PCL-Gerüsten

Die Chondrogenese der hASCs wurde durch das Differenzierungsmedium induziert. Ein DMMB-Assay wurde zur Bestimmung der Glykosaminoglykane an Tag 21 durchgeführt. Hier wurden auf dem KMZ-Scaffolds signifikant mehr GAGs als auf dem EP-Scaffold nachgewiesen. Außerdem wurde auf dem KMZ-Scaffold in der Induktionsgruppe eine hoch signifikant größere Menge an GAGs im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Dieser Effekt des Differenzierungsmediums war auf dem EP-Scaffold nur tendenziell mit einem $p=0,326$ nachweisbar (Abbildung 5.6)

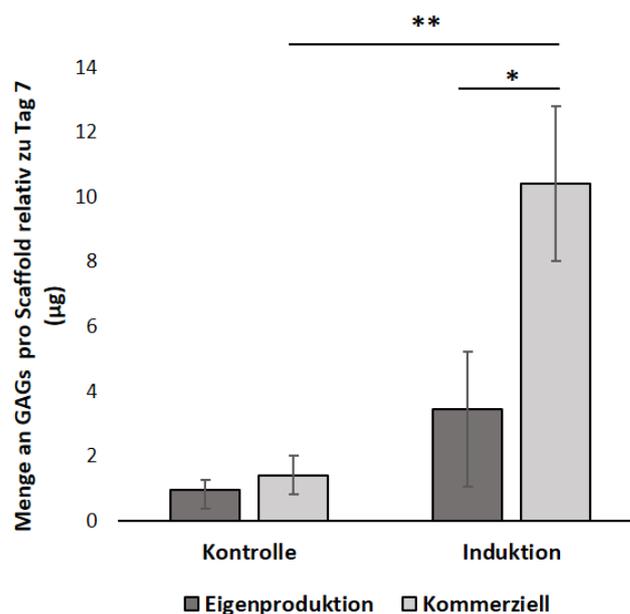


Abbildung 5.6: Ermittlung der chondrogenen Differenzierung von hASCs auf EP-PCL und KMZ-PCL mittels DMMB Assay. Die Daten sind als Mittelwert dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die SD, $n=3$, * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$.

5.3. Teil 3: Untersuchung verschiedener PCL-Scaffold-Konfigurationen

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die Porengröße und Porenform von Poly- ϵ -Caprolacton Scaffolds auf das Seeding und die Proliferation von humanen Adipose Derived Stem Cells hat. Die Abbildung 5.7 zeigt die Verteilung der ausgesäten Zellen auf dem Scaffold bzw. im Seedingwell. Es wird sichtbar, dass sich an Tag 1 am meisten Zellen auf den Scaffolds mit einer Porengröße von 300 μm , gefolgt von 350 μm und abschließend 400 μm befanden. Dies untermauert die univariante ANOVA Analyse. Sie ergab einen signifikanten Einfluss der Porengröße auf die Zellzahl, die sich an Tag 1 auf den

Ergebnisse

Scaffolds befindet, mit einem $p=0,024$. In der statistischen Analyse konnte kein signifikanter Einfluss ($p=0,495$) der Porenform festgestellt werden.

Außerdem lässt sich in Abbildung 5.7 erkennen, dass an Tag 1 deutlich weniger Zellen auf dem Scaffold adhären waren als im Well. Der Mittelwert der in Prozent auf den Scaffolds befindlichen Zellen lag bei $19,39\pm 5,34\%$. Jedoch ist hierbei eine hohe Standardabweichung zu beachten und es wurde insgesamt bei keiner Konfiguration die ursprünglich ausgesäte Zellzahl von 250.000 Zellen gemessen.

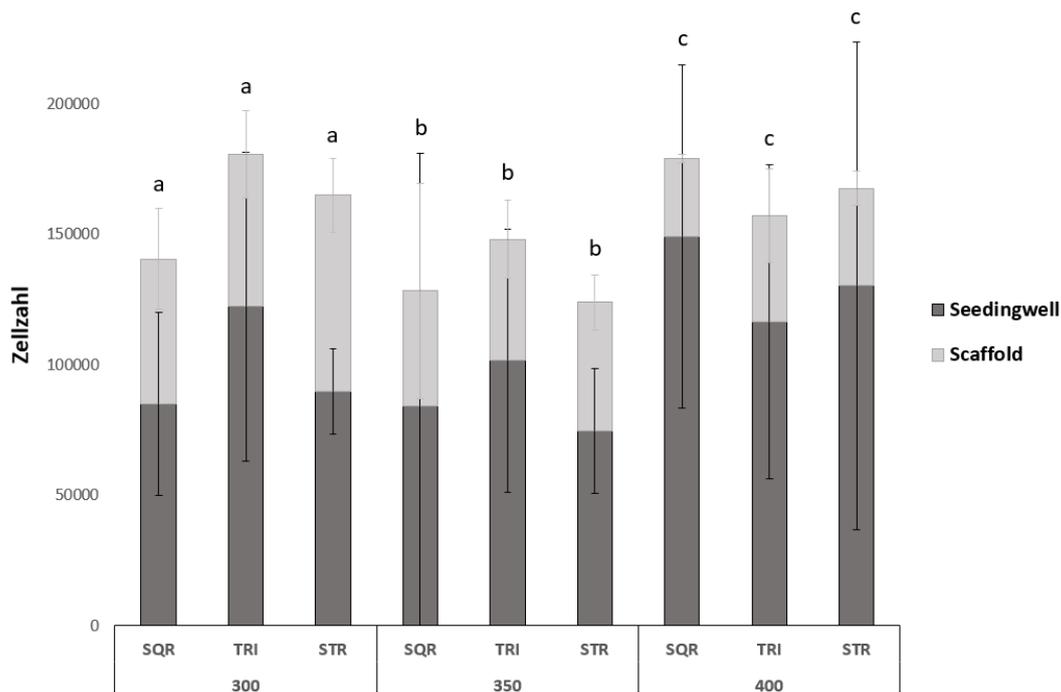


Abbildung 5.7: Verteilung der Zellen an Tag 1 nach dem Seeding auf den Scaffold und im Seedingwell. Die Zellzahl wurde mittels Konzentrationsreihe von hASCs im AlamarBlue Assay bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die SD, $n=3$, univarianter ANOVA.

Die Abbildung 5.8 zeigt jedoch, dass nach 7 Tagen Proliferation die Zellzahl, die ursprünglich ausgesät wurde (250.000 Zellen/Scaffold), von allen Porenformen mit einer Porengröße von 300 µm und 350 µm Scaffolds deutlich überschritten wurde. Diese Proliferation spiegelt sich auch in der ANOVA-Analyse wider. Dort ergab sich ein signifikanter Einfluss der Zeit ($p<0,01$). Zudem konnte ein signifikanter Einfluss ($p<0,01$) der Porengröße festgestellt werden, wobei die Zellzahl umso höher war, desto kleiner die Pore. Für die weiteren Versuche mit PCL-Gerüsten wurde sich fortan für die Konfiguration 300 SQR entschieden, da auf diesen nach 7 Tagen tendenziell die meisten Zellen befanden.

Ergebnisse

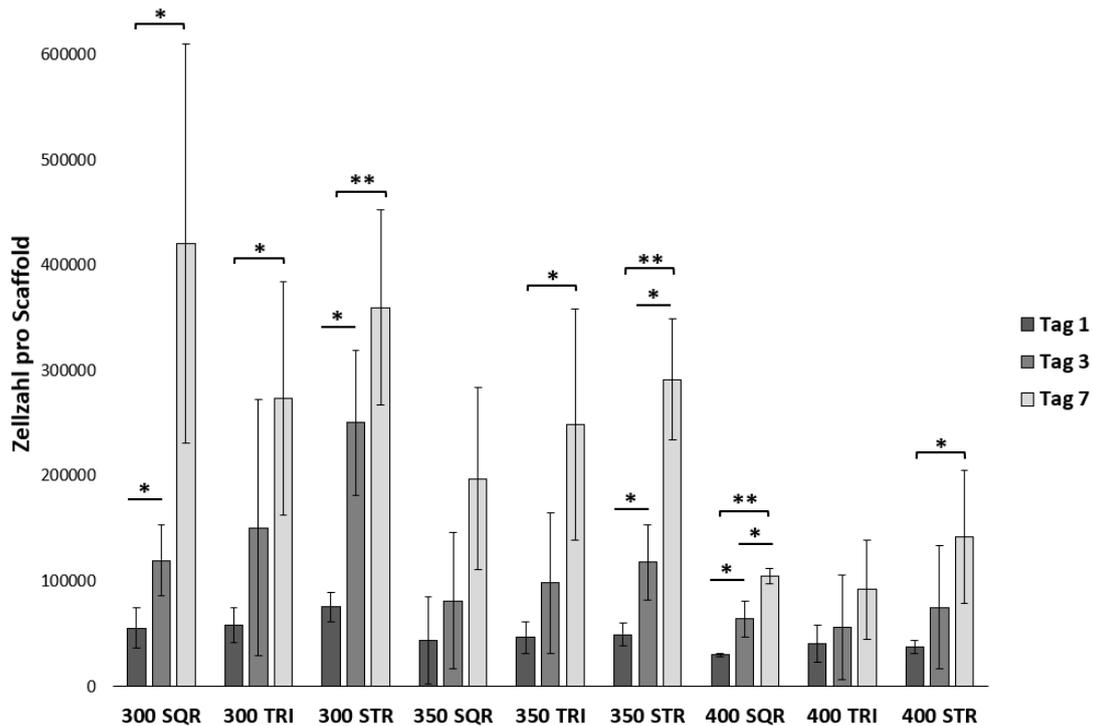


Abbildung 5.8: Anzahl der hASCs auf den verschiedenen Scaffoldkonfigurationen an Tag 1, 3 und 7. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Konzentrationsreihe im AlamarBlue Assay. Die Daten sind als Mittelwert dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die SD, n=3, * = p<0,05, ** = p<0,01.

5.4. Teil 4: Herstellung und Untersuchung der Bioaktivität von chondrogen bzw. osteogen aktivierten kommerziellen PCL Scaffolds

5.4.1. Part A: Herstellung von aktiviertem chondrogenen bzw. osteogenen PCL Scaffolds

Um die Wirksamkeit der Dezellularisation zu untersuchen, wurde eine Histologie durchgeführt. Diese zeigte, dass in der chondrogenen und osteogenen Differenzierungsgruppe fast keine Zellkerne mehr vorhanden waren und somit der Großteil der Zellen entfernt wurde (Abbildung 5.9). Für eine genauere Beurteilung der verbleibenden DNA-Menge auf den uPCL-Gerüsten wurde ein PicoGreen Assay durchgeführt. Dieser ergab in beiden Differenzierungsgruppen eine signifikante Reduktion des genetischen Materials bei nur noch minimaler verbleibender Restmenge an DNA (Abbildung 5.10 A, D).

