

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

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

Differenzierung und Vaskularisierung humaner Präadipozyten im Polyurethangerüst in vivo

Peter Georg Leuthner

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. R. Staudenmaier
2. Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier

Die Dissertation wurde am 04.04.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.01.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	6
2. Ziel und Aufgabenstellung.....	8
3. Theoretische Grundlagen.....	9
3.1. Fettgewebe.....	9
3.2. Rekonstruktive Chirurgie	11
3.3. Tissue Engineering.....	12
3.4. Therapieansatz zur vaskulären Integration	14
4. Material und Methoden.....	15
4.1. Fettzellgewinnung	15
4.1.1. Präadipozytenisolation und -kultivierung.....	15
4.1.2. Passagierung.....	17
4.2. Polyurethanschaum.....	18
4.3. Besiedelung der Konstrukte	19
4.4. Mausmodell.....	20
4.5. Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung.....	23
4.5.1. Versuchsaufbau 1	23
4.5.2. Versuchsaufbau 2	23
4.5.3. Versuchsaufbau 3	24
4.5.4. Gruppeneinteilung.....	24
4.6. Explantation.....	25
4.7. Histologische Auswertung.....	26
4.7.1. Biokompatibilität und Vitalität	27
4.7.2. Histomorphometrische Auswertung der Neovaskularisierung und Differenzierung	27
5. Ergebnisse	29
5.1. Präadipozytenisolation	29
5.2. Beimpfung und Biokompatibilität des Scaffolds	30
5.3. Histologie der Konstrukte.....	32
5.3.1. Gruppe A (Woche 1).....	33
5.3.2. Gruppe B (Woche 3).....	35

5.3.3.	Gruppe C (Woche 5)	37
5.3.4.	Gruppe D (Woche 7)	39
5.3.5.	Gruppe E (Woche 9)	41
5.4.	Neovaskularisierung	43
5.5.	Prädipozytendifferenzierung	45
6.	Diskussion.....	48
6.1.	Isolation und Kultivierung von humanen Vorläuferzellen.....	48
6.2.	Einbringen der Zellen in eine dreidimensionale Trägermatrix.....	49
6.3.	Vaskuläre Integration des Konstrukts durch Gefäßeinlage	51
6.4.	Histomorphometrische Evaluation.....	52
7.	Zusammenfassung	54
8.	Literaturverzeichnis.....	55
9.	Anhang	59
9.1.	Übersicht der Operationen.....	59
9.2.	Material	60
9.3.	Übersicht der Zellkulturmedien.....	61
9.4.	Histologische Färbungen	62
10.	Veröffentlichungen und Vorträge.....	62
11.	Danksagung.....	63

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1.a Einzelne Präadipozyten in Zellkulturflasche	10
Abb. 3.1.b Univakuoläres Fettgewebe (Mensch)	10
Abb. 3.3.a Grundschemata des Tissue-Engineering	12
Abb. 3.4.a Schema AV-Shunt	14
Abb. 3.4.b Schema Gefäß-Ligatur	14
Abb. 3.4.c Schema Durchfluß-Model	14
Abb. 4.1.a Zerkleinerung des Fettgewebes	16
Abb. 4.1.b Enzymatischer Abbau	16
Abb. 4.1.c Zentrifugation und Zellpellet	16
Abb. 4.1.d Zellkulturflasche	16
Abb. 4.2.a Porengröße etwa 0,2mm	18
Abb. 4.2.b Interkonnektivität im Anschnitt	18
Abb. 4.2.c Nahaufnahme Polyurethanschaum	18
Abb. 4.2.d Rasterelektronenaufnahme	18
Abb. 4.2.e Polyurethanzylinder	19
Abb. 4.2.f Beimpfen des Scaffolds	19
Abb. 4.4.a Darstellung des Gefäßbündels	21
Abb. 4.4.b Einbringen des Konstrukts	21
Abb. 4.4.c Geschlossener Silikonstreifen	22
Abb. 4.4.d Hautnaht	22
Abb. 4.4.e Kontrolle vor Wundverschluss	22
Abb. 4.4.f Schema zur Position der Konstrukte	22
Abb. 4.6.a Explantation	25
Abb. 4.6.b Explantiertes Konstrukt und Kontrolle	25
Abb. 5.1.a Präadipozyten einen Tag nach Aussaat in Zellkulturflasche	29
Abb. 5.1.b Präadipozyten nach einer Woche Differenzierung	29
Abb. 5.2.a HE-Schnitt einer Kontrolle nach einer Woche Beobachtungszeit	30
Abb. 5.2.b Vitalitätsfärbung eines Konstrukts nach einer Woche Beobachtungszeit	31
Abb. 5.2.c Auswertung vitaler Zellen	31
Abb. 5.2.d Auswertung avitaler Zellen	31
Abb. 5.4.a Neovaskularisierung	43
Abb. 5.4.b Neovaskularisierung Konstrukt 1 Woche	44
Abb. 5.4.c Neovaskularisierung Konstrukt 3 Wochen	44
Abb. 5.4.d Neovaskularisierung Konstrukt 5 Wochen	44
Abb. 5.4.e Neovaskularisierung Konstrukt 7 Wochen	44
Abb. 5.4.f Neovaskularisierung Konstrukt 9 Wochen	44
Abb. 5.5.a Auswertung Präadipozytendifferenzierung	45
Abb. 5.5.b Periarteriellles Fett bei Konstrukt 3 Wochen	46
Abb. 5.5.c Periarteriellles Fett bei Konstrukt 3 Wochen	46
Abb. 5.5.d Periarteriellles Fett bei Konstrukt 5 Wochen	46
Abb. 5.5.e Periarteriellles Fett bei Konstrukt 5 Wochen	46
Abb. 5.5.f Periarteriellles Fett bei Konstrukt 7 Wochen	46
Abb. 5.5.g Periarteriellles Fett bei Konstrukt 7 Wochen	46
Abb. 5.5.h Periarteriellles Fett bei Konstrukt 7 Wochen	46
Abb. 5.5.i Periarteriellles Fett bei Konstrukt 9 Wochen	46
Abb. 5.5.j Periarteriellles Fett bei Konstrukt 9 Wochen	46
Abb. 5.5.k Auswertung der Adipozyten eines Konstrukts nach 9 Wochen	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.5.a Versuchsaufbau 1	23
Tabelle 4.5.b Versuchsaufbau 2	23
Tabelle 4.5.c Versuchsaufbau 3	24
Tabelle 4.5.d Gruppen	24
Tabelle 5.2.a Ergebnis der Vitalitätsfärbung	31
Tabelle 5.3.a Gesamtzahl der Konstrukte.....	32
Tabelle 9.1.a Übersicht der Operationen.....	59
Tabelle 9.4.a Histologische Färbungen	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFN	Atipamezol, Flumazenil, Naloxon
APC	Adipose precursor cells
bFGF	basic fibroblast growth factor
et al.	et alii
EZM	Extrazelluläre Matrix
FDA	Fluoresceindiaceetat
Lsg.	Lösung
mm	Millimeter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MMF	Midazolam, Medetomidin und Fentanyl
PBS	Phosphatpuffer
PDGF-BB	platelet derived growth factor (homodimer)
PI	Propidiumjodid
PLGA	Poly(L-lactic-co-glycolic acid)
Tab.	Tabelle
z.B.	zum Beispiel
z.Z.	zur Zeit

1. Einleitung

Die Behandlung komplexer, angeborener oder erworbener Defekte der körperlichen Integrität gehört seit jeher zu den größten Herausforderungen der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie. Große Gewebedefekte, die nach Tumorresektion oder Traumata wie z.B. durch Verbrennungen entstehen, können bisher nur durch aufwendige Lappenplastiken oder durch Einbringung von Fremdmaterial zufriedenstellend gedeckt werden. Jedoch bringt jede der Methoden bestimmte Nachteile mit sich. So stehen lokale Lappen nur in begrenztem Umfang zur Verfügung, freie Lappenplastiken sind zudem operativ sehr aufwendig und mit dem Risiko eines Transplantatverlustes durch Perfusionsdefizite behaftet. Außerdem geht der Gebrauch von Fremdmaterial oft mit einer Fremdkörperreaktion des umliegenden Gewebes einher, was zu einer ästhetisch ungünstigen und zum Teil schmerzhaften Kapselbildung führt (Cordeiro, 2008).

Dabei gab es schon früh Bemühungen, autologes Gewebe zur Deckung zu verwenden. Etwa wurde bereits im Jahr 1893 durch Neuber freies Fettgewebe zur Deckung kleinerer Defekte benutzt (Neuber, 1893). Die Probleme, die sich bereits damals abzeichneten, konnten bis heute nicht zufriedenstellend gelöst werden: Das Schrumpfen des Transplantats bis hin zur völligen Involution (Eremia, 2000), Resorption und Fibrosierung, ein ungünstiger Hebedefekt, sowie die Begrenztheit des Spendergewebes sind Einschränkungen, die neuer Lösungen bedürfen (Fagrell, 1996).

Seit Mitte der 80er Jahre entwickelte sich das Forschungsfeld des *Tissue Engineerings*. Dieses macht sich zum Ziel, vitales Gewebe durch Amplifikation bestimmter Zellreihen unter Einsatz bio-, ingenieur- und naturwissenschaftlicher Techniken zu züchten (Langer, 1993). Dieses bio-artifizielle Gewebe soll im Idealfall die Aufgaben des Empfängermechanismus übernehmen und sich weitestgehend in den Organismus integrieren (Müller, 2005). Nach erst vielversprechenden in vitro Versuchen, blieb der Erfolg in vivo jedoch aus. Implantierte Zellen gingen kurze Zeit nach der Einbringung zugrunde. Die Ursache lag dabei vermutlich zum größten Teil an der mangelnden Vaskularisierung und Sauerstoffversorgung des transplantierten Konstrukts. Da ein Abstand der Zellen von über 200 µm zur Oberfläche, die durch den Wirtsorganismus per Diffusion versorgt wird, zur Unterversorgung eben jener führt (Patrick, 1999) (Miller, 2003), mussten Techniken entwickelt werden, die Oberfläche des zu implantierenden Konstrukts zu vergrößern, welche am Nährstoffaustausch teilnimmt. Dabei sollte auch eine dreidimensionale Formbarkeit des Konstrukts gewährleistet sein.

Dieses scheint durch die Etablierung sogenannter Scaffolds möglich. Dabei handelt es sich um aus verschiedenen Materialien gefertigte Kunststoffe, die als Gerüst für dreidimensionale Zell-Matrizes

dienen. Die Optimierung der Materialwahl und Porösität dieser Schäume waren unter anderem Gegenstand früherer Arbeiten dieser Forschungsgruppe (Staudenmaier, 2004; Hoang, 2009). Es zeigte sich bei der Forschung an Chondrozyten, dass der verwendete Stoff Polyurethan als Trägermatrix geeignet ist und beste Bedingungen für Tissue Engineering bietet (Feucht, 2011).

Nachdem die *in vitro* Kultivierung, Amplifikation und Beimpfung von Polyurethanschäumen mittels Präadipozyten in unserer Forschungsgruppe bereits etabliert werden konnten, soll es nun Ziel dieser Arbeit sein, erste *in vivo* Versuche am Mausmodell durchzuführen. Hierfür wurden humane, *in vitro* amplifizierte Präadipozyten in Polyurethanscaffolds eingebracht und diese danach operativ um die Leistenarterien einer athymischer Nacktmäuse gelegt. Nach definierten Zeitspannen wurden diese Implantate entfernt und histologisch ausgewertet. Hierbei wurde besonders Augenmerk auf die Neovaskularisation, Differenzierung in adulte Adipozyten und die Schaffung eines Gewebeverbundes gelegt.

2. Ziel und Aufgabenstellung

Die grundlegende Absicht des *Tissue Engineerings* mit Adipozyten ist es, durch biotechnologische Methoden humanes Gewebe herzustellen, welches zur plastisch-rekonstruktiven Therapie angeborener oder erworbener Fehlbildungen verwendet werden kann. Voraussetzungen hierfür sind die Herstellung dreidimensionaler Konstrukte aus biokompatiblen Material, dessen Besiedelung mit entsprechenden Zellen für die Rekonstruktion und die Generierung eines Gewebeverbandes, der durch einen dominanten Gefäßstiel versorgt wird. Diese axiale Durchblutung ist essentiell für den freien Gewebetransfer.

Ziele der vorliegenden Arbeit „Differenzierung und Vaskularisierung humaner Präadipozyten im Polyurethangerüst *in vivo*“ waren:

- Der Nachweis des Überlebens und der Differenzierung der in das Polyurethanscaffold eingebrachten Präadipozyten zu reifen Fettzellen *in vivo*.
- Die Etablierung eines Versuchsdesigns zur Neovaskularisierung und Präfabrikation eines Konstrukts im immuninkompetenten Mausmodell anhand eines implantierten Gefäßbündels.

Hierfür wurden nach unserem Wissen zum ersten Mal *humane* Präadipozyten verwendet. Dieses ist aus immunologischer Sicht für die zukünftige Anwendbarkeit bei Patienten von Bedeutung, nachdem Zellen anderer Individuen einer Spezies oder artfremder Spender durch das Immunsystem bekämpft werden. Im Versuchsaufbau wurde dieses durch die Wahl einer immuninkompetenten Maus berücksichtigt.

3. Theoretische Grundlagen

3.1. *Fettgewebe*

Fettgewebe ist eine Untergruppe des Bindegewebes, welches überwiegend aus Fettzellen (Adipozyten), Fibrozyten und versorgenden Blutgefäßen besteht (Junqueira, 2005). Die Adipozyten entwickeln sich wie Fibroblasten und weitere Zellreihen aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Die sogenannten Präadipozyten (Abbildung 3.1a) stellen dabei eine Zwischenform dar, welche für die vorliegende Arbeit isoliert und kultiviert werden sollten. Aus diesen Vorläuferzellen können auch im Erwachsenenorganismus permanent Fettzellen entstehen (Benninghoff, 2003). Präadipozyten können sich zu braunen, multivakuolären Fettzellen entwickeln, die für den Wärmehaushalt vor allem bei Säuglingen von Bedeutung sind, oder zu weißen, univakuolären Fettzellen, die den Hauptteil des Fettgewebes Erwachsener bilden. Dieses erfüllt für den menschlichen Organismus mehrere Aufgaben.

So dient es als Bindegewebe zum Schutz und zur Einbettung von Organen und Gefäß-Nervenbündeln. Das sogenannte Baufett wirkt z.B. in Hand- und Fußsohlen als Polster gegen mechanische Belastungen von vulnerablen Strukturen. Auch das periorbitale Fett sowie der Wangenfettpropp bestehen aus dieser Form des Fettgewebes.

Ihm gegenüber steht das Speicherfett als Energiequelle bei langandauernder Nahrungskarenz. Dieses befindet sich subkutan oder als Fettanhängsel um das Kolon herum. Speicherfett ist auch an der Formgebung des Körpers beteiligt. Die Verteilung ist alters- und geschlechtsabhängig. Während sich bei Neugeborenen das subkutane Fett auf das ganze Integument verteilt, nimmt das Gewebe im Laufe der Entwicklung an bestimmten Stellen ab und tritt an anderen vermehrt auf. Dieses wird neben genetischen Einflüssen auch durch hormonelle Einwirkung von Testosteron und Östrogenen bestimmt und trägt maßgeblich zur weiblichen oder männlichen Körperform bei. Zusätzlich wirkt es als endokrines Organ. Das von Fettgewebe produzierte Leptin ist an der Regulation des Essverhaltens beteiligt und sorgt für das Sättigungsgefühl (Junqueira, 2005).

Fettgewebe ist reichlich durchblutet (Abbildung 3.1b). Tatsächlich jede Zelle Kontakt mit mindestens einer Kapillare (Zilles, 2010). Es wirkt durch seine schlechte Wärmeleitfähigkeit als Kälteschutz und ist nicht zuletzt ein wichtiger Bestandteil des Metabolismus. Triacylglycerine, die den Fetttropfen innerhalb der Zelle bilden, stellen die energiereichste Speicherform des Körpers dar. Sie haben einen mehr als doppelt so hohen Brennwert wie Kohlenhydrate, Triacylglycerin hat einen Energiegehalt von 39kJ/g, Kohlenhydrate hingegen 17kJ/g. Sie werden nach der

Nahrungsaufnahme durch den Abbau der Chylomikronen gewonnen (Schmidt, 2007). Im Falle langer Nahrungskarenz wird zuerst retroperitoneales und subkutanes Fettgewebe mobilisiert, erst später folgt Baufett wie das Wangenfett und der Periorbitale Fettkörper. Diese Reserven können den Menschen bei durchschnittlichem Stoffwechsel etwa einen Monat lang mit Energie versorgen.

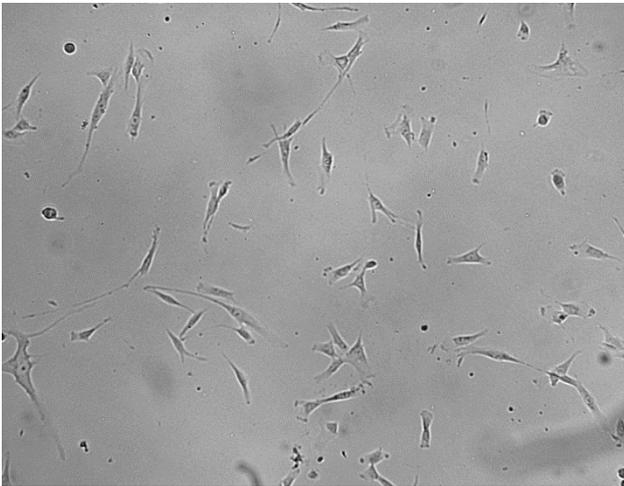


Abb. 3.1.a Einzelne Präadipozyten in Zellkulturflasche
Typisch ist das spindelförmige Aussehen (10x Vergrößerung)

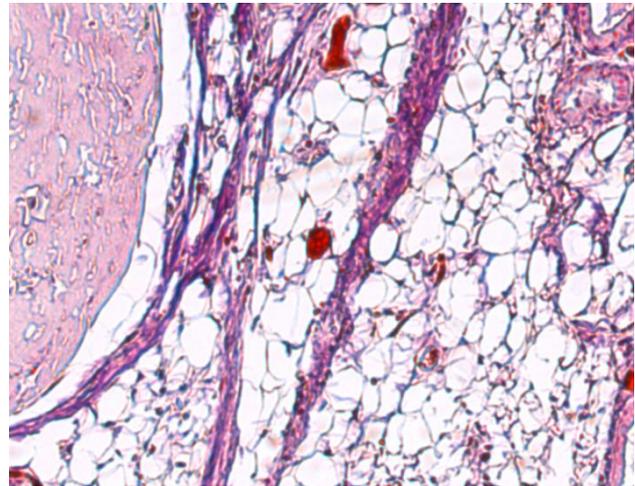


Abb. 3.1.b Univakuoläres Fettgewebe (Mensch)
Charakteristische Siegelringform. Es zeigt sich zusätzlich die ausgeprägte Vaskularisierung (20x Vergrößerung)

3.2. Rekonstruktive Chirurgie

Die Rekonstruktive Chirurgie stellt neben der Ästhetischen-, der Brandverletzten- und der Handchirurgie eine der vier Säulen der Plastischen Chirurgie dar. Sie befasst sich mit der Wiederherstellung von Form und Funktion am ganzen menschlichen Körper (Biemer 2007). Angeborene Fehlbildungen, wie beispielsweise kraniofaziale Dysostosen, oder erworbene Gewebedefekte, wie sie nach Tumoroperationen oder Traumata vorkommen, bringen zum Teil schwerwiegende funktionelle sowie ästhetische Beeinträchtigungen mit sich. Der operativen Sanierung dieser Verhältnisse widmet sich die Rekonstruktive Chirurgie.

Dafür stehen heute verschiedene chirurgische Techniken zur Verfügung. Die primäre Naht ist die einfachste Methode eines Wundverschlusses. Allerdings darf die Wunde nicht länger als 24 Stunden bestehen und der Defekt muss klein genug sein, um die Wundränder spannungsfrei zu adaptieren, da es sonst zu Wundheilungsstörungen kommen kann.

Eine weitere Option bietet die lokale Verschiebeplastik wie die Rotationsplastik oder auch die sogenannte Z-Plastik (Aguilar, 2005). Dabei können unter Berücksichtigung der Hautspannungslinien Hautinseln aus unmittelbarer Nähe in das Defektgebiet geschwenkt werden.

Außerdem können mit größerem chirurgischem Aufwand sogenannte Fernlappen, wie zum Beispiel der *Cross-leg-flap* zur Defektdeckung benutzt werden. Dabei ist die Distanz zum primären Defekt deutlich größer und bedarf oft eines an einem Gefäßbündel gestielten Lappens wie z.B. bei einem *Latissimus-dorsi-Lappen*.

Schließlich bietet sich jedem Plastischen Chirurgen auch noch das Verfahren des freien Lappens. Dabei wird zunächst ein ganzer Gewebeverband von Haut, Bindegewebe und Muskulatur aus der Entnahmestelle präpariert. Hierfür ist abermals ein zentral versorgtes Gewebeareal nötig, welches als freier Lappen in Form eines musculo-kutanen oder sogar osteo-kutanen Transplantats zur Defektdeckung verwendet werden kann. Dabei muss der gehobene Gefäßstiel mikrochirurgisch mit Gefäßen des Empfängerareals anastomosiert werden, weshalb der freie Lappen als die wohl chirurgisch anspruchsvollste Alternative zu werten ist. Als Beispiele können der DIEP-Flap (*Deep inferior epigastric perforator flap*) zur Brust-Rekonstruktion oder der Radialis-Flap zur Rekonstruktion bei Mundboden-Karzinom herangeführt werden.

Der Vorteil der hier beschriebenen Methoden ist die durch langjährige klinische Praxis erworbene Erfahrung der Operateure und die dadurch meist sehr guten funktionell-ästhetischen Ergebnisse.

Nachteile hingegen lassen sich bezüglich des ungünstigen Hebedefekts, der Begrenztheit von Entnahmestellen und der zum Teil mehrere Stunden dauernden Operationen konstatieren. Dabei kann es im Fall des freien Lappens auf Grund von Thrombosen oder postoperativer Schwellung zur Minderperfusion des Lappens bis hin zum Transplantatverlust kommen.

3.3. Tissue Engineering

„Tissue Engineering ist die Anwendung von Prinzipien und Methoden der Ingenieur-, Werkstoff- und Lebenswissenschaften zur Gewinnung eines fundamentalen Verständnisses von Struktur-Funktions-Beziehungen in normalen und pathologischen Säuger-Geweben; und die Entwicklung von biologischem Ersatz zur Erneuerung, Bewahrung oder Verbesserung der Gewebefunktion“ (Skalak, 1988). Hierbei werden aus Biopsien organischen Gewebes Vorläuferzellen isoliert, diese in Zellkulturflaschen amplifiziert (Abb. 3.3.a) und auf geeignete Trägermaterialien, sogenannte Scaffolds, übertragen, was gemeinhin als „beimpfen“ bezeichnet wird. Sollen diese Vorläuferzellen nun spezifische Funktionen des Zielgewebes übernehmen, müssen diese oftmals erst durch spezielle Kulturbedingungen zur Ausdifferenzierung hin zu adultem Gewebe angeregt werden. Ziel dabei ist die Herstellung möglichst funktioneller Gewebekomplexe, welche letztendlich biologische Aufgaben übernehmen sollen.

Die Vorteile dieser Technik sind vor allem in der unkomplizierten Gewinnung des Ausgangsmaterials auszumachen, z.B. die Liposuction oder auch die Blutentnahme, der Amplifikationsfähigkeit der Vorläuferzellen und dem fehlendem Hebedefekt. Durch Scaffolds können die durch Tissue Engineering gewonnenen Zellen in eine dreidimensionale Form gebracht und zur Rekonstruktion von Gewebedefekten genutzt werden (Hoang, 2009).

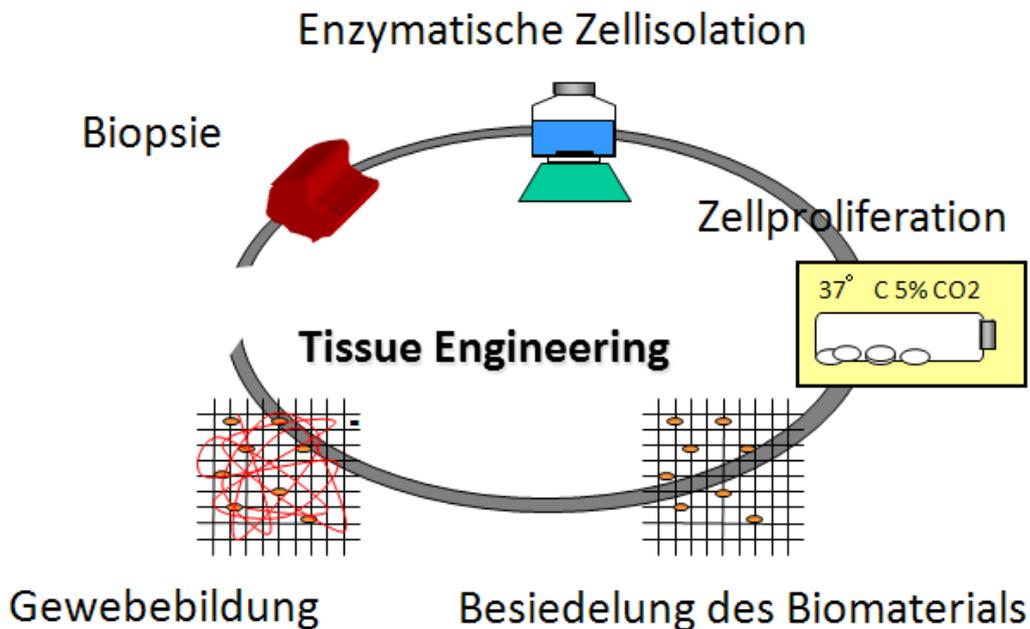


Abb. 3.3.a Grundschemata des Tissue-Engineering

(Quelle: Storck, Staudenmaier, 2010)

Die Langzeit-Ergebnisse und die klinische Anwendung des Tissue Engineerings liegen jedoch hinter den Erwartungen zurück (Patrick, 2002). Die Probleme dieser Technik liegen in der hohen Komplexität des zu entwickelnden Gewebes. Wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt sind z.B. Adipozyten im Fettgewebe in Kontakt mit mindestens einer Kapillare. Diese feinste Perfusion ist die Grundlage für die Funktion und den Erhalt der Zelle. Diese Architektur der Durchblutung lässt sich jedoch nicht biotechnologisch nachbauen. Eine mangelnde Vaskularisation der Scaffolds führt zur Minderversorgung und somit Absterben der besiedelten Zellen. Die Induktion von Neoangiogenese stellt somit einen zentralen Punkt der Erzeugung dauerhaft stablier Gewebeverbände dar.

Des Weiteren brauchen spezialisierte Zellen hochspezifische Umgebungsvariablen. Zytokine des benachbarten Gewebes und des gesamten Organismus beeinflussen sowohl Metabolismus als auch Funktion der implantierten Zellen. Die komplexen Zusammenhänge sind seitens der Zellforschung bisher nur teilweise verstanden. Daher gestaltet es sich als äußerst kompliziert, die Vorläuferzellen zur Differenzierung in die gewünschte Zelllinie anzuregen ohne, dass es zur Dedifferenzierung oder zum Absterben der Zellen kommt.

3.4. Therapieansatz zur vaskulären Integration

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, ist eine Voraussetzung zur Generierung autologen, tissue-engineerten Gewebes die vaskuläre Perfusion. Zur klinisch-praktischen Handhabbarkeit sollte diese axial erfolgen. Das bedeutet, dass die Durchblutung anhand eines definierten Gefäßstranges und nicht diffus aus der Umgebung erfolgt. Ein freies Transplantat bedarf also einer zentralen Blutversorgung durch einen Gefäßstiel.

Die neue Technik der sogenannten „präfabrizierten Lappen“ bietet hierbei eine Möglichkeit, einen Gefäßanschluss in ein Konstrukt zu integrieren. Der Begriff Präfabrikation wurde 1982 erstmalig von Shen beschrieben und wird seitdem mit jeglicher Vorbehandlungen eines Transplantats verbunden. Im weiteren Text wird er auf das Einbringen des tissue-engineerten Konstrukts um ein Gefäßbündel angewendet. Ziel dabei ist die Einsprossung neuer Gefäße aus der zentral versorgenden Arterie in die Peripherie des Scaffolds. Dieser Arterienstamm kann später dazu verwendet werden, das präfabrizierte Konstrukt frei zu transplantieren (Shen, 1982).

Es gibt dabei unterschiedliche Konfigurationen der eingeschlossenen Gefäße. Beim Arterio-venösen Shunt werden eine Arterie und eine Vene miteinander anastomosiert. Bei großer Distanz kann dies auch anhand eines venösen oder arteriellen Interponats als Verlängerung geschehen (siehe Abb. 3.4.a). Für den ligierten Gefäßstumpf müssen die Arterie und die Vene distal unterbunden werden (siehe Abb. 3.4.b). Beim Durchfluß-Model -wie in dieser Arbeit- bleiben die Gefäße in ihrer Kontinuität erhalten (siehe Abb. 3.4.c).

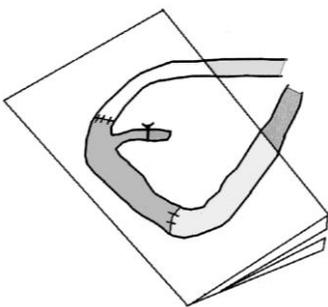


Abb. 3.4.a Schema AV-Shunt

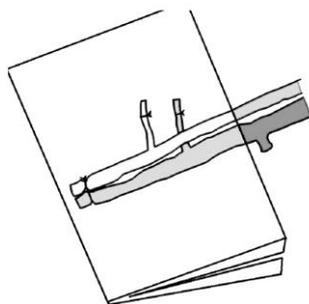


Abb. 3.4.b Schema Gefäß-Ligatur

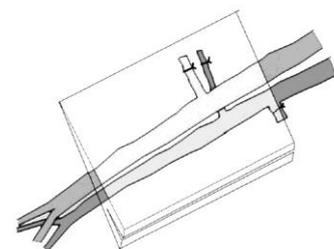


Abb. 3.4.c Schema Durchfluß-Model
(Quelle: Tanaka, 2003)

Im Jahr 2009 erreichte Hoang die Präfabrikation eines mit Chondrozyten beimpften Polyurethanscaffolds in Form eines menschlichen Ohres subkutan im Kaninchenmodell. Er konnte zeigen, dass das Konstrukt ausreichend durch die Gefäßschlinge versorgt wird und anhand dieser transplantierbar ist (Hoang, 2009).

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Anwendbarkeit des Polyurethanschaums auf Fettzellen zu übertragen und die Voraussetzung zur Präfabrikation eines Konstrukts zu überprüfen.

4. Material und Methoden

4.1. Fettzellgewinnung

4.1.1. Präadipozytenisolation und -kultivierung

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: Hepes (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)

Tris (Tris-hydroxymethylaminomethan, FA Merck, 1.08382.0100, 100 g)

NH₄Cl (Suprapur® Ammoniumchlorid, FA Merck, 1.001143.0050, 50 g)

Aussaatmedium

Methoden:

Die Präadipozyten wurden aus OP-Resektaten menschlichen Fettgewebes gewonnen. Diese stammten aus elektiven Eingriffen an der Klinik und Poliklinik für plastische Chirurgie oder Gynäkologie des Klinikums rechts der Isar. Dabei handelte es sich um eine Abdominoplastik eines 57-jährigen Mannes, die Brust-Resektion bei einem Patienten mit Gynäkomastie und die Brustreduktion einer 50-jährigen Frau. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Operation gesund und nahmen keine dauerhaften Medikamente ein.

Die Präparate wurden sofort nach Entnahme in ein steriles Gefäß mit DMEM/Ham's F12 Medium gegeben und zur Verarbeitung ins Labor gebracht, wobei nach einem modifizierten Präparationsprotokoll nach Hauner (Hauner, 2001) vorgegangen wurde. Im Labor wurden die Präparate auf einer sterilen Petrischale zunächst per Skalpell von sichtbaren Gefäß- und Bindegewebsstrukturen befreit und mit der Schere zerkleinert bis sich eine breiige Konsistenz ergab (Abb. 4.1.a). Anschließend wurde das Gewebe auf einer Präzisionswaage abgewogen um die benötigte Menge an Verdaulösung zu ermitteln. Pro Gramm Fettgewebe wurden hierfür 1 ml Kollagenpuffer mit je 7,5 g / 500 ml Bovines Serum Albumin und 0,5 g / 500 ml Collagenase NB4 hinzugefügt. Das Gemisch aus zerkleinertem Fett und Verdaulösung wurde nun in einem Kolben im Wärmebad eine Stunde bei 37°C inkubiert und alle 15 Minuten gerührt (Abb. 4.1.b). Nach der Inkubationszeit wurde die abgesunkene Phase, in welcher sich die Präadipozyten befanden, mit

einer sterilen Pipette abgesaugt und über ein Zellsieb (Falcon Cell Strainer mit 70µm Porengröße) in 50 ml Falcons filtriert. Nach der Zentrifugation (10min; 2000 U/min) wurde der Überstand verworfen (Abb. 4.1.c) und das Pellet mit jeweils 1 ml Aussaatmedium pro zu befüllender Zellkulturflasche (etwa 6 - 7 Stück) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in die P75 Zellkulturflaschen mit 20 ml Aussaatmedium aufgeteilt. Eine Berechnung der Zellzahl pro Flasche war zu diesem Zeitpunkt wegen der Verfälschung durch zusätzliche Erythrozyten nicht möglich. Die befüllten Kulturflaschen (Abb. 4.1.d) kamen zur weiteren Inkubation in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Nach zwei Tagen wurde das Aussaatmedium der Flaschen abgegossen und der Boden zweimal mit PBS gewaschen um die verbliebenen Erythrozyten aus der Flasche zu entfernen. Mit neuem Aussaatmedium befüllt, wurden diese wieder im Brutschrank inkubiert.



Abb. 4.1.a Zerkleinerung des Fettgewebes



Abb. 4.1.b Enzymatischer Abbau



Abb. 4.1.c Zentrifugation und Zellpellet



Abb. 4.1.d Zellkulturflasche

4.1.2. Passagierung

Materialien:

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

Trypsin/EDTA Lsg.(0,05%/0,02% in PBS mit Mg²⁺, FA Biochrom AG, L2143, 100 ml)

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

Aussaatmedium

Zählkammer (Glastic®, FA Hycor, 87144)

Methoden:

Die Zellkultur wurde zweimal pro Woche mit neuem Aussaatmedium versorgt und täglich auf Kontamination überprüft. Dabei wurde vor allem auf Schlierenbildung und Trübung des Mediums als Zeichen einer Besiedelung durch Pilze geachtet. In regelmäßigen Abständen wurde die Dichte der Aussaat unter dem Lichtfeldmikroskop bewertet.

Bei einer etwa 70%igen Konfluenz der Präadipozyten wurde eine Passagierung durchgeführt. Hierfür musste zunächst das gesamte Kulturmedium aus den Flaschen abgekippt werden. Nach abschließender Auswaschung mit PBS wurde die restliche Flüssigkeit abgesaugt. Nun folgte die Trypsinierung mittels 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung. Nach 5-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde die Enzymreaktion durch 6ml DMEM gestoppt. Durch seitliches Klopfen an die Kante der Flaschen wurde das vollständige Ablösen der Zellen vom Flaschenboden unterstützt, was unter dem Mikroskop überprüft wurde. Nach Abfüllen des Flascheninhaltes in Falconröhrchen wurden die Präadipozyten durch Zentrifugation (10 Minuten bei 2000 Umdrehungen/min) vom Überstand getrennt. Das Pellet wurde mit 1ml DMEM resuspendiert. 20 µl daraus wurden mit 20 µl Trypanblau gemischt und in einer Zählkammer ausgezählt. Nach Errechnung der Zellzahl in der Ursprungslösung wurde diese so aufgeteilt, dass sich in jeder neuen Zellkulturflasche etwa 1 Million Vorläuferzellen befanden. Aufgefüllt mit 20 ml Zellkulturmedium wurden jene wieder in den Brutschrank gebracht.

Das Wachstum der Präadipozyten wurde jeden Tag unter dem Mikroskop kontrolliert. Sobald der Zellrasen wieder dicht genug war, wurde eine erneute Trypsinierung durchgeführt. Die Zellreihen wurden gemäß der Anzahl ihrer Passagierungen beschriftet. Der Ausgangszustand wurde mit „p0“ bezeichnet, nach der ersten Passage „p1“, dann „p2“ usw. Der Status der Zelllinien zum Zeitpunkt der Beimpfung der Polyurethanscaffolds ist der Tabelle 9.1.a zu entnehmen.

4.2. Polyurethanschaum

Material:

Polyurethanschaum (Fa. Polymaterials, Kaufbeuren, Deutschland)

Flüssiger Stickstoff (hauseigene Apotheke)

Biopsy Punch 5mm-Stanzen (Fa. Stiefel, Offenbach, Deutschland)

Ethanol 70% (hauseigene Apotheke)

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

Um komplexe, dreidimensionale Zellverbände zu erzeugen, ist es unerlässlich, so genannte Scaffolds, also Zellträgermatrizes, zu entwickeln. So ist es hierbei wichtig, dass sowohl die Porengröße und –interkonnektivität (Abb 4.2a-d) ein Befüllen des gesamten Konstrukts zulassen, ohne jedoch zu großporig zu sein, was das Auslaufen der Zellen sowie mechanische Instabilität zu Folge hätte. Zusätzlich sollte das verwendete Material biokompatibel und biologisch abbaubar sein und eine Durchwanderung von Kapillaren und Blutgefäßen zulassen. Diese Voraussetzungen sind in vorhergehenden Arbeiten unseres Forschungsteams schon überprüft und verifiziert worden.

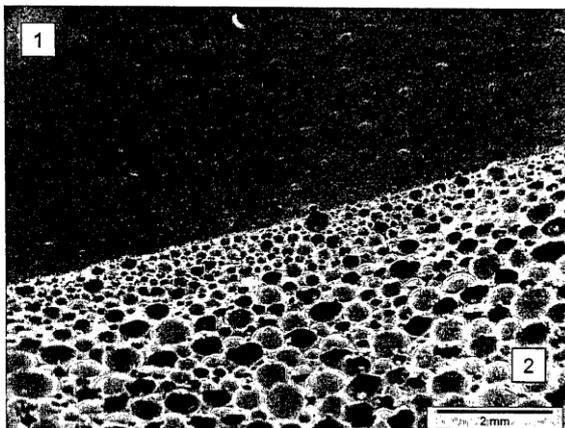


Abb. 4.2.a Porengröße etwa 0,2mm

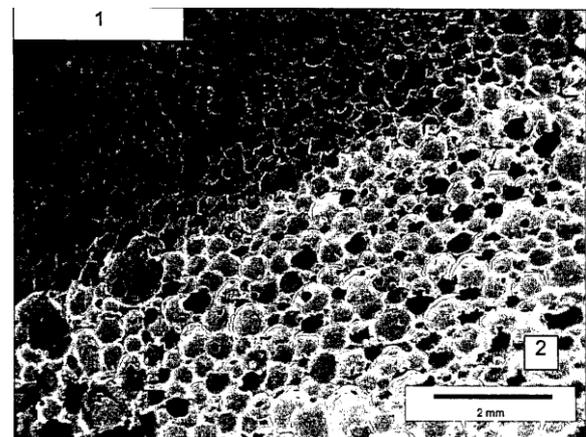


Abb. 4.2.b Interkonnektivität im Anschnitt

Quelle: Polymaterials

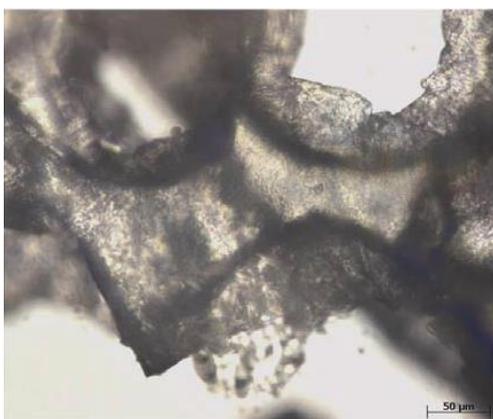


Abb. 4.2.c Nahaufnahme Polyurethanschaum (Mauth 2009)

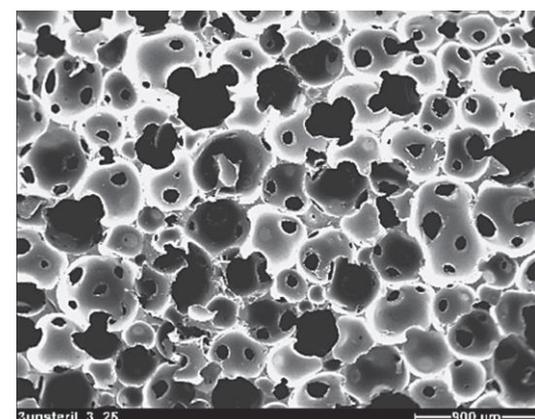


Abb. 4.2.d Rasterelektronenaufnahme

Methoden:

Die von der Firma Polymaterials bereitgestellten Schäume wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und mit einem Skalpell in etwa 2mm dicke Scheiben geschnitten. Daraufhin wurden mit einer Biopsiestanze Zylinder mit 5mm Durchmesser ausgestanzt. Zum Sterilisieren wurden diese 5 Minuten lang in 70%-iges Ethanol gelegt, dann mit PBS gewaschen und in einem Fläschchen mit PBS zum Autoklavieren in die hausinterne Apotheke des Klinikums rechts der Isar gebracht



Abb. 4.2.e Polyurethanzylinder



Abb. 4.2.f Beimpfen des Scaffolds

4.3. Besiedelung der Konstrukte

Materialien:

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)

DMEM (FA Sigma, D8437,500 ml)

Fibrinogen (5g Fibrinogen in 50ml Traylor, FA Sigma,F-4753)

Thrombin (1ml Thrombin in 100 ml Thrombinpuffer, FA Baxter)

Multiwell Plate (FA Sigma, CLS3337)

Zählkammer (Glastic®, FA Hycor, 87144)

Methoden:

Für die Trypsinierung der Fettzellen wurde das Zellkulturmedium zunächst aus der Flasche abgekippt und nach Auswaschung mit PBS komplett abgesaugt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 3 ml Trypsin Lösung pro Flasche. Nach gleichmäßiger Verteilung wurden diese im Brutschrank bei 37° für 5 min inkubiert. Der Erfolg wurde unter einem Lichtfeldmikroskop überprüft. Ein adäquates Ablösen der Zellen war durch ihre rundliche Form sowie ein freies Schweben im Medium zu erkennen. Zur Beendigung der Trypsin-Reaktion wurde jeder Flasche 6 ml DMEM hinzugefügt.

Nach 10-minütiger Zentrifugation des gesammelten Flascheninhaltes wurde der Überstand

abgegossen und das Pellet mit 1ml DMEM in einem Falcon-Röhrchen resuspendiert. Die Gesamtzahl der Zellen wurde analog zur Prozedur der Passagierung anhand einer Zählkammer bestimmt, das Falcon-Röhrchen abermals zentrifugiert und der Überstand abgegossen.

Ein Scaffold sollte nun mit etwa 1 Million Präadipozyten beimpft werden. Zur Ädhäsion der Zellen auf dem Kunststoff wird dabei ein Zellklebstoff benötigt. Im Tissue Engineering hat sich hierbei vor allem ein Fibrin-Thrombin-Gemisch bewährt. Durch Vorarbeiten in der Forschungsgruppe konnte dafür eine optimale Konzentration beider Komponenten gefunden werden (Eyrich, 2007). Ein Polyurethanzylinder nimmt dabei etwa 40 µl Flüssigkeit auf. Somit mussten dem Pellet pro Million Zellen 20µl Thrombin-Lösung und 20 µl Fibrin-Lösung zugesetzt werden, wodurch die Polymerisation initiiert wurde.

In ein 24-well-plate verteilte Polyurethanscheibchen (Abb. 4.2.f) sind dann mit dieser Suspension beimpft worden, worauf sie 10 Minuten inkubierten und dann mit Zellkulturmedium begossen wurden. Nach weiteren 24 Stunden im Brutschrank waren die Konstrukte fertig zur Implantation.

4.4. Mausmodell

Materialien:

Nacktmäuse (NMRI Foxn1 nu/nu; FA Charles River, Sulzfeld, Deutschland)

Sterile Abdecktücher (FA Raucodrape)

MMF (Midazolam, Medetomidin und Fentanyl, Tierstall, rechts der Isar)

AFN (Atipamezol, Flumazenil, Naloxon, Tierstall, rechts der Isar)

Sterile Silikonstreifen, blau (FA Gyrus Medical GmbH, Tuttlingen, Deutschland)

Prolene-Naht 6-0 (FA Ethicon)

Baytril (Wirkstoff Enrofloxacin, Fa. Bayer)

Operationsmikroskop Universal S2 (Zeiss, Deutschland)

Methoden:

Als Mausmodell dienten weibliche, 6-7 Wochen alte, circa 25 g schwere, athymische Nacktmäuse der Firma Charles River. Diese wurden über den gesamten Beobachtungszeitraum im Tierstall des Klinikums München rechts der Isar gehalten und durch die Tierpflegerinnen mit Nahrung und Wasser versorgt.

Die Narkose erfolgte durch 0,1 ml der Anästhetika-Kombination MMF, das intraperitoneal appliziert wurde. Nach Fixation der betäubten Maus in dorsaler Lage wurde ein Längsschnitt in der Leiste vorgenommen und das Gefäß-Nerven-Bündel mit Hilfe eines Operationsmikroskops aufgesucht. Der Nerv wurde zur Schonung frei präpariert und vom Gefäßstiel gelöst. Danach erfolgte die Unterminierung und Mobilisation des Gefäßstranges (Abb. 4.4.a). Um die Einsprossung

von Gefäßen aus Wundgrund zu verhindern erfolgte das Einbringen eines etwa einen Zentimeter breiten Silikonstreifens unter das Gefäßbündel. Nach Befeuchtung des OP-Situs wurde nun das durch einen Assistenten bereitgestellte Konstrukt tangential bis zur Mitte angeschnitten und um den Gefäßstiel gelegt (Abb. 4.4.b). Danach erfolgte eine mikroskopische Überprüfung der erhaltenen Durchgängigkeit des Gefäßlumens, da es bei der Manipulation bei der Einbringung leicht zur Torquierung oder einer Abklemmung kommen kann. Nach Ummantelung des Konstrukts durch den Silikonstreifen wurde dieser durch zwei Nähte fixiert (Abb. 4.4.c). Schließlich wurde die Haut mit nicht resorbierbaren Fäden vernäht.

Als Kontrolle wurde den Mäusen ein beimpftes Konstrukt subkutan in die Nackenfalte implantiert (Abb. 4.4.e). Hierfür wurde die Haut längs inzidiert und per Schere unterminiert. In die präparierte Hauttasche wurde das Konstrukt, welches bereits vorher mit Silikonstreifen ummantelt wurde, eingebracht. Zur Infektionsprophylaxe wurde den Mäusen 0,02 ml Baytril (Fa. Bayer, Wirkstoff Enrofloxacin) intramuskulär auf Höhe der Skapula injiziert. Zur Antagonisierung des MMFs wurde 0,1 ml AFN appliziert. Der weitere Verlauf wurde täglich kontrolliert und die Mäuse auf eventuelle Entzündungen der Wunde oder Schonhaltung der operierten Extremitäten untersucht.

Insgesamt wurden 19 Mäuse operiert, wobei davon eine Maus zum Erlernen der Technik und Durchführung des Eingriffes diente.



Abb. 4.4.a Darstellung des Gefäßbündels

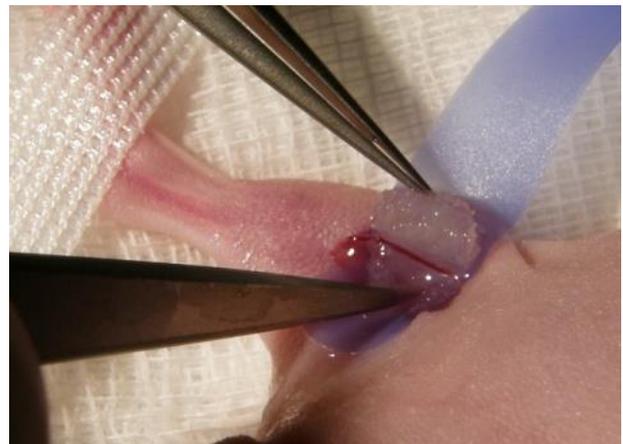


Abb. 4.4.b Einbringen des Konstrukts

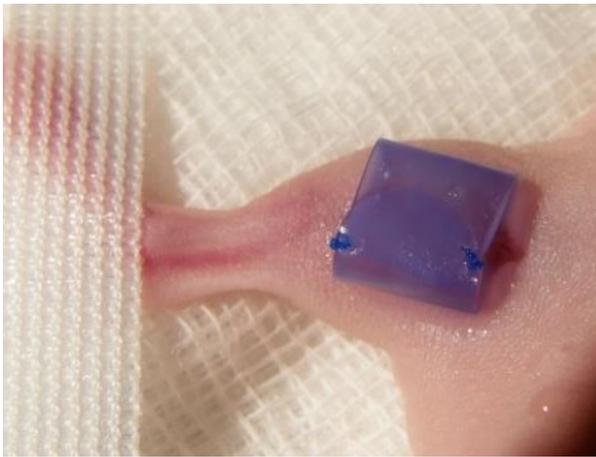


Abb. 4.4.c Geschlossener Silikonstreifen



Abb. 4.4.d Hautnaht



Abb. 4.4.e Kontrolle vor Wundverschluss

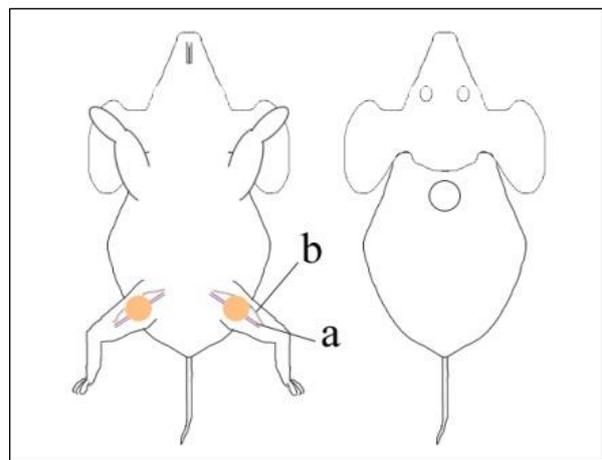


Abb. 4.4.f Schema zur Position der Konstrukte (links) und Kontrolle (rechts) (a: arteria und vena Femoralis, b: geschnonter Nerv)

4.5. Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung

4.5.1. Versuchsaufbau 1

Die Präadipozyten für den Versuchsaufbau 1 wurden aus dem Resektat einer Abdominoplastik eines 57-jährigen Mannes gewonnen, der in der Klinik für Plastische Chirurgie am Klinikum rechts der Isar operiert wurde. Die Zellkulturen wurden einmal passagiert (P1) und mit dem Fibrin/Thrombin-Gemisch anschließend in die Polyurethanscaffolds eingebracht. Insgesamt wurden 5 Mäuse operiert. Bei problematischen anatomischen Voraussetzungen wurde zum Teil auf einen Gefäßanschluss verzichtet (so bei Maus 2 und 4) und stattdessen die Kontrolle in die Leiste gelegt. Es wurde pro Beobachtungszeit eine Maus operiert.

Tabelle 4.5.a Versuchsaufbau 1

Maus	Versuch	Fett	Passage	Leiste rechts	Leiste links	Dorsum	Beobachtung
1	1	M 57J Abdomen	P1	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	1 Woche
3	1	M 57J	P1	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	9 Wochen
2	1	M 57J	P1	Konstrukt	Kontrolle		5 Wochen
4	1	M 57J	P1	Kontrolle	Konstrukt		7 Wochen
5	1	M 57J	P1	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	3 Wochen

4.5.2. Versuchsaufbau 2

Die Präadipozyten für Versuchsaufbau 2 wurden aus dem Resektat eines Mannes mit Gynäkomastie gewonnen, der in der Klinik für Plastische Chirurgie am Klinikum rechts der Isar München operiert wurde. Wegen der zu geringen Menge an Präadipozyten im Ausgangsmaterial wurden die Zellkulturen zweimal bzw. dreimal passagiert (P2, P3) und dadurch amplifiziert. 24 Stunden präoperativ wurden die Scaffolds besiedelt. Allen Mäusen wurde jeweils an der linken und rechten Leiste ein Konstrukt implantiert. Bei Versuchsaufbau 2 wurde auf eine Kontrolle im Rücken wegen eines Mangels an Ausgangsgewebe verzichtet. Insgesamt wurden 6 Mäuse operiert. Maus 4 verstarb nach zweimaliger Wundrevision und wurde deswegen nicht verwertet.

Tabelle 4.5.b Versuchsaufbau 2

Maus	Versuch	Fett	Passage	Leiste rechts	Leiste links	Dorsum	Beobachtung
1	2	M Gynäkomastie	P2	Konstrukt	Konstrukt		9 Wochen
2	2	M Gyn	P2	Konstrukt	Konstrukt		9 Wochen
3	2	M Gyn	P2	Konstrukt	Konstrukt		5 Wochen
4	2	M Gyn	P3	Konstrukt	Konstrukt		exitus
5	2	M Gyn	P3	Konstrukt	Konstrukt		1 Woche
6	2	M Gyn	P3	Konstrukt	Konstrukt		1 Woche

4.5.3. Versuchsaufbau 3

Die Vorläuferzellen für Versuchsaufbau 3 wurden aus dem Resektat einer Mammareduktion einer 50-jährigen Frau gewonnen, die in der Klinik für Plastische Chirurgie am Klinikum rechts der Isar operiert wurde. Die Zellkulturen wurden einmal passagiert (p1) und schließlich in die Polyurethanschäume eingebracht. Allen Mäusen wurde jeweils ein Konstrukt in die linke und rechte Leiste implantiert und eine Kontrolle subkutan unter die Rückenhaut platziert (wegen Kontamination des Konstrukts fehlend bei Maus 2). Insgesamt wurden 7 Mäuse operiert.

Tabelle 4.5.c Versuchsaufbau 3

Maus	Versuch	Fett	Passage	Leiste rechts	Leiste links	Dorsum	Beobachtung
1	3	W 50 Brust	P1	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	3 Wochen
2	3	W 50 Brust	P1	Konstrukt	Konstrukt		3 Wochen
3	3	W 50 Brust	P1	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	5 Wochen
4	3	W 50 Brust	P1	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	5 Wochen
5	3	W 50 Brust	P1	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	7 Wochen
6	3	W 50 Brust	P1	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	7 Wochen
7	3	W 50 Brust	P1	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	7 Wochen

Für eine Übersicht der Operationen siehe Anhang 9.1

4.5.4. Gruppeneinteilung

Die Gruppen wurden anhand der jeweiligen Beobachtungszeiträume der Mäuse eingeteilt.

Tabelle 4.5.d Gruppen

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E
Beobachtungszeit	1 Woche	3 Wochen	5 Wochen	7 Wochen	9 Wochen

4.6. *Explantation*

Materialien:

Formalinlösung 10% (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)

Methoden:

Nach Ablauf der definierten Beobachtungszeiträume wurden die Mäuse nach schon beschriebener Methode narkotisiert und fixiert. Nach Eröffnen des Operationssitus erfolgte die Präparation des Scaffolds aus der bindegewebigen Schicht, die sich um das Silikonpaket herum gebildet hatte. Dieses Bindegewebe wurde eröffnet, der Gefäßstrang auf erhaltenen Durchfluss untersucht und anschließend durch Ligaturen nach proximal und distal verschlossen. Dadurch konnte eine größere Blutung bei Explantation des Konstrukts vermieden werden, was zu Verunreinigung des anzufärbenden Gewebes geführt hätte. Nach Exzision des Scaffolds wurde dieses zur Fixation in 10%-ige Formalinlösung gegeben. Die Mäuse wurden nach Explantation aller Konstrukte in Narkose durch einen Genickbruch getötet.



Abb. 4.6.a Explantation



Abb. 4.6.b Explantiertes Konstrukt und Kontrolle

4.7. *Histologische Auswertung*

Materialien:

- Isopropanol** (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 1l)
- Aqua bidest.** (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 5l)
- Propidiumjodid** (FA Sigma, P4170, 100mg)
- Fluoresceindiacetat** (FA Sigma, F7378, 5 g)
- Aqua dest.** (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 5l)
- Hämatoxylin** (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 1l)
- Eosin** (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 1l)
- Formalinlösung 10%** (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)
- 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)
- Digitalkamera** (Axio Vision Cam, FA Carl Zeiss, Jena)
- Floureszenzmikroskop** (FA Carl Zeiss,, Jena)
- Lichtmikroskop DMI 6000B** (FA Leica, Deutschland)
- Adobe Photoshop CS 2** (FA Adobe, USA)
- ImageJ** (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)

4.7.1. **Ölrot-O-Färbung**

Wegen der Ähnlichkeit von Fibroblasten und Präadipozyten unter dem Mikroskop wurde nach Kultivierung der Vorläuferzellen eine Ölrot-Färbung von in vitro differenzierten Präadipozyten angefertigt. Diese erlaubt eine spezifische Anfärbung von Fettvakuolen und eignet sich so zur Detektion von adultem Fettgewebe. 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.

4.7.2. Biokompatibilität und Vitalität

Zur Beurteilung der Toxizität des Polyurethanschaums und der Vitalität der Präadipozyten wurde ein Konstrukt nach einer Woche Beobachtungszeit *in vivo* explantiert und eine Lebend-/totfärbung angefertigt. Durch dieses Verfahren ist es möglich lebende von toten Zellen anhand der fluoreszierenden Farbstoffe Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid zu differenzieren. Dabei färbt Fluoresceindiacetat (FDA) spezifisch lebende Zellen an, da FDA in die Zelle aufgenommen und hydrolysiert wird und das entstehende Fluorescein die intakte Zellwand nicht passieren kann. Unter Verwendung eines Blaufilters erscheinen die vitalen Zellen grün. Propidiumiodid (PI) kann dagegen nur durch eine defekte Zellmembran dringen, worauf es sich an der Kern-DNA anlagert und die Zelle unter Grünfilter rot anfärbt.

Die Färbelösung besteht aus 500 µl FDA-Lösung (25 mg / ml) und 500 µl PI-Lösung (1 mg / ml), die zusammen mit 60 ml Aqua dest. vermischt und für 10 Minuten bei 2000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert wird. Das explantierte Konstrukt wurde in feine Scheiben geschnitten und in der Färbelösung für 90 Sekunden in einem abgedunkelten Raum inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss betrachtet und mit einer Digitalkamera (Axio Vision) dokumentiert. Zur Auswertung wurde das Bild mit der Bildauswertungssoftware *ImageJ* geöffnet und dann durch Anwendung des Befehls „*Color Threshold*“ der rote Farbbereich der toten Zellen selektiv ausgewählt und dessen Flächeninhalt in Pixel gemessen. Das gleiche wurde für den grünen Farbbereich der vitalen Zellen wiederholt und dessen Flächeninhalt in Verhältnis zu den avitalen Zellen gestellt.

4.7.3. Histomorphometrische Auswertung der Neovaskularisierung und Differenzierung

Die Präparate zur Paraffineinbettung wurden nach Explantation mindestens 24 Stunden in Formalinlösung konserviert und im Anschluss daran zur Entkalkung in das Institut für Allgemeine Pathologie am Klinikum rechts der Isar gebracht. Nach erfolgter Einbettung in Paraffin wurden die Präparate im Gefrierschrank aufbewahrt und schließlich am Mikrotom in 7 µm dicke Scheiben geschnitten. Gefärbt wurden diese nach 24-stündiger Inkubation vor allem anhand von Trichromfärbungen nach Ladewig (siehe Anhang 9.4) sowie durch Hämatoxylin und Eosin. Bei der

Trichromfärbung stellen sich Kerne schwarz, Erythrozyten orange, Zytoplasma rot und Kollagen blau dar, was zur Erleichterung beim Auffinden von Blutgefäßen führte. Dadurch konnte die Neovaskularisierung ausgewertet werden. Die Fetttröpfchen wurden durch die lipophilen Reagenzien während der Färbung aus den Schnitten gewaschen, weshalb nur ein negativer Nachweis anhand der leeren Vakuolen möglich war.

Die Evaluation erfolgte an einem Lichtmikroskop der Firma Leica bei 50-,100- bzw. 400-facher Vergrößerung. Zur Fotodokumentation wurde die Bildbearbeitungssoftware *Leica Application suite* verwendet. Für die Übersichtsbilder wurden die gefärbten Schnitte rasterartig abfotografiert und mit der Bildbearbeitungssoftware *Photoshop CS2* von Adobe zu einem Mosaik zusammengefügt. Anhand dieser Übersichten gewinnt man einen Gesamteindruck über das zu untersuchende Konstrukt.

Als Maß für die Neovaskularisierung wurden auf den Übersichtsbildern Gefäße gesucht, die aus der Arterie sprossen. Diese wurden in *ImageJ* mit Hilfe des Tools „Multipoint“ eigenhändig ausgezählt und protokolliert. Dabei wurden bewusst die Gefäße aus der Bindegewebskapsel ausgelassen, um selektiv nur die von der Arterie ausgehende Gefäße zu werten.

Die Differenzierung der Präadipozyten zu adulten Fettzellen wurde anhand des histologischen Bildes untersucht. Da lipophiles Gewebe im Rahmen der Entparaffinierung während des Färbeprozesses verloren geht, konnten die Adipozyten auf den Übersichtsbildern nur indirekt nachgewiesen werden. Dabei wurden die typischen siegelringförmigen weißen Vakuolen gesucht und fotografisch dokumentiert. Zur Bestimmung von Anzahl und Flächenanteil am Gesamtkonstrukt wurden die Übersichtsbilder ebenfalls mit *ImageJ* untersucht. Hierfür wurde das Bild zunächst in 8-bit Graustufen umgewandelt und invertiert. Danach erfolgte die Auswahl des zu untersuchenden Areals. Hierbei wurden abermals Gewebsabschnitte aus dem Randbereich des Konstrukts nicht gewertet, weil diese als Bindegewebskapsel und somit als Fremdkörperreaktion der Maus zu werten waren. Schließlich wurde die Suchroutine „Analyze Particles“ in *ImageJ* verwendet, um das Areal automatisiert auf runde Strukturen bestimmter Größe abzusuchen. Die Ergebnisse wurden grün gefärbt und zur besseren Beurteilbarkeit mit dem Originalbild verglichen (Abb. 5.5.k). Als Maß der Fettzellendifferenzierung wurde der Flächeninhalt der detektierten Fettzellen in Relation zu der Fläche des untersuchten Konstruktquerschnitts gestellt. Hierbei wurde das Kapselgewebe abermals abgezogen, um selektiv die Fläche des Konstrukts zu werten.

5. Ergebnisse

5.1. Präadipozytenisolation

Der Erfolg der Präadipozytenisolation wurde durch die lichtmikroskopische Beurteilung des Zellrasens am Boden der Zellkulturflaschen überprüft. Es zeigten sich schon ein Tag nach der Aussaat ein rasches Wachstum der Präadipozytenkulturen (siehe Abbildung 5.1.a). Man erkennt die typische Morphologie der Vorläuferzellen als spindelförmige Zellen.

Abbildung 5.1.b zeigt die Ölrot-Färbung einer Zellkultur nach 10 Tagen Differenzierung. Man erkennt deutlich die rot gefärbten Fettvakuolen. Dadurch konnte bewiesen werden, dass nicht Fibroblasten sondern Präadipozyten kultiviert worden waren.

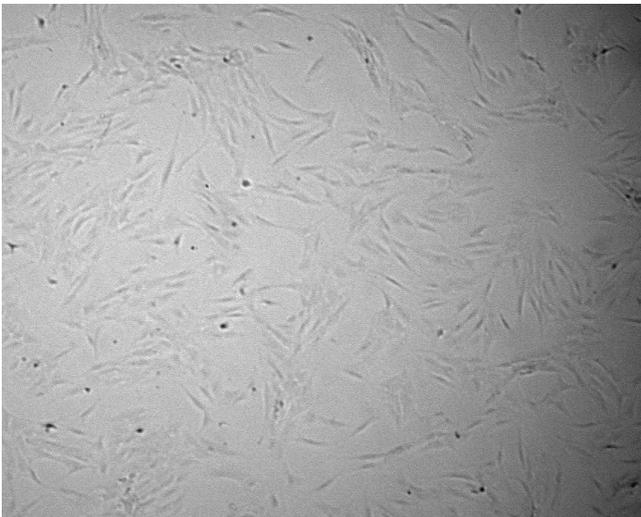


Abb. 5.1.a Präadipozyten einen Tag nach Aussaat in Zellkulturflasche
(10x Vergrößerung)

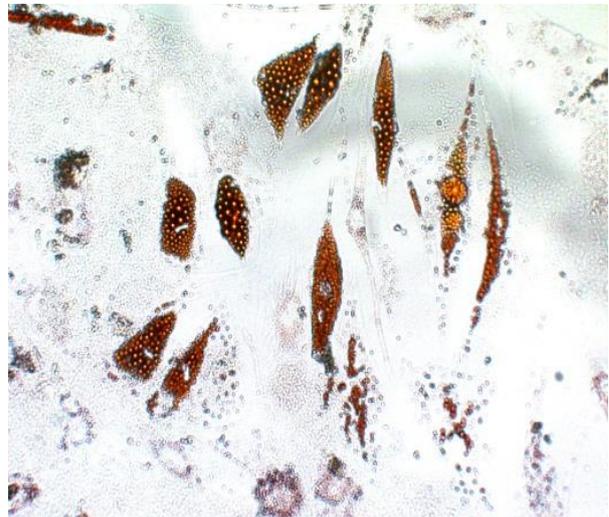


Abb. 5.1.b Präadipozyten nach einer Woche Differenzierung
(10x Vergrößerung, Ölrot-Färbung)

5.2. *Beimpfung und Biokompatibilität des Scaffolds*

Um den Erfolg der Beimpfung zu beurteilen, wurde eine nach Woche 1 explantierte Kontrolle mit Hilfe eines HE-Schnittes auf Dichte der beimpften Präadipozyten untersucht. Hierbei ließ sich eine homogene und ausreichende Durchsetzung des Scaffolds durch Präadipozyten nachweisen.

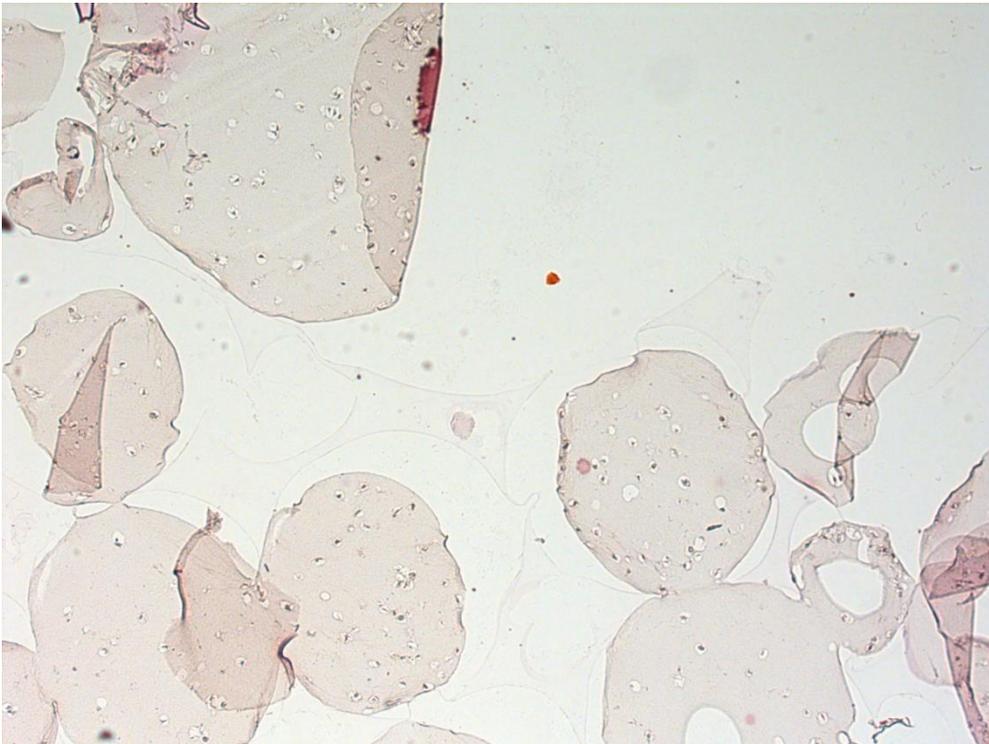


Abb. 5.2.a HE-Schnitt einer Kontrolle nach einer Woche Beobachtungszeit.
Die Präadipozyten sind gleichmäßig im angefärbten Fibrinkleber verteilt (5x Vergrößerung)

Als Maß für die Biokompatibilität des Scaffolds gilt das Überleben der Präadipozyten. Um das nachzuweisen wurde eine Vitalitätsfärbung eines Konstruktes mit Gefäßanschluss nach einer Woche Beobachtungszeit angefertigt und der Flächeninhalt der vitalen zu dem der avitalen in Verhältnis gestellt. Es zeigte sich, dass mehr als die Hälfte der Vorläuferzellen noch vital waren. Dies kann als Zeichen der Biokompatibilität des Polyurethanschaums sowie der ausreichenden Versorgung durch Nährstoffe innerhalb des Scaffolds gewertet werden.

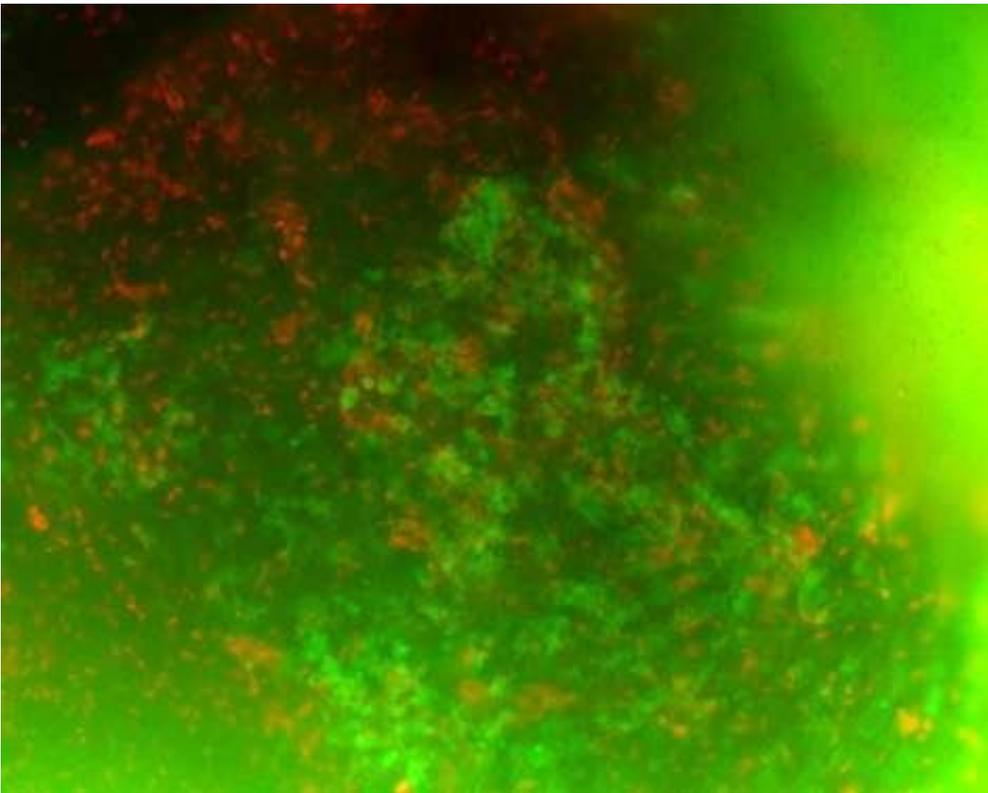


Abb. 5.2.b Vitalitätsfärbung eines Konstrukts nach einer Woche Beobachtungszeit

Die vitalen Präadipozyten (grün gefärbt) im Kontrast zu den stoffwechsellosen Präadipozyten (rot gefärbt)(10x Vergrößerung)

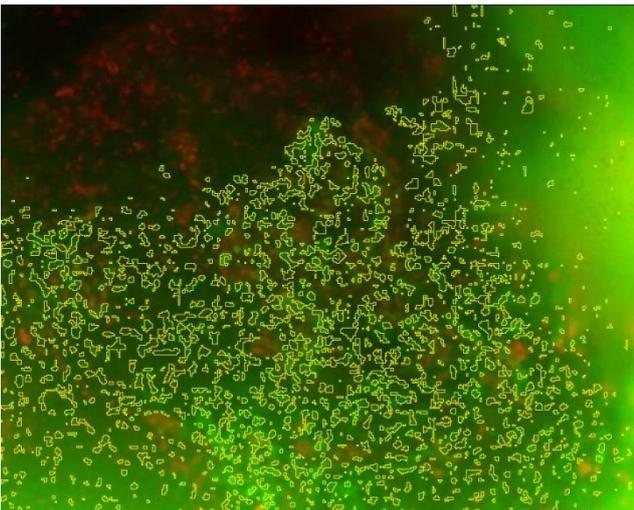


Abb. 5.2.c Auswertung vitaler Zellen

Die lebenden Zellen sind per *ImageJ* anhand ihres grünen Farbwertes markiert (10x Vergrößerung)

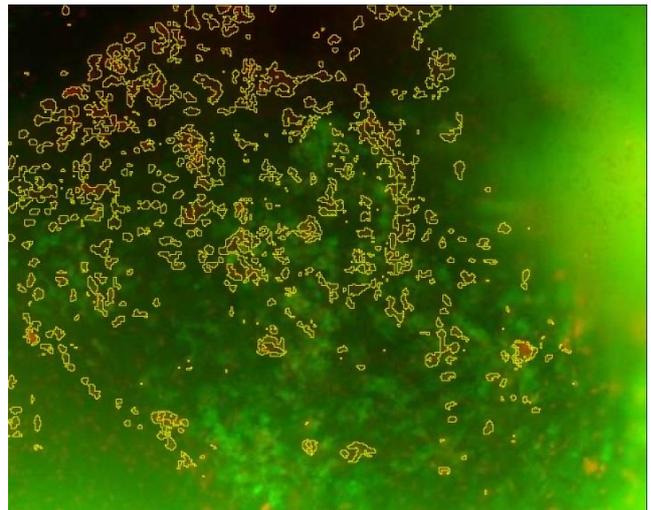


Abb. 5.2.d Auswertung avitaler Zellen

Die zugrunde gegangenen Zellen sind per *ImageJ* anhand ihres roten Farbwertes markiert (10x Vergrößerung)

Tabelle 5.2.a Ergebnis der Vitalitätsfärbung

Flächeninhalt vitaler Zellen	Flächeninhalt avitaler Zellen	Verhältnis vital/avital
19353 Pixel	15412 Pixel	1,26 : 1

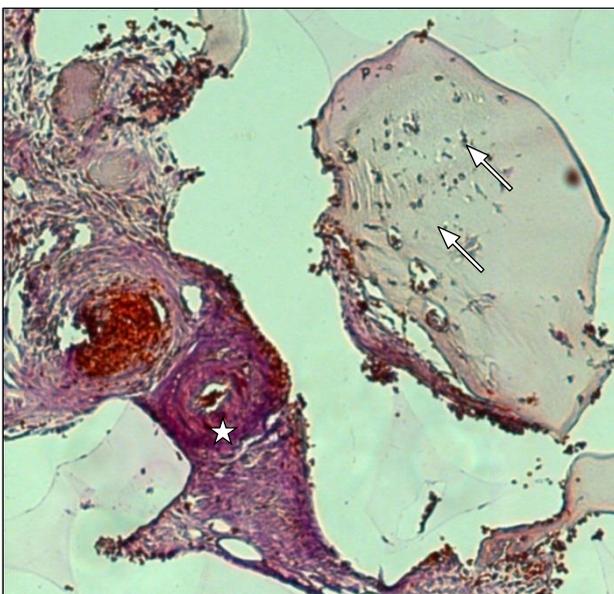
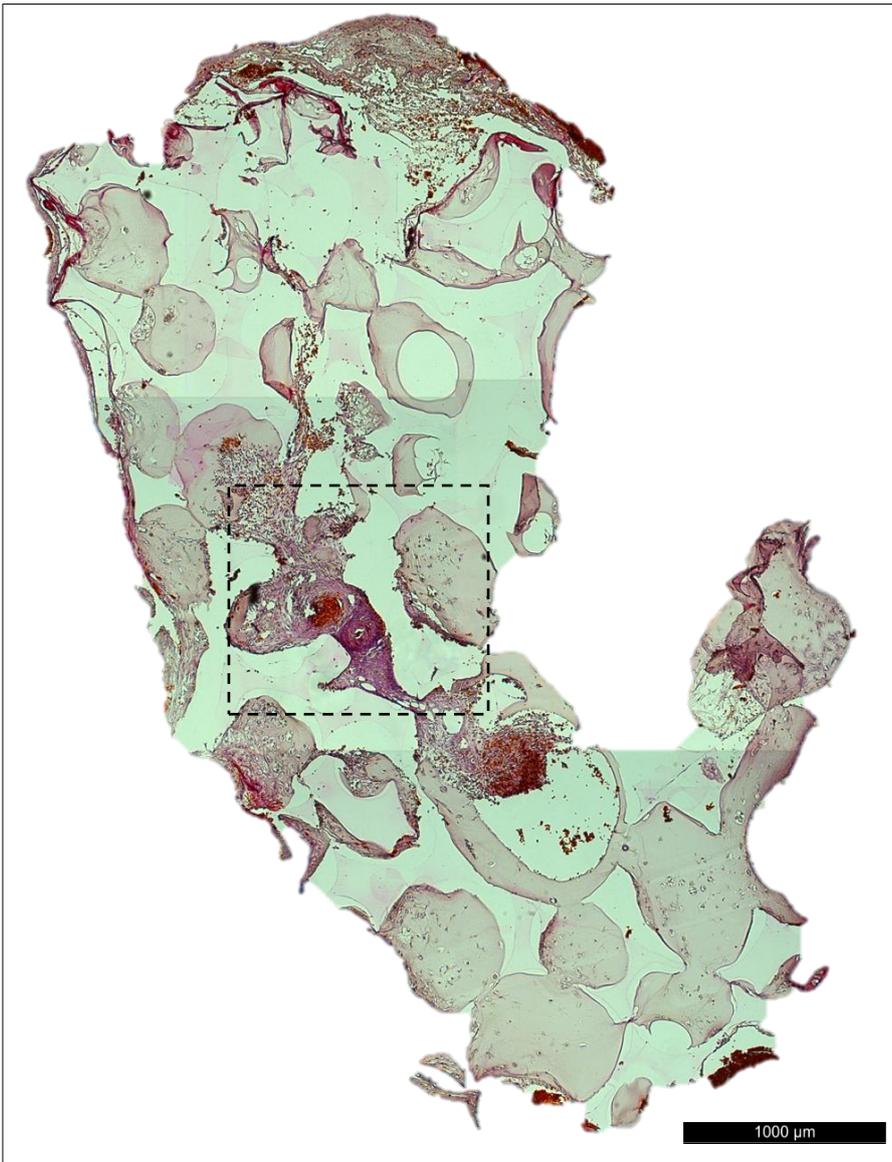
5.3. Histologie der Konstrukte

Nachfolgend sind einige repräsentative Übersichtsbilder der jeweiligen Beobachtungszeitpunkte abgebildet. Die Gesamtmenge der untersuchten Konstrukte und Kontrollen ist in Tabelle 5.3.a dargestellt. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung kam es bei einer Maus gehäuft zu Wundheilungsstörungen und dadurch zu notwendigen Nahtrevisionen. Wegen des nachfolgenden Versterbens der Maus wurden deren Konstrukte nicht bewertet.

Tabelle 5.3.a Gesamtzahl der Konstrukte

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E
Beobachtungszeit	1 Woche	3 Wochen	5 Wochen	7 Wochen	9 Wochen
Konstrukte	6	6	7	7	6
Kontrollen	1	2	3	4	1

5.3.1. Gruppe A (Woche 1)

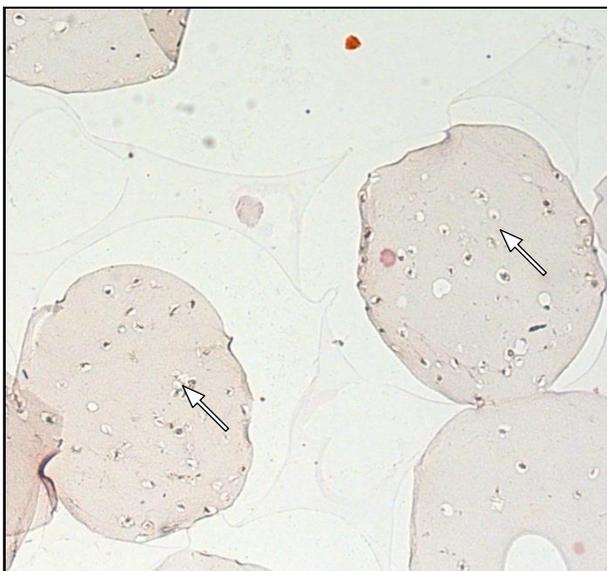
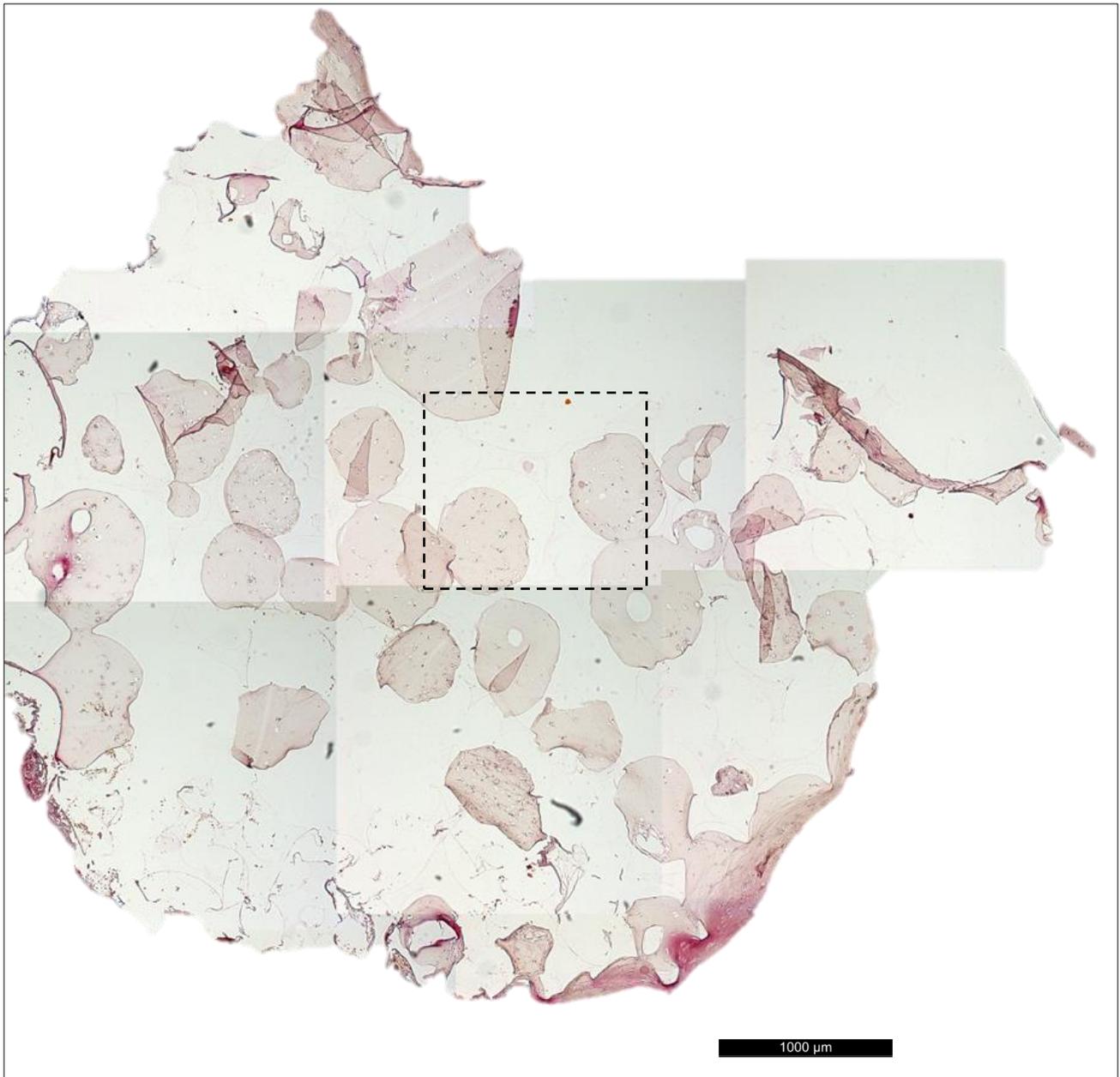


Oben: Konstrukt 1 Woche

Übersichtsaufnahme eines Konstrukts nach einer Woche in vivo Beobachtungszeit (40x Vergrößerung; Zentraler Schnitt). Es zeigen sich deutlich sowohl der noch erhaltene Fibrinkleber sowie die zentral liegende Arterie samt ihrer Begleitvenen. Die beginnende Bildung einer Bindegewebskapsel lässt sich am oberen Pol erkennen.

Links: Vergrößerung Konstrukt 1 Woche

Zentrale Arterie (Sternchen)
Prädipozyten im Fibrin-Kleber (Pfeile)



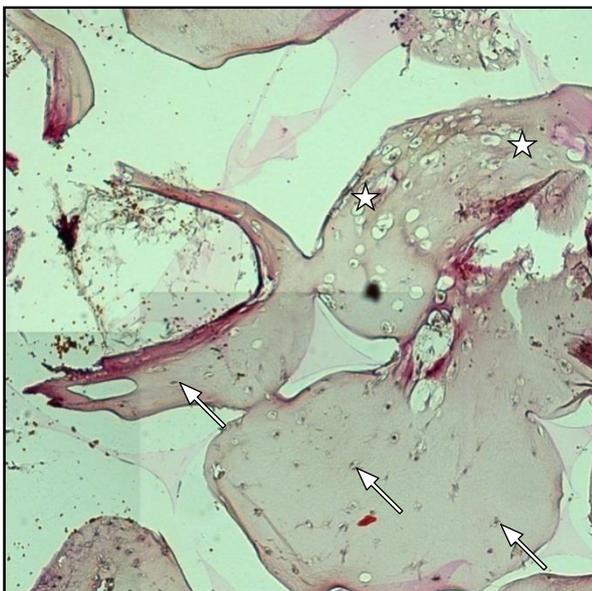
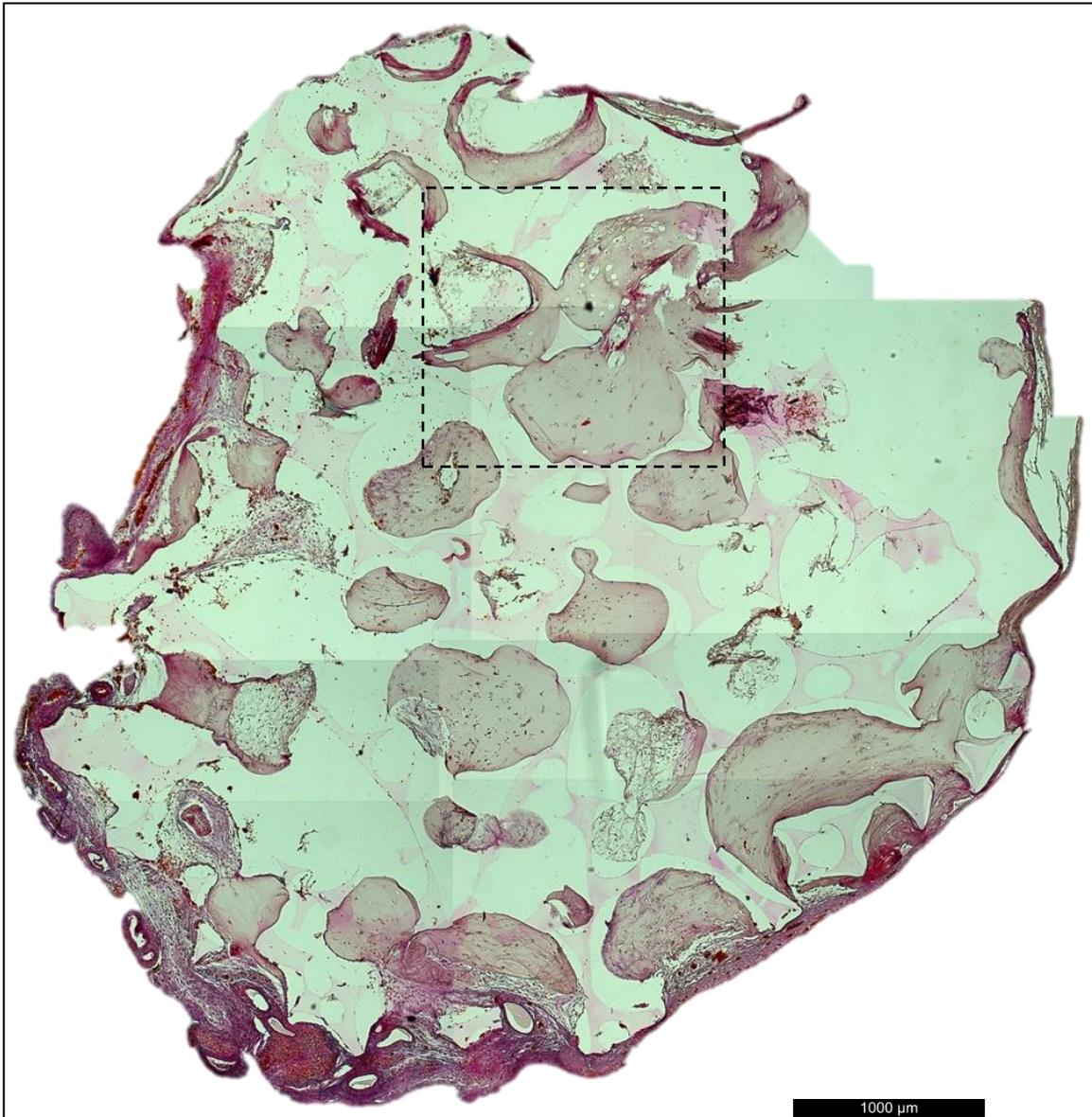
Oben: Kontrolle 1 Woche

Übersichtsbild einer Kontrolle nach einer Woche Beobachtungszeit. Die in den Fibrinkleber eingebrachten Präadipozyten lassen sich in der Vergrößerung erkennen. Im gesamten Schnitt lassen sich keine differenzierten Fettzellen oder neue Gefäße finden. (40x Vergrößerung; Zentraler Schnitt)

Links: Vergrößerung Kontrolle 1 Woche

Eingebrachte Präadipozyten im Fibrinkleber (Pfeile)

5.3.2. Gruppe B (Woche 3)

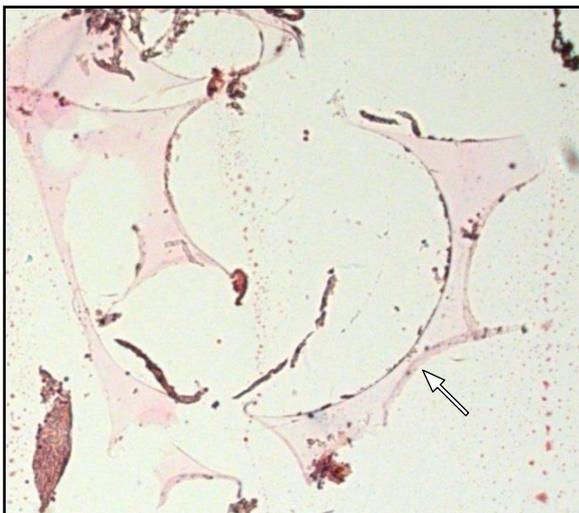


Oben: Konstrukt nach 3 Wochen Beobachtungszeit

Prädipozyten zeigen sich zum Teil undifferenziert. Vereinzelt finden sich Lakunen differenzierter Adipozyten
(40x Vergrößerung; Zentraler Schnitt)

Links: Vergrößerung Konstrukt 3 Wochen

Bereich mit mehreren Adipozyten (Sternchen)
Undifferenzierte Prädipozyten im Fibrinkleber (Pfeile)



Oben: Kontrolle 3 Wochen Beobachtungszeit.

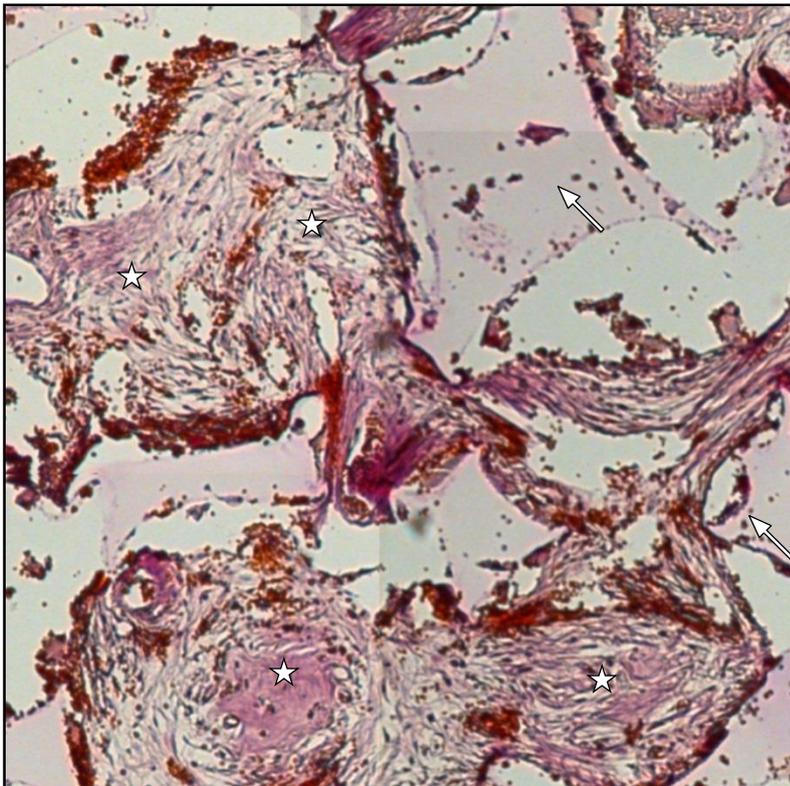
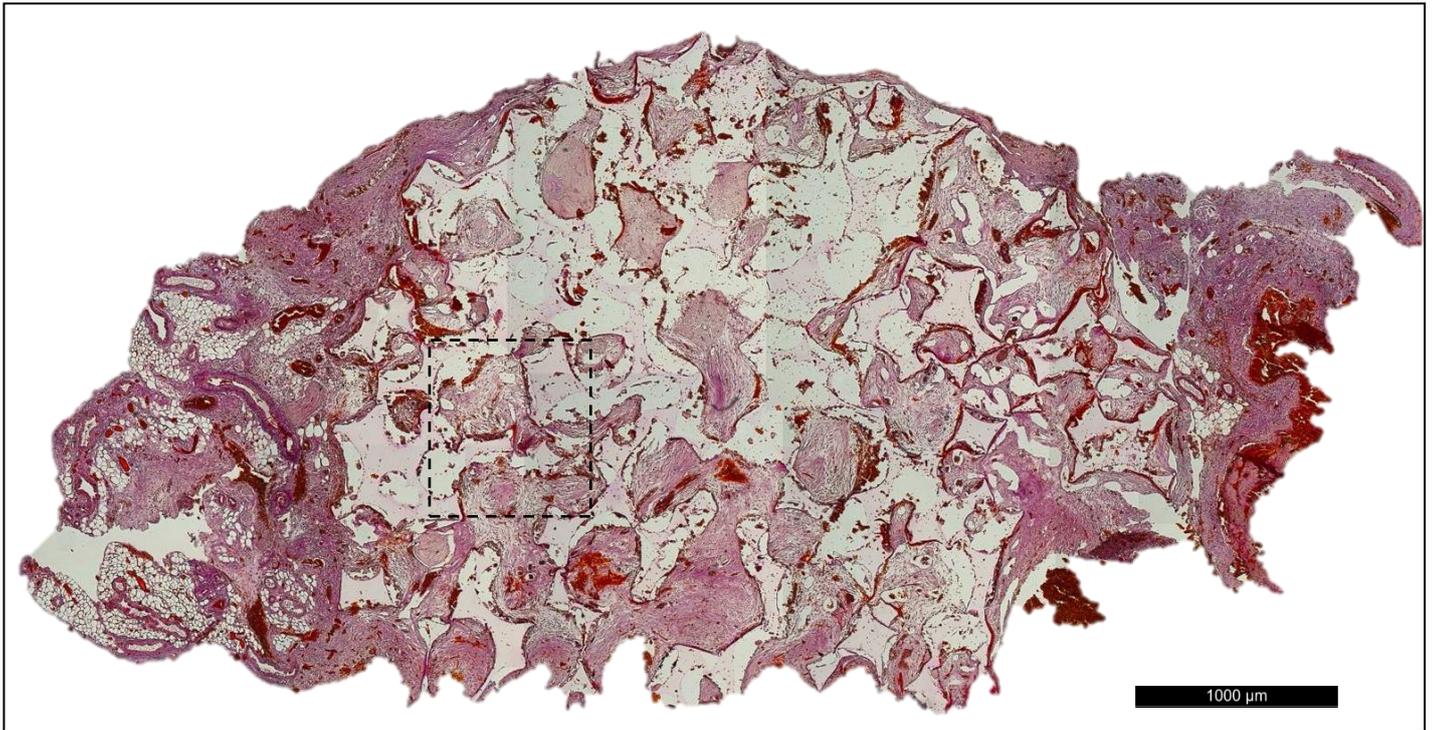
Übersichtsbild einer Kontrolle nach 3 Wochen Beobachtungszeit.

Im gesamten Schnitt lassen sich keine differenzierten Fettzellen oder neue Gefäße finden. (40x Vergrößerung; Zentraler Schnitt)

Links: Vergrößerung Kontrolle 3 Wochen

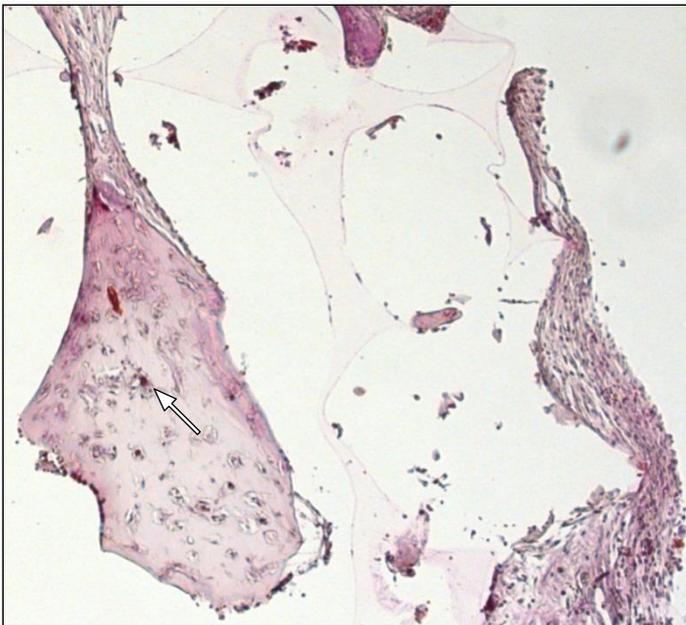
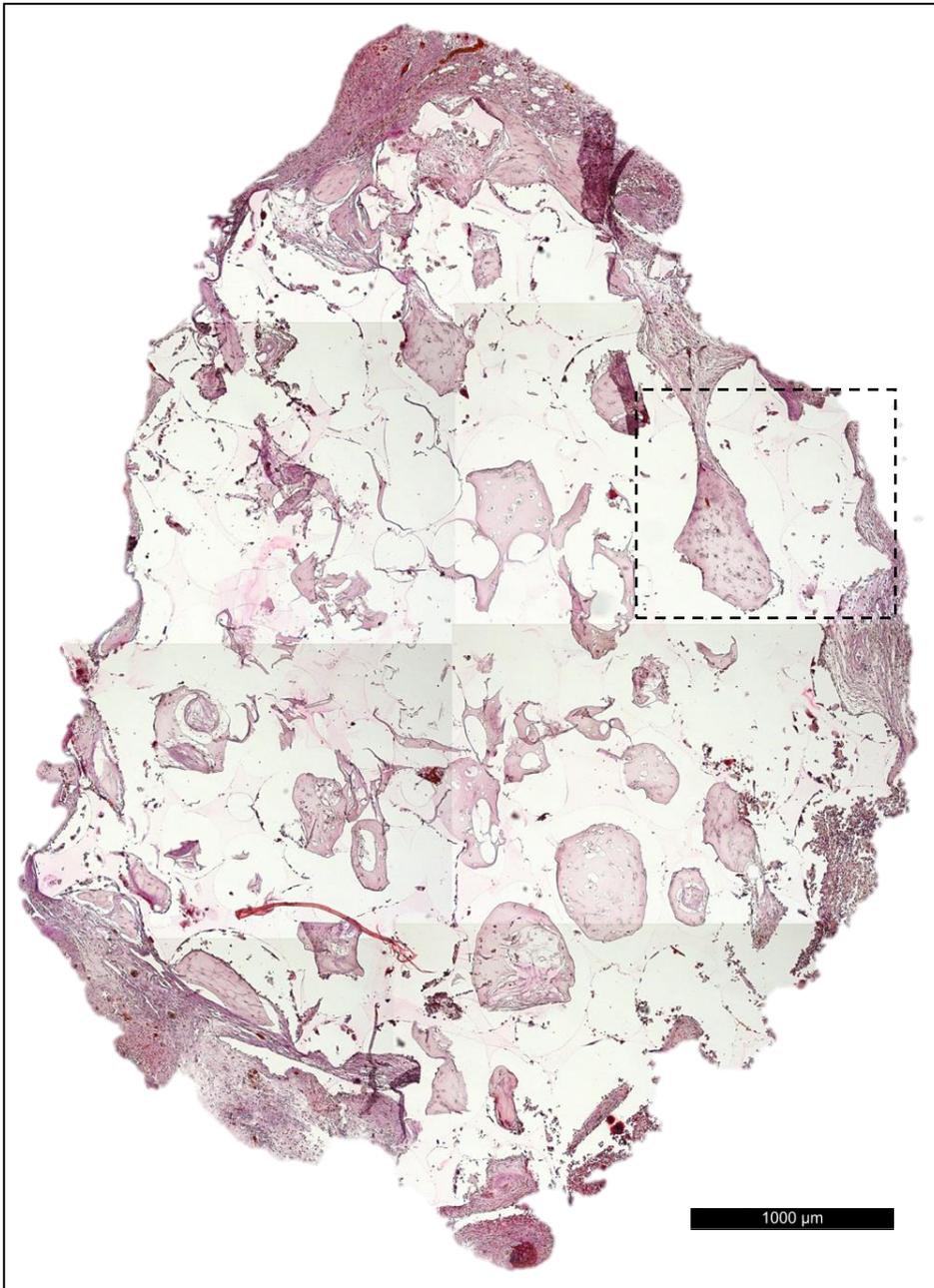
Auch auf der Vergrößerung findet sich kein Anhalt für differenzierte Adipozyten. Der Fibrinkleber ist zum Teil schon abgebaut. (Pfeil)

5.3.3. Gruppe C (Woche 5)



Oben: Konstrukt 5 Wochen Beobachtungszeit.
Gesamtes Konstrukt mit Bindegewebe durchsetzt.
Das an den Seiten zu sehende Fett stammt aus der Bindegewebskapsel und ist somit nicht zu werten.
(40x Vergrößerung; Randschnitt)

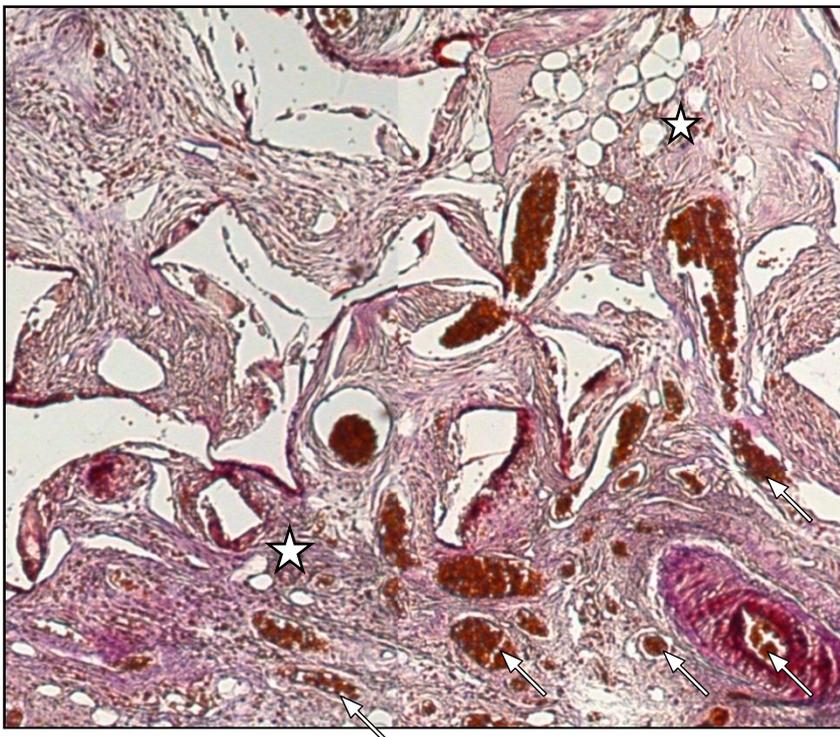
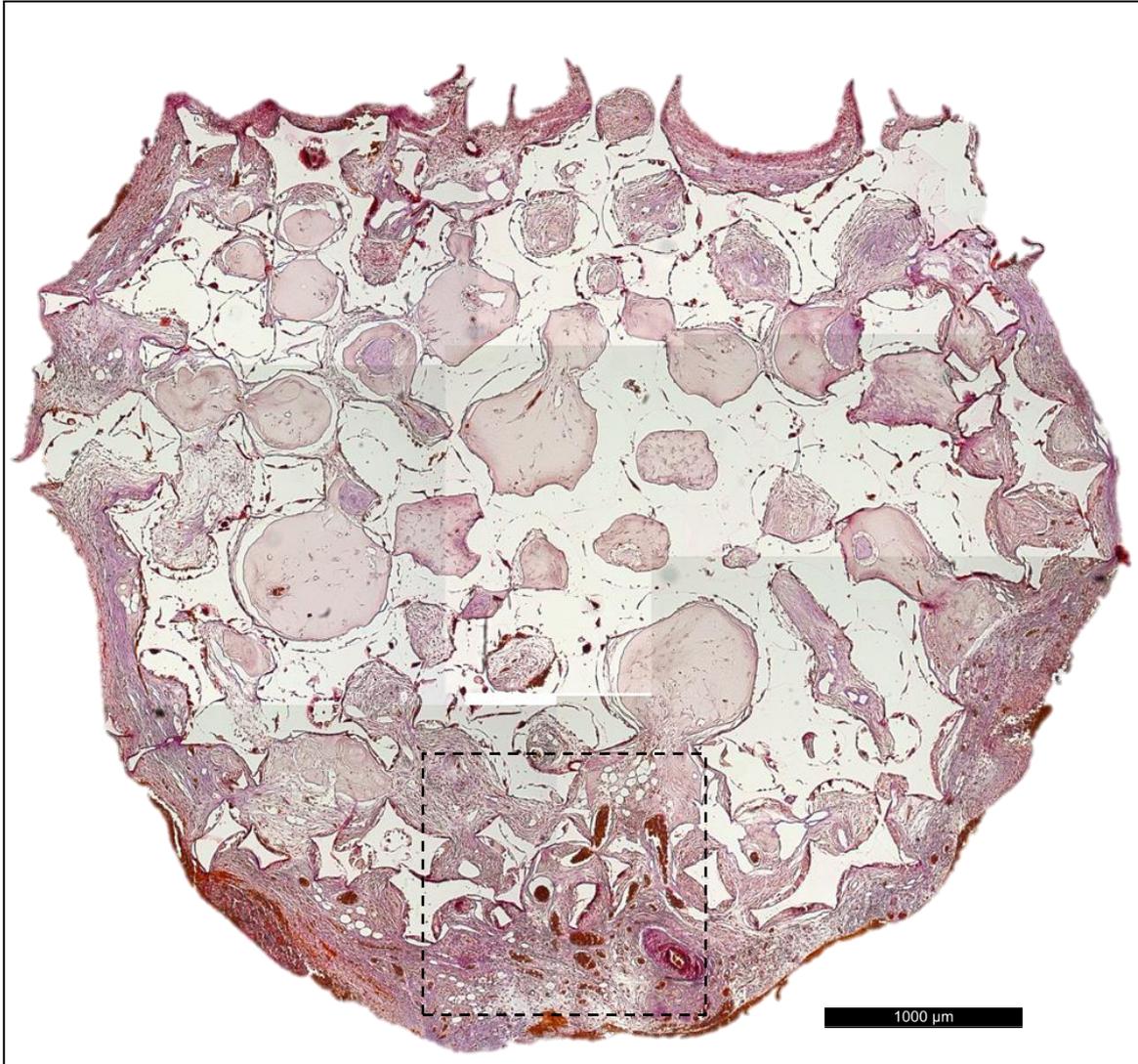
Links: Vergrößerung Konstrukt 5 Wochen
Man kann deutlich den stattgefundenen Umbau in Bindegewebe erkennen (Sternchen). Einzelne Felder mit Fibrinkleber (Pfeil)



Oben: Kontrolle nach 5 Wochen Beobachtungszeit.
Im Übersichtsbild sieht man den beständigen Abbau des Fibrinklebers. Bindegewebsverbände finden sich bis auf eine schmale Kapselbildung nicht. Außerdem sind keine Zeichen für Neovaskularisierung erkennbar. (40x Vergrößerung; Randschnitt)

Links: Vergrößerung Kontrolle 5 Wochen
Die Präadipozyten scheinen immer mehr zu degenerieren (Pfeil). Zur Differenzierung kommt es im gesamten Konstrukt nicht.

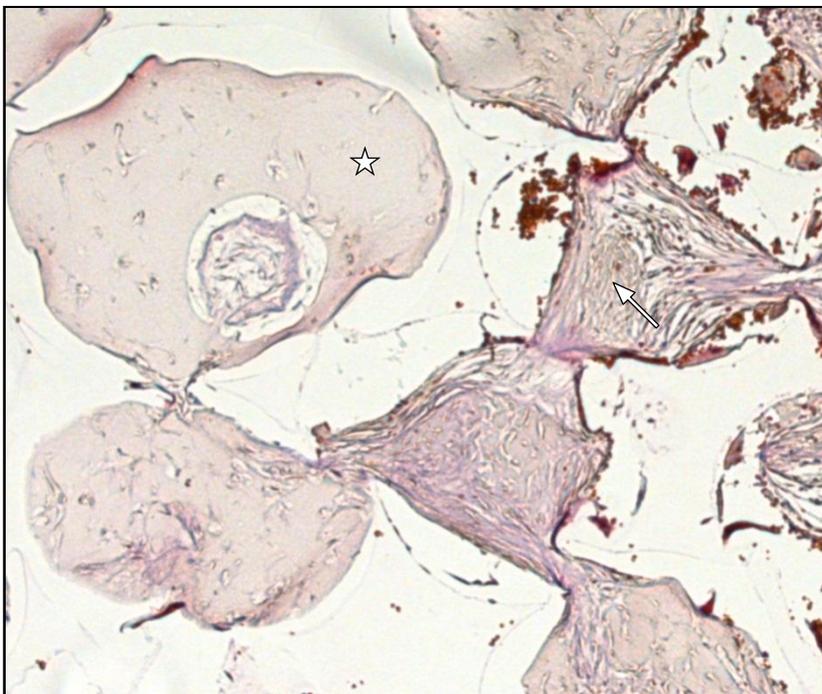
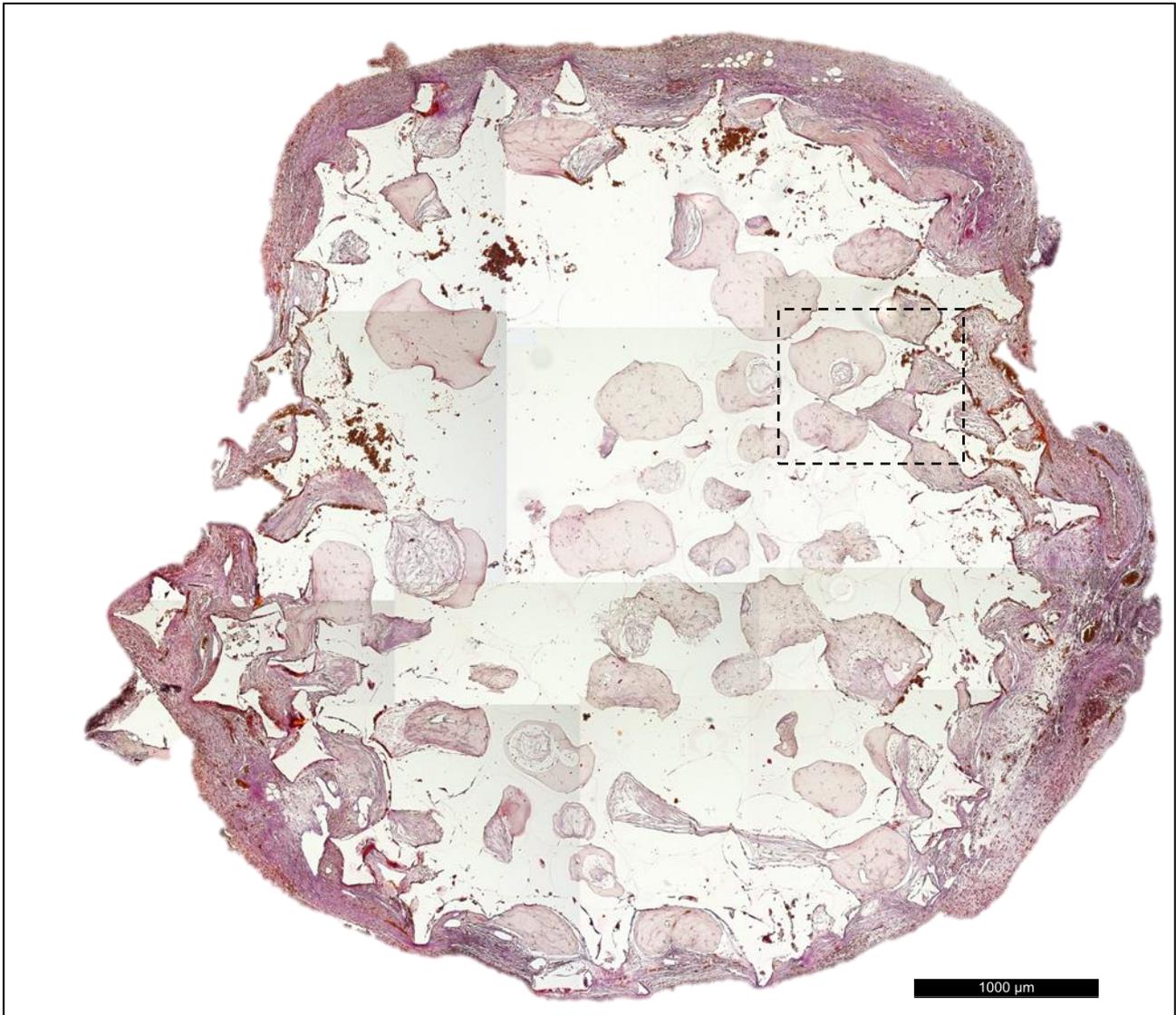
5.3.4. Gruppe D (Woche 7)

**Oben: Konstrukt nach 7 Wochen Beobachtungszeit**

Das Übersichtsbild zeigt den bindegewebigen Umbau nach 7 Wochen. Die zentrale Arterie ist im unteren Bildabschnitt querschnittlich zu finden. (40x Vergrößerung; Randschnitt)

Links: Vergrößerung Konstrukt 7 Wochen

Um die zentrale Arterie herum sieht man eine deutliche Aussprossung von neuen Blutgefäßen. Diese sind gesäumt von bestehendem Fettgewebe. Blutgefäße (Pfeile)
Fettgewebe (Sternchen)



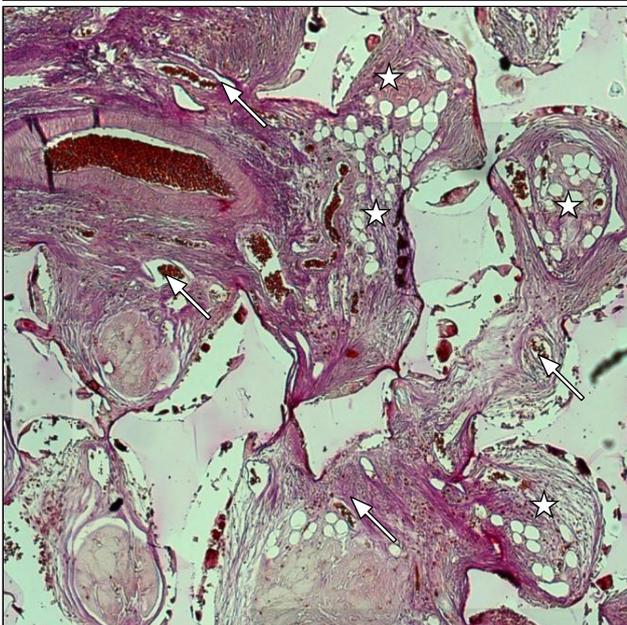
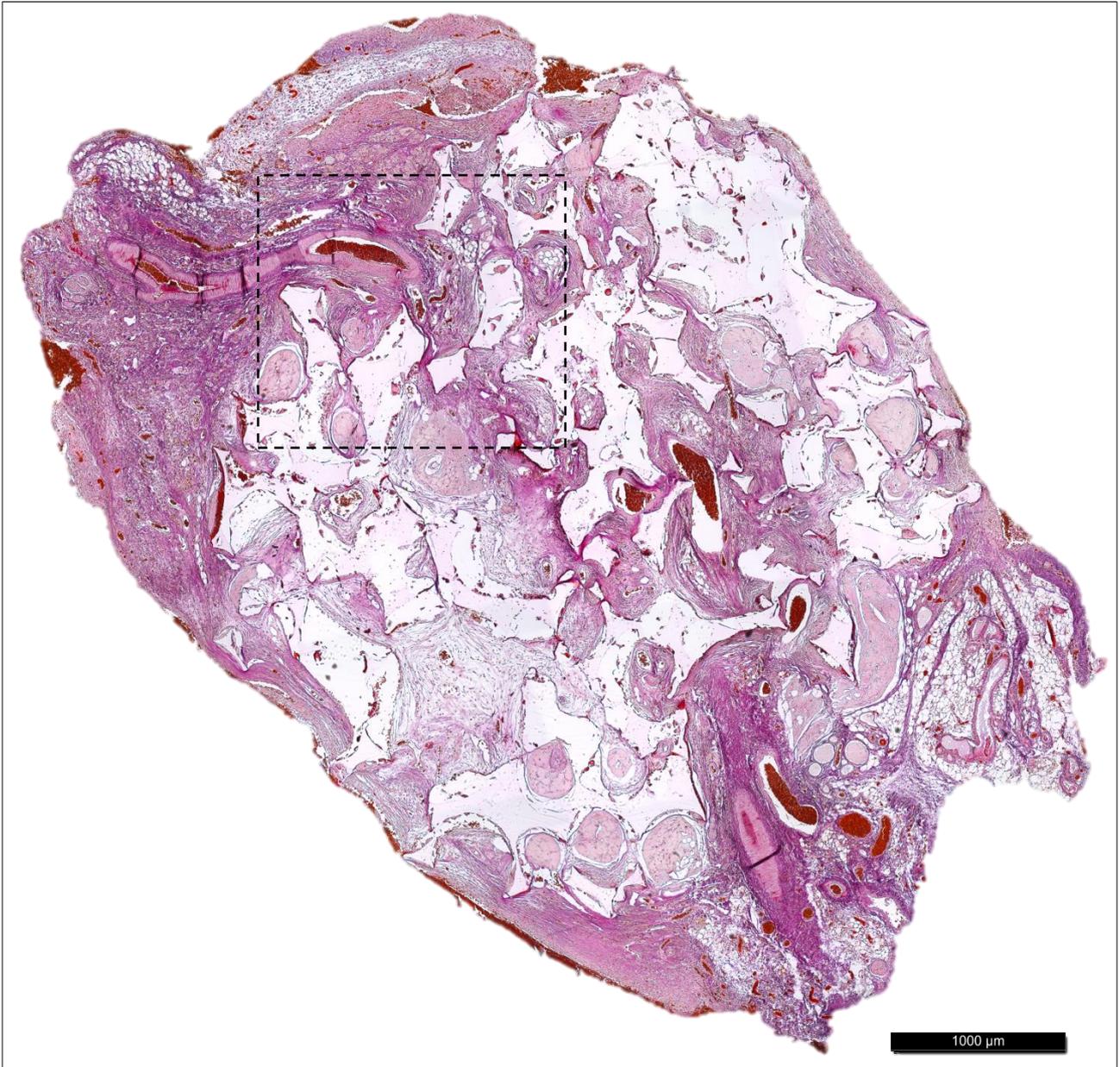
Oben: Kontrolle nach 7 Wochen Beobachtungszeit

Das Übersichtsbild zeigt die deutliche Kapselbildung mit vereinzelt Adipozyten, während im Inneren des Konstrukts kaum mehr Zellen zu finden sind. (40x Vergrößerung; Randschnitt)

Links: Vergrößerung Kontrolle 7 Wochen

Man erkennt den Übergang zwischen der Bindegewebskapsel (Pfeil) und dem Konstrukt (nicht angefärbt) gefolgt von dem Fibrinkleber (Sternchen).

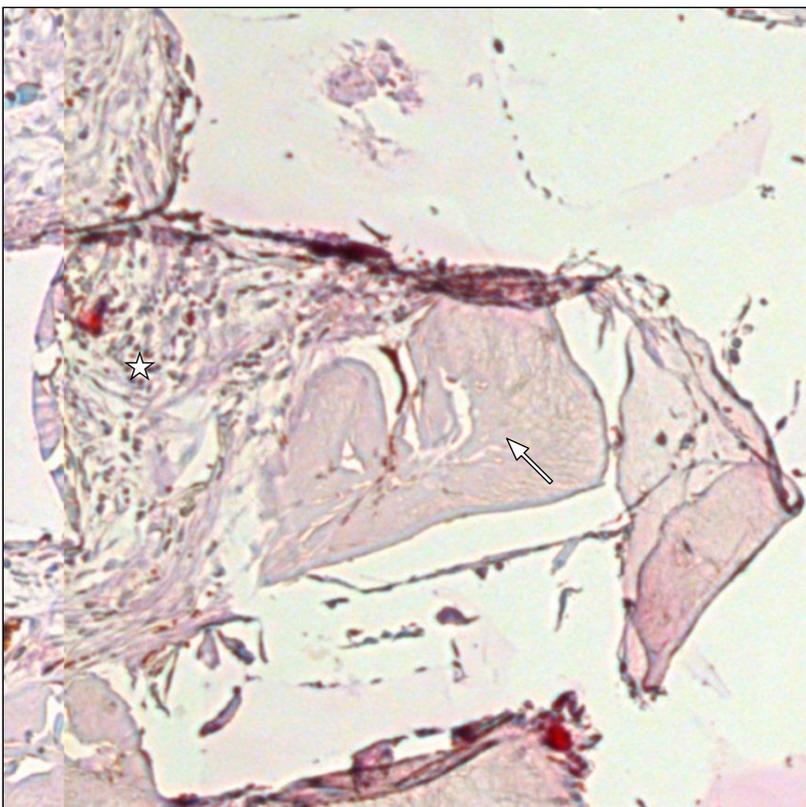
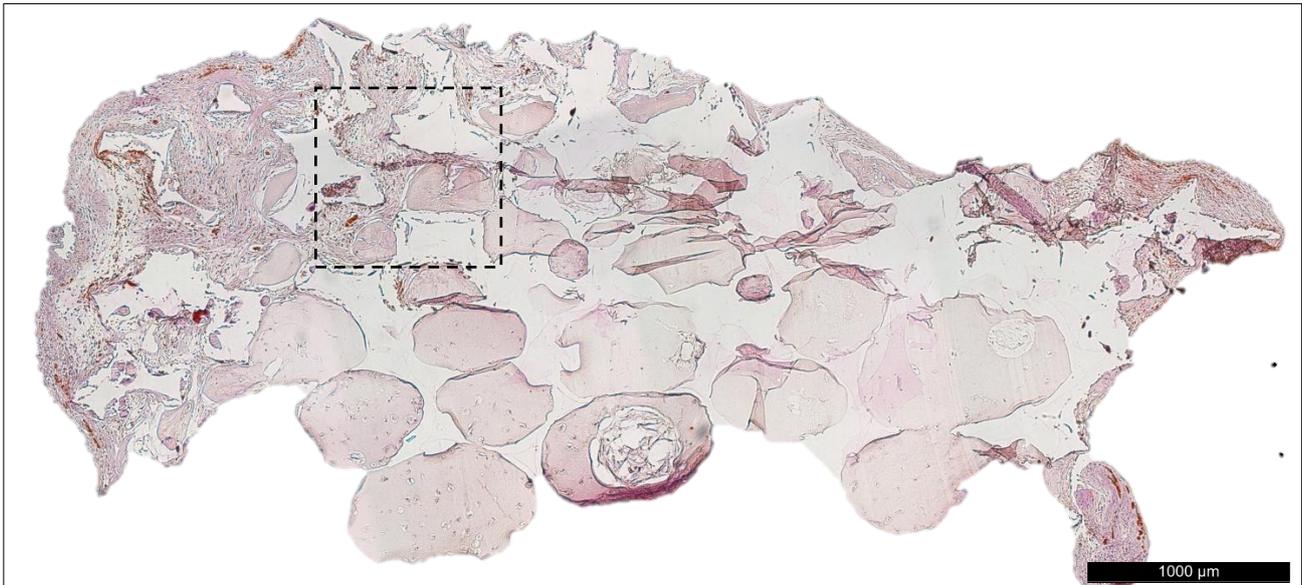
5.3.5. Gruppe E (Woche 9)

**Oben: Konstrukt 9 Wochen Beobachtungszeit**

Ein Großteil des Konstrukts wurde in Bindegewebe umgebaut. Zentral ist die Arterie angeschnitten. Es zeigen sich vor Allem um die Gefäße herum Stellen erhaltenen Fettgewebes. Das Gewebe wirkt dichter um das Gefäßbündel herum und nimmt erst wieder an der Kapsel zu (40x Vergrößerung; Zentraler Schnitt).

Links: Vergrößerung Konstrukt 9 Wochen

Um die Arterie herum zeigen sich Stellen adulten umgebauten Fettgewebes (Sternchen) und Arteriolen (Pfeile), die aus dem Stammgefäß abgehen.



Oben: Kontrolle nach 9 Wochen Beobachtungszeit

Das gesamte Konstrukt wirkt verkleinert. Es zeigen sich keine reifen Adipozyten oder einsprossende Gefäße. (40x Vergrößerung; Zentraler Schnitt)

Links: Vergrößerung 9 Wochen Beobachtungszeit

Wieder ist der Übergang zwischen Kapsel (Sternchen) und Konstrukt zu sehen. Während jene Bindegewebe aufweist, bleibt eine Besiedelung des Konstrukts (Pfeil) aus.

5.4. Neovaskularisierung

Die Neovaskularisierung wurde anhand der Anzahl der aussprossenden Gefäße aus dem Gefäßbündel bewertet (Abb. 5.4.b-e). Dafür wurden diese in den histologischen Übersichtsaufnahmen der Konstrukte ausgezählt und protokolliert.

Durchschnittlich konnten pro Konstrukt etwa 24 neue Gefäße aufgefunden werden. Es zeigte sich, dass neue Gefäße bereits nach einer bis drei Wochen in großer Anzahl vorhanden sind. Einen zusätzlichen Anstieg konnten wir nach 9 Wochen beobachten.

In den Kontrollen fanden sich keine Anzeichen einer Neovaskularisierung. Auch waren in manchen Konstrukten bei der Explantation kein Gefäßbündel mehr auffindbar.

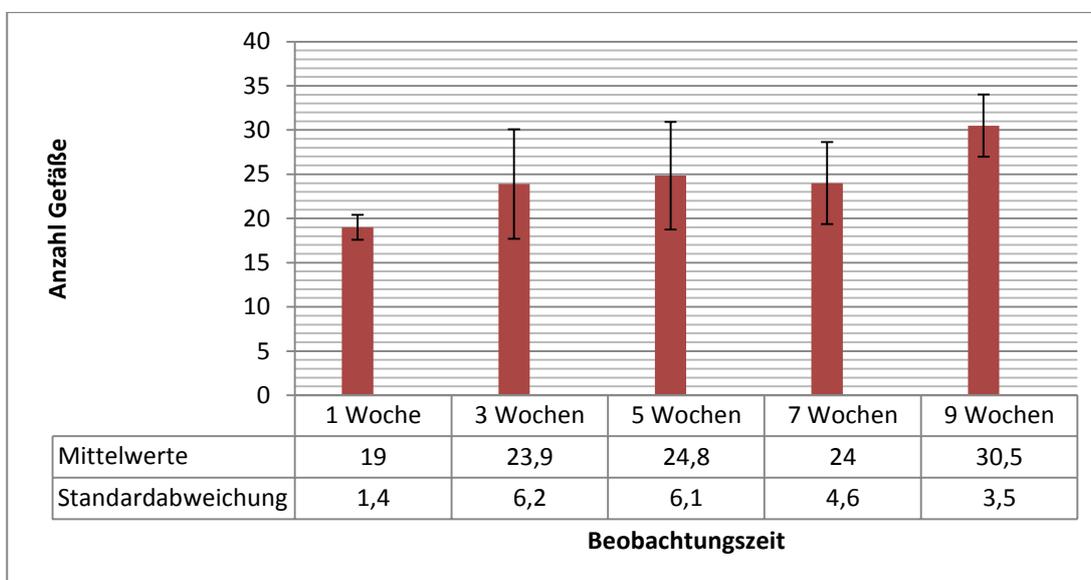


Abb. 5.4.a Neovaskularisierung

Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung der gezählten Gefäße

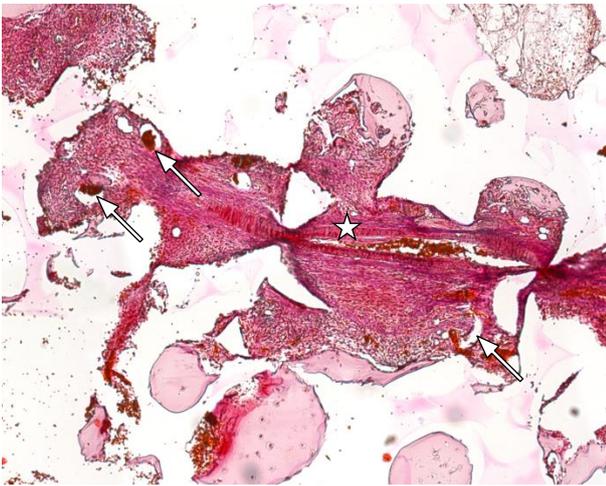


Abb. 5.4.b Neovaskularisierung Konstrukt 1 Woche

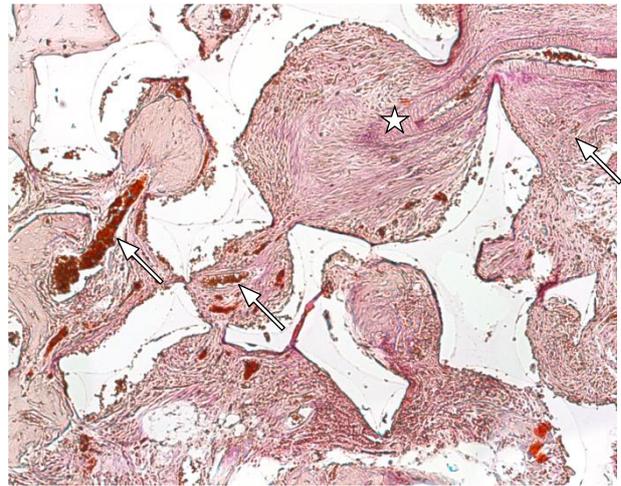


Abb. 5.4.c Neovaskularisierung Konstrukt 3 Wochen

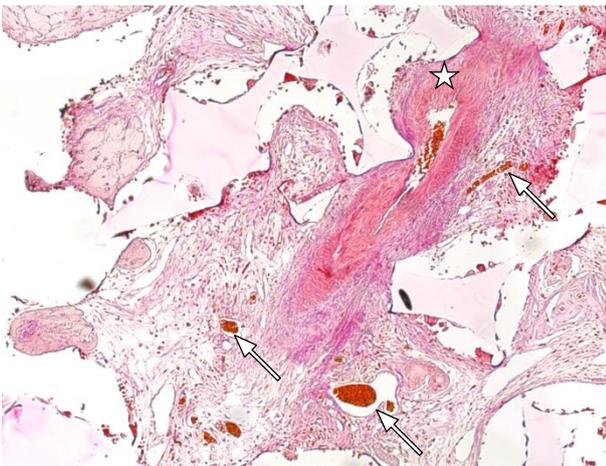


Abb. 5.4.d Neovaskularisierung Konstrukt 5 Wochen

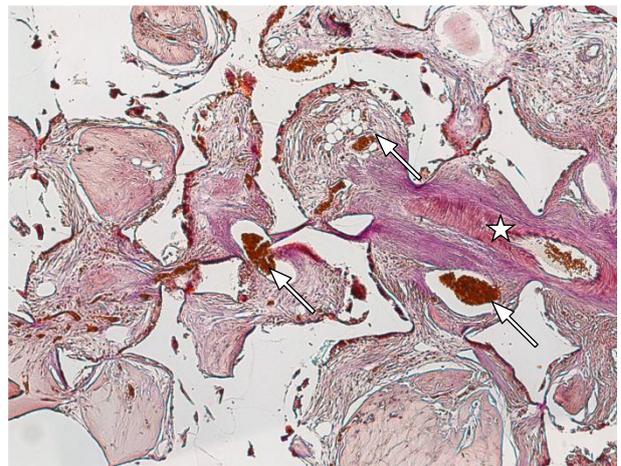


Abb. 5.4.e Neovaskularisierung Konstrukt 7 Wochen

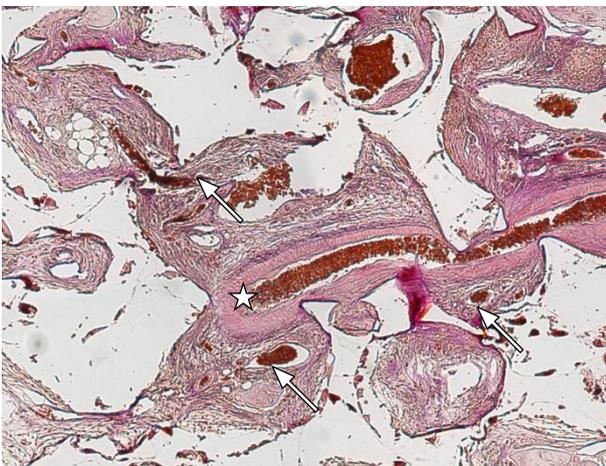


Abb. 5.4.f Neovaskularisierung Konstrukt 9 Wochen

Abb. 5.4 a-e: Zu sehen sind mediane Schnitte der Konstrukte unterschiedlicher Beobachtungszeiten auf Höhe des durchlaufenden Gefäßbündels (Stern). Die Erythrozyten sind durch die Ladewig-Färbung dunkel orange angefärbt, was die Identifikation der Gefäße (Pfeile) erleichtert. Alle 50x Vergrößerung.

5.5. Präadipozytendifferenzierung

Wie in Kapitel 5.2 beschrieben, zeigte sich anhand der Lebend-tot-Färbung, dass die Präadipozyten auch nach einer Woche Implantationszeit gut im Fibrinkleber überleben können. Nach drei Wochen allerdings differenzierten sich die Vorläuferzellen in Richtung Fibrozyten und damit in festes Bindegewebe.

Die Ausbildung fettreicher Tröpfchen blieb größtenteils aus, was auf eine Differenzierung zu adulten Fettzellen hätte schließen lassen können (siehe Abb. 5.5.a).

Jedoch zeigte sich vor allem nach 7- bis 9-wöchiger Beobachtungszeit ein vermehrtes Vorhandensein differenzierter Fettzellen in direkter Umgebung der zentralen Arterie (Abbildung 5.5a-i), was auf dem Übersichtsbild eines Konstrukts nach 9 Wochen besonders gut zu beobachten ist (Abb. 5.5.k).

Wie in Kapitel 5.3 beschrieben war jedoch ein Großteil der Konstrukte fast frei von differenzierten Fettzellen. In den Kontrollen wurden nach einer Woche Beobachtungszeit nur noch vereinzelt Fettzellen gefunden. In den späteren Kontrollen konnten keine adulten Adipozyten mehr nachgewiesen werden.

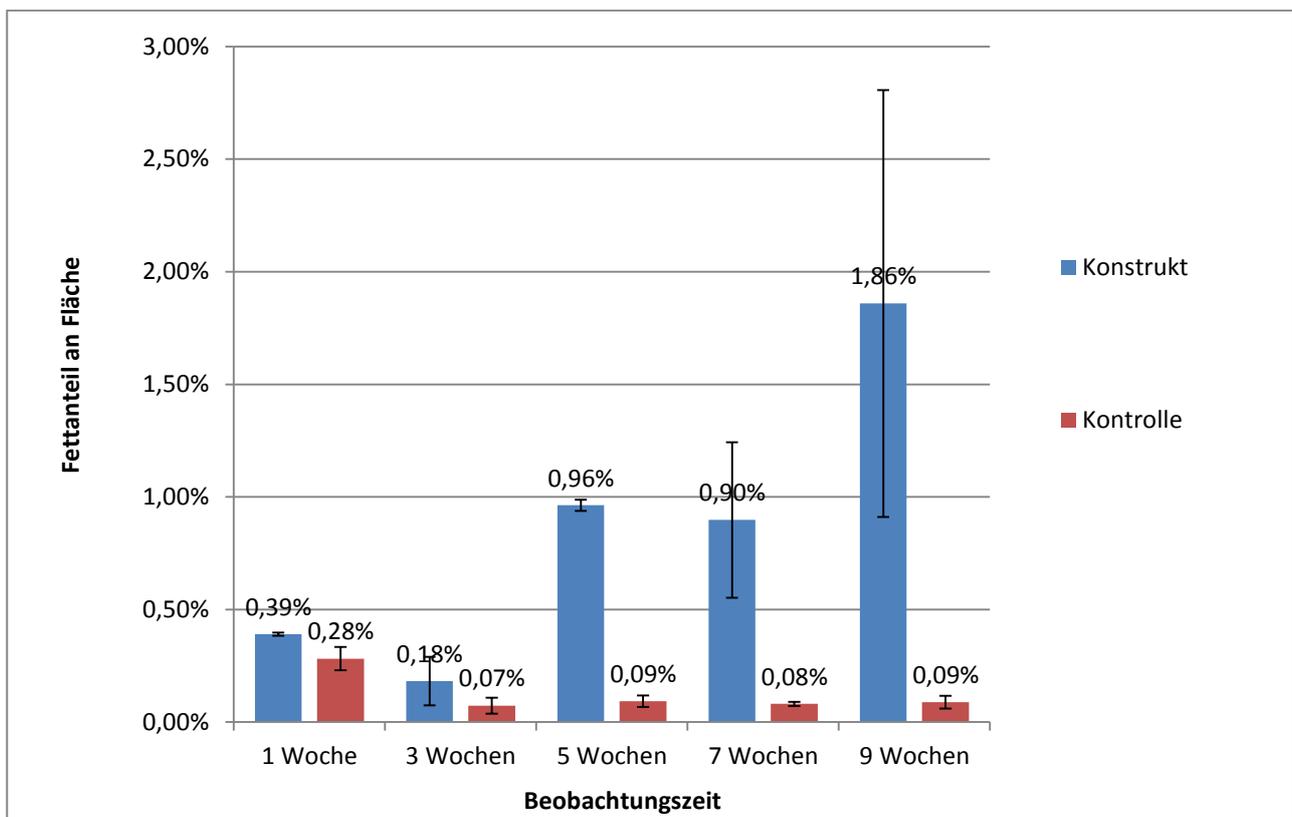


Abb. 5.5.a Auswertung Präadipozytendifferenzierung

Dargestellt sind hier die Ergebnisse der Präadipozytendifferenzierung. Dazu wurde der Flächeninhalt des von Fettzellen eingeschlossenen Areals in Verhältnis zur Gesamtfläche des Konstrukts abzüglich Kapselgewebe gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte und grafisch illustriert die jeweilige Standardabweichung.

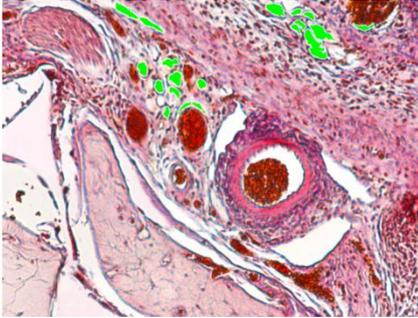


Abb. 5.5.b Periarteriellles Fett bei Konstrukt 3 Wochen

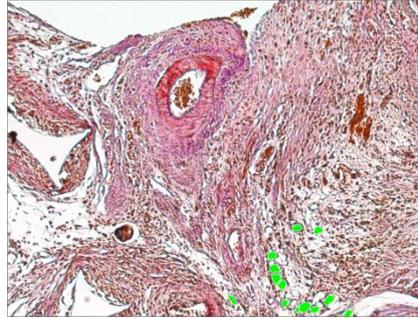


Abb. 5.5.c Periarteriellles Fett bei Konstrukt 3 Wochen

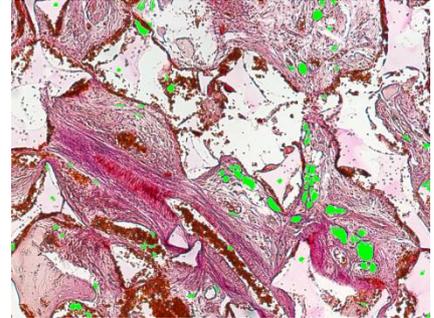


Abb. 5.5.d Periarteriellles Fett bei Konstrukt 5 Wochen

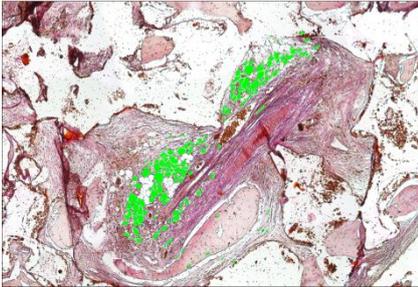


Abb. 5.5.e Periarteriellles Fett bei Konstrukt 5 Wochen

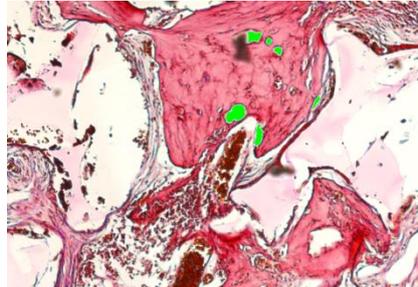


Abb. 5.5.f Periarteriellles Fett bei Konstrukt 7 Wochen

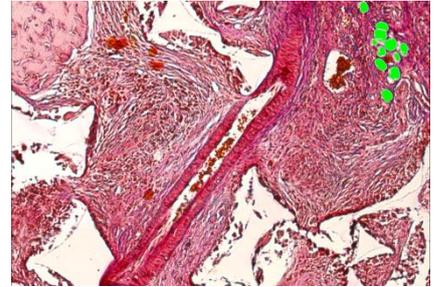


Abb. 5.5.g Periarteriellles Fett bei Konstrukt 7 Wochen

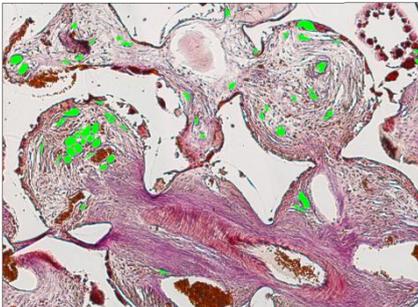


Abb. 5.5.h Periarteriellles Fett bei Konstrukt 7 Wochen

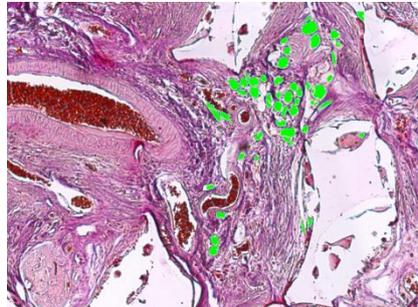


Abb. 5.5.i Periarteriellles Fett bei Konstrukt 9 Wochen

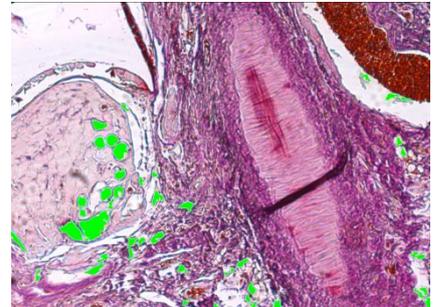


Abb. 5.5.j Periarteriellles Fett bei Konstrukt 9 Wochen

Abb 5.5.a-i: Zu sehen sind mediane Schnitte von Konstrukten unterschiedlicher Beobachtungszeit auf Höhe des zentralen Gefäßbündels. Es zeigt sich das vermehrte Vorhandensein differenzierter Adipozyten (grün markiert) in Nachbarschaft der Gefäße.

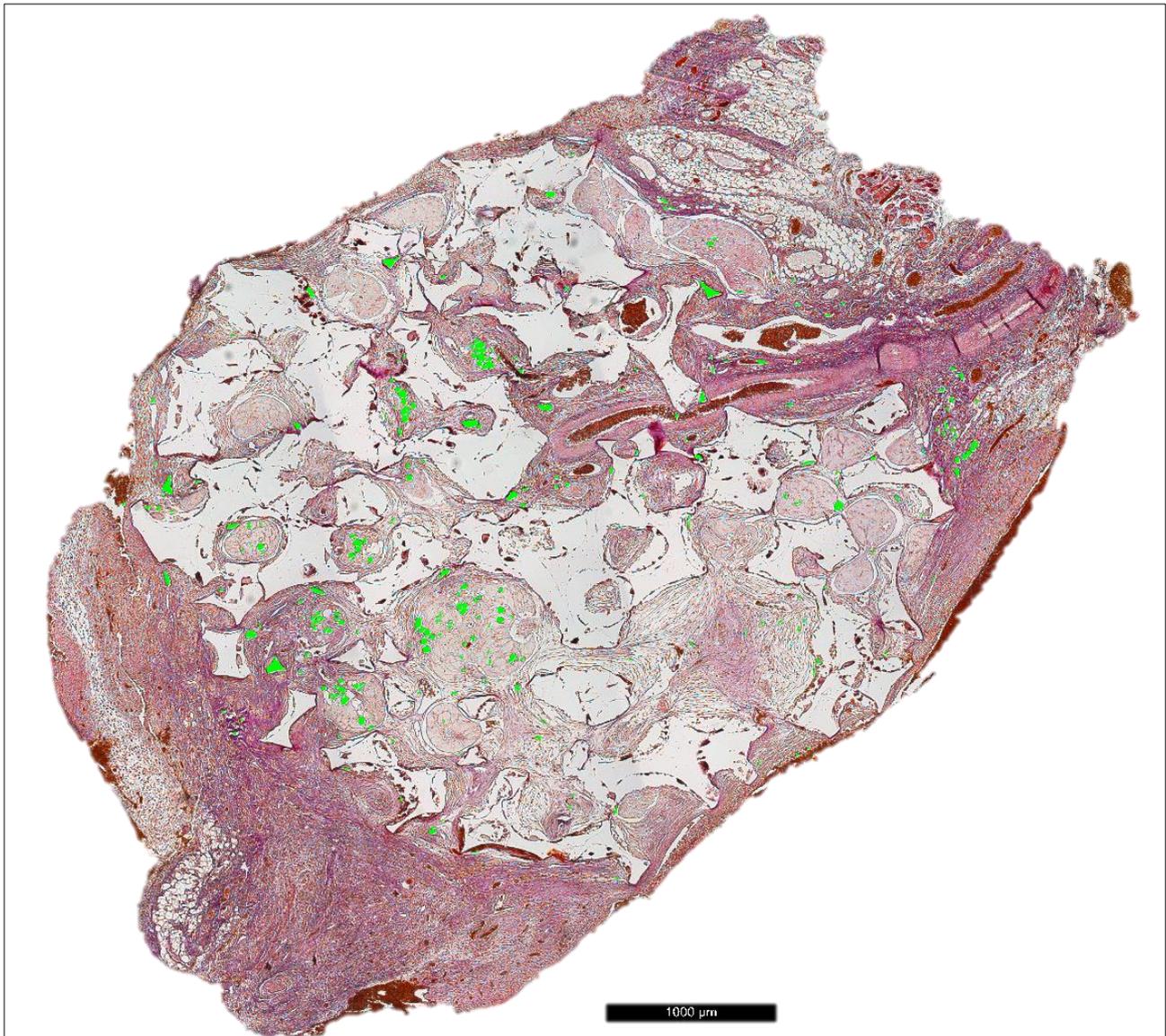


Abb. 5.5.k Auswertung der Adipozyten eines Konstrukt nach 9 Wochen

Die Adipozyten sind nach automatisierter Auswertung grün hervorgehoben. Gewertet wurde nur der zentrale ovale Bereich; die Ränder gehören zur Bindegewebskapsel. Es zeigt sich deutlich die mit der Neovaskularisierung einhergehende Differenzierung der Adipozyten in Nähe des zentralen Gefäßes (40x Vergrößerung; Zentraler Schnitt).

6. Diskussion

Das wissenschaftliche Ziel des Tissue Engineerings ist die biotechnologische Herstellung funktionellen menschlichen Gewebes. Dabei liegt das Augenmerk dieser vorliegenden Arbeit besonders in der Etablierung der Grundlagen neuer Methoden zur Rekonstruktion von komplexen Gewebedefekten im Sinne plastisch-rekonstruktiver Deckungen.

Hierfür wurden in dieser Arbeit folgende Techniken des Tissue Engineerings angewendet und sollen im nun Folgenden diskutiert werden:

6.1. *Isolation und Kultivierung von humanen Vorläuferzellen*

Die Optimierung der Isolation und Kultivierung von Präadipozyten war, wie erwähnt, Gegenstand früherer Arbeiten der Forschungsgruppe. Bei der Isolation der Fettvorläuferzellen aus den Op-Resektaten wurde auf ein modifiziertes Protokoll nach Hauner zurückgegriffen (Hauner, 2001). Dabei zeigte sich eine gute Effizienz bei der Ausbeute an Präadipozyten. Durch die in dieser Arbeit verwendete Prozedur konnten pro 100 g Ausgangsgewebe etwa 5 Millionen Zellen isoliert werden. Nach fortschreitender Entwicklung neuer Zellkulturmedien lässt sich in neu anzustrebenden Studien womöglich die Effizienz der Präadipozyten-Ausbeute und Kultivierung sogar noch weiter erhöhen. Um diese Effizienzsteigerung zu erzielen spielen auch unterschiedliche Vorbehandlungen der Zellkulturen eine Rolle. Etwa favorisieren manche Studien die Lyse von Erythrozyten, die nach dem Gewebsverdau zurückgeblieben waren (Horn, 2008). In unserer Arbeitsgruppe allerdings konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden, weshalb von diesem Vorgehen abgesehen wurde.

In Hinblick auf Amplifikation und Differenzierung der Präadipozyten sind die komplexen Interaktionen unterschiedlicher Wachstumsfaktoren und Zytokine von der Forschung bei weitem noch nicht vollständig verstanden. Der Einfluss dieser Wechselwirkungen auf die Proliferationsrate und das Differenzierungsverhalten der Zellen *in vitro* und *in vivo* ist von größter Bedeutung und wird in Zukunft maßgeblich die Entwicklung von Zellkulturzusätzen beeinflussen.

Dies könnte die meist fehlende Differenzierung der Präadipozyten in der vorliegenden Untersuchung erklären. Durch ihre Multipotenz sind diese befähigt sich zu unterschiedlichen Zelllinien zu differenzieren (Zhao, 2011). Die Vorläuferzellen brauchen also einen adäquaten Stimulus, wie beispielsweise die Präsenz von Insulin (Hauner, 1989), um sich in reife Fettzellen zu entwickeln.

Die Studie von Weiser zeigte (Weiser, 2008), dass die präoperative Präkultivierung der Konstrukte

mit Insulin die Differenzierung in reife Fettzellen deutlich anregt. Hierbei spielt insbesondere die Dauer der Induktion eine entscheidende Rolle. Weitere Untersuchungen dazu werden zurzeit in unserer Forschungsgruppe ausgewertet.

Die Amplifikation der Vorläuferzellen ist ein weiterer wichtiger Aspekt der Kultivierung. Letztendlich wurde bisher jedoch noch kein Weg gefunden, die Zellzahl des zu transplantierenden Gewebes auf ein klinisch anwendbares Level zu erhöhen. Zur Beimpfung der Scaffolds mit Präadipozyten sind derzeit noch große OP-Resektate (z.B. Abdominoplastik, Mammareduktion) von Nöten. Die gewonnene Menge an transplantierbarem Gewebe ist somit von einer klinischen Anwendung weit entfernt. Einen Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems bietet die Zugabe mitogener Substanzen wie bFGF, PDGF-BB und EGF (Tabata, 2000; Tegtmeier, 2004; Tsuji, 2008). Wie bei jeder Zellproliferationssteigerung kann es jedoch hier zu Dedifferenzierung der Zellen und somit zur Tumorentstehung kommen. Eine ausreichend hohe Zellproliferation bei gleichzeitiger Verhinderung von Mutation ist Grundbedingung für ein erfolgreiches Tissue Engineering.

Eine Möglichkeit liegt in der mehrmaligen Passagierung der Zellen. Somit lässt sich durch die klonale Expansion der Präadipozyten der Ertrag an Vorläuferzellen vervielfachen. Jedoch stellt der Vorgang der Trypsinierung eine potenzielle Schädigung der Stammzellen dar. In Versuchsaufbau 2 (siehe Kapitel 4.5.2) dieser Arbeit wurden Zellkulturen verwendet, welche aus Mangel an Präadipozyten öfter passagiert worden waren als in Versuchsaufbau 1 und 3 (Passage 2/3 vs Passage 1). Die Vergleichbarkeit der Gruppen ist jedoch trotzdem gegeben. Aus der Literatur (Zhao, 2011) ist bekannt, dass Präadipozyten relativ resistent in Hinblick auf den Verlust von Differenzierungspotential durch die Trypsinierung bis Passage 5 sind und somit kein signifikanter Qualitätsunterschied zwischen den Gruppen der Passage 1 bzw. Passage 2 oder 3 besteht.

6.2. Einbringen der Zellen in eine dreidimensionale Trägermatrix

Das Beimpfen oder Besiedeln beschreibt den Prozess, bei dem die *in vitro* kultivierte Zellkultur in eine räumliche Trägersubstanz integriert wird, um dadurch definierte räumliche Konstrukte herstellen zu können. Diesbezüglich ist es unerlässlich die zu implantierenden Zellen fest an das Gerüst zu binden, um ein Absinken oder sogar Auswaschen der Zellen zu verhindern. Zu diesem Zweck hat sich Fibrinkleber als besonders nützlich erwiesen (Cho, 2005; Schoeller, 2001), weil er zum einen wieder leicht durch körpereigene Enzyme abgebaut werden kann, und zum anderen im Rahmen der Entzündungsreaktion einen Faktor für Neovaskularisierung darstellt (van Hinsbergh, 2001; Eyrich, 2007). Dabei ist die optimale Konzentration der Komponenten des Klebers wichtig, da sich zum Beispiel eine zu hohe Konzentration an Fibrin negativ auf die

Differenzierungsfähigkeit der Präadipozyten auswirken kann (Aoyagi, 2012) und eine zu niedrige Konzentration die Festigkeit beeinträchtigt. Versuche dazu wurden bereits in Kooperation mit unserer Forschungsgruppe durchgeführt (Eyrich, 2007). Mit diesem Vorwissen konnte in dieser Arbeit ein optimales Gemisch aus Fibrinogen und Thrombin verwendet werden (siehe Kapitel 4.3).

Auch die Auswahl des verwendeten Materials für das Scaffold wird in der Literatur nach wie vor uneinheitlich bewertet. Bisläng wurden unterschiedlichste Verbindungen eingesetzt, von bioabbaubaren Polymerschwämmen aus PLGA (Lee, 2000; Patrick, 1999) über Kollagen- und Hyaluronsäureschwämme (von Heimburg, 2001) bis hin zu Polycaprolacton (Schantz, 2002) (Weiser, 2008). Metaanalysen der bestehenden Literatur konnten bisher noch keinen für alle Indikationen optimalen Trägerstoff bestimmen (Patrick, 2008). Die Forminstabilität von löslichen Komponenten macht deren Einsatz für komplexe dreidimensionale Defektdeckungen, wie zum Beispiel Ohrmuschelrekonstruktionen (Staudenmaier, 2004), unpraktikabel. Solide Scaffolds aus Fremdmaterial wiederum erzeugen häufig eine Fremdkörperreaktion mit Kapselbildung und Sklerosierung in unterschiedlichem Ausmaß (Holmes, 1990). Die Halbwertszeit im Gewebe spielt hierbei eine wichtige Rolle.

In dieser nun zur Diskussion stehenden Studie wurde nach unserem Wissen zum ersten Mal Polyurethanschaum als Scaffold für Präadipozyten zur Implantation mit Gefäßanschluss verwendet. Dieses Material war in unserer Forschungsgruppe bereits Gegenstand verschiedener Versuchsreihen zur Beimpfung mit Chondrozyten. Dabei erwies es sich aufgrund seiner Biokompatibilität und Formfestigkeit gut geeignet (Hoang, 2009; Lotz, 2009). Der Vergleich mit aus Polycaprolacton gefertigten Scaffolds wies zudem eine stärkere Neovaskularisierung und Adipogenese bei den Polyurethangerüsten auf (Wiggenhauser, 2011).

Es hat sich in Studien gezeigt, dass auch die vorgegebene räumliche Struktur und die Porengröße im Scaffold einen großen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat (Stenhamre, 2011). Die Poren der Trägermatrix sind als eine Art Migrationsschiene zu sehen (Tegtmeier, 2004), welche vermutlich einen Wachstumsreiz auf die Zellen bewirkt. Hierbei ist es von entscheidender Bedeutung, die Porengröße möglichst konstant zu halten, sowie eine Interkonnektivität zwischen den Poren zu gewährleisten. Dabei sollten die Poren etwa 200 µm im Durchmesser groß sein, um den reifen Adipozyten genügend Platz zur Bildung der Fettvakuole zu bieten. Mikro-CT-Aufnahmen der Polyurethanscheibchen können helfen die Qualität der Scaffolds im Vorfeld der Versuche zu überprüfen.

Einen weiteren bedeutsamen Faktor für die Proliferationsrate und das Differenzierungsverhalten der Präadipozyten stellt die Extrazelluläre Matrix dar (Cronin, 2007). So zeigte etwa Kral, dass eine Umgebung von Fibronectin die Proliferationsrate steigern kann (Kral, 1999). Seitdem versuchen Studien den Einfluss verschiedener Bestandteile der EZM wie Fibronektin, Gelatine, Kollagen G und Poly-D-Lysin zu evaluieren (Tegtmeier, 2004). Da hierbei wieder multiple Interaktionen zwischen verschiedenen Zelllinien und eingebrachten Wachstumsfaktoren auftreten können, die sich ihrerseits negativ auf Differenzierung und Proliferation auswirken können, sind standardisierte Versuchsbedingungen von zentraler Bedeutung. Inwiefern von außen zugebrachte Wachstumsstimulatoren oder sogenannte controlled drug delivery systems, die adipogene Substanzen wie Insulin, IGF-1 oder Dexamethason (Kral, 1999; Tabata, 2000) kontrolliert über längere Zeit abgeben, die Proliferation und Differenzierung von Fettvorläuferzellen anregen können, muss Gegenstand weiterer Forschung sein.

6.3. Vaskuläre Integration des Konstrukts durch Gefäßeinlage

In dieser Arbeit wurde im Sinne des Durchfluß-Modells versucht, durch Einlage des femoralen Gefäßbündels der Maus in das Scaffold (siehe Absatz 3.4), die Mikrovaskularisierung zu optimieren und die klinische Anwendbarkeit durch Präfabrikation des Konstrukts zu verbessern. Beim Durchfluß-Modell bleibt das in das Konstrukt implantierte Gefäßbündel in seiner Kontinuität erhalten. Dieses Modell wurde gewählt, weil es in früheren Arbeiten der Forschungsgruppe nach der Ligatur vermehrt zur Thrombosierung des Gefäßbündels kam (Dissertation Th. Gehrke) und ein arterio-venöser Shunt bei dem Gefäßlumen nicht möglich war.

In der histologischen Untersuchung konnte nun gezeigt werden, dass eine deutliche Neoangiogenese stattfand und diese zur suffizienten Nutrition des Konstrukts beitrug. Die Ummantelung durch den Silikonstreifen sorgte dafür, dass die Gefäße nicht aus der Gewebepерipherie, sondern aus der durchfließenden Arterie einsprossen. Das Maximum der Neoangiogenese schien nach 1-3 Wochen erreicht zu sein. Diese Ergebnisse decken sich mit vorangegangenen Studien des Arbeitskreises (Hoang, 2005). Nach 9 Wochen Beobachtungszeit konnten noch einmal mehr Gefäße gefunden werden. Dies könnte Ausdruck einer Entzündungsreaktion sein. In manchen Konstrukten waren bei der Explantation keine Gefäßbündel mehr auffindbar. Trotz der erfolgten Kontrolle könnte dies Folge einer eventuellen Torquierung der Gefäße während der Implantation und der resultierenden Nekrose gewesen sein.

Die spätere Anwendung des Konstrukts als präfabrizierten Lappen verlangt ein anastomosierbares Gefäßbündel, was wegen der Größe der Leistengefäße der Maus nicht gegeben ist. Deshalb muss

die weitere Erforschung der Transplantierbarkeit anhand größerer Tiere wie z.B. dem Kaninchenmodell (Hoang, 2009) erfolgen.

Die Wahl des Präfabrikationsmodells ist ein weiterer Faktor für Gewebewachstum und Neovaskularisation. So beschreiben mehrere Studien unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten für Modelle mit arteriovenösen Shunts, Gefäßligaturen und das Durchfluß-Modell (Tanaka, 2003). Während die Neovaskularisation bei dem Shunt mit venösem Interponat am stärksten ausgeprägt zu sein scheint, ist die klinische Umsetzung wegen der relativ unkomplizierten Operation bei der Gefäßligatur einfacher (Dolderer, 2010). Dies muss aber in weiteren Analysen evaluiert werden.

6.4. Histomorphometrische Evaluation

Die Konstrukte wurden nach der jeweiligen Beobachtungszeit explantiert, paraffiniert und mit H.E., sowie nach Ladewigs Trichromfärbung gefärbt. Diese erleichtert das Auffinden von Gefäßen durch die orange Färbung von Erythrozyten. Die mikroskopischen Mosaikaufnahmen, die von den Präparaten erstellt wurden, erlaubten dabei eine adäquate Beurteilung des gesamten Querschnitts eines Konstruktes. Dadurch konnten auch automatisierte Bildverarbeitungsalgorithmen von *ImageJ* verwendet werden, um histologische Strukturen definierter Größe und „Kreis-Ähnlichkeit“ zu detektieren und standardisiert auszuwerten.

Zur Detektion von Gefäßen eignete sich die Prozedur dabei nicht, weil der Kontrast der Erythrozyten gegenüber anderen Konstruktbestandteilen zu gering für eine elektronische Auswertung durch Bildbearbeitungsprogramme ist. Die Anzahl neuer Gefäße erfolgte stattdessen durch Auszählen anhand der typischen Morphe.

Abschließend bleibt zu sagen, dass die automatisierte Auswertung von gefärbten Schnitten mit Bildverarbeitungsalgorithmen durchaus seine Berechtigung in wissenschaftlichen Analysen haben kann. Es sind allerdings größere Geweb sareale mit deutlichem Kontrast zur Umgebung notwendig, damit eine valide Detektion durch das Programm gelingt. Dabei ist vor allem an immunhistochemische Färbeverfahren zu denken, welche eben selektiv die zu untersuchende Gewebsfraktion anfärbt. Dadurch erleichtert sich eine automatisierte Auswertung erheblich.

Bei der Auswertung der Neovaskularisation könnten histochemische Färbemethoden gegen Endothelzellen z.B. mit *Griffonia simplicifolia lectin* helfen, Gefäße spezifisch anzufärben (Bankston, 1991).

Nicht vergessen werden darf auch eine Differenzierung zwischen humanem und murinem

Fettgewebe. Anhand einer Trichchromfärbung kann dies nicht erfolgen. In dieser Arbeit wurden Areale außerhalb des runden Querschnitts des Konstrukts nicht als menschliches, sondern als Einwanderung von Fettgewebe der Maus gewertet. Des Weiteren muss diskutiert werden, ob das um das Gefäßbündel gefundene Fett tatsächlich differenzierte menschliche Fettzellen darstellen, oder ob es sich um während der Gefäß-Implantation eingebrachtes Fettgewebe handelt. Die Identifikation humaner Zellen innerhalb des Konstrukts muss durch spezielle immunhistochemische Färbeverfahren erfolgen. Hierfür würden sich Antikörper anbieten, die beispielsweise gegen humanes Vimentin gerichtet sind (Tsuji, 2008).

7. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Polyurethan auf Eignung als Trägersubstanz zu untersuchen, das Überleben der Präadipozyten nachzuweisen, eine Neovaskularisierung durch das eingebrachte femorale Gefäßbündel zu begünstigen, sowie eine Differenzierung der Fettvorläuferzellen zu erwirken.

Die Analyse hat gezeigt, dass eine Optimierung der Vaskularisierung von Scaffolds mit dem hier beschriebenen Versuchsaufbau möglich ist. Vor allem nach 3 Wochen zeigten sich deutlich aussprossende Gefäße aus dem Hauptast der Arterie. Da das Konstrukt zur Umwelt hin durch den Silikonmantel abgegrenzt war, konnte man die Neovaskularisierung des Konstrukts diesem Gefäßbündel zuschreiben. Durchschnittlich waren in den histologischen Übersichtsbildern etwa 24 neue Gefäße pro Ausschnitt aufzufinden.

Das Ergebnis der Differenzierung der Präadipozyten in Richtung reifer Fettzellen war größtenteils negativ. Nach etwa 3 Wochen zeigte sich ein progredienter Umbau der Präadipozyten in Richtung fibrozytischem Bindegewebes.

Bemerkenswert war dabei jedoch, dass die Präadipozyten periarteriell häufiger überlebten und diese sich sogar in adulte Fettzellen differenzierten.

Im Mosaik der Schnitte ließ sich zudem ein weiterer Effekt erkennen. Um die versorgende Arterie herum, war das erhaltene Bindegewebe deutlich dichter, was sich in die Periphere etwas ausdünnte, um dann am Rand des Konstrukts wieder dichter zu werden. Dieses kann als Zeichen dafür gewertet werden, dass die aussprossenden Gefäße zumindest die periarterielle Umgebung erfolgreich mit Nährstoffen versorgt haben. Am Rand des Konstrukts erfolgte die Nutrition am ehesten durch Diffusion des umliegenden Gewebes. Hier konnten neue Zellen einsprossen, da der Silikonstreifen nicht vollständig abgedichtet werden kann.

Letztlich könnte das vorliegende Konzept der Gefäßeinlage im Durchfluß-Model einen Grundstein zur Präfabrikation des Konstrukts als Grundlage für spätere Transplantation darstellen.

In einer neuen Versuchsreihe unserer Forschungsgruppe wird derzeit untersucht, welche Präkultivierungsstrategie die Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Fettzellen am effektivsten anregt. Dafür wurden die Konstrukte vor der Operation zwei Tage in ein Induktionsmedium mit Insulin gegeben und nach unterschiedlich langer Zeit zur Differenzierung in die Mäuse implantiert. Die Ergebnisse werden zurzeit noch ausgewertet.

8. Literaturverzeichnis

- Aguilar, E., Kastenbauer, E. (2005). *Ästhetische und Plastische Chirurgie an Nase, Gesicht und Ohrmuschel*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Aoyagi, Y., Kuroda, M., Asada, S., Tanaka, S., Bujo, H. (2012). Fibrin glue is a candidate scaffold for long-term therapeutic protein expression in spontaneously differentiated adipocytes in vitro. *Exp Cell Res*(318), S. 8-15.
- Bankston, P. W., Porter, G. A., Milici, A. J., Palade, G. E. (1991). Differential and specific labeling of epithelial and vascular endothelial cells of the rat lung by Lycopersicon esculentum and Griffonia simplicifolia I lectins. *Eur J Cell Biol*(54), S. 187-95.
- Benninghoff, Drenckhahn. (2003). *Anatomie - Band 1*. Urban & Fischer, München.
- Biemer, E., Höhnke, C. (2007). Plastische Chirurgie. In J. Siewert, *Basiswissen Chirurgie*. Thieme Verlag, Heidelberg.
- Cho, S. W., Kim, S. S., Won Rhie, J., Mi Cho, H., Yong Choi, C., Kim, B. S. (2005). Engineering of volumestable adipose tissues. *Biomaterials*(26), S. 3577-85.
- Cordeiro, P. G. (2008). Breast reconstruction after surgery for breast cancer. *N Engl J Med*(359), S. 1590-1601.
- Cronin, K. J., Messina, A., Thompson, E., Morrison, W., Stevens, G., Knight, K. (2006). The Role of Biological Extracellular Matrix Scaffolds in vascularized three-dimensional Tissue growth in vivo. *InterScience*(82), S. 122-128.
- Dolderer, J. H., Kehrer, A., Schiller, S. M., Schröder, U. H., Kohler, K., Schaller, H. E., Siegel-Axel, D. (2010). De-novo generation of vascularized tissue using different configurations of vascular pedicles in perforated and closed chambers. *Wien Med Wochenschr.*(160), S. 139-46.
- Eremia, S., Newman, N. (2000). 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), S. 1150.
- Eyrich, D., Brandl, F., Appel B, Wiese, H., Staudenmaier, R., Blunk, T. (2007). Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials*(28), S. 55-65.
- Fagrell, D., Enestrom, S., Berggren, A., Kniola, B. (1996). Fat cylinder transplantation: an experimental comparative study of three kinds of fat transplants. *Plast Reconstr Surg*(98), S. 97-98.
- Feucht, A., Hoang, N. T., Hoehnke, C., Hien, P. T., Mandlik, V., Storck, K., Staudenmaier, R. (2011). Neovascularisation and free microsurgical transfer of cartilage-engineered

- constructs. *HNO*(59), S. 239-47.
- Hauner H, S. T. (2001). Cultures of human adipose precursor cells. *Methods Mol Biol*(155), S. 239-247.
- Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Pfeiffer, E. F. (1989). Promoting Effect of Glucocorticoids on the Differentiation of Human Adipocyte Precursor Cells Cultured in a Chemically Defined Medium. *J. Clin. Invest*(84), S. 1663-70.
- Hausman, G. J., Richardson, R. L. (March 2004). Adipose tissue angiogenesis. *J ANIM SCI*(82), S. 925-934.
- Hoang, N. T., Hoehnke, C., Hien, P. T., Mandlik, V., Feucht, A., Staudenmaier, R. (2009). Neovascularization and free microsurgical transfer of in vitro cartilage-engineered constructs. *Microsurgery*, 29, S. 52-61.
- Hoang, N. T., Kloeppe, M., Werner, J., Staudenmaier, R., Biemer, E. (2005). Proposed new method for angiographically quantifying neovascularization in prefabricated flaps. *Microsurgery*(25), S. 220-6.
- Holmes, R. E. (1990). Alloplastic Implants. In J. G. MacCarthy, *Plastic Surgery* (S. 698-731). Philadelphia: Saunders.
- Horn, P., Bork, S., Diehlmann, A., Wagner, W. (2008). Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell lysis. *Cytotherapy*(10), S. 676-85.
- Junqueira, Carneiro. (2005). *Histologie*. (Gratzl, Hrsg.) Springer Verlag, Berlin.
- Kral, J., Crandall, D. (1999). Development of a human adipocyte synthetic polymer scaffold. *Plast Reconstr Surg*, 104(6), S. 1732-1738.
- Langer, R., Vacanti, J. (1993). Tissue Engineering. *Science*(260), S. 920-926.
- Lee, K., Halberstadt, C. H., Mooney, D. (2000). Breast reconstruction. In R. a. Langer, *Principles of tissue engineering* (S. 409-423). Academic Press, San Diego.
- Lotz, A. S., Havla, J. B., Richter, E., Staudenmaier, R., Kleinsasser, N. H. (2009). Cytotoxic and genotoxic effects of matrices for cartilage tissue engineering. *Toxicol Lett.*(190), S. 128-33.
- Mauth, C., Bono, E., Haas, S., Paesold, G., Wiese, H., Graf-Hausner, U. (2009). Cell-seeded polyurethan-fibrin structures - a possible system for intervertebral disc regeneration. *European Cells and Materials*, 18, S. 27-39.
- Miller, M. J., Patrick, C. W. (2003). Tissue Engineering. *Clin Plast Surg.*(30), S. 91-103.
- Müller, M. (2005). *Kokultivierung humaner Präadipozyten und Endothelzellen zur Züchtung von kapillarisiertem, autologem Fettgewebe*. Freiburg.
- Neuber, G. (1893). *Fetttransplantation*. Dtch Gesellschaft Chir.
- Patrick, C. W., Chauvin, P. B., Hobbey, J., Reece, G. P. (1999). Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering. *Tissue Eng.*(5), S. 139-151.

- Patrick, C. W., Uthamanthil, R., Beahm, E., Frye, C. (2008). Animal Models for Adipose Tissue Engineering. *Tissue Engineering*(14), S. 167-178.
- Patrick, C., Chauvin, P., Robb, G. (1998). Tissue engineered adipose tissue. *Frontiers in Tissue Engineering*.
- Schantz, J., Hutmacher, D. W., Nq, K. W., Lim, M. T., Teoh, S. H. (2002). Evaluation of a tissue-engineered membrane-cell construct for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*(17), S. 161-74.
- Schmidt, Lang. (2007). *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag.
- Schoeller, T. H., Lille, S., Wechselberger, G., Otto, A., Mowlavi, A., Piia-Katzer, H. (2001). Histomorphologic and volumetric analysis of implanted autologous preadipocyte cultures suspended in fibrin glue: a potential new source of tissue augmentation. *Aesthetic Plast. Surg.*(25), S. 57-63.
- Shen, T. (1982). Microvascular transplantation of prefabricated free tight flap. *Plast Reconstr Surg*(69), S. 568.
- Skalak, R. (1988). *Tissue Engineering*. New York: Liss.
- Staudenmaier, R. (2004). Gezüchtetes Knorpelgewebe in einem präfabrizierten, mikrovaskulären Lappen. *HNO*(52), S. 510-517.
- Stenhamre, H., Nannmark, U., Lindahl, A., Gatenholm, P., Brittberg, M. (2011). Influence of pore size on the redifferentiation potential of human articular chondrocytes in polyurethan urea scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.*(5), S. 578-88.
- Tabata, Y., Miyao, M., Inamoto, T., Ishii, T., Hirano, Y., Yamaoki, Y., Ikada, Y. (2000). De novo formation of adipose tissue by controlled release of basic fibroblast growth factor. *Tissue Engineering*(6(3)), S. 279-289.
- Tanaka, Y., Sung, K., Tsutsumi, A., Wayne, A. (2003). Tissue Engineering Skin Flaps: Which Vascular Carrier, Arteriovenous Shunt Loop or Arteriovenous Bundle, Has More Potential for Angiogenesis and Tissue Generation? *Plastic and Reconstructive Surgery*(112), S. 1636-44.
- Tegtmeier, F. (2004). *Tissue Engineering von Fettgewebe durch Kultivierung humaner Präadipozyten und Endothelzellen*. Freiburg.
- Tsuji, W., Inamoto, T., Yamashiro, H. (2009). Adipogenesis Induced by Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Tissue Eng Part A*(15 (1)), S. 83-93.
- van Hinsbergh, V. W., Collen, A., Koolwijk, P. (2001). Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*(936), S. 426-37.
- von Heimburg, D., Zachariah, S., Heschel, I., Kuhling, H., Schoof, H., Hafemann, B., N, P. (2001). Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in

vivo. *Biomaterials*(22(5)), S. 429-438.

- Weiser, B., Blunk, T. (2008). In Vivo Development and Long-Term Survival of Engineered Adipose Tissue Depend on In Vitro Precultivation Strategy. *Tissue Engineering Part A*(14), S. 275-284.
- Wiggenhauser, P. S., Müller, D. F., Melchels, F. P., Egana, J. T., Storck, K., Mayer, H., Leuthner P, Machens, H.G., Staudenmaier, R., Schantz, J. T. (2011). Engineering of vascularized adipose constructs. *Cell Tissue Res*, 2012 Mar;347(3):747-57.
- Zhao, Y., Waldman, S. D., Flynn, L. E. (2011). The Effect of Serial Passaging on the Proliferation and Differentiation of Bovine Adipose-Derived stem Cells. *Cells Tissues Organs*, S. ahead of print.
- Zilles, K., Tillmann, B. (2010). *Anatomie*. Springer, Berlin.

9. Anhang

9.1. Übersicht der Operationen

Tabelle 9.1.a Übersicht der Operationen

Maus	Versuch	Fett	Passage	OP-Datum	Leiste rechts	Leiste links	Dorsum	Explantation	Beobachtung	Objektträger
------	---------	------	---------	----------	---------------	--------------	--------	--------------	-------------	--------------

1	1	M 57J Abdomen	P1	12.03.09	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	19.03.09	1 Woche	KHM1R1
3	1	M 57J	P1	12.03.09	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	16.05.09	9 Wochen	KHM2R1
2	1	M 57J	P1	12.03.09	Konstrukt	Kontrolle		16.04.09	5 Wochen	KHM3R1
4	1	M 57J	P1	12.03.09	Kontrolle	Konstrukt		30.04.09	7 Wochen	KHM4R1
5	1	M 57J	P1	13.03.09	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	25.03.09	3 Wochen	KHM5R1
Probe				13.03.09	Leerkonstr	Leerkonstr	Leerkontr	02.04.09		

1	2	M Gynäkomastie	P2	15.04.09	Konstrukt	Konstrukt		17.06.09	9 Wochen	KHM1R2
2	2	M Gyn	P2	15.04.09	Konstrukt	Konstrukt		17.06.09	9 Wochen	KHM2R2
3	2	M Gyn	P2	15.04.09	Konstrukt	Konstrukt		21.05.09	5 Wochen	KHM3R2
4	2	M Gyn	P3	16.04.09	Konstrukt	Konstrukt		exitus		
5	2	M Gyn	P3	16.04.09	Konstrukt	Konstrukt		24.04.09	1 Woche	KHM5R2
6	2	M Gyn	P3	16.04.09	Konstrukt	Konstrukt		24.04.09	1 Woche	KHM6R2

1	3	W 50 Brust	P1	09.12.09	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	30.12.09	3 Wochen	KHM1R3
2	3	W 50 Brust	P1	09.12.09	Konstrukt	Konstrukt		30.12.09	3 Wochen	KHM2R3
3	3	W 50 Brust	P1	09.12.09	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	13.01.10	5 Wochen	KHM3R3
4	3	W 50 Brust	P1	10.12.09	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	13.01.10	5 Wochen	KHM4R3
5	3	W 50 Brust	P1	10.12.09	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	27.01.10	7 Wochen	KHM5R3
6	3	W 50 Brust	P1	10.12.09	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	27.01.10	7 Wochen	KHM6R3
7	3	W 50 Brust	P1	10.12.09	Konstrukt	Konstrukt	Kontrolle	27.01.10	7 Wochen	KHM7R3

9.2. *Material*

1,8-Diazabicycloundecene 98% (FA Acros, Geel, Belgien)
Anti-Anti (Antibiotic/Antimycotic, FA Gibco, 15240.062, 100 ml)
Apo-Transferrin (Fa Sigma, T1428, 100 mg)
Aqua bidest. (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 5l)
Aqua dest. (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 5l)
Aqua dest. (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 5l)
Biopsy Punch 5mm-Stanzen (Fa. Stiefel, Offenbach, Deutschland)
Biotin (Vit.H,FA Serva, 15060.02, 500 mg)
BSA (Bovines Serum Albumin(FA Sigma, A9418, 50g)
Collagenase NB4 Standard Grade (FA Serva, 17454, 1g)
Collagenase-Puffer (hausinterne Apotheke:Hepes(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)
Cortisol (FA Sigma, H0888, 1 g)
DABCO 3042 (FA Air Products, Norderstedt, Deutschland)
Dextrose (ACS reagent, FA Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, FA Sigma, D5796, 500 ml)
DMEM/Ham's F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium nutrient mixture F12 Ham,FA Sigma, D8437,500 ml)
D-Pantothensäure (FA Sigma, P5155, 100 g)
Eisenhämatoxylin nach Weigert (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 1l)
Eisessig (Essigsäure 100%, hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 100 ml)
Endothelial Cell Growth Medium MV (FA Promocell, C22020, 500 ml)
Eosin 1% (wässrige Lösung 10%, hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 100 ml)
Eukitt (FA O.Kindler GmbH, A 127, 100 ml)
Fibrinogen (FA Sigma,F-4753)
Formalin-Lsg 10% (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar)
FKS (Fötales Kälberserum(FA Gibco, 10270-106, 500 ml)
Fluoresceindiaceetat (FA Sigma, F7378, 5 g)
Formaldehyd(37%) (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 1 l)
IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin, FA Sigma, I5879, 250 mg)
Insulin (I9278,FA Sigma,Steinheim,5 ml)
Iso 70% (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 1l)
Iso 80% (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 1l)
Iso 95% (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 1l)
Iso rein (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 1l)
Isophoron-Diisocyanat 98% (FA Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Isopropanol (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 1l)
L-Glutamin (FA Gibco, 25030-024, 100 ml)
Lichtmikroskop DMI 6000B (Leica Camera AG, Solms, Deutschland)
Metylal 99,5+% (FA Acros, Geel, Belgien)
NH AdipoDiff Medium (FA Miltenyi Biotec, 130-091-677, 100 ml)

NH Expansion Medium (FA Miltenyi Biotec, 130-091-680, 500 ml)
NH₄Cl (Suprapur® Ammoniumchlorid, FA Merck, 1.001143.0050, 50 g)
Oil-Red-O (FA Sigma, O0625, 25 g)
Operationsmikroskop Universal S2 (Zeiss, Deutschland)
PBS Dulbecco (FA Biochrom AG, L1825, 500ml)
PBS Dulbecco (FA Biochrom AG, L1825, 500ml)
Phosphorwolframsäure 1% (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 1l)
Polyurethanschäum ((Fa. Polymaterials, Kaufbeuren, Deutschland)
Prolene-Naht 6-0 (Fa. Ethicon)
Propidiumjodid (FA Sigma, P4170, 100mg)
Sterile Silikonstreifen, blau (FA Gyrus Medical GmbH, Tuttlingen, Germany)
Thrombin (FA Baxter, PZN:3419656, 500 Units aus Tissucol Duo S1 Immuno)
Thrombinpuffer (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar: sterile 20mM Calciumchloridlösung)
Tissue-tek Compound (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, The Netherlands)
Trasyol 0,5 (FA Bayer Vital GmbH, PZN:4032037)
Trichromlösung nach Ladewig (hausinterne Apotheke Klinikum rechts der Isar, 1l)
Trijodothyronin (FA Sigma, T6397, 100 mg)
Tris (Tris-hydroxymethylaminomethan,FA Merck, 1.08382.0100, 100 g)
Troglitazon (FA Sigma, T2573, 5 mg)
Trypanblau Lsg. 0,4% (FA Sigma, T1854, 100 ml)
Trypsin/EDTA Lsg. (FA Biochrom AG, L2143, 100 ml)
Xylol (FA Hedinger,PZN 7475522, 1l)
Floureszenzmikroskop (FA Carl Zeiss,, Jena)
Adobe Photoshop CS 2 (FA Adobe, USA)
ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)

9.3. Übersicht der Zellkulturmedien

Verdaulösung:

Pro Gramm Fettgewebe 1ml Kollagenpuffer mit je
7,5g/500ml Bovines Serum Albumin und
0,5g/500ml Collagenase NB4

Aussaatmedium:

500ml mit 1:1 Mischung aus DMEM und DMEM/Ham's F12
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)
 500 µl Biotin(1mM)

9.4. Histologische Färbungen

Tabelle 9.4.a Histologische Färbungen

Hämalaun-Eosin(HE)-Färbung		Trichromfärbung nach Ladewig	
Xylol	5 Minuten	Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten	Xylol	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 Eisen-hämatoxylin nach Weigert	5 Minuten
Bläuen mit fließendem Leitungswasser ca. 37°C	5 Minuten	Spülen mit fließendem Leitungswasser ca. 37°C	5 Minuten
Aqua dest.		5 Minuten	
Eosin 1%+3 gtt Eisessig	3 Minuten	Beizen mit 1%iger Phosphorwolframsäure	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

10. Veröffentlichungen und Vorträge

Vortrag auf der 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie e.V. (Leipzig, September 2010)

Wiggenhauser, P. S., Müller, D. F., Melchels, F. P., Egana, J. T., Storck, K., Mayer, H., Leuthner P, Machens, H.G., Staudenmaier, R., Schantz, J. T. (2011). Engineering of vascularized adipose constructs. *Cell Tissue Res*

11. Danksagung

An erster Stelle danke ich meinen Eltern und Großeltern, dass sie mir diesen Lebensweg ermöglicht haben.

Ich bedanke mich bei Dr. Katharina Storck für die wissenschaftliche Betreuung und ihre Geduld beim Durchlesen meiner Arbeit.

Weiterer Dank gilt meinen Kollegen aus der Forschungsgruppe für die herzliche Zusammenarbeit und die Unterstützung: Dr. Bettina Rittler-Ungethüm, Lena Mayer, Dr. Sibylle Regn, Anne Hills, Guido Piontek, PD Dr. Jan-Thorsten Schantz, Prof. Torsten Blunk.

Nicht zuletzt möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Rainer Staudenmaier für die Überlassung dieser Arbeit und die jahrelange Unterstützung bedanken.