

Aus der Hals-, Nasen-, Ohren-Klinik und Poliklinik - Plastische Operationen  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tissue-Engineering 3D-gedruckter Polylactid-Knorpel-Implantate – ein translationales  
Forschungsprojekt zum individualisierten chirurgischen Verschluss von Septum-  
Perforationen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Felix Karl Ludwig Kaudela  
aus Freiburg im Breisgau

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Tag der Promotion: 04. Juli 2024

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Problem und Zielsetzung .....	1
<b>2 Literaturdiskussion</b> .....	<b>4</b>
2.1 Nasenscheidewand und Chondrozyten.....	4
2.1.1 Knorpelstruktur der Nase .....	4
2.1.2 Chondrozyten .....	5
2.2 Pathologien des nasalen Knorpels .....	9
2.2.1 Allgemeine Pathologien.....	9
2.2.2 Knorpeldefekte der Nasenscheidewand.....	11
2.3 <i>Tissue-Engineering</i> .....	13
2.3.1 Allgemein.....	13
2.3.2 Geschichte des <i>Tissue-Engineering</i> .....	14
2.3.3 <i>Tissue-Engineering</i> von Knorpel .....	15
2.3.4 <i>Tissue-Engineering</i> des Nasen-Septums .....	17
2.4 PLA und 3D-Druck.....	20
2.4.1 Allgemein.....	20
2.4.2 PLA.....	20
2.4.3 3D-Druck .....	23
2.4.4 Cura Ultimaker 2+ .....	24
2.5 Evaluation der Eigenschaften von Knorpelgewebe .....	25
2.5.1 Bedeutung für das <i>Tissue-Engineering</i> .....	25
2.5.2 EZM.....	25
2.5.3 Zellen und Struktur .....	26
2.5.4 Mechanische Eigenschaften .....	26
2.5.5 Veränderungen des Septum-Knorpels mit dem Alter .....	27
2.6 Zielsetzung .....	28
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.1 Material.....	29
3.1.1 Chondrozyten .....	29
3.1.2 Chemikalien, Antikörper und Lösungen .....	29
3.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	31
3.1.4 Geräte und Werkzeuge .....	33
3.2 Methoden.....	36
3.2.1 Versuchsablauf.....	36

3.2.2	PLA- <i>Scaffolds</i> .....	37
3.2.3	Patienten-individuelle <i>Scaffolds</i> .....	40
3.2.4	Isolation der Chondrozyten .....	45
3.2.5	Zellkultur .....	47
3.2.6	Besiedlung der PLA- <i>Scaffolds</i> .....	48
3.2.7	<i>AlamarBlue</i> -Assay.....	51
3.2.8	DAPI- und <i>Rhodamine-6G</i> -Färbungen der besiedelten <i>Scaffolds</i> .....	52
3.2.9	Fixieren und Einbetten der besiedelten <i>Scaffolds</i> .....	53
3.2.10	Hämatoxylin/Eosin-Färbung der besiedelten <i>Scaffold</i> -Schnitte .....	54
3.2.11	Safranin-O-Lichtgrün-Färbung der besiedelten <i>Scaffold</i> -Schnitte.....	54
3.2.12	Quantifizierungsmethode der HE- und der Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen .....	55
3.2.13	Zellzählung nach Ablösen der Zellen von den besiedelten <i>Scaffolds</i> mit TE.....	56
3.2.14	Proteinbestimmung der besiedelten <i>Scaffolds</i> .....	57
3.2.15	Kollagen-II-Färbung der Deckgläser .....	58
3.2.16	Statistische Auswertung .....	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>60</b>
4.1	Allgemein.....	60
4.1.1	Form und Struktur der <i>Scaffolds</i> .....	61
4.2	Entwicklung der Zellzahlen in 2D-Kultur.....	62
4.3	Zellviabilitätsmessung der <i>Scaffold</i> -kultivierten Chondrozyten mit dem <i>AlamarBlue</i> -Assay.....	68
4.4	Bestimmung des Proteingehalts der besiedelten <i>Scaffolds</i> .....	72
4.5	Bestimmung der Zellzahl der besiedelten <i>Scaffolds</i> mit TE und Durchlichtmikroskopische Aufnahmen .....	74
4.6	Prozentuale DAPI-Färbung der <i>Scaffold</i> -Oberfläche .....	78
4.7	<i>Rhodamine-6G</i> -Färbung.....	81
4.8	Klassifizierung der besiedelten <i>Scaffolds</i> anhand der Zelldichte nach HE-Färbung .....	82
4.9	Klassifizierung der besiedelten <i>Scaffolds</i> anhand der Zelldichte nach Safranin-O-Lichtgrün-Färbung.....	87
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>93</b>
5.1	Primärkultur von septalen Chondrozyten .....	93
5.2	Produktion der PLA- <i>Scaffolds</i> .....	95
5.3	Evaluation des Wachstums der Chondrozyten auf PLA- <i>Scaffolds</i> .....	96
5.3.1	Zellzählung der besiedelten <i>Scaffolds</i> mit TE .....	97
5.3.2	Bestimmung des Proteingehalts der besiedelten <i>Scaffolds</i> .....	98
5.3.3	<i>AlamarBlue</i> -Assay der besiedelten <i>Scaffolds</i> .....	100
5.3.4	DAPI- und <i>Rhodamine-6G</i> -Färbungen der besiedelten <i>Scaffolds</i> .....	102

5.3.5	HE-Färbungen der <i>Scaffold</i> -Schnitte .....	103
5.3.6	Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen der <i>Scaffold</i> -Schnitte .....	104
5.4	Zusammenfassung der Auswirkungen von Wachstumsfaktoren.....	105
5.4.1	Auswirkungen in der 2D-Kultur.....	105
5.4.2	Auswirkungen in der 3D-Kultur.....	105
5.5	PLA-Scaffolds – Evaluation als Stützsubstanz und der Mikrostruktur .....	107
5.6	Besiedlungsdauer der Scaffolds .....	109
5.7	Ausblick .....	110
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>124</b>

## Abkürzungsverzeichnis

PLA	Polylactid
WF	Wachstumsfaktoren
IGF-1	<i>Insulin-like-Growth-Factor-1</i>
TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming-Growth-Factor-<math>\beta</math>/ Transforming-Growth-Factor-<math>\beta</math>1</i>
bFGF-2	<i>Basic-Fibroblast-Growth-Factor-2</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
PG	Proteoglykane
GAG	Glykosaminoglykane
HE	Hämatoxylin-Eosin
ENS	<i>Empty-Nose-Syndrom</i>
VEGF	<i>Vaskular-Endothelial-Growth-Factor</i>
CAD	<i>computer aided design</i> (Computer-gestützte 3D-Design-Software)
FDM	<i>Fused Deposition Modeling</i>
ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol
PLLA	Poly-L-Milchsäure
PDLA	Poly-D-Milchsäure
PDLLA	Poly-DL-Milchsäure
PET	Polyethylenterephthalat
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
EVG	Elastin-Van-Gieson-Färbung
<i>non-WF-Scaffold</i>	mit Chondrozyten ohne WF-Einfluss besiedelter und kultivierter <i>Scaffold</i>
<i>WF-Scaffold</i>	mit Chondrozyten unter WF-Einfluss besiedelter und kultivierter <i>Scaffold</i>
FCS	<i>Bovine Calf Serum</i> (fetales Kälberserum)
DMEM/F-12 oder Kulturmedium	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium F12</i>
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
TE	Trypsin-EDTA
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride</i>

BSA	bovines Serumalbumin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
G	<i>Gauge</i>
U/Min.	Umdrehungen/Minute
PFA	Paraformaldehyd
T25-Zellkulturflaschen	25 cm <sup>2</sup> Grundfläche Zellkulturflasche
T75-Zellkulturflaschen	75 cm <sup>2</sup> Grundfläche Zellkulturflasche
T175-Zellkulturflaschen	175 cm <sup>2</sup> Grundfläche Zellkulturflasche
DNS	Desoxyribonukleinsäure
MIA	<i>multiple image alignment</i>
NaCl	Natrium-Chlorid
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Knorpelstrukturen der Nase .....	5
Abbildung 2: Kultivierungs-Schema für die Chondrozyten auf den PLA-Scaffolds ....	36
Abbildung 3: Scaffold-Planungsmodell mit Maßen .....	37
Abbildung 4: Druckvorschau für einen 300 µm-Scaffold in Cura .....	38
Abbildung 5: Cura Ultimaker 2+ während des Druckvorgangs .....	39
Abbildung 6: 300 µm-Scaffold von oben unter 40-facher Vergrößerung.....	40
Abbildung 7: 3D-Scan der Septum-Perforation .....	41
Abbildung 8: Design-Prozess des individualisierten 300 µm-Scaffolds .....	42
Abbildung 9: Individualisierter 300 µm-Scaffold mit Mikrostruktur .....	43
Abbildung 10: Maße des individualisierten 300 µm-Scaffolds.....	44
Abbildung 11: Gedruckter individualisierter 300 µm-Scaffold .....	45
Abbildung 12: Besiedlungszeitpunkt der Scaffolds .....	51
Abbildung 13: Vier Klassen der Klassifizierungsskala .....	55
Abbildung 14: 200 µm-Scaffold vor und nach der Sterilisation .....	61
Abbildung 15: 3D-gedruckte individualisierte 300 µm-Scaffolds .....	62
Abbildung 16: Prozentualer Zuwachs pro Tag in Zellkultur ohne und mit WF .....	64
Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkultur ohne WF im zeitlichen Verlauf.....	65
Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkultur mit WF im zeitlichen Verlauf.....	65
Abbildung 19: Kollagen-II-Färbungen der ohne und mit WF besiedelten Deckgläser.....	68
Abbildung 20: Zellviabilität/Zellmetabolismus auf den besiedelten Scaffolds .....	70
Abbildung 21: Vergleich der Zellviabilitäten der 3 Scaffold-Größen.....	71
Abbildung 22: Verhältnis von gemessener Zellviabilität zu ermittelter Zellzahl der besiedelten Scaffolds .....	72
Abbildung 23: Proteinkonzentrationen der besiedelten Scaffolds im zeitlichen Verlauf .....	73
Abbildung 24: DAPI-Färbungen der ehemals besiedelten Scaffolds nach Lyse und Proteinkonzentrationsbestimmung.....	74
Abbildung 25: Zellzahlen auf den besiedelten Scaffolds mit TE bestimmt.....	75
Abbildung 26: DAPI-Färbungen der ehemals besiedelten Scaffolds nach Lyse mit TE und Zellzahlbestimmung .....	76
Abbildung 27: Zellzahlen auf den besiedelten 300 µm-Scaffolds mit TE wöchentlich bestimmt.....	77
Abbildung 28: Durchlicht-mikroskopische Aufnahmen der besiedelten 300 µm-Scaffolds im zeitlichen Verlauf .....	78
Abbildung 29: Prozentualer Oberflächenanteil der DAPI-gefärbten besiedelten Scaffolds .....	79
Abbildung 30: Verlauf der DAPI-Färbungen der besiedelten 300 µm-Scaffolds .....	80
Abbildung 31: Vergleich der prozentualen DAPI-Färbungen der 3 besiedelten Scaffold-Größen .....	81
Abbildung 32: Klassifizierung der besiedelten Scaffolds anhand der Zelldichte nach HE-Färbung.....	84
Abbildung 33: Zeitlicher Verlauf der HE-Färbungen der besiedelten 300 µm-Scaffolds .....	85
Abbildung 34: Woche 10 der HE-Färbungen der besiedelten 300 µm-Scaffolds.....	86
Abbildung 35: Klassifizierung der besiedelten Scaffolds anhand der Zelldichte nach Safranin-O-Lichtgrün-Färbung .....	89

Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf der Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen besiedelter 300 µm-Scaffolds .....	91
Abbildung 37: Woche 10 der Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen besiedelter 300 µm- Scaffolds .....	92

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Anzahl der besiedelten Scaffolds pro Auswerteverfahren.....	49
--	----

# 1 Einleitung

## 1.1 Problem und Zielsetzung

Die menschliche Nase als primäres Organ des oberen Atemweges vereint verschiedene Funktionen. Dazu gehören die Reinigung, Befeuchtung und Erwärmung der eingeatmeten Luft. Außerdem erfolgt eine chemische Analyse der Atemluft durch olfaktorische Reize und eine biologische Kontrolle durch die antibakteriellen Bestandteile des Schleims, der ihre Oberfläche bedeckt. Die Nasenhöhle und die Nasennebenhöhlen spielen zudem eine Rolle bei der Artikulation der Nasallaute während der Sprachbildung. Zusätzlich ist das rudimentäre Vomeronasalorgan an der zwischenmenschlichen Kommunikation durch Pheromone beteiligt.(1) Um all diese Funktionen zu erfüllen, besteht die Nase neben dem äußeren Hautmantel und einer mucosalen Auskleidung aus einem knorpeligen und knöchernen Gerüst. Dabei teilt sich der Nasenknorpel in die äußeren und die inneren Anteile auf. Den äußeren Anteil des Knorpelgerüsts bilden der Flügelknorpel und der laterale Knorpel mit ihren verschiedenen Anteilen. Die inneren Anteile bestehen aus dem knorpeligen Nasen-Septum und dem knöchernen Nasen-Septum.(1)

Es gibt verschiedenste Pathologien des Nasenknorpels; diese sind bedingt durch erworbene Ursachen wie Operationen, Entzündungen, Traumata und Malignome sowie kongenitale Fehlbildungen. Sie führen zu funktionellen und ästhetischen Einschränkungen.(2) Defekte können unterschiedliche Auswirkungen haben, darunter kosmetische Beeinträchtigungen, Störungen des endonasalen Luftflusses und wiederkehrende Komplikationen wie Nasennebenhöhlenentzündungen und Nasenbluten, welche die Lebensqualität erheblich beeinträchtigen können.(2) Pathologien des Nasenknorpels können sowohl iatrogen durch Operationen verursacht sein oder in physischen oder chemischen Traumata ihren Ursprung haben. Daneben können neoplastische Läsionen oder entzündliche Ursachen bakterieller oder autoimmuner Natur zu einer relevanten Krankheitslast führen. Auch Anomalitäten des endonasalen Luftflusses, einschließlich der atrophischer Rhinitis und dem *Empty-Nose-Syndrom* (ENS), sind als relevante Krankheitsbilder mit engem Bezug zum Zustand des nasalen Knorpelgerüsts zu berücksichtigen.(3, 4)

Gesichtsdeformitäten, bedingt durch Traumata, angeborene Fehlbildungen oder postoperative Folgen, können die soziale Einbindung erheblich beeinträchtigen und haben weitreichende Folgen. Diese reichen bis hin zur Beschäftigungsunfähigkeit und einer eingeschränkten Vertrauenswürdigkeit.(5) Der Stellenwert einer als attraktiv empfundenen

Nase manifestiert sich nicht zuletzt darin, dass die Rhinoplastik eine der weltweit häufigsten durchgeführten plastischen Operationen ist.(6)

Eine der häufigsten Pathologien des knorpeligen Nasengerüsts ist die Septum-Perforation. Konkret handelt es sich dabei um einen Defekt der nasalen Mucosa und des dahinterliegenden knorpeligen Septums. Dies kann durch Veränderung des nasalen Luftflusses zu einer verminderten Funktionalität der Nase führen. Ätiologisch sind Nasenoperationen, iatrogene Eingriffe, Traumata und maligne Tumore am häufigsten kausal mit dem Auftreten dieses Krankheitsbildes assoziiert.(7-9) Laut Studien bewegt sich die Prävalenz in Europa etwa um die 0,9 %.(10) Dabei ist sie aber insbesondere nach Operationen an der Nasenscheidewand deutlich erhöht.(11)

Chirurgische Eingriffe zur Korrektur des Nasenknorpels umfassen Frakturkonstruktionen, Septum-Plastiken und Rhino-Plastiken. Diese erfordern alle eine Modifikation des nativen Nasenknorpels. Das erfordert in vielen Fällen die Verwendung von Knorpeltransplantaten.(12) Mannigfaltige Techniken zum chirurgischen Verschluss wurden in der Vergangenheit in der Fachliteratur publiziert.(13) Letztlich fehlen jedoch belastbare Zahlen zu Erfolgs- und Misserfolgsraten, was auch der Heterogenität der Pathologien sowie der verwendeten Techniken geschuldet ist.(14) Es treten vergleichsweise hohe Komplikationsraten, Revisionsraten und eine hohe Patientenunzufriedenheit auf.(15, 16) Darüber hinaus besteht nachweislich ein Mangel an geeigneten Transplantatmaterialien zur Korrektur von Nasendeformitäten.(17) Verschiedene Materialien, darunter autologer Ohr- und Rippenknorpel, Mukoperichondriallappen und andere autologe Gewebe sowie synthetische Materialien wie Silikon, werden heutzutage zum Verschluss von Nasenknorpeldefekten verwendet.(18-22) Die autologen Transplantate sind den anderen Materialien zwar histologisch überlegen, aber durch begrenzte Verfügbarkeit und Entnahmestellenmorbidity limitiert.(23) Die Anwendung von Silikon und anderen Kunststoffen als Alternative ist durch hohe Infektions- und Extrusionsraten limitiert.(22, 24) Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die hergebrachten Verfahren infrage zu stellen und nach neuen Verfahren zu suchen. Ziel dieser Arbeit ist es, für Pathologien der Nasen, die mit einem Knorpeldefekt einhergehen (insbesondere die Septum-Perforation), ein formstabiles Ersatzmaterial zu entwickeln, um die Morbidity und Limitationen autologer *Grafts* zu umgehen. Dies soll mittels *Tissue-Engineering* geschehen. *Tissue-Engineering*-Strategien haben zum Ziel, geschädigte Gewebe durch eine Kombination aus spezifischen Zelltypen, Gerüstmaterialien und Stimuli, etwa in Form von Wachstumsfaktoren (WF), zu ersetzen oder wiederherzustellen.(25)

Diese drei genannten Komponenten sind die Variablen, die die *in vitro*-Erzeugung hyalinen Knorpels maßgeblich beeinflussen können. Als Zellquelle wird menschlicher Septum-Knorpel verwendet, der bei Septum-Plastiken in der HNO-Klinik der Universitätsmedizin Mainz anfällt. Für die Gerüststruktur wird das biologisch abbaubare Biopolymer Polylactid (PLA) verwendet, welches von einem 3D-Drucker individualisiert in Form gedruckt werden kann. Dadurch kann perspektivisch für jeden Patienten individualisiert ein passendes Transplantat geschaffen werden. Als Stimulus kommen laut Literatur verschiedene Möglichkeiten wie WF, Thrombozyten-reiches-Plasma, mechanische Spannung, hydrostatischer Druck, Durchfluss- sowie Rotations-Bioreaktoren und weitere infrage.(12, 26-28) Diese Arbeit konzentriert sich auf die Verwendung verschiedener WF. Das Zellkulturmedium wird auf Basis von Vorarbeiten der Universität Basel (Fulco *et al.*) (29) mit einer Kombination aus *Insulin-like-Growth-Factor-1* (IGF-1), *Transforming-Growth-Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), *basic-Fibroblast-Growth-Factor-2* (bFGF-2) und Ascorbat versetzt.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein Verfahren zur Generierung eines 3D-gedruckten Patienten-individualisierbaren autologen PLA-Knorpel-Transplantats zu entwickeln. Dabei sollen folgende Punkte im Speziellen untersucht werden:

1. Ist die In-Kulturnahme und Expansion von septalen Chondrozyten aus Septum-Knorpelproben möglich?
2. Vergleich der Wachstumsformen von Chondrozyten in 2D- und 3D-Kultur.
3. Hat die Mikrostruktur der PLA-*Scaffolds* Einflüsse auf die zelluläre Besiedelung und mit welcher Mikrostruktur lässt sich die suffizienteste Besiedelung realisieren?
4. Welche Kombination aus WF bewirkt *in vitro* eine dem nativen hyalinen Knorpel möglichst ähnliche Differenzierung?
5. Verfeinerung von Möglichkeiten zur Evaluation von *in vitro* erzeugten PLA-Knorpel-Transplantaten.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Nasenscheidewand und Chondrozyten

#### 2.1.1 Knorpelstruktur der Nase

Die äußere Nase setzt sich aus verschiedenen stützenden und formgebenden Kompartimenten zusammen. Man differenziert zwischen dem äußeren Haut- und Weichteilmantel, dem Stützgerüst aus Knorpel und Knochen und der inneren Mucosa samt dem submucosalen Bindegewebe. So differenziert man den Septum-Knorpel vom oberen paarigen *lateralen* Knorpel und dem unteren paarigen *Alar*-Knorpel (Abb. 1). Diese drei Strukturen bestehen alle vollständig aus hyalinem Knorpel, welcher eine Unterform des allgemeinen Knorpelgewebes darstellt.(12) Der *Alar*-Knorpel teilt man nochmals anatomisch auf in den *Cartilago alaris major* mit *Crus mediale* und *laterale* und die *Cartilagines alares minores*. *Lateralen* Knorpel und Septum-Knorpel bilden unter anatomischen Gesichtspunkten eine Einheit. Diese Einheit besteht aus dem *Cartilago septodorsalis pars triangularis* (*lateralen* Knorpel) und dem *Cartilago septodorsalis pars septalis* (Septum-Knorpel oder auch *Cartilago quadrangularis septi nasi* genannt).(3) Der Nasen-Knorpel steht mit den assoziierten Knochenstrukturen (*Vomer*, *Lamina perpendicularis ossis ethmoidalis*, *Apertura piriformis*) in Verbindung und dient neben der Funktion als Stützgerüst der äußeren Nase auch als Trennwand der *anterioren* nasalen Kompartimente.

Die strukturelle Unversehrtheit dieses Nasenknorpels ist für die Funktion der Atemwege von entscheidender Bedeutung, da die Nase der einzige Weg ist, über den die Lunge weitgehend unabhängig von den externen Bedingungen gleichmäßig mit befeuchteter, erwärmter und gereinigter Luft versorgt wird.(3, 13, 30) Für die Funktion der Nase entscheidend ist die Verbindung zwischen dem Flügel- und Seitenknorpel sowie deren Position relativ zur Nasenscheidewand. Dieser Bereich bildet den engsten Querschnitt der Nasenhöhle, weshalb er auch die Nasenklappe oder *Limen nasi* genannt.(3) Diese Nasenklappe fungiert als „*flow-limiting-segment*“ für den nasalen Luftfluss. Sie bestimmt Geschwindigkeit, Richtung und Widerstand und somit die Form des Einatemstroms. Die Düsenwirkung bei der Einatmung sorgt für eine gleichmäßige Verteilung der Atemluft in Form einer turbulenten Strömung über die gesamte Fläche der Nasenschleimhaut. Dadurch ermöglicht sie erst die effiziente Funktion der Nase. Bei einer ausschließlich laminaren Strömung würden die Wand-fernen Strömungsanteile der Atemluft kaum in Kontakt mit der Nasenschleimhaut kommen und die Nase könnte so ihrer Funktion nicht nachkommen.(3) So werden im Nasenrachenraum weitgehend konstante klimatische Bedingungen geschaffen. Durch die vorgeschaltete Erwärmung durch die Nasenschleimhaut beträgt die Temperatur der Atemluft im Rachenraum 32–34 °C und die eingeatmete Luft ist wasserdampfgesättigt. Dabei stammt

die Hälfte der Flüssigkeit aus dem Sekret der Nase. Bei der Ausatmung wird Feuchtigkeit zurückgewonnen und im Vergleich zur ausschließlichen Mundatmung verliert der Körper so weniger wertvolle Flüssigkeit.(3) Zudem vermag der Nasenschleim bis zu 70 % der eingeatmeten Staubpartikel zu binden.(3) Ein zusätzlicher Effekt ist, dass bei der Ausatmung durch die Nase die sauerstoffarme Ausatemluft durch die Beschleunigung im Bereich der Nasenklappe von den Nasenlöchern wegtransportiert wird, wodurch ein erneutes Einatmen verhindert werden kann.(3) Zur Mundatmung wird erst bei sehr hohen benötigten Atemminutenvolumina übergegangen. Dies ist der Fall, wenn das Atemminutenvolumen 60 L/Min. übersteigt. Dadurch wird das Austrocknen der Nasenschleimhaut durch Feuchtigkeits- und Wärmeverlust verhindert.(3)

Der genaue Aufbau der zueinander in Beziehung stehenden Strukturen der Nase ist von elementarer Bedeutung für das Design des Knorpeltransplantats, da nur mit einer intakten wiederhergestellten Struktur auch die ursprüngliche Funktion der Nase wiederhergestellt werden kann. Also muss sich die Größe und Form des Neoknorpels an dem nativen Aufbau des Nasenknorpels orientieren, welcher in Abbildung 1 schematisch abgebildet wird.(12)

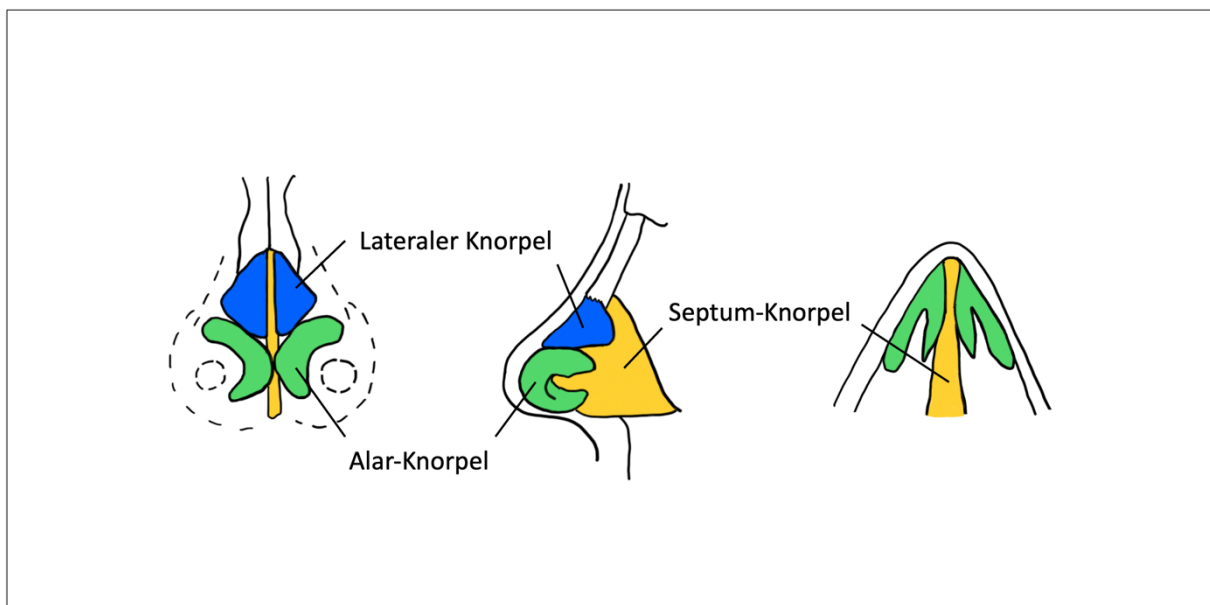


Abbildung 1: **Schematische Darstellung der Knorpelstrukturen der Nase**

Links frontale Ansicht, Mitte seitliche mediane Ansicht, Rechts transversale Ansicht. Abbildung adaptiert nach Griffin et. al.(31)

## 2.1.2 Chondrozyten

In der Literatur wird Knorpelgewebe bezeichnet als ein Gewebe, welches aus Chondrozyten und extrazellulärer Matrix (EZM) besteht (32), deren Hauptbestandteile Proteoglykane (PG)

und Kollagenfibrillen sind.(33) PG sind gewaltige Moleküle, bestehend aus einem Proteinkern (ca. 5 %) und daran kovalent gebundenen langen, unverzweigten Polysaccharid-Ketten (bis zu 95 %), die Strukturgeweben Viskosität und Elastizität verleihen.(34) Knorpel hat eine feste Konsistenz und verschiedene mechanische Eigenschaften, darunter die Druckverformbarkeit und die Fähigkeit nach dem Druck wieder in seine eigentliche Form zurückzukehren. Die Literatur bezeichnet diese Fähigkeit als Druckelastizität.(33) Zwischen den PG und Kollagenfibrillen gibt es Wechselwirkungen, worauf diese Fähigkeit zurückzuführen ist. Sie ist entscheidend für die Funktion des Knorpels als Stützgewebe.(33) Es gibt verschiedene Formen von Knorpel, welche unterschiedliche Funktionen im Körper erfüllen und sich deshalb in der Zusammensetzung ihrer EZM unterscheiden. Die nasalen Knorpelanteile bestehen ausschließlich aus hyalinem Knorpel. Der hyaline Knorpel ist von allen drei Knorpelarten die häufigste Form im menschlichen Körper. Zusätzlich zum Vorkommen in der Nase kommt er ebenso an den Rippen, in den Gelenken und während der Entwicklung im Primordial-Skelett vor.(35) Kollagen Typ II ist der vorherrschende Kollagentyp im hyalinen Knorpel.(32) Abgesehen davon gibt es noch Faserknorpel, der zusätzliche Kollagen Typ I Fasern enthält und beispielsweise in den Zwischenwirbelscheiben der Wirbelsäule vorkommt. Überdies existiert noch elastischer Knorpel, der elastische Fasern und Kollagen Typ II (32) aufweist und etwa das Stützgerüst der Ohrmuschel bildet.(33)

Die Entwicklung und das Wachstum von knorpeligen Strukturen beginnen mit der Differenzierung von Mesenchym-Zellen zu Chondroblasten. Die Mesenchym-Zellen bilden eine sphärische Form, aggregieren und teilen sich.(32) Sie produzieren die Füllsubstanz des Knorpels, die Knorpelmatrix, und beginnen sich zu Chondrozyten zu entwickeln. Dieser Prozess stellt eine von zwei Wachstumsformen des Knorpels dar.(33) Genannt wird sie interstitielles Wachstum, da die zukünftigen Chondrozyten durch die produzierte EZM zunehmend auseinander gedrängt werden. Dieses Wachstum geschieht hauptsächlich vor der Geburt und in der Kindheit in den Wachstumsplatten der Knochen.(33) Nachdem die Chondrozyten das interstitielle Wachstum beendet haben, sind sie gruppiert und nur durch schmale Matrix-Septen voneinander getrennt. Die Form nennt man isogene Gruppen, welche verteilt in der EZM liegen.(32) Das oberflächliche Mesenchym differenziert sich während der Knorpelbildung zu Fibroblasten. Diese bilden das Perichondrium, welches die Grenzschicht des Knorpels nach außen darstellt.(32) Zusätzlich bildet das Perichondrium einen Ort der Regeneration und des Wachstums für den Knorpel, da hier undifferenzierte Zellen verbleiben, die sich zu neuen Chondroblasten entwickeln können. Diese sind wiederum verantwortlich für die zweite Wachstumsform des Knorpels, welche appositionelles Wachstum genannt wird. Hierbei wird die neue Knorpelmatrix auf der Oberfläche des

bestehenden Knorpels abgelagert, wodurch das Dickenwachstum ermöglicht wird. Es ist zu beachten, dass die ausdifferenzierten, gesunden Chondrozyten normalerweise keine Zellteilung mehr durchführen. Dieser Prozess spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und dem Wachstum von Knorpelstrukturen im Organismus.(33)

Zusammenfassend besteht das Knorpelgewebe also aus rundlich/ovalen Chondrozyten, EZM und dem Perichondrium. Die Chondrozyten können in isogenen Gruppen oder vereinzelt.(33) Histologisch erkennt man eine Matrix ohne erkennbare Strukturen, in welcher Chondrozyten vereinzelt oder in Gruppen liegen. Die Matrix erscheint strukturlos, da die Kollagenfibrillen mit dem Lichtmikroskop schwer auszumachen sind.(33) Bei Färbung des Knorpels mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) stellt man bei der lichtmikroskopischen Betrachtung fest, dass sich um die Chondrozyten herum eine starke Basophilie zeigt.(32) Diese Basophilie um die Chondrozyten deutet auf den erhöhten Gehalt an polyanionischen PG hin.(33) Es gibt noch weitere histologische Begrifflichkeiten, die für die Beschreibung von Knorpelgewebe benutzt werden, darunter „Territorium“, „territoriale und interterritoriale Matrix“ und „Knorpelhöhle“.(32) Während des histologische Prozess kann es zum Zerfallen oder einer Veränderung der Form der Chondrozyten kommen, wodurch sich Räume oder Lücken im Gewebe bilden, welche „Knorpelhöhlen“ genannt werden. (32, 33) Die „territoriale Matrix“ ist die basophil gefärbte Matrix um einen Chondrozyten oder eine isogene Gruppe an Chondrozyten und bildet zusammen mit den Chondrozyten in ihr das „Territorium“.(32) Der Rest des Knorpelgewebes, bestehend aus weniger basophil gefärbter EZM zwischen den Territorien, bildet die „interterritoriale Matrix“.(32, 33)

Abgesehen vom Gelenkknorpel ist der hyaline Knorpel stets bedeckt vom Perichondrium. Dieses Perichondrium dient in erster Linie dem Schutz des Knorpelgewebes. Dazu besteht es aus zwei Schichten, welche nochmals spezifische Funktionen erfüllen.(32, 33) Die äußere Faserschicht wird *Stratum fibrosum* und die innere Zell-reiche Schicht *Stratum chondrogenicum* genannt. Erstere besteht aus festem Bindegewebe, welches für seine Funktion Kollagen Typ I (32) und Fibroblasten enthält. Dieses feste Bindegewebe dient in erster Linie dem Auffangen von Kräften, welche bei Druckbelastungen auf den Knorpel einwirken können. Somit verhindert diese äußere Schicht das leichte Brechen des Knorpels.(33) Dagegen erfüllt das innen liegende *Stratum chondrogenicum* eine andere Funktion: Da es Fibroblasten-ähnliche Chondroblasten enthält (32), ermöglicht es das appositionelle Wachstum des Knorpels. Somit kann diese Schicht aus Chondroblasten einer begrenzten Regeneration des Knorpels dienen.(33)

Der hyaline Knorpel hat keine eigenen internen Blutgefäße zur Versorgung. Die Blutgefäße reichen nur bis zu dem den Knorpel umgebenden Perichondrium, wovon ausgehend der Knorpel über Diffusion versorgt wird. Dies geschieht durch die Knorpelmatrix hindurch, wobei Entfernungen von mehreren Millimetern überwunden werden müssen.(33) Dies ist bei der Planung der verwendeten *Scaffolds* ein entscheidender Faktor, da bei einem zu dicken *Scaffold* eine Unterversorgung der Zellen im Inneren zu erwarten wäre. Deshalb scheint, korrespondierend zu der zu ersetzenden Struktur, eine Transplantatdicke von wenigen Millimetern sinnvoll. Hyaliner Knorpel enthält keine Lymphgefäße und ist nicht innerviert.(32) Diese Eigenschaften sind in Bezug auf die Komplexität des *Tissue-Engineering* von vereinfachender Natur, da weder Gefäß- noch Nervenstrukturen integriert werden müssen. Die Chondrozyten im ausgereiften und gesunden Knorpel unterliegen wie oben erwähnt nicht mehr der Zellteilung. Stattdessen sind sie verantwortlich für den Matrixumsatz, welcher in einem stetigen, langsamen Prozess erfolgt.(33) Aufgrund des Fehlens einer eigenen Blutversorgung im Knorpelgewebe werden hauptsächlich anaerobe Stoffwechselprozesse durchlaufen, sodass Glukose vorwiegend zu Lactat abgebaut wird.(32) Die wechselnde Kompression und Dekompression des Knorpels bei Belastung erzeugt eine Pumpwirkung, die zur Konvektion von Extrazellulärflüssigkeit führt. So entsteht bei Belastung ein beschleunigter Transport von Wasser und darin gelösten Nährstoffen.(32)

In der Literatur wird angenommen, dass es aufgrund der fehlenden Vaskularisierung des Knorpels bei einer Gewebeverletzung nicht zum Einsetzen einer Entzündungsreaktion kommt und dadurch die daraus resultierende Reparatur verhindert wird. Auch die geringe Zellzahl und geringe Proliferationsfähigkeit der Chondrozyten kann Ursache für eine intrinsische Reparaturunfähigkeit sein, die zu Narbengewebe mit abweichenden mechanischen Eigenschaften und geringer Haltbarkeit führt.(36)

Die EZM des hyalinen Knorpelgewebes besteht, wie schon erwähnt, hauptsächlich aus Kollagenfibrillen und PG. Diese Kollagenfibrillen setzen sich vorwiegend aus Kollagen Typ II zusammen, ergänzt durch kleinere Mengen von Kollagen Typ IX und XI. Sie sind gleichmäßig in der Matrix verteilt.(32, 33) Zusätzlich zu den Kollagenfibrillen Typ II, IX und XI gibt es im Knorpelgewebe noch weitere Kollagenfibrillen. Diese bestehen aus Kollagen Typ VI und sind vorwiegend in der territorialen Matrix, welche auch perizelluläre Matrix genannt wird, direkt um die Chondrozyten konzentriert. Diese perizelluläre Matrix enthält noch weitere für die Chondrozytenfunktion wichtige Bestandteile. Hier befinden sich EZM-Rezeptoren, wie Integrine, welche die Chondrozyten mit der territorialen Matrix verbinden.(33) Dabei spielen ebenfalls Glykoproteine wie Chondronektin eine Rolle, indem sie die Haftung der Chondrozyten an Kollagenen bewirken.(32) Die PG im Knorpelgewebe sind hauptsächlich

vom Aggrecan-Typ, der Glykosaminoglykan-Ketten (GAG) aus Chondroitinsulfat und Keratansulfat enthält. Die Aggrecan-Monomere sind zu großen PG-Aggregaten kombiniert, indem bis zu 200 Stück davon mittels des Proteins Hyaluronan nicht-kovalent verknüpft werden.(32) Die Kollagenfibrillen sind ebenfalls mit den PG vernetzt.(33) Diese PG-Aggregate haben die Fähigkeit, Wasser und Ionen aufgrund der negativ geladenen Seitenketten der PG zu binden, die an das Zentralprotein gebunden sind. Der hohe Wassergehalt, der an diese negativen Ladungen gebunden ist, ermöglicht die Funktion des Knorpels als Stoßdämpfer oder biomechanische Feder.(32)

Die Aktivität der Chondrozyten unterliegt einer hormonellen Regulation. Laut Junqueira *et al.* wird die Synthese sulfatierter Seitenketten von PG durch *Growth-Hormon* aus der Adenohypophyse, Thyroxin und Androgene beschleunigt, während sie durch Glucocorticoide und Östrogene verlangsamt wird. Das Wachstum des Knorpelgewebes wird vorwiegend von *Growth-Hormon* gesteuert, welches durch eine gesteigerte Produktion von IGF-1 in der Leber das Knorpelwachstum fördert. (32)

## **2.2 Pathologien des nasalen Knorpels**

### **2.2.1 Allgemeine Pathologien**

Pathologien des Nasenknorpels sind mannigfaltig und resultieren in funktionellen wie ästhetischen Einschränkungen für das Individuum. Man unterscheidet dabei erworbene Ursachen wie Operationen, Traumata, Entzündungen und Malignome der Nase von angeborene Ursachen wie kongenitalen Fehlbildungen.(2) Iatrogene Schäden nach Nasenoperationen, Nasentraumata und neoplastischen Läsionen zählen zu den häufigsten Ursachen für Erkrankungen des Nasenknorpels. Ferner können Malignome wie Basaliome oder Plattenepithelkarzinome zu ausgedehnten Substanzdefekten der äußeren und inneren Nase führen.(29) Grundsätzlich können Defekte auf die äußere Nase begrenzt sein oder die endonasalen Strukturen einbeziehen. Sie können jeweils unterschiedliche Folgen haben, wie eine Störung des Luftflusses in der Nase oder kosmetische Beeinträchtigungen. Ein knorpeliger Defekt kann sowohl in einer Obstruktion des Luftflusses (z. B. bei Vernarbungen oder Septum-Querstand) als auch einem „intensivierten“ Luftfluss resultieren. Eine Obstruktion der nasalen Atemwege kann Ursache wiederkehrender Nasennebenhöhlenentzündungen, Nasenbluten, Schlaflosigkeit, Kopfschmerzen und Schlafapnoe sein. Dies sind Folgen, welche alle die Lebensqualität der Patienten erheblich beeinträchtigen können.(2) Demgegenüber kann durch die Veränderung der Knorpelstrukturen und der endonasale Anatomie ebenfalls ein pathologisch intensiver Luftfluss entstehen. Dieser kann in einem konsekutiven Austrocknen der Mucosa resultieren,

was in Krankheitsbildern wie der *Rhinitis sicca anterior* und der *Rhinitis atrophicans* mündet.(37)

Bei der *Rhinitis sicca anterior* handelt es sich um eine chronische Entzündung der Schleimhaut des vorderen unteren Nasen-Septums. Die betroffenen Patienten schildern Symptome wie eine trockene Nase, dünne Krusten, Erosionen und Ulcerationen. Mögliche Hypothesen zur pathophysiologischen Genese umfassen eine laminare Luftströmung durch die Nase aufgrund pathologischer Erweiterung im Bereich des *Limen nasi*. Aber auch andere Ursachen wie das Bohren in der Nase oder einwirkende Toxine sind möglich. Zur Behandlung der *Rhinitis sicca anterior* werden Emollienzen und Nasensprays genutzt.(37)

Die atrophische Rhinitis dagegen bezeichnet ein Krankheitsbild, bei welchem der Verlust des Flimmerepithels und der schleimbildenden Becherzellen zur Austrocknung und zunehmenden Verkrustung der nasalen Mucosa führt. Die Ursachen umfassen chronische Entzündungsprozesse sowie exogene (Umweltbelastung, mechanische Einflüsse wie ein „bohrender Finger“) und endogene Ursachen (z. B. Septum-Deviation, operative Entfernung von Nasenmuscheln), die zur Zerstörung der Mikrostruktur (Zilien und Becherzellen) führen können. Klinisch äußert sich diese Erkrankung durch trockene Nasenschleimhäute mit Krustenbildung, ebenfalls besonders im unteren vorderen Teil des Septums. Im Verlauf des chronischen Entzündungsprozesses können bei den Patienten Knorpelnekrosen auftreten und sich eine permanente Septum-Perforation entwickeln.(3) Also kann die *Rhinitis atrophicans* Defekte der Nasenstrukturen als Ursache haben und auch zu ebensolchen Defekten führen.

Eine weitere erwähnenswerte Pathologie ist das *Empty-Nose-Syndrom (ENS)*, welches eine Spätkomplikation nach radikaler Nasenmuschelentfernung darstellt. Das ENS ist eine iatrogene Form der atrophischen Rhinitis. Zu den heute vermuteten Ursachen zählt eine veränderte Luftströmung durch die Vergrößerung der Nasenhöhle nach Operationen an den Nasenmuscheln. Ebenso die verkleinerte Schleimhautfläche scheint dabei eine Rolle zu spielen.(37) Symptome sind etwa eine Nasentrockenheit, Verkrustungen und eine paradoxe Nasenobstruktion sowie eine anhaltende subjektive Dyspnoe. Medizinische Therapieansätze umfassen Schleimhautbefeuchtung, Spülungen und Emollienzen bis zu Operationen. Die chirurgischen Interventionen sollten ausschließlich refraktären Fällen vorbehalten bleiben. Sie können die Rekonstruktion der Nasenmuschel unter Verwendung von implantierbaren Biomaterialien einschließen. Präventive Maßnahmen sind essenziell; schonende Operationstechniken der Nasenmuscheln können dieser Komplikation vorbeugen.(4)

Die Ästhetik der Nase und des Gesichtes bestimmt maßgeblich die Außenwirkung einer Person und hat Einfluss auf die sozialen Interaktionen in der Öffentlichkeit und im Privatleben. Korrespondierend haben Gesichtsdeformitäten erhebliche negative Auswirkungen auf das soziale Leben der Betroffenen, sei es aufgrund von angeborenen Behinderungen, Traumata oder postoperativen Folgen. Auswirkungen umfassen die wahrgenommene soziale Funktionalität, einschließlich der Beschäftigungsfähigkeit, Vertrauenswürdigkeit, zugesprochenen Ehrlichkeit und Leistungsfähigkeit.(5) So verwundert es nicht, dass die Rhinoplastik eine der häufigsten Operationen weltweit ist. Allein in den USA wurden im Jahr 2018 mehr als 200.000 Eingriffe durchgeführt.(6)

### **2.2.2 Knorpeldefekte der Nasenscheidewand**

Die Septum-Perforation ist eine der häufigsten Pathologien des knorpeligen Stützgerüsts der Nase. Der Septum-Knorpel ist ein quadratischer hyaliner Knorpel, der in der Mittellinie der Nasenhöhle als Stütze für die seitlichen Strukturen der Nase dient.(38) Das Septum ist aus Knorpel und Knochen, dem zugehörigen Perichondrium oder Periost und einer Mucosa aufgebaut. Bei einem Defekt dieser Struktur ist die Trennung des Atemweges aufgehoben und es kommt zu einer Veränderung des endonasalen Luftflusses. Dieser Luftfluss ist, wie oben ausgeführt, für die Funktion der Nase essenziell und es kann zu einer eingeschränkten bis hin zur aufgehobenen Funktionalität der Nase kommen. Perforationen und Defekte des Septum-Knorpels sind meist erworben und haben ihre Ursachen in Traumata, iatrogenen Eingriffen wie der Septum-Plastik, beidseitigen Elektrokoagulationen oder Ätzungen bei Nasenbluten, neoplastischen Läsionen, Entzündungen, Infektionen wie Lues, übermäßigem Gebrauch von abschwellendem Nasenspray, Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis wie granulomatösen Erkrankungen und Vaskulitiden oder der Einnahme von Kokain/Amphetaminen, toxischen Metallen oder topischen Kortikosteroiden.(7-9) Angeborene Defekte können bei abnormalem Wachstum oder Entwicklungsanomalien, wie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, auftreten. Die häufigsten Ursachen für eine Perforation des Septum-Knorpels sind jedoch vorherige Nasenoperationen und Traumata. Die Prävalenz liegt in Europa laut Studien bei etwa 0,9 %.(10) Dabei ist sie aber insbesondere nach Operationen an der Nasenscheidewand deutlich erhöht.(11)

Die Heilungsfähigkeit des Knorpels ist aufgrund der Avaskularität des Knorpels, der schwierigen Zellmigration durch die dichte EZM und des langsamen EZM-Umsatzes begrenzt.(39, 40) Verletzungen des Septum-Knorpels können durch die beeinträchtigte Funktion der Nasenatmungswege zu Symptomen wie Nasenbluten, Krustenbildung, verstopfter und trockener Nase, Rhinorrhoe, unangenehmem Geruch und Pfeifgeräuschen führen.(12, 18, 41, 42) Die ideale Behandlung der Perforation sollte nicht nur den Verschluss

beinhalten, sondern auch die Wiederherstellung der normalen Gewebestruktur und -funktion umfassen.(21, 31, 43, 44)

Verschiedene Materialien und Techniken sind beschrieben, um diese Defekte zu verschließen. Als Ersatzmaterialien kommen autologer Ohrknorpel (19) oder Rippenknorpel (20), temporoparietale Faszien-Transplantate, postaurikuläres Bindegewebe (18) und kortikaler Mastoid-Knochen mit Periost (21) in Betracht. Außerdem werden bestrahlte homologe Rippenknorpeltransplantate in der Rhino-Plastik verwendet.(45) Zum Verschluss der Schleimhaut mobilisiert man in der Regel mukoperichondriale Lappen (18), wobei sowohl ungestielte Lappen als auch Schleimhautlappen mit definierter Gefäßversorgung (z. B. *A. ethmoidalis*) Verwendung finden.(46) Bei Verwendung autologer *Grafts* sind die begrenzte Verfügbarkeit und die Morbidität der Spenderstelle Limitationen für eine breite Anwendung bei rekonstruktiven Verfahren.(23) Alternativ zur Verwendung autologer *Grafts* können synthetische Materialien wie Silikon, bioaktives Glas, poröses Polyethylen oder *Allograft*-Materialien wie *AlloDerm Select*<sup>TM</sup> (Biohorizons, Birmingham, Alabama, USA) als mechanische Barrieren eingesetzt werden. Bei *AlloDerm Select*<sup>TM</sup> handelt es sich um eine azelluläre dermale Matrix.(47) Neben der Gefahr einer bakteriellen Besiedelung synthetischer Materialien können diese nur schwer mit dem umgebenden Gewebe verwachsen, was das Risiko von Luxationen und Infektionen erhöht.(24) Als Alternative wird derzeit *Medpor*<sup>®</sup> (stryker, Kalamazoo, Michigan, USA), ein poröses Polyethylen hoher Dichte, verwendet. Dieses stellt ein biokompatibles poröses synthetisches Material für die Rekonstruktion des Gesichtsskeletts dar.(22) Außerdem wurde von Fulco *et al.* *Chondro-Gide*<sup>®</sup> (Geistlich Pharma, Wolhusen, Schweiz) zur Deckung von Nasenflügeldefekten verwendet. Hierbei handelt es sich um eine zugelassene, CE-gekennzeichnete, poröse Membran, welche aus Kollagen Typ I und Typ III porcinen Ursprungs besteht. Sie kann die Differenzierung von Chondrozyten unterstützen und wird häufig für die Reparatur von Gelenkknorpel verwendet.(29) Da die Daten zu Extrusionsraten, Haltbarkeit und Ästhetik sehr variieren, ist die Verwendung synthetischer Materialien den autologen Transplantaten heutzutage weiterhin unterlegen.(48) Aktuell stellen autologe Transplantate immer noch die erste Wahl zur Nasenrekonstruktion dar. Jedoch sind diese durch die Morbidität der Spenderstelle, der Verfügbarkeit des Gewebes und durch ein mögliches Transplantatversagen eingeschränkt.

