

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Hals-Nasen-Ohren Klinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier)

In vivo Langzeitstudie zur vaskulären Integration an *in vitro*
vorkultivierten, tissue engineeren Präadipozyten im Polyurethangerüst

Judith Helena Mayer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Zahnheilkunde

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. R. Staudenmaier

2. Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier

3. Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff

Die Dissertation wurde am 03.03.2015 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.11.2015 angenommen.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Anatomie und Physiologie des Fettgewebes	3
1.2 Tissue Engineering	6
1.3 Tiermodell	8
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Zellkultur	11
2.1.1 Isolation und Kultivierung von Präadipozyten	11
2.1.2 Passagierung von Präadipozyten	13
2.2 Trägermaterial	13
2.2.1 Vorbereitung der Polyurethanschäume	14
2.2.1.1 Verarbeitung der Polyurethanschäume	14
2.2.1.2 Sterilisierung der Polyurethanschäume	14
2.2.2 Herstellung des Zellmatrixklebers	15
2.2.3 Beimpfen der PU-Schäume mit Zellmatrixkleber und Präadipozyten	15
2.2.4 Induktion und Differenzierung - Experimentelle Abfolge adipogener Differenzierung	15
2.3 <i>In vivo</i> Versuche	16
2.3.1 Versuchstiere (NMRI-Foxn ^{nu} (NMRI-nu) ♀)	16
2.3.2 Einteilung der Gruppen	16
2.3.1.1 Gruppe 1	17
2.3.1.2 Gruppe 2	17
2.3.1.3 Gruppe 3	17
2.3.1.4 Gruppe 4	18
2.3.3 Implantation der Konstrukte (Zell-Matrix-Konstrukte)	18
2.3.4 Explantation der Konstrukte	20
2.4 <i>In vitro</i> Versuche	21
2.4.1 Einteilung der Gruppen	21
2.4.1.1 Gruppe 1	21
2.4.1.2 Gruppe 2	21
2.4.1.3 Gruppe 3	21
2.4.1.4 Gruppe 4	22

2.5 Histologie und Auswertung	22
2.5.1 Gewebeeinbettung und histologische Aufbereitung	22
2.5.1.1 Paraffineinbettung	22
2.5.1.2 Kryoeinbettung	22
2.5.2 Trichromfärbung nach Ladewig	23
2.5.4 Antikörperfärbung mit Vimentin-Antikörper SP20	24
2.5.5 Öl-Rot-Färbung	25
2.5.5.1 Öl-Rot-Färbung in der Zellkulturflasche	26
2.5.5.2 Öl-Rot-Färbung der Kryoschnitte	26
2.5.6 Lebend-Tot-Färbung	26
2.5.6 Fotografien	27
2.5.6.1 Zellkultur	27
2.5.6.2 Histologie	27
2.5.7 Auswertung	27
2.6 Materialien	30
2.6.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
2.6.2 Medien und Reagenzien	31
3 Ergebnisse	34
3.1 Ergebnisse der <i>in vitro</i> Versuche	35
3.1.1 Lebend-Tot-Färbungen	35
3.1.2 Öl-Rot-Färbungen	36
3.1.3 Trichromfärbungen nach Ladewig	37
3.2 Ergebnisse der <i>in vivo</i> Versuche	41
3.2.1 Histologische Auswertung	41
3.2.1.1 Trichromfärbungen nach Ladewig	41
3.2.1.2 Öl-Rot-Färbungen - Nachweis adipogener Differenzierung mittels Öl-Rot-Färbungen	74
3.2.1.3 AK-Färbungen	75
3.2.2 Statistische Auswertung	81
3.2.2.1 Auswertung der Kontrollen Nacken	81
3.2.2.2 Auswertung der Polyurethankonstrukte der Leiste	84
4 Diskussion	88
4.1 Diskussion der Methodik	88
4.2 Diskussion der Ergebnisse	91

4.2.1 In vitro	91
4.2.2 In vivo	93
5 Zusammenfassung	100
6 Literaturverzeichnis	102
7 Abbildungsverzeichnis	109
8 Tabellenverzeichnis	111
9 Anhang	112
10 Danksagung	115

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
° C	Grad Celsius
π	Pi
μm	Mikrometer
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm ²	Quadratmikrometer
A	Fläche
A. / V. femoralis	Arteria / Vena femoralis
Abb.	Abbildung
AFN	Atipamezol, Flumazenil, Naloxon
AG	Arbeitsgruppe
AP	Alkalische Phosphatase
ASCs	adipose tissue-derived stem cells bzw. adipogene mesenchymale Stammzellen
BSA	Bovines Serum Albumin
ca.	circa
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlendioxyd
d.h.	das heißt
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco´s modified eagle´s medium
ECGM	Edothelial Cell Growth Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
etc.	et cetera
FDA	Fluorescein Diacetat
FG	Fettgewebe
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
HNO	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
i.p.	intraperitoneal
kgKG	Kilogramm Körpergewicht

MEFO	Methanol-Formaldehyd
min.	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MMF	Medetomidin, Midazolam, Fentanyl
o.g.	oben genannt
OP	Operation
P	Passage
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PGA	Polyglycolic acid
PI	Propidium Iodide
PLGA	Polylactid-co-Glycolid acid
PU	Polyurethan
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TE	Tissue engineering
Tr.	Tropfen
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Der Weichgewebersatz ist in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie ein wichtiges Verfahren, um Patienten nach Tumoroperationen, Traumata, Verbrennungen, aber auch angeborenen Weichgewebsdefiziten ästhetisch und funktional wieder herzustellen.

In besonderem Maße eignet sich dafür Fettgewebe, da dieses einfach zu handhaben, in ausreichenden Mengen verfügbar und autolog ist, was bedeutet, dass Abstoßungsreaktionen limitiert werden können (Langer, Sinitsina 2002).

Zum ersten Mal führte Neuber 1893 eine Weichgewebsaugmentation im Gesicht mittels eines freien autologen Fetttransplantates durch. Er verzeichnete mit kleinen Transplantaten zufriedenstellende Erfolge, stellte aber auch fest, dass Transplantate, die die Größe einer Bohne oder Mandel übersteigen, sich nicht mehr vollständig in das umliegende Gewebe integrieren (Neuber 1893).

Auch heute treten solche Komplikationen immer wieder auf. Bei freien, autologen Transplantaten sind immer wieder massive Größenverluste sowie durch mangelnde Blutversorgung ausgelöste Nekrosen einzelner Anteile der Transplantate zu erkennen (Peer 1956; Rossatti 1960; Kononas, Bucky 1993). Zugleich zeigt sich im Spendergebiet durch den Volumenverlust eine unbefriedigende Narbenbildung. Auch bei Versuchen, größere Defekte mittels Injektion von abgesaugten Fettzellen zu beheben, sind immer wieder Formverluste sowie Ölzysten festzustellen (Har-Shai, Lindenbaum 1996; Mandrekas, Zambacos 1998). Ebenfalls führen die heute in der Brustrekonstruktion viel verwendeten alloplastischen Transplantate, wie z.B. Silikone, immer wieder zu erheblichen Problemen. Zum einen können Fremdkörper- und allergische Reaktionen entstehen, zum anderen Kontrakturen durch Kapselbildung sowie Rupturen der Implantate (Cordeiro 2008).

Ende der 1980er Jahre beschrieben Vacanti et al. (1988) zum ersten Mal das Verfahren des Tissue Engineering anhand von Leber-, Darm-, und Pankreasgewebe (Vacanti, Morse 1988). Hierbei wird eine kleine Menge Gewebe entnommen, die Zellen daraus extrahiert und in einer Zellkultur vervielfältigt. Anschließend werden diese in ein Trägermaterial/Scaffold, welches die Form und Größe des zu ersetzenden Gewebes hat, gegeben und transplantiert. Aber auch hier ist die Größe wieder der limitierende Faktor. Ebenso wie die freien Transplantate benötigt auch

das TE-Gewebe eine ausreichende Blutversorgung, welche allerdings ab einer bestimmten Größe nicht mehr gegeben ist und somit eine Nekrose der unterversorgten Zellen eintritt. Daneben muss auch das Trägermaterial bestimmte Eigenschaften erfüllen. Es muss biokompatibel sein, um sowohl die eingebrachten Zellen als auch das Empfängergewebe nicht zu schädigen. Und es muss eine gute Formstabilität aufweisen, um den Defekt dauerhaft zufrieden stellend zu decken.

Zahlreiche Forschungsgruppen haben sich in den letzten Jahrzehnten mit diesen Themen befasst, speziell auch mit dem TE von Fettgewebe. Dieses stellt ein stark heterogenes Gewebe dar, welches zum einen aus reifen Adipozyten und zum anderen aus der Stromavaskulären Fraktion besteht, in der neben Endothelzellen, Perizyten, Makrophagen, Fibroblasten und auch adipogene mesenchymale Stammzellen (ASCs), die auch Präadipozyten genannt werden, vorkommen. Aus der Stromavaskulären Fraktion werden diese Präadipozyten, also die Fettvorläuferzellen, isoliert und für TE-Ansätze verwendet. Die Protokolle zur Isolation dieser Zellen aus dem Fettgewebe sowie deren Kultivierung werden in zahlreichen Arbeiten eingehend beschrieben (von Heimbürg, Hemmrich 2005; Cho, Kim 2006; Choi, Cha 2006; Cawthorn, Scheller 2012). Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden diese Verfahren getestet und optimiert und konnten in mehreren Doktorarbeiten/Dissertationen erfolgreich angewendet werden (Rittler-Ungethüm 2012; Leuthner 2014).

Bei *in vivo* Versuchen wurde als Trägermaterial für die Präadipozyten u.a. mit gefriergetrockneten Kollagen Scaffolds (von Heimbürg, Zachariah 2001), mit so genannten Copolimerisaten aus Milchsäure und Glycolsäure wie PLGA (Patrick, Chauvin 1999; Patrick, Zheng 2002; Choi, Park 2005) und PLA (Weiser, Prantl 2008) sowie mit auf Hyaluronsäure basierenden Scaffolds (Hemmrich, Van de Sijpe 2008; Stillaert, Di Bartolo 2008) gearbeitet. Erste Erfolge, also die Reifung einzelner Adipozyten und somit die Bildung von kleinen Fettgewebsinseln, konnten erzielt werden, aber ausreichend stabiles und zusammenhängendes Fettgewebe sowie formstabile Scaffolds ohne Größenverlust verursachen noch Probleme.

Um eine adäquate Vaskularisierung der Konstrukte zu erlangen, erfolgten Versuche mit angiogenen Wachstumsfaktoren (Murphy, Peters 2000; Richardson, Peters 2001) und mit Gefäßstilen (Hofer, Knight 2003; Vashi, Abberton 2006). Diese sollen dazu beitragen, dass die Konstrukte gleichmäßig von Gefäßen durchwachsen werden und somit eine adäquate Nährstoffversorgung der eingebrachten Zellen ermöglicht wird.

Trotz all dieser Versuche ist der Forschungsbedarf noch groß, da es bis heute noch nicht gelungen ist, eine ausreichende Menge an vitalem Fettgewebe mittels TE zu kultivieren und zu transplantieren.

1.1 Anatomie und Physiologie des Fettgewebes

Das Fettgewebe ist eine Gewebearart, deren Zellen (Fettzellen/Adipozyten) energiereiche Fettsubstanzen (Lipide) aufnehmen, speichern und bei Bedarf wieder in die Blutbahn abgeben können (Schwegler 2002, S.26 ff.; Faller, Schünke 2004, S.83 ff.).

Bei normalgewichtigen Frauen macht das Fettgewebe ca. 25 % des Körpergewichtes aus, bei Männern zwischen 10 und 15 % (Welsch 2006, S.147).

Es werden zwei Arten von Fettgewebe unterschieden: zum einen das braune, plurivakuoläre, zum anderen das weiße, univakuoläre Fettgewebe (Kühnel 2002, S.126).

Das braune FG kommt, vor allem bei Neugeborenen, im Schultergürtel, Achselhöhle und Nierenhilus vor und dient in den ersten Lebensmonaten als wichtiges Wärmedepot. Beim Erwachsenen wird es nur noch rudimentär im Brustbereich unterhalb der Schlüsselbeine und im Hals vorgefunden (Faller, Schünke 2004, S.83). Den größeren Anteil macht das weiße FG aus. Es wird eingeteilt in Speicherfett, welches als Langzeitenergievorrat vor allem subkutan vorkommt und in Hungerzeiten als erstes eingeschmolzen wird, und in Baufett, welches zum polstern mechanisch beanspruchter Körperregionen wie Handteller oder Fußsohlen und zur Ausformung bestimmter Körperregionen wie Wangen oder Orbita dient (Schwegler 2002, S.26). Auch zählt das weiße Fettgewebe zum größten plastischen Organ des Körpers mit einer Vielzahl endokriner Funktionen und mit hoher Regenerationsfähigkeit im Zuge chirurgischer Eingriffe und ebenso hoher Expansionsfähigkeit als Folge veränderter Energiebalance (Cawthorn, Scheller 2012). Die adulten Fettzellen des weißen FGs sind relativ große Zellen mit einem Durchmesser von über 100 µm. Charakteristisch ist eine Lipidvakuole im Inneren der Zelle, die Zellkern und Zytoplasma an den Rand der Zellmembran drängt und dadurch die typische Siegelringform ergibt.

Ihre Entwicklung geht von pluripotenten Stammzellen mesodermalen Ursprungs aus, die das Potential besitzen, sich zu Myoblasten, Chondroblasten, Osteoblasten oder

Adipozyten zu differenzieren. Geht die Differenzierung in Richtung Adipozyt, geschieht dies über eine Zwischenform: die adipogenen mesenchymalen Stammzellen (ASCs) bzw. Präadipozyten (Abb.1), welche für den Versuchsaufbau dieser Arbeit von zentraler Bedeutung sind (Gregoire, Smas 1998).

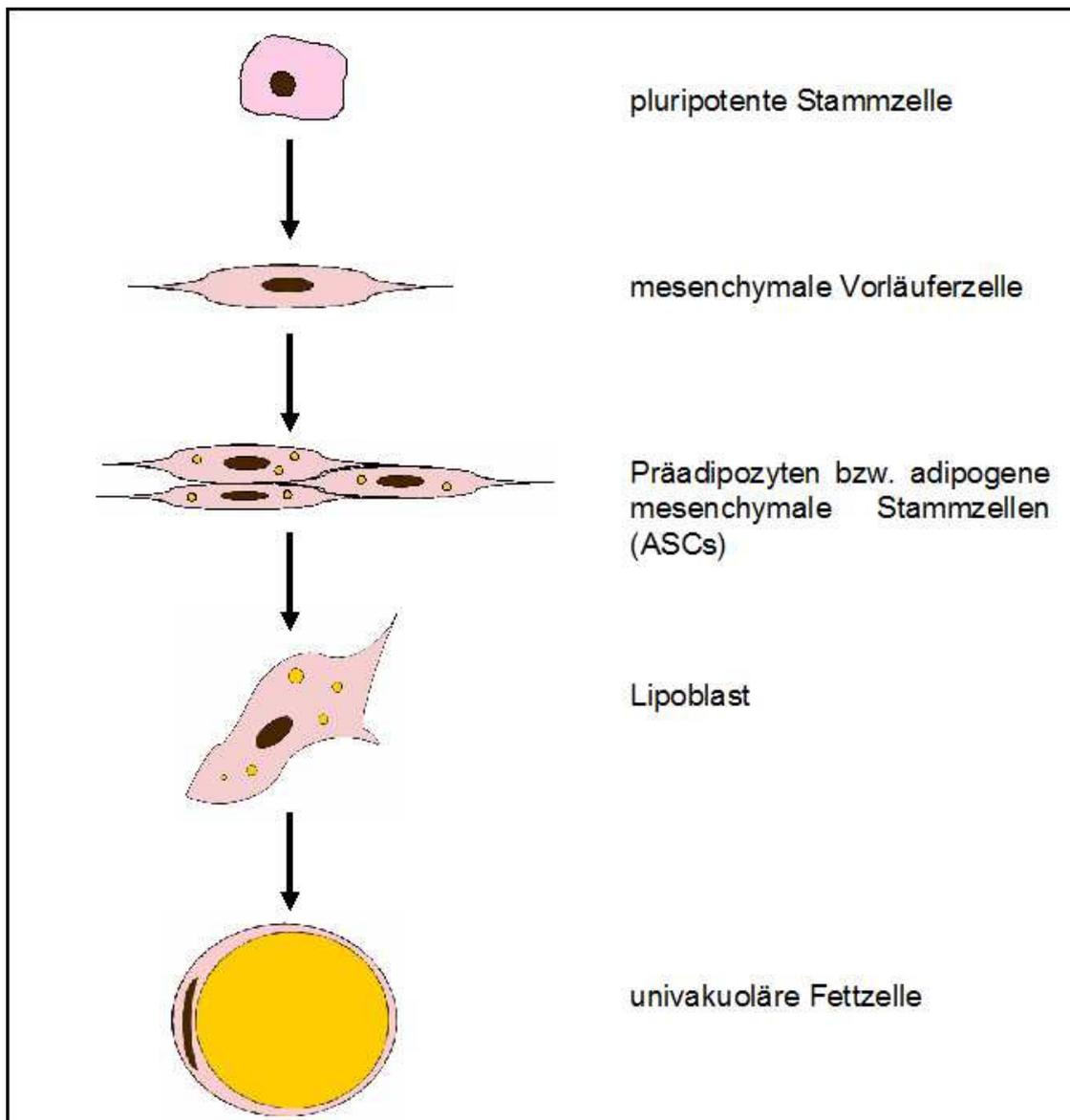


Abb. 1 Entstehung einer Fettzelle

Entwicklung einer Fettzelle von einer pluripotenten Stammzelle aus über die mesenchymale Vorläuferzelle (ASC) bis zur ausgereiften Fettzelle/Adipozyt mit der ihr typischen Siegelringform entstehend durch den, aufgrund des großen Lipideinschlusses, an den Rand gedrängten Zellkern.

Durch seine hohe Stoffwechselaktivität ist das (weiße) FG sehr gut durchblutet und jede Fettzelle ist mind. mit einer Kapillare verbunden. Um ihre Polsterfunktion zu verbessern, ist immer eine Gruppe von Fettzellen durch Bindegewebsfasern eng miteinander verbunden, hierdurch erscheinen sie im histologischen Schnitt häufig hexagonal (Welsch 2006, S.148 ff.) (Abb.2).

Die in den Adipozyten gespeicherten Lipide zählen zu den wichtigsten Energieträgern unseres Körpers und werden in Notzeiten oder bei lang anhaltender körperlicher Belastung abgebaut und verstoffwechselt. Die wichtigsten Lipide in unserem Körper sind die Fettsäuren und die Triglyzeride, bestehend aus Glycerin und drei Fettsäuren. Diese sind für viele Organe wie Leber, Herz und Muskulatur wichtige Energielieferanten. Triglyzeride werden entweder über die Nahrung im Darm aufgenommen und über das Lymphsystem im Fettgewebe gespeichert oder endogen in der Leber synthetisiert und über den Blutweg ins Fettgewebe transportiert. Werden mehr Nährstoffe aufgenommen, als vom Körper benötigt, findet die Lipogenese, also der Energiespeicher, statt. Die Lipogenese kann nur mittels des Hormons Insulin stattfinden. Dieses senkt bei hohem Blutglukosespiegel diesen über die Glykolyse ab und legt die Energiedepots an. In den Zeiträumen zwischen den Mahlzeiten oder bei erhöhtem Energiebedarf des Körpers muss der Blutglukosespiegel wieder angehoben werden, um die Organe weiter zu versorgen. Dies geschieht über die Lipolyse. Durch die Hormone Adrenalin und Glukagon werden Lipasen aktiviert, die die Triglyzeride aufspalten und somit den Fettabbau einleiten (Horn, Lindenmeier 2003, S.143 ff.).

Neben den bisher genannten Funktionen des Fettgewebes wie Energiespeicherung und -abgabe, Formgebung und Polsterung sowie Regulierung des Wärmehaushalts, werden vom FG auch Substanzen abgegeben, die sich auf den Blutdruck, die Blutgerinnung, das Immunsystem und den Stoffwechsel allgemein auswirken.

Eine dieser Substanzen ist das Hormon Adiponectin. Es hemmt in der Leber die Glukoneogenese und zeigt bei Diabetikern eine verminderte Konzentration im Blutplasma. Auch vermutet man eine hemmende Wirkung auf atherosklerotische Prozesse sowie auf Entzündungen (Miner 2004).

Ein weiteres wichtiges Hormon ist das Leptin. Dieses wird von den Fettzellen sezerniert und meldet dem Gehirn den Füllungszustand des Fettspeichers. Auch hat das Leptin Einfluss auf die Fertilität, die Osteogenese und das Immunsystem. Bei Leptinmangel ist ein erhöhtes Infektionsrisiko zu beobachten (Chaldakov, Stankulov

2003; Fantuzzi 2005). Noch zahlreiche weitere Substanzen werden von den Fettzellen sezerniert und in den Blutkreislauf abgegeben. Einfluss nehmen sie auf viele Funktionen im Körper und helfen u.a. bei der Regulation des Blutdrucks, der Blutgerinnung, der Stoffwechselaktivität etc. Dadurch wird das FG zum größten endokrinen Organ im menschlichen Körper.

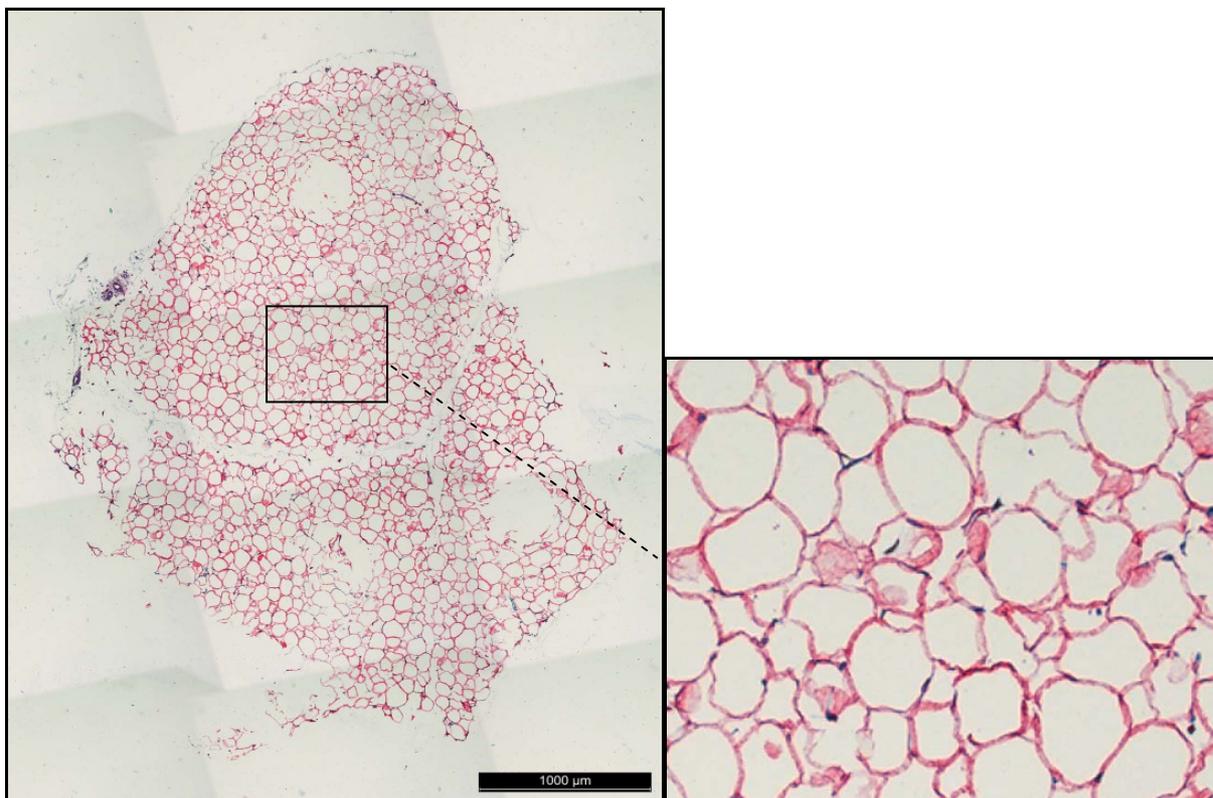


Abb. 2 Immunhistologische Färbung von humanem Fettgewebe mit Vimentin-Antikörper SP20 und Hämalaun Gegenfärbung

Deutlich erkennbare Lipidvakuolen mit den an Rand gedrängten Zellkernen (blau dargestellt) und der daraus entstehenden Siegelringform.

1.2 Tissue Engineering

Das Tissue Engineering (TE) bezeichnet ein interdisziplinäres Feld, welches sich mit den Grundlagen der Biowissenschaften und des Ingenieurwesens beschäftigt, um einen biologischen Ersatz von zerstörtem Gewebe zu entwickeln, der dessen Funktionen verbessern, aufrechterhalten oder wiederherstellen soll (Langer, Vacanti 1993).

Das Grundprinzip des TE besteht aus folgenden 3 Bestandteilen: Den Zellen, welche das verloren gegangene Gewebe ersetzen sollen, dem Trägermaterial (Scaffold) in

welches die Zellen eingebracht werden und das bis zu deren Ausreifung, den zu ersetzenden Platz einnehmen soll und dem Medium mit seinen Zusätzen, welche zum Überleben der Zellen wichtig sind und später zu deren Reifung beitragen.

Die ersten Versuche, mittels TE Leberzellen, Darmzellen und Pankreaszellen *in vivo* auf unterschiedlichen Scaffolds zu züchten, führten Ende der 1980er Jahre J.P. Vacanti und R. Langer durch (Vacanti, Morse 1988).

Seither hat sich vor allem in den USA ein großer Industriezweig rund um das TE gebildet. 2008 veröffentlichten M.J. Lysaght et al. eine umfangreiche Studie zur Lage der TE- und Stammzellindustrie, die im Januar 2012 aktualisiert wurde. Hierbei wurde ein Anstieg der weltweiten Ausgaben im TE um das 1,5 fache seit 2007 auf 3,6 Milliarden Dollar im Jahr 2011 geschätzt. 81 % davon allein in den USA. Dies zeigt einen deutlichen Nachholbedarf in Europa, dessen Ausgaben nur rund 11 % ausmachen (Lysaght, Jaklenec 2008; Jaklenec, Stamp 2012).

Durch das Tissue Engineering von Fettgewebe soll eine Alternative zu bisherigen Methoden zum Weichgewebersatz erzeugt werden. Immer wieder zeigt sich, dass sowohl Fettgewebstransplantate als auch Fettaspirate keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern. Die Bildung von Ölzysten sowie Nekrosen von Teilen der Transplantate werden wiederholt beschrieben (Smahel 1989; Weiser, Neubauer 2005).

Aufgrund ihres guten Differenzierungspotenzials und ihrer hohen Resistenz wird bevorzugt mit den Vorläuferzellen der Adipozyten, also den Präadipozyten, gearbeitet. Bedingt durch ihre geringere Größe erfolgt auch die für das Überleben der Zellen wichtige Revaskularisation nach Transplantation schneller. Die Transplantation von Präadipozyten scheint daher ein viel versprechender Weg, um größere und widerstandsfähigere Transplantate zur Weichgewebsaugmentation herzustellen (von Heimburg, Hemmrich 2005).

In der hier vorliegenden Arbeit werden humanen Präadipozyten aus Fettgewebe der Brust und des Abdomens isoliert, kultiviert und in Verbindung mit langzeitstabilem Fibrin in Konstrukte aus Polyurethan eingebracht und nach unterschiedlicher Vorkultivierung *in vitro* im Tiermodell um die A. und V. femoralis von athymischen Nacktmäusen gelegt.

Zum einen soll durch eine unterschiedliche Vorbehandlung der Präadipozyten *in vitro* die optimale Kultivierungsmethode zum Erhalt von reifen Adipozyten *in vivo* ermittelt werden. Zum anderen soll durch einen Gefäßanschluss eine homogene Vaskularisation des gesamten Konstrukts erlangt und dank dieser das Überleben der eingebrachten Zellen, vor allem in den zentralen Anteilen, gezeigt werden.

Wichtig ist hierbei auch das Trägermaterial, in diesem Falle das Polyurethanscaffold. Diese auf Poly- ϵ -caprolacton basierten Polyurethan (PU) Scaffolds wurden von der Firma PolyMaterials AG, Kaufbeuren, Germany, zur Verfügung gestellt. Mit einer Porosität um 85 %, einer Porengröße von bis zu 250 μm und einer starken Interkonnexion der Poren ist es als Trägermaterial für das TE bestens geeignet, da es sowohl den Raum als auch die Verbindung für das Wachstum der Zellen und der Gefäße bereit hält. Die Biokompatibilität sowie die Formstabilität des Materials wurden schon in zahlreichen Versuchen bestätigt. In unserer Forschungsgruppe erfolgten die ersten Versuche mit Chondrozyten (Hoang, Hoehnke 2009; Feucht, Hoang 2011). Hierbei konnten keinerlei Abstoßungsreaktionen, Nekrosen oder Degenerationen des Materials beobachtet werden.

1.3 Tiermodell

Vor einer klinischen Anwendung ist es erforderlich, erst anhand eines Tiermodelles den Erfolg und die Effizienz des TE-Gewebes zu testen. Es sind zahlreiche Arbeiten zum Thema TE von Fettgewebe mit *in vivo* Modellen veröffentlicht. Patrick (2008) hat Studien zwischen 1998 und 2007 beschrieben und zusammengefasst, die mittels TE von Fettgewebe und Scaffolds an Mäusen und Ratten durchgeführt wurden. Auch werden die verschiedenen Implantationsorte und Formen aufgezählt, wobei aufgrund der einfachen Handhabung subkutane Implantate überwiegen. Nur einzelne Forschungsgruppen haben mit aufwendigen Gefäßstilen in der Leistengegend gearbeitet, wobei dies eine gute Methode darstellt, sowohl eine frühe Blut- und Nährstoffversorgung der Scaffolds zu gewährleisten als auch eine spätere Transplantation des Konstruktes an eine andere Stelle zu ermöglichen (Patrick, Uthamanthil 2008).

Auch in unserer Forschungsgruppe hat sich das Gefäßstilssystem mit A. und V. femoralis in mehreren Versuchen etabliert. Erste vielversprechende Versuche

erfolgten mit Chondrozyten (Gehrke 2013). Auch die Übertragung auf das Fettzellmodell ist gelungen und soll nun in dieser Arbeit weitergeführt werden (Leuthner 2014). Vor allem gilt das Interesse den Unterschieden zwischen subkutan implantierten Scaffolds und jenen welche an einen Gefäßstil angeschlossen werden. Das Augenmerk liegt hierbei auf der vaskulären Integration der PUs, der Menge und Verteilung der Adipozyten und der Formstabilität der Konstrukte. Hierfür werden athymischen Nacktmäusen (NMRI-Foxn^{nu} (NMRI-nu)[♀]) drei Scaffolds implantiert. Eines subkutan in eine Hauttasche im Nacken und je eines in die rechte und linke Leiste um die freipräparierte A. und V. femoralis.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Bei der folgenden Arbeit wurde die adipogene Entwicklung von adipogenen mesenchymalen Stammzellen isoliert aus humanen Fettgewebsbiopsien gesunder Individuen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Im Zuge eines tissue engineered Ansatzes dienten biokompatible Polyurethanschäume und langzeitstabiles Fibrin als Zellträger, um mit Hilfe eines Nacktmausmodells die Gewebeentwicklung zu beobachten. Dabei wurde zum einen der Einfluss verschiedener *in vitro* Vorkultivierungsstrategien als auch die Entwicklungsstadien der adipogenen Differenzierung in Abhängigkeit von der *in vivo* Zeit erforscht.

Im Einzelnen waren die Ziele dieser Arbeit:

1. Die Entwicklung einer Methode zur effizienten Isolierung und Kultivierung humaner Präadipozyten aus Fettgewebsbiopsien gesunder Individuen.
2. Charakterisierung und Differenzierung nativer Zellen unter dem Einfluss von adipogenen Stimulationsfaktoren.
3. Besiedlung von biokompatiblen Polyurethankonstrukten mit Präadipozyten in Kombination mit einem langzeitstabilen Fibringel und nachfolgender Kultivierung *in vitro*. Dabei wurde anhand eines standardisierten Induktions- und Differenzierungsprotokolls und unterschiedlicher Kultivierungszeiten die Viabilität der Zellen innerhalb des Konstruktes sowie die Verteilung der Zellen untersucht.
4. Implantation der beimpften Konstrukte um den freipräparierten Gefäßstil der A. und V. femoralis von athymischen Nacktmäusen zur Unterstützung

der Angiogenese und der damit verbundenen Adipogenese der eingebrachten Präadipozyten.

5. Histologische Auswertung der explantierten Konstrukte unter Berücksichtigung der Menge an entstandenem Fettgewebe sowie der Vaskularisierung durch den Gefäßstil und der Formstabilität des eingebrachten Scaffolds hinsichtlich der unterschiedlichen Vorkultivierungsmethoden.

2 Material und Methoden

Alle Arbeiten wurden in Steriltechnik an einer Reinraumwerkbank durchgeführt. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Isolation und Kultivierung von Präadipozyten

Die Isolation der Präadipozyten erfolgte angelehnt an ein Präparationsprotokoll nach Hauner (2001). Das verwendete Fettgewebe wurde uns von der Gynäkologie und der Plastischen Chirurgie des Klinikums Rechts der Isar aus Mammareduktionsplastiken weiblicher Patientinnen im Alter zwischen 20 und 32 Jahren zur Verfügung gestellt (Tab.2). Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Gewebe in sterilem DMEM/Ham's F12 Medium gelagert und in das Labor der HNO-Forschung gebracht. Dort wurde es innerhalb von 12 Std. verarbeitet.

Zunächst erfolgte die Entfernung von sichtbaren Gefäß- und Bindegewebsstrukturen aus dem Fettgewebe (Abb.3A). Anschließend wurde es mit einer Schere zerkleinert bis es eine breiige Konsistenz erreichte (Abb.3B). Nach Abwiegen des Fettgewebsbreies auf einer Präzisionswaage erfolgte die Herstellung einer Verdauungslösung, wobei pro Gramm Fettgewebe 1 ml Collagen-Puffer mit je 7,5 g/500 ml Bovinem Serum Albumin (BSA) und 0,5 g/500 ml Collagenase NB4 in einem Magnetrührgerät vermischt und anschließend zum Fettgewebe gegeben wurden (Abb.3C). Zum Verdau wurde das Gemisch in einem Wärmebad, bei 37 °C, 1 bis 2 Stunden inkubiert und alle 10 bis 15 min. geschüttelt. Anschließend wurde die Verdauungslösung samt flottierenden Adipozyten auf 50 ml Falcons aufgeteilt und mit 2000 U/min. bei 37 °C für 10 min. zentrifugiert. Daraufhin entstanden drei klar voneinander abtrennbaren Schichten: zuoberst eine Ölschicht und das flottierende Fettgewebe, in der mittleren Schicht die Verdauungslösung und am Falconboden ein Zellpellet (Abb.3D). Nach vorsichtigem Abschütten der obersten Fettgewebs- und Ölschicht wurde das Pellet mit der Flüssigkeit resuspendiert, zur Entfernung restlicher Bindegewebs- und Zellreste durch ein 70 µm Zellsieb in ein weiteres 50 ml Falcon filtriert und anschließend nochmals zentrifugiert. Die Verdauflüssigkeit wurde abpipettiert und das Zellpellet aus Präadipozyten und Erythrozyten je nach Dicke mit

2 bis 4 ml Aussaatmedium resuspendiert und auf Kulturflaschen aufgeteilt. Auf die ausgesäten Zellen wurden zur Kultivierung 20 ml des Aussaatmediums ECGM gegeben. Eine genaue Auszählung der Präadipozyten war wegen der zusätzlich vorhandenen Erythrozyten zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Auf eine Erythrozytenlyse, wie in der Literatur beschrieben, wurde dennoch zum Schutz der Zellen verzichtet. Um eine Anhaftung der Präadipozyten am Boden der Kulturflasche zu garantieren, erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 24 bis 48 Std. Anschließend wurde durch 2 bis 3 maliges waschen mit PBS die nicht angehefteten Erythrozyten vom Flaschenboden ab gespült. Danach wurde wieder 20 ml Aussaatmedium auf die Präadipozyten gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage.

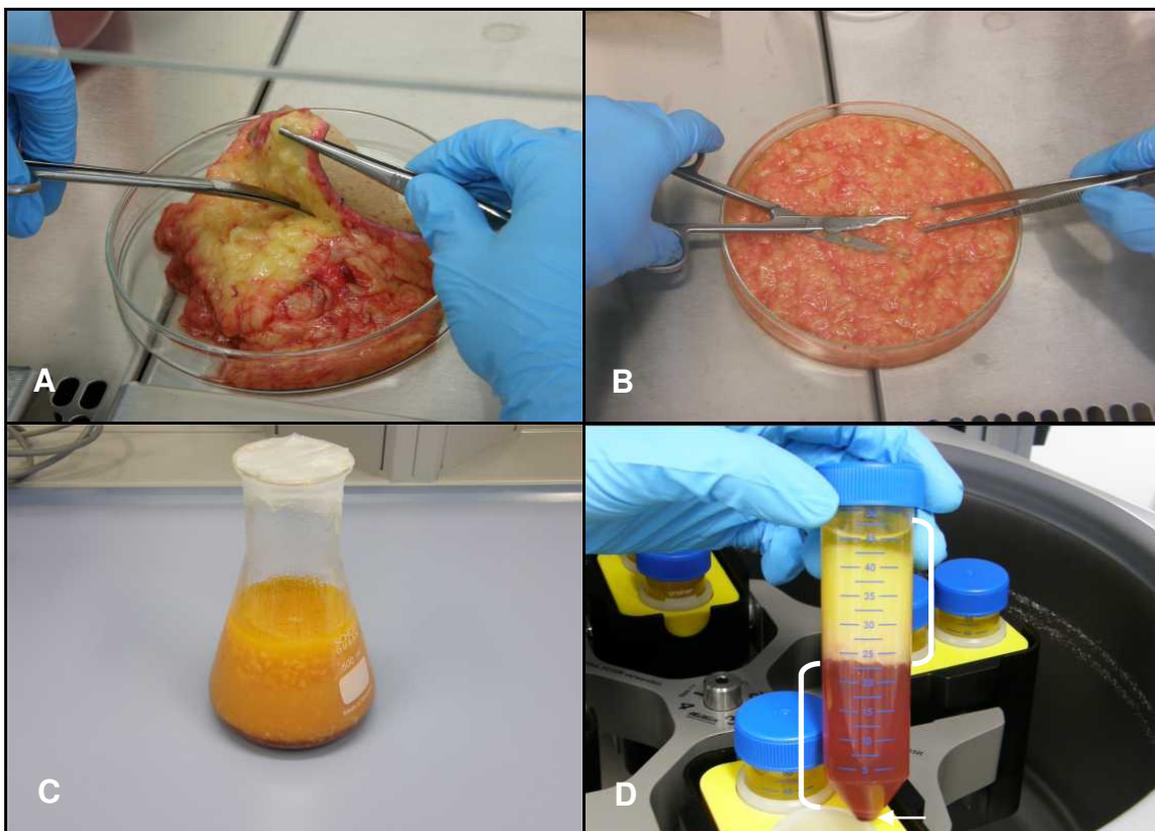


Abb. 3 Aufarbeitung des Fettgewebes

(A) Entfernen von Haut, Bindegewebe und Gefäßen. (B) Zerkleinern des Fettgewebes. (C) Fettgewebe in Verdauungslösung. (D) Schichten nach Zentrifugieren: oben: Öl + flottierende Adipozyten, Mitte: Verdauungslösung, unten (Pfeil): Zellpellet.

2.1.2 Passagierung von Präadipozyten

Ab einer Zelldichte von 70 % wurden die Zellkulturen passagiert, wobei die Primärkultur als P0 und alle folgenden Kulturpassagen als P1, P2 etc. bezeichnet wurden. Hierfür wurde zuerst das Medium aus der Kulturflasche abgeschüttet und der Boden 2- bis 3-mal mit PBS gewaschen. Nach sorgfältigem abpipettieren des PBS wurden 3 ml Trypsin/EDTA auf die am Boden anhaftenden Präadipozyten gegeben und die Kulturflasche für 4 min. in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die Zellen durch kräftiges Klopfen vom Flaschenboden gelöst und die Ablösung unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 6 ml ECGM gestoppt und die nun noch anhaftenden Zellen durch vorsichtige Resuspension mit einer Pipette vom Flaschenboden gelöst. Das Gemisch aus Präadipozyten, Trypsin und ECGM wurde in ein 50 ml Falcon gegeben und bei 2000 U/min. und 37 °C für 10 min. zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die Flüssigkeit über dem entstandenen Zellpellet vorsichtig entfernt und dieses mit 1 ml ECGM vermischt. Von diesem Gemisch wurden 10 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, mit 10 µl Trypanblau-Lösung 0,4 % resuspendiert, in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Blau gefärbte, geschädigte Zellen wurden nicht berücksichtigt. Anschließend wurden die Präadipozyten mit einer Dichte von ca. 1 Million Zellen pro Kulturflasche in 20 ml Medium ausgesät. Nach wiederholtem Erreichen einer Zelldichte von 70 % wurden die Präadipozyten erneut passagiert (P2, P3, ...), ausdifferenziert oder in Polyurethangerüste gebracht.

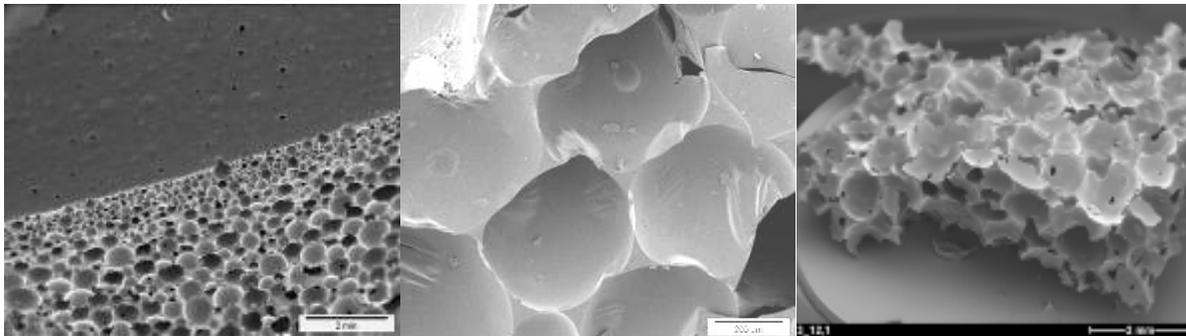
2.2 Trägermaterial

Als Trägermaterial wurden Polyurethanschäume der Firma Polymaterials AG (Kaufbeuren, Germany) verwendet. Dieser Poly-ε-caprolactone basierte Polyurethanschaum wird laut Herstellerangaben mittels eines Zwei-Komponenten Gießverfahrens hergestellt. Hierbei entsteht ein biodegradabler, porenreicher Schaum aus vernetztem Polyesterpolyurethan auf Basis von aliphatischen Diisocyanaten.

Die Porosität wurde mittels Quecksilberporosimetrie ermittelt und ergab eine Porosität von bis zu 85 %. Die Größe der Poren liegt zwischen 80 und 250 µm. Das

Vorhandensein von Porendurchgängen, also von Interkonnexionen zwischen den Poren, wurde mittels Porosimetrie und mikroskopischer Kontrolle nachgewiesen und gemessen. Hierbei zeigt sich ein Durchmesser der Durchgänge von 20-80 μm (Abb.4).

In unserer Tissue Engineering Arbeitsgruppe wird schon seit einiger Zeit erfolgreich mit diesem Material gearbeitet. Sowohl mit Chondrozyten als auch mit Adipozyten konnten schon positive Ergebnisse erzielt und die Biokompatibilität des Polyurethans bestätigt werden (Feucht, Hoang 2011; Rittler-Ungethüm 2012; Gehrke 2013; Leuthner 2014).



Quelle: Firma Polymaterials AG (Kaufbeuren, Germany)

Abb. 4 Polyurethan unter dem REM

2.2.1 Vorbereitung der Polyurethanschäume

2.2.1.1 Verarbeitung der Polyurethanschäume

Die Polyurethanschäume wurden in runden Blöcken mit einem Durchmesser von ca. 8 cm und einer Dicke von ca. 3 cm geliefert. Um die für die Implantationen nötigen Konstrukte mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Dicke von 2 mm zu bekommen, wurden die Böcke in flüssigen Stickstoff getaucht, mit einem Skalpell in 2 mm breite Streifen geschnitten und mit einer 5 mm Biopsiestanze ausgestanzt.

2.2.1.2 Sterilisierung der Polyurethanschäume

Zur Sterilisierung der fertigen Polyurethanschäume wurden diese zunächst 5 min. in 70 %-igem Alkohol und anschließend 2-mal in PBS gewaschen. In einer mit PBS gefüllten Glasflasche wurden sie anschließend autoklaviert.

2.2.2 Herstellung des Zellmatrixklebers

Die Fixierung der ASCs im dreidimensionalen Polyurethanschaum erfolgte mittels eines Zellklebers. Hierfür wurden bei Raumtemperatur 5 g Fibrinogen in 50 ml Trasyolol gelöst. Das entstandene Fibringel wurde daraufhin in Aliquots zu 1 bis 2 ml abgefüllt und bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert. 1 ml Thrombin wurde in 100 ml Thrombinpuffer bei Raumtemperatur gelöst, ebenfalls in Aliquots zu 1 bis 2 ml abgefüllt und ebenfalls bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert. Bei einer Mischung von 1:1 kurz vor Verarbeitung wurde aus den zwei aufgetauten Komponenten eine auspolymerisierte Fibrin-Thrombin-Matrix.

2.2.3 Beimpfen der PU-Schäume mit Zellmatrixkleber und Präadipozyten

Um die PUs zu beimpfen, wurden zunächst Präadipozyten aus der P1 Passage, wie unter Punkt 2.1.2 beschrieben, vom Kulturflaschenboden gelöst, zentrifugiert und mit Trypan-blau unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Nach Ermitteln der Zellzahl wurde das Zell-Medium-Gemisch nochmals mit 2000 U/min. bei 37 °C für 10 min. zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Da die ausgestanzten PUs ein Volumen von 40 µl aufnehmen können und jedes mit 1 Million Zellen beimpft werden sollte, wurden je 1 Million Präadipozyten zunächst mit 20 µl Thrombin und anschließend mit 20 µl Fibrinogen vermischt und in die PUs pipettiert. Bis zur vollständigen Auspolymerisation wurden die beimpften PUs für 15 bis 20 min. im Brutschrank aufbewahrt. Zur Inkubation wurden die beimpften Scaffolds aller Gruppen für 2 Tage in eine Kulturflasche mit 25 ml ECGM gegeben.

2.2.4 Induktion und Differenzierung - Experimentelle Abfolge adipogener Differenzierung

Mittels verschiedener Wachstumsfaktoren kann *in vitro* eine Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten eingeleitet werden. Zunächst wurde durch den Austausch des Basalmediums mit 20 ml eines Induktionsmediums (Herstellung siehe Reagenzien) die Proliferation der Präadipozyten gehemmt und eine Differenzierung eingeleitet. Nach zwei Tagen wurde das Induktionsmedium durch 20 ml eines Differenzierungsmediums (Herstellung siehe Reagenzien) ersetzt, welches weiterhin die Adipogenese der Zellen stimuliert.

2.3 *In vivo* Versuche

2.3.1 Versuchstiere (NMRI-Foxn^{nu} (NMRI-nu) ♀)

Als präklinisches *in vivo* Modell hat sich die athymische Nacktmaus (Deletion im FOXN-1 Gen) der Firma Charles River (Sulzfels, Germany) bei uns sowie in zahlreichen anderen Studien bewährt und wurde auch weiterhin als Modellsystem benutzt. Aufgrund der fehlenden adaptiven Immunität ist es möglich, auch humane Zellen oder Gewebe in die Nacktmaus zu implantieren um deren Entwicklung *in vivo* zu analysieren. Typischerweise kommt es zu keinen Abstoßungsreaktionen. Damit kann eine klinische Situation am naheliegendsten simuliert werden.

Für den Versuchsaufbau wurden insgesamt 45 (+3) Versuchstiere in einem Alter zwischen 6 bis 7 Wochen benötigt.

Die Unterbringung der Tiere erfolgte in den Tierhaltungsräumen des Präklinischen Forschungszentrums des Klinikums Rechts der Isar, zur Akklimatisierung schon eine Woche präoperativ. Hier wurden die Versuchstiere in speziellen Käfigen zur Haltung von Mäusen untergebracht, wobei immer 4 bis 6 Mäuse in einen Käfig gesetzt wurden. In den Haltungsräumen wurde ein geregelter Hell-Dunkel-Zyklus von je 12 Stunden mit Dämmerphasen sowie artgerechter Klimatisierung eingehalten. Autoklaviertes Futter (Mäusefutter Fa. Altromin) sowie Wasser (autoklaviertes Trinkwasser) erhielten die Tiere ad libitum. Als Einstreu diente spezielles Holzgranulat mit bis zu zwei Wechseln die Woche und Zellstoff als Nestbaumaterial. Die Pflege erfolgte sowohl durch den Operateur selbst als auch durch ausgebildete Versuchstierpfleger.

Hygienebestimmungen erfolgt gemäß den Empfehlungen der FELASA.

Genehmigt durch die Regierung von Oberbayern. Gz.: 55.2-1-54-2532-130-11

2.3.2 Einteilung der Gruppen

Zur Evaluation der optimalen *in vitro* Kultivierungsmethoden der mit Präadipozyten beimpften Polyurethanschäume vor der Implantation *in vivo* wurden verschiedene Gruppen mit unterschiedlichen Kultivierungszeiten und -medien angesetzt (Tab.1).

Tab. 1 Einteilung der Gruppen

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeitraum
Gruppe 1	2 Tage	---	---	1, 12, 24 Wochen
Gruppe 2	2 Tage	2 Tage	---	1, 5, 12, 24 Wochen
Gruppe 3	2 Tage	2 Tage	7 Tage	1, 5, 12, 24 Wochen
Gruppe 4	2 Tage	2 Tage	33 Tage	1, 5, 12, 24 Wochen

2.3.1.1 Gruppe 1

Nach der Beimpfung der Konstrukte mit dem Fibrin-Präadipozyten-Gemisch erfolgte eine zweitägige Inkubation bei 37 °C *in vitro*. Anschließend wurden die Konstrukte den Mäusen der Gruppe 1 sofort implantiert. Die *in vivo* Zeit in Gruppe 1 betrug 1, 12 und 24 Wochen. Proben der Woche 5 wurden von Vorversuchen mit derselben Vorkultivierung genommen, um nicht weitere Versuchstiere zu benötigen.

2.3.1.2 Gruppe 2

In Gruppe 2 folgte der zweitägigen Inkubation eine Induktion der Zellen, um die Proliferation der Präadipozyten zu stoppen und die Differenzierung zu reifen Adipozyten einzuleiten. Das ECGM wurde sorgfältig abpipettiert und durch 25 ml Induktionsmedium ersetzt. Nach weiteren zwei Tagen im Brutschrank wurden die Konstrukte den Mäusen implantiert. Die *in vivo* Zeit in Gruppe 2 betrug 1, 5, 12 und 24 Wochen.

2.3.1.3 Gruppe 3

Die PUs der Gruppe 3 wurden wie in Gruppe 2 nach zweitägiger Inkubation ebenfalls zwei Tage induziert, anschließend aber noch für 7 Tage im Brutschrank in Differenzierungsmedium gegeben, um die weitere Adipogenese anzuregen. Hierfür wurde wiederum das Induktionsmedium sorgfältig abgezogen und durch 25 ml

Differenzierungsmedium ersetzt. Nach Ablauf der 7 Tage wurden die Konstrukte in die Mäuse eingebracht. Die *in vivo* Zeit in Gruppe 3 betrug 1, 5, 12 und 24 Wochen.

2.3.1.4 Gruppe 4

In Gruppe 4 erfolgte ebenfalls nach der zweitägigen Inkubation eine zweitägige Induktion und im Anschluss daran wurden die PUs bis zur Implantation für 33 Tage in ein Differenzierungsmedium gegeben. Die *in vivo* Zeit betrug in der vierten Gruppe 1, 5, 12 und 24 Wochen (Tab.4).

2.3.3 Implantation der Konstrukte (Zell-Matrix-Konstrukte)

Vor der Narkose erfolgte eine präemptive Gabe des Schmerzmittels Metacam mit einer Dosis von 0,2 mg/kgKG s.c. Die Narkotisierung der Versuchstiere erfolgte mittels einer Injektion von MMF i.p. (Medetomidin, Midazolam, Fentanyl im Verhältnis 0,5 / 5 / 0,05 µg/gKG). Um eine Unterkühlung der Maus zu verhindern, wurde die Operation auf einer 42 °C beheizten Wärmplatte durchgeführt. Es wurde jeweils an der rechten und linken Leiste sowie am Rücken operiert. Zur Reinigung der Haut im Operationsgebiet wurde ein Hautdesinfektionsmittel verwendet. Die gesamte OP fand unter einem OP-Mikroskop statt.

Mittels einer Mikrochirurgie-Schere erfolgte eine ca. 8 mm lange Inzision im Leistenbereich, direkt über dem femoralen Gefäßbündel (Abb.5A). Anschließend wurde durch stumpfe Präparation mit einer Pinzette das Gefäßbündel freigelegt und der Nerv von Arterie und Vene getrennt (Abb.5B). Durch vorsichtiges unterminieren wurden A. und V. femoralis mobilisiert und eine 6 mm breite und 40 mm lange Silikonfolie darunter gelegt (Abb.5C). Nachfolgend wurde ein beimpftes PU-Konstrukt aus dem Brutschrank entnommen, vorsichtig mit einem Skalpell seitlich bis zur Hälfte eingeschnitten und um das Gefäßbündel angebracht (Abb.5D+E). Anschließend wurde die Silikonfolie um das Konstrukt gelegt und mit zwei Einzelknopfnähten vernäht (Abb.5F). Der Wundverschluss erfolgte über mehrere Einzelknopfnähte (Abb.5G+H).

Am Rücken wurde zwischen den Schulterblättern ebenfalls eine ca. 8 mm lange Inzision angebracht. Als Kontrolle wurde hier ein Konstrukt ohne Gefäßanschluss direkt in eine vorher stumpf präparierte Hauttasche zwischen Haut- und Muskelfaszie

eingbracht. Zur Abschirmung vom umliegenden Gewebe erfolgte auch hier vorher eine Ummantelung des Konstrukts mit einer Silikonfolie (Abb.5I).

Zur Wiedererkennung wurden die Ohren der Mäuse mit einer Lochzange markiert.

Um eventuellen Infektionen vorzubeugen erfolgte eine Injektion von 0,02 ml Baytril und zur Narkoseausleitung eine körporgewichtsabhängige Injektion von AFN (Atipamezol, Flumazenil, Naloxon im Verhältnis 2,5 / 0,5 / 1,2 µ/gKG).

Eine tägliche Kontrolle des Gesundheitszustands der Mäuse erfolgte durch uns und das Tierpflegepersonal. In der ersten postoperativen Woche wurden die Wunden und der Zustand der Mäuse täglich durch den Operateur überprüft. Ebenfalls erfolgte an den ersten beiden postoperativen Tagen eine wiederholte Gabe des Schmerzmittels Metacam (Dosis s.o.).

Anschließend erfolgte durch uns 2- bis 3-mal wöchentlich eine Kontrolle des Zustands der Mäuse. Tierpflegepersonal kontrollierte zudem täglich den Zustand der Tiere.

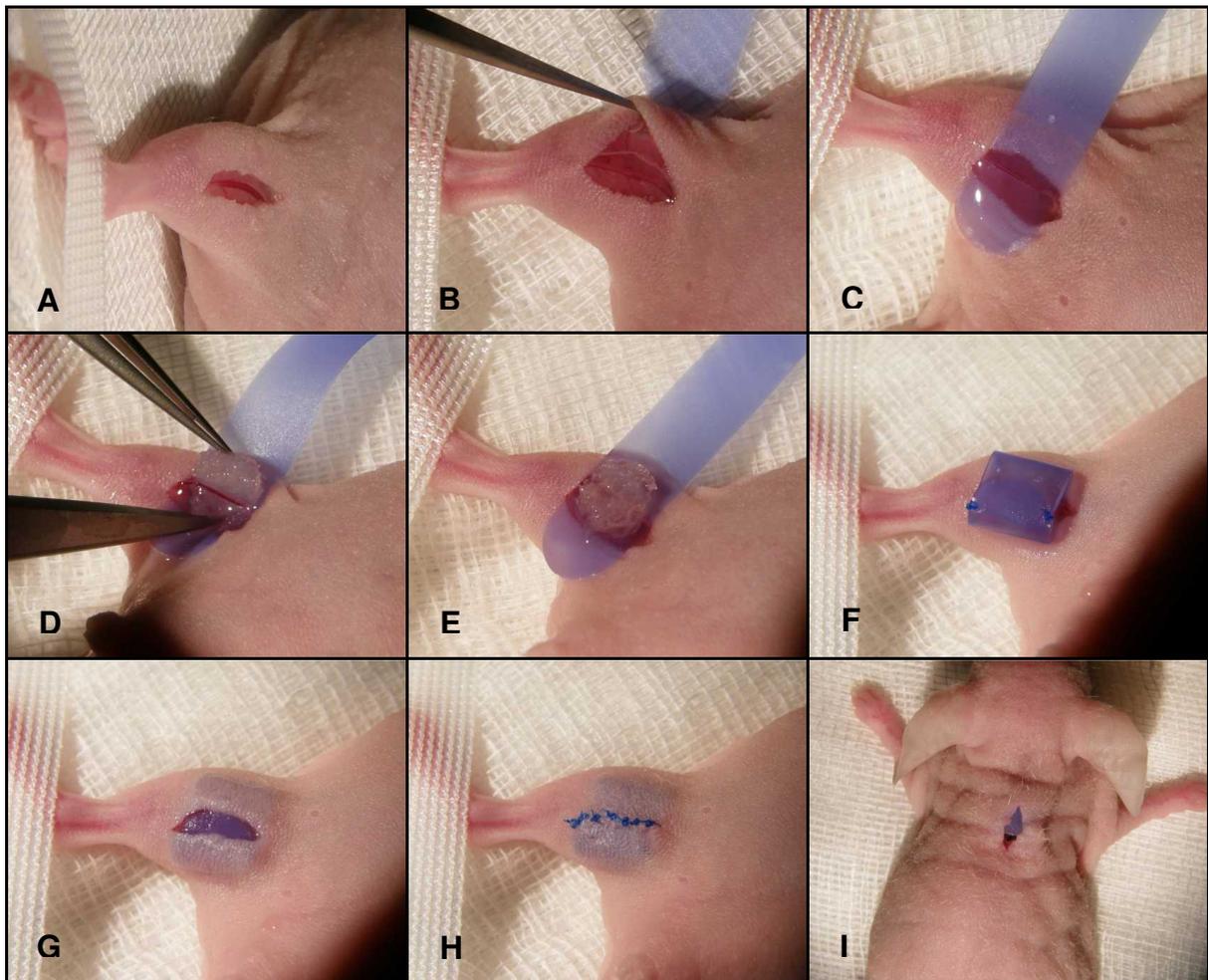


Abb. 5 Implantation der Konstrukte

(A) Ca. 8 mm Inzision in der rechten Leiste. (B) Ablösen des Nerves von A. und V. femoralis. (C) Mobilisierung des Gefäßbündels und Einbringen der Silikonfolie. (D) PU seitlich eingeschnitten und um Gefäßbündel gelegt. (E+F) PU mit Durchlaufgefäß und von Silikonfolie umhüllt. (G+H) Annäherung der Wundränder und Verschluss mit Einzelknopfnähten. (I) Inzision im Nacken mit Konstrukt (von Silikonfolie umhüllt).

2.3.4 Explantation der Konstrukte

Zur Explantation erfolgten wieder eine gewichtsabhängige Narkose mit MMF und eine Inzision in der Leistengegend bzw. am Rücken. Durch die Silikonfolie konnte das Konstrukt schnell aufgefunden werden. Zuerst musste eine Bindegewebskapsel, die sich um die Silikonfolie gebildet hatte, unter Schonung des Gefäßbündels vorsichtig durchtrennt werden. Nach Entfernung der Silikonfolie wurde das Konstrukt dargestellt und überprüft, ob durch das Gefäßbündel ein adäquater Durchfluss gegeben war. Anschließend wurde zur Vermeidung übermäßiger Blutung und Kontamination des Explantates eine Ligatur um das distale und proximale Ende des

Gefäßes gelegt und dieses mit einer Schere durchtrennt. Das Konstrukt der rechten Leiste wurde für Gefrier-, das der Linken für Paraffinschnitte vorbereitet. Das Kontrollkonstrukt wurde halbiert und je eine Hälfte ebenfalls für Gefrier-, die andere für Paraffinschnitte verwendet. Die Tötung des Versuchstieres erfolgte tierschutzgerecht mittels Genickbruch in Narkose.

2.4 *In vitro* Versuche

Parallel zu den *in vivo* Versuchen erfolgten *in vitro* Versuche.

2.4.1 Einteilung der Gruppen

Um herauszufinden welche Vorkultivierung die besten Ergebnisse liefert erfolgte eine Einteilung in vier Gruppen in welchen unterschiedliche Methoden getestet wurden.

2.4.1.1 Gruppe 1

Die mit Präadipozyten beimpften Scaffolds der Gruppe 1 wurden, entsprechend zu den *In vivo* Versuchen, zwei Tage in ECGM inkubiert und danach für 1, 5, 12 und 24 Wochen in Differenzierungsmedium gegeben, um die Reifung der Präadipozyten in Adipozyten einzuleiten.

2.4.1.2 Gruppe 2

In Gruppe 2 wurden, wie in den *in vivo* Versuchen, die beimpften PUs zwei Tage inkubiert und anschließend zwei Tage induziert. Danach wurden sie 1, 5, 12 und 24 Wochen in Differenzierungsmedium ausdifferenziert.

2.4.1.3 Gruppe 3

Wie im *In vivo* Modell wurden die PUs zwei Tage inkubiert, zwei Tage induziert und 7 Tage differenziert. Anschließend wurden sie für 1, 5, 12 und 24 Tage in Differenzierungsmedium gegeben.

2.4.1.4 Gruppe 4

Auch in Gruppe 4 wurden die beimpften Scaffolds, wie am *in vivo* Modell, zwei Tage inkubiert, zwei Tage induziert und 33 Tage differenziert, bis sie für 1, 5, 12 und 24 Wochen in Differenzierungsmedium gegeben wurden (Tab.3).

2.5 Histologie und Auswertung

Bei der Auswertung wurden unterschiedliche Verfahren und Färbungen angewandt.

2.5.1 Gewebeeinbettung und histologische Aufbereitung

Die Proben wurden mit zwei verschiedenen Konservierungsmethoden eingebettet. Zum einen mittels Paraffineinbettung und zum anderen mittels Kryoeinbettung.

2.5.1.1 Paraffineinbettung

Direkt nach der Explantation wurden die Konstrukte in ein mit 4 %-igem Formalin gefülltes Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 24 Stunden wurden diese in das Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie gegeben, wo eine Entwässerung und eine Paraffinummantelung der Konstrukte stattfanden. Im Anschluss daran erfolgte das Einbetten der Scaffolds so, dass die Schnittfläche parallel zum Gefäß lag, d.h. so, dass kreisrunde Schnitte angefertigt werden konnten.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Paraffinblöcke in ein Mikrotom eingespannt, 7 µm dünn geschnitten und in ein 45 °C warmes Wasserbad gegeben. Daraufhin wurden sie vorsichtig auf einen Super Frost Plus Objektträger aufgenommen, getrocknet und bis zur Färbung in einer Aufbewahrungsbox bei Raumtemperatur gelagert.

2.5.1.2 Kryoeinbettung

Für die Kryoschnitte wurden die Konstrukte ebenfalls direkt nach dem Explantieren anhand eines vorgegebenen Protokolls weiterverarbeitet. Zunächst erfolgte eine 30-minütige Inkubation in MEFO und anschließend 3-mal ein 10-minütiges Waschen mit

PBS. Nach diesem Vorgang wurden die Konstrukte je 30 min. in eine 10 %-ige und eine 20 %-ige Succroslösung gelegt und im Anschluss in einer 30 %-igen Succroslösung für 12 bis 24 Std. im Kühlschrank bei 2 bis 8 °C gelagert. Anschließend erfolgte abermals eine 6 bis 8-stündige Inkubation in Tissue-Tek. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Konstrukte im Gefrierfach bei -20 °C gelagert. Die Blöcke wurden an einem Kryotom ebenfalls 7 µm dick geschnitten, auf Super Frost Plus Objektträger aufgenommen und bis zur Färbung in Aufbewahrungsboxen bei -20 °C im Gefrierfach gelagert.

2.5.2 Trichromfärbung nach Ladewig

Mit der Trichromfärbung nach Ladewig werden u.a. die Erythrozyten orange rot angefärbt, wodurch Blutgefäße leicht erkannt werden können. Weiter werden angefärbt: Zellkerne schwarz, Zytoplasma rot, Kollagen blau (Mulisch and Welsch 2010, S.215 ff.).

Gefärbt wurde nach folgendem Protokoll:

Entparaffinisierung und Rehydratation:

Xylol	5 min.
Xylol	5 min.
Isopropanol 100 %	2 min.
Isopropanol 100 %	2 min.
Ethanol 96 %	2 min.
Ethanol 96 %	2 min.
Ethanol 70 %	2 min.
Ethanol 70 %	2 min.
Dest. Wasser	5 min.

Färbung:

Eisenhämatoxylin nach Weigert (Kernfärbung)	5 min.
Bläuen unter fließendem Wasser (ca. 37 °C)	5 min.
Beizen in 1 %iger Phosphorwolframsäure	1 min.

Entwässern und Eindecken:

Dest. Wasser	0,5 min.
Ethanol 70 %	5 sec.
Ethanol 70 %	5 sec.
Ethanol 96 %	5 sec.
Ethanol 96 %	5 sec.
Isopropanol 100 %	5 sec.
Isopropanol 100 %	2 min.
Xylol	5 min.
Xylol	5 min.
Eindecken mit Deckglas	

2.5.4 Antikörperfärbung mit Vimentin-Antikörper SP20

Ziel der immunhistologischen Färbung ist die optische Darstellung exprimierter Proteine auf der Oberfläche von Zielgeweben.

Mit der Immunhistologischen Färbung mit einem Antikörper gegen das humane Matrixprotein Vimentin soll eine spezifische Anfärbung der humanen Zellen (Prädipozyten sowie Adipozyten) in den Konstrukten erfolgen. Somit soll eine Unterscheidung zwischen murinen und humanen Zellen erreicht werden.

Gefärbt wurde nach folgendem Protokoll: Nach der Entparaffinisierung und Rehydratation (siehe Färbungen oben) der Schnitte im Zuge der absteigenden Alkoholreihe wurde das Protokoll des ZytoChem-Plus AP Polymer-Kits der Firma Zytomed verwendet. Das Prinzip der Polymerfärbung beruht auf dem Einsatz eines Enzym-Polymers, bei dem mehrere Moleküle Sekundärantikörper mit mehreren Molekülen Alkalische Phosphatase (AP) kovalent verbunden sind. Dabei erfolgt die Visualisierung gemäß einer Enzym-Substratreaktion in Gegenwart einer farbgebenden Komponente (Fast red), die schließlich eine mikroskopische Auswertung ermöglicht. Positiv gefärbte Bereiche erscheinen dabei leuchtend rot. Durch Gegenfärbung mit Hämalaun werden die negativen Bereiche blau angefärbt. Der in diesem Protokoll verwendete Vimentin- Antikörper war der monoklonale Antikörper SP20. Dabei handelt es sich um einen humanspezifischen Antikörper, der durch Immunisierung von Kaninchen produziert wurde.

Nach dem Entparaffinisierungsprozess wurden die Schnitte kurz in PBS gespült und dann einer enzymatischen Antigendemaskierung mit Digest All-3 unterzogen. Dabei wurden die Schnitte auf einem Papiertuch abgetropft und auf die Stege einer feuchten Kammer gelegt. Die Enzymlösung wurde tropfenweise auf die Schnitte

aufgebracht und die geschlossene Kammer dann im Inkubator für 10 min. bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut auf einem Papiertuch abgetropft, in eine Glasküvette mit PBS überführt und für 3 min. gewaschen. Dieser Vorgang des Waschens erfolgte weitere 2-mal. Danach wurden die Schnitte wieder in die feuchte Kammer überführt und mit der im Polymerkit befindlichen Blockierungslösung behandelt. Bei der Blockierlösung handelt es sich um eine Proteinlösung, die das Abblocken freier Bindungsstellen auf den Schnitten gewährleisten soll. Die Inkubation der Schnitte erfolgte bei 30 min. bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte wieder in eine Glasküvette überführt, diesmal aber mit Waschpuffer gewaschen. Dabei handelt es sich um den 20-fach konzentrierten Waschpuffer der Firma Zytomed, der 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde.

Nach dem Waschen (1x für 5 min.) mussten die Schnitte wieder gut abtropfen und in die feuchte Kammer gelegt werden. Sofort wurde der im Verhältnis 1:200 mit Reagent Diluent verdünnte Primärantikörper Vimentin-SP20 aufgetropft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C (im Kühlschrank).

Am nächsten Tag wurde der Antikörper in 3 aufeinander folgenden Waschschritten für 5 min. in Waschpuffer gewaschen. Danach musste das AP-Polymer-anti-rabbit aufgetropft und die Schnitte 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert werden. Danach erfolgten wieder 3 Waschschriffe von jeweils 5 min., bevor das Substrat aufgebracht wurde. Dabei handelte es sich um das Chromogen Fast Red, das zuvor mit einer AP-Red Pufferlösung (pro ml der mit 16 µl Chromogen mischen) angemischt wurde. Nach Auftropfen des Chromogens und Inkubation von ca. 10 min. wurde die Farbreaktion durch Spülen in destilliertem Wasser gestoppt. Danach erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun für 10 min. Nach dem Bläuen unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte wieder gemäß der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (siehe Protokoll oben) und schließlich mit Roti-Histo-Kitt II eingedeckelt.

2.5.5 Öl-Rot-Färbung

Es wurden Öl-Rot-Färbungen in der Zellkulturflasche und an den Kryoschnitten durchgeführt.

2.5.5.1 Öl-Rot-Färbung in der Zellkulturflasche

Zum Nachweis von adulten Fettzellen wurden die Zellen ausgewählter Proben schon in der Kulturflasche induziert und differenziert. Nach optischer Kontrolle der Fettzellreifung erfolgte nach ca. 12 bis 14 Tagen eine Anfärbung dieser mit Öl-Rot. Hierfür wurden 10 ml 10 %-igen Formalins auf das in der Kulturflasche befindliche Medium gegeben und für 15 min. in den Brutschrank gestellt. Nach sorgfältigem Abziehen der Flüssigkeit aus der Kulturflasche wurden 15 ml 10 %-igen Formalins auf den Flaschenboden gegeben und 5 Std. im Kühlschrank inkubiert. Abermals wurde das Formalin abgezogen und 10 ml einer Öl-Rot-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach 2 Std. im Kühlschrank konnte die Öl-Rot-Lösung abgegossen und der Flaschenboden 2- bis 3-mal mit PBS gewaschen werden. Zum mikroskopieren und fotografieren wurde der Flaschenboden mit 10 ml PBS benetzt.

2.5.5.2 Öl-Rot-Färbung der Kryoschnitte

Zur Färbung der Kryoschnitte wurden diese zunächst aus dem Gefrierfach genommen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden zuerst für 15 min. in 4 %-iges Formalin getaucht, für 5 min. in PBS gewaschen und kurz in 60 %-iges Isopropanol gegeben. Anschließend wurden sie für 1 Std. in einem mit Öl-Rot-Lösung gefüllten Färbekasten gegeben und zuletzt mit dest. Wasser gewaschen. Zum Einbetten wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine benetzt und mit einem Deckglas abgedeckt.

2.5.6 Lebend-Tot-Färbung

Neben den histologischen Untersuchungen der *in vitro* Konstrukte wurden diese auch vor ihrer Implantation in die Maus auf ihre Viabilität hin überprüft. Die mit Präadipozyten und Fibrin besiedelten PU-Konstrukte wurden gemäß ihrer *in vitro* Kultivierungszeiten (Gruppe 1 bis 4) einer Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung unterzogen. Ausgehend von einem Gemisch aus Fluorescein Diacetat (25 mg/ml) und Propidium Iodide (1 mg/ml), in dem die Konstrukte für 30 Sek. inkubiert wurden, lassen sich im Fluoreszenzmikroskop lebende grüne Zellen von sterbenden roten Zellen gut unterscheiden. Das Prinzip beruht darauf, dass gesunde Zellen Fluorescein-Diacetat durch die hydrolytische Aktivität membranständiger Enzyme

(Proteasen, Esterasen) zu Fluorescein spalten, welches im Fluoreszenzmikroskop unter blauem Licht grün leuchtet. Propidium Iodid lagert sich an die DNA an und färbt diese rot, daher kann dieser Farbstoff nur in die löchrige Membran toter Zellen eindringen und dort die Nukleinsäuren in der Zelle rot anfärben.

2.5.6 Fotografien

Die Fotografien wurden mit einem Leica-Durchlichtmikroskop durchgeführt.

2.5.6.1 Zellkultur

Zur Dokumentation des Wachstumsverhaltens und der Wachstumsgeschwindigkeit der Präadipozyten sowie nach erfolgreicher Öl-Rot-O-Färbung in der Kulturflasche, wurden diese mit einem Leica-Durchlichtmikroskop bei 5-, 10- und 20-facher Vergrößerung abfotografiert und mit der entsprechenden Software (Leica application) bearbeitet.

2.5.6.2 Histologie

Die gefärbten Schnitte wurden ebenfalls mit dem Leica-Durchlichtmikroskop bei einer 5-fachen Vergrößerung abfotografiert. Hierfür wurde im Bearbeitungsprogramm "Leica application" die spezielle Einstellung "Multi Step" gewählt, welche nach genauer Programmierung den ausgewählten Schnitt schrittweise automatisch abfotografierte. Anschließend konnten die einzelnen Fotos, dank einer voreingestellten, minimalen Überlagerung in Adobe Photoshop CS5 aneinandergesetzt werden so entstand ein Bild mit dem kompletten Schnitt.

2.5.7 Auswertung

Die Auswertung der zusammengeführten Bilder erfolgte ebenfalls mit Adobe Photoshop CS5.

Zu Beginn wurden die Flächen der einzelnen Konstrukte vermessen, um deren Formstabilität zu beurteilen. Um dies zu überprüfen, wurden mittels Photoshop die

Flächen der einzelnen Schnitte berechnet und mit der Ausgangsgröße ($A = 19,625 \text{ mm}^2$ ($d = 5 \text{ mm} \Rightarrow A = \frac{\pi \cdot d^2}{4}$)) des Polyurethanschaums verglichen. Da bei der Explantation die Gefäße eher entfernt vom Konstrukt abgeschnitten wurden, um dieses nicht zu beschädigen, ist auf den Bildern überschüssiges, für die Auswertung unnützes Gewebe zu erkennen. Um die Fläche des Implantates zu messen, diente der auf den Schnitten deutlich sichtbare Polyurethanschaum als Begrenzung.

Nach Festlegung der Grenzen des Konstruktes wurden innerhalb dieser die Blutgefäße einzeln mit einem Zählprogramm ausgezählt. Aufgrund der Trichromfärbung nach Ladewig konnten diese durch die orange gefärbten Erythrozyten gut erkannt werden.

Die Auszählung der Fettzellen erfolgte auch nur innerhalb der berechneten Fläche, um die tatsächliche Adipozytenzahl im Konstrukt festzustellen und nicht eine Verfälschung der Ergebnisse durch am Rand anhaftendes Fettgewebe zu erhalten. Diese Auszählung erfolgte auch wieder von Hand unter zu Hilfenahme der Auszählfunktion von Photoshop, mit welcher schon ausgezählte Zellen, markiert und dokumentiert werden konnten (Abb.6A+B). Gezählt wurden nur Zellen die die Form und Größe von nativen Adipozyten hatten und die den typisch an den Rand gedrängten Zellkern aufwiesen. Eine automatisierte Auszählfunktion mit dem Programm Image J wurde ausprobiert, allerdings waren nach Kontrolle der Ergebnisse diese nicht genau genug.

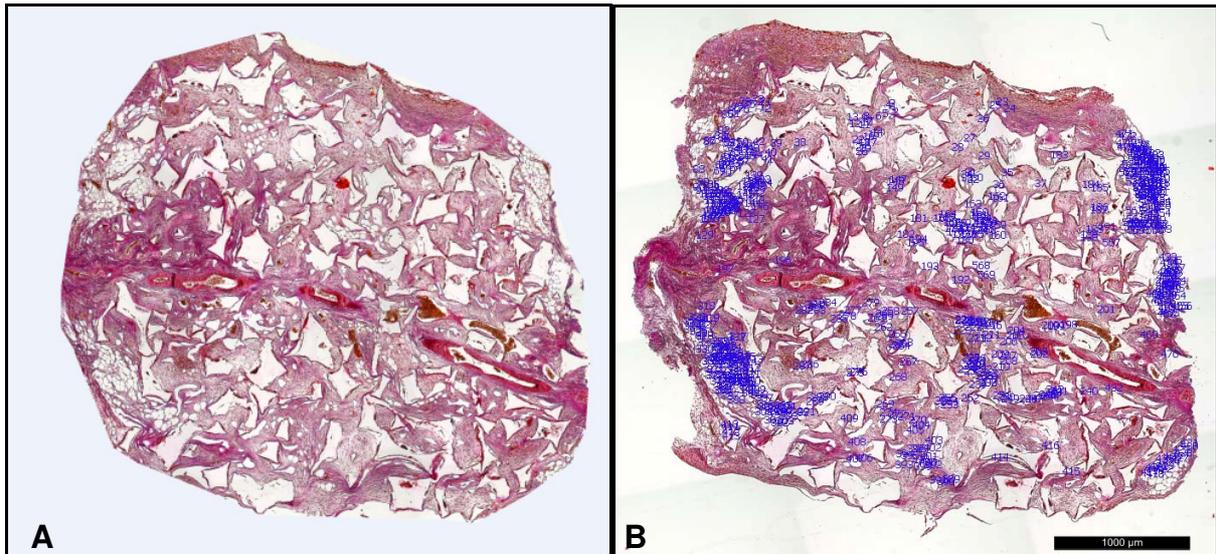


Abb. 6 Auswertung der Konstrukte

Zu Beginn erfolgte mittels Photoshop das Zuschneiden des Konstruktes, wobei das PU als Grenze diente (**A**), anschließend wurde das zugeschnittene Konstrukt von Hand ausgezählt (**B**).

Um den prozentualen Anteil der Adipozyten auf die Gesamtfläche des Konstruktes auszurechnen, musste zunächst ein Durchschnittswert für die Fläche eines einzelnen Adipozyten berechnet werden. Hierfür wurden 6 Flächen aus verschiedenen Gruppen und Zeiträumen mit homogen durchwachsenen Fettzellen (ohne andere störende Gewebsarten) ausgesucht. Diese Flächen wurden wiederum mittels Photoshop berechnet, die Zahl der Fettzellen bestimmt und somit die Fläche eines einzelnen Adipozyten berechnet ($A = 1500 \mu\text{m}^2$).

Die Auswertung der Antikörperfärbungen erfolgte ebenfalls an per Photoshop zusammengeführten Bildern. Hierbei konnten die humanen Zellen anhand ihrer deutlichen Rotfärbung von den murinen (Braunfärbung) unterschieden und ausgezählt werden.

Dokumentiert und ausgewertet wurden alle Ergebnisse mit Microsoft® Office Excel 2003.

2.6 Materialien

Für die Durchführung dieser Arbeit wurden folgende Geräte, Verbrauchsmaterialien, Medien und Reagenzien verwendet:

2.6.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Petrischale (60 x 15 mm, FA Sarstedt, Newton, USA)
- Präzisionswaage (FA Scaltec, Göttingen, Germany)
- Magnetrührgerät (FA IKA, Staufen, Germany)
- Schüttler (FA GFL, Burgwedel, Germany)
- Falcons (PP-Test tubes, 50 ml sterile, FA Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)
- Zentrifuge (FA Hettich, Tuttlingen, Germany)
- Zellsieb (Cell Strainer 70 µm Nylon, FA BD Falcon, Erembodegem, Belgium)
- Pipettus Pipetboy (FA Integra Biosciences, Fernwlad, Germany)
- Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, FA BD Falcon, Erembodegem, Belgium)
- P75 Kulturflaschen (Tissue Culture Flask 75 cm², FA Sarstedt, Newton, USA)
- P25 Kulturflaschen (Nunc Flasks Nunclon 25 cm², FA Nunc, Roskilde, Denmark)
- Zählkammer (FA Hycor, Amstelveen, Netherlands)
- OP-Mikroskop (FA Carl Zeiss, Jena, Germany)
- Mikrochirurgisches Besteck (FA Braun, Melsungen, Germany)
- Silikonfolie, blau (FA Gyrus Medical GmbH, Tuttlingen, Germany)
- Skalpell (FA Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan)
- Lochzange (FA Aesculap, Tuttlingen, Germany)
- Paraffinofen (FA Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Germany)
- Mikrotom (FA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Kryotom (FA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Objektträger Thermo Scientific Superfrost plus (FA Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig)
- Deckgläser (FA Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig)
- Mikroskop + Software (FA Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)

- Leukostip (FA Smith & Nephew GmbH, Marl, Germany)

2.6.2 Medien und Reagenzien

- DMEM/Ham's F12 Medium (Dulbecco's modified eagle's medium nutrient mixture F12 Ham, FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- Collagenpuffer steril (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar; Hepes (Merck1.10110) 47,6 g; Natriumchlorid Ph. Eur. 14,0 g; Kaliumchlorid Ph. Eur. 7,2 g; Calciumchlorid-Dihydrat 0,3 g; Glucose-Monohydrat Ph. Eur. 1,98 g; dest. Wasser zu 2000 ml)
- Collagenase NB4 (FA Serva, Heidelberg, Germany)
- BSA (Bovines Serum Albumin, FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- Aussaatmedium: ECGM (Endothelial Cell Growth Medium MV Supplement Mix, FA PromoCell, Heidelberg, Germany) + AA (Antibiotic/Antimycotic, FA Invitrogen, Darmstadt, Germany)
- PBS (Phosphate-Buffered Saline, FA Biochrom AG, Berlin, Germany)
- Trypsin/EDTA Solution (FA Biochrom AG, Berlin, Germany)
- Trypanblau-Lösung 0,4 % (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- 70 %-iger Alkohol (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar)
- Fibrinogen (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- Trasylol (FA Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany)
- Thrombin (FA Baxter, München-Unterschleißheim, Germany)
- Thrombinpuffer (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, sterile 20 mM Calciumchloridlösung)
- Induktionsmedium (Eigenherstellung aus 500 ml α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle, FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany), 5 % FKS (Fetales Kälber Serum, FA Invitrogen, Darmstadt, Germany), 12 ml AA (Antibiotic/Antimycotic, FA Invitrogen, Darmstadt, Germany), 500 μ l Insulin (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany), 10,75 mg Indomethacin (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany), 55,58 mg IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine, FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany), 0,02 mg Hydrocortison (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany))
- Differenzierungsmedium (Eigenherstellung aus 500 ml α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle, FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany), 5 % FKS

(Fetales Kälber Serum, FA Invitrogen, Darmstadt, Germany), 12 ml AA (Antibiotic/Antimycotic, FA Invitrogen, Darmstadt, Germany), 500 µl Insulin (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany))

- Metacam (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Germany)
- MMF (Medetomidin, Midazolam, Fentanyl, hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar)
- Hautdesinfektionsmittel Cutasept® (FA BODE Chemie GmbH, Hamburg, Germany)
- Baytril (FA Bayer AG, Leverkusen, Germany)
- AFN (Atipamezol, Flumazenil, Naloxon, hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar)
- 4 %-iges Formalin (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)
- Paraffin (FA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- MEFO (Methanol-Formaldehyd-Mischung, hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 50 ml 0,2 % Phosphatpufferlösung, 50 ml 37 %-iges Formalin, 100 ml Methanol)
- 10 %-ige Succroslösung (Eigenherstellung, 5 g Succrose, 50 ml Aqua dest.)
- 20 %-ige Succroslösung (Eigenherstellung, 10 g Succrose, 50 ml Aqua dest.)
- 30 %ige Succroslösung (Eigenherstellung, 15 g Succrose, 50 ml Aqua dest.)
- Tissue-Tek O.C.D. Compound (FA Sakura, Zoeterwoude, Netherlands)
- 10 %-iges Formalin (Eigenherstellung, 56 ml 37 %-iges Formalin, 500 ml PBS)
- Öl-Rot-Lösung (Eigenherstellung, 2,1 g Oil-Red-O-Pulver, 600 ml 70 %-iges Isopropanol, 450 ml Aqua bidest.)
- 60 %-iges Isopropanol (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)
- Kaisers Glyceringelatine (FA Omnilab, Bremen, Germany)
- Xylol (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)
- Isopropanol 100 % (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)
- Ethanol 96 % (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)
- Ethanol 70 % (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)
- Eisenhämatoxilin nach Weigert (Weigert'sche Lösung I und II zu gleichen Teilen) (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)
- Phosphorwolframsäure (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)

- Trichrom-Lösung nach Ladewig (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)
- Hämalan (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)
- Eosin 1 %-ig + 3 Tr. Eisessig (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)
- Digest All-3 (FA Invitrogen, Darmstadt, Germany)
- murines Serum (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- Waschpuffer (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- Vimentin SP20 (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- Reagent Diluent (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- AP-Polymer-anti-rabbit (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- AP-Red Pufferlösung (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- Chromogen Fast Red (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- Fluorescein Diacetat (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- Propidium Iodide (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- Roti- Histo-Kitt II (FA Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany)

3 Ergebnisse

Die Auswertung aller Konstrukte erfolgte an den zentralen Schnitten. Dadurch konnte bei den *in vivo* Versuchen die Entwicklung der Gefäße und der Fettzellen nahe der Durchlaufgefäße (A. und V. femoralis) beobachtet und ausgewertet werden. Für den direkten Vergleich erfolgte die Auswertung auch bei den Kontrollen im Nacken und den *in vitro* Proben in diesen Bereichen.

In jeder Gruppe und zu jedem Zeitraum wurden drei Mäuse implantiert, d.h., die Gruppengröße entspricht $n = 3$. Drei Mäuse mussten aufgrund von Komplikationen frühzeitig getötet werden. Um trotzdem drei Konstrukte pro Zeitraum zu erhalten wurden diese Implantationen an neuen Mäusen wiederholt (Tab.4). Jeder Maus wurden drei Konstrukte implantiert: je eines in der rechten und linken Leiste mit Durchlaufgefäß und eines als Kontrolle im Nacken zwischen den Schulterblättern, ohne Gefäßanschluss. Für die hier vorgestellten Versuche wurden die Hälfte eines Nackenkonstruktes und ein Konstrukt aus einer Leiste in Paraffin eingebettet und ausgewertet. Die restlichen Proben wurden als Gefrierschnitte eingefroren und sollen in nachfolgenden Arbeiten ausgewertet werden.

Die Auswertung der Konstrukte erfolgte anhand verschiedener Färbemethoden, um jeweils unterschiedliche Strukturen zu erkennen, hervorzuheben und darzustellen.

Schon in unseren Vorversuchen konnte mittels einer Lebend-Tot-Färbung die Zelltoxizität des Polyurethanschaums ausgeschlossen werden. Dennoch wurde auch in den hier beschriebenen Versuchen nochmals das Verhalten der Zellen auf dem Polyurethanschaum mittels einer Lebend-Tot-Färbung überprüft.

Da Präadipozyten in der Zellkultur den Fibroblasten sehr ähnlich sind, wurde zur Bestätigung der Adipozyten sowohl in der Kultruf Flasche als auch in den Konstrukten die Öl-Rot-Färbung angewandt. Durch diese werden die Lipide in den reifen Adipozyten durch eine orange-rote Färbung deutlich sichtbar.

Die Trichromfärbung nach Ladewig erfolgte als Übersichtsdarstellung der Schnitte und zur Beurteilung der Neovaskularisation in den *in vivo* Proben. Durch die orange-rote Anfärbung der Erythrozyten können auch kleinste Gefäße erkannt und ausgewertet werden.

Des Weiteren sollte überprüft werden ob, die in den *in vivo* Proben zu erkennenden Adipozyten aus den beimpften humanen Präadipozyten stammen oder ob sie

eingewandertes, murines Fettgewebe sind. Hierfür wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem Vimentin-Antikörper SP20 durchgeführt.

Um die Ergebnisse aufzuzeigen, werden unter den folgenden Punkten aus jeder Gruppe und jedem Zeitraum jeweils repräsentative Bilder dargestellt.

3.1 Ergebnisse der *in vitro* Versuche

Folgende Ergebnisse konnten bei den *in vitro* Versuchen anhand der verschiedenen Färbungen dokumentiert werden:

3.1.1 Lebend-Tot-Färbungen

Alle Konstrukte zeigten auch nach einer langen *in vitro* Kultivierungszeit von über 33 Tagen (Gruppe 4) eine Viabilität von über 50 %.

Aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Konstrukte und der Eigenfluoreszenz des Polyurethangerüsts war eine gute photographische Darstellung nicht immer möglich. Abbildung 7 zeigt daher exemplarisch den Ausschnitt eines Zell-Fibrin-PU-Konstruktes, das entsprechend Gruppe 3 insgesamt 9 Tage in Kultur war.

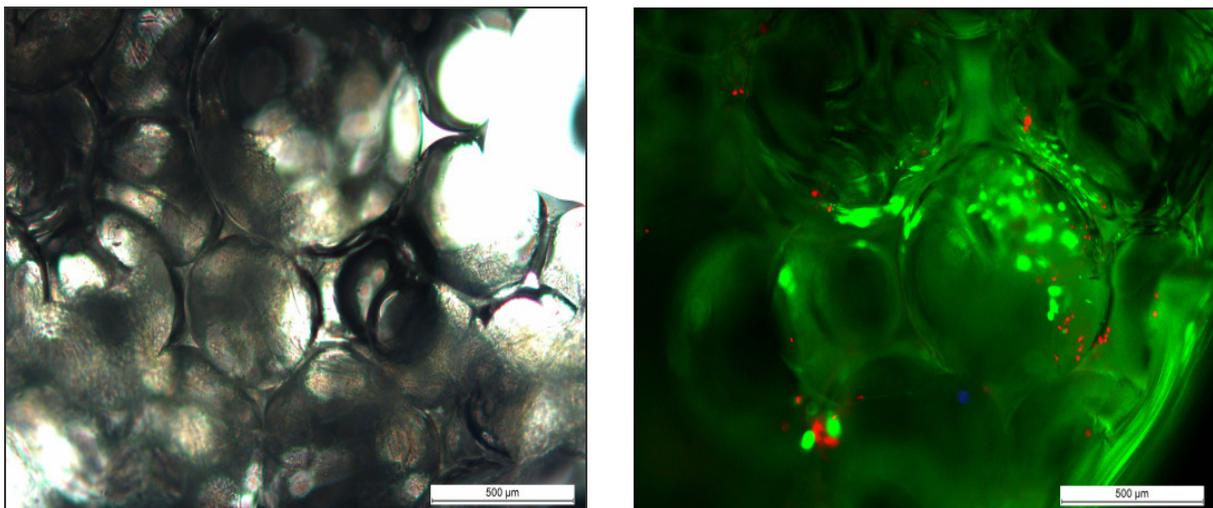


Abb. 7 Lebend-Tot Färbung

Lebend-Tot Färbung der Zell-Fibrin-Polyurethan-Konstrukte, die *in vitro* für 9 Tage in Kultur gehalten wurden. Links die Aufnahme bei 10-facher Vergrößerung im Durchlicht, rechts die Fluoreszenzaufnahme. Grün: lebende Zellen, rot: tote Zellen.

3.1.2 Öl-Rot-Färbungen

Um zu belegen, dass die aus dem nativen Fettgewebe entnommenen Zellen auch tatsächlich Präadipozyten, also Vorläuferzellen der Adipozyten, sind, wurden diese, wie unter Punkt 2.5.5.1 beschrieben, differenziert und die ausgereiften Zellen mittels einer Öl-Rot-Färbung sichtbar gemacht. Es ist deutlich zu erkennen, wie aus den spindelförmigen Präadipozyten nach und nach multilokuläre Zellen mit kleinen, kugeligen Lipidtropfen entstehen, die nach einigen Tagen an Größe zunehmen und in der Färbung orange-rot hervortreten (Abb. 8). Dazwischen befinden sich Areale mit nicht angefärbten, spindelförmigen Zellen, bei denen es sich um nicht differenzierte, zu grunde gegangene Präadipozyten handelt.

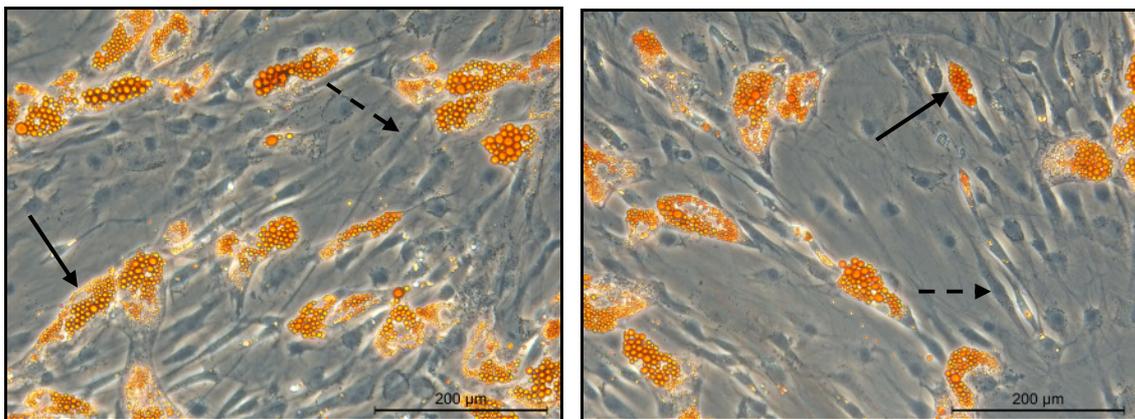


Abb. 8 Öl-Rot-Färbung in der Kulturflasche

Adipozyten nach 10 Tagen Differenzierung *in vitro* in der Kulturflasche. Es sind zahlreiche multilokuläre Zellen mit den darin befindlichen orange-rot angefärbten Lipiden zu erkennen (schwarzer Pfeil). Dazwischen nicht angefärbte, nicht differenzierte Präadipozyten (gestrichelter Pfeil).

3.1.3 Trichromfärbungen nach Ladewig

Tab. 1 Einteilung der Gruppen

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vitro</i> Zeitraum mit Diff.medium
Gruppe 1	2 Tage	---	---	1, 5, 12, 24 Wochen
Gruppe 2	2 Tage	2 Tage	---	1, 5, 12, 24 Wochen
Gruppe 3	2 Tage	2 Tage	7 Tage	1, 5, 12, 24 Wochen
Gruppe 4	2 Tage	2 Tage	33 Tage	1, 5, 12, 24 Wochen

Bei einer Trichromfärbung nach Ladewig werden die Erythrozyten orange-rot, die Zellkerne dunkelbraun, Bindegewebe blau bis blau-violett und das Fibrin rötlich angefärbt.

Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte über hochaufgelöste, zusammengesetzte Fotografien am Computer.

Die Präadipozyten sind als kleine, kugelige Struktur mit einem zentralen, dunkelbraun angefärbten Zellkern zu erkennen, während bei den zugrunde gegangenen Zellen nur noch einzelne Fragmente sichtbar sind. Bei den ausgereiften Adipozyten sind die charakteristischen leeren Vakuolen zu erkennen und die an den Rand gedrückten, länglichen Zellkerne. Bei den Paraffinpräparaten entstehen im Zuge des Entparaffinierungsprozesses leere Vakuolen, da durch die Alkoholreihe die Lipide herausgelöst werden. Das zur Stabilisierung der Zellen verwendete Fibrin stellt sich hellrot dar. Bei den *in vivo* Präparaten werden die Gefäße durch die orange-rot angefärbten Erythrozyten lokalisiert, das Bindegewebe ist als blau, blau-violette, faserige Struktur zu erkennen.

Die *in vitro* Versuche verliefen parallel zu den *in vivo* Versuchen. Die Herstellung und Vorkultivierung der Konstrukte erfolgte identisch.

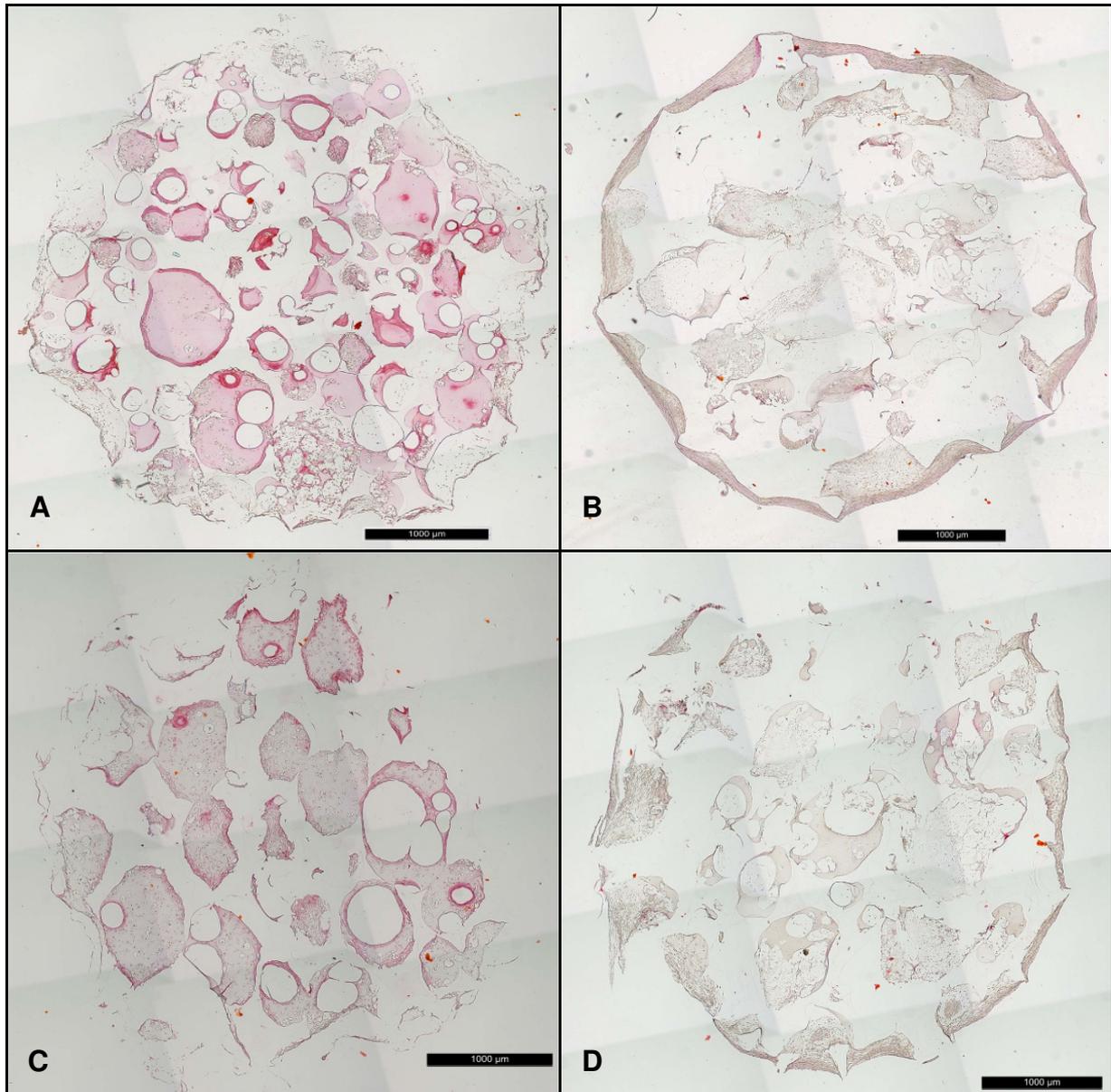
Zum Zeitpunkt der Implantation der *in vivo* Konstrukte wurden die *in vitro* Proben für exakt dieselben Zeiträume in Differenzierungsmedium in Kultur im Brutschrank bei 37 °C gehalten und anschließend ebenfalls histologisch ausgewertet.

Diese Versuche wurden durchgeführt, um zu beobachten, wie sich die in den Konstrukten befindlichen Zellen in einem Nährmedium (Differenzierungsmedium) entwickeln und ob eine Reifung hin zu Adipozyten stattfindet.

Es konnte in keiner der *in vitro* Gruppen eine Adipogenese beobachtet werden. Bei allen vier Gruppen ist nach einer Woche ausschließlich eine homogene Verteilung der Präadipozyten in den Poren des Polyurethans zu erkennen. Auch über den Verlauf von 24 Wochen können in keinem der Konstrukte Adipozyten gefunden werden. Eine leichte Veränderung der Zellen erfolgt nur in den 24-Wochen-Konstrukten der Gruppen 3 und 4. Hier kann eine dezente Vergrößerung des Lumens der Präadipozyten festgestellt werden.

Das Größenverhalten der *in vitro* Konstrukte variiert stark. Es ist in allen Gruppen und Zeiträumen eine Flächenabnahme zwischen 10 % und 40 % zu beobachten (Abb.10).

Bei den folgenden Beispielen werden nur die aussagekräftigsten Ergebnisse jeder Gruppe nach 1 und 24 Wochen dargestellt.



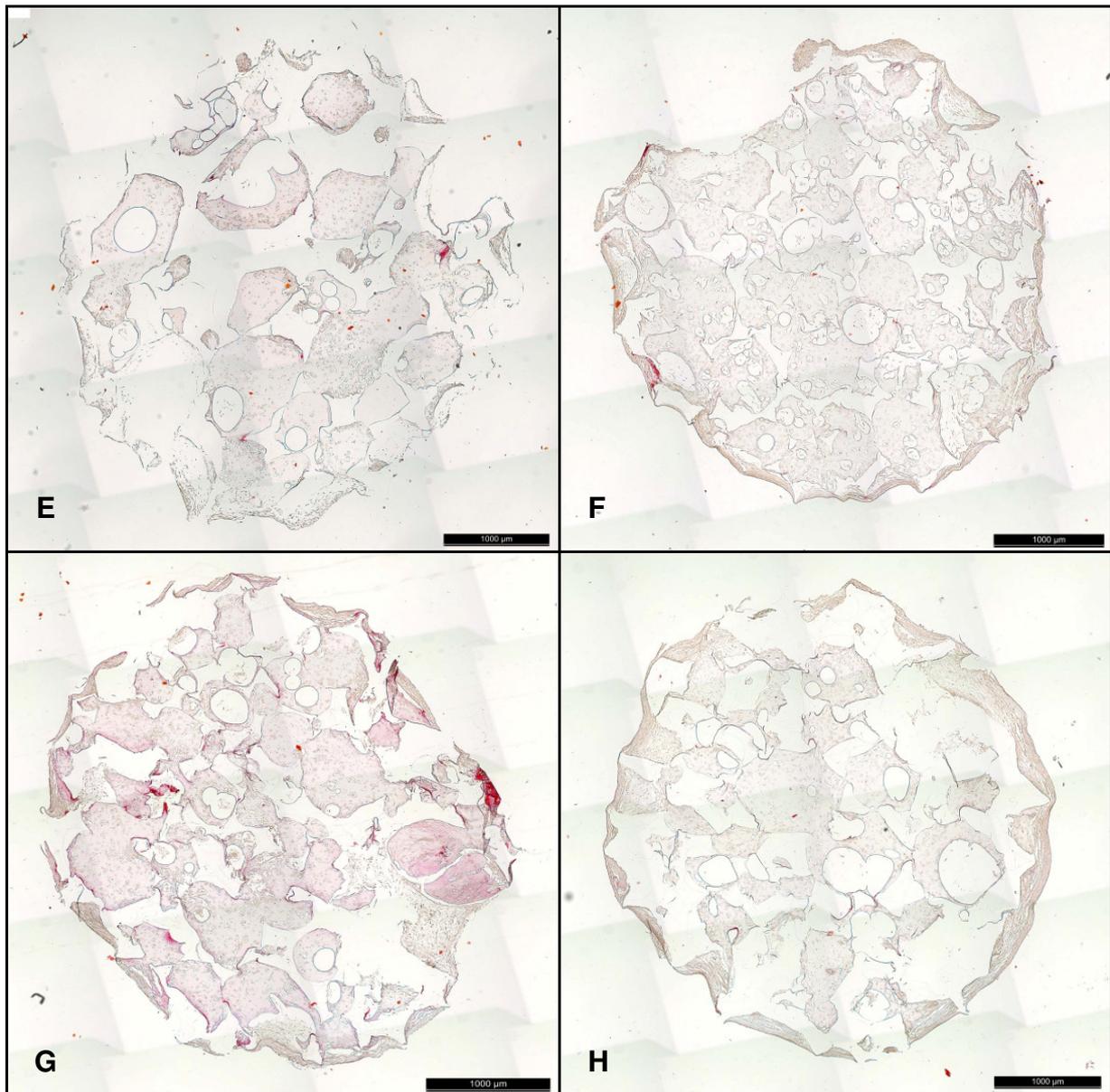


Abb. 9 Trichromfärbung nach Ladewig der *in vitro* Konstrukte

(A + B) Gruppe 1 nach 1 und 24 Wochen: Sowohl nach 1 als auch nach 24 Wochen können nur im Fibrin homogen verteilte Präadipozyten in den Poren des Polyurethans erkannt werden. Es hat keinerlei Adipogenese stattgefunden. (C + D) Gruppe 2 nach 1 und 24 Wochen: Hier zeigt sich dasselbe Bild wie in Gruppe 1. Zu sehen ist eine homogene Verteilung der Zellen ohne jegliche Reifung. (E + F) Gruppe 3 nach 1 und 24 Wochen: Die Konstrukte der Woche 1 zeigen ein ähnliches Bild wie schon in den vorangegangenen Gruppen. Nach 24 Wo. scheint jedoch das Lumen der Präadipozyten leicht vergrößert, allerdings sind keinerlei ausgereifte Adipozyten zu erkennen. (G + H) Gruppe 4 nach 1 und 24 Wochen: Gruppe 4 verhält sich wie Gruppe 3, auch hier sind keine reifen Adipozyten erkennbar.

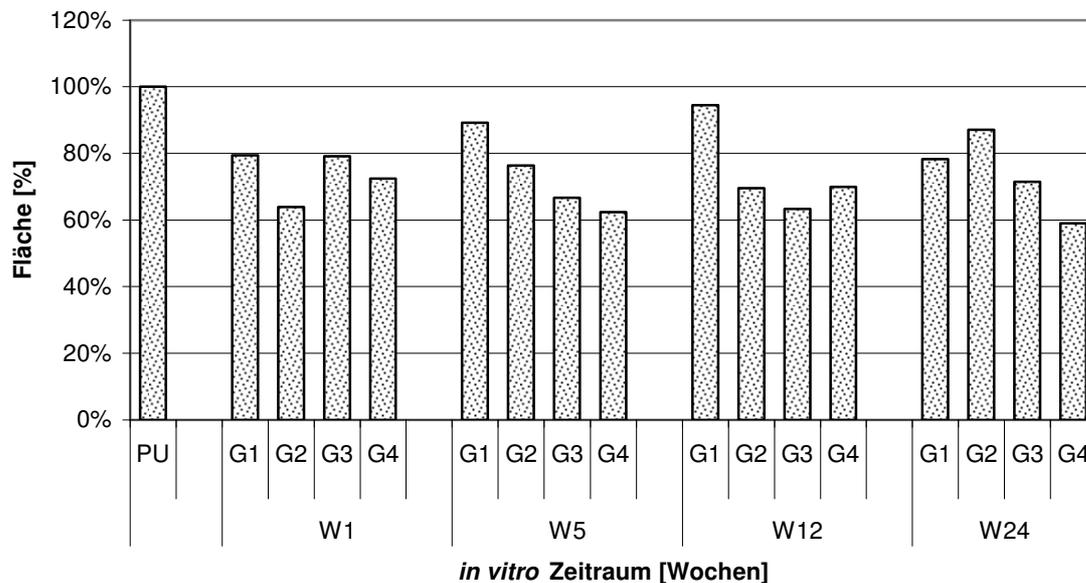


Abb. 10 Flächen der *in vitro* Konstrukte

In vitro konnte gezeigt werden, dass die zellbesiedelten Konstrukte über einen Zeitraum von 24 Wochen einen gewissen Form- und Größenverlust erlitten.

3.2 Ergebnisse der *in vivo* Versuche

Es erfolgte eine histologische und eine statistische Auswertung der *in vivo* Ergebnisse.

3.2.1 Histologische Auswertung

Bei der histologischen Auswertung wurden die Trichromfärbungen nach Ladewig, die Öl-Rot-Färbungen und die Antikörperfärbungen erfasst.

3.2.1.1 Trichromfärbungen nach Ladewig

Auch bei den *in vivo* Präparaten wurde die Auswertung der Bilder anhand der unter 3.1.4 genannten Kriterien durchgeführt. Das viele Fettgewebe außerhalb der Konstrukte wurde in der Zählung und Beurteilung nicht berücksichtigt. Es wurde nur Gewebe erfasst welches sich im Polyurethanscaffold befindet, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen.

Die folgenden Bilder zeigen die jeweils repräsentativsten Ergebnisse der Explantate (n=3).

Ergebnisse der Explantate – Nacken, ohne Gefäßanschluss

Da für die Histologie jeweils Proben für Paraffinschnitte und für Kryoschnitte benötigt wurden, aber je nur ein Konstrukt in den Nacken der Maus implantiert wurde, mussten diese nach der Explantation halbiert werden. Nur bei Gruppe 1, Woche 5 ist ein vollständiges Konstrukt zu erkennen, da dies aus Vorversuchen stammt.

Auch wurde hier wie bei den Konstrukten aus der Leiste nur das Fettgewebe, welches sich innerhalb des Polyurethans befindet, berücksichtigt. Fett, das aus dem umliegenden Gewebe anheftet, wurde aus der Auswertung ausgeschlossen.

Tab. 2 Gruppe 1

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeitraum
Gruppe 1	2 Tage	---	---	1, 5, 12, 24 Wochen

In Gruppe 1 erfolgte nach der Beimpfung der Polyurethanschäume lediglich eine Inkubation in ECGM von zwei Tagen.

Wie auch bei den Konstrukten aus der Leiste ist auch bei den Nackenproben in den Wochen 1 und 5 nur die gleichmäßige Verteilung des Fibrin- Zell Gemisches im gesamten Konstrukt zu beobachten. Eine Reifung der Präadipozyten ist nicht zu erkennen. Dagegen kann schon ein erster Anstieg der Neovaskularisation von den Rändern aus festgestellt werden (Abb.27+28).

Erst nach 12 Wochen finden sich reife Adipozyten. Diese beschränken sich allerdings, wie auch die steigende Neovaskularisation, nur auf den Randsaum des Konstruktes. In den zentralen Anteilen finden sich nur Reste des Fibrin-Zell Gemisches und Bindegewebe (Abb.29). Dieses Bild zeigt sich auch nach 24 Wochen. Hier findet sich auch ausschließlich Fett im Randbereich des Konstruktes (Abb.30).

Über die gesamten Zeiträume ist eine mäßige Größenabnahme zu verzeichnen.

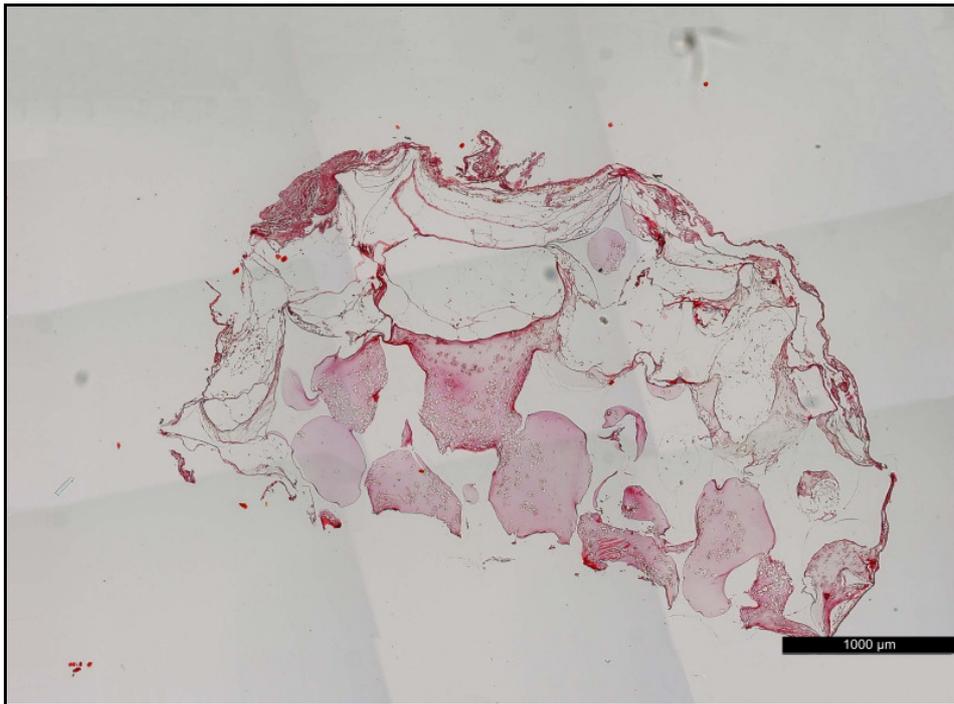


Abb. 11 Kontrolle Gruppe 1, Woche 1

In Gruppe 1 ist nach einer Woche *in vivo* auch bei den Kontrollen eine homogene Verteilung des Zell-Fibrin-Gemisches zu beobachten. Es sind kaum Gefäßeinsprossungen sowie keine Adipozyten erkennbar.

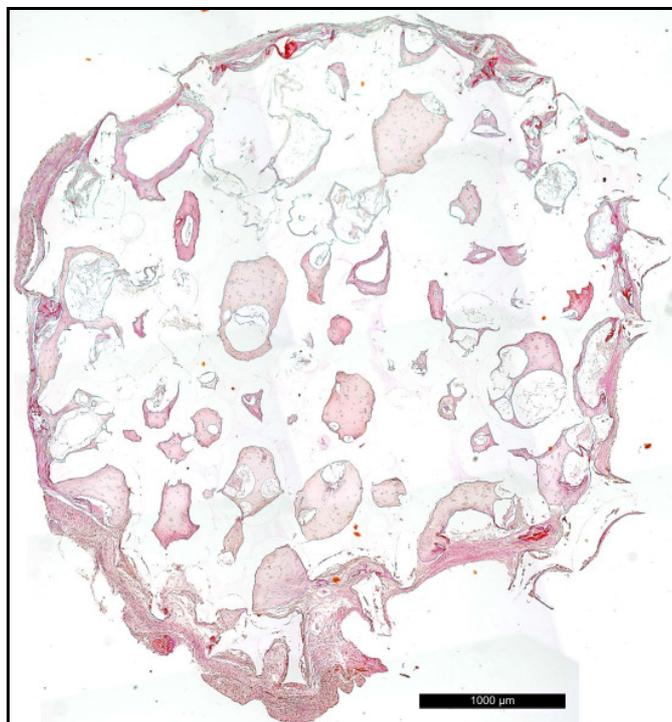


Abb. 12 Kontrolle Gruppe 1, Woche 5

Nach 5 Wochen sind in Gruppe 1 immer noch zahlreiche, homogen verteilte Präadipozyten im Fibrin zu erkennen. Eine Adipogenese ist so gut wie nicht zu beobachten. Eine beginnende Gefäßeinsprossung ist feststellbar.

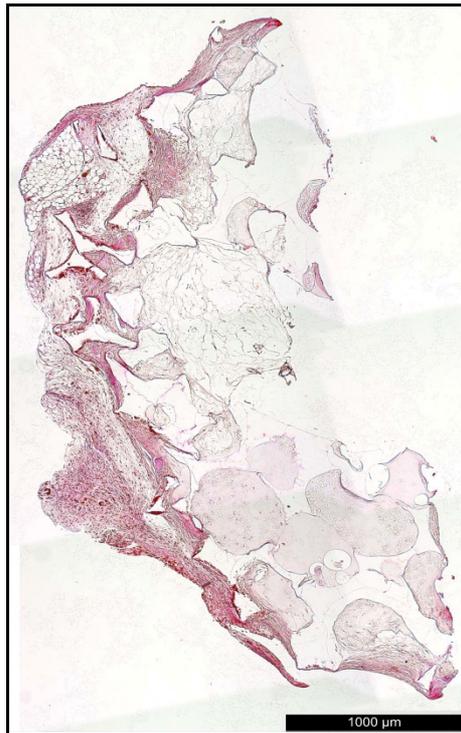


Abb. 13 Kontrolle Gruppe 1, Woche 12

Auch nach 12 Wochen *in vivo* kann in Gruppe 1 in den zentralen Bereichen des Konstruktes immer noch keine Differenzierung der Präadipozyten hin zu Adipozyten erkannt werden. Nur in den randständigen Bereichen kann ein Einwachsen von Fettgewebe beobachtet werden. Hier findet sich auch eine moderate Vaskularisation. Diese ist wiederum zentral nicht erkennbar.

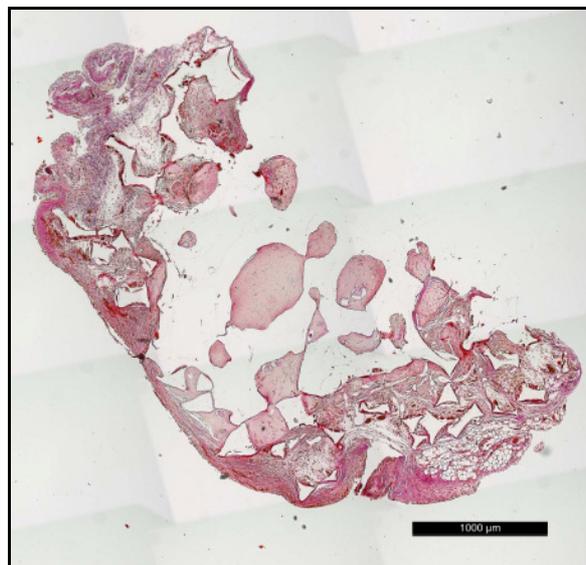


Abb. 14 Kontrolle Gruppe 1, Woche 24

Ein ähnliches Bild wie nach 12 Wochen findet sich auch nach 24 Wochen in Gruppe 1. In den Randbereichen sind Adipozyten mit zahlreichen Blutgefäßen erkennbar, allerdings findet man in den zentralen Anteilen weiterhin nur Reste des Fibrins mit vereinzelt Präadipozyten und keinerlei Blutversorgung. Die Größe der Konstrukte nimmt im Laufe der Zeiträume ab.

Tab. 3 Gruppe 2

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeitraum
Gruppe 2	2 Tage	2 Tage	---	1, 5, 12, 24 Wochen

In Gruppe 2 wurde nach einer zweitägigen Inkubation der Konstrukte in ECGM eine Induktion mit dem entsprechenden Induktionsmedium durchgeführt.

Nach 1 Woche *in vivo* können auch hier nur die Präadipozyten im Konstrukt sowie eine beginnende Neovaskularisation erkannt werden (Abb.31). Erst nach 5 Wochen sind einzelne Adipozyten im Randbereich festzustellen, wobei nicht klar ist, ob diese von außen einwachsen oder aus den beimpften Zellen entstanden sind. Auch ist hier eine Steigerung der Gefäßzahl zu erkennen (Abb.32).

Nach 12 Wochen ist schon reichlich Fettgewebe mit einer ausgeprägten Durchblutung zu beobachten. Allerdings befindet sich dieses auch hier nur im Randbereich des Konstruktes. Im Zentrum finden sich nur Reste der beimpften Präadipozyten (Abb.33).

Auch nach 24 Wochen ist im Zentrum noch keinerlei Fett zu finden. Die Zahl der Adipozyten, genauso wie die der Gefäße, geht zudem noch leicht zurück (Abb.34).

Wieder ist eine Größenabnahme über die 24 Wochen zu erkennen.

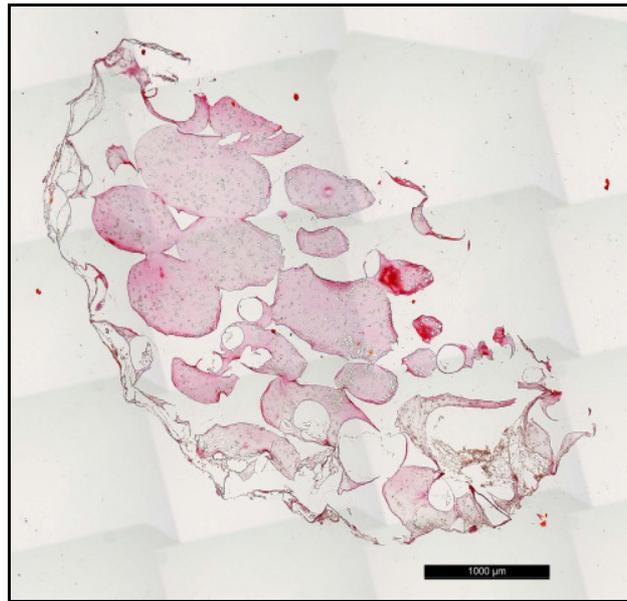


Abb. 15 Kontrolle Gruppe 2, Woche 1

In Gruppe 2 ist nach einer Woche der Zustand vergleichbar wie bei Gruppe 1. Man erkennt eine homogene Verteilung der Präadipozyten. Eine Gefäßneubildung bzw. -einsprossung kann nur vereinzelt beobachtet werden.

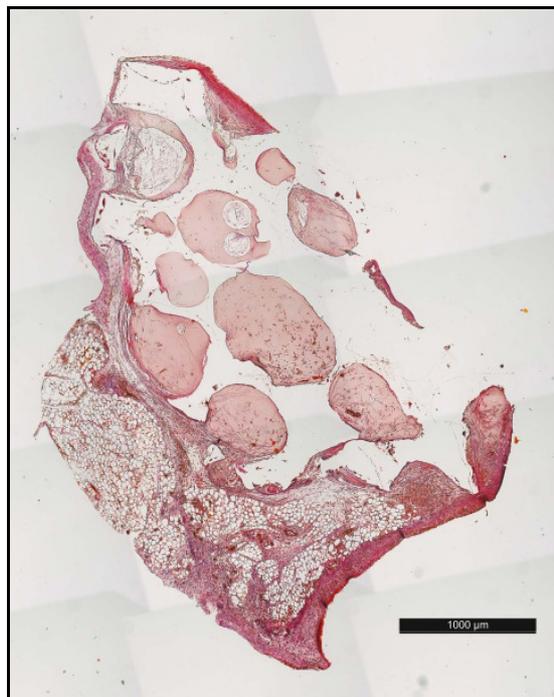


Abb. 16 Kontrolle Gruppe 2, Woche 5

Nach 5 Wochen lassen sich in Gruppe 2 am Rande des Konstruktes Fettgewebe und zahlreiche Blutgefäße beobachten. Im Inneren des Konstruktes sind nur die Fibrinfelder mit den darin befindlichen Präadipozyten und keine Gefäße erkennbar. Anhaftendes Fettgewebe außerhalb des Polyurethans wird nicht berücksichtigt.

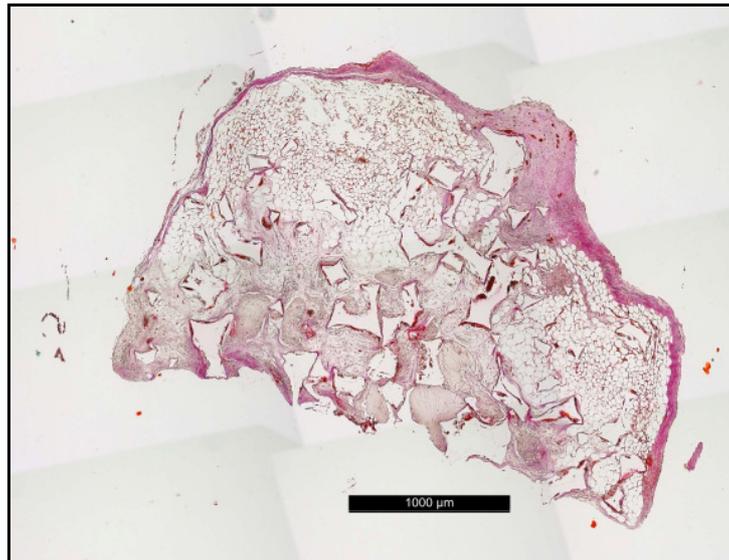


Abb. 17 Kontrolle Gruppe 2, Woche 12

Die Verteilung der Blutgefäße und der Adipozyten ist auch nach 12 Wochen in Gruppe 2 zweigeteilt. In den Randbereichen lassen sich reichlich Adipozyten und Blutgefäße auffinden. In den zentralen Anteilen allerdings können nur noch Bindegewebe und vereinzelt Fibrinfelder mit rudimentären Präadipozyten erkannt werden. Eine Vaskularisierung hat hier nicht stattgefunden.

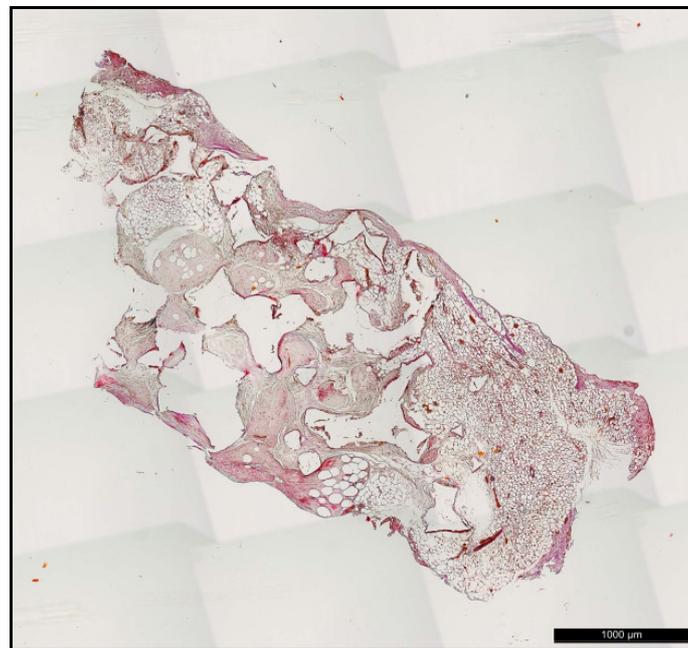


Abb. 18 Kontrolle Gruppe 2, Woche 24

Woche 24 weist eine gewisse Abnahme der Gefäß- und Adipozytenzahl auf. Vom Rand her wachsen vermutlich murine Adipozyten mit Blutgefäßen ein, im Zentrum sind dagegen nur Fibrinreste und Bindegewebe aufzufinden. Eine Größenabnahme kann beobachtet werden.

Tab. 4 Gruppe 3

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeitraum
Gruppe 3	2 Tage	2 Tage	7 Tage	1, 5, 12, 24 Wochen

In Gruppe 3 erfolgten zunächst ebenfalls eine zweitägige Inkubation sowie eine zweitägige Induktion, anschließend wurden die Konstrukte noch für 7 Tage in Differenzierungsmedium gegeben.

Auch hier zeigt sich nach einer Woche nur die homogene Verteilung der Präadipozyten. Gefäße sind vereinzelt im Randbereich auffindbar (Abb.35).

Nach 5 Wochen sind erste Adipozyten am Rand des Konstruktes zu erkennen. Ebenfalls lassen sich hier erste Gefäße finden. Zentral sind weiterhin nur Präadipozyten zu erkennen (Abb.36).

In Woche 12 ist ein deutlicher Fettsaum mit zahlreichen Blutgefäßen an den Rändern zu erkennen. Im Zentrum allerdings finden sich nur noch einzelne Fibrinfelder und Bindegewebe (Abb.37).

Die Neovaskularisation verzeichnet auch nach 24 Wochen noch eine leichte Steigerung, wohingegen die Adipozytenzahl abnimmt. Weiterhin sind auch im Zentrum keine Gefäße sowie Adipozyten festzustellen (Abb.38).

Von Woche 1 bis Woche 12 ist eine stetige Größenabnahme zu erkennen. Nach 24 Wochen kann, wie auch bei den Leistenkonstrukten, eine Abnahme von über die Hälfte der Ursprungsgröße beobachtet werden.

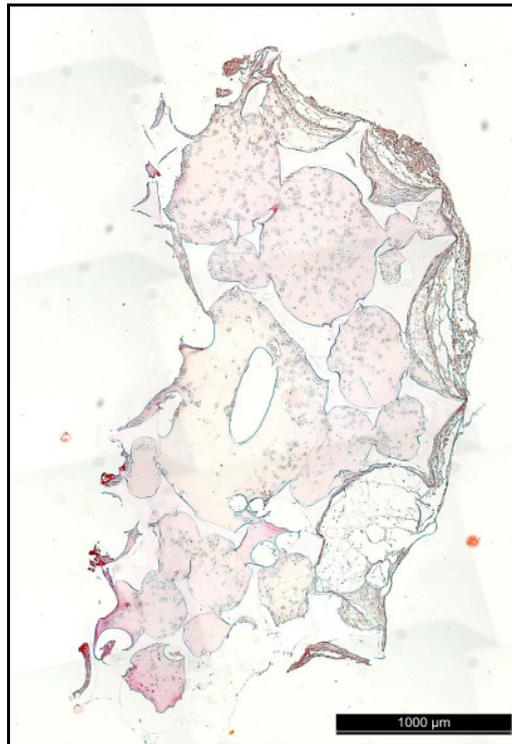


Abb. 19 Kontrolle Gruppe 3, Woche 1

Auch in Gruppe 3 kann nach 1 Woche *in vivo* nur die homogene Verteilung des Fibrin-Zell-Gemisches beobachtet werden. Eine Vaskularisierung des Konstruktes hat noch kaum stattgefunden.

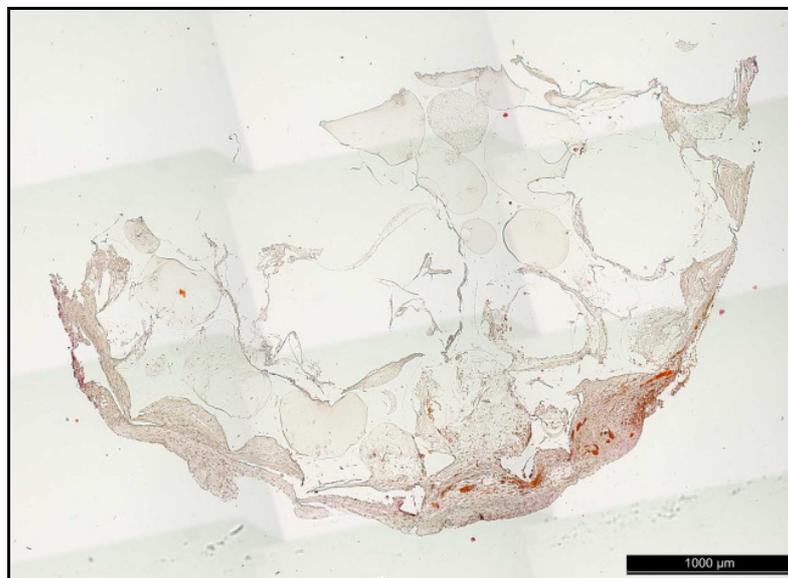


Abb. 20 Kontrolle Gruppe 3, Woche 5

Nach 5 Wochen findet man im Zentrum noch zahlreiche Fibrinfelder mit Präadipozyten, jedoch keine Blutgefäße. Im Randbereich ist eine gute Neovaskularisation sowie Fettgewebe sichtbar.

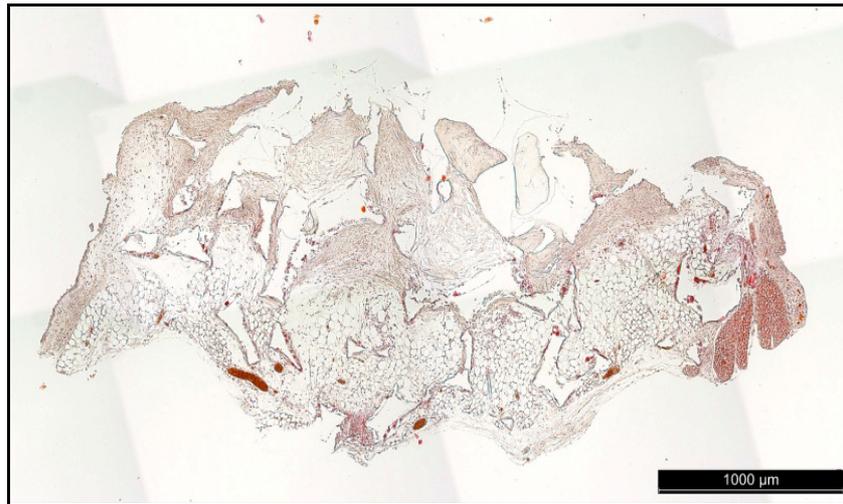


Abb. 21 Kontrolle Gruppe 3, Woche 12

Bei Gruppe 3 findet nach 12 Wochen *in vivo* auch nur in den Randbereichen eine ausgeprägte periphere Adipogenese und Gefäßeinsprossung statt. Im Zentrum des Konstruktes befindet sich eine massive Bindegewebsbildung und vereinzelt kleine verkümmerte Fibrinfelder. Es ist keine Gefäßneubildung erkennbar.

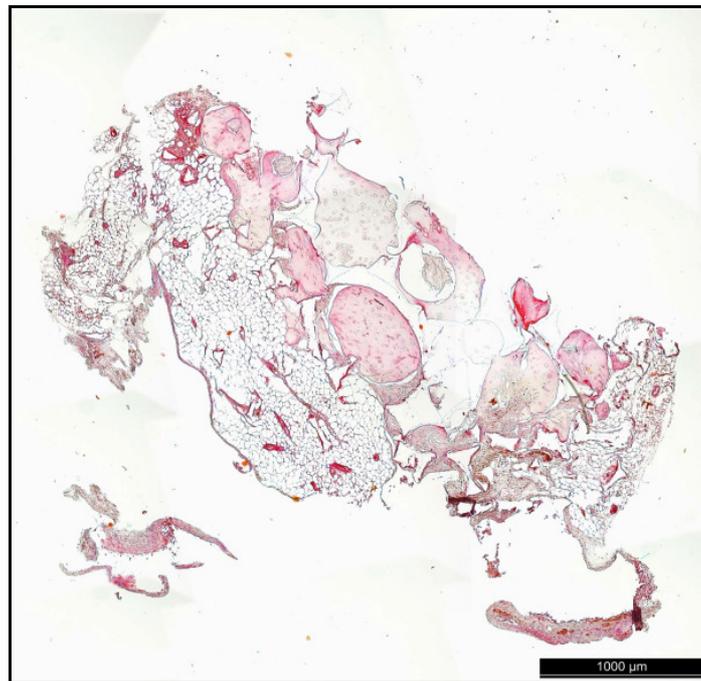


Abb. 22 Kontrolle Gruppe 3, Woche 24

Die Kontrollen von Gruppe 3 zeigen nach 24 Wochen ebenfalls Adipozyten mit einer ausgeprägten Blutversorgung im Randbereich des Konstruktes. Allerdings findet man auch hier im Zentrum nur Fibrinfelder mit Zellresten und teilweise Bindegewebe, jedoch keine Gefäße. Wie schon bei den Konstrukten der Leisten ist auch bei den Nackenkontrollen in Gruppe 3 eine deutliche Größenabnahme über die gesamten Zeiträume zu erkennen.

Tab. 5 Gruppe 4

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeitraum
Gruppe 4	2 Tage	2 Tage	33 Tage	1, 5, 12, 24 Wochen

In Gruppe 4 wurden ebenfalls eine Inkubation sowie eine Induktion für jeweils zwei Tage durchgeführt. Danach erfolgte eine 33-tägige Differenzierung der Konstrukte.

Auch hier ist in Woche 1 noch keinerlei Adipogenese erkennbar (Abb.39). Erst in Woche 5 breiten sich langsam Gefäße und Fettzellen vom Rand her aus (Abb.40). Allerdings ist auch bei keinem der Konstrukte der Gruppe 4 eine Neovaskularisation sowie Adipogenese in den zentralen Anteilen zu finden: weder in Woche 12 (Abb.41) noch in Woche 24 (Abb.42). Nur die Randbereiche scheinen gut durchblutet und von Fettgewebe durchwachsen.

Auch hier ist wieder eine Abnahme der Konstruktgröße zu erkennen.

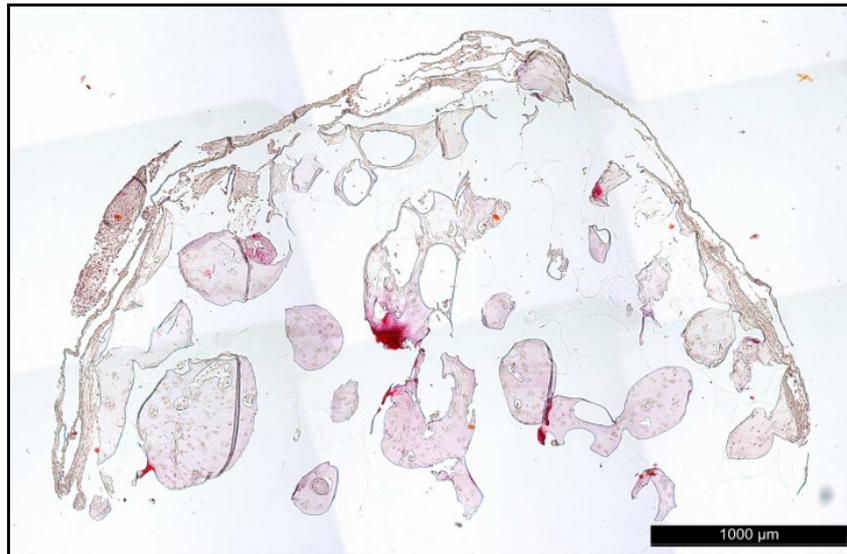


Abb. 23 Kontrolle Gruppe 4, Woche 1

Auch in Gruppe 4 findet man nach 1 Woche Fibrinfelder mit gleichmäßig verteilten Präadipozyten. Man kann aber auch an vereinzelt Stellen leicht vergrößerte Zellen beobachten, die sich vermutlich am Beginn der Adipogenese befinden. Kaum Neovaskularisation.

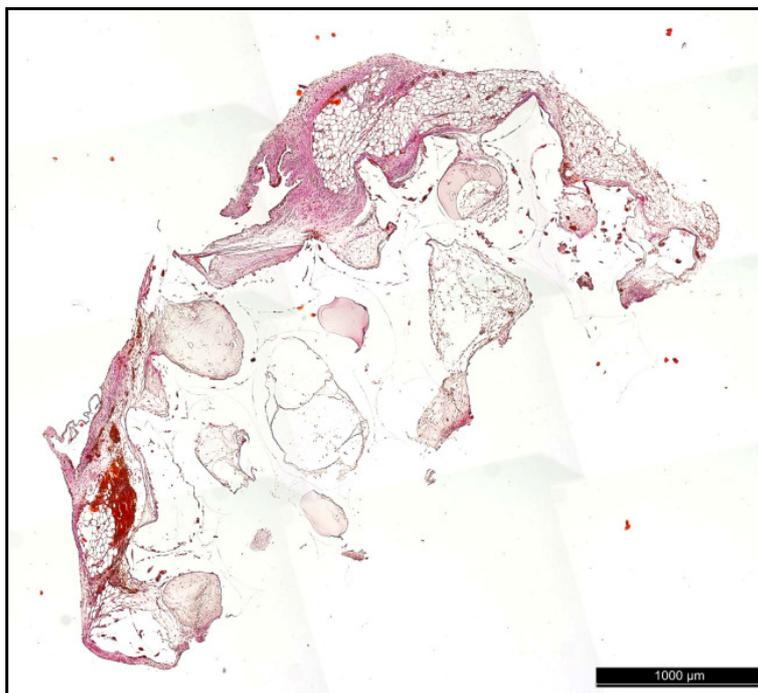


Abb. 24 Kontrolle Gruppe 4, Woche 5

Nach 5 Wochen befinden sich auch hier zentral immer noch Fibrinfelder mit gleichmäßig verteilten Präadipozyten. Nur randständig sind eine beginnende Neovaskularisation sowie Fettzellen zu beobachten.

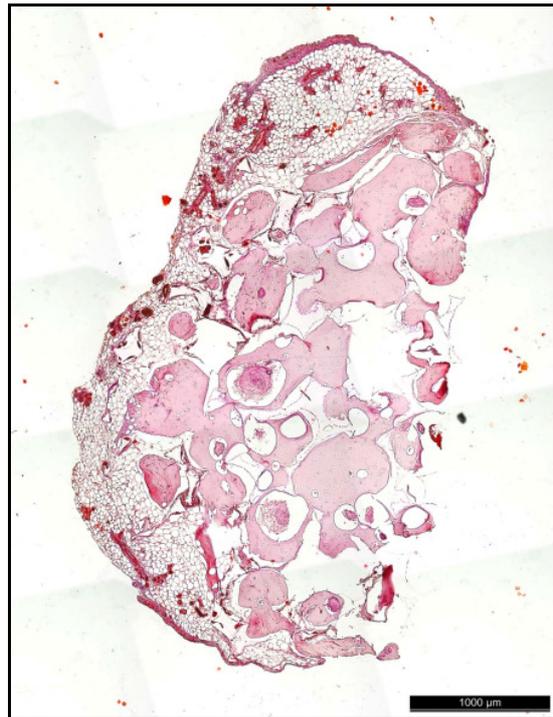


Abb. 25 Kontrolle Gruppe 4, Woche 12

Auch die Kontrollen der Gruppe 4 zeigen nach 12 Wochen einen dünnen randständigen Saum von gut durchblutetem Fettgewebe. Keine Neovaskularisation oder Adipogenese im Zentrum.

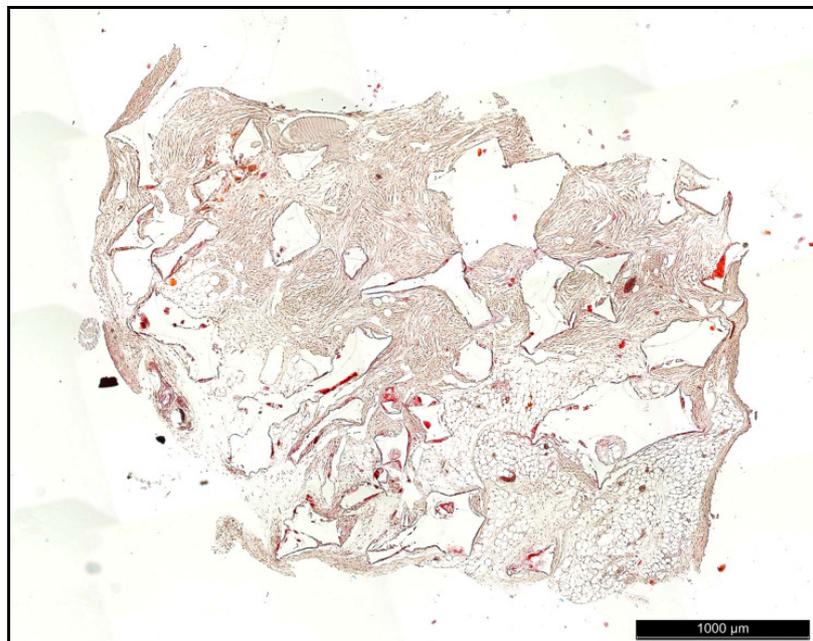


Abb. 26 Kontrolle Gruppe 4, Woche 24

Ebenso sind nach 24 Wochen nur die Randbereiche mit Blutgefäßen und Fettgewebe durchsetzt, wobei die Zahl der Adipozyten leicht zunimmt, die Gefäßzahl allerdings sinkt. Im zentralen Bereich des Konstruktes sind auch hier nur Fibrinfelder mit rudimentären Präadipozyten erkennbar. Eine geringe Größenabnahme ist von Woche 1 bis Woche 24 zu erkennen.

Ergebnisse der Explantate – Leiste

Tab. 2 Gruppe 1

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeitraum
Gruppe 1	2 Tage	---	---	1, 5, 12, 24 Wochen

In Gruppe 1 erfolgte nach der Beimpfung der Polyurethanschäume lediglich eine Inkubation in ECGM von zwei Tagen.

Anhand der Schnitte der Wochen 1 und 5 kann man deutlich erkennen, wie homogen die beimpften Präadipozyten über die Konstrukte verteilt sind. Eine Adipogenese hat zu diesem Zeitpunkt noch nicht stattgefunden. Entlang des Durchlaufgefäßes und an den Rändern ist eine zunehmende Neovaskularisation zu erkennen (Abb.11+12).

Nach 12 Wochen *in vivo* ist schon eine erste Reifung der Zellen erkennbar. Am zentralen Gefäßbündel entlang und an den Rändern des Konstruktes sind erste reife Adipozyten zu beobachten. Auch nimmt die Vaskularisation des Konstruktes noch mal weiter zu. Einzelne Bereiche sind mit Bindegewebe durchzogen (Abb.13).

Nach 24 Wochen ist keine bedeutende Veränderung mehr zu erkennen. Die Anzahl der Adipozyten entlang des Gefäßstiels und an den Rändern nimmt leicht zu, ebenso wie die Neovaskularisation. Immer mehr Anteile sind bindegewebig umgebaut (Abb.14).

Über die gesamten 24 Wochen ist eine stetige Größenabnahme der Konstrukte erkennbar.

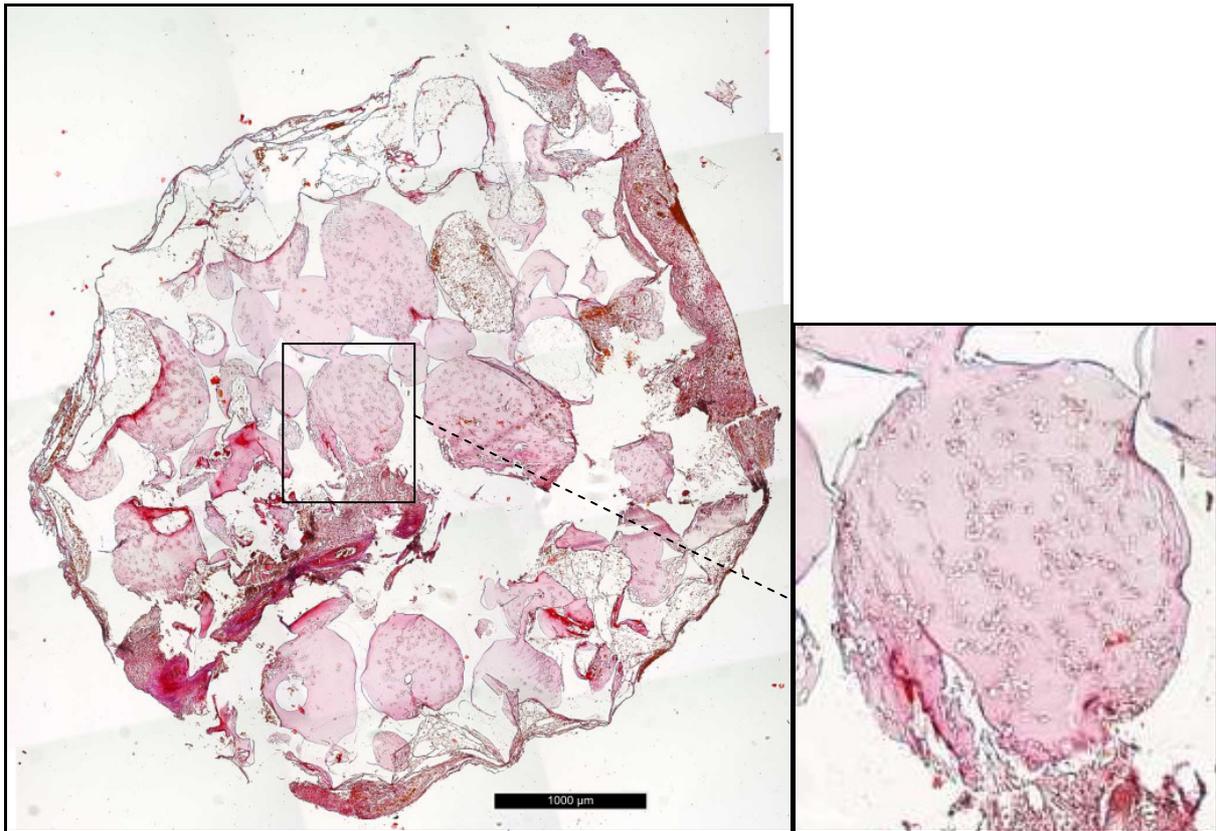
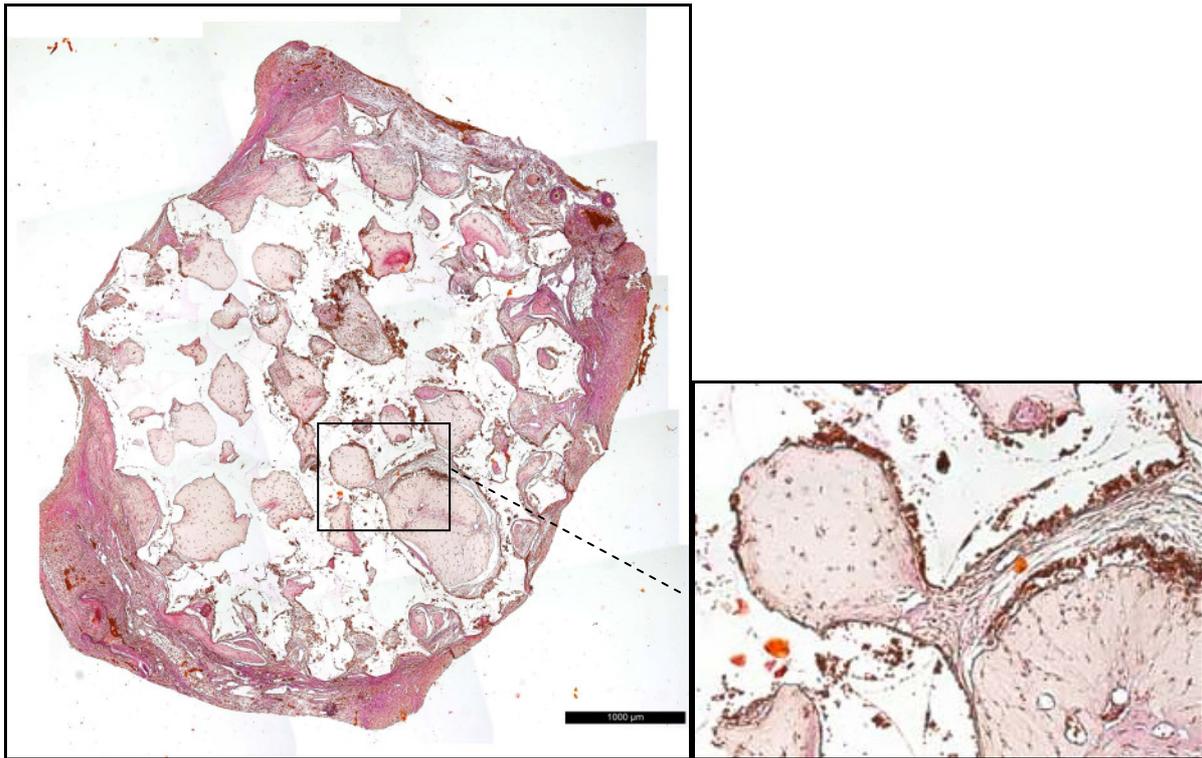


Abb. 27 Gruppe 1, Woche 1

Nach 1 Woche *in vivo* kann eine homogene Verteilung der im Fibrin befindlichen Präadipozyten über das gesamte Konstrukt beobachtet werden (siehe Detail). Entlang des zentralen Gefäßstiels ist ein dezenter Beginn der Gefäßneubildung zu erkennen. Die Größe und Form des Scaffolds wird weitgehend beibehalten.

**Abb. 28 Gruppe 1, Woche 5**

Nach 5 Wochen *in vivo* sind immer noch die gleichmäßig in Fibrin verteilten Präadipozyten zu erkennen. Eine Differenzierung hin zu reifen Adipozyten kann noch nicht beobachtet werden. Die Neovaskularisation nimmt stark zu. In einzelnen Arealen ist ein bindegewebiger Umbau zu erkennen.

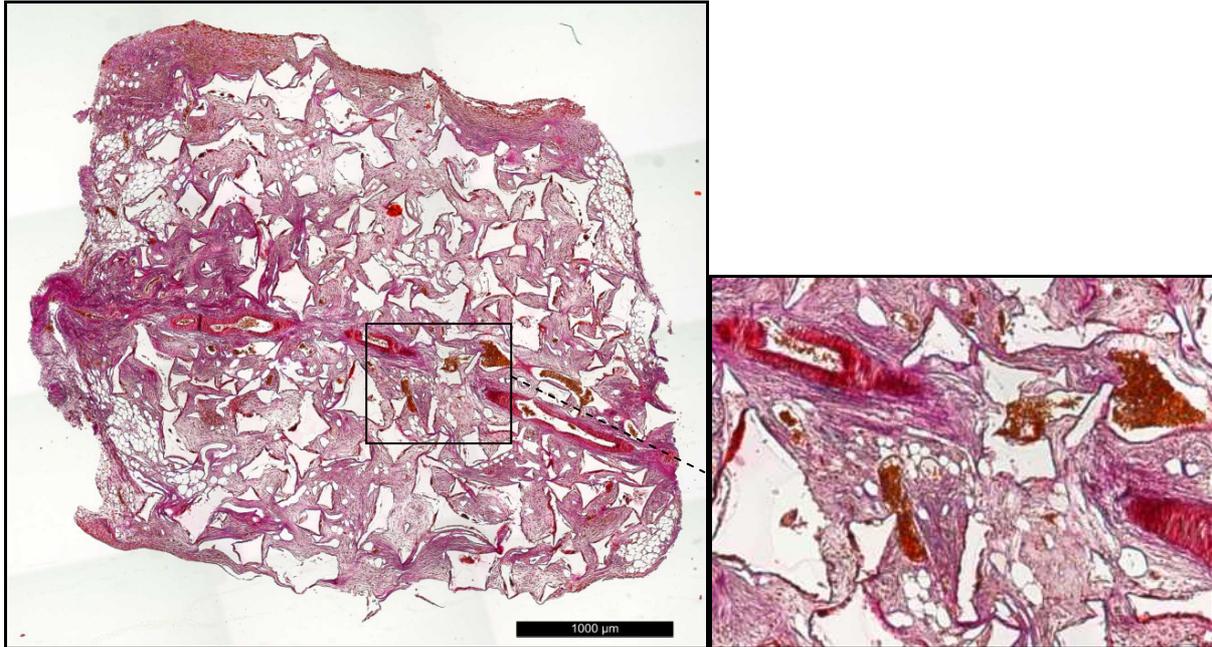


Abb. 29 Gruppe 1, Woche 12

Nach 12 Wochen *in vivo* kann ein starker bindegewebiger Umbau im gesamten Konstrukt beobachtet werden. Dazwischen findet sich vor allem im Bereich rund um das Gefäßbündel und am Rand schon eine steigende Anzahl von ausgereiften Adipozyten, wie in der Nahaufnahme zu sehen ist. Eine im Vergleich zu Woche 5 noch leicht steigende Neovaskularisation im gesamten Konstrukt, ausgehend vom Gefäßstiel, ist zu erkennen.

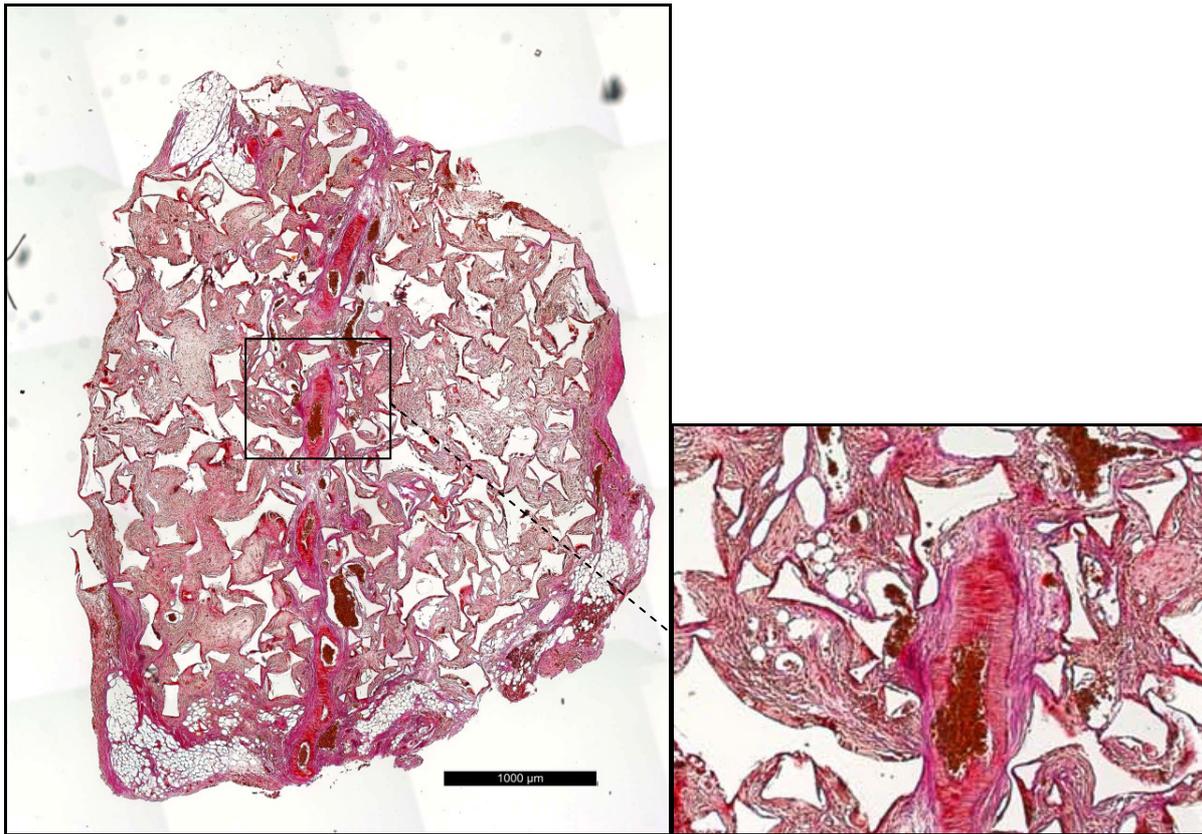


Abb. 30 Gruppe 1, Woche 24

Auch nach 24 Wochen können vor allem in den Bereichen nahe dem Durchlaufgefäß und in der Umgebung der neuen Gefäße einzelne Adipozyten registriert werden (siehe Detail). Der Großteil des Konstruktes ist mit Bindegewebe durchwachsen. Es sind so gut wie keine Fibrinreste mehr zu finden. Form und Größe der Konstrukte haben über die Zeiträume kontinuierlich abgenommen (Abb.50).

Das hier deutlich sichtbare Fettgewebe an den Enden des Konstruktes wurde, wie oben beschrieben, nicht erfasst, da es sich außerhalb des Polyurethangerüstes befindet und somit für die Auswertung irrelevant ist.

Tab. 3 Gruppe 2

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeitraum
Gruppe 2	2 Tage	2 Tage	---	1, 5, 12, 24 Wochen

In Gruppe 2 wurde nach einer zweitägigen Inkubation der Konstrukte in ECGM eine Induktion mit dem entsprechenden Induktionsmedium durchgeführt.

Nach 1 Woche *in vivo* zeigt sich ein ähnliches Bild wie schon in Gruppe 1. Es sind vor allem zahlreiche Präadipozyten zu erkennen, eine Neovaskularisation ist nur vereinzelt zu beobachten (Abb.15). Nach 5 Wochen steigt diese deutlich an und man kann in Gefäßnähe und an den Rändern einzelne reifende Vakuolen erfassen (Abb.16).

In den Schnitten der 12 Wochen Konstrukte sind entlang des zentralen Gefäßstiels und an den Rändern zahlreiche Adipozyten zu erkennen. Das Konstrukt ist sehr gut vaskularisiert. In einzelnen Bereichen ist ein bindegewebiger Umbau erkennbar (Abb.17).

Auch in Woche 24 sieht man in Gefäßnähe zahlreiche Adipozyten, allerdings weniger als noch in Woche 12. Dafür ist das Konstrukt vermehrt von Bindegewebe durchzogen, die Neovaskularisation nimmt weiter zu (Abb.18). Insgesamt ist über alle Zeiträume eine anhaltende Größenabnahme der Konstrukte erkennbar.

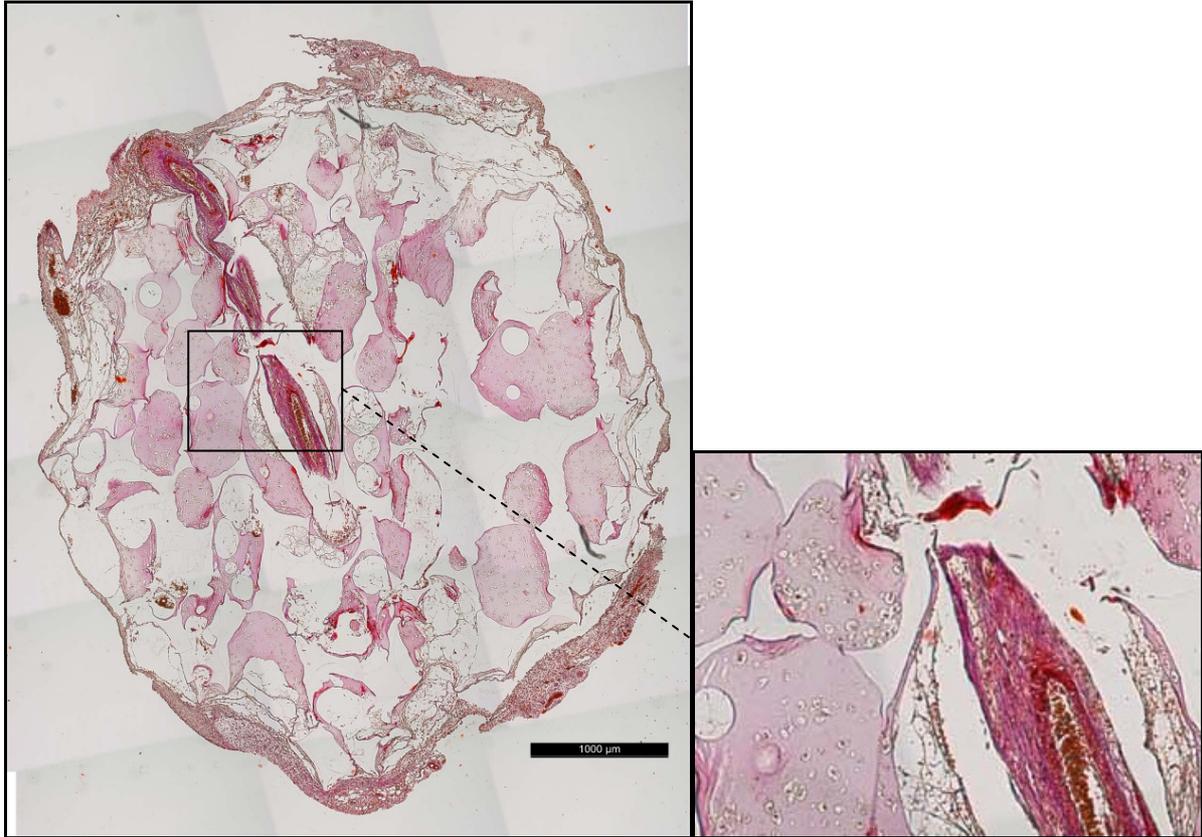


Abb. 31 Gruppe 2, Woche 1

Auch in Gruppe 2 ist nach 1 Woche eine gleichmäßige Verteilung des Zell-Fibrin-Gemischs über den gesamten Scaffold zu erkennen. Nur vereinzelt kann eine Neovaskularisation beobachtet werden.

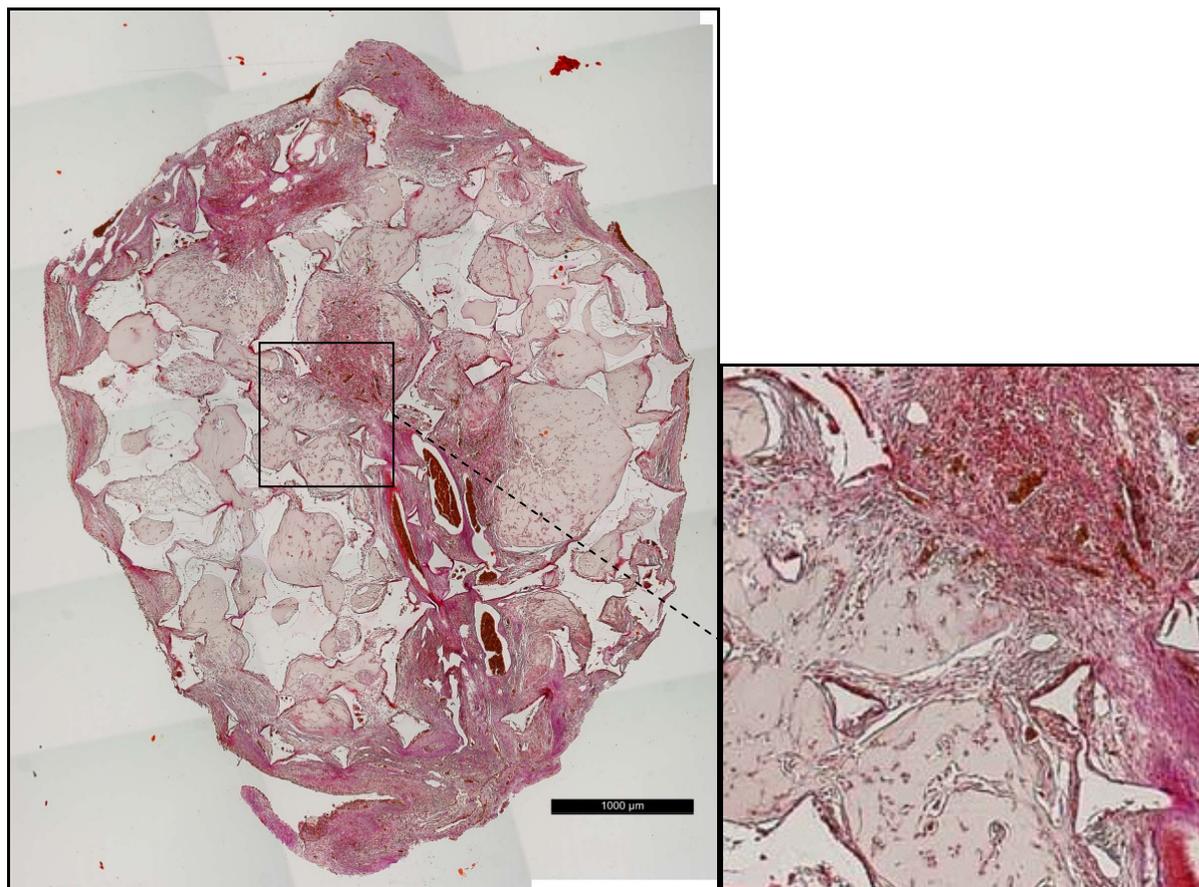
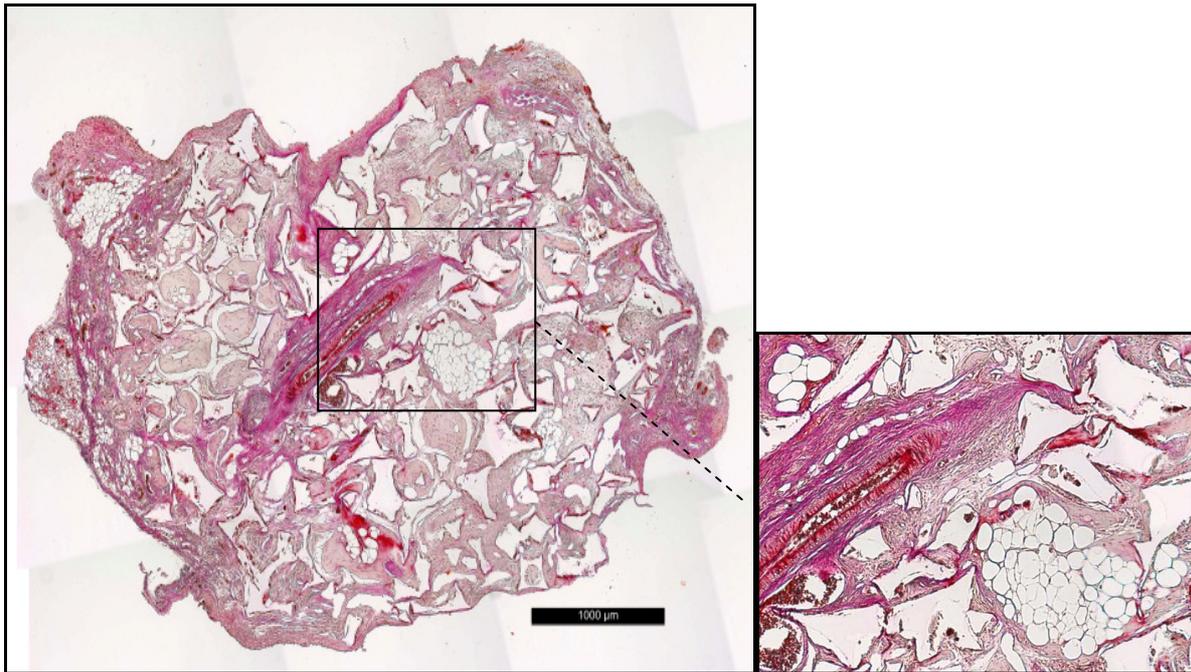


Abb. 32 Gruppe 2, Woche 5

Nach 5 Wochen ist in Gruppe 2 noch kaum eine Differenzierung der Präadipozyten zu registrieren. Nur vereinzelt sind kleine Vakuolen zu erkennen (siehe Detail). Einzelne Bereiche haben sich bindegewebig umgebaut. Die Anzahl der Gefäße nimmt stark zu.

**Abb. 33 Gruppe 2, Woche 12**

In Gruppe 2 ist nach 12 Wochen immer noch die ausgeprägte Neovaskularisation des Konstruktes zu erkennen. Vor allem in gefäßnahen Bereichen, wie in der Nahaufnahme zu sehen ist, und am Rand kann man eine starke Reifung der Adipozyten erkennen. Einzelne Bereiche sind bindegewebig umgebaut.

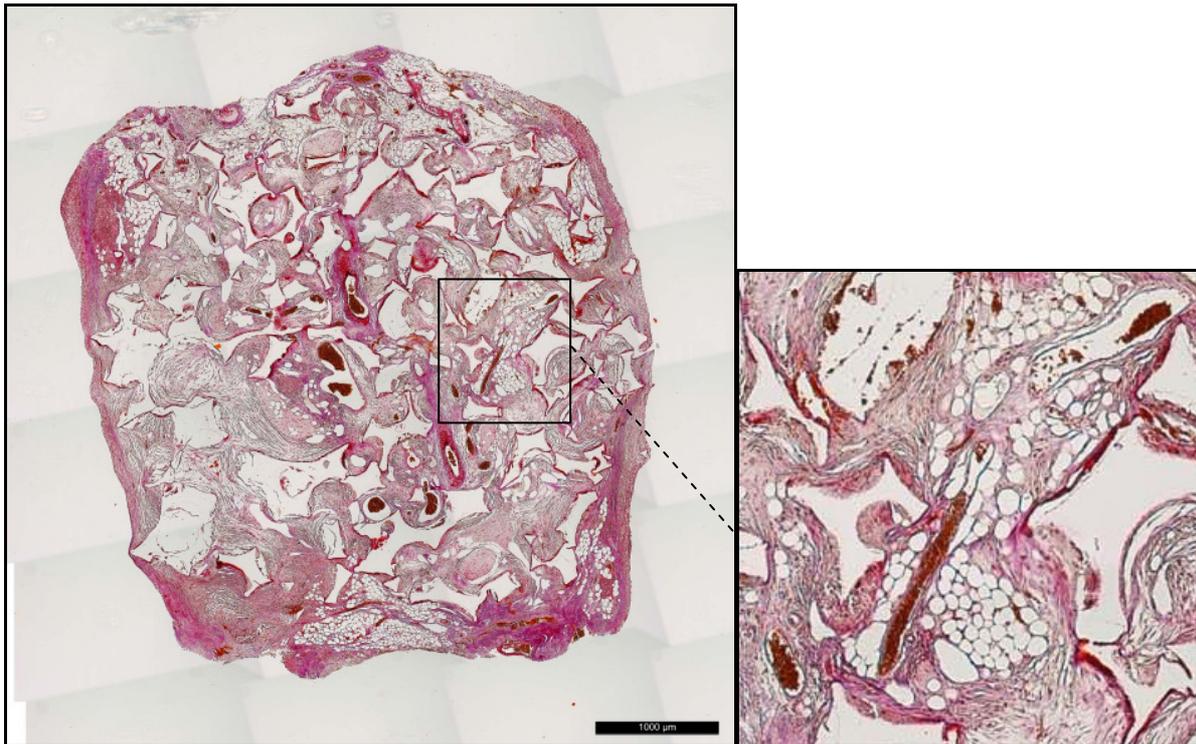


Abb. 34 Gruppe 2, Woche 24

Die Vaskularisation der Konstrukte ist in Gruppe 2 nach 24 Wochen sehr gut ausgebildet. Am Rand, um das Durchlaufgefäß und entlang der neu gebildeten Gefäße sind zahlreiche adulte Adipozyten zu erkennen, wobei im Vergleich zu Woche 12 kein Anstieg der Zellzahl zu beobachten ist. Das restliche Konstrukt ist mit Bindegewebe durchwachsen, es finden sich nur noch einzelne Fibrinreste. Eine Abnahme der Größe ist über die Zeiträume erkennbar.

Tab. 4 Gruppe 3

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeitraum
Gruppe 3	2 Tage	2 Tage	7 Tage	1, 5, 12, 24 Wochen

In Gruppe 3 erfolgten zunächst ebenfalls eine zweitägige Inkubation sowie eine zweitägige Induktion, anschließend wurden die Konstrukte noch für 7 Tage in Differenzierungsmedium gegeben.

Auch in Gruppe 3 kann man nach 1 Woche *in vivo* eine homogene Verteilung der beimpften Präadipozyten sowie eine beginnende Neovaskularisation vom Durchlaufgefäß und den Rändern aus beobachten (Abb.19). Nach 5 Wochen nimmt diese auch hier weiter zu, eine beginnende Adipogenese ist erkennbar (Abb.20).

In den Schnitten der Woche 12 geht die Adipogenese wieder von den Rändern sowie vom zentralen Gefäß aus. Hier sind zahlreiche Adipozyten zu erkennen. Die restlichen Bereiche sind von Bindegewebe durchwachsen (Abb.21). Bis zur Woche 12 ist eine dezente Abnahme der Größe erkennbar.

Nach 24 Wochen ist eine extreme Größenabnahme von mehr als der Hälfte aller Konstrukte festzustellen. Auch sind diese nicht mehr wie anfangs rund, sondern erscheinen spindelförmig. Die Zahl der Adipozyten pro mm² ist ebenfalls zurückgegangen. Nur die Vaskularisation nimmt weiterhin zu (Abb.22).

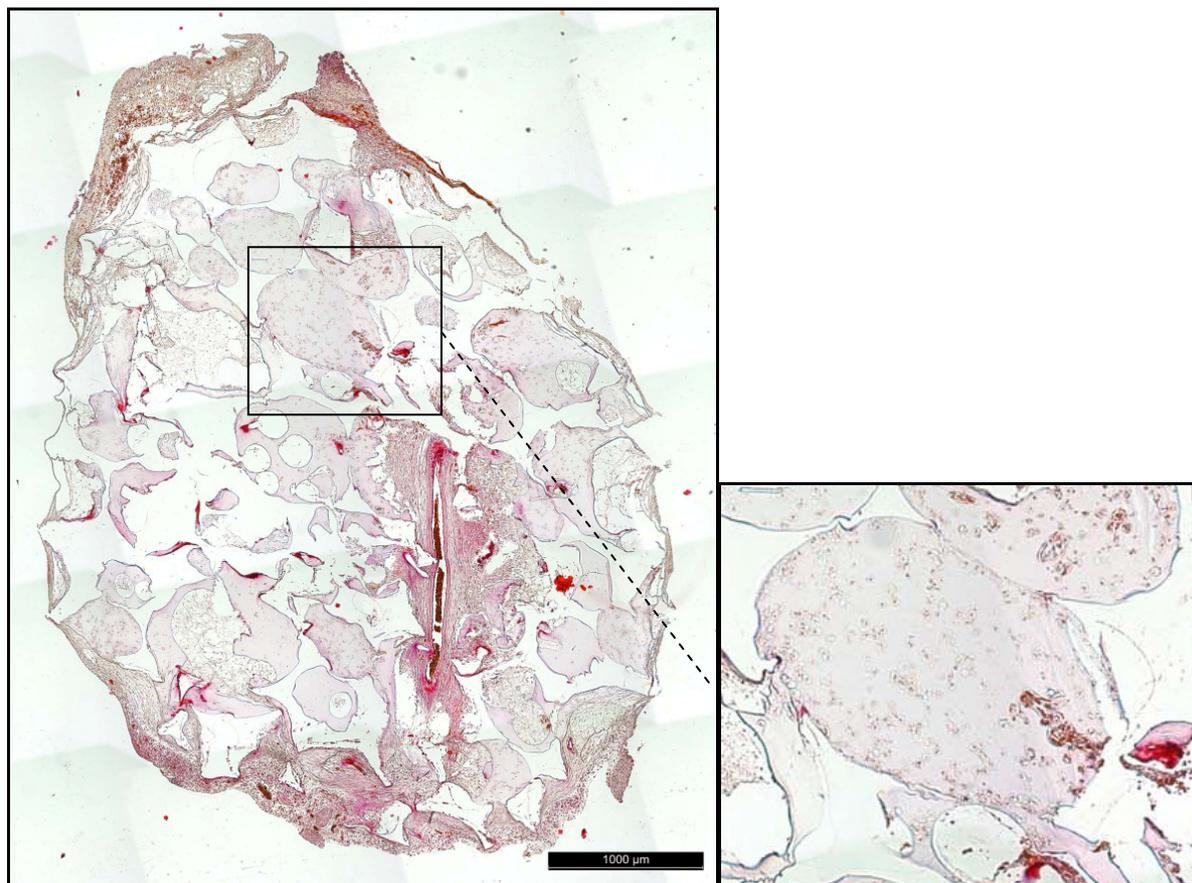
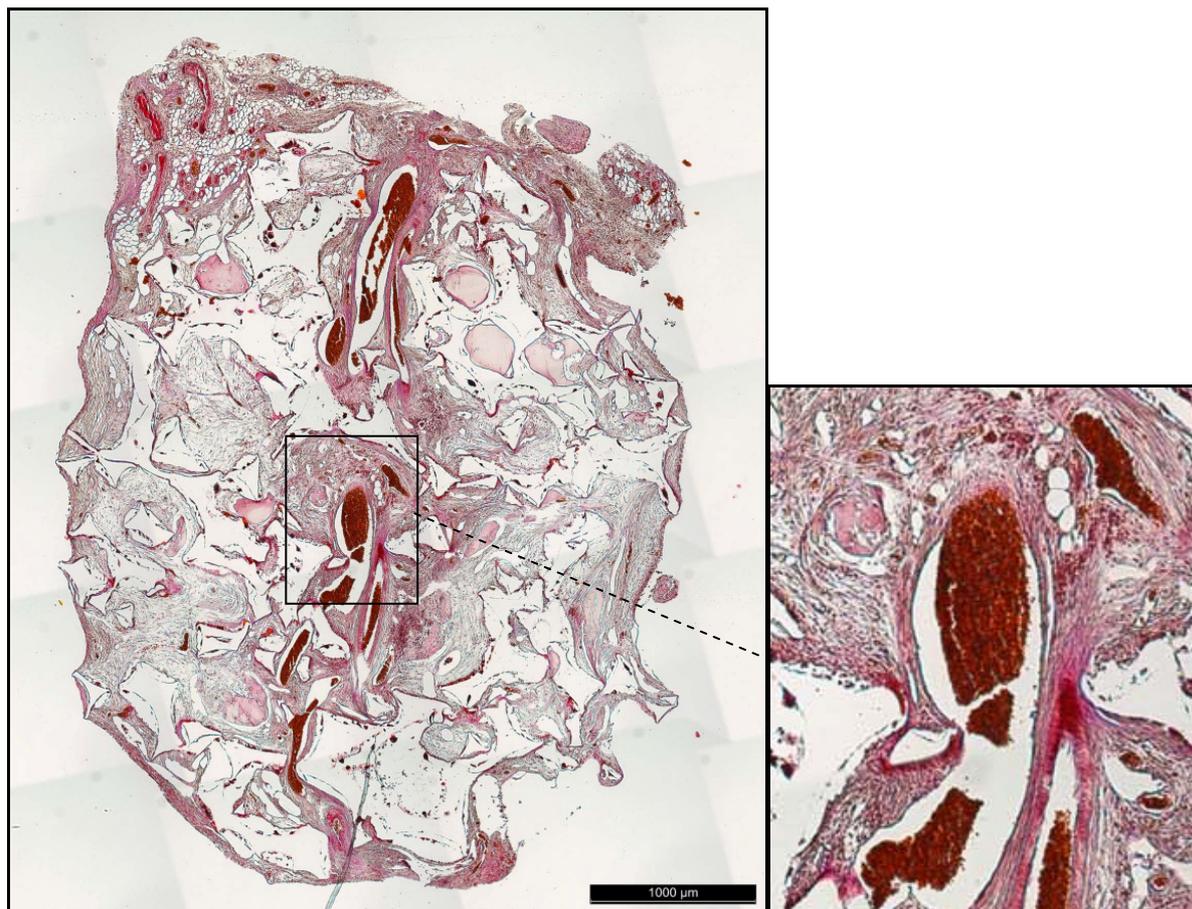


Abb. 35 Gruppe 3, Woche 1

Wie schon in Gruppe 1 und 2 kann auch in Gruppe 3 nach 1 Woche noch keine bedeutende Neovaskularisation beobachtet werden. Auch hier ist das Fibrin mit den darin befindlichen Präadipozyten homogen über das gesamte Konstrukt verteilt.

**Abb. 36 Gruppe 3, Woche 5**

In Gruppe 3 ist nach 5 Wochen ein ausgeprägter bindegewebiger Umbau zu beobachten. Eine Neovaskularisierung ist deutlich sichtbar. Schon einzelne Adipozyten sind entlang des zentralen Gefäßes zu erkennen (siehe auch Detail).

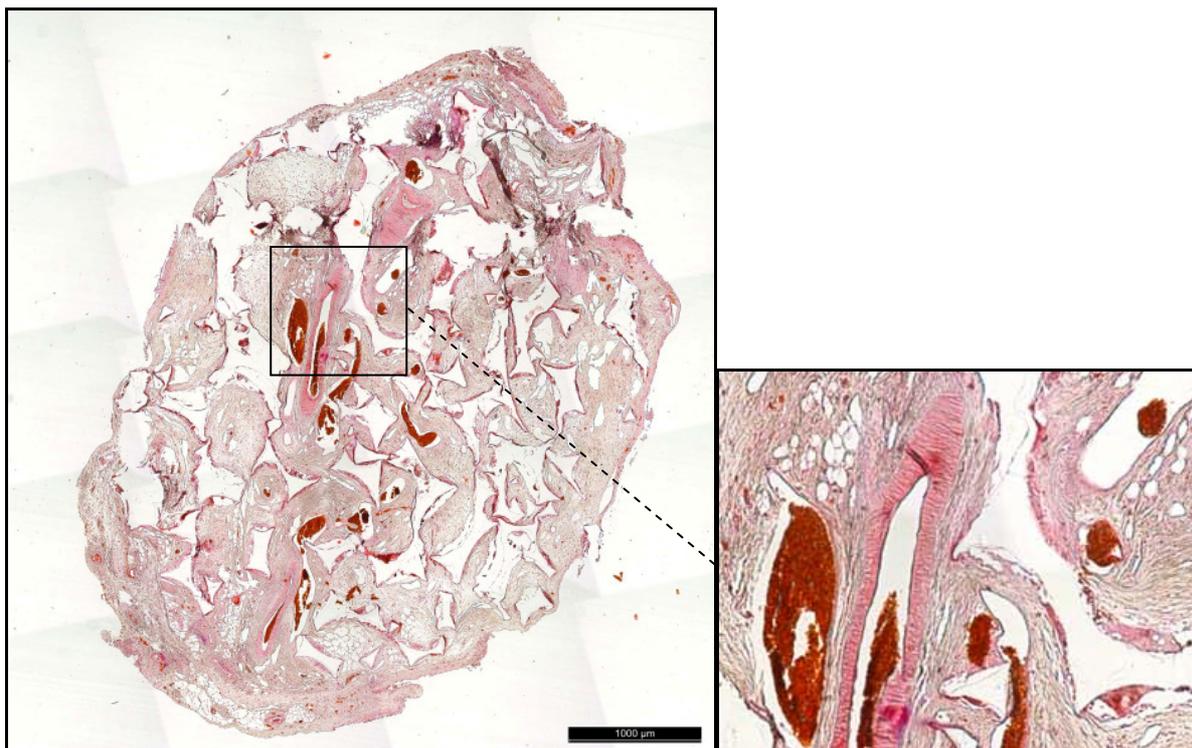
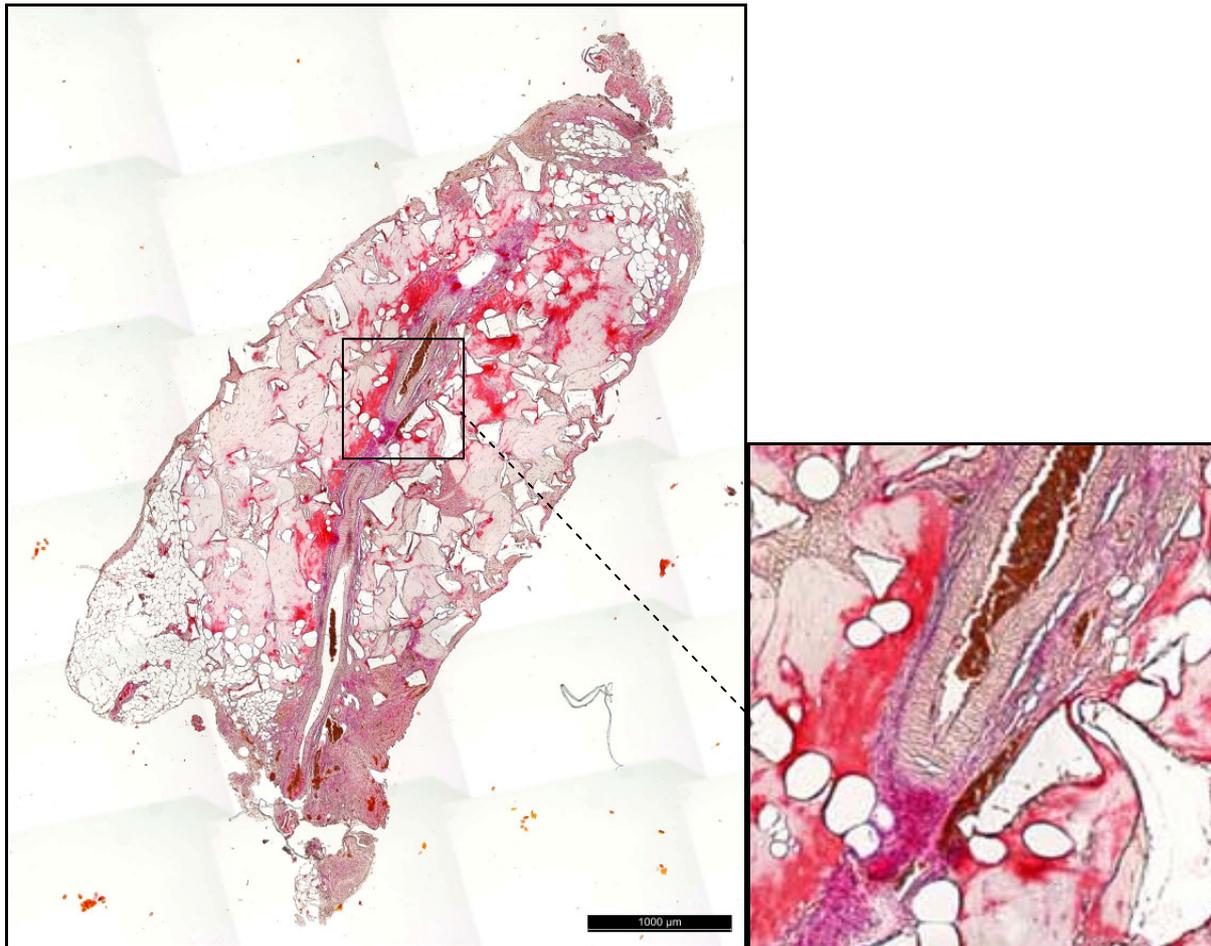


Abb. 37 Gruppe 3, Woche 12

Auch nach 12 Wochen ist in Gruppe 3 das Konstrukt zum großen Teil mit Bindegewebe durchwachsen und eine ausgeprägte Neovaskularisation zu erkennen. Eine Zunahme der Adipozyten lässt sich wieder hauptsächlich in Gefäßnähe sowie am Rand beobachten.

**Abb. 38 Gruppe 3, Woche 24**

Nach 24 Wochen findet man in den Konstrukten von Gruppe 3 teilweise Bindegewebe, teilweise auch Fibrinfelder mit rudimentären Präadipozyten. Reife Adipozyten sind wieder nur in Gefäßnähe (siehe Detail) sowie am Rand zu erkennen. Das komplette Konstrukt ist stark vaskularisiert. Auffällig in dieser Gruppe ist, dass alle Konstrukte nach 24 Wochen eine ungewöhnlich starke Größenabnahme aufweisen, sodass diese nun spindelförmig sind und nicht mehr die ursprüngliche runde Form erkennen lassen.

Tab. 5 Gruppe 4

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeitraum
Gruppe 4	2 Tage	2 Tage	33 Tage	1, 5, 12, 24 Wochen

In Gruppe 4 wurden ebenfalls eine Inkubation sowie eine Induktion für jeweils zwei Tage durchgeführt. Danach erfolgte eine 33-tägige Differenzierung der Konstrukte.

Neben den gleichmäßig verteilten Präadipozyten sind in Gruppe 4 schon nach 1 Woche *in vivo* einzelne reife Adipozyten in Gefäßnähe festzustellen (Abb.23). Diese Zahl nimmt nach 5 Wochen noch deutlich zu, wobei sich die Verteilung der Adipozyten wieder auf das Gefäßbündel sowie auf die Ränder der Konstrukte konzentriert (Abb.24). Auch nach 12 Wochen sind die Adipozyten vor allem in diesen Bereichen erkennbar (Abb.25), erst nach 24 Wochen kann man zum ersten Mal im gesamten Konstrukt Fettzellen feststellen, deren Zahl dadurch auch massiv ansteigt (Abb.26). Die Neovaskularisation verhält sich wie in den anderen Gruppen und nimmt stetig zu.

In Gruppe 4 ist auch wieder eine dezente Größenabnahme der Konstrukte über die gesamten 24 Wochen zu erkennen.

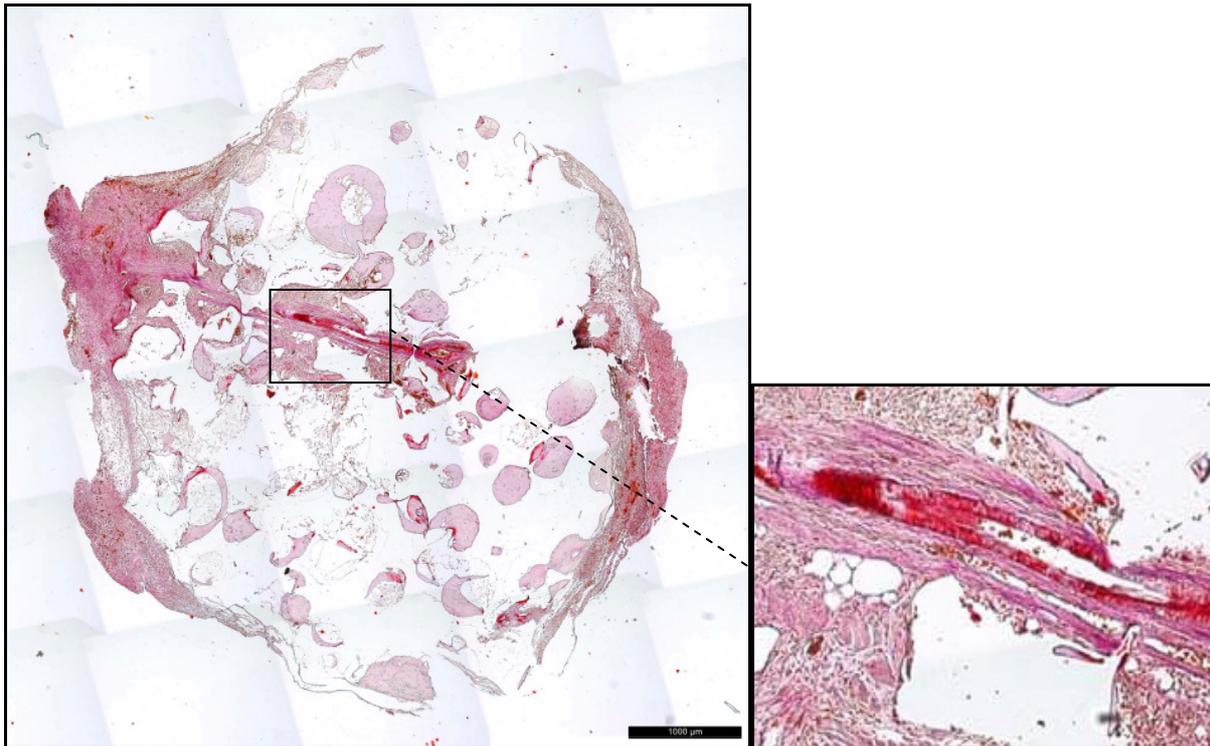
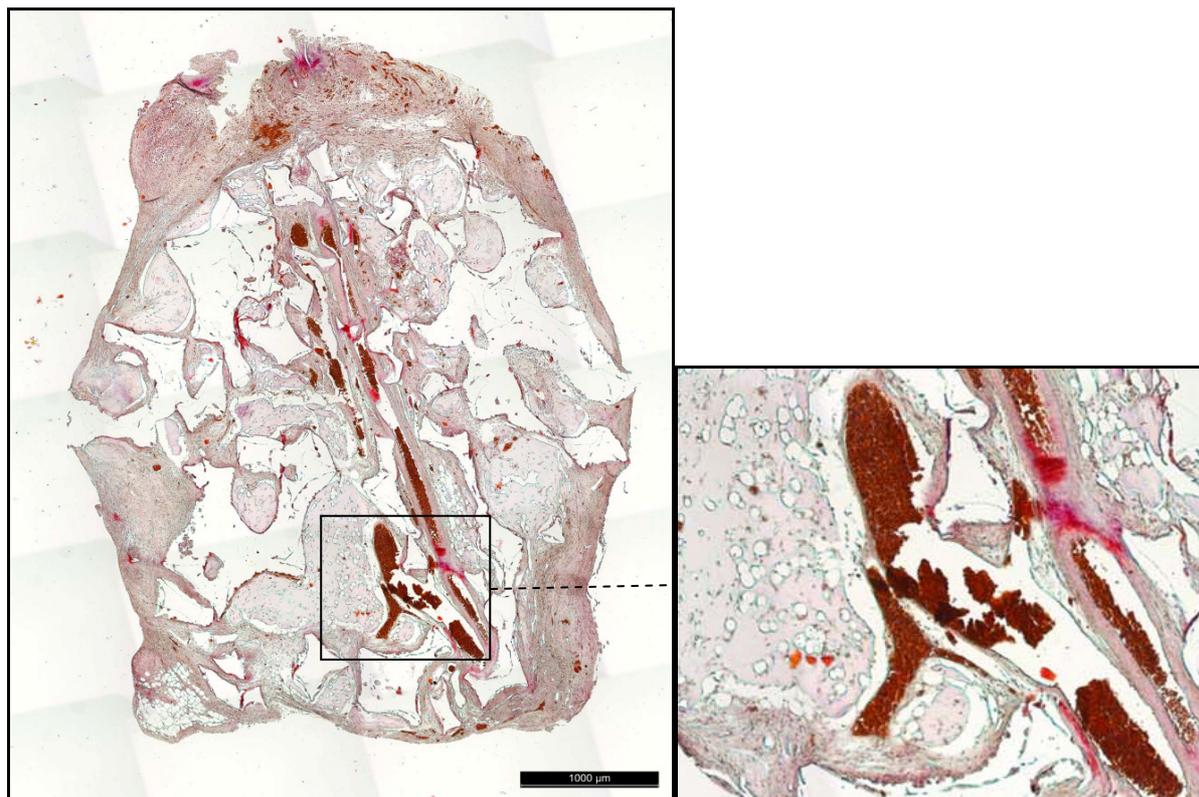


Abb. 39 Gruppe 4, Woche 1

Ausschließlich in 4 Gruppen lässt sich nach 1 Woche, in dem gut mit Nährstoffen versorgten Bereich rund um das Durchlaufgefäß, eine beginnende Adipogenese beobachten (siehe Detail). Eine Neovaskularisation hat kaum stattgefunden. Im restlichen Konstrukt findet man wie in allen anderen Gruppen eine homogene Verteilung des Fibrin-Zell-Gemisches.

**Abb. 40 Gruppe 4, Woche 5**

Wie auch schon in den vorangegangenen Gruppen lässt sich in Gruppe 4 nach 5 Wochen eine ausgeprägte Neovaskularisation beobachten. Auch hier kann schon eine Reifung der Präadipozyten hin zu Adipozyten detektiert werden. Vor allem in Gefäßnähe und an den Rändern sind noch kleine Vakuolen zu erkennen (siehe Detail). In gefäßfernen, also minderversorgten Regionen hingegen, findet man noch zahlreiche Präadipozyten.

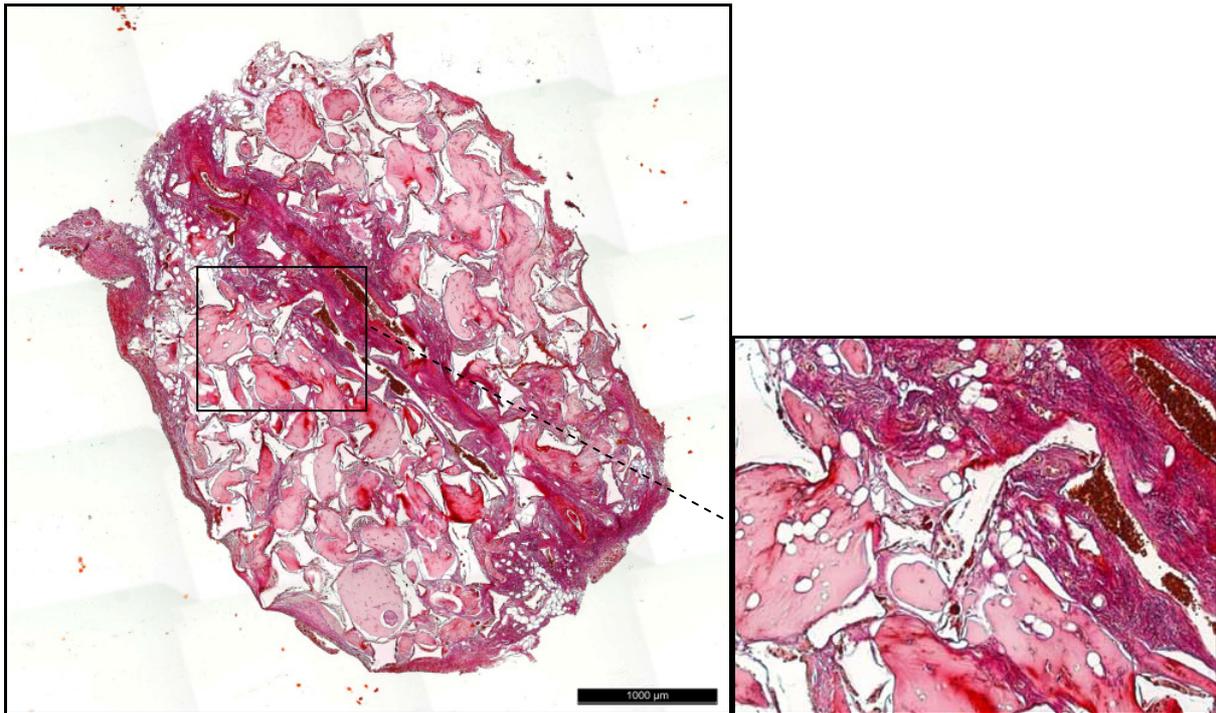


Abb. 41 Gruppe 4, Woche 12

Auch in Gruppe 4 ist nach 12 Wochen eine ausgeprägte Neovaskularisation zu erkennen. Ebenso ist eine vermehrte Adipogenese wieder im Bereich des Durchlaufgefäßes und an den Rändern zu erkennen (siehe Detail). Genau wie in Woche 5 durchzieht die Adipogenese noch nicht das komplette Konstrukt. In den Räumen dazwischen kann man noch die Fibrinfelder mit Zellen beobachten. In einzelnen Bereichen ist ein bindegewebiger Umbau auszumachen, der aber nicht vergleichbar mit der Gruppe 3 ist. Auch hat hier der Durchmesser des Konstruktes vergleichsweise nur mäßig abgenommen.

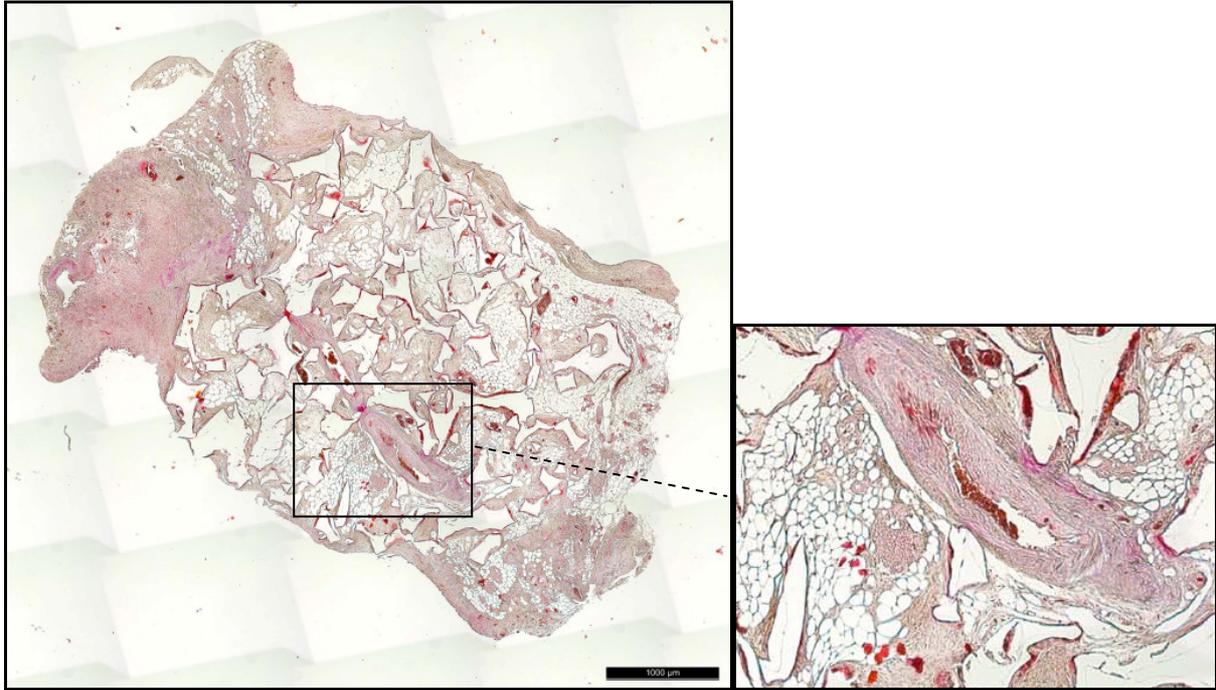


Abb. 42 Gruppe 4, Woche 24

In Woche 24 bei Gruppe 4 kann zum ersten Mal eine homogene Verteilung der ausgereiften Adipozyten über das gesamte Konstrukt beobachtet werden. Zwischen den einzelnen Fettzellnestern sind wenige Bindegewebszüge zu erkennen. Wie schon in den anderen Gruppe ist auch hier eine deutliche Gefäßneubildung erkennbar. Im Gegensatz zu Gruppe 3 ist, trotz langer *in vitro* und *in vivo* Zeit, keine allzu starke Größenabnahme zu beobachten.

3.2.1.2 Öl-Rot-Färbungen - Nachweis adipogener Differenzierung mittels Öl-Rot-Färbungen

Um nachzuweisen, dass die differenzierten Zellen in den Konstrukten auch tatsächlich Adipozyten darstellen, wurden an einzelnen Kryopräparaten eine Fettfärbung mit Öl-Rot durchgeführt, durch welche die enthaltenen Lipide orange-rot angefärbt werden. Durch das Schneiden der Konstrukte wurden allerdings teilweise die Zellwände der Adipozyten zerstört, sodass die Lipide auslaufen konnten und somit wenige intakte Fettzellen zu erkennen sind.

Nach einer Woche sind zahlreiche schwach rot angefärbte Zellen zu erkennen, die Präadipozyten. Das Polyurethangerüst ist intensiv rot angefärbt (Abb.43). Nach 24 Wochen erkennt man zahlreiche rote Adipozyten, wobei viele davon ihre Struktur verloren haben und nur noch als rötlich verschwommene Masse zu erkennen sind (Abb.44).

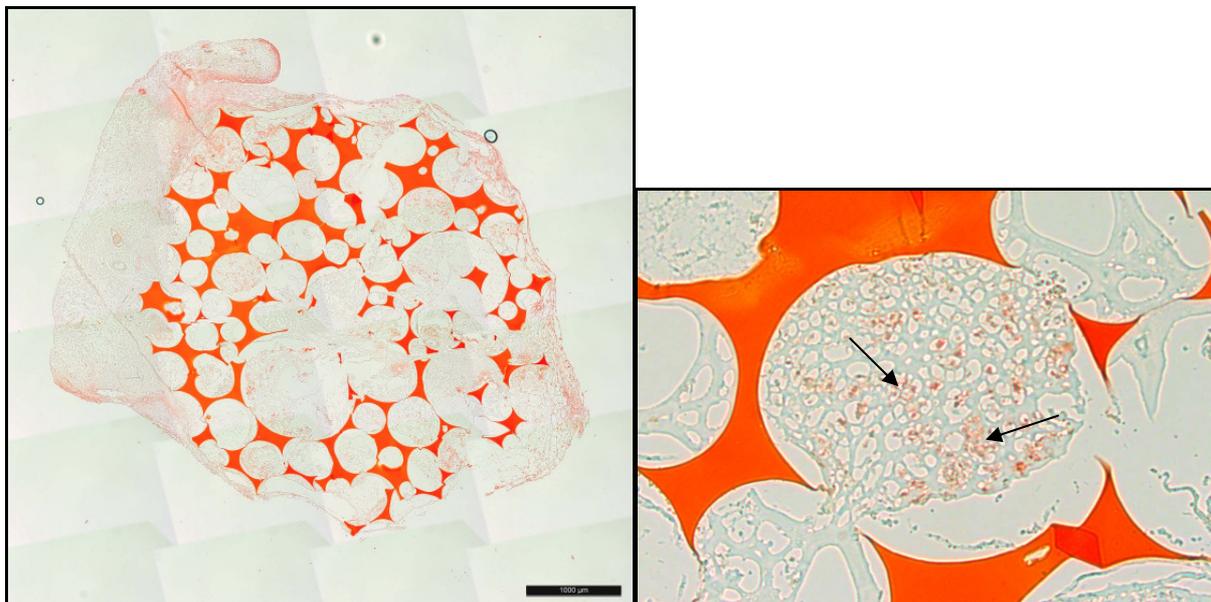


Abb. 43 Öl-Rot-Färbung eines Konstruktes von Gruppe 1 nach 1 Woche

Anhand eines Schnittes der Gruppe 1 nach 1 Woche ist die intensiv rote Färbung des Polyurethangerüsts zu erkennen. In der Nahaufnahme sieht man die schwach rot angefärbten Präadipozyten (Pfeile) im nicht angefärbten Fibrin.

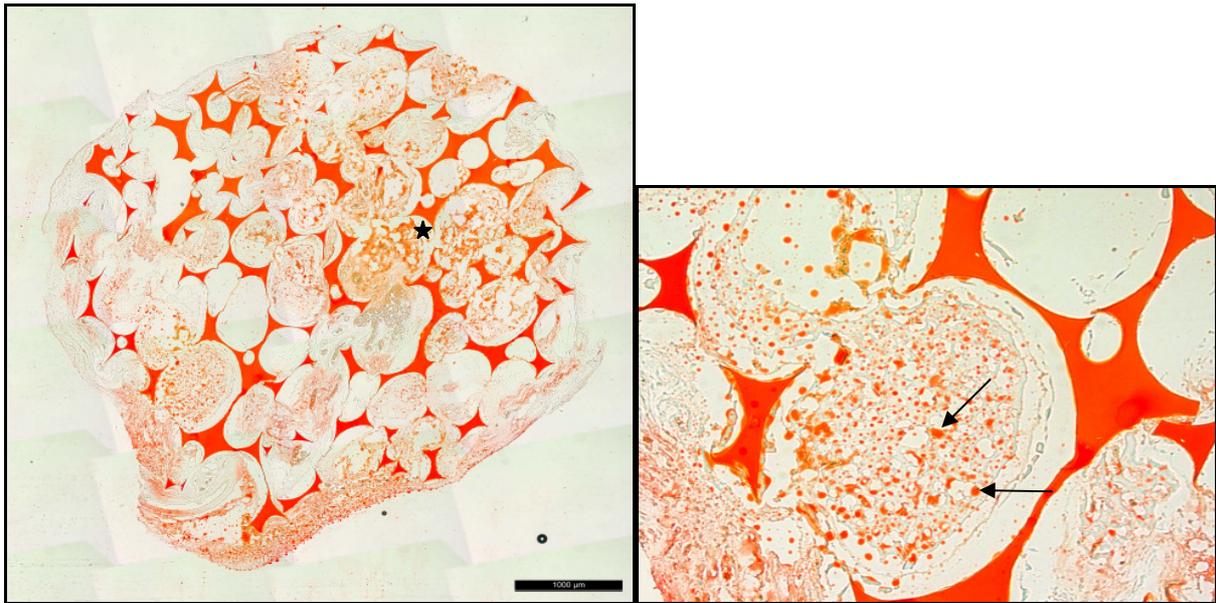


Abb. 44 Öl-Rot-Färbung eines Konstruktes der Gruppe 4 nach 24 Wochen

Nach 24 Wochen sind in Gruppe 4 zahlreiche rot angefärbte Areale zu beobachten, die teilweise noch die runde Form der Adipozyten (Pfeile) aufweisen, teilweise aber nur noch als eine verschwommene Lipidmasse erkennbar sind (Stern).

3.2.1.3 AK-Färbungen

Um herauszufinden, welchen Ursprungs die entstandenen Adipozyten sind, wurde eine Antikörper Färbung mit Vimentin durchgeführt. Bei dieser sollen spezifisch die humanen Zellen rot angefärbt werden, wohingegen die Murinen blauschwarz dargestellt sind. Somit soll überprüft werden, ob tatsächlich aus den eingebrachten humanen Präadipozyten die Fettzellen entstanden sind, oder ob diese nur den Anreiz für murinen Adipozyten darstellten.

Zunächst wurde eine Färbung von nativem humanem und murinem Fettgewebe durchgeführt, um den Erfolg der Färbung zu bestätigen (Abb.45).

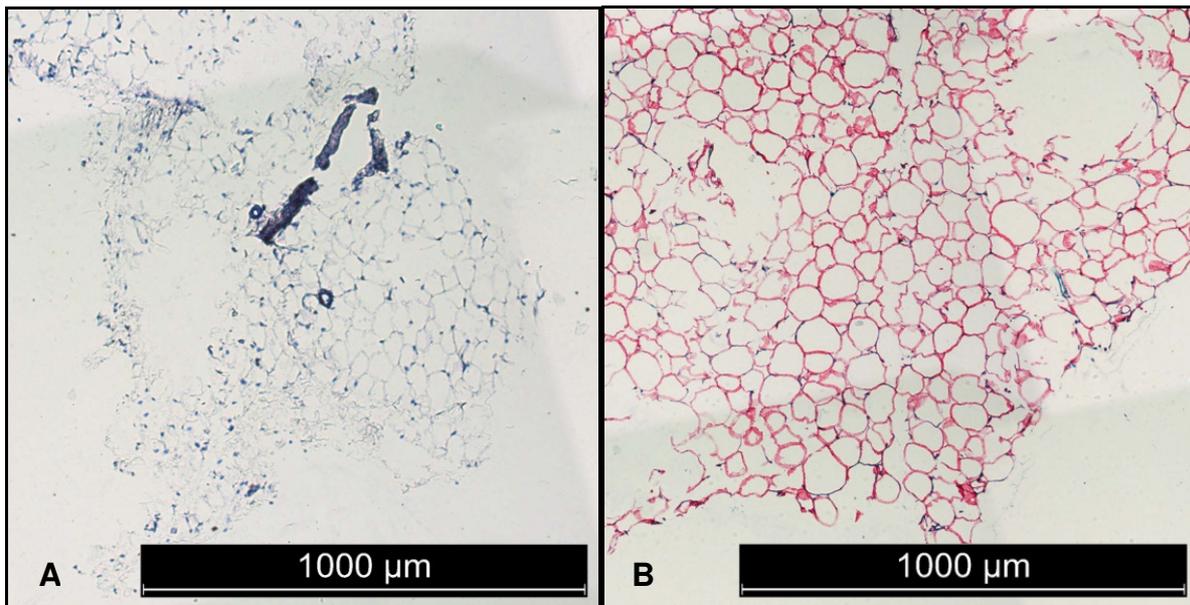


Abb. 45 Antikörperfärbungen nativen Fettgewebes

(A) Vimentinfärbung von nativem murinem Fettgewebe. (B) Vimentinfärbung von nativem humanem Fettgewebe.

In Gruppe 1 bis 3 kann man in allen Schnitten der Wochen 1 und 5 zahlreiche rot angefärbte Zellen humanen Ursprungs erkennen. Zu den späteren Zeitpunkten der Wochen 12 und 24 sind, wenn überhaupt, nur einzelne Areale humaner Zellen erkennbar, die vorhandenen reifen Adipozyten erscheinen murinen Ursprungs. Nur in Gruppe 3, Woche 24, sind auch rot angefärbte humane Adipozyten im Konstrukt zu sehen. Bei der Gruppe 4 kann man durch alle Zeiträume hindurch nur einzelne Felder mit humanen Zellen beobachten, das restliche Gewebe ist murin. In Woche 24 dann, in der zahlreiche Adipozyten zu erkennen sind, erscheinen diese nur murinen Ursprungs zu sein (Abb.46-49).

Zum besseren Vergleich wurden die jeweils angrenzenden Schnitte der trichromgefärbten Präparate gefärbt und hier dargestellt.

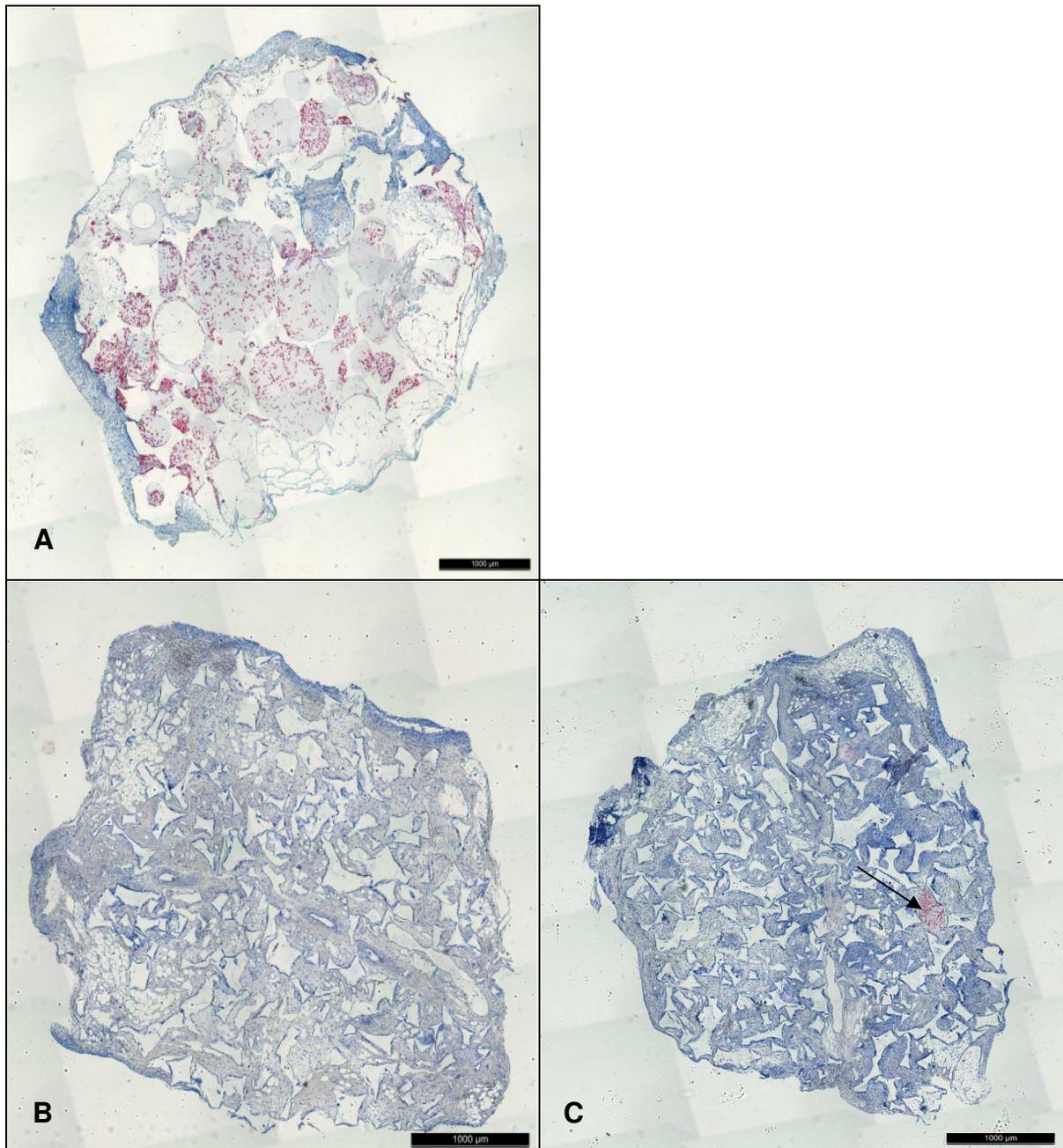


Abb. 46 Vimentinfärbungen Gruppe 1

(A) Nach 1 Woche sind in Gruppe 1 zahlreiche rot angefärbte, humane Zellen (Prädipozyten) zu erkennen. (B+C) Sowohl in Woche 12 als auch in Woche 24 sind vereinzelt Adipozyten vorhanden, welche allerdings keine Rotfärbung aufweisen, also nicht humanen Ursprungs sind. Nur rudimentär sind humane Zellfelder zu erkennen (Pfeil).

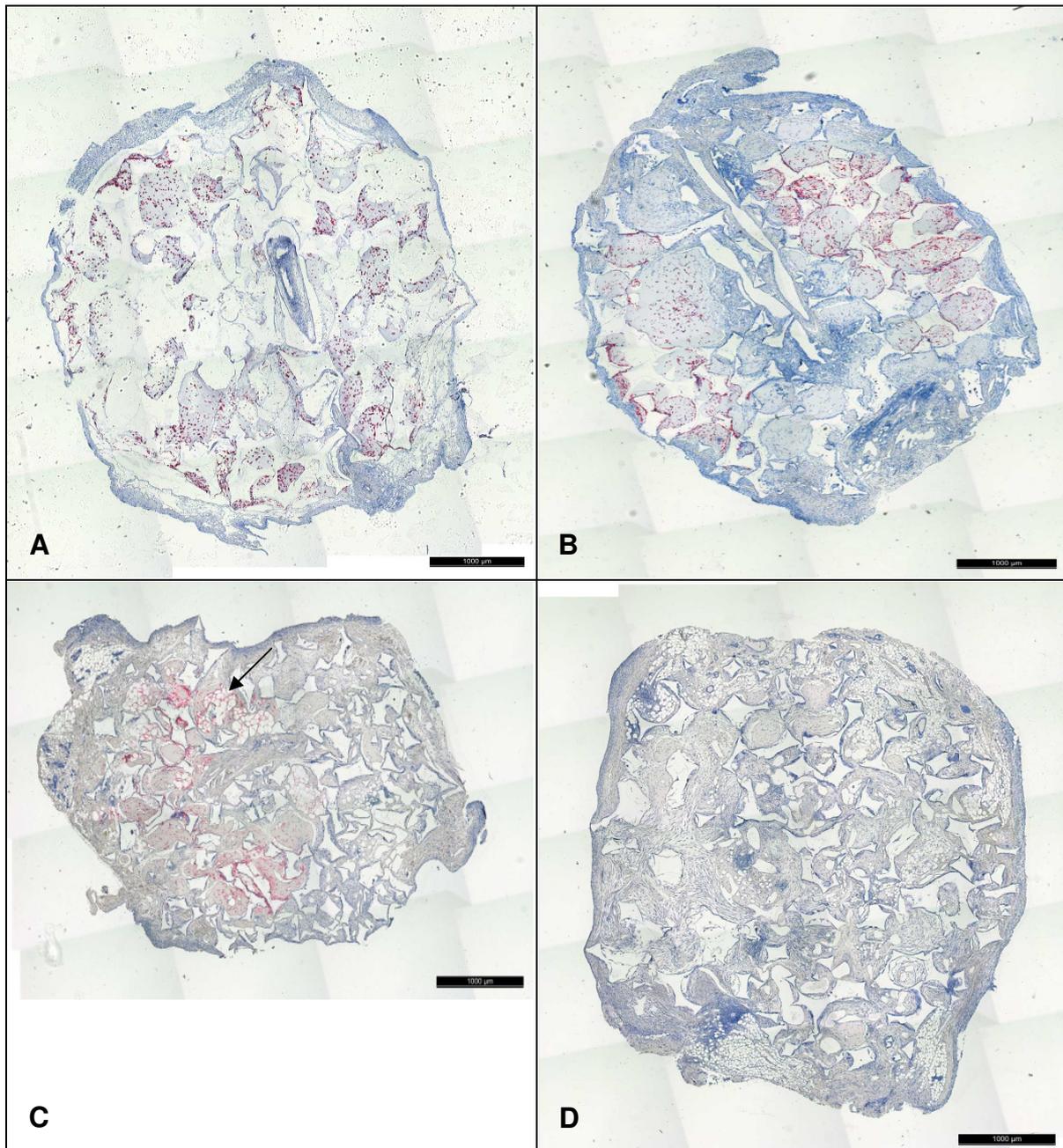


Abb. 47 Vimentinfärbungen Gruppe 2

(**A+B**) In Gruppe 2 sieht man nach 1 und 5 Wochen zahlreiche, homogen verteilte rot angefärbte Präadipozyten. (**C**) Nach 12 Wochen sind einzelne Felder von Präadipozyten humanen Ursprungs sichtbar, aber auch einzelne Adipozyten deren Zellmembran eine Rotfärbung aufweist (Pfeil). (**D**) In Woche 24 sind einige Adipozyten, aber keine humanen Zellen mehr vorhanden.

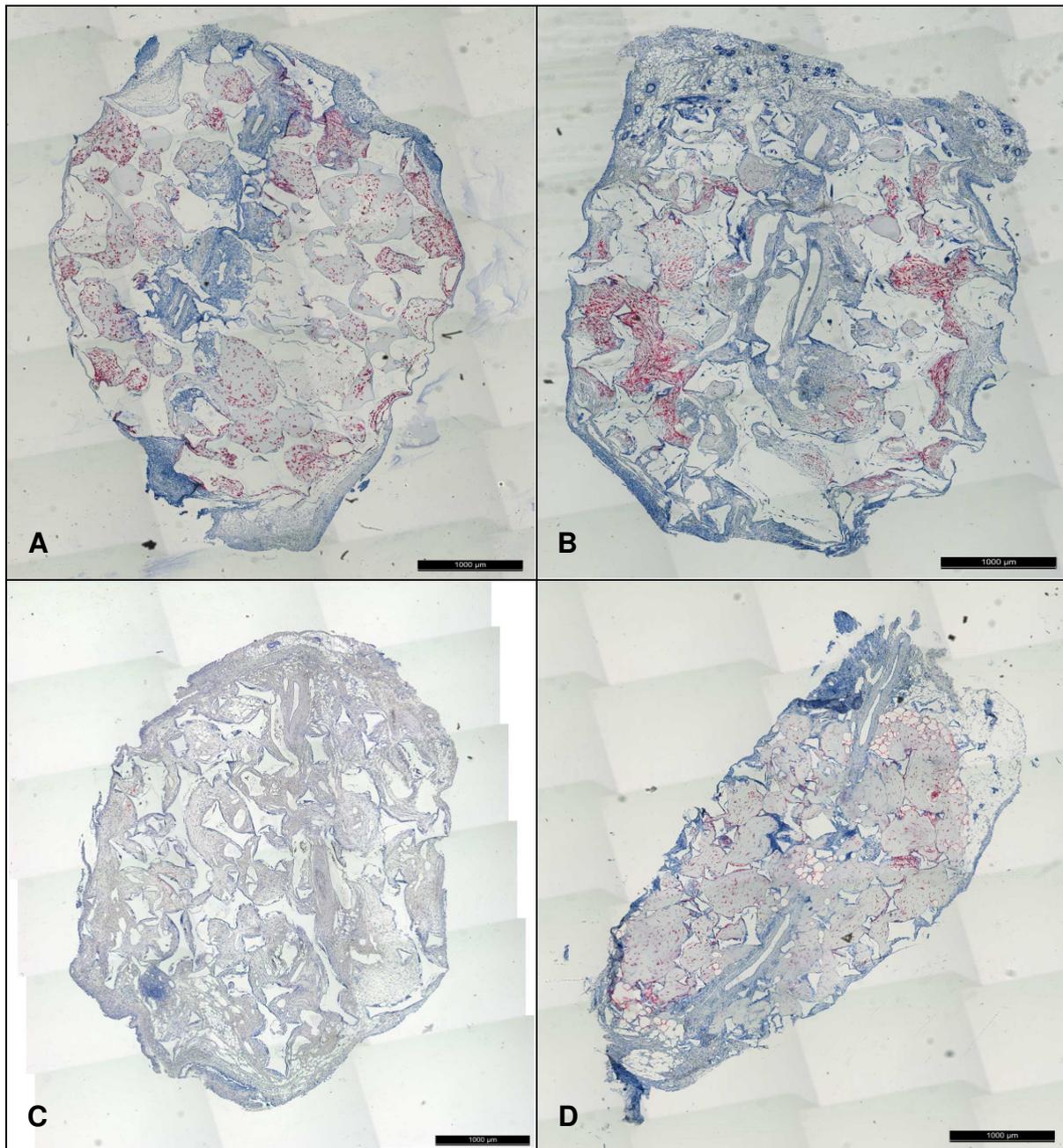


Abb. 48 Vimentinfärbungen Gruppe 3

(**A+B**) Gruppe 3 zeigt nach 1 und 5 Wochen das gleiche Bild wie schon Gruppe 1 und 2: eine homogene Verteilung der humanen Präadipozyten auf das gesamte Konstrukt. (**C**) Nach 12 Wochen sind fast ausschließlich murine Zellen erkennbar. (**D**) In den Explantaten der Woche 24 dagegen sind zahlreiche humane Adipozyten sowie Zellreste zu sehen, die sich auf das gesamte Konstrukt verteilen.

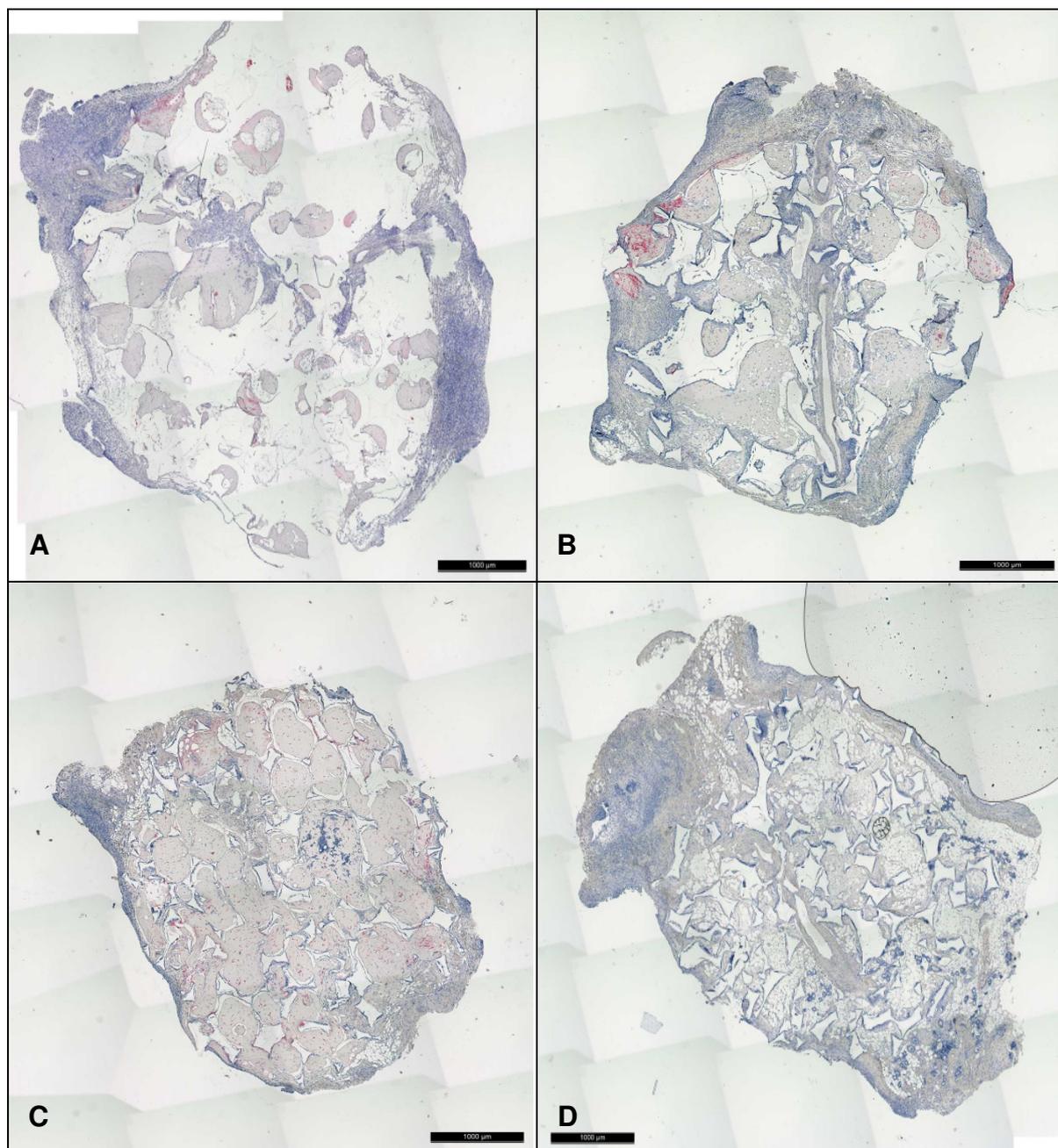


Abb. 49 Vimentinfärbungen Gruppe 4

(**A+B+C**) Immer wieder sind in Gruppe 4 nach 1, 5 und 12 Wochen Bereiche mit humanen Präadipozyten erkennbar. Keine der reifen Adipozyten zeigt Zeichen humanen Ursprungs. (**D**) Nach 24 Wochen ist das gesamte Konstrukt von zahlreichen Fettzellen durchzogen. Das gesamte Gewebe ist murinen Ursprungs.

3.2.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls an den Trichromfärbungen nach Ladewig, da diese durch die schon oben genannten Färbereigenschaften die größtmögliche Übersicht über die Schnitte bieten konnte.

3.2.2.1 Auswertung der Kontrollen Nacken

Flächen/Formstabilität der Kontrollen

Die Auswertung der Nackenkontrollen erfolgte identisch zu den Konstrukten der Leisten. Da die Explantate aus dem Nacken aufgrund differenzieller Aufbereitungsmethoden nach der Entnahme halbiert wurden, wurde auch die Ausgangsgröße des Polyurethans halbiert, um bei der Flächenberechnung als Vergleichswert zu dienen ($A = 9,8125 \text{ mm}^2$).

Bei den Nackenkontrollen kann über die gesamten Zeiträume hinweg ein Abwärtstrend bei der Flächengröße beobachtet werden. Nach 1 Woche *in vivo* ist die Größe bei allen vier Gruppen um 5 % bis 25 % zurückgegangen. Dieser Trend setzt sich nach 5 (26 % - 34 %) bzw. 12 Wochen (32 % - 44 %) fort. Ebenfalls ist bei den Nackenkontrollen nach 24 Wochen in Gruppe 3 eine massive Größenabnahme um 62 % zu beobachten. Die Konstrukte der Gruppen 1, 2 und 4 zeigen in Woche 24 eine Abnahme zwischen 19 % und 44 % (Abb.53).

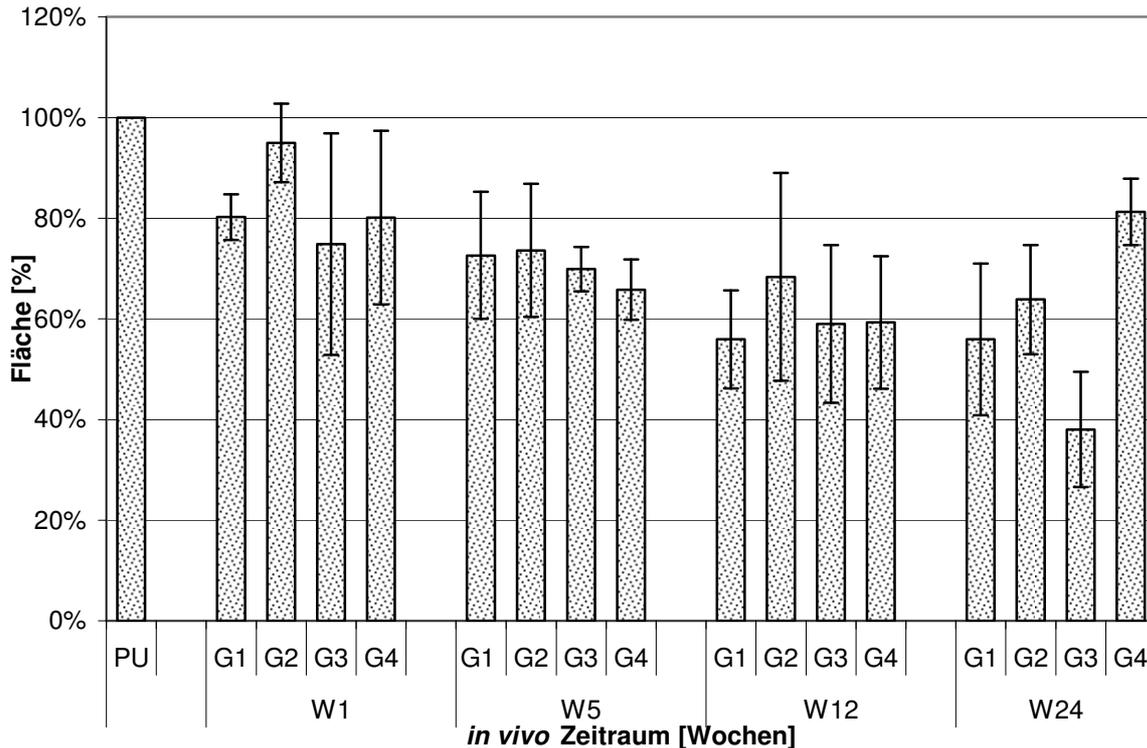


Abb. 50 Flächen der Kontrollen in %

Anzahl der Gefäße / Neovaskularisation der Kontrollen

Nach 1 Woche *in vivo* ist bei den Kontrollen aus dem Nacken keine signifikante Neovaskularisation festzustellen, sie befindet sich durchschnittlich zwischen 0,5 und 0,8 Gefäßen pro mm².

Erst nach 5 Wochen ist in allen Gruppen ein erster geringfügiger Anstieg zu erkennen, wobei dieser von Gruppe 1 mit 2,2 Gefäßen pro mm² zu Gruppe 4 mit 5,1 pro mm² leicht zunimmt.

In Woche 12 nimmt die Anzahl der Gefäße nochmals zu, wobei Gruppe 4 mit 8,3 pro mm² wiederum den höchsten Anstieg aufweist.

Bei Gruppe 1 und Gruppe 3 kann auch nach 24 Wochen noch eine Zunahme der Gefäßzahl beobachtet werden (4,8 bzw. 10,4 pro mm²), Gruppe 2 und 4 weisen mit 4,3 bzw. 6,9 pro mm² eher einen Rückgang auf (Abb.54).

Wie schon bei den Bildern unter 3.2.1.1 zu erkennen, ist die Verteilung und Lokalisation der Gefäße im Konstrukt bei den Nackenkontrollen nicht gleichmäßig. Blutgefäße werden fast ausschließlich im Randbereich der Konstrukte gefunden. Zentral findet so gut wie keine Neovaskularisation statt.

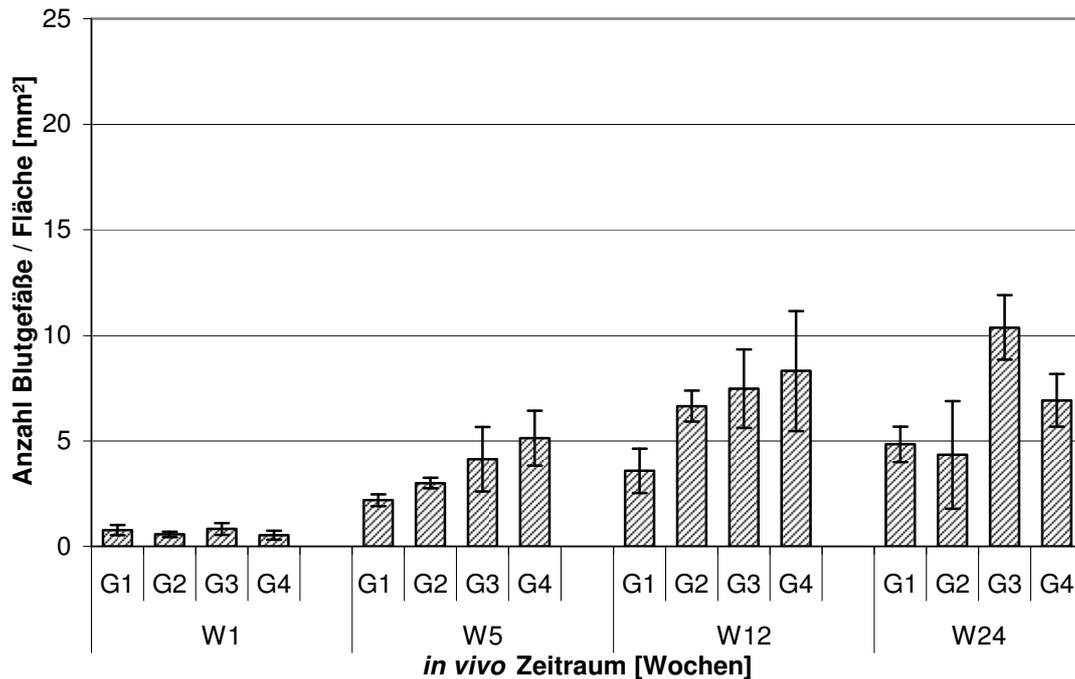


Abb. 51 Anzahl der Gefäße der Kontrollen pro mm²

Anzahl (und Verteilung) der Adipozyten in den Kontrollen

Wie auch bei den Konstrukten aus der Leiste können mit gerade mal 0,2 bis 0,7 Adipozyten pro mm² bei den Nackenkotrollen nach 1 Woche *in vivo* so gut wie kaum Adipozyten erfasst werden.

Erst nach dem 5-Wochen-Zeitraum werden in Gruppe 2 bis 4 erste Fettzellen erkannt (22,7 - 54,5 pro mm²). Gruppe 1 zeigt mit 0,4 pro mm² zu diesem Zeitpunkt noch so gut wie keine Adipogenese.

Nach 12 Wochen steigt die Zahl der Adipozyten pro mm² bei Gruppe 1 mit 36,7 pro mm², bei Gruppe 2 mit 60,3 pro mm² bis Gruppe 3 mit 78,7 pro mm² stetig an. Woche 24 fällt auf 40,5 pro mm² zurück.

In Woche 24 bleibt die Gruppe 1 bei 35,1 pro mm² annähernd konstant, Gruppe 2 und 3 zeigen mit 52,2 bzw. 69,2 pro mm² eine Abnahme der Zellzahl, nur bei Gruppe 4 kann ein Anstieg auf 79,1 pro mm² verzeichnet werden (Abb.55).

In Anbetracht der Bilder von 3.2.1.1 erkennt man deutlich, dass nur im Randbereich, wo auch ausschließlich die Neovaskularisation stattgefunden hat, Fettgewebe zu finden ist. Das Zentrum der Konstrukte besteht größtenteils aus Bindegewebe oder Resten des Fibrins.

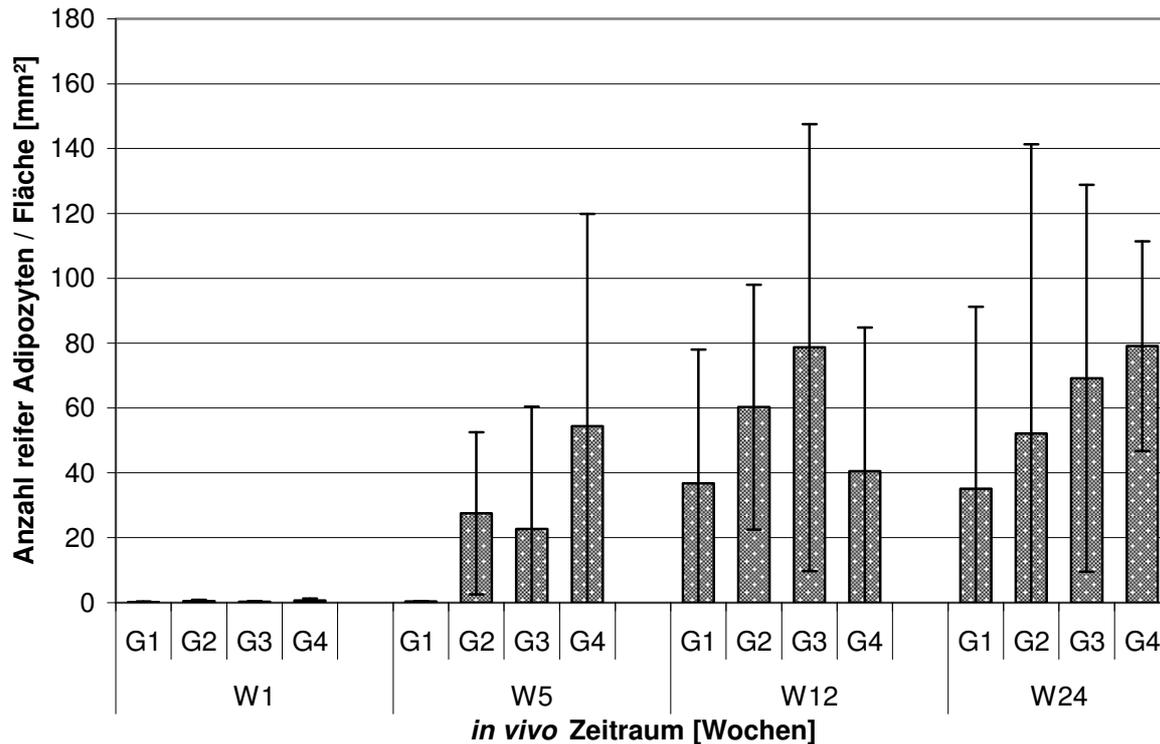


Abb. 52 Anzahl der Adipozyten der Kontrollen pro mm²

3.2.2.2 Auswertung der Polyurethankonstrukte der Leiste

Flächen / Formstabilität der Konstrukte

Für die zukünftige Anwendung am Menschen ist es erforderlich, dass die beimpften und implantierten Konstrukte formstabil bleiben, um ästhetisch und funktional zufriedenstellende Ergebnisse zu liefern.

In allen Gruppen nimmt die Größe des Scaffolds innerhalb der 24 Wochen ab. Vor allem bei den Konstrukten in der Leiste ist dieser Trend verstärkt zu beobachten. Nach 1 Woche bewegt sich die Größenabnahme in allen 4 Gruppen zwischen 16 % und 25 %, nach 5 Wochen zwischen 13 % und 21 % und nach 12 Wochen zwischen 21 % und 34 %. Die größte Abnahme ist nach 24 Wochen zu registrieren, wobei besonders Gruppe 3 hervorsticht. Hier ist nach 24 Wochen eine massive Größenabnahme um 63 % sowie eine deutliche Formveränderung erkennbar. In Gruppe 1, 2 und 4 bewegt sich die Größenabnahme in Woche 24 zwischen 32 % und 46 % (Abb.50).

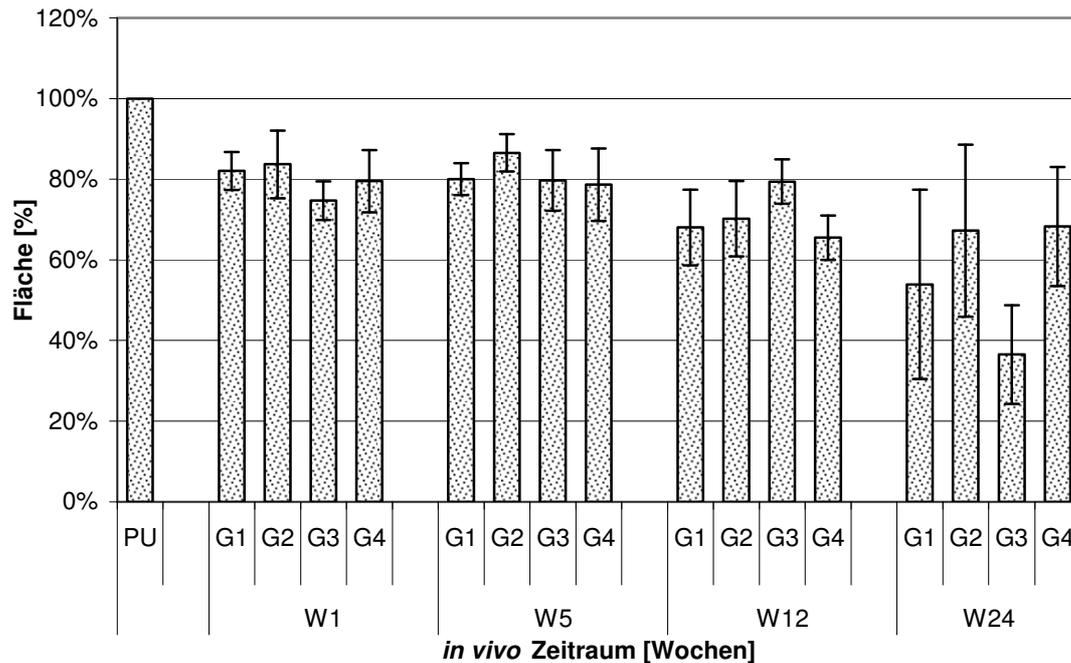


Abb. 53 Flächen in %

Anzahl der Gefäße / Neovaskularisation

Durch die Trichromfärbung nach Ladewig können die Blutgefäße leicht ausgezählt werden, da sich die darin befindlichen Erythrozyten orange-rot anfärben und somit stark hervorheben.

Nach 1 Woche *in vivo* kann in keiner der 4 Gruppen eine signifikante Gefäßneubildung beobachtet werden, sie befindet sich durchschnittlich zwischen 0,7-1,5 Gefäße pro mm².

Erst nach 5 Wochen findet ein deutlicher Anstieg der Gefäßzahl in allen Gruppen statt, wobei dieser in Gruppe 1 mit 5,2 Gefäßen pro mm² am niedrigsten ist und bis Gruppe 4 mit 7,6 pro mm² leicht zunimmt.

Über die Wochen 12 und 24 nimmt die Anzahl der Gefäße weiterhin zu. In Woche 12 sind die Werte der Gruppe 1 mit durchschnittlich 4,8 Gefäßen pro mm² die niedrigsten, die der Gruppe 4 mit 10,5 pro mm² die höchsten.

Nach 24 Wochen steigen die Werte weiterhin, wobei in Gruppe 1 und 2 die Anzahl der Gefäße bei ca. 10 pro mm² liegt und in Gruppe 4 bei 13,8 pro mm². Deutlich steigt der Wert von Gruppe 3, der sich bei durchschnittlich 18,5 Gefäßen pro mm² befindet (Abb.51).

Bei den Bildern unter 3.2.1.1 kann beobachtet werden, dass die Neovaskularisation sowohl an den Rändern der Konstrukte wie auch bei den Scaffolds mit

Gefäßschlinge, von Zentral aus beginnt. Zu späteren Zeitpunkten ist dann das gesamte Konstrukt mit zahlreichen Gefäßen durchzogen.

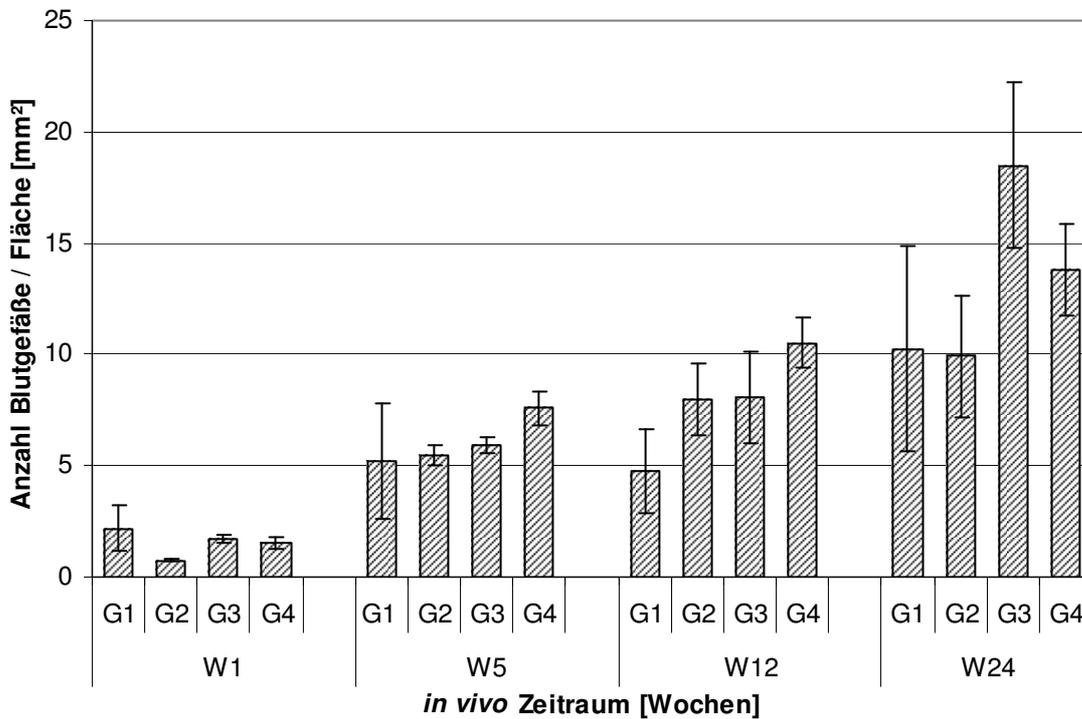


Abb. 54 Anzahl der Gefäße pro mm²

Anzahl und Verteilung der Adipozyten

In allen 4 Gruppen können nach einer Woche *in vivo* kaum reife Adipozyten gefunden werden. Durchschnittlich finden sich in Gruppe 1 gerade mal 0,3 Adipozyten pro mm², in Gruppe 2 und 3 sind es 1,0 bzw. 1,3 pro mm². In Gruppe 4 sind dagegen 3,5 pro mm² festzustellen.

Dies ändert sich allerdings nach 5 Wochen. Gruppe 1, mit der geringsten Vorkultivierungszeit, zeigt hier immer noch eine unzureichende Zellentwicklung mit 3,8 Adipozyten pro mm². Wohingegen in Gruppe 2 schon ein gewisser Anstieg auf 7,7 pro mm² zu erkennen ist. Dieser Trend ist bei Gruppe 3 und 4 noch deutlicher, hier liegen die Werte bei 23,1 bzw. 33,4 reifen Adipozyten pro mm².

Nach 12 Wochen zeigt sich auch in Gruppe 1 eine Zunahme der Anzahl der Adipozyten (25,1 pro mm²). Gruppe 2 und 3 zeigen auch hier wieder einen gewissen Anstieg auf 48,6 bzw. 42,0 Adipozyten pro mm², nur Gruppe 4 ist so gut wie unverändert zu Woche 5 bei 35,5 pro mm².

In Gruppe 1 ist auch nach 24 Wochen immer noch ein gewisser Anstieg erkennbar (37,4 pro mm²). In den Gruppen 2 und 3 lässt sich allerdings wieder ein Rückgang

der Adipozytenzahl erkennen (32,9 bzw. 31,0 pro mm²). Dies ist sowohl in den Konstrukten mit Gefäßanschluss als auch in den Kontrollen zu erkennen. Nur die Gruppe 4 zeigt nach 24 Woche eine deutliche Zunahme des Anteils reifer Adipozyten mit 121,4 pro mm² (Abb.52).

Neben der Gesamtzahl der Adipozyten ist es vor allem wichtig, die Verteilung dieser innerhalb des Konstruktes zu beurteilen. Vor allem der Vergleich der Scaffolds mit Gefäßanschluss um die A. und V. femoralis mit den Kontrollen (Scaffolds im Nacken, ohne Gefäßanschluss) ist hier von Bedeutung.

Anhand der Übersichtsaufnahmen unter Punkt 3.2.1.1 ist diese Verteilung gut zu beurteilen. Hier wird deutlich, dass die Adipogenese sowohl von den gut versorgten Randbereichen als auch vom zentralen Gefäßbündel aus beginnt. In den Bereichen dazwischen werden, wenn überhaupt, erst nach langer *in vivo* Zeit (12 - 24 Wochen) einzelne Adipozyten erkannt.

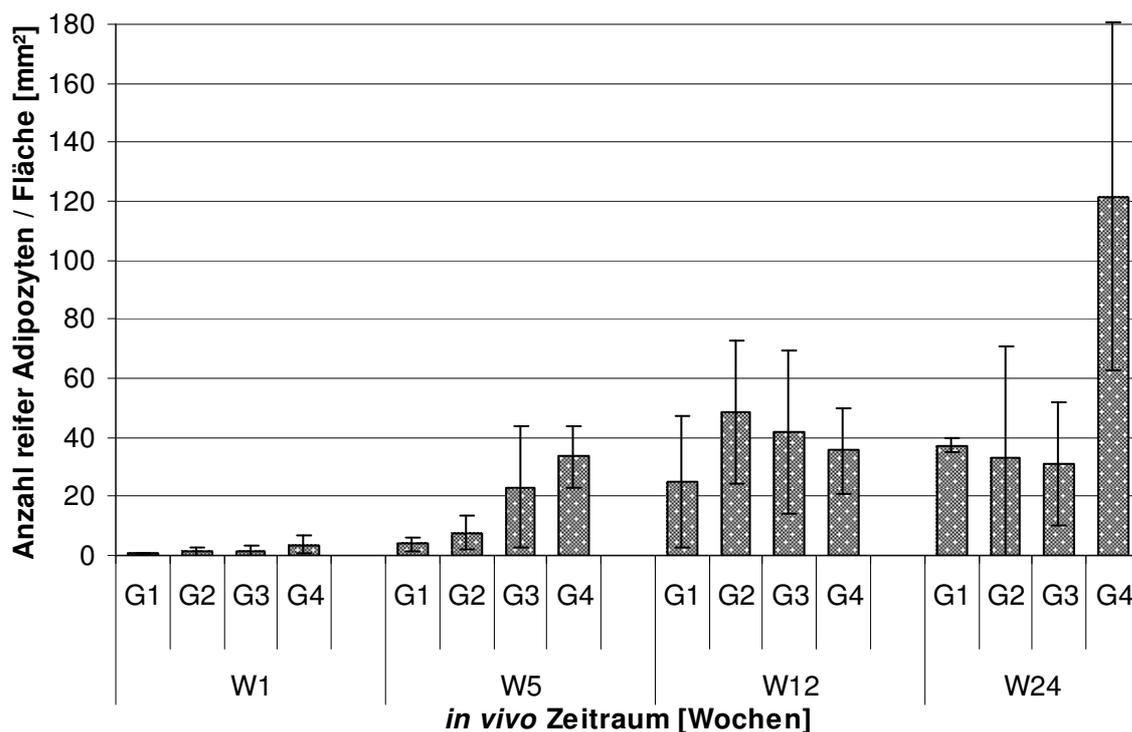


Abb. 55 Anzahl der Adipozyten pro mm²

4 Diskussion

Die Extraktion von Präadipozyten aus humanem Fettgewebe, das Einbringen dieser in ein dreidimensionales Gerüst und deren Kultivierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde schon in zahlreichen Arbeiten beschrieben. Dabei wurden wiederholt die gleichen Probleme erkennbar. Zum einen ist es die ungenügende Vaskularisierung der Konstrukte (Borges, Mueller 2003; Hemmrich, Van de Sijpe 2008) und im Zusammenhang damit eine unzureichende Durchwachsung der Konstrukte mit Adipozyten. Zum anderen ist es die mangelnde Formstabilität der Trägermaterialien, die schon nach kurzen *in vivo* Zeiten zu teilweise massiven Größenverlusten beitragen (von Heimburg, Zachariah 2001; Patrick, Zheng 2002; Cho, Kim 2006). Diese Faktoren erschweren die Übertragung dieser Versuche auf größere Modelle, was für eine spätere Anwendung am Menschen aber erforderlich wäre.

4.1 Diskussion der Methodik

Isolation und Kultivierung

Die Isolation und Kultivierung von Präadipozyten aus humanem Fettgewebe wird in zahlreichen Studien erfolgreich beschrieben (von Heimburg, Hemmrich 2005; Stillaert, Di Bartolo 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hauner et al. verwendet (Hauner, Skurk 2001). Zur Optimierung der Zellisolation und -amplifikation wurden in früheren Arbeiten bereits einige Variationen des Protokolls getestet und ausgewertet (Rittler-Ungethüm 2012). Auch die Verwendung eines speziellen Mediums (ECGM) der Firma PromoCell erhöhte die Proliferation der Präadipozyten. Durch dieses Medium stand schon nach der p1 Passage eine adäquate Anzahl von Zellen für die Versuche zur Verfügung und es konnte auf eine längere *in vitro* Kultivierungszeit verzichtet werden. Die genauen Bestandteile des Mediums waren über die Firma PromoCell nicht zu erfahren, nur eine Übersicht der Zusammensetzung (Tab.5).

Trägermaterial/Polyurethan

Ein wichtiger Bestandteil im Tissue Engineering ist das Trägermaterial, das so genannte Scaffold. Zu den wichtigsten Eigenschaften, die dieses erfüllen muss, zählen sowohl eine gute Biokompatibilität, d.h., es darf nicht zytotoxisch sein, als

auch gute mechanische Eigenschaften. Der Träger muss für einen bestimmten Zeitraum formstabil bleiben. Zumindest so lange, bis die eingebrachten Zellen des zu ersetzenden Gewebes die Form selbstständig halten können, dann wiederum sollte ein rückstandsloser Abbau stattfinden. Um den Zellen genügend Raum zur Differenzierung und eine genügende Nährstoffversorgung zu bieten, ist sowohl die Porengröße als auch deren Interkonnexion ein wichtiger Faktor. Heimbürg (2001) stellte fest, dass Präadipozyten eine Porengröße von min. 40 μm benötigen, um zu reifen Adipozyten heranreifen zu können (von Heimbürg, Zachariah 2001). Das zeigt, dass der von uns verwendete Polyurethanschaum, mit einer Porengröße von 80 bis 250 μm , als ideales Trägermaterial dient.

In unserer Arbeitsgruppe wird seit mehreren Jahren mit dem Polyurethanschaum der Firma Polymaterials AG gearbeitet. In vorausgegangenen Versuchen mit Chondrozyten konnte schon die Formstabilität und Biokompatibilität mit diesen Zellen nachgewiesen werden (Hoang, Hoehnke 2009; Feucht, Hoang 2011).

In ersten Fettzellversuchen *in vitro* konnte die gesamte Methodik des Beimpfens der Polyurethanschäume mit Präadipozyten mittels Thrombin und Fibrinogen ermittelt werden. Ebenfalls erfolgte der Nachweis der Biokompatibilität des mit Präadipozyten beimpften Scaffolds anhand von Lebend-Tot-Färbungen (Rittler-Ungethüm 2012).

In einem ersten Tiermodell mit Nacktmäusen über 9 Wochen *in vivo* zeigte sich, dass die Porengröße von bis zu 250 μm und die ausgeprägten Interkonnexionen des Polyurethans genügend Raum für die Ausreifung von Fettzellen (bis zu 100 μm) und eine entsprechende Gefäßversorgung bieten (Leuthner 2014).

Induktion und Differenzierung

In der Literatur wird immer wieder aufgezeigt, dass eine Vorbehandlung der Präadipozyten mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu einer verbesserten Adipogenese führt (Fischbach, Spruss 2004; Alhadlaq, Tang 2005; Cho, Kim 2006). In der hier vorliegenden Arbeit sollte ermittelt werden, wie lange eine Induktion und Differenzierung stattfinden muss, um eine optimale Reifung der humanen Präadipozyten zu gewährleisten. Das Protokoll der Vorbehandlung erfolgte nach Weiser et al. (2008), die damit bei einer 3T3-L1 Zelllinien schon positive Ergebnisse aufzeigen konnten (Weiser, Prantl 2008).

Tiermodell (mit Gefäßschlinge)

Ein immer wieder auftretendes Problem bei implantierten Scaffolds ist, dass in den zentralen Anteilen der Konstrukte aufgrund mangelnder Nährstoffversorgung eine Nekrose der hierfür sehr empfindlichen Präadipozyten beobachtet werden kann (Smahel 1989; von Heimbürg, Zachariah 2001; Stillaert, Di Bartolo 2008).

Dies ist ein Problem, das sich durch alle *in vivo* Bereiche des TE zieht. Eine Vaskularisierung von außen ist häufig zu langsam und mittels Diffusion kann eine Nährstoffversorgung nur bis in eine Tiefe von 150 µm stattfinden, somit werden die Zellen im Inneren nicht versorgt und nekrotisieren (Awwad, el Naggat 1986; Borges, Mueller 2003). Einige TE-Forschungsgruppen haben Versuche unternommen, dieses Problem mit angiogenen Faktoren (Richardson, Peters 2001) sowie unterschiedlichen Wachstumsfaktoren (Murphy, Peters 2000) zu beheben. Zufriedenstellend waren diese allerdings noch nicht.

Andere Forschungsgruppen wiederum erhoffen sich Erfolge durch ein Anschließen des TE Gewebes an einen Gefäßstiel. Versuche an Mäusen und Ratten mit geschlossenen Kammern um die superficialen epigastrischen Gefäße zeigen eine sehr gute Vaskularisation ausgehend vom Durchlaufgefäß (Hofer, Knight 2003; Cronin, Messina 2004; Kelly, Findlay 2006; Vashi, Abberton 2006).

Auch in unserer Arbeitsgruppe wird seit mehreren Jahren mit einem Gefäßmodell der A. und V. femoralis gearbeitet. Erste erfolgreiche Versuche mit einer Gefäßschlinge erfolgten mit dem Polyurethan am Chondrozytenmodell (Feucht, Hoang 2011). Anhand von Vorversuchen mit einem mit Präadipozyten beimpften Polyurethan, welches für bis zu 9 Wochen in athymischen Nacktmäusen um die A. und V. femoralis implantiert wurde, konnte gezeigt werden, dass sich im Polyurethan sowohl ein ausgeprägtes Gefäßnetz bildet als auch erste kleine Inseln mit Adipozyten zu erkennen sind (Leuthner 2014). Die Adipozytenzahl war aufgrund einer fehlenden Vorkultivierung der beimpften Scaffolds bei Weitem nicht ausreichend, weshalb dieser Punkt in der hier vorgestellten Arbeit mittels der *in vitro* Induktion und Differenzierung verändert wurde. Die Neovaskularisation zeigte in den Vorversuchen schon gute Ergebnisse und wird auch in dieser Arbeit positiv beschrieben.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Diskussion der Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Versuche.

4.2.1 In vitro

Lebend-Tot-Färbungen

Schon in vorangegangenen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die eingebrachten Präadipozyten in den Polyurethanschäumen überleben. Auch in dieser Arbeit wurden Lebend-Tot-Färbungen mittels einer Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt, um die Viabilität zu überprüfen. Vor allem war es wichtig, vor der Implantation zu kontrollieren, ob auch nach einer langen *in vitro* Zeit noch vitale Präadipozyten aufgefunden werden oder ob diese absterben. Es konnte gezeigt werden, dass selbst nach der längsten Vorkultivierungszeit in Gruppe 4 noch über 50% der Präadipozyten leben. Daraus lässt sich schließen, dass sowohl das Polyurethan als Trägermaterial geeignet ist und keine Zytotoxizität aufweist, als auch, dass die Präadipozyten *in vitro* durch die Vorkultivierungsmedien eine gewisse Zeit ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden und zum Zeitpunkt der Implantation teilweise noch vital sind.

Öl-Rot-Färbungen

Um zu kontrollieren, ob es sich bei den aus dem humanen Fettgewebe extrahierten Zellen tatsächlich um Präadipozyten handelt, wurden diese in der Kulturflasche differenziert und mittels Öl-Rot angefärbt. Aufgrund ihrer Affinität zu Triglyceriden und der intensiven Rötffärbung dient diese Färbung hervorragend zur Bestätigung einer adipogenen Differenzierung (Choi, Park 2005). Von jeder der für die Versuche verwendeten Zellen wurde eine Probe entnommen, um sie 8 bis 12 Tage im Differenzierungsmedium zu kultivieren und anschließend mit Öl-Rot anzufärben. Der Farbstoff heftet sich an die in den Fettzellen befindlichen Lipide an und färbt sie orange-rot. Alle eingefärbten Proben zeigten eine große Anzahl an reifen Adipozyten, sodass bewiesen werden konnte, dass es sich bei den extrahierten und kultivierten Vorläuferzellen um Präadipozyten handelt.

Öl-Rot-Färbungen bei längeren Differenzierungszeiträumen konnten nicht angefertigt werden, da sich die Zellen nach ungefähr 15 Tagen vom Kulturflaschenboden lösen und somit eine Färbung nicht mehr möglich ist.

***In vitro* Konstrukte - Trichromfärbung nach Ladewig**

Parallel zum Tiermodell erfolgte eine Versuchsreihe *in vitro*, bei der exakt gleich beimpfte und vorbehandelte Konstrukte zu den *in vivo* Zeiträumen in Differenzierungsmedium gehalten wurden. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Präadipozyten sich auch in einem Medium ausdifferenzieren und ein homogenes Fettgewebe bilden können. In manchen Forschungsgruppen scheint eine Adipogenese *in vitro* stattgefunden zu haben, wie auch bei Weiser (2008), an deren Differenzierungsmedien und -zeiträumen sich in dieser Arbeit orientiert wurde. Allerdings wurde hier statt mit humanen Präadipozyten mit der murinen 3T3-L1 Zelllinie gearbeitet. Ein direkter Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten primären humanen Fettzellen ist daher nicht möglich.

In den hier vorliegenden Versuchen konnte in keiner der *in vitro* Gruppen und zu keinem der Zeiträume eine Reifung der Präadipozyten zu Adipozyten festgestellt werden. Nach 1 Woche sind in allen 4 Gruppen homogen im Fibrin verteilte Zellen (Präadipozyten) in den Poren des Polyurethans zu beobachten, was für eine optimale Beimpfung des Trägermaterials spricht. Erst nach 24 Wochen lassen sich in Gruppe 3 und 4 kleine Unterschiede zu Gruppe 1 und 2 feststellen. Die Lumina der Präadipozyten erscheinen etwas vergrößert, wobei sie aber nicht die Größe ausgereifter Adipozyten erreichen und sich der Zellkern immer noch zentral in der Zelle befindet (reife Adipozyten → an den Rand gedrängter Zellkern, Siegelringform). Dies deutet auf eine Differenzierung der Zellen im Anfangsstadium hin. Möglicherweise befinden sich die Zellen *in vitro* in einer Art "Wartestellung", bis bessere Bedingungen für eine vollständige Ausreifung auftreten. Auch Stillaert et al. (2007) vermuteten, dass die Vorläuferzellen in einem undifferenzierten Zustand verbleiben, bis bessere Verhältnisse im Sinne einer ausreichenden Vaskularisierung auftreten und erst dann zu Adipozyten differenzieren (Stillaert, Findlay 2007). Dies gilt es allerdings in weiteren Versuchen noch zu verifizieren.

Eine Größenabnahme konnte bei den *in vitro* Konstrukten beobachtet werden, unklar ist hier allerdings, ob diese im Laufe der Kultivierung entsteht oder aufgrund der Varianz bei der Herstellung der Scaffolds.

4.2.2 In vivo

Flächen / Formstabilität der Konstrukte

Um als geeigneter plastischer Gewebeersatz zu dienen, muss das eingebrachte Gewebe die vorgegebene Form halten und darf nicht signifikant an Größe und Volumen verlieren (Cho, Kim 2005). Doch genau dies ist beim TE immer wieder das Problem (von Heimburg, Zachariah 2001; Patrick, Zheng 2002; Cho, Kim 2006).

Ein wichtiger Faktor hierbei ist das verwendete Trägermaterial.

Dabei spielen folgende Parameter eine bedeutete Rolle:

Einerseits die Resorptionsrate: Das Scaffold darf nicht zu schnell resorbiert werden, da es als Platzhalter für das zu entstehende Gewebe dient, aber ebenso wenig darf es zu lange verweilen um kein Wachstumshindernis für dieses darzustellen (Patrick, Zheng 2002).

Außerdem die Porengröße: Eine ausreichende Porengröße des Trägermaterials ist wichtig, um den eingebrachten Zellen Raum zum Anhaften und Wachsen zu ermöglichen und zum anderen genügend Platz bereit zu stellen, um Blutgefäße einsprossen zu lassen. Wie bei den freien Transplantaten ist auch beim TE eine schnelle Vaskularisation des implantierten Konstruktes bzw. Gewebes von großer Bedeutung für die Formstabilität. Nur so kann eine ausreichende Nährstoffversorgung des sich entwickelnden Gewebes gewährleistet werden (Peer 1956; Borges, Mueller 2003).

Und die Biokompatibilität: Das Material darf nicht zytotoxisch sein und soll biologisch abbaubar sein.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Formstabilität der Konstrukte durch das Vermessen der histologischen Schnitte beurteilt. Mittels Photoshop wurde der Umfang vermessen, anschließend die Fläche berechnet und mit dem idealen Ausgangswert bei einem Durchmesser von 5 mm verglichen. Dies setzt natürlich voraus, dass die Schnitte immer exakt parallel zur Konstruktoberfläche sind.

Nach 1 Woche bewegt sich die Größenabnahme in allen 4 Gruppen zwischen 16 % und 25 %, nach 5 Wochen zwischen 13 % und 21 % und nach 12 Wochen zwischen 21 % und 34 %. Die größte Abnahme ist nach 24 Wochen zu registrieren, wobei besonders Gruppe 3 hervorsticht. Hier ist nach 24 Wochen eine massive Größenabnahme um 63 % sowie eine deutliche Formveränderung erkennbar. In Gruppe 1, 2 und 4 bewegt sich die Größenabnahme in Woche 24 zwischen 32 % und 46 %.

Auch bei den Nackenkontrollen kann über die gesamten Zeiträume hinweg ein Abwärtstrend bei der Flächengröße beobachtet werden. Nach 1 Woche *in vivo* ist die Größe bei allen vier Gruppen um 5 % bis 25 % zurückgegangen. Dieser Trend setzt sich nach 5 (26 % - 34 %) bzw. 12 Wochen (32 % - 44 %) fort. Auch bei den Nackenkontrollen ist nach 24 Wochen in Gruppe 3 eine massive Größenabnahme um 62 % zu beobachten. Die Konstrukte der Gruppen 1, 2 und 4 zeigen in Woche 24 eine Abnahme zwischen 19 % und 44 %.

Warum die Ergebnisse der Gruppe 3 nach 24 Wochen sich von den restlichen unterscheiden, lässt sich schwer erklären. Es konnten keinerlei Komplikationen wie Infektionen oder Wunddehiszenzen bei den postoperativen Kontrolluntersuchungen beobachtet werden. Möglicherweise waren die Mäuse (alle im selben Käfig) nach der Implantation sehr aktiv und haben sich viel bewegt.

Hemrich (2008) konnte bei Versuchen mit einem Hyaluron-Gel, welches zusammen mit Präadipozyten subkutan in Schweineohren injiziert wurde, feststellen, dass die Größenabnahme mit der Bewegung der Ohren korrelierte. D.h., umso mehr die Schweine die Ohren bewegten, umso größer war der Volumenverlust des eingebrachten Gel-Zell-Gemisches (Hemrich, Van de Sijpe 2008).

Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass die Stabilität des Polyurethankonstruktes zufrieden stellend ist, immerhin sind nach 24 Wochen im Durchschnitt noch 56,5 % der Ausgangsgröße des Scaffolds vorhanden.

Patrick (2002) konnten in ihren Versuchen mit in den Rücken von Ratten implantierten und mit Präadipozyten beimpften PLGA Scaffolds nach 5 Monaten keine Überreste ihres Konstruktes mehr auffinden (Patrick, Zheng 2002).

Anzahl der Gefäße / Neovaskularisation

Wie schon in unseren Vorversuchen sollte auch in dieser Arbeit wieder auf die Gefäßneubildung geachtet werden, da diese u.a. ausschlaggebend für das

Überleben der eingebrachten Fettzellen ist (Cho, Kim 2005). Reife Adipozyten haben eine extrem niedrige Toleranz gegenüber einer Ischämie, sodass sie nach einer Transplantation ohne eine ausreichende Gefäßanbindung nach 4 Tagen beginnen zu nekrotisieren (Peer 1956; Smahel, Schütz 1990; Cho, Kim 2006). Präadipozyten reagieren zwar weniger empfindlich auf eine Minderversorgung als ausgereifte Fettzellen (Borges, Mueller 2003; Walton, Beahm 2004), allerdings muss einer adipogenen Differenzierung eine Vaskularisation voraus gehen (Crandall, Hausman 1997). Somit ist auch beim TE die Gefäßneubildung ein überaus wichtiger Bestandteil (Vacanti 2010).

In unseren Versuchen ist zu erkennen, dass die Gefäßschlinge ein entscheidender Punkt für die Vaskularisierung des vollständigen Konstruktes ist. In allen 4 Gruppen kann nach 1 Woche *in vivo* schon eine beginnende Aussprossung von Gefäßen aus dem Durchlaufgefäß beobachtet werden, welche in den Wochen 5, 12 und 24 massiv zunimmt. Auch von den Rändern aus ist trotz der Ummantelung des Konstruktes mit einer Silikonfolie eine dezente Vaskularisierung zu beobachten, welche allerdings nicht weit ins Zentrum hineinreicht. Dies zeigen auch die Nackenkontrollen. Hier ist deutlich zu sehen, dass ohne Gefäßschlinge nur die Außenareale durchblutet werden, im Zentrum der Scaffolds sind keinerlei Blutgefäße auffindbar. Somit können in diesen Bereichen auch keine Adipozyten aufgefunden werden, da ohne eine ausreichende Nährstoffversorgung über die Blutgefäße auch keine Adipogenese stattfinden kann. Wie schon in zahlreichen vorangegangenen Studien kann auch hier festgestellt werden, dass nur durch eine zusätzliche Unterstützung der Vaskularisierung im Zentrum des Konstruktes ein Überleben der Zellen gewährleistet werden kann. Ansonsten ist eine zentrale Nekrose unvermeidbar und eine Übertragung auf ein größeres Modell undenkbar (Awwad, el Naggat 1986; Borges, Mueller 2003).

Zwischen den einzelnen Gruppen ist in unseren Versuchen nur ein geringer Unterschied bei der Neovaskularisierung zu erkennen. Zwar ist eine leicht steigende Gefäßzahl von Gruppe 1 zu Gruppe 4 zu erkennen, aber ansonsten nimmt die Vorkultivierung der Scaffolds keinerlei Einfluss auf die Gefäßneubildung.

Anzahl und Verteilung der Adipozyten

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob, wo und wie viele Fettzellen im implantierten Polyurethan entstanden sind. Sowohl wir in unseren Vorversuchen als auch andere Forschungsgruppen haben eine Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten erzielen können. Ein häufiges Problem war allerdings, dass dies nur in den gut durchbluteten Außenbereichen des implantierten Gewebes möglich war, Zentral konnten meist nur degenerierte Zellreste und so gut wie keine Gefäße gefunden werden (Borges, Mueller 2003; Cho, Kim 2006; Stillaert, Di Bartolo 2008).

Um eine höhere Adipozytenzahl zu erlangen, wurden in dieser Arbeit unterschiedlich lange Vorkultivierungszeiträume getestet. In Gruppe 1 wurden die Scaffolds nach dem Beimpfen für zwei Tage im Aussaatmedium (ECGM) inkubiert und dann Implantiert. In Gruppe 2 erfolgte nach der zweitägigen Inkubation auch noch eine zweitägige Induktion, um eine Differenzierung einzuleiten. In Gruppe 3 und 4 wurden die Scaffolds anschließend an die Inkubation und die Induktion auch noch 7 bzw. 33 Tage in ein Differenzierungsmedium gegeben.

Es konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der Adipozyten deutlich von der Art und Länge der Vorkultivierung und der *in vivo* Zeit abhängt.

Nach 1 Woche sind in allen Gruppen nur zahlreiche, im Fibrin homogen verteilte Zellen (Präadipozyten) in den Poren des Polyurethans zu erkennen. Eine Reifung hin zu Adipozyten ist noch nicht zu beobachten. Die homogene Verteilung lässt auf eine gute Beimpfung des Trägermaterials mit den Präadipozyten schließen.

In Gruppe 1 kann über die gesamten Zeiträume nur eine kleine Anzahl reifer Adipozyten erkannt werden. Der Großteil des Konstruktes ist nach 24 Wochen mit Bindegewebe durchwachsen. Schuld daran ist vermutlich in dieser Gruppe die fehlende Vorkultivierung. Nach nur zwei Tagen Inkubation wurden die Scaffolds direkt implantiert. Den Zellen fehlte somit der Impuls, sich in Richtung Adipozyten zu differenzieren. Zum gleichen Ergebnis kommt man auch bei den Nackenkontrollen. Auch hier sind nur einige wenige reife Fettzellen vorhanden. Interessant ist allerdings die Verteilung der Zellen. Kann man bei den Leisten-Konstrukten nach 12 und 24 Wochen erkennen, wie die zwar geringe Adipogenese in den gut durchbluteten Bereichen um den Gefäßstil und am Rand leicht zunimmt, ist hingegen bei den Nackenkontrollen Fettgewebe nur im Randbereich auffindbar. Im Zentrum der

Kontrollen sind nur die Fibrinfelder mit den Präadipozytenresten zu erkennen, welche mit zunehmender *in vivo* Zeit resorbiert und umgebaut werden.

In Gruppe 2 zeigt sich ein ähnliches Bild wie in Gruppe 1. Die Gesamtzahl der Fettzellen beschränkt sich immer noch auf ein paar wenige, die nicht zur Bildung eines vollständigen Gewebeverbunds ausreichen. Die Kultivierung der beimpften Konstrukte für nochmals zwei Tage in Induktionsmedium scheint keinen großen Vorteil gegenüber der Gruppe 1 zu bringen.

Nach 5 Wochen kann man eine Vergrößerung vereinzelter Zellen beobachten, was für eine beginnende Adipogenese spricht. In Woche 12 sind dann wieder um das Durchlaufgefäß und an den Rändern erste, kleine Adipozytennester auszumachen, die sich bis Woche 24 weiter über das Konstrukt ausbreiten. Im Gegensatz dazu stehen wieder die Nackenkontrollen. Zwar können hier auch nach 5 Wochen schon Adipozyten beobachtet werden, deren Zahl sich über 12 bis hin zu 24 Wochen erhöht, allerdings sind diese auch hier wieder nur in den Randbereichen zu finden. Die Zentren aller Konstrukte sind teilweise bindegewebig umgebaut, teilweise sind noch einzelne Fibrinfelder zu finden.

Auch Gruppe 3 zeigt nach 1 Woche *in vivo* nur eine homogene Verteilung des Zell-Fibrin-Gemisches über das gesamte Konstrukt. Eine erste Adipogenese lässt sich auch hier wieder nach 5 Wochen entlang der Gefäße erkennen, welche sich in den folgenden Wochen wie in Gruppe 1 und 2 verhält und vom Durchlaufgefäß sowie von den Rändern aus stattfindet. Auch die Kontrollen zeigen zwar vergleichsweise viele Adipozyten, allerdings nur in den Randbereichen, zentral kann nur Bindegewebe gefunden werden.

In Gruppe 4 zeigt sich zum ersten Mal der Erfolg der Vorkultivierung. Die Konstrukte dieser Gruppe wurden zusätzlich zur 2-tägigen Induktion auch noch 33 Tage in einem Differenzierungsmedium kultiviert, um eine Reifung der Präadipozyten zu Adipozyten einzuleiten. Schon nach 1 Woche kann man einzelne Fettzellen in direkter Nachbarschaft zum Durchlaufgefäß erkennen. Die Zellen scheinen dank der langen Vorkultivierung schnell zu differenzieren. Auch die Woche 5 unterscheidet sich deutlich von den anderen Gruppen. Sind in Gefäßnähe und im Randbereich schon einige reife Fettzellen zu erkennen, dann sind auch in den Bereichen, in denen

die Gefäße erst später eingewandert sind, zahlreiche vergrößerte Präadipozyten zu erkennen, die nach und nach reifen und später zu adulten Adipozyten werden. Nach 12 Wochen ist nochmals eine Steigerung der Adipogenese zu erkennen, bis dann in Woche 24 der Großteil der Poren des Polyurethans mit reifen Adipozyten und zahlreichen Gefäßen ausgefüllt ist. Die Kontrollen zeigen keine Unterschiede zu den anderen Gruppen, trotz längerer Differenzierung. Auch hier ist nur Fettgewebe in den Randbereichen auffindbar, im Zentrum findet man nur Bindegewebe und degenerierte Präadipozyten im Fibrin.

Allgemein kommt es bei den Nackenkontrollen zu einer massiven Einsprossung von Fettgewebe an den Randbereichen. Vermutlich ist dies durch das fettreiche Außenmilieu im Implantationsgebiet zu erklären. Denn zum einen ist im Nacken der Maus schon ein natürliches Fettdepot vorhanden, zum anderen ist dies ein Gebiet, das kaum in Bewegung ist. Dies ist ein deutlicher Vorteil zur Leiste, die ein motorisch stark beanspruchtes Gebiet ist und in der, auch dadurch, kaum Fettgewebe zu finden ist (Choi, Cha 2006). Auch Patrick (2002) diskutieren einen Zusammenhang zwischen einem in der Regel fettarmen Implantationsgebiet und der begrenzten Bildung und Stabilität von Fettgewebe in einem dort platzierten Scaffold (Patrick, Zheng 2002).

Durch die ständige Aktivität der Maus werden die Konstrukte stark bewegt, wodurch wahrscheinlich die Entwicklung des Fettgewebes erschwert und die Formstabilität des Konstruktes belastet wird (Hemrich, Van de Sijpe 2008). Allerdings konnten wir bedingt durch die Größe der Mäuse bis jetzt nur in diesem Bereich einen einfachen und komplikationslosen Zugang zu einem größeren Gefäß schaffen.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, wie wichtig zum einen eine adäquate Vorkultivierung ist, zum anderen aber auch eine ausreichende Gefäßversorgung. Denn trotz identischer Kultivierung aller Konstrukte der Gruppe 4 zeigen sich hier bei den Nackenkontrollen keinerlei Vorteile zu den anderen Gruppen.

Wie in der Literatur aufgeführt wird (Green, Kehinde 1975; Fischbach, Spruss 2004; Cho, Kim 2006), ist auch hier zu erkennen, dass eine längere Vorkultivierung sich anschließend positiv auf das Verhalten der Vorläuferzellen *in vivo* auswirkt. Man kann daraus schließen, dass die Zellen (Präadipozyten) einen Impuls benötigen, um sich ausdifferenzieren zu können.

Vimentin-Antikörper-Färbung

Überraschend waren die Ergebnisse der Vimentin-AK-Färbungen. Ursprünglich wurden diese durchgeführt, um zu beweisen, dass das entstandene Fettgewebe, tatsächlich aus den von uns eingebrachten humanen Präadipozyten entstanden ist. Die Wirkung der Färbung wurde mit nativem Fettgewebe vom Menschen und von der Maus bestätigt (Abb.45).

In den Ein-Wochen Schnitten der Gruppen ist dies auch zu beobachten. Hier sind zahlreiche rot angefärbte, also humane Zellen zu erkennen. Ebenso ist es nach 5 Wochen. Zu diesem Zeitpunkt war aber auch größtenteils noch keine Adipogenese erkennbar. Sowohl bei den 12 als auch bei den 24 Wochen Konstrukten können in den Färbungen je nach Gruppe unterschiedlich viele reife Adipozyten gefunden werden. Überraschend war nur, dass sich diese in der Vimentin-Färbung nicht rot darstellen, also nicht humanen, sondern scheinbar murinen Ursprungs sind. Nur in einzelnen Konstrukten konnten auch Adipozyten mit einer rot gefärbten Zellmembran erkannt werden. Die war z.B. bei Gruppe 2, Woche 12 und bei der in mehreren Punkten abweichenden Gruppe 3, Woche 24 der Fall. Unklar ist, warum es Abweichungen wie diese gibt. Vermutlich besteht eine Möglichkeit, dass tatsächlich aus den implantierten Zellen, Adipozyten entstehen. Dass die restlichen Adipozyten murinen Ursprungs sind, erklärt Stillaert (2007), der ähnliche Beobachtungen gemacht hat: Durch den Kontakt mit den eingebrachten Präadipozyten werden wirtseigene (also hier von der Maus) Zellen angeregt, die sich zu Adipozyten zu differenzieren. Ausschlaggebend sind wahrscheinlich nicht die Zellen selbst, sondern deren Sekretion von Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren (Stillaert, Findlay 2007).

5 Zusammenfassung

In der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie bildet der Weichgewebersatz nach Verbrennungen, Tumoroperationen, Traumata etc. ein großes und wichtiges Feld. Aufgrund von immer wieder auftretenden Problemen bei den klassischen Verfahren, wie z.B. bei Fettgewebstransplantaten die unzufriedenstellenden Narbenbildungen im Spendergebiet oder die Abstoßungsreaktionen bei alloplastischen Transplantaten, sind Alternativen zu überlegen. Das Tissue Engineering von Fettgewebe bietet die Vorteile, dass mit autologen, also körpereigenen Zellen gearbeitet wird und dass keine großen Defekte im Spendergebiet auftreten.

In unserer Forschungsgruppe konnten in vorausgegangenen Arbeiten schon wichtige Punkte des TE mit Fettgewebe erforscht und etabliert werden. Einmal sind dies die Isolierung und Kultivierung von Präadipozyten aus humanem Fettgewebe und die Besiedelung von Polyurethangerüsten mit diesen sowie erste *in vivo* Versuche.

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob und wie lange eine Vorbehandlung der Präadipozyten mit speziellen Differenzierungsmedien zu einer verbesserten Adipogenese führt. In Kombination hiermit wurde auch überprüft, wie sich ein zentrales Durchlaufgefäß, hier die A. und V. femoralis von athymischen Nacktmäusen, auf die Adipogenese und Angiogenese im Polyurethangerüst auswirkt, verglichen mit den Kontrollen ohne Gefäßanschluss im Nacken. Ebenso wurde die Formstabilität der Konstrukte untersucht. Trotz bereits vorhandener Vorversuche wurde auch in dieser Arbeit anhand von Lebend-Tot-Färbungen das Überleben der Präadipozyten im Polyurethankonstrukt überprüft. Um sicher zu gehen, dass aus den Fettbiopsien auch Präadipozyten extrahiert wurden, erfolgten Öl-Rot-Färbungen.

Es wurden vier Gruppen mit Verschiedenen Vorkultivierungsstrategien eingeteilt, wobei in Gruppe 1 lediglich eine zweitägige Inkubation der beimpften Konstrukte in regulärem Wachstumsmedium stattfand, in Gruppe 2 zusätzlich noch eine Induktion der Zellen von zwei Tagen und in Gruppe 3 und 4 dazu noch eine Differenzierung von 7 bzw. 33 Tagen. In allen Gruppen wurden Konstrukte nach 1, 5, 12 und 24 Wochen explantiert und ausgewertet. Parallel zu den *in vivo* Versuchen wurden unter den gleichen Bedingungen auch Konstrukte *in vitro* kultiviert und zu denselben Zeiträumen ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigen deutlich die Relevanz einer adäquaten Blutversorgung. Und außerdem, dass mit länger andauernder Vorkultivierung eine deutlich verbesserte Adipogenese zu erzielen ist. So kann man von Gruppe 1 bis Gruppe 4 einen stetigen Anstieg der Adipozytenzahl erkennen, der nach 24 Wochen in Gruppe 4 am ausgeprägtesten ist. Auch ist zu erkennen, dass, verglichen mit den Konstrukten ohne Gefäßanschluss, bei denen mit Durchlaufgefäß auch eine Adipogenese im Zentrum stattgefunden hat. Eine Schrumpfung der Konstrukte konnte beobachtet werden, diese liegt aber im tolerierbaren Bereich. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass noch großer Forschungsbedarf vorhanden ist, erste Schritte in Richtung dreidimensionale, tissue engineerte und vaskulär integrierten Fetttransplantate aber unternommen wurden.

6 Literaturverzeichnis

- Alhadlaq, A., Tang, M., Mao, J. J.
Engineered adipose tissue from human mesenchymal stem cells maintains predefined shape and dimension: implications in soft tissue augmentation and reconstruction.
Tissue Eng. 11 (3-4) (2005): 556-566.
- Awwad, H. K., el Naggat, M., Mocktar, N., Barsoum, M.
Intercapillary distance measurement as an indicator of hypoxia in carcinoma of the cervix uteri.
Int J Radiat Oncol Biol Phys 12(8) (1986): 1329-1333.
- Borges, J., Mueller, M. C., Padron, N. T., Tegtmeier, F., Lang, E. M., Stark, G. B.
Engineered adipose tissue supplied by functional microvessels.
Tissue Eng 9(6) (2003): 1263-1270.
- Cawthorn, W. P., Scheller, E. L., MacDougald, O. A.
Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future.
J Lipid Res 53(2) (2012): 227-246.
- Chaldakov, G. N., Stankulov, I. S., Hristova, M., Ghenev, P. I.
Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology.
Curr Pharm Des 9(12) (2003): 1023-1031.
- Cho, S. W., Kim, I., Kim, S. H., Rhie, J. W., Choi, C. Y., Kim, B. S.
Enhancement of adipose tissue formation by implantation of adipogenic-differentiated preadipocytes.
Biochem Biophys Res Commun 345(2) (2006): 588-594.
- Cho, S. W., Kim, S. S., Rhie, J. W., Cho, H. M., Choi, C. Y., Kim, B. S.
Engineering of volume-stable adipose tissues.
Biomaterials 26(17) (2005): 3577-3585.
- Choi, Y. S., Cha, S. M., Lee, Y. Y., Kwon, S. W., Park, C. J., Kim, M.
Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse.
Biochem Biophys Res Commun 345(2) (2006): 631-637.

- Choi, Y. S., Park, S. N., Suh, H.
Adipose tissue engineering using mesenchymal stem cells attached to injectable PLGA spheres.
Biomaterials 26(29) (2005): 5855-5863.
- Cordeiro, P. G.
Breast reconstruction after surgery for breast cancer.
N Engl J Med 359(15) (2008): 1590-1601.
- Crandall, D. L., Hausman, G. J., Kral, J. G.
A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives.
Microcirculation 4(2) (1997): 211-232.
- Cronin, K. J., Messina, A., Knight, K. R., Cooper-White, J. J., Stevens, G. W., Penington, A. J., Morrison, W. A.
New murine model of spontaneous autologous tissue engineering, combining an arteriovenous pedicle with matrix materials.
Plast Reconstr Surg 113(1) (2004): 260-269.
- Faller, A., Schünke, M., Schünke, G.
Der Körper des Menschen. Einführung in Bau und Funktion.
Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2004, 14. Auflage, 83-85
- Fantuzzi, G.
Adipose tissue, adipokines, and inflammation.
J Allergy Clin Immunol 115(5) (2005): 911-919; quiz 920.
- Feucht, A., Hoang, N. T., Hoehnke, C., Hien, P. T., Mandlik, V., Storck, K., Staudenmaier, R.
Neovascularisation and free microsurgical transfer of cartilage-engineered constructs
HNO 59(3) (2011): 239-247.
- Fischbach, C., Spruss, T., Weiser, B., Neubauer, M., Becker, C., Hacker, M., Gopferich, A., Blunk, T.
Generation of mature fat pads in vitro and in vivo utilizing 3-D long-term culture of 3T3-L1 preadipocytes.
Exp Cell Res 300(1) (2004): 54-64.

- Gehrke, T.
Untersuchung humaner tissue-engineerter Knorpelkonstrukte im präfabrizierten Durchflussmodell der Maus.
Medizinische Dissertation, Technische Universität München (2013)
- Green, H. and O. Kehinde
An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion.
Cell 5(1) (1975): 19-27.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M., Sul, H. S.
Understanding adipocyte differentiation.
Physiol Rev 78(3) (1998): 783-809.
- Har-Shai, Y., Lindenbaum, E., Ben-Itzhak, O., Hirshowitz, B.
Large liponecrotic pseudocyst formation following cheek augmentation by fat injection.
Aesthetic Plast Surg 20(5) (1996): 417-419.
- Hauner, H., Skurk, T., Wabitsch, M.
Cultures of human adipose precursor cells.
Methods Mol Biol 155 (2001): 239-247.
- Hemrich, K., Van de Sijpe, K., Rhodes, N. P., Hunt, J. A., Di Bartolo, C., Pallua, N., Blondeel, P., von Heimburg, D.
Autologous in vivo adipose tissue engineering in hyaluronan-based gels--a pilot study.
J Surg Res 144(1) (2008): 82-88.
- Hoang, N. T., Hoehnke, C., Hien, P. T., Mandlik, V., Feucht, A., Staudenmaier, R.
Neovascularization and free microsurgical transfer of in vitro cartilage-engineered constructs.
Microsurgery 29(1) (2009): 52-61.
- Hofer, S. O., Knight, K. M., Cooper-White, J. J., O'Connor, A. J., Perera, J. M., Romeo-Meeuw, R., Penington, A. J., Knight, K. R., Morrison, W. A., Messina, A.
Increasing the volume of vascularized tissue formation in engineered constructs: an experimental study in rats.
Plast Reconstr Surg 111(3) (2003): 1186-1192; discussion 1193-1184.

- Horn, F., Lindenmeier, G., Moc, I., Grillhösl, C., Berghold, S., Schneider, N., Münster, B.
Biochemie des Menschen.
Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2003, 2. Auflage, 143-145
- Jaklenec, A., Stamp, A., Deweerd, E., Sherwin, A. M., Langer, R. S.
Progress in the Tissue Engineering and Stem Cell Industry.
Tissue Eng Part B Rev. (2012)
- Kelly, J. L., Findlay, M. W., Knight, K. R., Penington, A., Thompson, E. W., Messina, A., Morrison, W. A.
Contact with existing adipose tissue is inductive for adipogenesis in matrigel.
Tissue Eng 12(7) (2006): 2041-2047.
- Kononas, T. C., Bucky, L. P., Hurley, C., May, J. W., Jr.
The fate of suctioned and surgically removed fat after reimplantation for soft-tissue augmentation: a volumetric and histologic study in the rabbit.
Plast Reconstr Surg 91(5) (1993): 763-768.
- Kühnel, W.
Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie.
Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2002, 11. Auflage, 126-127
- Langer, R. and J. P. Vacanti
Tissue engineering.
Science 260(5110) (1993): 920-926.
- Langer, S., Sinitsina, I., Biberthaler, P., Krombach, F., Messmer, K.
Revascularization of transplanted adipose tissue: a study in the dorsal skinfold chamber of hamsters.
Ann Plast Surg 48(1) (2002): 53-59.
- Leuthner, P. G.
Differenzierung und Vaskularisierung humaner Präadipozyten im Polyurethangerüst in vivo.
Medizinische Dissertation, Technische Universität München (2014)
- Lysaght, M. J., Jaklenec, A., Deweerd, E.
Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics.
Tissue Eng Part A 14(2) (2008): 305-315.

- Mandrekas, A. D., Zambacos, G. J., Kittas, C.
Cyst formation after fat injection.
Plast Reconstr Surg 102(5) (1998): 1708-1709.
- Miner, J. L.
The adipocyte as an endocrine cell.
J Anim Sci 82(3) (2004): 935-941.
- Mulisch, M., Welsch, U.
Romeis Mikroskopische Technik.
Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 2010, 18. Auflage, 215-216
- Murphy, W. L., Peters, M. C., Kohn, D. H., Mooney, D. J.
Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering.
Biomaterials 21(24) (2000): 2521-2527.
- Neuber, G.
Fettransplantation. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie.
(1893)
- Patrick, C. W., Jr., Chauvin, P. B., Hobbey, J., Reece, G. P.
Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering.
Tissue Eng 5(2) (1999): 139-151.
- Patrick, C. W., Jr., Zheng, B., Johnston, C., Reece, G. P.
Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds.
Tissue Eng 8(2) (2002): 283-293.
- Patrick, C. W., Uthamanthil, R., Beahm, E., Frye, C.
Animal models for adipose tissue engineering.
Tissue Eng Part B Rev 14(2) (2008): 167-178.
- Peer, L. A.
The neglected free fat graft, its behavior and clinical use.
Am J Surg 92(1) (1956): 40-47.
- Richardson, T. P., Peters, M. C., Ennett, A. B., Mooney, D. J.
Polymeric system for dual growth factor delivery.
Nat Biotechnol 19(11) (2001): 1029-1034.

- Rittler-Ungethüm, B. M.
Tissue Engineering - Kultivierung humaner Präadipozyten zur Beimpfung dreidimensionaler Polyurethankonstrukte.
Medizinische Dissertation, Technische Universität München (2012)
- Rossatti, B.
Revascularisation and phagocytosis in free fat autografts: an experimental study.
Br J Plast Surg 13 (1960): 35-41.
- Schwegler, J. S.
Der Mensch Anatomie und Physiologie. Schritt für Schritt Zusammenhänge verstehen.
Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2002, 3. Auflage, 26-28
- Smahel, J.
Experimental implantation of adipose tissue fragments.
Br J Plast Surg 42(2) (1989): 207-211.
- Smahel, J., K. Schütz
Vascular augmentation of free adipose tissue grafts.
Plastic Surgery Springer Verlag 13(4) (1990).
- Stillaert, F., Findlay, M., Palmer, J., Idrizi, R., Cheang, S., Messina, A., Abberton, K., Morrison, W., Thompson, E. W.
Host rather than graft origin of Matrigel-induced adipose tissue in the murine tissue-engineering chamber.
Tissue Eng 13(9) (2007): 2291-2300.
- Stillaert, F. B., Di Bartolo, C., Hunt, J. A., Rhodes, N. P., Tognana, E., Monstrey, S., Blondeel, P. N.
Human clinical experience with adipose precursor cells seeded on hyaluronic acid-based spongy scaffolds.
Biomaterials 29(29) (2008): 3953-3959.
- Vacanti, J.
Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art.
J Pediatr Surg 45(2) (2010): 291-294.

- Vacanti, J. P., Morse, M. A., Saltzman, W. M., Domb, A. J., Perez-Atayde, A., Langer, R.
Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices.
J Pediatr Surg 23(1 Pt 2) (1988): 3-9.
- Vashi, A. V., Abberton, K. M., Thomas, G. P., Morrison, W. A., O'Connor, A. J., Cooper-White, J. J., Thompson, E. W.
Adipose tissue engineering based on the controlled release of fibroblast growth factor-2 in a collagen matrix.
Tissue Eng 12(11) (2006): 3035-3043.
- von Heimburg, D., Hemmrich, K., Zachariah, S., Staiger, H., Pallua, N.
Oxygen consumption in undifferentiated versus differentiated adipogenic mesenchymal precursor cells.
Respir Physiol Neurobiol 146(2-3) (2005): 107-116.
- von Heimburg, D., Zachariah, S., Heschel, I., Kuhling, H., Schoof, H., Hafemann, B., Pallua, N.
Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo.
Biomaterials 22(5) (2001): 429-438.
- Walton, R. L., Beahm, E. K., Wu, L.
De novo adipose formation in a vascularized engineered construct.
Microsurgery 24(5) (2004): 378-384.
- Weiser, B., Neubauer, M., Göpferich, A., Blunk, T.
Tissue engineering, Fat. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering (online). (2005)
- Weiser, B., Prantl, L., Schubert, T. E., Zellner, J., Fischbach-Teschl, C., Spruss, T., Seitz, A. K., Tessmar, J., Goepferich, A., Blunk, T.
In vivo development and long-term survival of engineered adipose tissue depend on in vitro precultivation strategy.
Tissue Eng Part A 14(2) (2008): 275-284.
- Welsch, U.
Lehrbuch Histologie.
München, Urban & Fischer, 2006, 2. Auflage, 147-148

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Entstehung einer Fettzelle	4
Abb. 2 Immunhistologische Färbung von humanem Fettgewebe mit VimentinAntikörper SP20 und Hämalaun Gegenfärbung	6
Abb. 3 Aufarbeitung des Fettgewebes	12
Abb. 4 Polyurethan unter dem REM	14
Abb. 5 Implantation der Konstrukte	20
Abb. 6 Auswertung der Konstrukte	29
Abb. 7 Lebend-Tod Färbung	35
Abb. 8 Öl-Rot-Färbung in der Kulturflasche	36
Abb. 9 Trichromfärbung nach Ladewig der <i>in vitro</i> Konstrukte	40
Abb. 10 Flächen der <i>in vitro</i> Konstrukte	41
Abb. 11 Kontrolle Gruppe 1, Woche 1	43
Abb. 12 Kontrolle Gruppe 1, Woche 5	43
Abb. 13 Kontrolle Gruppe 1, Woche 12	44
Abb. 14 Kontrolle Gruppe 1, Woche 24	44
Abb. 15 Kontrolle Gruppe 2, Woche 1	46
Abb. 16 Kontrolle Gruppe 2, Woche 5	46
Abb. 17 Kontrolle Gruppe 2, Woche 12	47
Abb. 18 Kontrolle Gruppe 2, Woche 24	47
Abb. 19 Kontrolle Gruppe 3, Woche 1	49
Abb. 20 Kontrolle Gruppe 3, Woche 5	49
Abb. 21 Kontrolle Gruppe 3, Woche 12	50
Abb. 22 Kontrolle Gruppe 3, Woche 24	50
Abb. 23 Kontrolle Gruppe 4, Woche 1	52
Abb. 24 Kontrolle Gruppe 4, Woche 5	52
Abb. 25 Kontrolle Gruppe 4, Woche 12	53
Abb. 26 Kontrolle Gruppe 4, Woche 24	53
Abb. 27 Gruppe 1, Woche 1	55
Abb. 28 Gruppe 1, Woche 5	56
Abb. 29 Gruppe 1, Woche 12	57
Abb. 30 Gruppe 1, Woche 24	58
Abb. 31 Gruppe 2, Woche 1	60

Abb. 32 Gruppe 2, Woche 5	61
Abb. 33 Gruppe 2, Woche 12	62
Abb. 34 Gruppe 2, Woche 24	63
Abb. 35 Gruppe 3, Woche 1	65
Abb. 36 Gruppe 3, Woche 5	66
Abb. 37 Gruppe 3, Woche 12	67
Abb. 38 Gruppe 3, Woche 24	68
Abb. 39 Gruppe 4, Woche 1	70
Abb. 40 Gruppe 4, Woche 5	71
Abb. 41 Gruppe 4, Woche 12	72
Abb. 42 Gruppe 4, Woche 24	73
Abb. 43 Öl-Rot-Färbung eines Konstruktes von Gruppe 1 nach 1 Woche	74
Abb. 44 Öl-Rot-Färbung eines Konstruktes der Gruppe 4 nach 24 Wochen	75
Abb. 45 Antikörperfärbungen nativen Fettgewebes	76
Abb. 46 Vimentinfärbungen Gruppe 1	77
Abb. 47 Vimentinfärbungen Gruppe 2	78
Abb. 48 Vimentinfärbungen Gruppe 3	79
Abb. 49 Vimentinfärbungen Gruppe 4	80
Abb. 50 Flächen der Kontrollen in %	82
Abb. 51 Anzahl der Gefäße der Kontrollen pro mm ²	83
Abb. 52 Anzahl der Adipozyten der Kontrollen pro mm ²	84
Abb. 53 Flächen in %	85
Abb. 54 Anzahl der Gefäße pro mm ²	86
Abb. 55 Anzahl der Adipozyten pro mm ²	87

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Einteilung der Gruppen	17, 37
Tab. 2 Gruppe 1	42, 54
Tab. 3 Gruppe 2	45, 59
Tab. 4 Gruppe 3	48, 64
Tab. 5 Gruppe 4	51, 69
Tab. 6 Übersicht Fett	112
Tab. 7 Übersicht der in vitro Versuche	112
Tab. 8 Übersicht der Operationen	113
Tab. 9 Zusammensetzung des ECGM nach Beigabe des Supplement Mix	114

9 Anhang

Tab. 6 Übersicht Fett

Herkunft	OP Datum	Alter des Patienten	Geschlecht
Abdominoplastik Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie der TUM	14.10.09	34 Jahre	weiblich
Mammareduktionsplastik Frauenklinik und Poliklinik der TUM	27.11.09	20 Jahre	weiblich
Mammareduktionsplastik Frauenklinik und Poliklinik der TUM	31.03.10	21 Jahre	weiblich
Mammareduktionsplastik Frauenklinik und Poliklinik der TUM	06.05.10	31 Jahre	weiblich

Tab. 7 Übersicht der in vitro Versuche

Gruppe	Passage / Fett	Inkub.	Indukt.	Diff. *		Woche 1	Woche 12	Woche 24
Gr1	P1 Abd. 14.10.09	13.11.09	---	16.11.09		23.11.09	08.02.10	03.05.10
Gr2	P1 Abd. 15.10.09	06.11.09	09.11.09	11.11.09		18.11.09	03.02.10	28.04.10
Gr3	P1 Abd. 15.10.09	06.11.09	09.11.09	11.11.09	+ 7 Tage	25.11.09	10.02.10	05.05.10
Gr4	P1 Abd. 15.10.09	06.11.09	09.11.09	11.11.09	+ 33 Tage	21.12.09	08.03.10	31.05.10

Abd. = Abdominoplastik

*Diff. Entspricht hier *in vivo* Zeitraum und nicht Vorkultivierung

Tab. 8 Übersicht der Operationen

Gruppe / Woche	Passage / Fett	Inkub.	Indukt.	Diff.	OP Maus1	OP Maus2	OP Maus3	EX
Gr1/Wo1	P1 Ma. 31.03.10	28.04.10 - 30.04.10	---	---	30.04.10	30.04.10	30.04.10	alle 07.05.10
Gr1/Wo5	---	---	---	---	---	---	---	---
Gr1/Wo12	P1 Ma. 31.03.10	21.04.10 - 23.04.10	---	---	23.04.10	23.04.10	23.04.10	alle 16.07.10
Gr1/Wo24	P1 Ma. 27.11.09 P1 Ma. 06.05.10	13.12.09 - 15.12.09 07.06.10 - 09.06.10	--- --- ---	--- --- ---	15.12.09	15.12.09 23.04.10	15.12.09	10.02.10 M1+3 01.06.10 M2 08.10.10
Gr2/Wo1	P1 Ma. 06.05.10	07.06.10 - 09.06.10	09.06.10 - 11.06.10	---	11.06.10	11.06.10	11.06.10	alle 18.06.10
Gr2/Wo5	P1 Ma. 31.03.10	10.05.10 - 12.05.10	12.05.10 - 14.05.10	---	14.05.10	14.05.10	14.05.10	alle 18.06.10
Gr2/Wo12	P1 Ma. 31.03.10 P1 Ma. 06.05.10	03.05.10 - 05.05.10 28.06.10 - 30.06.10	05.05.20 - 07.05.10 30.06.10 - 02.07.10	--- --- ---	07.05.10	07.05.10	07.05.10 02.07.10	19.06.10 M1+2 30.07.10 M3 24.09.10
Gr2/Wo24	P1 Ma. 27.11.09	13.12.09 - 15.12.09	15.12.09 - 17.12.09	---	17.12.09	17.12.09	17.12.09	alle 03.06.10
Gr3/Wo1	P1 Ma. 31.03.10	04.05.10 - 06.05.10	06.05.10 - 08.05.10	08.05.10 - 15.05.10	15.05.10	15.05.10	15.05.10	alle 22.05.10
Gr3/Wo5	P1 Ma. 31.03.10	27.04.10 - 29.04.10	29.04.10 - 01.05.10	01.05.10 - 08.05.10	08.05.10	08.05.10	08.05.10	alle 12.06.10
Gr3/Wo12	P1 Ma. 31.03.10 P1 Ma. 06.05.10	20.04.10 - 22.04.10 05.10.10 - 07.10.10	22.04.10 - 24.04.10 07.10.10 - 09.10.10	24.04.10 - 01.05.10 09.10.10 - 16.10.10	01.05.10	01.05.10	01.05.10 16.10.10	18.06.10 M1+2 24.07.10 M3 08.01.11
Gr3/Wo24	P1 Ma. 31.03.10	13.04.10 - 15.04.10	15.04.10 - 17.04.10	17.04.10 - 24.04.10	24.04.10	24.04.10	24.04.10	
Gr4/Wo1	P1 Ma. 31.03.10	15.04.10 - 17.04.10	17.04.10 - 19.04.10	19.04.10 - 22.05.10	22.05.10	22.05.10	22.05.10	alle 29.05.10
Gr4/Wo5	P1 Ma. 31.03.10	22.04.10 - 24.04.10	24.04.10 - 26.04.10	26.04.10 - 29.05.10	29.05.10	29.05.10	29.05.10	alle 03.07.10
Gr4/Wo12	P1 Ma. 31.03.10	21.04.10 - 23.04.10	23.04.10 - 25.04.10	25.04.10 - 28.05.10	28.05.10	28.05.10	28.05.10	alle
Gr4/Wo24	P1 Ma. 31.03.10	14.04.10 - 16.04.10	16.04.10 - 18.04.10	18.04.10 - 21.05.10	21.05.10	21.05.10	21.05.10	alle

Ma. = Mammareduktionsplastik

rot = frühzeitig explantiert aufgrund von Komplikationen

blau = nachgeholte Implantationen

Tab. 9 Zusammensetzung des ECGM nach Beigabe des Supplement Mix

Fetal Calf Serum	0,05 ml/ml
Endothelial Cell Growth Supplement	0,004 ml/ml
Epidermal Growth Factor (recombinant human)	10 ng/ml
Heparin	22,5 µg/ml
Hydrocortisone	1 µg/ml

10 Danksagung

Mein herzlicher Dank für die Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit gilt zahlreichen Menschen.

Zunächst bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Rainer Staudenmaier für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und die jahrelange Unterstützung.

Besonderen Dank gilt auch Dr. Katharina Storck für die intensive Betreuung und dafür, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Zudem will ich mich bei Dr. Sibylle Regn bedanken, die mir im Labor stets eine große Hilfe und Unterstützung war.

Natürlich gilt mein Dank auch allen Kollegen aus der Forschungsgruppe "Tissue engineering" der HNO. Vor allem bedanke ich mich bei Dr. Bettina Rittler-Ungethüm, Dr. Peter Leuthner und Moni Nitiu.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Univ.-Prof. Dr. Henning Bier, der es mir ermöglichte, an der Hals-Nasen-Ohren Klinik und Poliklinik der TU München diese Doktorarbeit durchzuführen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, ohne deren Geduld, Unterstützung und ständigen Motivation mein Studium und meine Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären.