



Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie  
Direktor: Prof. Dr. Hans-Günther Machens  
Klinikum rechts der Isar  
Technische Universität München

Zellkulturstudien humaner adipogener Stammzellen  
(Adipose-derived Stemcells, ASCs)  
auf patientenspezifischen Brustscaffolds

Su-Zeong Madeleine Fröhlich

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Hans-Günther Machens  
2. Prof. Dr. Marion B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 19.12.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.05.2020 angenommen.

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>II</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 ÜBERBLICK .....	1
1.2 RELEVANZ DER BRUSTREKONSTRUKTION.....	1
1.3 BISHERIGE THERAPIEN.....	2
1.3.1 Brustrekonstruktion mit festen nichtresorbierbaren Implantaten.....	3
1.3.1.1 Schwächen der Brustrekonstruktion mit Implantaten .....	4
1.3.2 Brustrekonstruktion mit Eigengewebe über Lappenplastiken .....	5
1.3.3 Brustrekonstruktion mit autologen Fetttransplantaten.....	6
1.3.4 Brustrekonstruktion mit angereicherten autologen Fetttransplantaten .....	8
1.3.5 Brustrekonstruktion mit autologen Fetttransplanteten und dem BRAVA®-System	9
1.3.6 Brustrekonstruktion mit autologen Fetttransplantaten und einer implantierbaren Kammer	10
1.3.7 Brustaufbau mit bioaktiven Füllsubstanzen .....	11
1.4 NEUE METHODIK .....	12
1.4.1 Tissue Engineering mit Adipose-derived Stem Cells (ASCs).....	13
1.4.2 Verwendung von Scaffolds zur Fettgewebsgenerierung.....	14
1.4.3 Herstellung eines patientenspezifischen Scaffolds .....	15
1.4.4 Bioreaktoren .....	16
1.5 FRAGESTELLUNG, UMFANG UND ZIELSETZUNG .....	18
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>19</b>
2.1 STATISCHE IN-VITRO EVALUATION VON ASCs AUF SCAFFOLDS .....	19
2.1.1 Vom Lipoaspirat bis zu mit ASCs besiedelten Scaffolds.....	19
2.1.1.1 Fettgewebsgewinnung .....	19
2.1.1.2 Isolation der ASCs .....	20
2.1.1.3 Kultivierung von ASCs .....	20
2.1.1.4 Zellexpansion .....	20
2.1.1.5 Zellernte .....	21
2.1.1.6 Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau.....	21
2.1.1.7 Herstellung von Fibrinkleber .....	22
2.1.1.8 Steigerung der Hydrophilität der Scaffoldoberfläche .....	22

2.1.1.9	Sterilisierung der Scaffolds .....	23
2.1.1.10	Besiedlung und Kultivierung der Scaffolds mit ASCs .....	23
2.1.2	Qualifizierung von Zellen.....	25
2.1.2.1	Rasterelektronenmikroskopie .....	25
2.1.2.2	Vitalitätsfärbung mit FDA+PI – Lebend-/Totfärbung.....	26
2.1.2.3	Phalloidin färbung .....	26
2.1.2.4	Ölrot-O-Färbung.....	27
2.1.3	Semiquantifizierung von Zellen.....	28
2.1.3.1	Trypsin-/Kollagenaseverdau .....	28
2.1.3.2	Ermittlung des DNA-Gehalts durch Hoechst-Assay .....	28
2.1.4	Bestimmung des Adiponektingehalts.....	29
2.1.4.1	Differenzierung zu Adipozyten.....	29
2.1.4.2	Adiponektin-ELISA (Enzym-linked Immunosorbent Assay) .....	30
2.1.5	Datenauswertung .....	31
2.2	DYNAMISCHE IN-VITRO-EVALUIERUNG VON ASCs AUF SCAFFOLDS .....	31
2.2.1	Von der Kultivierung zur Besiedlung mit ASCs auf Scaffolds .....	33
2.2.1.1	Kultivierung der ASCs.....	33
2.2.1.2	Zellexpansion.....	33
2.2.1.3	Zellerntezahl .....	33
2.2.1.4	Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau.....	34
2.2.1.5	Herstellung von Fibrinkleber .....	34
2.2.1.6	Steigerung der Hydrophilität der Scaffoldoberfläche .....	34
2.2.1.7	Sterilisierung der Scaffolds .....	34
2.2.1.8	Besiedlung und Kultivierung der Scaffolds mit ASCs.....	34
2.2.2	Qualifizierung von Zellen.....	35
2.2.2.1	Rasterelektronenmikroskopie .....	35
2.2.2.2	Hellfeldmikroskopie.....	35
2.2.2.3	Vitalitätsfärbung mit FDA+PI – Lebend-/Totfärbung.....	36
2.2.3	Semiquantifizierung von Zellen.....	36
2.2.3.1	Trypsin-/Kollagenaseverdau .....	36
2.2.3.2	Ermittlung des DNA-Gehalts durch PicoGreen®-Assay.....	36
2.2.4	Datenauswertung .....	37
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
3.1	ERGEBNISSE STATISCHE IN-VITRO-EVALUATION VON ASCs AUF SCAFFOLDS .....	37
3.1.1	Rasterelektronenmikroskopie .....	37
3.1.2	Vitalitätsfärbung mit FDA-PI – Lebend-/Totfärbung .....	39
3.1.3	Adhäsion der Zellen – Phalloidin färbung.....	40
3.1.4	Ölrot-O-Färbung .....	42
3.1.5	Wachstumsverhalten - Hoechst-Assay.....	42

3.1.6	Adiponektinsekretion .....	43
3.2	ERGEBNISSE DYNAMISCHE IN-VITRO-EVALUATION VON ASCs AUF SCAFFOLDS ...	44
3.2.1	Rasterelektronenmikroskopie .....	44
3.2.2	Hellfeldmikroskopie und Vitalitätsfärbung mit FDA-PI – Lebend-/Totfärbung.	45
3.2.3	Wachstumsverhalten - PicoGreen®-Assay .....	45
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
4.1	QUALITATIVE UNTERSUCHUNG MITTELS RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE, HELLFELDMIKROSKOPIE, LEBEND-/TOTFÄRBUNG UND PHALLOIDINFÄRBUNG .....	51
4.2	SEMIQUANTITATIVE UNTERSUCHUNG MITTELS PROLIFERATIONSASSAY ZUR BESTIMMUNG DER ZELLZAHL .....	54
4.3	ADIPONEKTINGEHALT UND ÖLROT-O-FÄRBUNG ZUR UNTERSUCHUNG DES ADIPOGENESEPOTENTIALS .....	56
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG, SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>58</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>60</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>76</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Jährliche Neuerkrankungs- und Sterbefälle sowie altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten (Europastandard) von Brustkrebs, Deutschland 1980-2004 .....	1
Abbildung 2: Trends und Häufigkeiten von Brustrekonstruktionen nach Mastektomie .....	3
Abbildung 3: Mastektomie rechts .....	3
Abbildung 4: Implantat bds. Kapsel Fibrose bds., Mammakarzinom links .....	5
Abbildung 5: TRAM-Lappenplastik. A. Rekonstruierte Brust. B. Entnahmestelle .....	6
Abbildung 6: Liposuktion und -filling A. Entnahme B. Transfer in Röhrchen C. Zentrifugieren D. Lipofilling .....	8
Abbildung 7: BRAVA®-Gewebeexpander .....	10
Abbildung 8: Patientin mit tubulärer Brust im Verlauf unter Anwendung von BRAVA®-Gewebeexpander und autologem Lipofilling .....	10
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Einsatz eines Scaffolds zur Brustrekonstruktion .....	13
Abbildung 10: Schematische Herstellung eines patientenspezifischen Scaffolds .....	16
Abbildung 11: Biaxial rotierender 3D-Bioreaktor .....	17
Abbildung 12: Aufbau biaxial rotierender 3D-Bioreaktor .....	17
Abbildung 13: Schematischer Experimentaufbau statische Versuchsreihe .....	19
Abbildung 14: Scaffold aus Polycaprolactone mit 60% Porenanteil, sowie einer Durchschnittsporengröße von 600 µm. A) Vorderseite, B) Rückseite ..	22
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Beimpfung von Scaffolds .....	24
Abbildung 16: Besiedelte Konstrukte in Nährmedium in einer 24-Wellplatte .....	24
Abbildung 17: Exemplarische Darstellung einer 96-Wellplatte in Tabellenform zur Veranschaulichung .....	29
Abbildung 18: Schematischer Experimentaufbau dynamische Versuchsreihe .....	32
Abbildung 19: Schematische Darstellung eines Scaffolds in 4 gleich große Stücke für die einzelnen Versuche .....	33
Abbildung 20: Aufbau Bioreaktor. A) Einsetzen der durchgestochenen TECs. B) Zuschrauben des Gefäßes. C) Bioreaktorgefäß mit Scaffolds. D) Brutschrank. E) Bioreaktor-Einstellungen .....	35
Abbildung 21: Visualisierung der nativen Scaffoldoberfläche und deren Bauweise. A. 35-fache Vergrößerung. B. 350-fache Vergrößerung .....	37
Abbildung 22: Einzelne ASCs. A. Scaffoldarchitektur mit einzelnen ASCs nach 5 Tagen, die ohne Fibrinkleber besiedelt wurden. B. vergrößerter Ausschnitt von A .....	38
Abbildung 23: Besiedlung von Scaffolds mit $2,5 \times 10^6$ ASCs obere Reihe a-c. ohne, untere Reihe A-C. mit Fibrinkleber nach 14 Tagen exemplarisch von drei unterschiedlichen Patientinnen a/A-c/C .....	39

Abbildung 24: Vergrößerte Darstellung SEM.....	39
Abbildung 25: Vitalitätsfärbung mit FDA+PI nach 5, 14 und 35 Tagen.....	40
Abbildung 26: Phalloidin-färbung. Obere Reihe: exemplarisch phalloidingefärbte Zellen an den Tagen 5, 14 und 35 in 10-facher, untere Reihe: in 40-facher Vergrößerung.....	41
Abbildung 27: Vergleich Phalloidin-färbung mit und ohne Fibrinkleber .....	41
Abbildung 28: Ölrot-O-Färbung nach 14 Tagen Besiedlung, exemplarisch von zwei Patientinnen, A und B.....	42
Abbildung 29: DNA-Gehaltermittlung im Hoechst-Assay .....	43
Abbildung 30: Adiponektingehaltermittlung im Adiponektinassay.....	44
Abbildung 31: SEM-Darstellung .....	44
Abbildung 32: Hellfeldmikroskopie .....	45
Abbildung 33: Lebend-/Totfärbungen.....	45
Abbildung 34: Proliferation der Zellen unter dynamischen Kultivierungsbedingungen .....	46

## Abkürzungsverzeichnis

3D	3-dimensional
$\alpha$ -MEM	$\alpha$ -minimum essential medium
Abb.	Abbildung
al.	aliae, alii alia
AM	Additive Manufacturing
ASCs	Adipose-derived stem cells
bds.	beidseits
BSC	Breast Conserving Surgery
C	Celsius
CaCl	Calciumchlorid
CAD	Computer aided design
CAM	Computer aided manufacturing
CT-Solution	Collagenase-Trypsin-Solution
d.h.	dass heißt
DIEP	deep inferior epigastric artery perforator
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ECGM	Endothelial cell growth medium
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
FDA	Fluoresceindiacetat
FDM	Fused deposition modelling
FKS	Fötales Kälber Serum
GAP	Gluteal artery perforator
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish-peroxidase)
HUVECs	human umbilical vein endothelial cells
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
LD	Latissimus dorsi
LGesamt	Gesamtzellzahl
LMW	Mittelwert
M.	musculus



MRI	Klinikum rechts der Isar, München
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
o.g.	oben genannte(r/n)
PAAG	Polyacrylamidgel
PBE	di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat EDTA
PBS	Phosphate buffered saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidiumiodid
PLGA	Polylaktat-Co-Glykolidsäure-Polymer
PLG	Polylaktat-Polyglykole
RPM	Rounds per minute
s.	siehe
SEM	Scanning electron microscopy
SL	Stammlösung
sog.	sogenannte
TE	TRIS und EDTA
TEC	Tissue engineered constructs
TRAM	transverse rectus abdominis muscle
TRIS-HCl	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
TUG	transverse upper gracilis
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolettstrahlung
VA	Ausgangsvolumen
VF	Verdünnungsfaktor
Vgl.	Vergleich(e)
z.B.	Zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Überblick

Brustkrebs ist die häufigste bösartige Krebserkrankung der Frau mit einer Inzidenz von ca. 1,7 Millionen Neuerkrankungen im Jahr 2012 weltweit [160]. In Deutschland beträgt nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts die Inzidenz von Mammakarzinoma bei jährlich ca. 47.500 Neuerkrankungen [56]. 386.500 Frauen sind in Deutschland an Brustkrebs erkrankt (10-Jahres-Prävalenz), so dass ca. 1% der weiblichen Bevölkerung betroffen sind, s. Abbildung 1 [6].

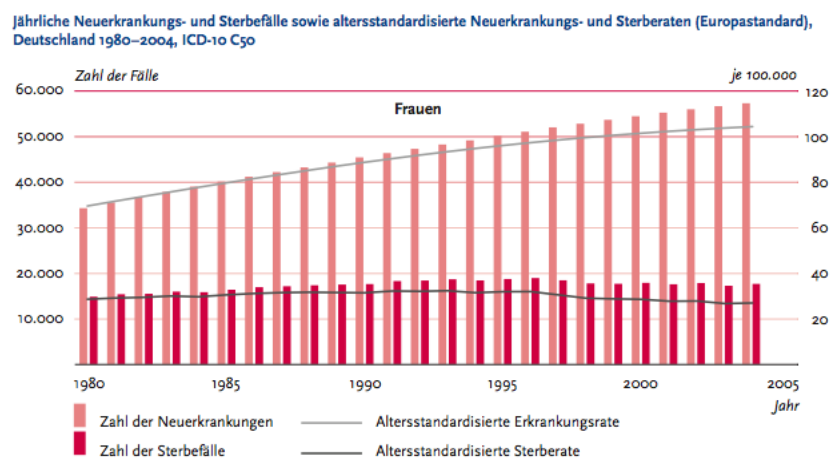


Abbildung 1: Jährliche Neuerkrankungs- und Sterbefälle sowie altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten (Europastandard) von Brustkrebs, Deutschland 1980-2004 [6]

Verbesserte Screeningverfahren zur Früherkennung von Brustkrebs durch Mammographien, verbesserte Behandlungsmöglichkeiten, sowie das Zurückgehen der Mortalitätsrate tragen also dazu bei, dass die Prävalenz von Brustkrebs steigt [131]. Es resultiert ein vergrößertes Patienten- und Therapievolumen inklusive brusterhaltender Therapien [87], wodurch die Anzahl der Patientinnen, die für eine Rekonstruktion in Frage kommen, größer wird.

## 1.2 Relevanz der Brustrekonstruktion

Die Diagnose von Brustkrebs betrifft Frauen in vielerlei Hinsicht. Angst vor der Krankheit an sich, den Nebenwirkungen von Chemo- und Strahlentherapie und einer möglichen gegebenenfalls radikalen Operation greifen tief in das Leben einer jeden Patientin ein [9, 103]. Hierbei ist die psychische und psychosoziale Belastung besonders groß [55]. Fast immer geht die Therapie mit einem Verlust oder Teilverlust

## Einleitung

von Brustdrüsengewebe einher. In bis zu einem Drittel der Fälle resultiert sogar eine komplette Entfernung der Brust (Mastektomie) [89]. Das Fehlen der weiblichen Brust verursacht bei vielen Patientinnen einen Integritätsverlust ihrer weiblichen Identität und beeinträchtigt damit das psychologische Wohlbefinden [105]. Die Brustrekonstruktion als Therapie einer Mastektomie bildet demnach einen integralen Bestandteil des Brustkrebsmanagement [50, 90] und ist insbesondere für den Erhalt der psychischen Gesundheit entscheidend [153]. Weiterhin führt ein erfolgreich durchgeführter Wiederaufbau der Brust zu weniger Schmerzen, sowie sexuellen und körperlichen Einschränkungen [46]. Das kosmetische Ergebnis mit den heute gängigen Methoden ist jedoch oftmals nicht zufriedenstellend, so dass eine Optimierung der Brustrekonstruktion erforderlich ist [2, 174].

### **1.3 Bisherige Therapien**

Die chirurgische Behandlung von Brustkrebs erfolgt über die Mastektomie, s. Abbildung 3, oder brusterhaltende Operationen (BCS, breast conserving surgery), an die sich gegebenenfalls eine axilläre Lymphknotendissektion anschließt. Je nach Krebsart und Stadium schließt sich eine adjuvante Strahlentherapie an.

Zur Zeit finden zwei Verfahren zur Brustrekonstruktion in der Praxis Anwendung. Zum Einen erfolgt das Einsetzen eines Fremdmaterials in Form eines soliden Brustimplantates, zum Anderen das Rekonstruieren der Brust mit Hilfe von Lappenplastiken [153, 152]. Dabei hängt der Erfolg der Brustrekonstruktion von unterschiedlichen Aspekten ab. Zu nennen sind diesbezüglich unter anderem Art und Stadium des Tumors, Tumorinvasivität und Ausmaß der Geweberesektion. Daneben ist zu beachten, den allgemeinen Gesundheitszustand der Patientin einzubeziehen und zu klären, ob noch eine adjuvante Strahlentherapie erfolgt.

Im Folgenden werden gängige Methoden zur Brustrekonstruktion und Augmentation vorgestellt. Abbildung 2 stellt graphisch die Trends über die Zeit dar.

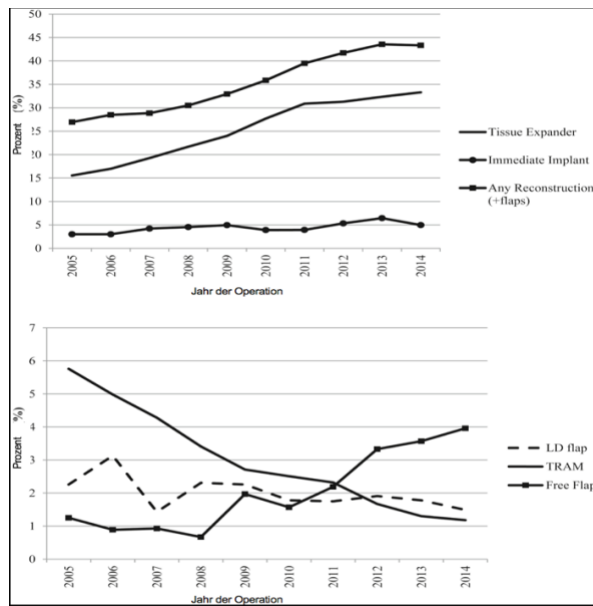


Abbildung 2: Trends und Häufigkeiten von Brustrekonstruktionen nach Mastektomie [114]. (LD flap: Latissimus dorsi Lappen, TRAM: Transverser rectus abdominis Lappen)



Abbildung 3: Mastektomie rechts (Klinikum rechts der Isar)

### 1.3.1 Brustrekonstruktion mit festen nichtresorbierbaren Implantaten

Bei der Rekonstruktion der Brust mit Hilfe eines Implantates finden verschiedene Materialien Anwendung. Neben Silikonkissen, die entweder mit einer sterilen Salzwasserlösung, einem Silikongel oder einem Kohesivgel gefüllt sind [114, 123], gibt es sogenannte formstabile Implantate, die als Inhalt ein Hochkohesivgel besitzen. Des Weiteren wird unterschieden, ob eine Brustrekonstruktion einzeitig unmittelbar nach der Mastektomie in derselben Operation stattfindet, oder ein zweizeitiges Verfahren gewählt wird. Bei der einzeitigen Brustrekonstruktion wird die vorhandene Gewebetasche, aus der das Tumorgewebe zuvor entnommen wurde, wiederverwendet. Bei der zweizeitigen Methode wird das Implantat erst in einer späteren Operation eingesetzt. Dies kann der Fall sein, wenn das vorliegende

## Einleitung

Brustgewebe sehr fest oder flach ist. In der Zwischenzeit wird ein Gewebeexpander vorläufig in die Brust eingesetzt, mit steriler Kochsalzlösung über einen Zeitraum von vier bis sechs Monaten befüllt und so das umliegende Gewebe gedehnt [34]. In einer zweiten Operation wird schließlich das permanente Brustimplantat eingesetzt. Muss eine sich anschließende Strahlentherapie abgewartet werden, so erfolgt die Implantation verzögert. Selten ist eine Unterstützung des Implantates mit Hilfe eines resorbierbaren Netzes oder azellulärem humanem Gewebe nötig, die das Implantat in Position halten und unterstützen. Das Implantat kann ebenfalls unter den großen Brustmuskel angebracht werden, wodurch das Implantat stabilisiert und eine natürlichere Brustkontur geformt wird.

### **1.3.1.1 Schwächen der Brustrekonstruktion mit Implantaten**

Der Wiederaufbau der Brust durch Implantate birgt neben allgemeinen Operationsrisiken wie Blutung, Infektion und Wundheilungsstörung die Gefahr einer Kapselfibrose [161]. Vergleich Abbildung 4. Dabei handelt es sich um eine Abwehrreaktion des Körpers auf Fremdmaterial. Die Fibrose kann zu Schrumpfungen und Kapselkontrakturen führen, was in einer Brustasymmetrie resultiert. Des Weiteren werden die Ränder des Implantats deutlich erkennbar. Oftmals müssen Implantate ausgetauscht werden, da sie keine lebenslange Standzeit besitzen, was zusätzliche Operationen mit entsprechenden Risiken verursacht. Sie können außerdem migrieren, sich deformieren und rupturieren mit der Gefahr, dass der Inhalt austritt [53]. Neben der Entstehung von Infektionen und Schmerzen fühlen sich Implantate sich nicht natürlich an und bereiten ein Fremdkörpergefühl, welches ein Grund zur Nichtdurchführung einer Brustrekonstruktion sein kann [139]. Außerdem ist eine Beeinträchtigung von Folgebehandlungen im Rahmen einer Strahlentherapie oder von Mammographie-Screenings häufig [12]. Problematisch bei einer sofortigen Brustrekonstruktion mit Implantaten ist, dass eine Strahlentherapie das kosmetische Ergebnis einer rekonstruierten Brust durch eine schlechtere Wundheilung und Vernarbung beeinträchtigt und die rekonstruierte Brust wiederum eine Strahlenbehandlung in ihrer Effektivität beeinflusst. Außerdem wird in seltenen Fällen von Implantatverlusten berichtet [52]. Eine Strahlentherapie Im Falle einer adjuvanten Strahlentherapie birgt diese ein höheres Risiko für ein misslungenes Ergebnis nach einer einzeitigen Brustrekonstruktion mit einem Implantat und insbesondere nach Einsetzen eines Gewebeexpanders, was dann das Entfernen der Brustprothese

## Einleitung

bedeutet und somit mit einer zusätzlichen Behandlung und daraus resultierenden Belastungen für die Patientin einhergeht [88]. Darüber hinaus folgt die Rekonstruktion mit Brustimplantaten dem Prinzip „one size fits all“, was in der Realität den verschiedenen anatomischen Formen und unterschiedlichen Gewebedefekten nur unzureichend gerecht wird [67], so dass patientenzentrierte Behandlungsalternativen Gegenstand aktueller Forschung sind.



Abbildung 4: Implantat bds. Kapselbildung bds., Mammakarzinom links (Klinikum rechts der Isar, München)

### 1.3.2 Brustrekonstruktion mit Eigengewebe über Lappenplastiken

Das Rekonstruieren der Brust mit körpereigenem Gewebe findet im heutigen klinischen Alltag hauptsächlich über Lappenplastiken statt.

Bei einer Lappenplastik handelt es sich entweder um ein freies oder gestieltes Transplantat aus Haut-, Fett- und Muskelgewebe aus einer anderen Körperregion, welches im Brustbereich implantiert wird. Der sogenannte TRAM (transverse rectus abdominis muscle) –Lappen wird beispielsweise aus der unteren Abdominalwand entnommen, s. Abbildung 5. Bei einem gestielten Lappen, der über seine Originalgefäße versorgt wird, wird unter der Haut getunnelt an die Brust angebracht. Bei der freien Lappenplastik wird der Lappen unter Absetzen der Gefäße brustfern exzidiert, dabei die Blutversorgung aus der Entnahmestelle getrennt und mikrochirurgisch in der Brustregion rekonstruiert. Beim DIEP (deep inferior epigastric artery perforator) –Lappen wird ähnlich dem TRAM –Lappen verfahren, nur dass kein Muskelgewebe entnommen wird. Vorteilhaft ist dabei, dass eine geringere Muskelschwäche und Herniationsgefahr in der Entnahmestelle besteht. Neuere Verfahren wie der freie Gluteallappen (GAP, gluteal artery perforator) oder Lappen

## Einleitung

aus der Innenseite der Oberschenkel (TUG-flap, transverse upper gracilis flap) werden herangezogen, wenn sich die TRAM-, Latissimus dorsi- oder DIEP-Lappen nicht anbieten, da zum Beispiel zu wenig oder zu dünnes Gewebe vorliegt. Die hier beschriebenen Brustrekonstruktionsverfahren mit Eigengewebe sind mit Morbiditäten verbunden. Zwar besteht bei Lappentechniken kein Fremdkörpergefühl, allerdings haben sie gegenüber der implantatbasierten Brustrekonstruktion eine höhere Rate Wundinfektionen zu verursachen und misslingen häufiger, was zu Zweitoperationen zur Korrektur sowie einer längeren Krankenhausaufenthaltsdauer führt [106]. Zu den Risiken der Lappenplastiken zählen zudem Stenosen der Gefäße, die zu einer Lappennekrose führen können [10, 57]. Neben dem Verlust des Lappens sind Hernien in der Entnahmestelle ebenfalls gefürchtete Komplikationen [113]. Die Schwächen der heute verfügbaren Standardverfahren unterstreichen die Notwendigkeit zur Entwicklung von Alternativen, die kosmetisch ansprechend und in ihrer Durchführung schonender sind, sowie mit einer geringeren Morbidität der Spenderseite einhergehen.



Abbildung 5: TRAM-Lappenplastik. A. Rekonstruierte Brust. B. Entnahmestelle (Klinikum rechts der Isar, München)

### 1.3.3 Brustrekonstruktion mit autologen Fetttransplantaten

Die Geschichte der autologen Fetttransplantation zur Brustrekonstruktion reicht weit zurück. Vincenz Czerny versuchte schon 1895 mit einem lumbalen Lipom eine Brustaugmentation durchzuführen [18]. Lange Zeit stand das Feld der autologen Fetttransplantation zur Brustrekonstruktion still, da transplantiertes Fettgewebe resorbiert wurde und nur zu einem geringen Teil überlebte [127]. Erst Anfang der 1980er Jahre gewann die autologe Brustaugmentation mit Fettgewebe mit der Einführung von Liposuktionen [71] als Transplantatquelle an klinischer Bedeutung [1, 7, 8, 71]. Das minimalinvasive Vorgehen, die geringere Spendermorbidity, der

## Einleitung

leichtere Zugang zum Fettgewebe bei meist reichlichem Vorkommen sowie Form, Haptik und das damit verbundene ästhetische Ergebnis sowie das Fehlen von Fremdkörperreaktionen, verdeutlichen die Vorteile einer Brustrekonstruktion mit autologen Fetttransplantaten [35]. Vergleich Abbildung 6. Claro et al. beschreiben einen verbreiteten klinischen Einsatz der autologen Fetttransplantation zur Brustrekonstruktion auf Grund von geringen Komplikationsraten und fehlenden Beeinträchtigungen in Follow-Up-Behandlungen von Brustkrebs [27]. Jedoch bestanden bis vor Kurzem Zweifel an der Vorhersagbarkeit des Therapieerfolgs mit relativ hohen Resorptionsraten von 25% bis 80% des Fetttransplantats [13, 16, 126, 147]. Zudem kommt es zu Interferenzen mit Mammographien zur Detektion von Brustkrebs und zur Beeinflussung von Folgetherapien, weshalb ihre Anwendung eingeschränkt war [81]. Auch wenn Aspekte der onkologischen Sicherheit in der Literatur kontrovers diskutiert werden, erfolgten weltweit erfolgversprechende Einsätze dieser Technik [17, 29, 38, 82, 133, 143, 177]. Zu den gering ausgeprägten Komplikationen zählen Zystenbildungen, Fettgewebsnekrosen und Kalzifizierungen [62, 95]. Neben den beschriebenen Bedenken haben sowohl Patientinnen, als auch plastische Chirurgen damit zu kämpfen, dass das kosmetische Ergebnis langfristig nicht zufriedenstellend ist.

Das Hauptproblem der autologen Fetttransplantation aus kosmetischer Sicht ist die schwer zu vorhersagende Resorptionsrate des Grafts, die wiederum von der Methode der Fettgewinnung abhängt [147]. Entscheidend für das Überleben von Fettgrafts ist, dass sie in kleinen Zellverbänden in einer stark vaskularisierten Umgebung vorliegen müssen [61, 149]. Coleman entwickelte diesbezüglich das Konzept vom „Structural Fat Grafting“. Dabei wird beschrieben, dass Fettgewebe in kleinen Aliquots über mehrere Zugänge in mehreren Schichten und in verschiedene Richtungen transplantiert werden müssen, damit möglichst viele Adipozyten Kontakt mit dem umliegenden Empfängergewebe für eine suffizientere Blutversorgung haben. Folglich erscheint die Transplantation in onkologisch vorbehandeltes Brustgewebe mit konsekutiv verminderter Gefäßstruktur als besondere Herausforderung [1, 28]. Plastische Chirurgen versuchen die Resorptionsraten von Fettgrafts mit Kanülen unterschiedlicher Lumina oder durch Zentrifugieren zu verringern. Die Ergebnisse von Studien, die sich damit beschäftigten, sind jedoch in sich nicht kohärent und es ist noch unklar, welche Methode den anderen überlegen ist [147]. Einige Studien sehen einen entscheidenden Vorteil in bestimmten Reinigungsmethoden, wie z.B. Zentrifugieren,



## Einleitung

von Lipoaspiraten [15, 76], während andere Studien keinen Unterschied bezüglich des Langzeitüberlebens der Fettgrafts in ihren Reinigungsmethoden für Lipoaspirate sehen [11, 138, 146]. Beispielsweise zerstört das zu starke Zentrifugieren die Zellen [85]. Ein eindeutiger Vorteil lässt sich bisher für keines der Verfahren nachweisen. Weitergehend sind nicht alle Studien, die sich mit der autologen Fetttransplantation befassen, spezifisch auf Brustrekonstruktionen hin untersucht worden.



Abbildung 6: Liposuktion und -filling (Klinikum rechts der Isar, München) A. Entnahme B. Transfer in Röhrchen C. Zentrifugieren D. Lipofilling

### 1.3.4 Brustrekonstruktion mit angereicherten autologen Fetttransplantaten

Ein Ansatz ist das Anreichern von Fettgrafts mit Medien, in denen Polymere und Wachstumsfaktoren enthalten sind. Dies hat ein längeres Überleben der transplantierten Fettgrafts und eine bessere Erhaltung der gewünschten Form zum Ziel. Untersuchungen von Kleintieren zeigten eine höhere Überlebensrate der Fettgrafts [31, 45, 102, 116, 157, 184]. Bei der Anreicherung mit ASCs macht man sich die vaskularisierenden und wachstumsfördernden Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen zunutze [58, 140]. Studien zeigen, dass mit ASCs angereicherte Fetteinspritzungen eine bessere Beständigkeit des Volumens aufweisen [73, 185]. Aufgrund von gemeinsamen Stimulationsreizen von solch angereicherten Lipofillings

## Einleitung

und Tumorzellen wird allerdings eine rezidivbegünstigende Wirkung dieser Methode diskutiert. [5, 121, 142, 151, 156]. Aktuelle Studien zeigen auf, dass lediglich nur bei Brustkrebspatientinnen mit sicherem Nachweis von Tumorfreiheit nach Behandlung mit ausschließlich reinen autologen Fetttransplantationen kein erhöhtes Rezidivrisiko besteht. In den Diskussionen wird nahe gelegt, nur unter höchster Vorsicht und mindestens nach sicherem Tumorausschluss mit angereicherten Lipoaspiraten zu behandeln, jedoch lässt sich eher eine Tendenz zum Verzicht solcher erkennen [120].

### **1.3.5 Brustrekonstruktion mit autologen Fetttransplanteten und dem BRAVA®-System**

Eine weitere Methode ist die Brustrekonstruktion mit dem externen BRAVA® (BRAVA LLC, Miami, FL, USA). Der BRAVA®-Gewebeexpander wurde ursprünglich für eine Brustvergrößerung ohne chirurgischen Eingriff entwickelt [79, 154]. Dabei wird der BRAVA®-Gewebeexpander von außen an der Brust befestigt und ein Vakuum hergestellt. Vergleich Abbildung 7. Durch den erzeugten Unterdruck wird eine Gewebeexpansion bewirkt, aus der eine Ödembildung und vermehrte Vaskularisierung resultiert. In dieses Milieu wird autologes Fettgewebe injiziert, s. Abbildung 8. Durch die verbesserte Durchblutung der Umgebung wird die Beständigkeit des Volumens der transferierten Fettzellen verbessert [39, 65, 78]. Da es durch das Tragen von BRAVA® zu Hautirritationen bis hin zu einer Dermatitis kommen kann, die notwendige Tragedauer recht hoch ist (>8h pro Tag, 12 Wochen) und zudem strahlentherapiebedingte Gewebekontraktionen durch das Verfahren nicht adressiert werden, ist das Anwendungsspektrum begrenzt [165].

## Einleitung



Abbildung 7: BRAVA®-Gewebeexpander (Klinikum rechts der Isar, München)

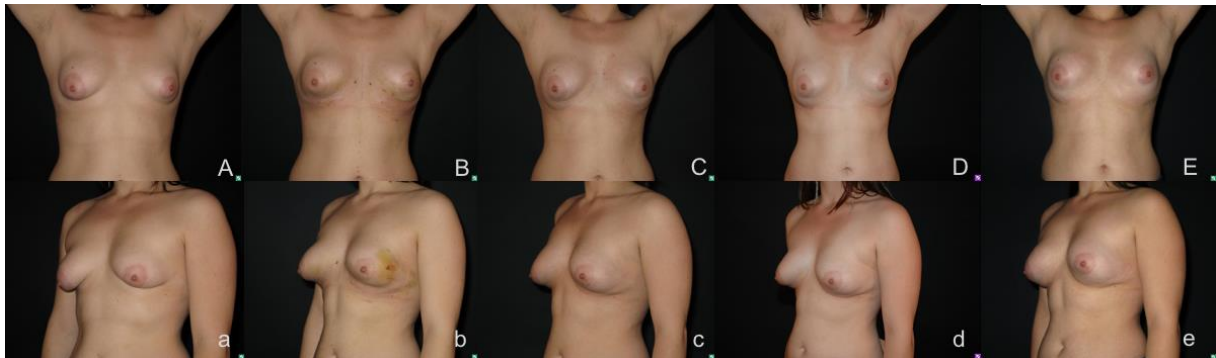


Abbildung 8: Patientin mit tubulärer Brust im Verlauf unter Anwendung von BRAVA®-Gewebeexpander und autologem Lipofilling (Klinikum rechts der Isar, München)

### 1.3.6 Brustrekonstruktion mit autologen Fetttransplantaten und einer implantierbaren Kammer

Die Forschungsgruppe von Morrison et al. beschäftigt sich mit Fettgewebsgenerierung basierend auf einem Gefäß-Kammermodell. Dabei wird eine Polykarbonat- oder Silikonkammer implantiert und mikrochirurgisch eine Gefäßschleife eingearbeitet. Injizierte Fettzellen werden anschließend durch einspritzende Gefäße im Rahmen der Angiogenese zu vaskularisiertem Fettgewebe umgewandelt. In Tierversuchen konnte mit dieser Methode ein großes Volumen an Fettgewebe generiert werden [33, 42, 49, 66, 109]. In einer Pilotstudie am Menschen konnten Morrison et al. bei einer von fünf Patientinnen Fettgewebe in der Brust mit einer Acrylkammer generieren [108]. Nachteilig dabei ist ein zusätzlicher operativer Eingriff zur Explantation der nicht resorbierbaren Kammer.

### **1.3.7 Brustaufbau mit bioaktiven Füllsubstanzen**

Zur Auffüllung von Brüsten wurden auch Injektionen mit Hydrogelen auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht [91, 97]. Jedoch eignen sich diese nicht für größere Volumina, wie sie z.B. bei der kompletten Mastektomie erforderlich sind, da aufgrund ihrer relativ flüssigen Struktur keine Formstabilität besteht [123, 124]. Außerdem bieten Hydrogele keine geeignete Oberfläche für eine ausreichende Zelladhäsion [44, 118]. Insbesondere wegen der schweren Nebenwirkungen der Hydrogele, vor allem Polyacrylamidgel (PAAG), kommen sie nicht für die Brustrekonstruktion in Frage. Hydrophiles Polyacrylamidgel ist ein transparentes nicht resorbierbares Gel aus 2,5% Polyacrylamid und 97,5% nichtpyrogenem Wasser und wurde ursprünglich als nicht zytotoxisch, nicht karzinogen, nicht pyrogen und damit als biokompatibel eingestuft [129, 175]. Sie finden vor allem im asiatischen Raum zur Brustaugmentation Anwendung [77]. PAAG wird u.a. als Aquamid, Bioalcamid, Intefall, Outline, Formacryl, Bioformacryl, Argiform und Amazinggel vertrieben. Allerdings kam es nach der Verabreichung zu schweren unerwünschten Nebenwirkungen bis hin zu Nekrosen mit vollständigem Verlust der Brust. Die notwendige chirurgische Sanierung ist ausgesprochen aufwendig und wenig erfolgversprechend [30, 36, 41, 63, 74, 92, 141, 158, 171, 175, 176, 182]. PAAG eignet sich daher nicht für eine schonende Behandlung von Gewebsdefekten in der Brust. Als Alternative ist Hyaluronsäure zu nennen, ein humanes Glykosaminoglykan in der extrazellulären Matrix (ECM, extracellular matrix) [30], das erst kürzlich seinen Eingang in die Brustaugmentation fand. Hyaluronsäure für die Brustaugmentation wird unter dem Handelsnamen Macrolane™ (Q-Med, Hertfordshire, UK) als biodegradierbares Material vertrieben [141]. Macrolane™ besteht aus 2% stabilisierter Hyaluronsäure und 98% Wasser. Es ist biodegradierbar mit einer individuell unterschiedlichen Resorptionsrate von 12-24 Monaten [63, 64]. Von Vorteil ist hierbei die ambulant durchführbare schnelle und minimalinvasive Behandlung mit kurzer Rekonvaleszenz und geringer Infektionsrate [72, 141]. Nachteilig erscheint hingegen der lückenhafte Anwendungsbereich bei größeren Gewebedefekten, zudem werden radiologische und palpatorische Untersuchungen zur Brustkrebserkennung beeinträchtigt, während das Ergebnis nicht von Dauer ist. [4, 32, 68, 141]. Zu den häufigen Komplikationen gehören Entzündungen, Knoten, parenchymale Fibrosen, Schmerzen an der Injektionsstelle und Kapselkontrakturen [4, 100, 101]. In Frankreich wurde 2011 die Behandlung mit Macrolane™ zur Brustaugmentation untersagt [19].

### **1.4 Neue Methodik**

Bisherige entwickelte Behandlungsmethoden werden den hohen Ansprüchen an Formstabilität, natürliches Gefühl, und Nachhaltigkeit nicht gerecht. Darüber hinaus sollte die rekonstruierte Brust nicht nur anatomisch, sondern auch physiologisch zur Patientin passen. Dies bedeutet auch, dass natürliche Alterungsprozesse, die der weiblichen Brust unterliegen, im Behandlungskonzept mitberücksichtigt werden. Die Schwächen der verfügbaren Verfahren unterstreichen die Notwendigkeit zur Entwicklung risikoärmerer, ästhetisch und funktionell ansprechender Alternativen. Das Rekonstruieren der Brust mit einer temporären Matrix zur Formstabilisierung, einem sogenannten Scaffold, das spezifisch auf die Anatomie der Patientin angepasst ist und die somit rekonstruierte Brust sich natürlich anfühlt, ist eine vielversprechende Herangehensweise, die den Weg in die Klinik finden könnte. Es wird dabei berücksichtigt, dass die Morbidität von Seiten der Spenderregion so gering wie möglich gehalten wird. Das Prinzip ist, dass die Brust mit einem Laser gescannt wird, woraufhin ein patientenspezifisches Scaffold hergestellt wird, was dann in die Brust implantiert und mit autologem Fettgewebe aufgespritzt wird. Vergleich Abb. 4. Dies lässt auf ein schonenderes Verfahren und kosmetisch zufriedenstellendere Ergebnisse hoffen, wobei die rekonstruierte Brust weder eine Therapie noch Vorsorgeuntersuchungen bei Brustkrebs beeinträchtigen darf. Dies gilt insbesondere für die Strahlentherapie, deren Problematik sich beispielsweise bei der Rekonstruktion mit Silikonimplantaten aufgezeigt wurde (s. Kapitel 1.3.1.1). Das Ziel ist eine möglichst naturgetreue Nachbildung der Brust sowie die gleichzeitige Vermeidung der Schwächen zuvor beschriebener Verfahren.

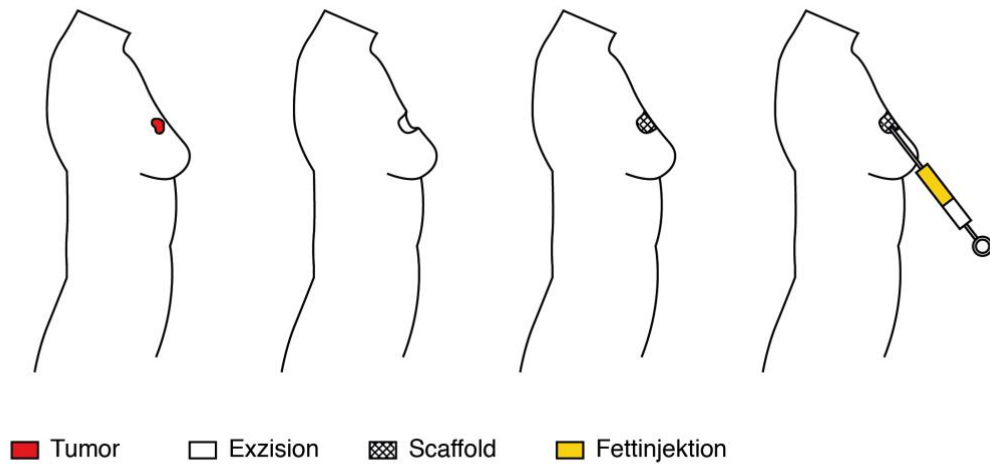


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Einsatzes eines Scaffolds zur Brustrekonstruktion (Eigene Darstellung)

### 1.4.1 Tissue Engineering mit Adipose-derived Stem Cells (ASCs)

Das Tissue Engineering macht sich die Methoden der Medizin, Natur- und Ingenieurwissenschaften zunutze, um Ersatzgewebe zu generieren oder deren Funktion zu verbessern [166]. Dabei ist es sinnvoll Fettgewebe als das bevorzugte Material im Tissue Engineering zu verwenden, da es häufig ausreichend vorhanden und relativ aufwendungsarm und schonend durch Liposuktionen zu beschaffen ist. Menschliches Fettgewebe besteht im Wesentlichen aus Adipozyten, Präadipozyten und Adipose-derived Stem Cells (ASCs). Letztgenannte sind pluripotente Stammzellen und sind in der Lage sich in Fett-, Knochen- und Knorpelzellen zu differenzieren [3, 37, 99, 110, 115], wobei sich ACSs aus subkutanem Fettgewebe besser expandieren und differenzieren lassen als solche aus viszeralem Fettgewebe [40]. Ihre Isolation und anschließende Differenzierung in verschiedene Gewebe sind kulturtechnisch einfach durchzuführen [47, 155, 167, 168]. In der Vergangenheit gab es vielfache Forschungsfortschritte im Bereich des Tissue Engineering mit ASCs. Erste vielversprechende Ergebnisse konnten durch Patrick et al. beim Einsatz von Polylaktat-Co-Glykolidssäure-Polymer-Konstrukte (PLGA) gezeigt werden [125]. ASCs waren reifen Fettzellen dabei hinsichtlich der Infiltration des Scaffolds, Überlebensrate, Volumenstabilität und Expansion in hypoxischem Umfeld überlegen [75, 117, 164]. In einem von Chhaya et al. im Jahr 2015 veröffentlichten Review wurde auf die

## Einleitung

Notwendigkeit von Definitionen hingewiesen. Hier wird u.a. der Begriff Tissue Engineered Construct (TEC) für Konstrukte mit Gewebegenerierung verwendet [24].

### **1.4.2 Verwendung von Scaffolds zur Fettgewebsgenerierung**

Um die Beständigkeit von Fettgrafts, und damit kosmetisch ansprechende Ergebnisse, zu verbessern, werden Scaffolds zur Formstabilisierung herangezogen. Die in dieser Arbeit verwendeten Scaffolds sind besonders großporig strukturiert, um das Einsprossen von Blutgefäßen zu erleichtern [111]. Um Form- und Volumenerhalt als größte Herausforderungen der autologen Lipotransplantation nachzukommen, bieten solche Scaffolds eine Matrix zur Verbesserung des Zellüberlebens [107, 132, 173]. Das Scaffold ist eine temporäre Matrix, die das Wachstum von Zellen und Gewebe unterstützt [139]. Drei Komponenten spielen bei der Generierung von Fettgewebe eine wichtige Rolle: ein biodegradierbares Material als vorübergehendes Gerüst, ein Mikromilieu mit suffizienter Versorgung und Oxygenierung sowie proliferierende und sich differenzierende Zellen [124]. Das implantierte Scaffold wird im zeitlichen Verlauf durch generiertes Gewebe ersetzt. Als Anwendungsvoraussetzung für die Brustrekonstruktion sollten sie nicht toxisch, nicht kanzerogen, nicht teratogen, hämokompatibel, implantierbar, bioresorbierbar und reproduzierbar sein. Funktionell müssen Scaffolds folgende Kriterien aufweisen: die Oberfläche von Scaffolds sollte eine Zelladhäsion, ein Zellwachstum und die Aufrechterhaltung von differenziertem Gewebe ermöglichen; es sollte biokompatibel sein, d.h. weder die Polymere noch die Abbauprodukte bei der Degradation sollten in vivo toxisch sein oder eine Entzündung hervorrufen; es sollte in vivo irgendwann vollständig ohne Eingriffe von außen verschwunden sein; es muss den mechanischen Belastungen standhalten und bis zum vollständigen Gewebsumbau als Stütze dienen, wobei die Schwierigkeit darin besteht, eine ausreichend löchrige Architektur zur optimalen Zellinfiltration und Vaskularisation zu schaffen, welche maßgebend für ein gutes Scaffold sind [20, 119]. Das Biokonstrukt muss außerdem das Volumen beibehalten, ein Mikromilieu für ein optimales Zellwachstum schaffen und die Angiogenese befördern können [164]. Die Komplikationsrate sollte dabei so gering wie möglich gehalten werden. Synthetische Scaffolds sind u.a. Poly-Laktat-Polyglykolyde (PLG)-Polymere, die seit geraumer Zeit von der Food and Drug Administration zugelassen sind [179].

### **1.4.3 Herstellung eines patientenspezifischen Scaffolds**

Bildbasierte Technologien (Imaging Based Technologies) haben in der Medizin die Therapie von Brustkrebs maßgeblich individualisiert. Die Integration von präzisen Bilddaten in das Behandlungskonzept ist entscheidend für ein ansprechendes, ästhetisches Ergebnis. Die Produktion dieser Scaffolds basiert auf der Integration unterschiedlicher Technologien. So werden die Körpermaße hochauflösend durch einen rezeptiven Laser erfasst und die Bilddaten über ein computergestütztes Designprogramm (computer aided design, CAD) verarbeitet. Über angeschlossene computergestützte Fabrikationstechniken (computer aided manufacturing, CAM) wie 3D-Drucker oder Schmelzschichtung entsteht so ein naturgetreues Brustabbild [23, 60, 83, 84, 96, 104, 134, 150]. Vergleich Abbildung 10. Die Herstellung von Schablonen zur intraoperativen Orientierung für Chirurgen wird bereits bei der Brustrekonstruktion verwendet [86, 163].

Neuere Verfahren zum Herstellen von Scaffolds sind früher entwickelten Anwendungen insbesondere durch die giftstofffreie Produktion überlegen. Beispielsweise bei der wärmeinduzierten Phasentrennung mussten toxische Porogene eingesetzt werden, um entsprechende Poren im Scaffold zu generieren [68, 148, 162]. Durch 3D-Druck wiederum kann das Scaffold durch Aufeinanderschichten ungiftiger Materialien als zusammenhängendes Porenkonstrukt gefertigt werden, was darüber hinaus der humanen ECM deutlich näherkommt [69, 70, 186].



## Einleitung

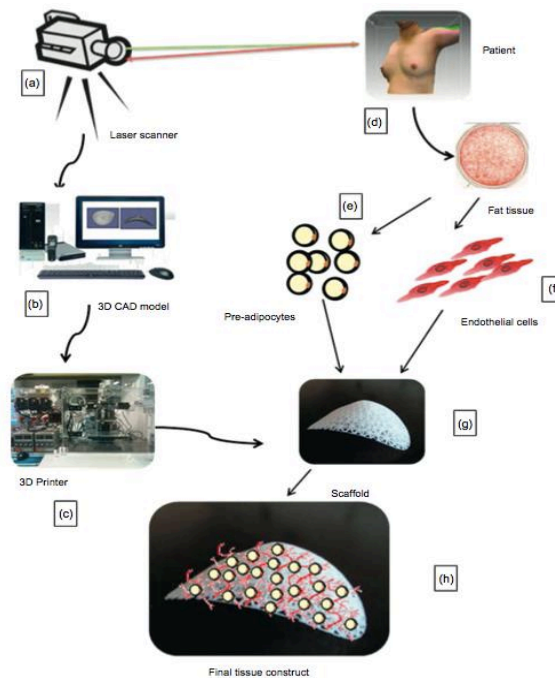


Abbildung 10: Schematische Herstellung eines patientenspezifischen Scaffolds. (a) ein Laserdigitizer scannt die Brust; (b) die Daten werden dann in eine CAD-Datei geschrieben und (c) über einen 3D-Drucker wird das Scaffold hergestellt; (d) Fettgewebe wird der Patientin entnommen und daraus die Präadipozyten und Endothelzellen (d,f) isoliert und in Kokultur auf das Scaffold beimpft. (g) und anschließend in die Brust implantiert (h). (Chhaya et al. 2013)

### 1.4.4 Bioreaktoren

Fettzellen sind auf ein spezifisches Umfeld angewiesen, um eine suffiziente Versorgung und eine gute Oxygenierung der Zellen zu gewährleisten [178]. Konventionelle Kulturverfahren finden unter statischen Bedingungen statt. Dabei werden Scaffolds im Rahmen des Tissue Engineering für die Generierung von Fettgewebe mit ASCs passiv beimpft, in dem sie sich z.B. mit einer Zellsuspension aufsaugen oder injiziert bekommen [125, 172].

Für einen optimierten Aufbau von Gewebe und deren genauere Analyse ist es allerdings sinnvoll, physiologische Kulturbedingungen zu schaffen [52]. Bioreaktoren, können dem durch physikalische und biomechanisch aktive Simulation beikommen. [80, 159, 187]. Die Generierung von Gewebe wird durch die Verwendung von biaxial rotierenden 3D-Bioreaktoren verbessert, da sie die Zelldichte durch eine homogene Verteilung von Zellen auf den Scaffolds steigern [14, 136, 137]. Fischbach et al. haben gezeigt, dass unter dynamischen Kulturbedingungen die Zellkohärenz von generiertem Fettgewebe verbessert wird und der intrazelluläre Lipidgehalt steigt [51]. Des Weiteren stieg die Expression von fettgewebsspezifischer Gene im Vergleich zu statisch kultivierten Proben. Fortier et al. erkannten nicht nur, dass ASCs im Vergleich zu anderen mesenchymalen Stammzellen unter wellenförmigen

## Einleitung

Bewegungsbedingungen ein dichteres Gewebe bildeten, sondern auch ein um 30% höherer Kollagen-Typ-V-mRNA-Gehalt (Kollagen Typ V ist Bestandteil des Interstitiums und charakteristisch für Binde- und Stützgewebe) messbar war und konnten somit ein verbessertes Tissue Engineering unter dynamischen Kultivierungsbedingungen zeigen [54]. Neben der einfacheren Untersuchung unter statischen Bedingungen liegt die dynamische Analyse im Bioreaktor somit nahe. Es gibt unterschiedliche Bioreaktoren. Das Besondere an unserem Bioreaktor sind zum einen ein integriertes Perfusionsystem, welches das Nährmedium unter maximalem Austausch bei geringsten Scherkräften zwischen Reservoir und Gefäß wechselt, zum anderen die biaxialen Rotationbewegungen, welche zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Zellen und des Nährmedium führen und schließlich die Nadel, an denen die Scaffolds „aufgespießt“ werden, damit sie so frei wie möglich ohne Kontakt zur Gefäßwand oder untereinander flotieren können, s. Abbildung 11. Bereits in den Arbeiten von Zhang et al. mit fetal mesenchymalen Stammzellen für Knochen Tissue Engineering wurde ein vergleichbarer Bioreaktor erfolgreich eingesetzt, s. Abbildung 12 [188].



Abbildung 11: Biaxial rotierender 3D-Bioreaktor (Eigene Darstellung)

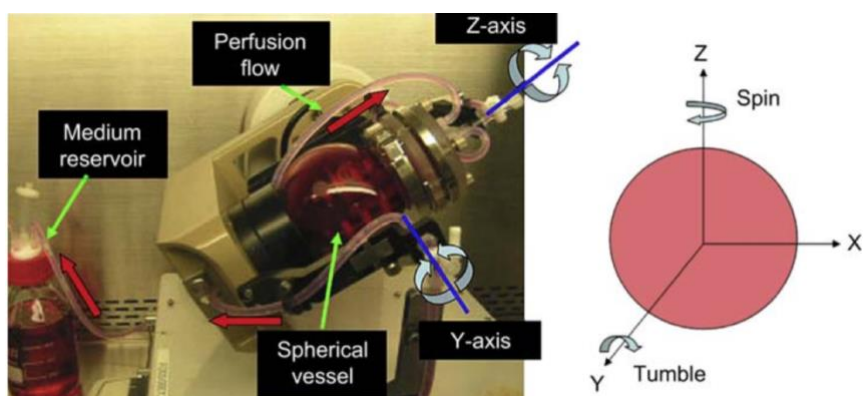


Abbildung 12: Aufbau biaxial rotierender 3D-Bioreaktor [188] (Zhang et al. 2009)

### **1.5 Fragestellung, Umfang und Zielsetzung**

Aufgrund der Limitationen bestehender klinischer Verfahren zur Brustrekonstruktion entwickelten wir ein Konzept zur Herstellung von patientenspezifischen Scaffolds zum individuellen Brustwiederaufbau basierend auf 3D-Imaging. Die vorliegende Arbeit spiegelt die Entwicklung dieses Konzeptes in vitro wider. Kernpunkte waren die Nutzung von brustförmigen Scaffolds in Miniaturformat und deren Besiedlung mit ASCs unter statischen sowie unter dynamischen Bedingungen in einem biaxial rotierenden 3D-Bioreaktor.

Folgende Fragestellungen wurden aufgestellt und mit den entsprechenden Versuchen verknüpft:

- wird ein Zellwachstum von ASCs auf den brustförmigen Scaffolds gewährleistet? Qualitative Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskopie, Lebend-Tot-Färbung und Phalloidin-färbung wurden hierbei durchgeführt.
- wie sieht das Zellwachstum nach der Besiedlung aus? Dafür wurde ein semiquantitativer Test wie das Proliferationsassay zur Bestimmung der Zellzahl durchgeführt.
- Lassen sich die ASCs in einem dreidimensionalen Raum in Fettzellen differenzieren? Dazu wurden die besiedelten Konstrukte in endotheliales Zellwachstumsmedium versetzt, das die ASCs zu Fettzellen differenzieren ließ. Daraufhin wurde der Adiponektingehalt bestimmt und die Darstellung von Lipiden mittels Ölrot-O-Färbung durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Statische in-vitro Evaluation von ASCs auf Scaffolds

Für die statische Versuchsreihe wurden ASCs aus Fettgewebe isoliert sowohl auf Scaffolds als auch auf Wellplatten besiedelt und untersucht. Abbildung 13 stellt den Experimentaufbau schematisch dar.

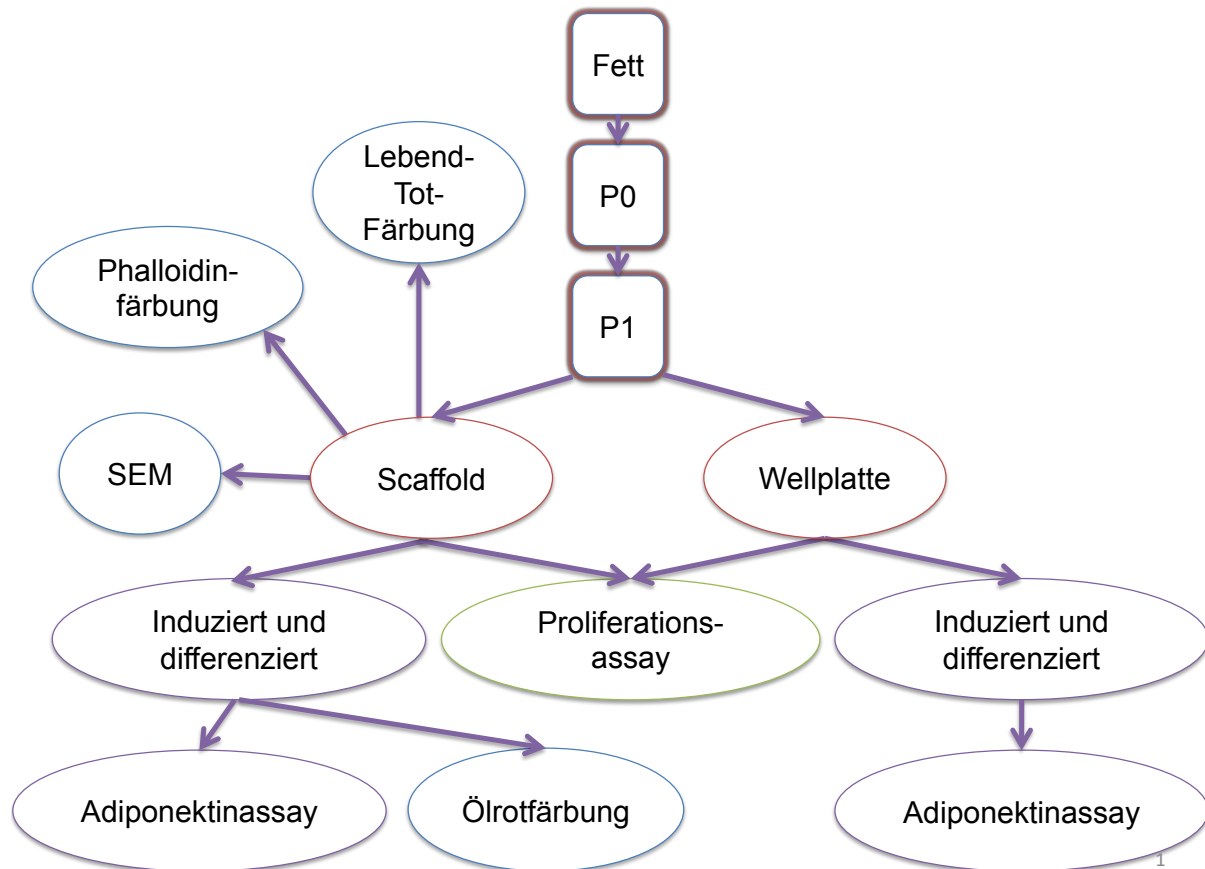


Abbildung 13: Schematischer Experimentaufbau statische Versuchsreihe (Eigene Darstellung)

#### 2.1.1 Vom Lipoaspirat bis zu mit ASCs besiedelten Scaffolds

##### 2.1.1.1 Fettgewebsgewinnung

Alle Zellkulturschritte für die statische Versuchsreihe erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, in der Sterilbank (Herasafe KS, Thermo Fisher Scientific). Alle dafür benötigten Materialien waren entweder steril verpackte Einwegartikel oder wurden vor der Anwendung per Dampfsterilisation bei 121°C und 4 bar für 20 Minuten autoklaviert (D-200, Systec).

Steriles Fettgewebe von 6 gesunden Patientinnen (Alter 39-69 Jahre) wurde durch Liposuktionen unter operativen Bedingungen gewonnen (informed consent). Die

## Material und Methoden

Lipoaspirate wurden sofort verarbeitet. Die gewonnenen ASCs wurden nicht gepoolt, sondern einzeln in den jeweiligen Versuchen untersucht.

### **2.1.1.2 Isolation der ASCs**

Zu jedem Gramm Fettgewebe wurde 1 ml Kollagenaselösung (2 mg Kollagenase pro ml, Serva), welche direkt vor Gebrauch frisch angemischt wurde, hinzugefügt und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (BD Bioscience), sogenannten Falcon-Tubes, für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad (B480, Büchi) inkubiert, wobei das Digestat alle 15 Minuten gut durchmischt wurde. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei 2000 RPM (rounds per minute) zentrifugiert (380 R, Hettich Rotina). Flottierende Adipozyten und der Überstand wurden dekantiert und verworfen. Das am Boden haftende Pellet mit der Zellfraktion wurde gemischt und mit einigen Milliliter DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco) oder PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, Gibco) aufgenommen und über einen Cellstrainer (70-100 µm, BD Bioscience) in ein neues Falcon-Tube filtriert. Anschließend wurden weitere Milliliter DMEM oder PBS durch das Zellsieb bis auf 40 ml aufgefüllt und nochmals für 5 Minuten bei 2000 RPM zentrifugiert, wobei der Überstand wieder verworfen wurde. Das Pellet wurde mit wenigen Milliliter DMEM oder PBS resuspendiert, erneut über einen Cellstrainer filtriert und nochmals für 5 Minuten bei 2000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig aspiriert, das Pellet mit Endothelial Cell Growth Medium aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche (Sarstedt) ausgesät. Dabei wurde pro 10ml verdautem Fettaspirat eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit 20 ml vorgelegtem ECGM (Endothelial Cell Growth Medium, Promocell) verwendet. Die Zellen wurden für 24 Std. im Brutschrank (Begasungsbrutschrank, Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Danach wurde das Medium mit noch nicht adhärenen Zellen, Zellresten und Erythrozyten verworfen, mit PBS gewaschen und mit frischem ECGM ausgelegt.

### **2.1.1.3 Kultivierung von ASCs**

Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage bis die Zellen 80% Konfluenz erreichten. Dazu wurde das Medium abgesaugt und mit frischen 20 ml ECGM ausgelegt.

### **2.1.1.4 Zellexpansion**

Zur Zellexpansion wurden die Zellen 2-3 mal mit 10 ml PBS gewaschen. Dann wurden pro Kulturflasche 3 ml Trypsin/EDTA (Lösung, Biochrom) zugegeben und für 2 Minuten

## Material und Methoden

bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen sich vom Boden ablösen, was mikroskopisch (DM IL, Leica) überprüft wurde. Die Trypsinierung wurde mit mindestens der doppelten Menge des hinzugefügten Trypsins mit Medium gestoppt. Die abgelösten Zellen samt Suspendat wurden für 3 Minuten bei 2000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit 1 ml ECGM resuspendiert, je nach Zellzahl ( $7,5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen pro 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche) auf 2 oder 3 neue 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen verteilt und mit 20 ml ECGM ausgelegt. Die Inkubation erfolgte wieder bei 37°C im Brutschrank.

### **2.1.1.5 Zellernte**

Zum Ernten der Zellen wurden die Schritte wie in Punkt 2.1.1.4 bis zum Verteilen auf neue 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Sarstedt) wiederholt. Die 1 ml Zellsuspension wurde in einem 15 ml Falcon-Tube auf 10 ml mit ECGM aufgefüllt. Die Bestimmung der Zellzahl folgt unter Kapitel 2.1.1.6.

### **2.1.1.6 Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau**

Trypanblau (0,4%-Lösung, Sigma-Aldrich) färbt tote Zellen blau, während lebende Zellen diesen Farbstoff nicht aufnehmen. Dies macht man sich zunutze, um die Anzahl der lebenden Zellen einer Probe zu bestimmen. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension von 10 ml der zu bestimmenden Probe (Ausgangsvolumen  $V_A=10$  ml) 1:1 mit Trypanblau verdünnt (Verdünnungsfaktor  $V_F=2$ ) und in einer 96-Well-Platte (transparent, Sigma-Aldrich) durch auf- und abpipettieren Kolbenhubpipette (2,0-20 µl, Eppendorf) durchmischt. 10 µl der mit Trypanblau verdünnten Zellsuspension wurden anschließend in eine Neubauer-Zählkammer (C-Chip, Biochrom) überführt. Alle ungefärbten Zellen der 4 Quadranten mit jeweils weiteren 16 Quadranten wurden unter dem inversen Labormikroskop (DM IL, Leica) ausgezählt und der Mittelwert (LMW) bestimmt. Die Gesamtzellzahl ( $L_{\text{Gesamt}}$ ) wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$L_{\text{Gesamt}} = 104 \cdot V_F \cdot V_A \cdot \text{LMW} = 104 \cdot 2 \cdot 10 \cdot \text{LMW}$$

Die Konstante 104 ergibt sich aus der Kammergeometrie.

### 2.1.1.7 Herstellung von Fibrinkleber

Zur Herstellung von Fibrinkleber wurden Fibrinogen- und Thrombinlösung hergestellt. 5 g Fibrinogen (Sigma) wurden in 50 ml Trasyolol (Aprotininlösung 1 mg/ml 0,9% NaCl) gelöst, Trasyolol fungiert als Fibrinolysehemmer und sorgt somit für eine Langzeitstabilität. 1 ml Thrombin (Sigma) wurde in 100 ml Thrombinpuffer (20 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung, Apotheke MRI) gelöst, was 5 U/ml Puffer entspricht. Es wurden jeweils 1ml Aliquots hergestellt und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden die hergestellten Lösungen im Wasserbad aufgetaut und im Verhältnis 1:1 gemischt.

### 2.1.1.8 Steigerung der Hydrophilität der Scaffoldoberfläche

Die in dieser Arbeit verwendeten Scaffolds wurden von Prof. Dietmar W. Hutmacher von der Queensland University of Technology zur Verfügung gestellt. Die Scaffolds bestehen aus Polycaprolactone mit 60% Porenanteil und einer Durchschnittsporengröße von 600 µm. Die Scaffolds wogen durchschnittlich 1,6 g, s. Abbildung 14.

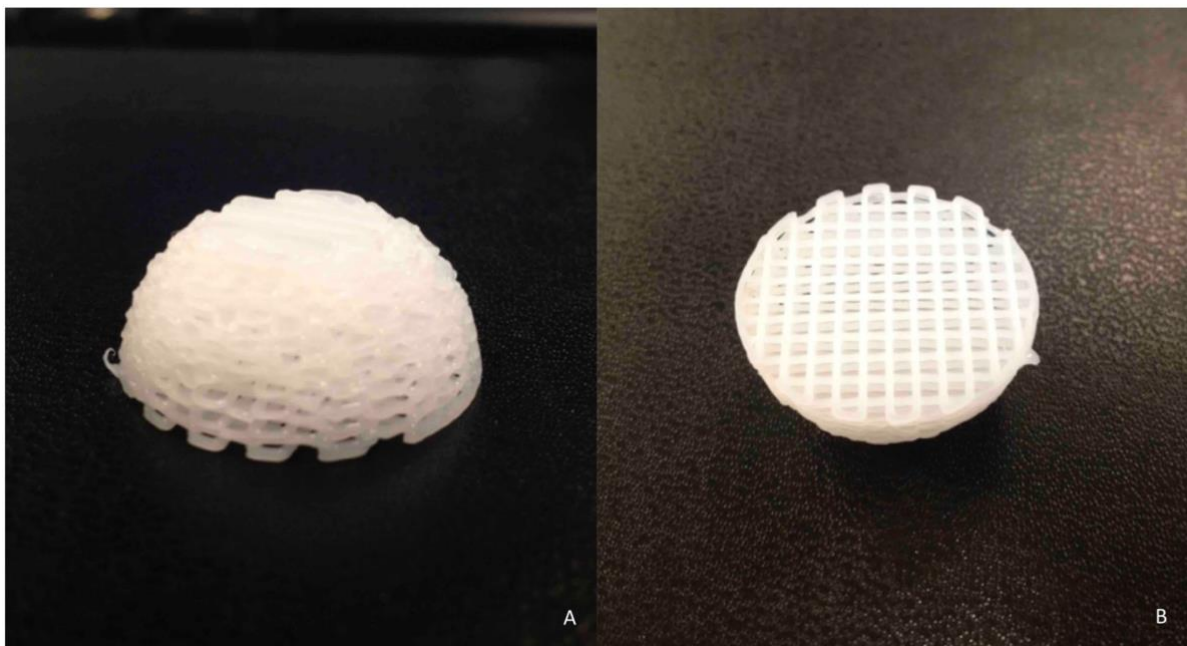


Abbildung 14: Scaffold aus Polycaprolactone mit 60% Porenanteil, sowie einer Durchschnittsporengröße von 600 µm. A) Vorderseite, B) Rückseite (Eigene Darstellung)

Natriumhydroxid (NaOH) wurde zur Verbesserung der Hydrophilität der Scaffoldoberfläche eingesetzt. Dazu wurden die Scaffolds in 70% Ethanol (Hausapotheke MRI) für 30 Minuten getränkt. Im nächsten Schritt wurden die Scaffolds in 5 M NaOH bei 37°C über Nacht im Brutschrank aufbewahrt und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen, bis der pH-Wert auf ca. 7 sank.

### **2.1.1.9 Sterilisierung der Scaffolds**

Mit NaOH bearbeitete Scaffolds wurden über Nacht in 70% Ethanol gelagert. Das Ethanol wurde verworfen und die Scaffolds in der Hood unter Laminar Flow Bedingungen getrocknet. Die Scaffolds wurden für 20 Minuten mit UV-Licht bestrahlt und anschließend mit einer sterilen Einmalpinzette (Carl Roth) umgedreht, so dass die Rückseite mit UV-Licht für weitere 20 Minuten bestrahlt werden konnte. Vor dem Besiedeln wurden die Scaffolds mit NaCl-Lösung gespült.

### **2.1.1.10 Besiedlung und Kultivierung der Scaffolds mit ASCs**

Jedes Gramm Scaffold wurde mit  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen beimpft. Die Scaffolds wurden vor der Beimpfung auf einer Präzisionswaage (Sartorius AG) gewogen, woraufhin dann die zu beimpfende Zellzahl rechnerisch bestimmt wurde. Nachdem die Zellen wie in Kapitel 2.1.1.6 beschrieben gezählt wurden und die jeweilig benötigte Zahl berechnet wurde, wurde der Fibrinkleber wie in Kapitel 2.1.1.7 beschrieben vorbereitet. Um das benötigte Fibrinvolumen zu bestimmen, wurden die etwa 120 mm • 120 mm • 120 mm messenden Scaffolds einer Volumenberechnung unterzogen, wobei die Formel zur Berechnung des Volumens einer Halbkugel  $\frac{1}{2} \cdot (\frac{3}{4} \cdot \pi \cdot \text{Maße des Scaffolds})$  herangezogen wurde. Es berechnete sich folgendes Volumen:

$$\text{Volumen } V_{\text{Scaffold gesamt}} = \frac{1}{2} \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \text{Maße des Scaffolds} = \frac{1}{2} \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot 120 \text{ mm} \cdot 120 \text{ mm} \cdot 120 \text{ mm} \approx 3,619 \text{ cm}^3$$

Da nur die Poren des Scaffolds gefüllt werden, wurde das Volumen V um dem Faktor 0,5 korrigiert. Hieraus ergibt sich

$$\text{Volumen } V_{\text{Poren}} = \text{Volumen } V_{\text{Scaffold gesamt}} \cdot 0,5 = 3,619 \text{ cm}^3 \cdot 0,33 \approx 1,2 \text{ cm}^3 = 1,2 \text{ ml}$$

Um die Menge an Fibrinkleber zu reduzieren, wurde der Kleber 1:4 mit ECGM verdünnt; pro Scaffold wurden demnach 120 µl Thrombinlösung mit 480 µl ECGM (insgesamt 600 µl) und 120 µl Fibrinogenlösung mit 480 µl ECGM (insgesamt 600 µl) angemischt, wobei die Zellen in letzterer Lösung suspendiert wurden. Insgesamt wurde pro Scaffold 1,2 ml verdünnter Fibrinkleber hergestellt. Um Zell- und Scaffoldanzahl zu reduzieren, wurde das Scaffold mit einem Einmalskalpell (No. 21, Produkte für die Medizin AG) in acht gleichgroße Stücke geteilt und zunächst mit jeweils 37,5 µl Thrombin-ECGM-



## Material und Methoden

Lösung benetzt. Daraufhin wurde das Scaffoldstück mit 75  $\mu\text{l}$  der Fibrin-Zell-ECGM-Suspension beimpft und mit den restlichen 37,5  $\mu\text{l}$  Thrombin-ECGM-Lösung überschichtet. Vergleich Abbildung 15.

Pro Patient und Untersuchungszeitpunkt wurden drei Scaffoldstücke herangezogen, so dass der Versuch als Triplikat aufgebaut war. Die Scaffolds wurden in 24-Well-Platten (Greiner-Bio-One) mit ECGM kultiviert, s. Abbildung 16. Ein Medienwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Um zu untersuchen, wie sich die Zellen in einer 3D-Umgebung (Scaffold) im Vergleich zu einer 2D-Umgebung (Well-Platte) verhalten, wurden zusätzlich 6-Well-Platten (Greiner-Bio-One) mit  $5 \cdot 10^4$  ASCs pro Well sowohl hinsichtlich ihrer Proliferation als auch Adiponektinsekretion untersucht.

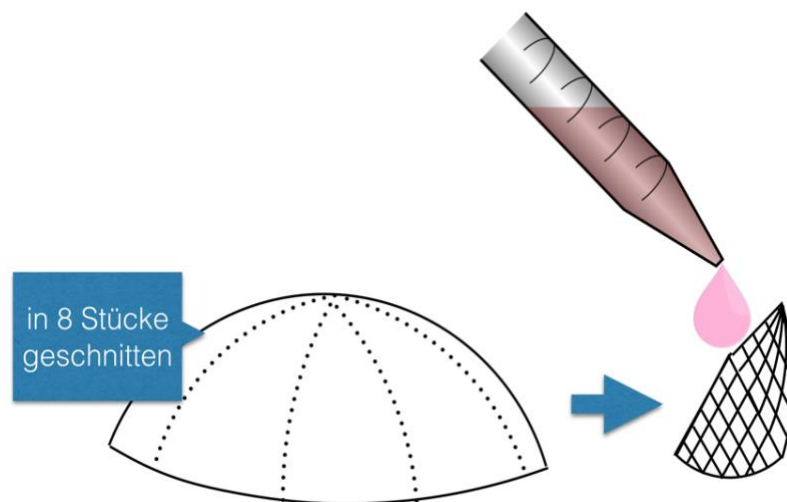


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Beimpfung von Scaffolds. Das Scaffold wird in 8 gleichgroße Kuchenstücke geschnitten und mit der Zell-Fibrin-Medium-Suspension benetzt. (Eigene Darstellung)

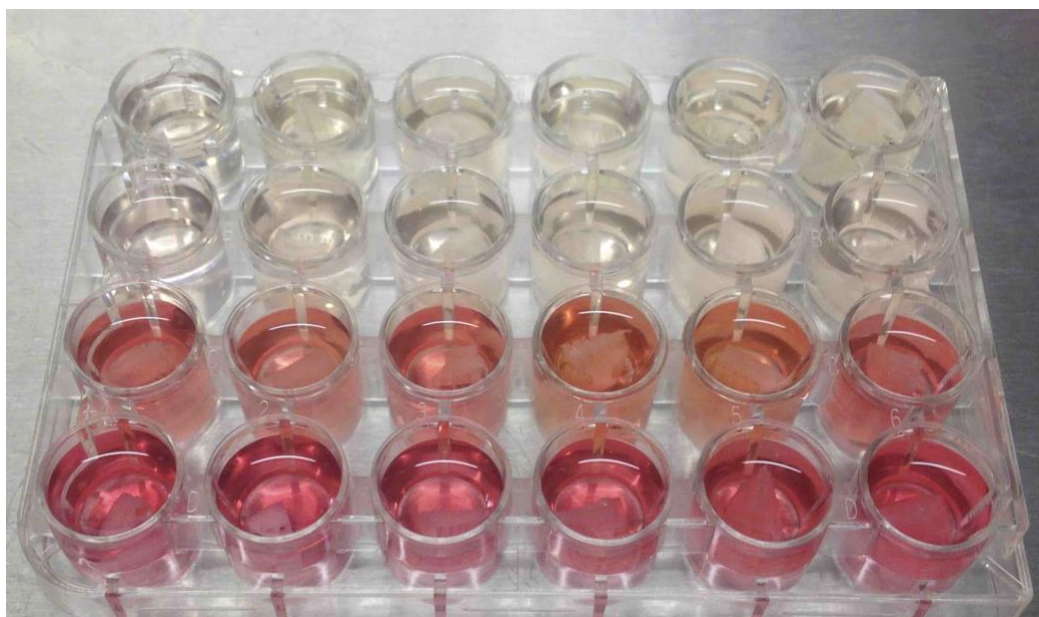


Abbildung 16: Besiedelte Konstrukte in Nährmedium in einer 24-Wellplatte (Eigene Darstellung)

### **2.1.2 Qualifizierung von Zellen**

Um eine genauere Beurteilung der Zellen auf den Scaffolds durchzuführen, wurden die Versuche für die Bildgebung, wenn nicht anders beschrieben, mit auf 7 µm geschnittenen Scheiben der Scaffolds durchgeführt. Die Scaffolds wurden mit ASCs besiedelt und mit den hier genannten Methoden qualitativ untersucht. Die Scaffoldscheiben wurden in 6-Well-Platten (Sarstedt) auf einer Wachstumsfläche von 8,87 cm<sup>2</sup> bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

#### **2.1.2.1 Rasterelektronenmikroskopie**

Die Rasterlektronenmikroskopie (englisch: scanning electron microscopy, SEM) dient zur Analyse von Oberflächenstrukturen. Ihr Vorteil gegenüber der Lichtmikroskopie liegt darin, dass sie eine 1000-fach größere Tiefenschärfe besitzt. Bei der Rasterelektronenmikroskopie fährt ein fein gebündelter Elektronenstrahl aus sogenannten Primärelektronen, die zu untersuchende Oberfläche ab. Dabei entstehen wiederum Elektronen, die durch Wechselwirkungen zwischen Elektronenstrahl und Probe erzeugt werden. Diese Sekundärelektronen werden dann für die Bilddarstellung akquiriert.

Um die Proben für die Rasterelektronenmikroskopie vorzubereiten, wurden diese zunächst in PBS gewaschen und anschließend in 3% Glutaraldehyd (12ml 25% Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich) in 88 ml PBS verdünnt und bei 4°C gelagert) fixiert. Die Fixate sind anschließend bis zu einem Monat haltbar. Nach der Fixierung wurden die Proben einmalig mit PBS gewaschen und dehydriert, indem sie jeweils 2 mal für 15 Minuten in ein von 50% bis 80 % konzentriertes Ethanolbad gebracht und zuletzt einmalig für 30 Minuten im 99% Ethanolbad inkubiert wurden. Danach wurden die Proben über Nacht in 99% Ethanol gekühlt gelagert und mit der „Critical Point Drying“-Methode getrocknet. Die getrockneten Proben wurden mit zerstäubtem Platin mit einer Strömung von 20 mA für 100 Sekunden ummantelt (Quorum K550X, Quorum Technologies Limited, West Sussex), um die elektronische Leitfähigkeit zu erhöhen. Die Proben wurden zur Fernhaltung störender Atome in einer Vakuumkammer mit dem Elektronenmikroskop (JSM6390LA analytical SEM, Joel Ltd., Tokyo, Japan) nach jeweils 14 bzw. 39 und 66 Tagen gescannt und bildlich festgehalten.

### **2.1.2.2 Vitalitätsfärbung mit FDA+PI – Lebend-/Totfärbung**

Vitale Zellen setzen Fluorescein in ihrer Zellmembran um, indem es im Cytoplasma hydrolytisch gespalten wird, so dass sie fluoreszierend grün leuchten. Beschädigte oder abgestorbene Zellen haben eine durchlässige Zellmembran, so dass Propidiumiodid in diese Zellen eindringen kann. Es lagert sich an die DNA an und färbt diese Zellen leuchtend rot.

Die fluoreszenzbasierte Vitalitätsuntersuchung erfolgte für alle Proben an Tag 5, 14 und 35. Dafür wurde eine Färbelösung aus Propidiumiodid PI (Sigma-Aldrich) und Fluoresceindiacetat FDA (Sigma-Aldrich) verwendet. Hierzu wurde PI-Pulver in Wasser für Injektionszwecke von Braun im Verhältnis 1 mg/ml und FDA-Pulver zu 25 mg/ml in Aceton gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert bei -20°C aufbewahrt. Kurz vor der Verwendung wurden die Materialien im Wasserbad aufgetaut. Die Färbelösung wurde aus 500 µl PI-Lösung und 500 µl FDA-Lösung in 39 ml PBS in einem Falcon-Tube angesetzt und mit einem Vortexer (Genie II, Scientific Industries, USA) gemischt. Die Färbelösung wurde sofort verwendet.

Die zu untersuchenden Scaffoldscheiben wurden vom Medium mit einem Sauger befreit und mit der frisch angemischten Färbelösung beschichtet. Nach 30 Sekunden Inkubationszeit im Dunkeln wurden die Proben umgehend am Fluoreszenzmikroskop mit Fluoreszenzeinheit unter UV-Licht betrachtet und fotodokumentiert, wobei die blaue Filtereinheit zur Darstellung lebender Zellen und die grüne Filtereinheit zur Darstellung toter Zellen benutzt wurden.

### **2.1.2.3 Phalloidinfärbung**

Phalloidin ist ein Toxin des Pilzes *Amanita phalloides*. Dieses wird zur spezifischen Anfärbung hochkonservierter F-Aktin Komponenten des Zytoskeletts verwendet. Dazu wurden die mit Zellen besiedelten Scaffoldscheiben 2 mal mit vorgewärmten PBS gewaschen. Die Proben wurden dann in 3,7% Formaldehyd in PBS (Roth) für 10 Minuten fixiert<sup>1</sup>. Danach folgte zwei- oder mehrmaliges Waschen mit PBS. Jede Probe wurde dann in eine Petrischale transferiert und für 3-5 Minuten mit 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) benetzt. Es erfolgte erneut zwei- oder mehrmaliges Waschen mit PBS. Um unspezifische Hintergrundsignale beim Fluoreszenzmikroskopieren zu reduzieren,

<sup>1</sup> Methanol kann Aktin während der Fixierung zerstören. Daher ist darauf zu achten, methanolfreie Formaldehyde für die Fixierung zu verwenden.

## Material und Methoden

wurden die Proben für 20-30 Minuten mit 1% BSA (Bovines Serum Albumin, Sigma-Aldrich) in PBS inkubiert. Zur Herstellung der Färbelösung wurden je 3 µl der methanolischen Vorratslösung AlexaFluor 488 (Life Technologies) in 200 µl PBS für jede der zu färbenden Probe gelöst und diese für 20 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Das Ansetzen einer Phalloidin-Stammlösung (SL) folgte dem Herstellerprotokoll: Vom Hersteller geliefertes lyophilisiertes Pulver (300E Phalloidin) wurde in 1,5 ml Methanol gelöst (Endkonzentration: 200 E/ml, entspricht 6.6 µM), aliquotiert (200 µl Proben) und bei -20°C unter Lichtausschluss bis zum Gebrauch gelagert. Eine Einheit (E) ist definiert als die Menge Phalloidin um einen Objektträger fixierter Zellen anzufärben (entspricht 5 µl SL). Im Anschluss folgte zwei- oder mehrmaliges Waschen mit PBS, woraufhin die Proben im inversen Labormikroskop (DM IL, Leica, Software LAS 4.3) fluorogen bei einer Wellenlänge von 488 nm untersucht wurden. Das F-Aktin stellte sich leuchtend grün dar. Für die Langzeitlagerung von mit Phalloidin gefärbten Präparaten wurden die Proben lichtisoliert luftgetrocknet und mit ProLong® Gold Antifade Reagent (Life Technologies) benetzt. So behandelte Proben konnten mindestens 6 Monate lichtgeschützt bei 2-6°C gelagert werden.

### **2.1.2.4 Ölrot-O-Färbung**

Ölrot-O ist ein fettlöslicher, rotfärbender Farbstoff, der zu den Azofarbstoffen gehört. Die Ölrot-O-Färbung wird verwendet, um Triglyceride darzustellen. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 2,1 g Ölrot-O-Pulver (Sigma) in 600 ml 70% Isopropanol (Apotheke, MRI) gegeben und 1 Stunde mit einem Magnetrührer vermischt. Die Stammlösung wurde wiederum mit 450 ml Aqua dest. (Apotheke, MRI) verdünnt und eine weitere Stunde umgerührt. Die Ölrot-O-Färbelösung wurde direkt vor Gebrauch mit einem Steril-Filter (Nalgene) filtriert. Die Proben wurden für die Färbung wie folgt vorbereitet: 10 ml 10% Formalin (Roth) wurden in das Medium, in dem die Scaffoldscheiben kultiviert wurden, gegeben und für 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die komplette Flüssigkeit wurde abgesaugt, 15 ml 10% Formalin wurde erneut auf die Zellen pipettiert und für 5 Stunden bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Das Formalin wurde abgesaugt, die Probe mit 15 ml Ölrot-O-Färbelösung benetzt und für weitere 2 Stunden im Kühlschrank gelagert. Die Ölrot-O-Färbelösung wurde abgesaugt, die Präparate mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend in PBS bei Phasenkontrastlicht fotografiert und dokumentiert.

### 2.1.3 Semiquantifizierung von Zellen

#### 2.1.3.1 Trypsin-/Kollagenaseverdau

Um die DNA aus den Zellen freizusetzen, wurden die besiedelten Scaffolds mit einer Trypsin-/Kollagenaselösung (Collagenase-Trypsin-Solution = CT-Solution) verdaut. Sowohl Trypsin als auch Kollagenasen gehören zu den Proteasen, die Eiweiße spalten und somit die Zellstruktur destruieren. Ein Achtelstück Scaffold wurde in 2 ml CT-Solution über Nacht bei 37°C im Wasserbad verdaut und danach sorgfältig mit einem Vortexer gemischt. Anschließend wurde für 45 Minuten bei 4000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei -20°C gelagert.

#### 2.1.3.2 Ermittlung des DNA-Gehalts durch Hoechst-Assay

Der Hoechst-Assay ist eine DNA-Quantifizierungsmethode bei der der Hoechst 33258-Farbstoff Bisbenzimidazol an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) bindet, wodurch es zu einer Fluoreszenzverstärkung, die zu einer Verschiebung der Emissionswellenlänge führt, kommt. Die Konzentration der mit Farbstoff gebundenen DNA ist linear zu den Emissionswerten. Die entstehenden Fluoreszenzsignale können optisch gemessen werden. Für diese Versuchsreihe wurden ASCs von drei der sechs Patientinnen untersucht.

DNA vom Kalbsthymus (Sigma-Aldrich) wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml in PBS gelöst, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Hoechst-Stocklösung (1 mg/ml in TEN-Puffer (Apotheke MRI) wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die Arbeitslösung wurde vor jedem Versuch aus 100 µl Stocklösung durch Verdünnung mit 100 ml PBS frisch hergestellt. Eine DNA-Standardreihe in absteigender Konzentration von 4000-62,5 ng/Well wurde als Duplikat mit der Limited-Dilution-Methode hergestellt. Dabei wurden in die ersten beiden Wells (A1 und A2) einer lichtundurchlässigen 96-Well-Platte (Brandt) jeweils 80 µl der Standard-DNA (100 µg/ml) pipettiert. Abbildung 17 zeigt zur Veranschaulichung eine 96-Wellplatte als tabellarische Darstellung. In den folgenden absteigenden Wells der ersten zwei Spalten wurde jeweils 40 µl PBS pipettiert. 40 µl des ersten Wells mit reiner Standard-DNA wurden mit dem darunterliegenden Well mit 40 µl vorgelegtem PBS durch auf- und abpipettieren durchmischt. 40 µl dieser Mischung wurden wiederum in das nächst darunterliegende Well pipettiert. Die Verdünnungsschritte wurden bis Zeile G entsprechend durchgeführt und die letzte Mischung verworfen. In Zeile H befand sich 40µl PBS als Leerwert. Hierdurch ergab sich eine Verdünnungsreihe von

## Material und Methoden

4000/2000/1000/500/250/125/62,5 ng/Well. 40 µl der zu untersuchenden Proben wurden in Triplikaten unverdünnt in die Wells pipettiert. Anschließend wurden 160 µl der Hoechst-Arbeitslösung in die Wells pipettiert und die Platte lichtgeschützt für 20 Minuten inkubiert. Die fluorimetrische Messung erfolgte bei einer Anregung von 360 nm und einer Emissionsmessung von 460 nm im Photometer (Chameleon V Multilabelreader, Deelux Labortechnik Gödenstorf). Die dazugehörige Software stammt von der Firma Mikrowin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abbildung 17: Exemplarische Darstellung einer 96-Wellplatte in Tabellenform zur Veranschaulichung. (Eigene Darstellung)

### 2.1.4 Bestimmung des Adiponektingehalts

#### 2.1.4.1 Differenzierung zu Adipozyten

Adiponektin ist ein Peptidhormon, das im menschlichen Organismus hauptsächlich von Adipozyten sezerniert wird. Besiedelte ACSs, wie in Kapitel 2.1.1.10 beschrieben, wurden zu Adipozyten differenziert. Für diese Versuchsreihe wurden ASCs ebenfalls von drei der sechs o.g. Patientinnen untersucht. Alle Scaffolds wurden nach Vierteilung von ECGM befreit und zunächst mit einem Induktionsmedium vermischt. Dessen Herstellung erfolgte durch Lösung von 25 ml FKS (5%, Biochrom), 5ml Antibiotic-Antimycotic (Gibco), 500 µl Insulin, eine Prise Hydrocortison (Sigma), 0,05 g IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin, Sigma) und 0,01 g Indomethacin (Sigma) in 500 ml  $\alpha$ -MEM (Sigma) wurden, abschließend wurden die Scaffolds in 2 ml Lösung pro Well kultiviert. Nach 24 Stunden wurde der erste Überstand als Ausgangskonzentration (0. Supernatant) entnommen, nach weiteren 24 Stunden das Induktionsmedium abgesaugt und mit Differenzierungsmedium versetzt. Dieses setzte sich aus 500 ml  $\alpha$ -MEM, 25 ml FKS, 5 ml Antibiotic-Antimycotic und 500 µl Insulin zusammen. Es wurde

nach dem Schritt der Differenzierung an Tag 2, 5, 8, 11 und 14 der jeweils 1 ml Überstand abgenommen und bis zur Adiponektin-gehaltbestimmung bei -20°C gelagert.

### **2.1.4.2 Adiponektin-ELISA (Enzym-linked Immunosorbent Assay)**

Die Adiponektinkonzentration der Proben wurde mit dem DuoSet® ELISA Development-Kit von R&D Systems bestimmt, welches nach der „Sandwich-Methode“ funktioniert. Ein capture-antibody (Fängerantikörper) am Boden eines Wells bindet Adiponektin, das als mittlere Schicht in das Well gegeben wird. Die Menge des gebundenen Adiponektin wird dann durch einen fluoreszierenden detecting-antibody (Erkennungsantikörper) bestimmt. Die optische Dichte ist dabei proportional zur Adiponektinkonzentration und wird photometrisch bestimmt. Alle Inkubationsschritte fanden, sofern nicht anders beschrieben, bei Zimmertemperatur statt.

Zunächst wurden transparente 96-Well-Platten (Sigma-Aldrich) mit dem capture-antibody beschichtet. Dafür wurde der capture-antibody als Arbeitslösung in einer Konzentration von 2 µg/ml in PBS gelöst und jeweils 100 µl dieser Lösung in ein Well pipettiert, mit einer Deckfolie abgedeckt über Nacht inkubiert. Der Inhalt wurde dekantiert, die Platte mit sauberen Zellstofftüchern abgetupft und jedes Well mit 400 µl eines Waschpuffers gereinigt. Als Waschpuffer diente 0,05% Tween® (R&D Systems) in PBS. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Die Beschichtungsreaktion wurde mit 300 µl eines Verdünnungsreagenz als Blockpuffer, 1% BSA (R&D Systems) in PBS, pro Well gestoppt. Ab hier konnten Platten entweder zur direkten Weiterverarbeitung genutzt oder bei -20°C gelagert werden. Für den ELISA wurden je 100µl der Probe in Triplikaten bzw. des Standards in Duplikaten in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:20<sup>2</sup> mit dem Verdünnungsreagenz in ein Well pipettiert. Der im Kit mitgelieferte Standard wurde wie in Kapitel 2.1.2.2 beschrieben zur Herstellung einer Standardkurve mit einer Ausgangskonzentration von 4000 pg/ml hergestellt. Die Platte wurde mit einer Deckfolie abgeklebt für zwei Stunden inkubiert. Danach wurde der Inhalt dekantiert, die Platte mit sauberen Zellstofftüchern abgetupft und es folgte zweimal der oben beschriebene Waschvorgang. Nun wurden je 100 µl der detecting-antibody-Arbeitslösung (2 µg/ml PBS) in die Wells pipettiert und für weitere zwei Stunden abgedeckt inkubiert. Der Inhalt wurde dekantiert, die Platte mit sauberen Zellstofftüchern abgetupft und wieder zweimal gewaschen. Anschließend wurden

<sup>2</sup> Die optimale Verdünnung wurde in vorangehenden Versuchen mit dem Kit bestimmt.

## Material und Methoden

100 µl einer 0,5%igen Streptavidin-HRP-Arbeitslösung in PBS (Streptavidin konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, englisch: horseradish-peroxidase, HRP, R&D Systems) in die Wells pipettiert und lichtgeschützt für 20 Minuten inkubiert. Der Inhalt der Platte wurde anschließend wieder dekantiert, mit frischen Zellstofftüchern abgetupft und der Waschvorgang sechsmal wiederholt. Danach wurden 100 µl einer Substrat-Lösung, die sich 1:1 aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Color Reagent A, R&D Systems), und Tetramethylbenzidin (Color Reagent B, R&D Systems) zusammensetzte in die Wells pipettiert und erneut lichtgeschützt für 20 Minuten inkubiert, wonach eine Blaufärbung der Proben zu beobachten war. Die Färbereaktion wurde mittels Hinzufügen von 50 µl 10% Schwefelsäure H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Well gestoppt. Ein Farbumschlag von blau auf gelb erfolgte bei erfolgreichem Reaktionsablauf. Die Platte wurde unverzüglich einer optischen Dichtmessung im Photometer (Multilabelreader, Deelux Labortechnik) bei einer Wellenlänge von 450 nm unterzogen. Bei der zugrundeliegenden Software handelte es sich ebenfalls um Mikrowin.

### 2.1.5 Datenauswertung

Alle Auswertungen und grafische Darstellungen der Rohdaten wurden mit Microsoft® Excel 2011 für Mac erstellt. Die Einzelwerte wurden in ihrer Einheit arithmetisch gemittelt und die Standardabweichung (MW±SD) als Streuungsmaß bestimmt. Über die Standardkurve wurde die Regression ermittelt und damit die Werte der zu untersuchenden Proben bestimmt.

## 2.2 Dynamische in-vitro-Evaluierung von ASCs auf Scaffolds

Für die Durchführung dieser Versuchsreihe wurden ASCs kultiviert <sup>3,4</sup> und auf 12 Scaffolds – 6 für die Versuchsreihe im Bioreaktor und 6 für die Versuchsreihe unter statischen Kulturbedingungen in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon™) - verteilt.

<sup>3</sup> Eine gleichzeitige Besiedlung der Scaffolds mit HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) war geplant, jedoch musste davon auf Grund einer Kontamination der HUVECs während ihrer Kultivierung abgesehen werden.

<sup>4</sup> Die Gesamtzellausbeute ergab  $8,2 \cdot 10^6$  Zellen. Damit standen pro Scaffold nur ca.  $6,8 \cdot 10^5$  Zellen zur Verfügung, entsprechend  $4,25 \cdot 10^5$  Zellen pro Gramm Scaffold (Vergleich zur statischen Versuchsreihe in München standen  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen pro Gramm Scaffold zur Verfügung).



## Material und Methoden

Untersucht wurden Vitalität und Proliferation auf den Scaffolds an Tag 10, 39 und 66. An Tag 39 wurden die Proben zusätzlich mit SEM-Imaging untersucht. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurden pro Versuchsreihe dementsprechend 2 Scaffolds als Doppelbestimmung herangezogen. Die Aufteilung der Scaffolds sowie den gesamten Versuchsaufbau für die darauffolgenden Experimente zeigen Abbildung 18 und Abbildung 19<sup>5</sup>. Die für diesen Versuch verwendeten ASCs wurden von Prof. Tong Sie Wah von der National University of Singapore bereitgestellt.

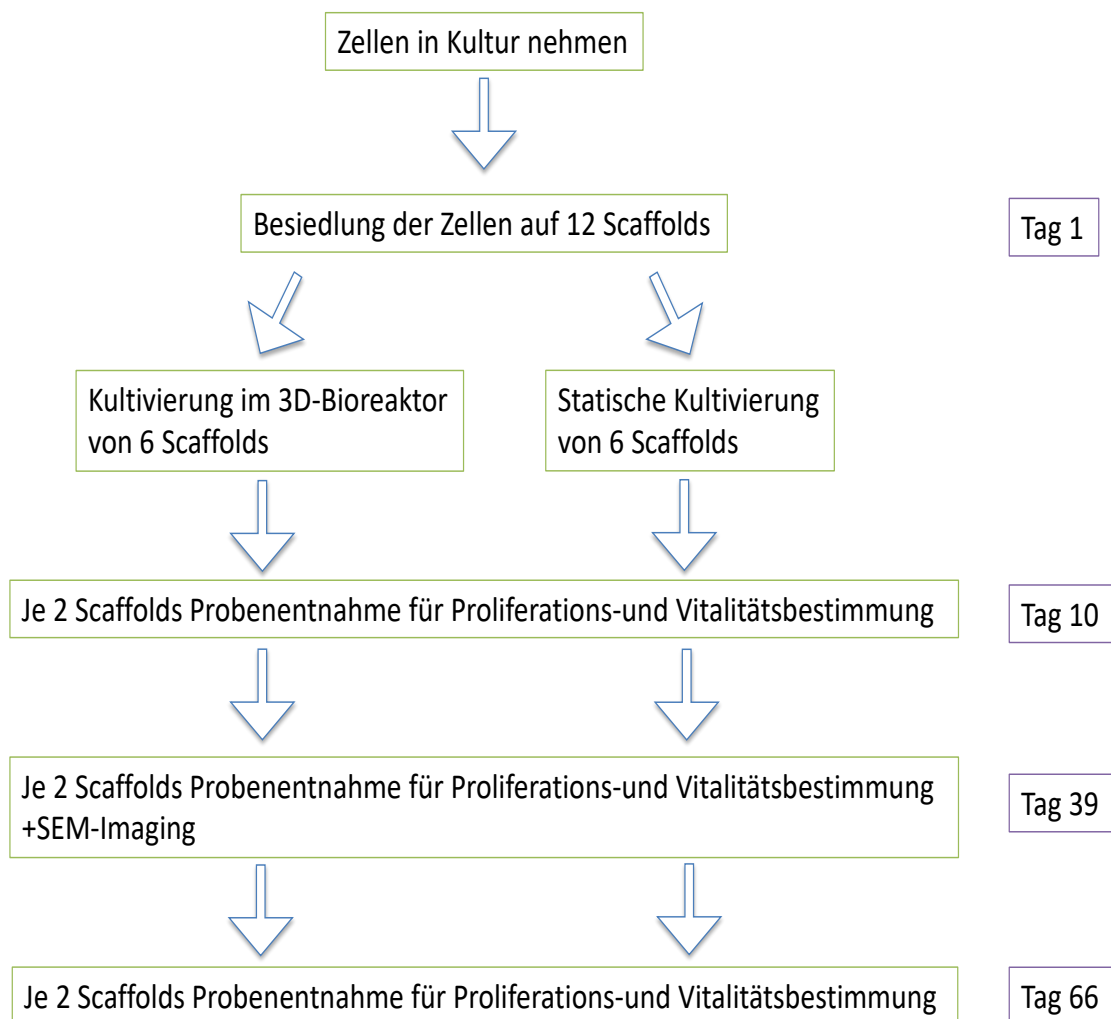


Abbildung 18: Schematischer Experimentaufbau dynamische Versuchsreihe. (Eigene Darstellung)

<sup>5</sup> Die statische Versuchsreihe musste wegen Kontamination an Tag 27 abgebrochen werden

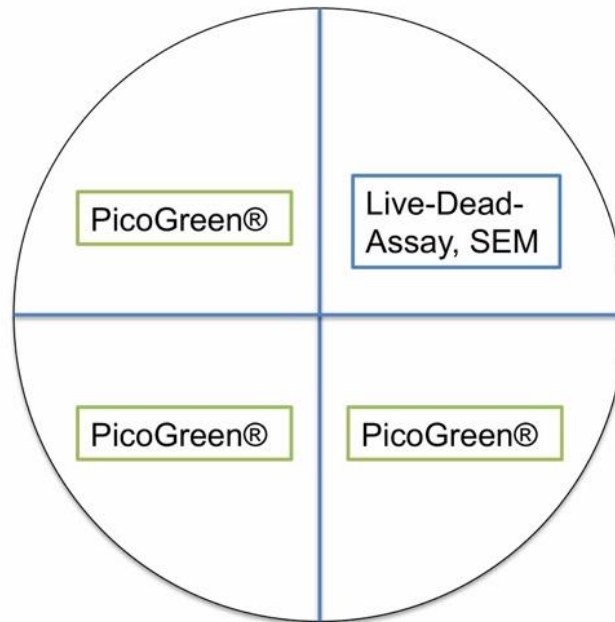


Abbildung 19: Schematische Darstellung eines Scaffolds in 4 gleich große Stücke für die einzelnen Versuche. (Eigene Darstellung)

### 2.2.1 Von der Kultivierung zur Besiedlung mit ASCs auf Scaffolds

#### 2.2.1.1 Kultivierung der ASCs

Die ASCs wurden in Petrischalen (10 cm Durchmesser) mit DMEM + Glutamax (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco) + 10% FKS (Research Instruments PTE LTD) + PenStrep (Gibco) kultiviert. Nach der Zellernte und Expansion in neun 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Corning SciMed Asia) wurden die ASCs für 12 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (Jouan Universal Co2 Incubator IGO150) kultiviert, wobei eine Zellexpansion durch Splitting im Verhältnis von 1:3 am 4. und am 9. Tag stattfand. Die Zellen wurden im oben erwähnten Medium kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

#### 2.2.1.2 Zellexpansion

Die Zellexpansion wurde wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben durchgeführt. Als in dieser Arbeit noch nicht beschriebene Materialien und Geräten wurden Trypsin/EDTA (TE) von Gibco, ein Lichtmikroskop (Olympus, CK40 with Camera Olympus DP25, Japan) und eine Zentrifuge (Sartorius Sigma 3 to 18K) verwendet.

#### 2.2.1.3 Zellerntezahl

Die Zahl der Zellen pro 175 cm<sup>2</sup> Kulturflasche wurde mit Hilfe des cellcounters (Bio-Rad TC10 Automated Cell Counter) ermittelt.

#### **2.2.1.4 Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau**

Die Färbung der Zellen mit Trypanblau 0,4% (Sigma) sowie die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte wie in Kapitel 2.1.1.6 erläutert.

#### **2.2.1.5 Herstellung von Fibrinkleber**

Der Fibrinkleber wurde wie in Kapitel 2.1.1.7 beschrieben hergestellt und in Aliquotes bei -20°C gelagert. Fibrinogen, Trasylol, Thrombin, und Thrombinpuffer stammten von Baxter Healthcare Asia Pte Ltd.

#### **2.2.1.6 Steigerung der Hydrophilität der Scaffoldoberfläche**

Hier erfolgte der Ablauf analog zu Kapitel 2.1.1.8.

#### **2.2.1.7 Sterilisierung der Scaffolds**

Die Scaffolds wurden wie in Kapitel 2.1.1.9 beschrieben sterilisiert. Zusätzlich wurde ein Sterilisationstest durchgeführt, indem die Scaffolds über Nacht in Medium gelagert wurden. Bei einer unvollständigen Sterilisation der Scaffolds kommt es zu etwaigen Kontaminationen, die lichtmikroskopisch nachgewiesen werden können. Bei negativem Sterilisationstest, konnte das Medium abgesaugt und die Scaffolds getrocknet werden.

#### **2.2.1.8 Besiedlung und Kultivierung der Scaffolds mit ASCs**

Der Fibrinkleber wurde wie in Kapitel 2.2.1.5 hergestellt und analog 1:4 mit Medium verdünnt, dabei handelte es sich um DMEM+Glutamax (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco) + 10% FKS (Research Instruments PTE LTD) + PenStrep (Gibco). Es wurden pro Scaffold 1,2 ml verdünnter Fibrinkleber hergestellt. Das Scaffold wurde mit der konvexen Seite nach unten mit 300 µl der beschriebenen Thrombin-Medium-Lösung benetzt. Anschließend wurden die gesamten 600 µl Fibrinogen-Zell-Medium-Lösung auf das mit Thrombin benetzte Scaffold transferiert und mit den übrigen 300 µl der Thrombin-Medium-Lösung bedeckt. Beimpfte Scaffolds für die statische Versuchsreihe wurden anschließend steril in 50 ml Falcontubes (Thermo Scientific Nunc) im Brutschrank mit DMEM+Glutamax (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco) + 10% FKS (Research Instruments PTE LTD) + PenStrep (Gibco) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Scaffolds wurden für die dynamische Versuchsreihe mit Nadeln durchgestochen, durch gekürzte Gummischläuche als

## Material und Methoden

Stopper an der Nadel in ihrer Position fixiert und in ein Gefäß mit 2,5 l des o.g. Mediums transferiert. Vergleich Abbildung 20. Anschließend wurde der Bioreaktor (TisXell Biaxial Bioreactor, Quintech Life Sciences) gemäß Protokoll in Betrieb genommen. Ein Mediumwechsel für den Bioreaktor fand alle 2 Wochen statt.



Abbildung 20: Aufbau Bioreaktor. A) Einsetzen der durchgestochenen TECs. B) Zuschrauben des Gefäßes. C) Bioreaktorgefäß mit Scaffolds. Zu erkennen sind die Nadel, an denen die TECs fixiert sind. Das Gefäß ist mit Nährmedium gefüllt. D) Der Bioreaktor ist in einem Brutschrank installiert. E) Bioreaktor-Einstellungen auf dem Display. (Eigene Darstellung)

## 2.2.2 Qualifizierung von Zellen

### 2.2.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Siehe Kapitel 2.1.2.1.

### 2.2.2.2 Hellfeldmikroskopie

Die Zellen wurden unter einem Lichtmikroskop (Olympus, CK40 with Camera Olympus DP25, Japan) beurteilt und fotodokumentiert.

### **2.2.2.3 Vitalitätsfärbung mit FDA+PI – Lebend-/Totfärbung**

Analog zu Kapitel 2.1.2.2 wurde eine Färbelösung aus Propidiumiodid PI (Sigma-Aldrich) und Fluoresceindiacetat FDA (Sigma-Aldrich) verwendet. Die FDA-Färbelösung wurde im Verhältnis von 1:100, die PI-Färbelösung im Verhältnis von 1:25 mit PBS verdünnt. Jede zu untersuchende Probe wurde zweimal in PBS gewaschen und wie oben beschriebenen in verdünnter FDA-Färbelösung für 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde daraufhin erneut zweimal in PBS gewaschen. Die anschließende Inkubation mit der PI-Färbelösung erfolgte für 2 Minuten bei Raumtemperatur. Ein letztes Waschen mit PBS folgte, bevor die Proben innerhalb von 30 Minuten mittels Konfokalmikroskopie fotodokumentarisch festgehalten wurden.

### **2.2.3 Semiquantifizierung von Zellen**

#### **2.2.3.1 Trypsin-/Kollagenaseverdau**

Der Versuchsaufbau ist analog zu Kapitel 2.1.3.1. In dieser Versuchsreihe wurde je ein Viertel eines Scaffolds mit einem Skalpell in weitere acht Teile mit einem Skalpell geschnitten und in 2 ml CT-Solution für drei Stunden im Brutschrank inkubiert, wobei zu jeder Stunde die Proben gründlich durch vortexen vermengt wurden. Anschließend wurden die Proben zur Lagerung bei -80°C tiefgefroren und zur erneuten Verwendung im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und gevortext. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Abschließend wurden die Proben für 45 Minuten bei 4000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde wie in Kapitel 2.1.3.1 beschrieben gesammelt.

#### **2.2.3.2 Ermittlung des DNA-Gehalts durch PicoGreen®-Assay**

Die Ermittlung des DNA-Gehalts wurde mit dem Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kit (Invitrogen) durchgeführt. Dabei wird doppelsträngige DNA durch Fluoreszenzfärbung quantifiziert. Eine High-Range Standardkurve mit 2 µg/ml DNA-Stocklösung wurde hergestellt. Zu je 100 µl unverdünnter Probe wurden 100 µl Arbeitslösung des Reagenz in eine lichtundurchlässige 96-Wellplatte (Thermo Scientific Nunc) pipettiert. Bei der Arbeitslösung handelte es sich um eine 200-fach verdünnte Lösung des Quant-iT™ PicoGreen® - Reagenz in TE Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5). Die Platte wurde für 2-5 Minuten lichtgeschützt inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 480 nm Exzitation und 520 nm Emission photometrisch (Tecan Infinite F200) gemessen.

#### **2.2.4 Datenauswertung**

Die graphische Auswertung aller Daten wurde mit Microsoft® Excel® für Mac 2011 durchgeführt. Von allen ermittelten Daten wurden die arithmetischen Mittelwerte mit Standardabweichung ( $MW \pm SD$ ) als Streuungsmaß bestimmt. Über Regressionsanalysen wurden Zusammenhänge zwischen den Faktoren demonstriert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse statische in-vitro-Evaluation von ASCs auf Scaffolds

##### 3.1.1 Rasterelektronenmikroskopie

In der Rasterelektronenmikroskopie stellte sich die Oberfläche von nativen, unbesiedelten Scaffolds eher glatt strukturiert mit abwechselnd zarten Rillen und kleinen Unebenheiten dar. Zudem kam die verschachtelnd anmutende Scaffoldkonstruktion mit einer balkenartigen Struktur zur Darstellung, s. Abbildung 21.

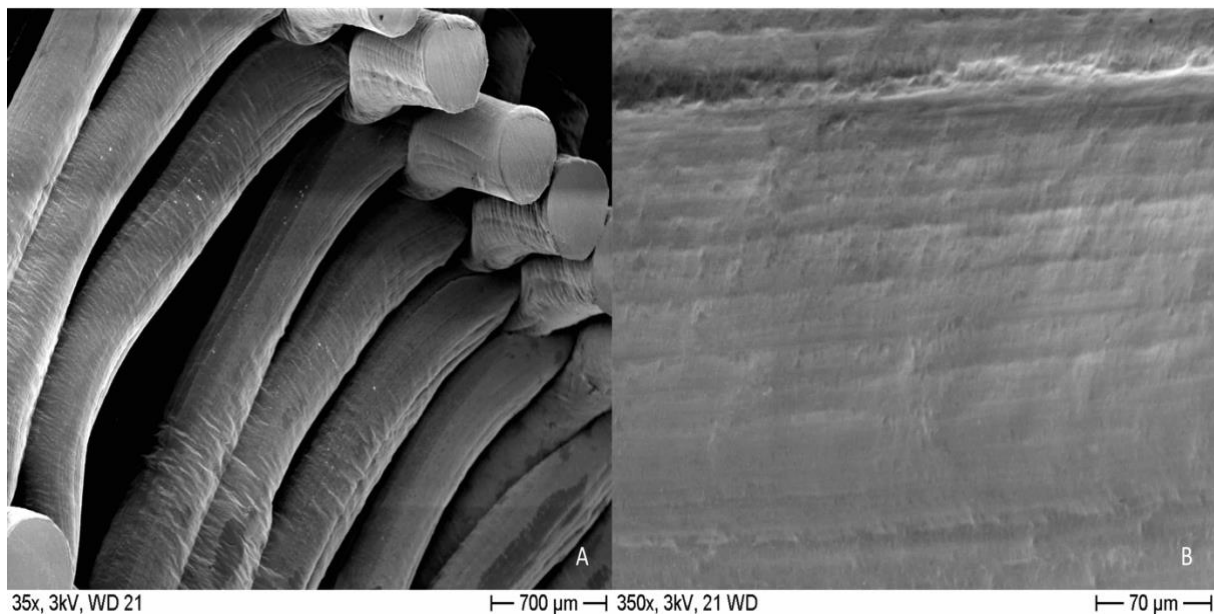


Abbildung 21: Visualisierung der nativen Scaffoldoberfläche und deren Bauweise. A. 35-fache Vergrößerung, Darstellung mehrerer Fibrillen. B. 350-fache Vergrößerung, Darstellung Oberfläche einer Fibrille. (Eigene Darstellung)

Abbildung 22 dient der Veranschaulichung der rasterelektronenmikroskopischen Morphologie von einzelnen ASCs auf dem Scaffold nach 5 Tagen Besiedlungszeit. Zur Darstellung kommen langgestreckte, spindelförmige Zellen, die auf der Scaffoldoberfläche adhärieren. Dieser Befund ist gut vereinbar mit ASCs. Aufgrund von fehlenden Störungen durch andere Materialien oder Strukturen eignete sich die Besiedlungstechnik ohne Fibrinkleber dafür am besten.

## Ergebnisse

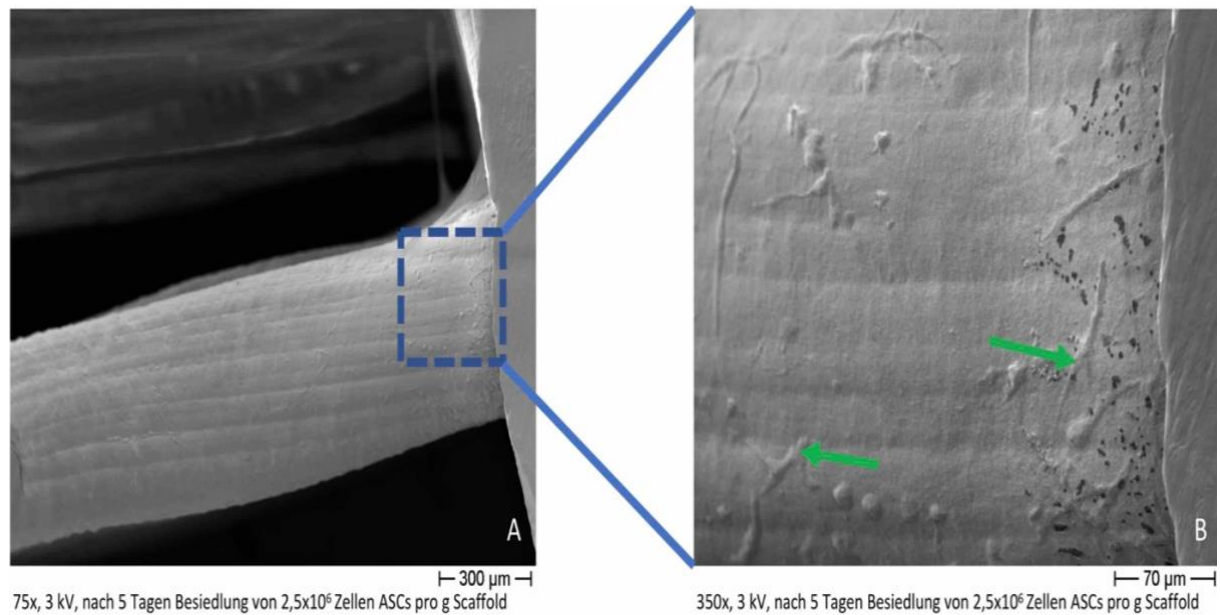


Abbildung 22: Einzelne ASCs. A. Scaffoldarchitektur mit einzelnen ASCs nach 5 Tagen, die ohne Fibrinkleber besiedelt wurden. B. vergrößerter Ausschnitt von A. Es sind hochauflösend einzelne ASCs erkennbar (grüne Pfeile). (Eigene Darstellung)

Abbildung 23 zeigt abwechselnd teppich- und netzartig haftende Zellrasen, die sich wie ein Film auf das Scaffold legen. In Bild C erscheint beispielhaft der Zellverbund leicht flächendeckender, als auf den anderen Aufnahmen. Hier erkennt man zudem das Zerreißen und Anheben des Zellrasens durch den Trocknungsprozess vor Bildgebung. In der 150-fachen Vergrößerung werden einzelne Zellen im Zellrasen mit ihrer für ASCs charakteristischen Morphologie sichtbar, s. Abbildung 24. Elektronenmikroskopisch zeigte sich optisch kein wesentlicher Unterschied zwischen den mit oder ohne Fibrinkleber besiedelten Konstrukten. In den bildgebenden Versuchsreihen wurde daher zur besseren Beurteilung der Zell-Scaffold-Interaktion auf Fibrinkleber bei der Besiedlung, wenn nicht anders angegeben, weitestgehend verzichtet und fibrinbesiedelte Konstrukte nur teilweise als Vergleich herangezogen. Für die Proliferations- und Adiponektinassays wurde Fibrinkleber auf Grund des besseren Handlings bei der Zellbeimpfung verwendet. Darauf wird in der Diskussion näher eingegangen.



## Ergebnisse

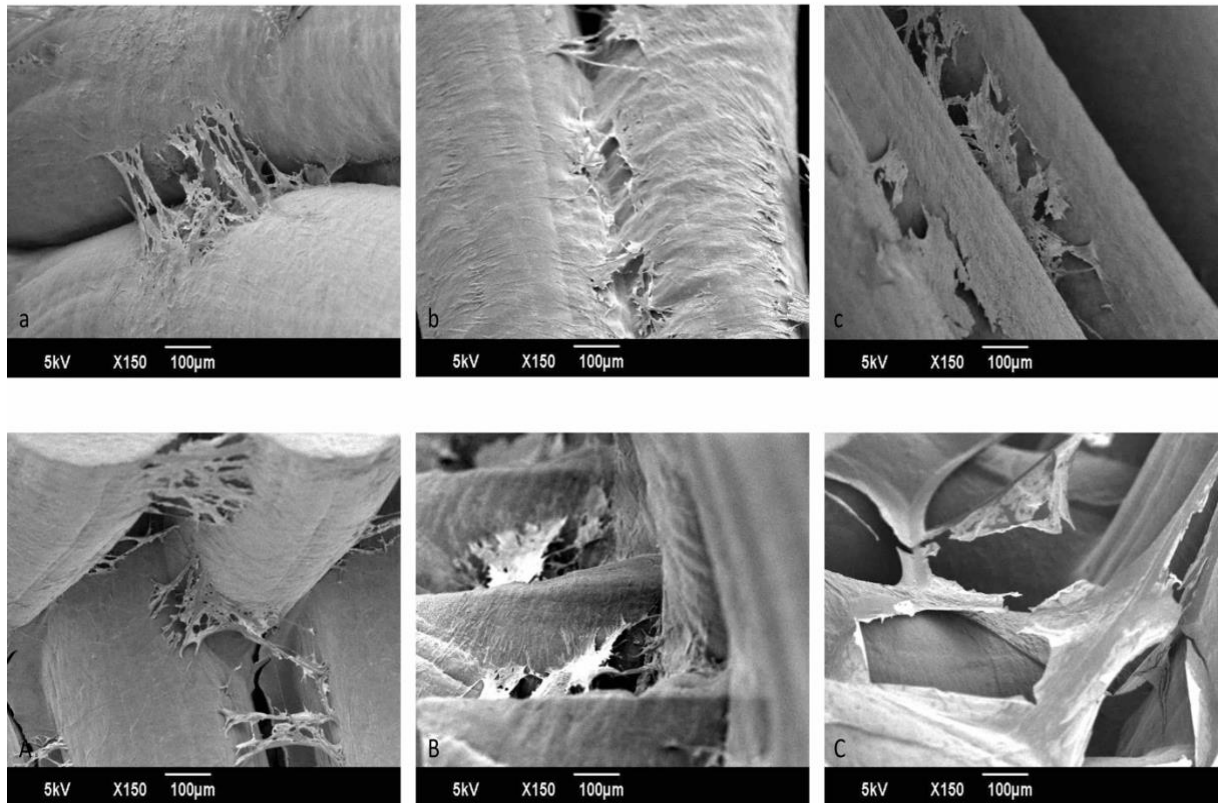


Abbildung 23: Besiedlung von Scaffolds mit  $2,5 \times 10^6$  ASCs obere Reihe a-c. ohne, untere Reihe A-C. mit Fibrinkleber nach 14 Tagen exemplarisch von drei unterschiedlichen Patientinnen a/A-c/C. (Eigene Darstellung)

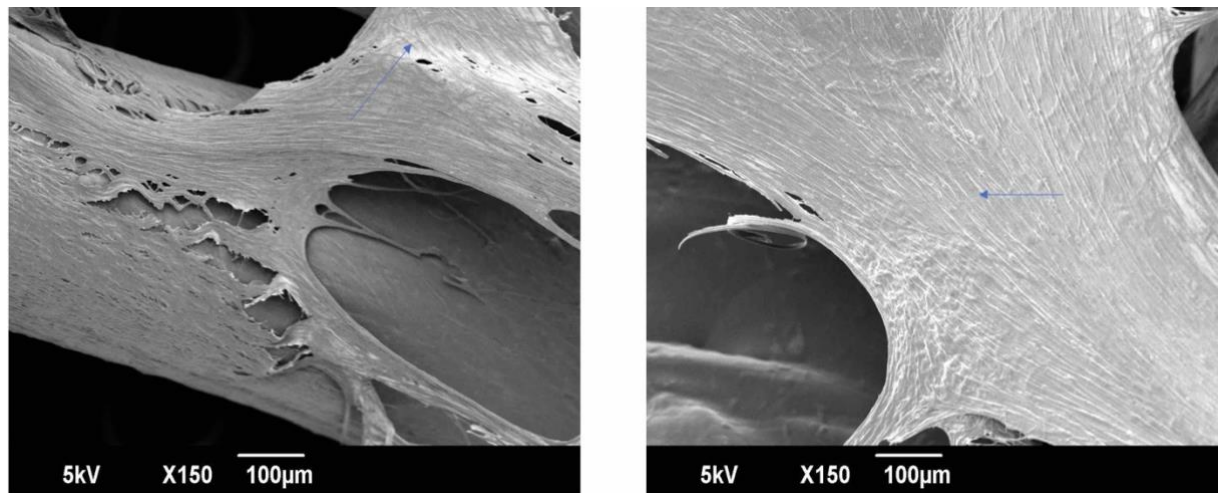


Abbildung 24: Vergrößerte Darstellung SEM. Ebenfalls Besiedlung von Scaffolds mit  $2,5 \times 10^6$  ASCs ohne Fibrinkleber nach 14 Tagen in Kultur einer weiteren Patientin, hier vergrößert zur besseren Darstellung des Zellrasens (blaue Pfeile). (Eigene Darstellung)

### 3.1.2 Vitalitätsfärbung mit FDA-PI – Lebend-/Totfärbung

Die Färbung und Messung wurden nach 5, 14 und 35 Tagen durchgeführt. Abbildung 25 zeigt exemplarisch Vitalitätsfärbungen mit FDA+PI besiedelter Konstrukte. Insgesamt zeigte sich ein vitaler Zellrasen mit gleichmäßiger Verteilung auf den Scaffolds. Es sind kaum oder nur vereinzelt tote Zellen sichtbar, was für optimale

## Ergebnisse

Kulturbedingungen spricht. Daher erübrigte sich die Auszählung und Bildung eines Lebend-/Tot-Verhältnisses.

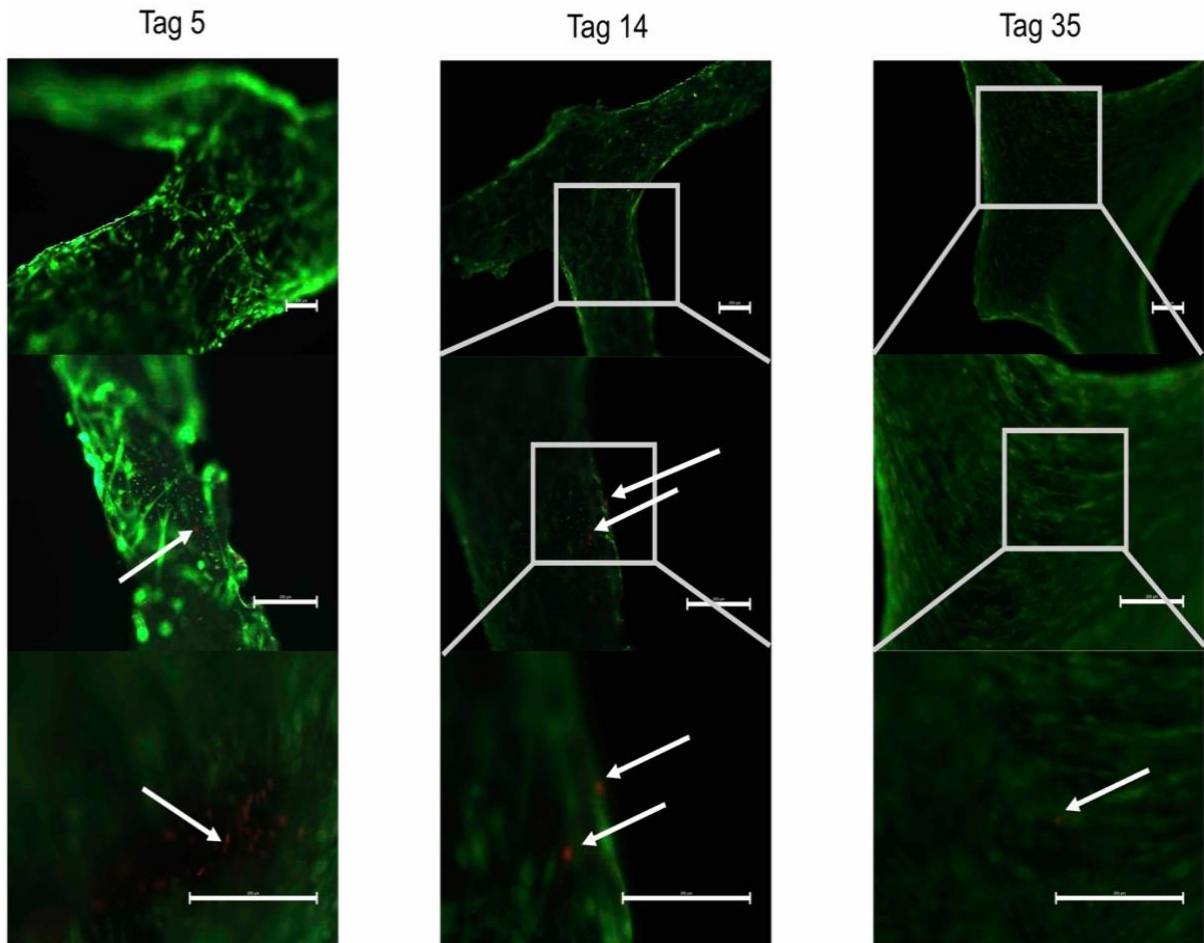


Abbildung 25: Vitalitätsfärbung mit FDA+PI nach 5, 14 und 35 Tagen: Vitale Zellen sind in grün, tote in rot dargestellt (s. Pfeile). Obere Reihe 10-, mittlere Reihe 40-, untere Reihe 60-fache Vergrößerung. Besiedlung ohne Fibrinkleber. Die Balken stellen 200 µm dar. (Eigene Darstellung)

### 3.1.3 Adhäsion der Zellen – Phalloidin färbung

In der Phalloidin färbung stellte sich das F-Aktin des Zytoskeletts leuchtend grün dar. Gemessen wurde an Tag 5, 14 und 35. Die folgenden Abbildungen zeigen repräsentativ unterschiedliche Eigenschaften der Zellverbände. Vergleich Abbildung 26. In allen Aufnahmen sieht man bereits an Tag 5 eine homogene, die Konstrukte ummantelnde Verteilung von Zellen. Abbildung 27 stellt eine Gegenüberstellung von besiedelten Konstrukten mit und ohne Fibrinkleber dar.

## Ergebnisse

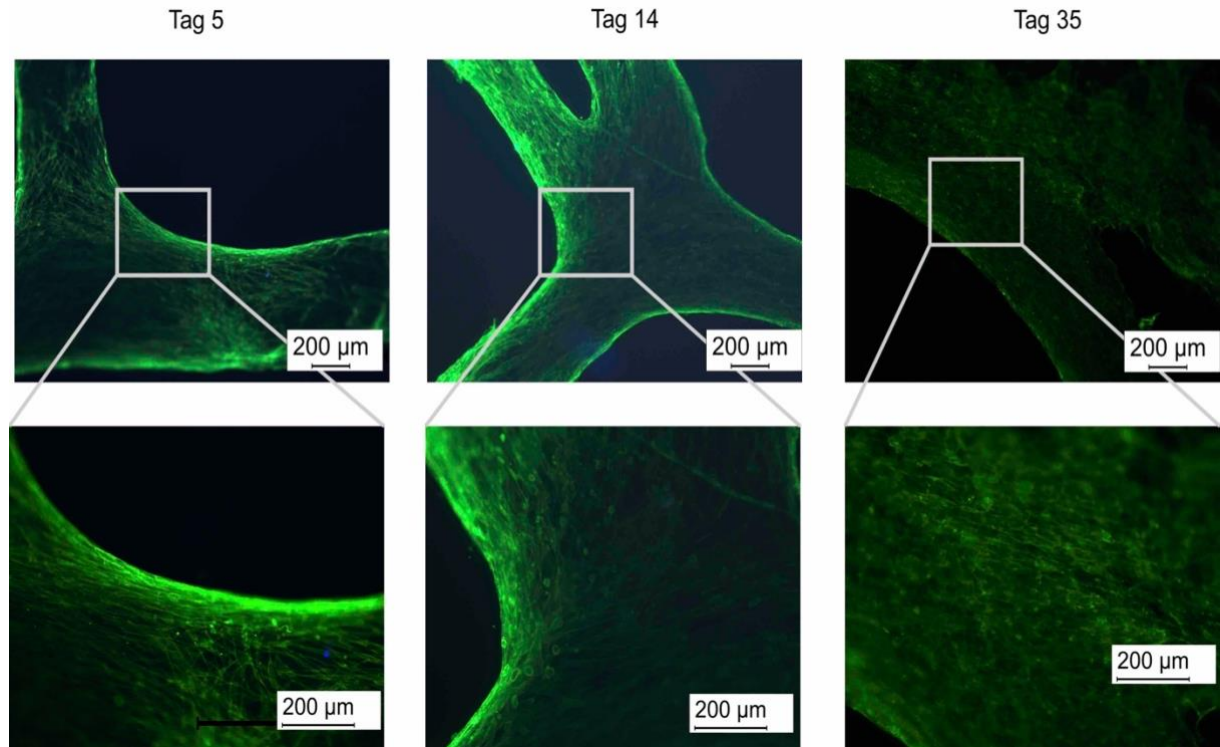


Abbildung 26: Phalloidininfärbung. Obere Reihe: exemplarisch phalloidingefärbte Zellen an den Tagen 5, 14 und 35 in 10-facher, untere Reihe: in 40-facher Vergrößerung. (Eigene Darstellung)

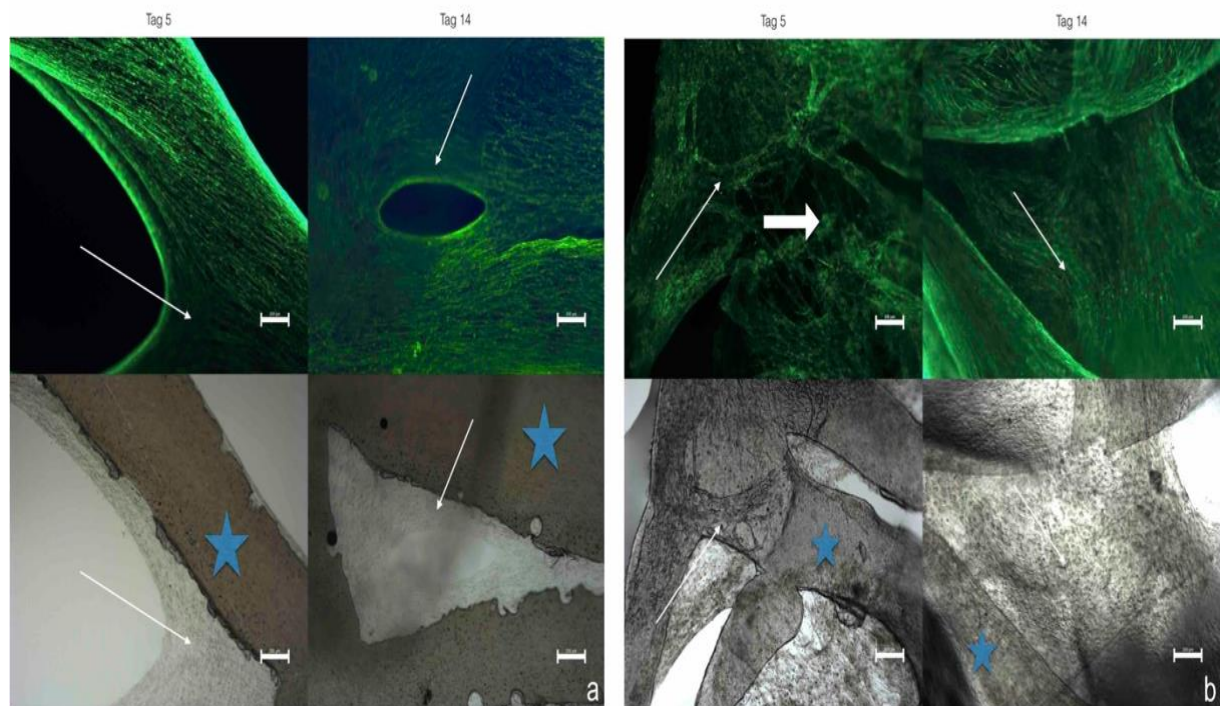


Abbildung 27: Vergleich Phalloidininfärbung mit und ohne Fibrinkleber. Dargestellt sind mit ASCs besiedelte Scaffolds. In den oberen Bildhälften sind fluoreszenz- in den unteren Bildhälften phasenmikroskopische Aufnahmen dargestellt. In beiden Darstellungstechniken lässt sich das Anhaften von Zellen auf dem Scaffold nachweisen (siehe dünne Pfeile). Phasenmikroskopisch sind die sogar über das Scaffold (mit Stern markiert) hinausreichende Zelladhäsionen zu erkennen (dünner Pfeil). a. Exemplarische Abbildung für die Scaffoldbesiedlung ohne Fibrin; b. Exemplarische Abbildung unter Einsatz von Fibrin. Dabei zeigten sich leicht porenfüllendere Zellverbände (dicker Pfeil). Weiße Balken stellen 200 µm dar. (Eigene Darstellung)

## Ergebnisse

### 3.1.4 Ölrot-O-Färbung

Gemessen wurde, nachdem die ASCs zu Adipozyten differenziert wurden, an Tag 5, 14 und 17. Gut zu erkennen sind die kleinen orange-rotgefärbten Lipideinschlüsse, s. Abbildung 28, hinweisend auf adipogene Differenzierung der Zellen. Des Weiteren sind die lipophilen Scaffolds angefärbt.

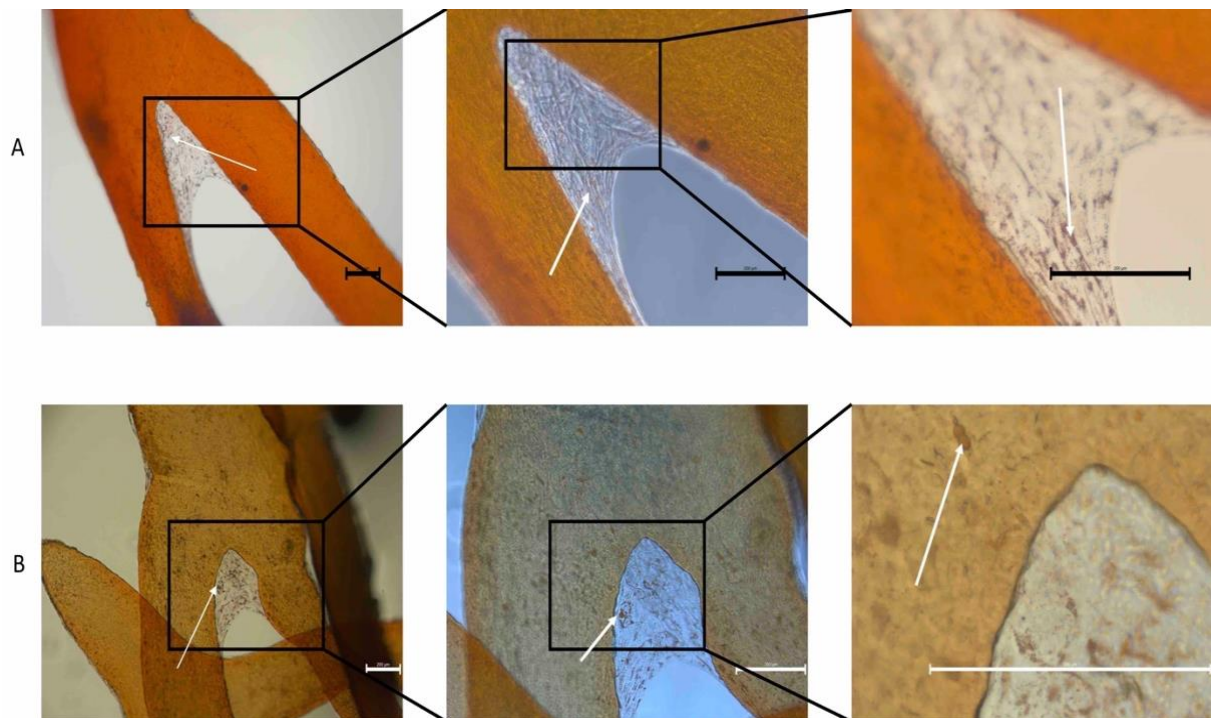


Abbildung 28: Ölrot-O-Färbung nach 14 Tagen Besiedlung ohne Fibrinkleber, exemplarisch von zwei Patientinnen, A und B. Die weißen Pfeile zeigen rotgefärbte Lipideinschlüsse. Die Balken (schwarz und weiß) stellen 200 µm dar. (Eigene Darstellung)

### 3.1.5 Wachstumsverhalten - Hoechst-Assay

Für die Erstellung der Graphiken eigneten sich die Ergebnisse von jeweils 3 Patientinnen. In den übrigen Proben konnten keine reproduzier- und verwendbaren Resultate erzielt werden und wurden nicht weiter verfolgt. Die Proben der Patientinnen waren zur Identifikation mit Nummern versehen. Bei den hier angegebenen Ziffern handelt es sich um die nicht numerisch geordneten jeweiligen Identifikationsnummern, die beibehalten wurden. Untersucht wurde die Proliferation der ASCs mit dem Hoechst 33258-Farbstoff Bisbenzimidazol. Es fanden Untersuchungen von auf den Well-Besiedlungsflächen kultivierten ASCs ( $5 \cdot 10^4$  ASCs auf  $8,87 \text{ cm}^2/\text{Well}$ ), nachfolgend als Wellplattengruppe bezeichnet, sowie von auf Scaffolds kultivierten Zellen ( $2,5 \cdot 10^6$  ASCs/g Scaffold), nachfolgend als Scaffoldgruppe bezeichnet, statt. Abbildung 29 zeigt die Proliferationsverläufe. Dabei lässt sich ein Anstieg des DNA-Gehalts bei allen

## Ergebnisse

hier gezeigten Proben über einen Beobachtungszeitraum von 11 Tagen erkennen. Der DNA-Gehalt in der Wellplattengruppe bei einer Patientin lag bei maximal  $258,9 \pm 4,2$  ng/ml, in den Untersuchungen der Scaffoldgruppe bei maximal  $261,2 \pm 97,5$  ng/ml nach 11 Tagen. Die Proliferationen auf den Scaffolds steigen, nach zunächst einem Tief an Tag 8, zu einem steileren Anstieg an als in der Wellplattengruppe, in der ein kontinuierlicher Anstieg zu verzeichnen war. Insgesamt war der finale DNA-Gehalt in beiden Gruppen etwa gleich hoch. Die Standardabweichungen lagen in der Scaffoldgruppe höher.

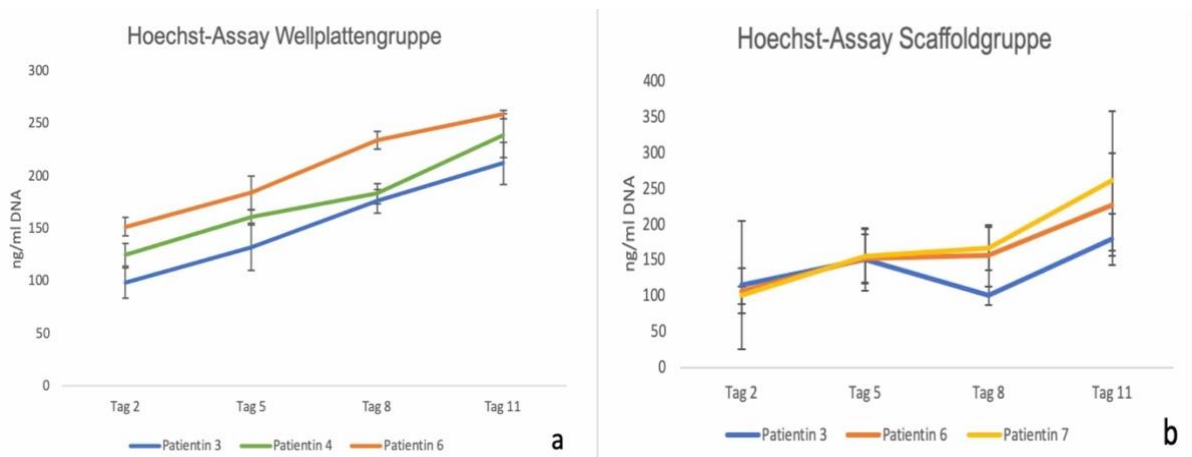


Abbildung 29: DNA-Gehalt. a. DNA-Gehalt der einzelnen Proben kultiviert auf 8,87 cm<sup>2</sup> 6-Well-Platten mit einer Ausgangszellzahl von 50.000 Zellen pro Well. b. DNA-Gehalt der einzelnen Proben kultiviert auf Scaffolds mit  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen pro Gramm Scaffold dar. (Eigene Darstellung)

### 3.1.6 Adiponektinsekretion

Nach Differenzierung der ASCs zu Adipozyten stieg der Adiponektingehalt im Laufe der Zeit sowohl in der Wellplattengruppe, als auch in der Scaffold-Gruppe stetig an, wobei zu erkennen ist, dass in der Scaffoldgruppe trotz höherer Ausgangszellzahl bei der Beimpfung der Adiponektingehalt deutlich niedriger ist als in der erstgenannten Gruppe. Maximal  $13084,5 \pm 492,8$  ng/ml in der Wellplattengruppe bei Patientin 7 im Vergleich zu maximal  $4742,3 \pm 648,1$  ng/ml bei Patientin 3 an Tag 11 in der Scaffoldgruppe. Auch hier war der Standardfehler in der Scaffoldgruppe insgesamt größer als in der Wellplattengruppe, auch wenn die Diskrepanz zwischen den beiden Gruppen weniger ausgeprägt ist wie in den Proliferationsassays. Vergleiche Abbildung 30.

## Ergebnisse

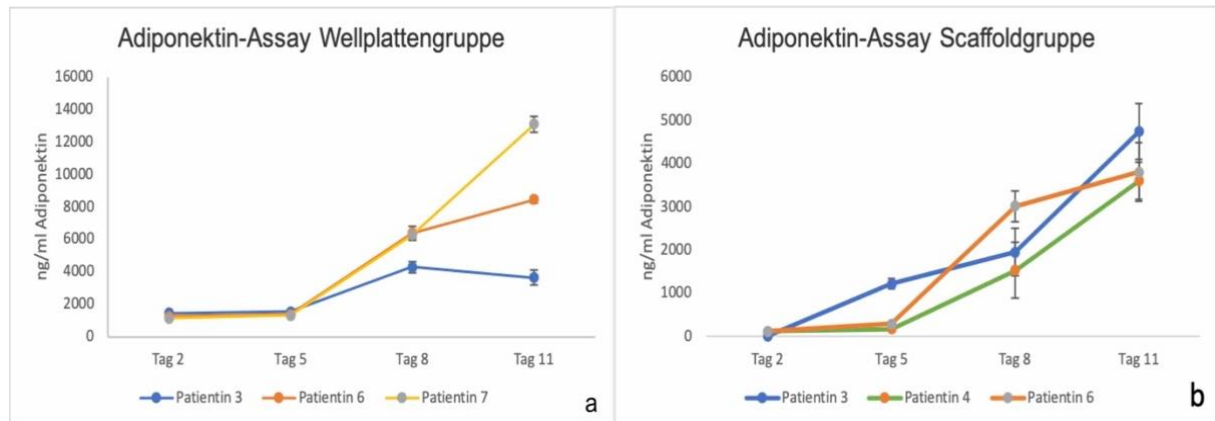


Abbildung 30: Adiponektin Gehalt. Dargestellt sind exemplarisch Proben von drei unterschiedlichen Patientinnen. a. ASCs kultiviert auf 8,87 cm<sup>2</sup> 6-Well-Platten mit einer Ausgangszellzahl von 50.000 Zellen Pro Well (Wellplatten-Gruppe), b. ASCs kultiviert auf Scaffolds mit 2,5•10<sup>6</sup> Zellen pro Gramm Scaffold (Scaffold-Gruppe), dar. Zu erkennen ist ein Anstieg des Adiponektin Gehalts in beiden Gruppen. Der Adiponektin Gehalt in der Scaffold-Gruppe ist jedoch trotz deutlich höherer Ausgangszellzahl fast nur halb so hoch wie in der Well-Gruppe.

### 3.2 Ergebnisse dynamische in-vitro-Evaluation von ASCs auf Scaffolds

#### 3.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopisch ließ sich im Gegensatz zu statischen Bedingungen eine flächendeckendere, teilweise vollständig poren ausfüllende Zellrasenbildung feststellen. Ein teppichartiger Zellrasenaufbau unter statischen Kultivierungsbedingungen lässt sich jedoch auch in dieser Versuchsreihe teilweise nachweisen. Vergleiche hierzu Abbildung 31.

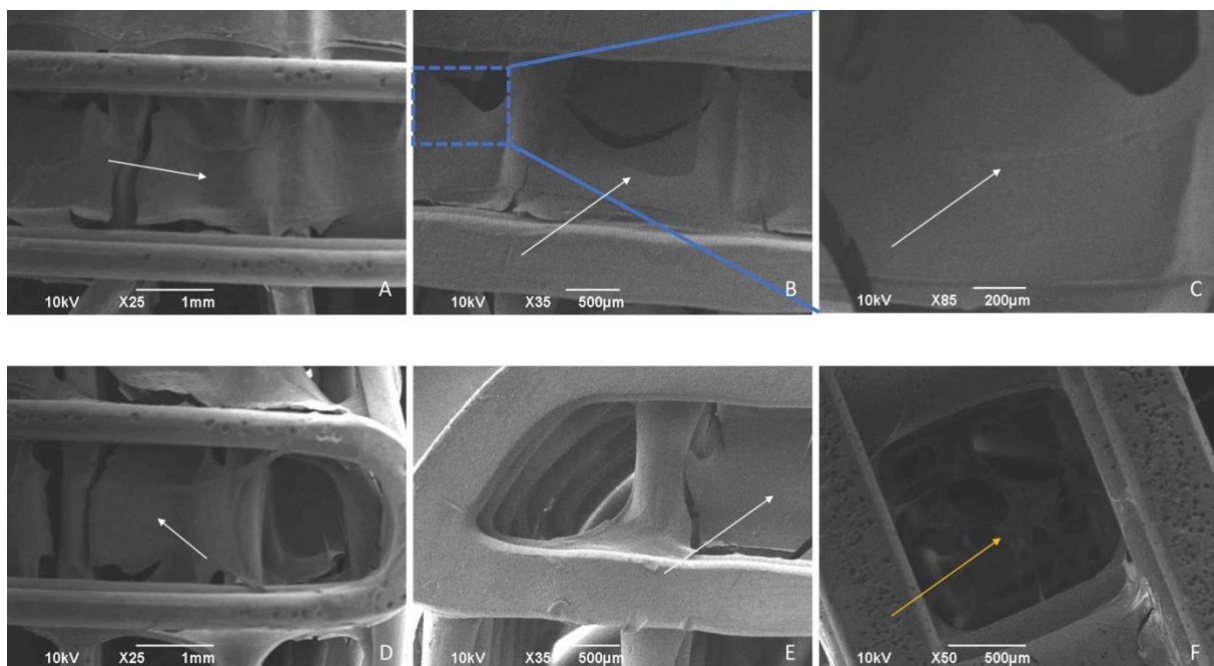


Abbildung 31: SEM-Darstellung. Scaffoldporenausfüllender Zellrasen (weiße Pfeile) nach 39 Tagen in Kultur linke und mittlere Spalte jeweils obere und untere Reihe (A-E). Rechte Spalte oberes Bild (C) stellt eine Vergrößerung des oberen Bildes in der mittleren Spalte (B) dar. Rechte Spalte unteres Bild (F) zeigt exemplarisch einen spinnennetzartigen porenüberbrückenden Zellverbund (gelber Pfeil) unter statischen Bedingungen nach 10 Tagen.

## Ergebnisse

### 3.2.2 Hellfeldmikroskopie und Vitalitätsfärbung mit FDA-PI – Lebend-/Totfärbung

An Tag 10 wurde sowohl die dynamische als auch statische Versuchsreihe untersucht, an Tag 39 konnte aus Kontaminationsgründen nur die dynamische Reihe untersucht werden. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu statischen Kultivierungsbedingungen nach 10 Tagen eine deutlich dichtere, porenausfüllende Zellverteilung, s. Abbildung 32. In der Vitalitätsfärbung zeigten sich nur vereinzelt tote Zellen, s. Abbildung 33, so dass auch hier aufgrund guter Kulturbedingungen auf ein Auszählen und Berechnen des Lebens-/Tot-Verhältnisses verzichtet werden konnte.

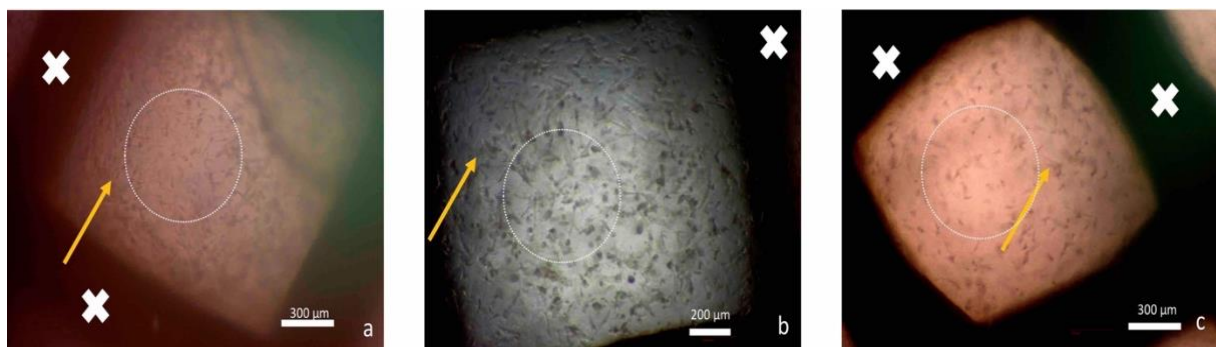


Abbildung 32: Hellfeldmikroskopie. ASCs nach 10 (a) und 39 (b) Tagen unter dynamischen Kulturbedingungen. Im Zentrum der Scaffoldpore (gestrichelter Kreis) zeigt sich im zeitlichen Verlauf ein dichteres Zellwachstum. Gelbe Pfeile zeigen auf einzelne Zellen, Scaffold markiert mit X. c stellt Zellen nach 10 Tagen unter statischen Kultivierungsbedingungen dar. Hier sieht man im Vergleich zu a im Zentrum weniger Zellen.

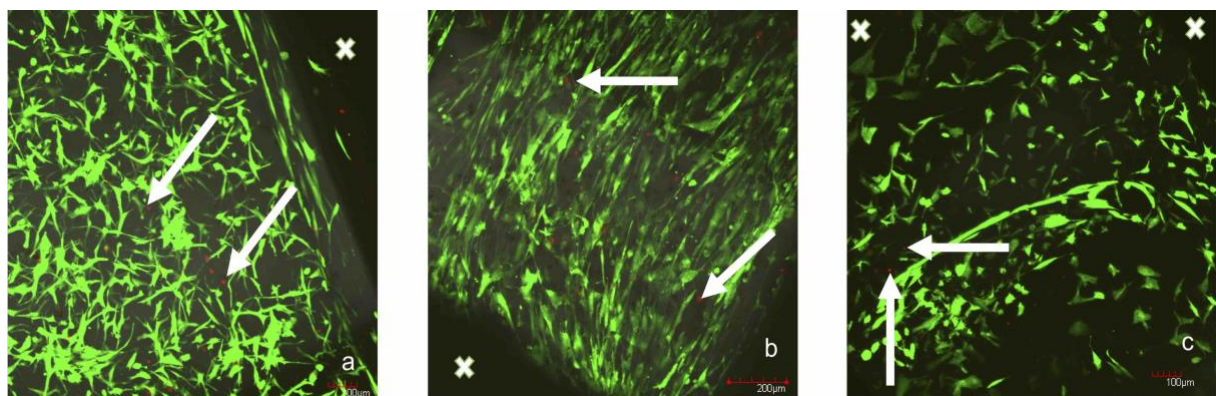


Abbildung 33: Lebend-/Totfärbungen nach 10 (a) und 39 (b) Tagen unter dynamischen Bedingungen. Hier zeigte sich eine zunehmende Verdichtung des Zellverbandes. Dieser war noch nach 39 Tagen vital mit einer vernachlässigbar geringen Zahl avitaler Zellen (rot gefärbt, weiße Pfeile, Scaffold markiert mit X); c. Zellen nach 10 Tagen unter statischen Kultivierungsbedingungen im Vergleich.

### 3.2.3 Wachstumsverhalten - PicoGreen®-Assay

Gemessen wurde der DNA-Gehalt von auf Scaffolds ausgesiedelten ASCs unter dynamischen Kultivierungsbedingungen im biaxialen 3D-Bioreaktor an den Tagen 10,

## Ergebnisse

39 und 65 mit dem Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen). Die statische Versuchsreihe musste aufgrund von Kontamination abgebrochen werden, so dass hier nur Tag 10 zur Darstellung des DNA-Gehalts ausgewertet wurde. Dieser lag bei  $513,7 \pm 142,9$  ng/ml. In der dynamischen Kultivierung zeigte sich ein leichter Abfall der Proliferation zum zweiten Messzeitpunkt von  $498,4 \pm 56,7$  ng/ml auf  $333,8 \pm 93,7$  ng/ml. im Verlauf stieg der Gehalt über den Ausgangswert hinaus auf  $1008,5 \pm 442,8$  ng/ml an. Vergleiche Abbildung 34.

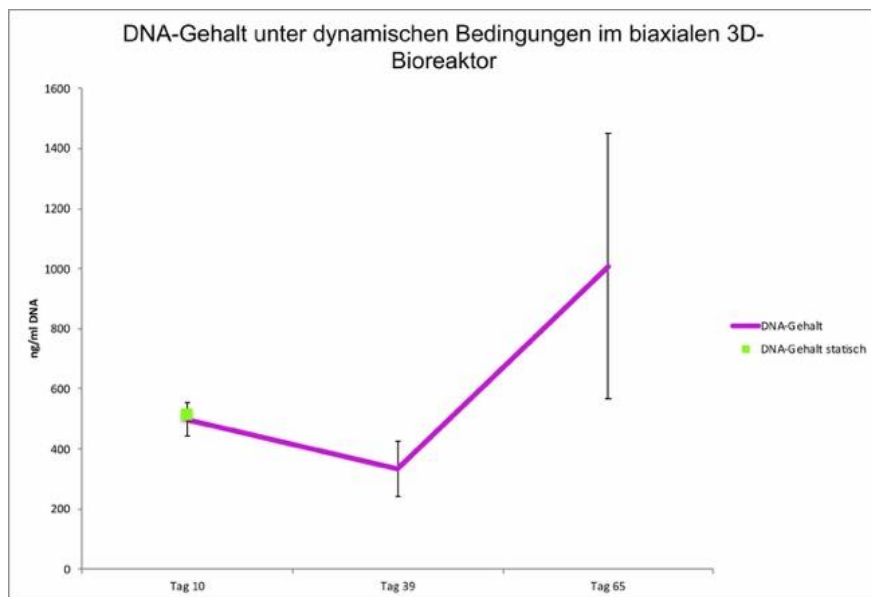


Abbildung 34: Proliferation der Zellen unter dynamischen Kultivierungsbedingungen über die Zeit. Der DNA-Gehalt wurde durch Fluoreszenzfärbung der doppelsträngige DNA photometrisch gemessen und relativ zu Tag 10 aufgetragen. Der grüne Punkt zeigt den DNA-Gehalt der statischen Versuchsreihe nach 10 Tagen [n=6].



## 4 Diskussion

Zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Experimente befand sich die Idee eines patientenspezifischen biodegradierbaren Scaffolds zur Brustrekonstruktion mit autologen Fettinjektionen noch in den Anfängen. Ziel dieser Arbeit sollte die Durchführung erster hierfür richtungsweisender Versuche sein. Im Fokus dieser Arbeit stand die Beurteilung des Zellwachstumsverhaltens mit besonderem Augenmerk auf die brustförmige Nachbildung eines auf 3D-Imaging-basierend gefertigten Scaffolds sowie die Untersuchung von Zell-Scaffold-Interaktionen. Finale Zielsetzung ist der klinische Einsatz von auf computergestützter Anfertigung (*computer-aided manufacturing, CAM*) basierenden patientinnenspezifischen Scaffolds für die individuelle Brustrekonstruktion. Der supportive Einsatz von Lipoinjektionen soll zu einem noch authentischeren Rekonstruktionsergebnis beitragen. Die biodegradierbaren Scaffold werden nach erfüllter Funktion abgebaut. In diesem innovativen Konzept werden mehrere Technologien integriert: 3D-Bildverarbeitung, Scaffolddesign mit besonderen Biomaterialien, additive Biofertigung, Tissue Engineering und chirurgische Expertise. Diese Arbeit dient als Grundlagenforschung und zeigt auf Laborebene, dass Zellüberleben und -wachstum sowie Adipogenese auf den hier behandelten Scaffolds möglich ist. Zudem wurden die Scaffolds hinsichtlich der Optimierung unterschiedlicher Kultivierungsmethoden untersucht. Dabei war eine zentrale Herausforderung dieser vorliegenden Arbeit die Generierung von ausreichend ASCs. Die Kultivierung von hohen Zellzahlen brachte u.a. die räumlichen Kapazitäten wie z.B. die Lagerung von Kulturflaschen in Brutschränken, an ihre Grenzen. Dies limitierte entscheidend weitergehende Untersuchungen oder Wiederholungen von Versuchen.

Auf dem Einsatzgebiet patientenspezifischer brustförmiger Scaffolds wurden mittlerweile Tierversuche im Klein- und Großtiermodell durchgeführt und große Fortschritte erzielt, aus denen neue Erkenntnisse gewonnen wurden. Daher wird an dieser Stelle auf den momentanen Wissensstand eingegangen. Der Forschungsgruppe um Hutmacher (Brisbane, Australien) gelang es im Großtiermodell ohne das Hinzuziehen externer adipogenesefördernder Substanzen und vorangehende Zellkulturen großvolumiges Fettgewebe zu generieren, was bekanntermaßen besonders herausfordernd ist [122, 126]. Im zeitlichen Verlauf fand nahezu keine Resorption statt. Darüber hinaus untersuchten sie den Einsatz klein- bzw.

## Diskussion

großformatiger brustförmiger Scaffolds mit unterschiedlichem Porenanteil aus Polycaprolacton-Biopolymeren [21, 22].

Im Kleintiermodell lag der Hauptfokus im Design und in der Herstellung von patientenspezifischen Scaffolds. Hierbei wurde die Brustform einer Brustkrebspatientin mit einem 3D-Laser erfasst und via computergestütztem Design ein Scaffold erstellt. Dabei wurde das Originalvolumen proportional verkleinert. Die Scaffolds wurden zunächst mit Fibrinkleber und humanen umbilikalen perivaskulären Zellen besiedelt und für vier Wochen unter statischen Bedingungen und anschließend in einem biaxial rotierenden Bioreaktor für zwei Wochen dynamisch kultiviert. Anschließend wurden die besiedelten Konstrukte (tissue engineered constructs, TECs) mit humanen umbilikalen venösen endothelialen Zellen besiedelt und anschließend in subkutanen Taschen beidseits an den Flanken der Ratten implantiert wurden. Es zeigten sich in allen Konstrukten über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 6 Monaten eine Angiogenese und Fettgewebsbildung. Letztere vergrößerte sich anteilig über alle untersuchten Zeiträume. Dabei war es in den Studien besonders schwierig Fettgewebe im Zentrum der Scaffolds zu generieren [21].

Es bleibt allerdings insgesamt offen, inwiefern sich der Einsatz von Zellkulturen im Klinikalltag vorteilsbringend nutzen lässt [21]. Eine Schwierigkeit sind dabei vor allem die Grenzen der technischen und kapazitären Umsetzung auf Grund der hohen Mengen an zu generierenden Zellen, welche auch eine Herausforderung in dieser Arbeit war. Daher ist die ökonomische und sinnvolle Integration von vorangehender Besiedlung realgroßer Scaffolds mit ASCs im Klinikalltag fragwürdig. Zunächst sind Isolierung, Expandierung und Beimpfung der ASCs auf Scaffolds zeitaufwendig und materialverbrauchend [144, 145]. Eine andere Schwierigkeit stellt das Hinzuziehen adipogenesefördernder Substanzen dar [43, 130]. Bedenken bestehen wie bereits in Kapitel 1.3.4 erörtert insbesondere aufgrund eines vermuteten Zusammenhangs zur Förderung der Rezidivbildung oder Neuentstehung von Brustkrebs durch angereicherte Lipoaspirate nach vorangegangener Mammaablation [142]. Da ASCs Wachstumsfaktoren und Zytokine sezernieren, die zwar die Gewebsregeneration und Vaskularisation unterstützen, jedoch auch verantwortlich für das Krebswachstum sind [5, 121, 151, 156, 169], muss hier die Möglichkeit einer Kostimulation diskutiert werden. Die momentane Studienlage deutet allerdings daraufhin, dass das alleinige Lipofilling bei Patienten mit niedrigem (Rückfall-)Risiko für Brustkrebs sicher zu sein scheint [170]. Diese Ansicht wurde auch in einer kürzlich erschienenen Studie von Orbay et al. aus

## Diskussion

dem Jahr 2018 vertreten. Allerdings wird von der Anreicherung mit ASCs und anderen Wachstumsfaktoren bei Patientinnen nach einer Brustkrebsresektion weiterhin eher abgeraten [120]. Eine eindeutige Risikobewertung ist zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund unzureichender Studienlage noch nicht möglich. Besonders gründlich sollte Fibrinkleber mit seinen wachstumsfördernden Eigenschaften untersucht werden, sollte er auch zukünftig klinisch zum Einsatz kommen.

Die Idee wurde daher auf Grund der beschriebenen Limitationen weiterentwickelt und im Großtiermodell experimentell angewendet. Einerseits sollte so das Problem der vorangehenden aufwendigen Zellkultivierung umgangen, andererseits auf die Anreicherung mit starken, externen adipogenen Stimuli wie beispielsweise Fibrinkleber oder Stammzellen verzichtet werden. Das resultierende Konzept orientierte sich daran den Empfängerorganismus als Bioreaktor zu nutzen. Dabei erwies es sich als besonders vielversprechend die Scaffolds zu implantieren und einer Prävaskularisierungszeit von zwei Wochen zu unterlegen. In dieser Zeit konnte sich durch Bildung von Blutgerinnseln ein Fibrinnetzwerk ausbilden. Anschließend wurden die Scaffolds mit autologem Fettaspirat unterspritzt. Es handelt sich folglich um ein zweizeitiges Vorgehen. Untersucht wurden drei Gruppen: In der ersten Gruppe wurden nur Scaffolds, in der zweiten die Scaffolds mit Fettaspiraten implantiert und der dritten Gruppe die Scaffolds zunächst implantiert und nach zwei Wochen Prävaskularisierungszeit ebenfalls mit Fettaspiraten unterspritzt. Dabei zeigte sich der höchste relative Fettgewebsanteile in der dritten Gruppe, was die Autoren auf die adipogenesefördernde Wirkung des Fibrinnetzwerks zurückführten [26, 98]. In der ersten Gruppe bildete sich durch mangelnde adipogene Stimuli überwiegend hochdifferenziertes Bindegewebe. Die Ergebnisse zeigen, dass je nach Therapieregime bedarfsgerechte Ansätze nach maßgeschneiderter Manier durchgeführt werden können. Bei einer Brustaugmentation steht das authentische Gefühl im Vordergrund, so dass die größtmögliche Fettgewebsgenerierung im Vordergrund steht. Hierzu würde sich die Methode der dritten Gruppe des Großtiermodells am besten eignen. Im Falle einer Rekonstruktion nach Brustkrebsresektion hingegen sollte, um eine Rezidiv zu vermeiden, möglichst die Generierung von hochdifferenziertem Bindegewebe angestrebt werden. Dafür würde sich die reine Scaffoldimplantation ohne additive Lipoinjektion besser eignen. Momentan befinden sich weitere größer angelegte Studien in Durchführung [21].

## Diskussion

Ein weiterer entscheidender Faktor für die erfolgreiche Fettgewebsgenerierung ist der Einfluss mechanischer Kräfte. Chhaya et al. nahmen an, dass sich mechanischer Stress negativ auf die Neoadipogenese auswirkt [183], so dass sie ein Scaffold konzipierten, das hart und stabil genug ist die Adipogenese vor inneren Kräften wie Kontraktoren während der Wundheilung und äußeren mechanischen Einflüssen wie beispielsweise Sport zu schützen. Darüber hinaus üben die Scaffoldarchitektur und -beschaffenheit einen großen Einfluss auf die Fettgewebsformierung aus [22, 111]. Chhaya et al. postulieren, dass ein langsam degradierendes Biopolymer mit einer Porengröße zwischen 1-2 mm eine Vaskularisierung und damit eine nachhaltige Fettgewebsregenerierung begünstigen. Die in dieser Arbeit verwendeten Scaffolds wiesen eine Porengröße von 600 µm auf, so dass angeregt werden kann, zukünftig großporigere Scaffolds zu untersuchen. Erste Anwendungen im Kleintiermodell stützen diese Annahme [22]. In dieser vorliegenden Arbeit sind keine Aussagen über Scaffoldveränderungen, die über die Zeit auftreten, getroffen worden. Dies lag unter anderem daran, dass bis zum Eintritt von Masseverlusten 12-18 Monaten vergehen müssen und damit der zeitliche Rahmen dieser Arbeit weit überschritten worden wäre [180]. Künftig sollte dem Feld der Bioanfertigung von Scaffolds auch unter Berücksichtigung unterschiedlicher mechanischer Einflüsse mehr Beachtung geschenkt werden. Vor diesem Hintergrund bliebe der Einsatz von insbesondere dynamischen Kultivierungsmöglichkeiten wie der hier angewendete Bioreaktor mit zusätzlichen mechanischen Untersuchungskomponenten weiterhin von nicht zu unterschätzender Wichtigkeit für zukünftige Forschungszwecke.

Die vorliegende Arbeit sollte dabei im Sinne der Grundlagenforschung die Fragen nach Wachstums- und Adipogenesepotential in den brustförmigen Scaffolds untersuchen.

Die Hypothesen waren:

- wird ein Zellwachstum von ASCs auf den brustförmigen Scaffolds gewährleistet?
- wie sieht das Zellwachstum nach der Besiedlung aus?
- Lassen sich die ASCs in einem dreidimensionalen Raum in Fettzellen differenzieren?

## Diskussion

Im Folgenden wird die Eignung von patientenspezifischen Brustscaffolds im Kontext der Arbeitshypothesen unter Einbeziehung des aktuellen Forschungsstandes diskutiert.

### **4.1 Qualitative Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskopie, Hellfeldmikroskopie, Lebend-/Totfärbung und Phalloidin färbung**

In den qualitativen Untersuchungen zeigte sich eine erfolgreiche Adhäsion und Zellüberleben der ASCs mit homogener Zellverteilung auf dem Scaffold. Insbesondere die Untersuchungen, in denen die Scaffolds mit ASCs ohne weitere Hilfsmittel wie Fibrinkleber besiedelt wurden, veranschaulichen diese Eigenschaften besonders gut, da keine weiteren Komponenten als Störfaktor zu Darstellung kamen (s. Kapitel 3.1.3). Fibrinkleber bringt in Zellkulturstudien dennoch diverse Vorteile mit sich. Er gewährt eine Anhaftung der ASCs auf die Scaffoldoberfläche und bewirkt eine gleichmäßige Zellverteilung [48, 181]. Darüber hinaus verstärkt er wie bereits erläutert das adipogene Potential, besitzt eine angiogene Wirkung und induziert die Bildung eines gut strukturierten Bindegewebes, das sich besser in die Umgebung integriert [25, 26, 98, 180]. Zusätzlich war die Beimpfung der Konstrukte mit Fibrinkleber auch in dieser Arbeit einfacher handhabbar, da makroskopisch bereits beimpfte von noch nicht beimpften Scaffolds unterschieden und somit eine versehentliche Doppelbeimpfung vermieden werden konnte. Auch wenn die Beimpfung der Scaffolds ohne Fibrinkleber zu einer besseren Darstellung der Zelladhäsion auf den Scaffolds, einer guten homogenen Verteilung und einer besseren bildlichen Beurteilung der Zell-Scaffold-Interaktion führte, besitzt eine Fibrinmatrix *in vitro* hinsichtlich der Versuchspraktikabilität sehr vorteilhafte Eigenschaften, die die Nutzung von Fibrinkleber hierhingehend gerechtfertigt erscheinen lassen. Nach aktuellem Wissensstand sollte allerdings von der humanen Anwendung von adipogenesefördernden Substanzen, zu der auch Fibrinkleber gehört, abgesehen werden. Gleiches gilt auch aus bereits weiter oben diskutierten Gründen für eine präklinische Zellkultivierung [21].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *in vitro* ein Zellüberleben auf den Scaffolds über einen längeren Zeitraum möglich war. Die Lebend-Tot-Färbung stellte metabolisch aktive Zellen fluoreszierend grün, metabolisch inaktive fluoreszierend rot dar. Gemessen wurde an mehreren Zeitpunkten bis zum 35. Tag, in den dynamischen Untersuchungen bis zum 39. Tag. In den Lebend-Tot-Färbungen waren sowohl in den

## Diskussion

statischen als auch dynamischen Untersuchungen bis zum letztgemessenen Zeitpunkt kaum avitale Zellen nachweisbar. Dass die Scaffolds ein Zellüberleben über einen noch deutlich längeren Zeitraum gewährleisten können, konnte in oben erwähnten Arbeiten im Klein- und Großtiermodell gezeigt werden. Hier betrug die Beobachtungszeiträume bis zu 6 Monate [21, 22]. Da eher langsam degradierende Materialien *in vivo* eine stabile Grundlage für die Regenerierung, Stabilisierung, Remodellierung und Reifung von Fettgewebe zu bieten scheinen, tragen entsprechende Scaffolds entscheidend zum langfristigen Überleben der Zellen bei. Optimalerweise wird ein Gleichgewicht zwischen guten Proliferationsbedingungen und Formstabilität über den Abbau hinaus erzielt [180].

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung einer Zell-Scaffold-Interaktion und inwiefern die Scaffolds ein Zellwachstum zuließen. Daher wurde eine Besiedlung möglichst ohne weitere Zusätze, welche eine Beurteilung stören würden, favorisiert. Das Handling bei der Beimpfung der Scaffolds mit ASCs war mit Fibrinkleber allerdings besser, da mit bloßem Auge erkannt werden konnte, wie das Zell-Medium-Fibrinklebergemisch die Konstrukte benetzte und haften blieb. In der Beimpfung mit einer bloßen Zellsuspension fiel diese in Tropfen der Schwerkraft folgend bodenwärts. Es entstand der Eindruck, als bliebe kein Probenmaterial an den Scaffolds haften. Dennoch verzichteten wir in den bildgebenden Untersuchungen weitestgehend auf die Verwendung von Fibrinkleber. In den Ergebnissen wurde schließlich deutlich, dass eine homogene Zelladhäsion und -verteilung auf den Scaffolds mit einer fibrinkleberfreien und offenbar nur dünnen Zellbenetzung möglich ist. Im Großtiermodell war nach einer reinen Scaffoldimplantation eine Fettgewebsgenerierung, wenn auch etwas weniger als mit zusätzlicher Fettinjektion, möglich. Dies lässt vermuten, dass die Scaffolds gute Proliferations- und Adhäsionsbedingungen bieten.

Die Zellverteilung in der statischen Versuchsreihe war nach 5 Tagen Wachstumszeit trotz gleicher Ausgangszellzahl in den verschiedenen Untersuchungen jedoch unterschiedlich fortgeschritten. Beispielsweise zeigte sich in der Phalloidinuntersuchung bereits nach 5 Tagen teilweise ein deutlich flächendeckenderer Zellrasen, s. Abbildung 26., als beispielsweise in den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen, wo teilweise nur einzelne Zellen darstellbar waren, s. Abbildung 22. Als Ursache hierfür kann in Betracht gezogen werden, dass die Scaffolds methodenbedingt mit unterschiedlicher Zellzahl besiedelt

## Diskussion

worden sind, da bei der Beimpfung trotz gleicher Ausgangszellzahl manche ASCs der Schwerkraft folgend verloren gegangen sind. Auf diese Annahme wird näher in Kapitel 4.2 eingegangen. Schlussendlich ließen sich aber nach 14 bzw. 35 Tagen ähnlich dichte Zellrasen bei allen Konstrukten feststellen, was darauf hinweist, dass auch auf dünner besiedelten Konstrukten die ASCs an Proliferation aufholten. Somit erscheint die Ausgangszellzahl bei primären Erreichen einer kritischen Ausgangsmenge von zu vernachlässigendem Einfluss auf die finale optische Zellrasenmorphologie zu sein. Untersuchungen zur exakten Bestimmung solcher Zellzahlen sollten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

In der Phalloidin-färbung zeigen sich die ASCs ohne Fibrinkleber als Zellverbund nahezu poren-ausfüllend. Vergleiche hierzu insbesondere Abbildung 27a. Die Zuhilfenahme von Fibrinkleber in einzelnen probatorischen Untersuchungen führte unter statischen Untersuchungsmethoden allerdings nach 5 Tagen zu einem besseren Ausfüllen der Scaffoldporen, siehe Abbildung 27b. Dies kann auf die adipogenese-fördernde Wirkung von Fibrin zurückgeführt werden. Die Zellverbände ohne Fibrinkleber bildeten erst nach 14 Tagen einen Zellrasen, der sich von den Scaffoldfibrillen ausgehend zum Zentrum hin spannt. Allerdings wurden exemplarisch nur wenige Scaffolds mit Fibrinkleber besiedelt, so dass keine eindeutige Aussage getroffen werden kann, ob der Einsatz von Fibrinkleber an dieser Stelle von Vorteil ist. In den Ergebnissen der bildgebenden Untersuchungen der TECs unter dynamischen Bedingungen, in denen stets Fibrinkleber verwendet wurde, war gut darstellbar, dass sich der Zellrasen über mehrere Poren hinweg bildete. Allerdings kann keine direkt vergleichende Aussage zur Überlegenheit der Kultivierung zwischen den TECs unter statischen und dynamischen Bedingungen getroffen werden. Beispielsweise kann im zuletzt aufgeführten Punkt der poren-ausfüllende Zellverband auch Ausdruck der adipogenese-fördernden Wirkung des Fibrinklebers sein und nicht nur die dynamischen Wirkungen im biaxialen 3D-Bioreaktor, welche wie in Kapitel 1.4.4 beschrieben für einen besseren Gewebeaufbau sorgen, verantwortlich gezeigt werden. Auch wenn nur ein Messzeitpunkt der statischen Versuchsreihe möglich war, wiesen erste optische Beobachtung der bildgebenden Untersuchungen auf eine dichtere Besiedlung unter dynamischen Bedingungen hin, Vergleich Kapitel 3.2.2. Um eine Aussage treffen zu können, wäre eine parallele Untersuchung mit TECs ohne Fibrinkleber unter dynamischen Kultivierungsbedingungen interessant gewesen. Des Weiteren wären größere Probenzahlen und längere Untersuchungszeiträumen notwendig gewesen,

um ein aussagekräftiges Urteil über den Vorteil von dynamischen Einflüssen treffen. Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit allerdings darauf hin, dass hinsichtlich des Einsatzes eines Bioreaktors Überlegenheit besteht.

### **4.2 Semiquantitative Untersuchung mittels Proliferationsassay zur Bestimmung der Zellzahl**

Für die Auswertung des Hoechst-Proliferationsassay wurden 3 korrelierende Kurven herangezogen. Die übrigen Kurven wurden auf Grund erheblicher Schwankungen der Messwerten nicht mit einbezogen. Ferner waren die Standardfehler, insbesondere in den Auswertungen der Scaffold-Gruppe, sehr hoch. Durch die geringe Anzahl der einzelnen Proben wurde daher auf weitergehende statistische Auswertungen verzichtet.

Für die unterschiedlichen Messwerte kommen mehrere Gründe in Frage. Die Handhabung der Beimpfung mit Fibrinkleber war wie oben beschrieben zwar deutlich besser als ohne. Allerdings rann auch das Zell-Medium-Fibrinklebergemisch wie die Zell-Mediumsuspension entsprechend der Schwerkraft nach unten, wenn auch etwas langsamer. Eine noch visköser Textur hätte zwar das Herunterrinnen weiter verlangsamt und daher einen Verlust von Zellen gegebenenfalls verhindern können, allerdings bestand dabei die Gefahr, dass das Zell-Medium-Fibrinklebergemisch zu schnell gerann und die Scaffolds sich schließlich auf Grund von bereits in der Pipette stattfindender Koagulation gar nicht mehr beimpfen lassen würden. Das im Methodenteil genannte, in mehreren Näherungsversuchen bestimmte Mischverhältnis erschien als der praktikabelste Kompromiss zwischen nicht zu flüssiger und nicht zu visköser Textur. Es kann also bereits bei der Beimpfung der Scaffolds zu unterschiedlichen Mengen von Zellen gekommen sein. Zudem war die Probenzahl relativ gering. Aus den Proliferationsassays kann daher weder eine patientinnenübergreifende, vergleichende Aussage getroffen, noch eine allgemeine Gültigkeit abgeleitet werden. Die Proliferationsassays dieser Arbeit sollen vielmehr exemplarisch einen Nachweis erbringen, dass die ASCs grundsätzlich auf den Scaffolds proliferieren können und damit deren Wachstumsverhalten beschreiben.

Die Ergebnisse zeigten einen über die Zeit steigenden DNA-Gehalt sowohl in der Scaffoldgruppe, als auch in der Wellplattengruppe. Auffällig waren hierbei ähnlich hohe DNA-Konzentrationen zwischen den Wellplatten und Scaffolds, obwohl die Scaffolds eingangs mit deutlich mehr Zellen besiedelt wurden, nämlich  $5 \cdot 10^4$  Zellen/Well vs.



## Diskussion

$2,5 \cdot 10^6$  Zellen/g Scaffold. Zusätzlich waren die Standardfehler in der Scaffoldgruppe um ein Vielfaches höher als in der Wellplattengruppe. Diese Beobachtungen sind womöglich ebenfalls der Tatsache geschuldet, dass die Zellen durch die großen Poren der Scaffolds nach unten hinuntergesickert und damit verlorengegangen sind. Konsekutiv wurden die Konstrukte mit unterschiedlichen Ausgangszellzahlen besiedelt, obwohl bei der Beimpfung ursprünglich alle Scaffolds dieselbe Zellmenge erhielten. Dies führte wahrscheinlich zu den teils sehr unterschiedlichen Ergebnissen.

Unter dynamischen Kultivierungsbedingungen ließ sich ebenfalls ein steigendes Proliferationsverhalten feststellen. Erwähnenswert ist hierbei der lange Beobachtungszeitraum von 65 Tagen. Dies war u.a. auf Grund des geringeren Arbeitsaufwands möglich, da das Medium im Bioreaktor nur in einem Gefäß gewechselt werden, wohingegen unter statischen Bedingungen jedes Well einzeln abgesaugt und mit frischem Medium ausgelegt werden musste. Der DNA-Gehalt verdoppelte sich in etwa im Vergleich zum ersten Messzeitpunkt, nämlich von  $498,4 \pm 56,7$  ng/ml auf  $1008,5 \pm 442,8$  ng/ml. Augenscheinlich ist hier der relativ hohe Standardfehler am letzten Messtag. Die Stärke des Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen) liegt in der Detektion von kleinsten DNA-Konzentrationen von bis zu 0,5 ng/ml DNA. Ferner ermöglicht es die Unterscheidung zwischen intakter DNA und degradierten Bestandteilen, womit der Hersteller eine hohe Spezifität und quantitative Genauigkeit für doppelsträngige DNA verspricht (186). Allerdings gibt es Hinweise dafür, dass die PicoGreen-Färbmethode anfällig für Störfaktoren wie RNA und Proteine ist und dazu neigt die tatsächliche DNA-Konzentration zu unterschätzen [93]. Diskussionswürdig ist, ob die PicoGreen-Färbmethode bei höheren Zellzahlen eine höhere Messgenauigkeit aufweist, wodurch der relativ hohe Standardfehler an Tag 65 zu erklären wäre. Die dynamischen Einflüsse des Bioreaktors als Erklärung für die große Varianz der Messwerte bei relativ hohen DNA-Konzentrationen kämen eher weniger als Ursache in Betracht, da die Bewegungen gleichmäßig waren und alle Scaffolds über alle Messzeitpunkte hinweg den selben mechanischen Kräften ausgesetzt waren. Ansonsten wären zu den anderen Messzeitpunkten ebenfalls hohe Standardfehler zu erwarten gewesen. Letztlich käme auch hier ein Beimpfungsfehler als Ursache in Betracht. Ein direkter Vergleich zwischen der statischen und dynamischen Kultivierung lässt sich nur eingeschränkt anstellen, da die Beimpfungsmethoden insbesondere hinsichtlich der Ausgangszellzahl unterschiedlich waren. Im Kleintiermodell zeigte sich unter

dynamischen Kultivierungsmethoden allerdings ein signifikant beschleunigtes Zellwachstum [22]. Dieser positive Einfluss kam vermutlich auch in den bildgebenden Untersuchungen der dynamischen Versuchsreihe zum Ausdruck. Hierauf wurde in Kapitel 4.1 eingegangen.

Zusammenfassend kann anhand der Ergebnisse dieser Arbeit festgestellt werden, dass eine Zellproliferation auf den Scaffolds über einen längeren Zeitraum möglich ist. Eine genaue Quantifizierung der ASCs gelang mit den durchgeführten Methoden jedoch nicht. Die hier dargestellten Ergebnisse korrelierten bezüglich des Wachstumsverhaltens der Zellen mit den beobachteten Ergebnissen der bildgebenden Untersuchungen, wo ein optischer Zuwachs von Zellverbänden über die Zeit zu verzeichnen war. Trotz leicht differenter Besiedlungsbedingungen erscheint die Herstellung eines Zusammenhangs aufgrund der identischen Scaffoldsubstanz hier zulässig.

### **4.3 Adiponektingehalt und Ölrot-O-Färbung zur Untersuchung des Adipogenesepotentials**

Die Qualifizierung der Adipogenese erfolgte via Ölrot-O-Färbung, die Quantifizierung mittels eines Adiponektinassays.

Die ASCs ließen sich in vitro mit einem spezifischen Medium zu reifen Adipozyten ausdifferenzieren. Mittels Ölrot-O-Färbung kamen lipidbeladene Zellen rot zur Darstellung, so dass der Nachweis einer adipozytären Ausdifferenzierung der Zellen erbracht wurde.

In den quantitativen Messungen wiederum stieg der Adiponektingehalt in allen Proben Gruppen über den gesamten Messzeitraum hinweg an, was als Ausdruck wachsender Proliferationsraten zu betrachten ist. Der Adiponektingehalt der Scaffoldgruppe war im Vergleich zur Wellplattengruppe erheblich geringer, des Weiteren zeigten die Messungen höhere Standardfehler. Diese Beobachtungen korrelieren mit dem Auswertungsmuster der Proliferationsassays, so dass auch hier der Effekt von ungleich beladenen Konstrukten und konsekutivem Zellverlust bei der Beimpfung postuliert werden muss.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Scaffolds eine Zelldifferenzierung und schließlich die Generierung von Fettzellen ermöglichten. Für die Anwendung in vivo ist dennoch zu berücksichtigen, dass hier ohne starke adipogene Stimuli die Scaffolds nur mit unspezifischem fibrovaskulärem Gewebe ausgefüllt werden [49, 94]. Dieses

## Diskussion

Problem wird im Großtiermodell der Gruppe Chhaya vielversprechend umgangen, indem die Scaffolds nach Implantation im Körper eine Prävascularisierungsphase durchlaufen und anschließend eine kleine Menge Lipoaspirat injiziert wird.

## **5 Zusammenfassung, Schlussfolgerung und Ausblick**

Die Brustrekonstruktion als Therapie der Mastektomie spielt im klinischen Alltag der Brustkrebstherapie eine große Rolle. Ihre Bedeutung wird auf Grund der steigenden Prävalenz von Brustkrebs, die durch eine verbesserte Diagnostik und die wachsende Zahl älterer Patientinnen bedingt ist, weiter zunehmen. Verfügbare Verfahren zur Brustrekonstruktion, wie die Implantation von Fremdmaterial (Silikonkissen) oder die autologe Brustrekonstruktion (Lappenplastiken) sind bisher hinsichtlich ästhetischer und funktioneller Aspekte sowie insbesondere aufgrund von Nebenwirkungen oftmals nicht zufriedenstellend. Konsekutiv stellt sich die Frage nach schonenden Methoden mit besseren Ergebnissen.

Unsere Arbeitsgruppe entwickelt einen innovativen Therapieansatz unter Verwendung biodegradierbarer Gerüste (Scaffolds) zur Brustrekonstruktion. Die Brust der Patientin wird dabei mit einem 3D-Laser gescannt, woraufhin ein individuell gefertigtes, formstabilisierendes und biodegradierbares Scaffold mittels additiver Bioanfertigung erstellt wird. Dieses patientenspezifische Scaffold wird nun der Patientin nach einer Mastektomie implantiert und mit autologem Fettgewebe unterspritzt. Das Scaffold soll in der klinischen Praxis dazu dienen die natürliche Form der rekonstruierten Brust zu erhalten und einen stabilen Gewebeverbund zu sichern.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob ein Adhären und Überleben der Zellen auf verkleinerten brustförmigen Scaffolds in vitro möglich ist und ob sich ein Gewebeverbund generieren ließ. Dazu wurden adipogene Stammzellen, sogenannte ASCs (adipose-derived stem cells), von 6 gesunden Patientinnen isoliert, kultiviert, expandiert, geerntet und auf die Scaffolds besiedelt. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die ASCs zu Fettzellen differenzieren lassen.

Mikroskopisch ließ sich in vitro nach 5, 14 und 35 Tagen ein Zellbridging erkennen. Eine Vitalfärbung stellte fest, dass lebende Zellen auf den Scaffolds adhärten. Das Zytoskelett wurde mittels einer Phalloidin-färbung dargestellt. Zudem erfolgten rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen. Es konnte gezeigt werden, dass auch die bloße Beimpfung der Scaffolds mit einer mutmaßlich geringen Menge an ASCs ohne Fibrinkleber zu einer guten Adhäsion führte und Proliferationen möglich waren. Ein Zusammenhang mit Beobachtungen im Großtiermodell, bei dem nach Implantation nativer Scaffolds in den Organismus Fettgewebe gebildet wurde und nachhaltig im Bereich der Brust verblieb, liegt nahe. Die Ölrot-O-Färbung zeigte intrazelluläre Lipidtropfen nach der Differenzierung zu Fettzellen. Der Adiponektingehalt stieg im

## Zusammenfassung, Schlussfolgerung und Ausblick

Verlauf. Ein quantitativer Test der Zellen stellte fest, dass die Proliferation über einen Zeitraum von 11 Tagen anstieg.

Eine weitere Zielsetzung im Rahmen des sogenannten „Tissue Engineering“ war, eine optimale Besiedlungstechnik zu entwickeln. So wurden die Zellen nicht nur statisch, sondern auch dynamisch in einem biaxialen 3D-Bioreaktor auf denselben Scaffolds kultiviert. Nach Kultivierung im Bioreaktor scheint ein besseres Ausfüllen der Scaffoldporen zu gelingen, was, wie in der Literatur bereits vielfach beschrieben, vermutlich auf die wachstumsfördernde Wirkung durch dynamische Kräfte zurückgeführt werden kann. Im Großtiermodell wird die Wichtigkeit eines Fibrinnetzwerks, welches sich in der Prävasikularisierungszeit bilden konnte, deutlich. Da es eine verbesserte Adipogenese ermöglichte, kam es zur Synthese großvolumigerer Fettgewebsformationen. Sollten Fibrinmatrizes für zukünftige Einsätze nicht nur auf Forschungsebene interessant bleiben, so ist es zwingend notwendig die Entartungsgefahr des Umgebungsgewebes beim Einsatz von solchen zu überprüfen und die Sicherheit der Patientinnen stets voranzustellen. Beide Aspekte stellen weiterhin entscheidende Herausforderungen für zukünftige Untersuchungen dar und bleiben wichtige Forschungsgegenstände.

Das Zellwachstumsverhalten ließ sich auf den Scaffolds mit in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Ressourcen nicht kohärent reproduzieren, so dass eine Interpretation insbesondere der quantitativen Untersuchungen limitiert war. Für generalisierte und übertragbare Schlussfolgerungen wären höhere Probenzahlen notwendig gewesen. Dennoch trägt die vorliegende Arbeit zur in vitro Charakterisierung der Eignung eines patientenspezifischen brustförmigen Scaffolds zum „Adipose Tissue Engineering“ bei. Weitere großangelegte Tierversuchsstudien inklusive Lipofilling von klinisch relevantem Scaffoldvolumen sind erforderlich, um den Weg zur humanen Anwendung und letztlich klinischen Translation zu ebnen. Der innovativen Idee einer Kombination aus patientenspezifischen Scaffoldimplantation und Lipofilling als Alternative zu Silikonimplantaten und Lappenplastiken zur Brustrekonstruktion wird mit vorliegender Studie eine grundlagenforschungsorientierte Basis verliehen.

## Literaturverzeichnis

1. Agha RA, Goodacre T, Orgill DP. Use of autologous fat grafting for reconstruction postmastectomy and breast conserving surgery: a systematic review protocol. *BMJ Open*. 2013;3(10):e003709.
2. Al-Ghazal SK, Fallowfield L, Blamey RW. Does cosmetic outcome from treatment of primary breast cancer influence psychosocial morbidity? *Eur J Surg Oncol*. 1999;25(6):571-3.
3. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004;6(1):7-14.
4. Becchere MP, Farace F, Dessena L, Marongiu F, Bulla A, Simbula L, Meloni GB, Rubino C. A case series study on complications after breast augmentation with Macrolane. *Aesthetic Plast Surg*. 2013;37(2):332-5.
5. Bertolini F, Petit JY, Kolonin MG. Stem cells from adipose tissue and breast cancer: hype, risks and hope. *British Journal Of Cancer*. 2015;112:419.
6. Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurth B-M, Wolf U. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Robert Koch-Institut; 2010.
7. Bircoll M. Cosmetic breast augmentation utilizing autologous fat and liposuction techniques. *Plastic and reconstructive surgery*. 1987;79(2):267-71.
8. Bircoll M, Novack BH. Autologous fat transplantation employing liposuction techniques. *Ann Plast Surg*. 1987;18(4):327-9.
9. Bleiker EM, Pouwer F, van der Ploeg HM, Leer JW, Ader HJ. Psychological distress two years after diagnosis of breast cancer: frequency and prediction. *Patient Educ Couns*. 2000;40(3):209-17.
10. Blondeel PN, Arnstein M, Verstraete K, Depuydt K, Van Landuyt KH, Monstrey SJ, Kroll SS. Venous congestion and blood flow in free transverse rectus abdominis myocutaneous and deep inferior epigastric perforator flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2000;106(6):1295-9.
11. Botti G, Pascali M, Botti C, Bodog F, Cervelli V. A clinical trial in facial fat grafting: filtered and washed versus centrifuged fat. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(6):2464-73.
12. Buchholz TA, Kronowitz SJ, Kuerer HM. Immediate breast reconstruction after skin-sparing mastectomy for the treatment of advanced breast cancer: radiation oncology considerations. *Ann Surg Oncol*. 2002;9(8):820-1.

13. Bulgin D, Vrabic E, Hodzic E. Autologous bone-marrow-derived-mononuclear-cells-enriched fat transplantation in breast augmentation: evaluation of clinical outcomes and aesthetic results in a 30-year-old female. *Case Rep Surg.* 2013;2013:782069.
14. Bursac N, Papadaki M, White JA, Eisenberg SR, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Cultivation in rotating bioreactors promotes maintenance of cardiac myocyte electrophysiology and molecular properties. *Tissue Eng.* 2003;9(6):1243-53.
15. Butterwick KJ. Lipoaugmentation for aging hands: a comparison of the longevity and aesthetic results of centrifuged versus noncentrifuged fat. *Dermatol Surg.* 2002;28(11):987-91.
16. Carvajal J, Patino JH. Mammographic findings after breast augmentation with autologous fat injection. *Aesthet Surg J.* 2008;28(2):153-62.
17. Chala LF, de Barros N, de Camargo Moraes P, Endo E, Kim SJ, Pincerato KM, Carvalho FM, Cerri GG. Fat necrosis of the breast: mammographic, sonographic, computed tomography, and magnetic resonance imaging findings. *Curr Probl Diagn Radiol.* 2004;33(3):106-26.
18. Champaneria MC, Wong WW, Hill ME, Gupta SC. The evolution of breast reconstruction: a historical perspective. *World J Surg.* 2012;36(4):730-42.
19. Chaput B, De Bonnecaze G, Chavoïn JP, Gangloff D, Garrido I. France prohibits the use of macrolane in aesthetic breast augmentation for reasons similar to criticisms of autologous fat grafting to the breast. *Aesthetic Plast Surg.* 2012;36(4):1000-1.
20. Chen G, Ushida T, Tateishi T. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience.* 2002;2(2):67-77.
21. Chhaya MP, Balmayor ER, Hutmacher DW, Schantz JT. Transformation of Breast Reconstruction via Additive Biomanufacturing. *Sci Rep.* 2016;6:28030.
22. Chhaya MP, Melchels FPW, Holzapfel BM, Baldwin JG, Hutmacher DW. Sustained regeneration of high-volume adipose tissue for breast reconstruction using computer aided design and biomanufacturing. *Biomaterials.* 2015;52:551-60.
23. Chhaya MP, Melchels FPW, Wiggerhauser PS, Schantz JT, Hutmacher DW. Chapter 10 - Breast Reconstruction Using Biofabrication-Based Tissue Engineering Strategies. In: Forgacs G, Sun W, editors. *Biofabrication.* Boston: William Andrew Publishing; 2013. p. 183-216.

24. Chhaya MP, Poh PS, Balmayor ER, van Griensven M, Schantz JT, Hutmacher DW. Additive manufacturing in biomedical sciences and the need for definitions and norms. *Expert Rev Med Devices*. 2015;12(5):537-43.
25. Cho SW, Kim I, Kim SH, Rhie JW, Choi CY, Kim BS. Enhancement of adipose tissue formation by implantation of adipogenic-differentiated preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(2):588-94.
26. Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:355-67.
27. Claro F, Jr., Figueiredo JC, Zampar AG, Pinto-Neto AM. Applicability and safety of autologous fat for reconstruction of the breast. *Br J Surg*. 2012;99(6):768-80.
28. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg*. 1995;19(5):421-5.
29. Coleman SR, Saboeiro AP. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg*. 2007;119(3):775-85; discussion 86-7.
30. Collins MN, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering--a review. *Carbohydr Polym*. 2013;92(2):1262-79.
31. Craft RO, Rophael J, Morrison WA, Vashi AV, Mitchell GM, Penington AJ. Effect of local, long-term delivery of platelet-derived growth factor (PDGF) on injected fat graft survival in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2009;62(2):235-43.
32. Crawford R, Shrotria S. Macrolane injections for breast enhancement in undiagnosed breast malignancy: a case report. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011;64(12):1682-3.
33. Cronin KJ, Messina A, Knight KR, Cooper-White JJ, Stevens GW, Penington AJ, Morrison WA. New murine model of spontaneous autologous tissue engineering, combining an arteriovenous pedicle with matrix materials. *Plast Reconstr Surg*. 2004;113(1):260-9.
34. Crosby MA, Dong W, Feng L, Kronowitz SJ. Effect of intraoperative saline fill volume on perioperative outcomes in tissue expander breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(3):1065-72.
35. de Blacam C, Momoh AO, Colakoglu S, Tobias AM, Lee BT. Evaluation of clinical outcomes and aesthetic results after autologous fat grafting for contour deformities of the reconstructed breast. *Plast Reconstr Surg*. 2011;128(5):411e-8e.



36. de Bree R, Middelweerd MJ, van der Waal I. Severe granulomatous inflammatory response induced by injection of polyacrylamide gel into the facial tissue. *Arch Facial Plast Surg.* 2004;6(3):204-6.
37. de Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174(3):101-9.
38. Delay E, Delpierre J, Sinna R, Chekaroua K. [How to improve breast implant reconstructions?]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2005;50(5):582-94.
39. Del Vecchio DA, Bucky LP. Breast augmentation using preexpansion and autologous fat transplantation: a clinical radiographic study. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(6):2441-50.
40. Djian P, Roncari AK, Hollenberg CH. Influence of anatomic site and age on the replication and differentiation of rat adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest.* 1983;72(4):1200-8.
41. Do ER, Shim JS. Long-term Complications from Breast Augmentation by Injected Polyacrylamide Hydrogel. *Arch Plast Surg.* 2012;39(3):267-9.
42. Dolderer JH, Abberton KM, Thompson EW, Slavin JL, Stevens GW, Penington AJ, Morrison WA. Spontaneous large volume adipose tissue generation from a vascularized pedicled fat flap inside a chamber space. *Tissue Eng.* 2007;13(4):673-81.
43. Donnenberg VS, Zimmerlin L, Rubin JP, Donnenberg AD. Regenerative therapy after cancer: what are the risks? *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(6):567-75.
44. Ducheyne P. *Comprehensive biomaterials.* Amsterdam ; Boston: Elsevier; 2011.
45. Duxue L, Luo SJ, Hao XG, Tang SM, Liang J. [The function of basic fibroblastic growth factor on revascularization of pearl fat graft transplantation]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 2005;21(2):128-31.
46. Eltahir Y, Werners LL, Dreise MM, van Emmichoven IA, Jansen L, Werker PM, Debock GH. Quality-of-life outcomes between mastectomy alone and breast reconstruction: comparison of patient-reported BREAST-Q and other health-related quality-of-life measures. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(2):201e-9e.
47. Entenmann G, Hauner H. Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. *Am J Physiol.* 1996;270(4 Pt 1):C1011-6.
48. Eyrich D, Wiese H, Maier G, Skodacek D, Appel B, Sarhan H, Tessma J, Staudenmaier R, Wenzel MM, Goepferich A, Blunk T. In Vitro and In Vivo Cartilage

Engineering Using a Combination of Chondrocyte-Seeded Long-Term Stable Fibrin Gels and Polycaprolactone-Based Polyurethane Scaffolds. *Tissue Engineering*. 2007;13(9):2207-18.

49. Findlay MW, Dolderer JH, Trost N, Craft RO, Cao Y, Cooper-White J, Stevens G, Morrison WA. Tissue-engineered breast reconstruction: bridging the gap toward large-volume tissue engineering in humans. *Plast Reconstr Surg*. 2011;128(6):1206-15.

50. Findlay PA, Lippman ME, Danforth D, Jr., McDonald H, d'Angelo T, Gorrell CR, Gerber NL, Schain W, Lichter AS. Mastectomy versus radiotherapy as treatment for stage I-II breast cancer: a prospective randomized trial at the National Cancer Institute. *World J Surg*. 1985;9(5):671-5.

51. Fischbach C, Seufert J, Staiger H, Hacker M, Neubauer M, Gopferich A, Blunk T. Three-dimensional in vitro model of adipogenesis: comparison of culture conditions. *Tissue Eng*. 2004;10(1-2):215-29.

52. Fischer JP, Wes AM, Tuggle CT, 3rd, Serletti JM, Wu LC. Risk Analysis of Early Implant Loss after Immediate Breast Reconstruction: A Review of 14,585 Patients. *J Am Coll Surg*. 2013.

53. Flassbeck D, Pfeleiderer B, Klemens P, Heumann KG, Eltze E, Hirner AV. Determination of siloxanes, silicon, and platinum in tissues of women with silicone gel-filled implants. *Anal Bioanal Chem*. 2003;375(3):356-62.

54. Fortier GM, Gauvin R, Proulx M, Vallee M, Fradette J. Dynamic culture induces a cell type-dependent response impacting on the thickness of engineered connective tissues. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;7(4):292-301.

55. Frick E, Tyroller M, Panzer M. Anxiety, depression and quality of life of cancer patients undergoing radiation therapy: a cross-sectional study in a community hospital outpatient centre. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2007;16(2):130-6.

56. Giersiepen K, Heitmann C, Janhsen K, Lange C. Themenheft 25 "Brustkrebs". Robert Koch-Institut; 2005.

57. Gill PS, Hunt JP, Guerra AB, Dellacroce FJ, Sullivan SK, Boraski J, Metzinger SE, Dupin CL, Allen RJ. A 10-year retrospective review of 758 DIEP flaps for breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2004;113(4):1153-60.

58. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100(9):1249-60.

50. Goisis M, Savoldi A, Guareschi M. Is hyaluronic acid gel a good option for breast augmentation? *Aesthetic Plast Surg.* 2011;35(1):134-6; author reply 7.
60. Gronet PM, Waskewicz GA, Richardson C. Preformed acrylic cranial implants using fused deposition modeling: a clinical report. *J Prosthet Dent.* 2003;90(5):429-33.
61. Guerrerosantos J, Gonzalez-Mendoza A, Masmela Y, Gonzalez MA, Deos M, Diaz P. Long-term survival of free fat grafts in muscle: an experimental study in rats. *Aesthetic Plast Surg.* 1996;20(5):403-8.
62. Gutowski KA, Force AFGT. Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force. *Plast Reconstr Surg.* 2009;124(1):272-80.
63. Heden P. Discussion: macrolane for breast enhancement: 12-month follow-up. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128(6):780e-1e.
64. Heden P, Olenius M, Tengvar M. Macrolane for breast enhancement: 12-month follow-up. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(2):850-60.
65. Herold C, Ueberreiter K, Vogt PM. Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study. *Plast Reconstr Surg.* 2012;130(3):479e-80e.
66. Hofer SO, Knight KM, Cooper-White JJ, O'Connor AJ, Perera JM, Romeo-Meeuw R, Penington AJ, Knight KR, Morrison WA, Messina A. Increasing the volume of vascularized tissue formation in engineered constructs: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg.* 2003;111(3):1186-92; discussion 93-4.
67. Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz JT, Gbureck U, Rackwitz L, Noth U, Jakob F, Rudert M, Groll J, Hutmacher DW. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(4):581-603.
68. Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001;12(1):107-24.
69. Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, Ng KW, Teoh SH, Tan KC. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res.* 2001;55(2):203-16.
70. Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud MV. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol.* 2004;22(7):354-62.

71. Illouz YG. Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases. *Plast Reconstr Surg*. 1983;72(5):591-7.
72. Inglefield C. Early clinical experience of hyaluronic acid gel for breast enhancement. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011;64(6):722-9.
73. Kamakura T, Ito K. Autologous cell-enriched fat grafting for breast augmentation. *Aesthetic Plast Surg*. 2011;35(6):1022-30.
74. Kang GC, Ong YS. Large unilateral breast autoinflation after breastfeeding linked to polyacrylamide hydrogel injection augmentation mammoplasty. *Aesthetic Plast Surg*. 2011;35(1):122-4.
75. Keck M, Haluza D, Selig HF, Jahl M, Lumenta DB, Kamolz LP, Frey M. Adipose tissue engineering: three different approaches to seed preadipocytes on a collagen-elastin matrix. *Ann Plast Surg*. 2011;67(5):484-8.
76. Khater R, Atanassova P, Anastassov Y, Pellerin P, Martinot-Duquennoy V. Clinical and experimental study of autologous fat grafting after processing by centrifugation and serum lavage. *Aesthetic Plast Surg*. 2009;33(1):37-43.
77. Khedher NB, David J, Trop I, Drouin S, Peloquin L, Lalonde L. Imaging findings of breast augmentation with injected hydrophilic polyacrylamide gel: patient reports and literature review. *Eur J Radiol*. 2011;78(1):104-11.
78. Khouri RK, Eisenmann-Klein M, Cardoso E, Cooley BC, Kacher D, Gombos E, Baker TJ. Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(5):1173-87.
79. Khouri RK, Schlenz I, Murphy BJ, Baker TJ. Nonsurgical breast enlargement using an external soft-tissue expansion system. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105(7):2500-12; discussion 13-4.
80. Kim BS, Mooney DJ. Scaffolds for engineering smooth muscle under cyclic mechanical strain conditions. *J Biomech Eng*. 2000;122(3):210-5.
81. Kling RE, Mehrara BJ, Pusic AL, Young VL, Hume KM, Crotty CA, Rubin JP. Trends in autologous fat grafting to the breast: a national survey of the american society of plastic surgeons. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(1):35-46.
82. Kneeshaw PJ, Lowry M, Manton D, Hubbard A, Drew PJ, Turnbull LW. Differentiation of benign from malignant breast disease associated with screening detected microcalcifications using dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging. *Breast*. 2006;15(1):29-38.

83. Kovacs L, Eder M, Hollweck R, Zimmermann A, Settles M, Schneider A, Endlich M, Mueller A, Schwenger-Zimmerer K, Papadopoulos NA, Biemer E. Comparison between breast volume measurement using 3D surface imaging and classical techniques. *Breast*. 2007;16(2):137-45.
84. Kovacs L, Eder M, Hollweck R, Zimmermann A, Settles M, Schneider A, Udovic K, Schwenger-Zimmerer K, Papadopoulos NA, Biemer E. New aspects of breast volume measurement using 3-dimensional surface imaging. *Ann Plast Surg*. 2006;57(6):602-10.
85. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, Gonda K, Harii K, Yoshimura K. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(3):1033-41; discussion 42-3.
86. Kurokawa M, Yamada N, Fu I, Tsutsumi S. Reconstruction of breast using a laser lithographic model: a case report. *Breast Cancer*. 2001;8(2):162-5.
87. Kvasnovsky CL, Kesmodel SB, Gragasin JL, Punnoose V, Johnson PA, Goel R, Reddy SK, Pierson RN, Jain A. Expansion of Screening Mammography in the Veterans Health Administration: Implications for Breast Cancer Treatment. *JAMA Surg*. 2013.
88. Lam TC, Hsieh F, Boyages J. The effects of postmastectomy adjuvant radiotherapy on immediate two-stage prosthetic breast reconstruction: a systematic review. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(3):511-8.
89. Lardi AM, Myrick ME, Haug M, Schaefer DJ, Bitzer J, Simmen U, Guth U. The option of delayed reconstructive surgery following mastectomy for invasive breast cancer: why do so few patients embrace this offer? *Eur J Surg Oncol*. 2013;39(1):36-43.
90. Lee CN, Hultman CS, Sepucha K. What are patients' goals and concerns about breast reconstruction after mastectomy? *Ann Plast Surg*. 2010;64(5):567-9.
91. Lemperle G, Morhenn V, Charrier U. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plast Surg*. 2003;27(5):354-66; discussion 67.
92. Leung KM, Yeoh GP, Chan KW. Breast pathology in complications associated with polyacrylamide hydrogel (PAAG) mammoplasty. *Hong Kong Med J*. 2007;13(2):137-40.

93. Li X, Wu Y, Zhang L, Cao Y, Li Y, Li J, Li Z, Gang W. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Analytical Biochemistry*. 2014;451:18-24.
94. Lokmic Z, Thomas JL, Morrison WA, Thompson EW, Mitchell GM. An endogenously deposited fibrin scaffold determines construct size in the surgically created arteriovenous loop chamber model of tissue engineering. *Journal of Vascular Surgery*. 2008;48(4):974-85.
95. Maillard GF. Liponecrotic cysts after augmentation mammoplasty with fat injections. *Aesthetic Plast Surg*. 1994;18(4):405-6.
96. Mankovich NJ, Samson D, Pratt W, Lew D, Beumer J, 3rd. Surgical planning using three-dimensional imaging and computer modeling. *Otolaryngol Clin North Am*. 1994;27(5):875-89.
97. Marler JJ, Guha A, Rowley J, Koka R, Mooney D, Upton J, Vacanti JP. Soft-tissue augmentation with injectable alginate and syngeneic fibroblasts. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105(6):2049-58.
98. Martin P. Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75-81.
99. Martinez-Estrada OM, Munoz-Santos Y, Julve J, Reina M, Vilaro S. Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion. *Cardiovasc Res*. 2005;65(2):328-33.
100. McCleave MJ. Is breast augmentation using hyaluronic acid safe? *Aesthetic Plast Surg*. 2010;34(1):65-8; discussion 9-70.
101. McCleave MJ, Grover R, Jones BM. Breast enhancement using Macrolane: a report of complications in three patients and a review of this new product. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63(12):2108-11.
102. Medina MA, 3rd, Nguyen JT, Kirkham JC, Lee JH, McCormack MC, Randolph MA, Austen Jr WG. Polymer therapy: a novel treatment to improve fat graft viability. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(6):2270-82.
103. Mehnert A, Koch U. Psychological comorbidity and health-related quality of life and its association with awareness, utilization, and need for psychosocial support in a cancer register-based sample of long-term breast cancer survivors. *J Psychosom Res*. 2008;64(4):383-91.
104. Melchels FP, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*. 2010;31(24):6121-30.

105. Metcalfe KA, Semple J, Quan ML, Vadaparampil ST, Holloway C, Brown M, Bower B, Sun P, Narod S. Changes in psychosocial functioning 1 year after mastectomy alone, delayed breast reconstruction, or immediate breast reconstruction. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(1):233-41.
106. Mioton LM, Smetona JT, Hanwright PJ, Seth AK, Wang E, Bilimoria KY, Gaido J, Fine NA, Kim JY. Comparing thirty-day outcomes in prosthetic and autologous breast reconstruction: a multivariate analysis of 13,082 patients? *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013;66(7):917-25.
107. Mojallal A, Lequeux C, Shipkov C, Rifkin L, Rohrich R, Duclos A, Brown S, Damour O. Stem cells, mature adipocytes, and extracellular scaffold: what does each contribute to fat graft survival? *Aesthetic Plast Surg*. 2011;35(6):1061-72.
108. Morrison WA, Marre D, Grinsell D, Batty A, Trost N, O'Connor AJ. Creation of a large adipose tissue construct in humans using a tissue-engineering chamber: A step forward in the clinical application of soft tissue engineering. *EBioMedicine*. 2016 Apr;6:238-245.
109. Morrison WA, Penington AJ, Kumta SK, Callan P. Clinical applications and technical limitations of prefabricated flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1997;99(2):378-85.
110. Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(3 Suppl):121S-8S.
111. Muller D, Chim H, Bader A, Whiteman M, Schantz JT. Vascular guidance: microstructural scaffold patterning for inductive neovascularization. *Stem Cells Int*. 2010;2011:547247.
112. Murugan R, Ramakrishna S. Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. *Tissue Eng*. 2007;13(8):1845-66.
113. Nahabedian MY, Momen B, Galdino G, Manson PN. Breast Reconstruction with the free TRAM or DIEP flap: patient selection, choice of flap, and outcome. *Plast Reconstr Surg*. 2002;110(2):466-75; discussion 76-7.
114. Nahabedian MY, Spear SL. Acellular dermal matrix for secondary procedures following prosthetic breast reconstruction. *Aesthet Surg J*. 2011;31(7 Suppl):38S-50S.
115. Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb*. 2006;13(2):77-81.

## Literaturverzeichnis

116. Nakamura S, Ishihara M, Takikawa M, Murakami K, Kishimoto S, Nakamura S, Yanagibayashi S, Mori Y, Fujita M, Kubo S, Yamamoto N, Kiyosawa T. Increased survival of free fat grafts and vascularization in rats with local delivery of fragmin/protamine microparticles containing FGF-2 (F/P MP-F). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;96(2):234-41.
117. Nguyen A, Pasyk KA, Bouvier TN, Hassett CA, Argenta LC. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg*. 1990;85(3):378-86; discussion 87-9.
118. Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*. 2010;31(21):5536-44.
119. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26(4):433-41.
120. Orbay H, Hinchcliff KM, Charvet HJ, Sahar DE. Fat Graft Safety after Oncologic Surgery: Addressing the Contradiction between In Vitro and Clinical Studies. *Plast Reconstr Surg*. 2018;142(6):1489-99.
121. Park J, Euhus DM, Scherer PE. Paracrine and Endocrine Effects of Adipose Tissue on Cancer Development and Progression. *Endocrine Reviews*. 2011;32(4):550-70.
122. Patel P, Robb GL, Patrick Jr CW. Soft Tissue Restoration Using Tissue Engineering. *Seminars in Plastic Surgery*. 2003;17(01):099-106.
123. Patrick CW. Breast tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*. 2004;6:109-30.
124. Patrick CW, Jr. Adipose tissue engineering: the future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection. *Semin Surg Oncol*. 2000;19(3):302-11.
125. Patrick CW, Jr., Chauvin PB, Hobbey J, Reece GP. Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering. *Tissue Eng*. 1999;5(2):139-51.
126. Peer LA. Cell survival theory versus replacement theory. *Plast Reconstr Surg (1946)*. 1955;16(3):161-8.
127. Peer LA. Loss of weight and volume in human fat grafts with postulation of "cell survival theory". *Plastic Reconstructive Surgery*. 1950.
128. Pelosi MA, 3rd, Pelosi MA, 2nd. Breast augmentation. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2010;37(4):533-46, viii.
129. Peters W, Fornasier V. Complications from injectable materials used for breast augmentation. *Can J Plast Surg*. 2009;17(3):89-96.



## Literaturverzeichnis

130. Petit JY, Lohsiriwat V, Clough KB, Sarfati I, Ihrai T, Rietjens M, Veronesi P, Rossetto F, Scevola A, Delay E. The oncologic outcome and immediate surgical complications of lipofilling in breast cancer patients: a multicenter study--Milan-Paris-Lyon experience of 646 lipofilling procedures. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128(2):341-6.
131. Peto R, Boreham J, Clarke M, Davies C, Beral V. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet.* 2000;355(9217):1822.
132. Piasecki JH, Moreno K, Gutowski KA. Beyond the cells: scaffold matrix character affects the in vivo performance of purified adipocyte fat grafts. *Aesthet Surg J.* 2008;28(3):306-12.
133. Pierrefeu-Lagrange AC, Delay E, Guerin N, Chekaroua K, Delaporte T. [Radiological evaluation of breasts reconstructed with lipomodeling]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2006;51(1):18-28.
134. Popov VK, Evseev AV, Ivanov AL, Roginski VV, Volozhin AI, Howdle SM. Laser stereolithography and supercritical fluid processing for custom-designed implant fabrication. *J Mater Sci Mater Med.* 2004;15(2):123-8.
135. Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen) 2008.
136. Radisic M, Euloth M, Yang L, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Bioeng.* 2003;82(4):403-14.
137. Radisic M, Yang L, Boublik J, Cohen RJ, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Medium perfusion enables engineering of compact and contractile cardiac tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(2):H507-16.
138. Ramon Y, Shoshani O, Peled IJ, Gilhar A, Carmi N, Fodor L, Risin Y, Ullmann Y. Enhancing the take of injected adipose tissue by a simple method for concentrating fat cells. *Plast Reconstr Surg.* 2005;115(1):197-201; discussion 2-3.
139. Reaby LL. Reasons why women who have mastectomy decide to have or not to have breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 1998;101(7):1810-8.
140. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004;109(10):1292-8.
141. Reichenberger MA, Biedermann N, Germann G. [Aesthetic breast augmentation]. *Chirurg.* 2011;82(9):782-8.

142. Riggio E, Bordoni D, Nava MB. Oncologic surveillance of breast cancer patients after lipofilling. *Aesthetic Plast Surg.* 2013;37(4):728-35.
143. Rigotti G, Marchi A, Galie M, Baroni G, Benati D, Krampera M, Pasini A, Sbarbati A. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(5):1409-22; discussion 23-4.
144. Rohner D, Hutmacher DW, Cheng TK, Oberholzer M, Hammer B. In vivo efficacy of bone-marrow-coated polycaprolactone scaffolds for the reconstruction of orbital defects in the pig. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003;66(2):574-80.
145. Rohner D, Hutmacher DW, See P, Tan KC, Yeow V, Tan SY, Lee ST, Hammer B. [Individually CAD-CAM technique designed, bioresorbable 3-dimensional polycaprolactone framework for experimental reconstruction of craniofacial defects in the pig]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2002;6(3):162-7.
146. Rohrich RJ, Morales DE, Krueger JE, Ansari M, Ochoa O, Robinson J, Jr., Beran SJ. Comparative lipoplasty analysis of in vivo-treated adipose tissue. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(6):2152-8; discussion 9-60.
147. Rubino C, Mazzarello V, Faenza M, Montella A, Santanelli F, Farace F. A Scanning Electron Microscope Study and Statistical Analysis of Adipocyte Morphology in Lipofilling: Comparing the Effects of Harvesting and Purification Procedures With 2 Different Techniques. *Ann Plast Surg.* 2013.
148. Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater.* 2003;5:29-39; discussion -40.
149. Sadick NS, Hudgins LC. Fatty acid analysis of transplanted adipose tissue. *Arch Dermatol.* 2001;137(6):723-7.
150. Sarment DP, Sukovic P, Clinthorne N. Accuracy of implant placement with a stereolithographic surgical guide. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(4):571-7.
151. Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C. Mechanisms of Disease: adipokines and breast cancer—endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism.* 2007;3:345.
152. Schain WS. Breast cancer surgeries and psychosexual sequelae: implications for remediation. *Semin Oncol Nurs.* 1985;1(3):200-5.

153. Schain WS, Wellisch DK, Pasnau RO, Landsverk J. The sooner the better: a study of psychological factors in women undergoing immediate versus delayed breast reconstruction. *Am J Psychiatry*. 1985;142(1):40-6.
154. Schlenz I, Kaider A. The Brava external tissue expander: is breast enlargement without surgery a reality? *Plast Reconstr Surg*. 2007;120(6):1680-9; discussion 90-1.
155. Schreml S, Babilas P, Fruth S, Orso E, Schmitz G, Mueller MB, Nerlich M, Prantl L. Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. *Cytotherapy*. 2009;11(7):947-57.
156. Schweizer R, Tsuji W, Gorantla VS, Marra KG, Rubin JP, Plock JA. The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis. *Stem Cells Int*. 2015;2015:120949.
157. Shoshani O, Livne E, Armoni M, Shupak A, Berger J, Ramon Y, Fodor L, Gilhar A, Peled IJ, Ullmann Y. The effect of interleukin-8 on the viability of injected adipose tissue in nude mice. *Plast Reconstr Surg*. 2005;115(3):853-9.
158. Smith EA, Oehme FW. Acrylamide and polyacrylamide: a review of production, use, environmental fate and neurotoxicity. *Rev Environ Health*. 1991;9(4):215-28.
159. Sodian R, Lemke T, Fritsche C, Hoerstrup SP, Fu P, Potapov EV, Hausmann H, Hetzer R. Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering. *Tissue Eng*. 2002;8(5):863-70.
160. Stewart BW, Wild CP. *World cancer report 2014*. 2014.
161. Sukhova I, Muller D, Eisenmann-Klein M, Machens HG, Schantz JT. [Quo vadis? Breast implants--current trends and new concepts]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 2012;44(4):240-53.
162. Tan Q, Li S, Ren J, Chen C. Fabrication of porous scaffolds with a controllable microstructure and mechanical properties by porogen fusion technique. *Int J Mol Sci*. 2011;12(2):890-904.
163. Tanabe YN, Honda T, Nakajima Y, Sakurai H, Nozaki M. Intraoperative application of three-dimensional imaging for breast surgery. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2005;39(6):349-52.
164. Tanzi MC, Fare S. Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches. *Expert Rev Med Devices*. 2009;6(5):533-51.
165. Uda H, Sugawara Y, Sarukawa S, Sunaga A. Brava and autologous fat grafting for breast reconstruction after cancer surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2013.

166. Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*. 1999;354 Suppl 1:S132-4.
167. Van RL, Roncari DA. Isolation of fat cell precursors from adult rat adipose tissue. *Cell Tissue Res*. 1977;181(2):197-203.
168. Van RL, Roncari DA. Complete differentiation in vivo of implanted cultured adipocyte precursors from adult rats. *Cell Tissue Res*. 1982;225(3):557-66.
169. van Kruijsdijk RC, van der Wall E, Visseren FL. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(10):2569-78.
170. Visscher LE, Cheng M, Chhaya M, Hintz ML, Schantz JT, Tran P, Ung O, Wong C, Hutmacher DW. Breast Augmentation and Reconstruction from a Regenerative Medicine Point of View: State of the Art and Future Perspectives. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017;23(3):281-93.
171. von Buelow S, von Heimburg D, Pallua N. Efficacy and safety of polyacrylamide hydrogel for facial soft-tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116(4):1137-46; discussion 47-8.
172. von Heimburg D, Zachariah S, Heschel I, Kuhling H, Schoof H, Hafemann B, Pallua N. Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2001;22(5):429-38.
173. von Heimburg D, Zachariah S, Low A, Pallua N. Influence of different biodegradable carriers on the in vivo behavior of human adipose precursor cells. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108(2):411-20; discussion 21-2.
174. Waljee JF, Hu ES, Ubel PA, Smith DM, Newman LA, Alderman AK. Effect of esthetic outcome after breast-conserving surgery on psychosocial functioning and quality of life. *J Clin Oncol*. 2008;26(20):3331-7.
175. Wang Z, Li S, Wang L, Zhang S, Jiang Y, Chen J, Luo D. Polyacrylamide hydrogel injection for breast augmentation: another injectable failure. *Med Sci Monit*. 2012;18(6):CR399-408.
176. Wang ZX, Luo DL, Dai X, Yu P, Tao L, Li SR. Polyacrylamide hydrogel injection for augmentation mammoplasty: loss of ability for breastfeeding. *Ann Plast Surg*. 2012;69(2):123-8.

177. Wang Y, Qi K, Ma Y, Liu Z, Zhao Y, Wang Y, Huo M, Shi L, Tong C, Ding Y. [Fat particle injection auto-transplantation a 10-year review]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2002;18(2):95-7.
178. Wigganhauser PS, Muller DF, Melchels FP, Egana JT, Storck K, Mayer H, Leuthner P, Skodacek D, Hopfner U, Machens HG, Staudenmaier R, Schantz JT. Engineering of vascularized adipose constructs. *Cell Tissue Res*. 2012;347(3):747-57.
179. Wong W.H. MDJ. Synthesis and Properties of Biodegradable Polymers Used as Synthetic Matrices for Tissue Engineering. *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*. 1997.
180. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. 2010;35(10):1217-56.
181. Wu X, Ren J, Li J. Fibrin glue as the cell-delivery vehicle for mesenchymal stromal cells in regenerative medicine. *Cytotherapy*. 2012;14(5):555-62.
182. Xu C, Cao M, Bao B, Li H, Yin D. Tissue degeneration 7 years after breast augmentation with injected polyacrylamide hydrogel (PAAG). *Aesthetic Plast Surg*. 2012;36(1):160-2.
183. Yang X, Cai X, Wang J, Tang H, Yuan Q, Gong P, Lin Y. Mechanical stretch inhibits adipogenesis and stimulates osteogenesis of adipose stem cells. *Cell Prolif*. 2012;45(2):158-66.
184. Yi CG, Xia W, Zhang LX, Zhen Y, Shu MG, Han Y, Guo SZ. VEGF gene therapy for the survival of transplanted fat tissue in nude mice. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2007;60(3):272-8.
185. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg*. 2008;32(1):48-55; discussion 6-7.
186. Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002;23(4):1169-85.
187. Zeltinger J, Landeen LK, Alexander HG, Kidd ID, Sibanda B. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. *Tissue Eng*. 2001;7(1):9-22.
188. Zhang ZY, Teoh SH, Chong WS, Foo TT, Chng YC, Choolani M, Chan J. A biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30(14):2694-704.

## **Danksagung**

Zuerst gebührt mein Dank Herrn PD Dr. med. J. T. Schantz, PhD, der mir das Thema nahe brachte und diese Arbeit intensiv betreute. Dabei war er nicht nur stets für Fragen und Anregungen verfügbar, sondern stand mir auch immer durch konstruktive Kritik zur Seite. Insbesondere möchte ich mich bei ihm für die Ermöglichung meines Forschungsaufenthalts in Singapur, der für mich eine prägende Erfahrung war, herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. H.G. Machens möchte ich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit bedanken, nachdem Herr PD Dr. med. J. T. Schantz, PhD, diese nicht mehr weiterführen konnte. Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. D.W. Hutmacher, PhD, von der Queensland University of Technology, der diese Arbeit von Anfang an mitbetreute, für die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung der Scaffolds. Herrn Mohit Chhaya, PhD, danke ich für die Beratung bei der Erstellung der Graphiken. Herrn Dr. Dr. med. D. Duscher danke ich für die Unterstützung und seinen Rat bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Durch hilfreiche Diskussionen und – wenn nötig – Motivation trug er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Sybille Regn, die mich in die Arbeit mit Zellkulturen einführte und mich bei der Aufstellung der Experimente unterstützte. Sie war stets mit Anregungen, Ideen, Ermutigungen und einem offenen Ohr für mich da. Ebenfalls danke ich Ramona Nitiu, Jascha Ell und Reyk Fischer für den anregenden Austausch und die gemeinsamen Stunden im Labor. Für die Bereitstellung der Laborarbeitsplätze durch die Tissue Engineering Gruppe der Hals-Nasen-Ohren-Klinik danke ich Frau PD Dr. med. Katharina Storck.

Einen besonderen Dank möchte ich Woon Shin Chong, Yhee Cheng und Hui Lun Soh aussprechen, die mich während meiner Zeit in Singapur begleitet haben.

Ich danke von ganzem Herzen meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit. Max Fröhlich danke ich für alles.