

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier)

Tissue Engineering
Kultivierung humaner Präadipozyten zur Beimpfung
dreidimensionaler Polyurethankonstrukte

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

Bettina Rittler-Ungethüm
2011

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier)

Tissue Engineering
Kultivierung humaner Präadipozyten zur Beimpfung
dreidimensionaler Polyurethankonstrukte

Bettina Monika Rittler-Ungethüm

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

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

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. R. Staudenmaier
2. Univ.-Prof. Dr. H. Deppe

Die Dissertation wurde am 21.11.2011 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 01.02.2012 angenommen.

Meinen Eltern und meinem Mann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil.....	3
2.1. Fettgewebe	3
2.1.1. Anatomie des Fettgewebes.....	3
2.1.2. Adipozytendifferenzierung in vitro	4
2.1.3. Fettgewebstransplantation	7
2.2. Tissue Engineering	8
2.2.1. Tissue Engineering, Definition.....	8
2.2.2. Tissue Engineering, Motivation.....	8
2.2.3. Tissue Engineering von Fettgewebe	9
2.3. Fragestellung.....	13
3. Material und Methoden	14
3.1. Isolation der Präadipozyten	16
3.1.1. Lagerung des Fettbiopsats	16
3.1.2. Digestion des Fettgewebe	17
3.1.3. Erylyse.....	17
3.1.4. MiniMACS™ System	19
3.2. Proliferation und Kultivierung der Präadipozyten	20
3.3. Differenzierung der Präadipozyten	22
3.4. Generierung eines dreidimensionalen Fettgewebsverbundes	23
3.4.1. Polyurethankonstrukte.....	23
3.4.2. Zellkleberherstellung	23
3.4.3. Kultivierung von mit Präadipozyten beimpfter Polyurethankonstrukte in vitro	24
3.5. Auswertung	26
3.5.1. Fotodokumentation	26
3.5.2. Zellproliferations-Assay MTT.....	26
3.5.3. Ölrot-O-Färbung	26
3.5.4. Lebend- Tot- Färbung mittels Fluoreszenz	27
3.5.5. Doppelfärbung Hämalaun-Eosin(HE) und Trichromfärbung	28
4. Ergebnisse	30
4.1. Isolation der Präadipozyten	30
4.1.1. Zeitabhängigkeit der Biopsatverarbeitung.....	30
4.1.2. Optimierung der Fettgewebsdigestion	31
4.1.3. Auswirkung der Erylyse	32
4.1.4. MiniMACS™ System.....	32
4.2. Proliferation und Kultivierung der Präadipozyten	33
4.3. Differenzierung der Präadipozyten	35
4.4. Generierung eines dreidimensionalen Fettgewebsverbundes	37
4.4.1. Polyurethankonstrukte.....	37
4.4.2. Kultivierung von mit Präadipozyten beimpfter Polyurethankonstrukte in vitro	37
5. Diskussion	41
5.1. Optimierung der Zellkulturbedingungen	41
5.1.1. Präadipozyten-Isolation	41
5.1.2. Mediumoptimierung	43

5.2. Dreidimensionale Trägermatrices.....	44
5.3. Perspektiven des Weichgewebs-Tissue Engineering	45
6. Zusammenfassung.....	46
7. Literaturverzeichnis.....	48
8. Curriculum vitae	55
9. Danksagung.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel
Allgemeiner Teil	
Tab. 1	Adipozytendifferenzierung am in vitro Modell (Gregoire, 1998)

Ergebnisse

Tab. 2	Zeitabhängigkeit der Biopsatverarbeitung
Tab. 3	Zellausbeute in Abhängigkeit der Digestionsdauer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel
Allgemeiner Teil	
Abb. 2.1.	Differenzierung der adipogenen Linie. Beziehung zwischen morphologischen Typen in vivo und Stadien der adipogenen Zelldifferenzierung in vitro (modifiziert nach Ailhaud, 1992)

Material und Methoden

Abb. 3.1.	Mechanisches Zerkleinern des Biopsats
Abb. 3.2.	Digestion im Wasserbad
Abb. 3.3.	Filtern der Zellsuspension
Abb. 3.4.	Zellpellet nach Zentrifugation
Abb. 3.5.	Aussaat in Zellkulturflasche
Abb. 3.6.	Kultivierung im Brutschrank
Abb. 3.7.	Multi Stand + Reagenzien, MiniMACS™
Abb. 3.8.	Darstellung der Versuchsreihenfolge zur Kultivierung isolierter Präadipozyten
Abb. 3.9.	Polyurethankonstrukt, 5mm Durchmesser
Abb. 3.10.	Polyurethankonstrukt, 2mm Breite
Abb. 3.11.	Zellpellet nach Zentrifugation
Abb. 3.12.	Resuspension des Zellpellet
Abb. 3.13.	Zählkammer (Trypanblau + Zellen)
Abb. 3.14.	Beimpfen der Konstrukte

Ergebnisse

Abb. 4.1.	Präadipozyten (1 Tag Kultivierung, 10x Vergrößerung), nach sofortiger Verarbeitung
Abb. 4.2.	Präadipozyten (1 Tag Kultivierung, 10x Vergrößerung), Verarbeitung nach 24 Stunden
Abb. 4.3.	Präadipozyten nach ½ Stunde Denaturierungszeit (10x Vergrößerung)
Abb. 4.4.	Präadipozyten nach 2 Stunden Denaturierungszeit (10x Vergrößerung)
Abb. 4.5.	Präadipozyten nach 9 Stunden Denaturierungszeit (10x Vergrößerung)
Abb. 4.6.	Präadipozyten (4 Tage Kultivierung) mit Erylyse (10x Vergrößerung)
Abb. 4.7.	Präadipozyten (4 Tage Kultivierung) ohne Erylyse (10x Vergrößerung)
Abb. 4.8.	Zu Adipozyten differenzierte Vorläuferzellen (10x Vergrößerung)
Abb. 4.9.	Isolierte Vorläuferzellen nach zwei Wochen Kultivierung (20x Vergrößerung)

Abb. 4.10.	Präadipozyten (1 Woche Kultivierung, 40x Vergrößerung)
Abb. 4.11.	Präadipozyten (1 Woche Kultivierung, 20x Vergrößerung)
Abb. 4.12.	Präadipozyten (1 Woche Kultivierung, 10x Vergrößerung)
Abb. 4.13.	Präadipozyten (2 Wochen Kultivierung, 10x Vergrößerung)
Abb. 4.14.	Präadipozyten P0 (1 Woche Kultivierung mit E.C. Growth Medium, 10x Vergrößerung)
Abb. 4.15.	Präadipozyten P1 (2 Tage Kultivierung, mit E.C. Growth Medium, 10x Vergrößerung)
Abb. 4.16.	Adipozyten 1 Woche nach Induktion mit Basalmedium 1 + Zusätze, (20x Vergrößerung)
Abb. 4.17.	Adipozyten 1 Woche nach Induktion mit α -MEM (20x Vergrößerung)
Abb. 4.18.	Adipozyten nach 10 Tagen Differenzierung mit Basalmedium 1 (40x Vergrößerung)
Abb. 4.19.	Adipozyten nach 10 Tagen Differenzierung mit α -MEM (40x Vergrößerung)
Abb. 4.20.	Adipozyten (21 Tage Kultivierung mit Differenzierungsmedium, 10x Vergrößerung)
Abb. 4.21.	Adipozyten (10 Tage Kultivierung mit Differenzierungsmedium, 20x Vergrößerung)
Abb. 4.22.	Adipozyten (26 Tage Kultivierung mit Differenzierungsmedium, 40x Vergrößerung)
Abb. 4.23.	Adipozyten (26 Tage Kultivierung mit Differenzierungsmedium, 20x Vergrößerung)
Abb. 4.24.	Polyurethankonstrukt mit Präadipozyten (1 Woche Inkubation)
Abb. 4.25.	Polyurethankonstrukt mit Präadipozyten (2 Wochen Inkubation)
Abb. 4.26.	Polyurethankonstrukt mit Präadipozyten (5 Wochen Inkubation)
Abb. 4.27.	Konstrukt nach 1 Woche Kultivierung (Trichrom)
Abb. 4.28.	Konstrukt nach 2 Tagen Kultivierung (HE)
Abb. 4.29.	Konstrukt nach 1 Woche Kultivierung (Trichrom)
Abb. 4.30.	Konstrukt nach 5 Wochen Kultivierung (Trichrom)

Diagrammverzeichnis

Diagramm	Titel
Ergebnisse	
Diagramm 1	Zellkulturen in BM2 (Mitte) zeigten eine höhere Proliferationsrate als Zellkulturen in BM1 (links)

1. Einleitung

Der Ersatz zerstörter Gewebe ist eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin. Vor allem in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie gibt es einen hohen Bedarf an adäquaten Rekonstruktionen von Weichteildefekten, die häufig nach Tumorresektionen, Verbrennungen oder schweren Traumen entstehen (Hemmrich, 2006).

Klinische Versuche, diese Weichteildefekte mit Fettpolstertransplantaten oder durch Injektionen von Fettgewebszellsuspensionen, die aus Liposuction gewonnenen werden, zu versorgen, bringen noch keine vollständig zufriedenstellenden Ergebnisse. Die Hauptprobleme dieser Techniken sind die niedrige Überlebensrate des Transplantates, das Auftreten von Nekrosen, die auf eine insuffiziente Vaskularisation zurückzuführen sind, und die Langzeitresorption des Transplantates. Bei der Injektion autologen Fettgewebes kommt hinzu, dass die sehr empfindlichen Adipozyten durch die Aspiration und Präparation beschädigt werden. Die noch intakten Zellen neigen dazu, Zysten oder lokale Postinjektionsnekrosen zu bilden.

Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, den Defekt unter Verwendung von allogenen bzw. alloplastischen Materialien, wie z.B. Teflon und Silikon, oder auch durch moderne Verfahrenstechniken, wie injizierbares Kollagen und Hyaluronsäure, zu decken. Zur chirurgischen Standardtherapie gehört die regionale und freie Lappenplastik. Auch diese Methoden zeigen Nachteile: z.B. können synthetische Materialien Fremdkörper- oder allergische Reaktionen verursachen und weisen keine gute Langzeitpersistenz auf. Bei den Lappenplastiken bestehen Einschränkungen durch das Risiko des Transplantatverlustes, der Morbidität des Hebedefekts und die Limitation der Spenderareale. (Patrick, 1998; Katz, 1999; Ersek, 1991; Eremia, 2000; Huss, 2002; Har- Shai, 1999; Ashinoff, 2000).

Demgegenüber stellen die nach dem Prinzip des Tissue Engineering hergestellten Fettgewebstrukturen, die immer lebensfähiger und funktioneller werden, vielversprechende mögliche Therapiealternativen dar. Diese neuen Lösungsansätze haben eine im Vergleich zu den gegenwärtig eingesetzten Methoden der Fettgewebstransplantation eine verbesserte Vorhersehbarkeit, Reproduzierbarkeit und bessere Überlebenszeit zum Ziel.

Verschiedene Arbeitsgruppen versuchten in der Vergangenheit, diese Tissue-Engineering Verfahren zu optimieren und in klinische Modelle zu integrieren. Beispielsweise wurden gefriergetrocknete Kollagenkonstrukte mit humanen Präadipozyten besiedelt und sowohl in vitro als auch in vivo untersucht (von Heimburg, 2000). Des Weiteren wurden Polymerkonstrukte aus Polyglycolsäure mit murinen 3T3-L1 Präadipozytenzelllinien beimpft und über einen längeren Zeitraum in vitro und in vivo generiert (Fischbach, 2004). Das Überleben der künstlich generierten Fettgewebstrukturen bleibt jedoch verbesserungswürdig, weshalb oben genannte Modelle noch nicht klinisch anwendbar sind.

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde versucht, einen Goldstandard zur humanen Präadipozytenisolation und -kultivierung zu etablieren.

Nach der Gewinnung von Fettgewebsbiopsaten im Rahmen von Mammareduktionsplastiken und Abdominoplastiken erfolgte die Isolation und Kultivierung der Präadipozyten. Dies erfolgte durch Variation geeigneter Kulturmedien, Anwendung unterschiedlich langer Denaturierungszeiten und unter Verwendung eines MiniMACS™ Systems, das durch magnetische Separation humaner, adulter Stammzellen Fettzellen gewinnen kann. Durch verschiedene Versuche konnte die Ausbeute der Zellen deutlich gesteigert werden. Nach einer Kultivierungszeit im Brutschrank und einer unterschiedlichen Anzahl an Passagierungen erfolgte zur Bestätigung der Differenzierung in adulte Adipozyten eine Färbung nach Öl-Rot-O. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Befüllung von dreidimensionalen Polyurethankonstrukten mit Präadipozyten. Die kultivierten Zellen wurden hierzu in Fibrinogen suspendiert, mit einer Thrombinkomponente vermischt und in ein dreidimensionales Polyurethangerüst pipettiert. Nach vollendeter Polymerisation erfolgte unter Zuhilfenahme geeigneter Medien die Kultivierung der Konstrukte im Brutschrank.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Fettgewebe

2.1.1. Anatomie des Fettgewebes

Fettgewebe kommt ubiquitär im ganzen Körper vor und macht bei der erwachsenen Frau ca. 15-25% und beim erwachsenen Mann ca. 10-20% des Körpergewichts aus (Ulfig, 2001). Es ist eine Sonderform des retikulären Bindegewebes und besteht aus Fettzellen (Adipozyten), zwischen denen Retikulinfasern zur Stabilisierung liegen (Moll, 1978). Grundsätzlich findet eine Unterscheidung zwischen weißem und braunem Fettgewebe statt. Im adulten Organismus liegt hauptsächlich weißes Fettgewebe vor, das als Speichergewebe für Neutralfette (Speicherfett), mechanisch wichtiges Füllgewebe (Baufett, z.B. Corpus adiposum orbitae, Corpus adiposum buccae etc.) und Kälteschutzgewebe (subkutanes Fett) dient. Braunes Fettgewebe kommt vermehrt bei Säuglingen vor und unterstützt die Wärmeproduktion durch Oxidation aufgenommener Fettsäuren. Im adulten Organismus findet sich braunes Fettgewebe nur noch rudimentär, z.B. im Mediastinum und um die Aorta gelegen (Kugler, 1994). Die plastische und wiederherstellende Chirurgie fokussiert sich vor allem auf das weiße, subkutane Fettgewebe.

Auf zellulärer Ebene besteht weißes Fettgewebe nicht nur aus lipidgeladenen reifen Adipozyten, sondern auch aus adipozytären Vorläuferzellen, verschiedenen Blutzellen, Epithelzellen, Perizyten und Fibroblasten, der sogenannten stromal-vaskulären Fraktion (SVF) (Ailhaud, 1992). Adipozyten kommen einzeln oder in Gruppen im lockeren Bindegewebe vor oder bilden Fettläppchen (Fettorgane), die von einer Bindegewebskapsel umgeben sind. Sie können einen Durchmesser von bis zu 120 µm erreichen und sind mesenchymaler Herkunft. Die spindelförmige Jugendform der Fettzelle, der Lipoblast, ist plurivakuolär, das bedeutet, dass sie viele kleine Fettvakuolen enthalten. Während ihrer Reifung vereinigen sich die Fettvakuolen zu einem zentral im Zytoplasma liegendem Fetttropfen. Die Zellen sind dann univakuolär und der große membranlose Fetttropfen drückt das Zytoplasma und den Kern an den Rand. Hieraus ergibt sich mikroskopisch die typische Siegelringform der Zellen. Das Fett in den univakuolären Fettzellen besteht hauptsächlich aus Triacylglyceriden (Glyzerin), das mit drei Fettsäuren verestert ist. Das weiße Fettgewebe verfügt über ein ausgeprägtes

Gefäßsystem, so steht jeder Adipozyt mit mindestens einer Kapillare in Verbindung. Diese Tatsache steht im Einklang mit der hohen Stoffwechselaktivität, die sogar höher ist als im Muskelgewebe. (Ulfig, 2001; Moll, 1978; Schiebeler, 1977).

2.1.2. Adipozytendifferenzierung in vitro

Während der letzten zwanzig Jahre wurden das Wachstum und die Entwicklung von Fettgewebe in vitro intensiv untersucht. Bis heute ist der komplexe Prozess der Adipozytendifferenzierung, ausgehend von der mesenchymalen Stammzelle hin zum murenen Adipozyt, nicht vollständig geklärt. Ein früher Meilenstein für die Erforschung der Adipozytendifferenzierung waren sicherlich die Arbeiten von Smith (1971), der erstmals das Wachstum von in Kultur befindlichen, fibroblastenähnlichen Zellen aus humanem Fettgewebe beschrieb. In weiteren Versuchen wurden verschiedene Präadipozytenzelllinien und Primärkulturen verwendet. Tabelle 1 fasst einige wichtige Modelle zusammen (Gregoire, 1998).

Tab. 1 Adipozytendifferenzierung am in vitro Modell (Gregoire,1998)

<u>Zelllinien</u>	<u>Abstammung/Entwicklungsstadium</u>	<u>Induktionsstoffe für die Differenzierung</u>
ES Zellen	murine Blastozyten	Retinsäure
CH3 10T1/2	Mausembryo	5-Azacytidin
TA1	gewonnen aus mit 5-Azacytidin vorbehandelten 10 T1/2 Zellen	10% FKS(Fötales Kälberserum), Insulin and Dex(Dexamethason)
Ob17	epidymales Fettgewebe erwachsener Mäuse	8% FKS, Insulin, T3(Trijod-Thyronin)
3T3-L1	Mausembryo	10% FKS, Dex, Insulin(hoch dosiert)
3T3-F442A	Mausembryo	10% FKS, Insulin

<u>Primärkultur</u>	<u>Quelle/Alter</u>	<u>Induktionsstoffe für die Differenzierung</u>
Ratte	subkutan, epidymal, retroperitoneal/neugeboren (48 Std.), 4 Wochen, erwachsen	Insulin, 10%FKS
Maus	subkutan, 8-12 Tage alt	serumfrei, Insulin, HDL (High Density Lipoprotein), Dex
Hase	perirenal, 4 Wochen alt	serumfrei, Insulin, Dex
Schwein	perirenal, subkutan/fetal, neugeboren(1-7 Tg alt)	serumfrei, Insulin mit oder ohne Glukokortikoide
Mensch	subkutan (abdominal), unterschiedliches Alter	serumfrei, Insulin (hoch dosiert), Glukokortikoide

Der Entwicklungsprozess multipotenter Stammzellen zu unipotenten Adipoblasten ist nicht einfach zu ermitteln. Jedoch gelang es durch Behandlung muriner 10T1/2 und 3T3 Zellen mit 5-Azacytidin (Taylor, 1979) mesenchymale Zellen in Adipozyten, Chondrozyten und Fibroblasten zu differenzieren. In vitro differenzierte Adipozyten haben viele Gemeinsamkeiten mit Fettzellen in vivo. Subkutane Präadipozyteninjektionen in athymische Nacktmäuse führten zu einer Entwicklung reifen Fettgewebes, das sich histologisch nicht von weißem Fettgewebe (WAT) zu unterscheiden schien (Green, 1979). Daher ist anzunehmen, dass sich die Fettzellentwicklung in vivo nach einem ähnlichen Mechanismus ereignet wie in vitro (siehe Abb. 2.1., modifiziert nach Ailhaud, 1992).

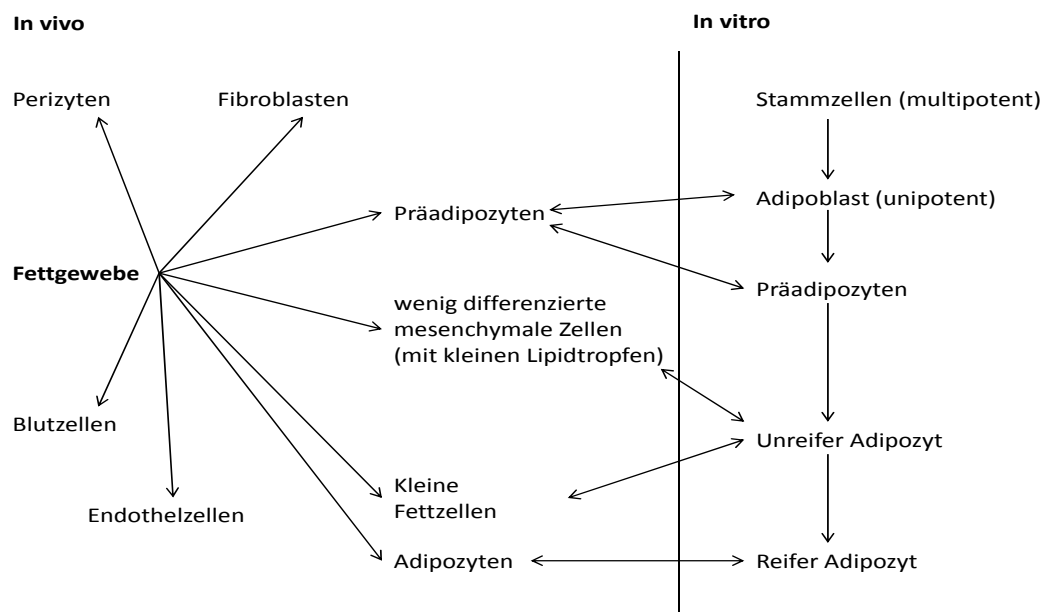


Abb.2.1. Differenzierung der adipogenen Linie. Beziehung zwischen morphologischen Typen in vivo und Stadien der adipogenen Zelldifferenzierung in vitro (modifiziert nach Ailhaud, 1992)

Die Adipozytendifferenzierung lässt sich grob in vier Stadien unterteilen:

1. Wachstumsstopp

Der Kontakt zwischen den Zellen oder der Zellverbund scheint nicht zwingend notwendig für den Beginn der Zelldifferenzierung. Vielmehr ist es der

Wachstumsstopp, der die Differenzierung einleitet. In einem Versuch von Vanderstraeten-Gregoire (1989) differenzierten Rattenpräadipozyten in serumfreiem Medium ohne interzellulären Kontakt. Die zwei Transkriptionsfaktoren C/EBP- α und PPAR- γ scheinen eine wichtige Rolle für den Wachstumsstopp zu spielen. Mc. Knight (1991) zeigte die antimitotische Aktivität von C/EBP- α durch den Gebrauch des C/EBP- α -Östrogenrezeptorfusionsproteins. Spiegelman und Kollegen (1997) bewiesen, dass der Faktor PPAR- γ in Fibroblasten einen Wachstumsstopp induzieren kann.

2. Klonale Expansion

Nach dem Wachstumsstopp brauchen die Präadipozyten eine geeignete Kombination an mitogenen und adipogenen Signalen, um die Differenzierung weiterzuführen. Versuche mit Präadipozyten-Zelllinien (3T3) zeigten, dass sich die Zellen im Wachstumsstopp mindestens einer DNA- Replikation und einer Zellverdoppelung unterziehen. Dies führt zur klonalen Ausdehnung der Zellen (Pairault, 1979). Präadipozyten aus humanem Fettgewebe scheinen die Zellteilung nicht zu brauchen, um den Differenzierungsprozess anzustoßen (Entenmann, 1996).

3. Frühe Änderung der Genexpression

Neben dem Wachstumsstopp und der klonalen Expansion steht auch eine Veränderung der Genexpression im Vordergrund. Die Transkriptionsfaktoren C/EBP und PPAR gelten als frühe Marker der Adipozytendifferenzierung. Der adipozytenspezifische PPAR- γ -Rezeptor wird schon in geringem Maße in Präadipozyten exprimiert und nach hormoneller Induktion der Differenzierung steigt seine Expression schnell an. Der Rezeptor kann schon nach dem zweiten Tag der 3T3-L1 Adipozytendifferenzierung nachgewiesen werden und sein maximales Expressionslevel erreicht er in reifen Adipozyten (Brun, 1996; Chawla, 1994).

4. Terminale Differenzierung

Während der terminalen Phase wächst die de novo Fettsäure- und Triglyceridsynthese im Adipozyten. Gleichzeitig kommt es zu einer zytoplasmatischen Lipidakkumulation. Durch den Umbau des Zytoskelettes wandelt sich die Fibroblasten- in eine Adipozytenmorphologie um. Die Zellen exprimieren notwendige Enzyme zur Triglyceridlipolyse, Triglyceridaufnahme,

zum Transport von Fettsäuren sowie Rezeptoren für lipogene und lipolytische Hormone (Mackall, 1976).

2.1.3. Fettgewebstransplantation

Fettgewebe ist ein wesentlicher Bestandteil des humanen Weichteilgewebes und wichtig zur Formgebung des Körpers. Die Idee, Fettgewebe an einer intakten Stelle des Körpers zu entnehmen und an die Stelle eines Konturdefektes zu transplantieren, wurde schon vor über 100 Jahren geboren. Den Grundstein legte 1889 van der Meulen, indem er eine Verlagerung des freien Omentums zwischen Leber und Zwerchfell durchführte (Billings, 1989). Bald darauf versuchte sich Neuber im Jahre 1893 an einer freien Fettgewebstransplantation. Er brachte kleine Fettgewebspartikel in einen Defekt ein (Neuber, 1893). Czerny berichtete zum Beispiel das erste Mal 1895 über eine Mammarekonstruktion mittels autologem, freiem Fettgewebe. Die postoperativen Ergebnisse waren gut, aber nach einiger Zeit stellten sich eine sukzessive Volumenabnahme und eine zunehmende Verhärtung des transplantierten Materials ein.

Auch heute sind die Ergebnisse bezüglich der Langzeitüberlebensrate freier Fettgewebstransplantationen mit autologem Fettgewebe ohne Gefäßanschluss enttäuschend. Es kommt zu einer progredienten Absorption des Transplantates mit einem Volumenverlust von 40-60% oder sogar zur vollständigen Resorption (Eremia, 2000; Ersek, 1991; Fagrell, 1996).

Die Einführung allogener Materialien zur Substitution von Weichteilgewebe drängte die Transplantation mit autologem Fettgewebe in den Hintergrund. Erst in den 80iger Jahren, als die Liposuction Einzug in den klinischen Alltag erhielt, kam das Interesse zurück. Fettgewebe wurde aspiriert und zur Deckung des Defektes reinjiziert. Zufriedenstellende Ergebnisse konnten auch hier nicht erzielt werden. Aufgrund des traumatisierenden Prozesses während der Absaugung fanden sich 90% deformierte und nur 10% unbeschädigte Adipozyten im Aspirat (Nguyen, 1990). In einer Untersuchung von Nguyen (1990) waren 9 Monate nach Reinjektion keine vitalen Zellen mehr nachweisbar und das Transplantat war vollständig fibrosiert. Lipofilling bleibt jedoch ein interessanter Ansatz für die Korrektur kleinerer Volumendefekte.

Roddi et al. (1994) füllten erfolgreich moderate Volumendefekte mit autologen Fettzellen bei Patienten mit Hemiatrophia faciei.

Bis heute gilt es jedoch die Verfahren zur autologen Fettgewebstransplantation mit voraussagbarem Volumeneffekt und guten Langzeitergebnissen zu verbessern.

2.2. Tissue Engineering

2.2.1. Tissue Engineering, Definition

Das Konzept des Tissue Engineering vereint Techniken aus Bio-, Ingenieurs- und Naturwissenschaften. Ziel ist die Schaffung neuen Gewebes, das dem Ersatz oder der Unterstützung vorhandenen Gewebes dient (Langer, 1993). Dazu werden dem Patienten kleine Mengen Gewebe entnommen und durch bestimmte Präparations- und Kultivierungsverfahren daraus die benötigten Zellen isoliert und vermehrt. Ist eine quantitativ ausreichende Menge an Zellen vorhanden, wird eine poröse Trägermatrix mit ihnen beimpft und retransplantiert. Die nahezu uneingeschränkten Variationsmöglichkeiten jeder einzelnen Komponente erlauben die Schaffung eines bioartificialen Gewebes mit definierten Eigenschaften, welches sich im Idealfall in den Empfängermechanismus integriert und Anschluss an dessen Blutgefäßsystem findet (Müller, 2005).

2.2.2. Tissue Engineering, Motivation

Die historische Aufgabe der Chirurgie bestand über lange Zeit daraus, dem Patienten in seiner akut lebensbedrohlichen oder schmerzhaften Situation durch Resektion zu helfen, ohne dass auf anschließende körperliche Funktion und Ästhetik Rücksicht genommen werden konnte. Im 19. Jahrhundert wurden rekonstruktive Verfahren entwickelt, um dem Patienten z.B. die Wiedereingliederung in das soziale Leben zu erleichtern.

In der heutigen Zeit sind moderne Techniken, wie Gewebstransplantationen, lebensrettend. Jedoch sind sie auch mit hohen Risiken verbunden. Bei körperfremden Transplantaten ist eine Suppression des Immunsystems unumgänglich, was zur Entstehung von Tumoren führen kann und auch ein Verlust des Transplantats trotz Immunsuppression ist möglich. Ein weiteres Problem ist die begrenzte Verfügbarkeit der Ersatzgewebe. Methoden, bei

denen allogene bzw. alloplastische Materialien als Defektersatz implantiert werden, scheitern häufig an Fremdkörperreaktionen, Infektionen und an Wanderungen der Implantate. Das Verfahren, körpereigenes, intaktes Gewebe an die Stelle des Defektes zu transplantieren, führte in manchen Fällen zu Narben- oder Tumorbildung.

All diese Probleme und Risiken führten zur Entwicklung des Tissue Engineering, ein vielversprechendes Forschungsgebiet Mitte der 80er Jahre. Jedoch liegen die Möglichkeiten des klinischen Einsatzes, trotz guter in vitro Ergebnisse verschiedener Gewebe, deutlich hinter den anfangs hohen Erwartungen zurück, was hauptsächlich durch eine fehlende vaskuläre Integration von Tissue Engineering-Konstrukten mit konsekutivem Absterben und Resorption des implantierten Gewebes in vivo bedingt ist.

2.2.3. Tissue Engineering von Fettgewebe

Das Ziel des Tissue Engineering von Fettgewebe ist es, Fettäquivalente zu konstruieren, die zur Reimplantation geeignet sind. Gerade in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie besteht ein hoher Bedarf an adäquater Versorgung von Weichteildefekten, die nach Tumoressektion, Verbrennungen oder schweren Traumen entstehen. Hier liegt die Motivation für die Schaffung körpereigener Fettgewebstransplante. Eine Strategie zur Anzucht von Fettäquivalenten stellt die Implantation zellbeinhaltender Konstrukte dar.

Für den therapeutischen Nutzen im klinischen Bereich ist es wichtig, ausreichend Gewebevolumen zu generieren, um die Trägermatrices mit einer ausreichenden Menge an Zellen beimpfen zu können. Die Zellträger dienen als Leitschiene für die in vitro gezüchteten Zellen und ermöglichen eine gewisse Beeinflussung der Geometrie und Architektur des gezüchteten Gewebes.

Die ideale Zelle zur Generierung von Fettgewebe sollte autolog oder nichtimmunogen sein. Sie sollte in ausreichender Menge vorhanden sein und wenn nötig in vitro vermehrt werden können. Das Potenzial der Zellen zur Differenzierung in Adipozyten darf dabei nicht verloren gehen.

Zur Gewinnung von Fettzellen stehen verschiedene Quellen zur Verfügung, die im folgenden Punkt erläutert werden.

a) Quellen zur Gewinnung von Fettzellen

1) Reife Adipozyten:

Reife lipidgeladene Adipozyten sind gegenüber mechanischem Einfluss sehr empfindlich und werden leicht während der Zellpräparation traumatisiert. Voll ausdifferenziert, verlieren sie die Fähigkeit zur Zellteilung und können daher nicht mehr vermehrt werden. Prinzipiell ist es möglich, reife Adipozyten in vitro zu erhalten, jedoch ist ihre Kultivierung kompliziert. Die Zellen erfahren durch ihre Lipidladung einen Auftrieb, der einer Anhaftung am Kulturflaschenboden entgegenwirkt. Dies erschwert einen für die Zellen notwendigen Nährmediumwechsel, da die Zellen frei in diesem umher schwimmen (Sugihara, 1987; Tholpady, 2005). Die Kultivierung von reifen Adipozyten ist daher beim Tissue Engineering nicht die vorherrschende Methode zur Zellgewinnung (Beahm, 2003).

2) Präadipozytenzelllinien:

Präadipozytenzelllinien, wie z.B. 3T3-L1, sind kommerziell erhältlich und lassen sich leicht in vitro vermehren und differenzieren. Ihre unkomplizierte Reproduzierbarkeit und gute Differenzierungsfähigkeit machen sie zu einer beliebten Komponente in der Grundlagenforschung des Tissue Engineering. Präadipozytenzelllinien sind der ideale Zelltyp, um Prinzipien in der Fettgewebszüchtung zu entwickeln (Fischbach, 2004; Beahm, 2003).

Nachteilig bei den tierischen Zelllinien sind allerdings ihr aneuploider Status und ihr xenogenetischer Ursprung. Das heißt, sie haben einen vom Menschen abweichenden Chromosomensatz und sind aus einer anderen Spezies gewonnen, was sie für den klinischen Nutzen am Menschen unbrauchbar macht. Bei den humanen Zelllinien besteht der Nachteil der Allogenität. Die Zellen sind hier zwar von der gleichen Spezies (Mensch), aber von einem anderen Individuum. Dies begünstigt Abstoßungsreaktionen des Empfängers.

3) Vorläuferzellen aus humanem Fettgewebe:

Das Fettgewebe enthält die sogenannten Vorläuferzellen, eine zelluläre Fraktion, die durch enzymatischen Verdau und Zentrifugation isoliert und später in Kulturflaschen proliferiert und kultiviert werden kann. Diese Zellquelle wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet und scheint sehr vielversprechend für den klinischen Nutzen.

Zu dieser Fraktion gehören multipotente Stammzellen, die sich entlang verschiedener mesenchymaler Linien differenzieren können, und unipotente Präadipozyten, die nur zu Adipozyten ausdifferenzieren.

Die Vorläuferzellen können einfach aus humanen Fettaspirationen oder Fettresektionen in der Klinik gewonnen werden. Das Hauptproblem bei dieser Zellquelle liegt in der Abstoßungsreaktion des Empfängers, wenn die Spende von einer anderen Person stammt (Weiser, 2005).

4) Mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark:

Mesenchymale Stammzellen (MSC) können aus Knochenmarksaspiraten gewonnen werden. Durch adipogene Stimulierung differenzieren diese Zellen zu Adipozyten aus. Es wird diskutiert, dass MSCs in allogenen Transplantationen nicht immunogen sind (Baksh, 2004), jedoch ist ihre Gewinnung, im Vergleich zu der der Vorläuferzellen, für den Spender unangenehmer und nur in kleineren Mengen verfügbar (Weiser, 2005).

5) Embryonale Stammzellen:

Embryonale Stammzellen wurden bis heute noch nicht für Tissue Engineering von Fettgewebe verwendet, sie müssen jedoch als mögliche Zellquelle für die Zukunft genannt werden. Aus ethischen Gründen und rechtlichen Beschränkungen ist die Anwendung und Verfügbarkeit humaner embryonaler Stammzellen bisher limitiert. Ihr großer Vorteil liegt in ihrem fast grenzenlosem Proliferationspotential und ihrer Fähigkeit, in eine Vielzahl von verschiedenen Zellen zu differenzieren (Weiser, 2005).

b) Schaffung eines dreidimensionalen Gewebsverbundes

Um gezüchtete Zellen in einen zusammenhängenden, dreidimensionalen Gewebsverbund zu bringen, ist ein Gerüst erforderlich, welches das Gewebe in einer bestimmten Form und Größe stabilisiert.

Dieses Gerüst muss biokompatibel sein, seine chemische Zusammensetzung und die Oberflächenstruktur sollten eine gute Zellanlagerung und Differenzierung erlauben und die biologische Funktion der Zellen sollte nicht behindert werden. Eine weitere Anforderung an den Träger betrifft die Mikroarchitektur. Eine hohe Porosität und Interkonnektivität ermöglichen eine gleichmäßige Verteilung der Zellen, das Einwachsen von Kapillaren und eine ausreichende Nährstoffversorgung. Während ihrer Reifung erreichen

Adipozyten durch eine zunehmende Lipidspeicherung einen Durchmesser von über 100 µm. Die Porengröße des Konstrukts sollte daher eine volle Ausdifferenzierung der Adipozyten erlauben.

Als synthetische Materialien eignen sich absorbierbare Polymere, wie Polylaktatsäure (PLA) oder Polyglycolsäure (PGA). Ihr Nachteil liegt in sauren Abscheidungsprodukten, welche die Zellfunktion beeinflussen können (Weiser, 2005).

Mit semisynthetischen und natürlichen Materialien wird versucht das natürliche Umfeld von Fettzellen nachzuempfinden. Dies geschieht unter Verwendung von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) von Fettgewebe, wie z.B. Kollagen. Aber auch Bestandteile der ECM anderer Gewebe, wie z.B. Fibrinkleber oder Hyaluronsäureester, sind eine Möglichkeit. Sie besitzen eine geringe Toxizität und, unter Verwendung von autologem Material, eine gering inflammatorische Reaktion.

Kollagen wurde in Versuchen als Gel oder poröser Schwamm, hergestellt durch Gefriertrocknung, verwendet (v. Heimbürg, 2001). Es wurde beobachtet, dass es die Umwandlung von Vorläuferzellen in Adipozyten verbessert (Ibrahimi, 2003). Der Nachteil des Kollagens ist jedoch seine potenzielle Immunogenität und der relativ hohe Preis.

Fibrinkleber fand des Öfteren Anwendung im Tissue Engineering von Fett (Cho, 2005, Schoeller, 2001). Es kann aus autologem Blut gewonnen werden. Da Fibrin in vivo schnell durch Proteasen zersetzt wird, können Proteaseinhibitoren zugesetzt werden, um die Verweildauer zu erhöhen (Meinhart, 1999).

Hyaluronsäure ist hochlöslich und wird daher in vivo sehr schnell resorbiert. Erst die Veresterung führt zu unlöslichen Polymeren, die als Zellträger fungieren können. Ein großer Vorteil hyaluronsäurebasierender Gerüste könnte die Steigerung der Angiogenese in vivo sein, welche durch die Abbauprodukte der Säure entsteht (West, 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurden speziell angefertigte Polyurethanschäume kombiniert mit einem Fibrinkleber als Träger verwendet. Der Schaum zeichnet sich durch eine besonders gute Offenporigkeit aus. Das heißt, dass sowohl die Poren zur Oberfläche hin geöffnet, als auch die Poren untereinander verbunden sind. So kann zwischen den Poren ein freier Austausch von Gasen

und Flüssigkeiten erfolgen und die Zellen können sich optimal entwickeln. Der Fibrinkleber ist ein Zweikomponentensystem aus Plasmaproteinfraktion und Thrombinkomponente. Die Zellen lassen sich in diesem Gel homogen verteilen und in die Polyurethanscaffolds applizieren. Über die Thrombinkomponente lässt sich die Verfestigungsdauer des Gels einstellen. Diese Kombination aus einem grobporigen Polymergerüst und einem Gelsystem erfüllt alle anfangs erwähnten Anforderungen und ist für das Tissue Engineering höchst geeignet.

2.3. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit mit dem Titel „Tissue Engineering - Kultivierung humaner Präadipozyten zur Beimpfung dreidimensionaler Polyurethankonstrukte“ soll ein Standard zur Isolation und Kultivierung von Präadipozyten in vitro geschaffen werden. Hierzu wurden verschiedene Aspekte des Tissue Engineering von Fettgewebe untersucht:

- Die Etablierung und Optimierung der Isolation humaner Präadipozyten durch Variation der Denaturierungszeit, durch Verwendung einer Erylyse und dem MiniMACS™ System;
- Die Optimierung der Zellkulturbedingungen für Präadipozyten in vitro durch Variation geeigneter Kulturmedien;
- Die Techniken der Beimpfung dreidimensionaler Polyurethankonstrukte mit Präadipozyten und deren Kultivierung in vitro.

Diese Untersuchungen dienen in Zukunft der Schaffung eines dreidimensionalen Gewebsverbundes auf der Basis humaner Präadipozyten.

3. Material und Methoden

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

Reagenzien +Materialien:

DMEM/Ham´s F12 (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium nutrient mixture F12 Ham, FA Sigma, D8437, 500 ml)

PBS Dulbecco (FA Biochrom AG, L1825, 500ml)

BSA (Bovines Serum Albumin, FA Sigma, A9418, 50g)

Collagenase NB4 Standard Grade (FA Serva, 17454, 1g)

Collagenase-Puffer (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar: Hepes (FA Merck, 1.10110) 47,6g, NaCl Ph.Eur. 14,0g, KCl Ph.Eur. 7,2g, CaCl₂-Dihydrat 0,3g, Glukose-Monohydrat Ph.Eur. 1,98g, Aqua dest. ad 2000ml)

Erylysepuffer (Tris 17 mM, NH₄Cl 16 mM in Aqua bidest.,hausinterne Apotheke des Klinikum Rechts der Isar, 500 ml)

PBS Dulbecco (FA Biochrom AG, L1825, 500ml)

Trypsin/EDTA Lsg. (FA Biochrom AG, L2143, 100 ml)

Trypanblau Lsg. 0,4% (FA Sigma, T1854, 100 ml)

α-MEM (Minimum Essential Medium , FA Sigma, M8042, 500 ml)

DMEM (Dulbecco´s modified eagle´s medium, FA Sigma, D5796, 500 ml)

Insulin (FA Sigma, I9278, 5 ml)

Anti-Anti (Antibiotic/Antimycotic, FA Gibco, 15240.062, 100 ml)

Apo-Transferrin (Fa Sigma, T1428, 100 mg)

Biotin (Vit.H, FA Serva, 15060.02, 500 mg)

D-Pantothensäure (FA Sigma, P5155, 100 g)

L-Glutamin (FA Gibco, 25030-024, 100 ml)

FKS (Fötales Kälberserum, FA Gibco, 10270-106, 500 ml)

Cortisol (FA Sigma, H0888, 1 g)

IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin, FA Sigma, I5879, 250 mg)

Trijodothyronin (FA Sigma, T6397, 100 mg)

Troglitazon (FA Sigma, T2573, 5 mg)

Endothelial Cell Growth Medium MV (FA Promocell, C22020, 500 ml)

NH AdipoDiff Medium (FA Miltenyi Biotec, 130-091-677, 100 ml)

NH Expansion Medium (FA Miltenyi Biotec, 130-091-680, 500 ml)

MACS™ Rinsing solution (FA Miltenyi Biotec, 130-091-222, 6x1.45 ml)
MACS BSA Stock Solution (FA Miltenyi Biotec, 130-091-376, 6x75 ml)
CD271 MicroBead Kit PE/APC (CD271(LNGFR)-APC or PE, human, Anti-APC/PE MicroBeads, FcR Blocking Reagent, FA Miltenyi, 130-092-819/283)
NH Expansion Medium (FA Miltenyi Biotec, 130-091-680, 100 ml)
NH AdipoDiff Medium (FA Miltenyi Biotec, 130-091-677, 100 ml)
Poly(caprolacton)diol,Mn=1250 (FA Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Poly(caprolacton)triol,Mn=900 (FA Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Isophoron-Diisocyanat 98% (FA Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
DABCO 3042 (FA Air Products, Norderstedt, Deutschland)
Dextrose (ACS reagent, FA Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Metylal 99,5+% (FA Acros, Geel, Belgien)
1,8-Diazabicycloundecene 98% (FA Acros, Geel, Belgien)
Fibrinogen (FA Sigma, F-4753, 1g)
Trasylol 0,5 (FA Bayer Vital GmbH, PZN:4032037, 5x50 ml)
Thrombin (FA Baxter, PZN:3419656, 500 Units aus Tissucol Duo S1 Immuno)
Thrombinpuffer (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar: sterile 20mM Calciumchloridlösung, 1l)
Formaldehyd(37%) (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 1 l)
PBS Dulbecco (FA Biochrom AG, L1825, 500ml)
Oil-Red-O (FA Sigma,O0625, 25 g)
Isopropanol (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 1l)
Aqua bidest. (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 5l)
Propidiumjodid (FA Sigma, P4170, 100mg)
Fluoresceindiaceetat (FA Sigma, F7378, 5 g)
Aqua dest. (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 5l)
Xylol (FA Hedinger, PZN 7475522, 1l)
Iso rein (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 1l)
Iso 95% (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 1l)
Iso 80% (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 1l)
Iso 70% (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 1l)
Aqua dest. (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 5l)
Eosin 1% (wässrige Lösung 10%, hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 100 ml)

Eisessig (Essigsäure 100%, hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 100 ml)

Eisenhämatoxylin nach Weigert (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 1l)

Phosphorwolframsäure 1% (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 1l)

Trichromlösung nach Ladewig (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 1l)

Eukitt (FA O.Kindler GmbH, A 127, 100 ml)

Lichtmikroskop (FA Carl Zeiss, Jena, Deutschland)

Kontrastiermikroskop DMIL (FA Leica, Wetzlar, Deutschland)

Axio Vison Cam (FA Carl Zeiss, Jena, Deutschland)

Software Axio Vision Rel. 4.6.

Digitalkamera (FA Canon, EOS 450D)

Glastic® (FA Hycor, 87144)

3.1. Isolation der Präadipozyten

Durch mechanische Zerkleinerung und enzymatische Digestion subkutanen Fettgewebes konnten Primärkulturen humaner Präadipozyten gewonnen werden. Dies geschah in Anlehnung an ein modifiziertes Präparationsprotokoll nach Hauner et al. (2000, Cultures of Human Adipose Precursor Cells). Die Fettgewebeproben stammten aus verschiedenen plastischen Operationen (Abdominoplastik, Mamma-Reduktionsplastik) von Patienten beiderlei Geschlechts und unterschiedlicher Altersgruppen (23-65 Jahre). Eine Einverständniserklärung der Patienten wurde vor dem Eingriff eingeholt. Die Dokumentation der Fettgewebsverarbeitung erfolgte mittels eines standardisierten Protokolls.

3.1.1. Lagerung des Fettbiopsats

Das Gewebe wurde unmittelbar nach der Entnahme in ein steriles, mit DMEM/Ham`s F12 Medium befülltes Behältnis gegeben und in das Tissue Engineering Labor gebracht. Bis zur Verarbeitung innerhalb von 24 Stunden wurde die Biopsie bei 8° C gekühlt.

3.1.2. Digestion des Fettgewebe

Nach Entfernung anhaftender Haut wurde das Fettgewebe mehrmals mit PBS gewaschen, um es oberflächlich von Erythrozyten und anderen Blutzellen zu reinigen. In einer sterilen Petrischale wurde das Fettgewebe mit Hilfe eines Skalpells von Bindegewebe und größeren Blutgefäßen befreit. Mit einer Schere wurde das präparierte Gewebe solange zerkleinert, bis sich eine breiige Konsistenz ergab. Die Probe wurde in ein Gefäß mit vorherig bestimmtem Leergewicht überführt. Nach der Gewichtsermittlung wurde jetzt das gleiche Volumen an Puffer mit Kollagenase (2 mg/ml) hinzugefügt und das Gewebe bei 37°C schüttelnd inkubiert. Das Digestat wurde alle 15-20 min durchmischt. Die Digestionsdauer variierte in den einzelnen Versuchen zwischen 30 Minuten und 9 Stunden. Nach Inkubation wurde die untere Phase mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, durch ein Zellsieb (Falcon Cell Strainer, 70µm Porengröße) in mehrere 50ml Falcons filtriert und bei 2000U/min, 10 min und 37°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand über dem entstandenen Zellpellet verworfen, das Sediment in 2 ml Aussaatmedium (DMEM und DMEM/Ham's F12 1:1 500ml, 5 ml L- Glutamin, 500 µl Insulin(5mg/ml), 12 ml Anti-Anti, 500 µl Apo- Transferrin (2 mg/ml, 500 µl D-Pantothensäure (4,05 mg/ml) und 500 µl Biotin (1mM) bzw. Endothelial Growth Medium s.u.) resuspendiert und je 1 ml in zwei P75 Kulturflasche mit 19 ml Aussaatmedium ausgesät.

3.1.3. Erylyse

Um die gewonnene Zellfraktion von roten Blutkörperchen zu befreien, wurden einige Zellpellets nach Zentrifugation und Verwerfung des Überstandes für 10 min in 20 ml Erythrozytenlyse-Puffer (Tris 17mM, NH₄Cl 16 mM in Aq. bidest.) resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert. Es folgte die Resuspension des neuen Zellpellets in 1 ml Aussaatmedium und die Zellzahlbestimmung mittels eines Lichtmikroskops. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung vermischt. 10 µl der Mischung wurden in eine Zählkammer (Glastic®, FA Hycor, 87144) pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Im Anschluss erfolgte die Aussaat der isolierten Zellen mit einer Zelldichte von 1.0-2.0x10⁴ Zellen/cm² in 19 ml Wachstumsmedium. Im Durchschnitt ergab dies wieder eine Ausbeute von

zwei P75 Kulturflaschen, d.h. 750000-1,5 Millionen Zellen pro Flasche. Die Isolation der Prädipozyten ist in Abbildung 3.1.-3.6. dargestellt.



Abb.3.1. Mechanisches Zerkleinern des Biopsats



Abb.3.2. Digestion im Wasserbad

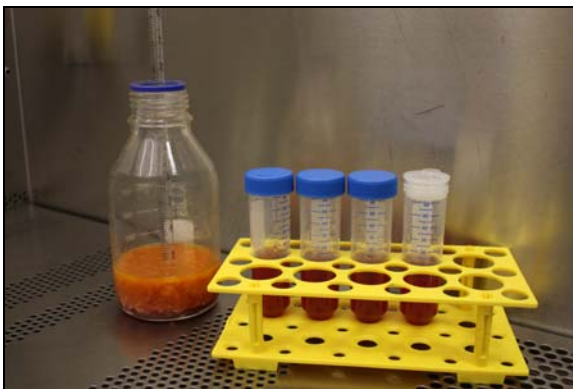


Abb.3.3. Filtern der Zellsuspension



Abb.3.4. Zellpellet nach Zentrifugation

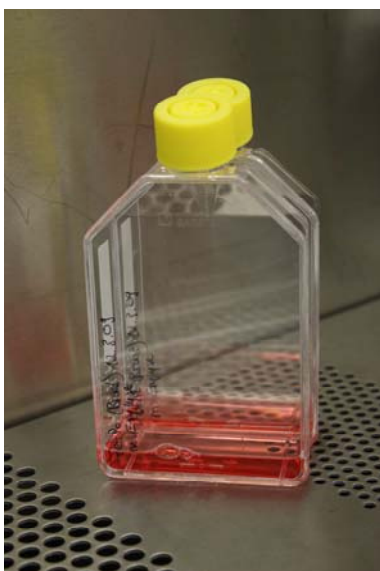


Abb.3.5. Aussaat in Zellkulturflasche



Abb.3.6. Kultivierung im Brutschrank

3.1.4. MiniMACS™ System

Zur Gewinnung von Adipozyten wurde auch das MiniMACS™ Separator System verwendet. Dies geschah durch magnetische Separation humaner, adulter Stammzellen. Als Quelle dienten subkutane Fettgewebsbiopsate (s.o.) mit einem Mindestgewicht von 250 g. Das Gewebe wurde, wie oben in der Präadipozytenisolierung beschrieben, präpariert und bearbeitet und zusätzlich noch durch einen Separationssieb mit einer Porengröße von 30 µm filtriert, um vorhandene Zellklumpen zu entfernen. Danach wurde die Zellsuspension bei 2000 U/min, 10 min und bei 37°C zentrifugiert. Die Flüssigkeit über dem entstandenen Zellpellet wurde abpipettiert und die Zellen wurden in 80 µl Separationspuffer (Verdünnung der MACS BSA Stock Solution mit AutoMACS™ Rinsing Solution 1:20) resuspendiert. Nun erfolgte eine indirekte magnetische Markierung der Stammzellen, dazu wurden 10 µl CD271 (LNGFR) Antikörper und 10 µl FcR Blocking Reagent zur Zellsuspension gegeben, gut gemischt und für 10 min bei 8° C gekühlt. Der Antikörper lagerte sich an den Oberflächenmarker CD271 der Stammzelle an und das FcR Blocking Reagent beugte einer unspezifischen Markierung am Fc Rezeptor vor. Dann wurden die Zellen unter Zugabe von 1 ml Puffer gewaschen und erneut bei 2000 U/min 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet mit 70 µl Puffer resuspendiert und 10 µl FcR Blocking Reagent plus 20 µl Anti-PE/APC Micro Beads zugegeben. Die Suspension wurde gemischt und für 15 Minuten bei 8°C gekühlt. Jetzt erfolgte das eigentliche magnetische Markieren der Stammzellen, indem sich das Anti-Immunglobulin Micro Beads an den Antikörper anlagerte.

Die Zellen wurden wieder mit Puffer gewaschen, zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 500µl resuspendiert. Nun wurde eine Säule (MS Columns) mit einem Schaft und einer mit eisenmagnetischen Kugeln gefüllten Matrix in das magnetische Feld des MiniMACS™ Separators platziert und diese mit 500 µl Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension in die Säule appliziert und drei Mal mit 500 µl Puffer nachgespült. Die unmarkierte Zellfraktion und der Puffer wurden unterhalb der Säule in einem Gefäß aufgefangen und die markierten Zellen verblieben, durch das magnetische Feld gehalten, in der Säulenmatrix (Abb.3.7.).

In einer P75 Kulturflasche wurden 20 ml NH Expansion Medium vorgelegt, die Säule wurde aus dem magnetischen Feld des MiniMACS™ genommen und die markierte Zellfraktion wurde mit Puffer aus der Säule in die Kulturflasche gespült. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Nach 60-70% Konfluenz der Zellen wurde das NH AdipoDiff Medium verwendet, um eine Differenzierung einzuleiten. Es beinhaltet DMEM, fötales Kälberserum und L-Glutamin.



Abb.3.7. Multi Stand + Reagenzien, MiniMACS™

3.2. Proliferation und Kultivierung der Präadipozyten

Zur Kultivierung der Präadipozyten wurde das Zellsediment nun ausgesät und in 19 ml Aussaatmedium pro Flasche kultiviert. Nach 12 h wurde das Kulturmedium erstmals abgesaugt und die sich am Boden anhaftende Primärkultur (p0) 2-3 Mal mit 10 ml PBS unter vorsichtigem Schütteln gespült. Anschließend wurde die Zellkultur wieder mit 20 ml Aussaatmedium pro Flasche versehen. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag, bis eine Konfluenz der Zellen von mindestens 70% erreicht war. Hierauf erfolgte die erste Zellpassage (p1). Nach dem vollständigen Entfernen des Medium wurde die Zellkultur mit PBS gespült. Nach dem Zusetzen von 2 ml Trypsin pro Kulturflasche kamen diese zur Inkubation 3-5 Minuten in den Brutschrank, um die Trypsinwirkung zu verstärken. Unter einem Kontrastiermikroskop (Leica DMIL) konnte anschließend das Zusammenziehen der Präadipozyten am Zellboden beobachtet werden. Die abgerundeten Zellen konnten durch intermittierendes Klopfen an der Seite der Kulturflasche vom Boden gelöst

werden. Durch Zugabe von ca. 4 ml Kulturmedium wurde die Wirkung des Trypsins gestoppt. Die resultierende Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 2000 U/min, 10 min und 37°C zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet konnte in 1 ml Aussaatmedium resuspendiert und die Zellzahl mittels eines Kontrastiermikroskops bestimmt werden. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung versetzt werden. 10 µl der Zell-/Farbsuspension wurden in eine Zählkammer (Glastic®, FA Hycor, 87144) pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Blau gefärbte, geschädigte Zellen blieben unberücksichtigt. Im Anschluss wurden die passagierten Zellkulturen mit einer Zelldichte von $1.0-2.0 \times 10^4$ Zellen/cm² in 19 ml Wachstumsmedium ausgesät. Im weiteren Verlauf erfolgte nach ca. 70-90%iger Konfluenz der Präadipozyten entweder eine erneute Passagierung (p2, p3), eine Ausdifferenzierung oder eine Einbringung in Polyurethangerüste (s.u.).

Die Präadipozyten wurden zur Optimierung der Kulturbedingungen in verschiedenen Zellkulturmedien kultiviert:

1) Als Basalmedium wurde eine 1:1 Mischung aus DMEM und DMEM/Ham`s F12 verwendet. Dieses Grundmedium diente unter anderem als Transportlösung für die Fettgewebprobe aus dem OP und zur vorübergehenden Lagerung des Fettgewebes bis zur Verarbeitung. Zu 500 ml Basalmedium wurden 5 ml L- Glutamin, 500 µl Insulin(5mg/ml), 12 ml Anti-Anti, 500 µl Apo- Transferrin(2 mg/ml), 500 µl D-Pantothensäure(4,05 mg/ml) und 500 µl Biotin(1mM) hinzugefügt (Bezeichnung im Folgenden als Basalmedium 1 (BM1)).

Um eine optimale Zellproliferation zu gewährleisten, wurde dem Basalmedium 1 10% FKS zugefügt und dieses dann als Aussaatmedium bzw. Wachstumsmedium verwendet.

2) Unter anderem wurde das Endothelial Cell Growth Medium MV (Bezeichnung im Folgenden als Basalmedium 2 (BM2)) der Firma Promocell verwendet. Die in diesem Medium beinhalteten Wachstumsfaktoren sollten die Zellproliferation erhöhen und beschleunigen.

3.3. Differenzierung der Präadipozyten

Nach ausreichender Proliferation wurden die Präadipozyten zu reifen Adipozyten ausdifferenziert.

Zur Induktion der Adipogenese wurden zwei verschiedene Medien getestet:

1) Zur Ausdifferenzierung der Zellen in der Kulturflasche wurden dem Basalmedium 1 (s.o.) 100 nM Cortisol, 1 nM Trijodthyronin, 500 nM Troglitazon, 1 µM Insulin und zur Induktion der Adipogenese in den ersten 2 Tagen IBMX zugefügt.

2) Zur Optimierung der Zelldifferenzierung wurden die zu 85-95% konfluierenden Zellen für zwei Tage in einem Induktionsmedium (α-MEM, 5% FKS, 12 ml Anti-Anti, 1 µM Insulin, 0,1 µM Cortisol, 0,5 mM IBMX, 60 µM Indomethacin) kultiviert, um die Adipogenese anzuregen. Die weitere Entwicklung erfolgte in einem Differenzierungsmedium (α-MEM, 5% FKS, 1 µM Insulin).

Die Versuchsreihenfolge bezüglich des Einsatzes der Medien ist in Abbildung 3.8. nochmals dargestellt.

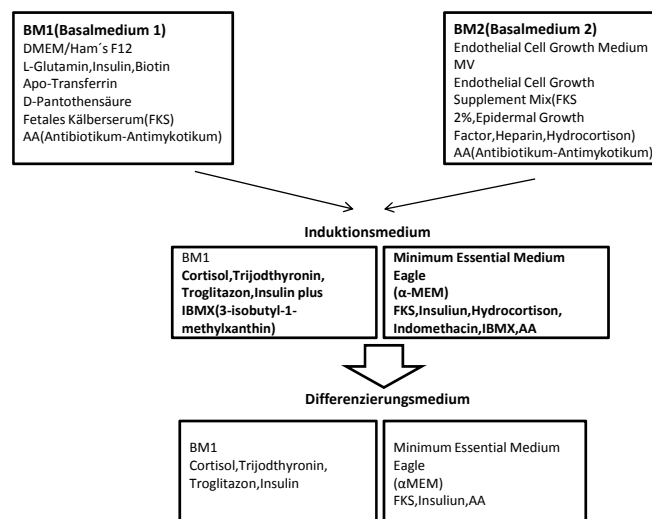


Abb.3.8. Darstellung der Versuchsreihenfolge zur Kultivierung isolierter Präadipozyten

3.4. Generierung eines dreidimensionalen Fettgewebsverbundes

3.4.1. Polyurethankonstrukte

Als Zellträger dienten Polyurethanschäume von der Firma Polymaterials AG, 87600 Kaufbeuren. Zur Herstellung wurden 5 g Poly(caprolacton)diol, 4 g Poly(capro)triol, 90 μL DABCO 3042, 0,2 g Dextrose, 1 g Methylal und 80 μL Diazabicycloundecene vermischt und in eine Kammer einer Zweikammerpumpe überführt. Die zweite Kammer war mit einer Mischung aus 2,15 g Isophoron-Diisocyanat und 0,5 g Methylal befüllt. Nach Erwärmung der Kammern auf 37°C konnten beide Komponenten langsam in eine auf 67°C vorgewärmte Form injiziert werden. Der Schaum wurde zwei Stunden bei 67°C ausgehärtet und zur Entfernung an der Oberfläche anhaftende Substanzen, wie zum Beispiel DABCO 3042, eine Stunde in heißem, destilliertem Wasser ausgekocht. Danach erfolgte über 24 Stunden eine Trocknung der Konstrukte im Vakuum. Das Resultat ist ein offenporiger Schaum mit einem Durchmesser von circa 200 μm .

Der Polyurethanschaum wurde für die Versuche in kleine rundliche, 2mm dicke Scheiben mit einem Durchmesser von 5 mm gestanzt (Abb.3.9. und 3.10.). Anschließend wurden sie mit Ethanol 70% befeuchtet, in PBS gewaschen und schließlich bei 121 °C, 20 Minuten, bei 2150 mbar sterilisiert.



Abb.3.9. Polyurethankonstrukt, 5mm Durchmesser

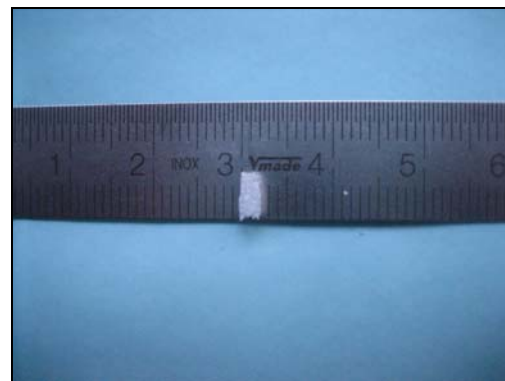


Abb.3.10. Polyurethankonstrukt, 2mm Breite

3.4.2. Zellkleberherstellung

Um die Zellen dauerhaft dreidimensional in einem Polyurethankonstrukt zu halten, wurde ein Zellkleber hergestellt. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe „Tissue Engineering“ Klinikum Rechts der Isar wurde die Zellkleberherstellung

in der Vergangenheit optimiert. Als biochemische Grundlage diente konzentriertes Fibrinogen als Kleberproteinlösung und eine Thrombinlösung mit verschiedenen Stabilisatoren (Faktor IV, Faktor VIII, und der Fibrinolyseinhibitor Aprotinin). Aus einem Fibrin-Chondrozyten-Gemisch waren initial kleine Quader hergestellt worden, die für Untersuchungen zur Stabilität, Formbeständigkeit, Degradation und Resorption verwendet wurden. Die daraus erworbenen Erkenntnisse dienten der Optimierung der Verdünnung der Einzelkomponenten und der eingesetzten Ausgangszellzahl. Das optimierte Ergebnis wurde in dieser Arbeit verwendet: 5g Fibrinogen wurden hierfür bei Raumtemperatur in 50 ml Trasylol und 1ml Thrombin in 100 ml Thrombinpuffer gelöst. Beide Komponenten wurden jeweils in Aliquots zu 1-2 ml abgefüllt und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Kurz vor Verarbeitung konnte die benötigte Menge an Thrombin und Fibrin bei Raumtemperatur aufgetaut werden. Eine Mischung der Komponenten im Verhältnis 1:1 ergab nach einigen Minuten eine auspolymerisierte Fibrin-Thrombin-Matrix.

3.4.3. Kultivierung von mit Präadipozyten beimpfter Polyurethankonstrukte in vitro

Ein vorbereitetes Polyurethankonstrukt wurde mit 1 Million Zellen besiedelt. Dazu wurde das Medium aus einer Kulturflasche abgezogen und um es vollständig zu entfernen, mit PBS nachgespült. Es wurden 2 ml Trypsin zugesetzt und die Kulturflasche für 3-5 min im Brutschrank inkubiert. Unter einem Kontrastiermikroskop (Leica DMIL) wurde das Zusammenziehen der Präadipozyten am Zellboden beobachtet. Die abgerundeten Zellen wurden durch intermittierendes Klopfen an der Seite der Kulturflasche vom Boden gelöst und die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von ca. 4 ml Kulturmedium abgestoppt. Die resultierende Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 2000 U/min, 10 min und 37°C zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet (Abb.3.11.) wurde in 1 ml Aussaatmedium resuspendiert (Abb.3.12.) und die Zellzahl mittels eines Kontrastiermikroskops bestimmt. Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung versetzt. 10 µl der Zell-/Farbsuspension wurden in eine Zählkammer (Glastic®, FA Hycor, 87144) pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt (Abb.3.13.). Blau gefärbte, geschädigte Zellen wurden nicht berücksichtigt.

Anschließend wurde erneut zentrifugiert und das überstehende Medium komplett entfernt. Nun erfolgte das Resuspendieren des Pellet in der Thrombinkomponente. Ein PU Konstrukt nimmt ein Volumen von 40 μ l auf, somit kommen auf 1 Million Zellen 20 μ l Thrombinlösung und 20 μ l Fibrinlösung. Nach Zugabe der Fibrinlösung wurde der Zellkleber durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette vorsichtig vermischt und 40 μ l wurden langsam in ein PU Konstrukt pipettiert (Abb.3.14.). Bis zur vollständigen Polymerisation wurde das Konstrukt ca. 15-20 Minuten im Brutschrank aufbewahrt und dann in eine Kulturflasche mit Nährmedium gegeben. Durch die Kultivierung in einem Induktionsmedium (α -MEM, 5% FKS, 12 ml Anti-Anti, 1 μ M Insulin, 0,1 μ M Cortisol, 0,5 mM IBMX, 60 μ M Indomethacin s.o.) für 2 Tage sollte die Adipogenese angeregt werden. Im weiteren Verlauf befanden sich die beimpften Konstrukte in einem Differenzierungsmedium (α -MEM, 5% FKS, 1 μ M Insulin), das die Entwicklung der Vorläuferzellen zu siegelringförmigen Adipozyten fördern sollte.

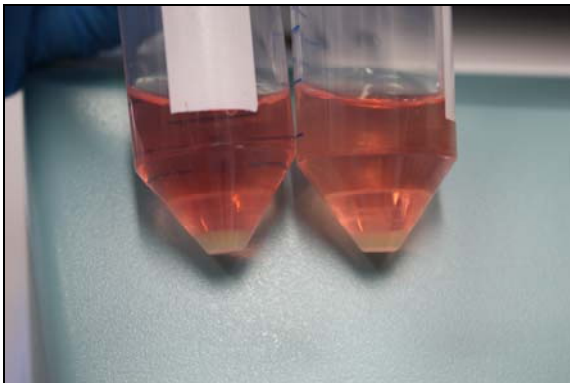


Abb.3.11.Zellpellet nach Zentrifugation



Abb.3.12.Resuspension des Zellpellet

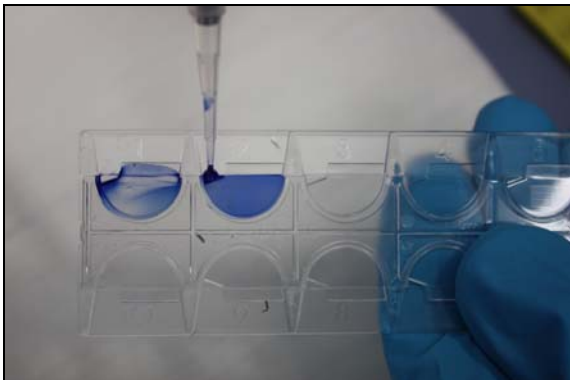


Abb.3.13.Zählkammer(Trypanblau+Zellen)

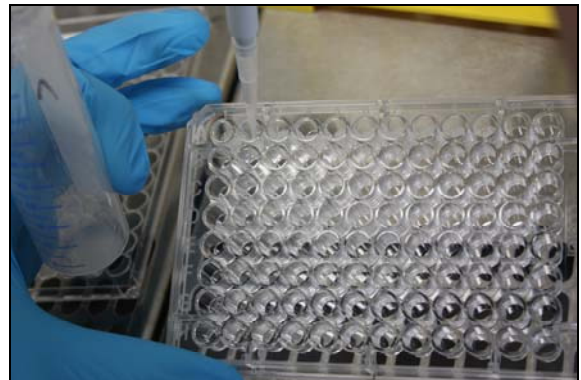


Abb.3.14.Beimpfen der Konstrukte

3.5. Auswertung

3.5.1. Fotodokumentation

Von allen relevanten Arbeitsschritten und Präparaten wurden Fotos mit einer Digitalkamera, Firma Canon, EOS 450D, angefertigt. Die Aufnahmen der Zellkulturen in der Kulturflasche und der Histoschnitte erfolgten durch ein Mikroskop in verschiedenen Vergrößerungen (10x, 20x, 40x) mit einer Axio Vison Cam.

Die Digitalfotos wurden mittels eines Bildverarbeitungsprogrammes (Adobe Photoshop Elements 8) lediglich in ihrer Bildqualität (z.B. Schärfe, Kontrast, Farbsättigung, Helligkeit etc.) verbessert.

3.5.2. Zellproliferations-Assay MTT

Die Wirkung unterschiedlicher Medien auf die Präadipozyten bezüglich der Proliferation konnte mit diesem Test beurteilt werden. Metabolisch aktive Zellen spalten das Salz des Tetrazoliums (MTT) in wasserunlösliches Formazan. Dieses kann in einem speziellen Lösungsmittel gelöst werden und mit einem Multiwell Spektrophotometer quantitativ bestimmt werden.

Hierfür wurden an Tag 10 Zellen paralleler Kulturen geerntet und gezählt. Die Zellen wurden in je 1 ml des zu untersuchenden Mediums resuspendiert und zu einer Dichte von 75.000 Zellen pro Milliliter verdünnt. In eine 96 wellplate wurden je Kammer 100 µl Zellsuspension (7500 Zellen) pipettiert und über Nacht inkubiert. Je 3 Kammern wurden pro zu untersuchendem Medium zur Beurteilung herangezogen. Nach 16 Stunden Inkubation wurden jeder Kammer 10 µl MTT(5 mg/ml) zugefügt. 3 Kammern, befüllt mit MTT und Medium dienten als Kontrolle.

Nach einer Inkubationsperiode von 4 Stunden bei 37°C wurden 100 µl MTT Lösungsmittel beigemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Absorption wurde bei 590 nm mit einem Referenzfilter von 620 nm gelesen.

3.5.3. Ölrot-O-Färbung

Da Präadipozyten unter dem Mikroskop eine große Ähnlichkeit zu Fibroblasten oder anderen Bindegewebszellen haben, erfolgte die Differenzierung der Präadipozyten in adulte Fettzellen und Färbung mittels Öl-Rot.

Als Vorbereitung wurden 56 ml Formalin 37% mit 500 ml PBS verdünnt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur Herstellung der Ölrot-O- Lösung wurden 2,1 g Oil-Red-O- Pulver in 600 ml Isopropanol über Nacht bei Raumtemperatur mit dem Magnetrührer gerührt. Es folgte eine Filtration durch einen Faltenfilter. Die Stammlösung wurde dann mit 450 ml Aqua bidest. verdünnt, erneut über Nacht gerührt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Direkt vor Gebrauch der Lösung wurde ein zweites Mal filtriert.

Im ersten Schritt des Färbevorgangs wurden die Zellen fixiert. Dazu wurden dem Medium in der Kulturflasche 10%ige Formalinlösung zugefügt und die Zellen für mindestens 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und 10 ml Formalinlösung 10% hinzugefügt. Nach Inkubation (5 Stunden bei 4°C) wurde die Formalinlösung durch 10 ml Ölrot-O- Lösung ersetzt und die Zellen für weitere 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Zum Entfernen der Ölrot-O- Lösung aus der Kulturflasche wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und im Anschluss in PBS fotografiert.

3.5.4. Lebend- Tot- Färbung mittels Fluoreszenz

Die Lebend- Tot- Färbung diente der mikroskopischen Untersuchung der in vitro Konstrukte auf lebende Zellen und somit dem Ausschluss der Toxizität der Konstrukte auf die Präadipozyten.

Eine Überprüfung erfolgte nach 1, 2 und 5 Wochen Inkubation im Nährmedium. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte durch eine Färbung mit Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid. Bei diesem Verfahren ist es möglich, durch den gleichzeitigen Einsatz zweier Fluoreszenzfarbstoffe lebende und tote Zellen differenziert anzufärben. Die lebenden Zellen werden durch Fluoresceindiacetat (FDA) spezifisch dargestellt. FDA wird in die Zellen aufgenommen und dort von Esterasen durch Hydrolyse zu Fluorescein und Acetat aufgespalten. Fluorescein kann die intakte Zellmembran anschließend nicht mehr passieren und wird in den vitalen Zellen angereichert. Unter dem Mikroskop erscheinen diese dann unter Verwendung eines Blaufilters grün. Tote, nekrotische Zellen wurden mit Propidiumiodid (PI) spezifisch angefärbt. PI kann nur durch Membrandefekte in nekrotische Zellen eindringen und lagert

sich dort an die DNA an. Die Zellkerne erscheinen somit im Fluoreszenzmikroskop unter einem Grünfilter rot fluoreszierend.

Zur Durchführung der Vitalitätsbestimmung wurden 500 µl einer FDA-Lösung (25mg/ml) und 500 µl einer PI-Lösung (1mg/ml) zusammen in einem Becherglas mit 60 ml Aqua dest. vermischt und für 10 min. bei 2000 U/min. und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach einer Inkubationszeit von 1, 2 bzw. 5 Wochen wurden die Konstrukte aus dem Nährmedium genommen, mit einem Skalpell in möglichst dünne Scheiben geschnitten und mit der Färbelösung übergossen. Nach einer Einwirkzeit von 90 Sekunden in einem abgedunkelten Raum, wurden die Konstruktteile der Lösung entnommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Zur Bilddokumentation diente eine Axio Vision Digitalkamera mit der Software Axio Vision Rel. 4.6.

3.5.5. Doppelfärbung Hämalaun-Eosin(HE) und Trichromfärbung

Unter Anwendung der HE- und Trichrom-Färbungen wurden die in vitro kultivierten Konstrukte beurteilt.

Die zellbefüllten Polyurethankonstrukte wurden über Nacht in 4%iges Formalin eingelegt und am nächsten Tag in eine Einbettkassette gegeben. In der Pathologie erfolgte die Entkalkung der Konstrukte. Anschließend wurden die Konstrukte in Paraffin eingebettet und bis zum Schneiden mit dem Microtom bei -20°C gelagert. Um einen gefärbten und für die lichtmikroskopische Untersuchung geeigneten Schnitt zu erhalten, wurde der Paraffinblock in das Microtom eingespannt und in ca.1µm dicke Schichten geschnitten. Es folgte das Aufziehen auf einen Objektträger und das Antrocknen im Wärmeschrank.

Es wurden zwei verschiedene Färbemethoden gewählt, die beide als einfache, gut durchführbare Übersichtsfärbungen gelten. Bei der Hämatoxylin-Eosin(HE) Färbung färbte der basische Farbstoff Hämatoxylin vor allem die Zellkerne, die basophile Nukleinsäuren enthalten, blau-violett an. Das Eosin färbte Zytoplasmakomponenten und Bindegewebe rot.

In der Trichromfärbung erscheinen Zellkerne braunschwarz, das Zytoplasma rot und Erythrozyten orangerot. Vorteil dieser Färbung ist die bessere Darstellung von Gefäßen, die vor allem für die Kenntlichmachung der Vaskularisierung der Konstrukte im in vivo Modell von großer Bedeutung ist.

Diese Färbung galt somit auch als Vorversuch. Im Folgenden sind die Färbeprotokolle dargestellt:

Hämalaun-Eosin(HE)-Färbung		Trichromfärbung	
<i>Xylol</i>	5 Minuten	<i>Xylol</i>	5 Minuten
<i>Xylol</i>	5 Minuten	<i>Xylol</i>	5 Minuten
Iso rein	2 Minuten	Iso rein	2 Minuten
Iso 95%	2 Minuten	Iso 95%	2 Minuten
Iso 80%	2 Minuten	Iso 80%	2 Minuten
Iso 70%	2 Minuten	Iso 70%	2 Minuten
Aqua dest.	5 Minuten	Aqua dest.	5 Minuten
Hämalaun	10 Minuten	Kernfärbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert	5 Minuten
Bläuen mit fließen-dem Leitungswasser ca. 37°C	5 Minuten	Spülen mit fließen-dem Leitungswasser ca. 37°C	5 Minuten
Aqua dest.	5 Minuten		
Eosin 1%+3 gtt Eisessig	3 Minuten	Beizen mit 1%iger Phosphorwolfram- säure	1 Minute
Aqua dest.	5 Minuten	Aqua dest.	30 Sekunden
Iso 70%	5 Sekunden	Iso 70%	5 Sekunden
Iso 80%	5 Sekunden	Iso 80%	5 Sekunden
Iso 95%	5 Sekunden	Iso 95%	5 Sekunden
Iso rein	2 Minuten	Iso rein	2 Minuten
Xylol	5 Minuten	Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten	Xylol	5 Minuten
Eukitt	Eindecken mit Deckglas	Eukitt	Eindecken mit Deckglas

4. Ergebnisse

4.1. Isolation der Präadipozyten

4.1.1. Zeitabhängigkeit der Biopsatverarbeitung

Das Zeitintervall zwischen Entnahme des Biopsats und Zellisolation war für eine erfolgreiche Zellkultur ausschlaggebend. Gewebe, das unmittelbar oder bis ca. 6 Stunden nach Entnahme verarbeitet wurde, zeigte gegenüber Gewebe, das über 24 Stunden im Kühlschrank gelagert wurde, bessere Ergebnisse bezüglich der Quantität vitaler Zellen. So erhielt man aus der gleichen Menge Fettgewebe, nach Verarbeitung am gleichen Tag ca. 50 % mehr Zellen pro P75 Kulturflasche, wie nach einer Verarbeitung nach 24 Stunden (Abb. 4.1./ 4.2. und Tab. 2)

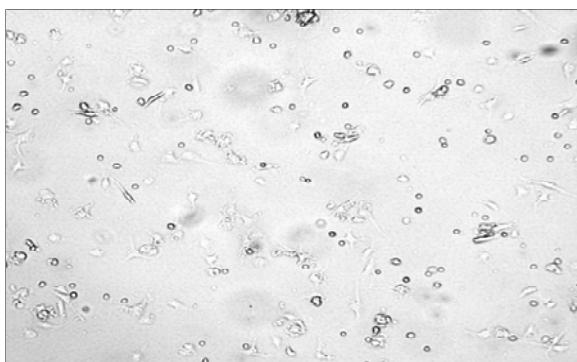


Abb.4.1. Präadipozyten (1 Tag Kultivierung, 10x Vergrößerung), nach sofortiger Verarbeitung

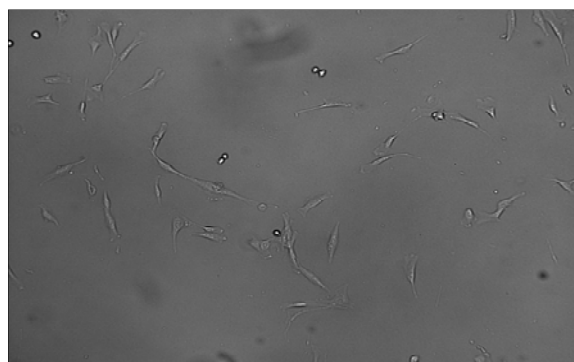


Abb.4.2. Präadipozyten (1 Tag Kultivierung, 10x Vergrößerung), Verarbeitung nach 24 Stunden

Tab.2 Zeitabhängigkeit der Biopsatverarbeitung

Verarbeitung des Fettgewebes	Unmittelbar nach Operation	Nach 6 Stunden	Nach 24 Stunden
Fettgewebsmenge	ca. 100 g	ca. 100 g	ca. 100 g
Zellpassage	P0	P0	P0
Zellausbeute nach 24 Stunden Kultivierung pro P75 Kulturflasche (Mittelwert aus je 2 Flaschen)	996.000	891.000	567.000

4.1.2. Optimierung der Fettgewebsdigestion

Die Digestion des Fettgewebes führte zur Isolierung der Fettvorläuferzellen. Dazu wurde das Biopsat möglichst breiig zerkleinert, um eine möglichst große Angriffsfläche für die Kollagenase zu schaffen.

Die Kollagenase löste durch ihre Enzymwirkung anschließend die Zellen aus dem Gewebsverbund. Die besten Digestionsergebnisse wurden bei einer Kollagenasekonzentration von 2mg/ml mit einer Inkubationszeit von 2-4 Stunden bei 37° C erzielt. Eine Digestionszeit unter einer ½ Stunde bzw. über 9 Stunden erbrachte deutlich schlechtere Kulturergebnisse bezüglich der gewonnenen Zellzahl (Abb.4.3.-4.5. und Tab.3).

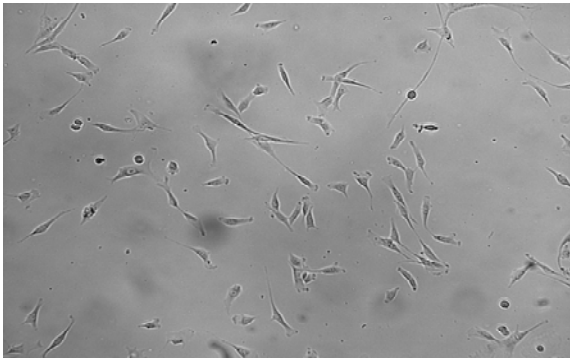


Abb.4.3. Präadipozyten nach ½ Stunde Denaturierungszeit (10x Vergrößerung)

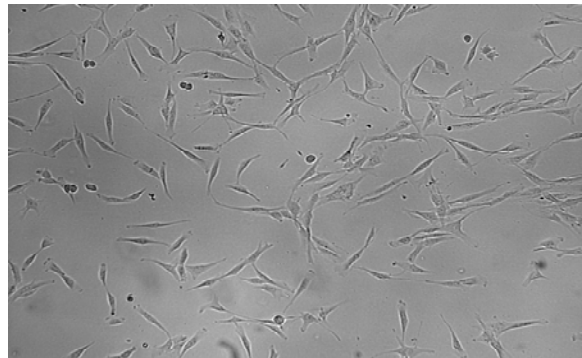


Abb.4.4. Präadipozyten nach 2 Stunden Denaturierungszeit (10x Vergrößerung)



Abb.4.5. Präadipozyten nach 9 Stunden Denaturierungszeit (10x Vergrößerung)

Tab.3 Zellausbeute in Abhängigkeit der Digestionsdauer

Digestionsdauer	½ Stunde	3 Stunden	9 Stunden
Zellzahl pro P75 Kulturflasche nach 24 Stunden Kultivierung (Mittelwert aus zwei Kulturflaschen)	380.700	729.000	81.000

4.1.3. Auswirkung der Erylyse

Ein Erylysepuffer, der während der Isolation von Präadipozyten verwendet wurde, befreite die Zellsuspension vor der Aussaat von roten Blutkörperchen. Dadurch sollte die Adhäsion unerwünschter stromaler Zellen reduziert und das Anhaften der Präadipozyten gefördert werden. Die Zellkulturen, die im Vorfeld mit der Erylyse behandelt wurden zeigten jedoch im Vergleich zu den Zellkulturen ohne verwendete Erylyse keine erhöhte Adhäsionsfähigkeit am Kulturflaschenboden. Nach dem ersten Mediumwechsel konnten auch die Zellkulturen ohne Erylyse nach mehrmaligem Waschen von den störenden Erythrozyten befreit werden. Zur Beurteilung wurden die Zellkulturen jeweils nach dem ersten Mediumwechsel unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

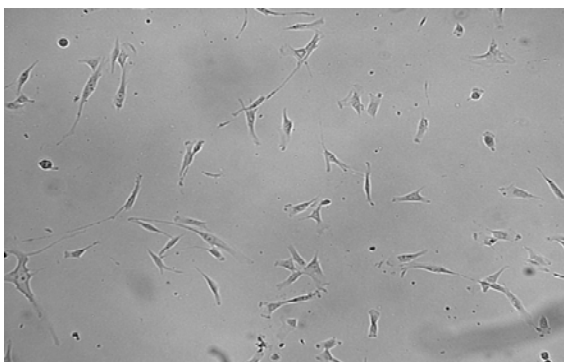


Abb.4.6.Präadipozyten(24 Stunden Kultivierung)mit Erylyse(10xVergrößerung)

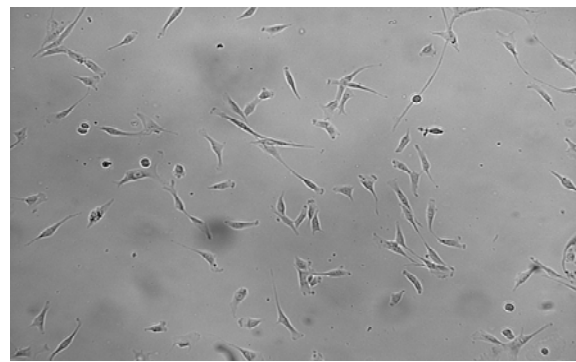


Abb.4.7.Präadipozyten(24 Stunden Kultivierung) ohne Erylyse(10xVergrößerung)

4.1.4. MiniMACS™ System

Durch das MiniMACS™ System der FA Miltenyi konnten Stammzellen aus Fettgewebe isoliert und kultiviert werden. Nach 2 Wochen erreichten die Zellen eine nahezu 70 % Konfluenz (Abb. 4.9.) Durch Zugabe eines spezifischen,

adipogenem Differenzierungsmedium entwickelten sich die Zellen zu Adipozyten (Abb.4.8.).

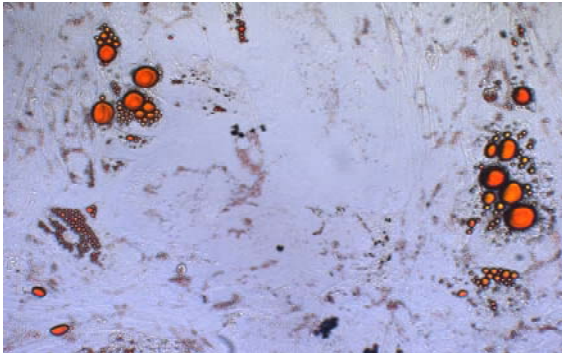


Abb.4.8. Zu Adipozyten differenzierte Vorläuferzellen (20x Vergrößerung)

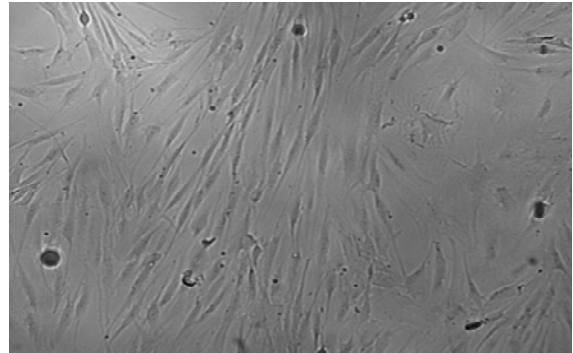


Abb.4.9. Isolierte Vorläuferzellen nach 2 Wochen Kultivierung (20x Vergrößerung)

4.2. Proliferation und Kultivierung der Präadipozyten

Zur Optimierung der Zellkulturbedingungen wurden verschiedene Kulturmedien untersucht. Dabei sollte aus einer möglichst geringen Menge an Fettgewebe eine quantitativ möglichst große Ausbeute an Fettvorläuferzellen erzielt werden.

1) Um die Proliferation der Zellen anzuregen, wurde dem Basalmedium 1 (s.o.3.2.) 10% FKS zugefügt. Nach einwöchiger Kultivierung wiesen die Zellen eine mäßige Proliferationsrate auf. Auch nach zwei Wochen blieb die gewünschte Konfluenz von 95% der Zellen aus (Abb. 4.10.- 4.13.).

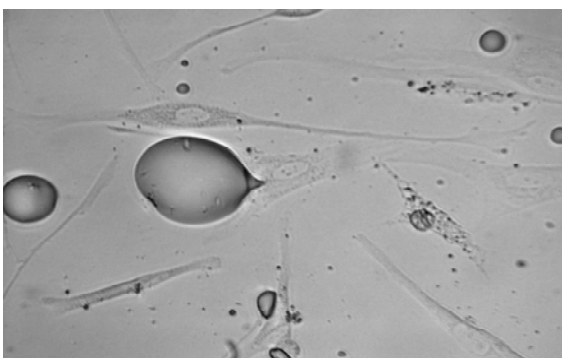


Abb.4.10. Präadipozyten (1Woche Kultivierung, 40x Vergrößerung)

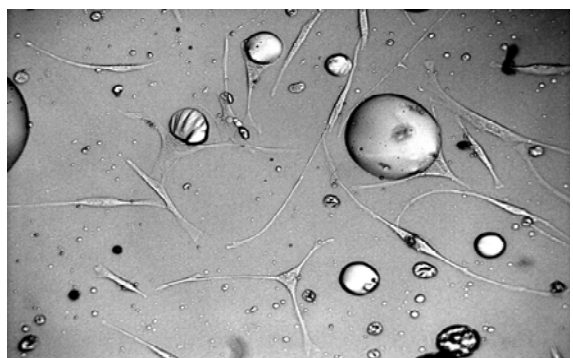


Abb.4.11. Präadipozyten (1 Woche Kultivierung, 20x Vergrößerung)

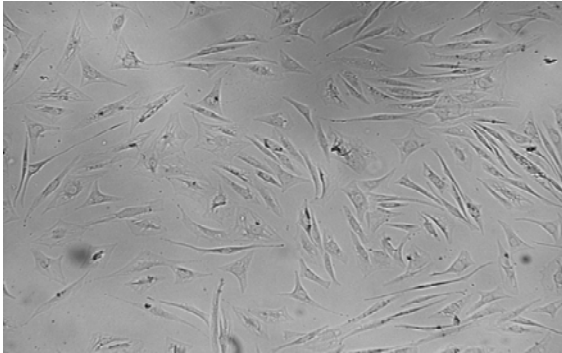


Abb.4.12.Prädipozyten (1Woche Kultivierung, 10x Vergrößerung)

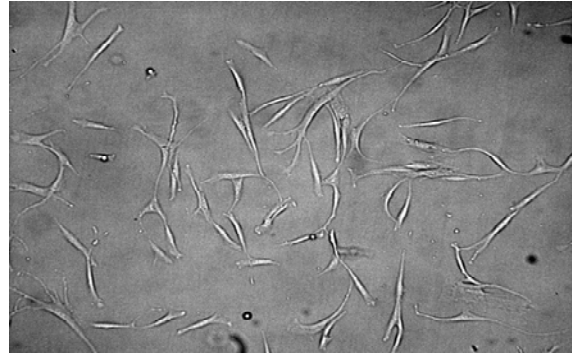


Abb.4.13.Prädipozyten (2 Wochen Kultivierung, 10x Vergrößerung)

2) Die besten Ergebnisse bezüglich Proliferationsgeschwindigkeit ergab die Kultivierung der Zellen in Endothelial Cell (E.C.)Growth Medium MV (s.o.3.2.). Die Zellkultur wies eine Woche nach der Isolierung eine nahezu 95%tige Konfluenz auf. Nach Passagierung und erneuter Aussaat erreichte die P1 Zellkultur nach zwei Tagen erneut einen gleichmäßigen Zellrasen (Abb.4.14/4.15).

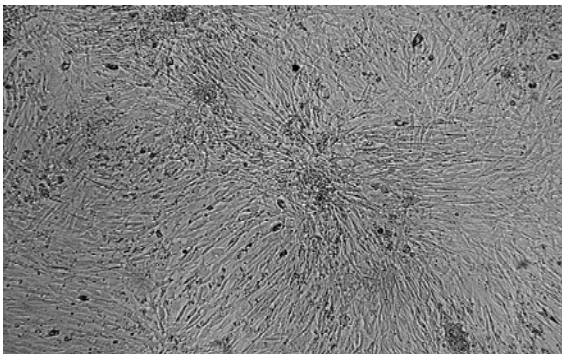


Abb.4.14.Prädipozyten P0 (1 Woche Kultivierung mit E.C.Growth Medium)

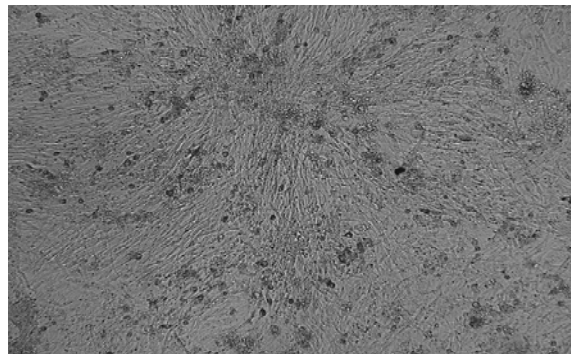


Abb.4.15.Prädipozyten P1 (2 Tage Kultivierung mit E.C.Growth Medium, 10x Vergrößerung)

Die Ergebnisse des Zellproliferations Assay MTT zeigten die gleiche Tendenz. Die Proliferationsrate der Zellen im Basalmedium 2 lag deutlich höher als im Basalmedium 1 (Diagramm 1).

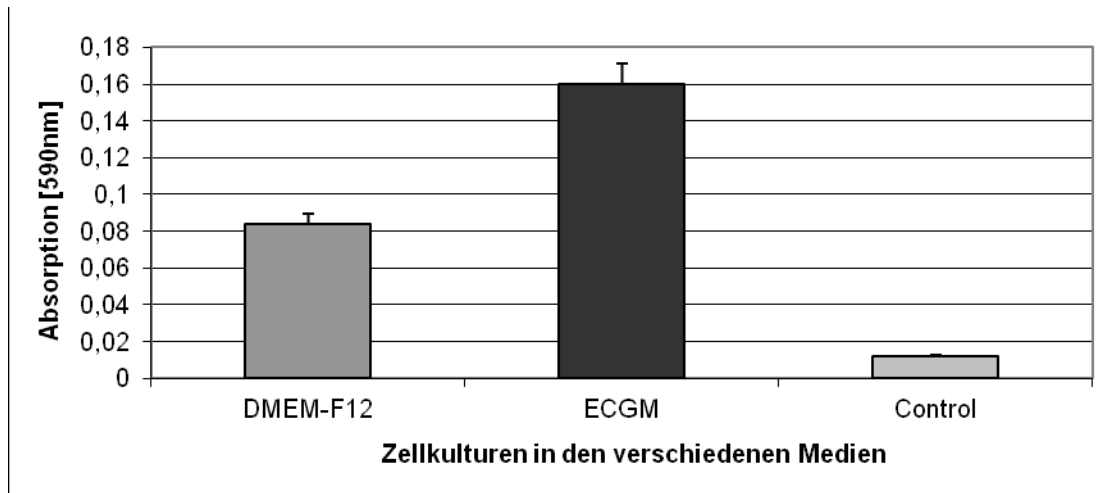


Diagramm 1. Zellkulturen in BM2 (Mitte) zeigten eine höhere Proliferationsrate als Zellkulturen in BM1 (links)

4.3. Differenzierung der Präadipozyten

Zur Umwandlung der Fettvorläuferzellen in Adipozyten wurden folgende Medien beurteilt:

1) Das Basalmedium 1 mit den Zusätzen 100 nM Cortisol, 1 nM Trijodthyronin, 500 nM Troglitazon, 1 μ M Insulin und 500 μ M IBMX induzierte die Adipogenese (Abb.4.16.). Die Proliferation wurde gestoppt und die Differenzierung eingeleitet. In den nächsten 3-5 Tagen entwickelten sich erste Fetttröpfchen in der Zelle. Nach 14-28 Tagen waren die multivakuolären Adipozyten komplett mit Lipidtröpfchen gefüllt und wandelten sich zu univakuolären Fettzellen um (Abb.4.18.). Diese muren Fettzellen ließen sich in den Standard-Plastik-Kulturflaschen nicht erhalten, da sie sich durch starke Abrundung und geringe Dichte vom Kulturflaschenboden lösten und beim Mediumwechsel verloren gingen.

2) Die Induktion und Differenzierung der Fettzellen mit dem Induktionsmedium α -MEM, 5% FKS, 12 ml Anti-Anti, 1 μ M Insulin, 0,1 μ M Cortisol, 0,5 mM IBMX, 60 μ M Indomethacin und dem Differenzierungsmedium α -MEM, 5% FKS, 1 μ M Insulin führte zu annähernd gleichen Ergebnissen (Abb.4.17. und 4.19.). Auch hier wurde die Entwicklung der ersten Fetttröpfchen zu multivakuolären Adipozyten und schließlich zur univakuolären Fettzelle unter dem Mikroskop beobachtet.

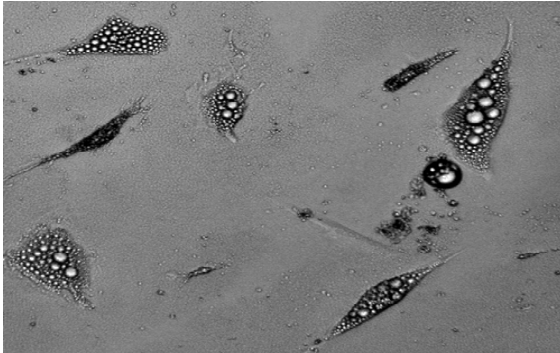


Abb.4.16. Adipozyten 1 Woche nach Induktion mit Basalmedium 1 +Zusätze(20x Vergrößerung)

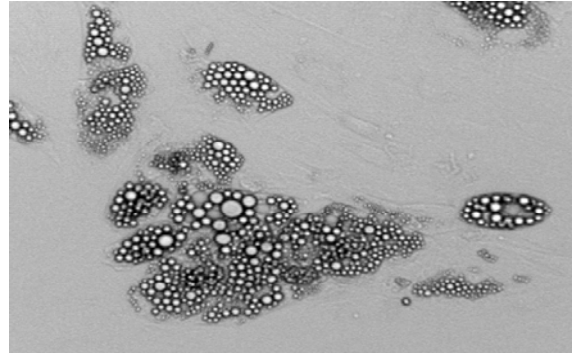


Abb.4.17. Adipozyten 1 Woche nach Induktion mit α -MEM (20x Vergrößerung)

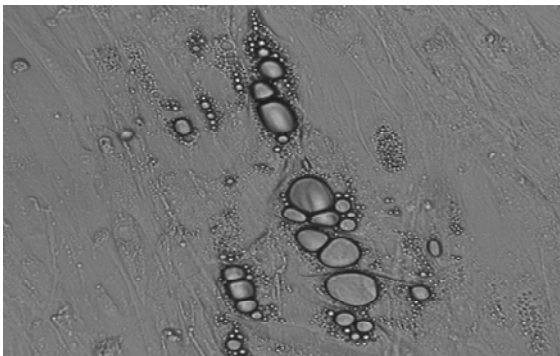


Abb.4.18. Adipozyten nach 10 Tagen Differenzierung mit Basalmedium 1 (40x Vergrößerung)

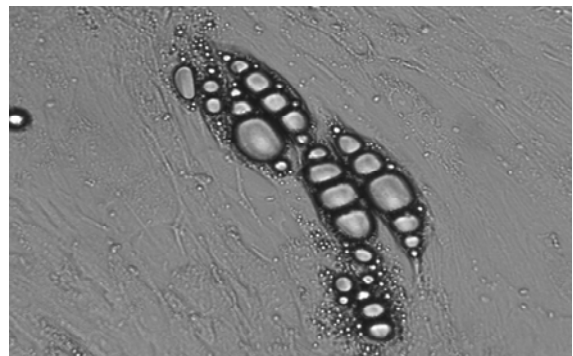


Abb.4.19. Adipozyten nach 10 Tagen Differenzierung mit α -MEM(40x Vergrößerung)

Durch die Ölrot-O-Färbung konnte bewiesen werden, dass es sich bei den generierten Zellen um Fettzellen handelte. Die in der Zellkultur vorhandenen Lipide färbten sich rot und die Umwandlung von der spindelförmigen Vorläuferzelle zur multivakuolären Fettzelle und schließlich zum univakuolären Adipozyten war durch die Färbung in der Kulturflasche gut nachzuvollziehen (Abb.4.20.-4.23.).

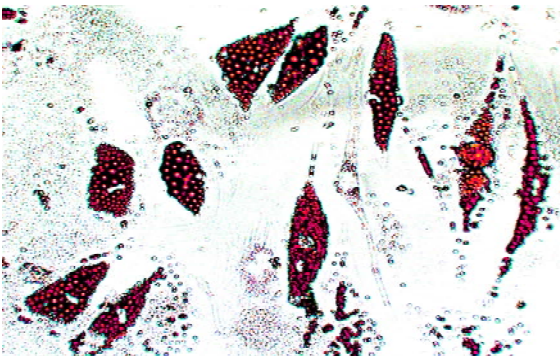


Abb.4.20. Adipozyten (10 Tage Kultivierung mit Differenzierungsmedium, 20x Vergrößerung)

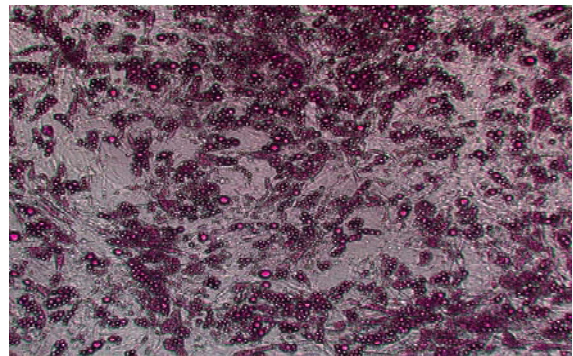


Abb.4.21. Adipozyten (21 Tage Kultivierung mit Differenzierungsmedium, 10x Vergrößerung)

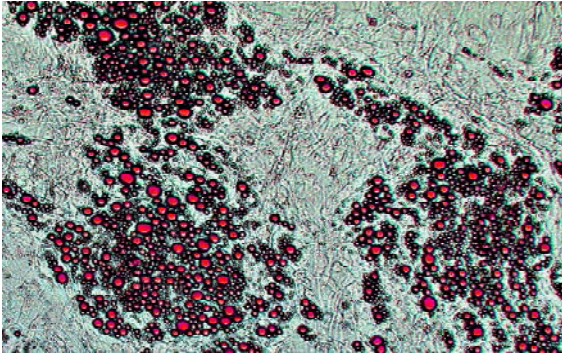


Abb.4.22. Adipozyten (26 Tage Kultivierung mit Differenzierungsmedium, 20x Vergrößerung)

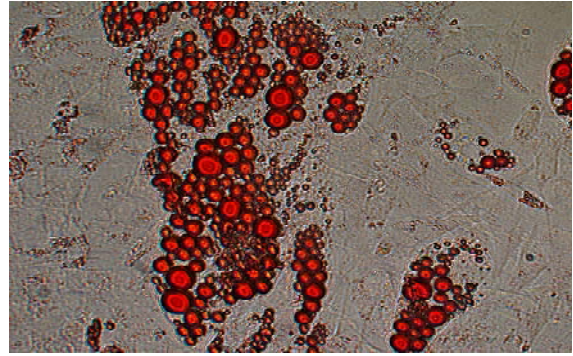


Abb.4.23. Adipozyten (26 Tage Kultivierung mit Differenzierungsmedium, 40x Vergrößerung)

4.4. Generierung eines dreidimensionalen Fettgewebsverbundes

4.4.1. Polyurethankonstrukte

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Tissue Engineering“ Klinikum Rechts der Isar entwickelte die Firma Polymaterials AG, 87600 Kaufbeuren im Vorfeld einen Polyurethanschaum, der als Zellträger im Bereich des Tissue Engineering geeignet schien. Der Schaum bietet eine 90%ige Porosität mit zur Oberfläche offenen und untereinander verbundenen Poren. Diese Voraussetzungen sind optimal für die Nahrung und somit für die Entwicklung der Zellen. In Vorversuchen zeigte sich eine gute Verträglichkeit des Schaumes mit Chondrozyten. Diese erfolgreichen Ergebnisse ließen sich in der Arbeit mit Fettzellen weiterführen. Die Lebend-Tot-Färbung (s.u.4.4.2.) bewies, dass auch der Polyurethanschaum mit Fettzellen verträglich ist. Durch die Interkonnektivität der Poren war ein gleichmäßiges Einbringen der Zellsuspension möglich.

4.4.2. Kultivierung von mit Präadipozyten beimpfter Polyurethankonstrukte in vitro

1) Lebend-Tot-Färbung mittels Fluoreszenz

Mit der Lebend-/Totfärbung sollte die prinzipielle Verträglichkeit der Zellen mit den Trägersubstanzen nachgewiesen werden.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der zellenthaltenden Polyurethankonstrukte mittels der Fluoreszenzfarbstoffen Propidiumjodid (PI) und Fluoresceindiaceetat (FDA) färbten sich die toten Zellen unter dem Grünfilter rot und die vitalen Zellen unter dem Blaufilter grün. Alle untersuchten Konstrukte wiesen nach 1, 2 und 5 Wochen (Abb.4.24.-4.26.)

Inkubation vitale Zellen auf. Eine Toxizität des Polyurethanschaums auf die Fettzellen konnte somit ausgeschlossen werden.

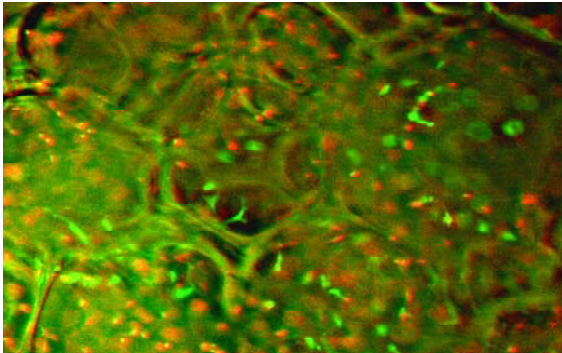


Abb.4.24. Polyurethankonstrukt mit Präadipozyten (1 Woche Inkubation)

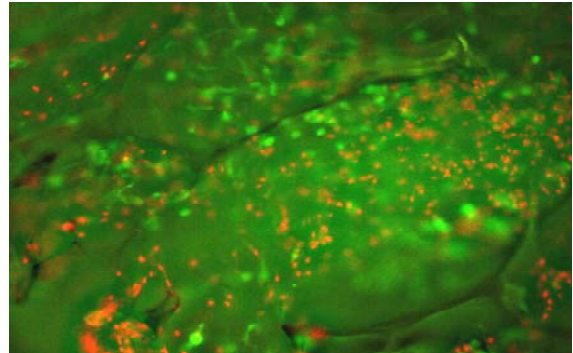


Abb.4.25. Polyurethankonstrukt mit Präadipozyten (2 Wochen Inkubation)

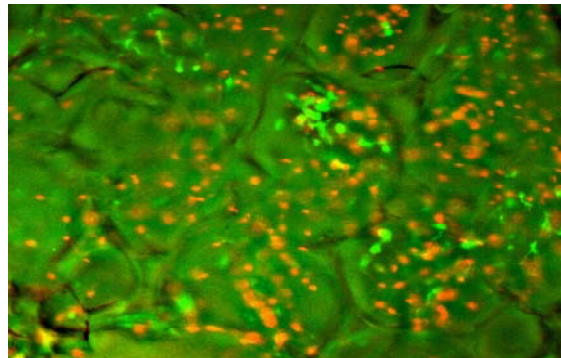


Abb.4.26. Polyurethankonstrukt mit Präadipozyten (5 Wochen Inkubation)

2) HE-Färbung und Trichrom-Färbung

Durch die HE- und Trichrom- Färbung konnte gezeigt werden, wie sich die Präadipozyten im Polyurethankonstrukt zu Adipozyten entwickeln. Die Scaffolds befanden sich vor der Verarbeitung zu Paraffinschnitten zwei Tage in einem Induktionsmedium und im weiteren Verlauf unterschiedlich lange in einem Differenzierungsmedium. Während der Färbung wurde eine Alkoholreihe eingesetzt, die den Lipidanteil der Zellen aus den Schnitten herauslöste. Es entstanden Lakunen mit blau gefärbten Zellkernen in der HE Färbung und braun-schwarzen Zellkernen in der Trichrom-Färbung. Das Fibrin-Thrombin-Gemisch bettete die Zellen ein und stellte sich im Schnitt blassrosa dar. Das Negativ entsprach somit der Fettzelle. Beurteilt wurden je drei Schnitte eines Konstruktes nach zwei Tagen bzw. ein und fünf Wochen Kultivierungsdauer. Dies erfolgte visuell unter einem Lichtmikroskop. Nach zwei Tagen Kultivierung

im Differenzierungsmedium ließ sich noch deutlich die Fibroblastenform der Präadipozyten erkennen. Vereinzelt kam es schon zur Lakunenbildung (Abb. 4.28.). Nach 1 und 5 Wochen war die typische Siegelringform der Adipozyten ausgebildet (Abb. 4.27/4.29/4.30.).

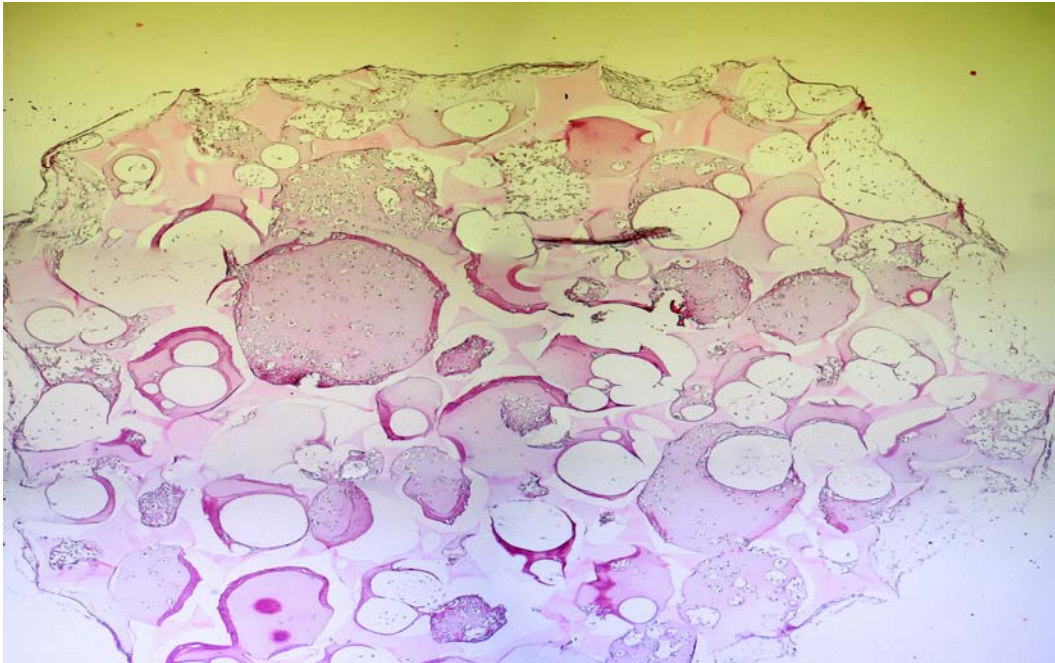


Abb.4.27. Konstrukt nach 1 Woche Kultivierung (Trichrom)

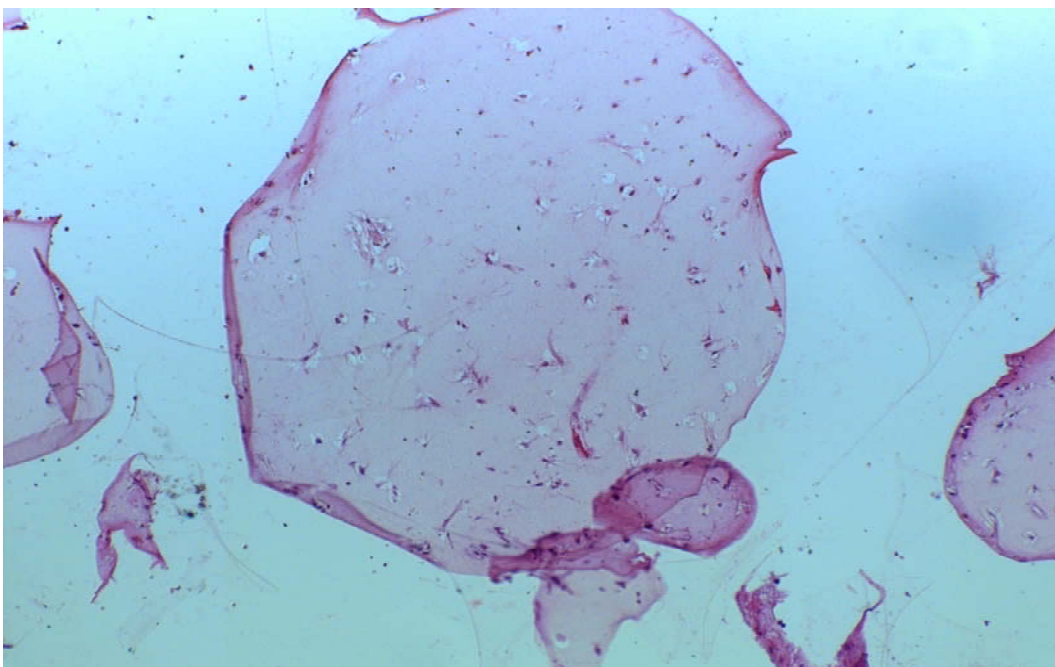


Abb.4.28. Konstrukt nach 2 Tagen Kultivierung (HE)

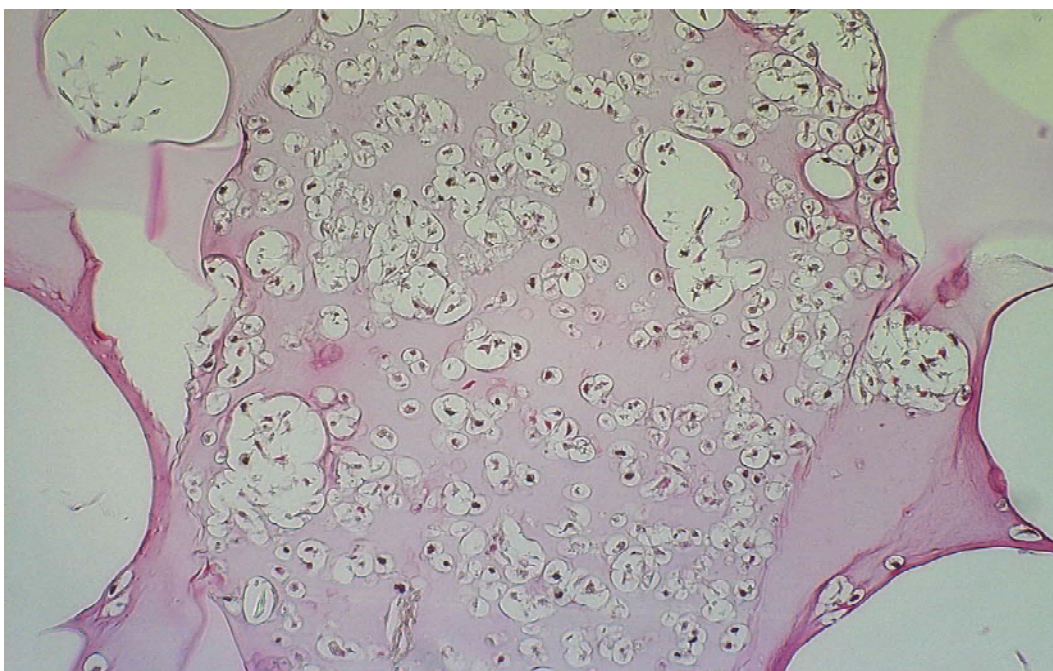


Abb.4.29. Konstrukt nach 1 Woche Kultivierung(Trichrom)

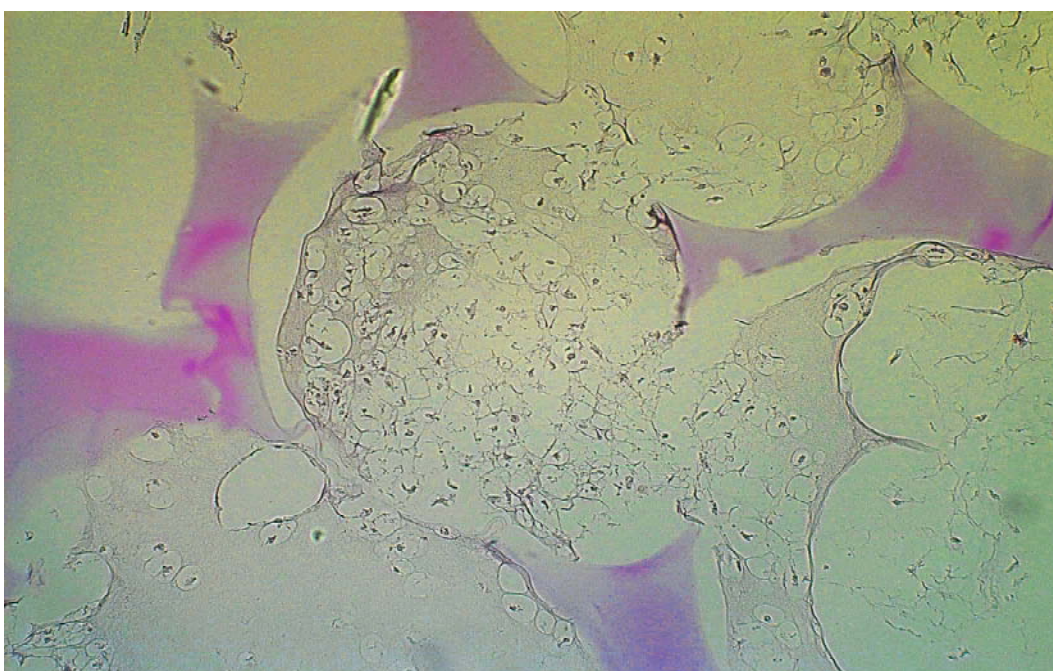


Abb.4.30. Konstrukt nach 5 Woche Kultivierung(Trichrom)

5. Diskussion

Beim Weichteil-Tissue Engineering sollen klein- und großflächige Gewebsdefekte durch den Einsatz moderner, gewebstechnologischer Verfahren ersetzt werden. Mit den gegenwärtig zur Verfügung stehenden Methoden zur Herstellung von artifiziellem Gewebe können ausschließlich kleine Fettvolumina generiert werden. Aktuell ist es noch nicht möglich größere Weichteildefekte mit ausreichend großen, gezüchteten Fettgewebstransplantaten zu decken (Weiser, 2005).

Die Forschungsschwerpunkte bei dieser Arbeit liegen daher in der Isolation von gewebspezifischen, humanen Vorläuferzellen, der Optimierung von Zellkulturbedingungen und der Einbringung der Zellen in eine geeignete Biomatrix.

5.1. Optimierung der Zellkulturbedingungen

5.1.1. Präadipozyten-Isolation

Um ein geeignetes Gewebe für das Weichteil-Tissue Engineering zu schaffen, sollten die verwendeten Fettgewebszellen bestimmte Kriterien erfüllen: Sie sollten autolog oder nicht immunogen sein, in ausreichender Menge vorhanden sein und in vitro vermehrt werden können. Das Potential der Zellen zur Ausdifferenzierung in Adipozyten darf dabei nicht verlorengelassen. Im Vergleich zu früheren Studien, in denen erfolgreich Fettgewebe aus murinen Präadipozytenzelllinien, wie zum Beispiel 3T3-L1 (Weiser, 2008), gewonnen wurde, basierte das generierte Gewebe dieser Arbeit auf humanen Präadipozyten. Diese brachten die Fähigkeit der in vitro Kultivierung mit sich und so konnten ausreichend viele Zellen für die Befüllung von Konstrukten gewonnen werden. Die humanen Präadipozyten ließen sich mit geeigneten Medien erfolgreich zu reifen Adipozyten ausdifferenzieren. Gegen eine Verwendung von murenen humanen Adipozyten sprach die extreme Empfindlichkeit und leichte Traumatisierung der Zellen während der Präparation. Außerdem haften die lipidgeladenen Zellen nicht am Kulturflaschenboden und erschwerten so die in vitro Kultivierung (Sugihara, 1987; Tholpady, 2005).

Für die hier beschriebenen Präadipozytengewinnung wurde ausschließlich durch Exzision gewonnenes Fettgewebe (Abdominoplastik oder Brustreduktion) verwendet. Aspirationslipektomien wurden ausgespart, da

eine stärkere Traumatisierung der Zellen durch Verwendung kleinlumiger Aspirationskanülen, von Lokalanästhetika und hypotoner Lösungen beschrieben wurde (Lalikos, 1997; Moore, 1995). Durch Optimierung der Verfahrenstechnik konnte die Zellzahl der isolierten Präadipozyten erhöht werden. Der zu beobachtende negative Einfluss eines längeren Zeitintervalls zwischen Entnahme des Biopsats und Zellisolation war auf eine verlängerte Ischämiezeit zurückzuführen. Durch die Hypoxie im Gewebe starben die Zellen ab und der Zellertrag minimierte sich. Die Verarbeitung des Biopsats innerhalb von 6 Stunden war somit der erste Schritt für eine quantitativ erfolgreiche Zellkultur. Die mechanisch, breiige Gewebsdissoziation führte zu einer Oberflächenvergrößerung des Fettgewebes und erhöhte die Enzymwirkung der Kollagenase. Die besten Digestionsergebnisse wurden bei einer Kollagenasekonzentration von 2 mg/ml bei einer Inkubationszeit von 2-4 Stunden bei 37°C erzielt. Ein Gewebsverdau unter einer halben Stunde löste weniger Zellen aus dem Verbund und eine Digestionsdauer über neun Stunden schien die Zellen ernsthaft zu schädigen, so dass die Zellausbeute eher gering ausfiel.

Eine verbesserte Proliferation und Adhäsion der Zellen am Kulturflaschenboden durch Verwendung einer Erylyse konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

Die Vorläuferzellen ließen sich in vitro mit spezifischen Medien zu reifen Adipozyten ausdifferenzieren. Die lipidbeladenen adulten Adipozyten konnten durch die Ölrot-O-Färbung dargestellt werden.

Ein weiterer Ansatz der Zellisolation war die Gewinnung von Stammzellen (adipose-derived stem cells-ADSCs) aus Fettgewebeproben unter Zuhilfenahme des MiniMACS™ Systems, mit dem Ziel eine besonders reine Zelllinie zu schaffen in der alle Zellen das gleiche Entwicklungsstadium haben. ADSCs besitzen ein multipotentes Differenzierungspotential (Zuk, 2002) und können unter Zugabe verschiedener Differenzierungsmedien (hier NH AdipoDiff Medium) in unterschiedliche Zelllinien, z.B. Adipozyten, Chondrozyten oder Osteozyten differenzieren. Die Verwendung des MiniMACS™ Systems war zu diesem Zeitpunkt gegenüber der üblichen Zellisolation mit einem höheren Zeitaufwand verbunden. Außerdem mussten mindestens 250 Gramm Ausgangsgewebe für die Isolierung zur Verfügung

stehen. Auf diese Weise wurden zwar ADSCs gewonnen, jedoch gingen die für uns wertvollen Präadipozyten bei dieser Art der Isolierung verloren. Quantitativ brachte das MiniMACS™ System bezüglich der Zellverproliferation also keinen Vorteil.

5.1.2. Mediumoptimierung

Die Kultivierung humaner Präadipozyten erfolgte anfangs nach einem Protokoll von Hauner (2000). Die verwendeten Grundmedien waren Dulbecco`s modified Eagle`s Medium (DMEM) und Ham`s F 12 Medium. Dabei wurde das Medium durch verschiedene Zusätze je nach Bedarf zu einem Aussaat-, Induktions- oder Differenzierungsmedium modifiziert. Das Aussaat- bzw. Wachstumsmedium beinhaltete zu 10% fötales Kälberserum. Dadurch wurden die Zelladhäsion, die Ausbreitung und die Vermehrung der Zellen gefördert. Je länger serumhaltiges Medium verwendet wurde, desto größer war die mitogene Aktivität der Zelle und die Zellausbeute stieg. Jedoch verliert die Zelle durch die Zugabe des Serums über einen längeren Zeitraum immer mehr ihr Differenzierungspotential (Hauner, 2000). Daher wurde eine möglichst kurze Proliferationszeit mit maximaler Zellausbeute angestrebt. Dieses in der eigenen Studie als „Basalmedium 1“ aufgeführte Medium wird häufig in der einschlägigen Literatur zur Kultivierung von Präadipozyten verwendet (Hauner, 2000; Halbleib, 2003). Da dieses Medium in unseren Versuchen jedoch weit hinter den gewünschten Ergebnissen zurücklag, wurde das Endothelial Cell Growth Medium getestet. Dieses führte zu einem deutlichen Anstieg der Zellproliferationsrate bei erhaltener Differenzierungsfähigkeit der Zellen. Der mitogene Effekt beruhte womöglich zum großen Teil auf der Substitution von EGF (Epidermal Growth Factor). Dieser Faktor wurde schon in früheren Studien erfolgreich zur Proliferationserhöhung eingesetzt (Heimburg, 2000).

Um die Adipozytendifferenzierung anzuregen und die Proliferation zu stoppen, wurde ein serumfreies Basalmedium 1 verwendet und verschiedenen Hormone, wie Cortisol, Trijodothyronin, Troglitazon, Insulin und zur Induktion der Adipogenese in den ersten 2 Tagen IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin) hinzugefügt. IBMX löste eine Genexpression aus, die für die Fettzellendifferenzierung nötig ist. Die Verwendung dieser Reagenzien gilt als Standard zur Einleitung der Differenzierung und wurde mit Erfolg in mehreren

Studien eingesetzt (Hauner, 2000; Fischbach, 2004; Weiser, 2008). Die Verwendung eines Modified Eagle Medium (MEM) in der α -Modifikation als Grundmedium brachte in dieser Arbeit bezüglich der Differenzierung keine signifikanten Vorteile.

5.2. Dreidimensionale Trägermatrices

Um einen dreidimensionalen Gewebsverbund zu generieren, benötigen die Zellen ein vorgefertigtes Gerüst, das als Träger (Scaffold) dient. Zu den Anforderungen an den Träger zählen neben einer guten Biokompatibilität auch adäquate mechanische Eigenschaften. Ein zu starrer Träger wäre für die Deckung von Weichteildefekten nicht geeignet. Die Oberflächenstruktur und die chemische Zusammensetzung sollen eine gute Zellanlagerung und die Möglichkeit zur Differenzierung erlauben. Eine hohe Porosität und Interkonnektivität der Poren gewährleistet eine gleichmäßige Verteilung und eine ausreichende Ernährung der Zellen im Träger. Da Präadipozyten im Laufe ihrer Entwicklung zum reifen Adipozyten einen Durchmesser von 100 μm erreichen, ist es wichtig, einen Träger mit ausreichend großem Porendurchmesser zu verwenden, der die volle Differenzierung der Zellen erlaubt.

In früheren Studien wurden synthetische, absorbierbare Polymere, wie Polyglycolsäure oder Polylactatsäure, als Scaffold verwendet (Fischbach, 2004; Seung-Woo, 2004). Ein Nachteil dieser Materialien sind die säurehaltigen Abbauprodukte, welche die Zellfunktion beeinflussen können.

In dieser Arbeit dienten Polyurethanschäume der Firma Polymaterials AG, 87600 Kaufbeuren als Zellträger. Die im Durchmesser fünf Millimeter breiten und zwei Millimeter dicken Konstrukte wurden mit einem Fibrin-Thrombin-Präadipozytengemisch beimpft. In einer Studie von 2007 beimpften Eyrich und Kollegen diese Art von Scaffold mit Chondrozyten und erzielte dabei zufriedenstellende Ergebnisse. Die Arbeitsgruppe „Tissue Engineering“ des Klinikum Rechts der Isar erforschte ebenfalls im Vorfeld die Verträglichkeit des Polyurethanschaums mit Chondrozyten. Es zeigten sich auch hier gute Ergebnisse. Der Träger stellte mit seiner 90%igen Porosität und mit den zur Oberfläche offenen, untereinander verbundenen Poren die optimale Grundlage für eine Beimpfung mit Zellen dar.

Positive Vitalitätsfärbungen konnten in dieser Arbeit beweisen, dass der Polyurethanschaum auch mit Fettzellen kompatibel war.

Die in vitro Kultivierung der Zellkonstrukte über 1-5 Wochen ergaben eine gute Entwicklung der Präadipozyten zu lipidgeladenen Fettzellen.

5.3. Perspektiven des Weichgewebs-Tissue Engineering

Aktuelle experimentelle Studien im Bereich künstlich hergestellten Fettgewebes zeigen vielversprechende Ansätze, jedoch ist die Wissenschaft noch weit vom Ziel der Generierung einer optimalen Funktionalität im Gewebsverbund entfernt. Auch die Kultivierung entnommenen Gewebes außerhalb des Körpers ist bisher technisch nicht ausgereift. Um adäquate Fettgewebskonstrukte zu generieren müssen die Kulturmethode, die spezifischen Trägermaterialien und die verwendeten Nährmedien verbessert werden. Auch die Identifizierung optimaler Spender (bezüglich Alter, Spenderstelle, Präadipozytenanteil im Fettgewebe etc.) und weiterer Modifikation der Biomatrix unter anderem durch Einbringung angiogenetischer und adipogener Faktoren, sind für die Zukunft wichtige Ansätze. So könnte möglicherweise z.B. durch Kopplung angiogenetischer Wachstumsfaktoren an die Trägermatrix oder durch Substitution extrazellulärer Matrixproteine der erwünschte Volumeneffekt der transplantierten Präadipozyten verbessert und stabilisiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage weiterer Untersuchungen am lebenden Organismus. Mit den hier gewonnenen Informationen zur Schaffung optimaler Fettgewebskonstrukte untersucht die Arbeitsgruppe „Tissue Engineering“, Klinikum Rechts der Isar, aktuell die grundlegenden Fragen der Neovaskularisation und Fettzellaugmentation am Modell der thymusaplastischen Nacktmaus. Ziel ist es künstlich hergestellte kleinvolumige Konstrukte durch weitere Untersuchungen schon in naher Zukunft für den klinischen Bedarf verfügbar zu machen.

6. Zusammenfassung

Die Deckung von Weichteilgewebsdefekten stellt nach wie vor eine große Herausforderung in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie dar. Als sinnvolle Alternative zu chirurgischen Techniken, wie z.B. die regionale oder freie Lappenplastik, zählt eine volumenpersistente Transplantation autologer Präadipozyten. Die klassischen Komponenten des Tissue Engineering, wie Zellen, Trägermatrices und gewebsinduzierende Substanzen, spielen hierbei eine wichtige Schlüsselrolle. Schon in früheren Studien wurde durch Variation verschiedener Komponenten versucht, für die Transplantation geeignetes, künstlich hergestelltes Fettgewebe zu züchten. Die Ergebnisse bleiben bis heute verbesserungswürdig. Daher stand die Etablierung und Optimierung der Präadipozytenisolierung und- kultivierung, sowie die Beimpfung von Polyurethankonstrukten mit Präadipozyten und deren Kultivierung in vitro, im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Durch Variation der Denaturierungszeiten, Kulturmedien und durch Verwendung einer Erylyse zur Entfernung störender Blutbestandteile und eines MiniMACS™ Systems zur Gewinnung von Stammzellen wurde bei der Isolierung und Kultivierung versucht, eine möglichst hohe Präadipozytenzahl aus subkutanen Fettbiopsaten zu gewinnen. Dabei lieferte eine Kollagenasekonzentration von 2mg/ml bei 2-4 Stunden Denaturierungszeit und 37°C die besten Ergebnisse. Die Verwendung des Endothelial Growth Medium brachte das beste Ergebnis bezüglich der Proliferationsrate. Der im Medium enthaltene EGF (Epidermal Growth Factor) schien einen hohen mitogenen Effekt auf die Zellen auszuüben. Die Erylyse und das MiniMacs System zeigten hinsichtlich einer höheren Zellausbeute keinen Vorteil.

Als Zellträger dienten auf Polycaprolacton basierende Polyurethanschäume. Durch ihre 90%ige Porosität, die Verbindung der Poren untereinander und zur Oberfläche, waren die Konstrukte ideal zur Beimpfung mit einem Fibrin-Trombin-Zellgemisch. Positive Vitalitätsfärbungen zeigten, dass die Präadipozyten mit dem Polyurethanschaum kompatibel waren. Während der in vitro Kultivierung der Konstrukte entwickelten sich die Präadipozyten innerhalb von 1-5 Wochen zu reifen Adipozyten.

Die in dieser Arbeit erworbenen Ergebnisse bilden die Grundlage für die Züchtung vitaler, volumenpersistenter, dreidimensionaler tissue-engineerter

Konstrukte aus Fettgewebe und ebnen den Weg für erfolgreiche in vivo Versuche.

7. Literaturverzeichnis

- **Ailhaud, G.; Grimaldi, P.; Negrel, R.** Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr.* 12 (1):207-233,1992
- **Altiok, S.; Xu, M.; Spiegelman, B.M.** PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA binding activity via down regulation of PP2A. *Genes Dev.* 11:1987-1998,1997
- **Baksh, D.; Song, L.; Tuan, R.S.** Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapie. *J.Cell Mol.Med.*,8(3):301-316,2004
- **Beahm, E.K.; Walton, R.L.; Patrick, C.W. Jr.** Progress in adipose tissue construct development. *Clin. Plast. Surg.*,30(4):547-558,2003
- **Billings, E. Jr.; May, J.W. Jr.** Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructiv surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery* 83:368-381,1989
- **Brun, R.P.; Kim, J.B.; Hu, E.; Altiok, S.; Spiegelman, B.M.** Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade. *Curr.Opin.Cell Biol.* 8:826-832,1996
- **Chawla, A.; Lazar, M.A.** Peroxisome proliferator retinoid signalling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 91:1786-1790,1994
- **Cho, S.W.; Kim, S.S.; Won Rhie, J; Mi Cho,H; Yong Choi,C; Kim, B.S.** Engineering of volumestable adipose tissues. *Biomaterials*,26 (17):3577-3585,2005
- **Czerny, A.** Plastischer Ersatz der Brustdrüse durch ein Lipom. *Chir. Kongr. Verhandl. Dsch. Gesellsch. Chir.* 2: 216,1895

- **De Martinis, F.D.; Francendese, A.** Very small fat cell populationes:mammalian occurrence and affect of age. J. Lipid. Res. 23: 1107-19,1982
- **Entenmann,G.; Hauner, H.** Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. Am.J.Physiol. 270(Cell Physiol.39):C1011-C1016,1996
- **Eremia, S.; Newman, N.** Long- term follow-up after autologous fat grafting: Analysis of results from 116 patients followed at least 12 months after receiving the last of a minimum of two treatments. Dermatol. Surg. 26:1150-8,2000
- **Ersek, R.A.** Transplantation of purified autologous fat: A 3-year follow-up is disappointing. Plast. Reconstr. Surg. 87: 219-227,1991
- **Fagrell, D.; Enestrom, S.; Berggren, A.; Kniola, B.** Fat cylinder transplantation: an experimental comparative study of three different kinds of fat transplants. Plast. Reconstr. Surg. 98:90-96,1996
- **Fischbach, C.; Spruß, T.; Weiser, B.; Neubaur, M.; Becker, C.; Hacker, M.; Göpferich A.; Blunk T.** Generation of mature fat pads in vitro and in vivo utilizing 3-D long-term culture of 3T3-L1 preadipocytes. Exp. Cell. Res. 300(1):54-64,2004
- **Fischbach, C.; Seufert, J.; Steiger, H.; Hacker, M.; Neubauer, M.; Göpferich, A.; Blunk, T.** Threedimensional in vitro model of adipogenesis.comparison of culture conditions. Tissue Eng.,10(1-2):215-229,2004
- **Francendese, A.; DeMartinis, F.D.** Very small fat cells.II. Initial observations on basal and hormon- stimulated metabolism. J. Lipid Res.,26:149-57,1985

- **Green, H.; Kehinde, O.** Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J.Cell.Physiol.*101:169-171,1979
- **Gregoire, F.M.; Smas, C.M.; Sul, H.S.** Understanding adipocyte differentiation. *Physiol.Rev.*78:783-809,1998
- **Halbleib, M.; Skurk, T.; de Luca, C.; von Heimburg, D.; Hauner, H.** Tissue Engineering of white adipose tissue using Hyaluronic acid-based scaffolds.I: in vitro differentiation of human adipocyte precursor cells on scaffolds. *Biomaterials* 24:3125-3132,2003
- **Har-Shai, Y.; Lindenbaum, E.S.; Gamliel-Lazarovich, A.; Beach, D.; Hirshowitz, B.** An integrated approach for increasing the survival of autologous fat grafts in the treatment of contour defects. *Plast. Reconstr. Surg.* 104:945-954,1999
- **Hauner, H.; Skurk, T.; Wabitsch, M.** Cultures of Human Adipose Precursor cells. *Methods in Molecular Biology, Vol. 155: Adipose Tissue Protocols:* 239-247,2000
- **Hemmrich, K.; von Heimburg, D.** Biomaterials for adipose tissue engineering. *Expert. Rev. Med. Devices.* 3:635-645,2006
- **Huss, F.R.M.; Kratz, G.** Adipose tissue processed for lipoinjection shows increased cellular survival in vitro when tissue engineering principles are applied. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*36:166-171,2002
- **Ibrahimi, A.; Bonino, F.; Bardon, S.; Ailhaud, G.; Dani, C.** Essential role of collagens for terminal differentiation of preadipocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*,187(3):1314-1322,1992

- **Katz, A.J.; Llull, R.; Hedrick, M.H.; Futrell, J.W.** Emerging approaches to the tissue engineering of fat.Clin.Plast.Surg.26:587-603,1999
- **Kugler, P.; Drenckhahn, D.** Anatomie des Menschen. 15 Auflage ed. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Band 1, Urban & Schwarzenberg, München,1994
- **Lalikos, J.F.; Li Y.Q.; Roth, T.P.; Doyle, D.W.; Matory, W.E.; Lawrence, W.T.** Biochemical assessment of cellular damage after adipocyte harvest.J. Surg. Res.70(1):95-100,1997
- **Langer, R.; Vacanti, J.** Tissue Engineering. Science 260: 920-926, 1993
- **Mackall, J.C.; Student, A.K.; Polakis, S.E.; Lane, M.D.** Induction of lipogenesis during differentiation in a preadipocyte cell line.J. Biol. Chem. 251(20):6462-6464,1976
- **Meinhart, J.; Fussenegger, M.; Hobling, W.** Stabilization of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction. Ann.Plast. Surg., 42(6):673-678,1999
- **Moll, K.J.; Moll, M.** Anatomie. 18 Auflage, Elsevier Urban &Fischer, München,1978
- **Moore, J.H.J. et al.** Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy:Effects of local anesthesia with lidocain.Aesth.Plast.Surg. 19:335-339,1995
- **Müller, M.** Kokultivierung humaner Präadipozyten und Endothelzellen zur Züchtung von kapillarisiertem, autologem Fettgewebe. Dissertation Uni Freiburg, Med. Fakultät,2005

- **Neuber, G.A.** Fettransplantation. Dtsch. Gesellschaft Chir. 22:66,1893
- **Nguyen, A.; Pasyk, K.A.; Bouvier, T.N.; Hasset C.A.; Argenta, L.C.** Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. Plast. Reconstr. Surg. 85:378-386; discussion 387,1990
- **Pairault, J.; Green, H.** A Study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5138-5142,1979
- **Patrick, C.W.; Jr., Chauvin, P.B.; Robb, G.L.** Tissue engineered adipose tissue. In: Patrick, C.W., Jr., Mikos, A.G., and McIntire, L.V., eds. Frontiers in Tissue Engineering. Oxford: Elsevier Science: 369-382,1998
- **Roddi, R.; Riggio, E.; Gilbert, P.M.; Hovius, S.; Vaandrager, J.M.; van der Meulen, J.** Clinical evaluation of techniques used in the surgical treatment of progressive hemifacial atrophy. J. Cran.Max. Facial Surg.,Vol.22,Issue 1:23-32, 1994
- **Schiebler, T.H.; Schmidt, W.; Zilles, K.** Anatomie. 6 Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1977
- **Schoeller, T.; Lille, S; Wechselberger, G; Otto, A.; Mowlavi, A.; Piza-Katzer, H.** Histomorphologic and volumetric analysis of implanted autologous preadipocyte cultures suspended in fibrin glue: a potential new source of tissue augmentation. Aesthetic Plast. Surg. 25(1):57-63,2001
- **Seung-Woo, C.; San-Soo K.; Jong Won, R.; HyunMi C.; Cha Yong C.; Byung-Soo, K.** Engineering of volume-stable adipose tissues. Elsevier Science, Biomaterials 26:3577-3585,2004

- **Smith, U.** Morphologic studies of human subcutaneous adipose tissue in vitro. *Anat. Rec.*169(1):97-104,1971
- **Sugihara, H.; Yonemitsu, N.; Miyabara, S.; Toda, S.** Proliferation of unilocular fat cells in primary culture. *J.Lipid Res.* 28(9):1038-1045, 1987
- **Taylor, S.M.; Jones, P.A.** Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5- azacytidine. *Cell* 17:771-79,1979
- **Tholpady, S.S.; Aojanepong, C.; Llull, R.; Jeong, J.H.; Mason, A.C.; Futrell, J.W.; Ogle, R.C.; Katz, A.J.** The cellular plasticity of human adipocytes. *Ann. Plast. Surg.* 54(6):651-656,2005
- **Ulfig, N.** Kurzlehrbuch Histologie. 2 Auflage, Thieme, Stuttgart, 2003
- **Umek, R.M.; Friedman, A.D.; McKnight, S.L.** CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* 251:288-292,1991
- **Vanderstraeten-Gregoire, F.** La differentiation in vitro des precurseurs des cellules adipeuses de rat (PhD thesis). Louvain: Unversite Catholique de Louvain,1989
- **von Heimbürg, D.; Zachariah, S.; Heschel, I.; Kühling, H.; Schoff, H.; Hafemann, B.; Pallua, N.** Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated an vitro and in vivo. *Biomaterials* 22(5):429-38,2001
- **Weiser, B.; Neubauer, M.; Göpferich, A.; Blunk, T.** Tissue Engineering, Fat. In: *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering(online)*. Ed Gary E. Wnek, Gary L. Bowlin, (Marcel Dekker Inc., New York,2005

- **Weiser, B.; Prantl, L.; Schubert, T.; Zellner, J.; Fischbach-Teschl, C.; Spruss, T.; Seitz, A.; Tessmar, J; Göpferich, A.; Blunk, T.** In vivo development and long-term survival of engineered adipose tissue depend on in vitro precultivation strategy. *Tissue Engineering: Part A*, Vol. 14, Number 2:275-284,2008
- **West, D.C.; Kumar, S.** Hyaluronan and angiogenesis. *Ciba Found. Symp.* 143:187-201,1989
- **Zuk, P.A. et al.** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13:4279-4295,2002

8. Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Bettina Monika Rittler-Ungethüm
Geburtsdatum: 15.06.1977
Geburtsort: München
Adresse: Asamstraße 17, 81541 München
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schule/Ausbildung/Studium:

1988-1998 Pater-Rupert-Mayer-Gymnasium, Pullach
1998 Allgemeine Hochschulreife
1998-1999 Studium der Kunstgeschichte, Universität Augsburg
1999-2001 Berufsfachschule für pharmazeutisch-technische Assistenten, München
2002 Staatliche Prüfung für pharmazeutisch-technische Assistenten
2005-2010 Studium der Zahnheilkunde, Ludwig-Maximilians-Universität, München
SS 2006 Naturwissenschaftliche Zahnärztliche Vorprüfung (Note 2)
SS 2007 Zahnärztliche Vorprüfung (Note 2)
Zahnärztliche Prüfung bestanden am 30.06.2010 (Note 2)
30.07.2010 Erteilung der Approbation als Zahnärztin

Promotion:

2008-2011 Doktorandin in der HNO Forschung im Klinikum Rechts der Isar, Bereich Tissue Engineering
Dissertationsthema: Tissue Engineering - Kultivierung humaner Präadipozyten zur Beimpfung dreidimensionaler Polyurethankonstrukte

Berufstätigkeit

2002-2005 Pharmazeutisch-technische Assistentin, in der Melusinenapotheke und der Brahmsapotheke München
Seit Dezember 2010 Zahnärztin in der Kinderzahnarztpraxis Dres. Benz, Reeka-Bartschmid, Landshut

9. Danksagung

Für die Verwirklichung meiner Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen ein herzliches Dankeschön.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Rainer Staudenmaier bedanken, der mir stets mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand.

Ein großer Dank geht auch an meine Betreuerin Dr. Katharina Storck, deren Unterstützung für das Gelingen dieser Arbeit sorgte.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kollegen vor allem Lena Mayer und Dr. Sybille Regn aus dem Tissue Engineering Labor des Klinikums Rechts der Isar für die Zusammenarbeit bedanken, sie war ein wichtiger Meilenstein für diese Arbeit.

Meinem Mann Florian danke ich für das Erdulden überstrapazierter Nerven, die stets konstruktive Kritik und die Umsetzung der Doktorarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären.

Zuletzt möchte ich meiner Freundin Dr. Julia Dorn danken, die mir mit ihrem fundierten Wissen viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit gegeben hat.