



Technische Universität München
Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier)

Adipose Tissue Engineering mit humanen mesenchymalen Stammzellen am Mausmodell

Reyk Sören Fischer

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

Vorsitzender:

Prüfer der Dissertation:

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

1. apl. Prof. Dr. R. Staudenmaier

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

Die Dissertation wurde am 12.11.2015 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.09.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	3
1. Verzeichnis der Abkürzungen	6
2. Einleitung	8
2.1. Hintergrund	8
2.2. Fettgewebe	9
2.3. Adipose Tissue Engineering	10
2.3.1. Mesenchymale Stammzellen zum Zwecke des Adipose Tissue Engineerings	10
2.3.2. Biomaterialien zum Zwecke der Formstabilität (Scaffolds)	12
2.3.3. Wirkungsspektrum der ASCs und deren Vorbehandlung	13
2.3.4. Vaskularisation der Konstrukte	15
3. Material und Methoden	16
3.1. Zellkultur	16
3.1.1. Isolation und Kultivierung.....	16
3.1.2. Passagierung.....	17
3.2. Scaffolds	17
3.3. Herstellung des langzeitstabilen Fibringels	18
3.4. Herstellung einer dreidimensionalen Zellkultur	18
3.5. Induktion	19
3.6. Versuchstiere	19
3.7. Gruppeneinteilung	19
3.8. Operationstechnik	20
3.8.1. Implantation der Konstrukte	20
3.8.2. Explantation der Konstrukte.....	22
3.9. Histologische Aufarbeitung	22
3.9.1. Paraffineinbettung und Anfertigung der Schnitte	22
3.9.2. Entparaffinierung und Bewässerung	23
3.9.3. Trichromfärbung nach Ladewig	23
3.9.4. Antikörperfärbung mit Vimentin-Antikörper SP20.....	24

3.10. Auswertung	25
3.10.1. Fotografien und Gewichtbestimmung.....	25
3.10.2. Auszählung.....	26
3.10.3. Statistische Auswertung	27
3.11. Materialien	28
3.11.1. Medien und Reagenzien	28
3.11.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
4. Ergebnisse	30
4.1. Auswertung der Nackenkonstrukte	31
4.2. Auswertung der Leistenkonstrukte	31
4.3. Volumenstabilität der Konstrukte	36
4.4. Auswirkung des Gefäßanschlusses	36
4.4.1. Anzahl der Fettzellen	37
4.4.2. Anzahl der Gefäßanschnitte	37
4.4.3. Konstruktgewichte.....	38
4.5. Auswirkung der Induktion und der ASCs	39
4.5.1. Randbereich.....	40
4.5.2. Kernbereich	41
4.6. Auswirkung der Fettlappenplastik	41
4.7. Vimentin-Antikörper-Färbung	42
5. Diskussion	44
5.1. Polyurethan zum Zwecke des Adipose Tissue Engineerings	44
5.2. Adipose derived stem cells, deren Induktion und das Potential endogener Stammzellen ...	45
5.3. Die Vaskularisation als Schlüsselfaktor des Adipose Tissue Engineerings	48
5.4. Limitationen des Studiendesigns	50
5.5. Ausblick	51
6. Zusammenfassung	51
7. Anhang	53
7.1. Abbildungsverzeichnis	53
7.2. Tabellenverzeichnis	54

7.3. Literaturverzeichnis.....	54
8. <i>Eidesstattliche Erklärung</i>.....	59
9. <i>Curriculum Vitae</i>.....	60
10. <i>Danksagung</i>.....	61

1. Verzeichnis der Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Fläche
A. / V. Femoralis	Arteria / Vena Femoralis
Abb.	Abbildung
AFN	Atipamezol, Flumazenil, Naloxon
ANOVA	Analysis of variance
AP	Alkalische Phosphatase
ASC	adipose derived stem cell
BAT	brown adipose tissue
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMSCs	bone marrow derived stem cell
BSA	Bovines Serum Albumin
ca.	circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
C/EBP	Ccaat-enhancer-binding proteins
CO ₂	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
dest.	Destilliertes
DIEP	Deep Inferior Epigastric Perforator
DMEM	Dulbecco´s modified eagle´s medium
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Fluorescein Diacetat
Engl.	Englisch
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HNO	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
IBMX	Isobutylmethylxanthin
Ind.	Induktion

i.p.	intraperitoneal
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
MEFO	Methanol-Formaldehyd
min.	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MMF	Medetomidin, Midazolam, Fentanyl
MSC	mesenchymal stem cell
° C	Grad Celsius
o.g.	oben genannt
OP	Operation
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PGA	Polyglycolic acid
PGM	Preadipocyte Growth Medium
PI	Propidium Iodide
PLGA	Polyactid-co-Glycolid acid
PU	Polyurethan
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SVF	stromal vascular fraction
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TE	Tissue engineering
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular Epidermal growth factor
wt%	Prozent des Gewichts
WAT	white adipose tissue
z. B.	zum Beispiel
zw.	Zwischen

2. Einleitung

Noch immer ist man in der rekonstruktiven Medizin auf der Suche nach einem adäquaten Weichteilersatz. Das „Adipose Tissue Engineering“ (als Überbegriff der künstlichen Herstellung biologischen Fettgewebes) bietet in diesem Bereich neue Lösungsansätze. Trotz vieler erfolgsversprechender Studien hat sich bis heute noch kein Goldstandard herauskristallisiert. Es ist weiterhin unklar unter welchen Bedingungen sich neues Fettgewebe am besten in vivo generieren lässt. In der vorliegenden Arbeit wird mittels eines Tierversuches nach Verbesserungsmöglichkeiten in diesem Bereich gesucht. Hierfür wurden Polyurethanschaumstoffe mit humanen mesenchymalen Stammzellen besiedelt und in 25 Nacktmäuse subkutan implantiert. Nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Wochen wurden die Konstrukte wieder explantiert und miteinander verglichen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet und mit der aktuellen Literatur verglichen.

2.1. Hintergrund

In der rekonstruktiven und plastischen Chirurgie gibt es eine Vielzahl an Behandlungen von kongenitalen, postoperativen oder posttraumatischen Weichteildefekten. So wurden zum Beispiel im Jahr 2010 5,3 Millionen rekonstruktive Eingriffe von der amerikanischen Gesellschaft für plastische Chirurgie erfasst, zwei Prozent mehr als im Vorjahr, über 75% davon nach Tumorsektionen (American Society of Plastic Surgeons). Diese Statistiken zeigen den ständig wachsenden Bedarf an Transplantaten, welche idealerweise nicht nur die Oberflächenkontur wiederherstellen, sondern auch die biologischen Funktionen des zu ersetzenden Weichteilgewebes zu übernehmen vermögen.

Die derzeit in der Klinik angewandten Verfahren zum Ersatz der Weichteildefekte gehen in verschiedene Richtungen. Eine Methode besteht darin, das verlorengegangene Gewebe durch natürliche (z.B. Kollagen) oder synthetische (z.B. Silikon) Materialien zu ersetzen. Wesentliche Nachteile dieser Materialien wie zum Beispiel allergische Reaktionen, Langzeitresorption, Bildung fibrotischer Kapseln, suboptimale mechanische Eigenschaften, Verformungen und Oberflächendiffusion konnten bislang jedoch nicht befriedigend gelöst werden (Patrick 2001). Eine andere Methode besteht in der Transplantation von körpereigenem Fettgewebe, welches ideal in Belangen wie Bioverträglichkeit, Immunantwort und Gewebsabstoßung erscheint (Neubauer et al. 2005). Die Transplantation freier autologer Fettlappen wird jedoch von insuffizienter Vaskularisierung limitiert, welche dann zu Nekrose, Resorption und damit verbundenem Volumenverlust führen kann (Patrick 2000). Um diesen Komplikationen vorbeugen zu können, wurden mikrochirurgische Verfahren mit Gefäßanschluss entwickelt, wie beispielsweise die so genannten DIEP-Flaps (Deep Inferior Epigastric Perforator Flap). Auch wenn diese Operationstechniken gute Resultate liefern, können Infektionen und große Narben an der Spenderstelle oft nicht vermieden werden. Außerdem

sind sie zum Teil sehr aufwändig und beanspruchen lange Operationszeiten, welche wiederum mit Risiken für den Patienten und hohen Kosten verbunden ist (Cristancho and Lazar 2011; Tachi and Yamada 2005). Ein weiterer Ansatz liegt in der subkutanen Injektion von autologem Fettgewebe, das so genannte Lipofilling. Vorteile liegen hierbei in der Vermeidung großer Narben und in kurzen Operationszeiten unter Verwendung minimalinvasiver Techniken. Die für die Fettgewinnung notwendige Liposuction schädigt die ausdifferenzierten Adipozyten jedoch in einem so großen Maße, dass Risiken wie lokale Nekrose, progressive Absorption und fibrotische Kapselbildung nicht vermieden werden können und eine wiederholte Injektion oft notwendig ist (Huss and Kratz 2002; Yoshimura et al. 2008).

Zusammenfassend stellt sich heraus, dass der Bedarf an geeigneten Transplantaten in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie ständig steigt, eine zufriedenstellende Lösung ohne die oben genannten Komplikationen und Limitierungen jedoch noch nicht gefunden wurde.

Die Ansätze des Adipose Tissue Engineering bieten neue vielversprechende Perspektiven in diesem Bereich. Ziel dabei ist, neues homologes Fettgewebe zu generieren, welches dem nativen Gewebe in Funktion, Struktur und mechanischen Eigenschaften entspricht und individuell zu applizieren ist. Um das zu erreichen müssen kritische Aufgaben wie u. a. die dauerhafte Beibehaltung von Form und Volumen, eine gute Integration und eine schnelle und suffiziente Vaskularisierung in einem für die Klinik relevanten Maß erfüllt werden (Bauer-Kreisel, Goepferich, and Blunk 2010).

Nach einer kurzen Einführung in das Thema mit dem aktuellen Stand der Wissenschaft wird in der vorliegenden Arbeit, unter Einbezug der aktuellen Literatur und eigenen, arbeitsgruppeninternen Vorerkenntnissen, im Rahmen eines Tierversuches nach neuen Lösungsansätzen für diese Aufgabenstellung gesucht. Hierfür wurden Polyurethankonstrukte, besiedelt mit adipogenen humanen mesenchymalen Stammzellen, in Nacktmäuse implantiert. Nach einer Beobachtungsphase von zwölf Wochen wurde beurteilt, unter welchen Bedingungen das meiste neue Fettgewebe entstanden ist.

2.2. Fettgewebe

Im menschlichen Körper gibt es zwei unterschiedliche Arten von Fettgewebe, weißes (engl. white adipose tissue, WAT) und braunes Fettgewebe (engl. brown adipose tissue, BAT). Im Fokus der aktuellen Tissue Engineering Forschung steht vor allem WAT, darum wird BAT in dieser Arbeit nicht betrachtet.

Ausgangspunkt bei der Entstehung von WAT sind embryonale Stammzellen aus dem Mesoderm. Diese differenzieren sich über Zwischenschritte wie adulte mesenchymale Stammzellen und Präadipozyten zu adulten Adipozyten aus (Gesta, Tseng, and Kahn 2007; Tang and Lane 2012).

WAT ist an den unterschiedlichsten Stellen im menschlichen Körper lokalisiert und macht bei einem normalgewichtigen, erwachsenen Menschen 10 bis 29% des Körpergewichts aus. Es ist somit das größte menschliche Organ (Kahn 2008). Es besteht hauptsächlich aus reifen Adipozyten, aber auch

Endothelzellen, Perizyten, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Fettvorläuferzellen und mesenchymale Stammzellen sind wichtige Bestandteile. Betrachtet man die Fettzelle an sich besteht ein ausdifferenzierter, weißer Adipozyt aus einer solitären Fettvakuole, umgeben von einem dünnen Saum an Zytoplasma und einer Plasmamembran (Christiaens and Lijnen 2010; Gregoire, Smas, and Sul 1998).

Neben endokrinen Funktionen, mechanischem Schutz und der Erhaltung der Oberflächenkontur ist die Hauptfunktion von WAT die Regulation des menschlichen Energiehaushaltes. Wird Energie benötigt, leiten katabole Hormone die Lipolyse der in der Fettvakuole enthaltenen Triglyceride ein und freie Fettsäuren werden ins Blut abgegeben. Ist Energie überschüssig, werden Triglyceride von Enzymen der Lipogenese synthetisiert und in der Fettvakuole eingespeichert (Tang and Lane 2012). Diese Mechanismen führen zu einem extrem hohen Metabolismus und zu einer hohen Plastizität von WAT. Damit zusammenhängend ist auch die Kapillarendichte von WAT, verglichen mit anderen Gewebearten, auffällig hoch. Jeder Adipozyt ist mit mindestens einer Kapillare verbunden.

Das Wachstum von WAT kann sowohl durch Hyperplasie und der damit verbundenen Neovaskularisierung erfolgen, als auch durch Hypertrophie mit verbundenem Umbau des bestehenden Gefäßsystems. In beiden Fällen scheinen Faktoren der Angiogenese die Regulation der Adipogenese zu beeinflussen, sodass sich bei der Entstehung von Fett die Vaskularisation als ein entscheidender Faktor herauskristallisiert. (Bauer-Kreisel, Goepferich, and Blunk 2010; Christiaens and Lijnen 2010; Kahn 2008).

2.3. Adipose Tissue Engineering

In diesem Abschnitt werden wichtige Faktoren mit dem aktuellen Stand der Wissenschaft des Adipose Tissue Engineerings herausgearbeitet. Entscheidende Komponenten hierbei sind

- (1) die verwendeten Zellen und deren Gewinnung,
- (2) das verwendete Biomaterial zum Zwecke der Formstabilität (das „Baugerüst“, engl. Scaffold), (3) die in vitro Vorbehandlung der Zellen bzw. Scaffolds und
- (4) die Sicherstellung einer suffizienten Perfusion des implantierten Konstrukts.

2.3.1. Mesenchymale Stammzellen zum Zwecke des Adipose Tissue Engineerings

Folgende Eigenschaften wären für eine Zelle als Ausgangspunkt des Adipose Tissue Engineerings wünschenswert: sie sollte in großen Mengen verfügbar sein, eine minimalinvasive Gewinnung und eine reproduzierbare Kultivierung sollten realisierbar sein, ihr Differenzierungs- und Proliferationspotential sollte vorhersehbar wenn nicht sogar steuerbar sein, und sie sollten in autologes oder autogenes Gewebe zu transplantieren sein (Bunnell et al. 2008).

Die schlechte Toleranz gegenüber mechanischer und hypoxischer Belastungen, welche bei der Gewinnung und Transplantation entstehen, macht ausdifferenzierte Adipozyten ungeeignet für diesen Zweck. So endeten bisherige Versuche der Transplantation durch insuffiziente Vaskularisierung oft mit Nekrose und Volumenverlust. Auch ihr ausdifferenzierter Status mit der Unfähigkeit zu proliferieren ist ein unüberwindbares Hindernis (Patrick 2001).

Aus diesem Grund liegt das Hauptaugenmerk der aktuellen Forschung auf Fettvorläuferzellen. Nach guten *in vitro* als auch *in vivo* Ergebnissen mit Zelllinien muriner Präadipozyten, wie z.B. die Zelllinien 3T3-L1 oder 3T3-F442A (Fischbach et al. 2004; Green and Kehinde 1975), ist es auch gelungen, humane Fettvorläuferzellen für diesen Zweck zu nutzen.

Vor allem multipotente adulte mesenchymale Stammzellen (engl. mesenchymal stem cells, MSCs) werden aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften häufig verwendet. Diese haben die Fähigkeit sich in verschiedene Zelltypen, wie unter anderen in Adipozyten, Myozyten, Chondrozyten und Osteozyten, zu differenzieren (Gesta, Tseng, and Kahn 2007; Tang and Lane 2012). Auch konnte gezeigt werden, dass ihr Proliferationspotential sich über mehrere Generationen erstreckt. Laut Studien sollen passagierte MSCs, verglichen mit der Primärkultur, eine reduzierte Expression von Oberflächenantigenen aufweisen, welche für die Transplantation in allogenes Gewebe von Vorteil wäre (Gimble, Katz, and Bunnell 2007).

MSCs können unter anderem aus Fettgewebe (engl. adipose derived stem cells, ASCs) und aus Knochenmark (engl. bone marrow derived stem cells, BMSCs) gewonnen werden. Ob oder in wie weit sich diese Zellen unterschiedlicher Herkunft voneinander unterscheiden, konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Neben vielen Gemeinsamkeiten in Sachen Morphologie, Oberflächenmarkern und Zytokinexpression bestehen Vermutungen, dass sie sich in ihrem Differenzierungsverhalten durchaus unterscheiden und das Proliferationspotential der ASCs länger erhalten bleibt (Puissant et al. 2005; Liu et al. 2007).

Die Gewinnung aus dem Knochenmark gestaltet sich wegen des höheren Komplikationsrisikos und der niedrigen Dichte an BMSCs jedoch schwierig (Auquier et al. 1995). Im Gegensatz dazu ist subkutanes Fettgewebe durch steigende Inzidenz an Adipositas in den westlichen Ländern in großen Mengen verfügbar und leicht zu gewinnen (Bunnell et al. 2008). Ein oft angewandtes minimalinvasives Verfahren zur Gewinnung von subkutanem Fettgewebe ist beispielsweise die sogenannte Liposuction (Fettabsaugung) mit über 200.000 Eingriffen pro Jahr allein in den U.S.A. (American Society of Plastic Surgeons). Aus dem hierbei gewonnenen Gewebe können ASCs, lokalisiert im sogenannten vaskulären Stroma (engl. stromal vascular fraction, SVF), unbeschädigt und in ausreichenden Mengen isoliert und kultiviert werden (Zuk et al. 2002). Entscheidend hierfür ist ihre Plastikadhärenz, die sie von anderen Zellen aus dem SVF unterscheidet (Bunnell et al. 2008).

In Betracht der einfachen Gewinnung, der großen Verfügbarkeit und dem hohen Potential zu differenzieren und proliferieren erscheinen ASCs als gut geeignet für Zwecke des Adipose Tissue

Engineerings und werden daher auch bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsaufbau verwendet.

2.3.2. Biomaterialien zum Zwecke der Formstabilität (Scaffolds)

Da eines der Hauptziele des Adipose Tissue Engineerings im Ersatz von defektem bzw. erkranktem Gewebe nach dessen Explantation besteht, ist die Gewährleistung von Volumen- und Formstabilität des neu generierten Gewebes eine der großen Herausforderungen die es zu bewältigen gilt. Bestenfalls sollte das neu generierte Gewebe der individuellen Form des entnommenen, defekten Gewebes angepasst werden können. Weil implantierte ASCs dies zu Beginn allein nicht gewährleisten können, muss auf zusätzliches Biomaterial zur Unterstützung zurückgegriffen werden.

Anforderungen an das zu diesem Zwecke verwendete Biomaterial bestehen dabei neben der erwähnten Volumen- und Formstabilität auch in der Bioverträglichkeit, der Möglichkeit der Besiedelung mit Zellen und der biologischen Resorption des Materials. Wünschenswert wäre ein Material, das zu Beginn in Bezug auf Form und Beschaffenheit dem entnommenen Gewebe ähnelt und gleichzeitig den neu implantierten Zellen so lange ideale Voraussetzungen zum Proliferieren und Differenzieren bietet, bis diese das „Gerüst“ nicht länger benötigen und es langsam resorbieren.

Die Lösungsansätze dieser Aufgabenstellung sind vielseitig, es kommen sowohl biologische als auch synthetische Substanzen zum Einsatz. Ein Ansatz nutzt zum Beispiel biologische Gele als Bindemittel für die zu implantierenden Zellen. Neben Matrigel, ein Proteinmix gewonnen aus einem Sarkom der Maus, Myogel (gewonnen aus Skelettmuskel) oder Fibringel stehen heute noch viele andere solcher Substanzen zur Verfügung, mit denen in einer Vielzahl an Studien bereits erfolgreich neues Fettgewebe in vivo gezüchtet werden konnte (Wittmann et al. 2013; Torio-Padron et al. 2007; Abberton et al. 2008; Kawaguchi et al. 1998). Vorteile dieser Substanzen bestehen in der guten Bioverträglichkeit, der einfachen Besiedelung mit Zellen und der einfachen Applikation via subkutaner Injektion. Eine Limitation hingegen besteht in dem schnellen biologischen Abbau und der niedrigen Formstabilität der Gele, das in Langzeitversuchen immer in vollständiger Resorption des gezüchteten Gewebes endete (Casadei et al. 2012). Unter diesem Aspekt entwickelte Eyrich et al. ein Verfahren zur Herstellung eines langzeitstabilen Fibringels, welches immerhin über einen Beobachtungszeitraum von drei Wochen seine Stabilität beibehalten konnte (Eyrich et al. 2007). Dieser Sachverhalt konnte bereits in einem arbeitsgruppeninternen Versuch bestätigt werden (Wittmann et al. 2013).

Ein weiterer Ansatz sind Scaffolds aus Silikon oder Polycarbonat mit einem zentralen Hohlraum, welche die Volumen- und Formstabilität gewährleisten sollen. Auch mit dieser Methodik konnte bereits erfolgreich neues Fett innerhalb des Hohlraums in Langzeitversuchen generiert werden (Walton, Beahm, and Wu 2004) (Findlay et al. 2009). Die nicht gegebene biologische Abbaubarkeit

der dabei verwendeten Materialien erfordert jedoch aufwändige Operationen sowohl zur Im- als auch zur Explantation, welche die klinische Verwendung dieser Scaffolds limitieren.

Ein weiterer Ansatz besteht in der Verwendung poröser Scaffolds. Neben biologischen Substanzen wie Seide, quervernetzter Hyaluronsäure oder Kollagen, werden auch synthetische Materialien wie zum Beispiel Polylactide, Polyglycolsäuren, Polyethylenglycole oder Polyurethane verwendet. Durch Variation des molekularen Gewichts der synthetischen Substanzen kann der Zeitraum des biologischen Abbaus gesteuert werden (McBane et al. 2011; Gopferich 1996; Lavik and Langer 2004). Auch in Sachen Bioverträglichkeit und Formstabilität zeigen diese Substanzen durchaus vorteilhafte Eigenschaften, welche bereits zur erfolgreichen Fettgenerierung in vivo beigetragen haben (Fischbach et al. 2004; Wiggenhauser et al. 2012; Choi, Park, and Suh 2005). Nachteile dieser Substanzen bestehen zum Teil in der schwierigen Besiedelung mit Zellen, da diese nicht immer von allein an das synthetische Material adhären. Ein anderer möglicher Nachteil von Polylactiden und Polyglycolsäuren sind ihre Abbauprodukte, welche ein saures Milieu verursachen und so für die Adipogenese unvorteilhaft sein könnten (Gopferich 1996). Ein weiterer Punkt der bei der Verwendung poröser Scaffolds beachtet werden muss, ist die jeweilige Porengröße des Materials. In Studien mit porösen Kollagenscaffolds konnte ein Zusammenhang zwischen der Porengröße des Materials und der darin stattfindenden Adipogenese gezeigt werden. Grundlegend hierfür ist die besonders ausgeprägte Größendifferenz zwischen undifferenzierter Zelle (Durchmesser ca. 10µm) und einem reifen Adipozyten mit einem Durchmesser von bis zu 100µm (von Heimburg et al. 2003).

In Anbetracht der Vor- und Nachteile der hier aufgelisteten Substanzen wird in dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsaufbau eine Kombination aus einem langzeitstabilen Fibringel und einem Polyurethanscaffold mit einer Porengröße von 400µm verwendet (Wiese and Maier 2007). Dadurch werden die genannten Vorteile des Fibringels genutzt, ohne an Form- oder Volumenstabilität einzubüßen, wie es in arbeitsgruppeninternen Vorversuchen bereits erfolgreich gezeigt werden konnte (Wiggenhauser et al. 2012; Wittmann et al. 2013).

2.3.3. Wirkungsspektrum der ASCs und deren Vorbehandlung

Es wurde in den letzten Jahren viel Aufwand betrieben um herauszufinden, unter welcher Vorbehandlung ASCs am besten zur Generierung von neuem Fettgewebe beitragen können. Hierbei ist neben dem eigenen Differenzierungs- und Proliferationsverhalten der ASCs auch deren Effekt auf das lokale, wirtseigene Gewebe und den darin enthaltenen endogenen Stammzellen entscheidend.

Ursprüngliche Ansätze des Adipose Tissue Engineerings zielten meist darauf ab, allein durch Proliferation und Differenzierung implantierter ASCs, neues Fettgewebe zu generieren. Heute besteht jedoch Grund zur Annahme, dass ASCs nach der Implantation mit dem lokalen Gewebe interagieren und kommunizieren. Die Überlegung dabei ist, dass ASCs durch Sekretion von Zytokinen, Antioxidantien und Wachstumsfaktoren wirtseigene endogene Stammzellen zur Differenzierung

stimulieren (Gimble, Katz, and Bunnell 2007). So konnte in mehreren in vivo Studien gezeigt werden, dass sowohl implantierte als auch wirtseigene Zellen im neu generierten Fettgewebe enthalten waren (Choi et al. 2009; Tsuji et al. 2009; von Heimburg et al. 2003). Auch Studien ohne zellbasiertem Ansatz berichten von erfolgreicher Gewebegenerierung in vivo, wodurch das Differenzierungspotential endogener Stammzellen ebenfalls unterstrichen wird (Yuksel et al. 2000).

Um die Auswirkung von ASCs auf die lokale Gewebsentwicklung besser erfassen zu können, wurden bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuch sowohl mit ASCs besiedelte als auch unbesiedelte Scaffolds auf die gleiche Weise vorbehandelt, implantiert und nach einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen miteinander verglichen.

Was das eigene Differenzierungs- und Proliferationsverhalten der ASCs betrifft, ist es von besonderem Interesse, in wieweit und auf welche Weise dieses gesteuert werden kann. Reguliert wird dieser Differenzierungsprozess von einem Netzwerk aus mehreren Transkriptionsfaktoren. Diese wiederum steuern die Expression hunderter Proteine, die verantwortlich für die Ausbildung des Phänotyps einer reifen Fettzelle sind. Im Zentrum dieses Netzwerks stehen zwei Haupttranskriptionsfaktoren, $PPAR\gamma$ und $C/EBP\alpha$, die den gesamten terminalen Differenzierungsprozess regulieren. Mehrere bereits gut etablierte Substanzen können an unterschiedlichen Stellen in dieses Netzwerk eingreifen, was in Abb. 1 nochmals veranschaulicht wird.

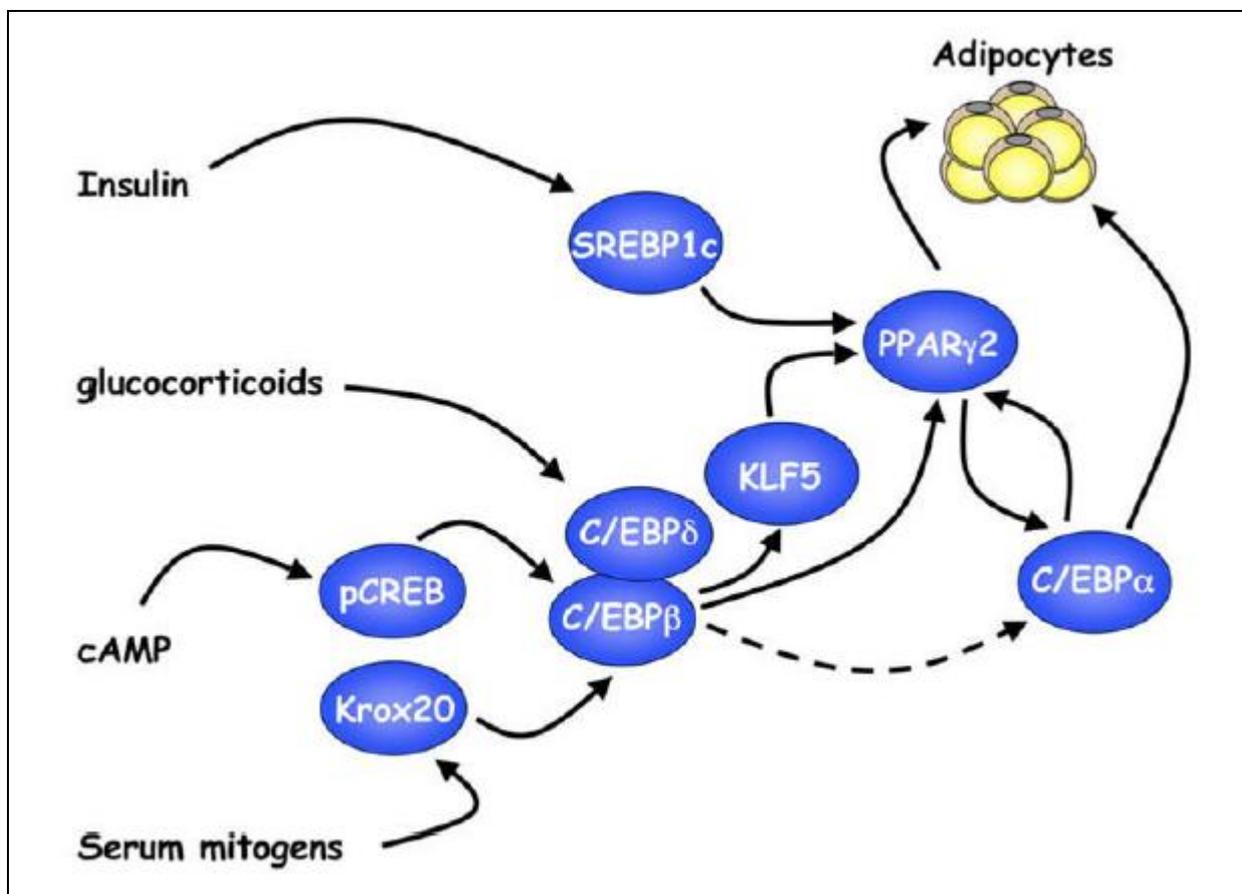


Abb. 1: Schematische Darstellung zur Induktion der Adipogenese durch eine Kaskade an Transkriptionsfaktoren modifiziert nach (Farmer 2006)

Angewendet werden solche Substanzen meistens in Mischform. Typische Bestandteile solcher Mischungen sind Glukokortikoide (z.B. Dexamethason), Phosphodiesterasehemmer zur Erhöhung des cAMP-Spiegels (z.B. Isobutylmethylxanthin, IBMX), und Insulin. Auch PPAR γ Agonisten wie z.B. Indomethacin können ergänzend wirken. Werden ASCs auf diese Weise stimuliert, treten sie wieder in den aktiven Zellzyklus ein und durchlaufen ihn mindestens zweimal. Während dieser Phase kann bereits die Expression von für die Adipogenese spezifischen Transkriptionsfaktoren beobachtet werden. Zusammen mit anderen Regulatoren des Zellzyklus ermöglichen diese wiederum die Expression von PPAR γ und C/EBP α , die die terminale Differenzierung einleiten. Erkennbar ist dieser Schritt an der Ausbildung von Fettvakuolen und an einem für Fettzellen spezifischen Metabolismus (Farmer 2006).

Obwohl ein positiver Effekt der Induktion in vielen Studien über die Fettgenerierung *in vitro* beobachtet werden konnte, wurde in vielen *in vivo* Studien darauf verzichtet (Bauer-Kreisel, Goepferich, and Blunk 2010).

Um den Effekt der Induktion *in vivo* besser erfassen zu können, wurden in dieser Arbeit sowohl induzierte als auch nicht induzierte ASCs mit Polyurethanscaffolds implantiert und nach einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen miteinander verglichen.

Der letzte wichtige Aspekt der bei der Vorbehandlung der Zellen beachtet werden muss, ist der Zeitpunkt der Induktion. Dies betreffend konnte unsere kooperierende Arbeitsgruppe unter Prof. Dr. Torsten Blunk in einem Tierversuch mit murinen Präadipozyten der Zelllinie 3T3-L1 zeigen, dass eine Induktion im Zeitraum zwischen zwei bis neun Tagen vor Implantation die besten Ergebnisse liefert (Weiser et al. 2008).

2.3.4. Vaskularisation der Konstrukte

Dass die suffiziente Vaskularisation eine entscheidende Rolle für die Adipogenese innerhalb der Konstrukte spielt und derweil eine entscheidende Limitation in Bezug auf die Generierung von neuem Fettgewebe darstellt, wurde schon weiter oben im Text herausgearbeitet (siehe 2.2. Fettgewebe). Es gibt verschiedene Ansätze, diesem Problem vorzubeugen. Ein Beispiel hierfür ist die Verwendung von Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor* (EGF) und *basic fibroblast growth factor* (bFGF), die nachweislich einen positiven Effekt auf die Angiogenese und Adipogenese haben, wie es in zahlreichen Studien bereits belegt werden konnte (Hebert et al. 2009). Eine systemische Gabe oder eine Einarbeitung solcher Wachstumsfaktoren in das Trägermaterial ist jedoch limitiert, da es eine außerordentlich große Menge an hochreinem Protein benötigt, um nachweislich einen positiven Effekt auf die Angiogenese am Implantationsort zu erzeugen (Tabata et al. 1999; Yancopoulos et al. 2000).

Auch das Design der Scaffolds kann in Bezug auf die Vaskularisation eine Rolle spielen. So wurde durch die Herstellung von Scaffolds mit Mikrokanälen die Migration von neuen Blutgefäßen gefördert und so die Sauerstoffversorgung des gezüchteten Fettgewebes mit Erfolg verbessert (Lovett et al. 2009). Eine andere Möglichkeit besteht im Anschluss der Konstrukte an das wirtseigene Gefäßsysteme mit Hilfe von mikrochirurgischen Operationsverfahren. Hierfür wurden in vorangegangenen Studien in vivo die implantierten Konstrukte an Gefäßschlaufen, ligierten Gefäßen oder Durchflussgefäßen angeschlossen und so ebenfalls mit Erfolg die Vaskularisation gefördert (Lokmic and Mitchell 2008).

Trotz dieser vielversprechenden Lösungsansätze und der zum Teil erfolgreichen Generierung von neuem, vaskularisiertem Fettgewebe ist es bis heute nicht gelungen, über das Volumen von 1ml an neuem Gewebe hinauszukommen (Kimura et al. 2010).

Da für die rekonstruktive Chirurgie deutlich größere Präparate notwendig sein werden, ist der Anschluss an das wirtseigene Gefäßsystem für die klinische Anwendung wahrscheinlich unumgänglich. Darum wurde in dem in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuch hierauf das Hauptaugenmerk gelegt. Dafür wurden jeweils zwei Konstrukte in die beiden Leistenregionen einer Maus implantiert, ein Konstrukt mit und eins ohne Anschluss an ein wirtseigenes Durchflussgefäß (unter sonst vollkommen gleicher Vorbehandlung). Abschließend wurde nach einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen verglichen, in welchem der beiden Konstrukte mehr neues Fettgewebe entstanden ist und welches Konstrukt die bessere Neovaskularisation aufwies.

3. Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden der Aufbau, die Durchführung, die Auswertung des Tierversuches und alle dafür verwendeten Materialien detailliert beschrieben.

3.1. Zellkultur

Die Isolation und Kultivierung der Zellen sowie die Besiedelung der Scaffolds übernahm die Arbeitsgruppe unter Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk am Universitätsklinikum Würzburg. Alle Arbeiten wurden in Steriltechnik an einer Reinraumwerkbank durchgeführt. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.1.1. Isolation und Kultivierung

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Verfahren sind gut etabliert und wurden schon in einer Vielzahl von Studien angewendet (Bunnell et al. 2008; Neubauer et al. 2005; Wiggenhauser et al. 2012).

Mittels Liposuction wurde subkutanes Fettgewebe von vier gesunden Frauen gewonnen. Die Patientinnen waren zwischen 20 und 40 Jahre alt und hatten einen Body Mass Index zwischen 28 bis 33 kg/m².

Mittels einer Verdaulösung bestehend aus Kollagenase-Puffer (Hepes 0.1 M, NaCl 0.12 M, KCl 0.05 M, CaCl₂ 0.001 M, Glukose 0.005 M), 1.5% Bovinem Serum Albumin (BSA) und 0.1% Kollagenase NB4 (vom Clostridium Histolyticum) wurde das gewonnene Fettgewebe in einem Verhältnis von 2:1 für zwei Stunden bei 37°C mit Hilfe eines Horizontalschüttlers verdaut. Anschließend wurde die entstandene Lösung bei 2000U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstandene mehrschichtige Überstand, bestehend aus ausdifferenzierten Adipozyten und Verdaulösung, wurde verworfen. Das dem Boden anliegende Zellpellet wurde durch ein 70µm Zellsieb filtriert und mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen. Nach wiederholtem Filtrieren und Zentrifugieren wurde das Zellpellet anschließend mit Wachstumsmedium (PGM2 versetzt mit 10% Fetal Bovine Serum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin) in P75 Kulturflaschen gegeben und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Ausspülen der nicht am Plastik anhaftenden Zellen (v.a. Erythrozyten) wurde nach Abschütten des Mediums der Kulturflaschenboden mit PBS gewaschen. Den verbliebenen, am Plastik anhaftenden ASCs wurde danach wieder Wachstumsmedium zugeführt. Ein Mediumwechsel fand jeden 2. Tag statt.

3.1.2. Passagierung

Bei Erreichen einer Zelldichte von ca. 70% wurden die ASCs einmalig passagiert. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und der Kulturflaschenboden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 3ml 0,25% Trypsin/EDTA hinzugegeben und für 4 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch starkes Klopfen vom Boden gelöst und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Um die Wirkung des Trypsins zu stoppen wurden 6ml Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) hinzugegeben. Zur Isolierung der ASCs wurde das Gemisch in Falcons überführt und 10min bei 2000U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden wieder verworfen, das Zellpellet wurde mit 1ml ECGM vermischt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde jetzt die genaue Zellzahl in einem Gemisch von 10µl Zellpellet/ECGM-Lösung und 10µl 0,4% Trypanblaulösung bestimmt. Stark blau angefärbte, beschädigte Zellen wurden dabei nicht berücksichtigt. Je 1 Millionen Zellen pro P75 Kulturflasche wurden anschließend wieder mit Wachstumsmedium in den 37°C warmen Brutschrank gestellt.

3.2. Scaffolds

Als Gerüst wurden Schäume, hergestellt von der Firma Polymaterials AG (Kaufbeuren, Deutschland), verwendet. Hierbei handelt es sich laut Angaben des Herstellers um ein bioresorbierbares, vernetztes poly(ε-caprolakton)-basiertes Polyurethan (PU) (Wiese and Maier 2007). Die genaue

Zusammensetzung besteht dabei aus Polycaprolakton Diol (28.3 wt%), Polycaprolakton Triol (17.0 wt%), Polyethylenglycol (19.5 wt%), Polytetramethylenglycol (5.7 wt%), Diisocyanate (28.6 wt%), destilliertes Wasser (0.2 wt%), Pluronic P-123 (0.1 wt%) und Diazabicycloundecene (0.6 wt%). Alle dafür verwendeten Materialien wurden von der Firma Acros Organics (Geel, Belgien) oder der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bereitgestellt. In einem 2-Komponenten-Gießverfahren wurden daraus offeneporige (Porendurchmesser 400µm), dreidimensionale Scaffolds entwickelt, welche in vorangegangenen Studien schon in Tierversuchen getestet wurden (Wittmann et al. 2013; Wiggenhauser et al. 2012). Geliefert wurde das Material in großen Blöcken. Um die für die Implantation notwendige Form von 2mm langen und 5mm im Durchmesser großen Zylindern zu erhalten, wurde das Material in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend mit Hilfe eines Skalpell und einer Biopsiestanze zurechtgeschnitten. Das Volumen eines fertigen Scaffolds betrug somit 0,4ml. Zur Sterilisierung der Scaffolds wurden diese zuerst 5 Minuten in 70% Alkohol getränkt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. In einer Glasflasche, gefüllt mit PBS, wurden sie abschließend autoklaviert.

3.3. Herstellung des langzeitstabilen Fibringels

Um die Fixierung der ASCs im dreidimensionalen Polyurethanschaum sicherzustellen wurde ein langzeitstabiles Fibringel hergestellt. Hierfür wurde 1ml einer 500U/ml Thrombinlösung in 100ml Thrombinpuffer, welcher 40mM CaCl₂ enthält, verdünnt. Außerdem wurden 5g Fibrinogen in 50ml der Aprotininlösung Trasylol® verdünnt. Danach wurden das entstandene Fibrin- und Thrombingel im Verhältnis von 1:1 (jeweils 20µl) kurz vor der Beimpfung der Scaffolds miteinander vermischt, sodass ein Matrixkleber mit 50 mg/ml Fibrinogen, 20 mM CaCl₂, 2.5 U/ml Thrombin und einem pH von 7.4 entstand (Eyrich et al. 2007).

3.4. Herstellung einer dreidimensionalen Zellkultur

Wie unter dem Punkt 2.1.2. *Passagierung* beschrieben, wurden die Zellen vom Boden der Kulturflaschen gelöst und unter einem Lichtmikroskop gezählt. Um genügend humane ASCs zur Verfügung zu haben wurden die gewonnenen Zellen der vier Spenderinnen nun miteinander gepoolt. Danach wurden jeweils eine Million ASCs mit 40µl des Matrixklebers vermischt und auf ein Scaffold in einem sterilen Glasring in einer 12 Lochplatte pipettiert. Zur vollständigen Polymerisierung des Klebers wurden die beimpften Polyurethanschäume für 45 Minuten bei 37°C ausgehärtet. Nach vorsichtigem Herauslösen der Scaffolds aus den Glasringen wurden diese anschließend wieder mit Wachstumsmedium in Kulturflaschen gegeben. Die zwei bis siebentägige Inkubation fand dynamisch mit Hilfe eines Horizontalschüttlers bei 50rpm, 37°C und 5% CO₂ statt.

3.5. Induktion

Bei drei der fünf Gruppen (die genaue Gruppeneinteilung s.u.) wurde nach einer zweitägigen Inkubation in Wachstumsmedium die Adipogenese mittels Induktionsmedium (PGM2 versetzt mit 1.7 μM Insulin, 1 μM Dexamethason, 500 μM IBMX und 200 μM Indomethacin) induziert. Bei den restlichen Gruppen wurde weiterhin mit dem oben beschriebenen Wachstumsmedium verfahren.

3.6. Versuchstiere

Für den in vivo Teil des Versuchs wurden insgesamt 25 weibliche, athymische Mäuse (Deletion im FOXN-1 Gen) verwendet. Die 25 Mäuse waren zum Zeitpunkt der Implantation zwischen 48 und 52 Tage alt. Die Tiere wurden während des gesamten Versuchszeitraums unter artgerechten, sterilen Bedingungen im Mausstall des Präklinischen Forschungszentrums des Klinikums Rechts der Isar gehalten. Der Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens wurde zuvor von der Regierung von Oberbayern bewilligt.

3.7. Gruppeneinteilung

Die 25 Versuchstiere wurden in fünf Gruppen eingeteilt. Es wurden alle 25 Tiere nach demselben Schema operiert. Pro Maus wurden drei Konstrukte implantiert: ein Konstrukt in die linke Leiste mit Gefäßanschluss an die A. und V. femoralis, eins in die rechte Leiste ohne Gefäßanschluss und eins zwischen die Schulterblätter, ebenfalls ohne Gefäßanschluss (siehe Abb. 2).

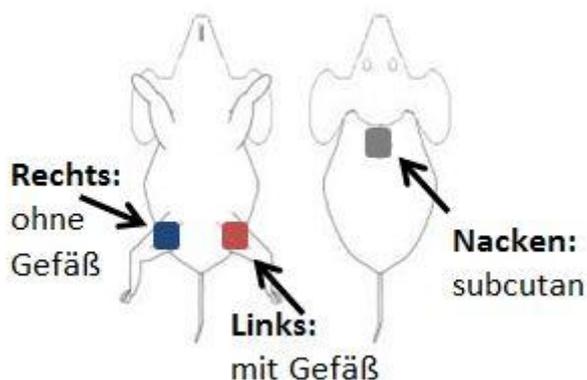


Abb. 2: Schematische Darstellung der Implantatlokalisationen

Bei Gruppe 5 wurde zusätzlich ein gestielter Fettlappen auf beide Konstrukte in der Leistengegend gelegt und mittels Einzelknopfnahnt fixiert.

Der Hauptunterschied zwischen den jeweiligen Gruppen lag in der Herstellung der Konstrukte. Innerhalb einer Gruppe wurden alle Konstrukte gleich hergestellt.

Gruppe 1: Es fand keine Beimpfung mit humanen ASCs statt, lediglich das Fibringel wurde aufgetragen. Danach wurden die Scaffolds zwei Tage in Wachstumsmedium und anschließend fünf Tage in Induktionsmedium bei 37°C gelagert.

Gruppe 2: Wie Gruppe 1, jedoch wurden die Scaffolds sieben Tage lang nur in Wachstumsmedium und nicht in Induktionsmedium gelagert.

Gruppe 3: Nach der Beimpfung mit ASCs und dem Fibringel wurden die Scaffolds zwei Tage in Wachstumsmedium und fünf Tage in Induktionsmedium bei 37°C gelagert.

Gruppe 4: Wie Gruppe 3, jedoch wurden die Scaffolds sieben Tage lang nur in Wachstumsmedium und nicht in Induktionsmedium gelagert.

Gruppe 5: Identische Herstellung wie Gruppe 3, zusätzlich wurde in dieser Gruppe die oben erwähnte Fettlappenplastik durchgeführt.

Die Unterschiede der Konstruktherstellung sind noch einmal in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Gruppenübersicht mit Verdeutlichung der Unterschiede bezüglich der Konstruktherstellung

	Wachstums- medium	Induktions- medium	ASCs	Fibringel	Beobachtungszeitraum
Gruppe 1	2 Tage	5 Tage	-	+	12 Wochen
Gruppe 2	7 Tage	-	-	+	12 Wochen
Gruppe 3	2 Tage	5 Tage	+	+	12 Wochen
Gruppe 4	7 Tage	-	+	+	12 Wochen
Gruppe 5	2 Tage	5 Tage	+	+	12 Wochen

3.8. Operationstechnik

Bei der im Folgenden beschriebenen Operationstechnik handelt es sich um ein Verfahren, das in Vorversuchen eigens von unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde (Wiggenhauser et al. 2012).

3.8.1. Implantation der Konstrukte

Mit einer vom Mausgewicht abhängigen Dosis an MMF (Medetomidin, Midazolam, Fentanyl) wurde die Intrapertonealnarkose eingeleitet. Um einer Unterkühlung der Maus während der Operation vorzubeugen wurde eine 40°C warme Wärmeplatte als Unterlage verwendet. Zur besseren Visualisierung wurde ein OP-Mikroskop eingesetzt. In Rückenlage wurden mittels Klebestreifen die

Mausbeine an der Unterlage fixiert, sodass das Operationsgebiet an den Leisten gut zugänglich war und mit einem Hautdesinfektionsmittel gereinigt werden konnte.

Mit Hilfe einer Mikrochirurgieschere erfolgte eine ca. 8mm lange Inzision oberhalb des Gefäßbündels der A. und Vv. femoralis. Durch stumpfes Präparieren mittels einer Pinzette wurden eben erwähnte Gefäße und der dazugehörige Nerv freigelegt. Nachdem der Nerv nach lateral von dem Gefäß separiert werden konnte um eine Lähmung des Hinterlaufs zu vermeiden, wurde das Gefäßbündel mobilisiert und unterminiert. Zur Implantation der Konstrukte wurden diese aus dem Medium genommen und mit einem Skalpell seitlich eingeschnitten. Durch Anheben des Gefäßbündels mit einer Pinzette konnte das Konstrukt um dieses gelegt werden (siehe Abb. 3). Der Wundverschluss erfolgte mittels mehrerer Einzelknopfnähte.

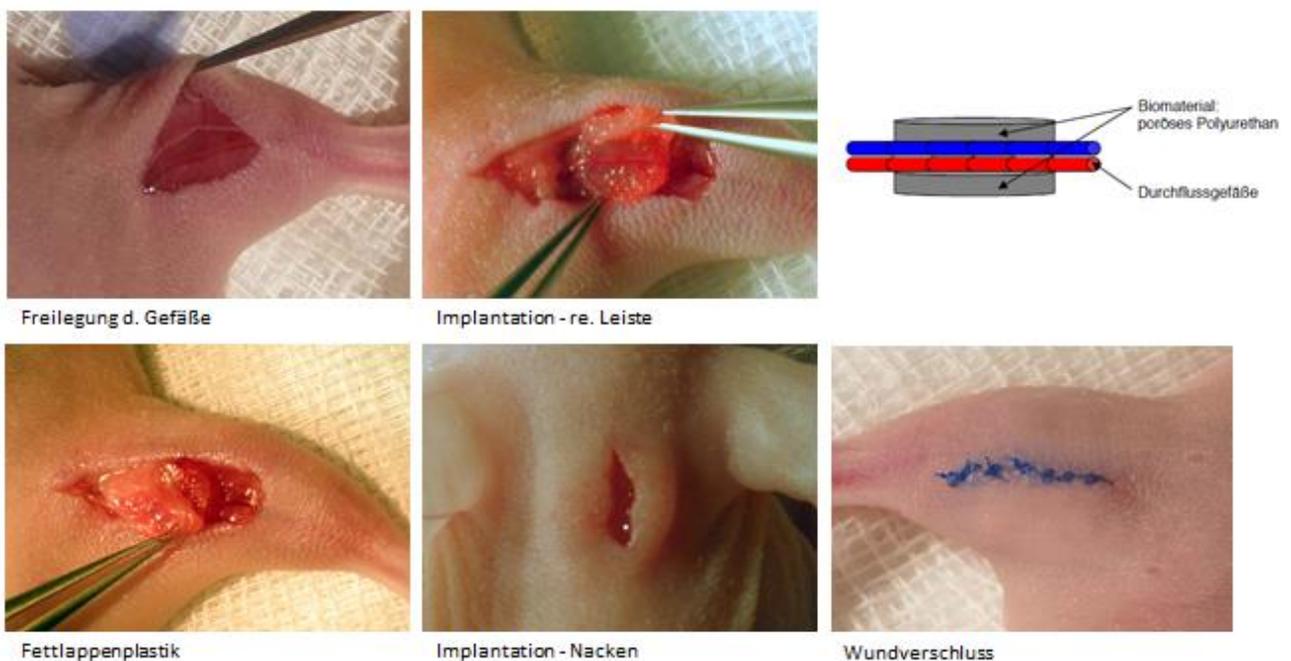


Abb. 3: Bilderreihe zur Darstellung der Implantationstechnik. Es werden die verschiedenen Lokalisationen, das schrittweise Vorgehen und eine schematische Darstellung des Gefäßanschlusses gezeigt.

Bei der Implantation ohne Gefäßanschluss entfiel die Freilegung und Mobilisation des Gefäßbündels. Nach seitlichem Einschneiden des Konstrukts wurde dieses hierbei nur auf das Gefäßbündel gelegt.

Erfolgte eine zusätzliche Fettlappenplastik, so wurde das weiter proximal benachbarte subkutane Fettgewebe mit Hilfe einer Pinzette stumpf mobilisiert, lediglich ein kleiner Stiel zur Sicherung der suffizienten Vaskularisation wurde belassen. Nach ausreichender Mobilisation wurde dann der nun bewegliche Fettlappen oben auf das Konstrukt aufgelegt und mittels einer Einzelknopfnäht fixiert.

Für die Implantation zwischen den Schulterblättern wurde die Maus in Bauchlage gebracht und das Operationsgebiet desinfiziert. Es folgte wieder eine ca. 8mm lange Inzision zwischen den Schulterblättern. Nach stumpfer Präparation einer subcutanen Faszientasche wurde das Konstrukt ebenfalls seitlich eingeschnitten und implantiert.

Mit einer intraperitonealen Injektion von einer vom Mausgewicht abhängigen Dosis an AFN (Atipamezol, Flumazenil, Naloxon) wurde die Narkose ausgeleitet. Um möglichen Infektionen vorzubeugen wurden 0,02ml Baytril subkutan verabreicht. Mittels einer Lochzange wurden die Mäuse an den Ohren markiert.

3.8.2. Explantation der Konstrukte

Die Narkoseeinleitung fand identisch zur Implantation statt. Nach narbenorientierter Inzision der Haut mit einer Mikrochirurgieschere konnten die Konstrukte lokalisiert werden. Mittels einer Pinzette und stumpfer Präparation wurden die Konstrukte freigelegt. Alle Konstrukte waren sehr mit dem umliegenden Binde- bzw. Fettgewebe verwachsen, sodass sich eine Mobilisation oft schwierig gestaltete. Bei den Konstrukten mit Gefäßanschluss wurden nach Kontrolle des adäquaten Blutdurchflusses beide Gefäßenden mit einer Schere durchtrennt. Nach der Explantation aller drei Konstrukte erfolgte die Tötung der Mäuse mittels Genickbruch in Narkose.

3.9. Histologische Aufarbeitung

Alle 75 Konstrukte wurden nach identischem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen explantiert und auch identisch histologisch aufgearbeitet.

3.9.1. Paraffineinbettung und Anfertigung der Schnitte

Direkt nach der Explantation wurden alle Konstrukte für mindestens 12h in 3,7% Formalin gelagert. Das Auswaschen des Fixierungsmittels und die für die Paraffineinbettung notwendige Entwässerung erfolgten automatisch per Tissue Processor. Bei der nachfolgenden, manuellen Paraffineinbettung mit Hilfe einer Paraffinausgießstation wurde darauf geachtet, dass die spätere Schnittfläche vertikal zur Längsachse der Konstrukte verläuft, sodass kreisrunde, zum möglicherweise vorhandenen Gefäß parallele Schnitte entstanden. Geschnitten wurden die ausgehärteten Paraffinblöcke mit einem Mikrotom in 7µm dicke Scheiben, welche gleich darauf in ein 45°C warmes Wasserbad gegeben wurden. Nach Aufnahme auf Super Frost Plus Objektträger wurden die Schnitte für mind. 12h in einem Ofen bei 40°C getrocknet und bis zur Färbung bei Raumtemperatur gelagert. Zur Bestimmung der Konstruktmitte wurde jedes Konstrukt ganz durchgeschnitten und jeder Schnitt gezählt. Bei der

weiteren Auswertung fanden jeweils nur Schnitte aus der mittleren Region der Konstrukte Verwendung.

3.9.2. Entparaffinierung und Bewässerung

Zur Entparaffinierung der Schnitte wurden diese zweimal für fünf Minuten in Xylol getaucht. Danach wurde mit einer absteigenden Alkoholreihe (siehe Tab. 2) den Präparaten schrittweise wieder Wasser zugeführt:

Tab. 2: Protokoll zur Entparaffinierung der Schnitte

Reagenz	Zeit
Reines Isopropanol	5min
Reines Isopropanol	5 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 70%	2 min
Ethanol 70%	2 min
Aqua dest.	2 min

3.9.3. Trichromfärbung nach Ladewig

Der Vorteil dieser Färbung lag in den orange angefärbten Erythrozyten, mit Hilfe derer sich das Blutgefäß leicht lokalisieren ließ. Weiter werden angefärbt: Zellkerne schwarz, Zytoplasma rot, Kollagen blau, Fibrin rot

Zu Beginn wurden die entparaffinierten und bewässerten Schnitte zur Kernfärbung für fünf Minuten in Eisenhämatoxylin nach Weigert getaucht. Nach dreiminütigem Spülen mit 37°C warmen Leitungswasser und einminütigem Beizen mit 1% Phosphorwolframsäure wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie für fünf Minuten mit der Trichomlösung nach Ladewig gefärbt wurden. Anschließend wurde noch mal mit destilliertem Wasser gespült und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe plus Xylol das Wasser wieder entzogen (siehe Tab. 3).

Tab. 3: Protokoll zur Trichromfärbung nach Ladewig

Reagenz	Zeit
Ethanol 70%	5 sec
Ethanol 70%	5 sec
Ethanol 96%	5 sec
Ethanol 96%	5 sec
Reines Isopropanol	5 sec
Reines Isopropanol	2 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min

Abschließend folgte das Eindecken mit Eindeckmedium und Deckglas.

3.9.4. Antikörperfärbung mit Vimentin-Antikörper SP20

Diese Färbung dient zur Unterscheidung zwischen humanen und murinen Adipozyten mittels einem monoklonalem Rabbit-anti-human-Antikörper (Klon SP20).

Für die immunhistologische Färbung wurde das AP-Polymerkit „Zytochem plus AP Polymer anti-Rabbit“ (ZUC031-006) der Firma ZYTOMED Systems GmbH (Berlin, Germany) verwendet. Das Prinzip dieser Färbung beruht auf einem Enzympolymeresystem, bei dem mehrere Moleküle des Sekundärantikörpers mit mehreren Molekülen Alkalische Phosphatase (AP) kovalent miteinander verbunden sind. Nach Bindung des Primärantikörpers an das Gewebeeptop binden die Polymere an die invariable Kette des Primärantikörpers. Die Zugabe des Chromogens Fast Red, das von der alkalischen Phosphatase als Substrat gespalten wird, lässt das Gewebe rot erscheinen. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden der mitgelieferten Anleitung des Herstellers entnommen.

3.9.4.1. Herstellung des Waschpuffers

Es wurde der Waschpuffer von ZYTOMED Systems GmbH (Berlin, Germany) verwendet. Dieser musste in einem Verhältnis von 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt werden.

3.9.4.2. Herstellung der Fast-Red-Lösung

Verwendet wurde das Permanent AP Red Kit der Firma Zytomed. Dabei wurden unmittelbar vor der Färbung pro ml der AP-Red Pufferlösung (vor Verwendung auf RT bringen) 16 µl Chromogen hinzugegeben.

3.9.4.3. Herstellung der Antikörperlösung

Hierfür wurde der Primärantikörper anti-Vimentin SP20 in einem Verhältnis von 1:200 in Antibody Diluent (Zytomed) verdünnt.

3.9.4.4. Färbung

Um einer Austrocknung der Schnitte während des Färbevorgangs vorzubeugen wurde bei längeren Inkubationszeiten mit einer feuchten Kammer gearbeitet. Die entparaffinierten, bewässerten Präparate wurden nach folgendem Protokoll gefärbt.

1. Waschen in destilliertem Wasser für 3 x 2 Minuten
2. Enzymatische Antigendemaskierung durch Auftropfen von Digest All-3, Inkubation für 10 Minuten bei 37°C
3. Waschen in PBS für 3 x 2 Minuten
4. Blocken von unerwünscht freien Epitopen durch Auftropfen von murinem Serum, Inkubation für 30 Minuten
5. Waschen in o.g. Waschpuffer für 2 Minuten
6. Auftropfen der o.g. Antikörperlösung, Inkubation über Nacht bei 4°C (im Kühlschrank)
7. Waschen in o.g. Waschpuffer für 3 x 5 Minuten
8. Auftropfen von AP-Polymer-anti-rabbit, Inkubation für 30 Minuten bei RT
9. Waschen in o.g. Waschpuffer für 3 x 5 Minuten
10. Auftropfen der o.g. Fast-Red-Lösung, Inkubation für 10 Minuten
11. Stoppen der Farbreaktion durch Waschen in destilliertem Wasser
12. Gegenfärben mit Hämalaun, Inkubation für 10 Minuten
13. Bläuen durch Waschen in Leitungswasser

Das Entwässern und Eindecken erfolgte identisch zur Trichomfärbung nach Ladewig.

3.10. Auswertung

Ausgewertet wurden jeweils die gefärbten Schnitte aus dem zentralen Bereich der Konstrukte. Dadurch konnte bei den Konstrukten mit Gefäßanschluss das Geschehen um die angeschlossenen Durchlaufgefäße besser beurteilt werden.

3.10.1. Fotografien und Gewichtbestimmung

Um später mit Hilfe von Photoshop CS5® (Adobe Systems Software, Ireland) das jeweilige Konstruktvolumen ermitteln zu können, wurden die explantierten Konstrukte in zwei Ebenen auf Millimeterpapier fotografiert.

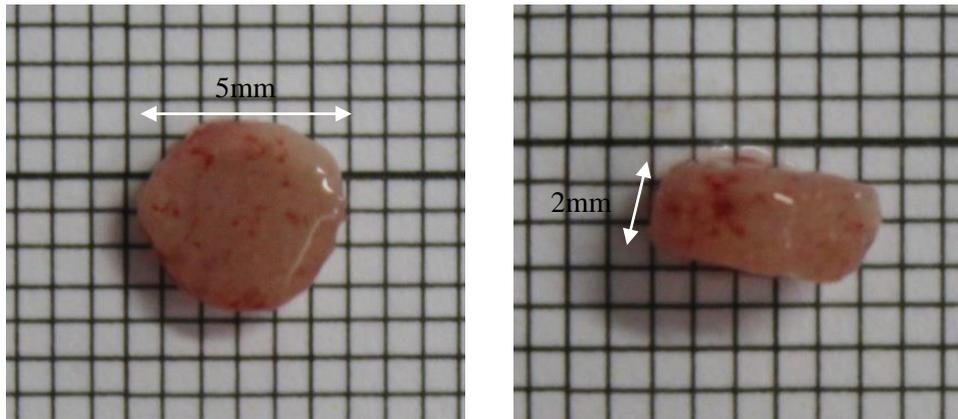


Abb. 4: Beispielfotografien der explantierten Konstrukte in zwei Ebenen auf Millimeterpapier

Dabei kam es teilweise zu einer Größenzunahme der explantierten Konstrukte im Vergleich zum Implantationszeitpunkt, was wahrscheinlich mit der neuen Gewebebildung innerhalb der Scaffolds zu erklären ist. Auch am Scaffold haftende Fettpolster konnten beobachtet werden und wurden zunächst belassen, um später unter dem Mikroskop beurteilen zu können, welche Fettzellen noch innerhalb des Scaffoldgrenzen liegen und somit bei der Auswertung miteinbezogen werden können. Außerdem wurde darauf geachtet, ob zum Zeitpunkt der Explantation das Durchflussgefäß noch eine Perfusion auswies. Dabei konnten zusätzliche, neu entstandene vaskuläre Kollateralen bereits makroskopisch erkannt und dokumentiert werden.

Zur Digitalisierung der gefärbten Schnitte wurde ein Leica Durchlichtmikroskop verwendet. Hiermit wurden die Schnitte in fünffacher Vergrößerung in mehreren Abschnittsaufnahmen fotografiert und mit Adobe Photoshop CS5® zusammengesetzt. Dadurch entstand eine detailreiche Übersichtsaufnahme, bestehend aus mehreren, sich gegenseitig überlappenden Mosaikbildern.

Außerdem wurde nach dem Fotografieren das Gewicht jedes Konstruktes mit Hilfe einer Hochpräzisionswaage bestimmt.

3.10.2. Auszählung

Auf jedem fotografierten Mittelschnitt in Trichromfärbung wurden alle sichtbaren Fettzellen und Gefäßanschnitte mit Hilfe von Adobe Photoshop CS5® manuell gezählt. Dabei wurden nur Fettzellen und Gefäßanschnitte berücksichtigt, die innerhalb der definierten Konstruktgrenzen lagen. Um mögliche Unterschiede zwischen Rand- und Kernbereich eines Konstruktes besser herausarbeiten zu können, wurde die für die Zählung berücksichtigte Fläche in einen Mittel- und Außenbereich unterteilt. Hierfür wurde ein Kreis mit einer definierten Fläche von $3,2\text{mm}^2$ um den jeweiligen Mittelpunkt gezogen (siehe Abb. 5).

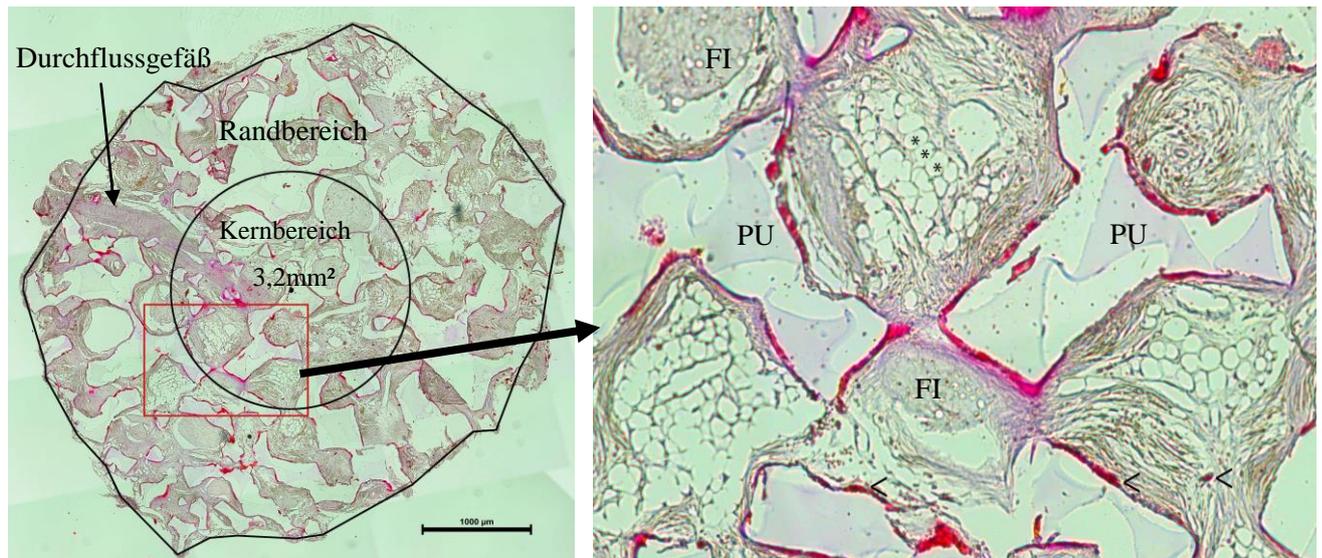


Abb. 5: Übersichtsaufnahme (links) und Detailaufnahme mit Strukturbezeichnung (rechts) eines Mittelschnittes in Trichromfärbung (*=Fettzellen, >=Gefäßanschnitte, PU=Scaffold, FI=Fibringel)

3.10.3. Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit abgebildeten Diagramme wurden mit SPSS Statistics 22® (IBM, Armonk, USA) erstellt. Auch die durchgeführten Tests auf Signifikanz wurden mit Hilfe dieses Programmes durchgeführt. Die p-Werte orientieren sich am Signifikanzniveau $\alpha=0,05$, d.h. sobald der p-Wert unter 5% lag wurde ein Fehler erster Art (die Nullhypothese wurde irrtümlich abgelehnt) ausgeschlossen (Bender and Lange 2007).

Um herauszufinden welcher Test auf Signifikanz anzuwenden ist, wurden die erhobenen Daten mittels Kolmogorow-Smirnow-Test und Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft (Shapiro and Wilk 1965). Dabei wurde eine Normalverteilung bezüglich der ausgezählten Fettzellen in Gruppe 3 bis 5 im Randbereich festgestellt. Außerdem besteht eine Normalverteilung der Daten im Bereich der Anzahl der Gefäßanschnitte, Konstruktgewichte und Konstrukt Durchmesser. Aus diesem Grund konnte hier ein einfacher Student t-Test angewendet werden (Altman and Bland 1995). In allen anderen Bereichen, in denen keine Normalverteilung der Daten vorlag, musste auf nicht parametrische Tests (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Kruskal-Wallis-Test) zurückgegriffen werden (Bender, Lange, and Ziegler 2007).

Folgende Tests auf Signifikanz wurden angewendet:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| - Auswirkung des Gefäßanschlusses: | |
| - Anzahl der Fettzellen: | Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test |
| - Anzahl der Gefäßanschnitte: | Student t-Test für verbundene Stichproben |
| - Gewicht: | Student t-Test für verbundene Stichproben |
| - Auswirkung der Induktion und ASCs: | Kruskal-Wallis-Test (Vergleich zw. Gruppe 1-4) |
| - Auswirkung der Fettplattenplastik: | Student t-Test (Vergleich Gruppe 3 mit Gruppe 5) |

- Volumenstabilität: Student t-Test (Vergleich mit Ausgangswert von 5mm)

3.11. Materialien

Im Folgenden werden alle verwendeten Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte mit Namen und Hersteller aufgelistet.

3.11.1. Medien und Reagenzien

- AP-Polymer-anti-rabbit (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- AP-Red Pufferlösung (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- Atipamezol (FA Pfizer, Berlin, Germany)
- Basal Medium PGM2 (FA Lonza, Walkersville, USA)
- Baytril (FA Provet AG, Lyssach, Switzerland)
- BSA (Bovines Serum Albumin, FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- Chromogen (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- Collagenase NB4 (FA Serva, Heidelberg, Germany)
- Collagenpuffer steril (hauseigene Apotheke Klinikum Rechts der Isar; Hepes (Merck 1.10110) 47,6g; Natriumchlorid Ph. Eur. 14,0g; Kaliumchlorid Ph. Eur. 7,2g; Calciumchlorid-Dihydrat 0,3g; Glucose-Monohydrat Ph. Eur. 1,98g; dest. Wasser zu 2000ml)
- Digest All-3 (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- Dexamethason (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- DMEM/Ham's F12 Medium (Dulbecco's modified eagle's medium nutrient mixture F12 Ham, FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- ECGM (Endothelial Cell Growth Medium MV Supplement Mix, FA PromoCell, Heidelberg, Germany)
- Eisenhämatoxin (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- Eosin 1% (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- Ethanol 70% (hauseigene Apotheke des Klinikums Rechts der Isar, München, Germany)
- Ethanol 96% (hauseigene Apotheke des Klinikums Rechts der Isar, München, Germany)
- Fentanyl (FA Janssen-Cilag, Baar, Switzerland)
- Fetal bovine serum FBS (FA Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
- Fibrinogen (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- Flumazenil (FA Hameln Pharma Plus, Hameln, Germany)
- Formalin 10% (Eigenherstellung, 27ml 37% Formalin, 100ml PBS)
- Formalin 4% (Eigenherstellung, 11ml 37% Formalin, 100ml PBS)

- Hämalalaun (FA Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany)
- Hautdesinfektionsmittel (Cutasept, FA BODE Chemie GmbH, Hamburg, Germany)
- Indomethacin (FA Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany)
- Induktionsmedium (Eigenherstellung: PGM2 versetzt mit 1.7 μ M Insulin, 1 μ M Dexamethason, 500 μ M IBMX und 200 μ M Indomethacin)
- Insulin (FA Sanofi-Aventis, Frankfurt a. M., Germany)
- Isobutyl-1-methylxanthine IBMX (FA Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany)
- MEFO (Methanol-Formaldehyd-Mischung, hauseigene Apotheke Klinikum rechts der Isar, 50ml 0,2% Phosphatpufferlösung, 50ml 37%iges Formalin, 100ml Methanol)
- Medetomidin (FA Pfizer, Berlin, Germany)
- Metacam (FA Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Germany)
- Midazolam (FA Ratiopharm, Ulm, Germany)
- Naloxone (FA Inresa Arzneimittel, Freiburg, Germany)
- Paraffin (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- PBS (Phosphate-Buffered Saline, FA Biochrom AG, Berlin, Germany)
- Penicillin/Streptomycin (FA Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
- Phosphorwolframsäure
- Reagent Diluent (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- Thrombin (FA Baxter, München-Unterschleißheim, Germany)
- Thrombinpuffer (hauseigene Apotheke Klinikum rechts der Isar, sterile 20mM Calciumchloridlösung)
- Tissue-Tek O.C.D. Compound (FA Sakura, Zoeterwoude, Netherlands)
- Trasylol (FA Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany)
- Trichrom-Lösung nach Ladewig (hauseigene Apotheke Klinikum rechts der Isar)
- Trypanblau-Lösung 0,4% (FA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)
- Trypsin/EDTA Solution (FA Biochrom AG, Berlin, Germany)
- Vimentin SP20 Antikörper (Rabbit anti-Vimentin SP20, FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- Wachstumsmedium (PGM2 versetzt mit 10% Fetal Bovine Serum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin)
- Waschpuffer (FA Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany)
- Xylol (FA Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, Germany)

3.11.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Autoklav (FA LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Germany)
- Deckgläser (FA Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig)
- Falcons (PP-Test tubes, 50ml sterile, FA Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)
- Feuchte Kammer (FA NeoLab, Heidelberg, Germany)
- Leukostrip (FA Smith & Nephew GmbH, Marl, Germany)
- Lochzange (FA Aesculap, Tuttlingen, Germany)
- Magnetrührgerät (FA IKA, Staufen, Germany)
- Mikroskop + Software (FA Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)
- Mikrotom (HYRAX, FA Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)
- Objektträger Thermo Scientific Superfrost plus (FA Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig)
- OP-Mikroskop (OPMI-1F, FA Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)
- P25 Kulturflaschen (Nunc Flasks Nunclon 25cm², FA Nunc, Roskilde, Denmark)
- P75 Kulturflaschen (Tissue Culture Flask 75cm², FA Sarstedt, Newton, USA)
- Paraffinofen (FA Memmert, Schwabach, Germany)
- Petrischale (60x15mm, FA Sarstedt, Newton, USA)
- Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml, FA BD Falcon, Erembodegem, Belgium)
- Pipettus Pipetboy (FA Integra Biosciences, Fernwlad, Germany)
- Präzisionswaage (FA Scaltec, Göttingen, Germany)
- Schüttler (FA GFL, Burgwedel, Germany)
- Skalpell (FA FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan)
- Tissue Processor (ASP 300, FA Leica Camera AG, Wetzlar, Germany)
- Wärmplatte (FA Labocom, Hofheim-Wallau, Germany)
- Wasserbad (FA Histo Line Laboratories, Pantigliate, Italy)
- Zählkammer (FA Hycor, Amstelveen, Netherlands)
- Zellsieb (Cell Strainer 70µm Nylon, FA BD Falcon, Erembodegem, Belgium)
- Zentrifuge (FA Hettich, Tuttlingen, Germany)

4. Ergebnisse

Zur graphischen Darstellung und zur subjektiven Beurteilung der Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt repräsentative Beispielaufnahmen jeder Gruppe dargestellt. Durch das manuelle Auszählen der ausgereiften Fettzellen und der angeschnittenen Gefäße konnten die gewonnen Ergebnisse objektiviert werden.

4.1. Auswertung der Nackenkonstrukte

Bei der Explantation der Konstrukte aus dem Nackenbereich zeigte sich in den meisten Fällen eine Verwachsung mit der Haut (siehe Abb. 6). Im Gegensatz dazu war kein einziges der Konstrukte im Leistenbereich mit der Haut verwachsen. Auffallend hierbei war die hohe Anzahl an Fettzellen bei den wenigen Nackenkonstrukten, die nicht mit der Haut verwachsen waren (siehe Tab. 4).

Im Vergleich der Nackenkonstrukte mit und ohne Verwachsung mit Hilfe eines T-Tests zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,014$). Möglicherweise stellen die Hautverwachsungen eine Migrationsbarriere für einwachsendes Mausfett dar und sind daher eine Limitation für den Versuchsaufbau. Deshalb wurden diese Konstrukte nicht weiter in der Versuchsauswertung berücksichtigt. Als echte Kontrollen wurden die Leistenkonstrukte ohne Gefäßanschluss bewertet, da hier für beide Seiten die gleichen Umgebungsbedingungen herrschten.

Tab. 4 Anzahl der Fettzellen in den Nackenkonstrukten (*=Konstrukt nicht mit der Haut verwachsen)

KonstruktNr.	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
1	365*	338*	82	311	88
2	124	96	86	83	108
3	18	152*	164	127	361*
4	92	709*	145	42	261
5	497*	136	155	165	113

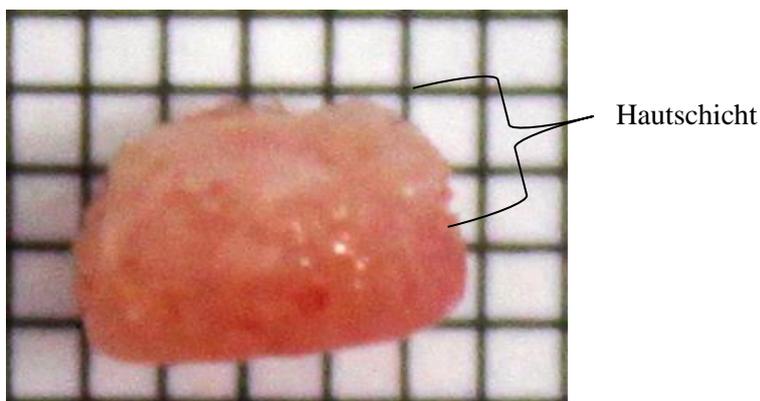


Abb. 6: Nackenkonstrukt Seitenaufnahme

4.2. Auswertung der Leistenkonstrukte

Es folgt die graphische Darstellung repräsentativer Beispielaufnahmen der einzelnen Gruppen. Außerdem wurde versucht, durch subjektive Betrachtung der Aufnahmen die Ergebnisse in Worten zusammenzufassen. Grundsätzlich konnte dabei ein erhöhtes Auftreten reifer Fettzellen in den Randbereichen sämtlicher Gruppen beobachtet werden. Zur besseren Übersicht ist in Abb. 7 ein

Streudiagramm der gezählten Fettzellen pro mm² der Gesamtfläche abgebildet. Jeder Punkt steht dabei für den Wert eines Konstruktes, unterteilt jeweils in Gruppen und Gefäßanschluss. Insgesamt wurden 50 Leistenkonstrukte von 25 Mäusen ausgezählt.

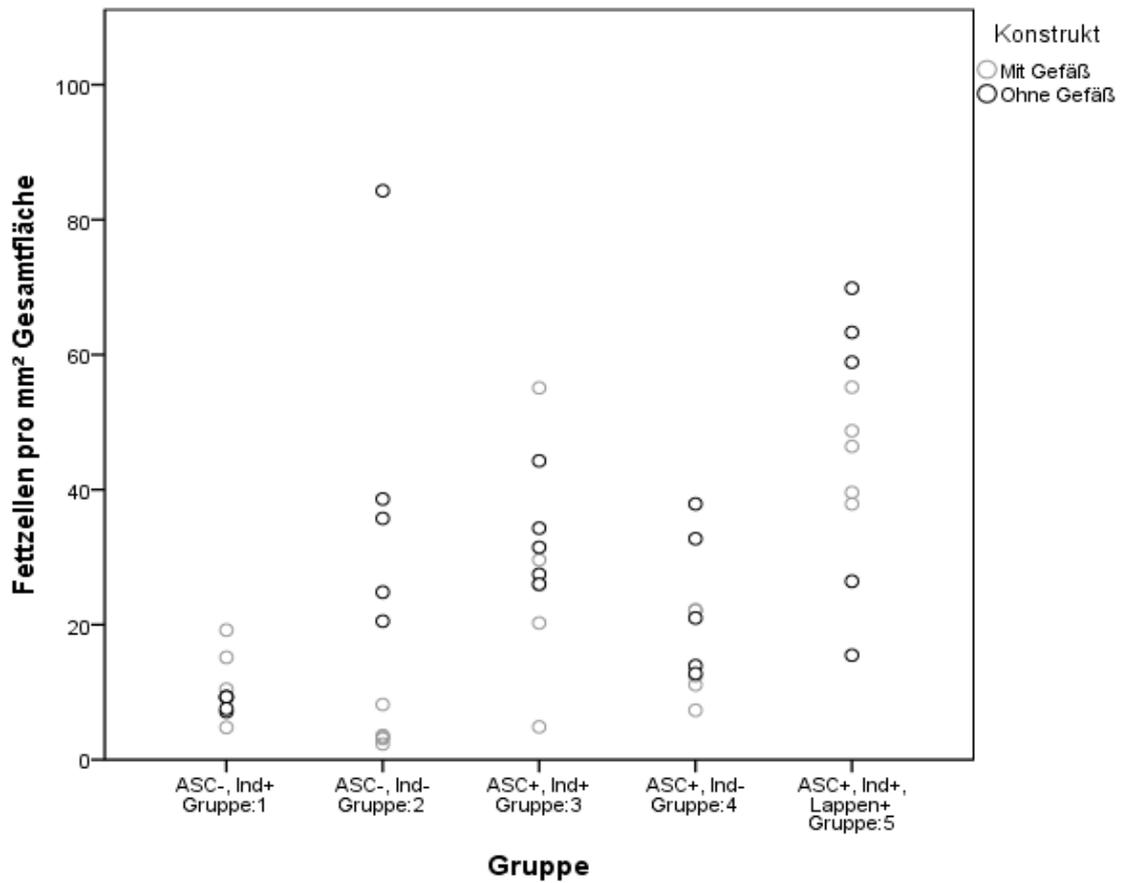


Abb. 7: Das Streudiagramm zeigt die Anzahl der Fettzellen pro mm² der Gesamtfläche, unterteilt in Gruppen und Gefäßanschluss. Jeder Punkt steht dabei für die Fettzellen eines einzelnen Konstruktes wodurch die Streuung innerhalb der einzelnen Gruppen verdeutlicht wird.

Gruppe 1 (ASC-, Ind+)

Es zeigt sich ein sehr homogenes Bild mit einer geringen Anzahl an reifen Fettzellen in der gesamten Gruppe. Die spärlich vorhandenen Fettzellen befinden sich meistens in randständiger Lokalisation, nur in den Konstrukten mit Gefäßanschluss sind vereinzelt auch Fettzellen in zentraler Lage erkennbar. Das Fibrinnetz füllt größtenteils die Poren des PUs vollständig aus, teilweise fand ein Umbau in Bindegewebe statt (siehe Abb. 8 Detailaufnahme). Die Vaskularisation ist in den Konstrukten mit Gefäßanschluss deutlich stärker ausgeprägt.

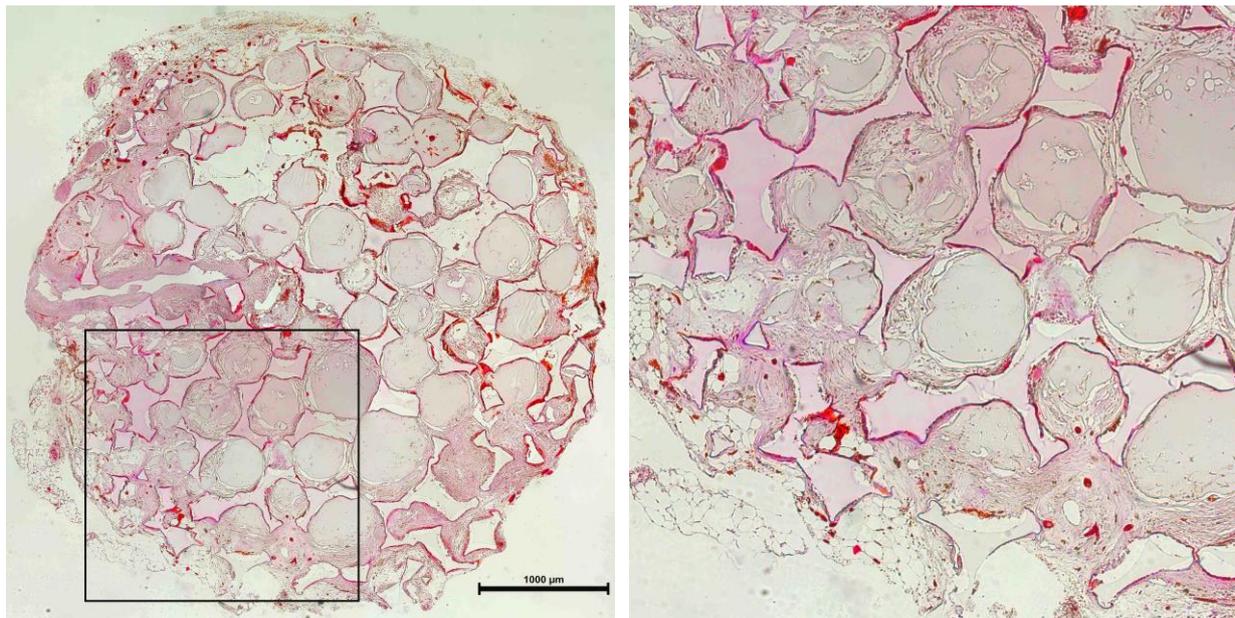


Abb. 8: Übersichtsaufnahme (links) und zugehörige Detailaufnahme (rechts) von Maus 3, Gruppe 1, linke Leiste mit Gefäßanschluss.

Gruppe 2 (ASC-, Ind-)

Es fällt vor allem die besonders starke Bildung reifer Fettzellen im Randbereich der Konstrukte ohne Gefäßanschluss auf. Dagegen fand in den Konstrukten mit Gefäßanschluss so gut wie keine Adipogenese statt. In zentraler Lage sind in allen Konstrukten wenige bis keine Fettzellen vorhanden. Das Fibrinnetz füllt fast vollständig die runden Poren des PU-Scaffolds aus, teilweise fand ein Umbau in Bindegewebe statt. Die Vaskularisation ist in den Konstrukten mit Gefäßanschluss deutlich stärker ausgeprägt.

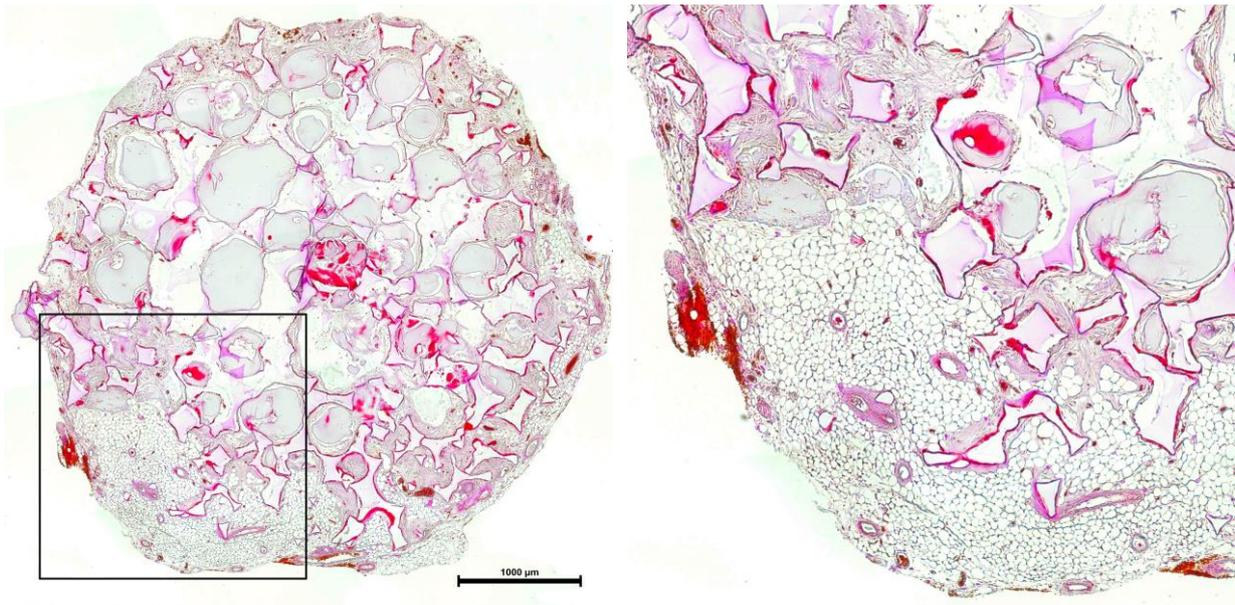


Abb. 9: Übersichtsaufnahme (links) und zugehörige Detailaufnahme (rechts) von Maus 3, Gruppe 2, rechte Leiste ohne Gefäßanschluss.

Gruppe 3 (ASC+, Ind+)

Während in den Konstrukten ohne Gefäßanschluss kongruent eine hohe Anzahl an Fettzellen zu beobachten ist, zeigt sich in den Konstrukten mit Gefäßanschluss eine breite Streuung. Die Mehrzahl der Fettzellen ist randständig lokalisiert. Es befinden sich teilweise reife Adipozyten innerhalb des intakten Fibringels eingeschlossen (siehe Detailaufnahme in Abb. 10), jedoch ist die Mehrheit der beimpften ASCs in einem unreifen Zustand homogen verteilt im Fibringel vorzufinden. Das Fibringel füllt die Poren der PU-Scaffolds voll aus, teilweise fand ein Umbau zu Bindegewebe statt. Die Vaskularisation betreffend kann kein entscheidender Unterschied zwischen den Konstrukten mit und ohne Gefäßanschluss festgestellt werden, hier zeigt sich ein auffallend homogenes Bild.

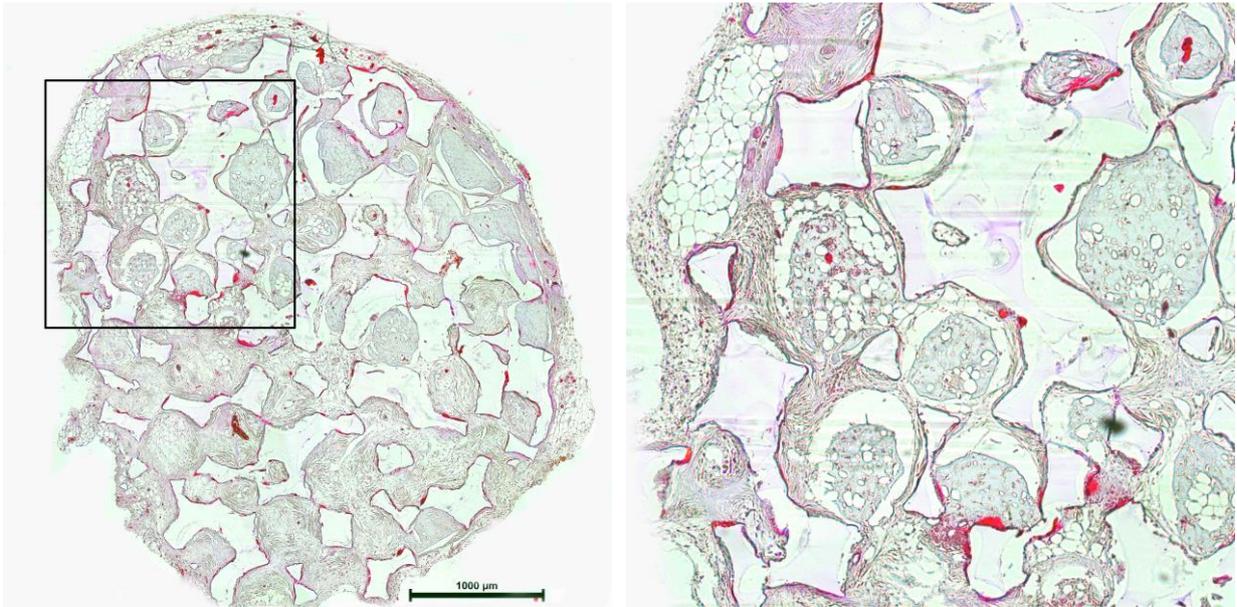


Abb. 10: Übersichtsaufnahme (links) und zugehörige Detailaufnahme (rechts) von Maus 2, Gruppe 3, rechte Leiste ohne Gefäßanschluss.

Gruppe 4 (ASC+, Ind-)

Zusammenfassend zeigt sich ein größtenteils einheitliches Bild mit geringfügig mehr Fettzellen in den Konstrukten ohne Gefäßanschluss, diese sind vor allem im Randbereich lokalisiert. Die beimpften ASCs befinden sich größtenteils in einem unreifen Zustand homogen innerhalb des intakten Fibringels verteilt, streckenweise sind erste kleine Vakuolen zu erkennen (siehe Detailaufnahme in Abb. 11). Das Fibringel füllt die Scaffoldporen annähernd vollständig aus. Die Vaskularisation ist in den Konstrukten mit Gefäßanschluss deutlich stärker ausgeprägt.

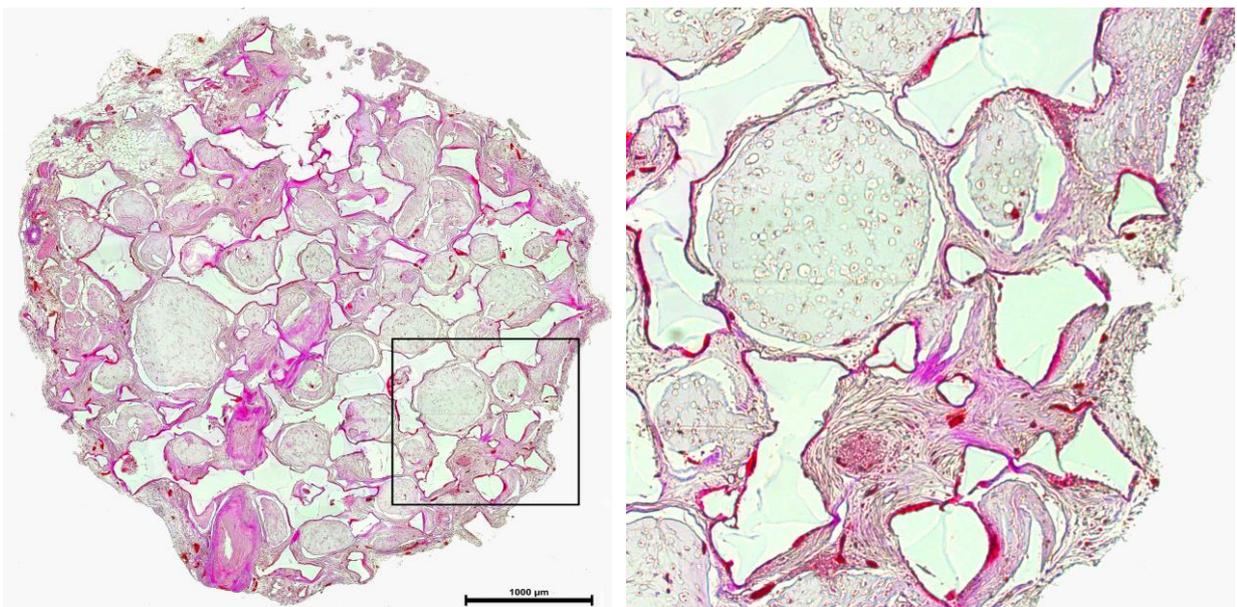


Abb. 11: Übersichtsaufnahme (links) und zugehörige Detailaufnahme (rechts) von Maus 5, Gruppe 4, linke Leiste mit Gefäßanschluss.

Gruppe 5 (ASC+, Ind+, Fettlappenplastik+)

Sowohl in den Konstrukten mit als auch ohne Gefäßanschluss sind gleichermaßen auffallend viele Fettzellen vorhanden, häufig auch in zentraler Lage. Die beimpften ASCs befinden sich in sehr heterogenen Differenzierungsgraden, vom reifen Adipozyten bis hin zur unveränderten Stammzelle sind viele unterschiedliche Stadien zu erkennen. Das Fibrinnetz ist größtenteils gleichmäßig verteilt, stellenweise fand ein Umbau zu Bindegewebe statt. Die Vaskularisation ist in den Konstrukten mit Gefäßanschluss deutlich stärker ausgeprägt.

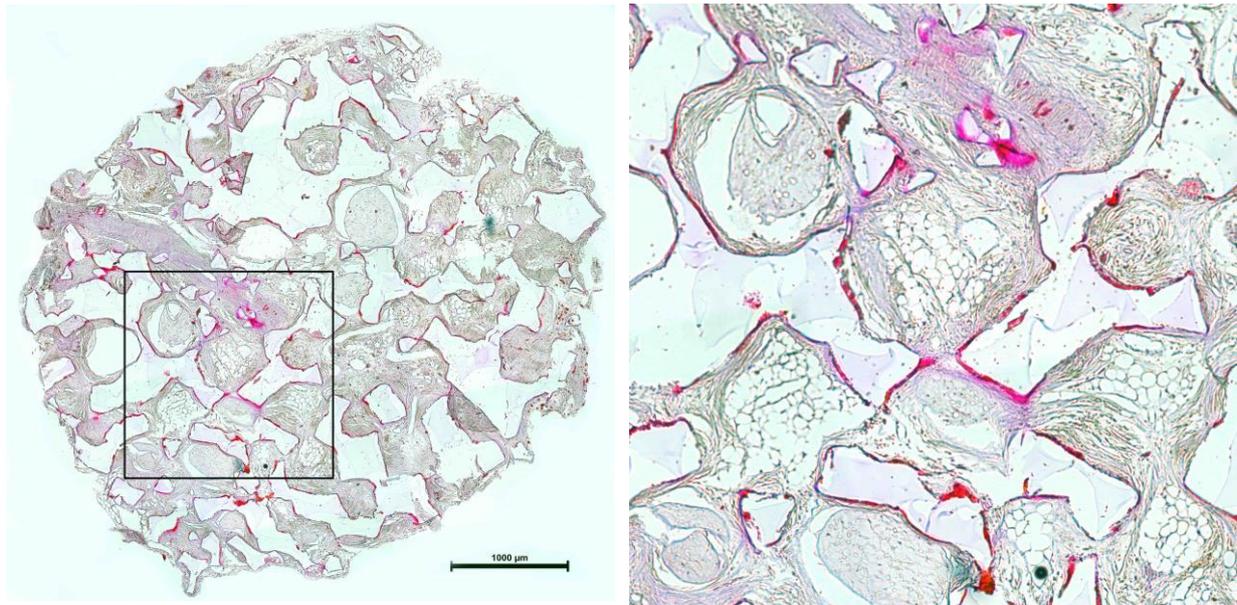


Abb. 12: Übersichtsaufnahme (links) und zugehörige Detailaufnahme (rechts) von Maus 2, Gruppe 5, linke Leiste mit Gefäßanschluss.

4.3. Volumenstabilität der Konstrukte

Die 50 Konstrukte der Leistenregionen wurden nach der Explantation auf Millimeterpapier fotografiert (siehe Abb. 4) und anhand der Fotos der jeweilige Konstrukturchmesser bestimmt. Bei subjektiver Betrachtung konnte keine Formveränderung festgestellt werden, alle Konstrukte haben ihre Zylinderform mit kreisrunder Grundfläche beibehalten. Außerdem konnte mit Hilfe eines Student t-Tests gezeigt werden, dass es signifikant zu keiner Veränderung des Durchmessers im Vergleich zum Ausgangswert von 5mm gekommen ist ($p=0,001$). Von einem Volumenverlust während des zwölfwöchigen Beobachtungszeitraumes ist daher nicht auszugehen.

4.4. Auswirkung des Gefäßanschlusses

Um zu überprüfen welche Auswirkungen der Gefäßanschluss auf die Adipogenese hat, wurden 3 Variablen in allen 5 Gruppen miteinander verglichen: die neu entstandenen Fettzellen, die ausgezählten Gefäßanschnitte und das jeweilige Konstruktgewicht nach der Explantation.

4.4.1. Anzahl der Fettzellen

Als erstes wurden die neu entstandenen Fettzellen beider Leistenkonstrukte einer Maus miteinander verglichen und geschaut, ob mit oder ohne Gefäßanschluss mehr Fett entstanden ist (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bei verbundenen Stichproben). Hierbei zeigten sich im Kern- und Randbereich der Konstrukte gegensätzliche Ergebnisse. Während im Konstrukt kern der Gefäßanschluss sich scheinbar positiv auf die Adipogenese auswirkt (knapp nicht signifikant $p=0,064$), wirkt er sich im Randbereich der Konstrukte signifikant negativ aus ($p=0,015$). Der Vergleich der Konstrukte mit und ohne Gefäßanschluss ist in Abb. 13 noch einmal graphisch dargestellt, aufgeteilt in Rand- und Kernbereich eines Konstruktes.

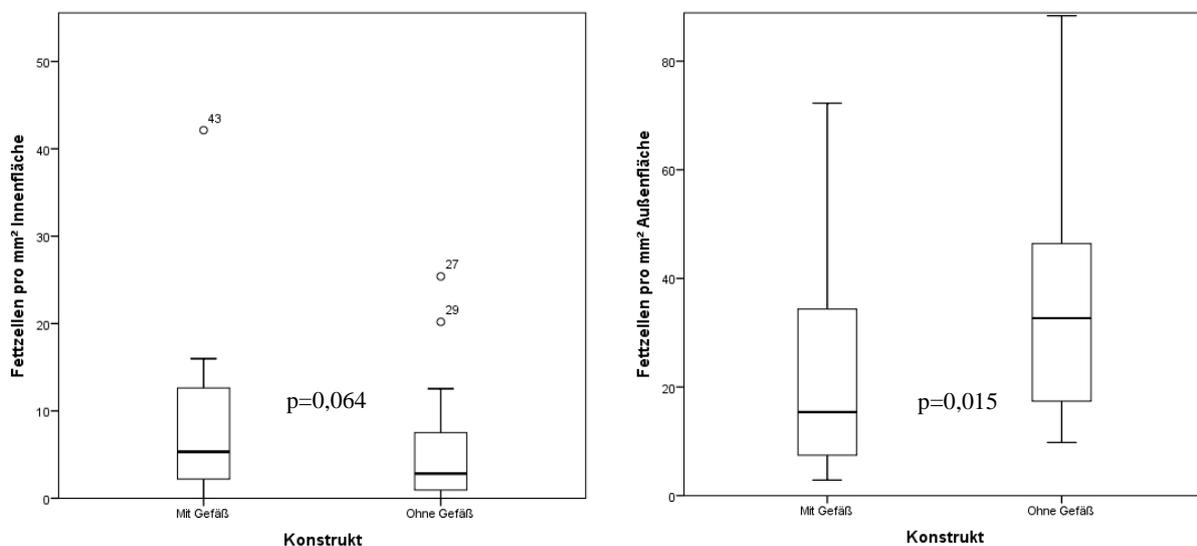
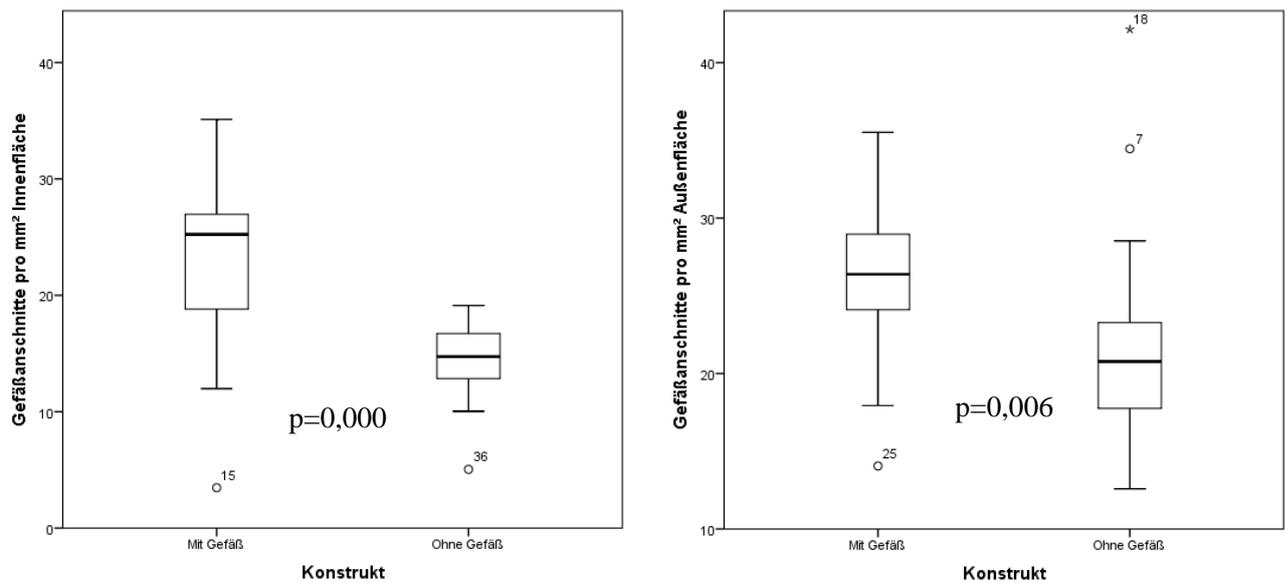


Abb. 13: Vergleich der Anzahl an Fettzellen pro mm² in Abhängigkeit des Gefäßanschlusses, aufgeteilt in Kern- (links) und Randbereich (rechts)

Betrachtet man den Konstrukt kern, so ist bei 17 von 25 Mäusen in den Konstrukten mit Gefäßanschluss mehr Fett entstanden. Dem gegenüber ist bei der Betrachtung der Konstrukt ränder bei 19 von 25 Mäusen mehr Fett in den Konstrukten ohne Gefäßanschluss entstanden.

4.4.2. Anzahl der Gefäßanschnitte

Eine weitere Möglichkeit, die Auswirkungen des Gefäßanschlusses zu objektivieren ist das Auszählen der Gefäßanschnitte. Auch hierbei wurde zwischen den Konstrukten mit und ohne Gefäßanschluss verglichen und in Rand- und Kernbereich der Konstrukte unterteilt (Abb. 14).



Mittelwerte + Standardabweichung

Konstrukt		Innenfläche	Außenfläche
Mit Gefäß	Mittelwert	22,8	26,8
	Standardabweichung	7,4	6,4
Ohne Gefäß	Mittelwert	14,6	21,8
	Standardabweichung	3,0	6,2

Abb. 14 Anzahl der Gefäßanschnitte pro mm² mit und ohne Gefäßanschluss im Konstrukt Kern (links) und in den Konstrukt Rändern (rechts)

Sowohl im Kernbereich mit $22,8 \pm 7,4$ Gefäßanschnitten/mm² als auch im Randbereich mit $26,8 \pm 6,4$ Gefäßanschnitten/mm² konnten mehr Gefäßanschnitte in den Konstrukten mit Gefäßanschluss gezählt werden. Wendet man einen Student t-Test für verbundene Stichproben an, so kann eine hohe Signifikanz für beide Bereiche gezeigt werden (Kernbereich $p=0,000$; Randbereich $p=0,006$).

4.4.3. Konstruktgewichte

Ein anderer Weg die Auswirkungen des Gefäßanschlusses zu überprüfen, ist die Gewichtbestimmung der Konstrukte nach der Explantation. Auch hierbei wurden die Konstrukte mit und ohne Gefäßanschluss miteinander verglichen (Abb. 15).

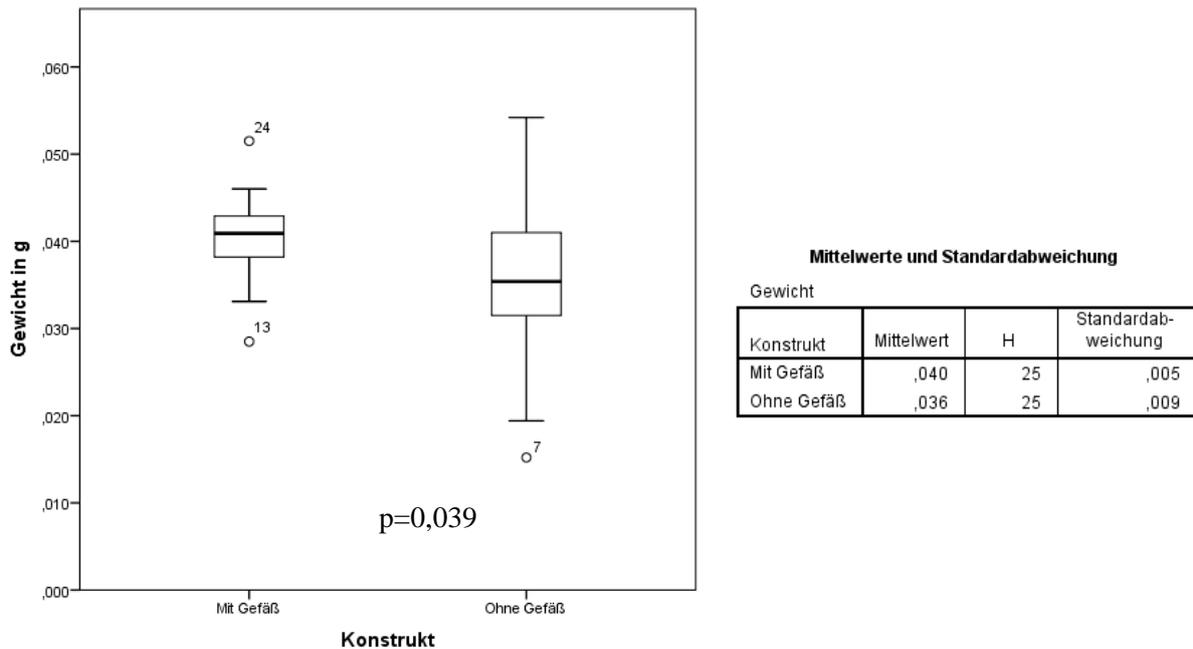


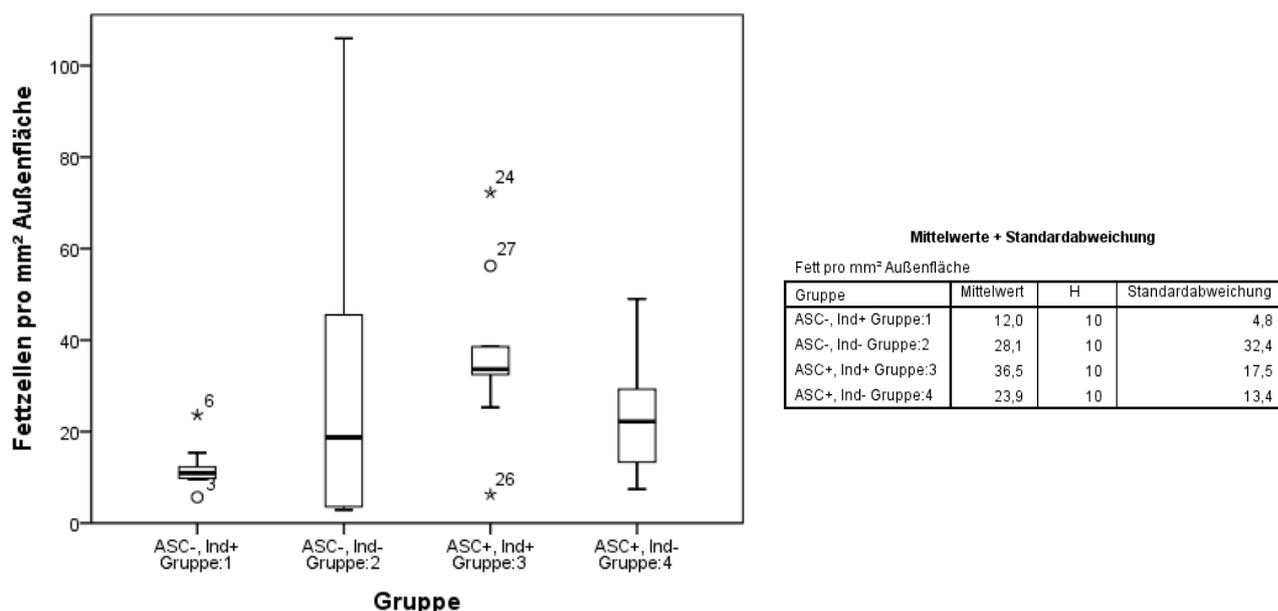
Abb. 15: Konstruktgewichte in g mit und ohne Gefäßanschluss (post explantationem)

Durchschnittlich waren die Konstrukte mit Gefäßanschluss mit 40 ± 5 mg schwerer als die Konstrukte ohne Gefäßanschluss mit nur 36 ± 9 mg. Mit Hilfe eines Student t-Test für verbundene Stichproben konnte eine Signifikanz gezeigt werden ($p=0,039$).

4.5. Auswirkung der Induktion und der ASCs

Um feststellen zu können, inwiefern sich die Induktion und das Beimpfen mit ASCs auf die Adipogenese auswirken, werden im Folgenden die Gruppen 1 bis 4 bezüglich der neu entstandenen Fettzellen miteinander verglichen. Dabei werden die gezählten Fettzellen beider Leistenkonstrukte einer Maus (mit und ohne Gefäßanschluss) zusammengefasst, dadurch entsteht eine Fallzahl mit $n=10$ pro Gruppe. Es wird wieder zwischen Rand- und Kernbereich differenziert.

4.5.1. Randbereich

Abb. 16: Fettzellen/mm² der Außenfläche in Gruppen unterteilt (Gruppe 1-4)

Betrachtet man den Randbereich (Abb. 16), so ist bei der Gruppe mit induzierten ASCs (Gruppe 3) mit durchschnittlich $36,5 \pm 17,5$ Fettzellen/mm² am meisten Fett entstanden, was für einen positiven Effekt der Induktion und der ASCs auf die Adipogenese spricht. Vergleicht man die Gruppen mit Hilfe eines Kruskal-Wallis-Test, so kann ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3 gezeigt werden ($p=0,043$). Da der einzige Unterschied der beiden Gruppen in der Besiedelung der Scaffolds mit ASCs besteht, kann ein positiver Effekt der ASCs auf die Adipogenese angenommen werden.

Vernachlässigt man die nicht gegebene Normalverteilung der Daten in Gruppe 1 und 2, was bei einer Gruppenstärke von insgesamt 50 Konstrukten durchaus vertretbar ist (Lumley et al. 2002), kann auch eine univariate Varianzanalyse (engl. Analysis of variance, ANOVA) angewendet werden. Diese zeigt einen signifikant positiven Effekt der Kombination von Induktion und ASCs (siehe Tab. 5), nicht aber der einzelnen Faktoren. Auffallend ist außerdem die große Standardabweichung ($32,4$ Fettzellen/mm²) und zum Teil hohe Anzahl an Fettzellen mit durchschnittlich $28,1$ Fettzellen/mm² in der Gruppe ohne Induktion und ASCs (Gruppe 2), was weitere Rückschlüsse limitiert.

Tab. 5: P-Werte ANOVA Gruppe 1-4 im Bezug der Fettzellen pro mm² der Außenfläche

Faktor	p-Wert
Induktion	0,738
ASCs	0,112
Induktion+ASCs	0,028

4.5.2. Kernbereich

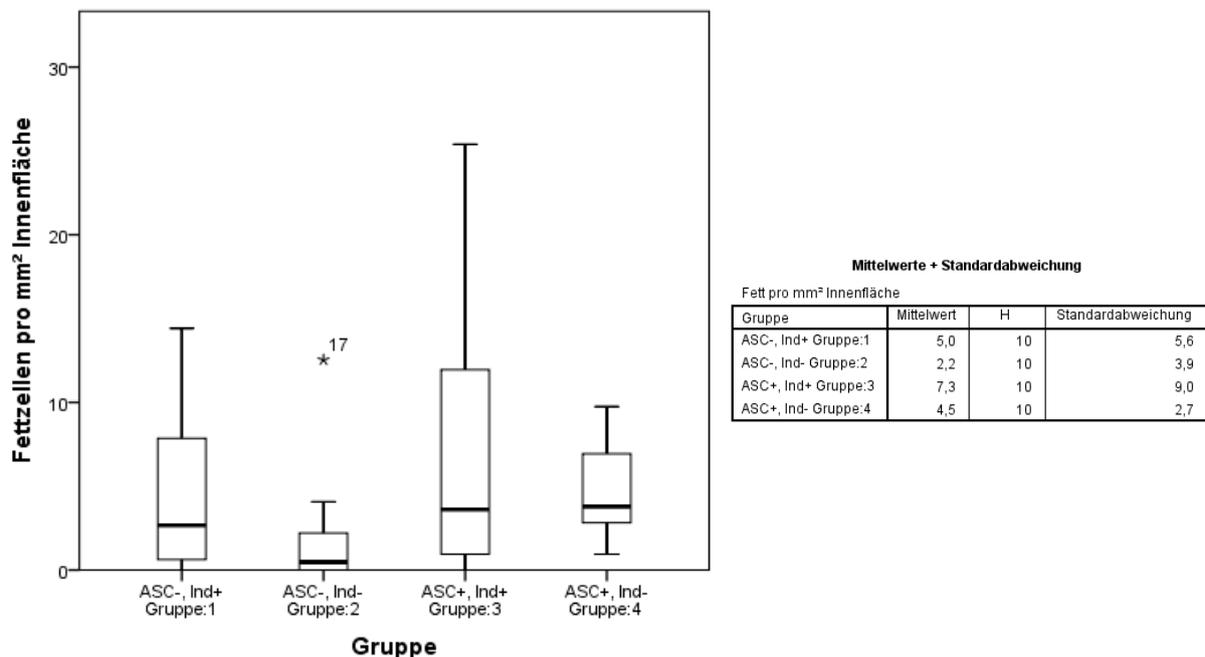


Abb. 17: Fettzellen/mm² der Innenfläche in Gruppen unterteilt (Gruppe 1-4)

Auch bei der Betrachtung des Kernbereichs ist in der Gruppe 3 mit durchschnittlich $7,3 \pm 9$ Fettzellen/mm² am meisten Fett entstanden, jedoch deutlich weniger als im Randbereich (Abb. 17). Die zweitstärkste Gruppe ist die Gruppe ohne Zellen aber mit Induktion (Gruppe 1) mit durchschnittlich $5 \pm 5,6$ Fettzellen/mm². Wendet man im Kernbereich einen Signifikanztest nach Kruskal-Wallis an, kann jedoch keine Signifikanz gezeigt werden.

Verstößt man auch hier wieder gegen die Voraussetzung der nicht gegebenen Normalverteilung der Daten und führt eine univariate Varianzanalyse durch, kann hingegen ein signifikant positiver Effekt der Induktion auf die Adipogenese belegt werden, jedoch nicht für die ASCs allein oder für die Kombination von Induktion und ASCs (Tab. 6).

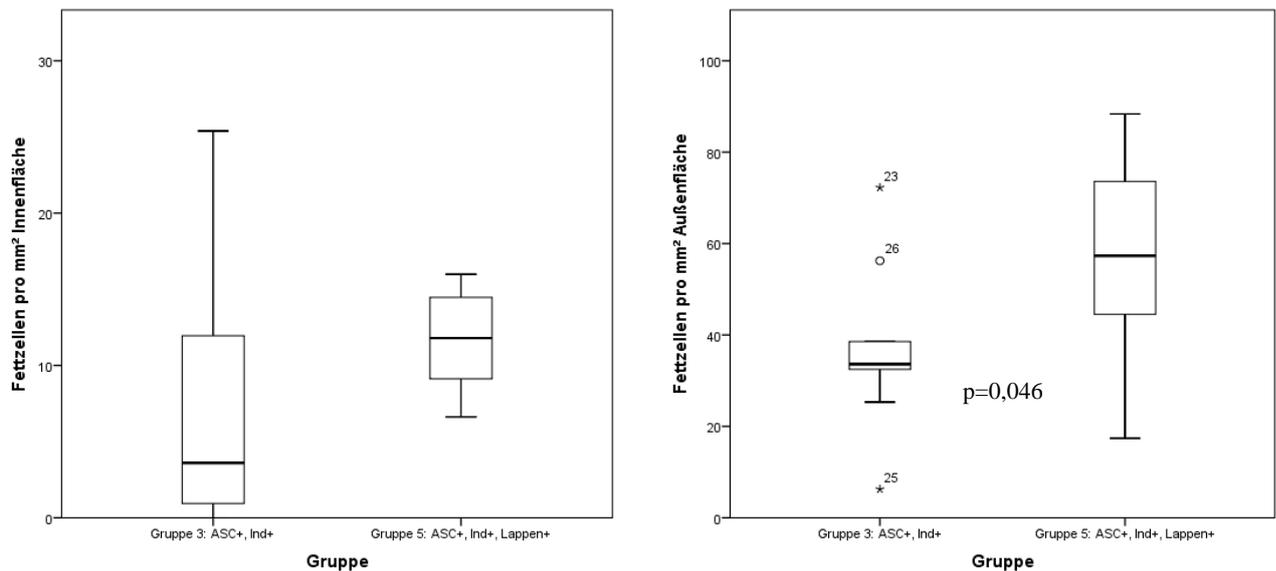
Tab. 6: P-Werte ANOVA Gruppe 1-4 im Bezug der Fettzellen pro mm² der Innenfläche

Faktor	p-Wert
Induktion	0,039
ASCs	0,061
Induktion+ASCs	0,414

4.6. Auswirkung der Fettablappenplastik

Zur Schaffung eines fettreichen Milieus am Implantationsort wurde bei Gruppe 5 ein gestielter Fettablappen auf beide Leistenkonstrukte gelegt und mittels Einzelknopfnahnt fixiert (siehe Abb. 3). Um

die Auswirkung dieser Fettlappenplastik auf die Adipogenese im Konstrukt feststellen zu können, dient der Vergleich zwischen den Gruppen 3 und 5. Bei beiden Gruppen wurden die Scaffolds mit ASCs beimpft und anschließend induziert, der einzige Unterschied besteht lediglich in der bei Gruppe 5 durchgeführten Fettlappenplastik. In Abb. 18 ist der Vergleich in Form von Boxplots dargestellt, unterteilt in Kern- und Randbereich.



Mittelwerte + Standardabweichung

Gruppe		Fett pro mm ² Innenfläche	Fett pro mm ² Außenfläche
Gruppe 3: ASC+, Ind+	Mittelwert	7,3	36,5
	Standardabweichung	9,0	17,5
Gruppe 5: ASC+, Ind+, Lappen+	Mittelwert	14,3	55,6
	Standardabweichung	10,2	21,9

Abb. 18: Vergleich zwischen Gruppe 3 und 5: Anzahl der Fettzellen/mm² der Innenfläche (links) und Außenfläche (rechts)

In beiden Gruppen ist wieder deutlich mehr Fett im Randbereich als im Kernbereich der Konstrukte entstanden. Im Kernbereich ist mit $14,3 \pm 10,2$ Fettzellen/mm² in Gruppe 5 mehr Fett entstanden als in Gruppe 3 mit $7,3 \pm 9$ Fettzellen/mm², jedoch konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung des Randbereichs ist ebenfalls in Gruppe 5 mit $55,6 \pm 21,9$ Fettzellen/mm² mehr Fett als in Gruppe 3 mit $36,5 \pm 17,5$ Fettzellen/mm² entstanden, hier konnte eine Signifikanz mittels Student t-Test nachgewiesen werden ($p=0,046$). Diese Ergebnisse zeugen von einem positiven Effekt der Fettlappenplastik auf die Adipogenese im Konstrukt.

4.7. Vimentin-Antikörper-Färbung

Um herausfinden zu können, ob die neu entstandenen Fettzellen in den Konstrukten murinen oder humanen Ursprungs sind, wurden Schnitte aus der Konstruktmitte einer immunhistologischen Färbung mittels eines monoklonalen Antikörpers, der gegen das humane intermediäre Filamentprotein

Vimentin (Klon SP 20) gerichtet ist, unterzogen. Beispiele aus der Versuchsreihe, positiv sowie negativ Kontrolle sind in Abb. 19 abgebildet.

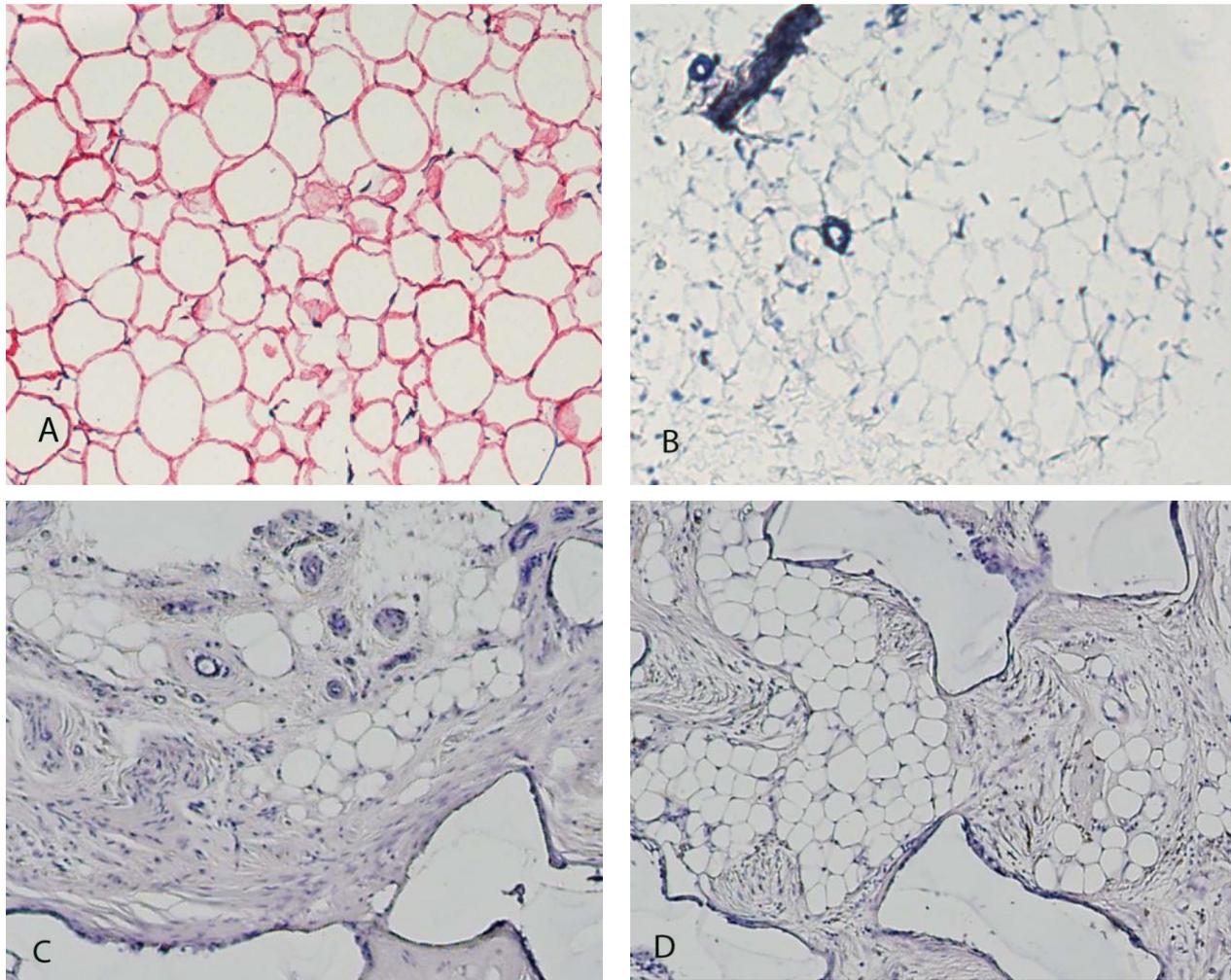


Abb. 19: Vimentin-Antikörper SP20 Färbung: A humanes Fett; B murines Fett; C Beispiel aus Gruppe 3; D Beispiel aus Gruppe 5

Wie in Abb. 19 A zu sehen ist, bindet der Antikörper an humanes Vimentin, wodurch sich humanes Fettgewebe im mikroskopischen Bild rot darstellt. Im Gegensatz dazu ist eine Bindung an murines Vimentin nicht möglich, daher erscheint das murine Fettgewebe bei der negativen Kontrolle aufgrund der Hämalaungegenfärbung bläulich (Abb. 19 B). Wendet man dieses Verfahren an Mittelschnitten der Leistenkonstrukte an, so erscheinen alle gefärbten Schnitte dieser Versuchsreihe bläulich, da auch hier nur die Gegenfärbung mit Hämalaun funktioniert hat. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei den neu entstandenen Fettzellen innerhalb der Konstrukte um Fettgewebe murinen Ursprungs handelt (Abb. 19 C+D).

5. Diskussion

Zwar existieren heutzutage viele erfolgsversprechende Ansätze zur Generierung von neuem Fettgewebe *in vivo*, ein Goldstandard hat sich bis jetzt jedoch nicht herauskristallisiert. Die vorliegende Arbeit untersuchte diesen Sachverhalt anhand eines Tierversuches mit 25 Nacktmäusen während eines Beobachtungszeitraums von 12 Wochen. Das Studiendesign war dabei so ausgelegt, dass einzelne Faktoren, deren Effekte auf die Adipogenese in der Literatur kontrovers diskutiert werden, getrennt voneinander untersucht werden konnten. Zu diesen Faktoren zählen einerseits die Auswirkungen von ASCs und deren Induktion auf das wirtseigene Gewebe. Andererseits wurde untersucht, ob ein wirtseigenes, umliegendes fettreiches Milieu und ein Anschluss an das wirtseigene Gefäßsystem einen Effekt auf die Adipogenese haben. Ein letzter Punkt den es zu untersuchen galt bestand in der Volumenstabilität der verwendeten Polyurethanscaffolds.

Um diese Faktoren getrennt voneinander untersuchen zu können wurden die 25 Versuchstiere in 5 Gruppen à 5 Tieren unterteilt. Tabelle 1 auf Seite 19 veranschaulicht die Gruppeneinteilung. Die Konstrukte in Gruppe eins und zwei dienten dabei zur Kontrolle und wurden ohne ASCs implantiert, in den restlichen drei Gruppen wurden die Scaffolds mit ASCs besiedelt. Um die Adipogenese gezielt innerhalb der Scaffolds anzuregen wurden die Konstrukte der Gruppen eins, drei und fünf vor der Implantation zusätzlich in Induktionsmedium gelagert. In Gruppe fünf wurde zusätzlich eine Fettlappenplastik durchgeführt um ein fettreiches Milieu am Implantationsort zu schaffen.

Die dabei erzielten Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert und mit der aktuellen Literatur verglichen.

5.1. Polyurethan zum Zwecke des Adipose Tissue Engineerings

Da im Rahmen des Adipose Tissue Engineerings die Form- und Volumenstabilität zu Beginn nicht vom neu generierten Gewebe allein gewährleistet werden kann, muss auf zusätzliches Biomaterial als Gerüst zurückgegriffen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür eine Kombination aus einem porösen poly(ϵ -caprolakton)-basierten Polyurethan (Porendurchmesser 400 μ m) und einem langzeitstabilen Fibringel verwendet. Das Fibringel dient zur gleichmäßigen Verteilung und Stabilisation der Zellen innerhalb der Poren und wurde bereits in arbeitsgruppeninternen Versuchen erfolgreich getestet (Wittmann et al. 2013).

Während des Beobachtungszeitraums von zwölf Wochen konnte dabei gezeigt werden, dass es signifikant zu keiner Veränderung des Scaffolddurchmessers gekommen ist ($p=0,001$). Auch im Bereich der Formstabilität kam es bei der subjektiven Betrachtung der explantierten Scaffolds zu keiner Veränderung, alle 75 explantierten Scaffolds haben ihre Zylinderform beibehalten. Dieses Ergebnis ist durchaus positiv zu werten und bietet für zukünftige Vorhaben im Bereich des Adipose Tissue Engineerings erfolgsversprechende Perspektiven.

Allerdings liegen im Bereich der Form- und Volumenstabilität nicht die einzigen Anforderungen an das verwendete Biomaterial, auch Faktoren wie Biokompatibilität und der biologische Abbau des Materials spielen eine wichtige Rolle. Diese Faktoren werden jedoch im Patentantrag des Herstellers detailliert beschrieben und wurden daher in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht (Wiese and Maier 2007).

Ein Vergleich mit der einschlägigen Literatur ist nur bedingt möglich, da die Zusammensetzung von Polyurethanen äußerst variabel erscheint. Zum Beispiel untersuchten Laschke et al. die Biokompatibilität von drei unterschiedlichen Polyurethanscaffolds in einem Tierversuch und zeigten, dass keines dieser Scaffolds eine Fremdkörperreaktion verursachte oder zytotoxisches Potential aufzeigte (Laschke et al. 2009).

Aufgrund der rudimentären Studienlage im Bereich des Langzeitüberlebens von neu generiertem Fettgewebe sind Aussagen über die ideale Zeitdauer des biologischen Abbaus der verwendeten Biomaterialien differenziert zu betrachten. So konnte bisher nur Schoeller et al. unter Verwendung von nicht resorbierbarem Silikon über einen Zeitraum von 12 Monaten neues Fettgewebe generieren (Schoeller et al. 2001). Weiser et al. hingegen generierte neues Fettgewebe über einen Zeitraum von 6 Monaten mit Hilfe eines Polyglycolsäure-Scaffolds, obwohl dieser bereits nach vier Wochen vollständig abgebaut wurde (Weiser et al. 2008). Es ist daher gänzlich unklar, wie lange das Trägergerüst bestehen bleiben muss, um einen Volumenverlust des Implantats zu vermeiden und gleichzeitig die Adipogenese innerhalb der Scaffolds nicht zu behindern. Unter diesem Aspekt erscheint die gut steuerbare Zeitdauer des biologischen Abbaus von Polyurethan durch Variation des molekularen Gewichts als großer Vorteil (McBane et al. 2011), so können in Zukunft gewonnene Aspekte einfach umgesetzt werden.

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse und unter Anbetracht der aus der Literatur gewonnenen Aspekte wäre es wünschenswert, das hier verwendete Polyurethan in einer Studie mit längerem Beobachtungszeitraum zu testen. Außerdem sollte überlegt werden, ob erneut Faktoren wie zum Beispiel die Zeitdauer des biologischen Abbaus im Zusammenhang mit der Generierung von neuem Fettgewebe untersucht werden sollten, sodass das verwendete Biomaterial noch besser daran angepasst werden kann.

5.2. Adipose derived stem cells, deren Induktion und das Potential endogener Stammzellen

Obwohl in der Vergangenheit eine Vielzahl von in vivo Studien im Bereich des Adipose Tissue Engineerings veröffentlicht wurden, gibt es immer noch einige ungeklärte Fragen was die Rolle von ASCs im wirtseigenen Gewebe betrifft. Dies wird durch eine Metaanalyse von Bauer-Kreisel et al. aus dem Jahre 2010 verdeutlicht, in welcher 21 in vivo Studien auf die Frage hin untersucht wurden, ob das neu entstandene Fettgewebe dabei von den implantierten oder den bereits vorhandenen,

wirtseigenen Zellen abstammt (Bauer-Kreisel, Goepferich, and Blunk 2010). Alle aufgelisteten Studien verfolgten einen zellbasierten Ansatz. In 11 Studien wurden die Zellen zusätzlich induziert. Das Ergebnis dieser Metaanalyse wies eine auffallend große Diskrepanz auf. So besagten 12 der 21 Studien, das neu entstandene Gewebe stammt von den implantierten Zellen ab. Hingegen wurde in 2 Studien die Behauptung aufgestellt, das neu entstandene Gewebe stamme von wirtseigenen Zellen ab. In den restlichen 7 Studien war das neu entstandene Gewebe eine Mischung aus beidem.

Tsuji et al. veröffentlichte zum Beispiel eine dieser 7 Studien. Darin wurde während eines Beobachtungszeitraums von 24 Wochen sowohl mit einem zellbasierten als auch mit einem zellfreien Ansatz erfolgreich neues Fettgewebe generiert (Tsuji et al. 2009). Interessanterweise ist dabei am meisten Fett in den Scaffolds entstanden, die zwar mit ASCs besiedelt wurden, in denen aber das neu entstandene Gewebe nur zum geringen Teil humanen Ursprungs war. Sowohl dieser Sachverhalt als auch die Tatsache, dass mit zellfreien Ansätzen erfolgreich Fett gezüchtet werden kann, verdeutlichen das Potential endogener Stammzellen und lässt vermuten, dass die Funktionen und Interaktionen der implantierten ASCs weiterreichender sind als bisher angenommen.

Ähnlich verhält es sich mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit. Mit Hilfe einer Vimentin-Antikörperfärbung konnte gezeigt werden, dass die neu entstandenen Fettzellen von murinen Vorläuferzellen abstammen. Ebenfalls kann die randständige Lokalisation der meisten Fettzellen als Indiz für diese Einwanderungshypothese angesehen werden. Trotzdem konnte durch Auszählen der neu entstandenen Fettzellen und dem anschließenden Vergleich zwischen den fünf Gruppen ein signifikant positiver Effekt der humanen ASCs auf die Adipogenese innerhalb der Scaffolds belegt werden. So ist im Randbereich der mit induzierten ASCs besiedelten Scaffolds (Gruppe 3 und 5) durchschnittlich am meisten Fett entstanden. Auch ein Vergleich zwischen den Gruppen 1 und 3 verdeutlicht diesen Effekt: In Gruppe 3 ist mit $36,5 \pm 17,5$ Fettzellen pro mm^2 der Außenfläche signifikant mehr Fett als in Gruppe 1 mit $12 \pm 4,5$ Fettzellen pro mm^2 der Außenfläche entstanden, dabei bestand der alleinige Unterschied der beiden Gruppen in der Besiedelung der Scaffolds mit ASCs (siehe Abb. 16).

Durch eine Recherche der einschlägigen Literatur können die Fragen, welche durch diesen Sachverhalt aufgeworfen werden, bis heute nicht endgültig beantwortet werden. Erklärungsansätze beziehen sich dabei vor allem auf das vielseitige Funktionsspektrum der ASCs. Zu diesen Funktionen zählen neben ihrem ausgeprägten Proliferations- und Differenzierungspotential (Bakker et al. 2004; Aust et al. 2004) auch ihre Fähigkeit, benachbarte Zellen durch Sekretion von verschiedensten Botenstoffen zu stimulieren. ASCs sezernieren hohe Mengen an Wachstumsfaktoren wie beispielsweise epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) oder insulin-like growth factor (IGF) (Kim et al. 2009; Wei et al. 2009). Ebenfalls sezernieren sie Zytokine wie zum Beispiel granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), zahlreiche Interleukine (IL 6,7,8 und 11) oder Tumornekrosefaktor α (Kilroy et al. 2007; Rehman et al. 2004). Gesteigert wird

die Sekretion dieser pro-angiogenen und anti-apoptotischen Wachstumsfaktoren unter hypoxischen Bedingungen (Lee et al. 2009). Der Grundgedanke hierbei ist, dass die implantierten ASCs durch Sekretion der genannten Botenstoffe endogene Stammzellen stimulieren, welche daraufhin in das Konstrukt immigrieren und dort differenzieren. Es bleibt jedoch unklar, inwieweit die eigene Differenzierung der implantierten ASCs dafür notwendig ist.

Als weiterer Anhaltspunkt zur Untermauerung dieser Hypothese kann das Ergebnis der durchgeführten Fettlappenplastik in Gruppe 5 herangezogen werden. Durch Fixation eines gestielten subkutanen Fettlappens auf dem implantierten Konstrukt wurde in Gruppe 5 versucht, ein fettreiches Milieu am Implantationsort zu schaffen. Der signifikante Unterschied zwischen Gruppe 3 mit $36,5 \pm 17,5$ Fettzellen pro mm^2 der Außenfläche und Gruppe 5 mit $55,6 \pm 21,9$ Fettzellen pro mm^2 der Außenfläche deutet einen positiven Effekt der Fettlappenplastik auf die Adipogenese innerhalb der Scaffolds an ($p=0,046$; siehe Abb. 18)

Unter der Voraussetzung, dass im murinen subkutanen Fettgewebe die Dichte an MSCs ähnlich hoch wie beim Menschen ist (Fraser et al. 2006), kann dieser Sachverhalt die besonders starke Immigration muriner Fettzellen in dieser Gruppe erklären und dient als weitere Bekräftigung der oben genannten Hypothese.

Eine ebenso viel diskutierte Problematik liegt in der adipogenen Induktion der Zellen bevor diese implantiert werden. Durch den positiven Effekt der Induktion, welcher in unzähligen Studien ex vivo beobachtet werden konnte, hat sich in der Vergangenheit eine Art Goldstandard in Bezug auf die Bestandteile des Induktionsmediums entwickelt, mit welchem in den meisten dieser Studien die Zellen induziert wurden. Typische Bestandteile sind Glukokortikoide, Phosphodiesterasehemmer zur Erhöhung des cAMP-Spiegels, Insulin bzw. IGF-I und PPAR γ -Agonisten (Casadei et al. 2012). Betrachtet man wiederum die Metaanalyse von Bauer-Kreisel et al. fällt auf, dass trotz dieser Erfolge bei 10 der 21 in vivo Studien auf eine adipogene Induktion verzichtet wurde. Aufgrund erfolgreicher Ergebnisse mit beiden Ansätzen ist bis heute ungeklärt, ob eine adipogene Induktion wirklich notwendig ist.

Die erzielten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen hinsichtlich dieser Fragestellung auch keine weiteren Rückschlüsse zu. Zwar ist im Kernbereich der Scaffolds mit Induktion durchschnittlich mehr Fett entstanden, eine eindeutige Signifikanz konnte aber nicht gefunden werden (siehe Abb. 17).

Abschließend kann gesagt werden, dass bis heute die Funktionen und Interaktionen der implantierten Zellen und das große Potential der endogenen Stammzellen zwar nicht im Detail bekannt sind, eine duale Rolle der ASCs als Mediatoren und gleichzeitig als Grundsubstanz für neues Fettgewebe jedoch mehr als wahrscheinlich ist und in zukünftigen Studien weiter untersucht werden sollte.

5.3. Die Vaskularisation als Schlüsselfaktor des Adipose Tissue Engineerings

An der zentralen Rolle einer suffizienten Vaskularisation im Bereich des Adipose Tissue Engineerings wird in der einschlägigen Literatur nicht mehr gezweifelt. So ist man sich einig, dass ohne die Gewährleistung einer suffizienten Vaskularisation das neu generierte Fettgewebe nicht auf Dauer überleben kann. Grundlegend hierfür ist der hohe Metabolismus und die hohe Plastizität von Fettgewebe (Tang and Lane 2012). Viel diskutiert ist dabei die Interaktion zwischen vaskulären Endothelzellen und ASCs. Neben der bereits erwähnten Sekretion von angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF an bFGF von Seiten der ASCs, werden im ähnlichen Maß auch Faktoren von Endothelzellen sezerniert, welche wiederum die Differenzierung und Proliferation der ASCs stimulieren. Bereits im Jahre 1994 konnten Varzaneh et al. diesen gegenseitigen Effekt mit Hilfe von Kulturen nachweisen (Varzaneh et al. 1994). Im Jahre 2007 brachten Borges et al. beide Zelltypen zum ersten Mal in einem 3D-Modell in vitro zusammen, mit dem Ergebnis, dass nur die ASCs weiter proliferierten, während die Endothelzellen in Apoptose traten (Borges et al. 2007). Trotz großer Bemühungen in diesem Bereich wurde diese Problematik der unzureichenden vaskulären Endothelzellproliferation und der damit verbundenen insuffizienten Vaskularisation des neuen Fettgewebes bis heute nicht befriedigend gelöst (Verseijden et al. 2010).

Als möglicher Lösungsansatz für dieses Problem wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt eines Gefäßanschlusses untersucht. Hierfür wurden die Konstrukte in der linken Leistenregion an das bestehende Gefäßsystem nach Prinzip eines Durchflussgefäßes angeschlossen, während auf der gegenüberliegenden Seite darauf verzichtet wurde. Um den dadurch entstandenen Effekt messen zu können wurden sowohl die Konstruktgewichte, die Anzahl der Gefäßanschnitte und die Anzahl an Fettzellen innerhalb der Konstrukte miteinander verglichen. Das dabei erzielte Ergebnis ist jedoch schwer einzuordnen. Die signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Konstruktgewicht und der gezählten Gefäßanschnitte lassen vermuten, dass der Gefäßanschluss durchaus mit einer gesteigerten Vaskularisation der Konstrukte einherging. Durchschnittlich waren die Konstrukte mit Gefäßanschluss mit 40 ± 5 mg signifikant schwerer als die Konstrukte ohne Gefäßanschluss mit nur 36 ± 9 mg, was auf einen erhöhten Flüssigkeitsanteil zurückzuführen sein könnte ($p=0,039$; siehe Abb. 15) (Thews and Vaupel 2005). Auch die gezählten Gefäßanschnitte bekräftigen diese Vermutung, so sind sowohl im Rand- als auch im Kernbereich der Konstrukte mit Gefäßanschluss signifikant mehr Gefäßanschnitte zu zählen (Randbereich: $p=0,000$, Kernbereich $p=0,006$; siehe Abb. 14). Vergleicht man hingegen die gezählten Fettzellen miteinander, erhält man im Randbereich der Konstrukte ein gegenteiliges Ergebnis. So ist bei 19 von 25 Mäusen signifikant mehr Fett im Randbereich der Konstrukte ohne Gefäßanschluss entstanden ($p=0,015$;). Im Bereich des Konstrukt kerns konnte diesbezüglich keine Signifikanz gefunden werden, hier ist durchschnittlich mehr Fett in den Konstrukten mit Gefäßanschluss entstanden ($p=0,064$, siehe Abb. 13).

Erklärungsansätze für dieses Ergebnis zu finden ist schwierig. Ein Vergleich mit der einschlägigen Literatur wird dadurch limitiert, dass bisher keine Studie mit ähnlichem Design wie in der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurde. Zwar wird in zahlreichen Studien über eine erfolgreiche Generierung von neuem Fettgewebe mit Hilfe von Durchflussgefäßen berichtet, ein direkter Vergleich zwischen Konstrukten mit und ohne Anschluss an ein Durchflussgefäß wurde bis heute jedoch noch nicht beschrieben. Sowohl in hohle Scaffolds als auch in poröse Scaffolds wurden bereits Gefäße integriert, auf Kontrollgruppen ohne Gefäßanschluss wurde dabei aber immer verzichtet (Rophael et al. 2007; Walton, Beahm, and Wu 2004; Stillaert et al. 2007). Somit ist es also offensichtlich möglich mit Hilfe von integrierten Gefäßbündeln neues Fettgewebe zu generieren, die Vor- und Nachteile eines Gefäßanschlusses können dadurch aber nicht genauer bestimmt werden.

Eine interessante Arbeit im Bereich der Vaskularisation von Konstrukten im Rahmen des Tissue Engineerings veröffentlichten Lokmic et al. im Jahre 2007 (Lokmic et al. 2007). Darin wurde unter Verwendung von hohlen Polycarbonatscaffolds mit integriertem Gefäßbündel über einen Zeitraum von insgesamt 112 Tagen das Sauerstofflevel und das Proliferationsverhalten endothelialer Vorläuferzellen innerhalb der generierten Hohlräume gemessen. Erstaunlicherweise konnte eine maximale Proliferationsrate an Tag 7 beobachtet werden, gleichzeitig bestand auch die maximale Hypoxie innerhalb der Hohlräume. Ein niedriger Sauerstoffgehalt scheint sich also positiv auf das Proliferationsverhalten der endothelialen Vorläuferzellen innerhalb der Scaffolds auszuwirken. Betrachtet man dieses Ergebnis unter dem Aspekt, dass die implantierten ASCs vor allem unter hypoxischen Bedingungen Wachstumsfaktoren und Zytokine zur Stimulation endogener Stammzellen sezernieren (Lee et al. 2009), könnte darin ein möglicher Erklärungsansatz für das in der vorliegenden Arbeit erzielte Ergebnis gefunden werden. So macht es durchaus Sinn, dass endogene Stammzellen vor allem in die Konstrukte ohne Gefäßanschluss immigrieren, weil unter den dort herrschenden hypoxischen Bedingungen die implantierten ASCs besonders viele Botenstoffe sezernieren.

Eine Frage die sich bei diesem Erklärungsansatz jedoch in den Vordergrund stellt, besteht in der Sauerstoffversorgung der immigrierten Stammzellen. Es wurde bereits mehrfach erwähnt, dass eine adäquate Sauerstoffversorgung eine zentrale Rolle im Bereich des Adipose Tissue Engineerings spielt. In der Beantwortung dieser Fragestellung kann vielleicht auch der Grund für die auffällig randständige Lokalisation der meisten Fettzellen gefunden werden. In diesem Bereich wäre es nämlich denkbar, dass die immigrierten Stammzellen die umliegende Gefäßversorgung nutzen. Somit wären Sie unabhängig von dem implantierten Durchflussgefäß, was das besonders starke Wachstum neuer Fettzellen in den Konstrukten ohne Gefäßanschluss ebenfalls erklären würde. Dem gegenüber reicht die Sauerstoffversorgung ohne Gefäßanschluss im Konstrukt kern für eine erfolgreiche Fettgenerierung nicht aus. Ebenfalls gilt es zu bedenken, dass bei plastischen Eingriffen mit größeren

Weichteildefekten auf einen zentralen Gefäßanschluss im Sinne eines präformierten, freien Gewebelappens nur schwer zu verzichten sein wird.

Sind die in diesem Abschnitt aufgestellten Hypothesen wirklich zutreffend, würden sich daraus neue Herausforderungen für zukünftige Studienmodelle ergeben. Ziel dabei wäre es, ein Gleichgewicht zwischen hypoxischen Bedingungen zur Stimulation der implantierten ASCs und gleichzeitig einer adäquaten Sauerstoffversorgung für immigrierende Stammzellen auch im Konstrukt kern herzustellen.

5.4. Limitationen des Studiendesigns

Durch das multifaktorielle Studiendesign der vorliegenden Arbeit konnten mehrere wichtige Faktoren des Adipose Tissue Engineerings innerhalb eines Versuches getrennt voneinander untersucht werden. Um dabei die Übersicht zu erhalten sind wegen der vielen Variablen auch einzelne Limitationen im Bereich der Methodik entstanden, welche im folgenden Abschnitt Aufmerksamkeit bekommen sollen.

Eine Limitation des Studiendesigns liegt in dem vordefinierten Beobachtungszeitraum von 12 Wochen. Da für einen klinischen Einsatz das Langzeitüberleben eines Weichteilersatzes von großer Bedeutung ist, können die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse nicht als abschließende Erkenntnisse angesehen werden. Ebenfalls erlaubt der einzelne Endpunkt der Studie nur limitierte Rückschlüsse auf die Adipogenese während der 12 Wochen. Es kann zum Beispiel keine Aussage darüber getroffen werden, zu welchem Zeitpunkt die Proliferationsrate der Stammzellen am höchsten war oder ob ausdifferenzierte Fettzellen bereits wieder in Apoptose getreten sind.

Um die Stabilität des neu entstandenen Gewebes nach Abbau des Scaffolds genauer untersuchen zu können, wäre ebenfalls ein längerer Beobachtungszeitraum notwendig gewesen und war daher kein primärer Bestandteil dieser Arbeit. Die Übergangsphase zwischen Abbau des Scaffolds und Wachstum des neuen Gewebes stellt aber einen interessanten Aspekt für zukünftige Studien dar.

Um sicherzustellen, dass die verwendeten ASCs zum Zeitpunkt der Implantation noch vital waren, wäre ein Live-Dead-Assay unter Verwendung von Kontrollkonstrukten von Vorteil gewesen. In Arbeitsgruppen internen Vorversuchen mit ähnlicher Methodik wurde dies jedoch bereits verwirklicht und ist daher nicht zwangsläufig erforderlich gewesen (Wittmann et al. 2013).

Als letzter Kritikpunkt des vorliegenden Studiendesigns kann die kleine Fallzahl mit $n=5$ Tieren pro Gruppe gewertet werden. Vor einem klinischen Einsatz wäre daher die Überprüfung der hier aufgestellten Hypothesen in Studien mit größeren Fallzahlen wünschenswert. Trotzdem konnten signifikante Ergebnisse gezeigt werden, sodass Schlussfolgerungen bezüglich der Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen definitiv möglich sind.

5.5. Ausblick

Obwohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der einschlägigen Literatur kein endgültiger Goldstandard bezüglich der Generierung von neuem Fettgewebe gefunden werden konnte, sind die aktuellen Ansätze und bisher erzielten Ergebnisse vielversprechend. So ist zum Beispiel mit den verwendeten Polyurethanscaffolds ein Material gefunden worden, das sich für zukünftige Aufgabenstellungen des Adipose Tissue Engineerings im besonderen Maße eignet.

Ein Punkt den es sicherlich noch weiter zu erforschen gilt, ist die gezielte Induktion der Adipogenese innerhalb der Scaffolds. Da für das dafür verwendete Induktionsmedium bisher kein eindeutig positiver Effekt gezeigt werden konnte, stellen hypoxische Bedingungen und ein fettreiches Milieu am Implantationsort mögliche Alternativen in diesem Bereich dar. Die simultane adäquate Sauerstoffversorgung des neu entstehenden Fettgewebes, vor allem auch im Konstrukt kern, erweist sich dabei als einer der limitierenden Faktoren und ist somit eine der großen Herausforderungen, die es in zukünftigen Studienmodellen im Bereich des Adipose Tissue Engineering zu bewältigen gilt. Ein Lösungsansatz für diese Problemstellung könnte möglicherweise in den Interaktionen zwischen ASCs und endogenen Stammzellen liegen, welche dafür aber noch detaillierter verstanden werden müssen.

6. Zusammenfassung

Noch immer ist man in der rekonstruktiven Medizin auf der Suche nach einem adäquaten Weichteilersatz. Das Adipose Tissue Engineering bietet in diesem Bereich neue Lösungsansätze. Trotz vieler erfolgsversprechender Studien hat sich bis heute noch kein Goldstandard herauskristallisiert. Es ist weiterhin unklar unter welchen Bedingungen sich neues Fettgewebe am besten in vivo generieren lässt. Die vorliegende Arbeit untersuchte diesen Sachverhalt anhand eines Tierversuches mit 25 Nacktmäusen über einen Beobachtungszeitraum von 12 Wochen. Hierfür wurden adipose derived stem cells (ASCs) mit Hilfe von einem langzeitstabilen Fibrinigel auf Polyurethanscaffolds besiedelt und subkutan in beide Leistenregionen und zwischen die Schulterblätter einer Maus implantiert. Die Konstrukte in der linken Leiste wurden an das bestehende Gefäßsystem angeschlossen. In Kontrollgruppen wurden unbesiedelte Scaffolds auf die gleiche Art implantiert. Das Studiendesign war dabei so ausgelegt, dass Faktoren, deren Effekte auf die Adipogenese kontrovers in der Literatur diskutiert werden, getrennt voneinander untersucht werden konnten. Zu diesen Faktoren zählen die verwendeten Polyurethanscaffolds, das Funktionsspektrum von mesenchymalen Stammzellen, der Effekt einer adipogenen Induktion und der Anschluss an das wirtseigene Gefäßsystem.

Am Ende des Beobachtungszeitraumes waren die 0,4ml großen Scaffolds nur teilweise mit reifen Fettzellen besiedelt, diese waren alle murinen Ursprungs. Dabei konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Scaffolds während des gesamten Beobachtungszeitraums ihre Form und ihr Volumen beibehalten haben. Außerdem zeigte sich ein positiver Effekt auf die Adipogenese durch das Besiedeln

der Scaffolds mit ASCs und durch die Schaffung eines fettreichen Milieus am Implantationsort durch eine Fettlappenplastik. Eine Aussage über den Effekt einer adipogenen Induktion konnte nicht getroffen werden. Etwas unerwartet war das Ergebnis bezüglich des Gefäßanschlusses, dieser scheint einen negativen Effekt auf die Adipogenese im äußeren Bereich der Scaffolds zu erzeugen.

Erklärungsansätze für dieses Ergebnis basieren auf der Hypothese, dass die implantierten ASCs durch Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren endogene Stammzellen stimulieren, vor allem unter hypoxischen Bedingung. Diese immigrieren daraufhin in das Scaffold und beginnen zu differenzieren.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse liefern weitere neue Perspektiven im Bereich des Adipose Tissue Engineerings und bieten eine Grundlage für zukünftige Studien, um die hier aufgestellten Hypothesen zu überprüfen. Besonders die Stabilität der verwendeten Polyurethanscaffolds erwies sich als vielversprechend, hierzu wären weitere Studien mit Schwerpunkten in Sachen Biokompatibilität und biologischer Abbau mit längeren Beobachtungszeiträumen sinnvoll.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung zur Induktion der Adipogenese durch eine Kaskade an Transkriptionsfaktoren modifiziert nach (Farmer 2006).....	15
Abb. 2: Schematische Darstellung der Implantatlokalisationen.....	19
Abb. 3: Bilderreihe zur Darstellung der Implantationstechnik. Es werden die verschiedenen Lokalisationen, das schrittweise Vorgehen und eine schematische Darstellung des Gefäßanschlusses gezeigt.	21
Abb. 4: Beispielfotografien der explantierten Konstrukte in zwei Ebenen auf Millimeterpapier	26
Abb. 5: Übersichtsaufnahme (links) und Detailaufnahme mit Strukturbezeichnung (rechts) eines Mittelschnittes in Trichromfärbung (*=Fettzellen, >=Gefäßanschnitte, PU=Scaffold, FI=Fibringel) .	27
Abb. 6: Nackenkonstrukt Seitenaufnahme.....	31
Abb. 7: Das Streudiagramm zeigt die Anzahl der Fettzellen pro mm ² der Gesamtfläche, unterteilt in Gruppen und Gefäßanschluss. Jeder Punkt steht dabei für die Fettzellen eines einzelnen Konstrukts wodurch die Streuung innerhalb der einzelnen Gruppen verdeutlicht wird.	32
Abb. 8: Übersichtsaufnahme (links) und zugehörige Detailaufnahme (rechts) von Maus 3, Gruppe 1, linke Leiste mit Gefäßanschluss.....	33
Abb. 9: Übersichtsaufnahme (links) und zugehörige Detailaufnahme (rechts) von Maus 3, Gruppe 2, rechte Leiste ohne Gefäßanschluss.....	34
Abb. 10: Übersichtsaufnahme (links) und zugehörige Detailaufnahme (rechts) von Maus 2, Gruppe 3, rechte Leiste ohne Gefäßanschluss.....	35
Abb. 11: Übersichtsaufnahme (links) und zugehörige Detailaufnahme (rechts) von Maus 5, Gruppe 4, linke Leiste mit Gefäßanschluss.....	35
Abb. 12: Übersichtsaufnahme (links) und zugehörige Detailaufnahme (rechts) von Maus 2, Gruppe 5, linke Leiste mit Gefäßanschluss.....	36
Abb. 13: Vergleich der Anzahl an Fettzellen pro mm ² in Abhängigkeit des Gefäßanschlusses, aufgeteilt in Kern- (links) und Randbereich (rechts).....	37
Abb. 14 Anzahl der Gefäßanschnitte pro mm ² mit und ohne Gefäßanschluss im Konstrukt kern (links) und in den Konstrukt rändern (rechts).....	38
Abb. 15: Konstruktgewichte in g mit und ohne Gefäßanschluss (post explantationem).....	39
Abb. 16: Fettzellen/mm ² der Außenfläche in Gruppen unterteilt (Gruppe 1-4).....	40
Abb. 17: Fettzellen/mm ² der Innenfläche in Gruppen unterteilt (Gruppe 1-4)	41
Abb. 18: Vergleich zwischen Gruppe 3 und 5: Anzahl der Fettzellen/mm ² der Innenfläche (links) und Außenfläche (rechts)	42

Abb. 19: Vimentin-Antikörper SP20 Färbung: A humanes Fett; B murines Fett; C Beispiel aus Gruppe 3; D Beispiel aus Gruppe 5.....	43
--	----

7.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Gruppenübersicht mit Verdeutlichung der Unterschiede bezüglich der Konstruktherstellung.	20
Tab. 2: Protokoll zur Entparanffinierung der Schnitte	23
Tab. 3: Protokoll zur Trichromfärbung nach Ladewig.....	24
Tab. 4 Anzahl der Fettzellen in den Nackenkonstrukten (*=Konstrukt nicht mit der Haut verwachsen)	31
Tab. 5: P-Werte ANOVA Gruppe 1-4 im Bezug der Fettzellen pro mm ² der Außenfläche	40
Tab. 6: P-Werte ANOVA Gruppe 1-4 im Bezug der Fettzellen pro mm ² der Innenfläche	41

7.3. Literaturverzeichnis

- Abberton, K. M., S. K. Bortolotto, A. A. Woods, M. Findlay, W. A. Morrison, E. W. Thompson, and A. Messina. 2008. "Myogel, a novel, basement membrane-rich, extracellular matrix derived from skeletal muscle, is highly adipogenic in vivo and in vitro." *Cells Tissues Organs* no. 188 (4):347-58. doi: 10.1159/000121575.
- Altman, D. G., and J. M. Bland. 1995. "Statistics notes: the normal distribution." *BMJ* no. 310 (6975):298.
- ASPS - American Society of Plastic Surgeons. 2011. "2011 Plastic Surgery Statistics Report". Available from <http://www.plasticsurgery.org/Documents/news-resources/statistics/2011-statistics/2011-cosmetic-procedures-trends-statistics.pdf>.
- Auquier, P., G. Macquart-Moulin, J. P. Moatti, J. L. Blache, G. Novakovitch, D. Blaise, C. Faucher, P. Viens, and D. Maraninchi. 1995. "Comparison of anxiety, pain and discomfort in two procedures of hematopoietic stem cell collection: leukocytapheresis and bone marrow harvest." *Bone Marrow Transplant* no. 16 (4):541-7.
- Aust, L., B. Devlin, S. J. Foster, Y. D. Halvorsen, K. Hicok, T. du Laney, A. Sen, G. D. Willingmyre, and J. M. Gimble. 2004. "Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates." *Cytotherapy* no. 6 (1):7-14. doi: 10.1080/14653240310004539.
- Bakker, A. H., F. M. Van Dielen, J. W. Greve, J. A. Adam, and W. A. Buurman. 2004. "Preadipocyte number in omental and subcutaneous adipose tissue of obese individuals." *Obes Res* no. 12 (3):488-98. doi: 10.1038/oby.2004.55.
- Bauer-Kreisel, P., A. Goepferich, and T. Blunk. 2010. "Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration." *Adv Drug Deliv Rev* no. 62 (7-8):798-813. doi: 10.1016/j.addr.2010.04.003.
- Bender, R., and S. Lange. 2007. "[What is the p-value?]." *Dtsch Med Wochenschr* no. 132 Suppl 1:e15-6. doi: 10.1055/s-2007-959030.
- Bender, R., S. Lange, and A. Ziegler. 2007. "[Multiple testing]." *Dtsch Med Wochenschr* no. 132 Suppl 1:e26-9. doi: 10.1055/s-2007-959035.
- Borges, J., M. C. Muller, A. Momeni, G. B. Stark, and N. Torio-Padron. 2007. "In vitro analysis of the interactions between preadipocytes and endothelial cells in a 3D fibrin matrix." *Minim Invasive Ther Allied Technol* no. 16 (3):141-8. doi: 10.1080/13645700600935398.
- Bunnell, B. A., M. Flaat, C. Gagliardi, B. Patel, and C. Ripoll. 2008. "Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation." *Methods* no. 45 (2):115-20. doi: 10.1016/j.ymeth.2008.03.006.

- Casadei, A., R. Epis, L. Ferroni, I. Tocco, C. Gardin, E. Bressan, S. Sivoilella, V. Vindigni, P. Pinton, G. Mucci, and B. Zavan. 2012. "Adipose tissue regeneration: a state of the art." *J Biomed Biotechnol* no. 2012:462543. doi: 10.1155/2012/462543.
- Choi, J. S., H. J. Yang, B. S. Kim, J. D. Kim, J. Y. Kim, B. Yoo, K. Park, H. Y. Lee, and Y. W. Cho. 2009. "Human extracellular matrix (ECM) powders for injectable cell delivery and adipose tissue engineering." *J Control Release* no. 139 (1):2-7. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.05.034.
- Choi, Y. S., S. N. Park, and H. Suh. 2005. "Adipose tissue engineering using mesenchymal stem cells attached to injectable PLGA spheres." *Biomaterials* no. 26 (29):5855-63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.022.
- Christiaens, V., and H. R. Lijnen. 2010. "Angiogenesis and development of adipose tissue." *Mol Cell Endocrinol* no. 318 (1-2):2-9. doi: 10.1016/j.mce.2009.08.006.
- Cristancho, A. G., and M. A. Lazar. 2011. "Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation." *Nat Rev Mol Cell Biol* no. 12 (11):722-34. doi: 10.1038/nrm3198.
- Eyrich, D., F. Brandl, B. Appel, H. Wiese, G. Maier, M. Wenzel, R. Staudenmaier, A. Goepferich, and T. Blunk. 2007. "Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering." *Biomaterials* no. 28 (1):55-65. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.027.
- Farmer, S. R. 2006. "Transcriptional control of adipocyte formation." *Cell Metab* no. 4 (4):263-73. doi: 10.1016/j.cmet.2006.07.001.
- Findlay, M. W., A. Messina, E. W. Thompson, and W. A. Morrison. 2009. "Long-term persistence of tissue-engineered adipose flaps in a murine model to 1 year: an update." *Plast Reconstr Surg* no. 124 (4):1077-84. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181b59ff6.
- Fischbach, C., T. Spruss, B. Weiser, M. Neubauer, C. Becker, M. Hacker, A. Gopferich, and T. Blunk. 2004. "Generation of mature fat pads in vitro and in vivo utilizing 3-D long-term culture of 3T3-L1 preadipocytes." *Exp Cell Res* no. 300 (1):54-64. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.05.036.
- Fraser, J. K., I. Wulur, Z. Alfonso, and M. H. Hedrick. 2006. "Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology." *Trends Biotechnol* no. 24 (4):150-4. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.01.010.
- Gesta, S., Y. H. Tseng, and C. R. Kahn. 2007. "Developmental origin of fat: tracking obesity to its source." *Cell* no. 131 (2):242-56. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.004.
- Gimble, J. M., A. J. Katz, and B. A. Bunnell. 2007. "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine." *Circ Res* no. 100 (9):1249-60. doi: 10.1161/01.RES.0000265074.83288.09.
- Gopferich, A. 1996. "Mechanisms of polymer degradation and erosion." *Biomaterials* no. 17 (2):103-14.
- Green, H., and O. Kehinde. 1975. "An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion." *Cell* no. 5 (1):19-27.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas, and H. S. Sul. 1998. "Understanding adipocyte differentiation." *Physiol Rev* no. 78 (3):783-809.
- Hebert, T. L., X. Wu, G. Yu, B. C. Goh, Y. D. Halvorsen, Z. Wang, C. Moro, and J. M. Gimble. 2009. "Culture effects of epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on cryopreserved human adipose-derived stromal/stem cell proliferation and adipogenesis." *J Tissue Eng Regen Med* no. 3 (7):553-61. doi: 10.1002/term.198.
- Huss, F. R., and G. Kratz. 2002. "Adipose tissue processed for lipoinjection shows increased cellular survival in vitro when tissue engineering principles are applied." *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* no. 36 (3):166-71.
- Kahn, C. R. 2008. "Medicine. Can we nip obesity in its vascular bud?" *Science* no. 322 (5901):542-3. doi: 10.1126/science.1165667.
- Kawaguchi, N., K. Toriyama, E. Nicodemou-Lena, K. Inou, S. Torii, and Y. Kitagawa. 1998. "De novo adipogenesis in mice at the site of injection of basement membrane and basic fibroblast growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* no. 95 (3):1062-6.
- Kilroy, G. E., S. J. Foster, X. Wu, J. Ruiz, S. Sherwood, A. Heifetz, J. W. Ludlow, D. M. Stricker, S. Potiny, P. Green, Y. D. Halvorsen, B. Cheatham, R. W. Storms, and J. M. Gimble. 2007. "Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors." *J Cell Physiol* no. 212 (3):702-9. doi: 10.1002/jcp.21068.

- Kim, W. S., B. S. Park, S. H. Park, H. K. Kim, and J. H. Sung. 2009. "Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors." *J Dermatol Sci* no. 53 (2):96-102. doi: 10.1016/j.jdermsci.2008.08.007.
- Kimura, Y., W. Tsuji, H. Yamashiro, M. Toi, T. Inamoto, and Y. Tabata. 2010. "In situ adipogenesis in fat tissue augmented by collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor." *J Tissue Eng Regen Med* no. 4 (1):55-61. doi: 10.1002/term.218.
- Laschke, M. W., A. Strohe, C. Scheuer, D. Eglin, S. Verrier, M. Alini, T. Pohlemann, and M. D. Menger. 2009. "In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering." *Acta Biomater* no. 5 (6):1991-2001. doi: 10.1016/j.actbio.2009.02.006.
- Lavik, E., and R. Langer. 2004. "Tissue engineering: current state and perspectives." *Appl Microbiol Biotechnol* no. 65 (1):1-8. doi: 10.1007/s00253-004-1580-z.
- Lee, E. Y., Y. Xia, W. S. Kim, M. H. Kim, T. H. Kim, K. J. Kim, B. S. Park, and J. H. Sung. 2009. "Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF." *Wound Repair Regen* no. 17 (4):540-7. doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00499.x.
- Liu, T. M., M. Martina, D. W. Hutmacher, J. H. Hui, E. H. Lee, and B. Lim. 2007. "Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages." *Stem Cells* no. 25 (3):750-60. doi: 10.1634/stemcells.2006-0394.
- Lokmic, Z., and G. M. Mitchell. 2008. "Engineering the microcirculation." *Tissue Eng Part B Rev* no. 14 (1):87-103. doi: 10.1089/teb.2007.0299.
- Lokmic, Z., F. Stillaert, W. A. Morrison, E. W. Thompson, and G. M. Mitchell. 2007. "An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct." *FASEB J* no. 21 (2):511-22. doi: 10.1096/fj.06-6614com.
- Lovett, M., K. Lee, A. Edwards, and D. L. Kaplan. 2009. "Vascularization strategies for tissue engineering." *Tissue Eng Part B Rev* no. 15 (3):353-70. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0085.
- Lumley, T., P. Diehr, S. Emerson, and L. Chen. 2002. "The importance of the normality assumption in large public health data sets." *Annu Rev Public Health* no. 23:151-69. doi: 10.1146/annurev.publhealth.23.100901.140546.
- McBane, J. E., S. Sharifpoor, K. Cai, R. S. Labow, and J. P. Santerre. 2011. "Biodegradation and in vivo biocompatibility of a degradable, polar/hydrophobic/ionic polyurethane for tissue engineering applications." *Biomaterials* no. 32 (26):6034-44. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.048.
- Neubauer, M., M. Hacker, P. Bauer-Kreisel, B. Weiser, C. Fischbach, M. B. Schulz, A. Goepferich, and T. Blunk. 2005. "Adipose tissue engineering based on mesenchymal stem cells and basic fibroblast growth factor in vitro." *Tissue Eng* no. 11 (11-12):1840-51. doi: 10.1089/ten.2005.11.1840.
- Patrick, C. W., Jr. 2000. "Adipose tissue engineering: the future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection." *Semin Surg Oncol* no. 19 (3):302-11.
- Patrick, C.W. 2001. "Tissue engineering strategies for adipose tissue repair." *Anat Rec* no. 263 (4):361-6.
- Puissant, B., C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, L. Penicaud, L. Casteilla, and A. Blancher. 2005. "Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells." *Br J Haematol* no. 129 (1):118-29. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x.
- Rehman, J., D. Traktuev, J. Li, S. Merfeld-Clauss, C. J. Temm-Grove, J. E. Bovenkerk, C. L. Pell, B. H. Johnstone, R. V. Considine, and K. L. March. 2004. "Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells." *Circulation* no. 109 (10):1292-8. doi: 10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1.
- Rophael, J. A., R. O. Craft, J. A. Palmer, A. J. Hussey, G. P. Thomas, W. A. Morrison, A. J. Penington, and G. M. Mitchell. 2007. "Angiogenic growth factor synergism in a murine tissue engineering model of angiogenesis and adipogenesis." *Am J Pathol* no. 171 (6):2048-57. doi: 10.2353/ajpath.2007.070066.

- Schoeller, T., S. Lille, G. Wechselberger, A. Otto, A. Mowlavi, and H. Piza-Katzer. 2001. "Histomorphologic and volumetric analysis of implanted autologous preadipocyte cultures suspended in fibrin glue: a potential new source for tissue augmentation." *Aesthetic Plast Surg* no. 25 (1):57-63.
- Shapiro, S. S., and M. B. Wilk. 1965. "An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)." *Biometrika* no. 52:591-&. doi: Doi 10.2307/2333709.
- Stillaert, F., M. Findlay, J. Palmer, R. Idriji, S. Cheang, A. Messina, K. Abberton, W. Morrison, and E. W. Thompson. 2007. "Host rather than graft origin of Matrigel-induced adipose tissue in the murine tissue-engineering chamber." *Tissue Eng* no. 13 (9):2291-300. doi: 10.1089/ten.2006.0382.
- Tabata, Y., S. Hijikata, M. Muniruzzaman, and Y. Ikada. 1999. "Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor." *J Biomater Sci Polym Ed* no. 10 (1):79-94.
- Tachi, M., and A. Yamada. 2005. "Choice of flaps for breast reconstruction." *Int J Clin Oncol* no. 10 (5):289-97. doi: 10.1007/s10147-005-0527-4.
- Tang, Q. Q., and M. D. Lane. 2012. "Adipogenesis: from stem cell to adipocyte." *Annu Rev Biochem* no. 81:715-36. doi: 10.1146/annurev-biochem-052110-115718.
- Thews, Gerhard, and Peter Vaupel. 2005. *Vegetative Physiologie : mit 64 Tabellen ; [neue AO]*: Heidelberg : Springer , 2005. - XV, 619 S.
- Torio-Padron, N., N. Baerlecken, A. Momeni, G. B. Stark, and J. Borges. 2007. "Engineering of adipose tissue by injection of human preadipocytes in fibrin." *Aesthetic Plast Surg* no. 31 (3):285-93. doi: 10.1007/s00266-006-0221-6.
- Tsuji, W., T. Inamoto, H. Yamashiro, T. Ueno, H. Kato, Y. Kimura, Y. Tabata, and M. Toi. 2009. "Adipogenesis induced by human adipose tissue-derived stem cells." *Tissue Eng Part A* no. 15 (1):83-93. doi: 10.1089/ten.tea.2007.0297.
- Varzaneh, F. E., G. Shillabeer, K. L. Wong, and D. C. Lau. 1994. "Extracellular matrix components secreted by microvascular endothelial cells stimulate preadipocyte differentiation in vitro." *Metabolism* no. 43 (7):906-12.
- Verseijden, F., S. J. Posthumus-van Sluijs, P. Pavljasevic, S. O. Hofer, G. J. van Osch, and E. Farrell. 2010. "Adult human bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells support the formation of prevascular-like structures from endothelial cells in vitro." *Tissue Eng Part A* no. 16 (1):101-14. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0106.
- von Heimburg, D., M. Kuberka, R. Rendchen, K. Hemmrich, G. Rau, and N. Pallua. 2003. "Preadipocyte-loaded collagen scaffolds with enlarged pore size for improved soft tissue engineering." *Int J Artif Organs* no. 26 (12):1064-76.
- Walton, R. L., E. K. Beahm, and L. Wu. 2004. "De novo adipose formation in a vascularized engineered construct." *Microsurgery* no. 24 (5):378-84. doi: 10.1002/micr.20056.
- Wei, X., Z. Du, L. Zhao, D. Feng, G. Wei, Y. He, J. Tan, W. H. Lee, H. Hampel, R. Dodel, B. H. Johnstone, K. L. March, M. R. Farlow, and Y. Du. 2009. "IFATS collection: The conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats." *Stem Cells* no. 27 (2):478-88. doi: 10.1634/stemcells.2008-0333.
- Weiser, B., L. Prantl, T. E. Schubert, J. Zellner, C. Fischbach-Teschl, T. Spruss, A. K. Seitz, J. Tessmar, A. Goepferich, and T. Blunk. 2008. "In vivo development and long-term survival of engineered adipose tissue depend on in vitro precultivation strategy." *Tissue Eng Part A* no. 14 (2):275-84. doi: 10.1089/tea.2007.0130.
- Wiese, H., and G. Maier. 2007. Open-pored polyurethane foam without skin formation, formulation for the production thereof and use thereof as a carrier material for cell and tissue cultures or medicaments. Google Patents.
- Wiggenhauser, P. S., D. F. Muller, F. P. Melchels, J. T. Egana, K. Storck, H. Mayer, P. Leuthner, D. Skodacek, U. Hopfner, H. G. Machens, R. Staudenmaier, and J. T. Schantz. 2012. "Engineering of vascularized adipose constructs." *Cell Tissue Res* no. 347 (3):747-57. doi: 10.1007/s00441-011-1226-2.
- Wittmann, K., K. Storck, C. Muhr, H. Mayer, S. Regn, R. Staudenmaier, H. Wiese, G. Maier, P. Bauer-Kreisel, and T. Blunk. 2013. "Development of volume-stable adipose tissue constructs

- using polycaprolactone-based polyurethane scaffolds and fibrin hydrogels." *J Tissue Eng Regen Med*. doi: 10.1002/term.1830.
- Yancopoulos, G. D., S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand, and J. Holash. 2000. "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." *Nature* no. 407 (6801):242-8. doi: 10.1038/35025215.
- Yoshimura, K., K. Sato, N. Aoi, M. Kurita, T. Hirohi, and K. Harii. 2008. "Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells." *Aesthetic Plast Surg* no. 32 (1):48-55; discussion 56-7. doi: 10.1007/s00266-007-9019-4.
- Yuksel, E., A. B. Weinfeld, R. Cleek, J. M. Waugh, J. Jensen, S. Boutros, S. M. Shenaq, and M. Spira. 2000. "De novo adipose tissue generation through long-term, local delivery of insulin and insulin-like growth factor-1 by PLGA/PEG microspheres in an in vivo rat model: a novel concept and capability." *Plast Reconstr Surg* no. 105 (5):1721-9.
- Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim, and M. H. Hedrick. 2002. "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." *Mol Biol Cell* no. 13 (12):4279-95. doi: 10.1091/mbc.E02-02-0105.

8. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel: „Adipose Tissue Engineering mit humanen mesenchymalen Stammzellen am Mausmodell“ in der Fachabteilung Hals-Nasen-Ohren Heilkunde an der Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar unter der Anleitung und Betreuung durch Univ.-Prof. Dr. med. R. Staudenmaier ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt. Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt. Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert. Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst. Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich nicht einverstanden.

....., den

.....

Unterschrift

9. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Reyk Fischer
Geburtsdatum	11.08.1986
Geburtsort	Isny im Allgäu
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder

Schulbildung

1993 - 1997	Grundschule Neutrauchburg
1997-2006	Abitur am Gymnasium Isny

Hochschulausbildung

10/2006-09/2009	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
10/2009-05/2014	Medizinstudium an der Technischen Universität München

Praktisches Jahr

02/2013-05/2013	Chirurgie, Klinikum rechts der Isar, München
06/2013-09/2013	Hals-Nasen-Ohrenklinik, Klinikum rechts der Isar, München
09/2013-11/2013	Kardiologie, Klinikum rechts der Isar, München
12/2013-01/2014	Internistische Notaufnahme, Klinikum rechts der Isar, München

Beruflicher Werdegang

Seit 09/2014	Assistenzarzt der inneren Medizin am Krankenhaus Weilheim
--------------	---

....., den

.....

Unterschrift

10. Danksagung

Ich danke Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier als Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der technischen Universität München für die freundliche Überlassung des Themas.

Besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater apl. Prof. Dr. R. Staudenmaier für die Ermöglichung dieser Arbeit und die freundliche Unterstützung bei der Korrektur.

Meiner Betreuerin Frau Dr. med. Katharina Storck für die zeitunabhängige Erreichbarkeit und die Unterstützung bei der Formulierung und Korrektur der Arbeit.

Meiner Arbeitsgruppe unter der Leitung von Dr. rer. nat. Sybille Regn für die liebevolle und unbezahlbare Unterstützung beim praktischen Teil dieser Arbeit. Es hat mir viel Freude bereitet mit Euch (Monika, Lena, Jascha, Maria, uvm.) zusammen zu arbeiten.

Der Arbeitsgruppe unter Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk am Universitätsklinikum Würzburg für die freundliche Zusammenarbeit.

Dem Team des präklinischen Forschungszentrums des Klinikums Rechts der Isar für die Hilfe während der Tierversuche.

Zuletzt gilt ein besonderer Dank meinen Eltern Babs und Wolf-Dieter Fischer, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet haben.