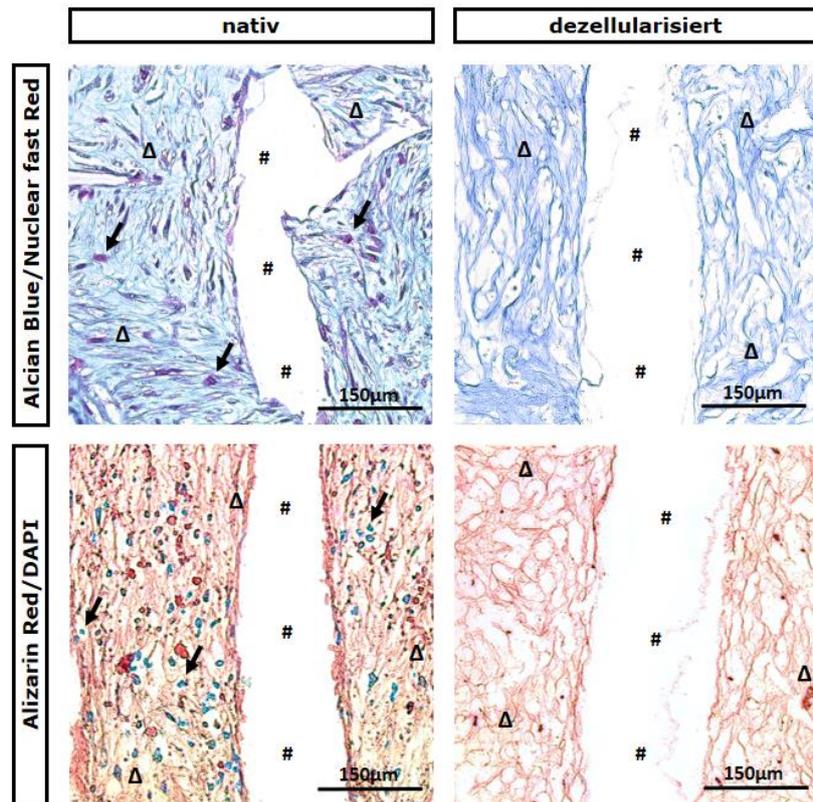


Abbildung 5.9: Histologische Darstellung des Dezellularisierungsprozesses von acPCL (obere Reihe) und aoPCL (untere Reihe) mittels spezifischer Anfärbung der ECM der Zellkerne. Die Histologie veranschaulicht die Entfernung von Zellkernen (↓). Zudem zeigen die Bilder die Persistenz der gewebespezifischen ECM (Δ; blau = GAGs, rot = Kalziumablagerungen). Die während der histologischen Einbettung verwendeten Lösungsmittel führten zur Auflösung des PCL-Gerüsts. Mit # markierten weißen Flächen stellen die ursprünglichen PCL Filamente dar. (modifiziert aus [134])

Zur Beurteilung des Einflusses der Dezellularisierung auf die Zusammensetzung der ECM wurde zusätzlich zur Histologie noch eine biochemische Analyse durchgeführt. Hinsichtlich der chondrogenen Differenzierung zeigten die histologischen Bilder optisch einen marginalen Unterschied in der Intensität der Alcian Blau Färbung und damit auch in der Menge der knorpeligen Extrazellulärmatrix (Abbildung 5.9). Der DMMB-Assay, der zum Nachweis von knorpelspezifischen Glykosaminoglykanen dient, untermauert die Auswertung der Histologie. Es gab keinen signifikanten Verlust von GAGs durch den Dezellularisierungsprozess (Abbildung 5.10 B). Im Hydroxypolin-Assay hingegen zeigt sich jedoch eine signifikante Abnahme nach der Dezellularisation und damit indirekt auch ein Kollagenverlust (Abbildung 5.10 C).

In Bezug auf die knöcherne Differenzierung, war in der Histologie nur ein geringer Unterschied in der Intensität der Alizarin Red Färbung erkennbar (Abbildung 5.9). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die osteogene Grundstruktur der ECM erhalten geblieben ist. Der

Ergebnisse

Kalzium-Assay spiegelt die Ergebnisse der Histologie wider, denn es war lediglich eine nicht-signifikante tendenzielle Abnahme der Kalziummenge zu verzeichnen (Abbildung 5.10 E).

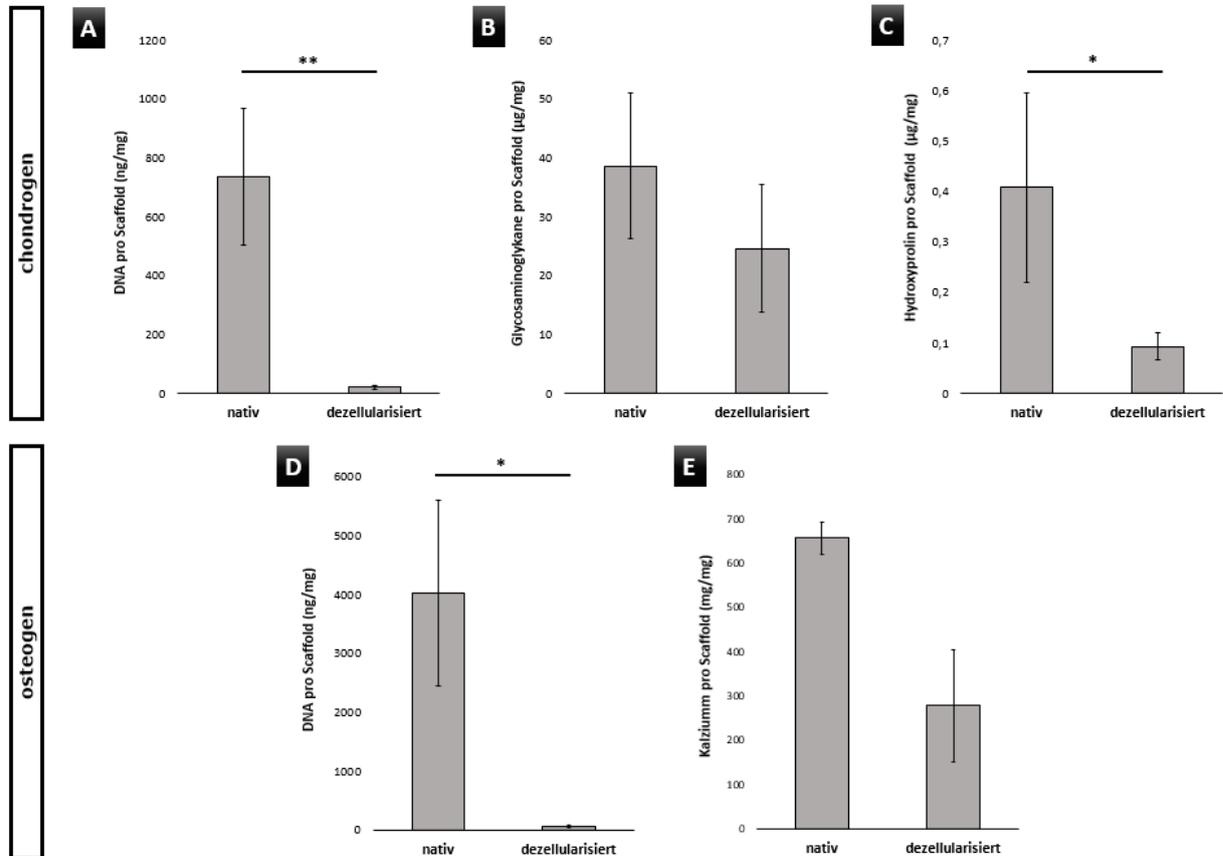


Abbildung 5.10: Analyse der Extrazellulärmatrix vor (nativ) und nach dem Dezellularisierungsprozess mittels verschiedener biochemischer Assays: Die Menge an DNA pro Scaffold wurde mit dem PicoGreen Assay (A,D) quantifiziert. Die ECM des Knorpels wurde mit dem DMMB-Assay (GAGs; B) und dem Hydroxyprolin-Assay (Kollagen; C) gemessen. Mit dem Kalzium-Assay (E) wurde die knöchernen ECM untersucht. Die Daten sind als Mittelwert dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die SD, n=3, * = p<0,05, ** = p<0,01 (modifiziert aus [134])

5.4.2. Part B: Untersuchung des Einflusses von aktiviertem PCL Scaffolds auf hASCs

5.4.2.1 Rezellularisierung

Die Untersuchung der Vitalität der hASCs auf den aktivierten PCL Scaffolds wurde mit einer Lebend/Tot-Färbung nach 3 Tagen visualisiert. In den Bildern in Abbildung 5.11 B-D sind fast alle Zellen lebend angefärbt und kaum tote Zellen sichtbar. Zudem imponiert das ao/acPCL-Scaffolds im Vergleich zu dem uPCL-Scaffold mit einer höheren Zellzahl, die homogen auf dem Gerüst verteilt ist. Im Gegensatz dazu füllen die Zellen beim unmodifizierten PCL die Poren nicht aus.

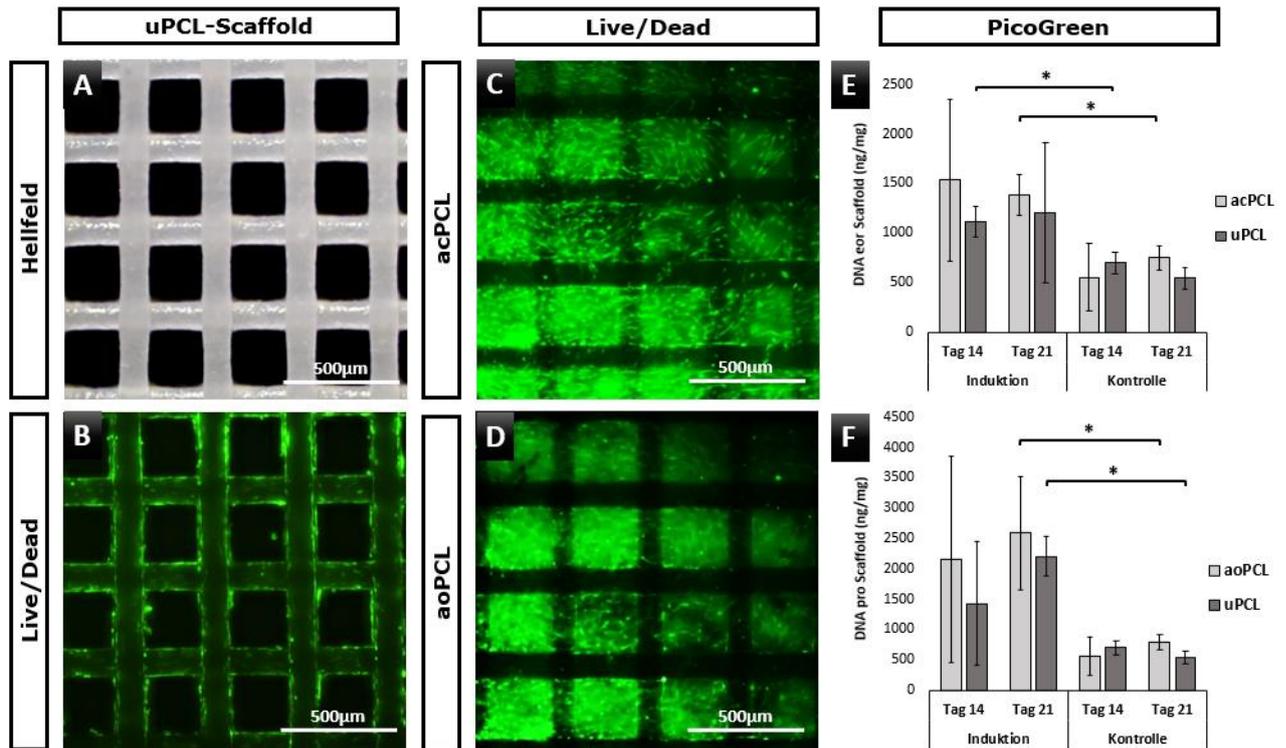


Abbildung 5.11: Die Geometrie von unmodifizierten PCL Scaffolds wurde mit einer Auflichtmikroskopie im Hellfeld (A) dargestellt. Die an Tag 3 durchgeführte Lebend/Tot-Färbung zeigt die Zelladhäsion und Vitalität der hASCs auf uPCL (B), acPCL (C) und aoPCL (D). Die Quantifizierung der Proliferation von hASCs auf den verschiedenen Scaffoldkonfigurationen erfolgte mittels PicoGreen-Assay (DNA-Menge pro Gerüst) in Differenzierungs- und Kontrollmedium. Die Daten sind als Mittelwert dargestellt, die Fehlerbalken repräsentieren die SD, n=3, * = p<0,05. (modifiziert aus [134])

5.4.2.2 Biochemische Analyse

Zur Untersuchung der Proliferation wurde der PicoGreen-Assay durchgeführt. Eine signifikante Erhöhung der DNA-Menge und somit der Zellzahl konnte sowohl durch das chondrogene als auch durch das osteogene Differenzierungsmedium im PicoGreen-Assay gefunden werden, was sich in der ANOVA-Analyse beim Vergleich der Induktion mit der Kontrollgruppe zeigte. Darüber hinaus ergab sich in der t-Test Analyse an Tag 14 in der uPCL Gruppe und an Tag 21 in der acPCL Gruppe eine signifikant höhere ds-DNA Menge im chondrogenen Differenzierungsmedium als in der Kontrolle. Abbildung 5.11 F zeigt eine signifikant größere Menge an ds-DNA und somit an Zellen im osteogenen Differenzierungsmedium gegenüber dem Kontrollmedium auf beiden Scaffold-Gruppen an Tag 21. In der Gruppe der osteogenen Induktion zeigte sich außerdem eine tendenzielle Zunahme der dsDNA über die Zeit. (Abbildung 5.11 E,F).

Ergebnisse

Die chondrogene Differenzierung wurde mittels DMMB-Assay zur Bestimmung des GAG-Gehalts (Abbildung 5.12 B) und des DMAB-Assays (Abbildung 5.12 A) zur Bestimmung des Hydroxyprolin-Gehalts untersucht. Im DMAB-Assay gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem acPCL-Scaffold und dem uPCL-Scaffold im Kontrollmedium. Ein signifikanter Anstieg der Menge an Hydroxyprolin konnte jedoch zu beiden Zeitpunkten in der acPCL-Gruppe im Vergleich zur uPCL-Gruppe im Induktionsmedium gemessen werden. Zudem konnte an Tag 14 und 21 ein deutlich höherer Hydroxyprolingehalt der acPCL-Gruppe in der Induktion im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Dieser Effekt konnte beim unmodifizierten PCL nur an Tag 14 beobachtet werden. Diese Ergebnisse konnten durch den signifikanten Einfluss $p=0,0033$ der Gerüstvariante und des Mediums $p=0,000031$ in der ANOVA Analyse untermauert werden. Im DMMB-Assay konnte nur ein insignifikanter Unterschied verzeichnet werden. An Tag 21 waren auf dem acPCL in der Induktionsgruppe mehr GAGs als in der Kontrolle nachweisbar. Bezüglich des unmodifizierten PCLs zeigte sich nur ein tendenzieller Einfluss des Mediums (Abbildung 5.12 C).

Der Kalzium-Assay wurde zur Quantifizierung der Osteogenese auf aoPCL bzw. uPCL durchgeführt. Die statistische Analyse zeigte im Kontrollmedium sowohl an Tag 14 als auch Tag 21 eine signifikant größere Kalziummenge auf dem aoPCL als auf uPCL. Im Induktionsmedium konnte dieser Unterschied nur an Tag 21 beobachtet werden. Auffällig ist zudem, dass nur ein marginaler Unterschied zwischen dem Kalziumgehalt in der Induktions- und Kontrollgruppe auf den osteogen aktivierten PCL Scaffolds erkennbar war. Somit lässt sich sagen, dass die hASCs auf den aoPCL-Scaffold in dem Kontrollmedium annähernd so viel Kalzium synthetisiert haben wie die Zellen im Induktionsmedium. Darüber hinaus war in der ANOVA ein signifikanter Einfluss des Mediums $p=0,00655$ und des Gerüsts $p=0,000133$ auf die Kalziumproduktion zu verzeichnen (Abbildung 5.12 Abbildung 5.12C).

Ergebnisse

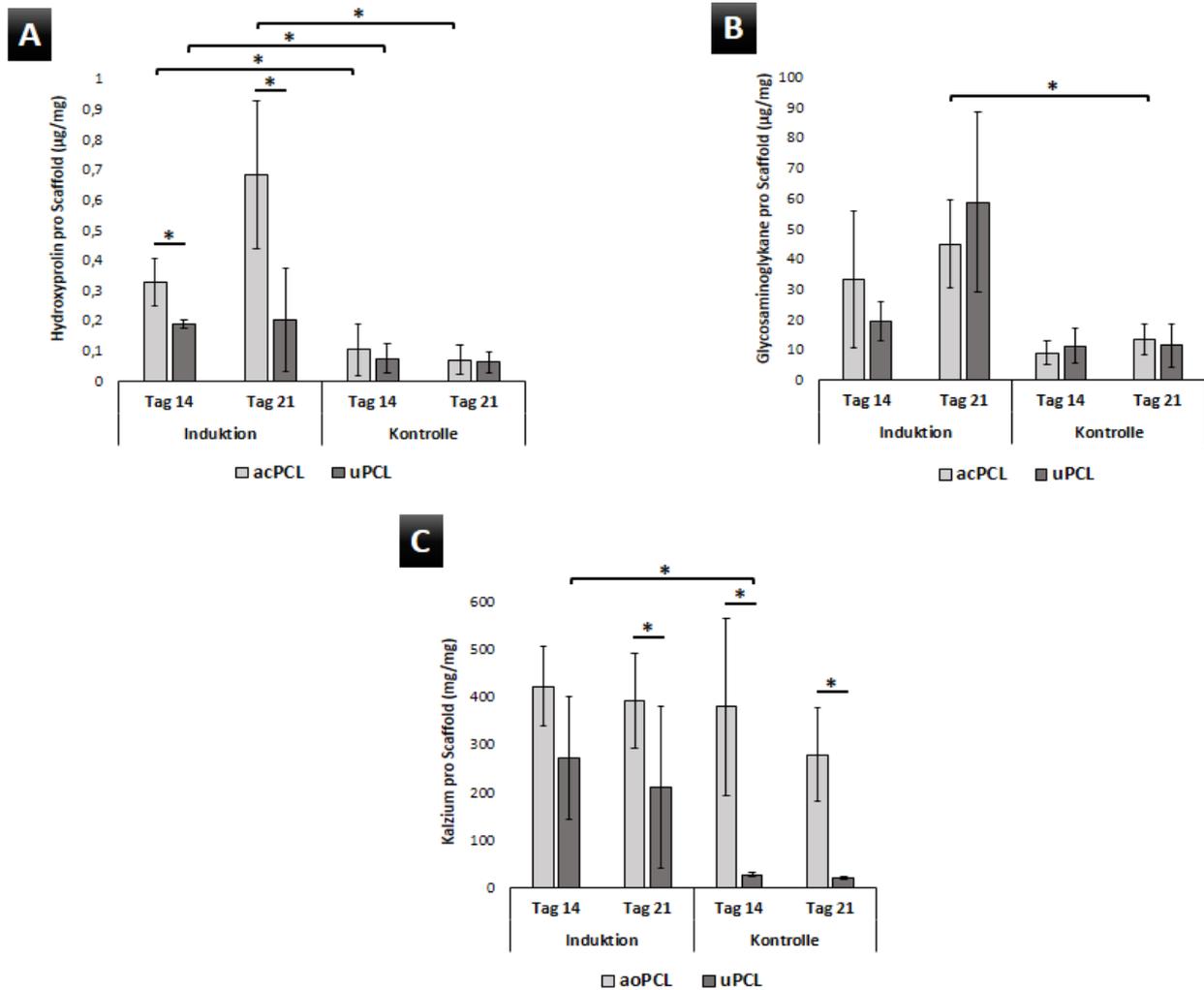


Abbildung 5.12: Analyse der von hASC produzierten ECM an Tag 14 und 21 im Induktions- bzw. Kulturmedium (Kontrolle) auf ac/aoPCL im Vergleich zu uPCL. Der Hydroxyprolinassay (A) und DMMB (B) wurde für die chondrogene Differenzierung durchgeführt. Die Analyse der knöchernen ECM erfolgte mittels Kalziumassay (C). Die jeweiligen Scaffolds ohne Zellen dienten als Background. Die Daten sind als Mittelwert dargestellt, die Fehlerbalken repräsentieren die SD, n=3, * = $p < 0,05$ (modifiziert aus [134])

5.4.2.3 Genexpressionsanalyse

Die Real-Time PCR wurde an Tag 14 zur Untersuchung der Expression der für die chondrogene bzw. osteogene Differenzierung relevanten Gene durchgeführt.

Hinsichtlich der chondrogenen Differenzierung wurden die Gene ACAN, SOX9, COL2A1 und COL10A1 ohne signifikanten Unterschied in beiden Gruppen hochreguliert. Während COL2A1 tendenziell höher in der acPCL Gruppe exprimiert wurde, war ACAN auf uPCL insignifikant höher exprimiert. COL1A1 war in der PCR in beiden Scaffold-Gruppen fast identisch herunterreguliert. Es konnten zwei signifikante Unterschiede in der Genregulierung festgestellt werden. COL9A1 wurde von hASCs auf chondrogen aktivierten PCL deutlich höher

Ergebnisse

exprimiert als auf unmodifiziertem PCL. Auf uPCL signifikant höher reguliert war ITGA11. (Abbildung 5.13 A)

Ebenfalls an Tag 14 wurde eine RT-PCR zur Analyse der osteogenen Differenzierung von hASCs auf den beiden Scaffoldvarianten durchgeführt. Hier waren alle Gene außer COL10A1 signifikant höher auf osteogen aktiviertem PCL exprimiert als auf unmodifiziertem PCL. COL1A1, COL9A1, SPP1 und ALPL sind in der aoPCL-Gruppe signifikant hochreguliert, während die Werte dieser Gene in der unmodifizierten PCL-Gruppe sich unter 1 befinden und somit herunterreguliert sind. ACAN hingegen ist in den Zellen auf beiden Scaffoldvarianten herunterreguliert, jedoch signifikant stärker in der uPCL Gruppe. (Abbildung 5.13 B).