## 2.3 *Tissue-Engineering*

### 2.3.1 Allgemein

Der Verlust oder das Versagen eines Organs oder Gewebes ist eine große Herausforderung in der Patientenbehandlung.(49) Ärzte behandeln den Verlust von Organen oder Geweben, indem sie Organe transplantieren, chirurgische Rekonstruktionen durchführen oder mechanische Geräte, wie Dialyse-Maschinen, verwenden. Obwohl diese Therapien bis heute unzählige Leben gerettet und verbessert haben, sind sie dennoch nicht vollkommen.(49) *Tissue-Engineering* ist ein vergleichsweise neues Fachgebiet, das lebende Zellen, biokompatible Materialien sowie geeignete biochemische (z. B. WF) und physikalische (z. B. zyklische mechanische Belastungen) Faktoren, einschließlich Kombinationen davon, verwendet, um gewebeähnliche Strukturen zu schaffen.(36) *Tissue-Engineering* ist also keine alleinstehende Wissenschaft. Es ist ein interdisziplinäres Gebiet, welches es vermag, die Fähigkeiten der *Life-Science* und des Ingenieurwesens zu kombinieren. Ziel hiervon ist die Erzeugung medizinisch verwendbarer Transplantate.(49) Es wurden allgemeine Strategien für die Schaffung von neuem Gewebe entwickelt, die mit Sicherheit relevantesten sind:

1. Gewebe-induzierende Substanzen: Der Erfolg dieses Ansatzes hängt von der großangelegten Produktion und Reinigung geeigneter Signalmoleküle wie WF (z. B. Knochen-morphogenetische Proteine, bFGF-2, vaskulärer endothelialer WF (VEGF) und der Differenzierungsfaktor TGF- $\beta$  (36)) ab.(49)
2. Gerüststrukturen: Kultivierung von Zellen in oder auf *Scaffolds*. Die Zellgerüste erfüllen in der Regel mindestens eine der folgenden Funktionen: Zellanheftung und möglicherweise Migration, Speicherung und Präsentation von WF. Sie sollen eine poröse Umgebung für eine ausreichende Diffusion von Nährstoffen, Sauerstoff, Abfallprodukten und exprimierten Produkten sowie mechanische Steifigkeit oder Flexibilität bieten.(36) In offenen Systemen werden Zellen an *Scaffolds* befestigt. Nach dem Verschmelzen von Zellen und *Scaffolds* werden diese Konstrukte schlussendlich in den Körper integriert. Die *Scaffolds* können aus natürlichen Materialien wie Kollagen oder synthetischen Polymeren wie PLA, Polyglycolsäure und Polycaprolacton hergestellt werden. Diese Materialien sind bereits in der Medizin bekannt und zugelassen, was sie besonders attraktiv für die Forschung macht. Obwohl diese Ersatzmaterialien hinsichtlich ihrer Biokompatibilität schon teilweise beachtliche Ergebnisse erzielen (29), gibt es noch offene Fragen. Dazu zählt etwa die potenziellen Immunogenität dieser Materialien.(36) Die resultierende immunologische Abstoßung kann zwar durch immunsuppressive Medikamente oder die Verwendung

von autologen Zellen verhindert werden (49), jedoch ist dies *vice versa* mit potenziell negativen Nebenwirkungen verbunden. In *Scaffolds* können bei der Herstellung WF aufgebracht oder sogar direkt integriert werden, was durch eine langsame, gleichmäßigere Freisetzung eine zweckdienliche verbesserte Pharmakokinetik der WF fördert.(36)

3. Lebende Zellen: Diese werden in der Regel aus Spendergewebe entnommen. Dieses ist oft nur in begrenztem Maße verfügbar oder muss aus Stamm- oder Vorläuferzellen abgeleitet werden.(36)

Eine wichtige Voraussetzung für das erfolgreiche *Tissue-Engineering* ist eine Kultivierungsumgebung, die es den Zellen ermöglicht, wie in nativem Gewebe zu funktionieren. Häufig ahmt die Kultivierungsumgebung einige kritische Aspekte der nativen Umgebung nach. Dafür passt man die Materialien, die mechanischen Bedingungen und das chemische Milieu entsprechend an.(36)

Neben dem Ersatz spezifischer Gewebe umfasst ein Teilgebiet des *Tissue-Engineerings* zudem die Entwicklung spezialisierter extrakorporaler Unterstützungssysteme. Diese enthalten Zellen (z. B. bioartifizielle Leber und Niere) sowie Gewebereinheiten, die für diagnostische Untersuchungen verwendet werden können.(36)

### 2.3.2 Geschichte des *Tissue-Engineering*

Um die Geschichte des *Tissue-Engineering* darzustellen, wird hier Bezug auf eine Übersichtsarbeit von Berthiaume *et al.* genommen. Laut dieser Arbeit konzentrierten sich die ersten auf *Tissue-Engineering* basierenden Therapien auf Hauttransplantationstechniken.(36) Im weiteren Verlauf wurden Methoden für die Zell- und Gewebekonservierung entwickelt, welche die Einrichtung allogener Hautbanken ermöglichten. Durch diese Entwicklung wurden Hauttransplantate als Standardprodukt verfügbar. Der erste synthetische Hautersatz wurde schon 1962 entwickelt, während die ersten erfolgreichen gezüchteten Hautprodukte erst Ende der 1970er- und Anfang der 1980er-Jahre auf den Markt kamen. Obwohl der Begriff „*Tissue-Engineering*“ erst ca. 1987 geprägt wurde, gilt laut Berthiaume *et al.* dieser Zeitraum als Beginn des modernen *Tissue-Engineering*.(36) Eines der ersten gezüchteten kommerziellen Hautprodukte war *Epice!®* (Vericel Corporation, Cambridge, Massachusetts, USA), ein *Autograft*, welches aus körpereigenen Keratinozyten hergestellt und unter anderem zur Behandlung von schweren Verbrennungen eingesetzt wurde.(50-52) Für das *Tissue-Engineering* war dieses Produkt ein Durchbruch. Doch wegen seiner Fragilität und schwierigen Handhabung konnte *Epice!®* nur begrenzt eingesetzt werden.(36) In den 1990er-Jahren nahm die Entwicklung des *Tissue-*

*Engineerings* Fahrt auf und es wurden mehrere gezüchtete Haut- und Gelenkknorpelprodukte auf den Markt gebracht. In diesem Zuge begannen viele Forschungsgruppen, das Konzept auf verschiedenste Gewebe anzuwenden. Es wurden mehr und mehr Unternehmen gegründet, in der Hoffnung, dass es durch *Tissue-Engineering* schon bald möglich wäre, komplexere Körperteile herzustellen.(53) Es wurden Fortschritte erzielt, etwa im Bereich der Haut, Knorpel und Hornhaut. Dennoch blieben bis heute große Herausforderungen bestehen, darunter die Frage nach einer funktionellen Gefäßversorgung der gezüchteten Gewebe, der Identifizierung zuverlässiger Zellquellen und der Steuerung von komplexen Anordnungen verschiedener Zelltypen.(36)

### **2.3.3 *Tissue-Engineering* von Knorpel**

Die meisten Forschungsergebnisse zur Knorpelregeneration liegen für den Gelenkknorpel vor, da in der alternden Bevölkerung zunehmend die Prävalenz für degenerative Gelenkerkrankungen gestiegen ist. Die lässt sich auch auf die zunehmende Fettleibigkeit zurückführen, die zu zahlreichen Gewebeschäden im Gelenkbereich führt.(36) Auch bei jungen und gesunden Menschen ist der Bedarf hoch, da in dieser Bevölkerungsgruppe Sportverletzungen gehäuft auftreten und die spontane Regeneration nach Gelenkknorpelschäden begrenzt ist.(36) Die derzeitigen Knorpelreparaturtechniken, die zur Behandlung akuter Verletzungen eingesetzt werden, lassen sich laut Berthiaume *et al.* im Allgemeinen in drei Kategorien einteilen: Markstimulationstechniken wie die Mikrofakturtechnik (54), osteochondrale Transplantationstechniken (36) und zellbasierte Reparaturtechniken (36). Im Folgenden geht es um die zellbasierten Reparaturtechniken, da nur diese zum *Tissue-Engineering* zählen und sinnvoll im Gebiet des Nasen-Septums angewendet werden können. Außerdem basieren folgende Informationen vordergründig auf Forschung im Bereich des Gelenkknorpels und sind eventuell nur bedingt auf den Knorpel des Nasen-Septums übertragbar. Dennoch sind sie für diese Arbeit von hoher Relevanz, da es sich bei Gelenkknorpel auch um hyalinen Knorpel handelt. Berthiaume *et al.* gliedert die Entwicklung des *Tissue-Engineering* in vier aufeinanderfolgenden Generationen, die sich durch aufeinander aufbauende Techniken und Prinzipien auszeichnen.(36)

Im Jahr 1994 führten Brittberg *et al.* die erste kommerziell verfügbare zellbasierte Knorpelreparaturtechnologie namens *Carticel* (Genzyme, Cambridge, Massachusetts) ein.(55) Diese innovative Methode gehört laut Berthiaume *et al.* zur ersten Generation des *Tissue-Engineering* von Knorpel und beinhaltet die Entnahme von autologen Chondrozyten aus einem wenig beanspruchten Gelenkbereich. Darauf folgt die *in vitro*-Kultivierung dieser Zellen und die Implantation der expandierten Zellen auf der Knorpelverletzung im menschlichen Knie. Diese Vorgehensweise erwies sich als äußerst erfolgreich bei der

Reparatur von Knorpelverletzungen im Knie und erzielte in Studien über zehn Jahre langfristige funktionelle Verbesserungen.(36, 55) Doch es gab auch Schwachpunkte in diesem Verfahren. Ein häufig ignoriertes Aspekt der Techniken zur Chondrozyten-Isolierung ist die enorme Variabilität der Qualität der Spender-Chondrozyten. Diese ist vom Alter des Spenders (56), dem Gesundheitszustand des Spendergelenks (57) und weiteren Faktoren abhängig.(36) Ein weiteres Problem war und ist, dass die *in vitro*-Kultivierung von humanen Knorpelzellen zu einer De-Differenzierung der Chondrozyten führt, die mit einer Verschiebung von einer überwiegend Kollagen-Typ-II-haltigen hyalinen Matrix zu einer Faserknorpel-ähnlichen Matrix einhergeht.(36, 58) Wichtige Folgen dieser Differenzierung sind der Verlust der sphärischen Form der nativen Chondrozyten (59) und der Fähigkeit zur Produktion von Knorpel-spezifischen PG und Kollagen Typ II.(36, 60) Dabei scheint besonders die Kultivierung der Chondrozyten im *Monolayer* einen starken Einfluss zu haben. Hier nehmen sie ein Fibroblasten-ähnliches Aussehen an (61) und wechseln von der Typ-II- zur Typ-I-Kollagensynthese. Dieser Wechsel in der Kollagensynthese führt zur Bildung von Faserknorpel mit geringeren biomechanischen Eigenschaften.(36, 62) Dieses Problem der De-Differenzierung ist sehr bedeutend für das *Tissue-Engineering* von Knorpel und stellt damit eine der großen Herausforderungen dieser Arbeit dar. In Studien schien die De-Differenzierung reversibel zu sein. Es wurde beobachtet, dass die Wiederherstellung Chondrozyten-spezifischer Funktionen durch die Übertragung auf Agarosegel-Kulturen ermöglicht werden kann.(36, 63) Weitere Möglichkeiten, entdifferenzierte Zellen wieder in eine Chondrozyten-ähnliche Form zu bringen, sind laut Berthiaume *et al.* Kollagengele (64), Fibrinmatrices (65, 66) und Zellkulturen auf synthetischen biologisch abbaubaren Polymeren.(36, 67)

Bei der Matrix-assoziierten Chondrozyten-Implantation handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Technik von Brittberg *et al.*, also einer Chondrozyten-Transplantationstechnik der zweiten Generation. Nach Berthiaume *et al.* werden dafür biodegradierbare *Scaffolds* verwendet.(36) Diese dienen den Chondrozyten, wohlgernekt *in vivo*, vorübergehend als Stütze, bis diese die *Scaffolds* durch synthetisierte Matrixbestandteile ersetzen können.(36, 68) Um diese Techniken weiterzuentwickeln wurde versucht, die Synthese der EZM durch Einbringen von WF in das Gerüst zu erhöhen. Zusätzlich erhoffte man sich dadurch eine natürlichere räumliche Verteilung der Chondrozyten im regenerierten Knorpel.(36, 69)

Die dritte Generation der zellbasierten Knorpelreparaturtechnologien basiert laut Berthiaume *et al.* auf der Kultivierung der Zellen in einem *Scaffold*. Dadurch soll, noch bevor die Implantation erfolgt, ein relativ ausgereifter Knorpel *in vitro* erzeugt werden.(36) Gründe für

dieses Vorgehen sind beispielsweise, dass das Vorhandensein einer Matrix um die Zellen herum die Zellen möglicherweise vor schädlichen Einflüssen schützen und die Zellretention an der Implantationsstelle fördern kann.(70, 71) Bei der dritten Generation der zellbasierten Knorpelreparaturtechnologien handelt es sich im Wesentlichen um *Tissue-Engineered*-Knorpel. Dennoch steht diese immer noch vor großen Herausforderungen. Eine dieser Herausforderungen ist die unzureichende Re-Differenzierung der Zellen nach längerer Kultur im *Monolayer*. Dies führt dazu, dass die Zellen nicht den gewünschten Phänotyp mit der Kollagen-II-Sekretion beibehalten, wodurch die EZM-Zusammensetzung nicht der nativen Zusammensetzung entspricht. Ferner ist die Skalierung von Kultursystemen auf klinisch relevante Dicken aufgrund von Transportbeschränkungen ein weiteres Problem. Dies erschwert eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Transplantat und eine ausreichende Nährstoffversorgung der tieferen Gewebeschichten. Ein weiteres Hindernis ist das fehlende Verständnis von Materialeigenschaften der *Scaffolds*, die die Zelldifferenzierung unterstützen können. Schließlich stellt auch die begrenzte Verfügbarkeit geeigneter Zellquellen eine weitere Herausforderung dar.(36, 72)

Um dieses letzte Problem der begrenzten Quellen an nativem Knorpel zu adressieren, entsteht laut Berthiaume *et al.* eine vierte Generation der zellbasierten Knorpelreparaturtechnologie.(36) Diese benutzt mesenchymale Vorläuferzellen aus verschiedenen Nicht-Knorpelgeweben. Diesen könnten die Fähigkeit zur Chondrozyten-Differenzierung haben.(36, 73) Einige Studien zeigten in der Co-Kultur von mesenchymalen Vorläuferzellen mit ausdifferenzierten Chondrozyten, dass diese Vorläuferzellen so in Richtung des reifen Chondrozyten-Phänotyps geführt werden können.(36, 74, 75)

Insgesamt zeigen die von Berthiaume *et al.* beschriebenen verschiedenen Generationen des *Tissue-Engineerings* von Knorpel vielversprechende Ansätze für die Behandlung von Knorpeldefekten. Herausforderungen, wie die De-Differenzierung der Zellen während der Kultivierung und ihre erfolgreiche Re-Differenzierung, bleiben jedoch bestehen und sind für einen effektiven Knorpelersatz noch zu bewältigen. Die Weiterentwicklung der für die *Scaffolds* verwendeten Materialien und ein besseres Verständnis der Zelldifferenzierung erscheinen entscheidend, damit die klinische Anwendbarkeit dieser Technologie noch weiter verbessert wird.

#### **2.3.4 Tissue-Engineering des Nasen-Septums**

Die chirurgische Rekonstruktion des Nasen-Septums erfordert eine strukturelle Unterstützung. Das kann in Form eines synthetischen, allogenen oder autologen Knorpeltransplantats erfolgen. Allogene Transplantate können zur Krankheitsübertragung,

immunologischer Abstoßung und Resorption führen.(76, 77) Die Verwendung biokompatibler, synthetischer Materialien ist zwar nicht mit Immunreaktionen verknüpft, dennoch kann sie Infektionen, Extrusionen und gelegentlich Fremdkörperreaktionen verursachen, was zu suboptimalen Ergebnissen führt.(76, 78, 79) Bei Silikon beispielsweise kommt es laut einer Übersichtsarbeit von Kim *et al.* mit einer Inzidenz von bis zu 36 % zu Infektionen, Fremdkörperreaktionen im Sinne von Kontrakturen, Verkalkungen, Extrusionen und Verschiebungen des Implantats. Auch bei Verwendung von *Medpor*® in Rhino-Plastiken würden Probleme mit Infektionen und Extrusionen auftreten. Außerdem sei es bei Bedarf aufwendig zu entfernen, da es sehr stark an der Mucosa und am Perichondrium adhären würde.(80) Und auch bei biokompatiblen, synthetischen Materialien kann es auf die Abbauprodukte, etwa Metallionen, zu immunologisch-allergischen Reaktionen kommen oder durch den beim Abbau entstehenden sauren pH-Wert kann es zu Immunreaktionen kommen.(81)

Autologe Knorpeltransplantate gelten heutzutage immer noch als bevorzugte Option. Autologe Zellen bergen in der klinischen Anwendung nicht das Risiko einer immunogenen Abstoßung oder Krankheitsübertragung (82), sind aber insbesondere für die Regeneration von Knorpelgewebe nur begrenzt verfügbar.(42) Man gewinnt sie in der Regel aus dem Ohrknorpel oder, falls man größere Mengen benötigt, aus dem Rippenknorpel.(83, 84) Diese Techniken haben einige Nachteile. Die Hauptnachteile dieser Technik sind einerseits der zusätzliche chirurgische Eingriff und andererseits die Probleme an der Entnahmestelle (29), wozu etwa Wundheilungsstörungen oder Hebedefekte zählen. Speziell bei der Verwendung von Ohrknorpel ist die gebogene Form und die Elastizität des Ohrknorpels für die operative Verwendung problematisch. Zusätzlich kann es an der Entnahmestelle zu Deformationen und Narbenbildung kommen, wobei diese laut Ho *et al.* nur selten auftreten und wenn nur geringe Auswirkung auf die Zufriedenheit der Patienten haben.(84) Bei der Verwendung von Rippenknorpel dagegen kann es zu stärkeren Schmerzen und einem Pneumothorax kommen.(84) Dabei liegt die Wahrscheinlichkeit für die schwerwiegende Komplikation eines Pneumothorax laut Studien jedoch unter 1 %.(85) Künstlich gezüchtetes Knorpelgewebe könnte also dazu beitragen, die mit der Verwendung von nativem Knorpel verbundenen Nachteile zu überwinden. Dabei erscheint das Prinzip so einfach wie genial: Viele autologe Chondrozyten können aus einer kleinen Knorpelbiopsie der Nasenscheidewand gewonnen werden, woraufhin die Amplifikation zur großflächigeren Nutzung erfolgt. Dies geschieht, indem sie in Gegenwart spezifischer WF *in vitro* kultiviert werden.(83, 86, 87) Die Injektion der Zell-Suspension in den Knorpeldefekt oder der Transfer eines mit Chondrozyten beladenen Hydrogels sind schon heute praktizierte Methoden der Gelenkknorpelregeneration, die aber im kraniofazialen Bereich aufgrund der stabilisierenden

Funktion des Knorpels leider nicht anwendbar sind.(42) Das Kultivieren und Einbringen der vermehrten Zellen erfolgt kennzeichnend für das *Tissue-Engineering* auf geeigneten Gerüste, die mit strukturellen Vorgaben und biochemischen Faktoren für die Zelldifferenzierung sorgen sollen. Dies erzeugt Knorpeltransplantate in klinisch relevanten Größen und mechanischen stabilisierenden Eigenschaften, die sich nach der Implantation weiterentwickeln können.(28, 88, 89) Dabei gilt es betreffend der *Scaffolds* einige Dinge zu beachten: Die *Scaffolds* sollten keine zytotoxischen oder entzündlichen Nebenprodukte enthalten.(42) PLA, Kollagen, Hyaluronsäure (90), L-Polycaprolacton (91), Polyglycolsäure (22), Fibrin (40) und bakterielle Zellulose (92) werden als Gerüste für Chondrozyten beim *Tissue-Engineering* von Knorpelgewebe verwendet. Außerdem sollte die Geschwindigkeit des biologischen Abbaus der *Scaffolds* langsamer sein als die Geschwindigkeit der Knorpelneubildung.(42) Dennoch muss man trotz eindrucksvoller Bilder von ektopisch wachsenden Knorpel-ähnlichen Strukturen bei verschiedenen Tieren (93) betonen, dass die Anwendung von künstlich gezüchtetem Knorpelgewebe zur dauerhaften Wiederherstellung kraniofazialer Strukturen im klinischen Umfeld bisher kaum umgesetzt ist.

Eine der wenigen bisher bekannten klinischen Anwendungen von mit *Tissue-Engineering* erzeugtem Knorpelgewebe im kraniofazialen Bereich ist die Arbeit von Fulco *et al.* aus dem Jahr 2014.(29) Im Rahmen einer „*First-in-human*“-Studie wurden am Universitätsspital Basel fünf Patienten mit einem Defekt des Nasenflügels nach Exzision eines Nicht-Melanom-Hautkrebses rekrutiert. Von diesen Patienten wurden Knorpelzellen aus einer Nasenscheidewand-Biopsie entnommen und auf Kollagenmembranen aus Kollagen Typ I und Typ III mit autologem Serum und WF (bFGF-2, TGF- $\beta$ 1 und Ascorbat) über einen Zeitraum von vier Wochen kultiviert. Ziel hiervon war, künstliche Knorpeltransplantate herzustellen, die nach der den Nasenflügel betreffenden Tumorexzision unter Lappenplastiken implantiert werden konnten.(29) Die Transplantate in der Studie wiesen eine gemischte hyaline und fibröse Knorpelmatrix auf. In der Nachbeobachtung zeigte das rekonstruierte Gewebe nach 6 Monaten für den Nasenflügel typische fibromuskuläre Fettstrukturen. Laut Fulco *et al.* waren nach einem Jahr alle Patienten mit den ästhetischen und funktionellen Ergebnissen zufrieden und keine unerwünschten Ereignisse aufgetreten. Im Rahmen dieser Studie erwiesen sich autologe Nasenknorpeltransplantate also als sicher und praktikabel für die Rekonstruktion von Nasenflügeln.(29)

Diese klinischen Ergebnisse lassen vermuten, dass mit *Tissue-Engineering* hergestellter Knorpel auch für andere anspruchsvolle Gesichtsrekonstruktionen, wie die Rekonstruktion des Nasen-Septums, getestet werden kann.

## 2.4 PLA und 3D-Druck

### 2.4.1 Allgemein

Biofabrikationstechniken haben zum Ziel, das heutige Verständnis von menschlichen Zellen, Geweben und Organen in Kombination mit speziell angefertigten *Scaffolds* für Anwendungen im *Tissue-Engineering* umzusetzen. Dafür werden *Scaffolds* mit definierten 3D-Geometrien und -Topologien entwickelt, um in diese Biomoleküle mit spezifischen Konzentrationen einzubringen. Für *Tissue-Engineering*-Anwendungen sind einige Bedingungen beschrieben: Die *Scaffolds* benötigen eine hohe Porosität und mechanische Festigkeit sowie eine einstellbare Porengröße. Große Poren ermöglichen eine leichte Diffusion von Molekülen, Abfallprodukten und Gasen innerhalb des 3D-Gerüsts. Sie unterstützen auch die Migration, Ausbreitung und Proliferation von Zellen.(94, 95)

Die Fortschritte im *Scaffold*-Design in Verbindung mit der raschen Entwicklung additiver Fertigungstechniken und der Verfügbarkeit hochauflösender 3D-Drucker ermöglichen die effiziente Herstellung biologisch abbaubarer *Scaffolds*. Diese sind in Form und Funktion für das *Tissue-Engineering* geeignet.(96) Zu den biokompatiblen Materialien, die üblicherweise für implantierbare Strukturen verwendet werden, gehören PLA, Polyglykolsäure, Polycaprolacton und Mischungen aus Polyethylenglykol.(93)

Bei der Entwicklung passender *Scaffolds* für das *Tissue-Engineering* müssen noch mehr Parameter berücksichtigt werden. Dazu zählen die Abbaugeschwindigkeit des Gerüsts, die Biokompatibilität des Polymers, die Integration in das Wirtsgewebe und die optimale Porengröße. Mehrere Studien haben gezeigt, wie wichtig insbesondere die Porengröße des *Scaffolds* für das *Tissue-Engineering* ist.(96) Für das *Tissue-Engineering* des Stützgewebes Knochen liegt laut Studien die kritische Porengröße von Kompositgerüsten bei ca. 100 µm (97, 98), während die optimale Porengröße für das Knochenwachstum bei ca. 300–350 µm liegt.(99)

### 2.4.2 PLA

PLA ist ein biobasierter und bioabbaubarer Polyester, der aus Milchsäure hergestellt wird und in zwei stereochemischen Formen oder deren Mischungen vorkommen kann. Die spezifischen Eigenschaften des PLA stehen in direktem Zusammenhang mit den Anteilen der Isomere Poly-L-Milchsäure (PLLA), Poly-D-Milchsäure (PDLA) und Poly-DL-Milchsäure (PDLLA), d. h. Polymeren aus L-Milchsäure, D-Milchsäure und DL-Milchsäure.(100, 101) Die Synthese von PLA geschieht entweder über Milchsäure-Monomere oder über Lactid-Dimere, welche ringförmige Verbindungen aus zwei Milchsäure-Monomeren sind. Beide können

entweder synthetisch oder durch Fermentation hergestellt werden. Die biobasierte Fermentation macht dabei einen dominierenden Anteil von etwa 90 % aus.(102) Der Grundstoff Milchsäure wird biotechnologisch aus nachwachsenden Rohstoffen wie Maisstärke und Zuckerrohr gewonnen.(103) Die Herstellung polymerer Milchsäure erfolgt in erster Linie durch die Ring-öffnende Polymerisation von Lactid-Dimeren bei 140–180 °C. Ebenfalls können Katalysatoren verwendet werden. Dabei führt die Verwendung von Lactid-Dimeren zu höher-molekularem PLA.(102) Im Folgenden sollen die Eigenschaften des PLA beschrieben werden. PLA ist ein klarer, farbloser Thermoplast mit mittlerer Sprödigkeit und mechanischen Eigenschaften, welche denen des Polymers Polyethylenterephthalat (PET) ähneln. Thermoplasten sind Kunststoffe, welche sich in einem bestimmten Temperaturbereich verformen lassen. So sind beide Polymere je nach Polymerisierungsgrad thermische stabil bis 200–300 °C (104) und als Thermoplasten verarbeitbar.(102) Die am häufigsten verwendeten PLA-Kunststoffe erfordern Schmelztemperaturen von mindestens 185–190 °C.(105) Andere interessante Eigenschaften von PLA sind eine hohe Kapillarwirkung, schwere Entflammbarkeit (102, 106), UV-Beständigkeit, Elastizität, Hydrophobie, Steifigkeit, Biokompatibilität sowie eine hohe Bioabsorptionsfähigkeit *in vivo*.(107, 108)

Reines PLA hat vielseitige Anwendungsbereiche. Dazu gehört etwa die Biomedizin, die Verpackungsindustrie, die Herstellung von Hygieneprodukten sowie die Produktion von biologisch abbaubaren Müllbeuteln und Windeln.(102) Das von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene PLA wird im Gesundheitswesen eingesetzt und ist eines der ersten abbaubaren und resorbierbaren Biomaterialien, das für diesen Zweck verwendet wird.(109) Die Herstellung poröser *Scaffolds* ist eine Anwendung mit großem Potenzial für den Einsatz dieses Polymers im Bereich des *Tissue-Engineerings*. Die Gerüste dienen als künstlicher Ersatz für die EZM, die für die Kontrolle des Zellwachstums, die Zellfixierung und den Erhalt der Zelleigenschaften während der Gewebezüchtung unerlässlich ist. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Gerüstmaterialien für die Knochenregeneration entwickelt, darunter auch solche auf der Basis von PLLA.(110) Um die Produktqualität zu steigern und Herstellungskosten zu reduzieren, wird PLA oft in Form von Copolymeren oder Mischungen eingesetzt. Ein Beispiel hierfür sind PLA/Glycolsäure-Copolymere, die im medizinischen Bereich als Träger für Wirkstoffe verwendet werden. PLA ermöglicht so eine kontrollierte Freisetzung von Medikamenten.(102) Die Bildung von PLA-Mischungen ist eine gängige Technik zur Modifizierung der Eigenschaften von PLA. Verschiedene Arten von Nanopartikeln werden in Studien als Verstärkungsmittel für die PLA-Matrix in Betracht gezogen, z. B. Kohlenstoff-Nanoröhrchen, *Nanoclays*, Nanosilica und Cellulose-Nanokristalle.(111) PLA kann auch mit anderen biologisch abbaubaren Polymeren wie

Polycaprolacton gemischt werden, um seine Eigenschaften anzupassen. Andere gängige Polymere zur Modifikation des PLA sind Polypropylen, Polystyrol, Polycarbonat und Polymethylmethacrylat. Das Mischen von PLA kann eine wirtschaftliche Strategie zur Modifizierung der physikalischen, mechanischen und chemischen Eigenschaften bieten.(112) PLA hat als Rohstoff für additive Fertigungsverfahren wie den 3D-Druck eine hohe Bedeutung. Die entsprechenden Drucktechnologien werden immer ausgereifter und sind heutzutage auch in kostengünstigen Versionen verfügbar.(102)

Die Entsorgungs- und Recyclingmöglichkeiten für biobasierte Kunststoffe sind je nach Material unterschiedlich. Während nicht biologisch abbaubare Varianten wie Bio-PET zusammen mit konventionellen Kunststoffabfällen recycelt werden können, landen biologisch abbaubare Kunststoffe wie PLA häufig in der Müllverbrennung, wo die organischen Stoffe zu Kohlenstoffdioxid verbrannt werden. Eine weitere Entsorgungsmöglichkeit ist die Kompostierung von PLA, wobei es unter kontrollierter Temperatur und Feuchtigkeit durch Mikroorganismen zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut wird. Das Recycling von PLA kann durch Umschmelzen oder Hydrolyse erfolgen.(113) Für das Umschmelzen werden spezielle Verfahren benötigt, welche durch mechanische Zerkleinerung und anschließendes Einschmelzen eine Rückgewinnung des Rohstoffs ermöglichen. Dabei wird der Qualitätsverlust im Vergleich zu Neuware als relativ gering eingeschätzt. Moderne Verfahren können den Kunststoff in Monomere hydrolysieren, reinigen und in Lactid-Dimere umwandeln, die für eine erneute Polymerisation verwendet werden können.(102) Es ist zu beachten, dass die Umweltbedingungen, das Vorhandensein von Zusatzstoffen, das Molekulargewicht und die chemische Struktur die wichtigsten Parameter sind, die den Grad der Zersetzung von PLA beeinflussen.(114) Dadurch stellt sich natürlich die Frage, wie und in welchem Zeitraum der Abbau im Körper vonstattgeht.

PLA ist einerseits unter kontrollierten Bedingungen innerhalb weniger Monate kompostierbar, andererseits dauert der Abbau in der freien Natur mehrere Jahrzehnte.(115) Der Abbauperioden im menschlichen Körper liegt dazwischen. Laut Russo *et al.* beginnt die Absorption von PLA-Fäden nach zwei Jahren. Russo *et al.* konnten keine unerwünschten Reaktionen nach der Implantation der PLA-Fäden dokumentieren.(116) Bei Rosenzweig *et al.* ergaben sich in der Zellkultur über den Zeitraum von 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede in der Steifigkeit zwischen frisch gedruckten und den 21 Tage kultivierten PLA-*Scaffolds*.(96) Wenn diese zwischen 5 und 10 % gedehnt wurden, zeigten sie mit nativem Knorpel-Gewebe vergleichbare Druckeigenschaften. Die Autoren der Studie vermuten, dass die gedruckten *Scaffolds* vielversprechende mechanische Eigenschaften für den Einsatz im Gebiet des *Tissue-Engineerings* aufweisen.(96) Sie konnten zusätzlich zeigen, dass nach

einer 21-tägigen Kultivierung Chondrozyten eine ausgedehnte Besiedlung von PLA-Scaffolds erreichen können. Die Chondrozyten zeigten zu diesem Zeitpunkt eine sehr hohe Viabilität und bildeten dichte Zellschichten und EZM-enthaltendes Gewebe auf dem PLA-Scaffold.(96) Das Wachstum der Chondrozyten schien in dieser Studie auf PLA dichter zu sein als auf anderen Polymeren und teilweise konnte ein Einwachsen in die Porenstrukturen beobachtet werden.(96) Außerdem zeigten Rosenzweig *et al.*, dass Chondrozyten auf PLA-Scaffolds PG, sulfatierte GAG und Kollagen II produzieren und mit der Knorpel-spezifischen Färbung Safranin-O angefärbt werden können.(96)

### 2.4.3 3D-Druck

Die additive Fertigung, allgemein als 3D-Druck bezeichnet, basiert auf dem Konzept der Umwandlung eines digitalen Modells in ein dreidimensionales physisches Objekt. Im Laufe der Zeit haben sich in der Industrie verschiedene 3D-Drucktechnologien entwickelt. Zentrales gemeinsames Merkmal ist die schichtweise Erzeugung der Objekte.(117) Eines der ältesten 3D-Druckverfahren ist die Stereolithografie, bei der flüssiges Harz als Druckmaterial verwendet wird, welches durch UV-Licht aushärtet. Im Jahr 1988 patentierte Carl Deckard von der *University of Texas* ein neues Verfahren, das *Selective Laser Sintering*, bei dem Kunststoffpulver mithilfe eines Lasers geschmolzen wird. Parallel entwickelte Scott Crump die ersten 3D-Drucker für die Extrusion von Kunststofffilamenten. Dies stellt einen Meilenstein der Entwicklung dar. Diese patentierte Technik ist unter dem Namen *Fused Deposition Modelling* bekannt und zählt aufgrund ihrer Benutzerfreundlichkeit und der geringen Anschaffungskosten zu den beliebtesten Technologien im Bereich der additiven Fertigung.(117) Heutzutage gibt es immer mehr Verfahren und Materialien für den 3D-Druck.

Der 3D-Druck hat in den vergangenen zwei Jahrzehnten zu bedeutenden Fortschritten in vielen Bereichen geführt. Dazu gehört unter anderem die Luft- und Raumfahrt, die Kunst, die Produktion Konsumgütern und vor allem die Fertigungstechnik.(118) Mit den Fortschritten in der 3D-Drucktechnologie wird von immer mehr Forschern im Bereich der biomedizinischen Technik der 3D-Druck als Werkzeug für biomedizinische Anwendungen eingesetzt. Dazu zählt auch das *Tissue-Engineering*.(119) Ein zentraler Punkt hierfür war, dass Studien das Bewusstsein für die dramatischen Unterschiede im Zellverhalten zwischen 2D- und 3D-Kultursystemen schärfen konnten. Laut diesen bietet die Kultivierung von Zellen in 3D-Strukturen eine optimierte Umgebung zur Steuerung des Zellverhaltens und zur Verbesserung der Zellfunktionen.(120-123) Der 3D-Druck, basierend auf computergestützter 3D-Design-Software (CAD), erfordert keine physischen Masken oder Gussformen zur Erstellung der inneren Architektur von *Scaffolds*. Daher kann er als innovatives und flexibles Werkzeug zur Herstellung komplexer 3D-Strukturen im Mikro- bis Nanomaßstab bei

geringeren Kosten und hoher Effizienz dienen.(119) Daher wird fortlaufend versucht, 3D-Biofabrikationstechniken zu entwickeln, die in der Lage sind, komplexe, funktionelle 3D-Architekturen mit geeigneten Biomaterialien herzustellen. Dies dient dem Zweck, die natürliche Mikroumgebung der verwendeten Zellen zu imitieren.(119)

Die *Fused Filament Fabrication* (124), auch *Fused Deposition Modeling* (FDM) (125, 126) genannt, ist heute das am weitesten verbreitete additive Fertigungsverfahren. Bei diesem Verfahren werden mit einem beheizten Extruder thermoplastische Polymerfilamente aufgeschmolzen und aus Schichten das zu konstruierende Gerüst aufgebaut.(127) Der Druckkopf bewegt sich über einer Druckplattform und das extrudierte Filament wird auf der Druckplattform entladen, wodurch die erste Schicht des Objekts entsteht. Die weiteren Schichten werden aufgetragen, indem vor der erneuten Extrusion die Plattform jedes Mal abgesenkt oder die Düse angehoben wird. Die Filamente verbinden sich mit der vorhergehenden Schicht. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis das endgültige 3D-Konstrukt gefertigt ist. Die Temperatur des Druckkopfes kann bei den meisten Druckern eingestellt werden, sodass verschiedene Polymere verwendet werden können.(128, 129) Dadurch ist das Verfahren sehr flexibel in der Anwendung.

Die in Desktop-3D-Druckern am häufigsten verwendeten Materialien sind PLA und Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS). Dabei ist ABS im Gegensatz zu PLA nicht biologisch abbaubar.(96) Es besteht auch die Möglichkeit, PLA und PLA-Polymermischungen in Kombination mit verschiedenen Hydrogelen als sogenannte *Composite Scaffolds* zu fertigen. Diese haben sich als effektive *Scaffolds* für das *Tissue-Engineering* von Knorpel (130-132), Bandscheiben (132-134) und Knochen (131, 135, 136) erwiesen.(96) Der Einsatz des 3D-Drucks für die Produktion solcher *Scaffolds* ermöglicht eine hohe Reproduzierbarkeit und eine einheitliche Größe der Poren sowie eine Geometrie, die an die gewünschte Gewebebeschaffenheit angepasst werden kann.(96)

#### **2.4.4 Cura Ultimaker 2+**

Der Cura Ultimaker 2+ (Ultimaker, Utrecht, Niederlande) ist eine Weiterentwicklung des 3D-Druckers Ultimaker 2 und zeichnet sich durch seine leichte Bedienbarkeit aus.(137) Dieses Gerät verwendet das oben erläuterte Verfahren des FDM zur Erzeugung der gewünschten Modelle.(138) Er verfügt über eine beheizte Druckplatte und ermöglicht somit gute Druckergebnisse mit verschiedenen Materialien. Die Druckdaten werden mittels der Software Cura (Ultimaker, Utrecht, Niederlande) vorbereitet und über eine SD-Karte im Drucker ausgelesen. Laut dem Hersteller bietet er hohe Druckpräzision und vier variable Düsendurchmesser von 0,25 mm, 0,4 mm, 0,6 mm und 0,8 mm. Das ermöglicht abhängig

von dem gewählten Düsendurchmesser die Erstellung präziser 3D-Drucke mit Schichtdicken von bis zu 0,02 mm. Der angegebene Filament-Durchmesser beträgt 2,85 mm, und die Druckgeschwindigkeit kann im Bereich von 30–300 mm/s angepasst werden. Die Düsentemperatur kann zwischen 180 und 260 °C eingestellt werden und die Betriebstemperatur der Düse wird in weniger als 2 Min. erreicht.(137, 139) Dieser 3D-Drucker ermöglicht die Herstellung von reproduzierbaren *Scaffolds* mit einem Porennetzwerk, welches laut Studien förderlich für die Zellmigration ist.(126, 140) Der Drucker unterstützt verschiedene Filament-Materialien, darunter ABS und PLA, die im Hobby-Desktop-3D-Druck am häufigsten verwendet werden.(96) Kuhlmann *et al.* konnten zeigen, dass der Ultimaker 2+ in der Lage ist, geeignete, reproduzierbare und biokompatible *Scaffolds* herzustellen. Diese eigneten sich hervorragend für *in vitro-Tissue-Engineering*-Experimente. Außerdem konnten sie zeigen, dass die gedruckten *Scaffolds* erheblich günstiger als kommerziell hergestellte kaufbare *Scaffolds* für das *Tissue-Engineering* sind. Ein weiterer Vorteil der selbst produzierten *Scaffolds* ist der einfache Zugang durch eigene Produktion. Zusätzlich besteht jederzeit die Möglichkeit, das Design des Gerüsts zu verändern, um es an neue experimentelle Voraussetzungen anzupassen.(138, 141)

## 2.5 Evaluation der Eigenschaften von Knorpelgewebe

### 2.5.1 Bedeutung für das *Tissue-Engineering*

Das Verständnis der mechanischen Eigenschaften der verschiedenen Anteile des Nasenknorpels ist für das *Tissue-Engineering* von großer Bedeutung. Um die strukturellen Grundlagen der biomechanischen Unterschiede zwischen den Nasenknorpelanteilen zu verstehen, sollte man das Gewebe mechanisch als auch histologisch-strukturell untersuchen.(31) Die Entwicklung eines erfolgreichen Implantats hängt von der strukturellen Kompatibilität des Implantats mit dem umgebenden Hart- und Weichgewebe ab. Ein ideales Implantat sollte ähnliche mechanische Eigenschaften wie das native Gewebe aufweisen, da etwa ein Implantat mit einem höheren Elastizitätsmodul zu einer Belastung des umliegenden Gewebes führen kann. Das kann zum Versagen des Transplantats führen.(31, 142, 143)

### 2.5.2 EZM

Die EZM setzt sich aus Kollagen (10–25 %) und PG/GAG (5–10 %) sowie dem enthaltenen Wasser (65–80 %) zusammen.(144) Alcianblau färbt die sauren Polysaccharide des Knorpels und die *periodic acid-Schiff reaction* (PAS) die PG des Knorpels. Der Septum-Knorpel zeigt eine stärkere PAS- und Alcianblau-Färbung als der *Alar-* oder der *laterale* Knorpel. Studien zeigten, dass der Gehalt an Glykoproteinen und PG zu den mechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels beiträgt.(145) Zum Nachweis von GAG in paraffinierten

Gewebeschnitten wird auch die Safranin-O-Färbung verwendet. Die GAG sind orange bis rot gefärbt, die Zellkerne schwarz, mit bläulich/grünem Zytoplasma.(146) Die Elastin-Van-Gieson-Färbung (EVG) färbt den Elastin- (schwarz) und Kollagen-Anteil (rot) des Knorpels. Der hyaline Nasenknorpel weist keinen Elastin-, sondern nur einen Kollagenanteil auf.(31) Die Masson-Trichrom-Färbung dient ebenfalls zur Beurteilung des Kollagengehalts. Dabei färbt sie Kollagen rot.(146) Kollagen Typ II, welches spezifisch für den hyalinen Knorpel ist, lässt sich immunhistochemisch nachweisen.

### 2.5.3 Zellen und Struktur

Die Struktur des Nasenknorpels kann mit einer HE-Färbung untersucht werden. Nasenknorpel besteht aus Chondrozyten, welche in einer homogenen Knorpelmatrix eingebettet sind. Damit weist er ausschließlich hyaline Knorpelmerkmale auf.(31) Prozentual gesehen machen die Chondrozyten nur 1–10 % des gesamten Knorpels aus.(144) Im *septalen* Knorpel sind die Chondrozyten dichter gepackt als im *alaren* und *lateralen* Nasenknorpel. Bei diesen sind sie gleichmäßiger in der Matrix verteilt.(31)

### 2.5.4 Mechanische Eigenschaften

Mit den Fortschritten im Bereich des *Tissue-Engineering* ist es wahrscheinlich, dass gezüchteter Knorpelersatz bald den autologen Knorpel als traditionelles Material für Nasenrekonstruktionen ersetzen kann. Die Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften erscheint wichtig, um die strukturellen Eigenschaften des zu entwickelnden Knorpeltransplantats festzulegen. Hierbei sind die Elastizität sowie die Reaktion auf Druck-, Zug- und Scher-Kräften vermutlich von entscheidender Bedeutung. Ohne Kenntnisse der mechanischen Eigenschaften des Nasenknorpels sind die Möglichkeiten zur Herstellung eines Knorpeltransplantats mit nativen Eigenschaften beschränkt.(31, 147) Aufgrund der komplexen Geometrie des Nasenknorpels muss man sich dieser erst bewusst werden, um dann die mechanischen Eigenschaften der einzelnen Nasenknorpelareale zu bestimmen und miteinander zu vergleichen. Wie bereits erwähnt unterscheidet man den Septum-Knorpel, den oberen paarigen *lateralen* Knorpel und den unteren paarigen *Alar*-Knorpel. Diese drei Strukturen bestehen aus hyalinem Knorpel und lassen sich für die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften nochmals unterteilen. Das Septum wird in der Literatur in „*septal posterior*“(31), „*septal middle*“(31) und „*septal anterior*“(31) und der *Alar*-Knorpel in „*alar medial*“(31) und „*alar lateral*“(31) unterteilt.(12, 31) Griffin *et al.* stellten in ihren Untersuchungen fest, dass das Septum „(*posterior*  $2.32 \pm 0.22$  mm, *middle*  $2.19 \pm 0.22$  mm and *anterior*  $1.97 \pm 0.12$  mm)“(31) signifikant dicker ist als die *Alar*-Knorpel „(*lateral*  $1.40 \pm 0.24$  mm and *medial*  $1.54 \pm 0.28$  mm,  $p < 0.05$ )“(31). Diese erschienen in den

Untersuchungen wiederum dicker als die *lateralen* Knorpel „(0,76 ± 0,11 mm,  $p < 0.05$ )“<sup>(31)</sup>.<sup>(31)</sup> Für jeden Bereich des Nasenknorpels bestimmten sie ein Elastizitätsmodul unter Druck. Die Bereiche weisen laut Griffin *et al.* unterschiedliche Druckeigenschaften auf „(*septal* 2,72 ± 0,63 MPa, *alar* 2,09 ± 0,81 MPa und *lateral* 0,98 ± 0,29 MPa)“<sup>(31)</sup>.<sup>(31)</sup> Insgesamt ist in Kompression laut diesen Ergebnissen der Septum-Knorpel signifikant steifer als der *Alar*-Knorpel und dieser ist signifikant steifer als der *laterale* Knorpel.<sup>(31)</sup> Der Septum-Knorpel ist *posterior* signifikant steifer als *anterior*, aber laut den Autoren gibt es keinen Unterschied zwischen *superiorem* und *inferiorem* Septum-Knorpel. Dieser Unterschied kann laut Griffin *et al.* durch die Nähe zum Nasenknochen erklärt werden. Die Drucksteifigkeit des menschlichen Knochens ist wesentlich höher als die des menschlichen Knorpels.<sup>(31)</sup> Um eine Abweichung des mechanischen Moduls zwischen Knochengewebe und hinterer Nasenscheidewand zu vermeiden, muss die hintere Nasenscheidewand laut Griffin *et al.* ein höheres Elastizitätsmodul aufweisen als die vordere Nasenscheidewand.<sup>(31)</sup> Die mechanische Steifigkeit, unabhängig von der Dicke, verhalte sich so, dass der *Alar*-Knorpel „(*lateral* 0.62 ± 0.12 MPa and *medial* 0.64 ± 0.12 MPa)“<sup>(31)</sup> signifikant steifer ist als der hintere Septum-Knorpel „(0.34 ± 0.15 MPa, *middle* 0.37 ± 0.13 MPa and *anterior* 0.24 MPa ± 0.12)“<sup>(31)</sup> und der *laterale* Knorpel „(0.36 ± 0.19 MPa)“<sup>(31)</sup>.<sup>(31)</sup> Die Spannungsrelaxationsrate zeigt laut diesen Untersuchungen Unterschiede zwischen den Knorpelanteilen, wobei der *Alar*-Knorpel über 15 Min. eine höhere Relaxationsrate aufweist als der *septale* und *laterale* Knorpel.<sup>(31)</sup> Bei der Entwicklung von Knorpelimplantaten für die Nase sollte man also berücksichtigen, dass das menschliche Nasengerüst aus drei Knorpelanteilen mit unterschiedlichen mechanischen Druckeigenschaften besteht.<sup>(31)</sup>

### 2.5.5 Veränderungen des Septum-Knorpels mit dem Alter

Der GAG-Gehalt, der den Wasserhaushalt in der EZM des Knorpels aufrechterhält, ist einer der wichtigsten Faktoren für die Steifigkeit, Elastizität und Haltbarkeit des Gelenkknorpels.<sup>(148)</sup> Kim *et al.* zeigten, dass der GAG-Gehalt in der *dorsalen* Septum-Region mit zunehmendem Alter signifikant abnimmt, während in der *anterioren* Septum-Region nur ein geringerer Trend zur Abnahme anzunehmen ist. Dies legt nahe, dass altersbedingte GAG-Veränderungen im Nasenknorpel von der anatomischen Lage abhängig sind.<sup>(146)</sup> Auch der Kollagengehalt verändert sich mit dem Alter. Verschiedene Studien zeigen, dass dieser mit zunehmendem Alter ansteigt. Wieder gibt es regionale Unterschiede, wobei der Kollagengehalt im *posterioren* Septum schneller ansteigt.<sup>(146, 149, 150)</sup> Die Zelldichte des Knorpels bestimmt die Qualität des Knorpels und hat Auswirkungen auf die Knorpelreparatur.<sup>(146)</sup> Hier zeigen Studien, dass mit zunehmendem Alter eine Abnahme der Zellzahl im Nasenknorpel stattfindet.<sup>(146, 149)</sup> Der Verlust von GAG und Zellen mit

zunehmendem Alter kann zu einem klinisch signifikanten Stabilitätsverlust des dorsalen Nasen-Septums führen.(146)

## 2.6 Zielsetzung

Die Ziele dieser Arbeit lassen sich in zwei Schritte gliedern. Zunächst soll evaluiert werden, ob

- sich menschliche Chondrozyten aus Überschussgewebe isolieren und im Labor in Zellkultur vermehren lassen?
- sich *Scaffolds* aus dem im Körper biologisch abbaubaren PLA in einem Ultimaker 2+ 3D-Drucker in benötigter Form drucken lassen?

In einem zweiten Schritt soll erforscht werden, ob

- sich 3D-gedruckte *Scaffolds* aus PLA mit den aus Überschussgewebe isolierten und in Zellkultur vermehrten Zellen besiedeln lassen?
- WF Einfluss auf die Vermehrung der isolierten Zellen und die Produktion von Gewebe haben?
- die Zellen in der Lage sind, im *Scaffold* ein funktionelles und formstabiles Gewebe und Knorpelsubstanz zu bilden?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chondrozyten

Es wurde mit humanen Chondrozyten aus Septum-Knorpel gearbeitet. Diese stammten aus dem OP der HNO-Klinik der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz.

##### 3.1.2 Chemikalien, Antikörper und Lösungen

<i>Collagenase from Clostridium histolyticum</i> , Produktnummer: C5138-500MG	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
<i>Bovine Calf Serum (FCS), Iron Supplemented</i>	VWR Life Science Seradigm, Radnor, PA, USA (Avantor, Radnor, Pennsylvania, USA)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium F12</i> (DMEM/F-12) (1:1) (1x)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA)
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
Ethanol (Rotipuran® ≥ 99,8 %, p. a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin, 10.000 Einheiten/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
Trypsin-EDTA (10x TE: 5 g/L Trypsin und 2 g/L EDTA, 2x TE: 1 g/L Trypsin und 0,4 g/L EDTA, 1x TE: 0,5 g/L Trypsin und 0,2 g/L EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
<i>Insulin-Like-Growth-Factor-1 recombinant human (E. coli-derived) (IGF-1)</i> , aliquotiert 2 µg/ml, Endkonzentration 10 ng/ml	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
<i>Transforming-Growth-Factor-Beta-1 recombinant human (HEK293-derived)</i> (TGF-β1), aliquotiert 1 µg/ml, Endkonzentration 1 ng/ml	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
<i>Fibroblast-Growth-Factor-basic-2 recombinant human (E. coli-derived)</i>	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

(bFGF-2), aliquotiert 10 µg/ml, Endkonzentration 5 ng/ml	
<i>L-Ascorbic acid</i> , Endkonzentration 50 µg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
Autoklaviertes, destilliertes Wasser	Autoklav, tuttnauer Systec 5050 ELVC (Tuttnauer Systec GmbH, Linden)
Destilliertes Wasser ( <i>Aqua dest.</i> )	Hausanlage
<i>Aqua ad injectabilia</i> Braun, Lösungsmittel zur Herstellung von Parenteralia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<i>alamarBlue™ M Cell Viability Reagent</i>	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA)
Formaldehyd Methanol-frei 30 %: Formaldehyd 4 %, pH 7,6	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Rhodamine-6G-chloride</i>	Molecular probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA)
DAPI ( <i>4',6-diamidino-2- phenylindole, dihydrochloride</i> )	Molecular probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA)
<i>terralin® liquid</i>	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
PLA-Filament	Ultimaker B.V., 3511 ED Utrecht
Färbekit: Safranin-O-Lichtgrün-Färbung zur Knorpel-Darstellung <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Lichtgrün-Goldner-III</li> <li>○ Weigert Stammlösung A</li> <li>○ Weigert Stammlösung B</li> <li>○ Safranin-O-Lösung, wässrig, 1%ig</li> </ul>	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main
<i>DC™ Protein Assay Kit II</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Lysepuffer EDTA-frei: 15 ml <i>Aqua dest.</i> + 10 ml zweimolaren Trispuffer pH 7,25 + 4 g SDS (8 %) + 23 ml 87 % Glycerin (44 %), 1:3 mit <i>Aqua dest.</i> verdünnen + 2 Tabletten	Selbst angesetzt

PhosSTOP + 2 Tabletten Proteasehemmer ohne EDTA	
Trispuffer pH 7,25 (2 M Tris/HCl (400mM))	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
87 % Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PhosSTOP Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>Protease inhibitor cocktail tablets</i> (ohne EDTA)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
Kollagen-II-Antikörper	MP Biomedicals Inc., Eschwege
Puffer TBS-T20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	AppliChem GmbH, Darmstadt / Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Goat-Normalserum 1:10	Dako, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, USA
Zweit-Antikörper <i>Anti-Mouse/horseradish peroxidase (HRP)</i>	Dako, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, USA
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Dako, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, USA
<i>Aquaeous mount</i>	Zytomed Systems, Berlin
Hämalaun	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Xylol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Hedinger, Stuttgart
96 % Ethanol, vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Weigerts Eisenhämatoxylin	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main
1 % Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mayer's Hämalaun (Roth)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eosin (Roth/je 100 ml 1 Tropfen Eisessig)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Eukitt® Quick-hardening mounting medium: Entellan</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt)
Paraffin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einwegskalpell ( <i>Feather Disposable Scalpel</i> )	Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan
--	--

<p>Eppendorfggefäße <i>Safe-Lock-Tubes</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 0,5 ml</li> <li>○ 1,5 ml</li> <li>○ 2 ml</li> <li>○ 5 ml</li> </ul>	<p>Eppendorf AG, Hamburg</p>
<p><i>Falcon</i>-Röhrchen: <i>cellstar® Tubes</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 15 ml</li> <li>○ 50 ml</li> </ul>	<p>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</p>
<p>Petrischalen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Petrischale, PS, 35×10 mm, mit Nocken, Steril</li> <li>○ Gewebekulturschale, Steril, 35 mm, <i>advanced</i></li> <li>○ <i>Cell Culture Dishes, PS, 145×20 mm, vents, TC, sterile</i></li> <li>○ <i>Petri Dish 60×15 mm, with vents, sterile</i></li> </ul>	<p>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</p>
<p>serologische Pipetten mit Spitze <i>cellstar®</i>, steril</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 5 ml, Graduierung 1/10 ml, steril</li> <li>○ 10 ml, Graduierung 1/10 ml, steril</li> <li>○ 25 ml, Graduierung 2/10 ml, steril</li> </ul>	<p>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</p>
<p>Zellkulturflaschen <i>cellstar®</i> mit Sterilfilter, steril</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 25 cm<sup>2</sup></li> <li>○ 75 cm<sup>2</sup></li> <li>○ 175 cm<sup>2</sup></li> </ul>	<p>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</p>
<p>Zellschaber (1,8 cm Klinge), steril</p>	<p>Falcon (<i>Corning Incorporated</i>), Corning,</p>

	New York, USA
96-Well-Platte: <i>cellstar</i> ® <i>microplate</i> , <i>black</i> , <i>sterile</i>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellsieb <i>Easystrainer</i> 100 µm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Sterilfilter <i>Puradisc FP 30 Cellulose Acetate Syringe Filter</i> , 0.2 µm, <i>sterile</i> (50 pcs)	Cytiva, Whatmank, Freiburg im Breisgau
Sterile 21 Gauge (G) Kanüle BD <i>Microlance</i> ™ 3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sterile 10 ml-Spritze BD <i>Discardit</i> ™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Pipetten-Spitzen 200 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipetten-Spitzen 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Quali-Pipettenspitzen, 0,5–10(20) µl	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Rotilabo®-Einbettkassette Macro, weiß	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
24-Well-Zellkultur-Platte, steril: <i>cellstar</i>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<i>Kimberly-Clark</i> ™ Cellulose-Präzisionswischtücher	KimtechScience™, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Deckgläser 18×18 mm	IDL GmbH & Co. KG, Nidderau
Einweg-Pasteurpipetten, graduiert, unsteril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Superfrost-Objektträger	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig
Objektträger, geschnitten mit Mattrand 76×26 mm	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster

### 3.1.4 Geräte und Werkzeuge

Brutschrank Heracell 150i CO <sub>2</sub> <i>Incubator</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Ochsenhausen

Laborabzug nach DIN 12924	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
sterile Werkbank <i>Flow Hera safe</i>	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH), Burgwedel
Zählkammer Neubauer- <i>improved</i>	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
Cura Ultimaker 2+ Connect	Ultimaker B.V., 3511 ED Utrecht, Niederlande
Waage Kern PCB	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Photometer Multiskan <i>Ascent</i>	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Mikroskop Nikon <i>Eclipse TE2000-U</i>	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskop Nikon TMS <i>Inverted Phase Contrast Microscope</i>	Nikon GmbH, Düsseldorf
<i>Vortex Top-Mix 11118 Fisher Brand®</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA)
Autoklav tuttner Systec 5050 ELVC	Tuttner Systec GmbH, Linden
Feinwaage, Kern ABT120-5DM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
<i>Leica EG1150 H Heated Paraffin Embedding Module</i>	Leica, Wetzlar
Mikroskop Nikon <i>Eclipse E200</i>	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskopkamera Nikon DS-Fi1	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikrotom Leica RM2165	Leica, Wetzlar
Tischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Vortex-Schüttler, VV3	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA

Waage, Kern PCB8000-1	Kern & Sohn GmbH, Balingen
HERAEUS MULTIFUGE 1L-R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
UNIVERSAL 16 R, Tischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Bandelin Sonopuls	Bandelin <i>electronic</i> GmbH & Co. KG, Berlin
Photometer Fluoroskan <i>Ascent</i>	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Digitale monochromatische Mikroskopkamera Olympus XM10	Evident, Tokyo, Japan
Umluft-Trockenschrank Heraeus UT20 <i>Function line</i>	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Leitz Orthoplan Durchlichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
<i>Pipetboy acu</i>	IBS Integra Biosciences GmbH, Biebertal
Transferpette® S <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 100–1000 µl</li> <li>○ 20–200 µl</li> <li>○ 2–20 µl</li> </ul>	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 10–100 µl</li> <li>○ 1–10 µl</li> </ul>	Eppendorf AG, Hamburg

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Versuchsablauf

Im ersten Schritt des Versuchsablaufs wurden die Septum-Knorpelproben enzymatisch aufgeschlossen und die Chondrozyten in Kultur genommen. Dabei wurden sie in einen Arm mit WF und einen Arm ohne WF aufgeteilt. *In vitro* wurden die Zellen dann bis zu der Zellzahl expandiert, welche für die Besiedlung der *Scaffolds* berechnet war. Diese Zielgröße variierte aufgrund der initialen Knorpelmenge und den geplanten Analysemethoden Proben-individuell. Abhängig von der in Kultur genommenen Zellzahl an Tag Null und der Anzahl an zu besiedelnden *Scaffolds* wurde nach zwei bis drei Wochen die erforderliche Zellzahl erreicht. Diese wurden dann, ebenfalls aufgeteilt in die zwei Versuchsarme, auf PLA-*Scaffolds* übertragen. Auf diesen wurden die Zellen zehn Wochen lang kultiviert. Nach einer, drei, fünf und zehn Wochen wurde jeweils ein mit Chondrozyten ohne WF-Einfluss besiedelter und kultivierter *Scaffold* (non-WF-*Scaffold*) und ein mit Chondrozyten unter WF-Einfluss besiedelter und kultivierter *Scaffold* (WF-*Scaffold*) pro *Scaffold*-Größe (100 µm, 200 µm und 300 µm) entnommen und mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt, anschließend fixiert, eingebettet, geschnitten und gefärbt. Zu den gleichen Zeitpunkten wurden auch besiedelte *Scaffolds* entnommen, um die Proteinkonzentration und die Gesamtzahl der Zellen pro *Scaffold* mit konzentriertem Trypsin-EDTA (TE) zu bestimmen. Parallel dazu wurden die Chondrozyten in Zellkulturflaschen kultiviert. Auch hier wurden die Zellen nach einer, drei, fünf, siebeneinhalb und zehn Wochen geteilt, gezählt und auf Deckgläsern ausgesät. Die Chondrozyten-*Scaffolds* wurden nach in Abbildung 2 dargestelltem Schema kultiviert. Der obere Arm wurde ohne WF, der untere mit WF kultiviert.

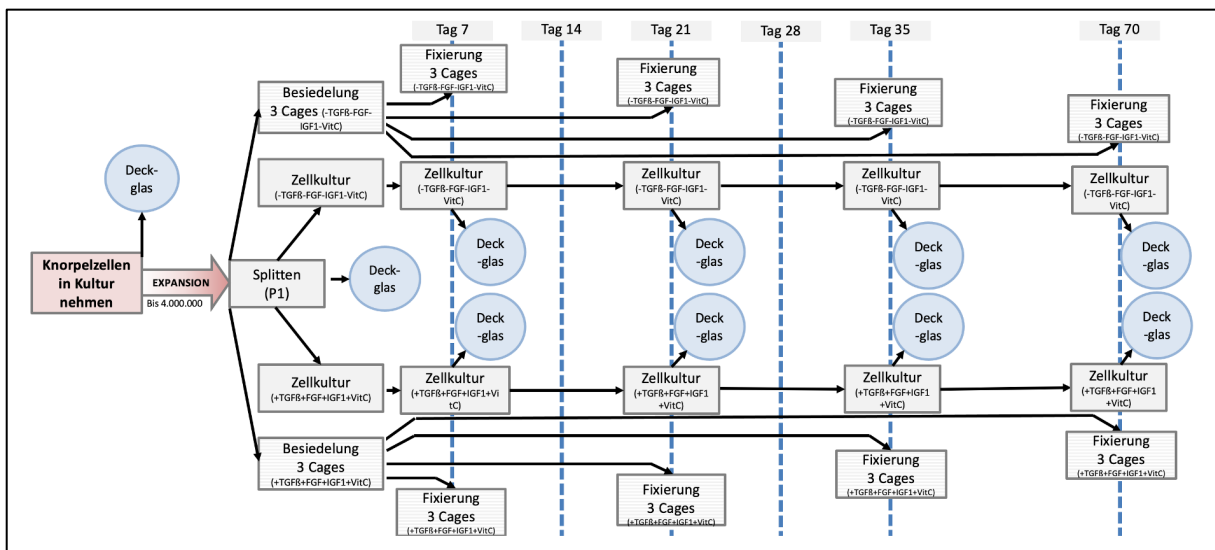


Abbildung 2: Kultivierungs-Schema für die Chondrozyten auf den PLA-Scaffolds

Die Abbildung zeigt das Kultivierungsschema für die Zellkulturen und Scaffolds ohne die zusätzlichen Scaffolds für die Proteingehalt- und Zellzahlbestimmung.

### 3.2.2 PLA-Scaffolds

Die Chondrozyten wurden auf Scaffolds aus PLA der Firma Ultimaker kultiviert. Dabei handelt es sich um einen synthetischen Polyester auf Basis der Milchsäure. PLA besteht aus einzelnen Lactat-Monomeren und zeichnet sich durch eine hohe Biokompatibilität sowie Abbaubarkeit aus. Es wurden drei verschiedene PLA-Scaffolds eingesetzt, welche sich in den Gitterabständen und geringfügig in den Außenabmessungen unterscheiden. Im weiteren Verlauf wird für diese die Bezeichnung 100  $\mu\text{m}$ -, 200  $\mu\text{m}$ - und 300  $\mu\text{m}$ -Scaffolds benutzt. Diese Einteilung basiert auf den Gitterabständen (Abb. 3).

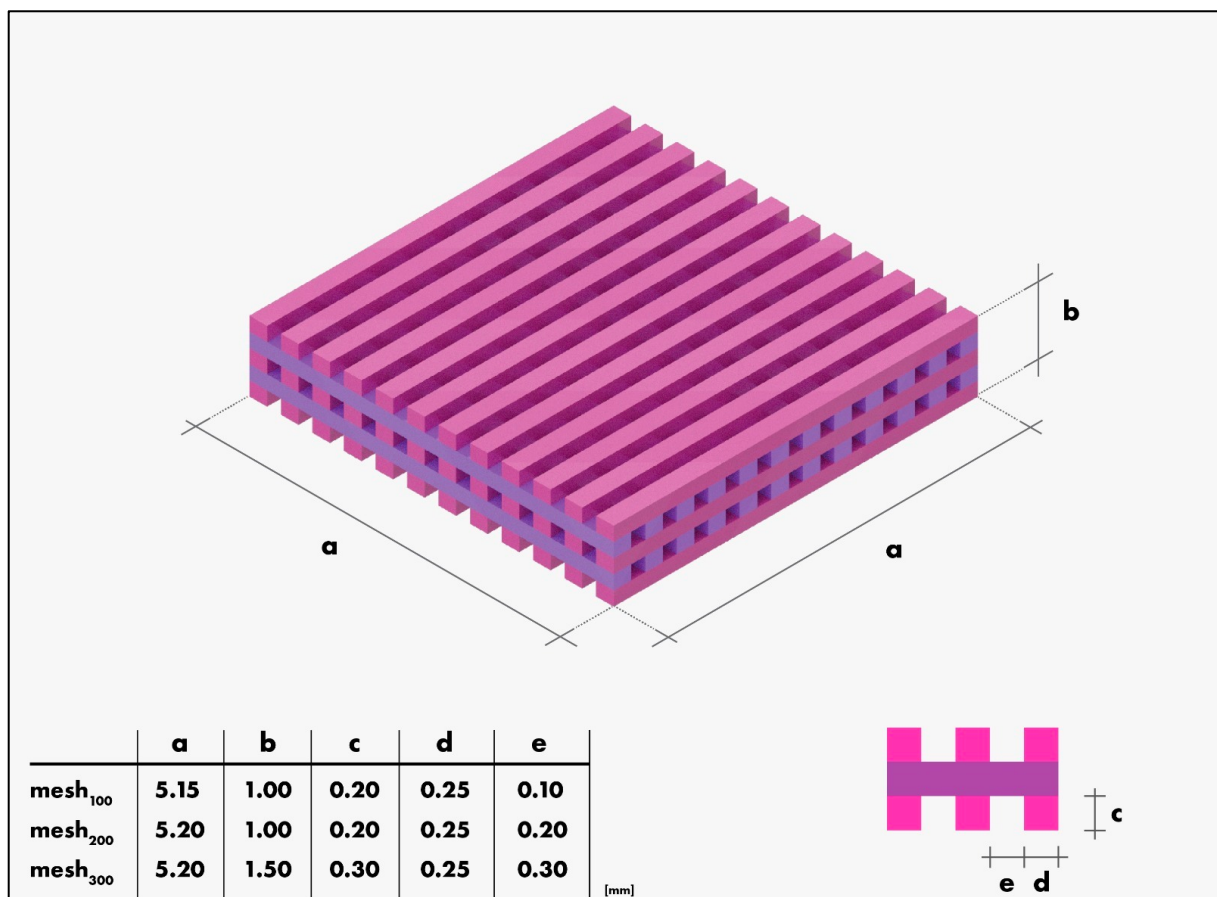


Abbildung 3: Scaffold-Planungsmodell mit Maßen

Die Abbildung zeigt die Struktur der Scaffolds. Diese ist für alle drei Scaffold-Größen identisch. Die 100  $\mu\text{m}$ -Scaffolds unterscheiden sich in den Außenmaßen aufgrund planungstechnischer Ursachen um 0,05 mm in Maß (a) von den anderen Scaffold-Größen, die 300  $\mu\text{m}$ -Scaffolds unterscheiden sich in den Maßen um 0,5 mm in Maß (b) und 0,1 mm um Maß (c) von den anderen Scaffold-Größen. Der entscheidende Unterschied ist Maß (e), welches den Gitterabstand und somit die Scaffold-Größe definiert.

Die Struktur der *Scaffolds* ist identisch. Der 3D-Drucker fertigte Streben an, die orthogonal aufeinander ausgerichtet sind. Eine Strebe besteht aus mehreren parallelen aufeinanderliegenden Bahnen, die insgesamt eine Höhe und Breite von 0,25 mm ( $d$ ) misst. Der Abstand zwischen den Bahnen ist der Gitterabstand ( $e$ ). Daraus setzt sich ein Quader zusammen, dessen Abmessungen von der Bahnlänge, -breite, -höhe, -anzahl und -abstand bestimmt wird.

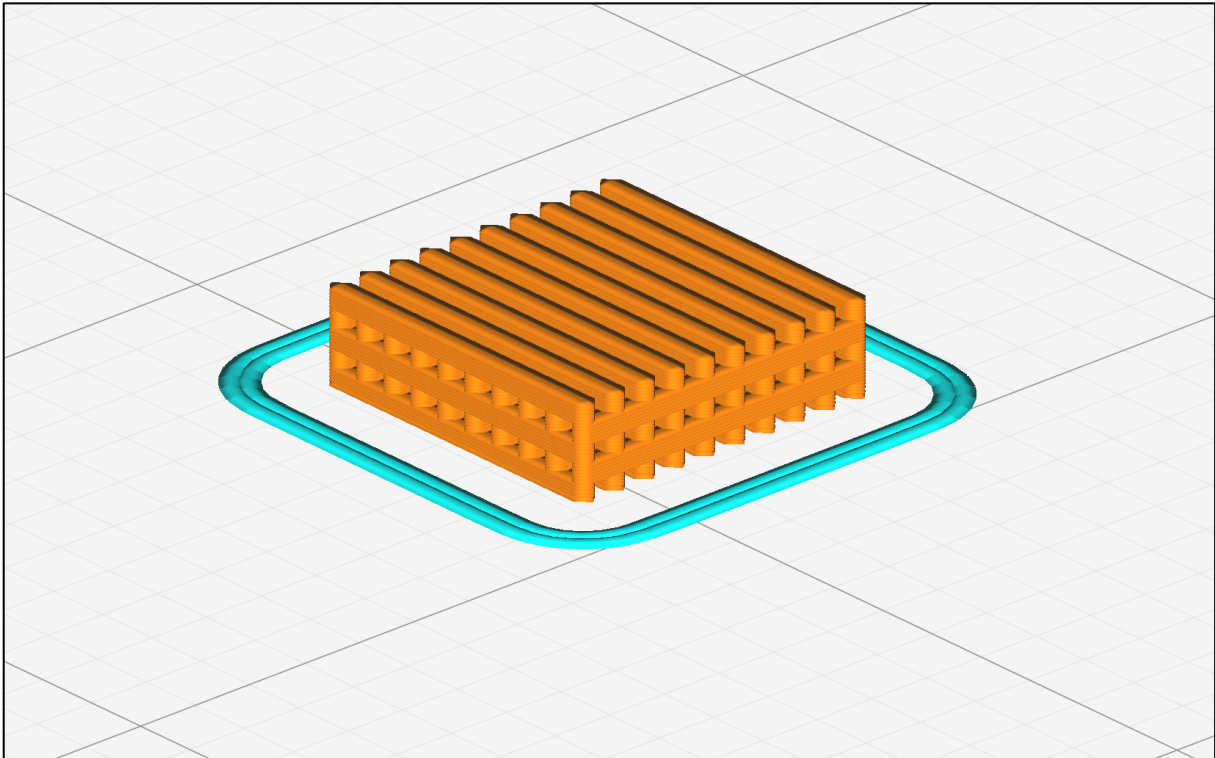


Abbildung 4: Druckvorschau für einen 300  $\mu\text{m}$ -Scaffold in Cura

Hier wird in Abbildung 4 beispielhaft die Druckvorschau im *Slicing*-Programm Cura des 300  $\mu\text{m}$ -Scaffolds gezeigt. Die türkisfarbene Umrandung dient als Vorbereitungsmaßnahme der Druckerdüse und gehört nicht zum *Scaffold*. Dadurch wird eine bessere Druckqualität gewährleistet.

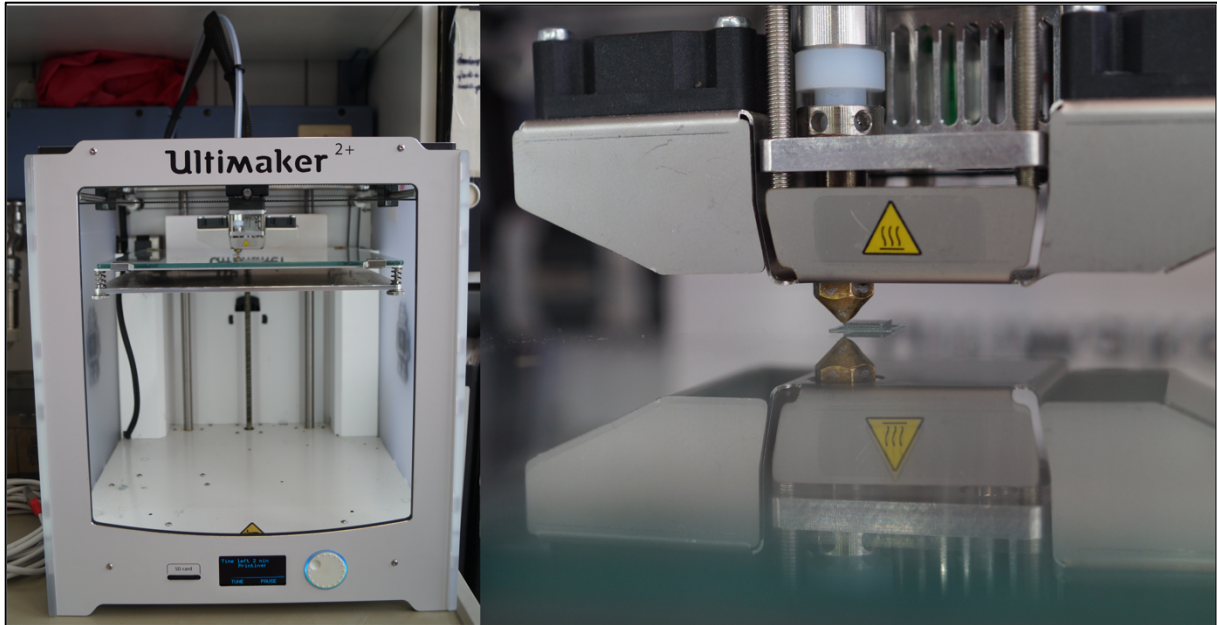


Abbildung 5: Cura Ultimaker 2+ während des Druckvorgangs

Für den Druck der *Scaffolds* wurde der 3D-Drucker Cura Ultimaker 2+ verwendet (Abbildung 5). Als Filament kam das bereits beschriebene PLA (Ultimaker B.V., 3511 ED Utrecht, Niederlande) zum Einsatz. Vor dem Druck wurden die Arbeitsfläche des Druckers sowie die Pinzetten zur Entnahme der *Scaffolds* mit Flächendesinfektionsmittel (Terralin liquid) gereinigt. Das *Modelling* der *Scaffolds* erfolgte mithilfe des Programms Rhino 8 + Grasshopper (Rhino3D, Robert McNeel & Associates), während das *Slicing* mit dem Programm Ultimaker Cura Version 4.11.0 (Ultimaker B.V., 3511 ED Utrecht, Niederlande) mit freundlicher Unterstützung von [REDACTED] durchgeführt wurde. Eine Druckgeschwindigkeit von 40 mm/s wurde gewählt. Die initiale Drucktemperatur betrug 190 °C, die Drucktemperatur lag bei 200 °C und am Ende wurde eine finale Drucktemperatur von 185 °C erreicht. Der Druckdüsendurchmesser betrug 0,25 mm. Da der Druckvorgang bei diesen Temperaturen durchgeführt wurde, konnte von einer gewissen Sterilität der *Scaffolds* ausgegangen werden. Diese wurden unmittelbar nach dem Vorgang in *Falcons* überführt und gelagert. In Abbildung 6 ist ein unbesiedelter 300 µm-*Scaffold* von oben zu sehen.

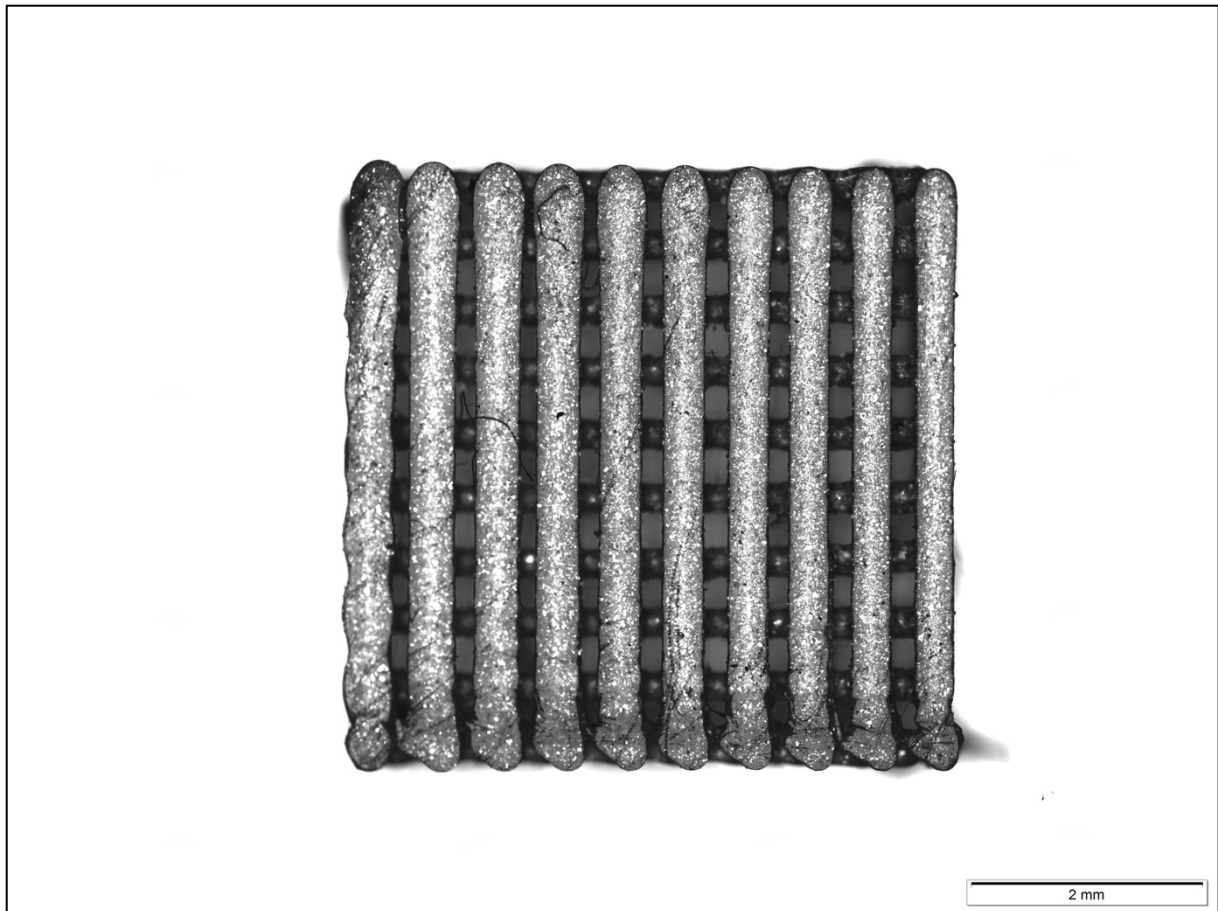
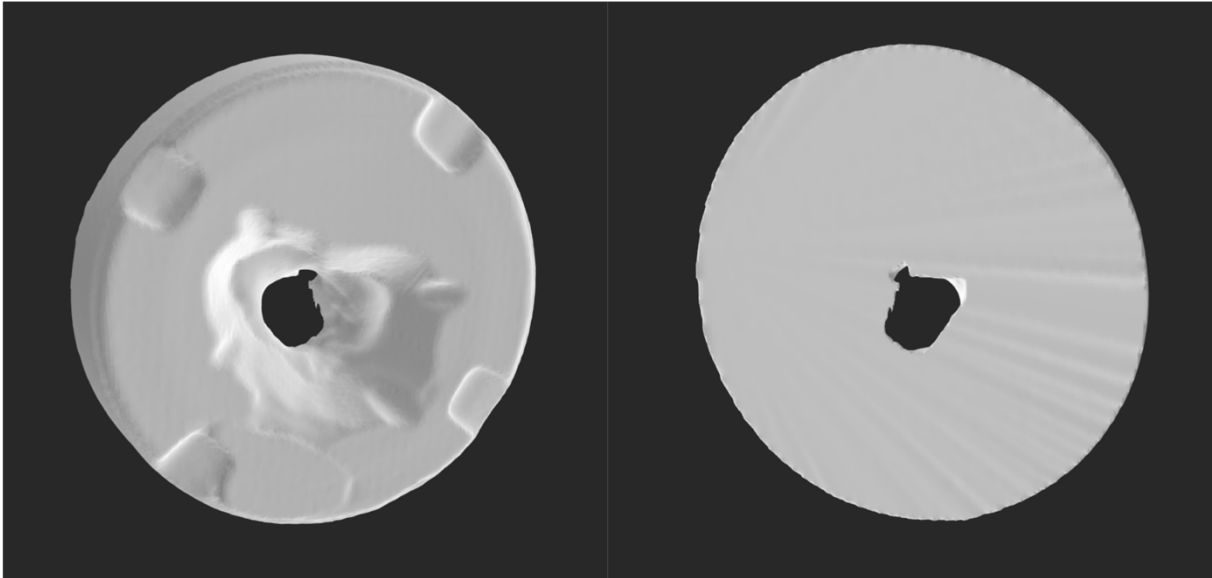


Abbildung 6: 300 µm-Scaffold von oben unter 40-facher Vergrößerung

Vor dem Verwenden in Zellkultur wurden die *Scaffolds* für eine Stunde in 100 % Ethanol gegeben, um eventuelle Verunreinigungen zu beseitigen. Anschließend wurden sie bei einer Temperatur von 64 °C für mindestens 30 Minuten getrocknet.

### 3.2.3 Patienten-individuelle *Scaffolds*

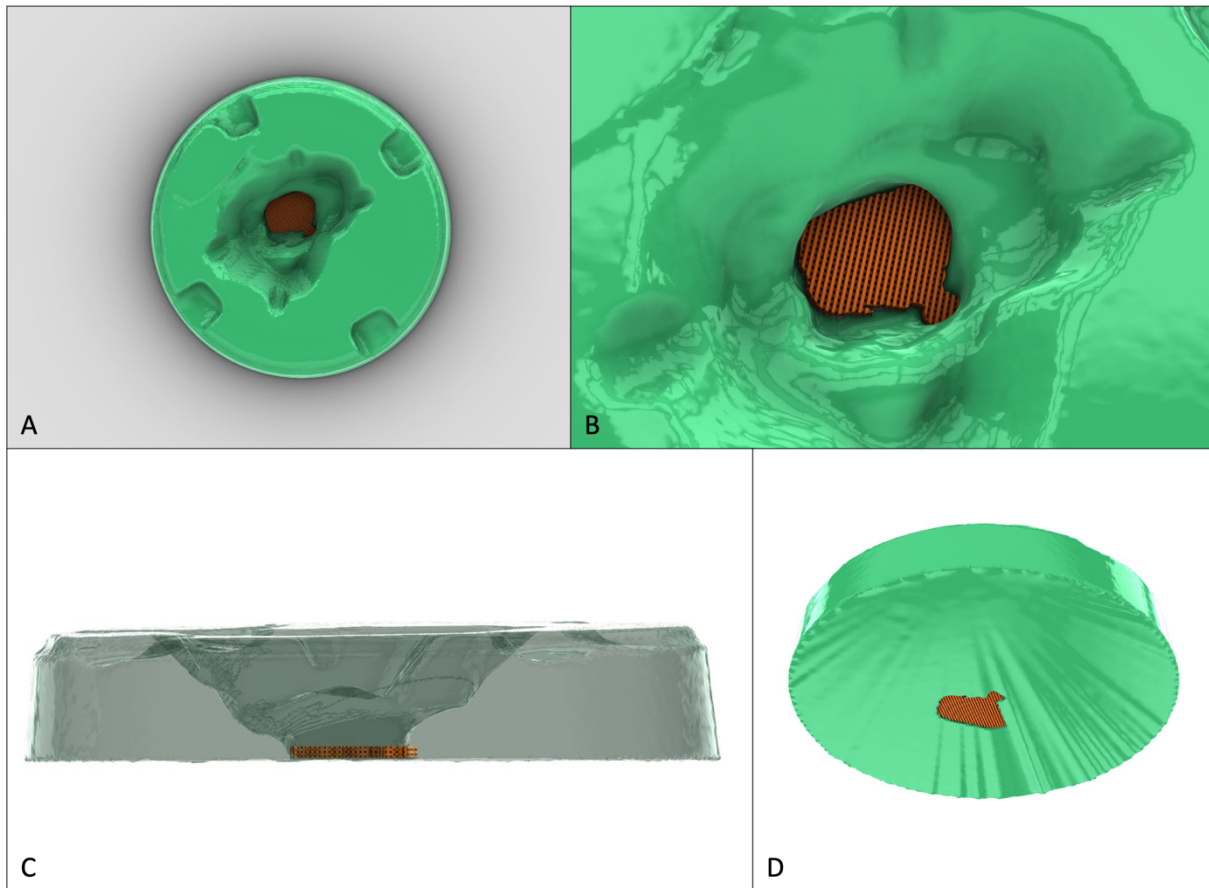
Nach der Evaluation der oben gezeigten einfachen *Scaffolds* sollte untersucht werden, ob aus 3D-Scans von Patienten mit Septum-Perforationen Patienten-individualisierte *Scaffolds* entworfen und gedruckt werden können. Dies war dank eines freundlicherweise durch den Kooperationspartner Jörn Brom (Brom Epithetik, Heidelberg) zur Verfügung gestellten 3D-Scans einer perforierten Nasenscheidewand möglich. Auf Basis einer Abformung der Septum-Perforation wurde die Gipsform als Negativ gescannt, was wiederum das digitale Einpassen einer digitalen Vorlage für einen passgenauen *Scaffold* ermöglichte. Der im STL-Format zur Verfügung gestellte *Scan* enthält die Geometrie und die Maße der Perforation in einem virtuellen 3D-Modell (Abb. 7).



*Abbildung 7: 3D-Scan der Septum-Perforation*

*Linkes Bild Ansicht von oben, rechtes Bild Ansicht von unten.*

Aus dieser STL-Datei wurde dann im Rahmen des *Modelling* mit den CAD-Programmen Rhino 8 + Grasshopper (Rhino3D, Robert McNeel & Associates) auf Grundlage der Geometrie und der Maße des 3D-Scans ein 3D-Modell mit der Perforationsfläche als Grundfläche, einer Höhe von 1,5 mm und dem Gitterdesign der 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* ein individualisiertes *Scaffold*-Modell für den 3D-Drucker geschaffen (Abb. 8 und 9).



**Abbildung 8: Design-Prozess des individualisierten 300 µm-Scaffolds**

*Bild (A) zeigt den 3D-Scan in Rhino 8 mit eingesetztem Scaffold in der Aufsicht; Bild (B) zeigt dieselbe Perspektive in Vergrößerung. Bild (C) zeigt den transparenten 3D-Scan mit eingesetztem Scaffold in der Seitenansicht und Bild (D) zeigt den 3D-Scan mit eingesetztem Scaffold von unten. Man erkennt, dass die Form des Scaffolds Grundlage der Funktion als passendes Transplantat für die Septum-Perforation des Patienten ist.*

Abbildung 8 zeigt die Kombination aus dem 3D-Scan des Negativs und dem darauf basierenden eingepassten 300 µm-Scaffold-Modell aus verschiedenen Perspektiven. Zusammengefasst wurde der innere Aufbau des 5×5 mm großen Scaffold mit einem Gitterabstand von 300 µm auf die individuelle Grundfläche des Knorpeldefekts transferiert.

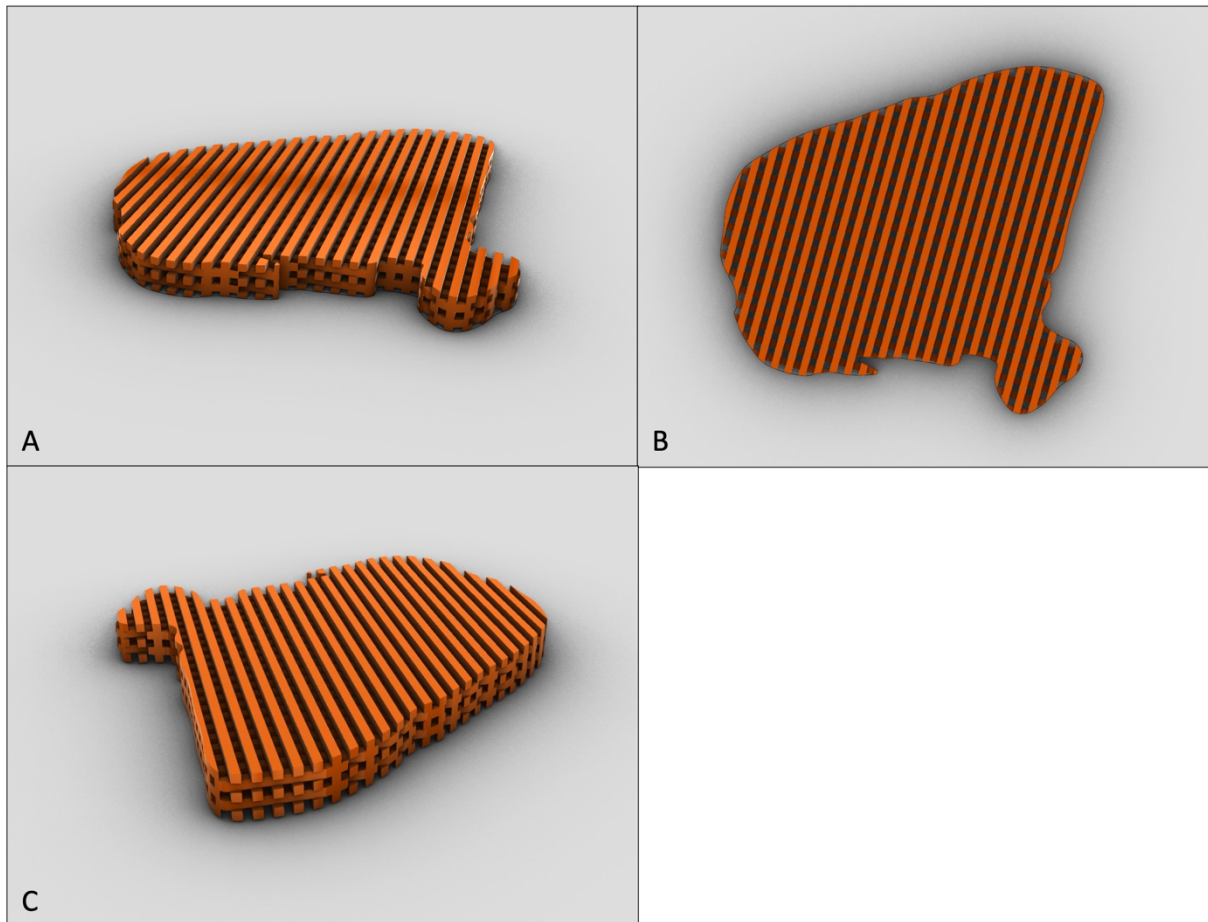


Abbildung 9: **Individualisierter 300  $\mu$ m-Scaffold mit Mikrostruktur**

Bild (A) zeigt das 3D-Modell des Scaffolds von schräg-vorn, Bild (B) zeigt die Grundfläche des Scaffolds und Bild (C) zeigt das Modell von schräg-hinten.

Abbildung 10 zeigt die Grundfläche und einen Querschnitt des individualisierten *Scaffolds*. Dazu sind zwei Durchmesser der Grundfläche von 15 mm und 16 mm, welche auf den Maßen der STL-Datei basieren, eingezeichnet. Der Gitterabstand von 300  $\mu$ m basiert als Teil der Mikrostruktur auf dem ursprünglichen 300  $\mu$ m-*Scaffold*. Im Querschnitt ist zusätzlich die ebenfalls auf dem 300  $\mu$ m-*Scaffold* basierende Höhe von 1,5 mm ersichtlich.

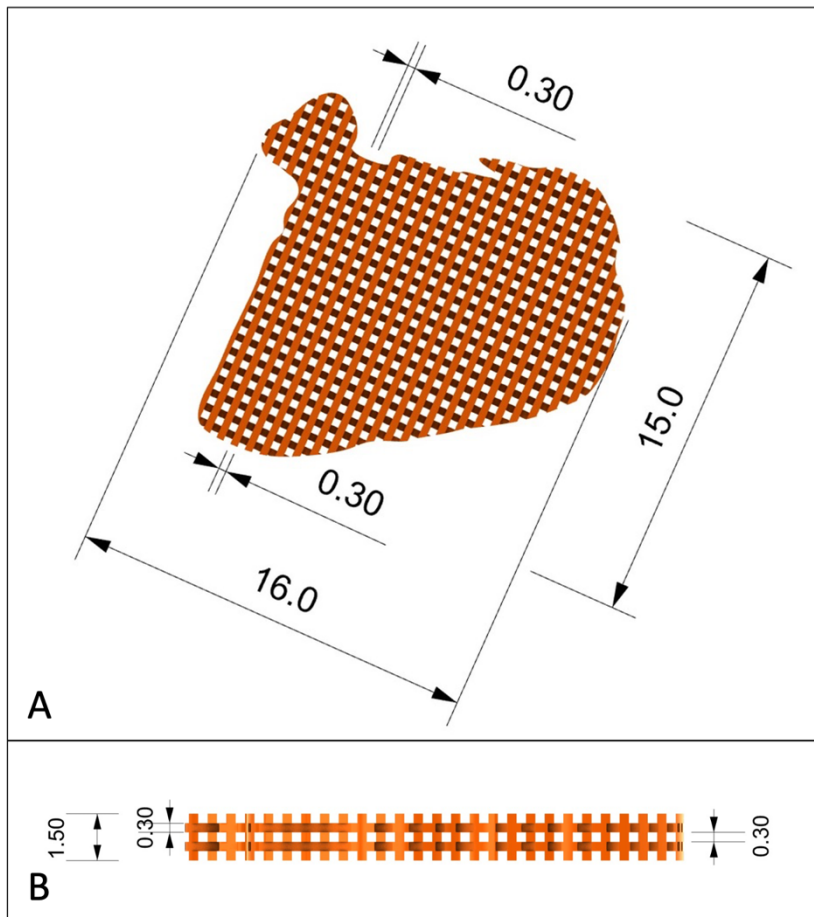


Abbildung 10: **Maße des individualisierten 300 µm-Scaffolds**

Bild (A) zeigt die Grundfläche des Scaffolds samt Maßen, Bild (B) zeigt einen Querschnitt des Scaffolds samt Maßen.

Der individualisierte *Scaffold* wurde homolog mit dem Cura Ultimaker 2+ unter Verwendung des etablierten PLA (Ultimaker B.V., 3511 ED Utrecht, Niederlande) gedruckt. Vor dem Druck wurden ebenfalls die Arbeitsfläche des Druckers sowie die Pinzetten zur Entnahme der *Scaffolds* mit Flächendesinfektionsmittel (Terralin liquid) gereinigt. Ebenso wurde das *Slicing* mit dem Programm Ultimaker Cura Version 5.5.0 (Ultimaker B.V., 3511 ED Utrecht, Niederlande) mit freundlicher Unterstützung von [REDACTED] durchgeführt. Die übrigen Verfahrensschritte entsprachen den Arbeitsschritten der standardisierten *Scaffolds*. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis dieses Design- und Druckprozesses auf der Druckplattform und unter dem Mikroskop.

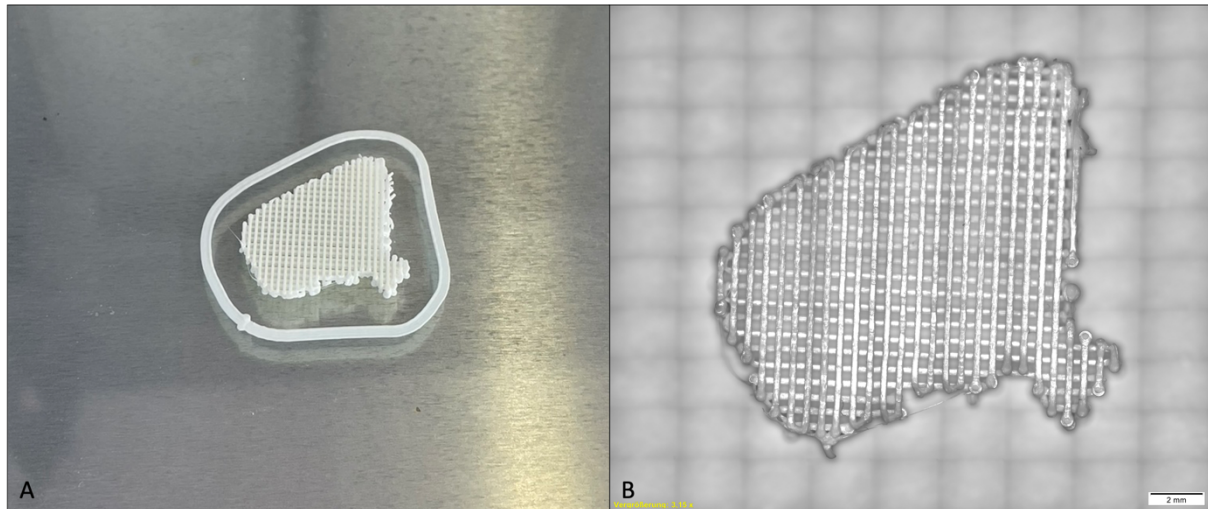


Abbildung 11: **Gedruckter individualisierter 300 µm-Scaffold**

Bild (A) zeigt den Scaffold nach dem Druck auf der Druckplattform. Bild (B) zeigt den identischen Scaffold in 3,15-facher Vergrößerung mit dem Mikroskop aufgenommen.

### 3.2.4 Isolation der Chondrozyten

Vor der Kultivierung und Amplifikation *in vitro* wurden die Chondrozyten aus humanem Septum-Knorpel isoliert, der als Überschussmaterial bei Septum-Plastiken in der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Universitätsmedizin Mainz anfiel (Ethikvotum „Rekonstruktion von Gewebsdefekten im Kopf-Hals-Bereich mittels 3D-gedruckter Zell-Biomaterial-Implantate“, Antragsnummer 2023-17203\_1).

#### 3.2.4.1 Ansetzen der Enzymlösung

Für den Knorpelaufschluss wurde das Kulturmedium *Dulbecco's Modified Eagle Medium F12* (DMEM/F-12 oder Kulturmedium) mit 0,2 % „*Collagenase from Clostridium histolyticum*“ und 5 % fetalem Kälberserum (FCS) versetzt. Zur Aufschließung von 100 mg Knorpel wurde 1 ml Enzymlösung verwendet. Zunächst wurde die entsprechende Menge *Collagenase from Clostridium histolyticum* in einem 5 ml-Eppendorfgeläß abgewogen und in Kulturmedium gelöst. Daraufhin wurde die gesamte Lösung mittels eines sterilen Filters (*Puradisc FP 30 Cellulose Acetate Syringe Filter*) sterilfiltriert und mit 5 % FCS versetzt.

#### 3.2.4.2 Enzymatische Aufspaltung und In-Kulturnahme

Die Knorpelprobe wurde unter sterilen Bedingungen im Operationssaal in ein 50 ml-*Falcon* mit 10 ml *Phosphat-buffered-saline* (PBS), welches 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) enthielt, überführt. Anschließend wurde sie im Labor unter sterilen Bedingungen gewogen und mit einem Skalpell in 3–5 mm große Knorpelstücke zerkleinert. Dann wurde die

vorbereitete Enzymlösung dazu und die Petrischale bei 37 °C für 24 Stunden in den Brutschrank gegeben.

Am nächsten Tag wurde die Suspension mit einer Pipette durch ein Sieb mit einer Porengröße von 100 µm (*Easystainer*, Greiner Bio-One GmbH) filtriert. Danach wurde die Petrischale mit PBS gespült und das PBS ebenfalls durch das Sieb gegeben. Das Sieb wurde mehrmals mit PBS gespült und ein Zellschaber (*Falcon (Corning Incorporated)*) wurde verwendet, um die Chondrozyten durch das Sieb zu streichen.

Die Suspension wurde für 5 Min. bei 1500 Umdrehungen pro Minute (U/Min.) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert, welches 10 % FCS und 1 % P/S enthielt und im Folgenden als Standardkulturmedium bezeichnet wird. Die Zellzahl wurde mithilfe von Trypanblau und einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Jeweils drei Deckgläser mit Zellen wurden für jeden experimentellen Arm, ohne WF und mit WF, ausgesät. Entsprechend der Gesamtzellzahl wurden zwischen 50.000 und 150.000 Zellen pro Deckglas ausgesät und kurz vor Erreichen der Konfluenz mit vierprozentigem Paraformaldehyd (PFA) oder fünfundsiebzigprozentigem Ethanol fixiert.

Die Hälfte der restlichen Chondrozyten wurde mit Standardkulturmedium entnommen und auf 5 ml Standardkulturmedium ergänzt. Im Anschluss erfolgte die Hinzugabe von WF. Die andere Hälfte wurde ebenfalls auf 5 ml Standardkulturmedium ergänzt, jedoch ohne WF hinzuzugeben. Die Zellen im jeweiligen Medium wurden in eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche transferiert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank gelagert. Das Kulturmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Bei Konfluenz der Zellen wurden sie in ihrer Gesamtheit in größere Zellkulturflaschen überführt, erst in eine 75 cm<sup>2</sup>-Flasche und dann in eine 175 cm<sup>2</sup>-Flasche. Die Zellzahl wurde dabei mithilfe des Neubauer-Zählkammerverfahrens bestimmt. Dabei war das Ziel, eine Zellzahl von 4 Mio., später 6 Mio. Zellen pro Versuchsarm zu erreichen. Nach 14 bis 21 Tagen wurden die Zellen auf die *Scaffolds* überführt, jeweils eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche besiedelt und mindestens zwei Deckgläser pro Versuchsarm ausgesät.

#### 3.2.4.3 Wachstumsfaktormedium

Für das Standardkulturmedium mit WF wurde das Kulturmedium DMEM/F-12 verwendet, welches mit 10 % FCS und 1 % P/S ergänzt wurde. Anschließend wurden vier WF hinzugefügt. Die WF IGF-1, TGF-β1 und bFGF-2 wurden bei einer Temperatur von -30 °C aliquotiert gelagert und jeweils beim Ansetzen des Mediums aufgetaut. Ascorbat wurde als Pulver bei Raumtemperatur gelagert und nach Bedarf eingewogen. Danach wurde es in

destilliertem Wasser (*Aqua dest.*) gelöst und mithilfe eines Sterilfilters (*Puradisc FP 30 Cellulose Acetate Syringe Filter*) sterilfiltriert. Es wurde jeweils eine entsprechende Menge in das Standardkulturmedium pipettiert, um die Zielkonzentrationen im Medium zu erreichen. Diese betrug für IGF-1 10 ng/ml, für TGF- $\beta$ 1 1 ng/ml, für bFGF-2 5 ng/ml und für Ascorbat 50  $\mu$ g/ml.

### 3.2.5 Zellkultur

#### 3.2.5.1 Kultivierung

Die Chondrozyten wurden in Zellkulturflaschen der Fläche 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> und 175 cm<sup>2</sup> (T25, T75 und T175-Zellkulturflaschen) im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Als Kulturmedium wurde DMEM/F-12 verwendet, welches mit 10 % FCS und 1 % P/S versetzt wurde (Standardkulturmedium). Regelmäßig wurde mit dem Lichtmikroskop das Wachstum kontrolliert und festgehalten. Pro Woche wurde das Medium zweimal gewechselt. Es handelte sich bei allen Kulturen um Primärkulturen, welche maximal bis zur Passage 10 kultiviert wurden. Das Arbeiten mit der Zellkultur fand immer an einer sterilen Werkbank (*Flow Hera safe*, Heraeus Holding GmbH) statt. Knapp vor der vollständigen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Medium abgeschüttet und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit TE abgelöst, wozu dieses in die Zellkulturflasche gegeben und dann 3 Min. im Brutschrank inkubiert wurde. Unter dem Lichtmikroskop wurde die vollständige Ablösung der Zellen kontrolliert, woraufhin die Reaktion mithilfe von Standardzellkulturmedium gestoppt wurde. Daraufhin wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-*Falcon* (Greiner *Bio-One* GmbH) pipettiert und bei 1500 U/Min. für 7 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet in 2 ml Zellkulturmedium durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend wurde die benötigte Menge Zellen entnommen, mit Zellkulturmedium vermischt und in eine neue Zellkulturflasche der entsprechenden Größe gegeben.

#### 3.2.5.2 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl in der Zellsuspension wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Dafür wurden 20  $\mu$ l der Zellsuspension mit 20  $\mu$ l 0,4%iger Trypanblau-Lösung vermischt und in die Zählkammer pipettiert. Es wurden immer mindestens zwei Quadrate ausgezählt. Die Gesamtzellzahl ergab sich durch folgende Formel:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Anzahl gezählte Zellen}}{4} \times 2 \times 10.000 \times \text{Volumen Zellsuspension in ml}$$

### 3.2.5.3 Deckgläser

Beim erstmaligen In-Kultur-nehmen und bei jedem weiteren Teilungsschritt wurden pro Zellkultur drei Deckgläser, also je drei Deckgläser mit und drei Deckgläser ohne WF, mit Zellen besiedelt. Dafür wurden die Deckgläser unter sterilen Bedingungen mit 70 % Ethanol sterilisiert und danach in PBS gewaschen. Dann wurden sie in kleine Petrischalen gegeben. Nachdem das PBS verdunstet war, wurden die Zellen in dem entsprechenden Medium auf die Deckgläser gegeben und im Brutschrank bei 37 °C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Dabei wurden diese mit dem Lichtmikroskop im Wachstum verfolgt. Kurz vor der vollständigen Konfluenz der Zellen wurden die Deckgläser fixiert. Dies geschah in zwei verschiedenen Verfahren, ein Deckglas wurde mit 75 % Ethanol und zwei Deckgläser mit 4 % PFA fixiert.

1. 75 % Ethanol: Die Deckgläser wurden in der Petrischale dreimal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde mit einer Einmal-Pipette abgezogen und 2 ml 75 % Ethanol zugegeben. Nach 20 Min. bei Raumtemperatur wurden die 2 ml Ethanol wieder abgezogen und das Deckglas dreimal mit PBS gewaschen.
2. 4 % PFA: Die Deckgläser wurden in der Petrischale dreimal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde mit einer Einmal-Pipette abgezogen und 2 ml 4 % PFA zugegeben. Nach 20 Min. bei Raumtemperatur wurden die 2 ml PFA abgezogen und das Deckglas dreimal in fünfminütigen Abständen mit PBS gewaschen.

Die Deckgläser wurden in PBS in einem Kühlraum bei 4 °C gelagert.

### 3.2.6 Besiedlung der PLA-Scaffolds

Nach 14–21 Tagen erreichte die durch das Neubauer-Zählkammer-Verfahren bestimmte Zellzahl pro Zellkultur (ohne WF, mit WF) den zur Besiedlung der *Scaffolds* berechneten Wert. Dieser Wert wurde vorausgesetzt, um alle benötigten *Scaffolds* zu besiedeln und die Anzahl dieser *Scaffolds* war abhängig von den geplanten Auswertemethoden pro Probe. Die Besiedlungsplanung wird im Folgenden aufgeteilt nach Auswertemethode geschildert.

#### 3.2.6.1 Auswertung besiedelter Scaffolds für Schnitt- und Fluoreszenzfärbungen

Die erste Probe wurde nur bis zur Woche 5 auf *Scaffolds* untersucht, die zweite bis fünfte Probe bis zur Woche 10. Die erste, zweite und dritte Probe wurde jeweils auf allen drei *Scaffold*-Größen kultiviert. Die vierte Probe wurde nur auf den 300 µm-*Scaffolds* kultiviert, mit Ausnahme der *Scaffolds*, die bis zur zehnten Woche besiedelt wurden, diese wurden in allen drei Größen besiedelt. Die fünfte Probe wurde nur auf 300 µm *Scaffolds* kultiviert. So wurden je Probe die vorher festgelegte Anzahl an *Scaffolds*, eine Zellkultur und drei Deckgläser je Arm mit Zellen der ersten Passage besiedelt. Je ein non-WF- und ein WF-

*Scaffold* je *Scaffold*-Größe wurde zu den Zeitpunkten Woche 1, 3, 5 und 10 der Besiedlung entnommen, Fluoreszenz-gefärbt und fixiert. Außerdem wurde zu diesem Zeitpunkt je Arm erneut drei Deckgläser ausgesät und die T25-Zellkultur *gesplittet* und mit der Neubauer-Zählkammer gezählt.

### 3.2.6.2 Auswertung besiedelter Scaffolds für Zellzahlbestimmung

Zusätzlich wurden ab der dritten Probe zusätzliche *Scaffolds* besiedelt, um die Zellzahl auf den non-WF- und WF-*Scaffolds* mit TE zu bestimmen. Bei der dritten Probe wurden Zellen der Passage 2 auf 300 µm-*Scaffolds* ausgesät und nach Woche 1, 2, 3, 4, 5 ausgewertet. Bei der vierten und fünften Probe wurden Zellen der ersten Passage auf 200 µm- und 300 µm-*Scaffolds* ausgesät und nach Woche 1, 3, 5 und 10 ausgewertet.

### 3.2.6.3 Auswertung besiedelter Scaffolds für Proteinbestimmung

Zusätzlich wurden ab der vierten Probe zusätzliche *Scaffolds* besiedelt, um die Proteinkonzentration der non-WF- und WF-*Scaffolds* zu bestimmen. Bei der vierten Probe wurden Zellen der Passage 1 auf 200 µm- und 300 µm-*Scaffolds* ausgesät, bei der fünften Probe wurden Zellen der Passage 1 auf 300 µm-*Scaffolds* ausgesät und nach Woche 1, 3, 5 und 10 ausgewertet. Die hier aufgeführte Tabelle 1 zeigt die Anzahl der besiedelten *Scaffolds* aufgeteilt nach Woche (Entnahmezeitpunkt), Auswertemethode der *Scaffolds* und *Scaffold*-Größe (Gitterabstand). Da jeweils ein *Scaffolds* unter WF-Einfluss und einer ohne WF-Einfluss besiedelt wurde, ergibt sich je *Scaffold*-Größe und Woche die Anzahl von zwei *Scaffolds*.

	Woche	Scaffolds für Schnittfärbungen und Fluoreszenzfärbungen			Scaffolds für Zellzahlbestimmung			Scaffolds für Proteinbestimmung			Gesamt /Probe	Gesamt /Arm
		100µm	200µm	300µm	100µm	200µm	300µm	100µm	200µm	300µm		
Probe 1 (CZ31)	1	2	2	2							18	9
	3	2	2	2								
	5	2	2	2								
	10											
Probe 2 (CZ33)	1	2	2	2						24	12	
	3	2	2	2								
	5	2	2	2								
	10	2	2	2								
Probe 3 (CZ34)	1 (1)	2	2	2			2			34	17	
	3 (2)	2	2	2			2					
	5 (3)	2	2	2			2					
	10 (4)	2	2	2			2					
	X (5)						2					
Probe 4 (CZ35)	1			2		2	2		2	44	22	
	3			2		2	2		2			
	5			2		2	2		2			
	10	2	2	2		2	2		2			
Probe 5 (KZ1)	1			2		2	2		2	32	16	
	3			2		2	2		2			
	5			2		2	2		2			
	10			2		2	2		2			
Gesamt		24	24	38	0	16	26	0	8	16	152	76

Tabelle 1: Anzahl der besiedelten Scaffolds pro Auswerteverfahren.

*Die Zeilen bilden die einzelnen Proben in Wochen aufgeteilt, die Spalten bilden die verschiedenen Auswerteverfahren in Scaffold-Größen aufgeteilt. Als Auswerteverfahren gab es Schnitffärbung, Zellzahlbestimmung und Proteinbestimmung. Die beiden rechten Spalten und die unterste Zeile dienen der Summierung der Einzelwerte. Bei Probe 3 sind zwei verschiedene Wochenangaben vorhanden, da die Scaffolds für Schnitt- und Fluoreszenzfärbungen nach dem klassischen Wochen-Schema und die Scaffolds für Zellzahlbestimmung nach Woche-1–Woche-5-Schema besiedelt wurden.*

Pro Scaffold wurden 300.000 Zellen benötigt, für die T25-Zellkulturen wurden jeweils 400.000 Zellen benötigt und für die Deckgläser wurden jeweils etwa 150.000 Zellen benötigt. Exemplarisch wurden etwa bei 12 Scaffolds (4×100 µm, 4×200 µm, 4×300 µm) pro Arm also 3.600.000 Zellen (24 Scaffolds×300.000 Zellen/2) für die Scaffolds, 400.000 für die Zellkultur und 450.000 Zellen für die 3 Deckgläser, also insgesamt 4.450.000 Zellen pro Arm benötigt. Es wurde jeweils mit Überstand gearbeitet, also benötigte man zur Sicherheit bei der ersten Probe 4 Mio., bei der zweiten und dritten Probe mindestens 5 Mio., bei der vierten Probe mindestens 8 Mio. und bei der fünften Probe mindestens 6 Mio. Zellen pro Arm.

Die PLA-Scaffolds wurden nach dem Trockenvorgang unter sterilen Bedingungen mit einer Pinzette in eine 24-Well-Platte überführt. Die 300.000 Zellen wurden jeweils in einem Volumen von 60 µl resuspendiert und mittig auf die Scaffolds pipettiert (Abbildung 12). Dadurch bildeten sie einen auf dem Scaffold aufliegenden Tropfen. Nachdem alle Scaffolds mit Zellen besiedelt wurden, wurde die 24-Well-Platte für 30 Min. in den Brutschrank gegeben. Dabei wurde die Platte sehr vorsichtig bewegt, um den Tropfen auf dem Scaffold möglichst zu erhalten. Nach dieser Zeit wurden in die Wells jeweils 700 µl Medium ohne/mit WF zugegeben und die Platte in den Brutschrank gestellt. Das Kulturmedium wurde wie auch in der Zellkulturflasche zweimal pro Woche gewechselt und die 24-Well-Platten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank gelagert. Da sich unterhalb der besiedelten Scaffolds in den Wells ein Zellrasen bildete, wurden die besiedelten Scaffolds alle zwei Wochen in neue 24-Well-Platten überführt.



Abbildung 12: **Besiedlungszeitpunkt der Scaffolds**

Die Aufnahme zeigt die Scaffolds in einer 24-Well-Platte zum Zeitpunkt der Besiedlung mit Chondrozyten. Die Tropfen auf den Scaffolds enthalten jeweils 300.000 Zellen. Die schwarz beschrifteten Wells enthalten non-WF-Scaffolds, die roten Wells enthalten WF-Scaffolds. In den Spalten sind die non-WF- und WF-Scaffolds aufgeteilt nach Scaffold-Größe, in den Zeilen nach Entnahmezeitpunkten in Wochen.

### 3.2.7 AlamarBlue-Assay

Um die Zellen auf den besiedelten Scaffolds hinsichtlich ihres Metabolismus und ihrer Viabilität zu untersuchen, wurde zu den Zeitpunkten Woche 2, 3, 4, 5 und Woche 10 der AlamarBlue-Assay durchgeführt. Es erfolgte die Untersuchung der besiedelten Scaffolds nach obigem Schema, getrennt nach Kultivierung mit und ohne WF und jeweils getrennt nach Gitterabstand von 100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  und 300  $\mu\text{m}$ .

Da nur die Zellen auf den Scaffolds untersucht werden sollten, wurden die besiedelten Scaffolds zuerst mittels steriler Pinzette und unter sterilen Bedingungen in eine neue 24-Well-Platte überführt. AlamarBlue-Reagenz wurde zehnpromig in Standardmedium ohne WF verwendet. Das AlamarBlue-Medium wurde für alle zu einem Zeitpunkt untersuchten besiedelten Scaffolds zusammen angesetzt. In jedes Well wurden 700  $\mu\text{l}$  10%iges

*AlamarBlue*-Medium pipettiert. Die 24-Well-Platte wurde bei 37 °C für vier Stunden im Brutschrank inkubiert, dabei erfolgte ein Farbumschlag von Blau zu Rot. Nach den vier Stunden pipettierte man mit einer 1 ml-Pipettenspitze das zehnpromtente *AlamarBlue*-Medium im Well fünfmal auf und ab. Dann wurden jeweils 200 µl des Mediums in eine 96-Well-Photometer-Platte überführt. Das *AlamarBlue*-Medium wurde im Fluoreszenz-Spektrometer bei der Wellenlänge 560/590 nm (Exzitation/Emission) untersucht. Das *AlamarBlue*-Medium wurde anschließend abgezogen und durch frisches Standardkulturmedium mit und ohne WF ersetzt.

### 3.2.8 DAPI- und *Rhodamine-6G*-Färbungen der besiedelten *Scaffolds*

#### 3.2.8.1 Färbemethode

Für die Bestimmung der Oberflächenbesiedelungsdichte wurden die besiedelten *Scaffolds* mit einer sterilen Pinzette aus der 24-Well-Platte entnommen und in einer kleinen Petrischale einmal mit PBS gewaschen. Die Färbelösung bestand pro besiedeltem *Scaffold* aus 2 ml PBS mit jeweils 0,5 µl DAPI-Stocklösung (5 mg/ml in *Aqua dest.*) (*4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Molecular probes by life technologies*) und 0,5 µl *Rhodamine-6G*-Stocklösung (*Rhodamine-6G-Chloride, Molecular probes by life technologies, Eugene*). Diese wurde nach Zugabe von DAPI und *Rhodamine-6G* mehrere Sekunden mit dem Vortex-Schüttler gemischt. Das PBS wurde von den besiedelten *Scaffolds* abgezogen und durch 2 ml Färbelösung ersetzt. Die Petrischalen mit den besiedelten *Scaffolds* wurden daraufhin für 30 Min. im Brutschrank inkubiert. Das DAPI färbt als Fluorophor den Zellkern, da es zwischen den Basenpaaren der Desoxyribonukleinsäure (DNS) interkaliert. *Rhodamine-6G* dagegen färbt als Fluorophor die Mitochondrien der Zelle. Danach wurden die besiedelten *Scaffolds* dreimal mit PBS gewaschen, dies geschah durch das Abziehen der Färbelösung, Zugabe von 2 ml PBS und mehrmaligem Auf- und Abpipettieren des PBS. Daraufhin wurden die besiedelten *Scaffolds* ohne PBS in neue kleine Petrischalen überführt. So wurden die besiedelten *Scaffolds* mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

#### 3.2.8.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die besiedelten *Scaffolds* wurden hinsichtlich ihrer am dichtesten besiedelten Seite untersucht. Dafür wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop die DAPI/*Rhodamine-6G*-gefärbten besiedelten *Scaffolds* hinsichtlich der dichteren Seite untersucht (folgend Oberseite genannt), um danach verschiedene Aufnahmen aus mehreren aneinandergereihten Bildern zu erstellen – *Multiple Image Alignment* (MIA) genannt. Dafür befand sich der zu untersuchende besiedelte *Scaffold* in einer kleinen Petrischale auf einem beweglichen Objektisch, der automatisch den *Scaffold* Stück für Stück unter dem Objektiv bewegte, während wiederholt Aufnahmen gemacht wurden. Bilder der DAPI-Färbung

(Emissionsmaximum 460 nm) wurden mit dem Filter „DAPI“ (Anregungsfilter 350/50 nm, Emissionsfilter 460/50 nm) aufgenommen, dabei wurde die Belichtungszeit bei 40-facher Vergrößerung stets auf 70 ms, bei 100-facher Vergrößerung auf 35 ms gesetzt und die Verstärkung stets auf 100 %. Bilder der *Rhodamine-6G*-Färbung (Emissionsmaximum bei 590 nm) wurden mit dem Filter „CY3“ (Anregungsfilter 545/25 nm, Emissionsfilter 605/70 nm) aufgenommen, dabei wurde die Belichtungszeit bei 40-facher Vergrößerung stets auf 30 ms, bei 100-facher Vergrößerung auf 10 ms gesetzt und die Verstärkung stets auf 0 %. Es wurden immer die gleichen Einstellungen gewählt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Bei 40-facher Vergrößerung wurde für beide Färbungen eine komplette MIA-Aufnahme der besiedelten *Scaffold*-Oberseite gemacht, zudem erfolgte eine Überlagerungs-MIA-Aufnahme. Für die 100-fache Vergrößerung wurde für beide Färbungen nur eine partielle Aufnahme der besiedelten *Scaffold*-Oberseite gemacht, die MIA-Aufnahme erfolgte stets vom rechten unteren Quadranten. Auch die besiedelte *Scaffold*-Unterseite wurde in beiden Färbungen bei 40-facher Vergrößerung als MIA-Aufnahme fotografiert.

### 3.2.8.3 *Prozentuale Flächenbestimmung der zellulären Besiedelung nach DAPI- und Rhodamine-6G-Färbung*

Zur Auswertung der mit dem Fluoreszenzmikroskop gemachten Aufnahmen wurde die Software *ImageJ* verwendet. Es wurde eine *Color-Threshold* eingestellt, die vergleichbare Werte ergab. Dann wurde die quadratische Oberseite des *Scaffolds* markiert und mithilfe der Software der gefärbte Anteil in Prozent der Oberseite berechnet. Die Daten wurden in *Microsoft Excel* übertragen und anschließend mit *GraphPad Prism* ausgewertet.

## 3.2.9 Fixieren und Einbetten der besiedelten *Scaffolds*

### 3.2.9.1 *Fixieren der besiedelten Scaffolds*

Nach der Fluoreszenzmikroskopie wurden die besiedelten *Scaffolds* in beschrifteten Rotilabo®-Einbettkassetten für einen Tag in 4 % Formalin fixiert. Am nächsten Tag wurden sie in 1 % Formalin überführt und bis zum Einbetten in dieser Lösung gelagert.

### 3.2.9.2 *Entwässern und Paraffinieren der besiedelten Scaffolds*

Am ersten Tag wurden die besiedelten *Scaffolds* in der Einbettkassette für 20 Min. in eine Küvette mit *Aqua dest.* überführt. Anschließend wurde das *Aqua dest.* abgegossen und durch frisches *Aqua dest.* ersetzt, um die Einbettkassetten erneut für 20 Min. darin zu wässern. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die Einbettkassetten für eine Stunde in eine frische Küvette mit siebzigprozentigem Isopropanol gelegt, für eine weitere Stunde in achtzigprozentigem Isopropanol, danach für eine weitere Stunde in neunzigprozentigem Isopropanol und schließlich für eine bis anderthalb Stunden in

eine Küvette mit hundertprozentigem Isopropanol. Während dieser Zeit wurde das hundertprozentige Isopropanol einmal gewechselt. Danach wurden die Einbettkassetten für mindestens zwei Stunden in eine frische Küvette mit Xylol gelegt. Zuletzt wurde das Xylol abgegossen, durch frisches Xylol ersetzt und über Nacht im Abzug gelagert. Am zweiten Tag wurden die Einbettkassetten gut abgetropft und für vier Stunden in Paraffin-I überführt. Danach wurden sie in Paraffin-II überführt und über Nacht im Wärmeschrank gelagert. Am dritten Tag wurden die besiedelten *Scaffolds* am Einbettautomaten in einen Paraffinblock eingebettet.

#### 3.2.9.3 *Schneiden der besiedelten Scaffolds*

Die in Paraffin eingebetteten besiedelten *Scaffolds* wurden mit dem Mikrotom in 8 µm dicke Schnitte geschnitten und auf *Superfrost*-Objektträger aufgezogen. Anschließend konnten die Schnitte mit HE oder Safranin-O-Lichtgrün gefärbt werden.

#### 3.2.10 Hämatoxylin/Eosin-Färbung der besiedelten *Scaffold*-Schnitte

Die Paraffinschnitte auf den *Superfrost*-Objektträgern wurden zunächst entparaffiniert. Hierzu wurden sie zweimal für jeweils 5 Min. in Xylol gegeben, um anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe für ebenfalls je 5 Min. behandelt zu werden. Im Anschluss daran wurden sie für 5 Min. in *Aqua dest.* gelegt, dann für 5 Min. in Mayer's Hämalun (Carl Roth GmbH & Co. KG). Nachdem sie für 10 Min. unter fließendem Leitungswasser gebläut wurden, wurden sie für 2 Min. in *Aqua dest.* gegeben. Anschließend erfolgte die Färbung mit Eosin (Carl Roth GmbH & Co. KG / je 100 ml + 1 Tropfen Eisessig) für 2–3 Min., gefolgt von einem Spülgang unter Leitungswasser. Danach wurden die Schnitte entsprechend einer aufsteigenden Reihe mit achtzigprozentigem und neunzigprozentigem Isopropanol für 1–2 Min. sowie hundertprozentigem Isopropanol für 3 Min. behandelt. Nach zweimaligem Eintauchen in Xylol für je 5 Min. wurden sie mit Entellan eingedeckt. Die Besonderheit beim Färben der geschnittenen besiedelten *Scaffolds* bestand darin, dass sie nicht in der Küvette, sondern liegend auf dem Objektträger gefärbt wurden. Auf diese Weise konnte ein Wegtreiben der Schnitte vermieden werden.

#### 3.2.11 Safranin-O-Lichtgrün-Färbung der besiedelten *Scaffold*-Schnitte

Die Paraffinschnitte auf den *Superfrost*-Objektträgern wurden zunächst entparaffiniert. Hierzu wurden sie zunächst zweimal für je 5 Min. in Xylol gelegt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe für je 2 Min. behandelt. Danach erfolgte eine zweiminütige Wässerung mit *Aqua dest.* Anschließend wurde für 10 Min. mit Weigerts Eisenhämatoxylin gefärbt, 10 s mit *Aqua dest.* gespült, 15 Min. mit Leitungswasser gebläut und nochmals 10 s

mit *Aqua dest.* gespült. Die Schnitte wurden zunächst für 3 Min. mit Lichtgrün-Goldner III gefärbt und dann für 10 s mit einprozentiger Essigsäure behandelt. Danach erfolgte die Färbung für 6 Min. mit wässriger Safranin-O Lösung und die erneute Behandlung für 10 s mit einprozentiger Essigsäure. Die Färbungen wurden dann zweimal für 2 Min. mit Isopropanol entwässert, zweimal für 5 Min. mit Xylol entwässert und schließlich mit einem Xylol-haltigen Eindeckmittel eingedeckt. Die Besonderheit bei der Färbung der geschnittenen besiedelten *Scaffolds* lag darin, dass sie nicht in der Küvette, sondern liegend auf dem Objektträger gefärbt wurden. Auf diese Weise konnte ein Wegtreiben der Schnitte vermieden werden.

### 3.2.12 Quantifizierungsmethode der HE- und der Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen

Nach der Färbung der Schnitte mit HE und Safranin-O-Lichtgrün wurden die Schnitte unter dem Lichtmikroskop analysiert und fotografiert. Dabei fiel auf, dass beim Schneiden und Färben einige Schwierigkeiten bestanden. Erstens war es häufig nicht möglich, die porösen *Scaffolds* ohne Stauchen oder Brüchigkeit zu schneiden. Dadurch waren die Schnitte teilweise morphologisch verändert oder es lagen nur kleine Bruchstücke auf dem Objektträger vor. Zweitens traten Probleme während des Färbeprozesses auf, da es nicht möglich war, die paraffinierten Schnitte senkrecht in der Küvette zu entparaffinieren und zu färben, ohne dass sie sich vom Objektträger lösten. Daher mussten die Schnitte liegend auf dem Objektträger gefärbt werden. Für einige besiedelte *Scaffolds* wurden viele gute Bilder erfasst, während andere kaum oder schlechte Bilder aufwiesen. Deshalb wurde jedes Bild einzeln auf einer Likert-Skala klassifiziert. Von 1 (vereinzelt Zellen/EZM sichtbar), 2 (einzelne Zellverbände/EZM sichtbar), 3 (konfluierende Zellverbände/EZM sichtbar) bis 4 (homogene Besiedlung der *Scaffolds* mit Zellen und EZM). Beispielhaft sind diese vier Klassen in Abbildung 13 dargestellt. Da je nach Schnittqualität und Färbung unterschiedlich viele Bilder pro besiedeltem *Scaffold* entstanden, wurde pro Klassifizierungswert 1, 2, 3 und 4 die Anzahl der Bilder summiert und mit dem Klassifizierungswert multipliziert. Die Summe der vier Multiplikationen wurde durch die Gesamtzahl der Bilder pro besiedeltem *Scaffold* geteilt. Dadurch ergab sich pro besiedeltem *Scaffold* ein Gesamtklassifizierungswert zwischen 1 und 4. Dieser ging in die statistische Auswertung ein.

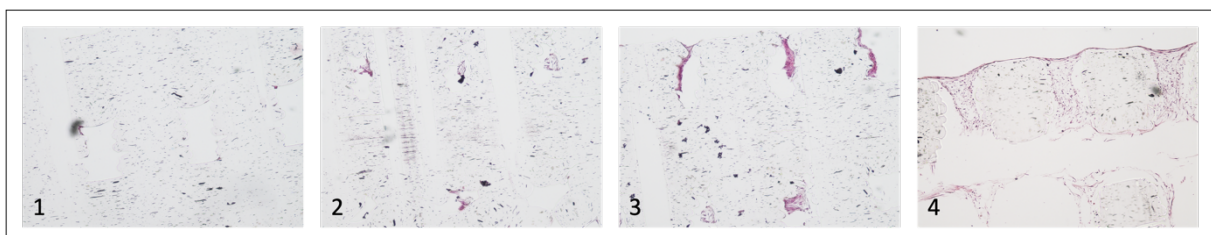


Abbildung 13: **Vier Klassen der Klassifizierungsskala**

Die vier Aufnahmen von HE-Färbungen der besiedelten 300 µm-Scaffolds zeigen exemplarisch die vier Klassifizierungsklassen in einer hundertfachen Vergrößerung. (1) zeigt Klasse 1 „vereinzelt Zellen/EZM sichtbar“, (2) zeigt Klasse 2 „einzelne Zellverbände/EZM sichtbar“, (3) zeigt Klasse 3 „konfluierende Zellverbände/EZM sichtbar“ und (4) zeigt Klasse 4 „homogene Besiedlung der Scaffolds mit Zellen und EZM“.

### 3.2.13 Zellzählung nach Ablösen der Zellen von den besiedelten Scaffolds mit TE

Um die absoluten Zellzahlen auf den Scaffolds zu ermitteln, wurden in zwei Durchgängen non-WF- und WF-Scaffolds kultiviert. Im ersten Durchgang wurden diese besiedelten Scaffolds bis zur Woche 1, 2, 3, 4 und 5 kultiviert und dann ausgewertet. Es wurden nur Scaffolds mit 200 µm Gitterabstand im ersten Durchgang benutzt. Im zweiten Durchgang wurde eine Probe nach oben beschriebenen Verfahren auf 200 µm- und 300 µm-Scaffolds besiedelt, es wurde zu den Zeitpunkten Woche 1, 3, 5 und 10 ausgewertet. Zu jedem Zeitpunkt wurde je ein non-WF- und ein WF-Scaffold entnommen und die Zellzahl ermittelt. Dafür nutzte man TE in doppelter Konzentration (1 Gramm/Liter (g/L) Trypsin, 0,4 g/L EDTA) im Vergleich zur benutzten TE-Konzentration in der Zellkultur. Fünf Milliliter TE der zehnfachen Konzentration 5 g/L Trypsin und 2 g/L EDTA wurden in 20 ml, anstatt in 45 ml, PBS gelöst. Dann entnahm man die besiedelten Scaffolds aus der 24-Well-Platte und überführte sie mit einer Pinzette in ein 15 ml-Falcon, um sie darin einmal mit PBS zu waschen. Anschließend wurden sie in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und 1 ml TE (doppelte Konzentration) zugegeben. Insgesamt inkubierte man die besiedelten Scaffolds für 15 Min. im Brutschrank bei 37 °C und schüttelte die Gefäße manuell zu den Zeitpunkten 5, 10 und 15 Min. für jeweils 10 s. Die Wirkung des TE stoppte man daraufhin mit 1 ml Standardmedium in einem 2 ml-Eppendorfgefäß und zentrifugierte das Gemisch für 7 Min. bei 1500 U/Min. bei Raumtemperatur. Um die Zellpellets nicht zu beschädigen, entnahm man die Scaffolds behutsam mit einer Pinzette. Nach dem Entfernen der Scaffolds aus den Eppendorfgefäßen wurden diese nochmals für 7 Min. bei 1500 U/Min. und Raumtemperatur zentrifugiert. Erst dann wurde das Medium bis auf 100 µl abgezogen. Dann resuspendierte man mit 100 µl Trypanblau und ermittelte die Zellkonzentration mit einer Neubauer-Zählkammer. Dabei wurde die Suspension mithilfe des Kapillareffektes unter das arretierte Deckglas gesogen und anschließend vier Quadranten ausgezählt. Unter der Vermutung, alle Zellen aus dem Scaffold gelöst zu haben, schloss man so aus der Konzentration auf die absoluten Zellzahlen der besiedelten Scaffolds. Es wurde beim Auszählen mit der Neubauer-Zählkammer nochmals zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden, für die absolute Zellzahl nutzte man die Summe beider Anteile.

### 3.2.13.1 DAPI-Färbung der TE-Scaffolds

Um zu überprüfen, ob man durch das oben beschriebene Verfahren alle Zellen von den *Scaffolds* lösen konnte, wurden die mit TE behandelten ehemals besiedelten *Scaffolds* direkt nach dem Prozedere mit DAPI gefärbt. Dafür wurde DAPI in PBS gelöst, mit einer Konzentration von 0,5 µl DAPI Stocklösung in 2 ml PBS. Nach einmaligem Waschen der TE-*Scaffolds* in PBS wurden diese mit der DAPI-Färbelösung für 30 Min. im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die TE-*Scaffolds* dreimal mit PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Es erfolgte eine MIA-Aufnahme der Seite mit den meisten Residuen in 100-facher Vergrößerung bei oben genannten Einstellungen (siehe Fluoreszenzmikroskopie).

### 3.2.14 Proteinbestimmung der besiedelten *Scaffolds*

Um die Syntheseleistung der Zellen zu ermitteln, wurde eine Bestimmung der Proteinkonzentration des *Scaffold*-Inhaltes durchgeführt. Wieder wurde zwischen besiedelten *Scaffolds* mit und ohne WF-Einfluss unterschieden. Verwendet wurden, wie beim zweiten Durchgang der Zellzahlbestimmung, *Scaffolds* der Gittergröße 200 µm und 300 µm. Untersucht wurden die Zeitpunkte Woche 1, 3, 5 und 10 nach Besiedlung der *Scaffolds*. Die *Scaffolds* besiedelte man wie oben genannt mit jeweils 300.000 Zellen in einem 60 µl Tropfen.

Am Tag der Proteinbestimmung erfolgte mithilfe einer Pinzette die Überführung der besiedelten *Scaffolds* in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß. Zum Auflösen des Zell-Matrix-Verbandes wurden jeweils 200 µl eines zuvor angesetzten Lysepuffers hinzu pipettiert. Beides wurde dann für 10 s mit dem Vortex-Schüttler durchmischt. Daraufhin folgte eine Kühlstellung auf Eis für 5 Min., danach nochmals ein Durchmischungsvorgang für 10 s, eine nochmalige Kühlstellung für 5 Min. und ein Durchmischungsvorgang für 10 s. Nach nochmaliger fünfminütiger-Kühlstellung folgte eine vierte und letzte Durchmischung für 10 s. Insgesamt wurden die Eppendorfgefäße mit den besiedelten *Scaffolds* für 15 Min. auf Eis gestellt.

Es folgte eine Zentrifugierung mittels Tischzentrifuge bei 13000 U/Min. und 12 °C für 5 Min.. Danach wurden die ehemals besiedelten *Scaffolds* mittels Pinzette entnommen und für einen etwaigen zweiten Lysevorgang in ein Eppendorfgefäß überführt. Dabei zeigte sich beim Entnehmen der ehemals besiedelten *Scaffolds* ein klebriger Faden, der im Eppendorfgefäß verblieb. Das Lysat der besiedelten *Scaffolds* wurde mittels Ultraschallstab (BANDELIN *electronic* GmbH & Co. KG) zweimalig für 30 s aufgebrochen, danach wurden die

EppendorfgeläÙe bis zur endgültigen Proteinbestimmung gesammelt und bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Zur Proteinbestimmung entnahm man aus jedem aufgetauten Lysat dreimal  $5\text{ }\mu\text{l}$  und pipettierte diese jeweils in ein *Well* einer 96-*Well*-Photometer-Platte. Zusätzlich pipettierte man einen Standard mit bekannten Proteinkonzentrationen in die 96-*Well*-Platte, auch jeweils dreimal  $5\text{ }\mu\text{l}$  der jeweiligen Konzentration. Als Standard wurde bovines Serumalbumin (BSA) mit den Konzentrationen  $0\text{ mg/ml}$ ,  $0,5\text{ mg/ml}$ ,  $0,75\text{ mg/ml}$ ,  $1\text{ mg/ml}$ ,  $1,5\text{ mg/ml}$ ,  $2\text{ mg/ml}$ ,  $2,5\text{ mg/ml}$  und  $3\text{ mg/ml}$  verwendet. Dann wurden  $25\text{ }\mu\text{l}$  *Protein Assay Reagent A* (*alkaline copper tartrate solution, DC™ Protein Assay Kit II, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA*) hinzugegeben, um dann  $200\text{ }\mu\text{l}$  *Protein Assay Reagent B* (*dilute Folin reagent, DC™ Protein Assay Kit II, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA*) zuzugeben. Dann wurde das Gemisch im Photometer gemischt und 15 Min. inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung bei einer Wellenlänge von  $750\text{ nm}$ . Von allen Extinktionen wurde die Extinktion bei  $0\text{ mg/ml}$  Protein abgezogen und mithilfe des Standards wurde eine Regressionsgerade gebildet. Dabei nutzte man den Mittelwert der Dreifachbestimmungen. Die Proteinkonzentrationen konnten mit Einsetzen der Mittelwerte in die Formel der Regressionsgeraden bestimmt werden.

#### 3.2.14.1 DAPI-Färbung der Proteinbestimmung-Scaffolds

Um zu überprüfen, ob man durch das oben beschriebene Verfahren EZM und Zellen von den besiedelten *Scaffolds* lösen konnte, wurden die lysierten *Scaffolds* direkt nach dem Prozedere mit DAPI gefärbt. Dafür wurde DAPI in PBS gelöst, mit einer Konzentration von  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  DAPI Stocklösung in  $2\text{ ml}$  PBS. Nach einmaligem Waschen der ehemals besiedelten *Scaffolds* in PBS wurden diese mit der DAPI-Färbelösung für 30 Min. im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Proteinbestimmung-Scaffolds dreimal mit PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Es erfolgte eine MIA-Aufnahme der Seite mit den meisten Residuen in 100-facher Vergrößerung bei oben genannten Einstellungen (siehe Fluoreszenzmikroskopie).

#### 3.2.15 Kollagen-II-Färbung der Deckgläser

Die mit Chondrozyten besiedelten Deckgläser wurden nach der Fixierung mit  $4\%$  PFA mit Kollagen-II-Antikörpern angefärbt. Die Deckgläser befanden sich in kleinen Petrischalen mit PBS. Am ersten Tag wurde das PBS abgezogen und die Deckgläser wurden danach zweimal je  $5\text{ Min.}$  mit dem Puffer TBS-T20 (einfach konzentriert) gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser in  $500\text{ }\mu\text{l}$  Hyaluronidase ( $1\%$  in PBS gelöst) für 30 Min. bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach fanden erneut zwei Waschstschritte mit TBS-T20 (einfach konzentriert) für

5 Min. statt. Die Deckgläser wurden für 18 Min. in einer Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mischung inkubiert und anschließend kurz mit *Aqua dest.* gespült. Nach erneuter Durchführung von zwei Waschschrritten mit TBS-T20 (einfach konzentriert) für 5 Min. wurden die Deckgläser mit je 500 µl *Goat*-Normalserum 1:10 für 45 Min. bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde der Erst-Antikörper Anti-Kollagen-II, 1:500 gelöst in 500 µl BSA, über Nacht bei 4 °C ohne Schütteln auf die Deckgläser gegeben.

Am zweiten Tag wurde der Erst-Antikörper wieder abgezogen und die Deckgläser zuerst mit der Lösung TBS-T20 (einfach konzentriert)/400nM Natrium-Chlorid (NaCl) und danach nur mit TBS-T20 (einfach konzentriert) für 5 Min. gewaschen. Danach wurde der Zweit-Antikörper *Anti-Mouse/horseradish peroxidase* (HRP), der zuvor in PBS im Verhältnis 1:250 verdünnt wurde, auf die Deckgläser gegeben und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte noch zweimal für jeweils 5 Min. mit TBS-T20 (einfach konzentriert) gewaschen. Für die Färbung der Kollagenase-II-positiven Areale wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zugesetzt und von der HRP umgesetzt. Anschließend wurde die Färbung für 5 Min. in *Aqua dest.* gewaschen, für 5 Min. in Hämalaun gefärbt und für 5 Min. in Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden die Deckgläser in *Aqueous Mount* eingedeckt.

### **3.2.16** Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden in *Microsoft Excel* gesammelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit *GraphPad Prism 10.0*. Es ist anzumerken, dass aufgrund des explorativen Charakters der Experimentation primär eine deskriptive statistische Evaluation vorgenommen wurde. Zur Unterstreichung gruppenspezifischer Unterschiede wurden jedoch statistische Vergleichstests ergänzt, ohne dass diesen ein eindeutiger confirmatorischer Anspruch beigemessen werden sollte. Die Versuchsgruppen wurden mittels *Mann-Whitney-Test* und *Kruskal-Wallis-Test* auf signifikante Unterschiede geprüft ( $p < 0,05$ ). P-Werte wurden bei Signifikanz mit angegeben. Bei einer Stichprobengröße unter drei wurde auf eine vergleichende statistische Testung verzichtet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Allgemein

Zur Darstellung der Ergebnisse ist es notwendig, den experimentellen Ablauf zu verdeutlichen. Nachdem die Knorpelproben aus dem OP in das Labor transferiert wurden, folgte dort der enzymatische Verdau. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Kultur genommen. Dabei zeigte sich nur in sehr wenigen Fällen eine bakterielle Kontamination der Proben. Von insgesamt 37 Knorpelproben konnten bis auf 5 Proben alle in Kultur genommen werden. Die Zellen wurden in Kultur auf zwei Arme, einen mit und einen ohne WF, aufgeteilt und nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl durch kulturelle Expansion auf die zuvor sterilisierten PLA-*Scaffolds* transferiert. Die nachfolgende Besiedelungsphase auf den *Scaffolds* dauerte zehn Wochen. In dieser Phase zeigte keiner der über 100 besiedelten *Scaffolds* Anzeichen einer bakteriellen oder anderweitigen Kontamination. Während dieser Zeit wurden verschiedene Analysemethoden angewandt, um die Entwicklung des Zellverbandes auf PLA zum dreidimensionalen Zell-*Scaffold*-Konstrukt multidirektional zu untersuchen. Parallel dazu wurden die Zellen während dieser Zeit weiterhin in der Zellkultur beobachtet, d. h. ihr Wachstumsverhalten in der 2D-Kultur untersucht. Dabei wurde sich auf die Entwicklung der Zellzahlen konzentriert und es wurden Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop gemacht, um Zellmorphologie und Wachstumsmuster zu analysieren.

Ziele der multidirektionalen Analyse waren zum einen die repetitive Quantifizierung der Besiedlungsfläche (Fluoreszenzmikroskopie), der Zellzahl (Zellzahlanalyse), der Stoffwechselaktivität (*AlamarBlue-Assay*) und Syntheseleistung (Proteinbestimmung) in der 3D-Kultur. Ferner wurde die Stabilität des Zellverbundes mikroskopisch nach Lyse untersucht. Durch Zusammenführung der Daten aus 2D- und 3D-Kultur sollten Erkenntnisse über das Expansions-, Proliferations- und Synthese-Verhalten mit einer Analyse der Zellmorphologie und Proteinsynthese kombiniert werden.

Neben der Analyse der 2D- und 3D-Kultur wurden Stichproben der non-WF- und WF-*Scaffolds* zu festgelegten Zeitpunkten fixiert, mit dem Mikrotom geschnitten und anschließend nach HE- und Safranin-O-Lichtgrün-Färbung mikroskopisch untersucht, um Erkenntnisse über das Zellwachstum innerhalb der besiedelten *Scaffolds* zu gewinnen. Diese Untersuchungen wurden konkret zu den Zeitpunkten eine, drei, fünf und zehn Wochen nach der Besiedlung der *Scaffolds* durchgeführt. Die Proliferationsanalyse mittels *AlamarBlue-Assay* wurde zu den Zeitpunkten zwei, drei, vier, fünf und zehn Wochen nach der Besiedlung durchgeführt.

Um den spezifischen Einfluss der WF darzustellen, wurden die Tests jeweils im Vergleich der non-WF- und WF-*Scaffolds* durchgeführt. Ferner wurde in der 3D-Kultur der Einfluss der Gitterstruktur auf die Besiedlung durch getrennte Evaluation der *Scaffolds* mit 100  $\mu\text{m}$ -, 200  $\mu\text{m}$ - und 300  $\mu\text{m}$ -Gitterabstand getestet. Die maximale Probenanzahl betrug bei den *Scaffolds* mit 300  $\mu\text{m}$ -Gitterabstand fünf, bei den kleineren Gitterabständen wurde nach initialer Analyse der Besiedlungsfläche zugunsten der 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* auf weitere Proben verzichtet.

#### 4.1.1 Form und Struktur der *Scaffolds*

Zunächst wurde versucht, die gedruckten *Scaffolds* mittels Autoklavieren für die Zellkultur zu sterilisieren. Dies misslang, da Temperatur und Druck während des Autoklaviervorgangs zur Verformung der *Scaffolds* führten. Deshalb wurden im nächsten Versuch die *Scaffolds* mittels hundertprozentigem Alkohol für eine halbe Stunde sterilisiert und anschließend bei 64 °C für eine halbe Stunde getrocknet. Diese Form der Sterilisation gelang. Keiner der im Verlauf besiedelten *Scaffolds* zeigte in der Besiedlungsphase Anzeichen einer bakteriellen oder anderweitigen Kontamination. Wie in Abbildung 14 ersichtlich, zeigten sie auch in Form und Struktur durch die Sterilisation mit Alkohol keine Veränderungen. Auch während der durchgeführten Versuchen konnte im zeitlichen Verlauf keine visuell erkennbare Veränderung von Form und Struktur der *Scaffolds* beobachtet werden.

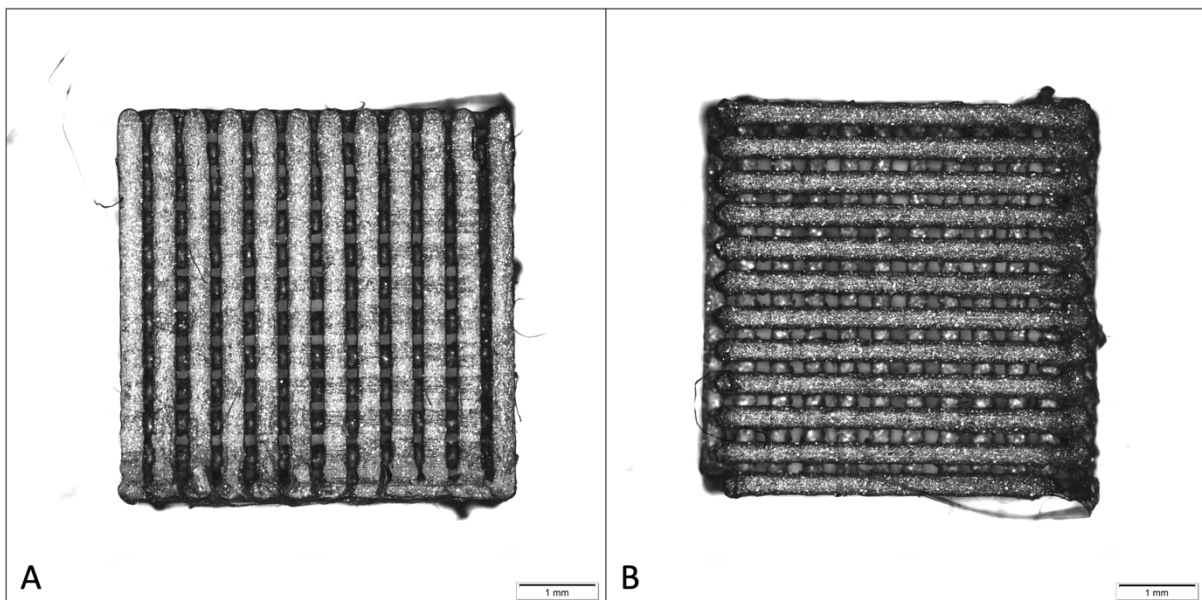


Abbildung 14: 200  $\mu\text{m}$ -*Scaffold* vor und nach der Sterilisation

200  $\mu\text{m}$ -*Scaffold* vor (A) und nach (B) der Sterilisation mit Alkohol. 40-fache Vergrößerung.

Um die *Scaffolds* zukünftig auch für Septum-Perforationen mit Patienten-individuellen Geometrien nutzen zu können, sollte gezeigt werden, dass die o. g. Gitterstruktur auch in individualisierten Geometrien modelliert und gedruckt werden kann. Dies konnte exemplarisch für eine aus einem 3D-Scan einer Septum-Perforation generierte Druckvorlage gezeigt werden. Unter Mithilfe von [REDACTED] konnte basierend auf den Maßen des 3D-Scans das *Modelling* und *Slicing* des 3D-Druckmodells durchgeführt werden. Auch das Drucken erfolgte in gleicher Weise wie bei den ursprünglichen *Scaffolds* problemlos mit dem 3D-Drucker Ultimaker 2+. Es wurden drei Drucke des individualisierten 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* angefertigt. Diese sind mit Vorder- und Rückseite in Abbildung 15 gezeigt. Die Vorderseite zeigte bis auf kleine Abweichungen zwischen den *Scaffolds* keine Druckfehler. Bei der Rückseite gab es zwischen den einzelnen Drucken Qualitätsunterschiede. Es zeigten sich kleine Abweichungen des sehr filigranen Randbereichs des *Scaffolds* von der Druckvorlage. Insgesamt zeigte sich auch der individualisierte Scaffold als homogene, gut individuell-planbare und reproduzierbare Plattform für zelluläre Besiedelung.

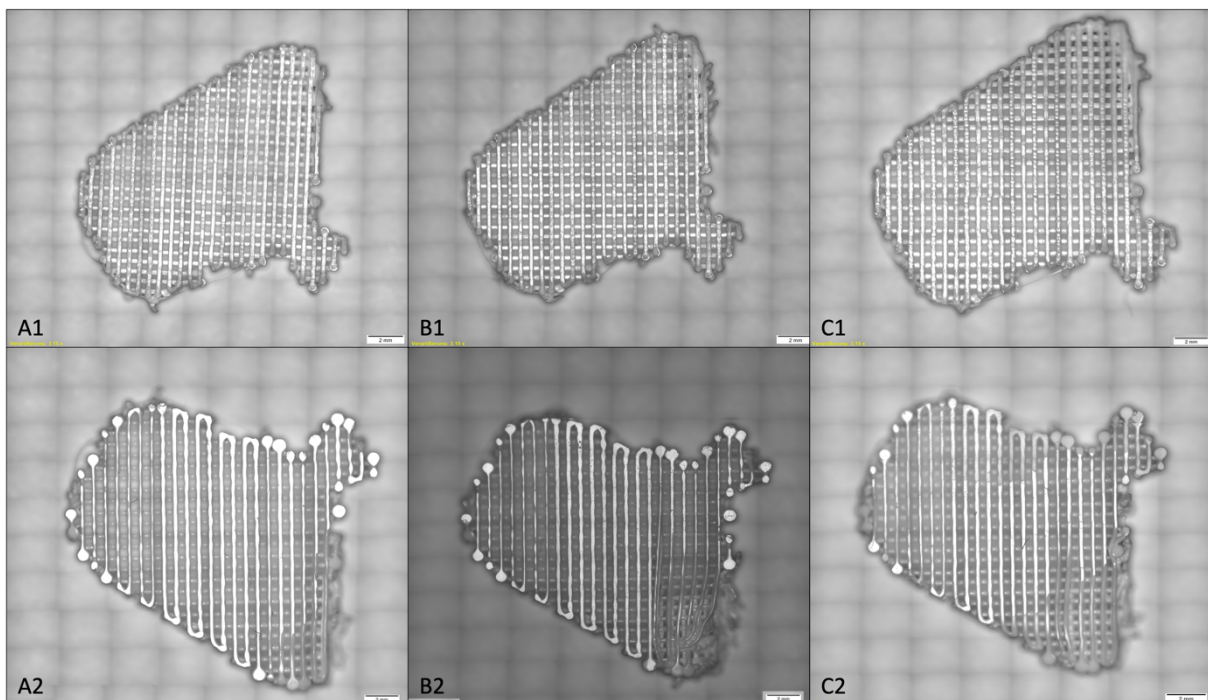


Abbildung 15: **3D-gedruckte individualisierte 300  $\mu\text{m}$ -Scaffolds**

Die Buchstaben (A), (B) und (C) stehen jeweils für einen gedruckten Scaffold. (1) steht für die Oberseite, (2) steht für die Unterseite der Scaffolds.

## 4.2 Entwicklung der Zellzahlen in 2D-Kultur

Die Zellen wurden ohne und mit WF parallel in T25-Zellkulturflaschen kultiviert, vom Tag der In-Kulturnahme bis zum Ende des zehnwöchigen Kultivierungszeitraums auf den *Scaffolds*.

Für die Passagen 0 bis 3 betrug die Zahl der in Kultur genommenen Chondrozyten-Proben  $N=5$ , für Passage 4 war  $N=4$  und für Passage 5  $N=3$ . Diese Unterschiede in der Anzahl der Stichproben sind darauf zurückzuführen, dass nicht alle Proben bis zur Woche 10 kultiviert wurden und einige Proben zu Beginn weniger expandiert und somit passagiert werden mussten, da eine geringere Zellzahl für die Besiedlung der *Scaffolds* notwendig war. Die Passagierzeiten unterschieden sich innerhalb der Proben aus verschiedenen Gründen. Überwiegend waren Unterschiede in der initialen Expansionszeit der Zellen die Ursache. Angesichts dessen war ein Vergleich der absoluten Zellzahlen zum Ende der jeweiligen Passage statistisch nicht sinnvoll umsetzbar. Daher visualisiert Abbildung 16 die Mediane der prozentualen Zunahme pro Tag innerhalb der verschiedenen Passagen ohne und mit WF. Die zeitliche Analyse zeigte für beide Gruppen einen steilen Abwärtstrend, der sich schon ab der zweiten Passage auf einem niedrigen Niveau von ca. 30 % zu stabilisieren schien. Diese Unterschiede innerhalb der Gruppen ohne und mit WF über die Zeit konnten auch statistisch signifikant (*Kruskal-Wallis-Test*, ohne WF  $p=0,0014$ , mit WF  $p=0,021$ ) nachgewiesen werden. Es zeigte sich in der Gruppen-spezifischen Auswertung ein Trend zu höheren Wachstumsraten bei den Zellen ohne WF über die ersten drei Passagen, der sich jedoch ab Passage 3 bis Passage 5 umzukehren schien. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Mediane in einer der Passagen zwischen den Zellkulturen ohne und mit WF. Außerdem nahmen die Interquartilsabstände ab Passage 1 in beiden Gruppen stark ab, woraus sich schließen lässt, dass sich die anfänglich sehr unterschiedlichen Wachstumsverhalten der Proben im Laufe der Zeit angleichen.

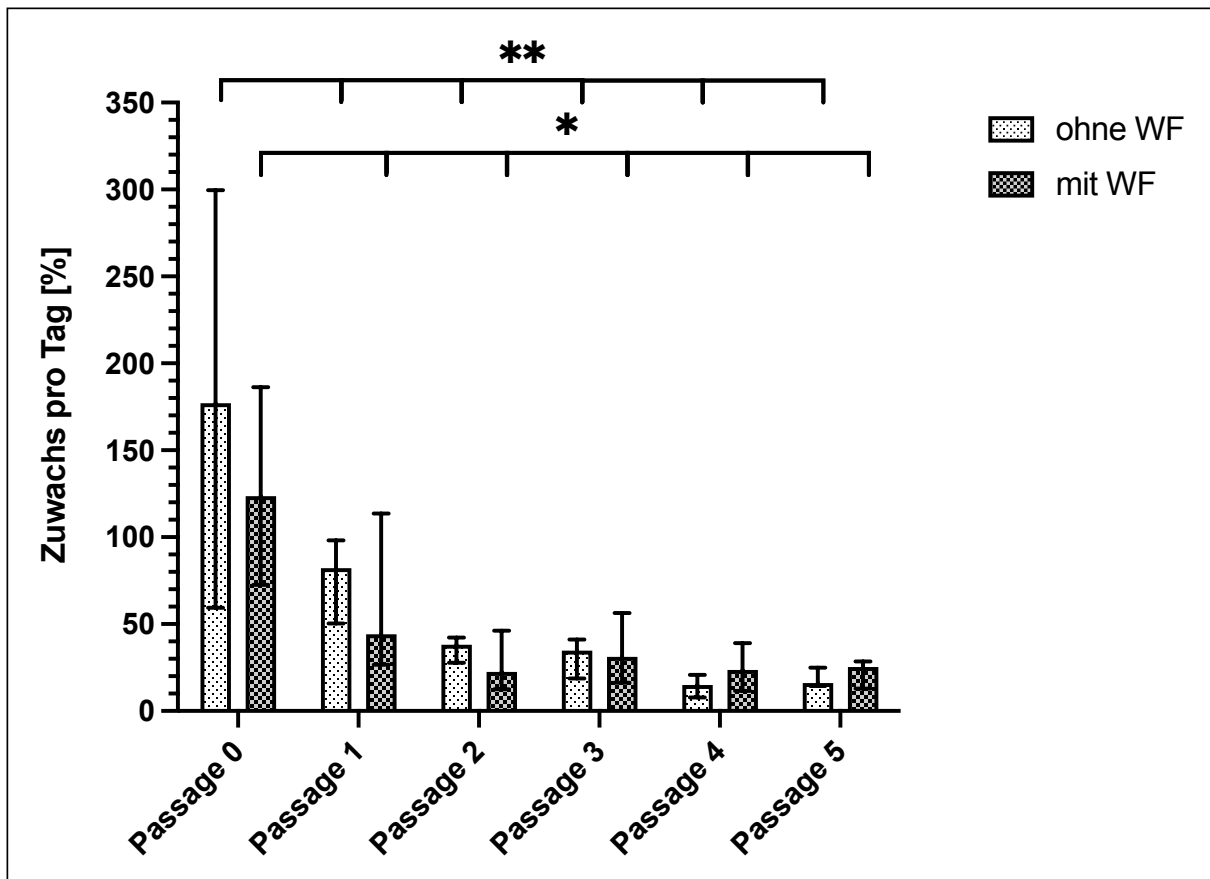
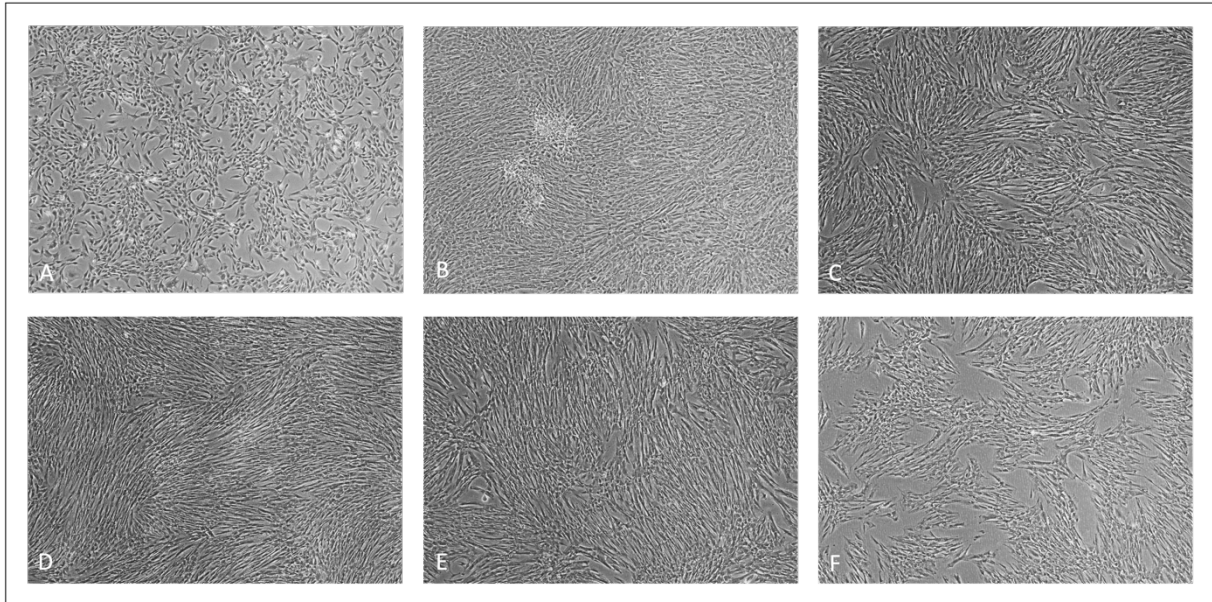


Abbildung 16: **Prozentualer Zuwachs pro Tag in Zellkultur ohne und mit WF**

Dargestellt sind die Unterschiede der Mediane des prozentualen Wachstums pro Tag von Passage 0 bis Passage 5 und die dazugehörigen Interquartilsabstände von Zellen in Kultur ohne und mit WF. Für die Passagen 0 bis 3 ist  $N=5$ , für Passage 4 ist  $N=4$  und für Passage 5 ist  $N=3$ . Statistische Testung mit dem Mann-Whitney-Test zwischen den Gruppen, statistische Testung mit dem Kruskal-Wallis-Test zwischen den Zeitpunkten innerhalb der Gruppen (\*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ ).

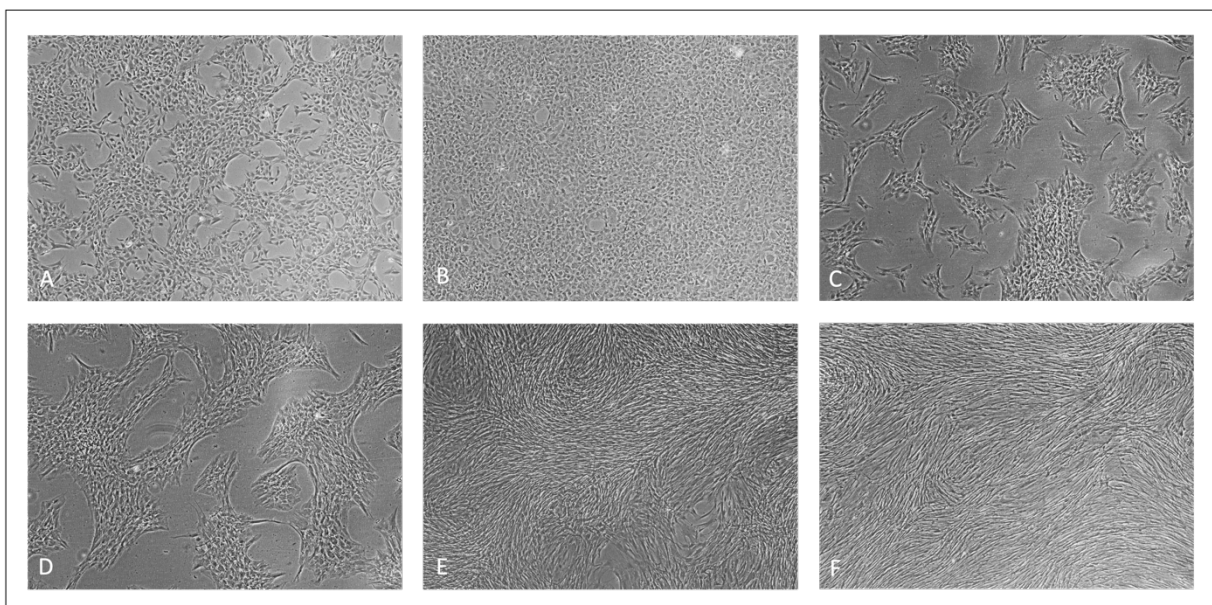
Um das Verhalten der Chondrozyten in 2D-Kultur weiter zu untersuchen, wurden wiederholt lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht, um die Morphologie und das Wachstumsmuster der Chondrozyten in der Zellkulturflasche festzuhalten. Beispielhafte Aufnahmen sind in den beiden folgenden Abbildungen 17 und 18 zu sehen. Abbildung 17 zeigt die Chondrozyten ohne WF, Abbildung 18 mit WF. Die Aufnahmen wurden von der identischen Knorpelprobe und am jeweils selben Tag gemacht. Die Analyse dieser Bilder erfolgte in zwei Kategorien: der Morphologie der einzelnen Zelle und dem übergeordneten Wachstumsmuster. Bei den Chondrozyten ohne WF sah man an Tag 8 eine rundliche Morphologie (Abb. 17 A). Sie begannen jedoch bereits, Zellfortsätze zu den Nachbarzellen auszubilden. Von Tag 15 bis Tag 49 (Abb. 17 B-E) zeigten die Zellen eine zunehmende Prävalenz einer länglichen und bipolaren Morphologie mit zwei entgegengesetzten Ausläufern. Konträr dazu zeigten die Zellen an Tag 83 (Abb. 17 F) wieder eine zunehmend rundliche Morphologie bei gleichzeitig deutlich reduzierter Zelldichte verglichen mit den vorherigen Aufnahmen. Im Hinblick auf das

Wachstumsmuster der Zellen zeigten sich ebenfalls deutliche Veränderungen über den Zeitraum der Observation. An Tag 8 (Abb. 17 A) waren die Zellen gleichmäßig verteilt. Von Tag 15 bis Tag 49 (Abb. 17 B-E) schienen sie immer dichter und parallel zu liegen und eine Art Zellstrang/Verband auszubilden. An Tag 83 (Abb. 17 F) war die Zelldichte deutlich geringer und die Zellverbände schienen voneinander getrennt zu sein.



**Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkultur ohne WF im zeitlichen Verlauf**

Die Abbildung zeigt exemplarisch die lichtmikroskopische Entwicklung der Morphologie von Chondrozyten ohne WF in Zellkulturflaschen bei 40-facher Vergrößerung. Die Zeitpunkte sind: (A) Tag 8, (B) Tag 15, (C) Tag 29, (D) Tag 35, (E) Tag 49 und (F) Tag 83.



**Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkultur mit WF im zeitlichen Verlauf**

*Die Abbildung zeigt exemplarisch die lichtmikroskopische Entwicklung der Morphologie und des Wachstumsmusters von Chondrozyten mit WF in Zellkulturflaschen bei 40-facher Vergrößerung. Die Zeitpunkte sind: (A) Tag 8, (B) Tag 15, (C) Tag 29, (D) Tag 35, (E) Tag 49 und (F) Tag 83.*

Bei den Chondrozyten mit WF zeigte sich in der lichtmikroskopischen Analyse an Tag 8 (Abb. 18 A) eine im Vergleich zur Kontrollgruppe noch rundere Morphologie. Sie begannen bereits, ein übergeordnetes Wachstumsmuster zu bilden. Sie lagerten sich eng aneinander und bildeten ein verzweigtes Netzwerk mit rundlichen Aussparungen. Im zeitlichen Verlauf erschienen die Zellen morphologisch runder als die Zellen ohne WF, obwohl sie zunehmend amorphe Formen annahmen. Aufgrund des sehr dichten Zellverbandes an Tag 15 (Abb. 18 B) war eine Beurteilung der individuellen Morphologie nicht suffizient möglich. An den Tagen 29 und 35 (Abb. 18 C und D) löste sich der dichte Zellverband. Es zeigte sich vielmehr ein Netzwerk aus einzelnen Zellinseln. Waren diese an Tag 29 noch klein, so schienen sie an Tag 35 schon größer zu werden. Am Tag 49 (Abb. 18 E) war dieses Muster allenfalls noch zu erahnen und die Zellen schienen sich der Morphologie von Zellen ohne WF anzunähern. Korrespondierend zeigten sie vermehrt die o. g. längliche, bipolare Form und die parallele Anordnung. Diese Entwicklung setzte sich in den observierten Kulturen bis zu Tag 83 (Abb. 18 F) fort. Hier erschienen die Zellen wie die Zellen ohne WF an Tag 35 (Abb. 17 D), mit fast ausschließlich länglicher, bipolarer, Fibroblasten-ähnlicher Form und paralleler Anordnung in Zellsträngen. Die Zelldichte schien deutlich höher zu sein als bei den Zellen ohne WF zum gleichen Zeitpunkt. Gleiche oder ähnliche Beobachtungen konnten in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Zellmorphologie und Wachstumsmuster der beiden Gruppen unterschieden sich also im zeitlichen Verlauf.

Um das Wachstum der Chondrozyten in 2D-Kultur und vor allem auch die De-Differenzierung der Zellen noch weiter zu untersuchen, wurden Deckgläser der Gruppen ohne und mit WF ausgesät und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen das Knorpel-spezifische Protein Kollagen II gefärbt. Die folgenden Aufnahmen in Abbildung 19 zeigen den Verlauf dieser Färbung für Probe 1. In der lichtmikroskopischen Analyse zeigte sich in Passage 0 (Abb. 19 A0 und B0), dass in beiden Gruppen vereinzelte Zellen in ähnlicher Intensität positiv braun angefärbt wurden. In Passage 1 sah man in der Gruppe ohne WF (Abb. 19 A1) noch wenige positiv angefärbte Zellen in einer Ansammlung konfluenter Zellen, die eine parallele längliche Morphologie aufwiesen. In der Gruppe mit WF (Abb. 19 B1) zeigten sich zusammen gelagerte Zellen in Inseln mit länglichen Auszügen und dazwischen Zell-freien Räumen. Es zeigten sich in diesem repräsentativen Ausschnitt keine positiv gefärbten Zellen. In Passage 2 zeigte sich in der Gruppe ohne WF (Abb. 19 A2) nochmals weniger positiv gefärbte Zellen als in Passage 1, die zuvor konfluente Zellen waren lockerer in einer Art Netz organisiert. In der Gruppe mit WF (Abb. 19 B2) sah man ein fast identisches

Muster wie in der Passage 1, nur waren die Zellinseln rundlicher und größer. In Passage 3 sah man in der Gruppe ohne WF (Abb. 19 A3) die Entwicklung der vorherigen Passage fortgesetzt, es fanden sich in diesem repräsentativen Ausschnitt noch eine Kollagen-II-positive Zelle und die länglichen Zellen waren in einem noch lockereren Netz organisiert. In der Gruppe mit WF (Abb. 19 B3) zeigten sich weiterhin die zuvor beobachteten Zellinseln. In einzelnen Kulturen imponierten unter WF-Einfluss zirkulär organisierte Zellinseln mit Kollagen-II-positiv gefärbtem Hof im Zentrum (Abb. 19 B3). In Passage 4 zeigten sich in der Gruppe ohne WF (Abb. 19 A4) fast vollständig konfluente Zellstränge aus länglichen Zellen. Eine Zelle schien noch leicht positiv gefärbt zu sein. In der Gruppe mit WF (Abb. 19 B4) setzte sich das Bild aus der vorherigen Passage fort, der hier gewählte Ausschnitt zeigt eine etwas kleinere Zellinsel mit positivem mittig angehäuften Material. Die Aufnahmen zeigten in höherer Vergrößerung (Abb. 19 C), dass die Zellen in Passage 0 vorwiegend intrazelluläre Kollagen-II-positive Einschlüsse aufwiesen. Dagegen zeigte sich auch in höherer Vergrößerung (Abb. 19 D), dass die zeitlich fortgeschrittenen Passagen der Zellen mit WF die positiven Areale außerhalb der Zellen in den Höfen der Zellinseln aufwiesen. Diese Färbungen zeigen auf der einen Seite große Übereinstimmungen mit den lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 17 und 18 in der Zellmorphologie und im Wachstumsmuster. Zudem zeigen sie die De-Differenzierung der Zellen ohne WF durch den Verlust der Kollagen-II-positiv gefärbten Zellen in den hier gezeigten Aufnahmen. Zusätzlich zeigen sie ein Phänomen der Zellen mit WF, welche ab Passage 3 positiv-gefärbtes Material zu produzieren schienen. Es muss aber erwähnt werden, dass dieses Phänomen nicht in allen kultivierten Proben nachgewiesen wurde. Die De-Differenzierung im Sinne des ursprünglichen Verlusts der Kollagen-II-positiven Zellen als auch die Veränderungen in der Zellmorphologie und im Wachstumsmuster waren dagegen stringent in allen untersuchten Proben nachweisbar.

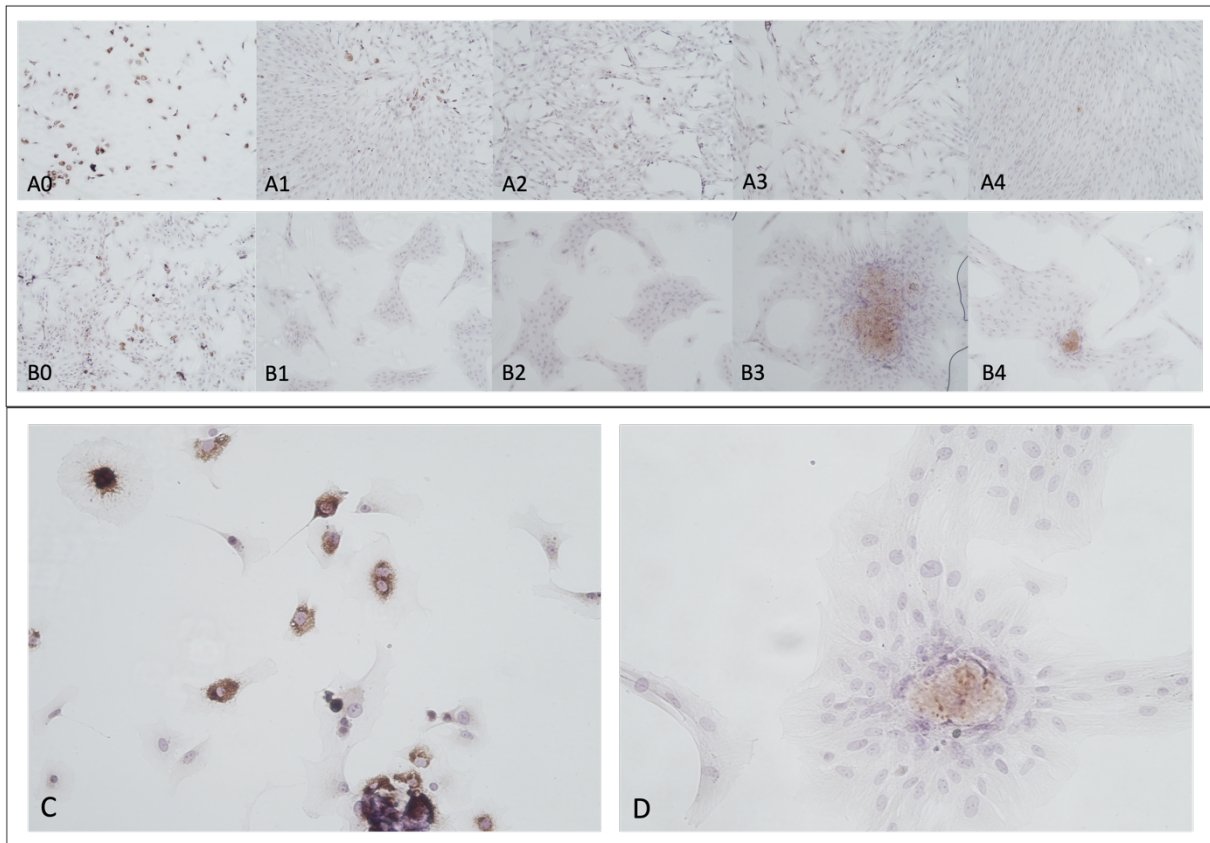


Abbildung 19: **Kollagen-II-Färbungen der ohne und mit WF besiedelten Deckgläser**

Die Abbildung zeigt exemplarisch den Verlauf der Kollagen-II-Färbungen der Deckgläser von Probe 1 in einer hundertfachen Vergrößerung. Mit (A) markierte Aufnahmen sind ohne und mit (B) markierte Aufnahmen mit WF kultiviert. (0) steht für Passage 0, (1) steht für Passage 1, (2) steht für Passage 2, (3) steht für Passage 3, (4) steht für Passage 4. Aufnahme (C) zeigt Passage 0 der Zellen ohne WF in zweihundertfacher Vergrößerung. Aufnahme (D) zeigt Passage 3 der Zellen mit WF in zweihundertfacher Vergrößerung. Braun-gefärbte Areale sind Kollagen-II-positiv.

### 4.3 Zellviabilitätsmessung der Scaffold-kultivierten Chondrozyten mit dem AlamarBlue-Assay

Während der zehnwöchigen Kultivierung der besiedelten Scaffolds wurde von Woche 2 bis Woche 5 wöchentlich und einmalig in Woche 10 ein AlamarBlue-Assay durchgeführt. Dabei erfolgte eine photometrische Messung des Umsatzes des AlamarBlue-Mediums der Zellen auf den besiedelten Scaffolds, wodurch sich verschieden hohe Extinktionswerte ergaben. Die Mediane der Extinktionswerte werden zusammen mit den zugehörigen Interquartilsabständen in Abbildung 20 dargestellt.

In beiden Gruppen wurde eine Zunahme der Zellviabilität bis zur Woche 10 beobachtet. Hinsichtlich der Wirkung der WF auf Zellviabilität und Stoffwechselaktivität konnten mehrere

Trends auf allen drei *Scaffold*-Größen beschrieben werden. Hinsichtlich der Wirkung der WF auf Zellviabilität und Stoffwechselaktivität war die Extinktion von Woche 3 bis Woche 5 bei Testung der non-WF-*Scaffolds* tendenziell höher als bei den WF-*Scaffolds*. In Woche 10 zeigte sich ein umgekehrtes Muster, da die WF-*Scaffolds* eine höhere Zellviabilität aufwiesen. In Woche 2 zeigten sich nur marginale Unterschiede. Es zeigten sich größtenteils keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Lediglich bei den 300 µm-non-WF-*Scaffolds* wurde in Woche 4 ein signifikant höherer Extinktionswert detektiert (*Mann-Whitney-Test*,  $p=0,0317$ ). Auch die Testung der anderen *Scaffold*-Größen zu diesem Zeitpunkt zeigte diese Tendenz, ohne jedoch ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen. Zudem scheint die Zellviabilität dynamisch von der Größe der Gitterabstände der *Scaffolds* abhängig zu sein. Bei den besiedelten 300 µm-*Scaffolds* zeigten sich tendenziell höhere Mediane zu den jeweiligen Zeitpunkten im Vergleich zu den besiedelten 200 µm-*Scaffolds*. Zumindest in Woche 2 schienen auch die Werte der besiedelten 100 µm-*Scaffolds* niedriger zu sein als die der besiedelten 200 µm-*Scaffolds*. Bei den non-WF-*Scaffolds* der Größe 100 µm und 200 µm unterschieden sich die Werte der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte signifikant (*Kruskal-Wallis-Test*, (A)  $p=0,0355$  und (B)  $p=0,0315$ ) innerhalb der Gruppe, während bei ähnlicher Tendenz kein signifikanter Unterschied in der Versuchsgruppe der Zellen auf besiedelten 300 µm-*Scaffolds* imponierte.

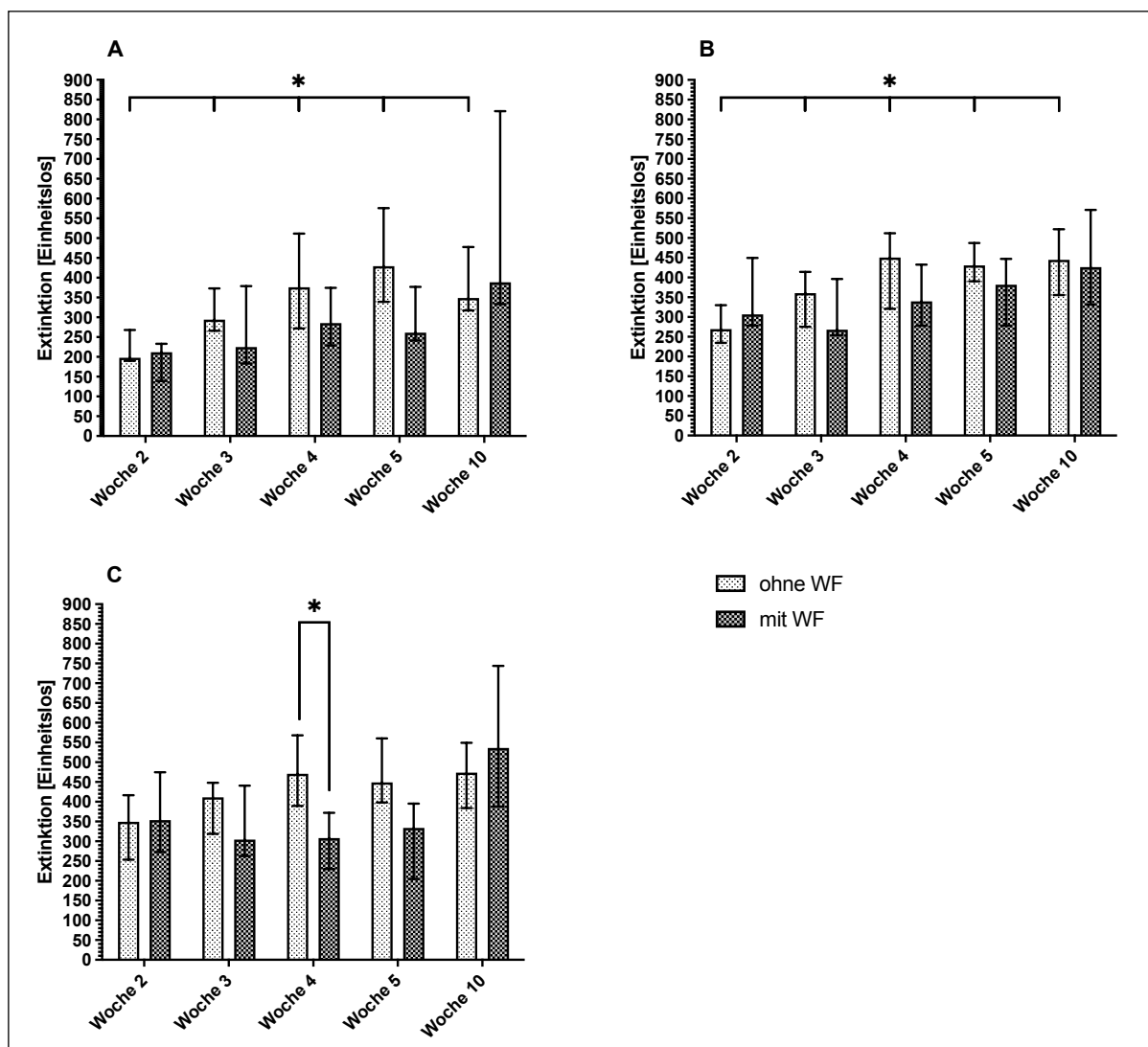


Abbildung 20: **Zellviabilität/Zellmetabolismus auf den besiedelten Scaffolds**

Dargestellt sind die Mediane mit Interquartilsabständen der Extinktionen des AlamarBlue-Assays der non-WF- und WF-Scaffolds als Zellviabilitäts-Indikatoren zu den Zeitpunkten Woche 2, 3, 4, 5 und 10. In Diagramm (A) sind die Werte für die besiedelten 100 µm-Scaffolds, in Diagramm (B) für die besiedelten 200 µm-Scaffolds und in Diagramm (C) für die besiedelten 300 µm-Scaffolds dargestellt. Bei den besiedelten 100 µm-Scaffolds ist  $N=4$  für Woche 2–5 und  $N=3$  für Woche 10, bei den besiedelten 200 µm-Scaffolds und besiedelten 300 µm-Scaffolds beträgt  $N=5$  für Woche 2–5 und  $N=4$  für Woche 10. Statistische Testung mit dem Mann-Whitney-Test zwischen den Gruppen, statistische Testung mit dem Kruskal-Wallis-Test zwischen den Zeitpunkten innerhalb der Gruppen (\*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ ).

Um die Auswirkung des Gitterabstandes der Scaffolds auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurden, dargestellt in der folgenden Abbildung 21, die Mediane der Extinktionswerte der drei Scaffold-Größen einer Gruppe zu den fünf Zeitpunkten verglichen. Dabei zeigte sich, dass die besiedelten 300 µm-Scaffolds tendenziell die höchste Zellviabilität aufwiesen, vor allem wenn man die non-WF-Scaffolds betrachtet. Sehr deutlich erkennt man, dass die Mediane der Prozentwerte der besiedelten 100 µm-Scaffolds insgesamt kleiner waren als jene der

besiedelten 200  $\mu\text{m}$ - und 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds*. Ausnahmen bildeten Woche 4 und Woche 5 der WF-*Scaffolds*. Hier übertraf die Stoffwechselaktivität der besiedelten 200  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* die der besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds*. Die Unterschiede der einzelnen besiedelten *Scaffolds* wurden zu den einzelnen Zeitpunkten statistisch getestet, dabei erwiesen sich diese in Woche 1 (*Kruskal-Wallis-Test*,  $p=0,0281$ ) der WF-*Scaffolds* als statistisch signifikant.

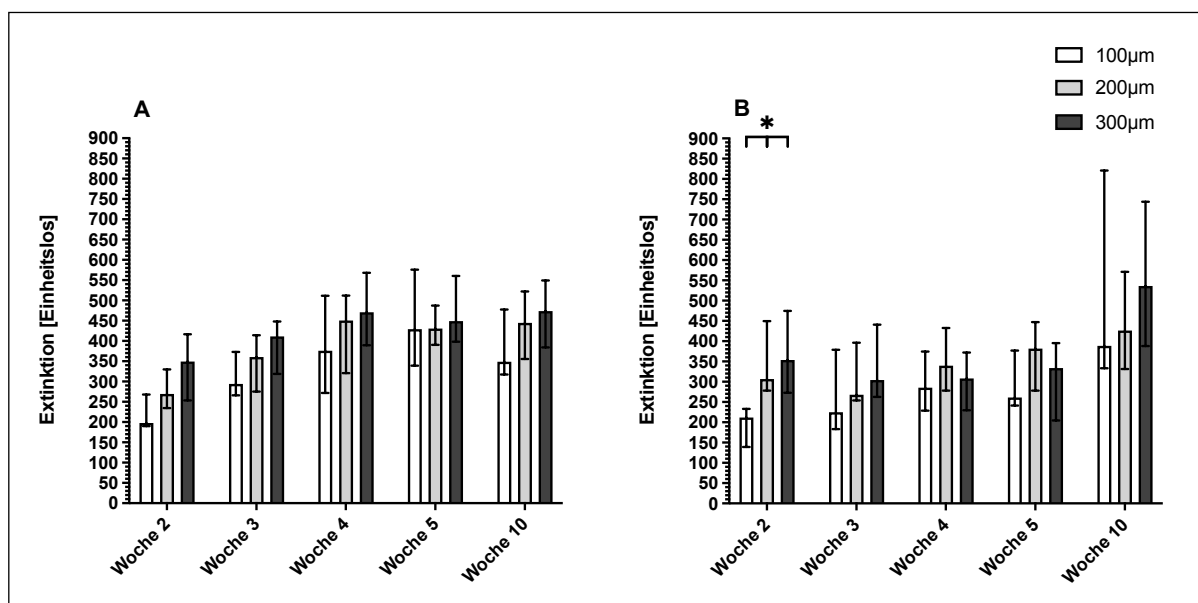


Abbildung 21: Vergleich der Zellviabilitäten der 3 Scaffold-Größen

Die Abbildung zeigt den Vergleich der Mediane mit Interquartilsabständen der Extinktionen als Zellviabilitäts-Indikatoren gemessen mit dem AlamarBlue-Assay der drei Scaffold-Größen 100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  und 300  $\mu\text{m}$  zu den Zeitpunkten Woche 2, 3, 4, 5 und 10. (A) zeigt die non-WF-Scaffolds, (B) die WF-Scaffolds. Statistische Testung mit dem *Kruskal-Wallis-Test* zwischen den Gruppen (\*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ ).

Um die mit dem *AlamarBlue-Assay* ermittelte Zellviabilität unabhängig von den unterschiedlichen Zellzahlen zu analysieren, wurde für die drei Proben, bei denen die Zellzahl mit TE ermittelt wurde, das Verhältnis aus Extinktion und Zellzahl der korrespondierenden besiedelten *Scaffolds* gebildet. Die Mediane werden samt zugehöriger *range* in Abbildung 22 dargestellt. Es zeigte sich, dass außer in Woche 10 der besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* die Verhältnisse der Extinktionen zu den Zellzahlen für die non-WF-*Scaffolds* größer als die der WF-*Scaffolds* waren. Das bekräftigt die reinen Extinktionsdaten und zeigt die Wirkung der WF auf eine geminderte Zellviabilität. Es ließen sich *Scaffold-Größen-übergreifend* keine einheitlichen Zu- oder Abnahmetendenzen beobachten, was mit der gleichzeitigen Zunahme der Extinktionen im *AlamarBlue-Assay* und der Zellzahlen im TE-Verfahren zusammenhängen könnte. Es konnten mittels *Mann-Whitney-Test* und *Kruskal-Wallis-Test* keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen und innerhalb der Gruppen ohne und mit WF festgestellt werden.

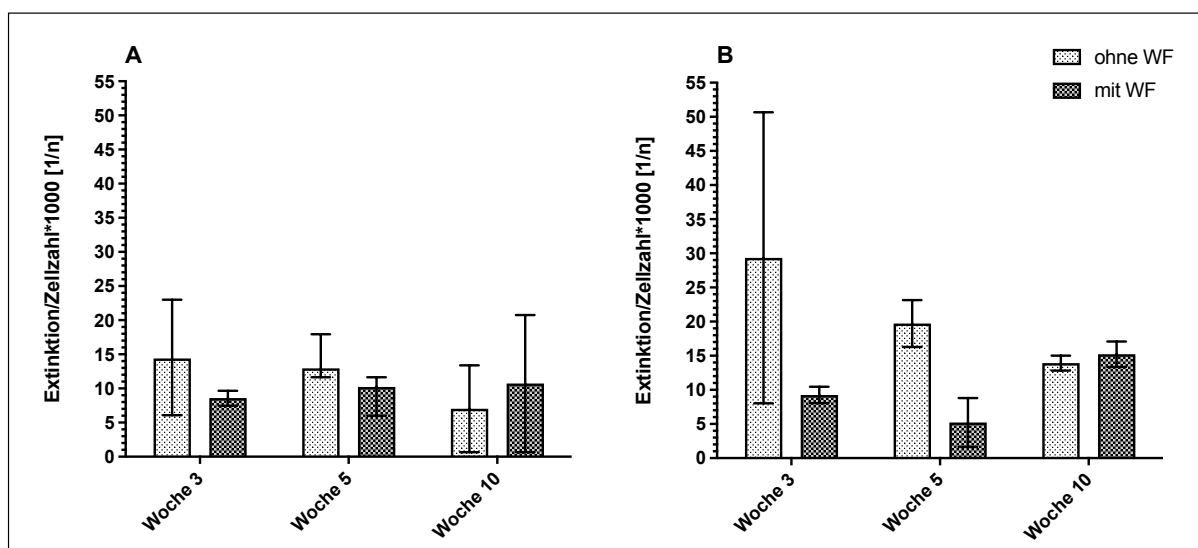


Abbildung 22: Verhältnis von gemessener Zellviabilität zu ermittelter Zellzahl der besiedelten Scaffolds

Die Abbildung zeigt das Verhältnis der mittels AlamarBlue-Assay ermittelten Extinktionen zur mit TE bestimmten Zellzahl der non-WF- und WF-Scaffolds, multipliziert mit dem Faktor Tausend. Dieses Verhältnis konnte in Woche 3, 5 und 10 gebildet werden und beruht auf den Daten von Probe 3, 4 und 5. (A) zeigt die Mediane mit range für die besiedelten 200 µm-Scaffolds, (B) zeigt die Mediane mit range für die besiedelten 300 µm-Scaffolds. In Woche 3 und 5 der besiedelten 200 µm-Scaffolds ist N=3, in Woche 10 ist N=2. Für die besiedelten 300 µm-Scaffolds beträgt N=2 zu allen Zeitpunkten. Statistische Testung mit dem Mann-Whitney-Test zwischen den Gruppen, statistische Testung mit dem Kruskal-Wallis-Test zwischen den Zeitpunkten innerhalb der Gruppen (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.4 Bestimmung des Proteingehalts der besiedelten Scaffolds

Während der Kultivierung der besiedelten Scaffolds wurden zu den Zeitpunkten Woche 1, 3, 5 und 10 an exemplarischen Stichproben die Proteinkonzentrationen bestimmt. Dazu wurden die Zellen auf den besiedelten Scaffolds lysiert und die Proteinkonzentrationen der Lysate bestimmt. Abbildung 23 zeigt die Proteinkonzentrationen der non-WF- und WF-Scaffolds über die vier Zeitpunkte. Die Betrachtung der Diagramme zeigt, dass es über beide Scaffold-Größen hinweg übereinstimmende Trends gab. Zu jedem Zeitpunkt war der Wert oder das arithmetische Mittel der zwei Werte der Proteinkonzentrationen bei den WF-Scaffolds höher als bei den non-WF-Scaffolds. Im zeitlichen Verlauf von Woche 1 bis Woche 5 zeigte sich sowohl bei den WF-Scaffolds als auch bei den non-WF-Scaffolds ein Anstieg der Proteinkonzentrationen. In Woche 10 der besiedelten 200 µm-Scaffolds sowie Woche 3 der besiedelten 300 µm-Scaffolds gab es hierbei Ausnahmen. Bei den besiedelten 200 µm-Scaffolds kam es in Woche 10 sowohl mit als auch ohne WF-Einfluss zu einer Abnahme der Proteinkonzentration. Bei den 300 µm-non-WF-Scaffolds kam es hingegen in Woche 2 zu

einer Abnahme des arithmetischen Mittels der Proteinkonzentrationen. Aufgrund der Stichprobengrößen konnte keine statistische Testung durchgeführt werden.

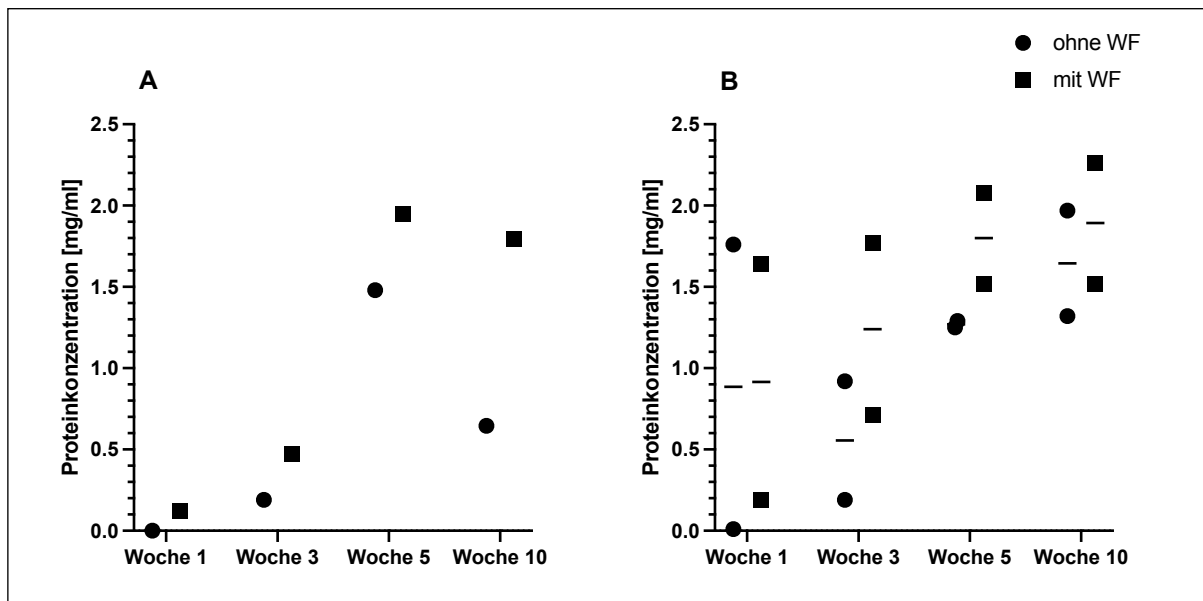
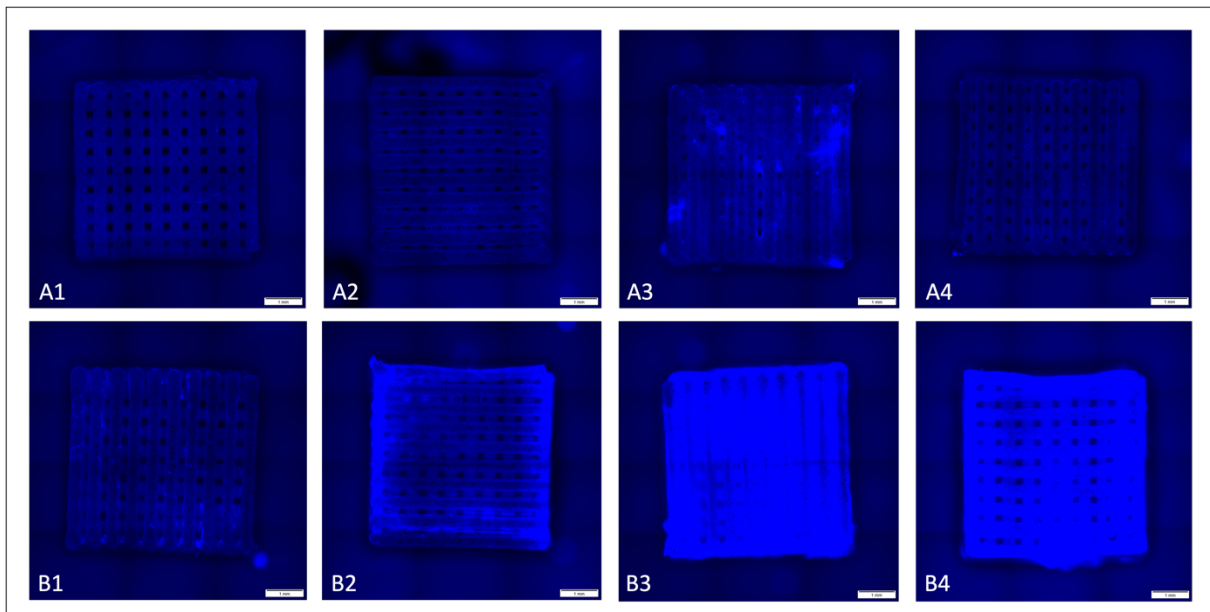


Abbildung 23: **Proteinkonzentrationen der besiedelten Scaffolds im zeitlichen Verlauf**

In (A) sind die Proteinkonzentrationen in mg/ml der besiedelten 200 µm-Scaffolds als einzelne Werte dargestellt. Hier ist  $N=1$  und zum Zeitpunkt Woche 1 wurde ein negativer Wert für den non-WF-Scaffold ermittelt, der in der Auswertung nicht berücksichtigt wurde. In (B) sind die Proteinkonzentrationen der besiedelten 300 µm-Scaffolds als einzelne Werte sowie ihr arithmetisches Mittel als dazwischenliegende Linie dargestellt.

Um nach der Bestimmung der Proteinkonzentrationen auf den besiedelten Scaffolds zu untersuchen, ob die Lyse des Scaffold-Inhaltes vollständig war, wurden die Scaffolds direkt im Anschluss mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden Aufnahmen gemacht, die in Abbildung 24 exemplarisch für die vierte Probe gezeigt werden. Es zeigte sich, dass auf den non-WF-Scaffolds nur minimale residuale Zell-besiedelte Flächen zur Darstellung kamen, welche sich mit DAPI positiv anfärbten. Nur in Woche 5 (Abb. 24 A3) waren überhaupt angefärbte Flächen sichtbar. Dagegen zeigten sich selbst nach Lyse mit steigender Kultivierungszeit zunehmend größere DAPI positive Flächen bei den WF-Scaffolds. Der einzige Unterschied in der Behandlung und Auswertung der besiedelten Scaffolds war die Kultivierung mit WF. Also lassen diese Aufnahmen vermuten, dass die gemessenen Proteinkonzentrationen (Abb. 23) der non-WF-Scaffolds korrekt waren und die der WF-Scaffolds zu den späteren Zeitpunkten weitaus unterhalb der tatsächlichen Konzentrationen lagen.



**Abbildung 24: DAPI-Färbungen der ehemals besiedelten Scaffolds nach Lyse und Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Abbildung zeigt exemplarische Aufnahmen der DAPI-gefärbten, ehemals besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -Scaffolds einer Probe nach der Lyse des Inhalts für die Proteinbestimmung. Die mit (A) beschrifteten ehemals besiedelten Scaffolds wurden ohne WF-Einfluss und die mit (B) beschrifteten ehemals besiedelten Scaffolds mit WF-Einfluss kultiviert. (1) steht für Woche 1, (2) für Woche 3, (3) für Woche 5 und (4) für Woche 10. Eine intensivere Anfärbung zeigt mehr verbliebene Zellen auf den ehemals besiedelten Scaffolds.

#### 4.5 Bestimmung der Zellzahl der besiedelten Scaffolds mit TE und Durchlicht-mikroskopische Aufnahmen

Im Laufe der Kultivierung der besiedelten Scaffolds wurde die Zellzahl in und auf den Scaffolds zu den Zeitpunkten Woche 1, 3, 5 und 10 gemessen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die besiedelten Scaffolds mit doppelt konzentriertem TE behandelt und anschließend mithilfe des Neubauer-Zählkammer-Verfahrens analysiert. Die Werte in Abbildung 25 stellen die Mediane mit Interquartilsabständen der Zellzahlen der besiedelten 200  $\mu\text{m}$ - und 300  $\mu\text{m}$ -Scaffolds dar. Dabei werden die Gruppen ohne und mit WF verglichen. Eine Betrachtung der Diagramme zeigt übereinstimmende Trends für beide Scaffold-Größen. Die medianen Zellzahlen bei den WF-Scaffolds waren zu jedem Zeitpunkt höher als bei den non-WF-Scaffolds. Zudem war von der ersten bis zur fünften Woche eine Zunahme der medianen Zellzahlen sowohl bei den non-WF- als auch bei den WF-Scaffolds festzustellen. Woche 5 und 10 der 200  $\mu\text{m}$ -WF-Scaffolds sowie Woche 10 der 200  $\mu\text{m}$ -non-WF-Scaffolds bildeten Ausnahmen, da es hier im Vergleich zur vorherigen Woche jeweils zu einer leichten Abnahme der Mediane der Zellzahlen kam. Allerdings blieb die Zellzahl bei den WF-Scaffolds höher als bei den non-WF-Scaffolds. Auch die Zellzahlen der 300  $\mu\text{m}$ -WF-

*Scaffolds* in Woche 1 lagen außerhalb des erkennbaren Trends, da der Median höher als die der anderen Wochen war. Die Zellzahlen der 300  $\mu\text{m}$ -WF-*Scaffolds* in Woche 10 zeigten eine leichte Abnahme zu Woche 5. Es wurden bei den besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (*Mann-Whitney-Test*) ohne und mit WF und auch innerhalb der Gruppen (*Kruskal-Wallis-Test*) zwischen den vier Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

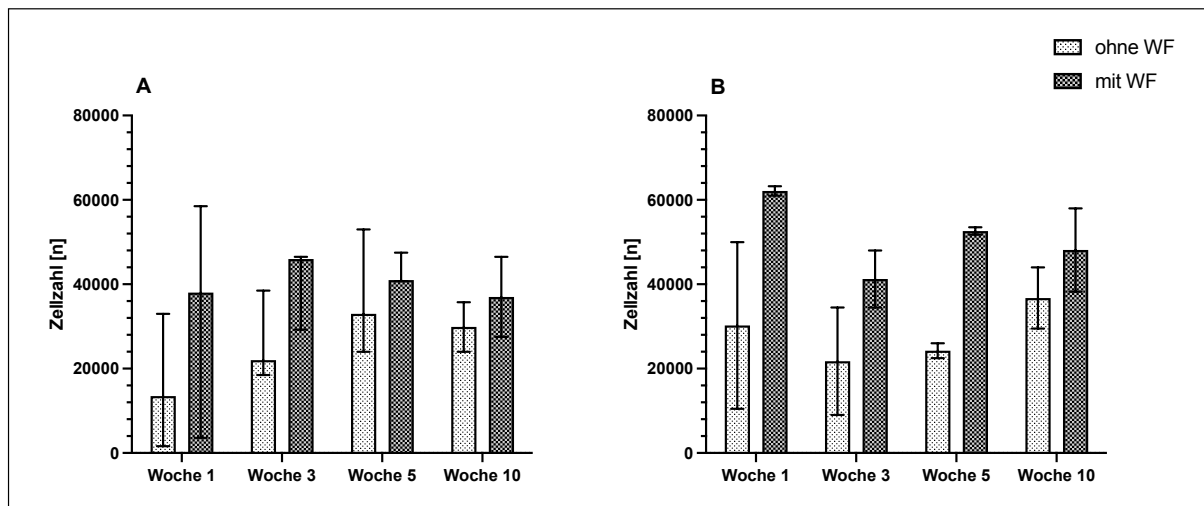
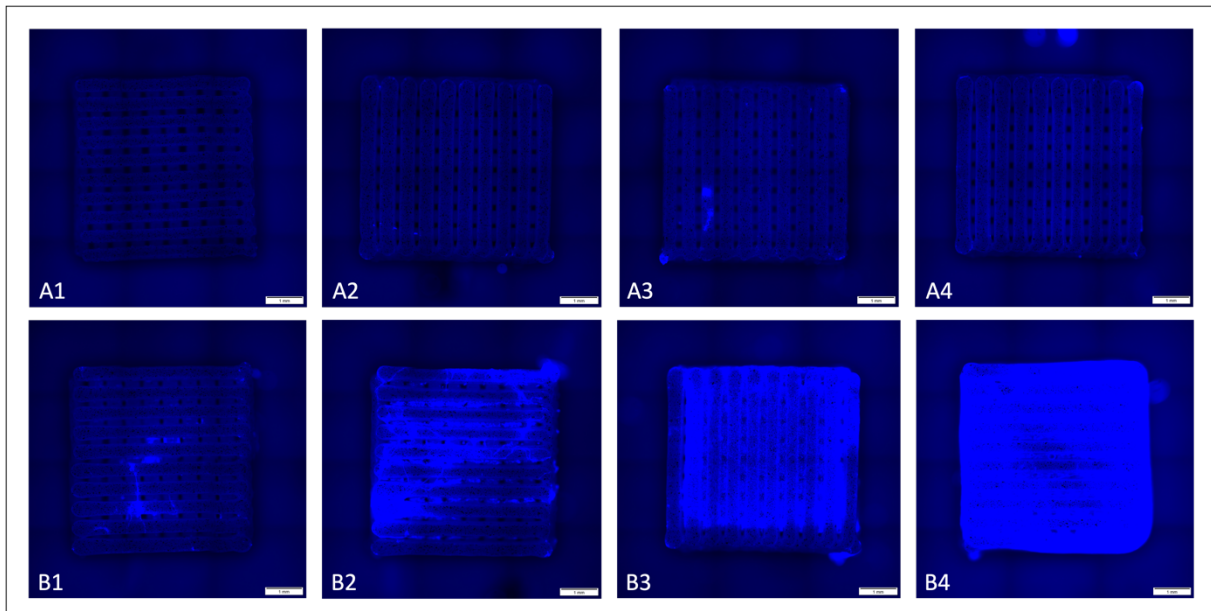


Abbildung 25: Zellzahlen auf den besiedelten *Scaffolds* mit TE bestimmt

In (A) sind die Mediane mit Interquartilsabständen der Zellzahlen auf den besiedelten 200  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* dargestellt. Die non-WF- und WF-*Scaffolds* wurden jeweils von Woche 1 bis Woche 10 verglichen. Die Stichprobenanzahl beträgt  $N=2$ . In (B) sind die Mediane mit Interquartilsabständen auf den besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* dargestellt. Die Stichprobenanzahl beträgt in den Wochen 1 bis 5 jeweils  $N=3$ , in Woche 10 beträgt sie  $N=2$ . Hierbei werden ebenfalls von Woche 1 bis Woche 10 die non-WF- und WF-*Scaffolds* verglichen. Statistische Testung mit dem Mann-Whitney-Test zwischen den Gruppen, statistische Testung mit dem Kruskal-Wallis-Test zwischen den Zeitpunkten innerhalb der Gruppen (\*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ ).

Um nach der Bestimmung der Zellzahlen auf den besiedelten *Scaffolds* zu untersuchen, ob die Lyse des *Scaffold*-Inhaltes vollständig war, wurden die ehemals besiedelten *Scaffolds* direkt im Anschluss ebenfalls mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht, die in Abbildung 26 exemplarisch gezeigt werden. Es ist klar zu erkennen, dass auf den non-WF-*Scaffolds* kaum DAPI-positive Flächen darstellbar waren. Dies spricht dafür, dass nahezu alle adhäsiven Zellen durch TE abgelöst wurden. Dagegen waren bei den WF-*Scaffolds* von Zeitpunkt zu Zeitpunkt mehr DAPI-gefärbte Flächen und damit auch eine große Zahl residual verbliebener Zellen sichtbar. Der einzige Unterschied in der Behandlung und Auswertung der ehemals besiedelten *Scaffolds* war die Kultivierung mit WF. Also lassen diese Aufnahmen vermuten, dass die ermittelten Zellzahlen (Abb. 25) der non-WF-*Scaffolds* annähernd korrekt waren und die der WF-*Scaffolds* zu den

späteren Zeitpunkten weitaus unterhalb der tatsächlichen Zellzahlen lagen. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den Ergebnissen der DAPI-Färbung nach Proteinkonzentrationsbestimmung.



**Abbildung 26: DAPI-Färbungen der ehemals besiedelten Scaffolds nach Lyse mit TE und Zellzahlbestimmung**

Die Abbildung zeigt Aufnahmen der 300 µm-Scaffolds nach der Lyse des Inhalts mit TE für die Zellzahlbestimmung. Die mit (A) beschrifteten Scaffolds wurden ohne WF-Einfluss und die mit (B) beschrifteten Scaffolds mit WF-Einfluss kultiviert. (1) steht für Woche 1, (2) für Woche 3, (3) für Woche 5 und (4) für Woche 10. Eine intensivere Anfärbung zeigt mehr verbliebene Zellen auf dem Scaffold.

Die besiedelten 300 µm-Scaffolds wurden in einem zusätzlichen Durchgang zu den Zeitpunkten Woche 1, 2, 3, 4 und 5 analysiert. Bei diesen besiedelten Scaffolds wurde ebenso eine Bestimmung der Zellzahl auf und in den Scaffolds durchgeführt und diese folgte dem gleichen Verfahren wie bei den anderen Zellzahlbestimmungen. Eine Betrachtung der Abbildung 27 zeigt übereinstimmende Trends für die Scaffolds. Zu jedem Zeitpunkt war die Anzahl der Zellen bei den WF-Scaffolds höher als bei den non-WF-Scaffolds. Überdies war im zeitlichen Verlauf eine Zunahme der Zellzahlen sowohl bei den non-WF- als auch bei den WF-Scaffolds zu beobachten. Woche 5 stellte dabei eine Ausnahme dar, da hier in beiden Gruppen im Vergleich zu Woche 4 eine leichte Abnahme der Zellzahl zu verzeichnen war. Dennoch blieb die Zellzahl bei den WF-Scaffolds höher als bei den non-WF-Scaffolds.

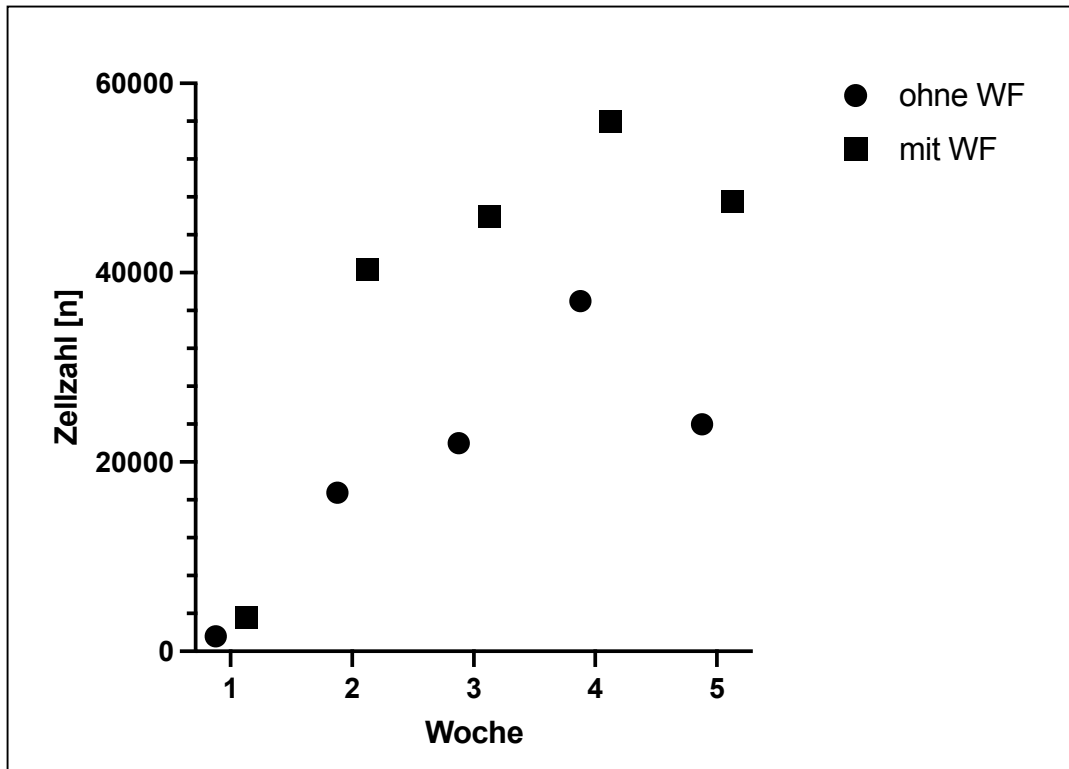


Abbildung 27: Zellzahlen auf den besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -Scaffolds mit TE wöchentlich bestimmt

Die Abbildung zeigt die Zellzahlen auf den besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -Scaffolds zu den Zeitpunkten Woche 1, 2, 3, 4 und 5 für jeweils einzelne Messungen bei  $N=1$ . Es wurden die non-WF- und die WF-Scaffolds verglichen.

Um die Messergebnisse auch qualitativ zu bestätigen, wurden zu bestimmten Zeitpunkten Durchlicht-mikroskopische Aufnahmen der besiedelten *Scaffolds* angefertigt. In Abbildung 28 wird jeweils ein mittlerer Ausschnitt der besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* unter einer 40-fachen Vergrößerung dargestellt. Es wurde darauf geachtet, dass die Aufnahmen nach dem Transfer der besiedelten *Scaffolds* in eine neue 24-Well-Platte gemacht wurden, da eine Verwechslung der Zellen am Boden des *Wells* mit den Zellen in den besiedelten *Scaffolds* vermieden werden sollte. In beiden Gruppen, sowohl ohne als auch mit WF, zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine Zunahme des Inhalts der besiedelten *Scaffolds*. Dieser Inhalt zeigte sich als netzartige Strukturen und tropfenförmige Ausbuchtungen, die vermutlich Zellen darstellten. Ab Tag 39 schienen die WF-*Scaffolds* (Abb. 28 B2) insgesamt jedoch mehr Inhalt im *Scaffold* aufzuweisen. Dies zeigte sich durch eine dunklere Fläche zwischen den Gittern des *Scaffolds*. Diese Ergebnisse korrelieren mit den oben beschriebenen Ergebnissen der Zellzählung mit TE.

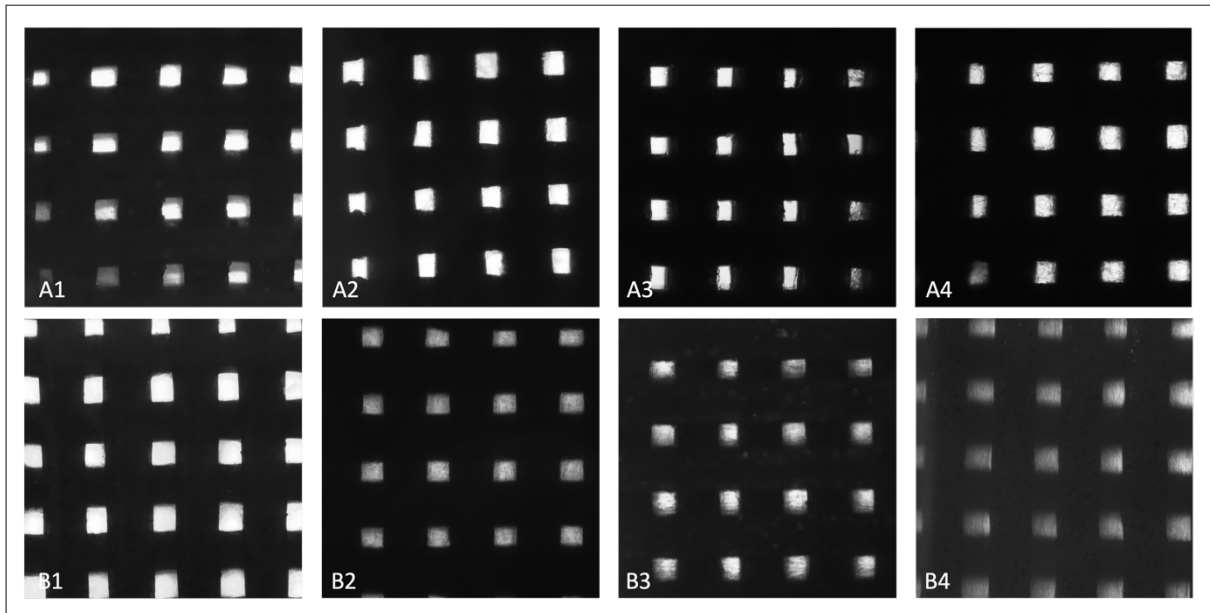


Abbildung 28: **Durchlicht-mikroskopische Aufnahmen der besiedelten 300 µm-Scaffolds im zeitlichen Verlauf**

Die mit (A) gekennzeichneten Bilder zeigen die 300 µm-non-WF-Scaffolds der Probe 3 zu den Zeitpunkten (1) Tag 25, (2) Tag 39, (3) Tag 53 und (4) Tag 87 nach In-Kulturnahme. Die mit (B) markierten Bilder zeigen die 300 µm-WF-Scaffolds der Probe 3 zu den identischen Zeitpunkten.

#### 4.6 Prozentuale DAPI-Färbung der Scaffold-Oberfläche

Nach einer, drei, fünf und zehn Wochen Kultivierung wurden die besiedelten *Scaffolds* mit DAPI-Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Auf der Oberfläche der gefärbten besiedelten *Scaffolds* waren DAPI-positive Flächen erkennbar und diese wurden mittels *ImageJ* hinsichtlich des prozentualen Flächenanteils analysiert. Die Mediane dieser Prozentwerte werden in Abbildung 29 dargestellt und die Gruppen ohne und mit WF verglichen. Insgesamt zeigten sich auch bei dieser Analyse der besiedelten *Scaffolds* Trends über alle drei *Scaffold*-Größen. So war der Median der prozentualen DAPI-Färbung der WF-*Scaffolds* bis auf Woche 3 der besiedelten 100 µm-*Scaffolds* stets größer als der Median der non-WF-*Scaffolds*. Außerdem zeigte sich in jeder *Scaffold*-Größe eine stetige Zunahme der mit DAPI angefärbten Fläche von Woche 1 bis Woche 10. Insgesamt schienen die Mediane der besiedelten 100 µm-*Scaffolds* kleiner zu sein als die der besiedelten 200 µm- und 300 µm-*Scaffolds*. Diese Trends konnten bei den besiedelten 100 µm- und 200 µm-*Scaffolds* zwischen den Gruppen ohne und mit WF nicht statistisch signifikant nachgewiesen werden. Jedoch ergab sich bei den besiedelten 300 µm-*Scaffolds* zum Zeitpunkt Woche 5 und Woche 10 ein signifikant größerer Wert (*Mann-Whitney-Test*, Woche 5  $p=0,0317$   $N=5$ , Woche 10  $p=0,0286$   $N=4$ ) für die WF-*Scaffolds* in der prozentualen DAPI-Färbung der *Scaffold*-Oberfläche. Außerdem unterschieden sich die Mediane der 100 µm-WF-*Scaffolds*

(Kruskal-Wallis-Test,  $p=0,0014$ ) als auch die Mediane der 300  $\mu\text{m}$ -non-WF-Scaffolds (Kruskal-Wallis-Test,  $p=0,0357$ ) im zeitlichen Verlauf signifikant voneinander, was den Zunahme-Trend der Besiedlungsfläche bestätigt.

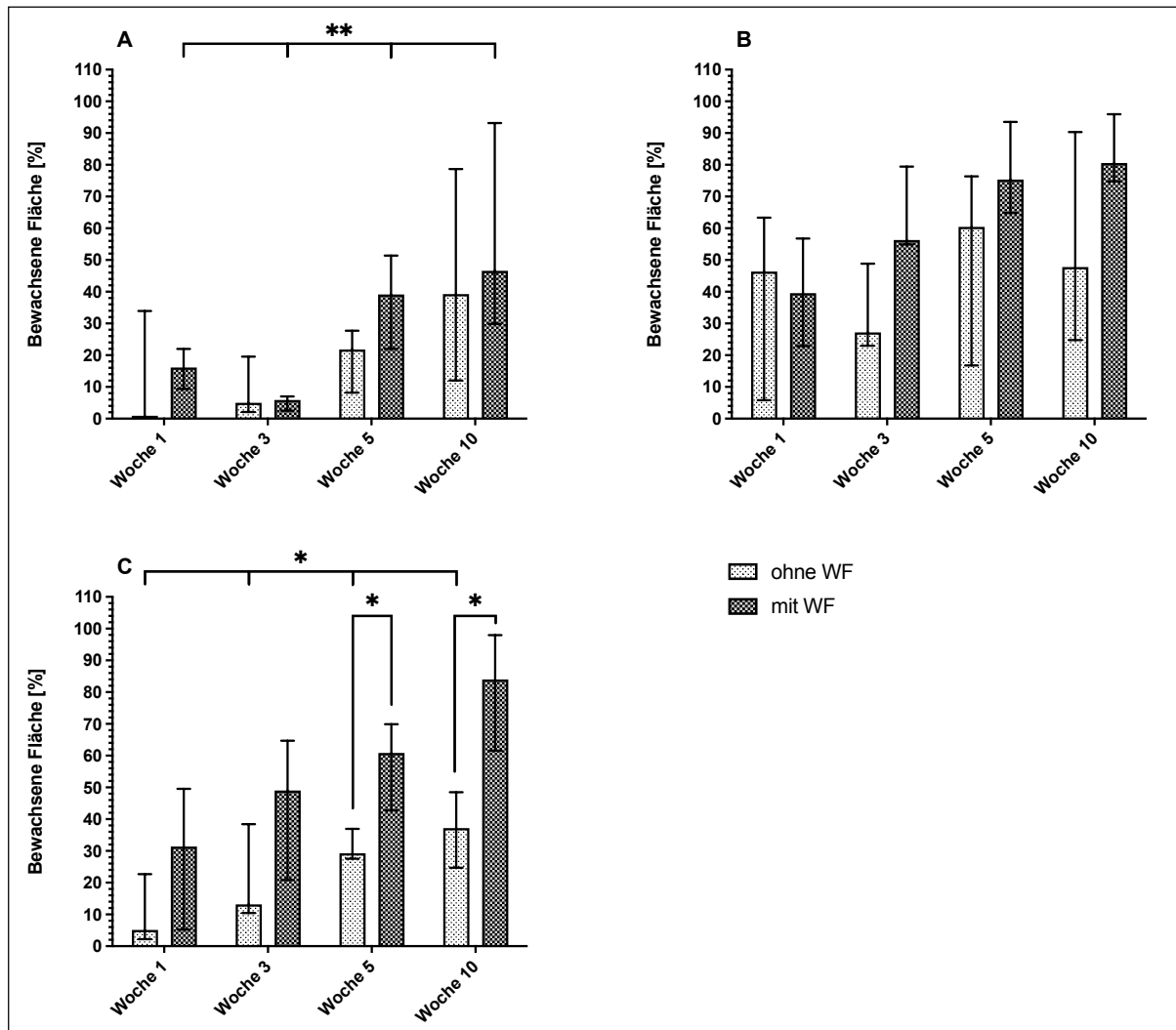


Abbildung 29: **Prozentualer Oberflächenanteil der DAPI-gefärbten besiedelten Scaffolds**

Die Abbildung zeigt die Mediane mit Interquartilsabständen der DAPI-gefärbten Oberflächenanteile der besiedelten Scaffolds in %. Die Werte für die besiedelten 100- $\mu\text{m}$ -Scaffolds werden in (A), die Werte für die besiedelten 200- $\mu\text{m}$ -Scaffolds in (B) und die Werte für die besiedelten 300- $\mu\text{m}$ -Scaffolds in (C) dargestellt. In einem Zeitraum von Woche 1 bis Woche 10 werden die non-WF- und WF-Scaffolds verglichen. Die Anzahl der Proben beträgt sowohl für die besiedelten 100  $\mu\text{m}$ -Scaffolds als auch für die besiedelten 200  $\mu\text{m}$ -Scaffolds jeweils  $N=3$ . Für die besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -Scaffolds beträgt sie für die Woche 1 bis 5  $N=5$  und für Woche 10  $N=4$ . Statistische Testung mit dem Mann-Whitney-Test zwischen den Gruppen, statistische Testung mit dem Kruskal-Wallis-Test zwischen den Zeitpunkten innerhalb der Gruppen (\*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ ).

Um die Ergebnisse nochmals qualitativ darzustellen, werden in Abbildung 30 möglichst repräsentative Bilder der DAPI-Färbungen der besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -Scaffolds gezeigt. Der

einzigste Unterschied in der Behandlung der Zellen bei der Expansion und Besiedlung der *Scaffolds* war die Zugabe der oben genannten WF zum Zellkulturmedium. Ohne WF-Einfluss war bei den besiedelten *Scaffolds* eine sehr schwache Zunahme der gefärbten Fläche zur Woche 3 (Abb. 30 A2) zu erkennen, die in Woche 5 (Abb. 30 A3) etwas stärker zunahm und in Woche 10 (Abb. 30 A4) wieder abzunehmen schien. Von Woche 1 (Abb. 30 B1) bis Woche 10 (Abb. 30 B4) zeigte sich bei den WF-*Scaffolds* eine kontinuierlich zunehmende angefärbte Fläche. Diese war im Vergleich zu den non-WF-*Scaffolds* immer größer. Da DAPI die Zellkerne von Zellen anfärbt, spricht diese Anfärbung für eine dichtere Besiedlung der *Scaffolds* mit Chondrozyten.

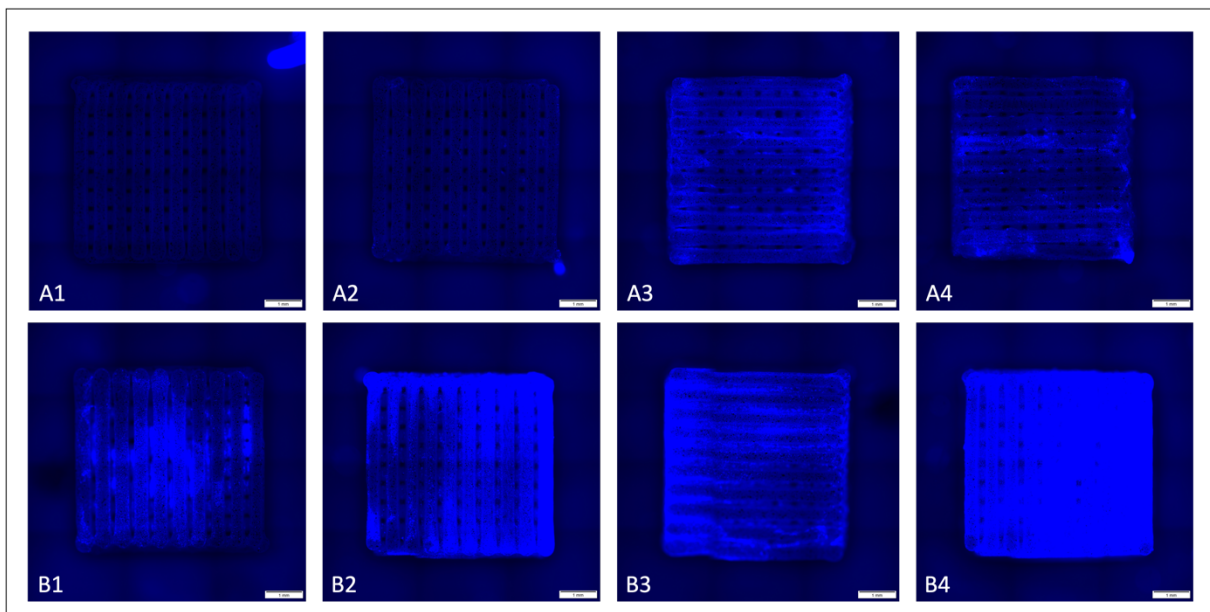


Abbildung 30: **Verlauf der DAPI-Färbungen der besiedelten 300 µm-Scaffolds**

Die Abbildung zeigt den Verlauf der DAPI-Färbung der besiedelten 300 µm *Scaffolds* der vierten Probe in den Wochen 1 (1), 3 (2), 5 (3) und 10 (4). Dabei entspricht (A) den non-WF-*Scaffolds* und (B) den WF-*Scaffolds*. DAPI färbt die Zellkerne blau-fluoreszierend. Eine stärkere Färbung spricht für eine höhere Anzahl von Zellen. Die Abbildungen wurden unter 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

Um die Auswirkung des Gitterabstandes der *Scaffolds* auf die Besiedlungsfläche zu untersuchen, wurden die Mediane der prozentualen DAPI-Oberflächenfärbungen der drei besiedelten *Scaffold*-Größen einer Gruppe zu den vier Zeitpunkten verglichen. Dies wird in der folgenden Abbildung 31 gezeigt. Dabei zeigte sich, dass die besiedelten 200 µm-*Scaffolds* Gruppen-unabhängig tendenziell die größte DAPI-positiv-gefärbte Fläche aufwiesen. Sehr deutlich erkennt man, dass die Mediane der Prozentwerte der besiedelten 100 µm-*Scaffolds* insgesamt kleiner waren als jene der besiedelten 200 µm- und 300 µm-*Scaffolds*. Hinsichtlich der Besiedlungsfläche zwischen *Scaffolds* verschiedener

Gitterabstände zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in Woche 3 (*Kruskal-Wallis-Test*,  $p=0,0076$ ) und Woche 5 (*Kruskal-Wallis-Test*,  $p=0,0329$ ) der WF-Scaffolds.

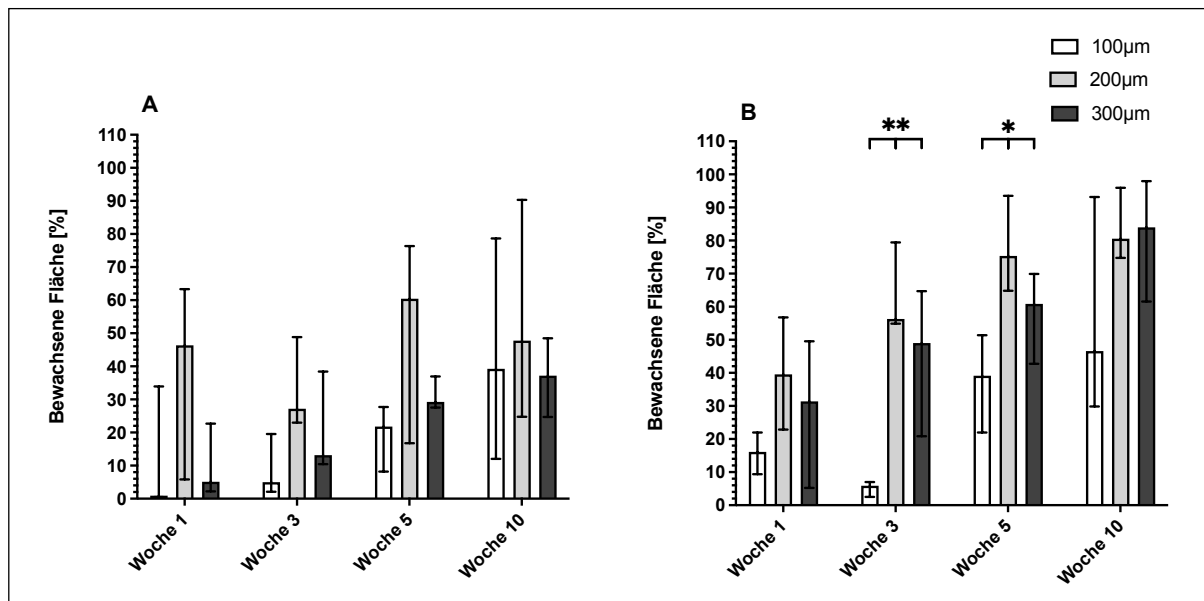


Abbildung 31: Vergleich der prozentualen DAPI-Färbungen der 3 besiedelten Scaffold-Größen

Die Abbildung zeigt den Vergleich der Mediane mit Interquartilsabständen der prozentualen DAPI-Färbungen der drei besiedelten Scaffold-Größen 100 µm, 200 µm und 300 µm zu den Zeitpunkten Woche 1, 3, 5 und 10 in %. (A) zeigt die non-WF-Scaffolds, (B) die WF-Scaffolds. Statistische Testung mit dem Kruskal-Wallis-Test zwischen den Gruppen (\*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ ).

#### 4.7 Rhodamine-6G-Färbung

Zu den gleichen Zeitpunkten wie bei den DAPI-Färbungen wurden die besiedelten Scaffolds parallel mit der Fluoreszenzfärbung *Rhodamine-6G* gefärbt. Auf der Oberfläche der besiedelten und gefärbten Scaffolds waren ebenfalls *Rhodamine-6G*-positive Flächen erkennbar und diese wurden mittels *ImageJ* hinsichtlich des prozentualen Flächenanteils analysiert. Es zeigten sich in der Auswertung der Proben zu den DAPI-Färbungen identische Trends über alle drei besiedelten Scaffold-Größen. Ebenso die Trends zwischen den verschiedenen Scaffold-Größen waren identisch. Dies zeigte sich auch in Aufnahmen der Scaffolds, in welchen die Aufnahmekanäle im blau-fluoreszenten und im orangen-fluoreszenten Fester kombiniert wurden. Die Aufnahmen der *Rhodamine-6G*-Färbungen zeigten aber durchgehend eine höhere Hintergrundfluoreszenz im Vergleich mit den DAPI-Färbungen, wodurch die Auswertung erschwert wurde. Deshalb wurde im Weiteren darauf verzichtet.

## 4.8 Klassifizierung der besiedelten *Scaffolds* anhand der Zelldichte nach HE-Färbung

Zu den Zeitpunkten eine, drei, fünf und zehn Wochen nach Besiedlung wurden die besiedelten *Scaffolds* fixiert, geschnitten und mit HE gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte unter dem Lichtmikroskop analysiert und fotografiert. Fixierung und Färbeprozess erwiesen sich aufgrund der porösen Ultrastruktur als ausgesprochen schwierig und anspruchsvoll. Zum einen war es häufig nicht möglich, die porösen *Scaffolds* ohne Stauchen oder Brüche zu schneiden. Dadurch waren die Schnitte teilweise morphologisch verändert oder es lagen nur Bruchstücke auf dem Objektträger vor. Überdies erwies sich ein Entparaffinieren und Färben der paraffinierten Schnitte senkrecht in der Küvette als unmöglich, ohne dass sich diese vom Objektträger lösten. Daher mussten die Schnitte mit großem Aufwand in horizontaler Lage gefärbt werden, was die Anzahl erfolgreicher Färbungen steigerte, auch wenn die Umsetzung weiterhin schwierig war. Aufgrund dieser technischen Schwierigkeiten zeigten die mikroskopischen Aufnahmen der geschnittenen und gefärbten besiedelten *Scaffolds* ein inhomogenes Bild. Für einige besiedelte *Scaffolds* wurden viele gute Bilder erfasst, während andere *Scaffolds* kaum suffizient-verwertbare Schnittpräparate lieferten. Bei der Auswertung der Bilder konnte man zwar erkennen, dass sich auf den WF-*Scaffolds* tendenziell mehr Zellen und EZM befanden, aber eine quantitative Auswertung erschien nicht praktikabel. Deshalb wurde jedes Bild einzeln auf einer Likert-Skala von 1 (vereinzelt Zellen/EZM sichtbar), 2 (einzelne Zellverbände/EZM sichtbar), 3 (konfluierende Zellverbände/EZM sichtbar) bis 4 (homogene Besiedlung der *Scaffolds* mit Zellen und EZM) verblindet klassifiziert. Im Abschnitt Material und Methoden finden sich exemplarische Aufnahmen zur Verdeutlichung der Klassifizierungsstufen. Da je nach Schnittqualität und Färbung unterschiedlich viele Bilder pro besiedeltem *Scaffold* entstanden, wurde pro Klassifizierungswert 1, 2, 4 und 4 die Anzahl der Bilder summiert und mit dem Klassifizierungswert multipliziert, um dann die Summe der vier Multiplikationen durch die Gesamtzahl der Bilder pro besiedeltem *Scaffold* zu teilen. Dadurch ergab sich pro besiedeltem *Scaffold* ein Gesamtklassifizierungswert zwischen 1 und 4. Aus diesen Gesamtklassifizierungswerten wurde dann entsprechend der Stichprobengröße der Median bestimmt. Diese sind graphisch in Abbildung 32 dargestellt. Dabei werden die Gruppen mit und ohne WF über die Zeitpunkte Woche 1, 3, 5 und 10 verglichen. Es ist anzumerken, dass diese Daten aufgrund der erheblichen Störfaktoren im Fixierungs- und Färbeprozess nur eine eingeschränkte statistische Beurteilbarkeit erlaubten. Um die Stärke der unten beschriebenen Unterschiede zu validieren, wurden diese dennoch beigefügt.

Aufgrund der o. g. technischen Schwierigkeiten konnten nicht von allen besiedelten *Scaffolds* Schnitte und Färbungen angefertigt werden. Ferner wurde sich, aufgrund des sehr aufwändigen Färbeprotokolls und einer Gesamtzahl von über 100 besiedelten *Scaffolds*, gegen eine Färbung sämtlicher Präparate und für die Färbung und Auswertung von Stichproben entschieden. Ebendarum beschränkten sich die HE-Färbungen auf vier repräsentative Proben, dabei insbesondere die besiedelten 300 µm-*Scaffolds*. Auch die korrespondierenden besiedelten 100 µm- und 200 µm-*Scaffolds* einer repräsentativen Probe wurden geschnitten und gefärbt. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Stichprobengrößen für die verschiedenen besiedelten *Scaffold*-Größen. Für die besiedelten 300 µm-*Scaffolds* wurden 4 Proben in Woche 1 bis Woche 5 und 3 Proben in Woche 10 untersucht; für die besiedelten 100 µm- und 200 µm-*Scaffolds* wurde nur exemplarisch jeweils 1 Probe untersucht. Es zeigten sich hinsichtlich der Dichte der zellulären Besiedelung Trends, welche über alle drei *Scaffold*-Größen zu erkennen waren. Die Einzelwerte und Mediane der Gesamtklassifizierungswerte der WF-*Scaffolds* waren, bis auf Woche 10 der besiedelten 200 µm-*Scaffolds*, stets größer als die Einzelwerte und Mediane der non-WF-*Scaffolds*. Überdies zeigte sich in jeder besiedelten *Scaffold*-Größe von Woche 1 bis Woche 5 eine stetige Zunahme-Tendenz der Gesamtklassifizierungswerte. Zwischen Woche 5 und Woche 10 ließ sich keine eindeutige Tendenz in Bezug auf Zunahme oder Abnahme feststellen. Zwischen den einzelnen *Scaffold*-Größen schien es keine in der histologischen Analyse detektierbaren Unterschiede zu geben. In der statistischen Testung ergaben sich in Woche 3 der besiedelten 300 µm-*Scaffolds* ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe ohne und mit WF (*Mann-Whitney-Test*,  $p=0,0286$ ). Ansonsten wurden zu keinem anderen Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ohne und mit WF festgestellt. Im Gegensatz zu den DAPI-Färbungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der einzelnen Gruppen gefunden werden, wobei aufgrund der geringen Stichprobenzahlen nur die besiedelten 300 µm-*Scaffolds* (*Kruskal-Wallis-Test*) ausgewertet werden konnten.

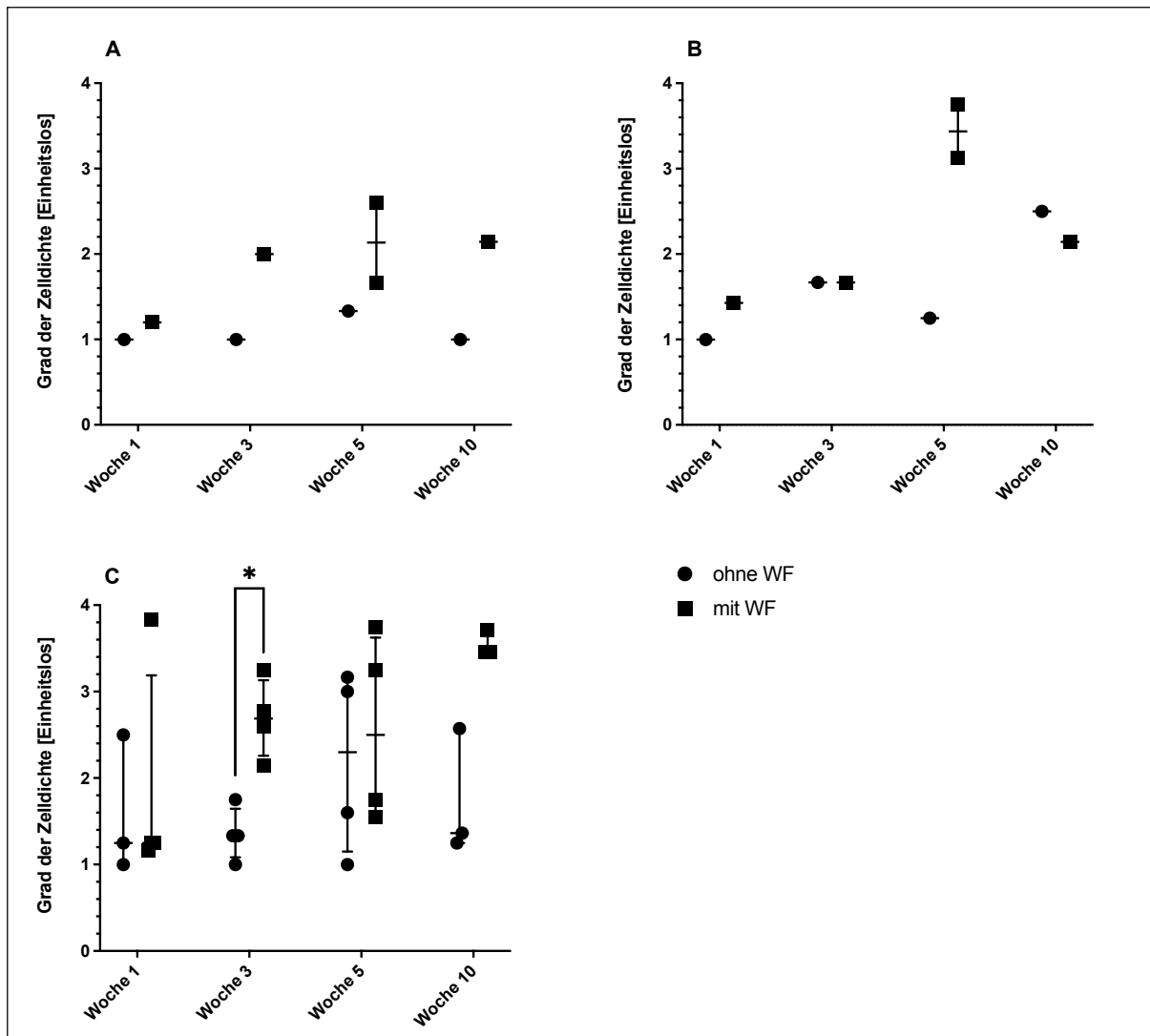


Abbildung 32: **Klassifizierung der besiedelten Scaffolds anhand der Zelldichte nach HE-Färbung**

Die Abbildung zeigt die Einzelwerte und Mediane mit Interquartilsabständen der Gesamtklassifizierungswerte der HE-gefärbten Schnitte der besiedelten Scaffolds. (A) zeigt die besiedelten 100 µm-Scaffolds, (B) zeigt die besiedelten 200 µm-Scaffolds und (C) zeigt die besiedelten 300 µm-Scaffolds. Es wurden von Woche 1 bis Woche 10 jeweils die non-WF- und WF-Scaffolds verglichen. Für die besiedelten 100 µm-Scaffolds sowie die besiedelten 200 µm-Scaffolds beträgt die Stichprobengröße jeweils N=1 und für Woche 5 der besiedelten 100 µm- und 200 µm-WF-Scaffolds N=2. Für die besiedelten 300 µm-Scaffolds beträgt die Stichprobengröße von Woche 1 bis Woche 5 N=4 und in Woche 10 N=3. Statistische Testung mit dem Mann-Whitney-Test zwischen den Gruppen, statistische Testung mit dem Kruskal-Wallis-Test zwischen den Zeitpunkten innerhalb der Gruppen (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Zur qualitativen Darstellung der Ergebnisse wurden repräsentative Bilder der HE-Färbungen von besiedelten 300 µm-Scaffold-Schnitten ausgewählt und in Abbildung 33 dargestellt. Die Bilder zeigen den zeitlichen Verlauf der dritten Probe ohne und mit WF. Alle Bilder stammen von derselben Probe. Der einzige Unterschied zwischen der Behandlung der Zellen in der Expansion und der Besiedlung der Scaffolds war die Zugabe der oben erwähnten WF zum

Zellkulturmedium. Bis zur Woche 5 war bei den non-WF-*Scaffolds* kaum eine Zunahme der Färbung zu erkennen. Erst in der Woche 10 (Abb. 33 A4) zeigte sich ein violettfarbener Zellsaum um den *Scaffold*. Dieser schien jedoch die Zwischenräume des *Scaffolds* nicht auszufüllen. Dies lässt sich besonders gut in der Aufnahme in höherer Vergrößerung erkennen (Abb. 33 C). Zwischen Woche 1 (Abb. 33 B1) und Woche 5 (Abb. 33 B3) zeigte sich bei den WF-*Scaffolds* eine kontinuierlich zunehmende Menge intensiv gefärbter Zellen auf der Oberfläche des PLA, welche im Vergleich zu den non-WF-*Scaffolds* zu jedem Zeitpunkt in Menge und Intensität weit stärker ausgeprägt war. In Woche 5 (Abb. 33 B3) löste sich der *Scaffold* vom Objektträger, jedoch blieb der Zellinhalt des *Scaffolds* haften. Dennoch ließen sich anhand der Lücken Rückschlüsse auf eine nahezu homogene Besiedlung des *Scaffolds* ziehen. Der WF-*Scaffold* in Woche 10 (Abb. 33 B4 und D) wies, bis auf durch Schnittartefakte verursachte Lücken, eine nahezu homogene Zellbesiedlung in den Zwischenräumen auf.

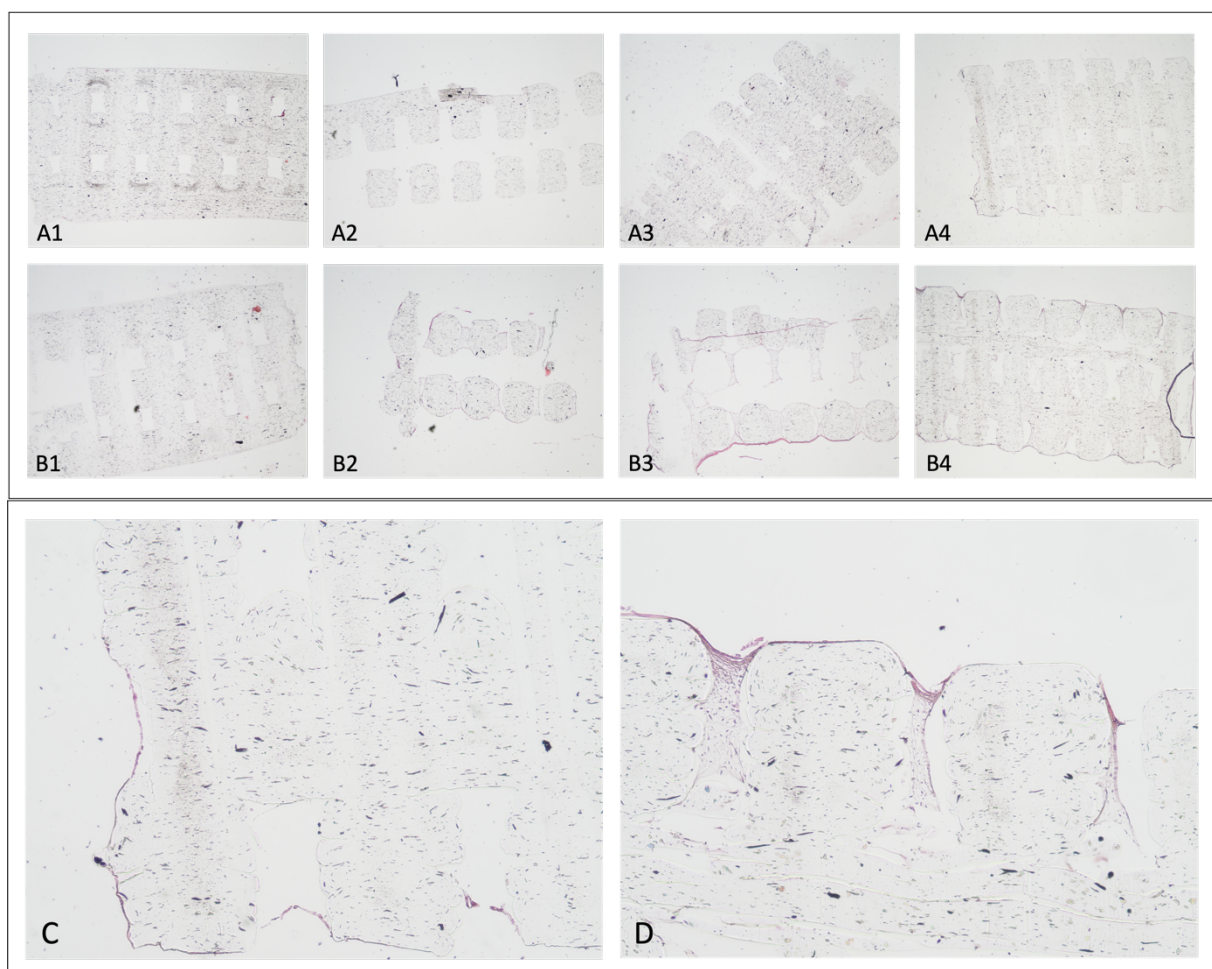
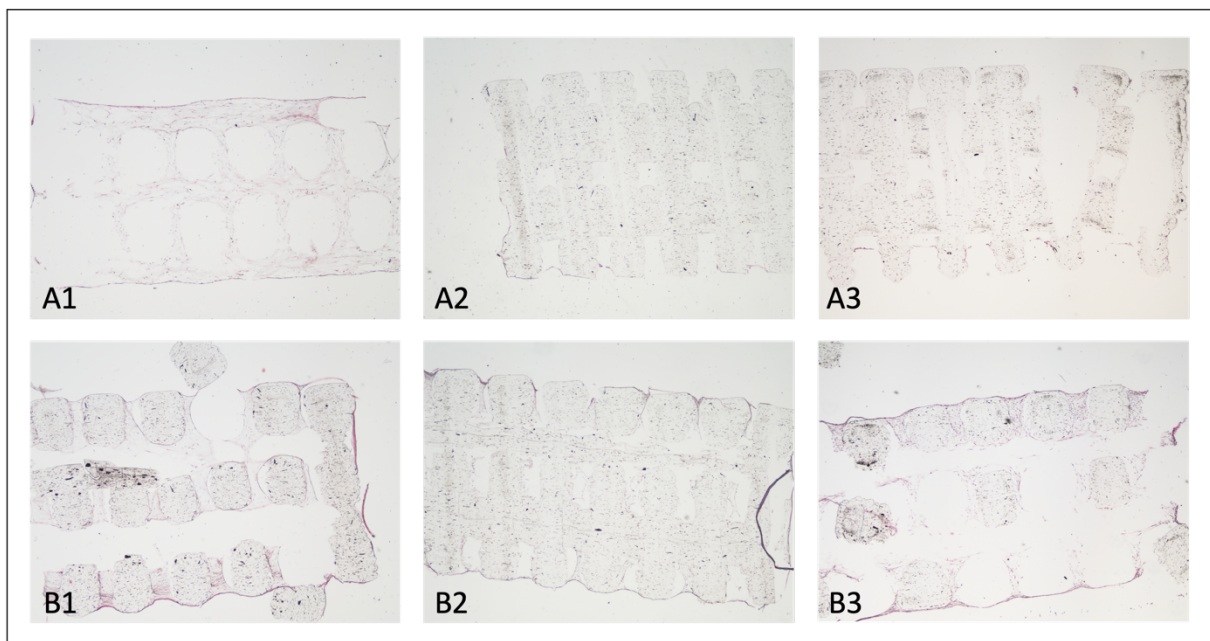


Abbildung 33: **Zeitlicher Verlauf der HE-Färbungen der besiedelten 300 µm-Scaffolds**

Die Abbildung zeigt den HE-Färbungsverlauf der besiedelten 300 µm-Scaffold-Schnitte der dritten Probe in der Woche 1 (1), 3 (2), 5 (3) und 10 (4). Non-WF-Scaffolds sind mit (A) und WF-Scaffolds mit (B) markiert. Die Aufnahmen wurden unter 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Aufnahme (C) zeigt den 300 µm-non-WF-

*Scaffold aus Woche 10 in hundertfacher Vergrößerung. Aufnahme (D) zeigt den 300 µm-WF-Scaffold aus Woche 10 in hundertfacher Vergrößerung.*

Bei der Auswertung aller HE-gefärbten Schnitte ergab sich der Eindruck, dass insbesondere die Schnitte der zeitlich fortgeschrittenen Scaffolds in der zehnten Woche den besten Nachweis einer flächigen zellulären Besiedelung im Sinne von dicht ausgefüllten *Scaffolds* aufwiesen. Deshalb werden hier in Abbildung 34 Schnitte aus Woche 10 vergleichend dargestellt. Insgesamt werden drei repräsentative Proben gezeigt. In den korrespondierenden gefärbten Schnitten zeigte sich, dass in jeder Aufnahme der WF-Scaffolds mehr gefärbtes Material vorhanden war. In den Aufnahmen der non-WF-Scaffolds war dagegen weniger zelluläre Besiedelung auf der PLA-Struktur sichtbar. Der *Scaffold* hat sich in einigen Aufnahmen vom Objektträger gelöst und Lücken hinterlassen. Trotzdem ließen sich Rückschlüsse auf den Füllungszustand der *Scaffolds* ziehen. In den Aufnahmen der Probe 1 (Abb. 34 A1) zeigte sich eine durchgehende Besiedelung des non-WF-Scaffolds. Im Vergleich zu den korrespondierenden Aufnahmen des WF-Scaffolds von Probe 1 (Abb. 34 B1) war jedoch eine sichtbar schwächere Anfärbung zu erkennen.



**Abbildung 34: Woche 10 der HE-Färbungen der besiedelten 300 µm-Scaffolds**

*Die Abbildung zeigt die HE-Färbungen der besiedelten 300 µm-Scaffold-Schnitte dreier Proben in Woche 10. Dargestellt sind die Proben 1 (1), 2 (2) und 3 (3). WF-Scaffolds (B) sind den non-WF-Scaffolds (A) gegenübergestellt. Die Bilder wurden unter 40-facher Vergrößerung aufgenommen.*

#### **4.9 Klassifizierung der besiedelten *Scaffolds* anhand der Zelldichte nach Safranin-O-Lichtgrün-Färbung**

Nach der Kultivierung über eine, drei, fünf und zehn Wochen wurden die besiedelten *Scaffolds* fixiert, geschnitten und mit Safranin-O-Lichtgrün gefärbt. Die Schnitte wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop analysiert und fotografiert. Dabei traten die gleichen technischen Schwierigkeiten wie bei den HE-Färbungen auf (siehe oben). Aufgrund der technischen Schwierigkeiten waren die Ergebnisse der Schnitte und Färbungen ebenfalls inhomogen. Für manche besiedelte *Scaffolds* gab es kaum und wenn, dann schlecht interpretierbare Bilder, während andere sehr viele und qualitativ gut verwertbare Schnittbilder aufwiesen. Bei der Durchsicht der Bilder und der HE-Färbung wurde festgestellt, dass die WF-*Scaffolds* tendenziell am meisten Zellen und EZM aufwiesen. Eine Quantifizierung erwies sich jedoch als schwierig. Daher wurde jedes Bild wie oben beschrieben auf einer Likert-Skala von 1 (vereinzelt Zellen/EZM sichtbar), 2 (einzelne Zellverbände/EZM sichtbar), 3 (konfluierende Zellverbände/EZM sichtbar) bis 4 (homogene Besiedlung der *Scaffolds* mit Zellen und EZM) klassifiziert. Das Verfahren zur Bestimmung des Gesamtklassifizierungswerts entsprach dem Verfahren, das bei der HE-Färbung angewendet wurde (siehe oben). Die Mediane der Gesamtklassifizierungswerte werden in Abbildung 35 graphisch dargestellt. Die Gruppen ohne und mit WF werden zu den Zeitpunkten Woche 1, 3, 5 und 10 verglichen.

Auch bei der Färbung und Analyse der Safranin-O-Lichtgrün-Schnitte beschränkten sich diese aus denselben Gründen wie bei den HE-Schnitten auf repräsentative Schnitte und Aufnahmen. Da die zellulären Besiedlungsmuster von *Scaffolds* verschiedener Gitterabstände bereits im Rahmen der HE-Färbung hinlänglich evaluiert wurden, konzentrierten sich die Safranin-O-Lichtgrün-Schnitte zur besseren Vergleichbarkeit lediglich auf besiedelte *Scaffolds* mit einem Gitterabstand von 300  $\mu\text{m}$ . Der Fokus lag auf den Wochen 5 und 10, da hier die höchste Zellbesiedlung und am meisten EZM sowie die größten Unterschiede zwischen den Gruppen ohne und mit WF erwartet wurden. Allerdings wurde als repräsentative Stichprobe für eine Probe auch die Woche 1 und 3 der besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* sowie alle Wochen der besiedelten 200  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* und die Woche 10 der besiedelten 100  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* geschnitten und gefärbt. Für verschiedene Größen von besiedelten *Scaffolds* ergaben sich so unterschiedliche Stichprobengrößen. Es zeigten sich auch bei dieser Färbe- und Analyseverfahren der besiedelten *Scaffolds* Trends über alle drei *Scaffold*-Größen. Die Einzelwerte oder Mediane der Gesamtklassifizierungswerte der WF-*Scaffolds* waren bis auf Woche 10 der besiedelten 200  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* stets größer als die Einzelwerte oder Mediane der non-WF-*Scaffolds*. Dies entspricht den Ergebnissen der HE-

Färbungen, die an identischen besiedelten *Scaffolds* durchgeführt wurden. Zwischen Woche 1 und Woche 5 konnte in jeder besiedelten *Scaffold*-Größe eine stetige Zunahme der Gesamtklassifizierungswerte festgestellt werden. Zwischen Woche 5 und Woche 10 war es jedoch schwierig, eine eindeutige Tendenz zu identifizieren. Unterschiede in den verschiedenen Gitterabständen der *Scaffolds* schienen nicht klar erkennbar zu sein. Es ist zu beachten, dass nur Woche 10 der besiedelten *Scaffolds* mit einer Größe von 100  $\mu\text{m}$  untersucht wurde. Es zeigte sich in Woche 5 der besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe ohne und mit WF (*Mann-Whitney-Test*,  $p=0,0159$ ). Ansonsten wurde zu keinem anderen Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ohne und mit WF festgestellt. Wie bei der HE-Färbung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der einzelnen Gruppen gefunden werden, wobei aufgrund der geringen Stichprobenzahlen nur die besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* (*Kruskal-Wallis-Test*) ausgewertet werden konnten.

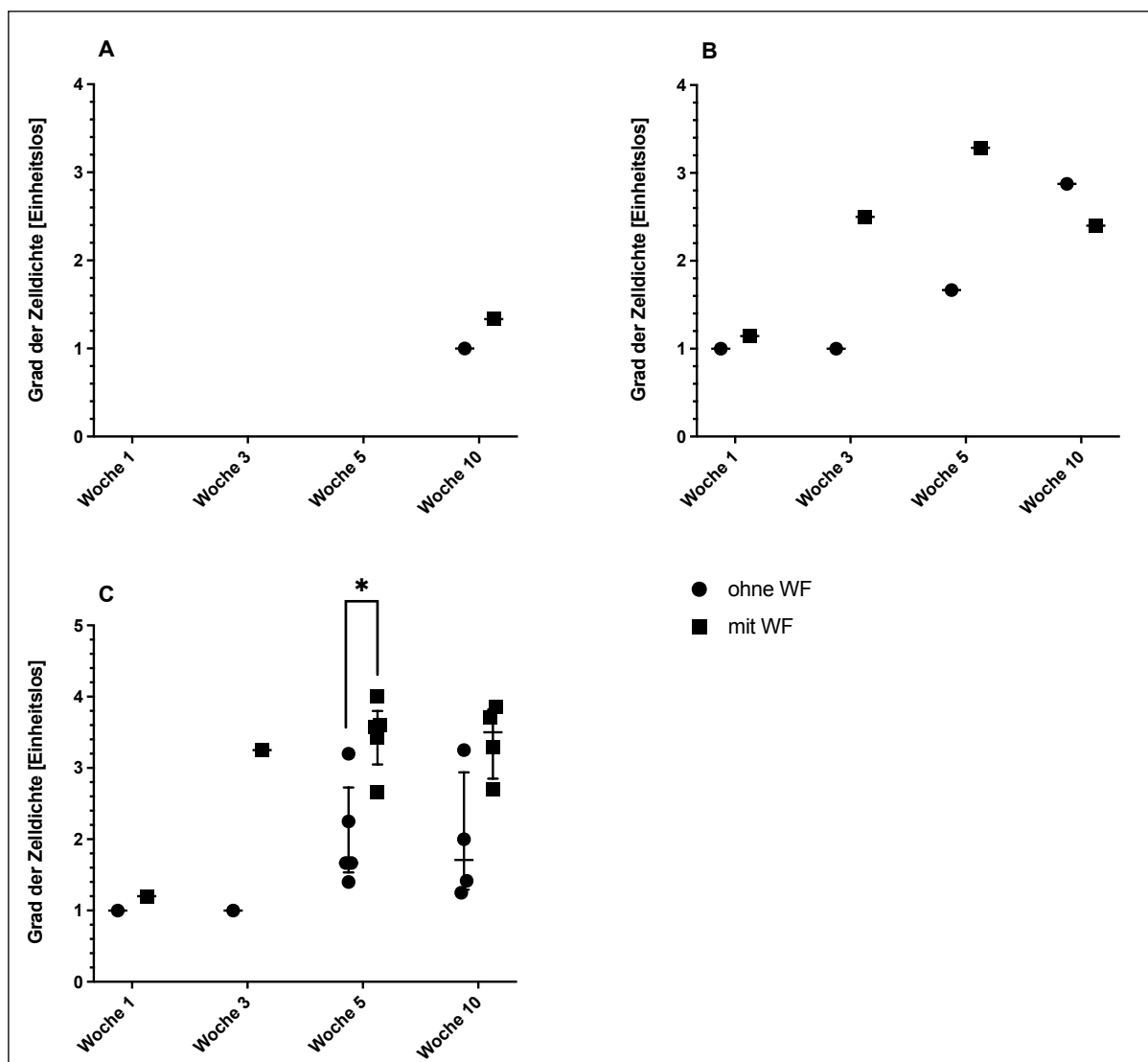
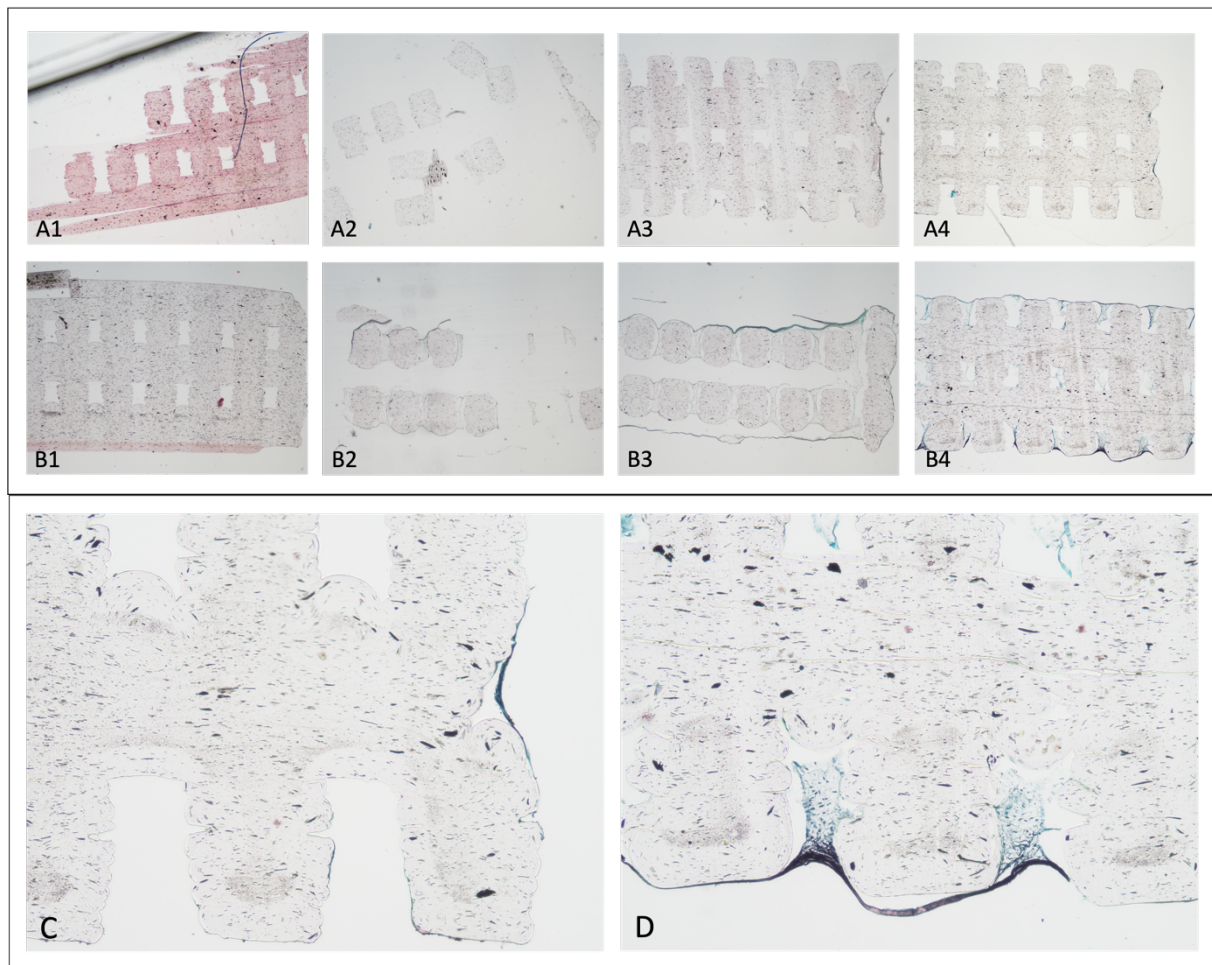


Abbildung 35: **Klassifizierung der besiedelten Scaffolds anhand der Zelldichte nach Safranin-O-Lichtgrün-Färbung**

Die Abbildung zeigt die Einzelwerte oder Mediane mit Interquartilsabständen der Gesamtklassifizierungswerte der Safranin-O-Lichtgrün-gefärbten Schnitte der besiedelten Scaffolds. (A) zeigt die besiedelten 100 µm Scaffolds, (B) zeigt die besiedelten 200 µm Scaffolds und (C) zeigt die besiedelten 300 µm Scaffolds. Es wurden zu den Zeitpunkten Woche 1, 3, 5 und 10 jeweils die non-WF- und WF-Scaffolds verglichen. Die Stichprobenanzahl beträgt für die besiedelten 100 µm-Scaffolds und die besiedelten 200 µm-Scaffolds jeweils N=1 und für Woche 1–5 der besiedelten 100 µm-Scaffolds N=0. Für die besiedelten 300 µm-Scaffolds beträgt N=1 für die Woche 1 bis Woche 3, in Woche 5 beträgt N=5 und in Woche 10 beträgt N=4. Statistische Testung mit dem Mann-Whitney-Test zwischen den Gruppen, statistische Testung mit dem Kruskal-Wallis-Test zwischen den Zeitpunkten innerhalb der Gruppen (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Zur qualitativen Darstellung der Ergebnisse werden in Abbildung 36 ausgewählte repräsentative Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen von besiedelten 300 µm-Scaffolds dargestellt. Die Bilder zeigen den zeitlichen Verlauf der dritten Probe ohne und mit WF-Einfluss. Alle Bilder stammen von derselben Probe. Der alleinige Unterschied bei der

Behandlung der Zellen in der Expansion und Besiedlung der *Scaffolds* lag in der Zugabe von WF zum Zellkulturmedium. Bei den non-WF-*Scaffolds* in Woche 1 (Abb. 36 A1) sowie in Woche 3 (Abb. 36 A2) ließ sich kaum gefärbtes Material beobachten. Nur in der fünften Woche (Abb. 36 A3) erkannte man hyaline Matrix auf der Oberfläche des besiedelten *Scaffolds*. Jedoch schien diese die Zwischenräume des besiedelten *Scaffolds* nicht auszufüllen. In Woche 10 (Abb. 36 A4) war mehr hyaline Matrix im Inneren des besiedelten *Scaffolds* zu erkennen, zusätzlich zeigten sich die bereits in Woche 5 imponierenden oberflächlichen Auflagerungen auf dem besiedelten *Scaffold*. Dies ließ sich besonders gut in der Aufnahme in höherer Vergrößerung erkennen (Abb. 36 C). Bei den WF-*Scaffolds* nahm die Menge grün gefärbter Areale von Woche 1 (Abb. 36 B1) bis Woche 5 (Abb. 36 B3) kontinuierlich zu und war im Vergleich zu den non-WF-*Scaffolds* zu jedem untersuchten Zeitpunkt deutlich größer in Menge und Intensität. In Woche 3 (Abb. 36 B2) löste sich der Scaffold vom Objektträger, jedoch haftete die EZM samt Zellen auf dem Objektträger. Die Lücken ließen jedoch darauf schließen, dass der Scaffold dicht besiedelt gewesen sein musste. Der WF-*Scaffold* in Woche 10 (Abb. 36 B4 und D) zeigte eine fast homogene Grünfärbung in den Zwischenräumen, was auf eine sehr dichte Besiedlung mit Chondrozyten und hohen Gehalt an Kollagenfasern in der EZM hindeutete. Der WF-*Scaffold*, hier dargestellt in Abbildung 36 D, zeigt eine rötlich Färbung im unteren Bereich des Bildes, welche das erhöhte Vorkommen von GAG anzeigt.



**Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf der Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen besiedelter 300 µm-Scaffolds**

Die Abbildung zeigt den Verlauf der Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen der besiedelten 300-µm-Scaffolds der dritten Probe in den Wochen 1 (1), 3 (2), 5 (3) und 10 (4). Dabei sind (A) die non-WF-Scaffolds und (B) die WF-Scaffolds. Es sollte beachtet werden, dass das PLA des non-WF-Scaffolds in Woche 1 eine ungewöhnliche Rotfärbung aufweist, die nicht dem Färbeverhalten der anderen Scaffolds entspricht, obwohl das Material der Scaffolds identisch ist. Die Bilder wurden unter 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Aufnahme (C) zeigt den 300 µm-non-WF-Scaffold aus Woche 10 in hundertfacher Vergrößerung. Aufnahme (D) zeigt den 300 µm-WF-Scaffold aus Woche 10 in hundertfacher Vergrößerung.

Auch bei der Auswertung aller mit Safranin-O-Lichtgrün gefärbten Schnitte ergab sich der Eindruck, dass vor allem die Schnitte der zeitlich fortgeschrittenen besiedelten Scaffolds in Woche 10 den Nachweis dicht ausgefüllter Scaffolds erbrachten. Es wurden vier repräsentative Proben in Woche 10 geschnitten und gefärbt. Um den Besiedlungszustand jeder Probe zu zeigen, wurde eine repräsentative Aufnahme ausgewählt und vergleichend in Abbildung 37 dargestellt. In den korrespondierenden gefärbten Schnitten ist zu sehen, dass in jedem Schnitt mehr gefärbtes Material in der mit WF behandelten Gruppe vorhanden war. In den Aufnahmen der zweiten (Abb. 37 A2), dritten (Abb. 37 A3) und vierten Probe (Abb. 37 A4) war sogar kaum gefärbtes Material vorhanden. In den Aufnahmen der WF-Scaffolds der

ersten (Abb. 37 B1), zweiten (Abb. 37 B2) und dritten Probe (Abb. 37 B4) zeigte sich das Grün der Färbung, welches das Zytoplasma von Chondrozyten und Kollagen in der EZM anzeigt, intensiver als in den Aufnahmen der non-WF-Scaffolds. Eine orange/rote Anfärbung, welche GAG anzeigt, zeigte sich in den Randbereichen des WF-Scaffolds der zweiten Probe (Abb. 37 B2 und 36 D) und bei dem WF-Scaffold der vierten Probe (Abb. 37 B4). In einigen Aufnahmen hatte sich der Scaffold vom Objektträger gelöst und Lücken hinterlassen. Dennoch ließen sich Rückschlüsse auf den Grad der matrizellulären Durchbauung der Scaffolds ziehen. In der Aufnahme von Probe 1 (Abb. 37 A1) war eine durchgehende Besiedlung des Scaffolds auch ohne WF-Einfluss feststellbar. Allerdings war im Vergleich zu der entsprechenden Aufnahme von Probe 1 mit WF-Einfluss (Abb. 37 B1) zumindest eine schwächere Anfärbung erkennbar. Insgesamt kann zusammengefasst werden, dass sowohl hinsichtlich der Anfärbung der Zellen selbst (HE-Färbung) als auch in der Färbung der EZM (Safranin-O-Lichtgrün-Färbung) korrespondierende Flächen gefärbt wurden. Dieses Erkenntnis bestätigte die Trends der Klassifizierung der Färbeaufnahmen.

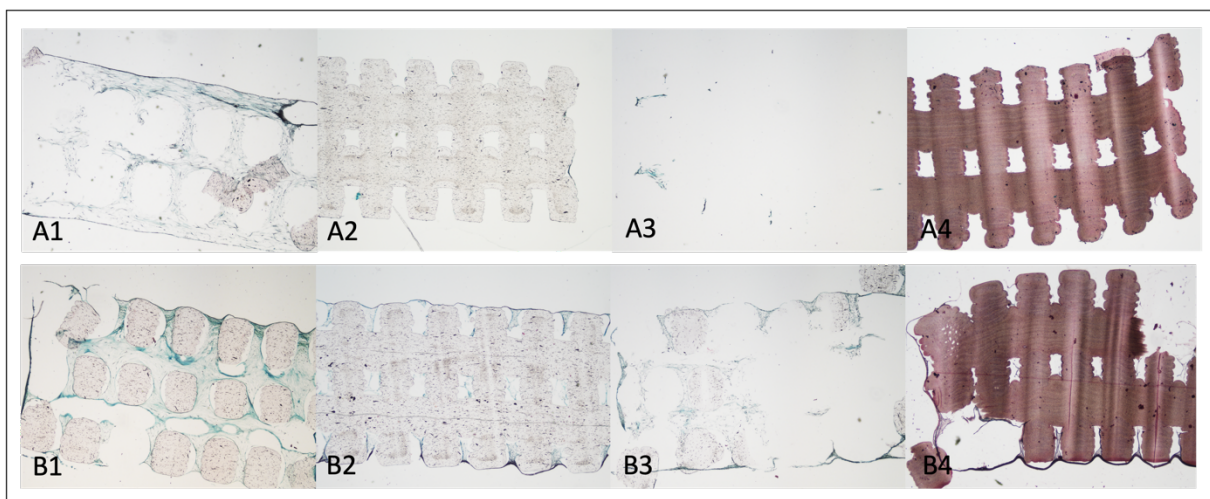


Abbildung 37: **Woche 10 der Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen besiedelter 300 µm-Scaffolds**

Die Abbildung zeigt Woche 10 der Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen der besiedelten 300 µm-Scaffolds-Schnitte von 4 Proben. Dabei ist Probe 1 (1), Probe 2 (2), Probe 3 (3) und Probe 4 (4). (A) entspricht den non-WF-Scaffolds und (B) den WF-Scaffolds. Es ist zu beachten, dass das PLA der Scaffolds von Probe 4 eine deutliche Rotfärbung aufweist, welche nicht identisch mit dem Färbeverhalten der anderen Scaffolds ist, obwohl das gleiche Material benutzt wurde. Die Bilder wurden in 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen Ausgangspunkt für das *Tissue-Engineering* von Septum-Knorpel zu etablieren. Hierbei wurde das Vorgehen in teilweise aufeinander aufbauende Themengebiete strukturiert. Zunächst sollte evaluiert werden, ob die In-Kulturnahme von septalen Chondrozyten in Primärkultur möglich ist. Anschließend sollten parallel die Wachstumsformen sowie das Synthese- und Proliferationsverhalten der Chondrozyten in 2D- und 3D-Kultur untersucht werden. Dabei wurde in beiden Kulturarten untersucht, ob die Zugabe einer Kombination aus WF *in vitro* eine dem nativen hyalinen Knorpel ähnlichere Differenzierung bewirkt. Zusätzlich sollte evaluiert werden, ob PLA als Adhäsions- und Stützsubstanz für das *Tissue-Engineering* von Knorpel geeignet und wenn ja, welche Mikrostruktur am geeignetsten für die zelluläre Besiedlung ist. Schlussendlich sollte mit der Beantwortung dieser Fragestellungen durch verschiedenste Analysemethoden grundsätzlich evaluiert werden, ob die Generierung artifizierender und individualisierter Knorpeltransplantate umsetzbar ist.

### 5.1 Primärkultur von septalen Chondrozyten

Die In-Kulturnahme der Chondrozyten war der erste Schritt der durchgeführten Versuche. Dabei war vorrangiges Ziel, die Sterilität der Proben zu gewährleisten und die Funktionalität der Kollagenase zum Verdau des Knorpels zu untersuchen. Dank eines Protokolls, das freundlicherweise von den Kooperationspartnern der AG [REDACTED] aus dem Zentrum für Unfallchirurgie und Orthopädie zur Verfügung gestellt wurde, gab es konkrete Angaben zur Konzentration und Menge der Enzymlösung für den Aufschluss der Knorpelprobe und die Zerkleinerung der Probe mit Skalpell. Diese Herangehensweise erwies sich als gut vom hyalinen Gelenkknorpel auf den hyalinen Nasenknorpel transferierbar. Jede einzelne, nicht primär verkeimte Probe konnte in die Zellkultur überführt werden. Von insgesamt 37 Knorpelproben konnten so letztlich bis auf fünf Proben alle in Kultur genommen werden. Diese geringe Kontaminationsrate wird von Fulco *et al.* für das Verfahren in gleicher Weise beschrieben.(29) Nasenknorpel wird in einem OP-Gebiet entnommen, in welchem die Sterilität vergleichsweise schlecht garantiert werden kann. Deshalb wurde nach einigen Proben beschlossen, das zum Transport verwendete PBS mit 1 % PS zu versetzen. Durch das PS sollten die Bakterien, die eventuell die Probe verunreinigten, abgetötet werden. Dadurch konnte die Kontaminationsrate weiter reduziert werden.

Wie die Ergebnisse zum prozentualen Zuwachs pro Tag in den Zellkulturen zeigten, können die Zellen erfolgreich in Kultur genommen und expandiert werden. Um zu überprüfen, ob tatsächlich Chondrozyten und nicht Fibroblasten in den Zellkulturen wuchsen, wurden zu

Beginn der Kultivierung Deckgläser besiedelt und diese immunhistochemisch mit Kollagen-II-Antikörpern gefärbt. Dabei zeigte jede Probe zu Beginn Kollagen-II positive Zellen, unabhängig von der Zugabe von WF in das Kulturmedium.

Die Ergebnisse zum prozentualen Zuwachs pro Tag zeigten für beide Gruppen eine signifikante Abnahme der Proliferationsraten. Die Zellen stellen also unabhängig von der Verwendung von WF in der 2D-Kultur über die Zeit ihre Proliferation immer mehr ein. Die Durchlicht-mikroskopischen Bilder in Abbildung 17 und 18 zeigen die Veränderung des mikroskopischen Phänotyps der Zellen, was in der Literatur als De-Differenzierung beschrieben wird.(36) Die Ergebnisse der 2D-Zellkulturen passen zu diesen in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen.(36, 59, 61) Die Kollagen-II-Positivität der Deckgläser ohne WF nahm von Passage zu Passage ab und auch die Form der Chondrozyten veränderte sich über die Zeit von sphärisch zu Fibroblasten-ähnlich.

Durch die Verwendung der WF in der 2D-Zellkultur veränderte sich der Verlauf dieser De-Differenzierung. Die Zellen behielten ihren sphärischen Phänotyp länger als die Zellen ohne WF bei und bei einer Probe begannen die Zellen nach 3 Passagen wieder Kollagen-II-positives Material zu exprimieren. Dies konnte in zwei weiteren Proben nicht reproduziert werden, was gewisse Fragen offen lässt. Die Zellen schienen in Bezug auf das Exprimieren Kollagen-II-positiven Materials probenabhängig nicht immer identische Reaktionen auf die WF zu zeigen, obwohl sie zunächst alle ein verändertes Wachstumsmuster in Form der Zellinseln oder Bälkchen zeigten und ihre sphärische Form länger beibehielten. Das Alter der Knorpelspender (56) oder noch unbekannte Faktoren könnten für die sehr heterogenen Wachstumsmuster verantwortlich sein. Allerdings sind diese Daten der Probenspender, festgelegt im korrespondierenden Ethikvotum („Rekonstruktion von Gewebsdefekten im Kopf-Hals-Bereich mittels 3D-gedruckter Zell-Biomaterial-Implantate“, Antragsnummer 2023-17203\_1), aus Datenschutzgründen nicht bekannt. Somit lassen sich hinsichtlich des Einflusses dieser Faktoren letztlich keine Erkenntnisse generieren.

Doch schlussendlich zeigten beide Gruppen, ohne und mit WF, zum Ende des etwa 12 bis 13 Wochen umfassenden Kultivierungszeitraums in der 2D-Zellkultur ein ähnliches Ergebnis. Die Wachstumsraten glichen sich auf niedrigem Niveau an, die Zellmorphologie wurde in beiden Gruppen Fibroblasten-ähnlich und die Zellen zeigten in beiden Gruppen ein Wachstumsmuster in Form paralleler Zellstränge. Da das Exprimieren des Kollagen-II-positiven Zellmaterials nur einmalig und auch nur bis zur Woche 5 nachgewiesen werden konnte (Abb. 19), wird dies als Ausnahme eingeordnet. Letztlich könnten die sehr artifiziellen und unphysiologischen Kulturbedingungen in der zweidimensionalen Kultivierung von

Chondrozyten für die De-Differenzierung hauptverantwortlich sein. Dies wird für Chondrozyten ebenfalls von Berthiaume *et al.* und Mukaida *et al.* beschrieben.(36, 72) Auch für andere Zellarten wie Astrozyten wird die zweidimensionale Form der Kultivierung als Hauptursache für eine De-Differenzierung von nativen Zellen gewertet.(122) Aufgrund der Aufnahmen, welche in Woche 10 ein dichteres Wachstum bei den Zellen unter WF-Einfluss zeigten, und dem prozentualen Zuwachs pro Tag in Zellkultur, welcher zum Ende der Kultivierung bei den Zellen mit WF-Einfluss höher war als bei jenen ohne, kann vermutet werden, dass die WF in der 2D-Kultur die De-Differenzierung verzögern, aber letztlich nicht verhindern. Eventuell würde eine noch längere Kultivierungsdauer ein noch vollständigeres Angleichen in Phänotyp und Proliferationsrate der beiden Gruppen zeigen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Kultivierung im *Monolayer* sowohl ohne als auch mit den hier verwendeten WF zur De-Differenzierung der Chondrozyten führt. Dieser Limitation kultureller Expansion sollte im weiteren Verlauf durch die Kultivierung der Chondrozyten auf den dreidimensionalen PLA-*Scaffolds* Rechnung getragen werden.

## 5.2 Produktion der PLA-Scaffolds

Um den Chondrozyten eine möglichst förderliche Umgebung zur Proliferation und Beibehaltung ihrer Differenzierung zu bieten, wurde als nächster Schritt ein geeigneter *Scaffold* für die dreidimensionale Kultivierung geschaffen. Dabei war einerseits erwünscht, mit möglichst einfachen und kostengünstigen Mitteln diese *Scaffolds* zu produzieren. Andererseits sollte auch ein Material verwendet werden, welches schon in der Medizin bekannt und zugelassen ist. Ferner sollte ein Material zum Einsatz kommen, welches die strukturelle Integrität des Implantates gewährleisten kann. In Kombination dieser Maximen wurde der etablierte 3D-Drucker von Ultimaker und PLA als Drucksubstanz verwendet. PLA ist einer der am häufigsten verwendeten Kunststoffe im 3D-Druck (96) und zusätzlich im menschlichen Körper abbaubar (116). Zusätzlich ist es bereits von der amerikanischen Zulassungsbehörde *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen und wird im Gesundheitswesen eingesetzt.(109) Bei der Erstellung der Modelle mittels CAD ergaben sich einige Schwierigkeiten. Das Hauptproblem war die Einstellung der geeigneten Drucktemperaturen. Diese wurden angepasst, um die Druckbarkeit und Auflösung der CAD-generierten Modelle nicht zu beeinträchtigen. Dabei erwies sich das Drucken der *Scaffolds* mit dem Gitterabstand von 100 µm am schwierigsten, da dieser Abstand bei zu hohen Drucktemperaturen nicht gewährleistet werden konnte. Das erhitzte PLA wurde zu flüssig und die Gitter verschmolzen miteinander, weshalb die Drucktemperatur auf 200 °C erniedrigt wurde. Um den Prozess des Druckens vieler PLA-*Scaffolds* parallel zu ermöglichen, wurde ein geeignetes Modell dafür erstellt. Jedoch zeigte sich während des Druckens, dass dieses Vorgehen zu Druckfehlern führte, die den Abbruch des gesamten Drucks erzwangen.

Deshalb wurde jeder *Scaffold* einzeln gedruckt, was jedoch mit erheblichem zeitlichem Mehraufwand verbunden war und sicher einen Ansatzpunkt zu einem ökonomischeren Zeit-Management der *Scaffold*-Produktion darstellt.

Ein weiteres Hindernis stellte auch die Sterilisation der PLA-*Scaffolds* dar. Der erste Versuch, die PLA-*Scaffolds* im Autoklaven zu sterilisieren, misslang, da sich sowohl die *Scaffolds* als auch die zur Aufbewahrung der *Scaffolds* dienenden Zellkulturplatten im Autoklaven bei Temperatur und Druck verformten und nicht mehr zu benutzen waren. Deshalb wurden die *Scaffolds* mittels hundertprozentigem Alkohol und der Trocknung bei 64 °C sterilisiert, was ohne Formveränderung ausgezeichnet gelang. Kein einziger *Scaffold* zeigte im Verlauf der Versuche eine bakterielle Kontamination.

Ansonsten war nach Überwindung dieser Hindernisse die Produktion der PLA-*Scaffolds*, wie in der Literatur beschrieben (119), ausreichend effizient und die PLA-*Scaffolds* in Form und Struktur homogen und reproduzierbar. Dies zeigte sich durch eine ausgeprägte Strukturhomogenität sämtlicher in Durchlicht- und Fluoreszenz-mikroskopischen Analysen dargestellten *Scaffolds* über den gesamten Versuchszeitraum. Die Porengröße war exakt einstellbar, was von Bajaj et al. (94) als Voraussetzung für *Tissue-Engineering* genannt wird.

### **5.3 Evaluation des Wachstums der Chondrozyten auf PLA-Scaffolds**

Die Kultivierung der Chondrozyten auf den PLA-*Scaffolds* sollte einerseits die Qualität der *Scaffolds* als strukturgebendes Stützgerüst evaluieren. Ferner sollte festgestellt werden, ob Chondrozyten in einer dreidimensionalen Kultur ihre ursprüngliche Differenzierung beibehalten. Neben der Verwendung des *Scaffolds* als Kulturgerüst sollte dies mithilfe der verwendeten WF erreicht werden. In der Literatur wird die dreidimensionale Kultivierung von Zellen als wichtige Voraussetzung für die Beibehaltung der Differenzierung genannt.(120-123) Um die Entwicklung der besiedelten *Scaffolds* zu verfolgen, wurden verschiedene Analysemethoden kombiniert. Einerseits die quantitative Auswertung des organischen Inhalts der besiedelten *Scaffolds* mittels Zellzählung und der Bestimmung der Proteinkonzentration sowie der Evaluation der Stoffwechselaktivität mit dem *AlamarBlue-Assay*. Andererseits die qualitative Auswertung der besiedelten *Scaffolds* durch Färbung der *Scaffold*-Oberfläche mittels Fluoreszenz-Vitalfärbungen und Färbungen der *Scaffold*-Schnitte mittels Safranin-O-Lichtgrün- und HE-Färbungen.

### 5.3.1 Zellzählung der besiedelten *Scaffolds* mit TE

Das Verfahren zur Ermittlung von Zellzahlen mittels Neubauer-Zählkammer ist Standard für zweidimensionale Zellkulturen. Es erschien naheliegend, dieses bewährte Verfahren auf die dreidimensionale Zellkultur zu übertragen. In der Literatur fanden sich keine ähnlichen Versuche, die Zellzahlen in *Tissue-Engineering*-Versuchen mittels Ablösen mit TE und Neubauer-Zählkammer zu bestimmen. Die Ermittlung der Zellzahlen auf den besiedelten *Scaffolds* erwies sich zu Beginn als schwierig, da besonders zu den frühen Zeitpunkten nur sehr wenige Zellen abzulösen waren. Die nach der Zentrifugation des *Scaffold*-Inhaltes vorhandenen Zellpellets waren mikroskopisch klein, im Eppendorfgefäß kaum sichtbar und beim Entfernen des Überstands sehr fragil. Mit diesen Zellpellets musste mit großer Vorsicht umgegangen werden. Auch stellte sich die Frage, wie lange und in welcher Konzentration das TE auf die besiedelten *Scaffolds* einwirken sollte, um alle Zellen zu lösen und ohne diese zu stark zu beschädigen. In der 3D-Kultur und mit WF wurde ein stärkerer Zell-EZM-Verbund als in der 2D-Kultur erwartet. Deshalb wurde die Konzentration des TE verdoppelt und die Einwirkzeit von drei Minuten auf 15 Minuten verlängert. Zusätzlich wurden alle fünf Minuten die besiedelten *Scaffolds* für 10 s geschüttelt, um die Angriffsfläche des TE zu vergrößern. Dadurch ergaben sich Probleme. In der Neubauer-Zählkammer zeigte sich, dass ein bis zu 50 % umfassender Anteil der Zellen durch diese Prozedur starb. Da in der 2D-Zellkultur der Anteil der toten Zellen im Neubauer-Verfahren sehr gering war und PLA ein biokompatibles Material ist, ist davon auszugehen, dass dieser hohe Anteil toter Zellen direkt durch die modifizierte Prozedur des enzymatischen Verdau und dem Herauslösen aus dem *Scaffold* entsteht und nicht durch die Kultivierung auf den besiedelten *Scaffolds* bedingt ist. Ebenfalls problematisch war die sehr geringe Anzahl an Zellen auf den besiedelten *Scaffolds*, da die nötigen Volumina zum Re-Suspendieren der Zellen im Vergleich zur Zellzählung von Zellen aus 2D-Zellkulturen überaus gering waren. Zu Vereinheitlichung wurde ein Volumen von 100 µl gewählt. Dadurch erniedrigte sich bei mehreren aufeinanderfolgenden Pipettier-Schritten die Präzision dieses Volumens. Zudem war die Konzentration der Zellen immer noch so gering, dass in der Neubauer-Zählkammer nur sehr wenige Zellen gezählt werden konnten, was die Präzision der ermittelten Zellzahlen potenziell beeinflusste.

All dieser Einschränkungen im Verfahren der Zellzahlbestimmung zum Trotz zeigten die Ergebnisse in mehreren Proben reproduzierbar und Gruppen-unabhängig eine Zunahme der Zellzahlen auf den besiedelten *Scaffolds*. Dies spricht für eine mit der Zeit zunehmende Besiedlung der *Scaffolds*. Außerdem zeigten die WF-*Scaffolds* konsistent höhere Zellzahlen als die non-WF-*Scaffolds*. Diese beiden Erkenntnisse werden durch die Durchlichtmikroskopischen Aufnahmen der besiedelten *Scaffolds* (Abb. 28) bestätigt. Diese zeigte

auch die deutlich stärkere Vermehrung der Zellen auf den WF-*Scaffolds* über die Zeit. Es stellt sich die Frage, ob dieses Ergebnis ausschließlich auf die verwendeten WF zurückzuführen ist oder ob die dreidimensionale Kultivierung an sich schon eine Auswirkung auf das Proliferationsverhalten hat. Für den positiven Einfluss der dreidimensionalen Kultivierung spricht, dass die Zellzahlen auf den WF-*Scaffolds* schon in Woche 1 höher waren als die Zellzahlen auf den non-WF-*Scaffolds*. Im Gegensatz wiesen in der 2D-Zellkultur die mit WF kultivierten Zellen in den ersten Passagen noch geringere Proliferationsraten auf als die ohne WF kultivierten Zellen. Gleichwohl zeigten die höheren Zellzahlen der WF-*Scaffolds* im direkten Vergleich mit den non-WF-*Scaffolds* den letztlich wahrscheinlich deutlich höheren Einfluss der WF auf die Proliferationsaktivität. Das bekräftigen auch die Ergebnisse der Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen nach der Ablösung mit TE (Abb. 26). Diese zeigten, dass auf den WF-*Scaffolds* mehr Zellen und EZM verblieben waren. Dies spricht für den starken Einfluss der WF, da nach Betrachtung dieser Ergebnisse die Interpretation der Zellzahlen nicht als absolut zu werten ist. Durch die Besiedlung unter WF-Einfluss ist auf den *Scaffolds* eine noch deutlich höhere Zellzahl vorhanden.

Diese Ergebnisse lassen einige Fragen offen. Bedeutet eine höhere Proliferationsrate der Zellen auf den WF-*Scaffolds*, dass diese Zellen eher der Differenzierung von Chondrozyten entsprechen? In der Literatur werden ausdifferenzierte Chondrozyten als Zellteilung-inaktiv beschrieben (33). Auf diese Ergebnisse übertragen, könnte man aufgrund dieser höheren Proliferationsraten also eine stärkere De-Differenzierung vermuten. Andererseits stellt sich die Frage, ob der Besiedlungsprozess der *Scaffolds* mit der Chondrogenese verglichen werden kann und eventuell andere Parameter in Bezug auf die Proliferationsraten der Chondrozyten anzuwenden sind.

Abschließend muss festgehalten werden, dass für die Klärung dieser Sachverhalte deutlich höhere Stichprobenzahlen vonnöten sind, um der o. g. Heterogenität des Proben-immanenten Proliferationsverhaltens Rechnung zu tragen.

### **5.3.2 Bestimmung des Proteingehalts der besiedelten *Scaffolds***

Als weiterer Parameter zur Beurteilung des Besiedlungsprozess der *Scaffolds* wurde der Proteingehalt der besiedelten *Scaffolds* bestimmt. Im Gegensatz zur Proliferationsrate lässt der Proteingehalt der besiedelten *Scaffolds* Rückschlüsse auf die Syntheseleistung der Chondrozyten zu. Für die Funktion von Knorpel als Stütz- und Strukturgewebe ist der Gehalt an Proteinen, wie Kollagen und PG, entscheidend.(33) Daher wurde der Proteingehalt der besiedelten *Scaffolds* mit einem Proteinkonzentrations-Assay bestimmt. Der organische Inhalt der besiedelten *Scaffolds* wurde möglichst vollständig vom *Scaffold* getrennt. Dabei

ergaben sich ähnliche Probleme wie bei der Bestimmung der Zellzahlen mit TE. Deshalb wurde nahezu identisch vorgegangen und die besiedelten *Scaffolds* in der 15-minütigen Lyse-Zeit alle fünf Minuten für zehn Sekunden geschüttelt, um den organischen Inhalt aus den *Scaffolds* zu lösen und die Angriffsfläche für den Lyse-Puffer zu vergrößern. Da es hierbei irrelevant war, lebende Zellen zu schonen, wurden die besiedelten *Scaffolds* mit höherer Intensität mittels Vortex-Schüttler gemischt. Dieses Verfahren wurde in dieser Form bislang nicht in der Literatur beschrieben. Daher gab es zum Zeitpunkt der Versuche keine Literaturreferenz, die Anhaltspunkte geben konnte, wie lang es dauern würde, um den gesamten organischen Inhalt aus den besiedelten *Scaffolds* zu lösen. Deshalb wurden die ehemals besiedelten *Scaffolds* der ersten Probe im Anschluss nochmals lysiert, um den verbliebenen Proteingehalt der *Scaffolds* zu bestimmen. Dabei stellte sich heraus, dass zumindest zu den frühen Zeitpunkten der Besiedlung nur marginale Reste auf den *Scaffolds* verblieben waren. Deshalb wurde der Ablauf über 15 Minuten beibehalten.

Die Ergebnisse der Proteingehaltsbestimmungen zeigten, dass die verwendete Kombination aus WF zu einer vermehrten Proteinsynthese der Chondrozyten führte, da die WF-*Scaffolds* durchgehend einen höheren Proteingehalt aufwiesen als die korrespondierenden non-WF-*Scaffolds*. Außerdem zeigten die Ergebnisse, dass der Proteingehalt auf den besiedelten *Scaffolds* in beiden Gruppen über die Zeit sukzessive zunahm. Dabei gab es von Woche 5 zur Woche 10 keine Zunahme mehr. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass der *Scaffold* nach 5 Wochen schon komplett ausgefüllt war. Daher konnte aufgrund der homogenen Besiedelung kein organisches Material mehr dazukommen. Eine andere Erklärung ist, dass aufgrund der Stabilität des Zell-Matrix-Verbundes die 15-minütige Lyse nicht mehr herauslösen konnte als in Woche 5. Eine zweite Lyse könnte, wie für die frühen Zeitpunkte geschehen, darüber Aufschluss geben. Um korrespondierend zur Lyse mit TE eine Aussage über die verbliebene Zell- und Protein-Masse auf den *Scaffolds* treffen zu können, wurden direkt im Anschluss an die Proteinbestimmung die ehemals besiedelten *Scaffolds* mit DAPI gefärbt (Abb. 24). Diese Färbungen zeigten trotz 15-minütiger Lyse unter Einfluss von WF eine mit der Besiedlungszeit zunehmende Menge an residualem DAPI-positivem Material auf den *Scaffolds*. Da DAPI die DNS in den Zellkernen anfärbt, können daraus nur beschränkte Rückschlüsse auf den Verbleib von Proteinen auf den ehemals besiedelten *Scaffolds* gezogen werden. Dennoch ist recht eindrücklich, dass sich auf den non-WF-*Scaffolds* nur noch marginale DAPI-positive Reste befanden. Die Behandlung mit Lyse-Puffer war nach dem Einfluss von WF während der Besiedlung augenscheinlich nicht in der Lage, den Zell-Matrix-Verbund suffizient aufzulösen. Die für zwei unabhängige Proben wiederholten Färb- und Messergebnisse suggerieren daher, dass ohne WF-Einfluss ein Zell-Matrix-Verbund vorliegt, welcher durch Lyse-Puffer deutlich einfacher zu trennen ist. Hinsichtlich des

Proteingehalts kann geschlossen werden, dass der Unterschied zu den Zeitpunkten Woche 5 und Woche 10 wohl noch größer war als in dieser Form der Proteingehaltsbestimmung messbar ist. Der Effekt der WF auf die Proteinsynthese ist vermutlich stärker als der rein aus den quantitativen Ergebnissen ableitbare Effekt. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den Ergebnissen nach Bestimmung der Zellzahl mittels TE-Lyse der *Scaffolds*. Sie zeigen sehr eindrücklich, dass es durch die Kombination aus dreidimensionalen *Scaffolds* und WF-Einfluss gelingt, homogene Zell-EZM-*Scaffold*-Konstrukte zu erzeugen. Diese Konstrukte sind so stabil, dass es mit zwei verschiedenen Lyse-Methoden nicht möglich ist, den gesamten organischen Inhalt daraus zu lösen.

Eine Problematik dieses Assays ist mit Sicherheit, dass er nicht den Gehalt eines Knorpel-spezifischen Proteins wie Kollagen II (33) nachweisen kann. Die Messergebnisse geben die Gesamtmenge vorhandener Proteine an, aber differenzieren nicht zwischen verschiedenen Proteinen. Deshalb kann man nicht mit Sicherheit sagen, dass das synthetisierte Protein mit Knorpel-EZM gleichzusetzen ist. In der Literatur verwendete Färbungen wie Alcian-Blau- (145), Elastin-van-Giesson- (31) und Masson-Trichrom-Färbung (146) können spezifischere Aussagen über den Gehalt an PG und Kollagen machen, ebenso die Safranin-O-Lichtgrün-Färbung. Eine tatsächliche Quantifizierung der Proteinmenge mit den o. g. Methoden erwies sich allerdings in der 3D-Kultur als nicht suffizient praktikabel.

### 5.3.3 *AlamarBlue*-Assay der besiedelten *Scaffolds*

Um die Stoffwechselaktivität der Zellen auf den besiedelten *Scaffolds* zu messen, wurde wiederholt der *AlamarBlue*-Assay mit allen besiedelten *Scaffold*-Größen und in beiden Gruppen ohne und mit WF durchgeführt. Dabei zeigte sich Gruppen-unabhängig eine Zunahme der Stoffwechselaktivität. Dieses Ergebnis korrespondiert auf den ersten Blick mit den Ergebnissen der Proteingehalt- und Zellzahlbestimmung. Es zeigte sich, dass *Scaffold*-Größen-übergreifend zunächst die Zellen auf den non-WF-*Scaffolds* mehr *AlamarBlue*-Medium pro Zeit umsetzten. In Woche 10 hatten die WF-*Scaffolds* einen tendenziell höheren *AlamarBlue*-Umsatz. Es stellt sich also die Frage, wie die WF-abhängige Veränderung der Umsatzrate des *AlamarBlue*-Mediums über die Zeit zu interpretieren ist. In der Literatur wird der *Alamarblue*-Assay beschrieben, um durch den Umsatz des Mediums Rückschlüsse auf die Anzahl Stoffwechsel-aktiver und somit vitaler Zellen in einem bestimmten Volumen zu ziehen.(151) Der gemessene Extinktionswert ist also kein direkter Indikator für die Stoffwechselaktivität der Zellen, sondern muss unter Berücksichtigung der absoluten Anzahl an Zellen in dem Volumen als Indikator für eine relative Stoffwechselaktivität pro Zelle interpretiert werden, da der Umsatz des Mediums nicht nur von der Aktivität der einzelnen Zellen, sondern auch von der Gesamtzahl der Zellen abhängig ist.

Im Verhältnis zu den mit TE gemessenen Zellzahlen auf den besiedelten *Scaffolds* zeigte sich, dass die Zellen mit WF in Woche 3, 5 und 10 tendenziell eine niedrigere relative Stoffwechselaktivität pro Zelle hatten. Also scheinen die WF eine Differenzierung der Zellen zu bewirken, welche eine geringere relative Stoffwechselaktivität gemessen im *AlamarBlue*-Assay verursacht. Differenzierte Chondrozyten werden in der Literatur als weitestgehend Stoffwechsel-inaktiv beschrieben.(33) Eine Ursache dafür könnte also eine durch die WF verursachte Chondrozyten-ähnlichere Differenzierung sein. Diese Erkenntnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Proteingehaltsbestimmungen und Zellzahlbestimmungen der besiedelten *Scaffolds*, welche bei den WF-*Scaffolds* eine höhere Syntheseleistung und Proliferationsrate als bei den non-WF-*Scaffolds* zeigten. Es stellt sich die Frage, ob der Faktor „Umsatz von *AlamarBlue*-Medium“ ausreichend repräsentativ ist, um als Globalparameter für die Stoffwechselaktivität und Viabilität dieser Zellen zu dienen. Alternativ könnte dafür ebenso die Syntheseleistung von Proteinen oder die Proliferationsrate als Indikator dienen. In jedem Fall zeigten die Ergebnisse jedoch, dass WF einen nachweisbaren Einfluss auf den Umsatz von *AlamarBlue* durch die Chondrozyten ausüben.

Ein alternativer Erklärungsversuch ist, dass bei den Zellen ohne WF das *AlamarBlue*-Medium aufgrund der geringeren Dichte des extrazellulären Matrixverbundes umfangreicher an die einzelnen Zellen gelangt und deshalb auch vermehrt von diesen umgesetzt wird. Indikator für diese Theorie ist der im Vergleich erhöhte Proteingehalt unter Einfluss von WF, welcher vermutlich die Diffusion des *AlamarBlue*-Mediums an die Zellen erschwert und so den Umsatz des Mediums verlangsamt. Andererseits ist es auch vorstellbar, dass bei einer geringeren Zellzahl die Zellen mehr auf den *Scaffolds* verteilt sind. Somit wäre die zur Verfügung stehende Oberfläche an Zellen größer. Bei einer größeren Zellzahl könnten sich die Zellen gruppieren und damit eine geringere Oberfläche bieten. Auch eine Kombination dieser beiden Effekte ist vorstellbar. Die Ergebnisse der Färbungen der *Scaffold*-Schnitte zeigten bei den WF-*Scaffolds* tendenziell mehr und dichtere Zellen sowie mehr EZM zwischen diesen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Betrachtung des Einflusses der Gitterabstände der *Scaffolds*. Dabei zeigte sich für beide Gruppen die Tendenz, dass sich mit größerem Gitterabstand der besiedelten *Scaffolds* ein gesteigerter absoluter Umsatz des *AlamarBlue*-Mediums ergab. Da sich die ermittelten Zellzahlen der verschiedenen besiedelten *Scaffold*-Größen den Ergebnissen nach nicht eindeutig unterscheiden, stellt sich die Frage, wie der Einfluss des Gitterabstandes der *Scaffolds* auf den *AlamarBlue*-Assay zu interpretieren ist. PLA als hydrophobes Material (107, 108) könnte bei geringerem Abstand

der Gitter einen größeren Einfluss auf die Zirkulation des *AlamarBlue*-Mediums haben. So könnte dessen Verfügbarkeit und infolgedessen der Umsatz bei größerem Abstand der Gitter höher sein und dadurch eine höhere Stoffwechselaktivität suggerieren. Andererseits könnte ein größerer Gitterabstand in einer disseminierten Verteilung der Zellen resultieren, welche wiederum eine gesteigerte Umsetzung des *AlamarBlue*-Mediums ermöglichen könnte. Folgt man dieser Argumentation, sollte sich bei zunehmender Besiedlungsdichte zu den späteren Zeitpunkten der Umsatz auf den verschiedenen Scaffold-Größen angleichen, was er den Ergebnissen nach nicht tat.

Schlussendlich lässt sich festhalten, dass die mit dem *AlamarBlue*-Assay bestimmten Werte von einigen Parametern, wie der absoluten Zellzahl, der relativen Stoffwechselaktivität der Zellen und dem Gitterabstand der *Scaffolds*, in Abhängigkeit stehen. Weitere mögliche Einflussfaktoren sind der Gehalt an Protein bzw. EZM, was deren negative Korrelation erklären könnte. Als ein globaler Zellparameter lässt er letztlich Raum für verschiedene Interpretationen.

#### **5.3.4** DAPI- und *Rhodamine-6G*-Färbungen der besiedelten *Scaffolds*

Um die Besiedlung der *Scaffolds* mit Zellen zusätzlich zur Bestimmung der Zellzahl zu quantifizieren, wurden wiederholt Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen angefertigt. Konkret wurden besiedelte *Scaffolds* parallel mit DAPI und *Rhodamine-6G* gefärbt. DAPI färbt die DNS im Zellkern der Zellen und *Rhodamine-6G* färbt die Mitochondrien der Zellen. Die Färbungen zeigten, dass sich mit WF-Einfluss die Besiedlung der Oberfläche der *Scaffolds* schneller und dichter vollzog als bei den *Scaffolds* ohne WF-Einfluss. Auch die Quantifizierung dieser Aufnahmen als prozentualer gefärbter Oberflächenanteil bestätigt diesen sichtbaren Unterschied in der Besiedlungsdichte. Da die Aufnahmen im blau- (DAPI) und orangen-fluoreszenten (*Rhodamine-6G*) Spektrum jeweils von denselben besiedelten *Scaffolds* gemacht wurden, war davon auszugehen, dass die Färbungen das gleiche Ergebnis erbringen würden. Dies zeigte sich auch in Aufnahmen der *Scaffolds*, in welchen die Aufnahmekanäle im blau-fluoreszenten und im orangen-fluoreszenten Fester kombiniert wurden. Jedoch waren aufgrund einer deutlich niedrigeren Hintergrundfluoreszenz die DAPI-Färbungen wesentlich besser abzugrenzen. Die DAPI-gefärbten Zellkerne konnten in den Aufnahmen einzeln ausgemacht werden und ermöglichten so die direkte Verifizierung des Vorhandenseins von Zellen. Bei *Rhodamine-6G*-Färbung dagegen zeigte sich lediglich eine diffuse orangefarbene Fläche mit regelhafter Überstrahlung, weshalb die Färbeergebnisse unspezifischer erschienen. Deshalb wurde im weiteren Verlauf auf die *Rhodamine-6G*-Färbung verzichtet.

Was bei den Ergebnissen dieser Färbungen diskutiert werden kann, ist die mögliche Aussagekraft über die Besiedlung des Inneren der *Scaffolds*. Da mit dem Fluoreszenzmikroskop nur Aufsicht-Aufnahmen gemacht wurden und der PLA-*Scaffold* nicht transparent war, konnte man nur die oberflächliche Besiedlung direkt nachweisen. Die Aufnahmen ermöglichten nur einen begrenzten Einblick auf die tiefere Besiedlung. Zu den Zeitpunkten Woche 1 und Woche 3 fiel auf, dass die Besiedlung der *Scaffolds* ausgehend von einer Seite geschah. Es zeigte sich eine besiedelte und eine weitestgehend unbesiedelte Seite. Um dies zu bestätigen, wurden von jedem besiedelten *Scaffold* jeweils von beiden Seiten Aufnahmen gemacht und die dichter besiedelte Seite in die Auswertung aufgenommen. Es ist aufgrund dieser Erkenntnis zu vermuten, dass die Besiedlung der *Scaffolds* ausgehend vom Zellrasen in den *Wells* geschieht und der Einfluss der primären Besiedlung in Tropfenform als gering anzusehen ist. Es war während des Versuch-Ablaufes nicht möglich zu gewährleisten, dass sich die besiedelten *Scaffolds* immer in der gleichen Orientierung im *Well* befanden, da sich diese beim Wechseln des Medium leicht drehen. Deshalb wurde die dichter besiedelte Seite als „Oberseite“ definiert. Die Besiedlung der *Scaffolds* erfolgt also nicht disseminiert durch konfluierende Zellinseln, sondern sehr wahrscheinlich ausgehend von einer Seite mit einem einzelnen, wachsenden Zellrasen. Daraus kann abgeleitet werden, dass sich Chondrozyten bei der Besiedlung von *Scaffolds* dreidimensional im zellulären Verbund ausbreiten. Ebenfalls interessant erscheint, dass zu den Zeitpunkten Woche 5 und Woche 10 diese „Oberseite“ nicht mehr eindeutig auszumachen war. Dafür scheinen zwei Erklärungen plausibel: Einerseits könnte durch mehrmaliges versehentliches Wenden der *Scaffolds* die Besiedlung nun über beide Seiten erfolgt sein. Andererseits wäre auch vorstellbar, dass sich die Besiedlung zu diesen Zeitpunkten durch den *Scaffold* hindurch auf die Gegenseite ausgebreitet haben könnte.

### 5.3.5 HE-Färbungen der *Scaffold*-Schnitte

Während DAPI- und *Rhodamine-6G*-Färbungen die zelluläre Besiedlung der Oberfläche zuverlässig anzeigten, sind Aussagen über die zelluläre Besiedlung im Inneren ebenso wie die Differenzierung des Zellverbundes letztlich nicht eindeutig daraus abzuleiten. Daher wurden die besiedelten *Scaffolds* zu spezifischen Zeitpunkten, anschließend an die zelluläre Besiedlung und Fluoreszenzmikroskopie, fixiert und histologisch gefärbt. Dieser Fixierungs- und Färbeprozess erwies sich, wie im Ergebnisteil ausführlich dargelegt, als ausgesprochen anspruchsvoll. Aus diesen Erfahrungen heraus wurde ein modifiziertes Färbeverfahren entwickelt, bei welchem die Schnitte unter Zugabe der Einzelsubstanzen in Tropfenform liegend gefärbt wurden. So konnte ein Wegschwemmen der Schnitte verhindert werden. Dies erwies sich in ca. 50 % der Fälle als praktikabel. Dennoch war aufgrund des ausgesprochen anspruchsvollen Färbeprotokolls mit sehr heterogenen Ergebnissen zu

rechnen, was sich negativ auf die direkte Vergleichbarkeit auswirkte. Da eine quantitative Analyse sich als nicht praktikabel erwies, wurden die Schnitte der besiedelten *Scaffolds* verblindet auf einer 4-Punkt-Likert-Skala qualitativ anhand ihrer Besiedlungsdichte eingeordnet.

Diese Färbungen geschahen zunächst mit der HE-Färbung, da diese eine etablierte Standardfärbung des färbenden Labors ist. Die Ergebnisse dieser Färbungen zeigten sowohl visuell qualitativ als auch kategorisiert quantitativ, dass sich die Besiedlung der *Scaffolds* nicht nur, wie mit den Fluoreszenzfärbungen gezeigt, über die Oberfläche der *Scaffolds* erstreckte, sondern im zeitlichen Verlauf auch das Innere der Implantate durchbaute. Außerdem zeigten sie, dass sich mehr Zellen im Inneren der WF-*Scaffolds* befanden, woraus sich schließen lässt, dass die verwendeten WF zu einer verstärkten und dichteren zellulären Besiedlung der *Scaffolds* führen. Zusätzlich zeigten sie, dass es schon nach fünf Wochen Besiedlung zu einer nahezu homogenen Verteilung der Zellen im Inneren der *Scaffolds* kam. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit den Ergebnissen von Fulco *et al.* vergleichen, welche auch mit den verwendeten WF erzielt wurden.(29) Weiterhin ergänzen diese Ergebnisse die Ergebnisse der Zellzählung und Fluoreszenzmikroskopie.

### 5.3.6 Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen der *Scaffold*-Schnitte

Um neben der zellulären Besiedelung auch weiterführende Aussagen über die EZM- und die PG-Synthese treffen zu können, wurde eine Knorpel-spezifische Safranin-O-Lichtgrün-Färbung der *Scaffold*-Schnitte ergänzt. Diese ist geeignet, um in Paraffin-fixiertem Knorpel sowohl die Chondrozyten als auch die EZM Knorpel-spezifisch darzustellen.(146) In der Literatur, wie bei Fulco *et al.* (29), wird diese Färbung verwendet, um mit *Tissue-Engineering* erzeugten Knorpel zu färben und den Gehalt an GAG nachzuweisen. Analog zu den Erkenntnissen der HE-Färbungen konnte auch in der Safranin-O-Lichtgrün-Färbung eine mit der Zeit zunehmende, über den gesamten Implantat-Körper ausgedehnte, zelluläre Besiedelung identifiziert werden. Dabei zeigte sich unter WF-Einfluss die zelluläre Besiedelung intensiviert. Die Safranin-O-Lichtgrün-Färbung erlaubt zudem eine Aussage über den GAG- und Kollagen-Gehalt der EZM. Der Großteil des Inhaltes der besiedelten *Scaffolds*, dabei besonders derer der WF-*Scaffolds*, war grünlich gefärbt. Dies spricht in der Safranin-O-Lichtgrün-Färbung neben der Färbung des Zytoplasma für eine vermehrte Anreicherung von Kollagen.(146, 152) In Proben unter WF Einfluss zeigten einige Bereiche des Implantates zudem isolierte rötlich/orangen angefärbte Bereiche, was für die Anreicherung von GAG in der EZM spricht.(146) Die Synthese der GAG ist diesen Ergebnissen nach dem Einfluss der WF zuzurechnen.

Zusammenfassend zeigte eine Analyse der gefärbten Schnittbilder eine homogenere und dichtere Besiedlung der *Scaffolds* mit Chondrozyten und Kollagen unter WF-Einfluss und eine geringe, aber exklusive Produktion von GAG bei den WF-*Scaffolds*. Dabei war der Gehalt an GAG in den hier besiedelten *Scaffolds* visuell geringer als bei Fulco *et al.* Dennoch war auch bei den Ergebnissen von Fulco *et al.* der Gehalt an GAG nicht in jeder untersuchten Probe identisch. Manche zeigten sehr viel und konzentriert angehäuftes GAG-positives Material in den Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen, andere zeigten dagegen kaum GAG-positives Material.(29) Es stellt sich die Frage, ob aufgrund von einer inhomogenen Verteilung der GAG im Implantat eventuell andere Schnittebenen der *Scaffolds* einen höheren Gehalt an GAG zeigen könnten.

## **5.4 Zusammenfassung der Auswirkungen von Wachstumsfaktoren**

### **5.4.1 Auswirkungen in der 2D-Kultur**

Die Zugabe von WF zur 2D-Zellkultur veränderte den Verlauf der De-Differenzierung der Zellen. Die Zellen hielten ihren ursprünglichen sphärischen Phänotyp länger bei und in einer Probe exprimierten sie nach drei Passagen wieder Kollagen-II-positives Material. Dieser Effekt war zwischen verschiedenen Proben nicht einheitlich, was möglicherweise auf das Alter der Knorpelspender oder noch unbekannte Faktoren zurückzuführen ist. Weiterhin zeigten die Zellen mit WF zunächst eine geringere Proliferationsrate in der Zellkultur als die Zellen ohne WF, was sich nach Passage 4 umzukehren schien. Trotz vorübergehender Effekte zeigten beide Gruppen, mit und ohne WF, gegen Ende des Kultivierungszeitraums ähnliche Ergebnisse in der 2D-Zellkultur: niedrige Wachstumsraten, Fibroblasten-ähnliche Zellmorphologie und ein homogenes Wachstumsmuster. Dies passt zu den in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen von Abbott *et al.*, die ebenfalls eine Veränderung der Chondrozyten-Morphologie im *Monolayer* zu einer Fibroblasten-ähnlichen Morphologie beobachteten.(61)

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass WF den Prozess der De-Differenzierung in der 2D-Kultur verlangsamen, aber nicht vollständig aufhalten können. Eine längere Kultivierung könnte möglicherweise weitere Unterschiede zwischen den Gruppen aufzeigen. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Kultur im *Monolayer*, sowohl mit als auch ohne WF, zu einer De-Differenzierung der Chondrozyten führt.

### **5.4.2 Auswirkungen in der 3D-Kultur**

Die Zellzahl- und die Proteingehaltsbestimmung in der 3D-Kultur zeigten, dass der WF-Einfluss in höheren Zellzahlen und höheren Proteingehalten resultierte. Die WF führten zu

einer Zunahme von Zellzahlen und auch des Proteingehaltes definitiv bis zur Woche 5. Zur Woche 10 schien es keinen deutlichen Zuwachs mehr zu geben. Dies kann zum einen mit einer limitierten Oberfläche der *Scaffolds*, zum anderen mit einer insuffizienten Lyse aufgrund einer zunehmenden Integrität des Zell-EZM Verbundes in Verbindung gebracht werden.

Der *Alamarblue*-Assay zeigte, dass der WF-Einfluss zu einem langsameren Umsatz des *AlamarBlue*-Mediums durch die Zellen führte. Dabei spielte der Parameter der absoluten Zellzahl auf den *Scaffolds* eine Rolle, welcher in den durchgeführten Untersuchungen gewichtet wurde. Die Ergebnisse scheinen auf den ersten Blick nicht direkt zu den Ergebnissen der Proteinsynthese zu passen. Eine mögliche Erklärung könnte eine Verlangsamung des Umsatzes des *AlamarBlue*-Mediums aufgrund vermehrter und dichterere EZM um die Zellen und ebenso ein reduzierter Zellstoffwechsel durch verstärkte Differenzierung bei den WF-*Scaffolds* sein.

Die DAPI- und *Rhodamine-6G*-Färbungen ergaben weitgehend übereinstimmende Ergebnisse. Über die Zeit nahm die Oberflächenbesiedelung in beiden Gruppen sukzessive zu. Mit WF kam es im Vergleich zu einer schnelleren und dichteren Besiedlung der *Scaffold*-Oberfläche. Färbungen mit HE zeigten eine zunehmende Besiedlung über die Zeit. Ferner verdeutlichten sie die Auswirkung der WF dahin gehend, dass sich mehr Zellen im Inneren der WF-*Scaffolds* befanden. Die Knorpel-spezifischen Färbungen der Schnitte mit Safranin-O-Lichtgrün verdeutlichten hinsichtlich der zellulären Besiedlung homologe Ergebnisse zur HE-Färbung. Zusätzlich konnten diese Färbungen einen unter WF-Einfluss intensivierten Kollagengehalt sowie disseminierte Ansammlungen von GAG innerhalb der *Scaffolds* zeigen.

In der Zusammenschau der verschiedenen Verfahren zeigen die WF in der 3D-Kultur folgende Auswirkungen: Eine schnellere Zunahme und insgesamt höhere Zellzahl, einen höheren Proteingehalt und einen im *AlamarBlue*-Assay gemessenen langsameren Umsatz des *AlamarBlue*-Mediums, woraus sich auf einen langsameren Zellmetabolismus schließen lässt. Zusätzlich kam es zu einer schnelleren und dichteren Besiedlung der *Scaffold*-Oberfläche und einer dichteren Besiedlung des *Scaffold*-Innenraums mit Zellen. Außerdem erhöhten sie die Kollagen- und GAG-Synthese im Inneren der dicht zellulär durchbauten *Scaffolds*.

## 5.5 PLA-Scaffolds – Evaluation als Stützsubstanz und der Mikrostruktur

Die Anforderungen an *Scaffolds* für das *Tissue-Engineering* werden in der Literatur wie folgt beschrieben: Sie bieten Möglichkeit zur Zellanheftung und Migration, Speicherung und Präsentation von WF. Zusätzlich bieten sie eine poröse Umgebung für eine ausreichende Diffusion von Sauerstoff, Nährstoffen, exprimierten Produkten und Abfallprodukten sowie mechanische Steifigkeit oder Flexibilität.(36) In Anbetracht der Ergebnisse der durchgeführten Versuche konnten viele dieser Anforderungen durch die verwendeten *Scaffolds* erfüllt werden. Die verschiedenen Färbungen, insbesondere die im zeitlichen Verlauf aufgenommene DAPI-Vitalfärbung, lassen darauf schließen, dass die expandierten Chondrozyten sich nicht nur an den *Scaffolds* anheften können, sondern auch durch diese hindurch migrieren und sich auf diesen vermehren können. Dies bestätigten auch die nach Ablösung von den *Scaffolds* mit TE bestimmten Zellzahlen. Die Integration von WF direkt in die *Scaffolds* ist theoretisch auch bei der Herstellung möglich, was durch langsame, gleichmäßigere Freisetzung eine zweckdienlich verbesserte Pharmakokinetik fördern kann.(35) Allerdings sind gerade proteinbasierte WF durch hohe Temperaturen einem hohen Risiko der Denaturierung und dem Funktionsverlust ausgesetzt.(153) Aus diesem Grund und aus Gründen der Praktikabilität wurden während der Versuche die WF mit dem Medium an die Zellen gegeben und nicht im PLA der *Scaffolds* integriert.

Die publizierten Abbaueiträume für PLA sind in der Literatur als sehr lang beschrieben. Auch in den hier durchgeführten Versuchen konnte im zeitlichen Verlauf kein visuell erkennbarer Abbau der *Scaffolds* beobachtet werden. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Ergebnissen von Russo *et al.* (116) überein, der einen Abbau von subkutanen PLA-Fäden frühestens nach 2 Jahren im menschlichen Körper beobachtete. Die langsame Resorptionszeit kann dahin gehend als Vorteil erachtet werden, dass für den Gewebeumbau eine lange Zeit zur Verfügung steht und in der Zeit der Integration die Stabilität des Implantates gewährleistet ist.(42) Daten zur PLA-Resorption sind hauptsächlich für Nahtmaterial in gut durchbluteten Gewebekompartimenten publiziert. Wie lange der Abbau in einem bradytrophen Milieu wie dem Nasen-Septum dauert, kann daher letztlich nicht zweifelsfrei abgeleitet werden. Die Porosität der *Scaffolds* kann, wie schon erwähnt, mit dem 3D-Druckverfahren gewährleistet werden. Dies wird in der Literatur als Voraussetzung gesehen, um die Zufuhr von Nährstoffen als auch die Abfuhr von Abfallprodukten aus dem Scaffold zu gewährleisten.(36, 94, 95) Als messbarer Parameter, der als Indikator für diese Vorgänge gelten kann, ist die nachgewiesene Zellviabilität im Inneren der besiedelten *Scaffolds* heranzuziehen. Dabei konnte unter WF-Einfluss in der HE-Färbung ein Wachstum von Zellen und in der Safranin-O-Lichtgrün-Färbung die Synthese von hyaliner Matrix im Inneren der *Scaffolds* nachgewiesen werden. Die anderen Parameter, wie die Ergebnisse

des *AlamarBlue*-Assays, der Zellzahlbestimmung und der Bestimmung der Proteinkonzentration, konnten dies nicht mit endgültiger Sicherheit nachweisen, da sie unter anderem eine zellfreie Zone im Inneren der besiedelten *Scaffolds* nicht abgebildet hätten. Die in der Literatur geforderte mechanische Stabilität und Flexibilität sind nicht Teil der im Rahmen dieser Dissertation abgebildeten Untersuchungen. Jedoch konnten, wie beschrieben, visuell keine Verluste an der *Scaffold*-Substanz über die Versuchsdauer beobachtet werden.

Um zu evaluieren, welche Porengröße, genauer gesagt welcher Gitterabstand, am geeignetsten für das Kultivieren der Chondrozyten ist, wurden in den Ergebnissen die Werte der verschiedenen *Scaffold*-Größen vergleichend dargestellt. Dies geschah nur für die Analysemethoden, bei denen sich sichtbare Tendenzen und auch in der statistischen Testung signifikante Unterschiede zeigten. Dies war der Fall für den *AlamarBlue*-Assay und die quantitative Auswertung der DAPI-gefärbten Flächenanteile. Mit dem *AlamarBlue*-Assay konnte gezeigt werden, dass die Stoffwechselaktivität/Zellviabilität der besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* höher war als die der besiedelten 200  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* und diese höher als die der besiedelten 100  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds*. Diese Ergebnisse waren konsistent über die beiden Gruppen ohne und mit WF nachweisbar. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Gitterabstand in den 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* die Differenzierung der Chondrozyten in Richtung einer höheren Stoffwechselaktivität/Zellviabilität fördert. Andererseits könnte dies auch eine Ursache darin haben, dass durch die größere Porengröße die Austauschfläche zwischen *AlamarBlue*-Medium und Zellen größer dementsprechend auch der Umsatz des *AlamarBlue*-Mediums höher ist. Gegen diese Einschätzung spricht lediglich, dass auch in Woche 5 und Woche 10 der Besiedlung die 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* die höchsten Werte aufwiesen, obwohl man in den Schnittfärbungen eine homogene Besiedlung der *Scaffolds* erkennen konnte. Die DAPI- und *Rhodamine-6G*-Färbungen zeigten in der Auswertung in großer Übereinstimmung bei den 200  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* zu jedem Zeitpunkt die größte besiedelte Fläche. Danach folgten die 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* und darauf mit größerem Abstand die 100  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds*. Dies lässt darauf schließen, dass zumindest für die oberflächliche Besiedlung der *Scaffolds* die 200  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* am geeignetsten sind. Um Erkenntnisse über die Besiedlung im Inneren der *Scaffolds* zu bekommen, sind die Daten der HE- und Safranin-O-Lichtgrün-Schnittfärbungen am relevantesten. Aufgrund der Heterogenität der Bilder wurde versucht, die Bilder über o. g. Klassifizierungsmethode zu quantifizieren. Hier zeigte sich aber keine klare Tendenz, welche *Scaffolds* im Inneren die dichteste Besiedlung aufwiesen. In der HE-Färbung schienen die 100  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* die niedrigste Besiedlung aufzuweisen. Zwischen den besiedelten 200  $\mu\text{m}$ - und 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* waren keine eindeutigen Tendenzen erkennbar und auch die statistische Testung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Scaffold*-Größen.

Die Ergebnisse legen also nahe, dass die optimale Porengröße für die Kultivierung von Chondrozyten im Bereich zwischen 200  $\mu\text{m}$  und 300  $\mu\text{m}$  liegt. Dies passt zu den in der Literatur beschriebenen Daten zum *Tissue-Engineering* von Knochen. Hier wird von Karageorgiou *et al.* eine optimale Porengröße von 300 bis 350  $\mu\text{m}$  angegeben.(99) In der Literatur wird auch die Frage nach der Dicke von Kultursystemen in Bezug auf Beschränkungen des Stofftransports gestellt.(36, 72) Die drei verschiedenen *Scaffold*-Größen unterschieden sich in den Außenmaßen nur hinsichtlich der 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds*, diese hatten, bedingt durch den vergrößerten Abstand der Streben, eine Dicke von 1,5 mm im Vergleich zu 1 mm der anderen beiden *Scaffold*-Größen. Die Ergebnisse zeigten keinen Unterschied in diesen beiden *Scaffold*-Dicken. Also scheint die Dicke von 1,5 mm die Transportkapazität innerhalb solcher *Scaffolds* nicht auszureizen.

Um für zukünftige Versuche und perspektivisch für den klinischen Einsatz Patienten-individualisierte *Scaffolds* drucken zu können, wurde dies exemplarisch für eine Septum-Perforation eines Patienten gezeigt. Dabei konnte der klinisch gewonnene *Scan* einer Septum-Perforation in ein passendes 3D-Modell translatiert werden, welches dieselben Gitterabstände und dieselbe Dicke wie die zuvor verwendeten 300  $\mu\text{m}$ -Modelle hatte. In drei Druckversuchen konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, diese CAD-generierten Modelle mit dem Ultimaker 2+ homogen und reproduzierbar zu drucken.

## 5.6 Besiedlungsdauer der Scaffolds

Der Kultivierungs-Zeitraum teilte sich in eine zwei bis drei Wochen umfassende Expansion der Chondrozyten in der 2D-Zellkultur und eine zehn Wochen umfassenden Besiedlung der PLA-*Scaffolds* auf. Der Besiedlungszeitraum umfasste bei der ersten Probe nur fünf Wochen. Bei den folgenden Proben wurde er verdoppelt, um etwaige langfristige Entwicklungen auf den *Scaffolds* evaluieren zu können. In der Auswertung der Ergebnisse zeigten sich Gruppen-unabhängig nur geringe Unterschiede zwischen den fünf und zehn Wochen besiedelten *Scaffolds*. In der Bestimmung des Proteingehalts und der Zellzahl auf den besiedelten *Scaffolds* zeigte weder die Gruppe ohne noch die Gruppe mit WF eine klare Tendenz zur exponentiellen Zunahme. Der Proteingehalt der besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* nahm in beiden Gruppen nur minimal zu und auf den 200  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* schien der Proteingehalt sogar tendenziell abzunehmen. Die Zellzahl auf den besiedelten 200  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* zeigte ebenfalls in beiden Gruppen eine leichte Abnahmetendenz. Die besiedelten 300  $\mu\text{m}$ -*Scaffolds* zeigten in der Gruppe ohne WF eine leichte Zunahme und in der Gruppe mit WF eine leichte Abnahme der Zellzahl. Die Zunahme der Zellzahlen war im Vergleich zur Zunahme zwischen Woche 1 und Woche 5 nur marginal. In der einmaligen wöchentlichen

Bestimmung der Zellzahlen auf den besiedelten 200 µm-*Scaffolds* zeigte sich in beiden Gruppen schon zwischen Woche 4 und Woche 5 eine leichte Abnahme der Zellzahlen. Auch bei den Ergebnissen der prozentualen Oberflächenbesiedlung, ermittelt mit der DAPI- und *Rhodamine-6G*-Färbung, zeigten sich über beide Gruppen und alle Größen nur eine leichte Zunahmetendenz zwischen Woche 5 und Woche 10. Davon wichen die Flächenzunahme der 200 µm-non-WF-*Scaffolds* in der DAPI-Färbung ab, welche eine Abnahmetendenz zeigten. Die Zunahmetendenzen waren ebenfalls wie bei den Proteingehalt- und Zellzahlbestimmungen nicht der zusätzlichen verstrichenen Zeit entsprechend. Ebenso verhielt es sich mit den Ergebnissen der HE- und Safranin-O-Lichtgrün-gefärbten Schnitte. Es zeigte sich, wenn nur eine geringe, nicht longitudinale und nicht exponentielle Zunahme. Daraus kann kein einheitliches Muster über die beiden Gruppen betreffend Zu- oder Abnahmetendenzen abgeleitet werden. Auch bei der Bestimmung der Stoffwechselaktivität/Zellviabilität mit dem *AlamarBlue*-Assay zeigten sich keine der zusätzlichen Kultivierungsdauer entsprechenden Zunahmetendenzen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Kultivierung der besiedelten *Scaffolds* über mehr als fünf Wochen *in vitro* keinen signifikanten Effekt auf den Besiedlungsgrad der *Scaffolds* zur Folge hat. Auch in der gesichteten Literatur wird bei Rosenzweig *et al.* nach einer drei Wochen umfassenden Besiedlungsdauer und bei Fulco *et al.* nach einer vier Wochen umfassenden Besiedlungsdauer eine dichte Besiedlung der *Scaffold*-Strukturen mit Chondrozyten und EZM beschrieben.(29, 96) Fulco *et al.* konnten nachweisen, dass die erzeugten Transplantate nach dem vier Wochen umfassenden Besiedlungszeitraum auch klinisch mit gutem Ergebnis eingesetzt werden konnten.(29) Demnach scheint es für zukünftige Versuche nicht sinnvoll eine 5 Wochen übersteigende Besiedlungsdauer einzuplanen. Auch aus Gründen der klinischen Praktikabilität scheint eine tendenziell kürzere Besiedlungsdauer wünschenswert, da die längere Kultivierung die Wahrscheinlichkeit einer bakteriellen Kontamination und die Kosten der Transplantate vermutlich erhöhen würde.

## 5.7 Ausblick

Diese Arbeit zeigt, dass PLA-*Scaffolds* unter Verwendung einer Kombination aus WF in einem fünfwöchigen Zeitraum mit zuvor expandierten autologen Chondrozyten suffizient besiedelt werden können, sodass sich eine dicht mit EZM und Zellen durchbaute Einheit mit dem PLA-*Scaffold* bildet. Zudem zeigt sie, dass es möglich ist, von einer Septum-Perforation ausgehend einen Patienten-individuellen *Scaffold* mit dem 3D-Drucker zu drucken. Langfristige Perspektive dieses Forschungsprojektes ist nun, die Ergebnisse der Studie hin zur Translation im Sinne eines perspektivischen Einsatzes am Patienten weiterzuentwickeln. Zunächst soll untersucht werden, ob die gewonnenen Erkenntnisse direkt auf größere, Patienten-individuelle *Scaffolds* umsetzbar sind und wo die Grenzen in Form und Größe der

*Scaffolds* für eine klinisch praktikable Besiedlung liegen. Es zeigte sich, dass aus wenigen 100 mg an Septum-Knorpel genügend Zellen expandiert werden können, um damit über 40 *Scaffolds* zu besiedeln. Auf klinischer Seite muss daher eine Möglichkeit geschaffen werden, mit möglichst geringer Invasivität eine kleine Knorpelprobe vom Patienten zu gewinnen. Dabei sollten die geringe Entnahmemenge und die Entnahmetechnik nicht zu den Nebenwirkungen der heute üblichen Knorpelentnahmetechniken an Rippen oder Ohren führen. Denkbar wäre etwa, die Probe in Lokalanästhesie in einem chirurgischen Eingriff an einem strukturell irrelevanten Anteil der Nasenscheidewand zu extrahieren. Außerdem könnten etablierte Entnahmestellen für autologen Knorpel wie Rippen- und Ohrknorpel auch für den minimalinvasiven Gewinn autologer Knorpelzellen genutzt werden. Durch kulturelle Expansion wird die zu gewinnende Zellzahl und der korrespondierende Hebedefekt im Vergleich zur Entnahme großer Knorpelanteile deutlich reduziert. In diesem Kontext wäre es etwa vorstellbar, den Knorpel mittels einer Stanzbiopsie zu gewinnen. Ferner zeigte sich, dass auch eine Differenzierung von Stammzellen hin zu Chondrozyten umsetzbar ist (154-160). Durch Differenzierung pluripotenter Zellen aus Fett (160), Knochenmark (155) oder sogar Urin (156, 157, 161) kann man Chondrozyten mit minimalem oder sogar ganz ohne Hebedefekt für die Besiedlung der *Scaffolds* einsetzen. Als weiteren Schritt kann man zukünftig auch komplexere 3D-Druckverfahren wie das *3D-Bioplotting* (162) anwenden. Dadurch wird ermöglicht, Chondrozyten und WF gemeinsam und früher in die Implantate einzubringen, um die Zeit der De-Differenzierung zu verkürzen und eine homogenere Besiedlung zu gewährleisten. Durch die homogenere Besiedlung der *Scaffolds* wäre auch eine schnellere Durchbauung der *Scaffolds* vorstellbar, was der Translation dieser Technik in die klinische Anwendung dienen dürfte.

## 6 Zusammenfassung

Knorpel ist integraler Bestandteil des Stützgerüsts der Nase.(1) Die Septum-Perforation, eine häufige Pathologie des knorpeligen Nasengerüsts, bezeichnet einen Defekt in der nasalen Mucosa und dem dahinterliegenden knorpeligen Septum. Dieser Zustand, oft durch vorherige Nasenoperationen verursacht, kann zu einer Beeinträchtigung der Nasenfunktionalität durch Veränderung des nasalen Luftflusses führen.(7-9) Diese Beeinträchtigung der Funktionalität kann zu erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität führen, beispielsweise durch wiederkehrende Nasennebenhöhlenentzündungen und Nasenbluten.(2)

Chirurgische Eingriffe zur Septum-Korrektur erfordern Modifikationen des Nasenknorpels und dabei oft Knorpeltransplantate, welche jedoch mit zusätzlicher Morbidität in Form eines sekundären Hebedefekts an der Entnahmestelle einhergehen können.(12, 23) Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines formstabilen Ersatzmaterials unter Verwendung von *Tissue-Engineering*-Strategien. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um ein Verfahren zur Generierung eines 3D-gedruckten, Patienten-individuellen autologen PLA-Knorpel-Transplantats zu entwickeln. Als Zellquelle wurde menschlicher Septum-Knorpel verwendet, der bei Septum-Plastiken in der HNO-Klinik der Universitätsmedizin Mainz anfiel. Für die Gerüststruktur wurde das biologisch abbaubare Biopolymer PLA verwendet, welches von einem 3D-Drucker individualisiert in Form gedruckt werden konnte. Der Fokus der Versuche lag auf der In-Kulturnahme der Chondrozyten, dem Vergleich der Wachstumsverhalten der Chondrozyten in 2D- und 3D-Kultur, der Untersuchung der Auswirkungen der WF IGF-1, TGF- $\beta$ , bFGF-2 und Ascorbat auf die Chondrozyten sowie dem Synthese- und Proliferationsverhalten der Chondrozyten auf den *Scaffolds* unter WF-Einfluss. So sollten die PLA-*Scaffolds* und deren Mikrostruktur als Adhäsions- und Stützsubstanz für artifizielle, individualisierte Knorpeltransplantate evaluiert werden.

Die Zugabe von WF führte zu einer Verlangsamung der De-Differenzierung der Chondrozyten in der 2D-Zellkultur. Die Zellen hielten ihren ursprünglichen sphärischen Phänotyp länger bei und in einer Probe exprimierten sie nach drei Passagen wieder Kollagen-II-positives Material. Ab der Hälfte des Kultivierungszeitraums zeigten die Zellen mit WF eine höhere Proliferationsrate als die Zellen ohne WF. Trotz vorübergehender Unterschiede zeigten beide Gruppen gegen Ende des Kultivierungszeitraums ähnliche Ergebnisse mit niedrigen Wachstumsraten und Fibroblasten-ähnlicher homogener Zellmorphologie.

Der Einsatz des etablierten 3D-Druckers Ultimaker 2+ mit dem von der FDA zugelassenen PLA als Drucksubstanz führte zu homogenen und reproduzierbare *Scaffolds* mit den Gitterabständen 100 µm, 200 µm und 300 µm. Die *Scaffolds* wurden mittels hundertprozentigem Alkohol sterilisiert, was ohne Formveränderung ausgezeichnet gelang. Kein einziger *Scaffold* zeigte eine mikrobiologische Kontamination. In der 3D-Kultur bewirkte die Zugabe von WF bei den *Scaffolds* eine Steigerung der Zellzahlen und Proteingehalte im Vergleich zu den non-WF-*Scaffolds*. Der *AlamarBlue*-Assay zeigte einen verlangsamten Zellstoffwechsel bei den Zellen der WF-*Scaffolds*. DAPI- und *Rhodamine-6G*-Färbungen zeigten unter WF-Einfluss eine schnellere und dichtere Zellbesiedelung der *Scaffold*-Oberfläche. HE-Färbungen zeigten eine schnellere und dichtere Zellbesiedelung des *Scaffold*-Inneren und Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen eine verstärkte Anreicherung von Kollagen und GAG bei Einsatz der WF. Die unter WF-Einfluss dicht zellulär durchbauten *Scaffolds* bildeten eine verschmolzene Einheit aus Zellen und PLA, sodass zwei unterschiedliche Lyse-Methoden diese Einheit nicht vollständig auflösen konnten.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die entwickelten *Scaffolds* die Anforderungen des *Tissue-Engineering* erfüllen, indem sie Zellanheftung, Migration und Proliferation ermöglichen. Mit dem *AlamarBlue*-Assay und den Fluoreszenzfärbungen konnte eine optimale Porengröße zwischen 200 µm und 300 µm identifiziert werden. In Kombination mit dem langsamen Abbau des PLA über die Versuchsdauer verdeutlicht dies die Eignung der *Scaffolds* für die Erzeugung Patienten-individueller, formstabiler autologer PLA-Knorpel-Transplantaten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass zwischen den fünf- und zehnwöchigen Besiedlungszeiträumen auf den PLA-*Scaffolds* nur geringfügige Unterschiede festzustellen waren. Proteingehalt, Zellzahl, Oberflächenbesiedelung und Stoffwechselaktivität wiesen keine exponentielle Zunahme auf. Die Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass eine Kultivierung der besiedelten *Scaffolds* über fünf Wochen hinaus keinen signifikanten Einfluss auf den Besiedlungsgrad hat, was auch für künftige Versuche und die Praktikabilität von Transplantaten relevant sein könnte.

Zusätzlich konnte exemplarisch der individuell planbare, homogene und reproduzierbare 3D-Druck eines *Scaffolds*, basierend auf dem klinischen *Scan* einer Septum-Perforation eines Patienten, gezeigt werden. Dies ermöglicht zukünftig die Translation der Forschung in Richtung klinischer Anwendung.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Werner Wolff; ;Laurenz J. Wurzinger; Hans-Gerhard Zilch GAGAADJEJKSMRJSWSFSESKS-B. Duale Reihe Anatomie. 2. Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2010.
2. Roblin DG, Eccles R. What, if any, is the value of septal surgery? *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2002;27(2):77-80.
3. Böhme ABGRG. Duale Reihe Hals-Nasen-Ohren- Heilkunde. Stuttgart: Hippokrates Verlag Stuttgart; 1996.
4. Kuan EC, Suh JD, Wang MB. Empty nose syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2015;15(1):493.
5. Rankin M, Borah GL. Perceived functional impact of abnormal facial appearance. *Plast Reconstr Surg.* 2003;111(7):2140-6; discussion 7-8.
6. Fichman M, Piedra Buena IT. Rhinoplasty. *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.; 2023.*
7. Frey HH, Weinaug P. [On the frequency and etiology of nasal septum perforation]. *Hno.* 1968;16(2):33-9.
8. Quinn JG, Bonaparte JP, Kilty SJ. Postoperative management in the prevention of complications after septoplasty: a systematic review. *Laryngoscope.* 2013;123(6):1328-33.
9. Ust'ianov lu A. [Treatment of spontaneous perforation of nasal septum in anterior atrophic rhinitis of nonspecific etiology]. *Vestn Otorinolaringol.* 2007(3):61-2.
10. Oberg D, Akerlund A, Johansson L, Bende M. Prevalence of nasal septal perforation: the Skövde population-based study. *Rhinology.* 2003;41(2):72-5.
11. Dąbrowska-Bień J, Skarżyński PH, Gwizdalska I, Łazęcka K, Skarżyński H. Complications in septoplasty based on a large group of 5639 patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018;275(7):1789-94.
12. Lavernia L, Brown WE, Wong BJB, Hu JC, Athanasiou KA. Toward tissue-engineering of nasal cartilages. *Acta Biomater.* 2019;88:42-56.
13. Varadharajan K, Sethukumar P, Anwar M, Patel K. Complications Associated With the Use of Autologous Costal Cartilage in Rhinoplasty: A Systematic Review. *Aesthet Surg J.* 2015;35(6):644-52.
14. Lindemann J, Scheithauer M, Hoffmann TK, Rettinger G, Kobes C, Sommer F. [Long-term results after surgical closures of septal perforations]. *Laryngorhinootologie.* 2014;93(11):751-5.
15. Neaman KC, Boettcher AK, Do VH, Mulder C, Baca M, Renucci JD, et al. Cosmetic rhinoplasty: revision rates revisited. *Aesthet Surg J.* 2013;33(1):31-7.
16. Bateman N, Jones NS. Retrospective review of augmentation rhinoplasties using autologous cartilage grafts. *J Laryngol Otol.* 2000;114(7):514-8.
17. Pirsig W, Kern EB, Verse T. Reconstruction of anterior nasal septum: back-to-back autogenous ear cartilage graft. *Laryngoscope.* 2004;114(4):627-38.
18. Metzinger SE. Diagnosing and treating nasal septal perforations. *Aesthet Surg J.* 2005;25(5):524-9.
19. Chua DY, Tan HK. Repair of nasal septal perforations using auricular conchal cartilage graft in children: report on three cases and literature review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006;70(7):1219-24.
20. Hanci D, Üstün O, Yilmazer AB, Göker AE, Kumral TL, Uyar Y. Costal Cartilage and Costal Perichondrium Sandwich Graft in Septal Perforation Repair. *J Craniofac Surg.* 2020;31(5):1327-9.
21. Pedroza F, Patrocinio LG, Arevalo O. A review of 25-year experience of nasal septal perforation repair. *Arch Facial Plast Surg.* 2007;9(1):12-8.
22. Oseni A, Crowley C, Lowdell M, Birchall M, Butler PE, Seifalian AM. Advancing nasal reconstructive surgery: the application of tissue engineering technology. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6(10):757-68.
23. Rotter N, Haisch A, Bücheler M. Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2005;262(7):539-45.

24. Bermueller C, Schwarz S, Elsaesser AF, Sewing J, Baur N, von Bomhard A, et al. Marine collagen scaffolds for nasal cartilage repair: prevention of nasal septal perforations in a new orthotopic rat model using tissue engineering techniques. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(19-20):2201-14.
25. Kundu J, Shim JH, Jang J, Kim SW, Cho DW. An additive manufacturing-based PCL-alginate-chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(11):1286-97.
26. Akbari P, Waldman SD, Propst EJ, Cushing SL, Weber JF, Yeger H, et al. Generating Mechanically Stable, Pediatric, and Scaffold-Free Nasal Cartilage Constructs In Vitro. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016;22(12):1077-84.
27. Chiu LL, To WT, Lee JM, Waldman SD. Scaffold-free cartilage tissue engineering with a small population of human nasoseptal chondrocytes. *Laryngoscope*. 2017;127(3):E91-e9.
28. Reuther MS, Briggs KK, Neuman MK, Masuda K, Sah RL, Watson D. Volume Expansion of Tissue Engineered Human Nasal Septal Cartilage. *J Otol Rhinol*. 2014;3(4).
29. Fulco I, Miot S, Haug MD, Barbero A, Wixmerten A, Feliciano S, et al. Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumour resection: an observational first-in-human trial. *The Lancet*. 2014;384(9940):337-46.
30. Badran KW, Chang JC, Kuan EC, Wong BJF. Anatomy and Surgical Approaches to the Rabbit Nasal Septum. *JAMA Facial Plast Surg*. 2017;19(5):386-91.
31. Griffin MF, Premakumar Y, Seifalian AM, Szarko M, Butler PE. Biomechanical characterisation of the human nasal cartilages; implications for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(1):11.
32. Junqueira LCU, Carneiro, J., & Gratzl, M. (Hrsg.). *Histologie*. Heidelberg: Springer Verlag; 2005.
33. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 5., vollständig überarbeitete Edition ed. Stuttgart: Thieme; 2. September 2015.
34. Reinhard Walther PR. Proteoglykane: Pschyrembel online; [updated 05.2017; cited 2023 06.11.]. Available from: <https://www.pschyrembel.de/Proteoglykane/K0HUT>.
35. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus. *Lernatlas der Anatomie*. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 2. überarbeitete Auflage ed. Stuttgart: Thieme; 2007.
36. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2011;2:403-30.
37. Hildenbrand T, Weber RK, Brehmer D. Rhinitis sicca, dry nose and atrophic rhinitis: a review of the literature. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2011;268(1):17-26.
38. Holden PK, Liaw LH, Wong BJ. Human nasal cartilage ultrastructure: characteristics and comparison using scanning electron microscopy. *Laryngoscope*. 2008;118(7):1153-6.
39. van Osch GJ, Brittberg M, Dennis JE, Bastiaansen-Jenniskens YM, Erben RG, Konttinen YT, et al. Cartilage repair: past and future--lessons for regenerative medicine. *J Cell Mol Med*. 2009;13(5):792-810.
40. Fussenegger M, Meinhart J, Höbling W, Kullich W, Funk S, Bernatzky G. Stabilized autologous fibrin-chondrocyte constructs for cartilage repair in vivo. *Ann Plast Surg*. 2003;51(5):493-8.
41. Scierski W, Polok A, Namysłowski G, Błazewicz M, Pamuła E, Stodolak E, et al. [Study of selected biomaterials for reconstruction of septal nasal perforation]. *Otolaryngol Pol*. 2007;61(5):842-6.
42. Shokri A, Ramezani K, Jamalpour MR, Mohammadi C, Vahdatinia F, Irani AD, et al. In vivo efficacy of 3D-printed elastin-gelatin-hyaluronic acid scaffolds for regeneration of nasal septal cartilage defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2022;110(3):614-24.
43. Berghaus A. Implants for reconstructive surgery of the nose and ears. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2007;6:Doc06.
44. Chang DT, Irace AL, Kawai K, Rogers-Vizena CR, Nuss R, Adil EA. Nasal septal perforation in children: Presentation, etiology, and management. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2017;92:176-80.

45. Sajjadian A, Naghshineh N, Rubinstein R. Current status of grafts and implants in rhinoplasty: Part II. Homologous grafts and allogenic implants. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(3):99e-109e.
46. Theissing JR, Gerhard; Werner, Jochen A.; Hoppe, Florian; Rudack, Claudia. *HNO-Operationslehre - Mit allen wichtigen Eingriffen.* Stuttgart: Verlagsgruppe Georg Thieme; 2006.
47. AlloDerm SELECT™ RTM [cited 2023 07.12.]. Available from: <https://de.biohorizons.com/Products/AlloDerm>.
48. Wee JH, Mun SJ, Na WS, Kim H, Park JH, Kim DK, et al. Autologous vs Irradiated Homologous Costal Cartilage as Graft Material in Rhinoplasty. *JAMA Facial Plast Surg.* 2017;19(3):183-8.
49. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260(5110):920-6.
50. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 1975;6(3):331-43.
51. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(11):5665-8.
52. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet.* 1981;1(8211):75-8.
53. Langer R, Vacanti JP. Artificial organs. *Sci Am.* 1995;273(3):130-3.
54. Kreuz PC, Steinwachs MR, Ergelet C, Krause SJ, Konrad G, Uhl M, et al. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(11):1119-25.
55. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994;331(14):889-95.
56. Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, Sjögren-Jansson E, Carlsson L, Peterson L, et al. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):R560-8.
57. Loeser RF, Shanker G, Carlson CS, Gardin JF, Shelton BJ, Sonntag WE. Reduction in the chondrocyte response to insulin-like growth factor 1 in aging and osteoarthritis: studies in a non-human primate model of naturally occurring disease. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9):2110-20.
58. Schiltz JR, Mayne R, Holtzer H. The Synthesis of Collagen and Glycosaminoglycans by Dedifferentiated Chondroblasts in Culture. *Differentiation.* 1973;1(2):97-108.
59. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature.* 1977;267(5611):531-2.
60. Rosenberg LC, Buckwalter JA, Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall VC. Cartilage proteoglycans. *Articular cartilage biochemistry.* United States: Raven Press, New York, NY; 1986.
61. Abbott J, Holtzer H. The loss of phenotypic traits by differentiated cells. 3. The reversible behavior of chondrocytes in primary cultures. *J Cell Biol.* 1966;28(3):473-87.
62. Rudert M, Hirschmann F, Schulze M, Wirth CJ. Bioartificial cartilage. *Cells Tissues Organs.* 2000;167(2-3):95-105.
63. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 1982;30(1):215-24.
64. Yasui N, Osawa S, Ochi T, Nakashima H, Ono K. Primary culture of chondrocytes embedded in collagen gels. *Exp Cell Biol.* 1982;50(2):92-100.
65. Itay S, Abramovici A, Nevo Z. Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* 1987(220):284-303.
66. Hendrickson DA, Nixon AJ, Erb HN, Lust G. Phenotype and biological activity of neonatal equine chondrocytes cultured in a three-dimensional fibrin matrix. *Am J Vet Res.* 1994;55(3):410-4.

67. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg.* 1991;88(5):753-9.
68. Marlovits S, Singer P, Zeller P, Mandl I, Haller J, Trattinig S. Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) for the evaluation of autologous chondrocyte transplantation: determination of interobserver variability and correlation to clinical outcome after 2 years. *Eur J Radiol.* 2006;57(1):16-23.
69. Chou CH, Cheng WT, Lin CC, Chang CH, Tsai CC, Lin FH. TGF-beta1 immobilized tri-co-polymer for articular cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;77(2):338-48.
70. Ball ST, Goomer RS, Ostrander RV, Tontz WL, Jr., Williams SK, Amiel D. Preincubation of tissue engineered constructs enhances donor cell retention. *Clin Orthop Relat Res.* 2004(420):276-85.
71. Francioli SE, Martin I, Sie CP, Hagg R, Tommasini R, Candrian C, et al. Growth factors for clinical-scale expansion of human articular chondrocytes: relevance for automated bioreactor systems. *Tissue Eng.* 2007;13(6):1227-34.
72. Mukaida T, Urabe K, Naruse K, Aikawa J, Katano M, Hyon SH, et al. Influence of three-dimensional culture in a type II collagen sponge on primary cultured and dedifferentiated chondrocytes. *J Orthop Sci.* 2005;10(5):521-8.
73. Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, et al. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum.* 2006;54(10):3254-66.
74. Bigdeli N, Karlsson C, Strehl R, Concaro S, Hyllner J, Lindahl A. Coculture of human embryonic stem cells and human articular chondrocytes results in significantly altered phenotype and improved chondrogenic differentiation. *Stem Cells.* 2009;27(8):1812-21.
75. Mo XT, Guo SC, Xie HQ, Deng L, Zhi W, Xiang Z, et al. Variations in the ratios of co-cultured mesenchymal stem cells and chondrocytes regulate the expression of cartilaginous and osseous phenotype in alginate constructs. *Bone.* 2009;45(1):42-51.
76. Lovice DB, Mingrone MD, Toriumi DM. Grafts and implants in rhinoplasty and nasal reconstruction. *Otolaryngol Clin North Am.* 1999;32(1):113-41.
77. Lin G, Lawson W. Complications using grafts and implants in rhinoplasty. *Operative Techniques in Otolaryngology-head and Neck Surgery.* 2007;18:315-23.
78. Stoll W. Complications following implantation or transplantation in rhinoplasty. *Facial Plast Surg.* 1997;13(1):45-50.
79. Rettinger G. Risks and complications in rhinoplasty. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2007;6:Doc08.
80. Kim HS, Park SS, Kim MH, Kim MS, Kim SK, Lee KC. Problems associated with alloplastic materials in rhinoplasty. *Yonsei Med J.* 2014;55(6):1617-23.
81. Witte F, Calliess T, Windhagen H. [Biodegradable synthetic implant materials : clinical applications and immunological aspects]. *Orthopade.* 2008;37(2):125-30.
82. Homicz MR, Schumacher BL, Sah RL, Watson D. Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue-engineered neocartilage composition. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;127(5):398-408.
83. Haug MD, Rieger UM, Witt P, Gubisch W. Managing the ear as a donor site for composite graft in nasal reconstruction: update on technical refinements and donor site morbidity in 110 cases. *Ann Plast Surg.* 2009;63(2):171-5.
84. Ho TT, Sykes K, Kriet JD, Humphrey C. Cartilage Graft Donor Site Morbidity following Rhinoplasty and Nasal Reconstruction. *Craniofacial Trauma Reconstr.* 2018;11(4):278-84.
85. Moon BJ, Lee HJ, Jang YJ. Outcomes following rhinoplasty using autologous costal cartilage. *Arch Facial Plast Surg.* 2012;14(3):175-80.
86. Rohrich RJ, Griffin JR, Ansari M, Beran SJ, Potter JK. Nasal reconstruction--beyond aesthetic subunits: a 15-year review of 1334 cases. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(6):1405-16; discussion 17-9.

87. Wolf F, Haug M, Farhadi J, Candrian C, Martin I, Barbero A. A low percentage of autologous serum can replace bovine serum to engineer human nasal cartilage. *Eur Cell Mater.* 2008;15:1-10.
88. Farhadi J, Fulco I, Miot S, Wirz D, Haug M, Dickinson SC, et al. Precultivation of engineered human nasal cartilage enhances the mechanical properties relevant for use in facial reconstructive surgery. *Ann Surg.* 2006;244(6):978-85; discussion 85.
89. Kafienah W, Jakob M, Démarteau O, Frazer A, Barker MD, Martin I, et al. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng.* 2002;8(5):817-26.
90. Hoshi K, Fujihara Y, Saijo H, Kurabayashi K, Suenaga H, Asawa Y, et al. Three-dimensional changes of noses after transplantation of implant-type tissue-engineered cartilage for secondary correction of cleft lip-nose patients. *Regen Ther.* 2017;7:72-9.
91. Morrison RJ, Nasser HB, Kashlan KN, Zopf DA, Milner DJ, Flanagan CL, et al. Co-culture of adipose-derived stem cells and chondrocytes on three-dimensionally printed bioscaffolds for craniofacial cartilage engineering. *Laryngoscope.* 2018;128(7):E251-e7.
92. Martinez Neto EE, Dolci JE. Nasal septal perforation closure with bacterial cellulose in rabbits. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010;76(4):442-9.
93. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(2):297-302; discussion 3-4.
94. Bajaj P, Schweller RM, Khademhosseini A, West JL, Bashir R. 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014;16:247-76.
95. Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, et al. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(4):371-83.
96. Rosenzweig DH, Carelli E, Steffen T, Jarzem P, Haglund L. 3D-Printed ABS and PLA Scaffolds for Cartilage and Nucleus Pulposus Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2015;16(7):15118-35.
97. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res.* 1970;4(3):433-56.
98. Jones AC, Arns CH, Sheppard AP, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Knackstedt MA. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT. *Biomaterials.* 2007;28(15):2491-504.
99. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005;26(27):5474-91.
100. Klotz S, Kaufmann N, Kuenz A, Prüße U. Biotechnological production of enantiomerically pure d-lactic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2016;100(22):9423-37.
101. de Albuquerque TL, Marques Júnior JE, de Queiroz LP, Ricardo ADS, Rocha MVP. Polylactic acid production from biotechnological routes: A review. *Int J Biol Macromol.* 2021;186:933-51.
102. Dr. Diana Freudendahl DRL, Jürgen Kohlhoff, Stefan Reschke. *Biokunststoffe aus Polymilchsäure*: HW-Verlag, Mering; 2020 [cited 2023 30.10.2023]. Available from: <https://werkstoffzeitschrift.de/biokunststoffe-aus-polymilchsaeure/>.
103. I.P. Mahendra PTN, N.T.H. Phuong, T.T. Hang, N.F. Alias, H. Ismail. Poly (L-lactic acid)/deproteinized natural rubber blends with enhanced compatibility. *Polimery* 66. 2021.
104. Liu X, Zhang L, Yuan C, Jia R, Shao C, Wang M, et al. A Study of the Pressure-Induced Solidification of Polymers. *Polymers (Basel).* 2018;10(8).
105. Spinu M, Jackson C, Keating MY, Gardner KH. Material Design in Poly(Lactic Acid) Systems: Block Copolymers, Star Homo- and Copolymers, and Stereocomplexes. *Journal of Macromolecular Science, Part A.* 1996;33(10):1497-530.
106. Carrasco F, Pagès P, Gámez-Pérez J, Santana OO, Maspoch ML. Processing of poly(lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties. *Polymer Degradation and Stability.* 2010;95(2):116-25.

107. Farah S, Anderson DG, Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;107:367-92.
108. Cifuentes SC, Frutos E, González-Carrasco JL, Muñoz M, Multigner M, Chao J, et al. Novel PLLA/magnesium composite for orthopedic applications: A proof of concept. *Materials Letters*. 2012;74:239-42.
109. Huang YS, Cui FZ. Preparation of biodegradable poly(lactic acid-co-aspartic acid) by copolymerization processes. *Current Applied Physics*. 2005;5(5):546-8.
110. Wu F, Liu C, O'Neill B, Wei J, Ngothai Y. Fabrication and properties of porous scaffold of magnesium phosphate/polycaprolactone biocomposite for bone tissue engineering. *Applied Surface Science*. 2012;258(19):7589-95.
111. Raquez J-M, Habibi Y, Murariu M, Dubois P. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. *Progress in Polymer Science*. 2013;38(10):1504-42.
112. Canetti M, Cacciamani A, Bertini F. Miscible blends of polylactide and poly(methyl methacrylate): Morphology, structure, and thermal behavior. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2014;52(17):1168-77.
113. Pang X, Zhuang X, Tang Z, Chen X. Polylactic acid (PLA): Research, development and industrialization. *Biotechnology Journal*. 2010;5(11):1125-36.
114. Sharma S, Majumdar A, Butola BS. Tailoring the biodegradability of polylactic acid (PLA) based films and ramie- PLA green composites by using selective additives. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;181:1092-103.
115. L. A-K. Wie nachhaltig ist PLA Filament wirklich? Paris: 3Dnatives Europa; 2021 [cited 2023 06.12.]. Available from: <https://www.3dnatives.com/de/feature-story-3d-druck-material-pla-nachhaltig-230720191/#!>
116. RUSSO RP, Vercesi F, Migliorini L, CHRISTEN MO. Case Report: Histological Findings After Insertion of PLLA Sutures With Bi-directional Cones in Human: Two Year Follow-up. *JPD*. 2018;14(2):121-4.
117. 3D-DRUCK-VERFAHREN: 3Dnatives; 2023 [cited 2023 30.10.2023]. Available from: <https://www.3dnatives.com/de/3d-technologies/#!>
118. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*. 2014;32(8):773-85.
119. Zhu W, Ma X, Gou M, Mei D, Zhang K, Chen S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;40:103-12.
120. Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm JM, Krek W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014;69-70:29-41.
121. Amann A, Zwierzina M, Gamerith G, Bitsche M, Huber JM, Vogel GF, et al. Development of an Innovative 3D Cell Culture System to Study Tumour - Stroma Interactions in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLOS ONE*. 2014;9(3):e92511.
122. Puschmann TB, Zandén C, De Pablo Y, Kirchhoff F, Pekna M, Liu J, et al. Bioactive 3D cell culture system minimizes cellular stress and maintains the in vivo-like morphological complexity of astroglial cells. *Glia*. 2013;61(3):432-40.
123. Ma X, Qu X, Zhu W, Li Y-S, Yuan S, Zhang H, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(8):2206-11.
124. Leong KF, Cheah CM, Chua CK. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*. 2003;24(13):2363-78.
125. Korpela J, Kokkari A, Korhonen H, Malin M, Närhi T, Seppälä J. Biodegradable and bioactive porous scaffold structures prepared using fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(4):610-9.
126. Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002;23(4):1169-85.
127. Hoque ME, Chuan YL, Pashby I. Extrusion based rapid prototyping technique: an advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication. *Biopolymers*. 2012;97(2):83-93.

128. Vaz VM, Kumar L. 3D Printing as a Promising Tool in Personalized Medicine. *AAPS PharmSciTech*. 2021;22(1):49.
129. Awad A, Trenfield SJ, Gaisford S, Basit AW. 3D printed medicines: A new branch of digital healthcare. *Int J Pharm*. 2018;548(1):586-96.
130. Haaparanta AM, Järvinen E, Cengiz IF, Ellä V, Kokkonen HT, Kiviranta I, et al. Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(4):1129-36.
131. Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(5):235-8.
132. Richardson SM, Curran JM, Chen R, Vaughan-Thomas A, Hunt JA, Freemont AJ, et al. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds. *Biomaterials*. 2006;27(22):4069-78.
133. Mizuno H, Roy AK, Vacanti CA, Kojima K, Ueda M, Bonassar LJ. Tissue-engineered composites of anulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(12):1290-7; discussion 7-8.
134. Mizuno H, Roy AK, Zaporozhan V, Vacanti CA, Ueda M, Bonassar LJ. Biomechanical and biochemical characterization of composite tissue-engineered intervertebral discs. *Biomaterials*. 2006;27(3):362-70.
135. Hu J, Liu X, Ma PX. Induction of osteoblast differentiation phenotype on poly(L-lactic acid) nanofibrous matrix. *Biomaterials*. 2008;29(28):3815-21.
136. Haimi S, Suuriniemi N, Haaparanta AM, Ellä V, Lindroos B, Huhtala H, et al. Growth and osteogenic differentiation of adipose stem cells on PLA/bioactive glass and PLA/beta-TCP scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(7):1473-80.
137. Ultimaker 2+ 3D Drucker: Thomas Hellmann ; [cited 2023 31.10.]. Available from: <https://www.freeform4u.de/ultimaker-2-plus-3d-drucker.html>.
138. Kuhlmann C, Blum JC, Schenck TL, Giunta RE, Wiggenhauser PS. Evaluation of the Usability of a Low-Cost 3D Printer in a Tissue Engineering Approach for External Ear Reconstruction. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21).
139. UltiMaker 2+ Connect: UltiMaker; [cited 2023 31.10.]. Available from: <https://ultimaker.com/3d-printers/s-series/ultimaker-2-connect/>.
140. Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, Ng KW, Teoh SH, Tan KC. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res*. 2001;55(2):203-16.
141. Hatz CR, Msallem B, Aghlmandi S, Brantner P, Thieringer FM. Can an entry-level 3D printer create high-quality anatomical models? Accuracy assessment of mandibular models printed by a desktop 3D printer and a professional device. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2020;49(1):143-8.
142. Mayer J, Wintermantel E, Leong K. Biomedical applications of polymer-composite materials: A review. *Composites Science and Technology*. 2001;61:1189-224.
143. Goswami DYE. *The CRC Handbook of Mechanical Engineering*. Boca Raton: CRC Press; 2004. 2688 p.
144. Leonhardt H, B. Tillman, G. Töndury, K. Zilles (eds). *Skelettsystem. Anatomie des Menschen*. Stuttgart: Thieme; 1987. p. 52–127.
145. Zhang L, Hu J, Athanasiou KA. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng*. 2009;37(1-2):1-57.
146. Kim SG, Menapace DC, Mims MM, Shockley WW, Clark JM. Age-Related Histologic and Biochemical Changes in Auricular and Nasal Cartilages. *The Laryngoscope*. 2023;n/a(n/a).
147. Westreich RW, Courtland HW, Nasser P, Jepsen K, Lawson W. Defining nasal cartilage elasticity: biomechanical testing of the tripod theory based on a cantilevered model. *Arch Facial Plast Surg*. 2007;9(4):264-70.
148. Abreu E, Mow VC, Huijskes R: *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology*. *BioMedical Engineering OnLine*. 2005;4(1):28.

149. Riedler KL, Shokrani A, Markarian A, Fisher LM, Pepper JP. Age-related histologic and biochemical changes in auricular and septal cartilage. *Laryngoscope*. 2017;127(11):E399-e407.
150. Rotter N, Tobias G, Lebl M, Roy AK, Hansen MC, Vacanti CA, et al. Age-related changes in the composition and mechanical properties of human nasal cartilage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002;403(1):132-40.
151. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*. 2012;12(9):12347-60.
152. Färbekit: Safranin-Lichtgrün-Färbung zur Knorpel-Darstellung: MORPHISTO GmbH [updated 28.09.2019; cited 2024 16.01.]. Available from: [https://www.morphisto.de/shop/detail/d/Färbekit%3A\\_Safranin-Lichtgrün-Färbung\\_zur\\_Knorpel-Darstellung//9441/](https://www.morphisto.de/shop/detail/d/Färbekit%3A_Safranin-Lichtgrün-Färbung_zur_Knorpel-Darstellung//9441/)
153. Christen P, Jaussi R, Benoit R. *Biochemie und Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
154. Murphy MP, Koepke LS, Lopez MT, Tong X, Ambrosi TH, Gulati GS, et al. Articular cartilage regeneration by activated skeletal stem cells. *Nat Med*. 2020;26(10):1583-92.
155. Zhu W, Chen K, Lu W, Sun Q, Peng L, Fen W, et al. In vitro study of nano-HA/PLLA composite scaffold for rabbit BMSC differentiation under TGF- $\beta$ 1 induction. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2014;50(3):214-20.
156. Zhang W, Hu J, Huang Y, Wu C, Xie H. Urine-derived stem cells: applications in skin, bone and articular cartilage repair. *Burns Trauma*. 2021;9:tkab039.
157. Zeng J, Huang L, Xiong H, Li Q, Wu C, Huang Y, et al. Injectable decellularized cartilage matrix hydrogel encapsulating urine-derived stem cells for immunomodulatory and cartilage defect regeneration. *NPJ Regen Med*. 2022;7(1):75.
158. De Kinderen P, Meester J, Loeys B, Peeters S, Gouze E, Woods S, et al. Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells Into Chondrocytes: Methods and Applications for Disease Modeling and Drug Discovery. *J Bone Miner Res*. 2022;37(3):397-410.
159. Li T, Liu B, Chen K, Lou Y, Jiang Y, Zhang D. Small molecule compounds promote the proliferation of chondrocytes and chondrogenic differentiation of stem cells in cartilage tissue engineering. *Biomed Pharmacother*. 2020;131:110652.
160. Ma XF, Ma XB, Qian WJ, Zhao HY, Ding JP, Zhao TL. Co-Culture of Adipose-Derived Stem Cells and Chondrocytes With Transforming Growth Factor-Beta 3 Promotes Chondrogenic Differentiation. *J Craniofac Surg*. 2020;31(8):2355-9.
161. Chen L, Li L, Xing F, Peng J, Peng K, Wang Y, et al. Human Urine-Derived Stem Cells: Potential for Cell-Based Therapy of Cartilage Defects. *Stem Cells Int*. 2018;2018:4686259.
162. Angelats Lobo D, Ginestra P. Cell Bioprinting: The 3D-Bioplotter™ Case. *Materials (Basel)*. 2019;12(23).

## 8 Danksagung

Am Ende dieses Projekts möchte ich allen Menschen danken, die diese Arbeit erst ermöglicht haben. Mein freundlicher Dank gilt allen Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe [REDACTED] [REDACTED], die mich fachlich unterstützten und für meine Anliegen stets ein offenes Ohr hatten.

Besonders hervorzuheben ist Dr. [REDACTED], der viel Zeit für mich aufbrachte und mir nicht nur während meiner Doktorarbeit, sondern auch darüber hinaus mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich bedanke mich für eine exzellente Betreuung. Ein besonderer Dank muss auch an [REDACTED] [REDACTED] gerichtet sein. Über Ihre hervorragende Einführung in die Arbeitsweisen eines Zellkulturlabors und die freundliche Unterstützung während der einzelnen Arbeitsschritte kann ich mich sehr glücklich schätzen. Ohne ihren großen Erfahrungsschatz und die praktische Unterstützung bei der histologischen Auswertung wäre dieses Projekt so nicht möglich gewesen. Vielen lieben Dank dafür.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. [REDACTED] [REDACTED] möchte ich herzlich für das in mich gesetzte Vertrauen, das Mentoring und die stets zielführenden wissenschaftlichen Gespräche danken. Dr. [REDACTED] [REDACTED] danke ich für den wissenschaftlichen Austausch und die Inspiration für neue Analysemethoden. [REDACTED] und dem Zellkulturlabor des Zentrums für Unfallchirurgie und Orthopädie der Universitätsmedizin Mainz danke ich für die Mitbenutzung ihrer 3D-Drucker und die Unterstützung in der Handhabung. [REDACTED] [REDACTED], Dr. [REDACTED] [REDACTED] und Dr. [REDACTED] [REDACTED] möchte ich für die moralische Unterstützung während des Schreibens dieser Arbeit danken. Unser Austausch und die Gespräche haben mir den langwierigen Schreibprozess erleichtert.

Einen besonderen Dank möchte ich auch an [REDACTED] richten. Vielen Dank für die Hilfe beim *Modelling* und *Slicing* der *Scaffolds*. Mit der Expertise im Bereich CAD und 3D-Druck war [REDACTED] eine große Bereicherung für dieses Projekt. Ich bedanke mich auch für die freundliche Überlassung von zahlreichen Grafiken.

Die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit verdanke ich nicht nur dem allzeit vorhandenen fachlichen Rat, sondern auch dem familiären Klima in der AG Prof. [REDACTED]. Dies half auch über Arbeiten im Labor hinweg, die mir ein hohes Durchhaltevermögen abverlangten. Dadurch entwickelte ich eine hohe Frustrationstoleranz, die mir sicher in der Zukunft auch noch nützlich sein wird.

Sehr herzlich möchte ich auch meinen Freunden danken, wozu ich auch meine Mitbewohner und ehemaligen Mitbewohner [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] zähle. Und zu guter Letzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für ihre mittlerweile 26 Jahre anhaltende Unterstützung, ohne die nicht nur diese Doktorarbeit, sondern auch der gesamte Weg bis hierhin nicht möglich gewesen wäre.

## 9 Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Kaudela
Vorname	Felix Karl Ludwig
Geburtstag	12.02.1998
Geburtsort	Freiburg im Breisgau
Staatsangehörigkeit	deutsch/österreichisch
Familienstand	ledig



### Promotion / Studium / Schule

07/20–03/24	Promotion: Universitätsmedizin Mainz, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, AG Prof. Dr. [REDACTED], „ <i>Tissue-Engineering</i> 3D-gedruckter Polylactid-Knorpel-Implantate – ein translationales Forschungsprojekt zum individualisierten chirurgischen Verschluss von Septum-Perforationen“
04/17–05/23	Medizinstudium: Johannes Gutenberg-Universität, Mainz 3. Staatsexamen 19.05.2023 2. Staatsexamen 07.04.2022 1. Staatsexamen 18.03.2018
2008–2016	Allgemeine Hochschulreife: Kant-Gymnasium, Weil am Rhein
2004–2008	Grundschule: staatliche Grundschule, Eimeldingen

### Praktische Erfahrungen

05/22–04/23	Praktisches Jahr: 3. Terial: Unfallchirurgie und Orthopädie, Anästhesie, Herzchirurgie, Allgemeinchirurgie, Universitätsmedizin Mainz, Mainz 2. Terial: Nephrologie, Allgemeine Notaufnahme, Rhythmologie, Universitätsmedizin Mainz, Mainz 1. Terial: Wahlfach Urologie, Helios Dr. Horst-Schmidt-Kliniken, Wiesbaden
07/21–08/21	Famulatur: Psychiatrie, Universitätsmedizin Mainz, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Mainz
03/21–04/21	Famulatur: Allgemeinchirurgie, Katholisches Klinikum Mainz, Mainz

09/20–10/20 Famulatur: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsmedizin Mainz, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Mainz

03/20 Famulatur: Allgemeinmedizin, Praxis [REDACTED], Efringen-Kirchen

09/16–02/17 Pflegepraktikum: St. Claraspital, Basel

**Auszeichnungen**

10/19–09/21 Deutschlandstipendium: Auszeichnung für besondere Leistungen im Studium durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung

2016 Franz-Schnabel-Preis: Auszeichnung für besondere Leistungen im Fach Geschichte der Trautmann-Schröder-Stiftung Karlsruhe