

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hans-Günther Machens

Herstellung vaskularisierter Fettgewebstrukture – Einfluss der Scaffold-Architektur auf Adipogenese und Integration ins Gewebe

Paul Severin Wiggerhauser

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Jan-Thorsten Schantz, Ph.D. Singapur
2. Univ.-Prof. Dr. Hans-Günther Machens
3. Univ.-Prof. Dr. Dr. Klaus Dietrich Wolff

Die Dissertation wurde am 17.04.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 29.01.2014 angenommen.

Impressum

Paul Severin Wiggerhauser

Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie
München rechts der Isar – Technische Universität München
Ismaninger Str. 22, 81675 München, Germany

Editing using XeLaTeX and TeXworks

Text and Artwork are intellectual property of the author.

Legal rights for reprinting of figures were obtained from:

- Springer Publishing, London, UK. Written consent by Dr M. Owen.
Engineering of vascularized adipose constructs
Cell Tissue Res. 2012 Mar;347(3):747-57
- Lynch PJ, Yale University, USA. Wikimedia Creative Commons Attribution 3.0.
Breast normal anatomy cross-section view
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Breast_anatomy_normal.jpg
- IOP Publishing, Bristol, UK. Written consent by Sarah Ryder.
CAD/CAM assisted breast reconstruction
Biofabrication. doi:10.1088/1758-5082/3/3/034114

München, 30. Mai 2014

Meinen Eltern

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

Abstract

Breast cancer is the most common type of cancer in women and the complete removal of all breast tissue, called mastectomy, can be still necessary despite all recent advances in oncological therapy. Although mastectomy can be life saving, it deteriorates women's quality of life significantly. Therefore the plastic reconstruction of the breast is performed to restore patient's body image and self-esteem and consequently to improve the patient's overall health. To diminish surgical complications like wound-healing disorders, infections or donor site morbidity and to improve the reconstructive outcome, a tissue engineering approach based on Rapid Prototyping and stem cell based adipose tissue regeneration can be employed to achieve these goals. Thus, the creation of individually shaped and vascularized adipose constructs is under recent investigation.

The aim of this work was to identify a macroscopic scaffold architecture that allows the customized engineering of vascularized adipose constructs. Therefore two scaffold architectures that were accessible Rapid Prototyping manufacturing for customization, were evaluated: on the one hand stacked-fibre architecture and on the other hand foam-like scaffold architecture. The evaluation included *in vivo* and *in vitro* adipogenic potential and ability for integration in surrounding tissue and for homogenous tissue regeneration.

For *in vitro* analysis, human adipose tissue derived stem cells (ASCs) were obtained from liposuctions in female patients after informed consent, isolated and cultured in the cell culture facility. After the principal assessment of the 6mm in diameter and 1mm height measuring scaffolds for adipose tissue engineering proving cell adhesion, regular distribution, maintenance of vitality and ability for differentiation, six stacked-fibre and six foam-like scaffolds were seeded with 1×10^6 ASCs in a fibrin matrix and differentiated using a commercial adipogenic nutrition medium for 17 days. The ratio of cell differentiation was assessed manually by identification of fat-positive marked cells after OilRed/Hematoxylin staining.

For *in vivo* analysis, twelve stacked-fibre and twelve foam-like scaffolds were each seeded with 1×10^6 ASCs in a fibrin matrix, pretreated with adipogenic medium for 12 days and implanted microsurgically in nude mice creating a flow-through vessel loop for angiogenesis. After two and four weeks *in vivo* constructs were explanted and histologically and immunohistologically processed. To quantify adipogenesis *in vivo*, a computer algorithm was established and validated.

The findings showed a principal suitability for adipose tissue engineering for both scaffold architectures. But adipogenesis was found to be superior in foam-like scaffolds in comparison to stacked-fibre scaffolds with a remarkable correlation of *in vitro* and *in vivo* results: $42 \pm 2\%$ vs. $34 \pm 1\%$ *in vitro* and $6.1 \pm 0,5\%$ vs. $4.2 \pm 0,3\%$ after two weeks and $9.1 \pm 2.5\%$ vs. $5.2 \pm 0.4\%$ after four weeks *in vivo*. The results were statistically significant with $p < 0.05$. The analysis of cell and blood vessel invasion into scaffolds showed a superior ability for tissue integration namely a full thickness invasion in stacked-fibre architectures. The overall quality of tissue regeneration was tendentially better in stacked-fibre Scaffolds than in foam-like scaffolds.

Furthermore a technology platform was implemented to produce an individual scaffold for breast reconstruction. This platform compromised CAD/CAM technologies and allowed the production of a tailor-made scaffold in realistic size and shape. Especially stacked-fibre scaffolds were suitable for this way of manufacturing.

Reviewing the scaffold properties and the findings of this work, foam-like scaffolds offer a higher adipogenic potential whereas stacked-fibre scaffolds offer high ability for fast integration and homogenous tissue formation. These effects may be due to stem cell accumulation and micro- milieu formation by the cavities of the foam-like scaffold and due to the targeting and guidance of cell and vessel invasion through the regular pattern of the stacked-fibre archi-

ture. In conclusion this study suggests foam-like architecture for highly adipogenic in vitro tissue engineering and stacked-fibre architecture for fast integration and homogeneous tissue regeneration as needed in in situ tissue engineering. All in all, the presented results support the goal of clinical breast reconstruction with tissue engineering and CAD/CAM technologies.

Zusammenfassung

Brustkrebs ist die häufigste Krebsart bei Frauen weltweit. Trotz der aktuellen Fortschritte in der Therapie, kann die komplette Entfernung der Brust unter speziellen Bedingungen notwendig werden. Allerdings verschlechtert dieser Eingriff die Lebensqualität der betroffenen Frauen signifikant. Daher wird eine plastische Rekonstruktion der Brust durchgeführt, um das Selbstbild und Selbstbewusstsein und letztendlich die allgemeine Gesundheit der Patientinnen wiederherzustellen. Um die chirurgischen Komplikationen wie Wundheilungsstörungen, Infektionen oder Spenderstellen-Morbidität zu verringern und um das rekonstruktive Ergebnis zu verbessern, könnte ein Tissue Engineering Ansatz eingesetzt werden, welcher auf Rapid Prototyping und stammzellbasierter Fettgewebsregeneration beruht. Daher ist die Herstellung maßgeschneiderter und vaskularisierter Fettgewebskonstrukte gerade Gegenstand intensiver Forschung.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation einer Scaffold-Architektur, welche die maßgeschneiderte Herstellung von vaskularisierten Fettgewebskonstrukten zulässt. Hierfür wurden zwei verschiedene Scaffold-Architekturen untersucht, welche dem Rapid Prototyping für eine individuelle Herstellung zugänglich waren: einerseits wurde eine stacked-fibre Architektur und andererseits eine schwammartige Architektur verwendet. Die Bewertung der Scaffold-Architekturen enthielt das adipogene Potential *in vitro* und *in vivo* als auch die Fähigkeit des Scaffolds zur Integration ins umliegende Gewebe als auch zur homogenen Geweberegeneration. Für die *in vitro* Analysen wurden humane Fettgewebsstammzellen (ASCs) durch Liposuktionen bei weiblichen Patientinnen nach vorheriger Einwilligung gewonnen und im Zellkulturlabor isoliert und kultiviert. Nach einer prinzipiellen Bewertung der 6mm im Durchmesser und 1mm in der Höhe messenden Scaffolds bezüglich Zelladhäsion, regulärer Zellverteilung, Aufrechterhaltung der Zellvitalität und Fähigkeit zur Differenzierung wurden sechs stacked-fibre und sechs schwammartige Scaffolds mit je 1×10^6 ASCs in einer Fibrin-Matrix besiedelt und mithilfe eines kommerziellen adipogenen Nährmediums 17 Tage lang differenziert. Die Differenzierungsrate der ASCs wurde manuell nach OilRed/Hämatoxylin-Färbung durch zählen der fett-positiven Zellen berechnet.

Für die *in vivo* Analysen wurden zwölf stacked-fibre und zwölf schwammartige Scaffolds mit je 1×10^6 ASCs in einer Fibrin-Matrix besiedelt, mit adipogenem Nährmedium für 12 Tage im Zellkulturlabor vorbehandelt und anschließend mikrochirurgisch in Nacktmäuse implantiert, indem ein Vessel-Loop mithilfe der femoralen Gefäße angelegt wurde. Nach zwei bzw. vier Wochen *in vivo* wurden die Konstrukte explantiert und histologisch sowie immunhistologisch ausgewertet. Zur Quantifizierung der Adipogenese wurde eigens ein Computer Algorithmus entwickelt und validiert.

Die Ergebnisse der Voruntersuchungen zeigten eine generelle Eignung der Scaffolds für das Adipose Tissue Engineering. Allerdings war die Adipogenese auf schwammartigen Scaffolds ausgeprägter als auf den stacked-fibre Scaffolds: $42 \pm 2\%$ vs. $34 \pm 1\%$ *in vitro* und $6,1 \pm 0,5\%$ vs. $4,2 \pm 0,3\%$ nach zwei Wochen bzw. $9,1 \pm 2,5\%$ vs. $5,2 \pm 0,4\%$ nach vier Wochen *in vivo*. Bemerkenswert war hierbei die Korrelation der *in vitro* und *in vivo* Resultate. Die gefundenen Unterschiede waren statistisch signifikant mit $p < 0,05$. Die Analyse der Zell- und Blutgefäßinvasion zeigte aufgrund einer kompletten Durchsetzung der stacked-fibre Scaffolds eine Überlegenheit der stacked-fibre Architektur in Bezug auf die Fähigkeit zur Integration ins umliegende Gewebe. Die allgemeine Qualität der Geweberegeneration war auf stacked-fibre Scaffolds tendenziell besser als auf schwammartigen Scaffolds.

In Anbetracht der Eigenschaften der Scaffolds und der Ergebnisse dieser Arbeit bieten schwammartige Scaffolds ein höheres adipogenes Potential, wohingegen stacked-fibre Scaffolds eine bessere Fähigkeit zur Integration und homogenen Geweberegeneration aufweisen. Diese Effekte könnten auf eine Akkumulation von Stammzellen, eine Bildung eines Mikromilieus in

den Höhlen der schwammartigen Scaffolds sowie auf eine zielgerichtete und gelenkte Zell- und Blutgefäßinvasion durch das regelmäßige Muster der stacked-fibre Scaffolds zurückgeführt werden.

Darüber hinaus wurde eine Technologieplattform implementiert, um individuelle Scaffolds zur Brustrekonstruktion herstellen zu können. Diese Plattform umfasste CAD/CAM Technologien und erlaubte die Herstellung von maßgeschneiderten Scaffolds in realistischer Form und Größe. Dabei waren speziell die stacked-fibre Scaffolds für das gewählte Fertigungsverfahren geeignet. Zusammenfassend empfiehlt diese Arbeit die Verwendung von schwammartigen Scaffold-Architekturen für adipogene in vitro Tissue Engineering Ansätze und von stacked-fibre Scaffold-Architekturen für eine schnelle Gewebeintegration und homogene Geweberegeneration, wie sie beim in situ Tissue Engineering gebraucht wird. Alles in allem unterstützen die präsentierten Ergebnisse den Ansatz zur klinischen Brustrekonstruktion mit Tissue Engineering und CAD/CAM Technologien.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinische Relevanz der Brustrekonstruktion	1
1.2	Anatomie der weiblichen Brust	1
1.2.1	Makroskopische Anatomie der weiblichen Brust	1
1.2.2	Histologie des Fettgewebes	2
1.3	Brustrekonstruktion mit Lappenplastiken	4
1.4	Alloplastische Materialien zur Brustrekonstruktion	6
1.5	CAD/CAM-Ansätze zur Brustrekonstruktion	6
1.6	Adipose Tissue Engineering	7
1.6.1	Definition Tissue Engineering	7
1.6.2	Stammzellen	7
1.6.3	Scaffolds	12
1.6.4	Vaskularisierungsstrategien	13
2	Problemstellung	16
2.1	Klinischer Ansatz	16
2.2	Experimentelle Fragestellung und Herangehensweise	16
2.3	Hypothesen	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Scaffolds	18
3.1.1	Stacked-fibre-Architektur	18
3.1.2	Schwammartige Architektur	18
3.2	Visualisierung der Scaffold-Architektur	18
3.2.1	Makroskopische Visualisierung	18
3.2.2	Auflichtmikroskopie	18
3.2.3	SEM	19
3.3	Grundlegende Methoden	19
3.3.1	Isolation der Stammzellen	19
3.3.2	Kultivierung	20
3.3.3	Wahl des Differenzierungsmediums	20
3.3.4	Multipotenz	22
3.4	Fibrin-Matrix und Seeding	24
3.5	In Vitro	25
3.5.1	Experimentelle Herangehensweise	25
3.5.2	Zelladhäsion mit SEM	25
3.5.3	Life/Dead-Färbung mit CLSM	26
3.5.4	Metabolische Aktivität mit AlamarBlue	26
3.5.5	Quantifizierung der adipogenen Differenzierung	27
3.6	In Vivo	28
3.6.1	Experimentelle Herangehensweise	28
3.6.2	Versuchsgruppen und Herstellung der Konstrukte	28
3.6.3	Maus-Modell	29
3.6.4	HE-Färbung	31
3.6.5	Quantifizierung der Adipogenese	31

3.6.6	Immunhistochemie	36
3.7	Statistische Auswertung	38
3.8	CAD/CAM	38
3.8.1	Scanvorgang und Datenverarbeitung	39
3.8.2	CAD	39
3.8.3	CAM	40
3.8.4	Deviation Plot	42
3.8.5	Contour Plot	42
4	Ergebnisse	44
4.1	In Vitro	44
4.1.1	Scaffold Charakterisierung	44
4.1.2	Metabolische Aktivität	44
4.1.3	Quantifizierung der Adipogenese	45
4.2	In Vivo	46
4.2.1	Chirurgische Beobachtung	46
4.2.2	Hämatoxylin/Eosin in Vivo	46
4.2.3	Quantifizierung der Adipogenese	46
4.2.4	MHC1 Färbung	46
4.2.5	Anti-SMA Färbung	47
4.3	CAD/CAM	48
4.3.1	Design und Symmetrie	49
4.3.2	Herstellung des Scaffolds	50
5	Diskussion	51
5.1	1. Hypothese: Adipogenesepotential der Scaffold-Architekturen	51
5.1.1	Fokus auf die Scaffold-Architektur	51
5.1.2	Verwendung einer Fibrin-Matrix	52
5.1.3	Eignung der Scaffolds zum Adipose Tissue Engineering	52
5.1.4	In vitro Adipogenese	53
5.1.5	Adipogenese in vivo	54
5.1.6	Stellungnahme zur 1. Hypothese	56
5.2	2. Hypothese: Integrationsfähigkeit der Scaffold-Architekturen	56
5.2.1	Zellinvasion	56
5.2.2	Angiogenese	56
5.2.3	Stellungnahme zur 2. Hypothese	58
5.3	3. Hypothese: Qualität der Geweberegeneration	58
5.3.1	Homogenität des regenerierten Fettgewebes	58
5.3.2	Haptische Qualität – Stiffness vs. Softness	59
5.3.3	Volumenstabilität des Scaffolds	59
5.3.4	Formgebung des Scaffolds	60
5.3.5	Individuelles Design des Scaffolds mit CAD/CAM	61
5.3.6	Einsatzmöglichkeiten des Scaffolds – In situ vs. In vitro	63
5.3.7	Stellungnahme zur 3. Hypothese	63
6	Schlussfolgerung	64

7	Anhang	65
7.1	Literaturverzeichnis	65
7.2	Publikationen	79
7.3	Danksagung	80
7.4	Erklärung	81

Abbildungsverzeichnis

1.1	Anatomie der weiblichen Brustdrüse	2
1.2	Entwicklung von weißem und braunem Fettgewebe	3
1.3	Fettgewebe als HE-Präparat	4
1.4	DIEP-Lappenplastik	5
1.5	Isolationsquellen adulter Stammzellen	10
1.6	Adipogene Differenzierung	13
2.1	Konzeptioneller Ansatz der Brustrekonstruktion mit Tissue Engineering	16
3.1	Isolation der hASC	21
3.2	Testung unterschiedlicher Differenzierungsmedien	22
3.3	Differenzierung in klassische mesenchymale Gewebe	24
3.4	Versuchsablauf der in vitro Experimente	25
3.5	Einfluss von PCL- und PU-Scaffold auf den AlamarBlue-Assay	27
3.6	Versuchsablauf der in vivo Experimente	29
3.7	Situs und Imlantation	31
3.8	Manuelle Auswertung der Fettvakuolen mit ACount	32
3.9	Code des Programms ACount	33
3.10	Code des ImageJ-Makros	34
3.11	Auswertung der Fettvakuolen durch ImageJ	35
3.12	Differenz der Flächenberechnung von ImageJ und ACount	35
3.13	Fertigungsprozesses für die individuelle Brustrekonstruktion	38
3.14	3D-Laserscanning	39
3.15	Modellierung der Brust-Shell	41
3.16	Modellierung des Solid Objects	41
3.17	Schematische Darstellung der Funktionsweise eines 3D-Druckers	42
3.18	Beispiel eines Contour Plots	43
4.1	Visualisierung der Scaffold-Architektur	44
4.2	Grundlegende Charakterisierung der Zell-Scaffold-Interaktion	45
4.3	Metabolische Aktivität über die Zeit	45
4.4	Quantifizierung der Adipogenese in vitro	46
4.5	Repräsentative histologische Schnitte aller Versuchsgruppen in vivo	47
4.6	Quantifizierung der Adipogenese in vivo	47
4.7	Nachweis des humanen Ursprungs der Adipogenese	48
4.8	Integration der Scaffolds in den Wirtsorganismus	48
4.9	Ergebnisse Deviation Plot	49
4.10	Ergebnisse Countour Plot	50
4.11	Individueller Scaffold zur Brustrekonstruktion	50
5.1	Bahnung der Angiogenese durch die Makro-Architektur	57

Tabellenverzeichnis

1.1	Aufschlüsselung der Verfahren zur Brustrekonstruktion	1
1.2	Charakteristika von weißem und braunem Fettgewebe	4
1.3	Übersicht chirurgischer Verfahren zur Brustrekonstruktion	5
1.4	Alloplastische Brustimplantate	6
1.5	Begriffsübersicht Potenz einer Stammzelle	8
1.6	Anteilige Ausprägung der Oberflächenmarker von ASC, SVF und MSC	11
1.7	Isolationsquellen von ASCs im Vergleich	11
1.8	Faktoren der adipogenen Differenzierung	12
1.9	Überblick über verwendete Scaffoldmaterialien im adipose TE	14
1.10	Vaskularisierungsstrategien im TE	15
2.1	Vergleich von stacked-fibre und schwammartiger Scaffoldarchitektur	17
3.1	Parameterkombinationen des ImageJ-Makros	36

Abkürzungsverzeichnis

ASC	Adipose Tissue Derived Stem Cell
ATE	Adipose Tissue Engineering
BRCA1	Breast ovarian cancer type 1 [gene]
BRCA2	Breast ovarian cancer type 2 [gene]
BSA	Bovines serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
CAD	Computer-Assisted-Design
CAL	Cell-Assisted-Lipotransfer
CAM	Computer-assisted-modelling
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Coprog	Copolymer Protected Gene Vectors
d.h.	das heißt
DIEP	Deep inferior epigastric perforator artery [flap]
engl.	englisch
EPC	Endothelial Progenitor Cell
ERP	Erythrocyte Progenitor Cell
ESC	Embryonic Stem Cell
Et al.	und andere
Etc.	et cetera
EZM	Extrazelluläre Matrix
GH	Growth Hormone
HE	Hematoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSC	Hematopoietic Stem Cell
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IGF	Insulin-Like-Growth-Factor
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzelle
lat.	lateinisch
M.	Musculus
Min	Minuten
MSC	Mesenchymal Stem Cell
NADH/H+	Nicotinamadenindinukleotid
PCL	Polycaprolacton
pCO ₂	Partialdruck Kohlenstoffdioxid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PKA	Proteinkinase A
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PU	Polyurethan
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Rapid Prototyping
RPM	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur

RXR	Retinoid-X-Rezeptor
S-GAP	Superior gluteal artery perforator [flap]
s.o.	siehe oben
SI	Einheitenzeichen des Système international d'unités werden als bekannt vorausgesetzt
SIEA	Superficial inferior epigastric artery [flap]
SMA	Smooth Muscle Antigen
SREB	Sterol Response Element Binding Protein
SVF	Stromal Vascular Fraction
T3	Trijodthyronin
TE	Tissue Engineering
THR	Schilddrüsenhormonrezeptor
TRAM	Transverse rectus abdominis myocutaneus [flap]
USA	United States of America
v.Chr.	vor Christi Geburt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
vs.	versus
VSC	Vascular stem cell
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Klinische Relevanz der Brustrekonstruktion

Jährlich erkranken in den USA 200.000 Frauen neu an Brustkrebs.[114] In Deutschland sind es 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr. Damit stellt der Brustkrebs mit einem Anteil von 23% die häufigste maligne Tumorentität des weiblichen Geschlechts dar.[70]

Obwohl die Behandlung des Mammakarzinoms in den vergangenen Jahrzehnten signifikant verbessert werden konnte, wird bei tausenden Frauen immer noch die Mastektomie, d.h. die vollständige Entfernung der Brustdrüse, durchgeführt. Diese hohe Anzahl basiert einerseits auf Diagnosen, welche eine Mastektomie indizieren, beispielsweise dem inflammatorischem Mammakarzinom, oder andererseits auf dem expliziten Wunsch der Patientinnen, durch die Mastektomie ein Rezidiv zu vermeiden.[30]

Allerdings beeinflusst die Mastektomie die Körperwahrnehmung und Selbstwertschätzung der Patientinnen deutlich negativ und führt so zu einer signifikanten Verschlechterung der Lebensqualität und des sozialen Funktionsniveaus der Patientinnen.[5, 16] Aus diesem Grund stellt die chirurgische Wiederherstellung der Brust die Methode der Wahl dar, um die mentale Genesung der Patientinnen zu fördern. Daher entschieden sich im Jahr 2009 laut Statistik der amerikanischen Vereinigung der plastischen Chirurgen insgesamt 90.000 Patientinnen für eine Brustrekonstruktion nach Mastektomie.[3]

Brustrekonstruktionsverfahren	2009	2008
Implantat allein	9.097	5.128
Gewebeexpander und Implantat	56.978	50.711
TRAM Lappenplastik	9.327	9.987
DIEP Lappenplastik	4.424	66.018
Latissimus Dorsi Lappenplastik	6.598	7.614
	86.424	79.458

Tabelle 1.1: Aufschlüsselung der Verfahren zur Brustrekonstruktion[3]

Darüber hinaus wird bei Patientinnen mit signifikanter Deformität der Brust eine chirurgische Rekonstruktion durchgeführt, da jene gleichwohl die mentale Gesundheit und damit die Lebensqualität der Patientinnen verschlechtert. Signifikante Asymmetrie (>200g Gewichts Differenz) und Formstörungen sind die häufigsten Beschwerden dieser meist jungen Patientinnen, welche um einen operativen Eingriff bitten, um ihre Selbstwahrnehmung und sexuelle Attraktivität zu erhöhen. Eine tubuläre Brust oder eine Aplasie der weiblichen Brust stellen daher plausible Indikationen für eine chirurgische Rekonstruktion der Brust dar.[38, 112, 125]

Schlussfolgernd hat die Brustrekonstruktion einen hohen Stellenwert bei der Therapie des Mammakarzinoms und im Genesungsprozess der Patientinnen.

1.2 Anatomie der weiblichen Brust

1.2.1 Makroskopische Anatomie der weiblichen Brust

Die weibliche Brust (auch Brustdrüse; lat. Mamma) ist ein Drüsenorgan zur Fütterung menschlicher Neugeborener und liegt der vorderen Brustwand subkutan vor dem Musculus pectoralis major in der mittleren Axillarlinie an. Das individuelle Erscheinungsbild der Brust wird durch

den vom Drüsenorgan und vom umgebenden Fettgewebe gebildeten Brusthügel sowie durch den stärker pigmentierten Mamillen-Areola-Komplex bestimmt. Die weibliche Brust beeinflusst damit das Erscheinungsbild des weiblichen Körpers und somit auch seine sexuelle Attraktivität entscheidend.[95] Die Brustdrüse ist in 12 bis 15 Lappen gegliedert, wovon jeder wiederum

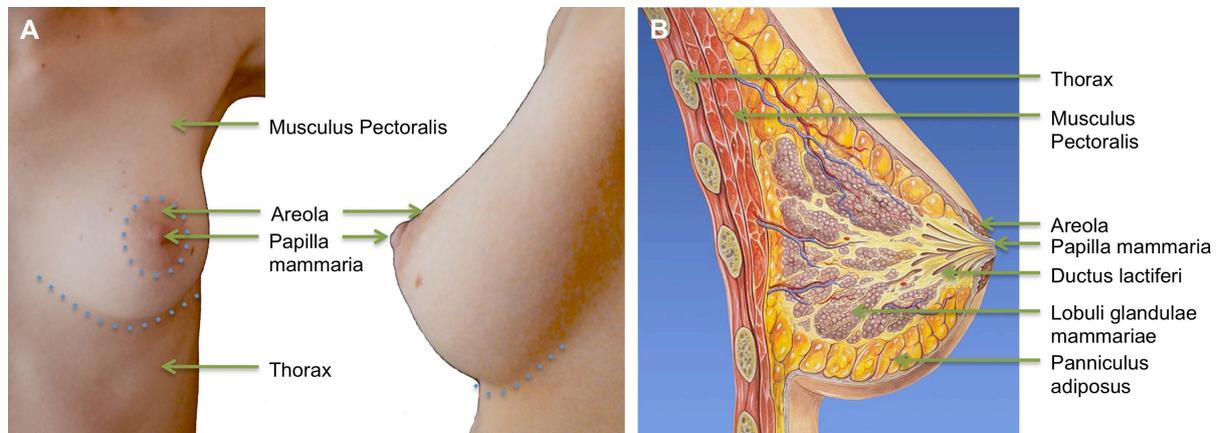


Abbildung 1.1: Anatomie der weiblichen Brustdrüse: (A) Rechte Brustdrüse einer jungen Frau in frontaler und seitlicher Ansicht in Farbfotografie. Anzeichnung des Mamillen-Areola-Komplexes (blauer Kreis) sowie der Submammarfalte (blaue Kurve). Korrekte anatomische Bezeichnung für Mamille ist Papilla mammaria. (B) Schematischer Sagittalschnitt durch eine gesunde Brustdrüse modifiziert und beschriftet nach Lizenz durch den Künstler[100]. Anatomische Bezeichnungen gemäß der Terminologia Anatomica von 1998 nach [129].

aus mehrerer kleinen Läppchen zusammengesetzt ist. Jedes Läppchen besteht aus mehreren azinösen Drüsenendstücken, gebildet von apokrinen Drüsenzellen mit umgebendem Myoepithel zur Laktation, und aus einem drainierenden Gang, dem Ductus lactifer. Alle Milchgänge (Ductus lactiferi) eines jeweiligen Drüsenlappens vereinigen sich in einem großen Ausführungsgang, welcher an der Brustwarze mündet.[134, 176]

Die Drüsenaktivität und somit auch ihre Größe wird entscheidend von Geschlechts- und Wachstumshormonen kontrolliert, kann aber auch von Medikamenten speziell Kontrazeptiva beeinflusst werden. Das Fettgewebe der Brust ist ebenfalls stark von hormonellen und nutritiven Faktoren abhängig. Daher sind die Form und die Größe der Brust unbeständig.[152]

Entscheidend für die Form der Brust ist auch die Bindegewebselastizität, speziell der unter Zug stehenden Cooper-Ligamente. Sie bestimmen durch ihre Straffheit die Ptose der Brust, d.h. die Lage des Mamillen-Areola Komplexes im Bezug zur Submammarfalte und gleichzeitiges Durchhängen des Drüsengewebes.[134]

Die Veränderlichkeit der weiblichen Brust wird speziell im Alterungsprozess deutlich. Es werden juvenile, präpartale, postpartale und senile Brustformen unterschieden. Charakteristisch sind Veränderungen in Bezug auf Volumen, Form und Ptose.[79]

Zusammenfassend ist die Brustdrüse ein individuell und intraindividuell sehr unterschiedlich ausgeprägtes Organ. Ihre Form und Größe ist abhängig von der jeweiligen Beschaffenheit des Drüsen-, Fett- und Bindegewebes. Sie prägt die sexuelle Attraktivität des weiblichen Körpers und dient der Fütterung von Neugeborenen.

1.2.2 Histologie des Fettgewebes

Das Fettgewebe wird nach der Einteilung des Biologen Albert von Kölliker zum Bindegewebe gerechnet. Dabei macht das Fettgewebe 10-15% des Körpergewichtes beim Mann und 25% bei der Frau aus. Es wird in braunes und weißes Fettgewebe untergliedert und hat neben seiner Energiespeicherfunktion noch weitere Aufgaben im Organismus.[176]

1.2.2.1 Entwicklung

Das Fettgewebe ist ein Derivat des Mesoderms. Dabei stammen braune und weiße Fettzellen einer gemeinsamen Vorläuferzelle ab. Der propagierte Entwicklungsweg verläuft von der embryonalen Stammzelle zur mesenchymalen Stammzelle (MSC) und anschließend getrennt über weitere Vorläuferzellen zur reifen braunen bzw. weißen Fettzelle.[166]

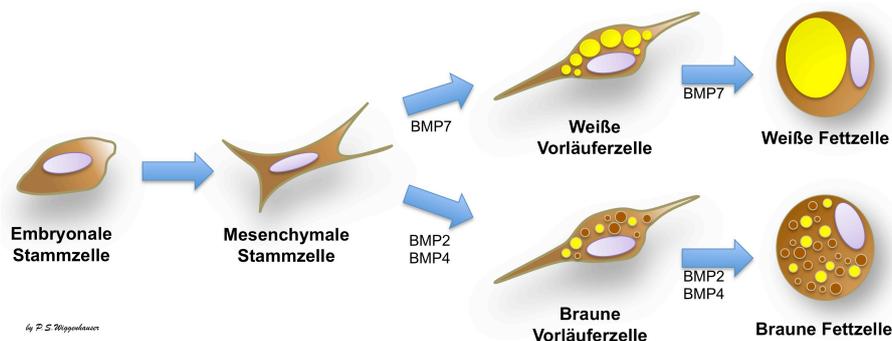


Abbildung 1.2: Entwicklung von weißem und braunem Fettgewebe: Weißes und braunes Fettgewebe sind mesenchymalen Ursprungs. Differenzierung in jeweilige reife Zelltypen erfolgt über spezifische Vorläuferzellen unter Einfluss multipler Stimuli. Grafik modifiziert nach [166].

1.2.2.2 Histologie

Das weiße Fettgewebe wird geprägt durch die Speicherfunktion der Adipozyten. Ein großer Fetteinschluss verdrängt das Zytoplasma an den Rand der Zelle. Dies führt zur typischen Konfiguration eines weißen Adipozyten: ein großer zentraler Lipideinschluss und ein periphär gelegener Zellkern mit Mitochondrien. Der Lipideinschluss ist von keiner Membran begrenzt und wird nur von Strukturproteinen der Zelle (Vimentin u.a.) umgeben. Aus diesem Grund wird das weiße Fettgewebe auch als univakuoläres Fettgewebe bezeichnet. Allerdings kann sich der Fetteinschluss andersartig darstellen: z.B. plurivakuolär nach Hungerperioden.[176]

In der histologischen Darstellung wird bei der Verarbeitung das Fett herausgelöst und kann nicht mehr in der HE-Färbung dargestellt werden. Die zentrale Fettvakuole ist herausgelöst und die Zellen erscheinen deshalb als ringförmige Strukturen mit peripher gelegenen Zellkern. Die Zellen an sich haben oft hexagonale Struktur, da sie dicht aneinander gedrängt liegen, und können über 100µm im Durchmesser erreichen. Gefrierschnitte hingegen ermöglichen ein schonendes Vorgehen und die Darstellung der Lipideinschlüsse mittels Ölrot-Färbung.[148, 170] Auffallend ist die reiche Gefäßversorgung des Fettgewebes. Hierbei berührt jeder Adipozyt mindestens eine Blutkapillare.[176]

Das braune Fettgewebe kommt vor allem beim Neugeborenen am Schultergürtel, an der Achselhöhle oder am Nierenhilus vor. Seine bräunliche Farbe beruht auf einem hohen Gehalt an Zytochromen und Blutgefäßen. Die einzelnen Zellen haben meist einen exzentrischen Kern, mehrere Fetteinschlüsse und viele Mitochondrien. Daher trägt es auch den Namen plurivakuoläres Fettgewebe.[95]

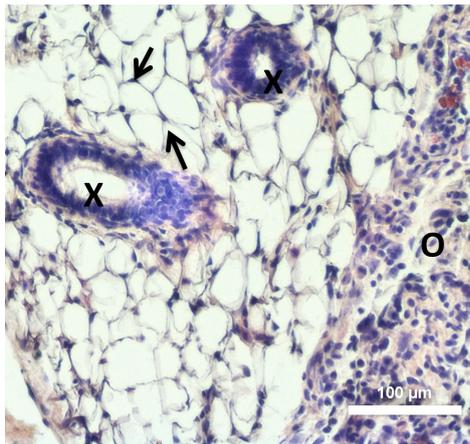


Abbildung 1.3: Fettgewebe als HE-Präparat: Typische Darstellung von Fettgewebe als HE-Präparat im Lichtmikroskop. Peripher gelegene Zellkerne (Pfeile) und ringartige Darstellung der restlichen Zellbestandteile. (X) Blutgefäße und (O) Bindegewebe.

	Weißes Fettgewebe	Braunes Fettgewebe
Vorkommen	ubiquitär, massiv in Subkutis an Brust, Gesäß, Hüfte (Frau) und am Bauch (Mann)	Schultergürtel, Achselhöhle, Nierenhilus
Makroskopisch	Weiß (Lipide) bis gelb (Carotide)	Braun (Zytochrome)
Fetteinschlüsse	Univakuolär	Plurivakuolär
Primäre Funktion	Energiespeicherung	Wärmegeneration

Tabelle 1.2: Charakteristika von weißem und braunem Fettgewebe[170, 176]

1.2.2.3 Funktion

Das weiße Fettgewebe wird meist als Bau- und Speicherfett bezeichnet: Die großen Lipideinlagerungen in den Adipozyten dienen dem Körper als Energiespeicher für Hungerperioden. Abhängig von der hormonellen Steuerung kann Energie in Form von Triacylglyceriden in den Adipozyten gespeichert oder durch Abbau der Triacylglyceride mobilisiert werden. Gleichzeitig dient weißes Fettgewebe an vielen Gelenken und subkutan als Polsterung vor Stößen und zur Wärmeisolation.[170]

Darüber hinaus erfüllt das weiße Fettgewebe noch viele weitere Aufgaben. Neuere Forschungen haben gezeigt, dass das weiße Fettgewebe an einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Mechanismen beteiligt ist. Zu nennen ist die Angiogenese durch sezernierte Faktoren der Adipozyten und die Entstehung von Gefäßerkrankungen wie Atherosklerose als Folge einer chronischen Entzündung des Fettgewebes infolge von Adipositas.[173, 159]

Das braune Fettgewebe dient der Thermogenese. Durch das in den Mitochondrien der braunen Fettzellen enthaltene Protein Thermogenin, welches die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung vom Zitratzyklus ermöglicht, wird die bei der Fettsäureoxidation freiwerdende Energie als reine Wärme freigesetzt.[132]

1.3 Brustrekonstruktion mit Lappenplastiken

Die chirurgische Rekonstruktion konzentriert sich auf die optische und haptische Wiederherstellung der weiblichen Brust. Denn die Rekonstruktion der Funktion (Laktation) ist nach aktuellem Stand der Technik nicht möglich und gemessen am durchschnittlichen Alter der Patientinnen auch nicht notwendig.[156]

Die Wiederherstellung des Brusthügels erfolgt mittels Lappenplastiken. Es kommen sowohl gestielte als auch freie Lappenplastiken zum Einsatz.

Bei den Perforatorlappen handelt es sich um freie Haut-Fett-Lappen. Dadurch verringern sich Komplikationen wie Hernienbildung und postoperativer Wundschmerz. Die Frühmobilisierung wird vereinfacht und die Liegezeit verkürzt. Daher sind die Perforatorlappenplastiken den myokutanen Lappenplastiken vorzuziehen.[67, 117] Eine Lappenplastik birgt wie alle operativen

Lappenplastik	Englisch	Details	Anmerkungen
DIEP	Deep inferior epigastric perforator	Freie Perforatorlappenplastik mit voluminösem Fett-Haut-Lappen aus der Region des Unterbauchs	Methode der Wahl zur autologen Brustrekonstruktion [67, 117]
S-GAP	Superior gluteal artery perforator	Freie Perforatorlappenplastik mit voluminösem Fett-Haut-Lappen aus dem Gesäßbereich	Alternativmethode zur DIEP-Lappenplastik bei unzureichendem subkutanem Fettgewebe oder Vorbelastung der Spenderstelle durch Voroperationen [42, 67]
SIEA	Superior inferior epigastric artery	Freier Haut-Fettlappen der Bauchdecke mit Präparation der versorgenden A. epigastrica inferior superficialis	Schonendste Form der Brustrekonstruktion; keine Durchtrennung des M. rectus abdominis notwendig [181]
TRAM	Transverse rectus abdominis muscle	Gestielter myokutaner Lappen vom M. rectus abdominis mit angrenzendem subkutanem Fettgewebe der infraumbilikalischen Bauchwand	Großer Hebedefekt durch Eröffnung der Rectusscheide und Mitnahme des Muskels: Instabilität der Bauchwand [30, 117]
Latissimus dorsi	Latissimus dorsi muscle	Gestielter myokutaner Lappen vom M. latissimus dorsi meist in Verbindung mit Implantat	Wenig voluminös, daher für größere Brüste Implantat erforderlich [30, 117]

Tabelle 1.3: Übersicht chirurgischer Verfahren zur Brustrekonstruktion

Verfahren auch Risiken: Wundheilungsstörungen, Hämatombildung, partieller sowie kompletter Lappenverlust. [67]

Unter dem Begriff „Donor Site Morbidity“ werden absehbare und potentiell mögliche Komplikationen an der Spenderstelle nach iatrogenen Manipulationen zusammengefasst. Absehbar ist beispielsweise die Schwächung der Bauchwand nach TRAM-Aufbau. Potentiell möglich sind aber auch Wundheilungsstörungen am abdominalen Corium nach DIEP-Aufbau, welche trotz lege artis durchgeführter Brustrekonstruktion auftreten können. [15]

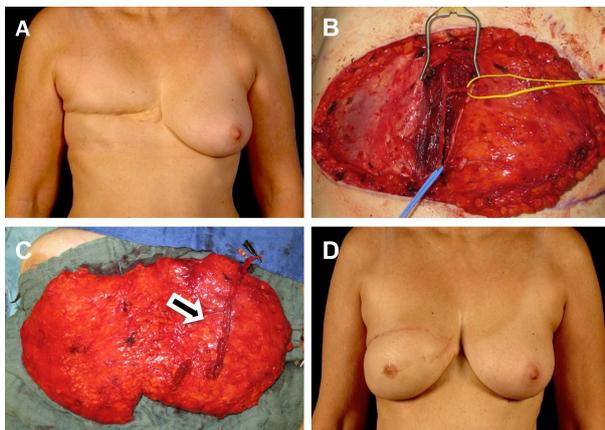


Abbildung 1.4: DIEP-Lappenplastik: Der Brusthügel wird nach Mastektomie (A) mit einem Haut-Fettlappen aus der Region abdominalis wiederhergestellt. Auf die sorgfältige Präparation der versorgenden Perforansgefäße (gelbes Band in B) wird bei der Mobilisation des Lappens streng geachtet. Nach der Lappenhebung werden die Perforansgefäße (Pfeil C) an die Arteria und Vena thoracica interna anastomosiert und die Brust neu geformt. Nach einer ungefähr dreimonatigen Erholungsphase wird mittels lokaler Lappenplastik die Brustwarze rekonstruiert und tätowiert. Das Ergebnis (D) ist eine natürlich weiche, ptotische und symmetrische Brust.

1.4 Alloplastische Materialien zur Brustrekonstruktion

Die alloplastische Brustrekonstruktion bezieht sich auf die Implantation von alloplastischen Materialien, d.h. nicht körpereigenen Materialien, zur Wiederherstellung des Brusthügels. Diese werden sub- oder präpektoral implantiert.

Material	Bewertung	
Silikonimplantat	<ul style="list-style-type: none"> + Langzeiterfahrung + Schnelle und einfache OP + Natürlichere Haptik als mit Kochsalzlösung gefüllte + Memory Effect + Minimaler Einfluss auf Brustkrebsnachsorge - Nur Standardformen und Standardgrößen - Risiko der Kapselkontraktur - Sicherheitsdiskussionen in den 1990ern 	[1, 8, 9, 52, 101, 150]
Implantat mit Kochsalzlösung gefüllt	<ul style="list-style-type: none"> + Langzeiterfahrung + Schnelle und einfache OP + Minimaler Einfluss auf Brustkrebsnachsorge - Nur Standardformen und Standardgrößen - Risiko der Kapselkontraktur - Möglichkeit der Ruptur 	[1, 8, 91, 101, 150]
Polyurethanimplantat	<ul style="list-style-type: none"> + Geringeres Risiko der Kapselkontraktur + Fixierung des Implantats an umgebendes Gewebe - Freisetzung von karzinogenem 2,4-Toluoldiamin (TDA) - Fremdkörperreaktion - Schwierige Implantatentfernung 	[9, 12, 34, 58, 59]

Tabelle 1.4: Alloplastische Brustimplantate

1.5 CAD/CAM-Ansätze zur Brustrekonstruktion

Computer Assisted Design (CAD) und Computer Assisted Modeling (CAM) wurden von Forschern des Tissue Engineering zur Vereinfachung der individuellen Brustrekonstruktion propagiert. Die Entwicklung günstiger Laserscanner und schneller Workstations führte zu einer Reihe von Erfindungen in Bezug auf das Design und die Produktion eines möglichen Brustimplantats.[28, 122]

Im Wesentlichen wird die Oberfläche eines Patienten mit Laserstrahlen abgetastet und ein virtuelles Ebenbild der Oberfläche berechnet. Diese Daten können für die Modellierung von Brüsten benutzt werden und an Rapid Prototyping (RP) Systeme übermittelt werden, sodass Brustmodelle gemäß den virtuellen Entwürfen produziert werden können.[71]

Das Scannen von Brüsten findet bereits klinische Anwendung in der Planung und Ergebniskontrolle von Operationen. Die Zuverlässigkeit in der Vorhersage von Brustvolumen, Größe und Form wurde bewiesen: 3D Laserscanning führte zu ebenso akkuraten Messungen wie eine Magnetresonanztomographie.[72, 83, 84, 85, 99]

Chua et al. verknüpften als Erste das 3D Laserscanning mit RP Systemen und beschrieben eine Methode zur Produktion eines groben Modells einer weiblichen Brust. Diese Methode hatte Einschränkungen bezüglich des produzierten Brustmodells, das anstelle eines vollkommenen, nur ein relief-ähnliches Brustmodell darstellte.[28] Daher entwickelten Schantz et al. ein CAD/CAM Verfahren zur Herstellung eines vollständigen Brustmodells im Maßstab 1:1, welches aus Tissue Engineering geeigneten Material mittels Rapid Prototyping produziert wer-

den konnte.[179]

Schlussfolgernd stellen die CAD/CAM Verfahren eine Möglichkeit zur Produktion individueller Brustimplantate oder Brustscaffolds dar. Bisher konnten allerdings keine Fettgewebstrukturen in Brustgröße gefertigt werden. Daher ist dies Gegenstand intensiver Forschung.[163]

1.6 Adipose Tissue Engineering

Im Jahr 1999 beschrieb Patrick et al. erstmalig die Herstellung von Fettgewebe aus adulten Stammzellen. Präadipozyten wurden aus einer Ratte isoliert und kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf einem Scaffold durch einen hormonellen Differenzierungscocktail zu Fettgewebe differenziert und im Rattenmodell getestet. In vivo konnte auf dem ganzen Scaffold die Bildung von Fettgewebe durch den Nachweis von Fetteinschlüssen in den implantierten Zellen gezeigt werden.[123]

Unter Adipose Tissue Engineering versteht man die Herstellung von vitalem Fettgewebe zur Behandlung von formverändernden (z.B. Tumorsektion) oder funktionellen (z.B. Decubitus) Fettgewebs- bzw. Volumendefekten.[163]

Ziel der Forschung ist es vitales Fettgewebe in ausreichenden Mengen herzustellen, um eine Brustrekonstruktion mit körpereigenen Stammzellen durchzuführen. So können Nebenwirkungen und Risiken der anderen chirurgischen Verfahren minimiert und im Zusammenspiel mit CAD/CAM Techniken eine passgenaue und individuelle Brustrekonstruktion, die ein optimales ästhetisches Ergebnis verspricht und so die mentale Gesundheit des Patienten effizient fördert, ermöglicht werden.[122]

1.6.1 Definition Tissue Engineering

Um die Definition des Begriffs "Tissue Engineering" wurde lange Zeit gerungen. 1993 erschien im Science Magazin ein Artikel von Langer und Vacanti mit dem Titel „Tissue Engineering“. Ihre Definition lautet:[87]

“Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and the life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function.”[87]

Übersetzt lautet diese: "Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Feld, das die Prinzipien von Ingenieurs- und Lebenswissenschaften anwendet, um biologisches Ersatzmaterial zu entwickeln, welches die Gewebefunktion wiederherstellt, aufrechterhält oder verbessert."

Es wird unterschieden zwischen in vitro und in vivo Tissue Engineering. In vitro bedeutet die Herstellung des Gewebeersatzes aus Stammzellen im Zellkulturlabor, in vivo die Implantation eines bioaktiven Materials und dessen Umwandlung in funktionelles Gewebe durch den Körper selbst.[163]

1.6.2 Stammzellen

Bereits 1909 benutzte der russische Histologe Maximov den Begriff Stammzelle auf einer Tagung in Berlin. Er postulierte das Vorhandensein einer hämatopoietischen Stammzelle.[107] Allerdings dauerte es bis 1963 bis Becker und McCulloch die Existenz von selbsterneuernden Zellen im Knochenmark nachweisen konnten.[10] Das blutbildende System hat Modellcharakter und dient nachfolgend der Illustration der allgemeinen Stammzelllehre.

1.6.2.1 Definition

„Eine Stammzelle ist eine sich selbst erneuernde Zelle, welche die Fähigkeit besitzt sich zu teilen und so aus sich eine Zelle mit dem identischen Entwicklungspotenzial und/oder eine Zelle mit einem eingeschränkten Entwicklungspotenzial hervorgehen zu lassen.“[96]

Es werden zwei Arten der Teilung unterschieden. Bei symmetrischer Teilung entstehen aus einer Stammzelle zwei neue Stammzellen. Bei asymmetrischer Teilung entstehen eine neue Stammzelle und eine differenziertere Tochterzelle.[178]

1.6.2.2 Potenz

Die Potenz einer Stammzelle bezeichnet deren Entwicklungspotenzial. Es wird zwischen totipotent, omnipotent, pluripotent, multipotent und unipotent unterschieden. Ausschlaggebend für die Klassifikation ist die Anzahl von Zelllinien (Lineage), welche bei asymmetrischer Teilung aus der Stammzelle hervorgehen können.[115]

Eine Zelllinie (Lineage) umfasst alle bei der Differenzierung einer Stammzelle in einen maturaen Zelltypen beteiligten Intermediärtypen. Differenzierung bedeutet die sukzessive Einschränkung des Entwicklungspotenzials mit reziprok voranschreitender Ausbildung des Phänotyps des jeweiligen maturaen Zelltypen.[178] In der natürlichen Ontogenese schränkt sich die Potenz

Potenz	Vorkommen	Differenzierung in	Beispiel
totipotent	Morula	Embryoblast und Trophoblast	Befruchtete Eizelle
omnipotent	Embryoblast	Alle drei Keimblätter	Embryonale Stammzelle (ESC)
pluripotent	Keimblatt	Alle Gewebe des Keimblattes	Mesenchymale Stammzelle (MSC)
multipotent	Adulter Organismus	Alle Zellen eines Gewebetypes	Hämatopoietische Stammzelle(HSC)
unipotent	Adulter Organismus	Alle Zellen der Zelllinie	Erythrocyte Progenitor cell (ERP)

Tabelle 1.5: Begriffsübersicht Potenz einer Stammzelle[80, 115]

der Stammzellen erstmalig bei der Differenzierung in Embryoblast und Trophoblast ein. Anschließend verlieren die ESC bei der Ausbildung der embryonalen Keimblätter ihre Fähigkeit, alle Zellen eines Organismus hervorbringen zu können. Alle weiteren abgeleiteten Stammzellen werden fortan in ihrer Entwicklungspotenz dem Gewebs- und Zellspektrum ihres Keimblattes zugeordnet. Eine MSC besitzt folglich die Fähigkeit alle Zelltypen des Mesenchyms ausbilden zu können. Für die weitere Entwicklung sind immer spezialisiertere Stammzellen (z.B. HSC) notwendig. Schließlich ist die Potenz einer Stammzelle soweit eingeschränkt, dass diese nur noch eine Zelllinie hervorbringen kann. Diese Stammzelle wird als unipotent (z.B. ERP) bezeichnet. Die Unterscheidung zwischen Stammzelle und Progenitorzelle ist in der Literatur allerdings ungenau. Charakteristisch für Progenitorzellen ist, dass diese die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben. Oftmals werden die multipotenten oder unipotenten Progenitorzellen des hämatopoetischen Systems fälschlicherweise als Stammzellen bezeichnet, obwohl diese die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben.[115, 176, 178]

1.6.2.3 Steuerung der Differenzierung

Es existieren mehrere Theorien über die Steuerung der Differenzierung. Einerseits wird die Differenzierung auf asymmetrische Teilung der Zellmembranproteine und andererseits auf sekundäre Faktoren zurückgeführt.

Postuliert wird eine asymmetrische Verteilung von Zellmembranproteinen bei der Zellteilung. Dies bedingt eine unterschiedliche Verteilung von Signaltransduktionsproteinen und Zelladhäsionsproteinen auf den Tochterzellen, sodass diese im konzertierten Zusammenspiel die Genak-

tivität der Stammzelle verändern und die Differenzierung der Stammzelle voranschreitet.[11] Andererseits werden hormonale Stimuli und Zell-Zell-Interaktionen der Stammzellnische als wesentliche Faktoren für den Erhalt der Stammzellaktivität bzw. Beginn der Differenzierung eingeschätzt. Hierbei ist das Mikromilieu, aufgebaut durch die Stromazellen der Stammzellnische (z.B. ME-Colony Stimulating Factor der Stromazellen des Knochenmarks), genauso entscheidend für das Schicksal der Stammzellen wie systemische hormonelle Faktoren (z.B. Erythropoietin oder Cortisol auf Differenzierung der HSC).[147, 183]

1.6.2.4 Stemness

Der Begriff Stemness lässt sich nur schwer ins Deutsche übertragen. Er bezeichnet das Wesen einer Stammzelle. Ursprünglich sollte das Wesen einer Stammzelle durch ein spezifisches Genmuster definiert werden. Diverse Studien versuchten durch den Vergleich verschiedener Stammzellpopulationen ein charakteristisches Muster aktiver Gene zu identifizieren.[7]

Aktuell wird der Begriff weiter gefasst und beschreibt Vorhandensein der Stammzeleigenschaften (Proliferationsfähigkeit und Differenzierungsfähigkeit). Diese Stammzeleigenschaften werden durch freie Faktoren aufrechterhalten bzw. beeinflusst: Genaktivität, Mikromilieu der Stammzellnische sowie humorale Stimuli.[13, 94, 143, 167]

Zusammenfassend bezeichnet Stemness das Wesen einer Stammzelle mit Vorhandensein der Stammzeleigenschaften (Proliferationsfähigkeit und Differenzierungsfähigkeit).

1.6.2.5 Vorkommen

Es wird unterschieden zwischen adulten und embryonalen Stammzellen. Adulte Stammzellen dienen im Organismus der Aufrechterhaltung der Zellzahl (Homöostase) und Reparatur von Schäden. Embryonale Stammzellen sind durch ihren Ursprung, dem Embryoblasten definiert. Sie dienen der pränatalen Entwicklung. Eine Sonderform stellen die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) dar. Dies sind reprogrammierte adulte Zellen mit dem Potenzial embryonaler Stammzellen.

1.6.2.5.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESC) kommen während der Ontogenese im Stadium der Blastozyste vor. Hier differenzieren sich die Zellen der Morula in Trophoblast und Embryoblast. Aus dem Embryoblast entwickelt sich zu Beginn des ersten Trimenon der Embryo während aus dem Trophoblasten die Plazenta hervorgeht. Daher sind alle Zellen des Embryoblasten (englisch auch inner cell mass) omnipotent und werden als ESCs bezeichnet. Während der weiteren Entwicklung des Embryos gehen aus ihnen bei der Gastrulation die Keimscheiben hervor.[37] Bis heute wurden noch keine Therapien beim Menschen durchgeführt. Dies ist durch zwei fundamentale Probleme der ESCs zurückzuführen. Einerseits wurden nach Injektion von ESCs im Mausmodell disseminierte Teratome gefunden und andererseits gestaltet sich die Differenzierung in den gewünschten Phänotypen aufgrund der Omnipotenz schwierig. Hierfür werden die manuelle Zellselektion (lineage selections) nach spontaner Differenzierung sowie die gezielte Differenzierung mittels hormoneller Stimuli angewandt.[178]

1.6.2.5.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind in nahezu allen Geweben des reifen Organismus vorhanden. Sie besitzen entweder multipotente Differenzierungseigenschaften im Sinne einer MSC oder erlauben die Differenzierung in alle Zelltypen ihres jeweiligen Gewebes (z.B. Cardiac Stem Cell).[80]

Der Einsatz von adulten Stammzellen im Tissue Engineering ist weit verbreitet. Dies hat mehrere Gründe: einfache Verfügbarkeit, sichere Anwendung und geringe Immunreaktion selbst bei

Isolationsquellen adulter Stammzellen

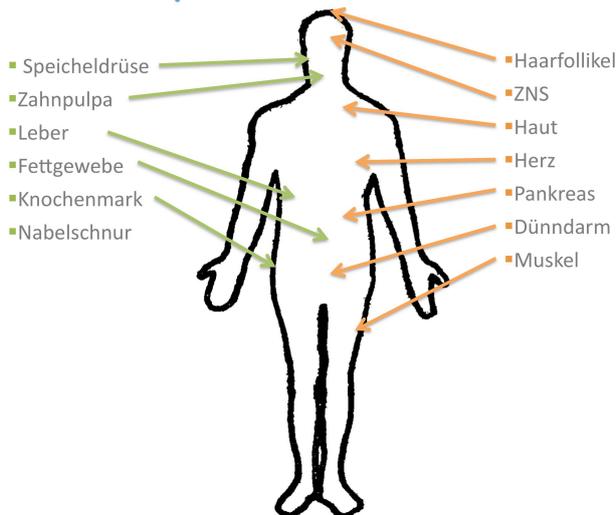


Abbildung 1.5: Isolationsquellen adulter Stammzellen: Adulte Stammzellen konnten aus einer Vielzahl von Geweben gewonnen werden. Sie dienen der Zellregeneration bzw. der Zellhomöostase der spezifischen Gewebe. Stammzellen aus Knochenmark, Fettgewebe, Zahnpulpa, Speicheldrüse, Leber und Nabelschnur können sich in alle mesenchymalen Gewebe differenzieren.[40, 57, 126, 137, 168, 187] Stammzellen aus Haut, Haarfollikel, ZNS, Dünndarmkrypten, Herz, Muskel und Pankreas in alle gewebsspezifischen Zelltypen.[49, 80, 92, 105, 188]

allogener Anwendung.[20, 80, 178]

Im Gewebe besitzen adulte Stammzellen dreifache Funktion: Regeneration nach Gewebeschaden, kontinuierliche Gewebeerneuerung und die Ausschüttung trophischer Mediatoren.[20] Verdeutlicht wird dies an folgenden Beispielen: Neuaufbau der Epidermis nach Verwundung durch epidermale Stammzellen, kontinuierliche Erneuerung der Dünndarmzotten durch Stammzellpopulation in den Krypten der Zotten sowie Erhöhung der VEGF Konzentration im ischämischen Myokard nach Injektion von MSCs.[49, 73, 162]

1.6.2.5.3 Induzierte pluripotente Stammzellen

Induzierte pluripotente Stammzellen sind künstlich hergestellte Stammzellen. Durch genetische Reprogrammierung (z.B. Retroviren, homologe Rekombination oder Zinkfinger-nucleasen) wird eine somatische Zelle in einen stammzellähnlichen Zustand überführt, sodass diese wieder teilungsfähig und pluripotent differenzierbar ist.[164]

Takahashi et al. modifizierten 2006 adulte humane Fibroblasten der Haut mittels Transduktion von Oct3/4, Sox2, Klf4, und c-Myc. Die so reprogrammierten Zellen waren in Bezug auf Proliferationsverhalten, Genexpression und Telomeraseaktivität mit ESCs vergleichbar und in alle drei Keimblätter differenzierbar.[157, 158]

Der Vorteil dieser Methode ist die Vermeidung ethischen Konflikte bei der Nutzung von ESCs (vgl. Embryonenschutzgesetz) sowie die Verwendung einfach zu gewinnender Zellen (z.B. Fibroblasten der Haut).

1.6.2.6 Adipose Tissue Derived Stem Cell

Adipose Tissue Derived Stem Cells (ASCs) sind aus dem Fettgewebe isolierte adulte Stammzellen mit der Qualität einer MSC. In der Literatur finden sich oftmals noch die veraltete Bezeichnung Präadipozyt (preadipocyte) oder meist weniger scharf definiert die Bezeichnung Adipose Tissue Derived Precursor Cells (APC oder auch ADPC).[43, 55, 163]

ASCs sind in den letzten Jahren in den Focus der Forschung gerückt, da sie eine sehr leicht zugängliche Quelle von MSCs bieten. Darüber hinaus sind die ASCs in Bezug auf Proliferationsfähigkeit und adipogener Differenzierung den MSCs aus dem Knochenmark überlegen. Dies alles prädestiniert ASCs zur Fettgewebsregeneration in der plastischen Chirurgie.[17, 124]

1.6.2.6.1 Definition

Die Definition von ASCs erfolgt über vier Kriterien: Plastikadhärenz, Proliferation, Differenzierung (adipogen, osteogen, chondrogen) sowie über Oberflächenmarker. Plastikadhärenz und Proliferationsfähigkeit sind klassische Kriterien für Stammzellen. Die Differenzierung in die drei genannten Gewebetypen entspricht dem Keimblattspektrum der MSCs. Zusammen genommen erlauben diese Kriterien unter Berücksichtigung des Spendegebietes (Fettgewebe) die Bestimmung der isolierten und kultivierten Zellen als ASCs.[6, 36]

Die aktuelle Forschung konzentriert sich auf die Charakterisierung von spezifischen Oberflächenmarkern. Die Unterscheidung zwischen den ASCs, den restlichen Zellen der bei der Isolation gewonnenen Stromal Vascular Fraction (SVF) und anderen MSCs gestaltet sich allerdings schwierig.[36]

	ASC[76]	ASC[56]	ASC[6]	SVF[6]	MSC[76]
CD14	--	--	--	-	--
CD18		--			
CD29	++	++	++	+	++
CD31			--	-	
CD34*	--	0	+		++
CD44	++	0	+		++
CD45	--		--	-	--
CD73	++		++	0	++
CD90	++		++	+	++
CD105	+	-	+	-	++
CD106	-		--	-	0
CD133	--				--
CD144	--				--
CD					

Tabelle 1.6: Anteilige Ausprägung der Oberflächenmarker von ASC, SVF und MSC: (0-15% - -; 15-40% -; 40-70% 0; 70-85% + 85-100% ++; *CD34+ nach Isolation und CD34- nach Kultivierung.

1.6.2.6.2 Isolation von ASCs

ASCs können entweder aus solidem Fettgewebe oder dem Aspirat einer Fettabsaugung isoliert werden. ASCs sind Bestandteil der SVF und werden durch Aussaat der SVF kultiviert. Sonstige Bestandteile der SVF sind Endothelzellen, Endothelzellvorläuferzellen, Perizyten, Perizyten Vorläuferzellen, Bindegewebszellen.[17, 142]

Kriterium	Liposuktion vs. Resektionsmaterial
Gewinnung	minimal invasiv vs. chirurgisch
Probenqualität	fein zerkleinert vs. solider Block
Vitalität der isolierten Zellen	Liposuktionsaspirat > Resektionsmaterial
Differenzierung adipogenes Potenzial	Adipogen, osteogen, chondrogen gleichwertig

Tabelle 1.7: Isolationsquellen von ASCs im Vergleich[18, 145]

Die Datenlage zur besten Isolationsquelle ist inkonsistent. Daher wird aufgrund der einfachen Durchführbarkeit in der plastischen Chirurgie die Liposuktion bevorzugt. Das Isolationsergebnis ist dabei abhängig von der Liposuktionsmethode, der Aufbewahrung des Fettaspirates, der Isolationsmethode, dem Spendeareal sowie dem Patienten.[6, 18, 43, 106, 145, 185]

1.6.2.6.3 Lokalisation

Es wird eine gefäßnahe Lage der ASC im Fettgewebe angenommen. In histologischen Studien wurde die Lage auf die Arteriolen und Venolen (25-75µm im Durchmesser) eingegrenzt.[94] Der Nachweis von Stammzellmarkern (SSEA, OCT4 und Telomerase) gelang Lin et al. im Bereich des Endothels. Die ursprüngliche Vermutung, die Stammzellnische im Bereich der Perizyten und glatten Gefäßmuskulatur zu finden, konnte nicht bestätigt werden, da Zellen in diesem Bereich CD34- waren, ASCs bei Isolation aber CD34+ sind. Ausgehend von diesen Befunden postulierten Lin et al., dass ASCs und endotheliale Vorläuferzellen sich von einer gemeinsamen vaskulären Stammzelle ableiten.[94]

Yang et al. fanden hingegen bei in vitro Studien zum Auswanderungsverhalten von ASCs aus Fettgewebsfragmenten einen großen Anteil von CD31-CD34-CD146+SMA+Zellen, welche somit Perizytenmarker aufweisen, und lokalisierten die ASCs im Bereich der Perizyten.[184]

Schlussfolgernd wird die genaue Lokalisation der ASCs weiterhin kontrovers diskutiert. Entscheidend ist die erfolgreiche Isolation über die SVF.

1.6.2.6.4 Adipogene Differenzierung

Die Differenzierung von ASC in (reife) Fettzellen erfolgt in Zellkultur mittels multimodaler Stimulation. Hierzu gehören hormonale Faktoren sowie Einfluss des Mikromilieus (pO₂, Bewegung, Kokultur mit reifen Fettzellen und die umgebende Matrix bezüglich Material und Architektur).[22, 45, 46, 64, 136, 151, 66]

Wirkmechanismus	Angriffspunkt	Stimulus	
Signaltransduktionskaskaden	Tyrosinkinasen	Insulin	[25, 60, 61, 120]
		IGF	[174]
		PGF2	[23]
		GH	[63, 109, 118]
	cAMP/PKA	cAMP	[29, 32, 86, 172]
		IBMX	[90, 144, 155]
	Arachidonsäure	[51]	
Transkriptionsfaktoren	SREB	Glukokortikoide	[24, 29, 61, 62, 82, 120, 135]
	RXR	Retinsäure	[120, 121, 138]
	PPAR	Thiazolidindione	[53, 89, 140]
		Prostacyclin PGI ₂	[23, 78, 116]
		Indomethacin, Ibuprofen	[82, 88]
	RXR/PPAR	Freie Fettsäuren	[154, 160]
	THR	T3	[32, 47]

Tabelle 1.8: Faktoren der adipogenen Differenzierung

1.6.3 Scaffolds

1.6.3.1 Definition und Funktion

Die umgebende Matrix hat einen signifikanten Einfluss auf die Differenzierung von Stammzellen. Hierbei sind sowohl Material als auch Architektur der Matrix von Bedeutung. Beispielsweise hat die Steifigkeit der Matrix einen signifikanten Einfluss auf die Differenzierung.[54, 64]

Im TE wird der Begriff Scaffold (engl. Gerüst) verwendet um eine artifizielle Matrix zu beschreiben, welche in ihrer Architektur und Materialbeschaffenheit entwickelt wurde, um eine optimale Matrix zur Geweberegeneration zu bieten und gleichzeitig das Zielgewebe bis zum Abschluss der Geweberegeneration zu substituieren.[17]

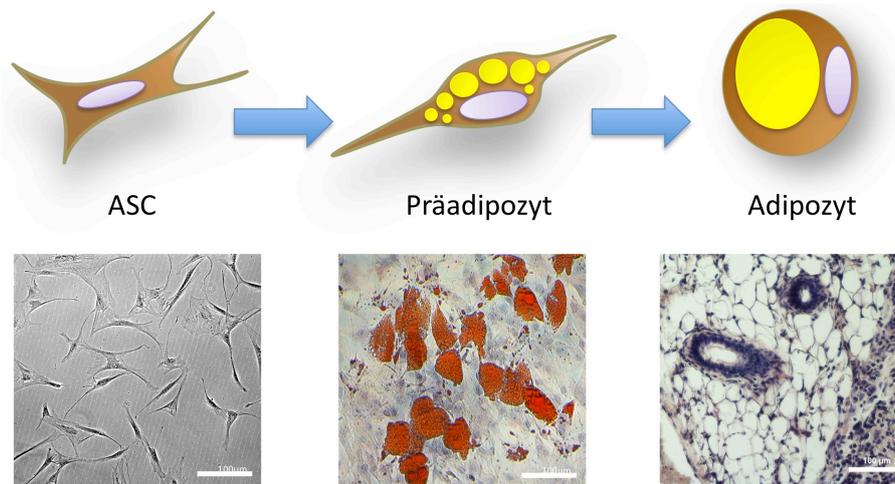


Abbildung 1.6: Adipogene Differenzierung: (Oben) Charakteristische Veränderungen der Morphologie während der Differenzierung durch Einlagerung von Lipiden. (Unten) Darstellung der ASCs im Phasenkontrast, durch OilRed/Hematoxylin Färbung in der Zellkultur und als HE-Präparat ex vivo.

Aus dieser Definition gehen drei wesentliche Anforderungen für einen Scaffold hervor: 1. Förderung der Regeneration durch Unterstützung der Differenzierung, 2. Ermöglichung der Integration im Defekt und 3. Temporärer und qualitativer Ersatz der Gewebefunktion im Defektgebiet.[163]

Aus Punkt 3 geht hervor, dass der Scaffold temporär im Defekt verbleibt und anschließend ohne toxische Abbauprodukte zu hinterlassen biologisch abgebaut werden soll.[163]

1.6.3.2 Scaffolds im Adipose Tissue Engineering

Aus den obigen Kriterien für Scaffolds gehen folgende Eigenschaften für den Einsatz im adipose TE hervor: 1. Förderung der Fettgewebsbildung, 2. Ermöglichung der Integration ins Gewebe mit schneller Vaskularisierung und 3. Pallelastisches aber kompressionsfähiges Material, welches innerhalb eines halben Jahres resorbiert werden kann.[122, 163]

1.6.4 Vaskularisierungsstrategien

Bereits 1973 zeigten Folkman und Hochberg, dass das Wachstum von Tumorzellen in Sphäroiden, also in 3D, im Gegensatz zur klassischen Zellkultur begrenzt ist. Die Sphäroide erreichten durchschnittlich einen Durchmesser von 3-4mm, bevor ihr Wachstum selbstregulierend zum Stillstand kam. Folkman und Hochberg führten dies auf einen mangelnden An- und Abtransport von Sauerstoff, Nährstoffen und anfallenden Metaboliten im Inneren des Sphäroiden zurück.[48]

Bei der in vitro Konstruktion von Geweben für die regenerative Medizin werden Dimensionen erreicht, welche die Sphäroide von Folkman und Hochberg um ein vielfaches überschreiten. Daher würden gemäß der Studie von Folkman und Hochberg die inneren Anteile eines Konstruktes mangelversorgt und nach einer gewissen Karenzzeit nekrotisch werden.[163]

Im adulten Organismus wird dies durch eine reiche Gefäßversorgung und Durchblutung verhindert. Beispielsweise ist Fettgewebe stark vaskularisiert, d.h. es ist von zahlreichen Blutgefäßen durchsetzt und reichlich mit Blut durchströmt.[176]

Im Tissue Engineering werden Strategien mit dem Ziel der Neuschaffung eines vaskularisierten Zustandes Vaskularisierungsstrategien genannt. Hierbei wird zwischen Angiogenese (Aussprossung von Kapillaren aus existierenden Gefäßen) und Vaskulogenese (Neubildung von Blutge-

Material	Beobachtungen	Zelltyp	
PEG (Polyethylenglykol)	+Formstabilität +Differenzierung nach Vorbehandlung in vitro	Humane MSCs	[2]
PLGA (Polylactid-co-Glycolid)	+Mechanische Stabilität und Volumenerhalt nach 6 Wochen +Phänotyp reifer Fettzellen	Humane Präadipozyten	[27]
PCL (Polycaprolacton)	+Spontane Differenzierung ohne weitere Stimuli +Verbleibende Stammzellen zwischen den differenzierten Zellen -Nur in vitro Studie	Murine ESC	[75]
Kollagen I	+Hohe Porosität für Zellmigration +Verstärkung der Proliferation und Differenzierung +Nachbildung natürlichen Zellmilieus +Minimale inflammatorische Reaktion	Humane ASC	[74]
HYAFF11 (Hyaluronsäurederivat)	+Komplette Differenzierung in vivo +Hohe Porosität für Differenzierung -Volumenschrumpfung	Humane Präadipozyten	[66]
Fibrin	+Natürliches, vitales Fettgewebe +Keine inflammatorische Reaktion +Keine Nekrose -Initiale Volumenschrumpfung	Humane Präadipozyten	[165]

Tabelle 1.9: Überblick über verwendete Scaffoldmaterialien im adipose TE

fäßen durch Stammzellen) unterschieden. Abzugrenzen ist hiervon der Begriff der Neovaskularisation, welcher eine pathologische Gefäßneubildung z.B. bei der diabetischen Retinopathie beschreibt.[171]

1.6.4.1 Vessel Loop Modell

Das Vessel Loop Modell basiert auf plastisch-chirurgischen Methoden zur Vorbereitung von Lappenplastiken. Grundlegend ist die Erkenntnis, dass schlecht vaskularisiertes Gewebe unter hypoxischen Bedingungen von einem angrenzenden und stark vaskularisierten Gewebe vaskularisiert werden kann.[35, 97, 110]

Im Tissue Engineering wurde diese Methodik auf ein Gefäßbündel reduziert, welches zur Vaskularisierung eines im Zellkulturlabor hergestelltes Konstruktes verwendet werden kann. Tanaka et al. untersuchten diverse Konstellationen, wo ein Gefäßbündel von einem Konstrukt wie ein Sandwich umfasste wurde und das Gefäßbündel entweder als arteriovenöser Shunt-Loop, als ligiertes oder als intaktes durchströmtes arteriovenöses Gefäßbündel vorlag. Das durchströmte (flow-through) Gefäßbündel war den anderen Formen überlegen und zeigte eine deutliche Gefäßneubildung ausgehend von den Vasa vasorum der Venen.[161]

1.6.4.2 Übersicht der Tissue Engineering Strategien zur Vaskularisierung

Einen Überblick über die in der Literatur verwendeten Strategien zur Vaskularisierung gibt die folgende Tabelle.

Methoden	Kommentar	
Vessel Loop	Chirurgische Induktion der Aussprossung von Gefäßen in das Konstrukt; Hypoxie vermittelt	[97, 128, 161]
COPROGS	Nichtviraler Gentransfer mittels Coprogs zur Expression von angiogenem VEGF	[133]
Transgene Zellen MSC/ASC	VEGF Release durch transgene Zellen Induktion durch Faktoren (z.B. VEGF) oder supportiven Einfluss der Stammzellen	[69, 149] [106, 139, 162]
Vascular Stem Cells (VSC, EPC)	Schnellere Gefäßneubildung durch Kapillarbildung aus VSC	[31, 146, 186]
Extrazelluläre Matrix Konstrukte	Azelluläre EZM von Blutgefäßen (z.B. mesenterielle Gefäßarkaden)	[102, 130]
Künstliche Blutgefäße	Artifizielles Kapillarbett aus synthetischen Materialien	[21, 81]

Tabelle 1.10: Vaskularisierungsstrategien im TE

2 Problemstellung

2.1 Klinischer Ansatz

Die klinische Verwendung von vaskularisierten Fettgewebstrukturen in der plastischen Chirurgie ist die Rekonstruktion der Körperkontur und Oberfläche nach Weichteilschaden. Gerade bei der Brustrekonstruktion ist ein artifizell hergestellter Fettlappen von großem Vorteil. Denn dieser ersetzt den komplikationsreichen und langwierigen Teil der Lappenhebung und ermöglicht gleichzeitig eine passgenaue und individuelle Rekonstruktion mit einem vormodellierten Fettlappen. Die konzeptionelle Herangehensweise besteht im ersten Schritt in der Stammzell-

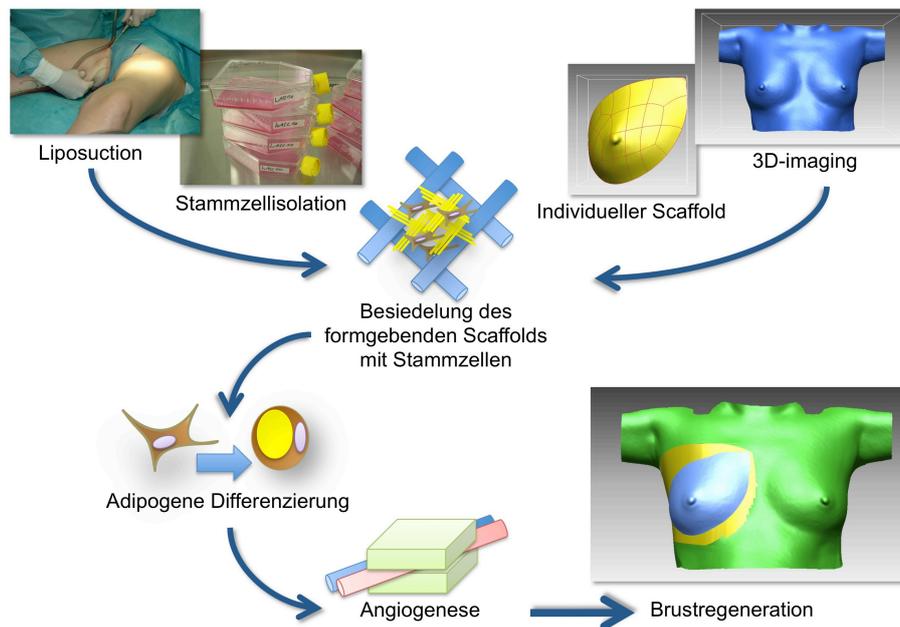


Abbildung 2.1: Konzeptioneller Ansatz der Brustrekonstruktion mit Tissue Engineering

gewinnung mittels Liposuktion, der Amplifikation der Stammzellen in vitro und der simultanen Herstellung eines individuell gefertigten Scaffolds in Form der zu rekonstruierenden Brust. Im nächsten Schritt wird der Scaffold mit Stammzellen besiedelt und die Differenzierung in Fettgewebe in vitro eingeleitet. Abschließend wird durch ein Angiogeneseverfahren die Vitalität des artifizierten Fettgewebes durch Gefäßbildung gesichert und die Brustrekonstruktion durch Implantation des in vitro hergestellten Fettgewebes abgeschlossen.

Durch modellhafte Experimente soll die Machbarkeit des klinischen Konzeptes demonstriert werden. Die Herstellung vaskularisierter Fettgewebstrukture im Kleintiermodell dient daher der Überprüfung der Machbarkeit.

2.2 Experimentelle Fragestellung und Herangehensweise

Diese Arbeit hat die Herstellung vaskularisierter Fettgewebstrukture zum Ziel. Für die Herstellung eines vitalen Fettgewebstruktes stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: in vitro und in vivo Tissue Engineering. Diese Herangehensweisen erfordern unterschiedliche Scaffold-Architekturen. Für das in vitro Tissue Engineering ist eine für den Differenzierungsprozess in vitro supportive Scaffoldarchitektur erforderlich. Für das in vivo Tissue Engineering ist eine

Scaffold-Architektur geeignet, welche die Invasion von Blutgefäßen und Stammzellen für die Bildung von Fettgewebe unterstützt.

In dieser Arbeit sollen zwei verschiedene Scaffold-Architekturen verglichen werden. Der erste Scaffold ist schwammartig aufgebaut und der zweite Scaffold hat eine stacked-fibre Architektur, d.h. er besteht aus gestapelten Fibrillen. Die zwei Scaffold-Architekturen unterscheiden sich durch folgende Merkmale:

Merkmal	Stacked-fibre Architektur	Schwammartige Architektur
Architektur	Gestapelte Fibrillen	Schwammartige, interkonnektierte Höhlen
Geometrie	Regelmäßig, kontrolliert	Unregelmäßig, zufällig
Porengröße	Individuell produzierbar, großporig	Unkontrolliert, abhängig von Höhlengröße und Ausmaß der Fusion benachbarter Höhlen
Interkonnektivität	Regelmäßig durch Stapelung der Fibrillen gegeben	abhängig von der Fusion der einzelnen Höhlen
Wachstumsfläche	Auf den Fibrillen in einer Ebene	Akkumuliert in den Höhlen des Scaffolds
Vorgesehener Einsatzbereich	In vivo Tissue Engineering	In vitro Tissue Engineering
Herstellungsverfahren	Fused deposition modelling (FDM)	Mold Casting und Einblasen von Gas zur Schwammbildung
Formgebung	„free form“, Rapid Prototyping durch FDM	Durch Gussformen (Mold Casting)

Tabelle 2.1: Vergleich von stacked-fibre und schwammartiger Scaffoldarchitektur

2.3 Hypothesen

Aus den Merkmalen der beiden Scaffold-Architekturen wurden die folgenden Hypothesen abgeleitet und in vitro und in vivo überprüft.

1. Die schwammartige Architektur eines Scaffolds führt zu Akkumulation von Stammzellen in den multiplen Höhlen des Scaffolds und dadurch zu einer höheren Adipogenese in vitro als bei stacked-fibre Architektur.
2. Die strukturierte stacked-fibre Architektur erleichtert die Invasion von Blutgefäßen und proliferativen Zellen und besitzt daher im Vergleich zur weniger strukturierten schwammartigen Scaffold-Architektur eine höhere Integrationsfähigkeit in den Wirtsorganismus.
3. Die Vorteile der stacked-fibre Architektur durch die Integrationsfähigkeit und der schwammartigen Architektur durch die überlegene in vitro Adipogenese führen zu einem gleichen Ausmaß an Fettgewebsbildung.

3 Material und Methoden

3.1 Scaffolds

3.1.1 Stacked-fibre-Architektur

Als repräsentatives Muster einer stacked-fibre Architektur diente Osteomesh® (Osteopore, Singapore, Singapore), ein kommerziell erhältlicher Scaffold aus Polycaprolakton (PCL). Dieser bestand aus vier Lagen geschichteter Fibrillen und wurde in Platten der Dimension 50mm x 40mm x 1mm steril verpackt erworben. Für die durchgeführten Versuche wurden unter sterilen Bedingungen im Biosafety Cabinet (Biosafety Cabinet, BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland) mit einer sterilen Biopsiestanze (Acupunch 6mm; Xio-medics, Unterhaching, Deutschland) und einer sterilen Einwegpetrischale (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) als Unterlage diskusförmige Proben des Scaffolds mit 6mm Durchmesser und einer Höhe von 1mm ausgestanzt.¹

3.1.2 Schwammartige Architektur

Ein biologisch abbaubarer Polyurethan-(PU)-Schwamm (iw570b; Polymaterials, Kaufbeuren, Deutschland) wurde als repräsentatives Muster einer schwammartigen Scaffold-Architektur verwendet. Dieser bestand aus einem hochgradig quervernetzten, komplett aliphatischen Polyetheresterurethan basierend auf PCL mit 5% Polyethylenglykol zur Steigerung der Hydrophilität und wurde en bloc geliefert. Zur Herstellung adäquater Scaffolds wurde der Schwamm in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend mit einem Skalpell (disposable standard scalpel; Feather Safety Razor, Osaka, Japan) in 1mm dicke Scheiben geschnitten. Aus diesen Scheiben wurden analog zum PCL diskusförmige Scaffolds mit 6mm Durchmesser und 1mm Höhe gewonnen. Zur experimentellen Verwendung mussten die PU-Scaffolds in 100ml PBS (H15-002; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) schwimmend in einer Laborflasche (100ml Duran Laborflasche; Duran Group, Mainz, Deutschland) von der Apotheke des Klinikum rechts der Isar bei 120°C entsprechend dem Protokoll für sterile Infusionslösungen autoklaviert werden.²

3.2 Visualisierung der Scaffold-Architektur

3.2.1 Makroskopische Visualisierung

Die makroskopische Darstellung der leeren Scaffolds erfolgte mit einer Spiegelreflexkamera (Nikon D70; Nikon, Düsseldorf, Deutschland) im Nahaufnahmemodus auf einem schwarzem Hintergrund.

3.2.2 Auflichtmikroskopie

Zur lichtmikroskopischen Darstellung der leeren Scaffolds wurde ein Durchlichtmikroskop (Eclipse TE 2000-S; Nikon, Tokyo, Japan) mit eingebauter digitaler Kamera (Optical Sight mit Elements BR3.0 Software; Nikon, Tokyo, Japan) verwendet. Da in Durchlichttechnik die Scaffolds

¹Dieser Scaffold wird im Folgenden als PCL-Scaffold bezeichnet werden.

²Dieser Scaffold wird im Folgenden als PU-Scaffold bezeichnet werden.

(Dicke 1mm) nicht dargestellt werden konnten, wurde das Mikroskop zu einem Auflichtmikroskop umgewandelt. Hierfür strahlte eine externe Lichtquelle (Nano light 11 Watt; Dennerle, Vinningen, Deutschland) mit 45° Einfallswinkel von seitwärts auf die Objektfläche.

3.2.3 SEM

Zur elektronenmikroskopischen Darstellung wurden die leeren Scaffolds mit einem doppelseitigen Klebeband auf der Probenhalterung des Mikroskops fixiert und von einer Sputter Maschine (SCD 005; BAL-TEC, Balzers, Lichtenstein) mit einer 10-20nm dicken Goldschicht überzogen. Anschließend erfolgte die Visualisierung mit einem Rasterelektronenmikroskop (Hitachi 3500-N SEM; Hitachi, Krefeld, Deutschland) bei einer Spulenspannung von 10kV.

3.3 Grundlegende Methoden

3.3.1 Isolation der Stammzellen

Die in der Arbeit verwendeten Stammzellen wurden aus Fettgewebe isoliert, welches bei Liposuktionen gewonnen wurde. Alle Liposuktionen wurden im Klinikum München rechts der Isar durchgeführt. Das Aspirat wurde nach informierter Einwilligung der Patientinnen zur wissenschaftlichen Verwendung der Gewebeproben ins Zellkulturlabor transportiert. Hier erfolgte die Isolation der ASC gemäß einem modifizierten Protokoll nach Schantz und Ng.[142]

Unter sterilen Bedingungen wurden im Biosafety Cabinet die schwimmenden Fettpartikel mit serologischen 50ml Pipetten (#357550; BD BioSciences, Bedford, USA) in 50ml Tubes (#62547254; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) transferiert. Pro Tube wurden 30ml Fettpartikel-Tumeszenz-Suspension abgefüllt und 15ml einer 0,15%igen Kollagenaselösung je Tube hinzugegeben. Für die 0,15%ige Kollagenaselösung wurden 0,368g CollagenaseA (#10103586001; Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) in 245ml PBS (H15-002; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gelöst. Die Lösung wurde manuell mit einer 5ml Spritze (5ml Injekt solo Luer zentrisch; B. Braun, Melsungen, Deutschland) sowie einem aufsteckbaren Sterilfilter (Millex-GV syringe driven filter unit, PVDF, 0,22µm; Millipore Ireland, Carrigtwohill, Irland) filtriert und in Aliquots zu je 15ml bei -20°C im Gefrierschrank (Standgefriergerät; Liebherr, Biberach a.d.R, Deutschland) in 15ml Tubes (#91015; TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) aufbewahrt und vor Verwendung im Wasserbad (WB10; Memmert, Schwabach, Deutschland) wieder auf 37°C aufgewärmt. Aspirat und Kollagenaselösung wurden vermischt und bei 37°C im Wasserbad (WB10; Memmert, Schwabach, Deutschland) für 30min inkubiert.

Nach Zugabe von 5ml Kulturmedium (Dulbecco's modified eagle medium DMEM E15-883, 10% fetales Kälberserum A15-152, 1% Antibiotikum/Antimykotikum P11-002; alle PAA Laboratories, Pasching, Österreich) wurden die Tubes mit 280g für 5min bei 4°C zentrifugiert, sodass sich die Emulsion in drei Phasen (Öl, Tumeszenz/PBS, SVF) auftrennte. Anschließend wurden die Tubes kräftig bis zur Wiedervermischung der gebildeten Phasen geschüttelt und nochmals für 5min unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Von den drei gebildeten Phasen wurden die oberen zwei (Öl, Tumeszenz/PBS) mit einer 50ml Pipette abgesaut. Hierbei wurden 5ml der Tumeszenzlösung im Tube belassen, damit die am Boden befindliche SVF nicht aufgewirbelt wurde.

Im nächsten Schritt wurden 5ml Lysispuffer hinzugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur für 10min inkubiert. Für den Lysispuffer (320mM NH₄Cl-), wurden 3,06g Ammoniumchlorid (A0171; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) in 180ml PBS gelöst. Die Lösung wurde mit einem Sterilfilter (Millex-GV syringe driven filter unit, PVDF, 0,22µm; Millipore

Ireland, Carrigtwohill, Irland) manuell filtriert, in Aliquots zu je 15ml bei -20°C im Gefrierschrank (Standgefriergerät; Liebherr, Biberach a.d.R, Deutschland) in 15ml Tubes (#91015; TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) aufbewahrt und vor Verwendung im Wasserbad (WB10; Memmert, Schwabach, Deutschland) wieder auf 37°C aufgewärmt. Nach der Inkubation wurden die Tubes erneut mit 280g für 5min bei 4°C zentrifugiert, sodass sich ein Pellet der SVF am Boden bildete. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 10ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einem Zellfilter (Cell strainer $100\mu\text{m}$; BD BioSciences, Bedford, USA) gereinigt und nach Nachspülen des Filters mit 10ml Kulturmedium (zur Gewinnung hängengebliebener Zellen) in eine 150ml Zellkulturflasche (#90151; TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) ausgesät.

3.3.2 Kultivierung

Die ASC wurden in 150ml Zellkulturflaschen (#90151; TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) im Inkubator (CB150/E3; Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 37°C und 5% pCO_2 vermehrt. Das Kulturmedium (Dulbecco's modified eagle medium DMEM E15-883, 10% fetales Kälberserum A15-152, 1% Antibiotikum/Antimykotikum P11-002; alle PAA Laboratories, Pasching, Österreich) wurde regelmäßig alle zwei bis vier Tage erneuert.

Bei Konfluenz wurden die Zellen 1:2 gesplittet. Hierfür wurden die ASC mit PBS (H15-002; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) zweimal gespült und mit 5ml Trypsin EDTA 1x (L11-004; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) nach 5min Inkubation von der Zellkulturflasche gelöst. Zu den suspendierten Zellen wurde 25ml Zellkulturmedium hinzugegeben und dieses auf und ab pipettiert, um das Trypsin zu stoppen. Anschließend wurde die Zellsuspension 1:1 auf zwei neue Zellkulturflaschen der Größe 150cm^2 verteilt und das Kulturmedium pro Flasche auf insgesamt 25ml aufgefüllt. Für die Versuche wurden alle Zellen in Passage 1 verwendet.

3.3.3 Wahl des Differenzierungsmediums

Zur Auswahl des Differenzierungsmediums wurde ein Vorversuch durchgeführt. Hierfür wurden 50.000 Zellen pro Well in einer 12-Lochplatte (#92012; TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) ausgesät. Jeder der zwei Versuchsgruppen waren sechs Wells mit ASCs von zwei verschiedenen Spendern (ein Spender à drei Wells; gematcht für beide Versuchsgruppen) zugeordnet. Am Tag 1 wurde die Differenzierung durch Austausch des Kulturmediums mit Differenzierungsmedium eingeleitet. Nach Administration des Differenzierungsmediums von Lonza (PT8002; Lonza, Walkersville, USA) wurde dieses regelmäßig erneuert. Beim Differenzierungsmedium von Promocell erfolgte zuerst eine Induktionsphase mit dem Induktionsmedium (C27437; Promocell, Heidelberg, Deutschland) für drei Tage und anschließend eine Differenzierungsphase mit dem Differenzierungsmedium (C27439; Promocell, Heidelberg, Deutschland) und regelmäßiger Erneuerung des Mediums. Nach 14 Tagen wurden die Zellen mit Formaldehyd 3,7% (#27244; Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland) für 30min fixiert und mit OilRed gefärbt. Hierfür wurden 300mg OilRed-Pulver (O02625; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) in 100ml 99%-Isopropanol gelöst und anschließend 3:2 in destilliertem Wasser verdünnt. Diese Arbeitslösung wurde mit einem Filterpapier (Grade 595, #10311642; Whatman, Maidstone, Großbritannien) verfeinert, um Farbkümpen zu vermeiden. Anschließend wurde das Formalin mit einer Pipette entfernt und der Zellrasen mit destilliertem Wasser gereinigt. Vor der Färbung wurde der Zellrasen für 5min mit 60%-Isopropanol bedeckt und im nächsten Schritt durch die filtrierte OilRed-Arbeitslösung ersetzt. Bei Raumtemperatur wurde die Färbelösung für 10min auf dem Zellrasen belassen, sodass der lipophile Farbstoff in die Lipidpartikel der Zellen diffundieren konnte. Abschließend wurde der Zellrasen mit Wasser

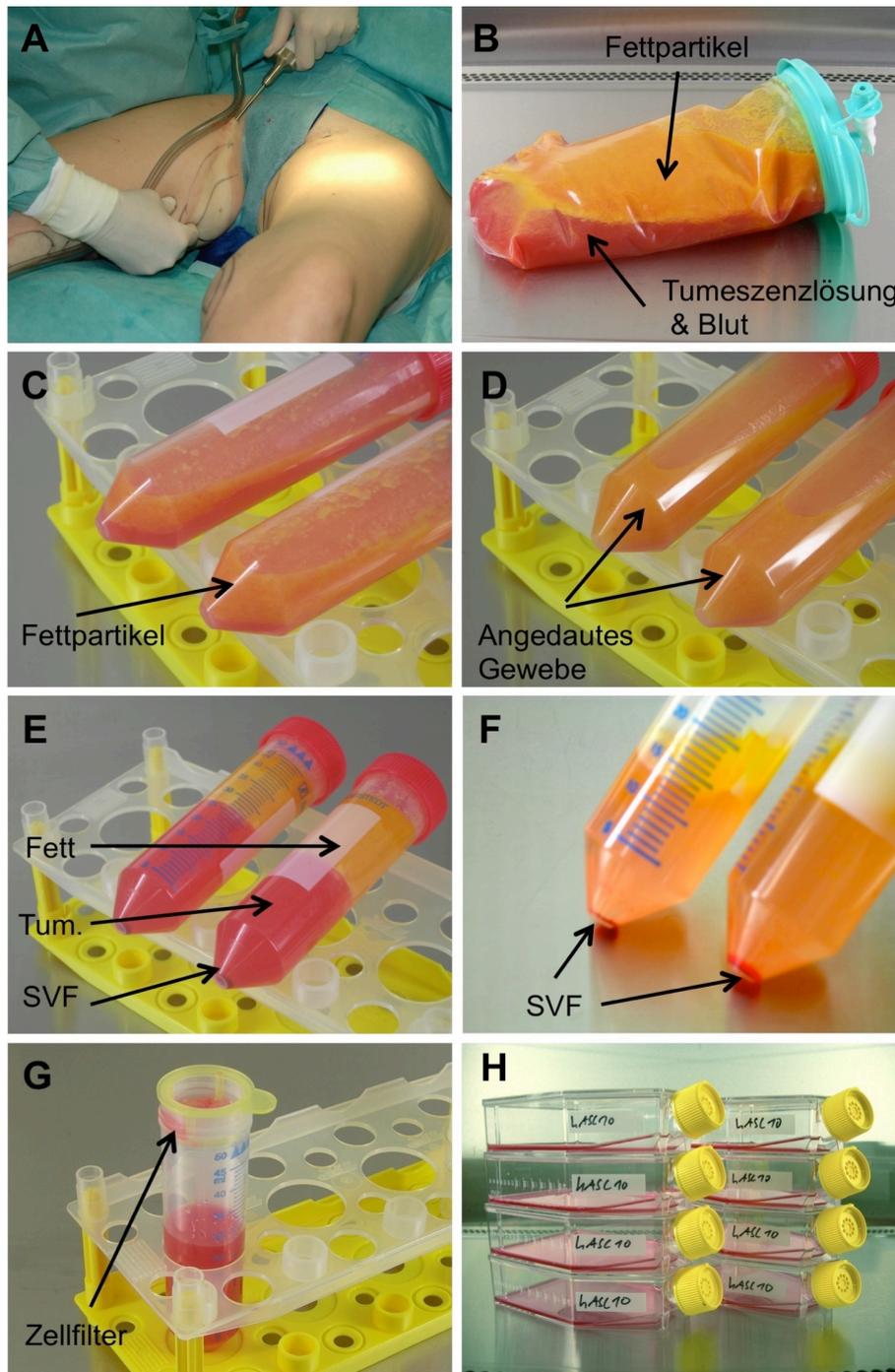


Abbildung 3.1: Schritte der Stammzellisolation: (A) Liposuktion, (B) Liposuktionsaspirat, (C) Fettpartikel und Tumescenzlösung im Tube, (D) Emulsion nach Einwirkung der Kollagenase, (E) drei Phasen nach Zentrifugation, (F) Stromal Vascular Fraction, (G) Zellfilter, (H) Aussaat in Kulturflaschen.

mehrmals gereinigt, bis im Reinigungswasser keine rötlichen OilRed-Rückstände mehr zu beobachten waren.

Vor der Quantifizierung wurden mikrofotografischen Aufnahmen mit Hilfe des Durchlichtmikroskops (Eclipse TE 2000-S; Nikon, Tokyo, Japan) mit eingebauter digitaler Kamera (Optical Sight mit Elements BR3.0 Software; Nikon, Tokyo, Japan) angefertigt, um die Fettvakuolen beurteilen zu können. Zur Quantifizierung der Lipideinlagerung wurden die Zellrasen an der Luft getrocknet und der OilRed-Farbstoff mit 90%-Isopropanol durch Inkubation für 15min

bei Raumtemperatur wieder aus den Zellen herausgelöst. Zur vollständigen Lösung wurde die Wellplatte manuell leicht, kreisend geschüttelt. Die Konzentration des OilRed-Farbstoffs wurde mit dem Photometer (Mithras LB940; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) bei der Wellenlänge $\lambda = 490nm$ bestimmt.

Aufgrund der Ergebnisse in diesem Vorversuch wurde für alle weiteren Versuche das Medium

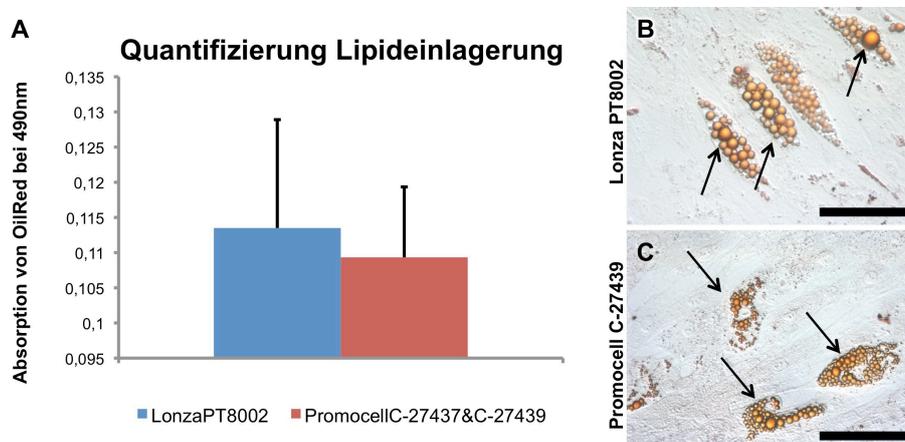


Abbildung 3.2: Testung unterschiedlicher Differenzierungsmedien: Die Quantifizierung der Lipideinlagerungen zur Bestimmung des Ausmaßes der Differenzierung erbrachte keine signifikanten Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde zur Auswertung der weiteren Experimente die optische Analyse nach OilRed-Färbung gewählt. Hierfür war das Medium von Lonza durch Bildung größerer Lipidtropfen von Vorteil. [Balken = 100µm]

(PT8002; Lonza, Walkersville, USA) zur Differenzierung der ASC verwendet.

3.3.4 Multipotenz

Zur Demonstration der Multipotenz wurden die ASC in einer 48-Loch-Wellplatte (#92096; TPP Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro Well in Kulturmedium ausgesät und inkubiert. Jede der sechs Versuchsgruppe bestand aus zwei Wells. Am Tag 1 nach dem Seeding wurde in insgesamt drei Versuchsgruppe die Differenzierung durch Austausch des Kulturmediums mit dem jeweiligen Differenzierungsmedium eingeleitet. Hierbei handelte es sich um: adipogenes Medium (PT8002; Lonza, Walkersville, USA), experimentelles osteogenes Medium (DMEM, fetales Kälberserum, Antibiotikum/Antimykotikum mit Zugabe von L-Ascorbinsäure-2-phosphat, HEPES, β -Glycerol-phosphat, CaCl, Vitamin D)³ und chondrogenes Medium (C-28012; PromoCell, Heidelberg, Deutschland). Als Kontrollen dienten die verbliebenen drei Versuchsgruppen. Diese wurden mit frischem Kulturmedium versorgt. Alle Medien wurden regelmäßig alle zwei bis vier Tage erneuert. Nach 26 Tagen wurden die Zellrasen von jeweils einer Differenzierungsgruppe und einer Kontrollgruppe gewebsspezifisch gefärbt:

1. Adipogene Färbung: Die Zellen wurden mit Formaldehyd 3,7% (#27244; Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland) für 30min fixiert. 300mg OilRed-Pulver (O02625; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) wurden in 100ml 99%-Isopropanol gelöst und anschließend 3:2 in destilliertem Wasser verdünnt. Diese Arbeitslösung wurde mit einem

³Die genaue Zusammensetzung und Herkunft der Inhaltsstoffe des osteogenen Mediums ist Inhalt der bis dato nicht veröffentlichten Dissertation von Isabell Kerler aus der experimentellen Unfallchirurgie am Klinikum rechts der Isar (AG Nüssler) und wird daher als vertraulich behandelt. Vergleiche hierzu Kerler et al. „Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe zeigen großes Potential zur osteogenen Differenzierung“ auf dem 127. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in Berlin vom 20. bis 23.4.2010.

Filterpapier (Grade 595, #10311642; Whatman, Maidstone, Großbritannien) verfeinert, um Farbkümpfen zu vermeiden. Anschließend wurde das Formalin mit einer Pipette entfernt und der Zellrasen mit destilliertem Wasser gereinigt. Vor der Färbung wurde der Zellrasen für 5min mit 60%-Isopropanol bedeckt und im nächsten Schritt durch die filtrierte OilRed-Arbeitslösung ersetzt. Bei Raumtemperatur wurde die Färbelösung für 10min auf dem Zellrasen belassen, sodass der lipophile Farbstoff in die Lipidpartikel der Zellen diffundieren konnte.

Abschließend wurde der Zellrasen mit Leitungswasser mehrmals gereinigt, bis im Reinigungswasser keine rötlichen OilRed-Rückstände mehr zu beobachten waren. Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (T865; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde für 5min durchgeführt. Durch zweimaliges Waschen mit Leitungswasser wurde das restliche Hämatoxylin entfernt. Um Austrocknung zu vermeiden, wurden die Zellrasen mit Leitungswasser befeuchtet.

2. Osteogene Färbung: Die Darstellung der osteogenen Differenzierung erfolgte durch den Nachweis von Calciumsalzen nach van Kossa. Hiefür wurden die Zellen mit PBS (H15-002; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) zweimal gewaschen und mit gekühltem (7°C) Methanol (Methanol; Apotheke München rechts der Isar, München, Deutschland) für 10min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellrasen mit Leitungswasser dreimal gewaschen und mit 10% Silbernitratlösung (#101512; Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit Leitungswasser gewaschen und mit einer Natriumcarbonat-Formaldehydlösung für 2min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese bestand aus 50g Natriumcarbonat (S2127; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) in 250ml einer 30-40% Formaldehyd-Lösung (#6398013; Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland). Anschließend wurden die Zellrasen erneut dreimal mit Leitungswasser gewaschen und die Zellen 5min mit 5% Natriumthiosulfat-Lösung (#6516; Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert. Das überschüssige Silbernitrat wurde durch Waschen mit Leitungswasser entfernt und die Zellrasen mit Leitungswasser zum Schutz vor Austrocknung befeuchtet.
3. Chondrogene Färbung: Die extrazelluläre Matrix wurde mit einer Alzianblau-Färbung dargestellt. Die Zellen wurden mit Formaldehyd 3,7% (#27244; Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland) für 10min fixiert und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Färbung erfolgte mit Alzianblau-Lösung (A526810G; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) für 30min bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Zellen mit Leitungswasser gewaschen und die Kerne mit NuclearFastRed (N3020; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) für 5min gegengefärbt. Abschließend wurde die übrige Färbelösung durch Waschen mit Leitungswasser entfernt und die Zellrasen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Leitungswasser befeuchtet.

Zur mikrofotografischen Aufnahme wurde ein Durchlichtmikroskop (Eclipse TE 2000-S; Nikon, Tokyo, Japan) mit eingebauter digitaler Kamera (Optical Sight mit Elements BR3.0 Software; Nikon, Tokyo, Japan) verwendet. Es wurde pro Versuchsgruppe eine repräsentative Aufnahme ausgewählt.

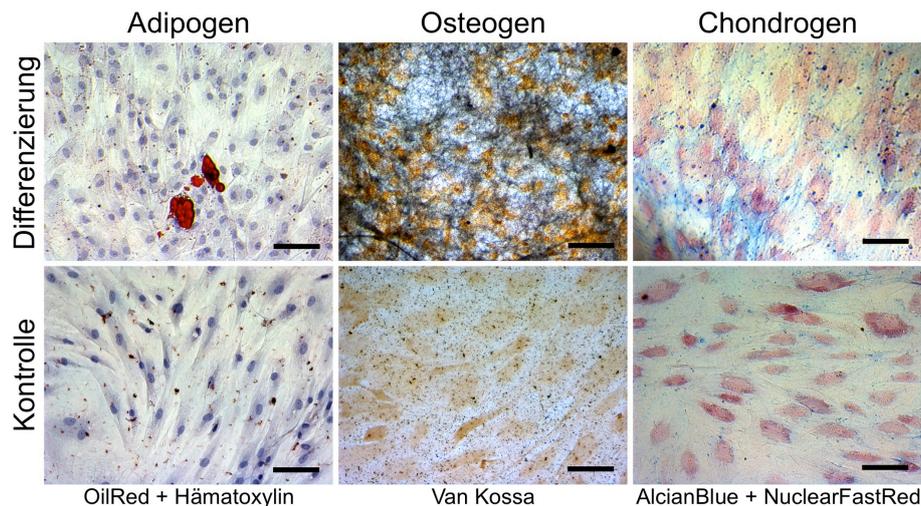


Abbildung 3.3: Differenzierung in klassische mesenchymale Gewebe: Der Nachweis der spezifischen Gewebetypen gelang mittels Darstellung von Fettvakuolen (rot), Calciumablagerung (tief scharz) und chondraler EZM (blau). In den Kontrollen war keine signifikante Färbung vorhanden. [Balken = 100µm]

3.4 Fibrin-Matrix und Seeding

Die Besiedelung der Scaffolds erfolgte stets mithilfe einer Fibrin-Matrix. Diese bestand aus Fibrinogen, welches mithilfe mit Thrombin vernetzt wurde, und Aprotinin, welches als Proteinaseinhibitor den Abbau des Fibrin verzögerte.[104, 103] Die Zusammensetzung der Komponenten wurde aus der Studie von Torio-Padron et al. übernommen.[165]

1000mg Fibrinogen (F8630; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurden in 10ml Aprotinin-Lösung mithilfe eines Magnetrührers (RH basic; IKA, Staufen, Deutschland) in einem sterilen Becherglas (#2110617; Duran Group, Mainz, Deutschland) gelöst. Die Aprotinin-Lösung enthielt Aprotinin (A1153; Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Konzentration von 10.000KIU pro ml PBS (H15-002; PAA Laboratories, Pasching, Österreich). Die aufgrund des Magnetrührers unsteril hergestellte Fibrinogen-Lösung wurde manuell mit einer 2ml Spritze (2ml Injekt solo Luer zentrisch; B. Braun, Melsungen, Deutschland) sowie einem aufsteckbaren Sterilfilter (Millex-GV syringe driven filter unit, PVDF, 0,22µm; Millipore Ireland, Carrigtwohill, Irland) filtriert. Thrombin (Tissucol Duo S Immuno; Baxter, Wien, Österreich) wurde in einer CaCl₂-Lösung (40mM CaCl₂ in H₂O; Apotheke des Klinikums MRI, München, Deutschland) in einer Konzentration von 5IU/ml gepuffert. Eine Reinigung der Thrombin-Lösung war aufgrund der Sterilität des Arzneimittelproduktes Tissucol Duo und der sterilisierten CaCl₂-Lösung nicht notwendig. Fibrinogen- und Thrombin-Lösungen wurden in 100µl-Aliquots bis zur Verwendung bei -20°C im Gefrierschrank (Standgefriergerät; Liebherr, Biberach a.d.R, Deutschland) gelagert.

Das Seeding erfolgte stets unter sterilen Bedingungen im Biosafety Cabinet (Biosafety Cabinet, BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland). Vor dem Seeding wurden die Scaffolds einzeln in einer 24-Loch-Wellplatte (#92024; TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) entsprechend der jeweiligen Versuchsanordnung verteilt. Nach dem Trypsinieren (vgl. Kapitel 3.3.1 Isolation der Stammzellen") wurden die ASC in der Thrombinlösung zu 50x10⁶ Zellen/ml suspendiert. Zu jeweils 20µl Zell-Thrombin-Suspension mit einer Zellzahl von 1x10⁶ Zellen/ml wurden je 20µl Fibrinogen-Lösung untergemischt. Danach wurden mit einer 100µl Pipette (Eppendorf 100µl Pipette; Eppendorf, Hamburg, Deutschland sowie TipOne 0-200µl Yellow Pipette Tip; Starlab, Ahrensburg, Deutschland) die Scaffolds mit jeweils 40µl Zell-Fibrinogen-Thrombin-Suspension durch Auftropfen (PCL) bzw. durch

Einsaugen (PU) nach Komprimieren mit der Pipettenspitze besiedelt. Die besiedelten Scaffolds wurden für 30min im Inkubator (CB150/E3; Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 37°C zur weiteren Verfestigung der Fibrin-Matrix inkubiert und anschließend mit 2ml Kulturmedium (Dulbecco's modified eagle medium DMEM E15-883, 10% fetales Kälberserum A15-152, 1% Antibiotikum/Antimykotikum P11-002; alle PAA Laboratories, Pasching, Österreich) pro Well versorgt.

Die Wellplatten mit den besiedelten Scaffolds wurden wie die Zellkulturen im Inkubator bei 37°C und 5% pCO₂ gelagert.

3.5 In Vitro

3.5.1 Experimentelle Herangehensweise

Die experimentelle Herangehensweise bei den in vitro Experimenten bediente sich eines strukturell gleichen Ablaufs. Dieser bestand aus Zellgewinnung, Seeding, Versuchsdurchführung und Auswertung. Zum besseren Verständnis der folgenden Experimente dient die schematische Darstellung des experimentellen Ablauf in Abbildung 3.4.

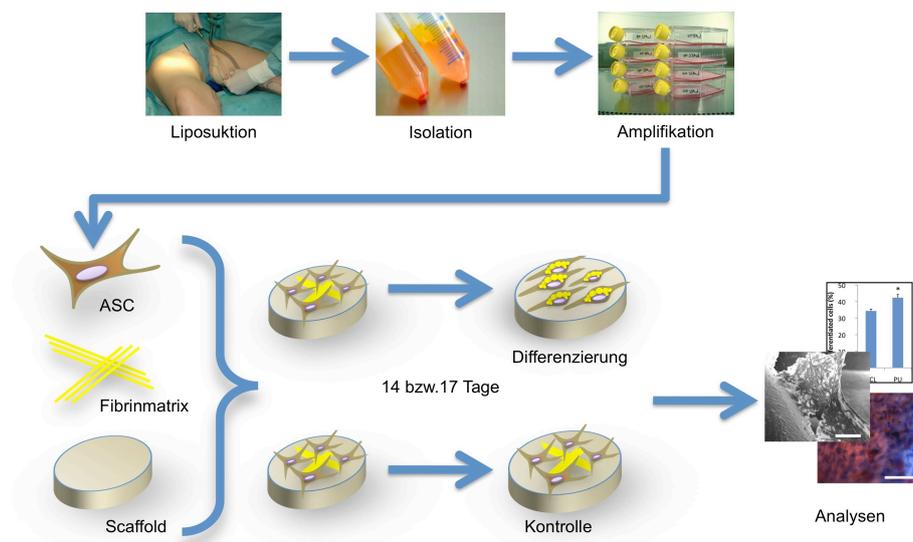


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der in vitro Experimente

3.5.2 Zelladhäsion mit SEM

Zum Nachweis der Zelladhäsion wurden ein PCL- und ein PU-Scaffold mit ASCs in einer Fibrin-Matrix besiedelt. Am 1. Tag nach dem Seeding wurde das Kulturmedium durch Differenzierungsmedium (PT8002; Lonza, Walkersville, USA) ersetzt und dieses alle zwei bis drei Tage erneuert.

Am 14. Tag nach dem Seeding wurde das Medium entfernt und die Scaffolds mit PBS (H15-002; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen und mit 3% Glutaraldehyd für 2 Tage bei 4°C fixiert. Die 3% Glutaraldehyd-Lösung wurde aus 25% Glutaraldehyd (#3778.1; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) durch Verdünnung mit PBS hergestellt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 99% Ethanol in Wasser) entwässert und bis zum Scannen bei 4°C in 99%-Ethanol aufbewahrt.

Nach der kritisch-Punkt-Trocknung wurden die Scaffolds sofort auf einem doppelseitigen Klebeband an der Probenhalterung fixiert und von einer Sputter Maschine (SCD 005; BAL-TEC, Balzers, Lichtenstein) mit einer 10-20nm dicken Goldschicht überzogen. Anschließend erfolgte die Visualisierung mit einem Rasterelektronenmikroskop (Hitachi 3500-N SEM; Hitachi, Krefeld, Deutschland) bei einer Spulenspannung von 10kV.

3.5.3 Life/Dead-Färbung mit CLSM

Zum Nachweis der Zellvitalität wurden zwei PCL- und zwei PU-Scaffolds mit ASCs in einer Fibrin-Matrix besiedelt. Am 1. Tag nach dem Seeding wurde das Kulturmedium durch Differenzierungsmedium (PT8002; Lonza, Walkersville, USA) ersetzt und dieses alle zwei bis drei Tage durch frisches Medium ausgetauscht.

Am 14. Tag nach dem Seeding wurde eine Life/Dead-Färbung durchgeführt. Lebendige Zellen wurden durch intrazellulär enzymatisch hydrolysiertes Calcein-AM im Fluoreszenzlicht grün markiert. Tote Zellen wurden hingegen durch eine Gegenfärbung mit Ethidiumbromid rot markiert, da dieses durch kompromittierte Zellmembranen diffundieren konnte.

Hierfür wurde das Medium entfernt und die Scaffolds zweimal mit PBS (H15-002; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen. Anschließend wurden die Scaffolds mit Calcein-AM 1:2000 (L-3224; Invitrogen, Carlsbad, USA) für 20min bei 37°C inkubiert. Das Calcein-AM wurde entfernt und die Scaffolds erneut mit PBS gewaschen. Die Gegenfärbung der toten Zellen erfolgte mit Ethidiumbromid 1:8000 (L-3224; Invitrogen, Carlsbad, USA) für 2min. Das toxische Ethidiumbromid wurde durch Waschen mit PBS entfernt und die Scaffolds direkt mit einem konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) im grünen und roten Farbspektrum analysiert.

3.5.4 Metabolische Aktivität mit AlamarBlue

Die metabolische Aktivität wurde mit dem kommerziell erhältlichen AlamarBlue-Assay (DAL 1025; Invitrogen, Carlsbad, USA) gemessen. Dieser ermöglichte eine Bestimmung der mitochondrialen Aktivität mittels Photometrie. Dem Assay lag die NADH abhängige Reduktion von Resazurin (blau) in Resorufin (rot) zu Grunde. Durch die ins Medium diffundierte Konzentration an Resorufin konnte die mitochondriale und somit indirekt die metabolische Aktivität im Photometer bei $\lambda = 600nm$ gemessen werden.

Das Experiment wurde mit sechs verschiedenen Versuchsgruppen durchgeführt: Jeweils eine Differenzierungs- und Kontrollgruppe für PCL-Scaffolds, PU-Scaffolds und Referenzkultur in 2D. Insgesamt 24 PCL- und 24 PU-Scaffolds sowie 24 Wells einer 24-Loch-Wellplatte (#92024; TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) wurden wie im Kapitel 3.4 "Fibrin-Matrix und Seeding" beschrieben mit ASCs besiedelt und mit 2ml Kulturmedium pro Well versorgt. Hierbei wurden 1×10^6 ACSs pro Scaffold und 50.000 ACSs pro Well verwendet.

Am 1. Tag nach dem Seeding wurde das Kulturmedium durch Differenzierungsmedium (PT8002; Lonza, Walkersville, USA) in den entsprechenden Gruppen ersetzt und das Medium von Differenzierungs- und Kontrollgruppen alle zwei bis drei Tage durch frisches Medium ausgetauscht.

Am Tag 1, 7 und 14 wurde jeweils ein AlamarBlue-Assay durchgeführt. Hierfür wurde das Medium entfernt und mit der automatischen Pipette (Eppendorf Research Pipette mit 100-5000µl epT.I.P.S standard/bulk Spitze; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durch jeweils 0,9ml Medium mit 0.1ml AlamarBlue-Lösung ersetzt. Hierbei wurde für die Differenzierungsgruppen Differenzierungsmedium mit 10% AlamarBlue verwendet und für die Kontrollgruppen Kulturmedium mit 10% AlamarBlue. Außerdem wurde jeweils für Differenzierungsmedium und Kul-

turmedium getrennt in leeren Wells Medium mit 10% AlamarBlue zur Erfassung des Leerwertes platziert. Daraufhin wurden die Zellen bei 37°C für 2h inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100µl pro Well mit einer manuellen Pipette (Eppendorf 100µl Pipette; Eppendorf, Hamburg, Deutschland sowie TipOne 0-200µl Yellow Pipette Tip; Starlab, Ahrensburg, Deutschland) in eine schwarze Wellplatte (schwarze 96-Loch-Zellkulturplatte; Corning Incorporated, New York, USA) transferiert und im Platerader (Mithras LB940; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) bei 600nm Wellenlänge die Fluoreszenz des Resorufin gemessen. Für die Auswertung wurden die Messwerte der Absorption von Tag 7 und 14 relativ zu Tag 1 für den jeweiligen Scaffold berechnet, um Aussagen über die Veränderung der metabolischen Aktivität treffen zu können.

Nach den Messungen wurde das Medium der Scaffolds durch AlamarBlue freies Kultur- bzw. Differenzierungsmedium ersetzt.

Um den Einfluss der Scaffolds auf den AlamarBlue-Assay (mögliche Reduktion von Resazurin durch das Scaffold Material) zu bestimmen, wurde in einer 24-Well-Lochplatte (#92024; TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) die Versuchsbedingungen reproduziert. Hierfür wurden drei leere PCL-Scaffolds, drei leere PU-Scaffolds und drei leere Wells in 2ml Differenzierungsmedium mit 10% Alamarblue-Lösung sowie drei leere PCL-Scaffolds, drei leere PU-Scaffolds und drei leere Wells in Kulturmedium mit 10% Alamarblue-Lösung für 2h bei 37°C im Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100µl pro Well mit der manuellen Pipette (Eppendorf 100µl Pipette; Eppendorf, Hamburg, Deutschland sowie TipOne 0-200µl Yellow Pipette Tip; Starlab, Ahrensburg, Deutschland) in eine schwarze Wellplatte (schwarze 96-Loch-Zellkulturplatte; Corning Incorporated, New York, USA) transferiert und im Platerader (Mithras LB940; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) bei 600nm Wellenlänge die Fluoreszenz des Resorufin gemessen.

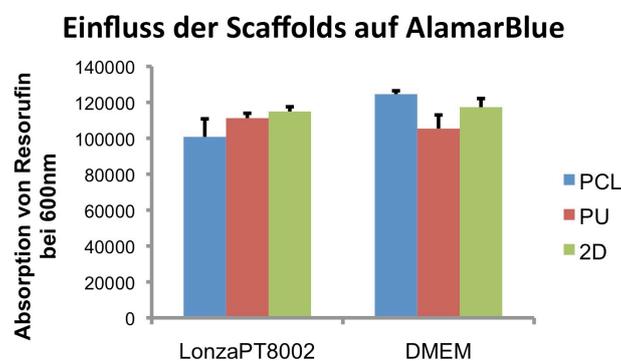


Abbildung 3.5: Einfluss von PCL- und PU-Scaffold auf den AlamarBlue-Assay: Die Messwerte der Absorption waren weder in Bezug auf das Medium noch in Bezug auf den Scaffold signifikant unterschiedlich (Anova-two-way-Test). Ein Einfluss der Scaffolds auf den Assay war daher aufgrund geringer Kausalität nicht auszuschließen, aber unwahrscheinlich.

3.5.5 Quantifizierung der adipogenen Differenzierung

Das Ausmaß der adipogenen Differenzierung wurde durch eine histologische Analyse der Lipideinschlüsse in den differenzierten ASCs bestimmt. Insgesamt sechs PCL- und sechs PU-Scaffolds sowie sechs Wells einer 24-Loch-Wellplatte (#92024; TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) wurden mit ASCs besiedelt und mit 2ml Kulturmedium pro Well versorgt. Hierbei wurden 1×10^6 ACSs pro Scaffold und 50.000 ACSs pro Well von drei verschiedenen Spendern verwendet. Die Differenzierung wurde am 1. Tag nach dem Seeding mit dem Differenzierungsmedium (PT8002; Lonza, Walkersville, USA) eingeleitet und das Medium alle

zwei bis drei Tage erneuert.

Am 17. Tag nach dem Seeding wurden die Konstrukte⁴ und Zellrasen mit Formaldehyd 3,7% (#27244; Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland) über Nacht fixiert. 300mg OilRed-Pulver (O02625; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) wurden in 100ml 99%-Isopropanol (hochreines Isopropanol; Apotheke München rechts der Isar, München, Deutschland) gelöst und anschließend 3:2 in destilliertem Wasser verdünnt. Diese Arbeitslösung wurde mit einem Filterpapier (Grade 595, #10311642; Whatman, Maidstone, Großbritannien) verfeinert. Anschließend wurde das Formalin mit einer Pipette entfernt und die Konstrukte sowie Zellrasen mit PBS (H15-002; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gereinigt und für 1h mit der OilRed-Arbeitslösung gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit Leitungswasser wurde die Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (T865; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 15min durchgeführt. Durch zweimaliges Waschen mit Leitungswasser wurde das restliche Hämatoxylin entfernt und die Proben bei 4°C im Kühlschrank (Standkühlgerät; Liebherr, Biberach a.d.R., Deutschland) über Nacht gelagert.

Die Auswertung erfolgte anhand von 12 histologischen Fotografien (Durchlichtmikroskop Eclipse TE 2000-S mit eingebauter digitaler Kamera; Nikon, Tokyo, Japan) von je zwei zufällig ausgewählten Arealen auf den Konstrukten bzw. Zellrasen. Durch manuelles Zählen der durch Hämatoxylin gefärbten Zellkerne sowie gleichzeitiger Bewertung der im Zytoplasma entsprechend positiven oder negativen Fetteinschlüsse wurde die prozentuelle Differenzierungsrate ermittelt.

3.6 In Vivo

3.6.1 Experimentelle Herangehensweise

Die experimentelle Herangehensweise bei den in vivo Experimenten folgte folgendem Ablauf: Zellgewinnung, Seeding, Differenzierung, Implantation, In Vivo Zeitraum, Explantation und Auswertung. Die schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs in Abbildung 3.6 dient dem besseren Verständnis. Die Techniken der in vitro Phase wurden bereits bei den in vitro Experimenten besprochen und werden deshalb nicht nochmals detailliert erläutert.

3.6.2 Versuchsgruppen und Herstellung der Konstrukte

Die in vivo Versuche wurden mit insgesamt acht Versuchsgruppen durchgeführt: besiedelte und unbesiedelte PCL-Scaffolds sowie besiedelte und unbesiedelte PU-Scaffolds mit Zeitpunkt der Explantation nach zwei bzw. vier Wochen in vivo. Pro Versuchsgruppe wurden drei Scaffolds verwendet.

Vor der OP wurden sechs PCL- und sechs PU-Scaffolds mit ASCs von drei verschiedenen Spendern besiedelt. Am 1. Tag nach dem Seeding wurde das Kulturmedium durch Differenzierungsmedium (PT8002; Lonza, Walkersville, USA) ersetzt und dieses alle zwei bis drei Tage durch frisches Medium ausgetauscht. Am 12. Tag nach dem Seeding wurde die Implantation durchgeführt.

Am Tag der OP wurden weitere sechs PCL- und sechs PU-Scaffolds mit einer Fibrin-Matrix ohne Zellen angefertigt. Hierfür wurden je 40µl der Fibrin-Thrombin-Lösung pro Scaffold aufgetragen und die Festigung der Fibrin-Matrix durch Lagerung der Scaffolds für 30min bei 37°C im Inkubator erreicht.⁵

⁴Als Konstrukte werden die mit Zellen besiedelten Scaffolds bezeichnet

⁵In Kapitel 3.4 "Fibrin-Matrix und Seeding" wurde der Vorgang des Seeding und die Verwendung der Fibrin-Matrix ausführlich erläutert. In den unbesiedelten Kontrollen wurden dieselben Materialien und Techniken

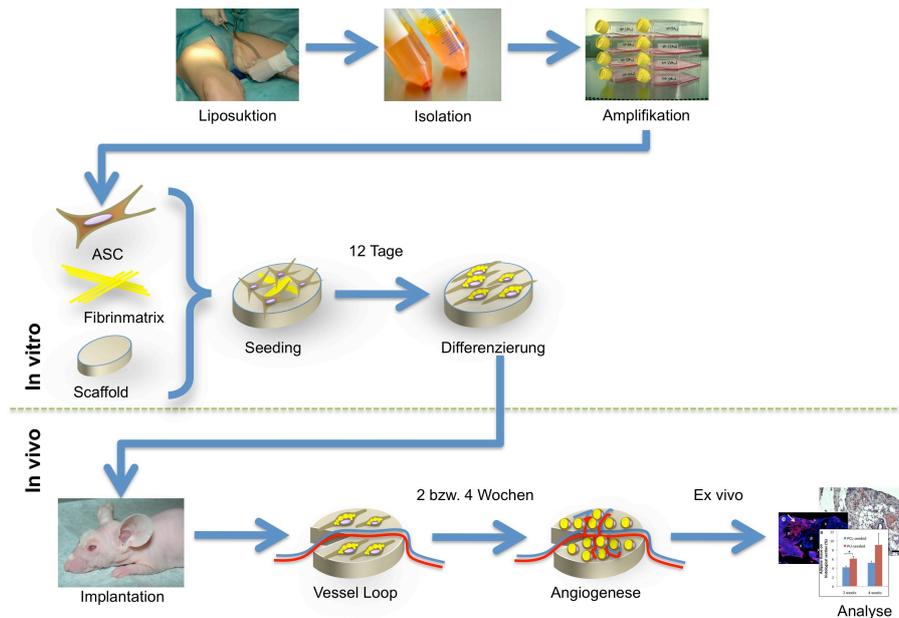


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der in vivo Experimente

Alle Scaffolds wurden unter sterilen Bedingungen an den OP-Tisch gebracht.

3.6.3 Maus-Modell

Die Verwendung des Maus-Modells und der damit erforderlichen Operations-, Zelltransplantations- und Opferungstechniken erfolgte mit Genehmigung der verantwortlichen Ethikkommission des Freistaates Bayern unter der Antragsnummer 55.2-1-54-2531-24-06.

Für die Versuche wurden Nacktmäuse (nu/nu; Charles River, Wilmington, USA) im Alter von sechs bis sieben Wochen verwendet. Die homozygote Genmutation nu/nu führte bei diesen Mäusen zu einer Aplasie des Thymus und damit zur fehlenden Ausbildung des adaptiven Immunsystems. Das Fehlen des adaptiven Immunsystems war für das Experiment von entscheidender Bedeutung, da dies die Transplantation menschlicher Zellen in den murinen Organismus ohne das Auftreten einer Host-vs-Graft-Reaktion ermöglichte.[77]

Zu Beginn der Operation wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen Applikation von 2ml MMF-Lösung sediert. Die MMF-Lösung bestand aus 5mg/ml Midazolam (Midazolam; Ratiopharm, Ulm, Deutschland), 1mg/ml Medetomidin (Domitor; Pfizer, Berlin, Deutschland) und 0,05mg/ml Fentanyl (Fentanyl; B.Braun, Melsungen, Deutschland) gelöst in 0,9% NaCl-Lösung (Isotone Natriumchloridlösung 0,9%; B.Braun, Melsungen, Deutschland). Anschließend wurden die Mäuse auf einer Wärmeplatte (Medan; Medax, Kiel, Deutschland) bei 37°C zum Schutz vor Auskühlung gelagert. Die Lagerung erfolgte auf einem sterilen Tuch (Raucodrape 33002; Lohmann und Rauscher, Neuwied, Deutschland) in Rückenlage mit außenrotierten, abduzierten und anteflektierten Beinen, welche in dieser Position mithilfe von Steri-Strips (R1546; 3M Germany, Neuss, Deutschland) fixiert wurden. Die Augen wurden durch die Applikation von Bepanthen-Augensalbe (PZN1578681; Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt.

Für die mikrochirurgische Operation wurden während der ganzen Prozedur ein Operationsmikroskop (Universal S2; Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland), eine Flachpinzette (#12-

verwendet. Der Unterschied bestand in der Ausführung ohne Zellen und dem Weglassen des Kulturmediums nach der Inkubation, da anschließend direkt die Implantation erfolgte.

368-12; KLS Martin, Tuttlingen, Deutschland), eine spitze Pinzette (HB 103; Hebu Medical, Tuttlingen, Deutschland), ein mikrochirurgischer Nadelhalter (FD015R; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und eine mikrochirurgische Schere (FD076R; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) verwendet.

Der Hautschnitt erfolgte über eine Länge von 1cm auf der medialen Seite des Oberschenkels. Anschließend wurden die Faszienhüllen mit der mikrochirurgischen Schere eröffnet. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Gewebe regelmäßig mit steriler Kochsalzlösung (Isotone Natriumchloridlösung 0,9%; B.Braun, Melsungen, Deutschland) gespült, um es vor Austrocknung zu schützen. Die Präparation des Gefäß- und Nervenbündels (Arteria femoralis, Venae femorales und Nervus femoralis) wurde stumpf mit den zwei Pinzetten durchgeführt. Nach Mobilisation des Gefäß- und Nervenbündels wurden Gefäße und Nerv voneinander gelöst und ein 6mm breiter Silikonstreifen (Blue silicon rubber stripe 6mm; A Gyrus, Tuttlingen, Deutschland) unter das Gefäßbündel geschoben. Anschließend wurde mit dem Skalpell (Disposable Standard Scalpel; Feather Safety Razor, Osaka, Japan) aus dem Konstrukt ein Keil herausgeschnitten und das Gefäßbündel durch den Keil über das Konstrukt gelegt. Dadurch wurde das Konstrukt zwischen Silikonstreifen und Gefäßbündel platziert. Auf diese Weise wurde ein Vessel-Loop vom Flow-Through Typ erzeugt.[161] Hierbei blieben die Kontinuität der Gefäße unversehrt und die Perfusion des Beines intakt. Anschließend wurden die beiden Enden des Silikonstreifens über dem Konstrukt durch zwei Einzelknopfnähte mit Prolene 6-0 Faden (EH7406H; Johnson & Johnson, New Jersey, USA) aneinander fixiert. Zum Schluss erfolgte die Hautnaht mit Prolene 6-0 in Einzelknopfnahrttechnik mit 5-8 Stichen.

Die Platzierung der PCL- und PU-Scaffolds erfolgte immer nach demselben Muster: am rechten Bein wurde immer ein PU- und am linken Bein immer ein PCL-Konstrukt implantiert. Es wurden außerdem in einer Maus entweder nur besiedelte oder nur unbesiedelte Scaffolds verwendet, sodass korrespondierende Scaffold-Paare sich immer im selben Organismus befanden. Nach der Operation wurden die Mäuse an den Ohren durch ein Lochmuster markiert und bis zum Aufwachen beobachtet. Anschließend wurden die Mäuse im Zentrum für präklinische Forschung der TU München im Klinikum München rechts der Isar untergebracht. Die Tierhaltung erfolgte in artgerechten Käfigen (Maxi-Miser-System; Thoren Caging Systems, Hazleton, USA) mit je sechs Tieren pro Käfig. Wasser (autoklaviertes Wasser) und Futter (V1246-003; Ssniff, Soest, Deutschland) erhielten die Tiere ad libidum. Die Haltung der Tiere erfolgte unter den Vorgaben der EU-Richtlinie 86/609 mit kontinuierlicher Pflege, Klimatisierung, Hell-Dunkel-Rhythmus und regelmäßiger Untersuchung von Sentinel-Tieren zur Hygienekontrolle.

Die Explantation der Konstrukte erfolgte nach zwei bzw. vier Wochen in Sedierung mit 2ml MMF-Lösung. Die MMF-Lösung bestand aus 5mg/ml Midazolam (Midazolam; Ratiopharm, Ulm, Deutschland), 1mg/ml Medetomidin (Domitor; Pfizer; Berlin, Deutschland) und 0,05mg/ml Fentanyl (Fentanyl; B.Braun, Melsungen, Deutschland) gelöst in 0,9% NaCl-Lösung (Isotone Natriumchloridlösung 0,9%; B.Braun, Melsungen, Deutschland). Der Hautschnitt erfolgte mit der mikrochirurgischen Schere über dem blau durchscheinenden Silikonband in einer Länge von 1cm. Die um das Silikonband gebildete Kapsel wurde mit der Schere eröffnet und das Silikonband freigelegt. Nach Durchtrennen des Silikonbandes wurde das Konstrukt durch Absetzen des Gefäßbündels erst unter- und dann oberhalb des Konstruktes explantiert. Die Blutstillung erfolgte provisorisch durch Kompression mit sterilisierten Gazin-Tupfern (walnussgroß, #15175; Lohmann und Rauscher, Neuwied, Deutschland).

Nach der Explantation wurden die Mäuse nach Gabe eines weiteren Bolus der MMF-Lösung tief sediert durch Genickbruch geopfert.

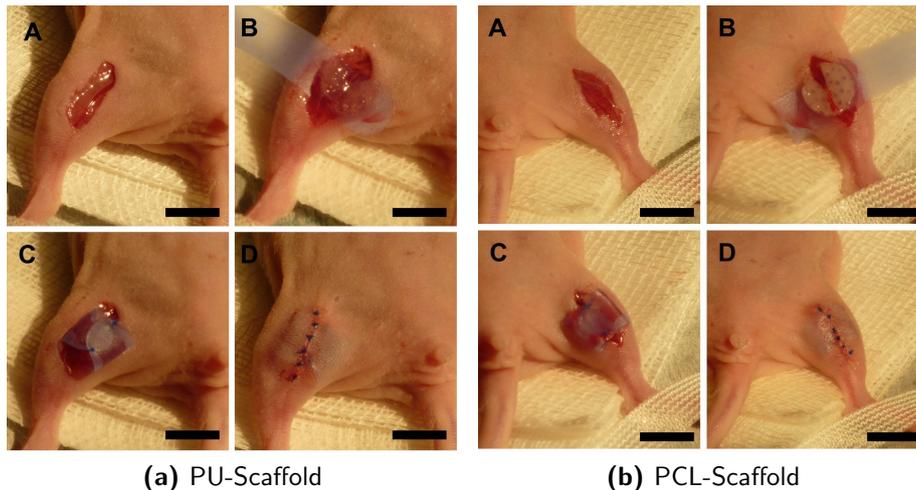


Abbildung 3.7: Situs und Implantation: (A) Hautschnitt und Situs, (B) Platzierung des PU-Scaffolds zwischen Gefäßbündel und Silikonstreifen, (C) Fixation des Silikonstreifens um das Konstrukt, (D) Hautnaht. [Balken = 5mm]

3.6.4 HE-Färbung

Die explantierten Konstrukte wurden in 3,7% Formaldehyd (#27244; Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland) fixiert und automatisch (ASP200S; Leica, Wetzlar, Deutschland) entwässert und in Paraffinwax gebettet. Mit einem Mikrotom (HM560V; Microm, Walldorf, Deutschland) wurden die Konstrukte orthogonal zum Verlauf des Gefäßbündels in 7µm dicke Scheiben geschnitten und auf einem Objektträger (Superfrost Plus; Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht.

Zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Konstrukte manuell mit Roti-Histol (#6640; Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) für zweimal 5min deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 80%, 70% und 50% Ethanol in destilliertem Wasser) sowie purem destilliertem Wasser für je 5min pro Bad rehydriert.

Die Färbung mit Hämatoxylin (T865; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte für 15min. Nach 10min Spülen in Leitungswasser erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin (X883; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 10min. Nach 5minütigem Spülen in Leitungswasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 99% und 99% Ethanol in destilliertem Wasser) entwässert, zweimal je 5min in Roti-Histol gebadet und mit Histo-Kit (#6638; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemountet.

3.6.5 Quantifizierung der Adipogenese

Zur Auswertung der Adipogenese wurden histologische Fotografien von den HE-gefärbten Schnittbildern angefertigt. Diese wurden in 20facher Vergrößerung mit einem Durchlichtmikroskop (Eclipse TE 2000-S; Nikon, Tokyo, Japan) und dessen eingebauter digitaler Kamera (Optical Sight mit Elements BR3.0 Software; Nikon, Tokyo, Japan) gemacht. Die Fotografien wurden im TIFF-Format in der Auflösung 1280 x 960 Pixel im RGB-Spektrum gespeichert.[19] Die angefertigten Fotografien enthielten aufgrund der 20fachen Vergrößerung jeweils Teilausschnitte der Konstrukte. Pro Konstrukt wurden vier zufällig im Schnittbild positionierte Fotografien von unterschiedlichen Schnittpreparaten aus unterschiedlichen Schnittebenen aufgenommen. So wurden insgesamt 4 (Bilder) x 3 (Konstrukte) x 2 (zwei bzw. vier Wochen) x 2 (PCL oder PU) x (besiedelt oder unbesiedelt) = 96 (Bilder) akquiriert. Dies entsprach zwölf

Bildern pro Versuchsgruppe.

Um die große Datenmenge zu bewältigen und Fehler durch eine subjektive Auswertung auszuschließen, wurde eine automatische Auswertung der Adipogenese angestrebt.

3.6.5.1 ACount.exe

Im ersten Schritt musste eine subjektive Auswertung durchgeführt werden. Denn es waren Referenzwerte für die Eichung der automatisierten Quantifizierung notwendig. Von den 96 akquirierten Bildern wurden sechs Exemplare mit und ohne Fettgewebe ausgewählt. Im Bildverarbeitungsprogramm (Gimp 2.6.7; www.gimp.org) wurden die leeren Fettvakuolen mit gelber Farbe markiert. Hierbei wurde ein im Foto sonst nicht vorkommender Gelbton (RGB: 255, 255, 0) verwendet. Anschließend wurde mit dem Programm ACount der Anteil gelber Pixel an der Gesamtpixelzahl des Fotos berechnet. Mit der Annahme, dass die Fettvakuolen mit dem Ausmaß an reifem Fettgewebe korrelieren, wurde der Anteil des Fettgewebes im histologischen Schnittbild mit dem Anteil der gelben Pixel an der Gesamtpixelzahl gleichgesetzt. Das Pro-

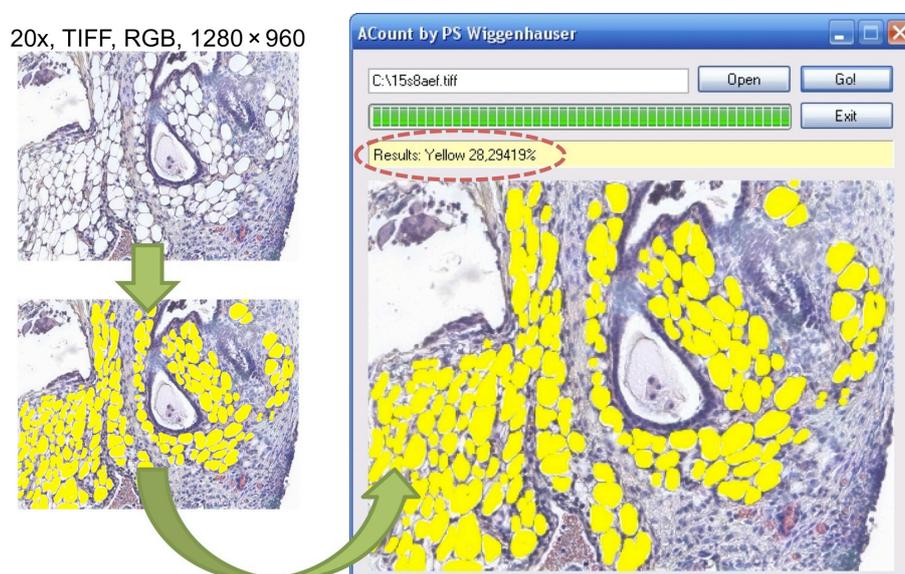


Abbildung 3.8: Manuelle Auswertung der Fettvakuolen mit dem Programm ACount: Im ersten Schritt wurde im histologischen Bild die Fettvakuolen manuell mit einem sonst nicht vorhandenen gelben Farbton markiert. Anschließend wurde der Anteil gelber Pixel an der Gesamtpixelzahl mit dem Programm ACount berechnet und so der Anteil des Fettgewebes am Schnittbild ermittelt.

ogramm ACount wurde für diese Aufgabe speziell programmiert. Das Programm wurde in C# geschrieben und mit SharpDevelop (Version 3.2.0; www.icsharpcode.net) erstellt. Es war unter Windows-Plattformen mit .net-Umgebung lauffähig.[177]

3.6.5.2 ImageJ Makro

Im zweiten Schritt wurde ein Makro programmiert um die Quantifizierung des Fettgewebes mit dem Programm ImageJ (1.43u; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) zu automatisieren. In der Routine des Makros wurde zuerst das Foto in Graustufen überführt und der Kontrast zwischen gefärbtem Präparat und leerem Hintergrund mit schwarz und weiß als einzigen Farbtönen maximal verschärft. Da die Fettvakuolen nach dem Auswaschen der Triacylglyceride bei der Herstellung der Schnittbilder dem leeren weißen Hintergrund entsprachen, wurden die Fettvakuolen zu ununterbrochenen einfarbigen weißen Flächen. Anschließend wurden die Farben des Fotos invertiert und die Fettvakuolen so zu polymorphen, schwarzen Arealen auf weißem Grund.

Mit einem Filter wurden die polymorphen, schwarzen Areale nach Rundungsgrad und Größe selektiert und so andere Elemente des ursprünglichen Hintergrundes (z.B. leeres Gefäßlumen oder weggeschmolzener Scaffold) aussortiert. Abschließend wurde der Anteil der selektierten, schwarzen Areale an der Bildfläche und somit der Anteil der Fettvakuolen, also des Fettgewebes, am histologischen Schnittbild berechnet.

```

using System;
using System.Collections.Generic;
using System.Drawing;
using System.Windows.Forms;

namespace ACount
{
    public partial class MainForm : Form
    {
        private Bitmap Sample; //Speicherablage des Bildes
        private void CountIt() //Routine der Flächenberechnung
        {
            try{
                float y = 0; //Anzahl gelbe Pixel
                this.labell.Text = "Calculation in progress!"; //Status
                this.Refresh();
                this.progressBar1.Maximum = this.Sample.Width; //Status
                this.progressBar1.Value = 0;
                //Bitmap Bild besteht aus einer Matrix von Pixeln (x,y).
                //i zählt von 0 bis zur Bildbreite in Pixeln
                for (int i = 0; i < this.Sample.Width; i++)
                {
                    //j zählt von 0 bis Bildhöhe in Pixeln
                    //pro i werden alle j durchlaufen
                    //also Matrixpunkte (i,0) (i,1) (i,2) bis (i,Höhe)
                    for (int j = 0; j < this.Sample.Height; j++)
                    {
                        //wenn Farbe des Pixels = gelb, RGB(255,255,0)
                        if (this.Sample.GetPixel(i,j) ==
                            System.Drawing.Color.FromArgb(255,255,0))
                            //dann
                            y++; //Zähler y = y+1
                    }
                    this.progressBar1.Value = i; //Status weitersetzen
                }
                //Prozent gelbe Pixel an allen Pixeln
                y = (100 * y) / (this.Sample.Width*this.Sample.Height);
                //Ergebnis ins Ausgabefeld
                this.labell.Text = "Results: Yellow " + y.ToString() + "%";
            }
            catch //Fehler abfangen
            {
                MessageBox.Show("Sorry an error occured!");
            }
        }
        ... restlicher Code zur Steuerung des Fensters nicht abgedruckt
    }
}

```

Abbildung 3.9: Code des Programms ACount

```

macro "multi_adipocount"{
print("Adipocount 2010");
print("by Wiggerhauser PS");
print("-----");

pfad = File.openDialog("Select a File");
open(pfad);
Dialog.create("How many pictures in one run?");
Dialog.addMessage("How many pictures to analyze in one run?");
Dialog.addNumber("quantity:", 12);
Dialog.show();
menge = 1;
menge = Dialog.getNumber();

//initialisation
dies = getInfo("image.filename");
jenes = "jenes";
erstes = dies;

//loop start
for(i = 0; i < menge; i++)
{
print("image selected:"+ getInfo("image.filename"));
//algorithm
run("Subtract Background...", "rolling=50 light separate");
run("8-bit");
setAutoThreshold("Percentile");
run("Convert to Mask");
run("Invert");
run("Analyze Particles...", "size=500-30000 circularity=0.10-1.00
show=Masks display clear include summarize");
selectWindow("Mask of " + dies);
run("Close");
print("Mask closed");
//next picture
run("Open Next");
jenes = getInfo("image.filename");
dies = jenes;
}
//end of loop

selectWindow(erstes);
run("Close");
selectWindow("Results");
run("Close");
print("-----");
print("Done");
selectWindow("Log");
selectWindow("Summary");
}

```

Abbildung 3.10: Code des ImageJ-Makros

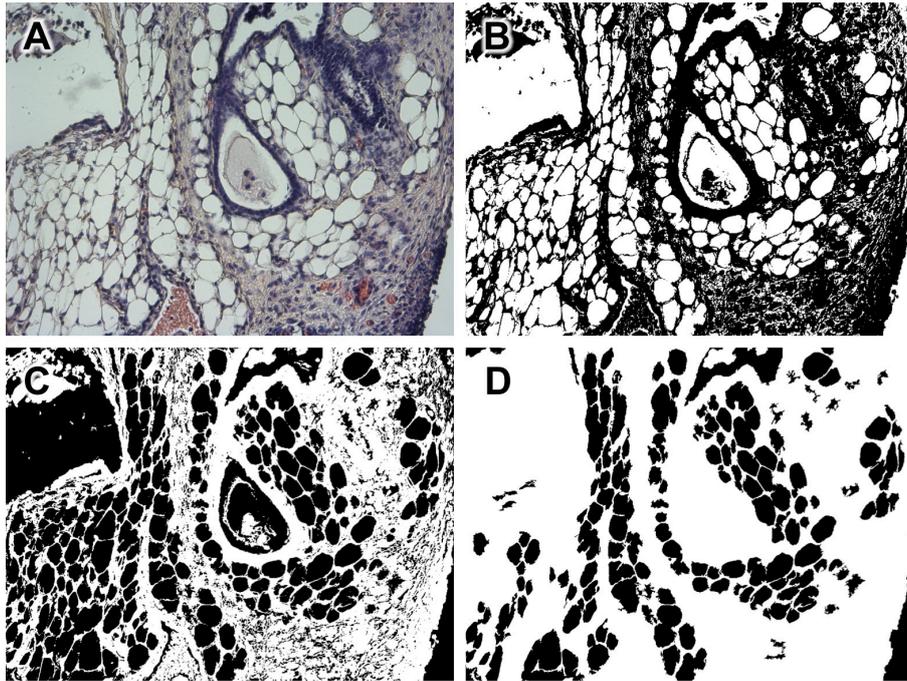


Abbildung 3.11: Auswertung der Fettvakuolen durch ImageJ (A) nativer histologischer Schnitt, (B) Kontrastverstärkung in schwarz/weiß, (C) Invertierung der Farben, (D) Selektion der Fettvakuolen nach Rundungsgrad und Größe.

3.6.5.3 Eichung des Makros

Im dritten Schritt wurden die mit ACount.exe ausgewerteten sechs histologischen Schnitte automatisch mit dem ImageJ-Makro unter verschiedenen Parametereinstellungen (siehe Tabelle 3.1) ausgewertet. Anschließend wurde die Differenz der Messung mit dem Programm ACount und der Messung mit dem ImageJ-Makro für jedes einzelne der sechs Fotos berechnet und die Parameterkombination mit der in der Summe geringsten Differenz ermittelt.

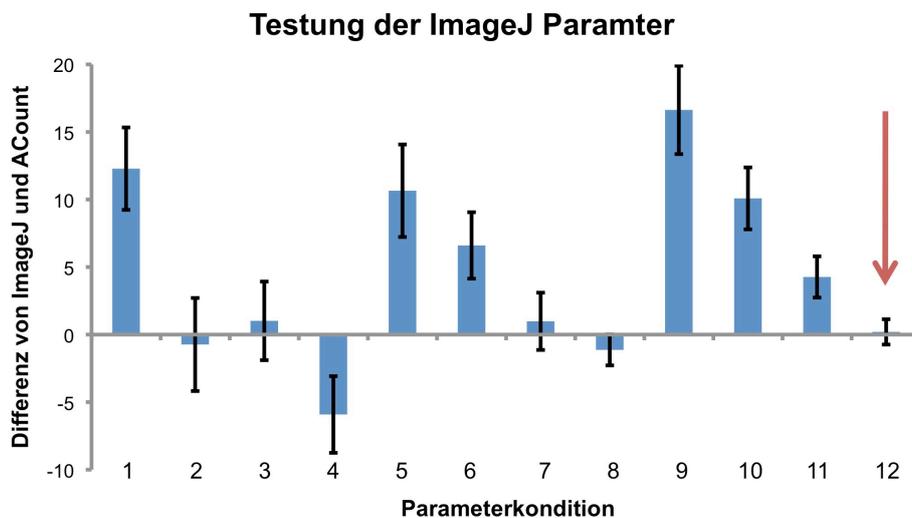


Abbildung 3.12: Differenz der Flächenberechnung von ImageJ und ACount bei verschiedenen Parametern

Kondition	Threshold	Circularity	ParticleSize
1	Default	0	unlimited
2	Default	0,1	unlimited
3	Default	0	30000
4	Default	0,1	30000
5	Triangle	0	unlimited
6	Triangle	0,1	unlimited
7	Triangle	0	30000
8	Triangle	0,1	30000
9	Percentile	0	unlimited
10	Percentile	0,1	unlimited
11	Percentile	0	30000
12	Percentile	0,1	30000

Tabelle 3.1: Parameterkombinationen des ImageJ-Makros

3.6.5.4 Finales Protokoll zur automatischen Quantifizierung der Adipogenese

Im vierten Schritt wurden mit dem geeichten ImageJ-Makro die 12 histologischen Fotografien jeder einzelnen Versuchgruppe automatisch und standardisiert ausgewertet. Hierbei wurden die originalen 96 Aufnahmen und die folgenden Parameter verwendet: Algorithmus zur Kontrastverstärkung „Percentile“, Rundungsgrad zur Auswahl der Fettvakuolen „0,1“ und maximale Größe der Fettvakuolen in Pixel „30.000“.

3.6.6 Immunhistochemie

Die explantierten Konstrukte wurden in 3,7% Formaldehyd (#27244; Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland) fixiert und automatisch (ASP200S; Leica, Wetzlar, Deutschland) entwässert und in Paraffinwax gebettet. Mit einem Mikrotom (HM560V; Microm, Walldorf, Deutschland) wurden die Konstrukte orthogonal zum Verlauf des Gefäßbündels in 7µm dicke Scheiben geschnitten und auf einem Objektträger (Superfrost Plus; Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht.

Zur immunhistochemischen Färbung wurden die Konstrukte manuell mit Roti-Histol (#6640; Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) für zweimal 5min deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 80%, 70% und 50% Ethanol in destilliertem Wasser) sowie purem destilliertem Wasser für je 5min pro Bad rehydriert.

Zur Demaskierung der Antigene wurden die Objektträger mit den anhaftenden Gewebeschnitten in eine Plastikkuvette (Plastik Küvette für Histologie; Kartell, Noviglio, Italien) gesteckt und diese mit 10mM Tris (#4855.2; Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 1mM EDTA (#8040.2; Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) in destilliertem Wasser (titriert auf pH=9) bis zum Rand aufgefüllt. Anschließend wurden die Präparate für 10min bei 100°C in einer Haushaltsmikrowelle (R-239IN-A; Sharp, Hamburg, Deutschland) erhitzt. Die Präparate wurden dann bei RT für 20min abgekühlt und mit destilliertem Wasser gewaschen.

Anschließend wurden die Objektträger in einer 14,6cm Durchmessernden Petrischale (#93150; TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) auf einem mit destilliertem Wasser befeuchteten Papierhandtuch (Scott performance; Kimberly-Clark, Koblenz, Deutschland) platziert und die einzelnen Schnitte mit einem PAP-Stift (PapPen 355; G. Kisker, Steinfurt, Deutschland) durch rechteckige Umrandung markiert.

Für die immunhistochemische Färbung wurden folgende Lösungen vorbereitet: 1x PBS durch Verdünnung von 50ml PBS ohne Calcium und Magnesium (H15-011; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in 450ml destilliertem Wasser. Eine 10% BSA-Lösung wurde durch Lösen

von 10g Albumin (T8442; Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 100ml des 1x PBS hergestellt. Die 10% BSA-Lösung wurde im Gefrierschrank (Standgefriergerät; Liebherr, Biberach a.d.R, Deutschland) bei -20°C aufbewahrt. Zur Herstellung einer 1% BSA-Lösung wurden 1ml 10% BSA-Lösung in in 9 ml 1x PBS verdünnt.

3.6.6.1 Anti-SMA

Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte mit 1x PBS gespült. Um die Zellwände für die immunhistochemische Färbung durchlässig zu machen, wurden die Schnitte bei RT für 5min in einer 0,1% Triton-X-100-Lösung (#3051.3; Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Präparate in 10% BSA-Lösung für 1h bei RT inkubiert.

Währenddessen wurde der primäre Antikörper (antiSMA mouse anti mouse #MA1-06110 Lot LFL321971; Thermo Scientific, Rockford, USA) 1:200 in 1% BSA verdünnt. Die 10% BSA-Lösung wurde mit 1x PBS abgewaschen und anschließend insgesamt 50-100µl der primären Antikörper-Lösung je nach Schnittfläche bis zu deren vollständigen Benetzung hinzugegeben. Die Schnitte mit dem primären Antikörper wurden bei 4°C im Kühlschrank (Standkühlgerät; Liebherr, Biberach a.d.R, Deutschland) über Nacht inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde der ungebundene primäre Antikörper durch Waschen mit 1x PBS entfernt. Im nächsten Schritt wurde der sekundäre Antikörper (Alexa568 goat anti mouse #A11019 Lot 737670; Invitrogen, Carlsbad, USA) 1:250 in 1% BSA verdünnt und die Schnitte mit jeweils 50-100µl sekundärer Antikörper-Lösung bedeckt. Die Inkubation erfolgte im Zellkulturinkubator (CB150/E3; Binder, Tuttlingen, Deutschland) für 1h bei 37°C. Dafür wurde die Petrischale zum Schutz der Antikörper vor Licht mit Alufolie (A+P Aluminiumfolie; Kaiser's Tengelman, Mühlheim a.d.R, Deutschland) umwickelt.

Abschließend wurden die ungebundenen sekundären Antikörper durch Spülen mit 1x PBS entfernt und die Schnitte mit 1-2 Tropfen DAPI Prolong Gold (P36931; Invitrogen, Carlsbad, USA) gegengefärbt, mit einem Deckglas (Deckgläser für Histologie Stärke 1; Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) gemountet und sofort mikroskopiert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Durchlichtmikroskop (Eclipse TE 2000-S; Nikon, Tokyo, Japan) mit eingebauter digitaler Kamera (Optical Sight mit Elements BR3.0 Software; Nikon, Tokyo, Japan) mit blauem und rotem Farbfilter im Fluoreszenzlicht (Intensilight C-HGFI; Nikon, Tokyo, Japan).

3.6.6.2 Anti-MHC1

Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte mit 1x PBS gespült. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte bei RT für 5min mit 3% Wasserstoffperoxid-Lösung bedeckt; für die Wasserstoffperoxid-Lösung wurden 1ml 30% H₂O₂ (#8070.2; Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 9ml PBS ohne Calcium und Magnesium (H15-011; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) verdünnt. Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Präparate in 10% BSA-Lösung für 1h bei RT inkubiert.

Währenddessen wurde der primäre Antikörper (antiMHC1 mouse anti human #MA1-19151 Lot LH1339261; Dianova, Hamburg, Deutschland) 1:200 in 1% BSA verdünnt. Die 10% BSA-Lösung wurde mit 1x PBS abgewaschen und anschließend insgesamt 50-100µl der primären Antikörper-Lösung je nach Schnittfläche bis zu deren vollständiger Benetzung hinzugegeben. Die Schnitte mit dem primären Antikörper wurden bei 4°C im Kühlschrank (Standkühlgerät; Liebherr, Biberach a.d.R, Deutschland) über Nacht inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde der ungebundene primäre Antikörper durch Waschen mit 1x

PBS entfernt. Im nächsten Schritt wurde der sekundäre Antikörper (goat anti mouse HRP #15-035-003 Lot 911811; Dianova, Hamburg, Deutschland) 1:250 in 1% BSA verdünnt und die Schnitte mit jeweils 50-100µl sekundärer Antikörper-Lösung bedeckt. Die Inkubation erfolgte im Zellkulturinkubator (CB150/E3; Binder, Tuttlingen, Deutschland) für 1h bei 37°C. Dabei wurde die Petrischale zum Schutz der Antikörper vor Licht mit Alufolie (A+P Aluminiumfolie; Kaiser's Tengelmann, Mülheim a.d.R, Deutschland) umwickelt.

Abschließend wurden die ungebundenen sekundären Antikörper durch Spülen mit 1x PBS entfernt, die Schnitte mit jeweils 50-100µl DAB-Lösung (D3939; Sigma Aldrich, Deutschland) als Substrat für die an den sekundären Antikörper gebundene Peroxidase bedeckt und für 5min bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser zweimal gewaschen und mit Hämatoxylin (T865; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 30s gegengefärbt. Nach Abwaschen des Hämatoxylins mit Leitungswasser wurden die Präparate mit einem Deckglas (Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) gemountet und sofort mikroskopiert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Durchlichtmikroskop (Eclipse TE 2000-S; Nikon, Tokyo, Japan) mit eingebauter digitaler Kamera (Optical Sight mit Elements BR3.0 Software; Nikon, Tokyo, Japan).

3.7 Statistische Auswertung

Für die Berechnung der Ergebnisse und zur Erstellung der Diagramme wurde Excel (Excel 2008 für Mac v12.3; Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) verwendet. Es wurde stets der Standardfehler abgebildet und angegeben.

Die statistischen Berechnungen wurden mit SigmaPlot (SigmaPlot 10; Systat Software, San Jose, USA) durchgeführt. Für alle statistischen Auswertungen wurden Anova-one-way-Tests durchgeführt und ein Signifikanzniveau von $p=0,05$ erwartet.

3.8 CAD/CAM

Für die Herstellung eines individuellen Scaffolds wurde ein Prozess mit einer Kombination von Computer-assisted Design (CAD) Computer-assisted Modelling/Manufacturing (CAM) verwendet. Hiefür wurde eine Prozesskette implementiert: diese umfasst den Scanvorgang, die Datensammlung und Verarbeitung, den Design-Prozess und die abschließende Fertigung des Scaffolds.

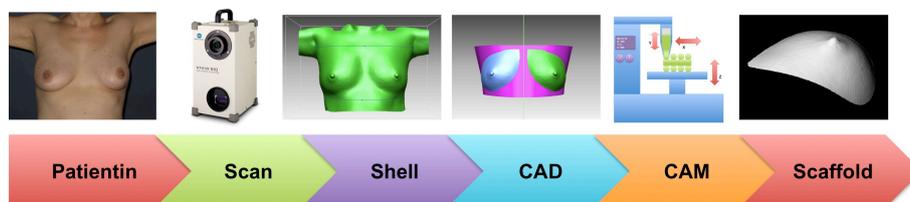


Abbildung 3.13: Die Innovation des Fertigungsprozesses lag in der Verbindung von CAD und CAM zur Herstellung eines spezifischen Scaffolds. Hierfür wurden industriübliche Desing und Fertigungsautomaten verwendet. Abbildung Vivid910 vom Hersteller (Konica-Minolta, Marunouchi, Japan).

Zur Demonstration der Machbarkeit wurden die Messdaten einer realen Person verwendet. Eine 46 Jahre alte Patientin, welche wegen eines invasiv duktales Mammakrazinoms in Behandlung

war, erklärte sich dankenswerterweise bereit, an der Studie teilzunehmen. Der Scan der Körperoberfläche der Patientin wurde von Dr. Ong Fook Rhu (School of Mechanical Engineering, Singapore Polytechnic, Singapur) durchgeführt.

3.8.1 Scanvorgang und Datenverarbeitung

Im ersten Schritt wurde die Oberfläche der Patientin dreidimensional digitalisiert. Hierfür wurde ein Laserscanner mit eingebauter Hochpräzisionskamera (Vivid 910; Konica-Minolta, Marunouchi, Japan) eingesetzt. Mit dem Scanner konnte ein Punkt auf der Oberfläche der Patientin erfasst und dessen Lokalisation im Raum bestimmt werden. Durch wiederholte Messung derartiger Oberflächenpunkte konnte eine geformte Oberfläche (Shell) berechnet werden, welche der Oberfläche der Patientin in ihrer dreidimensionalen Kontur entsprach. Für die Berechnung der Shell wurden die Daten mit den Messwerten (76800 Oberflächenpunkte bei Messung im FAST mode) in das CAD-Programm RapidForm (RapidForm 2006; Inus Technology, Seoul, Korea) importiert und ausgewertet.

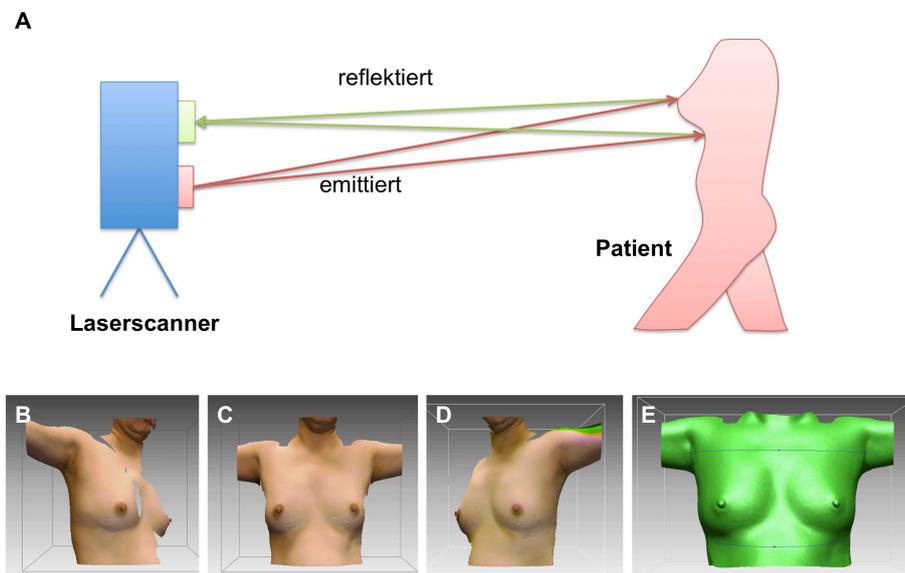


Abbildung 3.14: (A) Schema des Scanvorgangs. Hierbei wurden Laserstrahlen vom Scanner emittiert und nach Reflexion auf der Patientenoberfläche wieder registriert. Aus dem Verhältnis von Ausfall- zu Einfallwinkel ließ sich die Lokalisation des Reflexionsortes im Raum berechnen. (B,C,D) Für eine 180° Darstellung der vorderen Brustwand wurde eine Aufnahme in der Frontalebene (C) sowie jeweils eine Aufnahme in +30° bzw. - 30° Abweichung von der Frontalebene (B,D) durchgeführt. Nach dem Import der Messdaten in das CAD-Programm konnte die Oberflächen-Shell (E) als dreidimensionale Repräsentation der Patientenoberfläche berechnet werden.

3.8.2 CAD

Im zweiten Schritt wurde mit dem CAD-Programm (RapidForm 2006; Inus Technology, Seoul, Korea) der Scaffold zur Brustrekonstruktion digital modelliert.

Für die Modellierung der Brust war die Berechnung einer vereinfachten Thoraxwand (Thorax-Shell) von grundlegender Bedeutung. Daher wurde die Thorax-Shell zu aller erst berechnet. Hierfür wurden zwei transversale Linien auf die Oberflächen-Shell aufgetragen. Diese erstreckten sich von der linken zur rechten mittleren Axillarlinie und markierten die obere und untere Grenze der Thorax-Shell. Die obere Linie kreuzte dabei das Sternum auf Höhe des zweiten Interkostalraums. Die untere Linie wurde 10 mm unterhalb der unteren Umschlagsfalte der

tieferen Brust definiert. Hierbei muss beachtet werden, dass die Linien keine von links nach rechts gehende Gerade in der Transversalebene darstellen, sondern in ihrer dreidimensionalen Form der Oberflächen-Shell angepasst wurden. Dies konnte man sich wie das Ablegen eines Bindfadens auf dem Körper des Patienten vorstellen. Anschließend wurde mit dem Surfacing-Algorithmus des CAD-Programms die Thorax-Shell ausgehend von den zwei eingezeichneten Linien berechnet. Der Vorteil des Algorithmus bestand in der Berechnung einer Shell, welche leicht kurvig geschwungen war und welche nicht eine direkte (plane) Verbindung der zwei Linien darstellte. Dadurch wurde der Thorax-Shell (Abbildung 3.15 gelb) eine Form gegeben, welche der Form des muskuloskeletalen Thorax sehr nahe kam. Die Qualität der erzeugten Thorax-Shell wurde mittels Deviation-Plot überprüft. Es zeigte sich eine gute Übereinstimmung im Bereich des Sternums, der Claviculae und der Rippen. Deutlich war die Protrusion der Brust im Deviation Plot zu erkennen. Daher konnte dieser zur Definition der Grenzen der Brust eingesetzt werden. Definiert wurden die Brustgrenzen durch den Farbumschlag von blau auf grün.

Für das Ziel einer möglichst symmetrischen Brustrekonstruktion musste berücksichtigt werden, dass diese nicht durch ein symmetrisches Implantat sondern durch Symmetrie nach Implantation eines Implantats erreicht würde. Daher war das Implantat nicht als bloßes Spiegelbild der gesunden Brust zu entwerfen, sondern musste nach Implantation zur Symmetrie führen. Folglich musste die natürliche Asymmetrie des Thorax in den Designprozess mit einbezogen werden. Zu diesem Zweck wurde die Thorax-Shell gespiegelt. Hierfür wurde mit Hilfe der Mirroring-Funktion des CAD-Programms die Thorax-Shell entlang einer Symmetrieachse von der kranken zur gesunden Seite gespiegelt. Die Symmetrie Achse wurde vom CAD-Programm bestimmt und stellt die bestmögliche Symmetrie-Achse der modellierten Thorax-Shell dar. Anschließend wurde erneut der Deviation Plot durchgeführt und die Brustgrenzen bestimmt. Durch das Ausschneiden der Brust-Shell auf der gesunden Seite mit Begrenzung durch die gespiegelte Thorax-Shell der kranken Seite konnte so eine Brust-Shell modelliert werden, welche auf die Brustwand (Thorax-Shell) der kranken Seite passte und im Gesamtbild nach der Rekonstruktion zur Symmetrie des Oberkörpers bzw. beider Brüste führen sollte.

Zur Produktion eines Scaffolds musste zum Abschluss der Modellierung ein sogenanntes Solid Object berechnet werden. Bei Betrachtung der Brust-Shell (Abbildung 3.16 A) wurde deutlich, dass eine Shell nur eine Oberfläche widerspiegelte und kein Volumen besaß. Daher musste ein voluminöses Modell mit einer allseits umspannenden Oberfläche erzeugt werden. Durch Anwendung der Curves-Funktion des CAD-Programms wurden zwei Curves (Curve = dreidimensional gebogene Linie) berechnet, welche sich in ihrer Form der Grenze der Brust-Shell anschmiegen. Ausgehend von diesen zwei Curves wurden mit dem Boundary Fit Surface Algorithmus zwei Surfaces (Surface = Gitternetzmodell einer Oberfläche) generiert. Dieser Algorithmus setzte Curves und eine Shell voraus, da die zu erschaffende Surface an die Shell anmodelliert wurde (also ihre Geometrie übernahm) und die Curves die Außengrenzen der neuen Surface darstellten. Abschließend wurde mit den ausgewählten Curves und der Thorax-Shell einerseits die Rückwand des Scaffolds und mit der Brust-Shell andererseits die Vorderwand des Scaffolds berechnet. Diese zwei so erzeugten Surfaces konnten im CAD-Programm verschmolzen werden und so ein komplettes Solid Object generiert werden.

3.8.3 CAM

Im dritten Schritt erfolgte die Herstellung des Scaffolds mit Computer-assisted-Manufacturing (CAM). Bei diesem Verfahren wurden die Daten des Computermodells zur Steuerung eines 3D-Druckers verwendet. Durch das gezielte und schichtweise Anbringen von Fertigungsmaterial anhand von Koordinaten aus den Computerdaten konnte so ein Modell hergestellt werden,

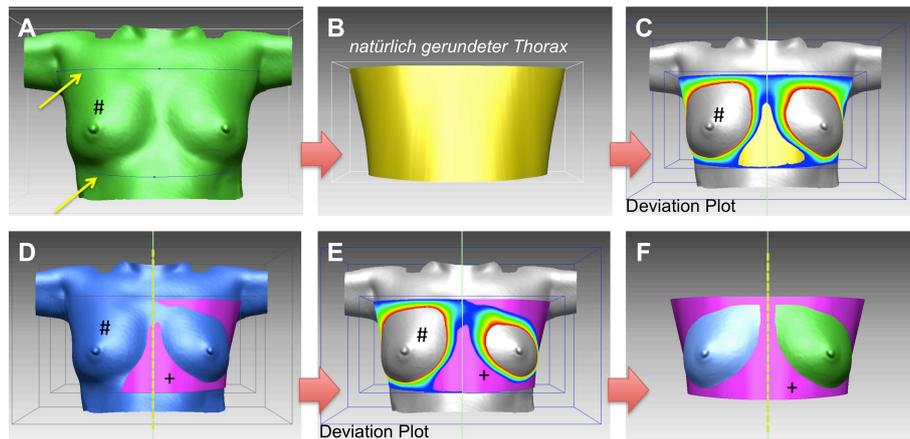


Abbildung 3.15: (A) Modellierung einer natürlichen Thorax-Shell. # erkrankte Brust. Pfeile deuten auf die zwei Linien zur Begrenzung der Thorax-Shell. Durch den Surfacing Algorithmus wurde eine Shell innerhalb der Linien berechnet und deren Qualität mittels Deviation Plot kontrolliert. Die Grenzen der Brust stellten sich im Farbumschlag von blau auf grün dar. (B) Modellierung des Scaffolds zur Rekonstruktion. Zur Schaffung von Symmetrie wurde die Thorax-Shell an der Symmetrie-Achse (grün gestrichelt) von der kranken auf die gesunde (+) Seite gespiegelt. Die Brustgrenzen verschoben sich im erneut durchgeführten Deviation Plot. Nach dem Ausschneiden der Brust-Shell (grüne Brust-Shell) aus der Oberflächen-Shell auf der gesunden Seite wurde die Brust-Shell zur erkrankten Seite gespiegelt (blaue Brust-Shell).

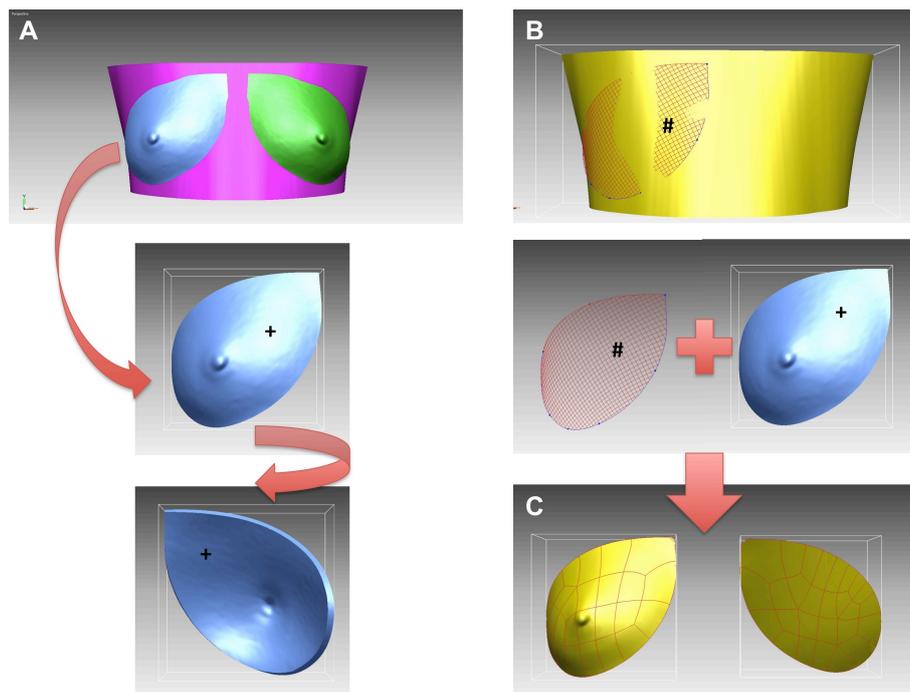


Abbildung 3.16: (A) Vorder- und Rückansicht der modellierten Brust-Shell. Beim Betrachten der Shell wird das Fehlen von Volumen deutlich. Eine Shell stellt nur eine Oberfläche dar! (B) Berechnung des Solid Objects für die Fertigung des Scaffolds. # markiert die Surface, welche mit dem Boundry Fit Surface Algorithmus erzeugt wurde. Diese wurde von den Curves (in Form der Außengrenzen der Brust) umrandet, an die Thorax-Shell anmodelliert und stellte die Rückseite des Solid Objects dar. Durch Wiederholen des Algorithmus mit der Brust-Shell (+) wurde eine weitere Surface für die Vorderseite berechnet. Nach Verschmelzen der zwei Surfaces konnte ein Solid Object (erkennbar an den polygonalen Gitternetzlinien in C) generiert werden.

ohne Gussformen oder sonstige Vorlagen verwenden zu müssen. Dieses Verfahren wird als Fused Deposition Modelling bezeichnet. Nach der Modellierung der Brust im CAD-Programm mussten die Shell-Objekte konvertiert werden, um in die Steuerungssoftware des 3D-Druckers

eingelassen werden zu können. Zu diesem Zweck wurde das Datenpaket vom anwendungsspezifischen Format des CAD-Programms in das STL-Format (Surface Tessellation Language; 3D Systems, Rock Hill, USA) transformiert.

Anschließend wurde mit dem 3D-Drucker (Stratasys Dimension SST 768, Eden Prairie, USA) die Herstellung eines Scaffolds mit Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS) durchgeführt. Dank für die Fertigung gilt Dr. Ferry Melchels (Institute of Health and Biomedical Innovation, Queensland University of Technology, Brisbane, Australien), welcher die Ausstattung für die Herstellung des Scaffolds im Labor hatte.

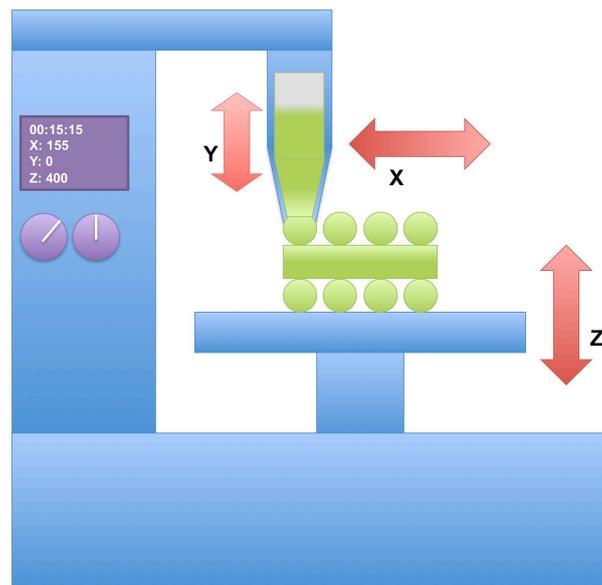


Abbildung 3.17: Grundlegende Komponenten waren die Steuerungseinheit, die Kartusche mit dem Polymer und eine Ablagefläche für das gefertigte Objekt. Beim Druckvorgang konnte der exakte Punkt für die Ablegung des Polymers anhand von Koordinaten (x,y,z) angesteuert werden. Vor der Fertigung wurde das Computermodell in einzelne jeweils gleich hohe Schichten in der x - y -Ebene zerlegt. Anschließend erfolgte die Herstellung schichtweise, wobei immer Material in der x - y -Ebene aufgetragen und in Richtung der z -Achse fortgeschritten wurde. Die Aufbringung des Materials in der x - y -Ebene erfolgte entsprechend der Koordinaten der jeweiligen Schicht, welche zuvor durch Zerlegung des Computermodells in Teilschichten berechnet worden waren.

3.8.4 Deviation Plot

Der Deviation Plot ist eine eingebaute Funktion des CAD-Programms Rapidform. Hierbei wird der Abstand zwischen zwei ausgewählten Shells berechnet. Der Abstand wird anschließend in eine Farbskala übertragen und die obere Shell anhand der Abstandswerte eingefärbt. In den verwendeten Beispielen wurde die Skala von 0 bis 10 mm codiert. Vereinfacht wird ein Abstand von 0 mm blau und einer von 10 mm rot markiert. Dazwischen liegen ansteigend im Abstand die Farben türkis, grün, gelb und orange. Vergleiche hierzu die abgebildeten Diagramme auf der linken Seite der jeweiligen Deviation Plots.

3.8.5 Contour Plot

Der Contour Plot ist eine eingebaute Funktion des CAD-Programms Rapidform. Hierbei wird der Abstand einer Shell zu einer hinter der Shell liegenden Ebene farblich codiert und durch aufgetragene Isolinien weiter visualisiert. Das Ergebnis ist vergleichbar mit dem Höhenprofil eines Berges.

Für den Plot war stets eine zweite Ebene erforderlich. Diese wurde als plane Ebene in der Frontalebene platziert. Dabei wurde diese Ebene stets hinter die Oberflächen-Shell, d.h. entfernt vom Untersucher bzw. dem Laserscanner, platziert. Durch die Beurteilung des Contour Plot

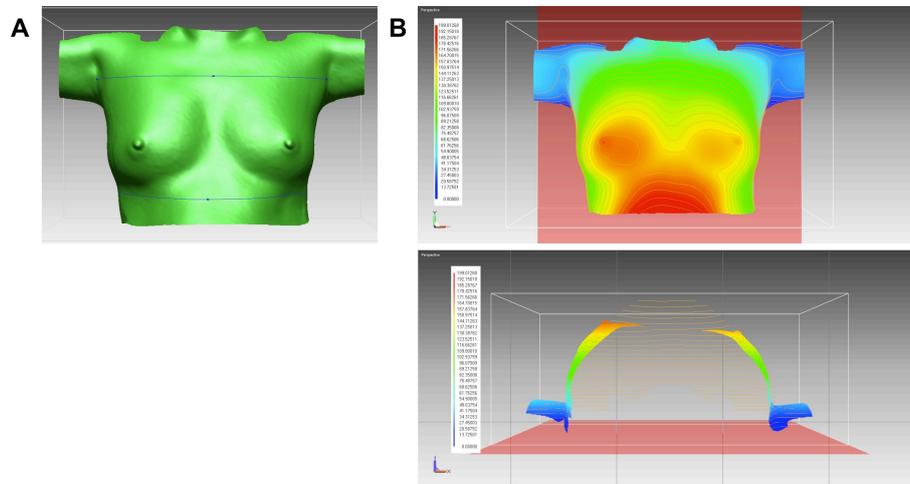


Abbildung 3.18: (A) zeigt die native Oberflächen-Shell der gescannten Patientin. (B) Contour Plot oben in frontaler und unten in transversaler Ansicht. Der Abstand zur roten Ebene hinter der Oberflächen-Shell wurde farblich und mit Isolinien markiert: blau nahe, rot entfernt von der roten Ebene. Beachte das Diagramm für die Farbkodierung links im Contour Plot.

bezüglich der Symmetrie der Farbkodierung ist es möglich, die Symmetrie der Shell optisch zu beurteilen.

4 Ergebnisse

4.1 In Vitro

4.1.1 Scaffold Charakterisierung

Nach der Präparation der Scaffold-Proben wurde deren Geometrie makroskopisch, mikroskopisch und elektronenmikroskopisch dargestellt. Der PCL-Scaffold zeigte dabei eine regelmäßige Geometrie, welche aufgrund der Produktion mittels Fused Deposition Modelling zu erwarten war: regelmäßig geschichtete Fibrillen mit triangulären Poren. Demgegenüber präsentierte sich der PU-Scaffold in einer zufälligen Geometrie aus unterschiedlich großen Höhlen und konnektierenden Poren. Nach der Visualisierung der Scaffold-Architektur wurden deren Eigen-

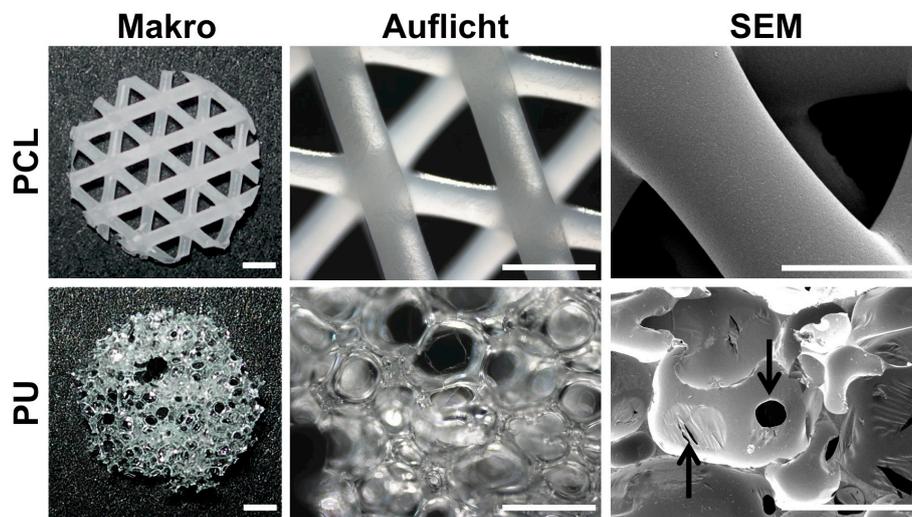


Abbildung 4.1: Visualisierung der Scaffold-Architektur: Dargestellt sind PCL-Scaffolds (obere Reihe) und PU-Scaffolds (untere Reihe) in makroskopischer, mikroskopischer (in Auflicht) und elektronenmikroskopischer Ansicht. Die Makroskopischen und mikroskopischen Aufnahmen verdeutlichen die Scaffold Architektur in Bezug auf ihre geometrische Streng. Die in striktem Muster angeordneten PCL-Fibrillen kontrastieren deutlich zum zufälligen Höhlensystem des PU-Scaffolds. Die Elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die glatten einzelnen Fibrillen der PCL-Scaffolds in typischer Schichtung sowie den Anschnitt mehrerer Höhlen im PU-Scaffold mit einer verbindenden Pore (Pfeil nach unten) bzw. einer partiell verschlossenen Pore (Pfeil nach oben). [Balken = 1mm; bei SEM PCL Balken = 0,5mm]

schaften in Bezug auf Zelladhärenz, Zellvitalität, Zelldifferenzierung und Zelldistribution charakterisiert. Vergleiche hierzu Abbildung 4.2. Im Elektronenmikroskop ließen sich auf beiden Scaffold-Architekturen haftende Zellrasen dargestellt. Die Vitalität der Zellen wurde mittels Life/Dead-Färbung bestätigt. In der Hämatoxylin/Eosin-Färbung zeigte sich eine regelmäßige Verteilung der ASCs auf den beiden Scaffold-Architekturen und bei Zugabe von adipogenen Differenzierungsfaktoren deutliche Lipideinschlüsse als Marker der adipogenen Differenzierung im Zellrasen.

4.1.2 Metabolische Aktivität

Zur differenzierteren Bestimmung der Zellvitalität auf den unterschiedlichen Scaffold-Architekturen wurden ASCs auf PCL- und PU-Scaffolds sowie in 2D Wellplatten kultiviert bzw. differenziert. Die Erfassung der metabolischen Aktivität erfolgte mittels AlamarBlue-Assay

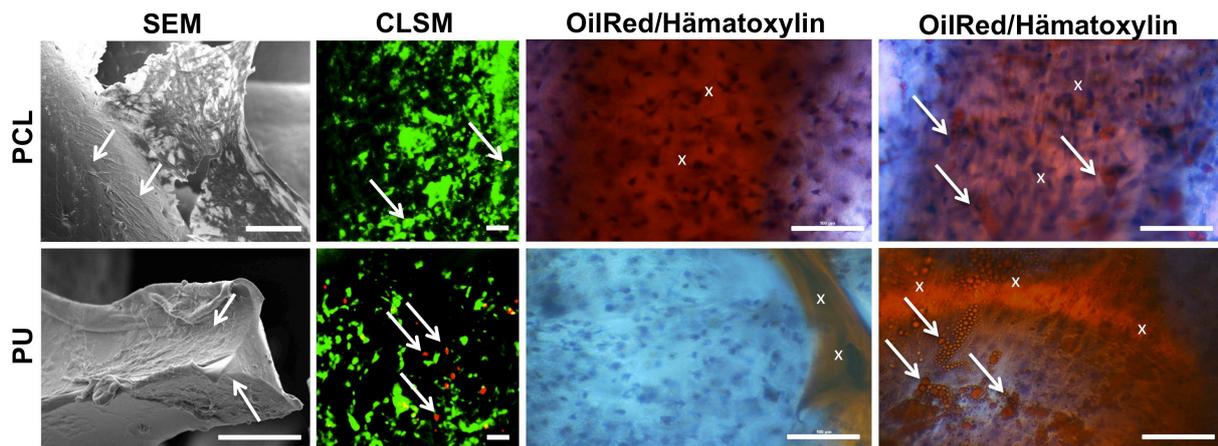


Abbildung 4.2: Grundlegende Charakterisierung der Zell-Scaffold-Interaktion: Besiedelte PCL-Scaffolds (obere Reihe) und PU-Scaffolds (untere Reihe) nach 14 Tagen in Kultur. Im Elektronenmikroskop (SEM) zeigen sich adhärenzte Zellrasen (Pfeil) auf beiden Scaffolds. Beachte die Abhebung des Zellrasens durch den Trocknungsprozess beim PCL-Scaffold. In der Life/Dead-Färbung (CLSM) werden vitale Zellen grün, tote Zellen rot (Pfeil) dargestellt. In der OilRed/Hämatoxylin-Färbung werden die Zellkerne blau und lipophile Substrate wie die Scaffolds (markiert durch X) oder Lipideinlagerungen in differenzierten Zellen (Pfeil) orange dargestellt. Spalte 3 zeigt undifferenzierte Zellen regelmäßig über den Scaffold verteilt; Spalte 4 zeigt differenzierte Zellen nach Zugabe von Differenzierungsstimuli. [Balken = 100µm]

als indirektes Maß der Zellvitalität. Unter dem Einfluss von Differenzierungsstimuli kam es zu einem Anstieg der metabolischen Aktivität in allen Gruppen (PCL, PU und 2D). Im reinen Kulturmedium zeigte sich ein Anstieg der Aktivität in der PU und 2D Gruppe nach sieben Tagen und einzig in der PU Gruppe auch noch nach 14 Tagen. Bei nicht signifikantem Unterschied zeigte sich im Trend der größte Anstieg der metabolischen Aktivität stets in der PU Gruppe, gefolgt von der 2D Gruppe und der kleinste Anstieg in der PCL-Gruppe.

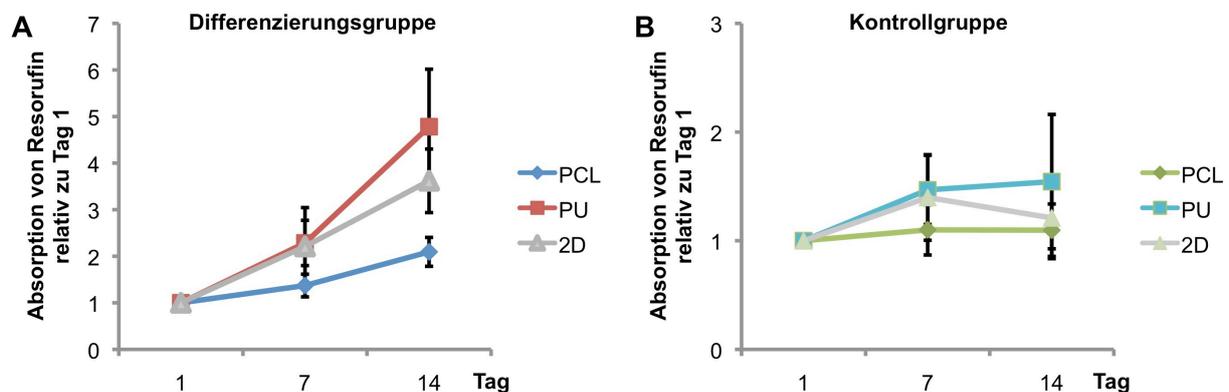


Abbildung 4.3: Metabolische Aktivität über die Zeit: Die metabolische Aktivität wurde photometrisch anhand der Konzentration von Resorufin im Medium für die Differenzierungsgruppe (A) und die Kontrollgruppe (B) am Tag 1, 7 und 14 ermittelt und die Aktivität relativ zu Tag 1 aufgetragen. [n=12]

4.1.3 Quantifizierung der Adipogenese

Zur Bestimmung des adipogenen Potentials der Scaffold-Architekturen in vitro wurden PCL- und PU-Scaffolds mit ASCs besiedelt und differenziert. 17 Tage nach dem Seeding erfolgte die OilRed/Hämatoxylin-Färbung und manuelle Bestimmung der Differenzierungsrate: PU-Scaffold $42 \pm 2\%$, PCL-Scaffold $34 \pm 1\%$ und 2D $11 \pm 2\%$.

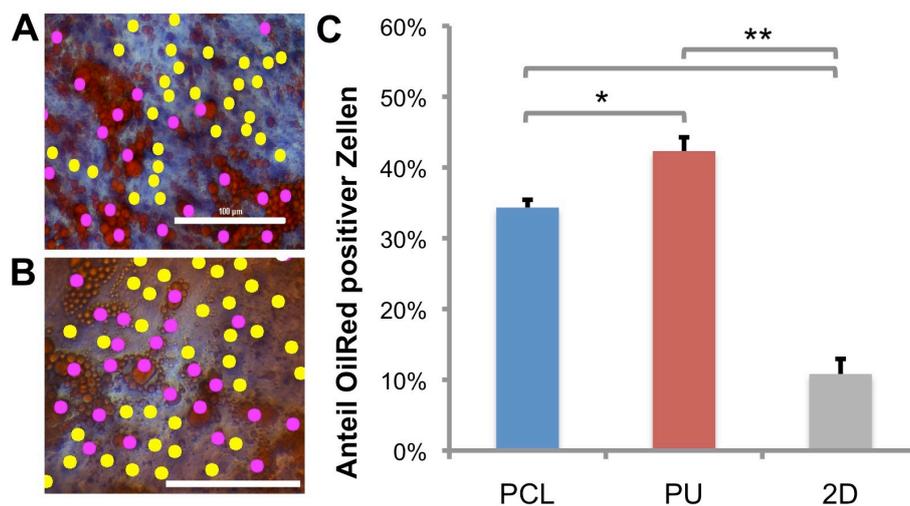


Abbildung 4.4: Quantifizierung der Adipogenese in vitro: Besiedelte PCL-Scaffolds (A) und PU-Scaffolds (B) wurden mit OilRed/Hämatoxylin gefärbt und die Differenzierung anhand des Quotienten aus differenzierten Zellen (pink) durch alle Zellen (gelb plus pink) bestimmt. Als Referenz diente eine 2D Kultur. Im Schaubild (C) wurden die Differenzierungsraten von PCL- und PU-Scaffold sowie 2D Kultur aufgetragen. Die Differenzierungsrate auf PU-Scaffolds war signifikant höher als auf PCL-Scaffolds: * $p < 0,05$. Die Differenzierungsrate auf Scaffolds signifikant höher als bei 2D Kultur: ** $p < 0,01$. [Balken = 100 μ m; n=12]

4.2 In Vivo

4.2.1 Chirurgische Beobachtung

Alle Mäuse tolerierten die OP gut und zeigten eine rasche Wundheilung. Keine Maus erlitt motorische Ausfälle am Bein oder andere vaskuläre Komplikationen während der gesamten Beobachtungszeit.

4.2.2 Hämatoxylin/Eosin in Vivo

Nach der Implantation wurden die Scaffolds für 2 bzw. 4 Wochen in vivo belassen. Es gab insgesamt 8 Versuchsgruppen durch 3 unabhängige Parameter: Scaffold-Typ, Besiedelungsstatus und Implantationsdauer. Jeder Gruppe waren 3 Scaffolds zugeordnet. In Abbildung 4.5 sind repräsentative Schnittbilder aus allen 8 Gruppen dargestellt.

4.2.3 Quantifizierung der Adipogenese

Zur Quantifizierung der Adipogenese wurden 12 histologische Schnittbilder pro Versuchsbedingung automatisch mit ImageJ ausgewertet. Der Anteil des Fettgewebes war nach 2 Wochen auf PU-Scaffolds ($6,1 \pm 0,5\%$) signifikant höher als auf PCL-Scaffolds ($4,2 \pm 0,3\%$). Nach vier Wochen war der Anteil des Fettgewebes auf PU-Scaffolds ($9,1 \pm 2,5\%$) nicht signifikant höher als auf PCL-Scaffolds ($5,2 \pm 0,4\%$).

4.2.4 MHC1 Färbung

Repräsentative Stichproben besiedelter und unbesiedelter Konstrukte wurden zu Nachweis des humanen Ursprungs der Fettgewebsbildung verwendet. Immunhistochemisch wurde der humane Typ des MHC1-Oberflächenproteins spezifisch angefärbt. Dadurch wurden die ASCs und Fettzellen auf den besiedelten Scaffolds braun markiert. Auf den unbesiedelten Scaffolds war keine Braunfärbung nachzuweisen.

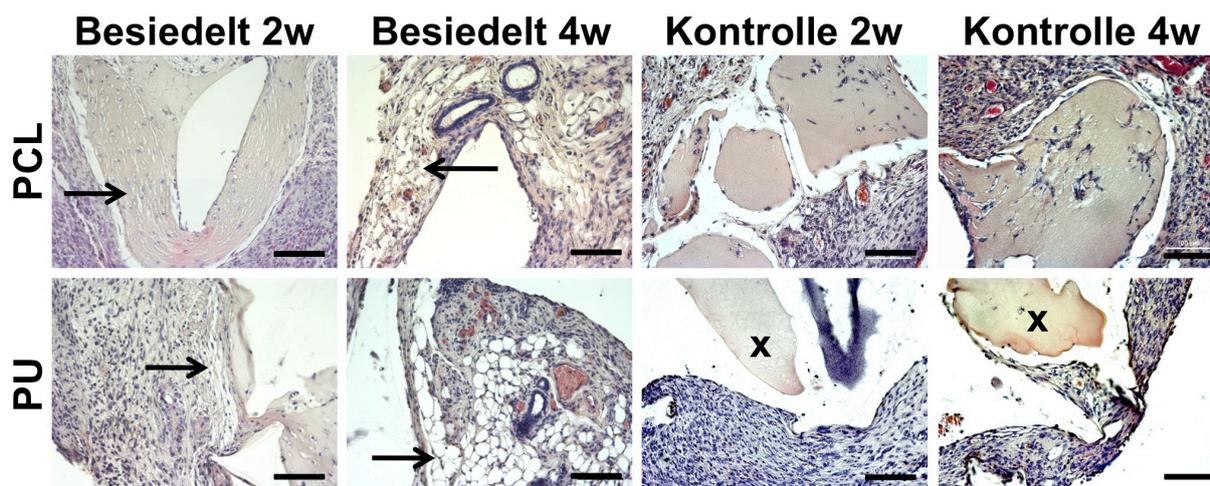


Abbildung 4.5: Repräsentative histologische Schnitte aller Versuchsgruppen in vivo: Dargestellt sind PCL-Scaffolds (obere Reihe) und PU-Scaffolds (untere Reihe) mit Besiedelung (Besiedelt) oder ohne Besiedelung (Kontrolle) nach 2 Wochen (2w) bzw. 4 Wochen (4w) in vivo. Pfeil weist auf Areale mit Fettgewebemorphologie. (X) zeigt unberührtes Fibrin, welches durch PU-Scaffold eingeschlossen wurde. [Balken = 100µm]

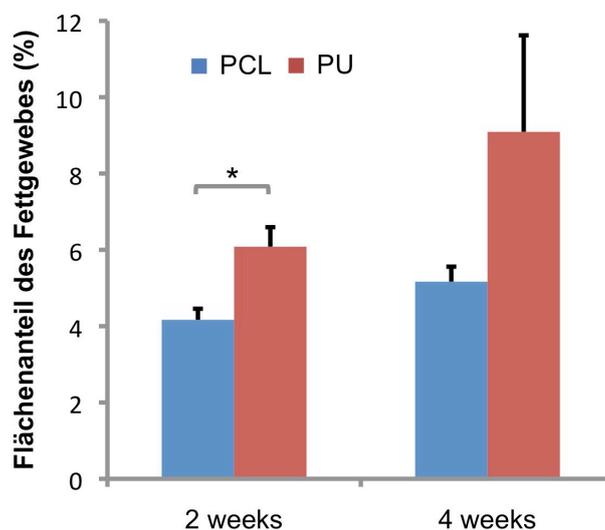


Abbildung 4.6: Quantifizierung der Adipogenese in vivo: Die Bildung von Fettgewebe war auf PU-Scaffolds nach 2 Wochen statistisch signifikant, nach 4 Wochen nicht signifikant höher als auf PCL-Scaffolds. Beachten im Vergleich hohen Standardfehler bei PU nach 4 Wochen. * $p < 0,05$ [n=12]

4.2.5 Anti-SMA Färbung

Die Immunhistochemische Färbung von SMA im murinen Gewebe wurde verwendet, um den Verlauf von Blutgefäßen im implantierten Scaffold zu visualisieren. Anhand der Lokalisation, des Verlaufs und der Anzahl der Blutgefäße konnten Aussagen über die Integration des Scaffolds in den Wirtsorganismus getroffen werden: in direkter Nachbarschaft des Vessel-Loops war die höchste Gefäßdichte nachweisbar. Ausgehend vom zentralen Vessel-Loop sprossen neue Blutgefäße in den Scaffold ein. Das Einsprießen von Gefäßen in zentrale Areale des Scaffolds konnte bei PCL-Scaffolds deutlich beobachtet werden. Bei PU-Scaffolds hingegen stoppte die Gefäßbildung an nicht-konnectierten Höhlen und war auf periphere Anteile des Scaffolds beschränkt.

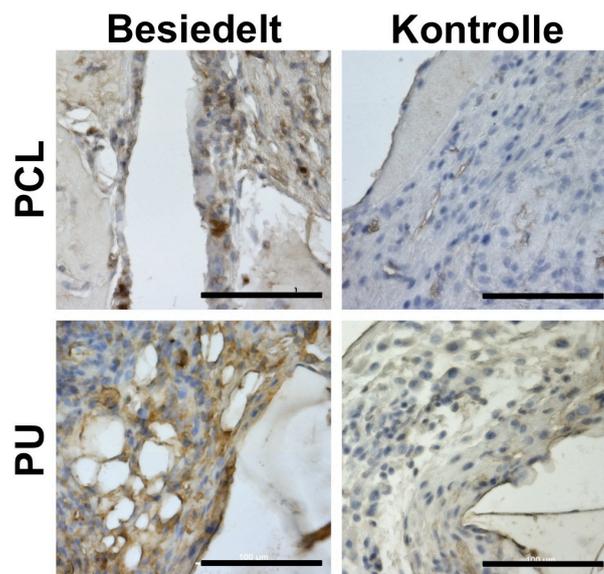


Abbildung 4.7: Nachweis des humanen Ursprungs der Adipogenese: Immunhistochemische Färbung von MHC1-Oberflächenmarkern. Durch spezifische Färbung der humanen Zellen auf den besiedelten Scaffolds ließ sich der humane Ursprung der Fettgewebsbildung nachweisen. Unbesiedelte Scaffolds (Kontrollen) zeigten keine signifikante Braunfärbung. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. [Balken = 100µm]

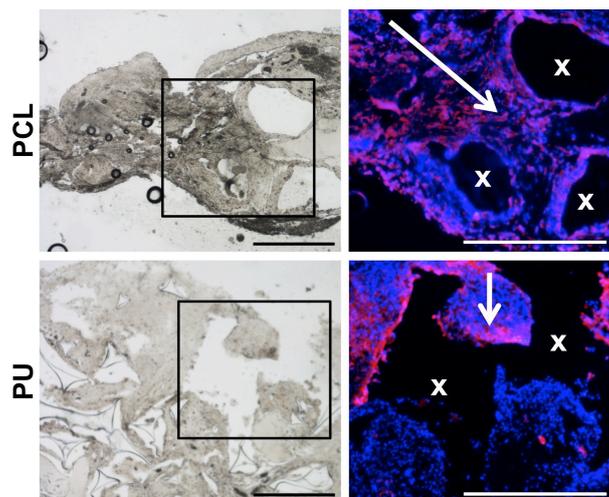


Abbildung 4.8: Integration der Scaffolds in den Wirtsorganismus: Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen von SMA (rot) im Durchlicht als Nativpräparat (erste Spalte) und als Teilausschnitt im Fluoreszenzlicht (zweite Spalte). Zellkerne wurden durch DAPI blau dargestellt. Auffallend ist im Nativpräparat die höhere Zelldichte im PCL-Scaffold. Das Einsprießen von Blutgefäßen (Pfeil) in zentrale Anteile des Scaffolds lies sich auf PCL-Scaffolds nachweisen. Auf PU-Scaffolds stoppte die Gefäßbildung an nicht-konnectierten Höhlen (Pfeil) und führte zu avaskulären Anteilen des Scaffolds (untere Bildhälfte). (X) markiert Negativ des Scaffolds. [Balken = 500µm]

4.3 CAD/CAM

Um dem klinischen Ansatz einer individuellen Brustrekonstruktion Rechnung zu tragen, wurde eine Technologieplattform zur Herstellung individueller Scaffolds etabliert. Zur Demonstration der Machbarkeit wurde die Prozesskette von der Erfassung der Biometrie einer Patientin bis hin zur Herstellung des speziell modellierten Scaffolds getestet.

4.3.1 Design und Symmetrie

Nach Berechnung der Oberflächen-Shell, dem virtuellen Abbild der Körperoberfläche der Patientin, war es möglich eine Shell in vereinfachter Form des Thorax (Abbildung 4.9 A, gelb) zu berechnen. Anhand dieser Thorax-Shell konnten die beiden Brüste in ihrer Konfiguration und Geometrie dargestellt werden. Nach der simulierten Mastektomie (Abbildung 4.10 B) wurde die gesunde Brust zur Gegenseite gespiegelt (Abbildung 4.10 C, blau) und hierbei an die Thorax-Shell der betreffenden Seite anmodelliert.

Im Deviaton Plot kam die Qualität der Thorax-Shell zur Darstellung. Durch die gewählte Methode zur Berechnung der Thorax-Shell entstand eine Kontur, die sich der natürlichen Oberfläche anlegte und erst im Bereich der Mamma deutlich abwich. Hierdurch wurde es möglich die Grenzen der Brust zu Markieren: Übergang von blau zu grün. Außerdem wurde die unterschiedliche Dimension der Brust deutlich, wenn diese an die andere Thoraxhälfte angepasst werden sollte. Durch die weniger fliehende rechte Thorax-Seite der Patientin wurde das benötigte Volumen zur symmetrischen Rekonstruktion deutlich kleiner.

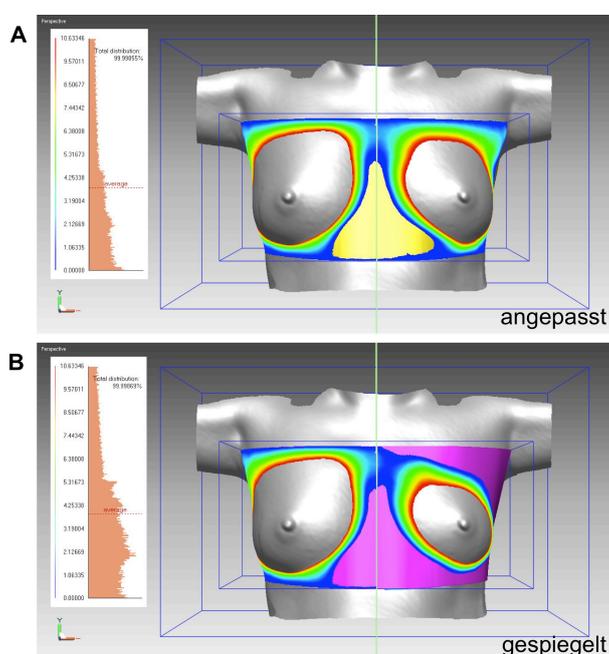


Abbildung 4.9: (A) Deviation Plot der Oberflächen-Shell (silber) und der angepassten Thorax-Shell (gelb). (B) Deviation Plot der Oberflächen-Shell (silber) und der von rechts nach links gespiegelten Thorax-Shell (lila). Distanz der Shell als Farbskalierung von 0 mm (blau) bis 10 mm (rot). Die Qualität der angepassten Thorax-Shell zeigt sich in (A) durch den geringen Abstand zur Oberflächen-Shell. Die Brust lässt sich durch das Vorspringen gegenüber der Thorax-Shell klar definieren: Übergang blau grün. Durch Spiegelung der Thorax-Shell wird die unterschiedliche Größe (Vergleiche A und B) des zur Rekonstruktion benötigten Scaffolds deutlich.

Der Contour Plot in Abbildung 4.10 wurde durchgeführt um die Qualität der Rekonstruktion zu verdeutlichen. Im Ausgangsbefund (A) war eine deutliche Asymmetrie beider Brüste in Form und Größe zu erkennen. In der simulierten Mastektomie (B) zeigte sich anhand des Contour Plots wie sich die vereinfachte Thorax-Shell von ihrer Form harmonisch in den Brustkorb einfügte. Nach der Rekonstruktion wurde ein deutlicher Gewinn an Symmetrie durch die Schaffung einer im Seitenvergleich gleich großen und gleich geformten Brust beobachtet. Dies konnte anhand des Farbverlaufes im Contour Plot eindrucksvoll gesehen werden.

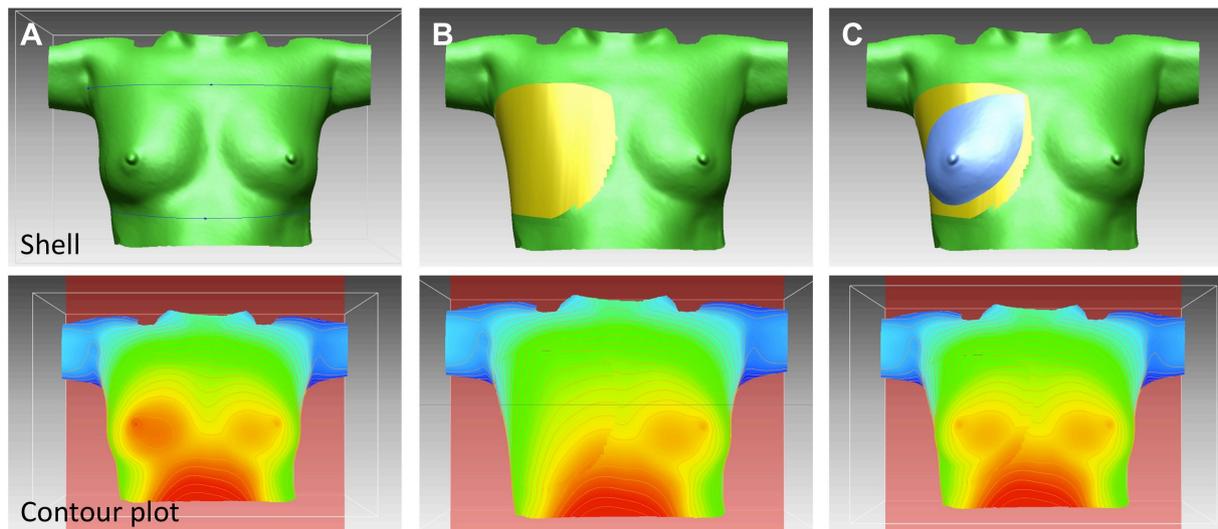


Abbildung 4.10: Die Abbildung zeigt schrittweise den Verlauf der Simulation anhand des Ausgangsbefundes (A), der simulierten Mastektomie (B) und anschließend der am Computer durchgeführten Rekonstruktion (C). In der unteren Reihe ist der Contour Plot zum korrespondierenden Shell-Objekt der oberen Reihe abgebildet. Die Oberflächen-Shell als Repräsentation der Körperoberfläche der Patientin ist grün dargestellt, die vereinfachte Thorax-Shell gelb, die Shell der modellierten Brust blau. Deutlich kommt die Asymmetrie im Ausgangsbefund (A) zur Darstellung. Vergleiche hierfür Ausdehnung und Intensität des Rottons der rechten, größeren Brust mit der Gegenseite. In der simulierten Mastektomie (B) wird die Oberflächen-Shell durch die vereinfachte Thorax-Shell harmonisch ersetzt. Als Bruch im Farbverlauf kommt ein Artefakt (bedingt durch die starke Vorwölbung des Epigastriums) zur Darstellung. Nach der Rekonstruktion (C) zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Symmetrie. Dies kann durch eine deutliche Übereinstimmung in Größe und Form der beiden Brüste nachvollzogen werden. Man sieht durch den Verlauf der Farbtöne und der Konturlinien eine harmonische Übereinstimmung der Oberkörperform und des Brusthügels beider Seiten. Die seitengleiche Lage der beiden Brustwarzen (Papillae mammae) kommt durch den Plot deutlich zur Darstellung.

4.3.2 Herstellung des Scaffolds

Auf Basis der Daten in der simulierten Rekonstruktion wurde ein Solid Object des Scaffolds berechnet. Dieses Model umfasste im Gegensatz zur Shell volle 360° und diente zur Steuerung eines Fused-Deposition-Modelling-Apparats. Auf diese Weise konnte ein Model des Scaffolds in realistischer Größe aus ABS-Polymer produziert werden. Das Volumen des Scaffolds betrug 200 ml.

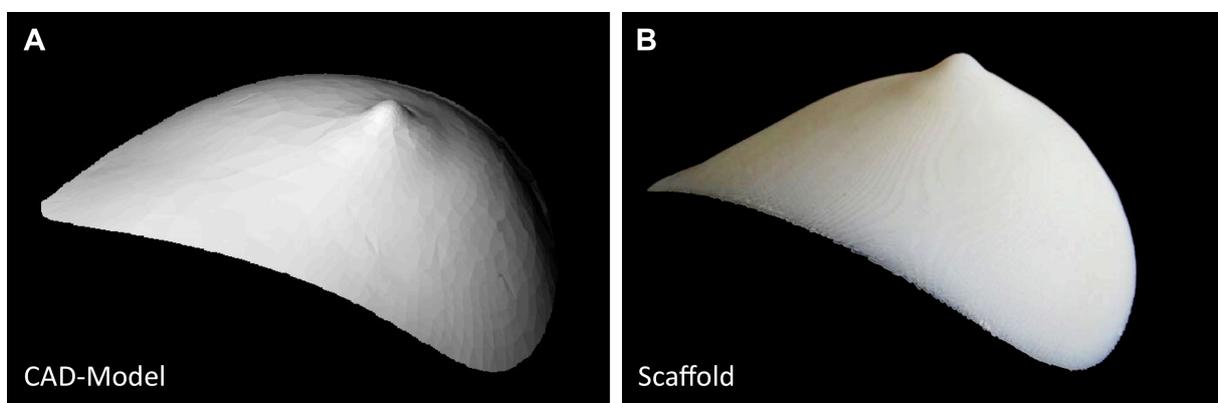


Abbildung 4.11: CAD-Modell und Scaffold auf Grundlage der simulierten Brustrekonstruktion im Fallbeispiel einer 46 Jahre alten Patientin. Deutlich sind beim Scaffold die Linien durch die schichtweise Bauweise des FDM zu erkennen.

5 Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit stand die Herstellung vaskularisierter Fettgewebstrukture für den potentiellen Einsatz zur funktionellen Brustrekonstruktion. Ziel der Arbeit war daher die Identifikation einer geeigneten Scaffold-Architektur für dieses klinische Anwendungsgebiet. Zu diesem Zweck wurde diese komplexe klinische Fragestellung auf drei experimentelle Fragestellungen reduziert, welche sich in den drei Hypothesen widerspiegeln: Adipogenesepotential der Scaffold-Architekturen, Integrationsfähigkeit der Scaffold-Architekturen in den Empfängerorganismus und Qualität der Geweberegeneration.

Die Hypothesen lauteten wie folgt:

1. Die schwammartige Architektur eines Scaffolds führt zu Akkumulation von Stammzellen in den multiplen Höhlen des Scaffolds und dadurch zu einer höheren Adipogenese in vitro als bei stacked-fibre Architektur.
2. Die strukturierte stacked-fibre Architektur erleichtert die Invasion von Blutgefäßen und proliferativen Zellen und besitzt daher im Vergleich zur weniger strukturierten schwammartigen Scaffold-Architektur eine höhere Integrationsfähigkeit in den Wirtsorganismus.
3. Die Vorteile der stacked-fibre Architektur durch die Integrationsfähigkeit und der schwammartigen Architektur durch die überlegene in vitro Adipogenese führen zu einem gleichen Ausmaß an Fettgewebsbildung.

Im Folgenden sollen diese drei Hypothesen diskutiert werden, indem die Ergebnisse dieser Arbeit interpretiert, kritisch hinterfragt und mit der bestehenden Weltliteratur verglichen werden.

5.1 1. Hypothese: Adipogenesepotential der Scaffold-Architekturen

5.1.1 Fokus auf die Scaffold-Architektur

Der Beginn des Adipose Tissue Engineering wurde durch die Publikation von Patrick et al. über die Differenzierung von Präadipozyten zu Fettzellen in vivo aus dem Jahr 1999 markiert.[123] Seither finden sich in der Literatur zahlreiche Veröffentlichungen zur Untersuchung diverser Scaffold-Materialien bezüglich ihre Eignung zum Adipose Tissue Engineering. Zum Überblick über diese Publikationen sei auf Tabelle 1.9 "Überblick über verwendete Scaffoldmaterialien im adipose TE" in der Einleitung verwiesen. Alle diese Publikationen verwendeten seit Patrick Scaffold-Strukturen, welche die natürliche extrazelluläre Matrix des Fettgewebes in ihrer Mikro-Architektur zu imitieren versuchten.[64] Ein Argument hierfür ist der positive Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Fettzellen.[119] Im Gegensatz hierzu wird in dieser Arbeit der Fokus auf die Makro-Architektur der Scaffolds gelegt. Der in einer Gruppe um Staudenmaier und Blunk verwendete PU-Scaffold imitiert durch sein Höhlensystem die makroskopische Umgebung der Fettzellen in ihrer Gliederung in Lobuli.¹

¹Bis zur Drucklegung dieser Arbeit konnte keine relevante Publikation aus dieser Arbeitsgruppe zur Fettgewebsregeneration mit Polyurethan-Schwämmen recherchiert werden. 1 Treffer auf www.pubmed.org am 8.1.2012 mit Suche nach „Staudenmaier polyurethan adipose“ ist vom Autor dieser Arbeit. Ausgehend vom Forschungsverbund (www.regimplant.de) wurden die elektronischen Dissertationen von LMU München, TU München, Univ. Bayreuth anhand der Schlagworte „tissue engineering“, „polyurethan“ und „staudenmaier“ durchsucht.

Im Kontrast hierzu wurde in dieser Arbeit erstmalig eine stacked-fibre Architektur eingesetzt, welche aus 500µm starken Fibrillen bestand. Eine Publikation von Kang et al. verwendete bereits PCL-Scaffolds.[75] Diese wiesen allerdings nano-fibrilläre Struktur auf und entsprachen nicht einer stacked-fibre Architektur sondern waren dem natürlichen Collagen nachempfunden. Des Weiteren wurden explizit zwei auf PCL basierende Systeme verwendet, um den Einfluss des Materials auf die Ergebnisse als Bias minimieren zu können. Dies ermöglichte eine leichtere Kausalattribution der gefundenen Effekte zur Makro-Architektur. An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass die Scaffolds als repräsentative Muster ihrer Makro-Architektur ausgewählt worden waren und somit Modellcharakter besitzen. Das im muskuloskeletalen Bereich eingesetzte Osteomesh ist für den klinischen Einsatz im adipose TE nicht ideal, was u.a. im Kapitel 5.3.2 "Haptische Qualität – Stiffness vs. Softness" erörtert wird. Dennoch besitzt es wie in der Problemstellung erläutert Modellcharakter für stacked-fibre Architekturen. Wichtig ist daher die Transformation der Ergebnisse auf Scaffolds mit derselben Makro-Architektur. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen daher explizit nicht als Bewertung zweier singulärer Scaffolds in der präklinischen Testung verstanden werden.

Schlussfolgernd ist diese Arbeit die erste, welche modellhaft den Einfluss zweier unterschiedlicher makroskopischer Scaffold-Architekturen auf die Fettgewebsbildung in vitro und in vivo im direkten Vergleich untersucht.

5.1.2 Verwendung einer Fibrin-Matrix

Als zweite Komponente zum Scaffold wurde in dieser Arbeit eine Fibrin-Matrix verwendet. Hierfür wurde eine Zusammensetzung der Fibrin-Matrix gewählt, wie sie bei Torio-Padron beschrieben wurde: eine Fibrinogen-Lösung wird hierbei mit Thrombin „gehärtet“ und durch die Beimengung von Aprotinin im Abbau verlangsamt.[50, 165]

Für die Verwendung von Fibrin-Matrix in dieser Arbeit sprachen vier Gründe:

1. Zum Seeding der Scaffolds war eine Fibrin-Matrix von Vorteil, da sie die Anhaftungsmöglichkeit der ASCs auf die Scaffoldoberfläche und somit deren homogene Verteilung unterstützte.[41, 182]
2. Die Fibrin-Matrix hat sich in diversen Studien zur Herstellung von Fettgewebe als geeignet erwiesen.[26, 184] Durch die Verwendung einer Fibrin-Matrix als Mikro-Architektur konnte das adipogene Potenzial der Scaffolds verstärkt werden, ohne die Parameter der Makro-Architektur der Scaffolds zu verändern.
3. Eine Fibrin-Matrix benötigt einen mechanisch belastbaren Scaffold, um langfristig volumenstabile Fettgewebstrukturen hervorzubringen.[27] Aufgrund ihrer Komprimierbarkeit war daher die Fibrin-Matrix eine geeignete zweite Komponente, um den langfristigen Einfluss der stabileren Makro-Architektur der Scaffolds vergleichen zu können.
4. Eine Fibrin-Matrix fördert die Zellmigration und erleichtert daher die Integration des Konstruktes in den Wirtorganismus.[14, 184] Unterschiede im Resportionsverhalten, können daher direkt auf die Makro-Architektur der Scaffolds zurückgeführt werden.

5.1.3 Eignung der Scaffolds zum Adipose Tissue Engineering

Zu Beginn der Versuche musste die prinzipielle Eignung der Scaffolds für das Adipose Tissue Engineering untersucht werden. Es wurden eine positive Adhäsion der ASC, homogene Zellverteilung und Möglichkeit der Zelldifferenzierung bei beiden Scaffolds gefunden. Die Beurteilung

der Zellvitalität bedurfte weitergehenderen Versuchen.

Im ersten Schritt wurde die Vitalität der ASCs mit einem Life/Dead-Assay bestimmt. Dieser führte in metabolisch aktiven Zellen zu grüner Fluoreszenz und bei kompromittierten Zellmembranen toter Zellen zu roter Fluoreszenz. Die Ergebnisse der Life/Dead-Färbung zeigten vitale Zellrasen auf beiden Scaffolds. Allerdings handelte es sich hierbei einerseits um eine Momentaufnahme am 14. Tag nach dem Seeding und andererseits konnte mit dem verwendeten CLSM der Scaffold nur partiell erfasst werden. Aus diesem Grund wurde der AlamarBlue-Assay durchgeführt um die metabolische Aktivität aller Zellen auf dem Scaffold während einer 14tägigen Beobachtungszeit *in vitro* zu betrachten.

Problematisch bei diesem Test war die Interpretation der Messwerte. Denn die metabolische Aktivität wird bei diesem Test über die mitochondriale Umsetzung von Resazurin in Resorufin ermittelt. Diese photometrisch erfasste Umsetzungsrate kann sowohl durch eine Änderung der Mitochondrienzahl als auch durch eine Änderung der gesamten Zellzahl verändert werden.[93] Daher war es nicht möglich, den Anstieg der Messkurven in der Differenzierungsgruppe ohne Vorbehalt einer Zellproliferation zuzuschreiben. Vorallem in Synopsis mit den Messungen aus der Kontrollgruppe zeigte sich eine deutliche Diskrepanz der Kurvenverläufe. Daher muss ein Teil des Anstiegs der metabolischen Aktivität durch den Differenzierungsprozess erklärt werden.

Darüber hinaus hat der AlamarBlue-Assay eine Schwäche bei höheren Zellzahlen (>50.000) da hier die Korrelation zwischen Messwert und Zellzahl abnimmt. Dies darf deshalb mitunter als Grund angenommen werden, weshalb die Ergebnisse des AlamarBlue-Assays keine statistische Signifikanz aufwiesen.[93]

Folglich wurden die Änderungen der metabolischen Aktivität in ihrer Tendenz zu erklären versucht. Hierbei zeigt sich in der Differenzierungsgruppe ein starker Anstieg der Aktivität der vermutlich auf dem Differenzierungsprozess (über PPARgamma vermittelter Anstieg der mitochondrialen Aktivität) beruht.[33] Der deutlich ausgeprägtere Anstieg der metabolischen Aktivität auf PU-Scaffolds darf als Hinweis auf ein im Vergleich zu PCL-Scaffolds erhöhtes Differenzierungspotential betrachtet werden. In der Kontrollgruppe zeigte sich ein mäßiger Anstieg der metabolischen Aktivität, welcher am ehesten auf einer Zellproliferation beruht. Allerdings konnte die Zellproliferation, wie oben begründet, nicht quantifiziert sondern nur in der Tendenz beschrieben werden. Die flachere Aktivitätskurve auf PCL-Scaffolds reflektiert die im Vergleich zum PU-Scaffold geringere Proliferationsmöglichkeit der ASCs aufgrund einer geringeren Scaffold-Oberfläche der PCL-Scaffolds.[180]

Zusammenfassend zeigten die ASCs auf PU- und PCL-Scaffolds vitales, proliferatives und differenzierendes Verhalten, was die Grundlage für alle weitergehenden Untersuchungen war.

5.1.4 *In vitro* Adipogenese

Die Quantifizierung der Adipogenese *in vitro* erfolgte durch manuelle Auswertung der Oil-Red/Hämatoxylin-Färbung. Oilred-positive Zellen wurden ins Verhältnis zu undifferenzierten nur Hämatoxylin-positiven Zellen gesetzt.

Es wurde eine signifikant höhere Differenzierungsrate auf PU-Scaffolds als auf PCL-Scaffolds gefunden. Dies kann durch den „Höhlen-Effekt“ der PU-Scaffolds erklärt werden. Aufgrund der Geometrie des PU-Scaffolds kommt es zu einer Anhäufung der ASCs am Boden der Höhlen wie Kirschen am Boden einer großen Obstschale. Dadurch kann ein Mikromilieu ausgebildet werden, welches sich positiv auf den Differenzierungsprozess ausübt. Der Einfluss des Mikromilieus auf das Stammzellverhalten wurde in der Literatur mehrfach beschrieben.[20, 151] Im Kontrast hierzu muss das Wachstum der ASCs auf den PCL-Fibrillen als eine Art Monolayer in 3D aufgefasst werden.

Eine Verzerrung der Ergebnisse durch unverhältnismäßig häufigeres Durchscheitern positiver Zellen in der Translumineszenz könnte hier eine Selektionsbias darstellen. Daher wurde versucht, dies durch eine Auswahl scharfer und einzelner Ebenen im Mikroskop zu umgehen. Der signifikante Unterschied ($p < 0,01$) der Differenzierungsrate von 2D-Kultur und Kultur in 3D auf Scaffolds sollte hingegen nicht als Ausdruck dieser möglichen Bias sondern als gewünschter Effekt durch die Kultur in 3D gewertet werden.

Als alternatives Verfahren wäre eine Quantifizierung der Adipogenese mittels Real-Time-PCR möglich gewesen. Dieses Verfahren wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. Mittels Real-Time-PCR wurde RNA quantifiziert, welche für den adipogenen Differenzierungsprozess typische Proteine (z.B. Adiponektin) kodierte.[2, 46, 75] Da die Arbeitsgruppe Machens zur Zeit dieser Arbeit die hierfür nötigen Geräte noch nicht besaß, musste auf diese Möglichkeit zur Quantifizierung der Adipogenese verzichtet werden.

Im Vergleich beider Methoden zeigt die Quantifizierung mittels multipler Real-Time-PCR eine geringere Gefahr für eine Selektionsbias, da hier die Adipogenese anhand der RNA im gesamten Konstrukt und nicht mittels zufällig selektierter mikrofotografischer Ausschnitte quantifiziert wird.

Nichtsdestotrotz darf das Verfahren mittels histologischer Auswertung als reliabel bezeichnet werden, da die in vitro Ergebnisse mit den in vivo Ergebnissen klar korrelieren und sich die Resultate in der Theorie (s.o.) erklären lassen.

5.1.5 Adipogenese in vivo

Nach der Quantifizierung der Adipogenese in vitro wurde die Bildung von Fettgewebe im Mausmodell untersucht. Hierfür wurden nu/nu Nacktmäuse verwendet, um eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern. Dadurch war für eine Machbarkeitsstudie eine einfache Ausgangslage gegeben: Verwendung humaner ASCs mit etablierten Nährmedien sowie ein erprobtes Vessel-Loop-Verfahren in der Maus.[98, 161, 175] So konnten im Voraus wichtige Störfaktoren (Differenzierungsqualität, Vaskularisierungsverfahren etc.) minimiert und der Focus auf die Hypothesen der Arbeit gerichtet werden.

5.1.5.1 Humaner Ursprung des Fettgewebes

Zu Beginn der Analyse der Adipogenese in vivo stand der Nachweis des humanen Ursprungs des Fettgewebes. Denn Ziel des Mausmodells war die Herstellung von Fettgewebe ausgehend von den ASCs der transplantierten Konstrukte.

Als eindeutiges Unterscheidungsmerkmal muriner und humaner Zellen wurde der MHC1-Oberflächenmarker, auch bekannt als HLA1, ausgewählt. Dieser Proteinkomplex ist bekannt aus der Transplantationsmedizin und dient im adaptiven Immunsystem zur Identifikation körpereigener Zellen. Aufgrund seiner Funktion wird dieser Komplex auf allen muren Zellen exprimiert. Somit ist die Identifikation einer humanen Zelle unter murinen Zellen durch den Einsatz von Antikörpern, welche spezifisch humanes und nicht murines MHC1 binden, möglich. Darüber hinaus ist aufgrund der Omnipräsenz von MHC1 auf allen muren Zellen die Identifikation unabhängig vom Zelltyp möglich. [176, 4]

Mit dieser Methode wurde auf repräsentativen Schnittpräparaten eine (durch den sekundären peroxidasegebundenen Antikörper vermittelte) Braunfärbung in der Peripherie der Siegelringstruktur der Adipozyten beobachtet. Aufgrund der Beziehung der Braunfärbung zu den morphologisch identifizierten Fettzellen und aufgrund der fehlenden Braunfärbung auf den Kontrollen, welche nicht mit humanen ASCs besiedelt worden waren, wurde die Validität der Methodik als gegeben betrachtet und der humane Ursprung des Fettgewebes angenommen.

5.1.5.2 Quantifizierung der Adipogenese in vivo

5.1.5.2.1 Methodik der Quantifizierung ex vivo

Um eine vergleichende Aussage über das Adipogenesepotential der Scaffold-Architekturen treffen zu können, wurde die Adipogenese quantifiziert. Hierfür wurde als Indikator der Anteil des Fettgewebes am histologischen Schnittbild bestimmt. Diese Herangehensweise versprach eine valide Aussage über das Adipogenesepotential der Scaffolds, da sie den Endpunkt (Fettgewebe) des Adipogeneseprozesses untersuchte.

Zur Durchführung dieser Aufgabe wurde ein ImageJ-Makro entwickelt, welches eine standardisierte Auswertung der histologischen Präparate ermöglichte. Dadurch konnten im Vergleich zur manuellen Auswertung eine höhere Anzahl an Schnittbildern aus unterschiedlichen Ebenen und von unterschiedlichen Konstrukten ausgewertet werden. So wurde eine höhere Objektivität der Ergebnisse erreicht.

In dieser Arbeit wurde explizit die ImageJ-Analyse bis ins Detail dargestellt und die Reliabilität der verwendeten Methodik durch ein weiteres manuelles Verfahren überprüft. Dadurch sollte die Reproduzierbarkeit dieser Methodik für andere Publikationen bzw. Dissertationen ermöglicht und eine Vergleichbarkeit zukünftiger Quantifizierungsergebnisse möglich gemacht werden.

Nach bestem Wissen und Gewissen handelt es sich in dieser Form um die Erstbeschreibung des ImageJ-Markos bezüglich Ablauf und Auswahl der verwendeten Algorithmen.

Die Innovationskraft dieser Methode liegt in ihrer leichten Durchführbarkeit, da für die histologischen Schnittbilder keine speziellen Färbungen nötig sind und von einem Standard-HE-Präparat ausgegangen wird. Die Identifikation des Fettgewebes erfolgt bei dieser Methode durch die freien Areale auf dem Präparat, welche durch die Herauslösung der Fettvakuolen bei der Herstellung der Schnittpräparate entstehen. Abschließend wird durch die verwendeten Algorithmen der Kontrast zwischen Gewebe und Vakuole verstärkt und die Fettvakuolen anhand ihrer Form und Größe selektiert und in der Fläche aufsummiert. Entscheidend für den prozentualen Vergleich ist die Anfertigung der Mikrofotografien unter konstanten Bedingungen: Auflösung, Pixelzahl, Vergrößerung etc.

Alles in allem stellt das ImageJ-Makro eine schnelle und aussagekräftige Methode zur Quantifizierung der Adipogenese dar.

5.1.5.2.2 Interpretation der Ergebnisse

Ausgangspunkt der Quantifizierung waren 7µm dicke Dünnschnitte der Konstrukte, welche nach zwei bzw. vier Wochen in vivo entnommen worden waren.

Das Ausmaß der Adipogenese war auf PU-Scaffolds nach zwei Wochen signifikant ($p < 0,05$), nach vier Wochen nicht signifikant ($p = 0,2$) höher als auf PCL-Scaffolds. Bemerkenswert ist hierbei die Korrelation zu den in vitro Ergebnissen. In allen Versuchen zeigte sich eine Überlegenheit der PU-Scaffolds gegenüber den PCL-Scaffolds. Dies verdeutlicht eindrucksvoll auch den Zusammenhang zwischen präimplantiver Vorbehandlung der Implantate und Fettgewebsbildung in vivo bzw. in Schlussfolgerung den Vorteil der akkumulierenden Höhlen der PU-Scaffolds bezüglich der Fettgewebsbildung.

Auffällig ist der hohe Standardfehler bei den PU-Scaffolds nach vier Wochen, welcher einerseits Ursache für die fehlende Signifikanz zu diesem Zeitpunkt ist, andererseits aber die inhomogene Gewebebildung (vgl. 5.3.1 "Homogenität des regenerierten Fettgewebes") auf PU-Scaffolds unterstreicht.

5.1.6 Stellungnahme zur 1. Hypothese

Die 1. Hypothese kann aufgrund der Ergebnisse als wahrscheinlich richtig angesehen werden.

5.2 2. Hypothese: Integrationsfähigkeit der Scaffold-Architekturen

Eine wesentliche Eigenschaft eines Scaffolds im Tissue Engineering ist seine Eigenschaft, sich im Gegensatz zu herkömmlichen Implantaten nahtlos ins Gewebe einzufügen. Aus diesem Grund wurde auf die Integrationsfähigkeit der Scaffold-Architekturen großen Wert gelegt. Die Integrationsfähigkeit subsumiert die Invasionsfähigkeit durch einwandernde Zellen sowie die Möglichkeit des Wirtsorganismus, das Implantat zu vaskularisieren und somit an das Kreislaufsystem anzuschließen.

5.2.1 Zellinvasion

In der histologischen Betrachtung fielen beim schwammartigen PU-Scaffold Areale auf, welche ohne jegliche Zellinvasion (Blutgefäße, Narbengewebe oder Fettgewebe) zur Darstellung kamen. Im Gegensatz hierzu zeigte der PCL-Scaffold eine vollständige Durchsetzung bzw. beginnende Vaskularisierung des azellulären Fibrins in allen Bereichen.

Diese histologischen Befunde widersprechen bei der ersten Betrachtung Untersuchungen zur Porosität und Porengröße von PCL- und PU-Scaffolds: diese zeigten eine inferiore Porosität des PCL-Scaffolds (58%) gegenüber dem PU-Scaffolds (93%) und eine annähernd gleiche durchschnittliche Porengröße (0,52mm vs. 0,46mm).[180] Diesen Daten zufolge hätte der PU-Scaffolds leichter in den Wirtsorganismus integriert werden müssen, da die Porosität als Maß der Durchlässigkeit eines Materials gelten kann.[153]

Darüber hinaus wurde von Heimburg et al. eine Porengröße größer als 40µm im Durchmesser für das Adipose Tissue Engineering gefordert. Diese wird nach obigen Daten von beiden Scaffolds um das 10fache übertroffen. Daher kann dieses Postulat die inhomogenen Ergebnisse nicht erklären.[65] Es bleibt also zu klären, welche weiteren Faktoren neben Porosität und Porengröße zu den beobachteten Ergebnissen geführt haben.

5.2.2 Angiogenese

Ausgehend von plastisch-chirurgischen Techniken, im Speziellen von gefäßgestielten Lappenplastiken, wurde die Verwendung von Gefäßbündeln zur Angiogenese im Tissue Engineering entdeckt. Diese Methode, als Vessel-Loop-Technik (engl. Gefäßschlingentechnik) bezeichnet, wurde durch weitere Adaptionen und systematische Verbesserungen für die Forschung optimiert und wird mittlerweile routinemäßig zur Vaskularisierung von Tissue-Engineering-Konstrukten eingesetzt.[110, 161]

Jenseits der Gefäßbündel sind zahlreiche Verfahren zur Angiogenese (vgl. Tabelle 1.10 "Vaskularisierungsstrategien im TE") bekannt und finden Verwendung in der Forschung. Da für jedes Verfahren Vor- und Nachteile bestehen, seien an dieser Stelle nochmals die Argumente für den Einsatz des Vessel-Loop in dieser Arbeit aufgeführt: Ursprung der Vaskularisierung von einem definierten Gefäß, Nachvollziehbarkeit der Vaskularisierungswege, Einsatz vorbehandelter Konstrukte, Fokus auf in vitro Tissue Engineering und keine weiteren Hilfsmittel wie EPCs, welche das Ergebnis verfälschen könnten. Dadurch war eine Reduktion möglicher Cofounder-Variablen möglich und das Experiment auf die Scaffold-Architektur als wichtigste Variable fokussiert.

Die immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen das SMA, dem auch in den

Blutgefäßwänden vorkommenden glattmuskulären Aktinfilament, erlaubte es die Lage und den Verlauf der Blutgefäße darzustellen.[176] Obwohl das histologische Verfahren keine dreidimensionale Übersicht geben konnte, ermöglichte die zum Verlauf des Gefäßbündels senkrechte Schnittführung es, die radiär vom Gefäßbündel ausgehenden neuen Blutgefäße in ihrer Ausbreitung zu erfassen und anhand ihrer Eindringtiefe in den Scaffold den Fortschritt der Angiogenese zu beurteilen.

Die so gewonnenen Ergebnisse ließen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Scaffold-Architektur und Angiogenese vermuten. Denn es zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Fortschritt der Angiogenese bei den beiden Scaffolds. Repräsentative Befunde wurden in der Abbildung 4.8 dargestellt: die strukturierte Architektur der PCL-Scaffolds ließ eine Angiogenese zwischen zwei übereinander liegenden Firbrillen in die Tiefe zu; eine schlecht interkonnektierte Höhle im PU-Scaffold wurde hingegen zur Sackgasse für den Angiogeneseprozess.

Müller et al. untersuchten den Angiogeneseprozess nach der Deckung eines Kalottendefekts mit einem regenerativen Knochenersatz. Dabei konnten sie zeigen, dass durch ein vorgefertigtes Tunnelsystem im Implantat die Vaskularisierung schneller erfolgte als ohne modellierte Tunnel. Sie postulierten deswegen, die Vaskularisierung durch vorgefertigte Bahnen für die Blutgefäße zielgerichtet steuern zu können. Dieses Prinzip wurde „vascular guidance“ genannt.[111]

Übertragen auf die Beobachtungen in dieser Arbeit gilt dieses Prinzip also nicht nur für Tunnel, welche mit dem Scaffold geformt werden, sondern auch für Tunnel in der Scaffold-Architektur selber. Denn im Vergleich zum zufälligen Höhlensystem der PU-Scaffolds bietet der PCL-Scaffold eine geordnete Architektur mit Platz zur Invasion und Vaskularisierung zwischen seinen Fibrillen. Weitergehend formuliert verschafft die Makro-Architektur des PCL-Scaffold eine Möglichkeit der Vascular-Guidance für die kleinen Blutgefäße.

Schlussfolgernd ist für die Integrationsfähigkeit eines Scaffolds in den Wirtsorganismus also

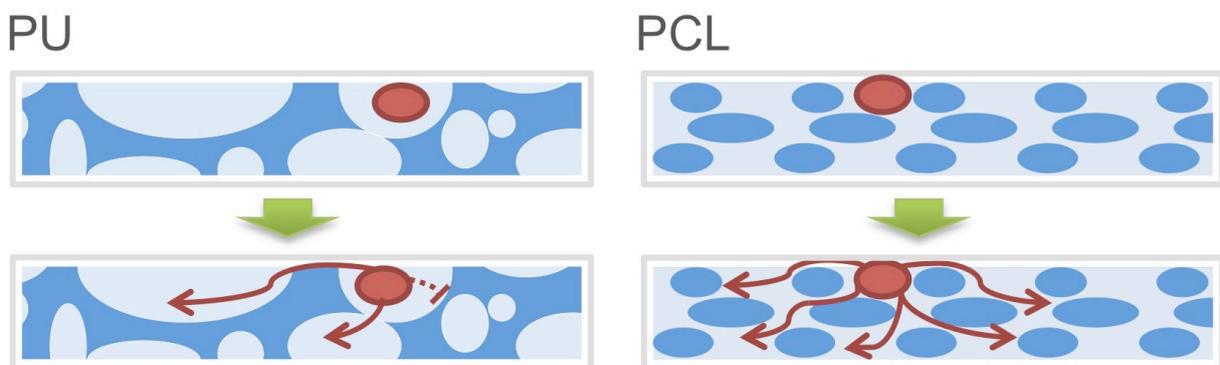


Abbildung 5.1: Bahnung der Angiogenese durch die Makro-Architektur: Schematische Darstellung der Angiogenese der PU- und PCL-Scaffolds ausgehend vom Vessel-Loop. Der Scaffold ist blau im Querschnitt dargestellt, der Vessel-Loop rot und die ausgehenden Gefäße als rote Pfeile. Die zufallsartige Anordnung des schwammartigen PU-Scaffolds führt zu einer inferioren Angiogenese aufgrund von langen Wegen und unüberwindbaren Hindernissen (gestrichelte Linie) als Folge unzureichend konnektierter Höhlen. Demgegenüber bietet die regelmäßig strukturierte Architektur des stacked-fibre PCL-Scaffolds zielgerichtete Pfade für die Angiogenese durch den gesamten Scaffold hindurch.

nicht nur eine hohe Porosität, sondern vielmehr auch eine strukturierte zielführende dreidimensionale Architektur des Scaffolds entscheidend. Denn eine zielführende Architektur des Scaffolds kann durch die Bahnung von Invasionswegen die Integration beschleunigen. Eine zufällige Architektur kann hingegen die Integration durch unkontrolliert verschlungene Verbindungen (wie sie in einem random-pattern Scaffold vorkommen können) behindern.

5.2.3 Stellungnahme zur 2. Hypothese

Die 2. Hypothese kann aufgrund der Ergebnisse als wahrscheinlich richtig angesehen werden.

5.3 3. Hypothese: Qualität der Geweberegeneration

Für eine zukünftige klinische Verwendung der untersuchten Scaffold-Architekturen ist die Beurteilung der Qualität der Geweberegeneration unumgänglich. Hierbei sind die entscheidenden Qualitätskriterien die Regeneration eines homogenen Fettgewebes, die haptische Qualität, die Volumenstabilität, die Möglichkeiten zur Formgebung und die klinischen Einsatzmöglichkeiten des Scaffolds.

5.3.1 Homogenität des regenerierten Fettgewebes

Durch die Injektion von ASCs und Fibrin als Matrix gelang es Torio-Padron et al. ein durchweg homogenes subkutanen Fettpolster zu generieren.[165] Daher sollte eine vollständige und homogene Fettgewebsregeneration als Maßstab für alle anderen Matrizes bzw. Scaffolds hergenommen werden. Das bedeutet, dass die Konstrukte in allen, auch den zentralen Anteilen, mit zusammenhängendem Fettgewebe durchsetzt sein sollten.

Im Vergleich zur Fibrinmatrix als einziges Trägermaterial ist die regenerative Fettgewebsbildung durch die PU-Scaffolds trotz der randständig vollständigen Fettgewebsbildung als kritisch zu beurteilen. Denn es zeigten sich in den Kontrollen teilweise unberührte Bereiche des Scaffolds, in denen eine unveränderte Fibrin-Matrix beobachtet wurde (vgl. Abbildung 4.5). Wie im vorhergehenden Kapitel diskutiert, ist dies möglicherweise Ausdruck der unterlegenen Integrationsfähigkeit der PU-Scaffolds aufgrund ihrer random-pattern Struktur und der daraus resultierenden Blockade der Invasionswege für den Wirtsorganismus. Eine komplette Integration des Konstruktes ist aber für eine klinische Anwendung eine bindende Voraussetzung. Ein Scaffold mit einem größerem Volumen (z.B. 5ml) wäre daher eine mögliche Methode, um den Anteil der nicht-integrierbaren, vermutlich zentral gelegenen Anteile der PU-Scaffolds und somit eine daraus möglicherweise resultierende signifikant inhomogene Fettgewebsregeneration zu identifizieren.

Eine ähnliche Situation stellt sich bei Betrachtung der PCL-Scaffolds dar. Hier ist der im Vergleich zum Fettgewebe hohe Anteil des Scaffolds am Gesamtvolumen, in Messwerten 42% (vgl. Porosität) des gesamten Konstruktes, ursächlich für eine nicht homogene Fettgewebsbildung, da das gebildete Gewebe durch die Fibrillen (vgl. Abbildung 4.5) durchschnitten wurde.[180] Des Weiteren konnte bei einer vergleichenden Studie zur Quantifizierung der Angiogenese in PCL- und PU-Scaffolds kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Anzahl der gebildeten Blutgefäße gefunden werden. Vermutlich war das kleine Volumen der Konstrukte (Durchmesser 6mm und Höhe 1mm) zu klein, um einen signifikanten Unterschied zu beweisen. Da die hier beschriebenen Beobachtungen, basierend auf der histologischen Auswertung, eine hohe Integrationsfähigkeit (vgl. 5.2 2. Hypothese: Integrationsfähigkeit der Scaffold-Architekturen) nahelegen, ist zur definitiven Klärung ebenfalls eine Studie mit größerem Volumen vorzuschlagen.

Folglich empfehlen die Erkenntnisse dieser Arbeit eine weiterführende Studie zur signifikanten Klärung der Homogenität der Fettgewebsregeneration bei den beiden Scaffold-Architekturen. Denn dadurch werden die Eigenschaften der Architekturen, die hohe präimplantative Fettgewebsbildung durch die Höhlen der PU-Scaffolds und die hohe Integrationsfähigkeit der PCL-Scaffolds neu gewichtet und dem klinischen Setting (Volumina größer 100ml) weiter angenähert.

5.3.2 Haptische Qualität – Stiffness vs. Softness

Ein weiteres Kriterium für die klinische Einsatzfähigkeit ist die haptische Qualität der Konstrukte. Die Verwendung von Silikon bei handelsüblichen Brustimplantaten spiegelt deren Eigenschaft eines annähernd natürlichen haptischen Eindrucks nach Implantation wieder.[1, 52] Die in dieser Arbeit verwendeten Scaffold-Architekturen unterschieden sich in ihrer haptischen Qualität deutlich. Der PU-Scaffold war unbehandelt mit einem Küchenschwamm, nach dem Seeding mit Fibrin mit Wachs zu vergleichen. Dem PU-Scaffold gegenüber stand ein rigider PCL-Scaffold.

Beide Scaffolds widersprechen daher dem Ziel einer natürlichen Haptik und wurden wie in der Problemstellung beschrieben als repräsentative Exemplare ihrer Architektur für diese Studie ausgewählt. Die Eigenschaften des Materials standen nicht im Fokus dieser Arbeit und wurden durch eine möglichst ähnliche Zusammensetzung der Scaffoldmaterialien in den Experimenten zu eliminieren versucht.

Wie in der Arbeit von Engler et al. beschrieben hat die Steifigkeit des Scaffold-Materials einen signifikanten Einfluss auf die Differenzierung von Stammzellen. Beispielsweise können rigide Scaffolds zur Bildung von rigiden Gewebetypen, z.B. Knochen, führen.[39, 141]

Diese in vitro und in vivo gewonnene Theorie des Tissue Engineering steht in deutlichem Kontrast zum Chamber-Modell von Morrison, welches in einer nahezu steifen Kammer zur Bildung von Fettgewebe führte. Daher stellt sich konsequenterweise die Frage bezüglich des Einflusses der Scaffold-Steifigkeit auf die Fettgewebsregeneration in größeren Volumina. Einerseits könnte durch die Steifigkeit ein anti-adipogen einwirkender Differenzierungsfaktor angenommen werden, andererseits könnte der Scaffold durch seine Steifigkeit ähnlich dem Chamber-Modell einen geschützten Raum bilden und zu einer erhöhten Menge an Fettgewebe führen.[35, 44, 68, 97] In der Konsequenz sollte durch weitere Studien das verwendete Scaffold-Material so optimiert werden, dass es die optimale Balance aus Haptik und regenerativem Potenzial repräsentiert.

5.3.3 Volumenstabilität des Scaffolds

Für die Anwendung in der Brustrekonstruktion ist eine vorhersagbare Volumenangabe des Fettgewebskonstruktes nach der Implantation notwendig. Problematischer Weise wird in der Literatur aber über eine partielle bis totale Rückresorption von transplantiertem Fettgewebe berichtet.

In einer tierexperimentellen Studie von Cho et al. wurde die Volumenbeständigkeit einer Fibrinmatrix zur Adipogenese mit und ohne formgebenden Scaffold untersucht: trotz der Bildung von homogenem Fettgewebe kam es zu einer signifikanten Volumenreduktion in der Gruppe ohne formgebenden Scaffold. Cho et al. führten in ihrer Studie den Schutz vor Kompression als Erklärung für diese experimentelle Beobachtung an: „This is likely due to that fibrin matrix with poor mechanical properties and fast matrix biodegradation may not provide a mechanically stable space to withstand in vivo compressive forces for volume-stable adipose tissue formation.”[27]

An dieser Stelle sei auf die Arbeit von Überreiter über den freien Fettgewebstransfer zum Brustaufbau verwiesen. In dieser Arbeit kam es ohne Ausbildung von Ölzysten, also ohne das Auftreten von Fettgewebstekrosen, zur partiellen Resorption (ca. 50% des ursprünglichen Volumens) des transplantierten Fettgewebes. Interessant ist in dieser Studie die Ursache der experimentellen Beobachtung: nutritive Faktoren können aufgrund der fehlenden Fettgewebstekrosen als unwahrscheinlich gelten, Atrophie aufgrund äußerer Kompression (Verband, Büstenhalter, etc.) ebenfalls, fraglich ist daher, ob die dauerhafte Kompression durch eine nicht expandierte Haut als Ursache angesehen werden kann.[169]

Einen anderen Ansatz zur Bildung von Fettgewebe in vivo verfolgten Forscher um W.A. Morrison: in einer kuppelförmigen Kammer platzierte dieser eine Gefäßschlinge und beobachtete in vivo eine Fettgewebsbildung in dieser Kammer. Das Ausmaß der Adipogenese war hierbei abhängig von Kuppelgröße, Material und Trägermaterial in der Kammer.[35, 68, 97]

In Synopsis der Literaturdaten kann die Wahl einer formstabilen Scaffold-Architektur als zweckmäßig für die experimentelle Zielsetzung dieser Arbeit angesehen werden. Denn es sollten form- und volumenstabile Konstrukte hergestellt werden.

In dieser Arbeit konnte folgendes Fettgewebsverteilungsmuster nach vier Wochen in vivo gefunden werden: zusammenhängendes Fettgewebe in geschützten Räumen und geringe Adipogenese an exponierten Stellen der Scaffolds. Dies sei an zwei exemplarischen Konstrukten demonstriert: zusammenhängendes Stück Fettgewebe in einem Zwickel zwischen zwei Fibrillen der stacked-fibre Architektur (Abbildung 4.5) und eine Insel von Fettgewebszellen, exponiert ohne Schutz auf der einstigen Oberfläche des Konstruktes (Abbildung 4.5).

Schlussfolgernd ist die Bereitstellung eines geschützten Raumes im Sinne von Abschirmung gegenüber dem umgebenden Gewebe für Herstellung eines langfristig volumen-stabilen Fettgewebes notwendig. Denn trotz der Formstabilität des PCL-Scaffolds und dem daraus resultierenden Schutz vor Druck war die Bildung von zusammenhängendem Fettgewebe in geschützten Räumen größer als in den nach außen exponierten, aber dennoch durch die umgebenden Fibrillen druckgeschützten Poren. Dies sollte als neue Erkenntnis bei der Diskussion über die Voraussetzungen für volumenstabile Fettgewebskonstrukte in Zukunft berücksichtigt werden.

5.3.4 Formgebung des Scaffolds

Die Rapid Prototyping Technik erlaubt es Scaffolds anhand von digitalen Simulationen zu erstellen. Dies ermöglicht den klinischen Einsatz eines Scaffolds zur individuellen (Brust-)Rekonstruktion. Aus diesem Grund ist es wichtig, Scaffold-Bauarten zu verwenden, welche der RP-Technik zugänglich sind.[108]

Beide in der Arbeit verwendeten Scaffold-Architekturen, ließen sich durch RP-gestützte Produktionsverfahren herstellen. Die PU-Scaffolds durch Solvent Casting, die PCL-Scaffolds mittels Fused Deposition Modelling.

Abgesehen von dem Vorteil der Rapid Prototyping Technik, Scaffolds in gewünschter Form nach einem virtuellen Modell produzieren zu können, macht diese Technik es möglich, Scaffolds in der Größe beliebig zu skalieren ohne dabei dessen Makro-Architektur zu verändern. Folglich bleiben die charakteristischen Eigenschaften der Scaffold-Makro-Architektur unabhängig von den Dimensionen der Scaffolds erhalten.[113]

Aus diesem Grund ist es möglich Schlussfolgerungen bezüglich der Scaffold-Architektur aus dieser Arbeit zu ziehen und auf größere Scaffolds zu übertragen.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang die partielle Unabhängigkeit des verwendeten Materials von der Herstellungstechnik. So kann ein Scaffold mit FDM produziert werden, wenn das Material über das System appliziert werden kann. Die Herstellung einer Scaffold-Architektur ist durch diese Technik also nahezu unabhängig von den Eigenschaften des verwendeten Materials.[71][113]

Im Gegensatz hierzu ist die Solvent Casting Technik abhängig von den chemischen Eigenschaften und der Anwendbarkeit des Materials für diese Technik. Eine Änderung der Materialzusammensetzung hat bei dieser Technik daher komplexe Änderungen der Scaffold-Eigenschaften zur Folge.[131]

Darüber hinaus erlaubt die Verwendung von FDM eine kontrollierte Generierung einer Binnen-Architektur der Scaffolds um Tunnel für Gefäße oder größere Räume für andere Scaffold-Materialien zur Kombination zu schaffen. Daher kann das FDM-Verfahren als flexibler an-

gesehen werden.[111]

Zusammengefasst boten beide Scaffold-Architekturen durch ihre Herstellung die Voraussetzung für einen klinischen Einsatz. Aufgrund spezifischer Unterschiede im Herstellungsverfahren ist die Herstellung der stacked-fibre Architektur der PCL-Scaffolds flexibler in Bezug auf Material und Kombinationsmöglichkeiten.

5.3.5 Individuelles Design des Scaffolds mit CAD/CAM

Die Kombination aus CAD und CAM ermöglichte bereits auf anderen Anwendungsgebieten die Individualisierung von Implantaten und so einen überlegenen Behandlungserfolg. Beispiel hierfür ist die Schädeldachrekonstruktion mit maßgefertigten Osteomesh-Implantaten durch Probst und Schantz.[127]

5.3.5.1 Implementierung des Fertigungsverfahrens

Die Implementierung einer Technologieplattform ist der erste Schritt auf dem Weg zu einem späteren klinischen Einsatz des CAD/CAM-Konzeptes. Denn ohne einen etablierten Fertigungsprozess, der zeitlich, arbeitstechnisch und funktionell optimiert ist, ist ein routinemäßiger Einsatz nicht möglich.

Routine bedeutet in der Medizin einen hohen Patientendurchsatz zu erzielen. Dies ist nicht möglich, wenn jeder Patient individuell gehandhabt werden muss und alle Fertigungsschritte für ihn speziell neu gefunden werden müssen. Stattdessen sollte ein standardisiertes Fertigungsverfahren etabliert sein, welches dennoch zu einem individuellen also personalisierten Brust-Scaffold führt.

Dieses Ziel ist durch eine Reduktion der Arbeitsschritte auf Daten-Akquise, Verarbeitung also CAD und anschließende Fertigung des Scaffolds via CAM möglich. Entscheidend ist hierbei die Flexibilität des modernen CAM-Fertigungsverfahrens. Dieses erlaubt die Herstellung individueller Scaffolds als Unikat ausgehend von einem Computermodell. Dadurch können Umwege über Schablonen oder Gussformen vermieden werden. Außerdem ist so eine maximale Automation möglich. Denn der Designvorgang wurde so implementiert, dass er auf einer Abfolge von Algorithmen des CAD-Programms ohne manuelle Hilfestellung beruht. Dadurch kann ausgehend von einem 3D-Bilddatensatz das Design mit Hilfe eines Programms automatisiert werden, welches die beschriebenen Algorithmen in der vorgestellten Reihenfolge ohne weitere manuelle Bedienung abarbeitet.

Ein weiterer Vorteil der vorgestellten Technologieplattform ist die Flexibilität des CAD-Programms. Für dieses ist es unerheblich, ob die 3D-Bilddaten mittels strahlungsarmen 3D-Laserscanning gewonnen wurden. Denn auch 3D-Bilddaten aus Computertomographie und Magnetresonanztomographie können nach Zwischenschaltung eines Umrechnungsprozesses in die erforderliche Dateistruktur über das CAD-Programm verarbeitet werden.

Zusammenfassend stellt also die Implementierung eines Fertigungsverfahrens einen wichtigen Schritt in Richtung klinischer Anwendbarkeit des Konzeptes dar.

5.3.5.2 Innovationskraft

Die Idee dieser Arbeit beruht auf einer Technologie zur Herstellung von regenerativen Brustimplantaten, um damit eine natürliche, individualisierte und schonend minimal-invasive Brustrekonstruktion durchzuführen. Die Innovation besteht hierbei in der Verbindung von CAD-basierter 3D-Modellierung der Brust, moderner Herstellung mittels 3D-Printing und bioaktiven Materialien zur Geweberegeneration. Denn das Wesen der Innovation liegt in der neuartigen

Kombination von Technologien. Hier wurden mehrere Spitzentechnologien zu einem Lösungsansatz verbunden.

Diese Technologie ist aktuell weltweit einmalig und verspricht den Patientinnen eine einzigartige Brustrekonstruktion. Dabei profitieren die Patientinnen von der Herstellungsweise des Implantats, da dieses als Unikat speziell für sie maßgefertigt wird und so ein sehr ästhetisches Operationsergebnis verspricht. Des Weiteren ermöglicht die eingesetzte Technik eine minimal-invasive Operationsmethode und ist somit schonend und risikoarm für die Patientin. Die verwendeten bioaktiven Implantate ermöglichen außerdem eine regenerative Brustrekonstruktion und führen so zu einem natürlichen Ergebnis ganz ohne Silikon.

Ausgehend von Patientinnen für die Brustrekonstruktion lässt sich die Technik auf Teilrekonstruktionen von angeborenen Deformitäten der Brust bis hin zu augmentativen Operationen in der ästhetischen Chirurgie ausweiten.

Zusammenfassend ist die vorgestellte Technologieplattform ein äußerst innovatives Konzept.

5.3.5.3 Symmetrie und Ästhetik

Die Überlegenheit des präsentierten Konzeptes gegenüber anderen klinischen Therapiestrategien wie z.B. Silikonimplantaten kommt einerseits durch die Fokussierung auf eine natürliche Regeneration und andererseits durch die strikte Beachtung von Symmetrie im Prozessablauf. Denn die Symmetrie stellt bei der Rekonstruktion einen wichtigen Faktor für die ästhetische Qualität der Therapie dar. Im hier präsentierten Modelling-Verfahren wird der Scaffold durch eine Spiegelung der verbleibenden Brust erzeugt. Dies führt zu einer guten Abstimmung beider Seiten und folglich zu einem ästhetischen Ergebnis.

Da aber der Oberkörper eines Menschen mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit nicht symmetrisch ist, wurde ein Zwischenschritt eingeführt, um die unterschiedliche Form beider Thoraxhälften zu berücksichtigen. Bei einer 1:1 Übertragung der Brust von der einen auf die andere Seite würde in der Gesamtschau eine Asymmetrie erzeugt werden, wenn die Thoraxform nicht berücksichtigt würde. Daher wird in dem hier präsentierten Verfahren die Brust an die jeweilige Thoraxhälfte anmodelliert. Darüber hinaus wird die Symmetrieebene nicht willkürlich als mediane Sagittalebene definiert sondern über einen Algorithmus als best mögliche Symmetrieebene der Thorax-Shell berechnet. Vergleiche hierfür Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10

Ausschlaggebend für die Modellierung ist die vereinfachte Thorax-Shell, welche zur Bestimmung der Brustgröße und Form verwendet wird. Für die Anwendbarkeit dieser Shell ist ein harmonischer Übergang, der der natürlichen Situation möglichst nahe kommt, im Bereich von Clavicula und Musculus pectoralis maior bedeutend. Da der Musculus pectoralis maior bei der modifizierten Mastektomie erhalten bleibt, wird nur das direkte Weichgewebe der Brust reseziert. Daher müssen beim Design des Scaffolds die verbleibenden anatomischen Strukturen berücksichtigt werden, so dass nur das echte Weichgewebe der Brust als Scaffold produziert wird. Bei einer zukünftigen weiteren Verbesserung des Verfahrens sollte darauf geachtet werden, dass die Hinterkante des Scaffolds weiter abgerundet wird. Dies sollte durch einen neuen Schritt am Ende des Modellierungsprozess machbar sein.

Die Effizienz dieses Verfahrens zeigt der Contour Plot (Abbildung 4.10) deutlich. Bei der präoperativen Aufnahme der Patientin liegt eine deutliche Asymmetrie der Brüste vor. In der simulierten Mastektomie wird deutlich, dass die unterschiedliche Größe der Brüste (Rotfärbung) nicht durch eine Fehleinstellung der Patientin relativ zum Scanner zustande kommt, sondern natürlich ist. Denn bei Betrachtung des Plot zeigt der Oberkörper (speziell im grünen und blauen Bereich) eine deutliche Symmetrie beider Seiten. Daraus kann man schließen, dass die Orientierung des Oberkörpers frontal zur Kamera und damit korrekt war. Im Plot nach der simulierten Rekonstruktion imponiert die Symmetrie des Oberkörpers und unterstreicht

die Berechtigung des Modelling-Prozesses.

Zusammenfassend ermöglicht der implementierte Prozess eine klare Fokussierung auf ein symmetrisches und damit ästhetisches Ergebnis der Therapie.

5.3.6 Einsatzmöglichkeiten des Scaffolds – In situ vs. In vitro

Die in dieser Arbeit untersuchten Scaffold-Architekturen konnten sich durch unterschiedliche Vorteile auszeichnen: die höhlenreiche PU-Architektur zeigte eine hohe Adipogenese in vitro und in vivo. Demgegenüber zeigte die stacked-fibre Architektur der PCL-Scaffolds eine hohe Integrationsfähigkeit in den Wirtsorganismus.

Aus diesem Grund ist für die PU-Architektur der Einsatz im in vitro Tissue Engineering und für die PCL-Architektur im in situ Tissue Engineering vorstellbar, da sie so ihre jeweiligen Stärken (Adipogenese bzw. Integrationsfähigkeit) ausspielen können.

Schlussfolgernd darf als Erkenntnis dieser Arbeit eine höhlenreiche Scaffold-Architektur für flache kleinvolumige in vitro Ansätze ohne das Bedürfnis einer intensiven Vaskularisierung und eine stacked-fibre Architektur für in situ Ansätze mit dem Ziel einer großvolumigen Rekonstruktion mit weitreichender Integration in den Wirtsorganismus empfohlen werden.

5.3.7 Stellungnahme zur 3. Hypothese

Die 3. Hypothese kann aufgrund der Ergebnisse weder verifiziert noch falsifiziert werden. Zur Klärung sind weitere Studien erforderlich.

6 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es zwei unterschiedliche Scaffold-Architekturen zu vergleichen und ihre Einsatzmöglichkeiten für die funktionelle Brustrekonstruktion zu evaluieren. Hierbei handelte es sich um eine stacked-fibre und eine schwammartige Scaffold-Architektur. Nach bestem Wissen wurde zum ersten Mal eine Makro-Architektur eines Scaffolds sowohl in vitro als auch in vivo analysiert. Ausschlaggebend für die Aussagekraft der Experimente waren die annähernd gleichen Herstellungsmaterialien der Scaffolds und die Verwendung einer Fibrin-Matrix zur Schaffung einer Mikro-Architektur bzw. eines Mikro-Milieus. Daher konnten die beobachteten Unterschiede direkt auf die Makro-Architektur der Scaffolds zurückgeführt werden.

Beide Scaffolds konnten mit humanen ASCs besiedelt werden und führten zur Generierung von Fettgewebe in vitro als auch in vivo. Die Adipogenese war dabei auf dem schwammartigen Scaffold sowohl in vitro als auch in vivo signifikant höher als auf dem stacked-fibre Scaffold. Konträr hierzu war die Integration (Invasion und Angiogenese) in den Wirtsorganismus beim stacked-fibre Scaffold intensiver als beim schwammartigen Scaffold. Das Ziel eines vaskularisierten Fettgewebskonstruktes konnte mit beiden Scaffold-Architekturen erreicht werden.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit konnten folgende neue Erkenntnisse gewonnen werden:

- Eine höhlenartige Makro-Architektur fördert die Adipogenese durch Schaffung eines Mikro-Milieus.
- Die Makro-Architektur eines Scaffolds ist entscheidend für seine Integrationsfähigkeit in den Wirtsorganismus. Dabei ist eine bahnende strukturierte Architektur des Scaffolds einer zufälligen und strukturlosen Architektur unabhängig von der Porosität überlegen.
- Zur Herstellung von Fettgewebe ist ein ausreichend steife Scaffold-Architektur erforderlich, um den einwirkenden Druck von außen abzumildern und einen geschützten Raum zur Bildung des Fettgewebes zur Verfügung zu stellen.
- Um die Homogenität der Geweberegeneration zu beurteilen sind große Volumina der Konstrukte erforderlich um die Unterschiede bezüglich der Integrationsfähigkeit signifikant beurteilen zu können.
- Die untersuchten Scaffold-Architekturen – speziell die stacked-fibre Architektur – können durch ihre Einsatzfähigkeit im RapidPrototyping mit der in dieser Arbeit etablierten Technologieplattform zur Herstellung patientenspezifischer Scaffolds in Form einer Brust verwendet werden.

Schlussfolgernd kann diese Studie als Machbarkeitsstudie und Ideenpool für größere Konstrukte zur funktionelle Brustrekonstruktion gelten. Darüber hinaus geben die akquirierten Daten Hoffnung, in Zukunft großvolumige Fettgewebskonstrukte in situ mit einem stacked-fibre Scaffold herzustellen, welcher durch seine Makro-Architektur die Integration in den Wirtsorganismus stimuliert und eine geschützte Umgebung zur Entwicklung von homogenem Fettgewebe bietet.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- [1] Agha-Mohammadi, S., De La Cruz, C. und Hurwitz, D.J. "Breast reconstruction with alloplastic implants". *J Surg Oncol*, 94 (2006) 471–8
- [2] Alhadlaq, A., Tang, M. und 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 (2005) 556–66
- [3] American Society of Plastic Surgeons. "2009 Reconstructive Surgery Trends". 2010. URL <http://www.plasticsurgery.org/Documents/Media/statistics/2009-reconstructive-trends-statistics.pdf>. Stand: 07.03.2011
- [4] Ansorge, S. "Immunsystem". In: G. Löffler, P. Petrides und P. Heinrich (Hrsg.) *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage. Springer Verlag, Berlin [u.a.], 2007, S. 1104–1138
- [5] Arndt, V., Stegmaier, C., Ziegler, H. und Brenner, H. "Quality of life over 5 years in women with breast cancer after breast-conserving therapy versus mastectomy: a population-based study". *J Cancer Res Clin Oncol*, 134 (2008) 1311–8
- [6] Baglioni, S., Francalanci, M., Squecco, R., Lombardi, A., Cantini, G., Angeli, R., Gelmini, S., Guasti, D., Benvenuti, S., Annunziato, F., Bani, D., Liotta, F., Francini, F., Perigli, G., Serio, M. und Luconi, M. "Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue". *FASEB J*, 23 (2009) 3494–505
- [7] Baker, M. "Leonard Zon: unlocking stemness in haematopoiesis". *Nature Reports Stem Cells* (2008) online publication: doi:10.1038/stemcells.2008.88
- [8] Barnsley, G.P., Sigurdson, L.J. und Barnsley, S.E. "Textured surface breast implants in the prevention of capsular contracture among breast augmentation patients: a meta-analysis of randomized controlled trials". *Plast Reconstr Surg*, 117 (2006) 2182–90
- [9] Bassetto, F., Scarpa, C., Caccialanza, E., Montesco, M.C. und Magnani, P. "Histological Features of Periprosthetic Mammary Capsules: Silicone vs. Polyurethane". *Aesthetic Plast Surg*, 34 (2010) 481–5
- [10] Becker, A.J., McCulloch, E. und Till, J.E. "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells". *Nature*, 197 (1963) 452–4
- [11] Beckmann, J., Scheitza, S., Wernet, P., Fischer, J.C. und Giebel, B. "Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins". *Blood*, 109 (2007) 5494–501
- [12] Berrino, P., Galli, A., Rainero, M.L. und Santi, P.L. "Long-lasting complications with the use of polyurethane-covered breast implants". *Br J Plast Surg*, 39 (1986) 549–53
- [13] Blanpain, C., Lowry, W.E., Geoghegan, A., Polak, L. und Fuchs, E. "Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche". *Cell*, 118 (2004) 635–48

- [14] Bleiziffer, O., Hammon, M., Naschberger, E., Lipnik, K., Arkudas, A., Rath, S., Prymachuk, G., Beier, J.P., Stürzl, M., Horch, R.E. und Kneser, U. "Endothelial progenitor cells are integrated in newly formed capillaries and alter adjacent fibrovascular tissue after subcutaneous implantation in a fibrin matrix". *J Cell Mol Med*, 15 (2011) 2452–61
- [15] Blondeel, N., Vanderstraeten, G.G., Monstrey, S.J., Van Landuyt, K., Tonnard, P., Lysens, R., Boeckx, W.D. und Matton, G. "The donor site morbidity of free DIEP flaps and free TRAM flaps for breast reconstruction". *Br J Plast Surg*, 50 (1997) 322–30
- [16] Brandberg, Y., Sandelin, K., Erikson, S., Jurell, G., Liljegren, A., Lindblom, A., Linden, A., von Wachenfeldt, A., Wickman, M. und Arver, B. "Psychological reactions, quality of life, and body image after bilateral prophylactic mastectomy in women at high risk for breast cancer: a prospective 1-year follow-up study". *J Clin Oncol*, 26 (2008) 3943–9
- [17] Brown, S.A., Levi, B., Lequeux, C., Lequex, C., Wong, V.W., Mojallal, A. und Longaker, M.T. "Basic science review on adipose tissue for clinicians". *Plast Reconstr Surg*, 126 (2010) 1936–46
- [18] Bunnell, B.A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B. und Ripoll, C. "Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation". *Methods*, 45 (2008) 115–20
- [19] Burger, W. und Burge, M.J. *Digitale Bildverarbeitung: Eine Einführung mit Java und ImageJ*. 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin [u.a.], 2006
- [20] Caplan, A. und Dennis, J. "Mesenchymal stem cells as trophic mediators." *J Cell Biochem*, 98 (2006) 1076–84
- [21] Carraro, A., Hsu, W.M., Kulig, K.M., Cheung, W.S., Miller, M.L., Weinberg, E.J., Swart, E.F., Kaazempur-Mofrad, M., Borenstein, J.T., Vacanti, J.P. und Neville, C. "In vitro analysis of a hepatic device with intrinsic microvascular-based channels". *Biomed Microdevices*, 10 (2008) 795–805
- [22] Carriere, A., Carmona, M.C., Fernandez, Y., Rigoulet, M., Wenger, R.H., Penicaud, L. und Casteilla, L. "Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect". *J Biol Chem*, 279 (2004) 40462–9
- [23] Catalioto, R.M., Gaillard, D., Maclouf, J., Ailhaud, G. und Negrel, R. "Autocrine control of adipose cell differentiation by prostacyclin and PGF2 alpha". *Biochim Biophys Acta*, 1091 (1991) 364–9
- [24] Chapman, A.B., Knight, D.M. und Ringold, G.M. "Glucocorticoid regulation of adipocyte differentiation: hormonal triggering of the developmental program and induction of a differentiation-dependent gene". *J Cell Biol*, 101 (1985) 1227–35
- [25] Chen, J.J. und London, I.M. "Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes". *Cell*, 26 (1981) 117–22
- [26] Cho, S.W., Kim, I., Kim, S.H., Rhie, J.W., Choi, C.Y. und Kim, B.S. "Enhancement of adipose tissue formation by implantation of adipogenic-differentiated preadipocytes". *Biochem Biophys Res Commun*, 345 (2006) 588–94

- [27] Cho, S.W., Kim, S.S., Rhie, J.W., Cho, H.M., Choi, C.Y. und Kim, B.S. "Engineering of volume-stable adipose tissues". *Biomaterials*, 26 (2005) 3577–85
- [28] Chua, C., Chou, S., Ng, W., Chow, K., Lee, S., Aung, S. und Seah, C. "An integrated experimental approach to link a laser digitiser, a CAD/CAM system and a rapid prototyping system for biomedical applications". *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 14 (1998) 110–115
- [29] Cook, J.S., Lucas, J.J., Sibley, E., Bolanowski, M.A., Christy, R.J., Kelly, T.J. und Lane, M.D. "Expression of the differentiation-induced gene for fatty acid-binding protein is activated by glucocorticoid and cAMP". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (1988) 2949–53
- [30] Cordeiro, P.G. "Breast reconstruction after surgery for breast cancer". *N Engl J Med*, 359 (2008) 1590–601
- [31] Critser, P.J., Voytik-Harbin, S.L. und Yoder, M.C. "Isolating and defining cells to engineer human blood vessels". *Cell Prolif*, 44 Suppl 1 (2011) 15–21
- [32] Darimont, C., Gaillard, D., Ailhaud, G. und Negrel, R. "Terminal differentiation of mouse preadipocyte cells: adipogenic and antimitogenic role of triiodothyronine". *Mol Cell Endocrinol*, 98 (1993) 67–73
- [33] Deng, T., Sieglaff, D.H., Zhang, A., Lyon, C.J., Ayers, S.D., Cvoro, A., Gupte, A.A., Xia, X., Baxter, J.D., Webb, P. und Hsueh, W.A. "A peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)/PPARgamma coactivator 1beta autoregulatory loop in adipocyte mitochondrial function". *J Biol Chem*, 286 (2011) 30723–31
- [34] Dini, G.M. und Ferreira, L.M. "Early complication with the use of polyurethane-covered breast implants". *Plast Reconstr Surg*, 117 (2006) 2098–100
- [35] Dolderer, J.H., Abberton, K.M., Thompson, E.W., Slavin, J.L., Stevens, G.W., Pennington, A.J. und Morrison, W.A. "Spontaneous large volume adipose tissue generation from a vascularized pedicled fat flap inside a chamber space". *Tissue Eng*, 13 (2007) 673–81
- [36] Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. und Horwitz, E. "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement". *Cytotherapy*, 8 (2006) 315–7
- [37] Drews, U. *Taschenatlas der Embryologie*. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006
- [38] Eisenmann-Klein, M. "Mammaaugmentation". In: A. Berger und R. Hierner (Hrsg.) *Plastische Chirurgie: Mamma, Stamm, Genitale*. Springer Verlag, Berlin [u.a.], 2007, S. 155–174
- [39] Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L. und Discher, D.E. "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification". *Cell*, 126 (2006) 677–89
- [40] Erices, A., Conget, P. und Minguell, J.J. "Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood". *Br J Haematol*, 109 (2000) 235–42

- [41] Eyrich, D., Wiese, H., Maier, G., Skodacek, D., Appel, B., Sarhan, H., Tessmar, J., Staudenmaier, R., Wenzel, M.M., Goepferich, A. und Blunk, T. "In vitro and in vivo cartilage engineering using a combination of chondrocyte-seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactone-based polyurethane scaffolds". *Tissue Eng*, 13 (2007) 2207–18
- [42] Feller, A.M., Richter-Heine, I. und Rudolf, K.D. "[The superior gluteal artery perforator flap (S-GAP-Flap)]". *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 34 (2002) 257–61
- [43] Fernández, M., Acuña, M.J., Reyes, M., Olivares, D., Hirsch, S., Bunout, D. und de la Maza, M.P. "Proliferation and differentiation of human adipocyte precursor cells: differences between the preperitoneal and subcutaneous compartments". *J Cell Biochem*, 111 (2010) 659–64
- [44] Findlay, M.W., Dolderer, J.H., Trost, N., Craft, R.O., Cao, Y., Cooper-White, J., Stevens, G. und Morrison, W.A. "Tissue-engineered breast reconstruction: bridging the gap toward large-volume tissue engineering in humans". *Plast Reconstr Surg*, 128 (2011) 1206–15
- [45] Fink, T., Abildtrup, L., Fogd, K., Abdallah, B.M., Kassem, M., Ebbesen, P. und Zachar, V. "Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia". *Stem Cells*, 22 (2004) 1346–55
- [46] Fischbach, C., Seufert, J., Staiger, H., Hacker, M., Neubauer, M., Goepferich, A. und Blunk, T. "Three-dimensional in vitro model of adipogenesis: comparison of culture conditions". *Tissue Eng*, 10 (2004) 215–29
- [47] Flores-Delgado, G., Marsch-Moreno, M. und Kuri-Harcuch, W. "Thyroid hormone stimulates adipocyte differentiation of 3T3 cells". *Mol Cell Biochem*, 76 (1987) 35–43
- [48] Folkman, J. und Hochberg, M. "Self-regulation of growth in three dimensions". *J Exp Med*, 138 (1973) 745–53
- [49] Fuchs, E. "The tortoise and the hair: slow-cycling cells in the stem cell race". *Cell*, 137 (2009) 811–9
- [50] Furst, W., Banerjee, A. und Redl, H. "Comparison of structure, strength and cytocompatibility of a fibrin matrix supplemented either with tranexamic acid or aprotinin". *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 82 (2007) 109–14
- [51] Gaillard, D., Negrel, R., Lagarde, M. und Ailhaud, G. "Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells". *Biochem J*, 257 (1989) 389–97
- [52] Gampper, T.J., Khoury, H., Gottlieb, W. und Morgan, R.F. "Silicone gel implants in breast augmentation and reconstruction". *Ann Plast Surg*, 59 (2007) 581–90
- [53] Gimble, J.M., Robinson, C.E., Wu, X., Kelly, K.A., Rodriguez, B.R., Kliewer, S.A., Lehmann, J.M. und Morris, D.C. "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells". *Mol Pharmacol*, 50 (1996) 1087–94
- [54] Gleeson, J.P., Plunkett, N.A. und O'Brien, F.J. "Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration". *Eur Cell Mater*, 20 (2010) 218–30

- [55] Gomillion, C.T. und Burg, K.J. "Stem cells and adipose tissue engineering". *Biomaterials*, 27 (2006) 6052–63
- [56] Gronthos, S., Franklin, D.M., Leddy, H.A., Robey, P.G., Storms, R.W. und Gimble, J.M. "Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells". *J Cell Physiol*, 189 (2001) 54–63
- [57] Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G. und Shi, S. "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (2000) 13625–30
- [58] Handel, N., Cordray, T., Gutierrez, J. und Jensen, J.A. "A long-term study of outcomes, complications, and patient satisfaction with breast implants". *Plast Reconstr Surg*, 117 (2006) 757–67; discussion 768–72
- [59] Handel, N. und Gutierrez, J. "Long-term safety and efficacy of polyurethane foam-covered breast implants". *Aesthet Surg J*, 26 (2006) 265–74
- [60] Harrison, J.J., Soudry, E. und Sager, R. "Adipocyte conversion of CHEF cells in serum-free medium". *J Cell Biol*, 100 (1985) 429–34
- [61] Hauner, H. "Complete adipose differentiation of 3T3 L1 cells in a chemically defined medium: comparison to serum-containing culture conditions". *Endocrinology*, 127 (1990) 865–72
- [62] Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R. und Pfeiffer, E.F. "Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium". *J Clin Invest*, 84 (1989) 1663–70
- [63] Hauner, H. und Loffler, G. "Adipogenic factors in human serum promote the adipose conversion of 3T3-L1 fibroblasts". *Int J Obes*, 10 (1986) 323–30
- [64] Hausman, G.J., Wright, J.T. und Richardson, R.L. "The influence of extracellular matrix substrata on preadipocyte development in serum-free cultures of stromal-vascular cells". *J Anim Sci*, 74 (1996) 2117–28
- [65] von Heimburg, D., Zachariah, S., Heschel, I., Kuhling, H., Schoof, H., Hafemann, B. und Pallua, N. "Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo". *Biomaterials*, 22 (2001) 429–38
- [66] von Heimburg, D., Zachariah, S., Low, A. und Pallua, N. "Influence of different biodegradable carriers on the in vivo behavior of human adipose precursor cells". *Plast Reconstr Surg*, 108 (2001) 411–20; discussion 421–2
- [67] Heitland, A., Köllensperger, E. und Pallua, N. "Neue Trends in der Brustrekonstruktion mit körpereigenem Gewebe". *Dtsch Arztebl*, 102 (2005) 422–427
- [68] 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. und Messina, A. "Increasing the volume of vascularized tissue formation in engineered constructs: an experimental study in rats". *Plast Reconstr Surg*, 111 (2003) 1186–92; discussion 1193–4

- [69] Holzbach, T., Vlaskou, D., Neshkova, I., Konerding, M.A., Wortler, K., Mykhaylyk, O., Gansbacher, B., Machens, H.G., Plank, C. und Giunta, R.E. "Non-viral VEGF(165) gene therapy–magnetofection of acoustically active magnetic lipospheres ('magnetobubbles') increases tissue survival in an oversized skin flap model". *J Cell Mol Med*, 14 (2010) 587–99
- [70] Husmann, G., Kaatsch, P. und Katalinic, A. *Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends*. 7 Auflage. Robert Koch Institut, Berlin, 2010
- [71] Hutmacher, D.W., Sittinger, M. und Risbud, M.V. "Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems". *Trends Biotechnol*, 22 (2004) 354–62
- [72] Isogai, N., Sai, K., Kamiishi, H., Watatani, M., Inui, H. und Shiozaki, H. "Quantitative analysis of the reconstructed breast using a 3-dimensional laser light scanner". *Ann Plast Surg*, 56 (2006) 237–42
- [73] Ito, M., Liu, Y., Yang, Z., Nguyen, J., Liang, F., Morris, R.J. und Cotsarelis, G. "Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis". *Nat Med*, 11 (2005) 1351–4
- [74] Itoi, Y., Takatori, M., Hyakusoku, H. und Mizuno, H. "Comparison of readily available scaffolds for adipose tissue engineering using adipose-derived stem cells". *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 63 (2010) 858–64
- [75] Kang, X., Xie, Y., Powell, H.M., James Lee, L., Belury, M.A., Lannutti, J.J. und Kniss, D.A. "Adipogenesis of murine embryonic stem cells in a three-dimensional culture system using electrospun polymer scaffolds". *Biomaterials*, 28 (2007) 450–8
- [76] Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. und Bieback, K. "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue". *Stem Cells*, 24 (2006) 1294–301
- [77] Kindred, B. "Immunological unresponsiveness of genetically thymusless (nude) mice". *Eur J Immunol*, 1 (1971) 59–61
- [78] Kliewer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C. und Lehmann, J.M. "A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation". *Cell*, 83 (1995) 813–9
- [79] Klinzing, S. und Kunert, P. "Mammaformung". In: A. Berger und R. Hierner (Hrsg.) *Plastische Chirurgie: Mamma, Stamm, Genitale*. Springer Verlag, Berlin [u.a.], 2007, S. 91–131
- [80] Klopsch, C., Donndorf, P., Kaminski, A., Ma, N. und Steinhoff, G. "[Cell sources for cardiovascular tissue engineering]". *Chirurg*, 82 (2011) 295–302
- [81] Kluger, P., Borchers, K., Refle, A., Engelhard, S., Meyer, W., Novosel, E., Graf, C. und Bierwisch, C. "Fabricating small diameter, branched vascular systems by combining inkjet printing and multiphoton polymerization - Abstracts from Termis EU 2011 Granada". *Histology and Histopathology*, 26 supplement 2 (2011) 20

- [82] Knight, D.M., Chapman, A.B., Navre, M., Drinkwater, L., Bruno, J.J. und Ringold, G.M. "Requirements for triggering of adipocyte differentiation by glucocorticoids and indomethacin". *Mol Endocrinol*, 1 (1987) 36–43
- [83] Kovacs, L., Eder, M., Hollweck, R., Zimmermann, A., Settles, M., Schneider, A., Endlich, M., Mueller, A., Schwenger-Zimmerer, K., Papadopulos, N.A. und Biemer, E. "Comparison between breast volume measurement using 3D surface imaging and classical techniques". *Breast*, 16 (2007) 137–45
- [84] Kovacs, L., Eder, M., Hollweck, R., Zimmermann, A., Settles, M., Schneider, A., Udovic, K., Schwenger-Zimmerer, K., Papadopulos, N.A. und Biemer, E. "New aspects of breast volume measurement using 3-dimensional surface imaging". *Ann Plast Surg*, 57 (2006) 602–10
- [85] Kovacs, L., Yassouridis, A., Zimmermann, A., Brockmann, G., Wohnl, A., Blaschke, M., Eder, M., Schwenger-Zimmerer, K., Rosenberg, R., Papadopulos, N.A. und Biemer, E. "Optimization of 3-dimensional imaging of the breast region with 3-dimensional laser scanners". *Ann Plast Surg*, 56 (2006) 229–36
- [86] Kurten, R.C., Navre, M., Gaddy-Kurten, D., Semenkovich, C.F., Ringold, G.M., Chan, L. und Richards, J.S. "Induction of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase subunits during adipogenesis in vitro". *Endocrinology*, 123 (1988) 2408–18
- [87] Langer, R. und Vacanti, J.P. "Tissue engineering". *Science*, 260 (1993) 920–6
- [88] Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Oliver, B.B., Ringold, G.M. und Kliewer, S.A. "Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs". *J Biol Chem*, 272 (1997) 3406–10
- [89] Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M. und Kliewer, S.A. "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)". *J Biol Chem*, 270 (1995) 12953–6
- [90] Lequeux, C., Auxenfans, C., Mojallal, A., Sergent, M. und Damour, O. "Optimization of a culture medium for the differentiation of preadipocytes into adipocytes in a monolayer". *Biomed Mater Eng*, 19 (2009) 283–91
- [91] Levi, B., Rademaker, A.W., Fine, N.A. und Mustoe, T.A. "Comparison of breast implant deflation for mentor anterior and posterior valve designs in aesthetic and reconstructive patients". *Plast Reconstr Surg*, 122 (2008) 685–92
- [92] Levy, V., Lindon, C., Harfe, B.D. und Morgan, B.A. "Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis". *Dev Cell*, 9 (2005) 855–61
- [93] Life Technologies. "Invitrogen AlamarBlue Product Info Sheet". Beigefügt zum Produkt. Life Technologies, Grand Island, NY, 2011
- [94] Lin, G., Garcia, M., Ning, H., Banie, L., Guo, Y.L., Lue, T.F. und Lin, C.S. "Defining stem and progenitor cells within adipose tissue". *Stem Cells Dev*, 17 (2008) 1053–63
- [95] Lippert, H. *Lehrbuch Anatomie*. 7. Auflage. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München [u.a.], 2006

- [96] Lodish, H.F., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. und Darnell, J. *Molecular cell biology*. 4. Auflage. Freeman, New York, NY, 2000
- [97] Lokmic, Z., Stillaert, F., Morrison, W.A., Thompson, E.W. und Mitchell, G.M. "An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct". *FASEB J*, 21 (2007) 511–22
- [98] Lonza Group. "Product Catalogue PT8002". 2010. URL <https://www.lonza.com/go/literature/491>. Stand: 03.03.2011
- [99] Losken, A., Seify, H., Denson, D.D., Paredes, Jr, A.A. und Carlson, G.W. "Validating three-dimensional imaging of the breast". *Ann Plast Surg*, 54 (2005) 471–6; discussion 477–8
- [100] Lynch, P.J. "Breast normal anatomy cross-section view". 2006. URL http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/32/Breast_anatomy_normal.jpg. Stand: 23.06.2011
- [101] Macadam, S.A., Ho, A.L., Cook, Jr, E.F., Lennox, P.A. und Pusic, A.L. "Patient satisfaction and health-related quality of life following breast reconstruction: patient-reported outcomes among saline and silicone implant recipients". *Plast Reconstr Surg*, 125 (2010) 761–71
- [102] Macchiarini, P., Walles, T., Biancosino, C. und Mertsching, H. "First human transplantation of a bioengineered airway tissue". *J Thorac Cardiovasc Surg*, 128 (2004) 638–41
- [103] Mahdy, A.M. und Webster, N.R. "Perioperative systemic haemostatic agents". *Br J Anaesth*, 93 (2004) 842–58
- [104] Mannucci, P.M. "Hemostatic drugs". *N Engl J Med*, 339 (1998) 245–53
- [105] Massirer, K.B., Carromeu, C., Griesi-Oliveira, K. und Muotri, A.R. "Maintenance and differentiation of neural stem cells". *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 3 (2011) 107–14
- [106] Matsumoto, D., Sato, K., Gonda, K., Takaki, Y., Shigeura, T., Sato, T., Aiba-Kojima, E., Iizuka, F., Inoue, K., Suga, H. und Yoshimura, K. "Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection". *Tissue Eng*, 12 (2006) 3375–82
- [107] Maximow, A. "Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. (Demonstrationsvortrag, gehalten in der ausserordentlichen Sitzung der Berliner Hämatologischen Gesellschaft am 1. Juni 1909)". *Folia Haematologica*, 8 (1909) 125–134
- [108] Melchels, F., Wigganhauser, P.S., Warne, D., Barry, M., Ong, F.R., Chong, W.S., Huttmacher, D.W. und Schantz, J.T. "CAD/CAM-assisted breast reconstruction". *Biofabrication*, 3 (2011) 034114
- [109] Morikawa, M., Nixon, T. und Green, H. "Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells". *Cell*, 29 (1982) 783–9

- [110] Morrison, W.A., Penington, A.J., Kumta, S.K. und Callan, P. "Clinical applications and technical limitations of prefabricated flaps". *Plast Reconstr Surg*, 99 (1997) 378–85
- [111] Muller, D., Chim, H., Bader, A., Whiteman, M. und Schantz, J.T. "Vascular guidance: microstructural scaffold patterning for inductive neovascularization". *Stem Cells Int*, 2011 (2010) 547247
- [112] Nahabedian, M.Y. "Breast deformities and mastopexy". *Plast Reconstr Surg*, 127 (2011) 91e–102e
- [113] Nasr, E.A. und Kamrani, A.K. *Computer-Based Design and Manufacturing: An Information-Based Approach*. Springer Verlag, New York, 2007
- [114] National Cancer Institute. "SEER Stat Fact Sheets: Breast". 2010. URL <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>. Stand: 23.05.2011
- [115] National Institute of Health - Department of Health and Human Services. "Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Direction". 2001. URL <http://stemcells.nih.gov/info/2001report/2001report.htm>. Stand: 03.03.2011
- [116] Negrel, R., Gaillard, D. und Ailhaud, G. "Prostacyclin as a potent effector of adipose-cell differentiation". *Biochem J*, 257 (1989) 399–405
- [117] Niederbichler, A. und Vogt, P. "Plastische Chirurgie". In: D. Henne-Bruns, M. Dürig und B. Kremer (Hrsg.) *Duale Reihe Chirurgie*. 3 Auflage, Kapitel 8. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007, S. 1167–1187
- [118] Nixon, T. und Green, H. "Contribution of growth hormone to the adipogenic activity of serum". *Endocrinology*, 114 (1984) 527–32
- [119] O'Connor, K.C., Song, H., Rosenzweig, N. und Jansen, D.A. "Extracellular matrix substrata alter adipocyte yield and lipogenesis in primary cultures of stromal-vascular cells from human adipose". *Biotechnol Lett*, 25 (2003) 1967–72
- [120] Pairault, J. und Lasnier, F. "Control of the adipogenic differentiation of 3T3-F442A cells by retinoic acid, dexamethasone, and insulin: a topographic analysis". *J Cell Physiol*, 132 (1987) 279–86
- [121] Pairault, J., Quignard-Boulangé, A., Dugail, I. und Lasnier, F. "Differential effects of retinoic acid upon early and late events in adipose conversion of 3T3 preadipocytes". *Exp Cell Res*, 177 (1988) 27–36
- [122] Patrick, C.W. "Breast tissue engineering". *Annu Rev Biomed Eng*, 6 (2004) 109–30
- [123] Patrick, C. W., J., Chauvin, P.B., Hobley, J. und Reece, G.P. "Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering". *Tissue Eng*, 5 (1999) 139–51
- [124] Peng, L., Jia, Z., Yin, X., Zhang, X., Liu, Y., Chen, P., Ma, K. und Zhou, C. "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue". *Stem Cells Dev*, 17 (2008) 761–73
- [125] Persichetti, P., Cagli, B., Tenna, S., Simone, P., Marangi, G.F. und Li Vecchi, G. "Decision making in the treatment of tuberous and tubular breasts: volume adjustment as a crucial stage in the surgical strategy". *Aesthetic Plast Surg*, 29 (2005) 482–8

- [126] Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. und Marshak, D.R. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells". *Science*, 284 (1999) 143–7
- [127] Probst, F.A., Huttmacher, D.W., Muller, D.F., Machens, H.G. und Schantz, J.T. "Calvarial Reconstruction by Customized Bioactive Implant". *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 42 (2010) 369–73
- [128] Pugh, C.W. und Ratcliffe, P.J. "Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system". *Nat Med*, 9 (2003) 677–84
- [129] Putz, R. und Papst, R. *Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen*, Band 2. 22. Auflage. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München [u.a.], 2006
- [130] Quint, C., Kondo, Y., Manson, R.J., Lawson, J.H., Dardik, A. und Niklason, L.E. "Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (2011) 9214–9
- [131] Raghunath, J., Rollo, J., Sales, K.M., Butler, P.E. und Seifalian, A.M. "Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage". *Biotechnol Appl Biochem*, 46 (2007) 73–84
- [132] Rassow, J. "ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung". In: J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker und R. Deutzmann (Hrsg.) *Duale Reihe Biochemie*. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2008, S. 164–182
- [133] Reckhenrich, A.K., Hopfner, U., Krotz, F., Zhang, Z., Koch, C., Kremer, M., Machens, H.G., Plank, C. und Egana, J.T. "Bioactivation of dermal scaffolds with a non-viral copolymer-protected gene vector". *Biomaterials*, 32 (2011) 1996–2003
- [134] Reißig, D. und Salvetter, J. "Hautanhangsgebilde". In: L. Wurzinger (Hrsg.) *Duale Reihe Anatomie*. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2010, S. 1173–1176
- [135] Ringold, G.M., Chapman, A.B. und Knight, D.M. "Glucocorticoid control of developmentally regulated adipose genes". *J Steroid Biochem*, 24 (1986) 69–75
- [136] Rodriguez Fernandez, J.L. und Ben-Ze'ev, A. "Regulation of fibronectin, integrin and cytoskeleton expression in differentiating adipocytes: inhibition by extracellular matrix and polylysine". *Differentiation*, 42 (1989) 65–74
- [137] Rotter, N., Schwarz, S., Jakob, M., Brandau, S., Wollenberg, B. und Lang, S. "[Salivary gland stem cells : Can they restore radiation-induced salivary gland dysfunction?]". *HNO*, 58 (2010) 556–63
- [138] Safonova, I., Darimont, C., Amri, E.Z., Grimaldi, P., Ailhaud, G., Reichert, U. und Shroot, B. "Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation". *Mol Cell Endocrinol*, 104 (1994) 201–11
- [139] Salem, H., Ciba, P., Rapoport, D.H., Egana, J.T., Reithmayer, K., Kadry, M., Machens, H.G. und Kruse, C. "The influence of pancreas-derived stem cells on scaffold based skin regeneration". *Biomaterials*, 30 (2009) 789–96

- [140] Sandouk, T., Reda, D. und Hofmann, C. "Antidiabetic agent pioglitazone enhances adipocyte differentiation of 3T3-F442A cells". *Am J Physiol*, 264 (1993) C1600–8
- [141] Schantz, J.T., Hutmacher, D.W., Chim, H., Ng, K.W., Lim, T.C. und Teoh, S.H. "Induction of ectopic bone formation by using human periosteal cells in combination with a novel scaffold technology". *Cell Transplant*, 11 (2002) 125–38
- [142] Schantz, J.T. und Ng, K.W. *A manual for primary human cell culture*. World Scientific, Singapore, 2004
- [143] Scheffler, B., Horn, M., Blumcke, I., Laywell, E.D., Coomes, D., Kukekov, V.G. und Steindler, D.A. "Marrow-mindedness: a perspective on neurogenesis". *Trends Neurosci*, 22 (1999) 348–57
- [144] Schimmel, R.J., Honeyman, T.W., McMahon, K.K., Serio, R. und Clark, R.B. "Inhibition of cyclic AMP accumulation in hamster adipocytes with phosphatidic acid: differences and similarities with alpha adrenergic effects". *J Cyclic Nucleotide Res*, 6 (1980) 437–49
- [145] Schreml, S., Babilas, P., Fruth, S., Orso, E., Schmitz, G., Mueller, M.B., Nerlich, M. und Prantl, L. "Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction". *Cytotherapy*, 11 (2009) 947–57
- [146] Singh, S., Wu, B.M. und Dunn, J.C. "Accelerating vascularization in polycaprolactone scaffolds by endothelial progenitor cells". *Tissue Eng Part A*, 17 (2011) 1819–30
- [147] Song, X., Zhu, C.H., Doan, C. und Xie, T. "Germline stem cells anchored by adherens junctions in the Drosophila ovary niches". *Science*, 296 (2002) 1855–7
- [148] Spaniel-Borowski, K. "Zytologie und Histologie - Grundlagen". In: L. Wurzinger (Hrsg.) *Duale Reihe Anatomie*. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2010, S. 20–72
- [149] Spanholtz, T.A., Theodorou, P., Holzbach, T., Wutzler, S., Giunta, R.E. und Machens, H.G. "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF(165)) Plus Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Producing Cells induce a Mature and Stable Vascular Network-a Future Therapy for Ischemically Challenged Tissue". *J Surg Res*, 171 (2011) 329–38
- [150] Spear, S.L. und Jespersen, M.R. "Breast implants: saline or silicone?" *Aesthet Surg J*, 30 (2010) 557–70
- [151] Stacey, D.H., Hanson, S.E., Lahvis, G., Gutowski, K.A. und Masters, K.S. "In vitro adipogenic differentiation of preadipocytes varies with differentiation stimulus, culture dimensionality, and scaffold composition". *Tissue Eng Part A*, 15 (2009) 3389–99
- [152] Steldinger, R. und Klosterhalfen, T. "Gynäkologische Anatomie und ihre Störungen". In: *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007, S. 8–27
- [153] Strybny, J. und Romberg, O. "Poröse Medien, Grundwasser". In: J. Strybny (Hrsg.) *Ohne Panik Strömungsmechanik!*. Vieweg, 2007, S. 207–224
- [154] Suruga, K., Suzuki, R., Goda, T. und Takase, S. "Unsaturated fatty acids regulate gene expression of cellular retinol-binding protein, type II in rat jejunum". *J Nutr*, 125 (1995) 2039–44

- [155] Swierczewski, E., Pello, J.Y., Arapinis, C., Aron, Y. und Krishnamoorthy, R. "Characterization of rat preadipocytes from normal rat adipose tissue by their effector response". *Biochem J*, 248 (1987) 383–7
- [156] Tachi, M. und Yamada, A. "Choice of flaps for breast reconstruction". *Int J Clin Oncol*, 10 (2005) 289–97
- [157] Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. und Yamanaka, S. "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors". *Cell*, 131 (2007) 861–72
- [158] Takahashi, K. und Yamanaka, S. "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors". *Cell*, 126 (2006) 663–76
- [159] Takaoka, M., Nagata, D., Kihara, S., Shimomura, I., Kimura, Y., Tabata, Y., Saito, Y., Nagai, R. und Sata, M. "Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling". *Circ Res*, 105 (2009) 906–11
- [160] Takase, S., Tanaka, K., Suruga, K., Kitagawa, M., Igarashi, M. und Goda, T. "Dietary fatty acids are possible key determinants of cellular retinol-binding protein II gene expression". *Am J Physiol*, 274 (1998) G626–32
- [161] Tanaka, Y., Sung, K.C., Tsutsumi, A., Ohba, S., Ueda, K. und Morrison, W.A. "Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation?" *Plast Reconstr Surg*, 112 (2003) 1636–44
- [162] Tang, Y.L., Zhao, Q., Zhang, Y.C., Cheng, L., Liu, M., Shi, J., Yang, Y.Z., Pan, C., Ge, J. und Phillips, M.I. "Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium". *Regul Pept*, 117 (2004) 3–10
- [163] Tanzi, M.C. und Fare, S. "Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches". *Expert Rev Med Devices*, 6 (2009) 533–51
- [164] Tenzen, T., Zembowicz, F. und Cowan, C.A. "Genome modification in human embryonic stem cells". *J Cell Physiol*, 222 (2010) 278–81
- [165] Torio-Padron, N., Baerlecken, N., Momeni, A., Stark, G.B. und Borges, J. "Engineering of adipose tissue by injection of human preadipocytes in fibrin". *Aesthetic Plast Surg*, 31 (2007) 285–93
- [166] Tseng, Y.H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L., Winnay, J.N., Taniguchi, C.M., Tran, T.T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., Ahrens, M.J., Dudley, A.T., Norris, A.W., Kulkarni, R.N. und Kahn, C.R. "New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure". *Nature*, 454 (2008) 1000–4
- [167] Tumber, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W.E., Rendl, M. und Fuchs, E. "Defining the epithelial stem cell niche in skin". *Science*, 303 (2004) 359–63
- [168] Turner, R., Lozoya, O., Wang, Y., Cardinale, V., Gaudio, E., Alpini, G., Mendel, G., Wauthier, E., Barbier, C., Alvaro, D. und Reid, L.M. "Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology". *Hepatology*, 53 (2011) 1035–45

- [169] Ueberreiter, K., von Finckenstein, J.G., Cromme, F., Herold, C., Tanzella, U. und Vogt, P.M. “[BEAULI™—a new and easy method for large-volume fat grafts]”. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 42 (2010) 379–85
- [170] Ulfig, N. *Kurzlehrbuch Histologie*. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005
- [171] Vailhe, B., Vittet, D. und Feige, J.J. “In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis”. *Lab Invest*, 81 (2001) 439–52
- [172] Verhaegen, M., Correze, C., Krug, E. und Nunez, J. “Cyclic AMP and lipogenesis in fat cells from thyroidectomized rats”. *Mol Cell Endocrinol*, 14 (1979) 167–80
- [173] Vona-Davis, L. und Rose, D.P. “Angiogenesis, adipokines and breast cancer”. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20 (2009) 193–201
- [174] Wabitsch, M., Hauner, H., Heinze, E. und Teller, W.M. “The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation”. *Metabolism*, 44 (1995) 45–9
- [175] Weiser, B., Prantl, L., Schubert, T.E., Zellner, J., Fischbach-Teschl, C., Spruss, T., Seitz, A.K., Tessmar, J., Goepferich, A. und Blunk, T. “In vivo development and long-term survival of engineered adipose tissue depend on in vitro precultivation strategy”. *Tissue Eng Part A*, 14 (2008) 275–84
- [176] Welsch, U. *Sobotta Lehrbuch Histologie*. 2. Auflage. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München [u.a.], 2006
- [177] Wenger, R. *Handbuch der .NET 4.0-Programmierung Band 1 C# und .NET-Grundlagen*. 1. Auflage. Microsoft Press, Köln, 2010
- [178] Wernig, M., Scheffler, B. und Brüstle, O. “Medizinische Perspektiven der Stammzellforschung”. In: D. Ganten und K. Ruckpaul (Hrsg.) *Grundlagen der Molekularen Medizin*. 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin [u.a.], 2003, S. 680–710
- [179] Wiggenhauser, P.S., Melchels, F.P., Hutmacher, D.W., Machens, H.G., Ong, F.R. und Schantz, J.T. “Fabrication of a customized tissue engineering scaffold for breast reconstruction - Abstracts from Termis EU 2011 Granada”. *Histology and Histopathology*, 26 supplement 2 (2011) 23
- [180] Wiggenhauser, P.S., Müller, D.F., Melchels, F.P.W., Egaña, J.T., Storck, K., Mayer, H., Leuthner, P., Skodacek, D., Hopfner, U., Machens, H.G., Staudenmaier, R. und Schantz, J.T. “Engineering of vascularized adipose constructs”. *Cell Tissue Res*, 347 (2012) 747–57
- [181] Wolfram, D., Schoeller, T., Hussl, H. und Wechselberger, G. “The superficial inferior epigastric artery (SIEA) flap: indications for breast reconstruction”. *Ann Plast Surg*, 57 (2006) 593–6
- [182] Wu, X., Ren, J. und Li, J. “Fibrin glue as the cell-delivery vehicle for mesenchymal stromal cells in regenerative medicine”. *Cytotherapy*, 14 (2012) 555–62
- [183] Xie, T. und Spradling, A.C. “decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the Drosophila ovary”. *Cell*, 94 (1998) 251–60

- [184] Yang, Y.I., Kim, H.I., Choi, M.Y., Son, S.H., Seo, M.J., Seo, J.Y., Jang, W.H., Youn, Y.C., Choi, K.J., Cheong, S.H. und Shelby, J. "Ex vivo organ culture of adipose tissue for in situ mobilization of adipose-derived stem cells and defining the stem cell niche". *J Cell Physiol*, 224 (2010) 807–16
- [185] Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., Sato, K., Inoue, K., Nagase, T., Koshima, I. und Gonda, K. "Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates". *J Cell Physiol*, 208 (2006) 64–76
- [186] Zhang, Z., Ito, W.D., Hopfner, U., Bohmert, B., Kremer, M., Reckhenrich, A.K., Harder, Y., Lund, N., Kruse, C., Machens, H.G. und Egana, J.T. "The role of single cell derived vascular resident endothelial progenitor cells in the enhancement of vascularization in scaffold-based skin regeneration". *Biomaterials*, 32 (2011) 4109–17
- [187] Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P. und Hedrick, M.H. "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies". *Tissue Eng*, 7 (2001) 211–28
- [188] Zulewski, H., Abraham, E.J., Gerlach, M.J., Daniel, P.B., Moritz, W., Müller, B., Vallejo, M., Thomas, M.K. und Habener, J.F. "Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes". *Diabetes*, 50 (2001) 521–33

7.2 Publikationen

Fachzeitschriften

1. Wiggenhauser, P.S., Müller, D.F., Melchels, F.P.W., Egana, J.T., Storck, K., Mayer, H., Leuthner, P., Skodacek, D., Hopfner, U., Machens, H.G., Staudenmaier, R. und Schantz, J.T. "Engineering of vascularized adipose constructs". *Cell Tissue Res*, 347 (2012) 747-57
2. Melchels, F., Wiggenhauser, P.S., Warne, D., Barry, M., Ong, F.R., Chong, W.S., Hutmacher, D.W. und Schantz, J.T. "CAD/CAM-assisted breast reconstruction". *Biofabrication*, 3 (2011) 034114

Buchbeiträge

1. Wiggenhauser, P.S. und Rubin, J.P. "Adipose Tissue Engineering - Clinical Applications In Breast Surgery". In: J.T. Schantz und D.W. Hutmacher (Hg.) *A Manual for Current Therapies in Regenerative Medicine*. World Scientific, Singapore, 2013

Zitierfähige Vorträge

1. Wiggenhauser, P., Mueller, D., Hutmacher, D., Melchels, F., Storck, K., Staudenmaier, R., Machens, H. und Schantz, J. "Evaluation of different scaffold designs for vascularized adipose tissue engineered constructs - Abstracts from Termis EU 2011 Granada". *Histology and Histopathology*, 26 supplement 2 (2011) 5
2. Wiggenhauser, P.S., Melchels, F.P., Hutmacher, D.W., Machens, H.G., Ong, F.R. und Schantz, J.T. "Fabrication of a customized tissue engineering scaffold for breast reconstruction - Abstracts from Termis EU 2011 Granada". *Histology and Histopathology*, 26 supplement 2 (2011) 23

Vorträge

1. Melchels, F.P., Wiggenhauser, P.S., Schantz, J.T. und Hutmacher, D.W. "Breast reconstruction using CAD/CAM and adipose tissue engineering", 2011. 9. *Biomaterials World Conference*
2. Wiggenhauser, P.S., Hutmacher, D.W., Machens, H.G., Ong, F.R., chong, W.S. und Schantz, J.T. "Individual breast reconstruction with 3d imaging and tissue engineering", 2011. 128. *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie*
3. Melchels, F.P., Wiggenhauser, P.S., Hutmacher, D.W. und Schantz, J.T. "CAD/CAM-assisted breast reconstruction following a tissue engineering approach". *ABSTE Conference 2011*
4. Wiggenhauser, P.S., chong, W.S., Hutmacher, D.W., Machens, H.G., Müller, D.F., Ong und Schantz, J.T. "Die patientenspezifische Brustrekonstruktion mit einem maßgeschneiderten Gewebsimplantat", 2010. 41. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgie*

7.3 Danksagung

Meine Doktorarbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen. Zu aller erst danke ich Herrn PD. Dr. Jan-Thorsten Schantz als geistigen Vater dieses Projektes, der mich wissenschaftlich aufgebaut, mich in meinen Vorhaben unterstützt und in Fragen zum Studium stets hilfreich beraten hat. Gleichfalls danke ich Herrn Dr. Daniel Müller für die Vernetzung mit der Arbeitsgruppe Staudenmaier in der HNO Klinik.

Danken möchte ich auch Frau Ursula Hopfner, die mich von meiner ersten Stunde an im Labor begleitet hat. Im Sommer 2009 hat sie mich in die Arbeit im Zellkulturlabor eingeführt und seither stets mit Tipps und Tricks aus ihrer großen Erfahrung unterstützt. Ich danke Frau Manuela Kirsch für die Unterstützung bei der Histologie. Darüber hinaus danke ich Ann Reckhenrich, Thomas Egana, Ziyang Zhang und Thilo Schenk für die wissenschaftlichen Dialoge und unterhaltsame Zeit im Labor.

Darüber hinaus danke ich Lena Mayer und Peter Leuthner für ihre Unterstützung im Maus Modell, welches ich mit Hilfe der HNO Klinik durchgeführt habe. Von Herrn Peter Leuthner habe ich die Technik des Vessel Loops erlernt und von Frau Lena Mayer wurde ich in der Vorbereitung der Tierversuche unterstützt.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Hans-Günther Machens für die Bereitstellung von Geldern sowohl für die Versuche selbst als auch für die Teilnahme an Kongressen. Ohne diese Gelder wären mir zahlreiche Möglichkeiten entgangen.

Abschließend danke ich noch den Patientinnen, welche der Verwendung von Gewebeproben für die Forschung zugestimmt und so diese Studie erst möglich gemacht haben.

Darüber hinaus danke ich noch allen, die nicht explizit erwähnt wurden und mich in den letzten Jahren auf meinem Weg durchs Labor begleitet haben.

Ich danke allen für ihre Unterstützung und vor allem für die Menschlichkeit, die gerade das Laborleben angenehm, spannend und schön gemacht hat.

München, den 30. Mai 2014

.....
gez. Paul Severin Wiggerhauser

7.4 Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Humanmedizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel: „Herstellung vaskularisierter Fettgewebstrukture – Einfluss der Scaffold-Architektur auf die Adipogenese und Integration ins Gewebe“ in der Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie am Klinikum München rechts der Isar ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Die vollständige Dissertation wurde in mediaTUM veröffentlicht. Die Fakultät für Humanmedizin hat der Vorveröffentlichung zugestimmt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Ich habe weder an dieser noch an einer anderen Fakultät bzw. Universität bisher eine Promotionsschrift vorgelegt.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den 30. Mai 2014

.....
gez. Paul Severin Wiggerhauser