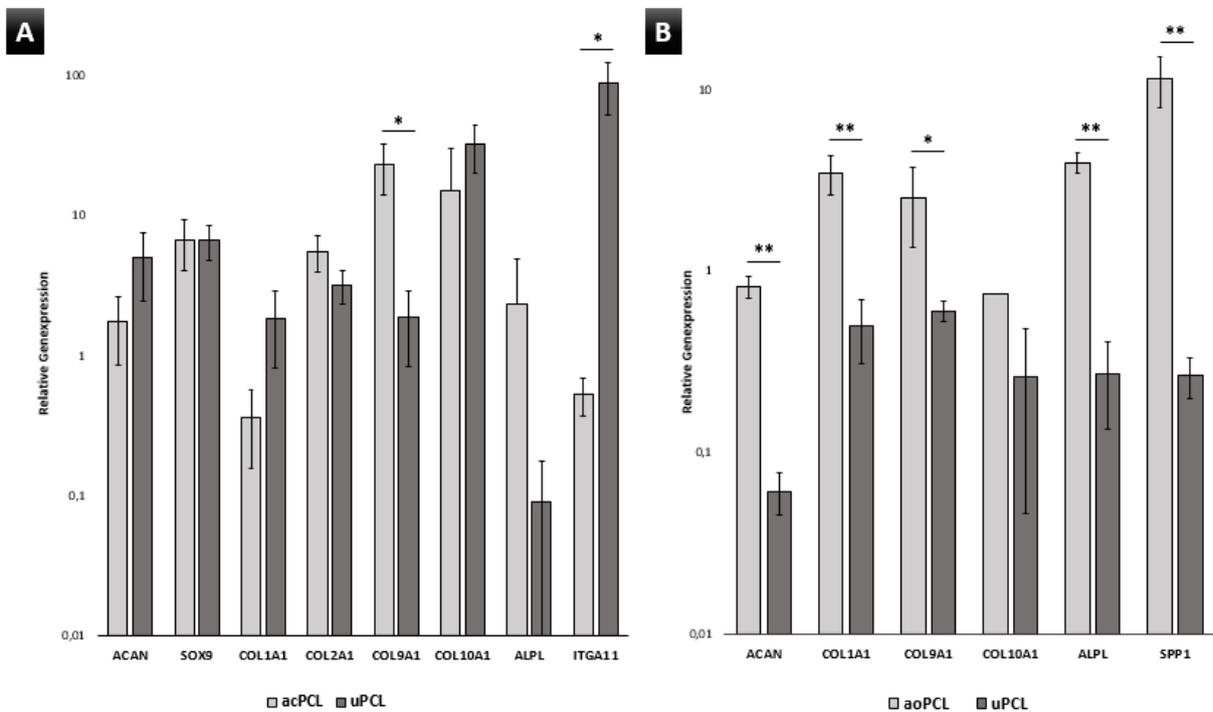


Abbildung 5.13: Die Diagramme zeigen die relativen Genexpressionsprofil von hASCs auf chondrogen (A) bzw. osteogen (B) aktivierten und unmodifizierten PCL. Die Auswertung erfolgte mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Die jeweiligen Scaffolds ohne Zellen dienten als Background. Die Daten sind als Mittelwert dargestellt, die Fehlerbalken repräsentieren die SD, $n=3$, * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$. (modifiziert aus [134])

6. Diskussion

Um Ästhetik und Funktion wiederherzustellen, werden kraniofaziale Defektbereiche unterschiedlichster Ätiologie aktuell zumeist mit autgenen Transplantaten aus Knochen oder Knorpel rekonstruiert [118]. Patienteneigenes Gewebe hat den Vorteil von potenziell vitalem Gewebe und fehlender immunologischer Reaktion. Jedoch ist es nur begrenzt verfügbar, geht mit einer Spenderstellenmorbidity einher und erfordert eine große Expertise des Chirurgen [32, 33]. Aufgrund dieser Limitationen erhält das Tissue Engineering in der kraniofazialen Rekonstruktion immer mehr Aufmerksamkeit [35]. Ziel ist es ein biologisch aktiviertes Ersatzmaterial herzustellen, das den physiologischen und mechanischen Eigenschaften von nativem Gewebe möglichst nahekommt. Dafür werden Zellen, Scaffolds und Wachstumsfaktoren kombiniert [38].

6.1. Teil 1: Einfluss der Gewebegewinnung auf hASCs

Stammzellen sind ein essenzieller Faktor im Tissue Engineering. Ohne diese wäre die Bioaktivierung von Gewebeersatzmaterialien nicht möglich. Daher ist die Proliferations- und Differenzierungskapazität der Stammzellen ein wichtiger Einflussfaktor. Humane Adipose Derived Stem Cells sind leicht zugänglich und kommen in hoher Konzentration vor [137]. Bislang wurden in vielen Studien schon unterschiedliche Spenderfaktoren untersucht: BMI, Rauchen, Alter, Diabetes,

und viele weitere [75, 138, 139]. Während diese Spenderfaktoren nur schwer zu beeinflussen sind, kann der Chirurg Einfluss auf die Gewebeentnahme bezüglich Fettgewebsart, Lokalisation und Technik der Fettgewinnung und somit auf die Stammzellen nehmen. Der Einfluss der Lokalisation der Gewebeentnahme auf hASCs wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht. Zum Beispiel der Vergleich von Bauch- und Oberschenkelfettgewebe. Deren Einfluss auf hASCs wird in der Literatur divers diskutiert [140, 141]. Des Weiteren wurde festgestellt, dass hASCs im subkutanen Fettgewebe in deutlich höherer Konzentration als im viszeralen Fett vorkommen [40]. Zudem wiesen die aus dem Unterhautfettgewebe isolierten hASCs ein höheres Proliferations- und Differenzierungspotential als im viszeralen Fett [49, 50].

Diskussion

Wir stellten die Hypothese auf, dass die Qualität von hASCs auch innerhalb des subkutanen Fettgewebes variieren könnte. Das subkutane Fettgewebe wird durch die Skarpa Faszie in eine superfizielle und tiefe Fettschicht getrennt und zeigt einen unterschiedlichen anatomischen Aufbau [53, 56]. Man könnte selektiv die Stammzellen nur aus einer Fettschicht isolieren und somit die Stammzellgewinnung optimieren, denn eine hohe Qualität der hASCs ist essentiell für das Tissue Engineering. Daher wurden die Eigenschaften der hASCs aus der superfiziellen Schicht mit Stammzellen aus dem tiefen subkutanen Fettgewebe verglichen. In der Proliferation und Koloniebildfähigkeit konnte kein wesentlicher Unterschied nachgewiesen werden. In der Differenzierungskapazität zeigte sich jedoch, dass hASCs aus der tiefen Fettschicht tendenziell besser adipogen und osteogen differenzieren.

Des Weiteren gibt es verschiedene Techniken zur Gewebeentnahme: Entnahme von Gewebestücken und Fettabsaugung. Bei der Fettabsaugung verwendeten wir ein BodyJet®-Gerät. Dabei handelt es sich um ein wasserassistiertes Lipoaspirationssystem. Durch den Wasserdruck wird das Fettgewebe aus dem Gewebeverbund herausgelöst und so eine schonende Absaugung ermöglicht [142, 143]. Bei der Gewebeentnahme wird das Fett in grobe Stücke geschnitten und anschließend direkt mit der enzymatischen Isolation begonnen. Jede Methode der Fettgewinnung stellt eine Manipulation der Stammzellen dar und könnte diese somit beeinflussen [144]. Wir haben den Effekt der beiden Methoden auf die Stammzellqualität untersucht. Die unterschiedlichen Gewebegewinnungsmethoden zeigten einen signifikanten Unterschied im Colony Forming Units Assay. Die Zellen aus dem Gewebestück bildeten eine deutlich höhere Anzahl an Kolonien. Der PicoGreen an Tag 14 zeigte eine tendenziell bessere Proliferation der Gewebestück-Stammzellen. Es könnte zur weiteren Abklärung noch ein FACS durchgeführt werden, da auch Fibroblasten Kolonien bilden und die Messung der Proliferation beeinflussen können [145]. Die in dieser Arbeit isolierten Zellen konnten aber erfolgreich in multiple Ziellinien differenziert werden. Dies spricht somit für das hauptsächliche Vorkommen von hASCs. Bezüglich deren Differenzierungskapazität waren hASCs der Lipoaspiration tendenziell in der adipogenen und osteogenen Differenzierung überlegen. Wohingegen hASCs aus dem Gewebestück insignifikant besser chondrogen differenzierten.

Zusammenfassend kann keine eindeutige Aussage über den Einfluss der Technik der Gewebegewinnung und des superfiziellen/tiefen subkutanen Fettgewebes auf die

Stammzellqualität von hASCs getroffen werden. Ob für die fehlende Signifikanz die Größe der Spenderzahl verantwortlich ist oder tatsächlich aufgrund eines fehlenden biologischen Effekts die Nullhypothese zutreffend ist, kann von dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Diesbezüglich sei aber auf die Diskussion in der aktuellen Literatur verwiesen, wo eine Vielzahl ähnlicher Studien zu unterschiedlichen Einflussfaktoren der Spender auf die Qualität der hASCs ebenfalls keine Signifikanz oder sogar widersprüchliche Beobachtungen ergeben hatten. [82]

6.2. Teil 2: Vergleich von kommerziellen und eigenproduzierten PCL-Scaffolds

Neben den Stammzellen ist ein wichtiger Teil des Tissue Engineerings das Gerüst, auf dem die Zellen differenzieren. PCL ist mit seinen Eigenschaften wie 3D Druckbarkeit, biologische Abbaubarkeit sowie Langzeitstabilität durch einen langsamen Abbauprozess ein vielversprechendes Material und besitzt bereits eine FDA Zulassung [33, 38]. Durch die 3D-Druckbarkeit von PCL ist die Herstellung von patientenindividuellen Implantaten mittels computergestütztem Design (CAD) möglich. Die virtuelle Planung mittels CAD basiert auf Bilddaten der gesunden Gegenseite des Patienten, die beispielsweise mit CT, MRT oder 3D-Scan gewonnen wurden [146, 147]. Die patientenspezifische Herstellung von PCL Scaffolds zieht aber hohe Kosten in der kommerziellen Produktion nach sich, welche durch die Abrechnung des Krankheitsbildes im Diagnosis Related Groups(DRG)-System vorraussichtlich nicht gedeckt wären [132]. Eine preisgünstigere Eigenherstellung wäre daher finanziell von Vorteil. Die biologische Aktivierbarkeit darf aber dadurch nicht beeinträchtigt werden [124].

In dieser Arbeit wurden PCL Scaffolds mit einem preisgünstigen 3D Drucker in Eigenproduktion hergestellt. Anschließend wurde die Vitalität, Proliferation und Differenzierung auf dem eigenproduzierten Scaffold mit einem kommerziell erworbenen Scaffold verglichen. Der Zytotoxizitätsassay bot keinerlei Anhalt für einen toxischen Effekt des eigenproduzierten PCL Scaffolds auf hASCs. Somit kann angenommen werden, dass die Chemikalien, die zum ersten Aufschluss der Polymerstruktur als Möglichkeit der Oberflächenvergrößerung verwendet wurden, erfolgreich entfernt wurden. In der Live/Dead-Färbung zeigten sich an Tag 1 deutlich mehr tote Zellen in der Eigenproduktion als im kommerziellen Scaffold. Da der

Diskussion

Zytotoxizitätsassay kein Hinweis auf toxische lösliche (Abbau-)Produkte des Scaffolds ergab, lässt sich vermuten, dass auf dem EP-Scaffold weniger Zellen besiedelt werden konnten und so mehr Zellen aufgrund fehlender langfristiger Adhärenz oder fehlendem Zell-Zell-Kontakt apoptotisch wurden. Dies passt zu der Beobachtung, dass in den Live/Dead-Bildern an Tag 7 eine deutlich Zunahme der Zellzahl und nahezu keine toten Zellen mehr auffällig waren. Untermauert wird diese Vermutung durch die Ergebnisse des PicoGreen Assays. Hier zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied der DNA-Menge und somit der Zellzahl zwischen den beiden PCL Scaffolds. Allerdings ist am Tag 7 die DNA Menge auf den EP Scaffolds knapp halb so hoch im Vergleich zu den kommerziell hergestellten Scaffolds. Der vermutlich von der Besiedelung herrührende Unterschied in der Zellzahl ist erst nach 21 Tagen in Kulturmedium ausgeglichen. Weitere Forschungen sollten daher eine Optimierung der Besiedelung von EP-PCL Scaffolds beinhalten. Insgesamt lässt sich aber schließen, dass sowohl das eigenproduzierte als auch das kommerzielle Scaffold ein geeignetes Gerüst für die Zellproliferation bieten.

Es wurde zudem die chondrogene Differenzierung der hASCs auf den PCL Gerüsten untersucht, um deren Anwendbarkeit als Scaffold in der kraniofaszialen Rekonstruktion von beispielsweise Ohr- und Nasenknorpeldefekten zu untersuchen. Die Chondrogenese war auf beiden PCL Gerüsten möglich, jedoch wurde auf dem KMZ-PCL mehr knorpelspezifische Gylkosaminoglykane produziert. Somit scheint das kommerziell hergestellte PCL-Scaffold derzeit dem eigenproduzierten Scaffold im Tissue Engineering überlegen zu sein und deshalb für die weiteren Versuche verwendet.

Bei eigenproduzierten PCL Scaffolds wurde eine befriedigende Bioaktivierbarkeit festgestellt. Die Herstellungskosten des EP-PCL waren deutlich geringer als die kommerziell erhältlichen Alternativen. Zudem ist EP-PCL leichter zugänglich. Insgesamt ist die Eigenproduktion ein vielversprechender Ansatz. Es benötigt aber weitere Anstrengungen die Druckpräzision des Ultimaker 3D Drucker zu erhöhen, um eine dünnere Filamentdicke, höhere Porosität und verbesserte Oberflächenbeschaffenheit zu erzielen und somit die Anwendbarkeit im Tissue Engineering weiter zu verbessern.

6.3. Teil 3: Untersuchung verschiedener PCL-Scaffold Konfigurationen

Durch die Verwendung des PCLs im 3D Druck bietet sich die Möglichkeit PCL in verschiedensten Konfigurationen zu drucken. Die wesentlichen Parameter, die modifiziert werden können sind die Filamentdicke, Porenform und Porengröße [148]. Indirekt wird durch Veränderung dieser Parameter auch die Porosität verändert, denn diese ist als der prozentuale Anteil des Hohlraums in einem Festkörper definiert [149]. Die Poren sind essentiell für die Proliferation und Migration der Zellen. Zudem beeinflusst die Größe der Poren und deren Geometrie das Zellwachstum und Differenzierungspotential von Zellen [150]. Bei einer kleineren Filamentdicke, die kleiner oder vergleichbar mit der Zellgröße ist, konnte eine geringere Zellhaftung, ein kugelförmiger Zellphänotyp und eine geringere Proliferation beobachtet werden [151]. Die Mindestporengröße wurde in frühen Arbeiten von Hulbert et al. mit 75-100 μm definiert [152]. Besitzen die Scaffolds größere Poren und eine regelmäßige Geometrie, so wird die Lebensfähigkeit und Proliferation von MSCs in-vitro begünstigt [153]. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die erhöhte Porosität den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen innerhalb des Gerüsts vereinfacht [154]. Zudem kann eine Erhöhung der Porengröße zu einer Verbesserung der Vaskularisierung und somit der Gewebeintegration führen [155]. In Bezug auf Porengröße und Porosität gibt es jedoch eine Obergrenze, da sie die mechanischen Eigenschaften des Konstrukts beeinflussen. Die mechanische Festigkeit ist für die Regeneration von tragendem Gewebe essentiell und kann durch eine Erhöhung des Hohlraumvolumens beeinträchtigt werden [156].

In diesem Abschnitt wurden verschiedene PCL Scaffold Konfigurationen in Bezug auf das Seeding und die Proliferation von hASCs untersucht. Dabei wurden drei verschiedene Porengrößen (300 μm , 350 μm , 450 μm) und drei Porenformen (viereckig, dreieckig und sternförmig) variiert und miteinander verglichen. Das Ziel war herauszufinden, auf welchem Scaffold die meisten Zellen adhären und so der geringste Zellverlust auftritt. Bei der Rekonstruktion von großen Defekten werden viele Stammzellen benötigt. Da die Gewinnung bzw. Herstellung einer sehr hohen Zahl von Stammzellen sehr aufwendig sind, ist eine hohe Seedingeffizienz von Vorteil. Zudem deutet eine gute Proliferation der Zellen auf eine gute Mikro- und Makroumgebung hin und ermöglicht eine gute Konfluenz der Zellen. Eine hohe Konfluenz und homogene Verteilung ist mit besseren Kulturergebnissen verbunden. Dies stellt ein wichtiges Ausgangskriterium für die Differenzierung der hASCs auf den Scaffolds für das

Tissue Engineering dar [157]. Es konnte festgestellt werden, dass mit einer höheren Porengröße die Anzahl der auf dem Scaffold befindlichen Zellen signifikant abnimmt und es zu einem deutlichen Zellverlust durch den Seedingprozess kommt. Es sollten weitere Anstrengungen unternommen werden, um die Effizienz zu verbessern. Hierbei kann an der Veränderung des Scaffolds und dessen Material sowie an der Seedingtechnik angesetzt werden.

Des Weiteren konnte ein signifikanter Einfluss der Porengröße in Bezug auf die Proliferation der Zellen festgestellt werden. Auf Scaffolds mit 300µm Porengröße vermehrten sich die hASCs besser. Bezüglich der Porenform konnte sowohl in der Seedingeffizienz als auch in der Proliferation kein signifikanter Einfluss der Porenform festgestellt werden. Tendenziell war das Zellwachstum auf dem PCL Scaffold mit einer Porengröße von 300 µm und einer viereckigen Porenform am vielversprechendsten. Daher wurde diese Scaffoldkonfiguration für den 4. Teil der Doktorarbeit verwendet.

6.4. Teil 4: Herstellung und Untersuchung der Bioaktivität von chondrogen bzw. osteogen aktivierten kommerziellen PCL Scaffolds

In diesem Teil der Arbeit ging es darum, einen Nutzen durch die Kombination eines von Zellen synthetisierte dECM und eines synthetischen PCL-Gerüsts zu erzielen, um die mechanischen Eigenschaften zu verbessern und gleichzeitig die biologische Mikroumgebung zu erhalten. Wir stellten die Hypothese auf, dass aktiviertes PCL eine bessere biologische Kompatibilität als unmodifiziertes PCL besitzt und die Proliferation und Differenzierung von hASCs in Knochen- und Knorpelgewebe fördern bzw. induzieren könnte.

In der Literatur wurde in mehreren Studien beschrieben, dass Dezellularisierungsprotokolle mit Natriumdesoxycholat und DNase effektiv Zellen entfernen und dabei die ECM weitestgehend erhalten bleibt [109]. Daher wurden in der Literatur Protokolle für diesen Teil der Doktorarbeit gesucht und modifiziert. Wie viel persistierendes genetisches Material nach der Dezellularisierung akzeptabel ist, ist in der Literatur umstritten. In manchen Publikationen wird das Fehlen von Zellkernen in der histologischen Färbung akzeptiert. Andere definieren einen Schwellenwert von weniger als 50 ng DNA pro mg Gewebe [158, 159]. Die Kombination aus chemischer und enzymatischer Dezellularisierung zeigte in Part A sowohl in der Histologie

Diskussion

als auch im PicoGreen-Assay eine weitgehend erfolgreiche Entfernung der Zellkerne und DNA im chondrogen und osteogen aktivierten PCL Scaffold.

Bei der Dezellularisierung des knochenaktivierten PCL Scaffolds konnte trotz erfolgreicher Entfernung von genetischem Material die knöchernen ECM zum Großteil erhalten werden. Die Histologie mit Alizarinrot-Färbung zeigte den Erhalt der knöchernen ECM. Dies konnte durch eine nicht signifikante Abnahme des Kalziumgehalts im biochemischen Assay bestätigt werden.

Ebenfalls erfolgreich war die Dezellularisierung der knorpeligen aktivierten PCL. Sowohl im DMMB als auch in der Histologie zeigte sich ein nahezu gleicher Gehalt an GAGs vor und nach der Dezellularisierung. Im Hydroxyprolin Assay war leider ein signifikanter Verlust messbar und somit eine Abnahme des Kollagengehalts ersichtlich. Das Dezellularisierungsprotokoll scheint dennoch ein gutes Gleichgewicht zwischen dem Persistieren der ECM-Matrix und dem Entfernen von genetischem Material zu ermöglichen.

In Part B wurde die biologische Kompatibilität der aktivierten PCL Scaffolds untersucht. Dafür wurde der Einfluss der chondrogenen bzw. osteogenen aktivierten PCL-Scaffolds auf die Vitalität, Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von hASCs mit unmodifiziertem PCL verglichen. Zur Eruierung der Vitalität der hASCs auf den Scaffoldvarianten wurde eine Lebend/Tot-Färbung an Tag 3 durchgeführt. Es waren nur vereinzelt tote Zellen sichtbar. Somit haben die aktivierten PCL Scaffolds keinen toxischen Einfluss auf die hASCs. Darüber hinaus lässt sich vermuten, dass ao/acPCL eine bessere Mikroumgebung für die Adhäsion bietet, da die Zellen homogener verteilt waren, was durch die Hochregulation der Genexpression von Integrin 11 unterstrichen wird [160]. Die Zellen proliferieren aber auf beiden Konstrukten annähernd gleich, denn im PicoGreen war an den Tagen 14 und 21 kein signifikanter Unterschied in der DNA-Menge zwischen den Scaffoldvarianten sichtbar. Ein signifikanter Einfluss des Induktionsmediums auf die DNA-Menge konnte festgestellt werden.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die ECM die Fähigkeit besitzt, durch Modulation chemischer und mechanischer Signalwege die Differenzierung von hASCs zu beeinflussen [8, 95]. Die Verwendung isolierter ECM Komponenten, wie Kollagen oder Kalzium, war hinsichtlich der Neubildung von spezifischem Gewebe einer dezellularisierten

Diskussion

Extrazellulärmatrix unterlegen. Die einzigartige 3D Struktur der dECM bietet optimale Bedingungen für die Proliferation und Differenzierung von hASCs [93, 115].

Die Untersuchung des Einflusses der von Zellen synthetisierten und dezellularisierten ECM auf die Osteogenese der hASCs zeigte eine überraschend hohe Wirkung. Im Gegensatz zu unmodifizierten PCL konnten aoPCL-Scaffolds in normalem Kulturmedium die hASCs zur Kalziumproduktion anregen und somit die Osteogenese induzieren. Dies wurde im Kalzium-Assay deutlich, denn dort wurde in der Kontrollgruppe auf aoPCL signifikant mehr Kalzium als auf der uPCL Gruppe gebildet. Diese Menge war etwa gleich hoch wie in der Induktionsgruppe. Der Kalziumassay zeigte zusätzlich einen additiven Effekt auf die Produktion des für die Konchenmatrix essentiellen Kalziums von hASCs auf aoPCL in der Induktionsgruppe. Zur Eruierung weiterer Knochenkomponenten wurde die RT-PCR durchgeführt. Je nach Phase der Osteogenese sind unterschiedliche Gene aktiv. Zu Beginn findet die Matrixreifung statt, die durch die Hochregulation von COL1 und ALPL geprägt wird [111]. Anschließend kommt es in der Osteogenese zur Mineralisierung. Als Marker dieser Phase gilt die Expression von Osteopontin (SPP1) [161]. Diese drei, für die Osteogenese essentiellen, Gene waren auf den aoPCL-Gerüsten signifikant höher exprimiert als auf uPCL. Somit unterstreichen die RT-PCR Ergebnisse die Resultate des Kalzium-Assays. Des Weiteren konnte eine signifikant höhere Expression von COL9A1 auf den aoPCL-Gerüsten festgestellt werden. COL9A1 hat eine organisierende und regulierende Wirkung an der Wachstumsfuge. Dies wurde in einer Studie bei COL9A1-Knockout-Mäusen nachgewiesen, wo Deformierungen des Skeletts beobachtet wurden [162]. Darüber hinaus konnte weder in den biochemischen Assays noch in der RT-PCR eine Differenzierung der hASCs in ein anderes Gewebe nachgewiesen werden.

Der andere Teilabschnitt von Part B befasste sich mit dem Einfluss des chondrogen aktivierten PCL Scaffolds auf die hASCs. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Menge des knorpelspezifischen Glykosaminoglykan zwischen acPCL und uPCL nachgewiesen werden. Jedoch wurde jedoch eine signifikante Erhöhung des Hydroxyprolins auf dem aktivierten PCL im chondrogenen Differenzierungsmedium festgestellt. Somit lässt sich wie in der Osteogenese ein additiver Effekt des aktivierten PCLs auf die Chondrogenese zeigen. Jedoch konnte acPCL im Gegensatz zum osteogene aktivierten PCL die Differenzierung der hASCs allein nicht induzieren. Zur genaueren Untersuchung des Einflusses wurde an Tag 14 eine RT-PCR durchgeführt. In der frühen Chondrogenese wird der Transkriptionsfaktor SOX9

Diskussion

exprimiert. Dieser bewirkt wiederum die Expression knorpelspezifischer Strukturproteine. Zu diesen zählen die, für die im Anfangsstadium der Chondrogenese stattfindende Kondensation essentiellen Kollagene, COL1A1 und COL2A1 [163]. Anschließend wird bei der Differenzierung der Progenitorzellen in Chondrozyten ACAN und COL9A1 hochreguliert [38]. Bei den während der Differenzierung exprimierten Genen gab es keinen signifikanten Unterschied. Die Gene waren in den hASCs auf beiden Scaffoldtypen ähnlich hochreguliert. In der Endphase der Differenzierung kommt es zur Hypertrophie der Chondrozyten und zur Expression von COL10A1 und ALPL [92, 164]. In der RT-PCR lag die relative Genexpression von ALPL bei uPCL unter 1 und war somit herunterreguliert. Dahingegen war die Phosphatase bei acPCL hochreguliert. Dies ist ein Hinweis, dass es auf den aktivierten PCL Scaffolds zu einer Differenzierung der hASCs in hypertrophe Chondrozyten kommt. COL9A1 spielt eine wichtige Rolle in der Quervernetzung von Kollagen 2-Fibrillen und für die Integration weiterer knorpeliger Strukturkomponenten [39, 165]. Es kam zu einer signifikant höheren Expression des COL9A1 auf acPCL. Insgesamt ermöglichen die knorpeligen aktivierten PCL-Scaffolds eine Unterstützung der chondrogenen Differenzierung von hASCs.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das aktivierte PCL ein geeignetes Material für die Geweberegeneration ist, insbesondere da dem aoPCL ein osteoinduktives Potential nachgewiesen werden konnte. Die Idee zielt darauf ab, dass in der zukünftigen klinischen Anwendung dieses Scaffold direkt implantiert werden könnte und im Körper durch hASCs aktiviert werden könnte. Fett könnte in der gleichen OP abgesaugt und die Stammzellen im OP durch neue Verfahren isoliert werden. Einige dieser befinden sich momentan in der Zulassung und könnten dadurch ein neues Feld im Tissue Engineering ermöglichen [166].

Die vielversprechenden Ergebnisse des 4. Teils der Arbeit sind jedoch nur in-vitro erzielt worden. Es sollten in-vivo Studien durchgeführt werden, um zu untersuchen ob die osteogen aktivierten PCL Scaffolds auch in-vivo die Osteogenese von hASCs induzieren können. Dabei sollten weitere Aspekte, die für die klinische Anwendung von entscheidender Bedeutung sind untersucht werden. Darunter fällt die Immunogenität, die Angiogenese und damit die Integration des Scaffolds im Defekt. Zudem ist die mechanische Langzeitstabilität hierbei zu beachten, da sie insbesondere in der Rekonstruktion im kraniofazialen Bereich für die Ästhetik und die Funktion eine wichtige Rolle spielt.

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

1. Borrelli, M.R., et al., *Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Craniofacial Reconstruction and Facial Aesthetics*. J Craniofac Surg, 2020. **31**(1): p. 15-27.
2. Zhou, G., et al., *In Vitro Regeneration of Patient-specific Ear-shaped Cartilage and Its First Clinical Application for Auricular Reconstruction*. EBioMedicine, 2018. **28**: p. 287-302.
3. Bly, R.A., et al., *Microtia Reconstruction*. Facial Plast Surg Clin North Am, 2016. **24**(4): p. 577-591.
4. Xia, J.J., J. Gateno, and J.F. Teichgraber, *New clinical protocol to evaluate craniomaxillofacial deformity and plan surgical correction*. J Oral Maxillofac Surg, 2009. **67**(10): p. 2093-106.
5. Hung, B.P., et al., *Three-Dimensional Printing of Bone Extracellular Matrix for Craniofacial Regeneration*. ACS Biomater Sci Eng, 2016. **2**(10): p. 1806-1816.
6. Gurley, J.M., et al., *Long-term outcome of autogenous rib graft nasal reconstruction*. Plast Reconstr Surg, 2001. **108**(7): p. 1895-905; discussion 1906-7.
7. Singh, V.P. and T.P. Moss, *Psychological impact of visible differences in patients with congenital craniofacial anomalies*. Prog Orthod, 2015. **16**: p. 5.
8. Kim, Y.S., et al., *Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering*. Bioeng Transl Med, 2019. **4**(1): p. 83-95.
9. Li, M.H., et al., *Regenerative approaches for cartilage repair in the treatment of osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2017. **25**(10): p. 1577-1587.
10. Nimeskern, L., et al., *Quantitative evaluation of mechanical properties in tissue-engineered auricular cartilage*. Tissue Eng Part B Rev, 2014. **20**(1): p. 17-27.
11. 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.
12. Morrison, R.J., et al., *Co-culture of adipose-derived stem cells and chondrocytes on three-dimensionally printed bioscaffolds for craniofacial cartilage engineering*. Laryngoscope, 2018. **128**(7): p. E251-E257.
13. Datta, P., et al., *Bone tissue bioprinting for craniofacial reconstruction*. Biotechnol Bioeng, 2017. **114**(11): p. 2424-2431.
14. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
15. Rajan, A., et al., *Optimized cell survival and seeding efficiency for craniofacial tissue engineering using clinical stem cell therapy*. Stem Cells Transl Med, 2014. **3**(12): p. 1495-503.
16. Firmin, F., C. Sanger, and G. O'Toole, *Ear reconstruction following severe complications of otoplasty*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2008. **61 Suppl 1**: p. S13-20.
17. Kasrai, L., A.K. Snyder-Warwick, and D.M. Fisher, *Single-stage autologous ear reconstruction for microtia*. Plast Reconstr Surg, 2014. **133**(3): p. 652-662.
18. Wiggerhauser, 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.
19. Chiu, L.L.Y., J.F. Weber, and S.D. Waldman, *Engineering of scaffold-free tri-layered auricular tissues for external ear reconstruction*. Laryngoscope, 2019. **129**(8): p. E272-E283.
20. Zhang, W. and P.C. Yelick, *Craniofacial Tissue Engineering*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. **8**(1).
21. Hahn, S., *Osseous and Cartilaginous Nasal Reconstruction*. Facial Plast Surg, 2017. **33**(1): p. 43-51.
22. Cohen, B.P., et al., *Tissue engineering the human auricle by auricular chondrocyte-mesenchymal stem cell co-implantation*. PLoS One, 2018. **13**(10): p. e0202356.
23. Bhumiratana, S., et al., *Tissue-engineered autologous grafts for facial bone reconstruction*. Sci Transl Med, 2016. **8**(343): p. 343ra83.

24. Ohara, K., K. Nakamura, and E. Ohta, *Chest wall deformities and thoracic scoliosis after costal cartilage graft harvesting*. *Plast Reconstr Surg*, 1997. **99**(4): p. 1030-6.
25. Wee, J.H., et al., *Complications associated with autologous rib cartilage use in rhinoplasty: a meta-analysis*. *JAMA Facial Plast Surg*, 2015. **17**(1): p. 49-55.
26. Long, X., et al., *Complication rate of autologous cartilage microtia reconstruction: a systematic review*. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 2013. **1**(7): p. e57.
27. Nyberg, E.L., et al., *3D-Printing Technologies for Craniofacial Rehabilitation, Reconstruction, and Regeneration*. *Ann Biomed Eng*, 2017. **45**(1): p. 45-57.
28. Ladani, P.S., R. Valand, and H. Sailer, *Ear Reconstruction Using Autologous Costal Cartilage: A Steep Learning Curve*. *J Maxillofac Oral Surg*, 2019. **18**(3): p. 371-377.
29. Chin, W., et al., *Modifications of three-dimensional costal cartilage framework grafting in auricular reconstruction for microtia*. *Plast Reconstr Surg*, 2009. **124**(6): p. 1940-1946.
30. Mussi, E., et al., *Ear Reconstruction Simulation: From Handcrafting to 3D Printing*. *Bioengineering (Basel)*, 2019. **6**(1).
31. Storck, K., et al., *Total reconstruction of the auricle: our experiences on indications and recent techniques*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 373286.
32. Rettinger, G., *Risks and complications in rhinoplasty*. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2007. **6**: p. Doc08.
33. Rindone, A.N., E. Nyberg, and W.L. Grayson, *3D-Printing Composite Polycaprolactone-Decellularized Bone Matrix Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1577**: p. 209-226.
34. Jovic, T.H., et al., *"Auricular reconstruction: A sociocultural, surgical and scientific perspective"*. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2020. **73**(8): p. 1424-1433.
35. Mellor, L.F., et al., *Investigation of multiphasic 3D-bioplotted scaffolds for site-specific chondrogenic and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells for osteochondral tissue engineering applications*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2020. **108**(5): p. 2017-2030.
36. Barbosa, I., et al., *Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies*. *Glycobiology*, 2003. **13**(9): p. 647-53.
37. Berthiaume, F., T.J. Maguire, and M.L. Yarmush, *Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges*. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2011. **2**: p. 403-30.
38. Dao, T.T., et al., *In Vitro Production of Cartilage Tissue from Rabbit Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Polycaprolactone Scaffold*. *Adv Exp Med Biol*, 2019. **1084**: p. 45-60.
39. Li, Y., et al., *Three-Dimensional Porous Scaffolds with Biomimetic Microarchitecture and Bioactivity for Cartilage Tissue Engineering*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019. **11**(40): p. 36359-36370.
40. Bacakova, L., et al., *Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review*. *Biotechnol Adv*, 2018. **36**(4): p. 1111-1126.
41. Wagner, J.M., et al., *Bone allografts combined with adipose-derived stem cells in an optimized cell/volume ratio showed enhanced osteogenesis and angiogenesis in a murine femur defect model*. *J Mol Med (Berl)*, 2019. **97**(10): p. 1439-1450.
42. Welsch, U., *Sobotta Lehrbuch Histologie*. Vol. 2. Auflage. 2006, München [u.a.] Elsevier, Urban & Fischer Verlag.
43. Ulfing, N., *Kurzlehrbuch Histologie*. Vol. 2 Auflage. 2003, Stuttgart: Thieme.
44. Kugler, P., *Anatomie des Menschen*. 1994, Urban & Schwarzenberg: München.
45. Wajchenberg, B.L., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome*. *Endocr Rev*, 2000. **21**(6): p. 697-738.
46. Ibrahim, M.M., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences*. *Obes Rev*, 2010. **11**(1): p. 11-8.

47. Mizuno, H., M. Tobita, and A.C. Uysal, *Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine*. *Stem Cells*, 2012. **30**(5): p. 804-10.
48. Prunet-Marcassus, B., et al., *From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(6): p. 727-36.
49. Schipper, B.M., et al., *Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells*. *Ann Plast Surg*, 2008. **60**(5): p. 538-44.
50. Macotela, Y., et al., *Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots*. *Diabetes*, 2012. **61**(7): p. 1691-9.
51. Lockwood, T.E., *Superficial fascial system (SFS) of the trunk and extremities: a new concept*. *Plast Reconstr Surg*, 1991. **87**(6): p. 1009-18.
52. Harley, O.J. and M.A. Pickford, *CT analysis of fat distribution superficial and deep to the Scarpa's fascial layer in the mid and lower abdomen*. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2013. **66**(4): p. 525-30.
53. Joshi, R. and H. Duong, *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Scarpa Fascia*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
54. Chopra, J., et al., *Re-evaluation of superficial fascia of anterior abdominal wall: a computed tomographic study*. *Surg Radiol Anat*, 2011. **33**(10): p. 843-9.
55. Lancerotto, L., et al., *Layers of the abdominal wall: anatomical investigation of subcutaneous tissue and superficial fascia*. *Surg Radiol Anat*, 2011. **33**(10): p. 835-42.
56. Sbarbati, A., et al., *Subcutaneous adipose tissue classification*. *Eur J Histochem*, 2010. **54**(4): p. e48.
57. Lundbom, J., et al., *Deep subcutaneous adipose tissue is more saturated than superficial subcutaneous adipose tissue*. *Int J Obes (Lond)*, 2013. **37**(4): p. 620-2.
58. Stecco, C., et al., *The fascia: the forgotten structure*. *Ital J Anat Embryol*, 2011. **116**(3): p. 127-38.
59. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 157-68.
60. Weissman, I.L., *Stem cells are units of natural selection for tissue formation, for germline development, and in cancer development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(29): p. 8922-8.
61. Morrison, S.J., N.M. Shah, and D.J. Anderson, *Regulatory mechanisms in stem cell biology*. *Cell*, 1997. **88**(3): p. 287-98.
62. Kolios, G. and Y. Moodley, *Introduction to stem cells and regenerative medicine*. *Respiration*, 2013. **85**(1): p. 3-10.
63. Giuliani, N., et al., *New insights into osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and their potential clinical applications for bone regeneration in pediatric orthopaedics*. *Stem Cells Int*, 2013. **2013**: p. 312501.
64. Lee, O.K., et al., *Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood*. *Blood*, 2004. **103**(5): p. 1669-75.
65. Zvaifler, N.J., et al., *Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals*. *Arthritis Res*, 2000. **2**(6): p. 477-88.
66. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science*, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
67. Jiang, Y., et al., *Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(8): p. 896-904.
68. Baglioni, S., et al., *Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue*. *FASEB J*, 2009. **23**(10): p. 3494-505.
69. Gomillion, C.T. and K.J. Burg, *Stem cells and adipose tissue engineering*. *Biomaterials*, 2006. **27**(36): p. 6052-63.
70. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. *Tissue Eng*, 2001. **7**(2): p. 211-28.
71. Hassan, W.U., U. Greiser, and W. Wang, *Role of adipose-derived stem cells in wound healing*. *Wound Repair Regen*, 2014. **22**(3): p. 313-25.

72. 2020 Plastic Surgery Statistics Report: American Society of Plastic Surgeons. Plastic Surgery Statistics Report 2020; Available from: <https://www.plasticsurgery.org/documents/News/Statistics/2020/plastic-surgery-statistics-full-report-2020.pdf>.
73. Bunnell, B.A., et al., *Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation*. Methods, 2008. **45**(2): p. 115-20.
74. Kang, H., et al., *In vivo cartilage repair using adipose-derived stem cell-loaded decellularized cartilage ECM scaffolds*. J Tissue Eng Regen Med, 2014. **8**(6): p. 442-53.
75. Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell, *Adipose-derived stem cells for regenerative medicine*. Circ Res, 2007. **100**(9): p. 1249-60.
76. Yun, I.S., et al., *Effect of human adipose derived stem cells on scar formation and remodeling in a pig model: a pilot study*. Dermatol Surg, 2012. **38**(10): p. 1678-88.
77. Perez-Simon, J.A., et al., *Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial*. Haematologica, 2011. **96**(7): p. 1072-6.
78. Puissant, B., et al., *Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells*. Br J Haematol, 2005. **129**(1): p. 118-29.
79. Varghese, J., et al., *Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy*. Stem Cell Res Ther, 2017. **8**(1): p. 45.
80. Ye, X., et al., *Age-Related Changes in the Regenerative Potential of Adipose-Derived Stem Cells Isolated from the Prominent Fat Pads in Human Lower Eyelids*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0166590.
81. Di Taranto, G., et al., *Qualitative and quantitative differences of adipose-derived stromal cells from superficial and deep subcutaneous lipoaspirates: a matter of fat*. Cytotherapy, 2015. **17**(8): p. 1076-89.
82. Kuhlmann, C., et al., *[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. **52**(6): p. 521-532.
83. Liu, M., et al., *Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from the Elderly Exhibit Decreased Migration and Differentiation Abilities with Senescent Properties*. Cell Transplant, 2017. **26**(9): p. 1505-1519.
84. Buschmann, J., et al., *Yield and proliferation rate of adipose-derived stromal cells as a function of age, body mass index and harvest site-increasing the yield by use of adherent and supernatant fractions?* Cytotherapy, 2013. **15**(9): p. 1098-105.
85. Pachon-Pena, G., et al., *Obesity Determines the Immunophenotypic Profile and Functional Characteristics of Human Mesenchymal Stem Cells From Adipose Tissue*. Stem Cells Transl Med, 2016. **5**(4): p. 464-75.
86. Frazier, T.P., et al., *Body mass index affects proliferation and osteogenic differentiation of human subcutaneous adipose tissue-derived stem cells*. BMC Cell Biol, 2013. **14**: p. 34.
87. Alaaeddine, N., et al., *Effect of age and body mass index on the yield of stromal vascular fraction*. J Cosmet Dermatol, 2018. **17**(6): p. 1233-1239.
88. Banks, J.M., et al., *The combined effects of matrix stiffness and growth factor immobilization on the bioactivity and differentiation capabilities of adipose-derived stem cells*. Biomaterials, 2014. **35**(32): p. 8951-9.
89. Xie, J., et al., *Substrate elasticity regulates adipose-derived stromal cell differentiation towards osteogenesis and adipogenesis through beta-catenin transduction*. Acta Biomater, 2018. **79**: p. 83-95.
90. Zhang, W., et al., *Effects of Matrix Stiffness on the Differentiation of Multipotent Stem Cells*. Curr Stem Cell Res Ther, 2020. **15**(5): p. 449-461.
91. Zhang, T., et al., *Regulating osteogenesis and adipogenesis in adipose-derived stem cells by controlling underlying substrate stiffness*. J Cell Physiol, 2018. **233**(4): p. 3418-3428.

92. Choi, J.S., et al., *In vitro cartilage tissue engineering using adipose-derived extracellular matrix scaffolds seeded with adipose-derived stem cells*. Tissue Eng Part A, 2012. **18**(1-2): p. 80-92.
93. Zhang, Z., et al., *Bone marrow stromal cell-derived extracellular matrix promotes osteogenesis of adipose-derived stem cells*. Cell Biol Int, 2015. **39**(3): p. 291-9.
94. Engler, A.J., et al., *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*. Cell, 2006. **126**(4): p. 677-89.
95. Park, J.S., et al., *The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF-beta*. Biomaterials, 2011. **32**(16): p. 3921-30.
96. Rowlands, A.S., P.A. George, and J.J. Cooper-White, *Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(4): p. C1037-44.
97. Tevlin, R., et al., *Biomaterials for craniofacial bone engineering*. J Dent Res, 2014. **93**(12): p. 1187-95.
98. Marin, E., F. Boschetto, and G. Pezzotti, *Biomaterials and biocompatibility: An historical overview*. J Biomed Mater Res A, 2020. **108**(8): p. 1617-1633.
99. Holzapfel, B.M., M. Rudert, and D.W. Hutmacher, *[Scaffold-based Bone Tissue Engineering]*. Orthopade, 2017. **46**(8): p. 701-710.
100. Hao, Z., et al., *The scaffold microenvironment for stem cell based bone tissue engineering*. Biomater Sci, 2017. **5**(8): p. 1382-1392.
101. Wiggerhauser, 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.
102. Sun, Y., et al., *Functionality of decellularized matrix in cartilage regeneration: A comparison of tissue versus cell sources*. Acta Biomater, 2018. **74**: p. 56-73.
103. Wong, M.L. and L.G. Griffiths, *Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: antigen removal vs. decellularization*. Acta Biomater, 2014. **10**(5): p. 1806-16.
104. 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.
105. 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.
106. Goldberg-Bockhorn, E., et al., *[Physical characterization of decellularized cartilage matrix for reconstructive rhinosurgery]*. Laryngorhinootologie, 2014. **93**(11): p. 756-63.
107. Lin, H., et al., *Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential*. Biomaterials, 2012. **33**(18): p. 4480-9.
108. Partington, L., et al., *Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds*. Acta Biomater, 2013. **9**(2): p. 5251-61.
109. Rahman, S., et al., *Optimising the decellularization of human elastic cartilage with trypsin for future use in ear reconstruction*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3097.
110. Giannoudis, P.V., H. Dinopoulos, and E. Tsiridis, *Bone substitutes: an update*. Injury, 2005. **36** Suppl 3: p. S20-7.
111. Miron, R.J., et al., *Osteoinductive potential of 4 commonly employed bone grafts*. Clin Oral Investig, 2016. **20**(8): p. 2259-2265.
112. Donos, N., et al., *The effect of enamel matrix proteins and deproteinized bovine bone mineral on heterotopic bone formation*. Clin Oral Implants Res, 2006. **17**(4): p. 434-8.
113. Garcia-Gareta, E., M.J. Coathup, and G.W. Blunn, *Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration*. Bone, 2015. **81**: p. 112-121.
114. Cypher, T.J. and J.P. Grossman, *Biological principles of bone graft healing*. J Foot Ankle Surg, 1996. **35**(5): p. 413-7.
115. Thakkar, S., et al., *Mesenchymal stromal cell-derived extracellular matrix influences gene expression of chondrocytes*. Biofabrication, 2013. **5**(2): p. 025003.

116. Reichert, J.C., et al., *A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones*. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(141): p. 141ra93.
117. Tao, O., et al., *The Applications of 3D Printing for Craniofacial Tissue Engineering*. *Micromachines* (Basel), 2019. **10**(7).
118. Aghali, A., *Craniofacial Bone Tissue Engineering: Current Approaches and Potential Therapy*. *Cells*, 2021. **10**(11).
119. Lam, C.X., et al., *Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo*. *J Biomed Mater Res A*, 2009. **90**(3): p. 906-19.
120. 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.
121. 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.
122. 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.
123. Calvert, J.W., et al., *Characterization of osteoblast-like behavior of cultured bone marrow stromal cells on various polymer surfaces*. *J Biomed Mater Res*, 2000. **52**(2): p. 279-84.
124. 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).
125. Nyberg, E., et al., *Comparison of 3D-Printed Poly-varepsilon-Caprolactone Scaffolds Functionalized with Tricalcium Phosphate, Hydroxyapatite, Bio-Oss, or Decellularized Bone Matrix*. *Tissue Eng Part A*, 2017. **23**(11-12): p. 503-514.
126. Kim, J.Y., et al., *Synergistic Effects of Beta Tri-Calcium Phosphate and Porcine-Derived Decellularized Bone Extracellular Matrix in 3D-Printed Polycaprolactone Scaffold on Bone Regeneration*. *Macromol Biosci*, 2018. **18**(6): p. e1800025.
127. Mansour, A., et al., *(*) Extracellular Matrices for Bone Regeneration: A Literature Review*. *Tissue Eng Part A*, 2017. **23**(23-24): p. 1436-1451.
128. Nie, X. and D.A. Wang, *Decellularized orthopaedic tissue-engineered grafts: biomaterial scaffolds synthesised by therapeutic cells*. *Biomater Sci*, 2018. **6**(11): p. 2798-2811.
129. Zhang, X., et al., *Mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix (mECM): a bioactive and versatile scaffold for musculoskeletal tissue engineering*. *Biomed Mater*, 2020. **16**(1): p. 012002.
130. Pittenger, M.F., et al., *Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress*. *NPJ Regen Med*, 2019. **4**: p. 22.
131. Wahl, E.A., et al., *Acute stimulation of mesenchymal stem cells with cigarette smoke extract affects their migration, differentiation, and paracrine potential*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 22957.
132. Placone, J.K., B. Mahadik, and J.P. Fisher, *Addressing present pitfalls in 3D printing for tissue engineering to enhance future potential*. *APL Bioeng*, 2020. **4**(1): p. 010901.
133. Schantz, J.-T. and K.-W. Ng, *A manual for primary human cell culture*. 2004, Hackensack New Jersey: World Scientific. xxi, 147 p.
134. 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.
135. Gilpin, A. and Y. Yang, *Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 9831534.
136. Rao, X., et al., *An improvement of the 2^{-delta delta} CT method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis*. *Biostat Bioinforma Biomath*, 2013. **3**(3): p. 71-85.
137. Chu, D.T., et al., *Adipose Tissue Stem Cells for Therapy: An Update on the Progress of Isolation, Culture, Storage, and Clinical Application*. *J Clin Med*, 2019. **8**(7).
138. Aust, L., et al., *Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates*. *Cytotherapy*, 2004. **6**(1): p. 7-14.

139. van Harmelen, V., et al., *Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003. **27**(8): p. 889-95.
140. Fraser, J., et al., *Differences in stem and progenitor cell yield in different subcutaneous adipose tissue depots*. *Cytotherapy*, 2007. **9**(5): p. 459-67.
141. Jurgens, W.J., et al., *Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies*. *Cell Tissue Res*, 2008. **332**(3): p. 415-26.
142. Hivernaud, V., et al., *Autologous fat grafting: A comparative study of four current commercial protocols*. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2017. **70**(2): p. 248-256.
143. Araco, A., et al., *Comparison of power water--assisted and traditional liposuction: a prospective randomized trial of postoperative pain*. *Aesthetic Plast Surg*, 2007. **31**(3): p. 259-65.
144. Prantl, L., et al., *Adipose Tissue-Derived Stem Cell Yield Depends on Isolation Protocol and Cell Counting Method*. *Cells*, 2021. **10**(5).
145. Alt, E., et al., *Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential*. *Biol Cell*, 2011. **103**(4): p. 197-208.
146. Melchels, F., et al., *CAD/CAM-assisted breast reconstruction*. *Biofabrication*, 2011. **3**(3): p. 034114.
147. Ha, J.F., et al., *Computer-Aided Design and 3-Dimensional Printing for Costal Cartilage Simulation of Airway Graft Carving*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2017. **156**(6): p. 1044-1047.
148. Rotbaum, Y., et al., *Quasi-static and dynamic in vitro mechanical response of 3D printed scaffolds with tailored pore size and architectures*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019. **96**: p. 176-182.
149. Leon, L.y., *New perspectives in mercury porosimetry*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 1998. **76-77**: p. 341-372.
150. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. *Biomaterials*, 2005. **26**(27): p. 5474-91.
151. Takahashi, Y. and Y. Tabata, *Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2004. **15**(1): p. 41-57.
152. Hulbert, S.F.e.a., *Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1970. **4**(3): p. 433-456.
153. Domingos, M., et al., *The first systematic analysis of 3D rapid prototyped poly(epsilon-caprolactone) scaffolds manufactured through BioCell printing: the effect of pore size and geometry on compressive mechanical behaviour and in vitro hMSC viability*. *Biofabrication*, 2013. **5**(4): p. 045004.
154. Akay, G., M.A. Birch, and M.A. Bokhari, *Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro*. *Biomaterials*, 2004. **25**(18): p. 3991-4000.
155. Klenke, F.M., et al., *Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo*. *J Biomed Mater Res A*, 2008. **85**(3): p. 777-86.
156. Wang, M.O., et al., *Evaluating changes in structure and cytotoxicity during in vitro degradation of three-dimensional printed scaffolds*. *Tissue Eng Part A*, 2015. **21**(9-10): p. 1642-53.
157. Olivares, A.L. and D. Lacroix, *Simulation of cell seeding within a three-dimensional porous scaffold: a fluid-particle analysis*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012. **18**(8): p. 624-31.
158. Graham, M.E., et al., *Development and characterization of decellularized human nasoseptal cartilage matrix for use in tissue engineering*. *Laryngoscope*, 2016. **126**(10): p. 2226-31.
159. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. *Biomaterials*, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
160. Popov, C., et al., *Integrins alpha2beta1 and alpha11beta1 regulate the survival of mesenchymal stem cells on collagen I*. *Cell Death Dis*, 2011. **2**: p. e186.
161. Liao, H.T., J.P. Chen, and M.Y. Lee, *Bone Tissue Engineering with Adipose-Derived Stem Cells in Bioactive Composites of Laser-Sintered Porous Polycaprolactone Scaffolds and Platelet-Rich Plasma*. *Materials (Basel)*, 2013. **6**(11): p. 4911-4929.

162. Brachvogel, B., et al., *Comparative proteomic analysis of normal and collagen IX null mouse cartilage reveals altered extracellular matrix composition and novel components of the collagen IX interactome*. J Biol Chem, 2013. **288**(19): p. 13481-92.
163. Gao, L., et al., *Effects of solid acellular type-I/III collagen biomaterials on in vitro and in vivo chondrogenesis of mesenchymal stem cells*. Expert Rev Med Devices, 2017. **14**(9): p. 717-732.
164. Zhong, L., et al., *The Regulatory Role of Signaling Crosstalk in Hypertrophy of MSCs and Human Articular Chondrocytes*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(8): p. 19225-47.
165. Guerrerosantos, J., *Nose and paranasal augmentation: autogenous, fascia, and cartilage*. Clin Plast Surg, 1991. **18**(1): p. 65-86.
166. Winnier, G.E., et al., *Isolation of adipose tissue derived regenerative cells from human subcutaneous tissue with or without the use of an enzymatic reagent*. PLoS One, 2019. **14**(9): p. e0221457.

7.2. Publikationen

Fachzeitschriften

1. Blum J.C., Schenck T.L, Birt A., Giunta R.E., Wiggenhauser P.S., "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.

Anhang

2. Kuhlmann C, Blum J.C., Schenck T.L., Giunta R.E., Wiggenhauser P.S. "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).
3. Wiggenhauser P.S., Kuhlmann C, Blum J, Giunta R.E., Schenck T., "Influence of software parameters on measurements in automatized image-based analysis of fat tissue histology." *Acta Histochem*, 2020. 122(4): p. 151537.

Vorträge

1. Kuhlmann C, Schenck T.L., Blum J.C., Giunta R.E., Wiggenhauser P.S. "Auswirkungen der Körpermorphologie und des Lebensstils auf die Qualität von Adipose tissue derived Stem Cells (ASCs)" (2019) 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen (DGPRÄC)
2. Wiggenhauser P.S., Blum J.C., Giunta R.E., Schenck T.L., "Einfluss von klinischen Faktoren auf die Qualität von Fettgewebstammzellen" (2021) 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen (DGPRÄC)

7.3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Meine Dissertation wäre ohne fachliche, kollegiale und freundschaftliche Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen.

Aus diesem Grund möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. med. T. L. Schenck für die Unterstützung und Rahmenbedingungen, die diese Promotion ermöglichten, bedanken. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Danken möchte ich besonders meinem Betreuer Dr. med. P.S. Wiggenhauser für die thematische Findung, Denkanstöße und die großartige Unterstützung hinsichtlich der Planung der Versuche. Die zahlreichen Gespräche auf intellektueller und persönlicher Ebene werden mir immer als bereichernder und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben.

Ein besonderer Dank geht an Frau A. Birt, die mich seit meiner ersten Stunde im Labor begleitet und ich in die Laborarbeit eingeführt hat. Aus ihrer großen Erfahrung stand sie mir mit Rat und Tat beiseite und hat mich stets motiviert und unterstützt.

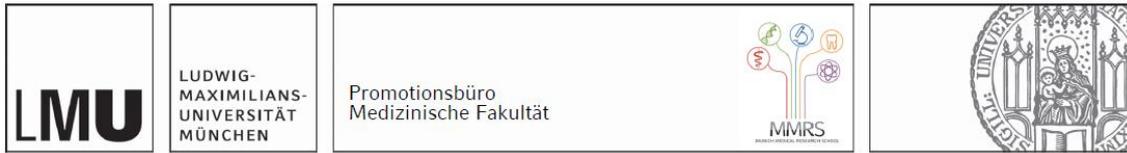
Ich möchte mich bei allen anderen Kolleg*innen aus dem Labor für fachliche Hilfestellungen und die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ebenfalls danke ich den Patienten und Patientinnen, die der Verwendung von Gewebeproben für Forschungszwecke zugestimmt haben und somit diese Arbeit ermöglichten.

Besonders meinen lieben Eltern und meinem Bruder für die unaufhörliche und liebevolle Unterstützung und Geduld danken. Meine Eltern förderten und unterstützen mich während meines gesamten Studiums und haben mit damit erst diese Dissertation ermöglicht.

Abschließend danke ich noch allen, die nicht explizit erwähnt wurden und mich in den Jahren der Doktorarbeit begleitet haben.

7.4. Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Jana Carina Blum

Name, Vorname

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

Bioaktivierung von 3D gedruckten Implantaten zur Anwendung in der kraniofazialen
Rekonstruktion

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

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

Ulm, 10.01.2024

Ort, Datum

Jana Carina Blum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand