

TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Klinikum Rechts der Isar, München

**Gegenüberstellung von ASC- und SVF- basierten
Fettgewebekonstrukten im Mausmodell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades (Dr.med.)

an der Medizinischen Fakultät

der Technischen Universität München

vorgelegt von

Michael Fritz Grießl, geb. 11.03.1991, Weiden i.d.Opf.

Traunstein, 2020

Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

Gegenüberstellung von ASC- und SVF- basierten Fettgewebekonstrukten im Mausmodell

Michael Fritz Grießl

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

Prüfende/-r der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Rainer Staudenmaier

2. Prof. Dr. Barbara Wollenberg

3. -

Die Dissertation wurde am 16.11.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.07.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Hintergrund.....	2
1.2	Adipose-Tissue-Engineering.....	3
1.2.1	Zellen.....	3
1.2.2	In-vitro-Vorkultivierung der Zellen.....	7
1.2.3	Trägermaterialien und Applikationsart.....	10
1.2.4	Angiogenese und chirurgische Vaskularisierung.....	11
1.2.5	Beispiele experimenteller Ansätze.....	12
1.3	Tiermodelle.....	14
1.4	Mediatoren- und Bausteinmodell.....	14
1.5	Fragestellung dieser Arbeit.....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Herstellung der Komposit-Konstrukte in-vitro.....	17
2.1.1	Vorbereitung der Konstruktkomponenten.....	17
2.1.2	Herstellung der Konstrukte.....	20
2.2	Vorkultivierung der Kompositkonstrukte.....	21
2.3	Implantation der Konstrukte.....	21
2.3.1	In-vivo-Implantation in die Maus.....	21
2.3.2	Gruppeneinteilung.....	22
2.3.3	Mikrochirurgische Implantation.....	23
2.3.4	Nachsorge.....	24
2.4	Explantation.....	24
2.5	Histologische Aufarbeitung.....	25
2.5.1	Fixierung, Paraffineinbettung und Vorbereitung zur Färbung.....	25
2.5.2	Auswahl der Schnitte für die Färbung.....	25
2.5.3	Trichrom Färbung nach Ladewig.....	25
2.5.4	Vimentin-Antikörper Färbung.....	26
2.7	Auszählung der histologischen Parameter.....	27
2.7.1	Vorbereitung für die Auszählung.....	27
2.7.2	Erhobene Parameter.....	27
2.7.3	Statistische Auswertung.....	28
2.8	Materialien.....	29
2.8.1	Reagenzien.....	29
2.8.2	Verbrauchsmaterial.....	31
2.8.3	Werkzeuge und Geräte.....	31
2.8.4	Software.....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Morphologische und histologische Beschreibung.....	33
3.1.1	Gruppe 1, ASC, ohne Vorkultivierung.....	35
3.1.2	Gruppe 2, SVF, ohne Vorkultivierung.....	36
3.1.3	Gruppe 3, ASC, mit Vorkultivierung.....	37
3.1.4	Gruppe 4, SVF, mit Vorkultivierung.....	38
3.1.5	Vimentin-Antikörperfärbung.....	39
3.2	Histomorphometrische Analyse.....	40
4	Diskussion.....	44
4.1	SVF als alternativer Mediator des Adipose-Tissue-Engineering.....	44
4.1.1	Physiologische Besonderheiten in der Verwendung der SVF im Vergleich zu ASC..	44
4.1.2	Vergleich der Zelllinien.....	47

4.2	Ursprung der Zellen.....	50
4.3	Methodik im Kontext mediatorenbasierter Gewebs-entwicklung.....	53
4.3.1	Vorkultur.....	53
4.3.2	Auswahl der Trägermaterialien (PU und Fibrin).....	56
4.4	Limitationen.....	57
4.4.1	Vergleichbarkeit.....	57
4.4.2	Methodik.....	57
4.4.3	Langzeit-Volumenstabilität.....	58
4.4.4	ASC, SVF und Tumorgenese.....	58
4.5	Ausblick.....	62
5	Zusammenfassung.....	63
6	Literaturverzeichnis.....	65
7	Danksagung.....	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Molecular mechanism of adipogenesis and its common in-vitro inducers... 8
Abbildung 2:	Übersicht Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau..... 22
Abbildung 3:	Schemazeichnung der Operationstechnik 24
Abbildung 4:	Wahl des Schnittes 27
Abbildung 5:	Konstruktbereiche..... 33
Abbildung 6:	Histologischer Schnitt von Gruppe 1 (ASC, ohne Vorkultivierung)..... 35
Abbildung 7:	Histologischer Schnitt von Gruppe 2 (SVF, ohne Vorkulturrückkultur)..... 36
Abbildung 8:	Histologischer Schnitt von Gruppe 3 (ASC, mit Vorkulturrückkultur)..... 37
Abbildung 9:	Histologischer Schnitt von Gruppe 4 (SVF, mit Vorkulturrückkultur) 38
Abbildung 10:	Beispielhaft dargestellte Immunhistochemie mit anti-human Vimentin Färbung (Gruppe 3, ASC mit adipogener Induktion)..... 39
Abbildung 11:	Histomorphometrische Quantifizierung der Fettgewebsentstehung in Tissu®Col-/PU-Konstrukten nach fünf Wochen in-vivo..... 41
Abbildung 12:	Histomorphometrische Quantifizierung der Angiogenese in Tissu®Col-/PU-Konstrukten nach fünf Wochen in-vivo. 43
Abbildung 13:	Fiktive Vorstellung der Abbaudynamik 52
Abbildung 14:	Vergleich von Versuchsaufbauten (in Ausschnitten) 54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Unterschiede in cluster-of-differentiation (CD) zwischen SVF, ASC und MSC... 4
Tabelle 2:	Zellen in der SVF..... 6
Tabelle 3:	Protokoll Trichrom Färbung nach Ladewig 25
Tabelle 4:	Vimentin-Antikörperfärbung..... 26
Tabelle 5:	Vergleich von in-vivo-Studien 52

1 Einleitung

Tissue-Engineering ist die artifizielle Herstellung von Gewebe, wobei in dieser Arbeit im Fachgebiet der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde Stammzellen zur Generierung sekundär transplantierbarer, gestielter Fettgewebstrukturen verwendet wurden (Griessler et al., 2018). Diese Konstrukte setzen sich aus einem Trägermaterial aus volumenstabilen, bioabbaubaren Polyurethan-Schwämmen, Fibrin, humanen Stammzellen und proliferativen und induktiven Nährmedien sowie mikrochirurgisch eingebrachten Gefäßbündeln zusammen und wurden in immundepletierte Mäuse implantiert (Griessler et al., 2018; C. W. Patrick et al., 2008). Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Studien zu diesem Thema, konzentriert sich diese Arbeit auf den Vergleich von Stammzellformulierungen (Storck et al., 2017; Wittmann et al., 2015; Wittmann et al., 2016): „Adipose-derived stromal and stem cells“ (ASC) und „Stroma-Vaskuläre-Fraktion“ (SVF). Diese unterscheiden sich in Gewinnung, Zellzusammensetzung, sowie im auto- und parakrinen Sekretionsprofil (Bourin et al., 2013; Bunnell et al., 2008; Dykstra et al., 2017; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001). Während ASC durch in-vitro-Passagierung aus der SVF gewonnen werden, beinhaltet Letztere neben ASC auch endotheliale Vorläuferzellen, Lymphozyten, Perizyten und Makrophagen (Bourin et al., 2013; Bunnell et al., 2008; Dykstra et al., 2017).

Verglichen wurden vier Gruppen: ASC bzw. SVF mit bzw. ohne Vorkultivierung. Diese bestand aus einem induktiven Medium, welches die Entwicklung von Fettgewebe und Gefäßnetzwerken unterstützen soll. Nach Herstellung der Konstrukte wurden diese mikrochirurgisch in die Leistenregion von immundepletierten Mäusen implantiert. Als Vaskularisierungsstrategie wurden die Vasa femoralia in Durchflussgefäßtechnik verwendet (Burghartz et al., 2015; Stillaert et al., 2007; Wiggenhauser et al., 2012). Nach einer fünfwöchigen in-vivo-Phase wurden die gewonnenen Konstrukte aus dem Mausmodell explantiert, histologisch aufgearbeitet und hinsichtlich Adipogenese und Angiogenese softwaregestützt evaluiert (Griessler et al., 2018).

Ziel dieser Arbeit ist es, bisheriges Wissen aus der ASC-basierten Tissue-Engineering-Forschung auf eine weitere Zellfraktion, die SVF, zu übertragen (Storck et al., 2017; Wittmann et al., 2015; Wittmann et al., 2016). Attraktiv macht diese Zelllinie insbesondere die simple Isolierung und ausbleibende Passagierung, was die Hoffnung nahelegt, das Forschungsgebiet des Tissue-Engineering näher an die Translation und somit die klinische Anwendbarkeit zu

bringen (Griessler et al., 2018; Wittmann et al., 2015). Weiterhin lässt die Zusammensetzung der Zellen mit beispielsweise endothelialen Vorläuferzellen einen Benefit für die Vaskularisierung der transplantierten Konstrukte erwarten (Anghelina et al., 2004, 2006; Bourin et al., 2013; Dykstra et al., 2017; Ell et al., 2017; Fraser et al., 2006; Moldovan, 2002; Planat-Benard et al., 2004; Rehman et al., 2004). Weiterhin soll in dieser Arbeit auf den Prozess des Ursprungs und der Entstehung des neuen Gewebes eingegangen werden. Hierbei stellt sich die Frage ob eingebrachte Zellen Gewebeverbände bilden indem eine Differenzierung zu Fett-, Bindegewebe- und Endothelzellen stattfindet (Bauer-Kreisel et al., 2010; Wiggenhauser et al., 2012; Wittmann et al., 2015). Alternative Theorien legen die Sekretion von parakrinen Faktoren durch die applizierten Stammzellen und damit einhergehende, konsekutive Einwanderung von Progenitorzellen des Transplantatempfängers nahe (Freiman et al., 2018; Griessler et al., 2018; Han et al., 2015; Mizuno et al., 2012; Stillaert et al., 2007; Storck et al., 2017; Volz et al., 2016; von Heimburg et al., 2001).

1.1 Hintergrund

Bisherige chirurgische Techniken zur Augmentation und Rekonstruktion von erworbenen oder angeborenen Gewebedefekten sind unter anderem die Transplantation von freiem, autologen Fett sowie die, insbesondere für größere Defekte verwendeten, Lappenplastiken (Vogt, 2011). Erstere ist aufgrund der mangelnden Hypoxietoleranz und der mechanischen Beanspruchung des verwendeten adipozytenreichen Gewebes und der einhergehenden resorptionsbedingten Volumen- und Forminstabilität in der Anwendung limitiert (Bucky et al., 2008; Eremia et al., 2000; Ersek, 1991; Ismail et al., 2017; Nguyen et al., 1990; Shim et al., 2017; Smahel, 1989). Hierbei wurden Volumenretentionsraten von durchschnittlich 50 % bzw. 76,8 % beschrieben (Groen et al., 2016; Herly et al., 2017). Bei Lappenplastiken wird das Gewebe mit intakter Blutversorgung verpflanzt und an die Zirkulation der Empfängerlokalisierung angeschlossen, was zu erhöhter postoperativer Morbidität und Komplikationsraten führt (Bucky et al., 2008; Vogt, 2011). Postoperative Korrekturen in bis zu 1/4 der Fälle wurden beschrieben (Weichman et al., 2013).

Tissue-Engineering befasst sich mit der Herstellung von artifiziell generiertem, biologischem Gewebe zum Ersatz nicht oder bedingt regenerierbarer Strukturen, wie zum Beispiel Herzgewebe (Radisic et al., 2003; Reis et al., 2016; Rodrigues et al., 2018), intraartikulärem Knorpel (Grande et al., 1999; Kazemi et al., 2017; Nam et al., 2018; Tribe et al., 2017), Nierenparenchym (Basu et al., 2011), Nervenzellen (Petersen et al., 2018) oder Bindegewebe.

Auf der Suche nach Alternativen zu o. g. chirurgischen Techniken ist vor allem ein Gewebe interessant, welches frequentiert im Rahmen minimalinvasiver korrigierend-ästhetischer Eingriffe entfernt wird: Fett. Das Liposuktionsprodukt ist eine Quelle für die darin enthaltenen Stammzellen, welche eine breite Differenzierungskapazität bis hin zum Kardiomyozyt aufweisen (Suzuki et al., 2015). Deren Multipotenz macht Sie zur Basis des Tissue-Engineering und ermöglicht die Herstellung von klinisch applizierbarem Gewebe, welches eine vielversprechende Alternative zu klassischen Techniken für rekonstruktiv-kosmetische Fragestellungen wie angeborenen Fehlbildungen, Brustaufbauten oder komplexen Traumata darstellt (Katz et al., 1999; C. W. Patrick, Jr., 2001).

1.2 Adipose-Tissue-Engineering

Aufgrund der Limitationen der bisherigen chirurgischen Möglichkeiten sind die Bestrebungen nach neuen Techniken mit patientenfreundlichen Materialien nachvollziehbar. Ein Produkt des Tissue-Engineering beinhaltet eine Auswahl oder Kombination folgender Komponenten: (1) Zellen, aufgebracht auf (2) ein Trägermaterial (engl. „scaffold“), welches sowohl Volumen und Form definiert, als auch (3) Faktoren zur Beeinflussung der zellulären Entwicklung beherbergen kann. Der vierte Teil besteht aus einer vaskulären Komponente zur Verbesserung der Blutversorgung des Gesamtkonstrukts (C. W. Patrick et al., 2008).

1.2.1 Zellen

Die verwendete Zellreihe sollte durch minimalinvasive Eingriffe und standardisierte Prozesse in ausreichender Quantität zu gewinnen sein ohne exzessive Schäden im Spendergewebe zurückzulassen. Alternativ sind Zellen mit Potential zur in-vitro-Expansion ohne Verlust der Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeit eine mögliche Quelle. Um eine Immunantwort im Sinne einer graft-vs.-host-disease (GvHD) zu vermeiden, sollten die Zellen autolog transplantiert werden oder im Falle einer allogenen Transplantation hypo- bis nicht-immunogen sein (Bauer-Kreisel et al., 2010).

Wie bereits angedeutet, ist die Verwendung von reifen Adipozyten, wie zum Beispiel beim „fat grafting“, nicht zielführend. Deren ausdifferenzierter Zustand, die damit einhergehende geringe Hypoxietoleranz (von Heimburg et al., 2005) sowie die Vulnerabilität gegenüber mechanischer Zerstörung durch die große Menge an intrazellulärem Fett kompromittiert sowohl Transplantationsfähigkeit als auch Langzeitüberleben und Volumenstabilität (C. W. Patrick, Jr., 2001; Weiser et al., 2008).

1.2.1.1 Adipose-derived stromal and stem cells (ASC)

2001 wurden adipose-derived stem and stromal cells (ASC) erstmals von Zuk et al. beschrieben (Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001). Zugrunde lag die Suche nach Alternativen zur Gewinnung von Stammzellen, welche bis dahin hauptsächlich aus dem Knochenmark („multipotent mesenchymal stromal cells“, MSC) extrahiert wurden, deren Ernte jedoch mit geringer Zellausbeute und hoher Spendermorbidity verbunden ist (Bourin et al., 2013; Bunnell et al., 2008; Zuk et al., 2002). Die Möglichkeit zur technisch simplen Gewinnung großer Mengen proliferationsfähiger Stammzellen ohne Schaffung eines relevanten Defekts wird von Fettgewebe erfüllt (Bauer-Kreisel et al., 2010). Die ASC werden aus einem durch enzymatische Verdauung, Zentrifugation und Reinigung aufbereiteten Lipoaspirationsprodukt, der Stroma-Vaskulären-Fraktion (SVF) isoliert, was im Material- und Methoden-Teil dieser Arbeit genauer erläutert wird (Bourin et al., 2013; Bunnell et al., 2008).

Eingehende Charakterisierung der ASC im Vergleich zu MSC zeigte gleichermaßen Adhärenz zu Plastikoberflächen, Selbsterneuerungskapazität sowie breite, jedoch nicht vollständige Übereinstimmung hinsichtlich Zelloberflächenmarkern (cluster-of-differentiation, CD). Unterschiede zeigten sich demnach v. a. in CD36 und CD106, Oberflächenmarker hämatopoetischer Zellen (Bourin et al., 2013). Bezüglich der Expression einzelner Marker auf ASC, darunter CD34, herrscht bis heute kein Konsens in der Literatur (Mildmay-White et al., 2017).

Tabelle 1: Unterschiede in cluster-of-differentiation (CD) zwischen SVF, ASC und MSC

Sowohl adipose-derived stromal and stem cells (ASC) als auch Stroma-Vaskuläre-Fraktion (SVF) und Mesenchymal Stem Cells (MSC) weisen unterschiedliche Oberflächenmarker-Profile auf. „++“ = >70 %, „+“ = 30–70 %, „+/-“ = > 2–30 %, „-“ = <2 %; „k. A.“ = keine Angabe (Bourin et al., 2013, Seite 12, Tabelle 1 sowie Seite 14, Tabelle 3).

Oberflächenmarker (CD)	SVF	ASC	MSC
CD10	k. A.	++	+/-
CD13 (APN)	+/-	++	++
CD31 (PECAM-1)	+/- (<20 %)	- (<2 %)	k. A.
CD34	+	+/- (variabel)	-
CD36	k. A.	+	-
CD45	+	-	-
CD73 (L-VAP-2)	+/-	++	++
CD90 (Thy-1)	+/-	++	++
CD105 (Endoglin)	+/-	++	++
CD106 (VCAM-1)	k. A.	+/-	+
CD235a (GYPA)	k. A.	-	k. A.

Des Weiteren bestätigte sich die multipotente Differenzierungsfähigkeit (Multipotenz) dieser Zellen. Unter adäquater Induktion konnte eine vergleichbare Genexpression und

Proteinsynthese wie bei Vorläuferzellen von Knorpel-, Knochen- und Myokardgewebe sowie Endothel- und Neuronalzellen beobachtet werden (Fraser et al., 2006; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001). Seither beschrieben mehrere Arbeitsgruppen die multimodale Differenzierungskapazität der Stammzellen, was von Mildmay-White et al. zusammengefasst wurde (Mildmay-White et al., 2017): Osteogene (Dragoo et al., 2003; Halvorsen et al., 2000), myogene (Mizuno et al., 2002), chondrogene (Awad et al., 2003; Erickson et al., 2002; Y. Wei et al., 2007) und organspezifische (Dhanasekaran et al., 2013; Ruiz et al., 2010) Differenzierung.

1.2.1.1.1 Angiogenetisches Potential der ASC

Planat-Benard et al. zeigten an einem Versuch mit ischämischen, hinteren Gliedmaßen bei Mäusen, dass die eingebrachten, aus SVF isolierten ASC Neovaskularisationspotential haben. Nach intramuskulärer Injektion der ASC (CD13+, CD34+, CD45-, CD14-, CD144-, CD31-) zeigten sich bessere Ergebnisse in der mikroangiografischen Evaluation der ischämischen Gliedmaßen, was die Gruppe u. a. den in der Immunfluoreszenz detektierten CD31-positiven Zellen (CD31; Marker endothelial differenzierter Zellen) zuschreibt. Dies spricht für eine enorme Differenzierungskapazität von initial CD31-negativen ASC und zeigt deren Potential zur Vaskularisierung auf. Als weitere kausale Theorie der Neovaskularisation zogen Planat-Bernrad et al. die Sekretion von pro-angiogenetischen Faktoren wie vascular-endothelial growth factor (VEGF) in Erwägung (Planat-Benard et al., 2004). Bemerkenswerterweise scheinen ASC die Fähigkeit zu besitzen, selbst ohne externe Induktion mit pro-angiogenetischen VEGF durch autokrine Sekretion eben jenes und weiterer Faktoren endotheliale Strukturen zu bilden. Vor allem unter hypoxischen Bedingungen findet eine signifikant höhere Sekretion von VEGF statt (Fraser et al., 2006; Rehman et al., 2004).

1.2.1.2 Verwendung der Stroma-Vaskulären-Fraktion (SVF)

Die bereits erwähnten ASC befinden sich, bevor sie isoliert und expandiert werden, in einem Zellgemisch, der Stroma-Vaskulären-Fraktion (SVF). Diese enthält neben adipogenen Stammzellen hämatopoetische Zellen, Endothelzellen und Immunzellen wie Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen (siehe Tabelle 2: Zellen in der SVF) (Dykstra et al., 2017, Bourin et al., 2013,). Deren Zusammensetzung ist heterogen und abhängig von verschiedenen Einflussfaktoren: von den Spendern und deren Körperfettanteil, der Spenderregion (abdominell, gluteal, viszeral, peritoneal etc.), der Mechanik der Liposuktion sowie der Art der enzymatischen Prozessierung (Bourin et al., 2013; Dykstra et al., 2017; Silva et al., 2017; Silva et al., 2015).

Tabelle 2: Zellen in der SVF

Während Adipose-derived Stem and Stromal Cells (ASC) aus der Stroma-Vaskulären-Fraktion (SVF) isoliert werden, weist die SVF eine breitere Zusammensetzung an Zellen unterschiedlicher Fraktionen auf (Dieser Tabelle liegen Daten der Quellen (1) Dykstra et al., 2017, Grafik 1, Seite 1104 und (2) Bourin et al., 2013, Seite 13, Tabelle 2 zugrunde).

Zelltyp	Häufigkeit
Mesenchymale Stamm- und Stromazellen	2–10 % ¹
Stammzellen der Hämatopoese	<0.1 % ²
M2 Monozyten und Makrophagen	10 % ¹
Lymphozyten	10–15 % ²
Regulatorische T-Zellen (T _{reg})	5–70 % der CD4-positiven T-Zellen ¹
Perizyten	3–5 % ² stark differierend, abhängig vom Endothelzellen-/Perizyten-Verhältnis, für Fettgewebe 10:1 – 7:10 ¹
Endotheliale Vorläuferzellen	7–30 % ¹

Folglich unterscheiden sich die beiden Zelllinien auch in ihren CD-Profilen. Der Hauptunterschied sind die hämatopoetischen und angiogenetischen Oberflächenmarker CD45 und CD31, welche in Zelllinien der SVF vorkommen, während sie bei Charakterisierung von ASC-Zelllinien abwesend sind (vergleiche hierzu 1.2.1.1 sowie Tabelle 1:

Unterschiede in cluster-of-differentiation (CD) zwischen SVF, ASC und MSC) (Bourin et al., 2013). Zudem zeigt sich im Zuge der Isolation, Passagierung und Expansion der ASC aus der SVF ein Verlust der Expression von CD34-Oberflächenmarkern (Mitchell et al., 2006; Scherberich et al., 2013; Yoshimura et al., 2006). Die Kinetik des CD34-Verlusts scheint unter anderem abhängig von dem verwendeten Medium und den darin enthaltenen Induktionsfaktoren zu sein (Rehman et al., 2004; Yoshimura et al., 2006). Die Funktion von CD34 ist bislang nicht vollständig geklärt. Suga et al. zeigten eine verbesserte Differenzierungskapazität CD34-negativer Stammzellen, was impliziert, dass der CD34-Verlust eine Prägung der ASC zu einer bestimmten Zellabstammung (z. B.: adipogen oder osteogen) beinhaltet. CD34-positive ASC hingegen haben eine größere Proliferationskapazität und exprimieren im Vergleich vermehrt Marker von endothelialen Vorläuferzellen, während jedoch die Fähigkeit zur Bildung von kapillären Strukturen unabhängig vom CD34-Profil ist (Suga et al., 2009). Die Quantität der VEGF-Sekretion in Abhängigkeit von der Expression von CD34 wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben (Kim et al., 2016; Suga et al., 2009).

1.2.2 In-vitro-Vorkultivierung der Zellen

Die Basis der Kulturmedien bilden kommerziell erhältliche Lösungen aus Elektrolyten und Zellnährstoffen wie Proteine und Wachstumsfaktoren. Neben tierischen und somit für den klinischen Einsatz limitierten Produkten (z. B. Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 DMEM/Ham's F-12 der Firma Invitrogen mit fetalem Rinderserum (fetal bovine serum, FBS)) stehen humane Serumlösungen (human-platelet lysate, thrombin-activated platelet-rich plasma) oder serumfreie Alternativen zur Verfügung (Lindroos et al., 2011).

Neben dieser Grundkomposition beinhaltet die Zellkultur weitere Faktoren, welche die Differenzierung der multipotenten ASC hin zur gewünschten Zelllinie (adipogen, chondrogen, osteogen, etc.) anstoßen. Für die adipogene Differenzierung ist ein anfänglicher „commitment step“ nötig, welcher die Stammzellen auf die adipogene Abstammungslinie limitiert, während Marker endständiger Differenzierung, wie sie reife Adipozyten exprimieren, noch fehlen (Lindroos et al., 2011). Für diesen initialen Schritt und die weitere Differenzierung zeigten sich Insulin, Isobutylmethylxanthin (IBMX) und Glucocorticoide wie Dexamethason bereits Ende des 20. Jahrhunderts als potente, pro-adipogene Induktionsfaktoren (Deslex et al., 1987; Hauner et al., 1989; Hauner et al., 1987).

Zentrale Rollen auf molekularer Ebene spielen die Transkription und Aktivierung der Proteine peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) sowie CCAAT-enhancer binding protein alpha (C/EBP α), sowie andere Mitglieder der C/EBPs-Familie (Farmer, 2006; Moreno-Navarrete et al., 2012; Volz et al., 2016). Diese werden entweder direkt oder mittels Signalkaskaden durch IBMX, Glucocorticoide, Insulin und Indomehtacin angestoßen (Volz et al., 2016). Faktoren wie basic-fibroblast-growth-factor (bFGF) greifen in die Signalkaskade des insulin-like-growth-factor-Rezeptors (IGF-Rezeptor) ein (Volz et al., 2016).

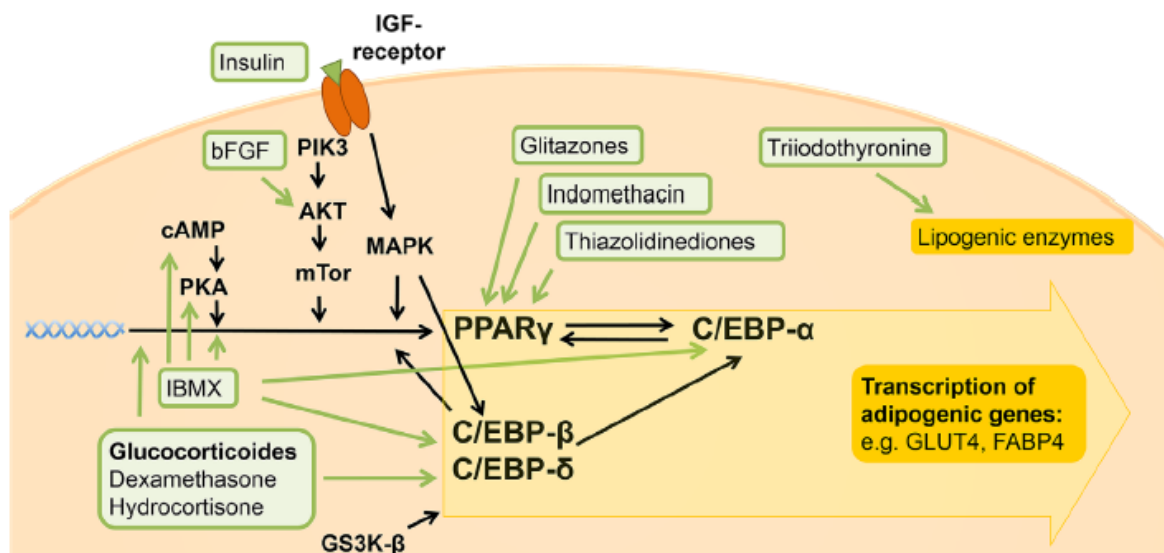


Abbildung 1: Molecular mechanism of adipogenesis and its common in-vitro inducers.

PPARgamma and C/EBPalpha are the main modulators of adipogenesis and their activation finally results in the transcription of adipogenic genes. In-vitro they are activated by the addition of different molecules (highlighted in green) like glucocorticoids, insulin or IBMX. Abbreviations: AKT = PKB: protein kinase B, bFGF: basic-fibroblast-growth-factor, cAMP: cyclicadenosinemonophosphate, C/EBP: CCAAT-enhancer binding protein, FABP: fatty acid binding protein, GLUT: glucosetransporter, GS3-Kbeta: glycogen synthase 3 kinase beta, IBMX: isobutylmethylxanthine binding protein, IGF: insulin-like-growth-factor, MAPK: mitogen-activated protein kinases, mTor: mammalian target of rapamycin, PIK3: phosphatidyl-3-kinase, PKA: protein kinase A, PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor.¹ (Volz et al. 2016, Seite 5, Grafik 1)

Je nach gewünschter Differenzierung, sowie abhängig von der zugrunde liegenden Zellfraktion (SVF oder ASC) sind folglich verschiedene Medien und Induktionsfaktoren nötig. Während bei alleiniger Verwendung und Kultivierung von ASC die adipogene Differenzierung im Vordergrund steht, muss bei Applikation von SVF auch die Einflussnahme auf die endothelialen Progenitorzellen bedacht werden. Diese Induktion zweier unterschiedlicher Zelllinien ist in gewisser Weise ein Spagat: Wittmann et al. 2015 kultivierten in einer stabilen Fibrinformulierung eingebrachte SVF-Zellen in einer Mischung aus „preadipocyte-growth-medium-2“ (PGM-2) und „endothelial-growth-medium-2“ (EGM-2) und evaluierten den

¹ Molekulare Mechanismen der Adipogenese und deren gängigen Induktoren in-vitro.

PPARγ und C/EBPα sind die Hauptmodulatoren der Adipogenese und ihre Aktivierung hat die Transkription von pro-adipogenen Genen zur Folge. In-vitro werden Sie durch die Zugabe verschiedener Moleküle (hervorgehoben in grün), wie Glucokortikoide, Insulin oder IBMX aktiviert. Abkürzungen: AKT = PKB: Proteinkinase B; bFGF: basic-fibroblast-growth-factor; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; C/EBP: CCAAT-enhancer binding protein; FABP: fatty acid binding protein; GLUT: glucose transporter, GS3-Kbeta: glycogen synthase 3 kinase beta; IBMX: isobutylmethylxanthine binding protein; IGF: insulin-like growth factor; MAPK: mitogen-activated protein kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; PIK3: phosphatidyl-3-kinase; PKA: protein kinase A; PPARγ: peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Übersetzung des Autors, Volz et al., 2016, Seite 5, Grafik 1).

Einfluss von adipogener Induktion auf Adipo- und Angiogenese in-vitro (Wittmann et al., 2015). Wichtig ist hierbei die Unterscheidung zwischen Vorkultivierung mit „growth-medium“ (PGM-2 und/oder EGM-2) sowie Vorkultivierung und Induktion (PGM-2, EGM-2 mit zusätzlichen Faktoren mit Einfluss auf den PPAR γ - und C/EBP α -Signaltransduktionsweg).

Eben jene Arbeitsgruppe zeigte Folgendes: Der vollständige Verzicht auf eine Vorkultur kompromittiert das Überleben der eingebrachten Zellen. Die adipogene Induktion begünstigt die Entstehung von lipidgefüllten Adipozyten, kompromittiert jedoch die Bildung von CD31-positiver, prävasculärer Strukturen. Reine Vorkultur mit PGM-2 und EGM-2 und Verzicht auf adipogene Induktion hingegen kompromittiert die Entstehung von reifen, lipidgefüllten Adipozyten, fördert jedoch die Bildung eines Gefäßnetzwerks (Wittmann et al., 2015). Letzteres schreiben die Autoren den in der Zellkultur enthaltenen Faktoren „fibroblast-growth factor-2“ (FGF-2) sowie VEGF und deren Einfluss auf die endothelialen Vorläuferzellen innerhalb der SVF zu (Wittmann et al., 2015). Zusammenfassend scheint die adipogene Induktion positiven Einfluss auf die Entstehung von Fettgewebe und negativen Einfluss auf die Angiogenese zu haben (Wittmann et al., 2015).

Neben der Art und Weise der Vorkultivierung mit oder ohne Induktion ist die Dauer der Vorkultur entscheidend. Diese bestimmt den Entwicklungsstand der Zellen zum Zeitpunkt der in-vivo-Implantation des präfabrizierten Konstrukts. Letztendlich ist der optimale Implantationszeitpunkt entscheidend: Vollständiger Verzicht auf Vorkultur, sozusagen die direkte Beimpfung und Implantation von zellhaltigen Konstrukten, verpasst den ersten, bereits erwähnten „commitment step“ der Vorläuferzellen und somit den Beginn der adipogenen Differenzierung. Dies zeigten Versuche mit 3T3-L1-Präadipozyten, welche selbst nach zwölfwöchiger in-vivo-Phase kein Fettgewebe bildeten (Fischbach et al., 2004; Weiser et al., 2008). Weiterhin zeigten Weiser et al., dass eine langfristig angelegte Vorkultur von 35 Tagen zur Ausdifferenzierung der eingebrachten Zellen mit histologischer Ähnlichkeit zu nativem Fettgewebe führt. Aufgrund der geringen Hypoxietoleranz endständig differenzierter Adipozyten unterliegen diese Konstrukte mit langer Vorkulturperiode ähnlichen Einschränkungen wie freie Fettgrafts: Bereits vier Wochen nach Implantation zeigen sich nekrotische Veränderungen, da sich die Vaskularisierung eben jener Konstrukte unzureichend zeigte. Eine Vorkulturdauer von zwei bis neun Tagen zeigte sich für die 3T3-L1-Präadipozyten als ausreichend, um in-vivo zufriedenstellende Ergebnisse zu erreichen (Weiser et al., 2008).

Hierbei muss man jedoch anmerken, dass, wie der Name bereit suggeriert, die verwendeten Zellen, anders als frisch isolierte ASC, bereits in Richtung der adipogenen Zelllinie differenziert sind. Für die Versuche mit SVF und ASC zeigten sich Vorkulturperioden von bis zu sieben Tagen als praktikabel und vielversprechend (Storck et al., 2017; Weiser et al., 2008; Wittmann et al., 2015; Wittmann et al., 2016).

1.2.3 Trägermaterialien und Applikationsart

1.2.3.1 Trägermaterialien und deren Eigenschaften

Die Körperverträglichkeit der Grundstoffe sowie deren Form- und Volumenstabilität ist ein wichtiger Anspruch an Materialien im Tissue-Engineering. Im Falle der Verwendung von bioabbaubaren Stoffen sollte die Dauer der Desintegration optimalerweise ähnliche Kinetik wie die Bildung von nachhaltigem, zusammenhängenden Gewebe aufweisen. Weitere spezifische Voraussetzungen der Trägermaterialien sind Poren zur Aufnahme der eingebrachten Zellen, welche einerseits groß genug für die wachsenden Adipozyten sein sollten ($> 100 \mu\text{m}$) und andererseits Vaskularisierung durch Interkonnektivität der Poren ermöglichen sollten (Bauer-Kreisel et al., 2010). Letzteres zeigten Marino et al. mittels Zellträgern aus Polycaprolactone (PCL) (Marino et al., 2012).

Die Verwendung von nicht-bioabbaubaren Trägermaterialien, wie z. B. formstabilen, mit Matrigel und „basic-fibroblast-growth-factor“ (bFGF) gefüllten Silikongewölben konnte die einwachsenden, sehr fragilen Adipozyten vor mechanischer Belastung bewahren (Walton et al., 2004). Allerdings birgt das Einbringen nicht-bioabbaubarer Materialien Risiken wie allergische Reaktionen und Kapselkontraktionen (eine Verhärtung der das Transplantat umgebenden Membran) (Bauer-Kreisel et al., 2010; C. W. Patrick, Jr., 2001). Trotz dieser Komplikationen ließen sich verträgliche Materialien finden, was Zhan et al. auflisten (Zhan et al., 2016): Darunter unter anderem Typ-1-Kollagenschwämme (Chan et al., 2016), injizierbare Konstrukte auf Seiden- (Bellas et al., 2015) sowie „polyglycolic-/polylactic-acid“ (PGA/PLA)-Basis (Deng et al., 2015).

Weiser et al. verwendeten in ihrem bereits vorgestellten Versuch mit 3T3-L1-Zellen körperverträgliche, bioabbaubare Konstrukte aus Polyglykolsäure, welche unter anderem zur Herstellung von resorbierbarem Nahtmaterial verwendet wird. Dieses Material zeigte positive Ergebnisse hinsichtlich der Unterstützung von Adipo- und Angiogenese, allerdings schrumpften die Gesamtkonstrukte (Weiser et al., 2008). Für klinische Anwendung ist dies inakzeptabel, da die Volumenstabilität ein Alleinstellungsmerkmal des Tissue-Engineering

gegenüber chirurgischen Techniken sein sollte (vgl. Punkt 1.1). Volumenstabilität konnten Wittmann et al. mit einem Poly(ϵ -caprolacton)-basierendem Polyurethan-Schwamm (PU) demonstrieren. Mit einem Abbauezeitraum von 1–1,5 Jahren eignet sich dieses Material als Unterstützungsstruktur bis stabiles, körpereigenes Gewebe entstanden ist. Mit einer Porengröße von $438 \pm 73 \mu\text{m}$ haben die eingebrachten Zellen Platz und werden während der Differenzierung vor mechanischer Kompromittierung geschützt. Zudem bilden die Verbindungen von $152 \pm 28 \mu\text{m}$ ideale Voraussetzungen für die Entstehung eines kapillären Netzwerks (Wittmann et al., 2016). Aufgrund dessen werden eben jene Träger auch in dieser Arbeit verwendet.

1.2.3.2 Fibrinformulierung

Die zur Volumenstabilisierung geeigneten PU-Schwämme werden zur optimalen Integration der Zellen in das Gesamtkonstrukt mit einem Fibrinringel versetzt. Eine von Wittmann et al. selbst hergestellte und zuvor bereits etablierte Fibrinformulierung, sogenanntes „stable fibrin“ (Eyrich et al., 2007), zeigte sich sowohl kurz- als auch mittelfristig (21 Tage) volumenstabil. Kommerziell erhältliches TissuCol[®] zeigt bei Anwendung ohne unterstützende Struktur einen Volumenverlust von bis zu 60 % (Wittmann et al., 2016).

Die verwendete Fibrinformulierung beeinflusst die im Gesamtkonstrukt enthaltenen Zellen unterschiedlich. Während die Kombination aus stabiler Fibrinformulierung mit Zellen der SVF sich gegenüber TissuCol[®] als unterlegen bezüglich des Einflusses auf Adipo- und Angiogenese auf zellulärer Ebene zeigte (Wittmann et al., 2015), konnten Storck et al. 2017 mittels einer Kombination aus stabiler Fibrinformulierung, PU-Schaum und ASC als Zellquelle hervorragende Volumenstabilität und zufriedenstellende Adipo- sowie Angiogenese demonstrieren (Storck et al., 2017). In Kombination mit zellfreundlichem, schnell abbaubaren TissuCol[®] lassen sich sowohl für ASC als auch für SVF als Zellquelle zufriedenstellende Ergebnisse bei kurzen Implantationszeiträumen erreichen (Torio-Padron et al., 2007; Wittmann et al., 2015). Auch in dieser Arbeit wird, auf Basis der bisherigen Ergebnisse, TissuCol[®] als Fibrinformulierung verwendet. Weitere Applikationsarten werden unter Punkt 1.2.5 „Beispiele experimenteller Ansätze“ vorgestellt.

1.2.4 Angiogenese und chirurgische Vaskularisierung

Das Zusammenspiel von Stammzellen, Adipozyten und Endothelzellen ist eine natürliche Eigenschaft von nativem Fettgewebe (Huber et al., 2015; Volz et al., 2016). Eine vaskuläre Struktur im Konstrukt zu etablieren ist essenziell, da die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung

eines großvolumigen Konstrukts und den darin enthaltenen Zellen garantiert werden muss. Dies ist wiederum die Basis für nachhaltige Vitalität und Volumenstabilität (Volz et al., 2017). Ansätze hierzu sind neben der angiogenetischen Kapazität der Zellen selbst (vgl. Punkt 1.2.1.1.1 und Punkt 1.2.1.2) das Konzept der Vaskularisierung durch Kapillarfragmente, sogenannte „adipose-tissue derived microvascular fragments“ (ad-MF), ein Zell- und Gewebekonglomerat, welches ähnlich isoliert wird wie SVF-Zellen, allerdings mit weitaus kürzerer enzymatischer Verdauung, was zum Erhalt von Gefäßstrukturen führt (Frueh et al., 2017b; Laschke et al., 2012). In-vivo setzen sich diese Fragmente wieder zusammen, bilden Verbindungen zum Gefäßsystem des Empfängers und initiieren die Bildung eines Lymphsystems (Frueh et al., 2017a). Allerdings befasste sich bis dato keine Studie mit dem Vergleich zwischen eben jenen ad-MF und ihrer „Schwesterfraktion“, der SVF. Eine weitere Verbesserung der Vaskularisierung sowie die Möglichkeit zur sekundären Transplantation eines Konstrukts und dessen Gefäßversorgung nach Vorbild der Lappenplastik mit geringerer iatrogenen Morbidität kann durch chirurgische Intervention erreicht werden: Cronin et al. verglichen Durchfluss- (flow-through) und ligierte Gefäßanschlüsse (ligated pedicle) für verschiedene, nicht-zellbesiedelte Trägermaterialien und zeigten bessere Ergebnisse hinsichtlich Gefäßdurchlässigkeit und Vaskularisierung in der Gruppe des Durchflussgefäßes (Cronin et al., 2004). Diverse Arbeitsgruppen bestätigten diese Ergebnisse und erzielten mit der Operationstechnik eines sog. „Arteriovenösen-Durchfluss-Gefäß“ (AV-flow through bundle) verlässliche, profunde und reproduzierbare Vaskularisierung (Burghartz et al., 2015; Freiman et al., 2018; Storck et al., 2017; Wiggenhauser et al., 2012), welche die Möglichkeit einer sekundären Transplantation des Konstrukts und dessen Gefäßanschlusses im Empfängergewebe eröffnet.

1.2.5 Beispiele experimenteller Ansätze

1.2.5.1 Zellulose Herangehensweise

Essenzielle Unterschiede im Adipose-Tissue-Engineering bringt die Frage nach zellhaltigen oder zelllosen Strategien mit sich. Letztere sind im Bezug auf Zeit- und Kostenintensivität klar im Vorteil, da weder Zellgewinnung oder -vorbehandlung nötig ist, noch immunologische Probleme auftreten können (Wnek et al. 2008, zitiert nach Bauer-Kreisel et al. 2010, S. 800). Allerdings ist folglich eine Migration von körpereigenen Zellen in das implantierte Konstrukt nötig, sogenannte de-novo-Adipogenese (C. W. Patrick et al., 2008). Diese Rekrutierung von körpereigenen Zellen steht unter multifaktoriellen Einflüssen, was Form, Größe und

Ausdehnung des entstehenden Gewebes unzureichend kontrollierbar macht (Bauer-Kreisel et al., 2010). Beispiele für zellulose Ansätze listen Bauer-Kreisel et al. (Bauer-Kreisel et al., 2010) sowie Patrick et al. (C. W. Patrick et al., 2008) auf.

1.2.5.2 Zellhaltige Ansätze

Wie bereits erwähnt, konnten mit einer Kombination aus PU-Schwämmen, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet werden, und ASC in stabiler Fibrinformulierung vielversprechende Ergebnisse erzielt werden (Griessl et al., 2018; Storck et al., 2017; Wittmann et al., 2016). Unter adipogener Induktion entwickelten sich zusammenhängende, gut vaskularisierte Fettgewebsverbände. Bei zusätzlicher Exposition gegenüber einem fettreichen Mikromilieu zeigte sich eine weitere Verbesserung der adipogenen Kapazitäten (Storck et al., 2017; Wittmann et al., 2016).

Jedoch sind ASC, ihre Isolierung von der SVF und anschließende Kultivierung zeit-, personal-, und folglich kostenintensiv. Des Weiteren ist im Hinblick auf klinische Translation eine Applikation in einer einzigen, therapeutischen Sitzung schwer umzusetzen.

Autologe Transplantierbarkeit und einfache Gewinnung ohne zwingend notwendige Kultivierung sind klare Vorteile der SVF und ermöglichen eine kostengünstige Anwendung. In-vitro-Versuche zeigten eine vielversprechende Alternative zu ASC und die Differenzierung in sowohl Adipozyten als auch endotheliale Strukturen (Lin et al., 2011; Zimmerlin et al., 2013). Die ersten in-vivo-Versuche im Bereich des Adipose-Tissue-Engineering wurde von Stillaert et al. 2007 und Wittmann et al. 2015 durchgeführt: Das bereits erwähnte Matrigel® wurde mit exzidiertem Fettgewebe bzw. SVF angewandt, mittels Silikonkonstrukten implantiert und mit einem AV-Durchflussgefäß vaskularisiert (Stillaert et al., 2007). Wittmann et al. 2015 verwendeten gepoolte SVF-Zellen, welche in Fibrin eingebracht und in Glassringen geliert wurden. Das entstandene, zylinderförmige Konstrukt wurde einerseits in-vitro kultiviert sowie in einem Pilotversuch in athymische Mäuse implantiert und hinsichtlich Volumenstabilität, Adipo- und Angiogenese evaluiert. Verglichen wurden verschiedene Fibrinformulierungen (vgl. Punkt 1.2.3.2) sowie der Einfluss einer in-vitro-Vorkultivierung der Zell-Fibrin-Konstrukte (vgl. Punkt 1.2.2). Die Gruppe konnte zeigen, dass die heterogene Zellpopulation in der SVF eine mögliche alternative Zellfraktion im Adipose-Tissue-Engineering darstellt (Wittmann et al., 2015).

Übertragbarkeit vom Labor in das klinische Setting wird von van Dongen et al. unterstützt: Die Ergebnisse von zweizeitiger, laborbasierter Prozessierung mittels Kollagenase und

intraoperativer Isolation der SVF sind hinsichtlich Qualität und Quantität von Zellen vergleichbar. Jedoch ist ein intraoperatives Setting zeiteffektiver und somit für die klinische Anwendung besser geeignet (van Dongen et al., 2018). Des Weiteren gibt es automatisierte Systeme zur zügigen Gewinnung von SVF-Zellen, was die klinische Anwendbarkeit weiter vereinfacht (Aronowitz et al., 2016; Rodriguez et al., 2017).

1.3 Tiermodelle

Es ist üblich, Adipose-Tissue-Engineering am Kleintiermodell (Maus oder Ratte) durchzuführen (C. W. Patrick et al., 2008). Aufgrund der positiven, am ehesten Insulin-like-growth-factor-vermittelten Einflüsse von Östrogenen auf die Adipogenese, sowie gegenteiligen Effekten von Androgenen (Dieudonne et al., 2000), liegt die Verwendung weiblicher Tiermodelle nahe. Sofern Zellen anderer Spezies verwendet werden (xenogene Transplantation), werden immundepletierte Tierstämme verwendet. (C. W. Patrick et al., 2008).

Ein Beispiel hierfür sind Mäuse mit homozygoter Deletion des Foxn1-Gens (NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}-Mäuse; Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Dieses Gen ist ein essenzieller Faktor in der Thymusevolution und -funktion (Vaidya et al., 2016). Beim Menschen führt eine loss-of-function-Mutation eben jenes Gens neben fehlendem Haarwuchs und Nageldystrophie zu einer schweren Einschränkung des Immunsystems (severe combined immunodeficiency, SCID). Zugrunde liegend ist hierbei ein insuffizientes bzw. nicht vorhandenes T-Zell-Immunsystem sowie eine teilweise gestörte Entwicklung weiterer Teile des zellulären Immunsystems (B- und Natürliche-Killer-Zellen) (Rota et al., 2017; Tasher et al., 2012). Derartige und vergleichbare, athymische Mausmodelle wurden in ca. 35 % der Studien bis 2007 verwendet (C. W. Patrick et al., 2008)

1.4 Mediatoren- und Bausteinmodell

Uneinigkeit herrscht im Forschungsgebiet des Tissue-Engineering bezüglich der Herkunft des Gewebes, welches das Konstrukt zum Zeitpunkt der Analyse auskleidet.

Während in bisherigen Studien die Ausdifferenzierung von eingebrachten Vorläuferzellen, hauptsächlich ASC, zu zusammenhängenden Gewebeverbänden, das Hauptziel war, zeigten Storck et al., dass nach zwölfwöchiger Implantation von humanen ASC in PU-/stable-fibrin-Konstrukten die ursprünglichen Zellen durch murines Gewebe ersetzt wurden (Storck et al.,

2017). Bereits in einem vorher durchgeführten fünfwöchigen in-vivo-Pilotprojekt mit chirurgischer Vaskularisierung zeigten sich rein murine Zellverbände (Wittmann et al., 2016).

Ähnliches beobachteten Stillaert et al. in der bereits vorgestellten Studie mit Matrigel®: Dass in SVF-haltigen Konstrukten nach sechswöchiger in-vivo-Phase der Hauptanteil der entstandenen Adipozyten murinen Ursprungs sind. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass bei in-vivo-Implantation die eingebrachten Zellen nicht als Vorläuferzellen, vielmehr jedoch als Induktoren und Mediatoren der Adipogenese fungieren und Letztere von Zellen des Transplantatempfängers ausgeht (Stillaert et al., 2007).

Somit sind zwei, sich zum Teil überlappende Theorien möglich: Einerseits die Entwicklung der eingebrachten Vorläuferzellen zu ausdifferenzierten Gewebeverbänden, im Sinne eines Bausteinprinzips. Andererseits die mediatorengetriggerte Einwanderung und anschließende Differenzierung von Zellen des Transplantatempfängers (Bauer-Kreisel et al., 2010; Gimble et al., 2007; Tsuji et al., 2009; Volz et al., 2016).

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Die Konsequenzen aus den Ergebnissen von Wittmann et al. (Wittmann et al., 2015) sind, einer weiteren Zellfraktion Beachtung zu schenken und diese mit den „klassisch“ verwendeten ASC am Tiermodell zu vergleichen. Diese Arbeit widmet sich somit der Übertragung bisherigen Wissens der Forschung mit ASC hinsichtlich Vorkultivierung und deren Dauer, Applikationsart mit eventuellen Trägermaterialien, Implantationstechnik und -ort sowie chirurgischer Vaskularisierung auf eine neue Zellfraktion. In Einklang mit den bisherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe um Katharina Storck-Hauber (Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik, Technische Universität München) und Thorsten Blunk (Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische-, und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Würzburg) (Griessler et al., 2018; Storck et al., 2017; Wittmann et al., 2015; Wittmann et al., 2016) werden in dieser Arbeit ASC- bzw. SVF-basierende, vorkultivierte und nicht-vorkultivierte, gleichermaßen vaskularisierte Konstrukte aus PU-Schwämmen und TissuCol®-Fibrinformulierung verglichen.

Wie bereits erwähnt, enthält die Zellfraktion der SVF neben ASC auch endotheliale Zellen und Makrophagen (Bourin et al., 2013). Ob diese Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung mit größerem adipo- und angiogenetischem Potential in-vivo einhergehen, soll in dieser Arbeit erneut thematisiert werden. Weiterhin soll der Einfluss einer adaptierten, pro-adipo- und angiogenetischen Vorkultur in Kombination mit adipogener Induktion auf die Gewebsentstehung, insbesondere im Hinblick auf jüngere Arbeiten, welche das Bausteinmodell in Frage stellen und mediatorenbasierte Theorien in den Vordergrund stellen, evaluiert werden (Griessler et al., 2018; Storck et al., 2017).

Die SVF als Zellfraktion hat den Vorteil, auf zeit- und kostenintensive Passagierung verzichten zu können, was deren Translation zur klinischen Anwendbarkeit als autologes Material greifbar macht. Dies wurde von Saxer et al. im Falle von proximalen Humerusfrakturen im Tissue-Engineering von Knochen bereits erfolgreich demonstriert (Saxer et al., 2016). Letztendliches Ziel ist die Generierung eines präfabrizierten Lappens, was bisher im Bereich der Plastischen Chirurgie Anwendung findet:

„Bei der Präfabrikation wird ein neuer Gefäßstiel in den zu transplantierenden Lappen eingebracht, z. B. ein AV-Loop oder ein Gefäßstiel, sodass die Lappenplastik nach einer Phase der Neovaskularisation der hinzugefügten Gefäße mit diesen als Hauptversorgung transplantiert werden kann.“ (Vogt P. M., 2011, S. 94)

2 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden Versuchsaufbau und Durchführung sowie die Auswertung der Tierversuche dargelegt. Des Weiteren werden alle verwendeten Materialien aufgeführt.

2.1 Herstellung der Komposit-Konstrukte in-vitro

Die Herstellung der Konstrukte, inklusive Zellgewinnung, wurde von der Arbeitsgruppe unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Torsten Blunk am Universitätsklinikum Würzburg übernommen.

2.1.1 Vorbereitung der Konstruktkomponenten

Die implantierten Konstrukte bestehen aus einem auf Poly-(ϵ -caprolacton)-basierendem Polyurethan-Schwamm (PU), der als Trägermaterial zur Inokulierung der im Folgenden aufgeführten Zellfraktionen in Verbindung mit definierten Fibrin Formulierung dient. Alle beschriebenen Arbeiten wurden an einer Reinraumwerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

2.1.1.1 Zellgewinnung

2.1.1.1.1 Herstellung der Stroma-Vaskulären-Fraktion (SVF) aus dem subkutanen Fettgewebe

Die Fettgewinnung zur Herstellung der Stroma-Vaskulären-Fraktion (SVF) fand mittels Liposuktion abdomineller, subkutaner Fettdepots statt. Die Proben wurden von drei gesunden, weiblichen Probanden im Alter von 30–56 Jahren mit einem BMI von 27-32 kg/m² gewonnen. Von allen Patientinnen wurde eine schriftliche Einverständniserklärung unterschrieben. Die Studiendurchführung wurde vom Ethikkommission der Universität Würzburg, Deutschland bewilligt (AZ: 55.2-1-54-2532-130-11). Bei der Herstellung der SVF wurde nach bereits etablierten und von der eigenen Arbeitsgruppe bereits angewendeten Protokollen vorgegangen (Wittmann et al., 2015).

Das gewonnene Material wurde zerkleinert, im Verhältnis 1:1 mit 0.1 % Kollagenase NB4 des *Clostridium histolyticum* und Kollagenase Puffer (Hepes 0.1 M, NaCl 0.12 M, KCl 0.05 M, CaCl₂ 0.001 M, Glukose 0.005 M, 1.5 % Bovinem Serum Albumin (BSA); 100 mL pro 100g Gewebe) in 50ml Polypropylen Zentrifugenröhrchen gegeben und für zwei Stunden bei 37°C in einem Horizontalschüttler verdaut. Zum Stoppen der Verdaureaktion wurde das Gemisch im

Verhältnis 1:1 mit einem Basalmedium, bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 (DMEM/F12;), 1 % Penicillin-Streptomycin (100 U/mL Penicillin, 0.1 mg/mL Streptomycin) sowie 10 % fetal-bovine-serum (FBS) gemischt und zentrifugiert (10 Minuten, 300 g). Nach Absaugen des Überstandes wurde das verbliebene Zellpellet mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) resuspendiert und Gewebereste mittels Filtration durch einen Zellsieb (cellstrainer) mit 100 µm Porengröße entfernt. Anschließend erfolgte zweimalige Zentrifugation (300 g, 10 min) sowie Waschung des Zellkonglomerats in PBS. Die nach Absaugen des Überstandes gewonnene SVF wurde in 1 ml Basalmedium aufgenommen. Hierzu wurden 5 % DMSO zugefügt. Danach wurde die Zellsuspension bis zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

2.1.1.1.2 Isolation der ASC

Die Fettgewinnung zur Herstellung der ASC fand mittels Liposuktion abdomineller, subkutaner Fettdepots statt. Die Proben wurden von drei gesunden, weiblichen Probanden im Alter von 42–56 Jahren mit einem BMI von 26-37 kg/m² gewonnen. Von allen Patientinnen wurde eine schriftliche Einverständniserklärung unterschrieben. Bei der Isolation der ASC wurde nach bereits etablierten und von der eigenen Arbeitsgruppe bereits angewendeten Protokollen vorgegangen (Storck et al., 2017; Wittmann et al., 2016).

Aus dem Liposuktionsprodukt wurde nach obigem Protokoll SVF gewonnen und bis zur weiteren Verarbeitung kryokonserviert. Nach dem Auftauen der Zellfraktion in Basalmedium wurde diese in Kulturflaschen aus Plastik gegeben. Nach 18 bis 24 Stunden Kultivierung bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgte die Selektion der ASC durch deren Plastikadhärenz an den Kulturflaschenwänden. Die nicht adhärenzte Fraktion, inklusive kontaminierenden Erythrozyten, wurde entfernt und frisches Medium zugegeben. Die Zellen wurden alle zwei Tage mit frischem Medium versorgt. Nach Erreichen einer Zelldichte von mindestens 75 % wurden die Zellen passagiert. Hierbei wird die Primärkultur als P0 und jede weitere Passage als P1 bzw. P2 bezeichnet. Zuerst wurde das Medium abgesaugt und die Kulturflaschen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte, nach Entfernen des PBS, die Zugabe von 1 ml 0.25 % Trypsin-EDTA zum Ablösen der Zellen, welche nach fünfminütiger Inkubation (bei 37°C und 5 % CO₂) durch Klopfen abgelöst, resuspendiert und abzentrifugiert (5 min, 300 g) wurden. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert und die Anzahl an vitalen Zellen mit Hilfe der Trypanblauexklusionmethode und einer Neubauer Zählkammer quantifiziert. Avitale Zellen charakterisieren sich durch eine starke Blaufärbung, während

lebende Zellen keinen Farbstoff aufnehmen. Hierzu wurde ein Verhältnis von 1:1 zwischen Trypanblau-Lösung (0,4 %) und Zellsuspension verwendet. Zur weiteren Expansion der Zellen wurden diese in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/Kulturflasche ausgelegt und erneut inkubiert. Nach zwei Passagen in Kultur wurden die Zellen dann für die weitere Versuchsanordnung verwendet.

2.1.1.2 Herstellung der Poly-(ϵ -caprolactone)-basierenden Polyurethan-Schwämme (PU)

Die Poly-(ϵ -caprolactone)-basierenden Polyurethan-Schwämme (PU) wurden nach bereits publiziertem und patentiertem Protokoll von der Firma Polymaterials AG (Kaufbeuren, Deutschland) gefertigt (Wiese et al., 2005).

Zusammenfassend werden beim Fertigungsprozess folgende Komponenten, alle entweder von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) oder der Firma Acros Organics (Geel, Belgium) hergestellt, gemischt und auf 40°C erhitzt: Polycaprolaktondioldiol (28.3 wt%), Isophorondiisocyanat (28.6 wt%), Polyethylenglycol (19.5 wt%), Polycaprolactontriol (17.0 wt%), Polytetramethylenglycol (5.7 wt%), destilliertes Wasser (0.2 wt%), Polyethylenglycol-block-Polypropylenglycol-block-Polyethylenglycol (Pluronic P-123, 0.1 wt%). Nach Abkühlen der Lösung auf 35°C wird in Dimethoxymethan gelöstes Diazabicycloundecen (0.6 wt%) zugegeben, wodurch es aufgrund von Gasfreisetzung zur Porenbildung kommt. Verfestigung des entstandenen Schaums wird durch Einwirkung von 50°C für drei Stunden erreicht. Nach Erreichen der gewünschten Festigkeit wurden alle Rückstände mit kochendem Wasser entfernt und die Konstrukte bei 10^{-2} mbar getrocknet. Dieses Material wurde in vorangegangenen Studien bereit in Tierversuchen verwendet. Hierbei wurde ebenfalls Porengröße ($438 \pm 73 \mu\text{m}$; lt. Wittmann 2013) sowie deren Interkonnektivität ($152 \pm 28 \mu\text{m}$; lt. Wittmann 2013) bestimmt (Storck et al., 2017; Wiggenhauser et al., 2012; Wittmann et al., 2015; Wittmann et al., 2016). Die gelieferten PU-Schaum Blöcke wurden auf handliche Größen zugeschnitten und mittels flüssigen Stickstoffs gefroren. Daraufhin wurden mit Hilfe einer sterilen Biopsiestanze zylindrische Scheiben mit zwei Millimeter Höhe und fünf Millimeter Durchmesser gewonnen. Durch Autoklavieren wurden die vorher mit PBS gewaschenen PU-Schwämmchen sterilisiert.

2.1.2 Herstellung der Konstrukte

2.1.2.1 Unterscheidung der Konstruktarten

Das Studiendesign beinhaltete induzierte, vorkultivierte und nicht-vorkultivierte Konstrukte. Somit wurde die Hälfte der Implantate für sieben Tage adipogen induziert. Die genaue Gruppeneinteilung und ein zugehöriges Schaubild befinden sich unter Punkt 2.3.2.

2.1.2.2 Besiedeln der Konstrukte mit Zellen

Bei der Besiedelung der Konstrukte wurde nach bereits etablierten und von der eigenen Arbeitsgruppe bereits angewendeten Protokollen vorgegangen (Storck et al., 2017; Wittmann et al., 2015).

Vor dem Besiedeln der Konstrukte wurde die kryokonservierte SVF-Zellfraktion aufgetaut und in 37°C warmen PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert und mit Erythrozyten-Lyse-Puffer (0.115 M NH₄Cl, 0.013M Na₂CO₃, 0.001 M EDTA, pH 7.4) versetzt, welcher nach zehn Minuten mittels Zentrifugation entfernt wurde. ASC wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Die gewonnenen Zellen der jeweiligen Zellfraktion wurden ausgezählt und anschließend gepoolt. Um eine Auszählung der Zellen zu ermöglichen, wurden die Zellen erst mit PBS gewaschen und dann mit 0,4 % Trypanblau gefärbt. Das Verhältnis von Zellmaterial und Puffer zu Trypanblaulösung war 1:1. Zur Auszählung der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet, dabei konnte man tote Zellen, die sich nach Aufnahme des Trypanblaus durch eine intensive blaue Färbung auszeichnen, von lebenden, ungefärbten Zellen deutlich unterscheiden. Gezählt wurden nur die ungefärbten Zellen. Eine Zelldichte von 8×10^5 Zellen pro Konstrukt wurde verwendet. Zur Herstellung der Kompositkonstrukte wurden die Zellen in 20 µl des Thrombinanteils der TissuCol®-Kits suspendiert und anschließend mit 20 µl des Fibrinogen-Anteils vermischt. Daraufhin folgte die Besiedelung der PU-Konstrukte mit dem Fibrin / Zellgemisch in Zwölf-Well-Platten (Innendurchmesser 5 mm) mittels Pipetten. Die Konstrukte wurden auf einem Horizontalschüttler (50 rpm, 37°C, 5 % CO₂) positioniert und die vollständige Polymerisation des Fibrinhydrogels abgewartet. Im Anschluss wurden die Konstrukte, je nach Gruppe, vorkultiviert oder, nach einer kurzen, transportbedingten Lagerung in Basalmedium direkt implantiert.

2.2 Vorkultivierung der Kompositkonstrukte

Bei der Vorkultivierung der präfabrizierten Konstrukte wurde nach bereits etablierten und von der eigenen Arbeitsgruppe bereits angewendeten Protokollen vorgegangen (Storck et al., 2017; Wittmann et al., 2015).

Wie bereits erwähnt, wurden jeweils die Hälfte der Konstrukte, entweder direkt implantiert oder vorkultiviert. Für die Präkultivierung wurde preadipocyte-growth-medium-2 (PGM-2; It. Hersteller bestehend aus preadipocyte-basal-medium-2 (PBM-2), 10 % fetal-bovine-serum (FBS) und 1 % penicillin-streptomycin) und endothelial-cell-growth-medium-2 (EGM-2; It. Hersteller bestehend aus endothelial-cell-basal-medium-2 (EBM-2), human-epidermal-growth-factor (hEGF), 5 % fetal-bovine-serum (FBS), Gentamycin/Amphotericin-B, insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1), vascular-endothelial-growth-factor (VEGF), Ascorbinsäure (AA), Hydrocortison (HC) and fibroblast-growth-factor-2 (FGF-2)) verwendet. Die beiden Komponenten wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Die in-vitro-Präkultivierung fand auf einem Horizontalschüttler unter dynamischen Bedingungen statt (37°C, 5 % CO₂). Des Weiteren wurden zu dem Präkultivierungsmedium aus PGM-2 und EGM-2 folgende adipogene Induktoren hinzugefügt: 1,7 µM Insulin (bovines Insulin), 1 µM Dexamethason, 500 µM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) und 200 µM Indomethazin. Die Kultivierung erfolgte für sieben Tage, das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

2.3 Implantation der Konstrukte

2.3.1 In-vivo-Implantation in die Maus

Der Antrag AZ: 55.2-1-54-2532-130-11 zur Durchführung des Tierversuchs wurde von der Regierung von Oberbayern bewilligt.

2.3.1.1 Verwendete Tiere

Als Tiermodell wurden athymische, weibliche Nacktmäuse mit einer homozygoten Deletion des Foxn1-Gens (NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}-Mäuse; Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die 30 verwendeten Mäuse waren zum Implantationszeitpunkt zwischen sechs und acht Wochen alt und wurden artgerecht unter sterilen Bedingungen in den Mäusräumen des Zentrums für Präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums Rechts der Isar gehalten. Selbiges Tiermodell wurde bereits vielfach verwendet (Storck et al., 2017; Weiser et al., 2008; Wittmann et al., 2015; Wittmann et al., 2016)

2.3.1.2 Identifikation der Mäuse

Die Versuchstiere wurden gruppenabhängig in separaten Käfigen gehalten und konnten an Hand ihrer Ohrmarkierung identifiziert werden. Diese wurden nach gängigem Schema, dem "universal mouse numbering system" (Jackson Laboratory et al., 1966) durchgeführt.

2.3.2 Gruppeneinteilung

Jede Gruppe enthielt fünf Versuchstiere. Jedes implantierte Konstrukt bestand aus PU-Schwämmen, welche mit den jeweiligen Zellen und TissueCol® Fibrinhydrogel beimpft wurden. Folgende Gruppeneinteilung bestand (siehe Abbildung 2):

Die implantierten Konstrukte der Gruppe 1 und 3 wurden mit ASC beimpft. Gruppe 1 wurde sofort implantiert. Gruppe 3 wurde nach oben genanntem Schema sieben Tage vorkultiviert. Die implantierten Konstrukte der Gruppe 2 und 4 wurden mit SVF beimpft wurden. Gruppe 2 wurde sofort implantiert. Gruppe 4 wurde nach oben genanntem Schema sieben Tage vorkultiviert.

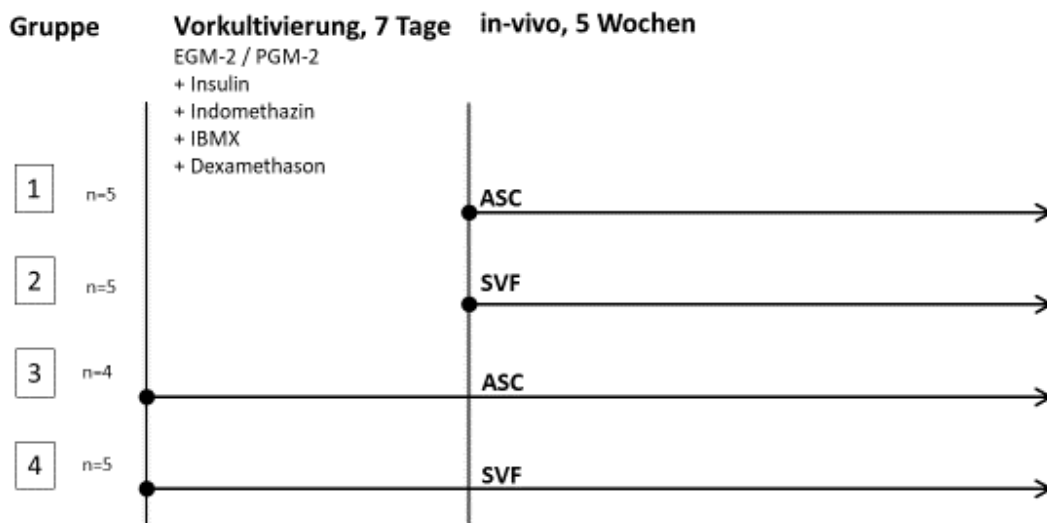


Abbildung 2: Übersicht Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau

Gruppe 1: Anzahl der Versuchstiere n=5, Verwendung von adipose-derived stromal and stem cells (ASC) ohne Vorkultivierung mit direkter Implantation nach Herstellung der Konstrukte, Explantation nach fünf Wochen in-vivo. **Gruppe 2:** Anzahl der Versuchstiere n=5, Verwendung von Stroma-Vaskuläre-Fraktion (SVF) ohne Vorkultivierung mit direkter Implantation nach Herstellung der Konstrukte, Explantation nach fünf Wochen in-vivo. **Gruppe 3:** Anzahl der Versuchstiere n=4, Verwendung von adipose-derived stromal and stem cells (ASC) mit siebentägiger Vorkultivierung mit pro-adipogenen und pro-angiogenen Induktionsmedien sowie nachfolgender Implantation, Explantation nach fünf Wochen in-vivo. **Gruppe 4:** Anzahl der Versuchstiere n=5, Verwendung von Stroma-Vaskulären-Fraktion (SVF) mit siebentägiger Vorkultivierung mit pro-adipogenen und pro-angiogenen Induktionsmedien sowie nachfolgender Implantation, Explantation nach fünf Wochen in-vivo (Griessler et al., 2018, Seite 2, Abbildung 1).

2.3.3 Mikrochirurgische Implantation

Bei der im Folgenden beschriebenen mikrochirurgischen Implantation der Konstrukte wurde nach modifizierten Protokollen der eigenen Arbeitsgruppe vorgegangen. (Burghartz et al., 2015; Stillaert et al., 2007; Wiggenhauser et al., 2012)

2.3.3.1 Vorbereitung und verwendetes Operationsmaterial

Vor Beginn der Operation erhielten die Mäuse zur Infektionsprophylaxe 0,02 ml Baytril und zur Analgesie einen Tropfen Metacam (Dosis 0,2 mg/kg Körpergewicht). Durch die anschließende intraperitoneale Injektion von Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (im Verhältnis 0,5/5/0,05 µg/g Körpergewicht) wurden die Tiere anästhesiert. Die Augen der Mäuse wurden mit Bepanthen-Augensalbe vor Austrocknung geschützt. Nach Setzen eines Schmerzreizes zur Überprüfung der Narkosetiefe wurde das Tier auf einer steril abgedeckten Wärmeplatte in Rückenlage positioniert. Die Beine wurden mit Leukostrip fixiert um eine optimale Operationssituation zu gewährleisten. Die Operation wurde mit Hilfe eines Operationsmikroskops (OPMI-1F, Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt.

2.3.3.2 Implantation

Das Operationsgebiet wurde desinfiziert und die Inguinofemoralregion, ventral der Arteria und Vena femoralis mit einer Mikrochirurgieschere mit einer ca. sieben Millimeter großen Inzision eröffnet. Es folgte die stumpfe Präparation und Freilegung des zwischen Hiatus adductorius und Leistenband verlaufende Gefäß-Nervenbündel. Um weder Motorik noch Sensibilität der Mäuse einzuschränken, wurde der Nerv vom Gefäßbündel freipräpariert, mobilisiert und vom Gefäßbündel separiert. Das Konstrukt wurde aus den Zwölf-Well-Platten genommen und seitlich „sandwichartig“ inzidiert. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass das Konstrukt möglichst wenig mechanisch kompromittiert wird. Durch vorsichtiges Anheben des Gefäßbündels wurde dieses in das aufgeschnittene Konstrukt gelegt. Daraufhin wurde das Operationsgebiet mit nicht-resorbierbaren Fäden (Größe 6) mit Einzelknopfnähten verschlossen. Zur Antagonisierung der Narkotika wurde den Mäusen Atipamezol, Flumazenil und Naloxon (AFN im Verhältnis 2,5/0,5/1,2 µg/gKG) injiziert.

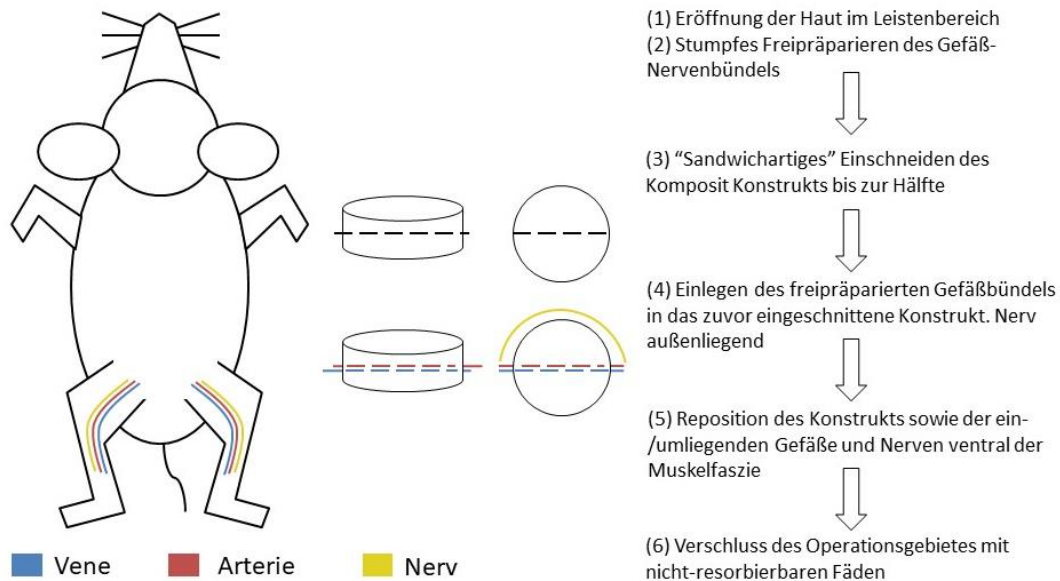


Abbildung 3: Schemazeichnung der Operationstechnik

Maus in Rückenlage, Ansicht der Maus von ventral. Schematische Darstellung des Gefäß-Nervenbündels unterhalb des Ligamentum inguinale. Operationsschritte (1) – (6).

2.3.4 Nachsorge

Die Konstrukte wurden fünf Wochen in-vivo belassen. Während der ersten postoperativen Tage erfolgten tägliche Naht- und Wundkontrollen sowie die Gabe von Metacam (Dosis s.O.) verabreicht. Anschließend erfolgte die Kontrolle der Vitalität der Mäuse in regelmäßigen Abständen.

2.4 Explantation

Nach fünf Wochen in-vivo wurden die Konstrukte explantiert. Hierzu wurde die Mäuse nach bereits genannten Protokoll analgisiert und anästhesiert. Es erfolgte die Explantation der Konstrukte aus der Leistenregion. Hierzu wurde die Leistenregion inzidiert und die Konstrukte mittels stumpfer Präparation lokalisiert. Teilweise Verwachsungen der Konstrukte mit Haut bzw. Bindegewebe erschwerten die Mobilisation. Vor Explantation der Konstrukte wurde deren Gefäßanschluss auf Intaktheit überprüft. Wichtig war hierbei die Kontrolle eines bestehenden Blutflusses durch die Gefäße. Die noch analgisierten und anästhesierten Mäuse wurden durch Genickbruch exekutiert.

2.5 Histologische Aufarbeitung

Jedes der 20 Konstrukte wurde nach gleichem Schema aufgearbeitet.

2.5.1 Fixierung, Paraffineinbettung und Vorbereitung zur Färbung

Die gewonnenen PU-Schwämme wurden sofort in 4 % gepufferte Formaldehydlösung gegeben und darin für mindestens zwölf Stunden fixiert. Durch Anwendung einer aufsteigend konzentrierten Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert. Dies erfolgte mit Hilfe eines automatischen Tissue-Processors. Die anschließende Einbettung in Paraffin erfolgte per Hand. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die runde Fläche der zylindrischen Konstrukte parallel zur künftigen Schnittfläche des Paraffinblocks liegt. Nach Schneiden des gesamten Blockes mit einem Histiotom in 7 µm dicke Scheiben wurden diese in ein 45°C warmes Wasserbad gegeben und anschließend auf Objektträger gezogen. Nach Trocknung der Schnitte im Ofen waren diese zum Färben vorbereitet. Bei der Prozessierung wurde ein Konstrukt der Gruppe 3 durch den Tissue-Processor zerstört. Hiervon liegen keine histologischen Schnitte vor.

2.5.2 Auswahl der Schnitte für die Färbung

Da die Konstrukte komplett geschnitten wurden, konnte der Mittelbereich des Konstrukts bestimmt werden, indem die Zahl der Schnitte ermittelt und halbiert wurde. Die Schnitte um den Bereich dieses Mittelschnitts wurden gefärbt (siehe Abbildung 2–4).

2.5.3 Trichrom Färbung nach Ladewig

Die Trichrom Färbung nach Ladwig stellt Zellkerne dunkelbraun bis dunkelgrau, Bindegewebe blauviolett und Erythrozyten hellrot-orange dar. Muskulatur färbt sich braunrot. Folgendes, leicht modifiziertes Protokoll wurde verwendet (Romeis et al., 2010):

Tabelle 3: Protokoll Trichrom Färbung nach Ladewig

Schritt	Zeit und Reagenz	
Entparaffinierung	2 x 5 Min.	Xylol
Bewässern der Schnitte mittels absteigender Alkoholreihe	2 x 2 Min.	reines Isopropanol
	2 x 2 Min.	96 % Ethanol
	2 x 2 Min.	70 % Ethanol
	spülen	Aqua destillata
Färbung	5 Min.	Eisenhämatoxylin nach Weigert (Verhältnis 1:1 von Weigert'scher Lösung I
Spülen	3 Min.	Leitungswasser (ca. 37°C)
Beizen	1 Min.	1 % Phosphorwolframsäure (1g in 100 ml)
Spülen	Aqua destillata ca. 37°C	
Färbung	5 Min.	Trichrom nach Ladewig
Spülen	Aqua destillata	

Aufsteigende Alkoholreihe	2 x 5 Sek.	70 % Ethanol
	2 x 5 Sek.	96 % Ethanol
	5 Sek.	reines Isopropanol
	2 Min.	reines Isopropanol
	2 x 5 Min.	Xylol
Eindeckeln mittels Deckgläsern		

2.5.4 Vimentin-Antikörper Färbung

Für die Evaluation des Ursprungs des Gewebes (murin oder human) wurden von jedem Konstrukt exemplarisch Färbungen mit anti-human-Vimentin durchgeführt. Hierbei wurde bei den bereits deparaffinierten Proben wie folgt vorgegangen:

Tabelle 4: Vimentin-Antikörperfärbung

Schritt	Zeit und Reagenz	
Waschen	3 x 2 Min.	Aqua destillata
Enzymdigestion zur Exposition der Antigene	Inkubation 10 Min., Raumtemperatur	Enzymlösung (Digest-all™3)
Waschen	3 x 2 Min.	PBS
Blocken von freien Antigenen	Inkubation 30 Min., Raumtemperatur	mouse-serum M5905
Waschen	2 Min.	Waschpuffer*
Applikation des Antikörper	Inkubation über Nacht bei 4°C	rabbit anti-human Clone SP20, Konz. 1:200
Waschen	3 x 5 Min.	Waschpuffer*
Applikation des AP-Polymer	Inkubation 30 Min., Raumtemperatur	anti-rabbit AP-Polymer
Waschen	3 x 5 Min.	Waschpuffer*
Färben	10 Min.	Permanent AP Red
	Stoppen der Farbreaktion	Aqua destillata
	5 Min.	Hämatoxylin
Spülen	Leitungswasser	
Aufsteigende Alkoholreihe und Eindeckeln mittels Deckgläser siehe Tabelle 2-1		
*Der Waschpuffer wurde nach vorgegebenem Protokoll 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt		

2.7 Auszählung der histologischen Parameter

2.7.1 Vorbereitung für die Auszählung

2.7.1.1 Wahl des Schnitts für die Auswertung

Wie bereits oben erwähnt, wurden Schnitte aus dem Mittelbereich des Konstrukts gefärbt. Um einen Schnitt für die Auswertung auszuwählen wurden diese Schnitte unter dem Lichtmikroskop betrachtet und letztendlich einer ausgewählt, der sowohl annähernd runde Gesamtform, wenig Gewebeschrumpfung erfahren hatte und eine angeschnittene Arteria femoralis im Zentralbereich des Schnittes aufwies.

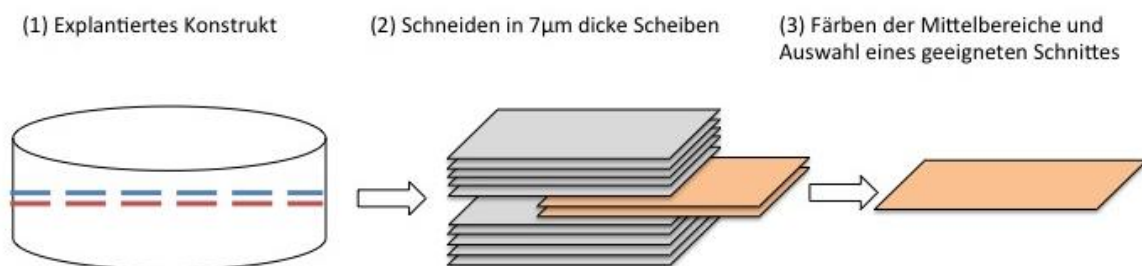


Abbildung 4: Wahl des Schnittes

Das explantierte, zylinderförmige Konstrukt mit innen liegendem Gefäßbündel (rot: Arterie, blau Vene) **(1)** wird nach Einbettung in Parafin histologisch prozessiert und in 7 µm dicke Scheiben geschnitten **(2)**. Nach Auszählung der Gesamtschnitte erfolgte die näherungsweise Ermittlung der Mitte des Konstrukts und die Färbung eben jener Parafinschnitte (orange Schnitte in **(2)**). Ausgewählt wurde ein Schnitt mit histologisch sichtbaren Gefäßen (Arteria und Vena femoralis) **(3)** (Modifiziert nach Griessl et al., 2018, Seite 3, Abbildung 2 D).

2.7.1.2 Digitalisierung

Die gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines Leica Durchlichtmikroskops digitalisiert. Hierzu wurden das Multi-Step Programm des Mikroskops verwendet um mehrere, das gesamte Konstrukt abdeckende Einzelbilder zu erstellen. Diese wurden in fünffacher Vergrößerung aufgenommen. Vor dem Export der Bilder wurde ein 1000 µm großer Maßstab in die rechte, untere Ecke der Bilder eingesetzt und eingebrannt.

Mit Hilfe der Automerge-Funktion von Adobe Photoshop CS5® wurden die erstellten Einzelbilder zusammengefügt und als ein hochauflösendes Mosaikbild abgespeichert.

2.7.2 Erhobene Parameter

2.7.2.1 Fläche und Bereichsdefinition (innen/außen)

Die bereits beim Digitalisieren eingefügte Messskala von 1000 µm konnte mit Hilfe des Analysetools von Adobe Photoshop CS5® als logische Einheit im Programm festgelegt werden.

Das Polygon-Lasso-Werkzeug wurde zur Abgrenzung des Konstruktes gegenüber mitexplantiertem Bindegewebe verwendet. Hierzu waren die Ränder des PU Schaums die wegweisenden Anhaltspunkte. Erneut wurde das Analysetool verwendet um die Gesamtfläche des Konstrukts in der Einheit Quadratmillimeter (mm^2) zu errechnen. Mit Hilfe des Transformationstools wurde der Mittelpunkt näherungsweise ermittelt um daraufhin einen Innenbereich von 3,2mm Durchmesser festzulegen.

2.7.2.2 Auszählung der Parameter

Das Zählwerkzeug von Adobe Photoshop CS5® wurde verwendet um gesondert für Innen- und Außenbereich sowohl Adipozyten als auch Blutgefäße auszuzählen.

2.7.3 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen sowie die zugehörigen Boxplots wurden mit Hilfe von SPSS Statistics 22® durchgeführt. Hierzu wurden nicht-parametrische Tests angewendet. Für die Analyse zweier unverbundener Stichproben wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Bei allen Tests wurde stets ein α -Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt, somit wurde das Risiko für einen Fehler erster Art, der fälschlichen Annahme der Alternativhypothese bei geltender Nullhypothese auf 5% eingedämmt.

Die Tests wurden sowohl für das Gesamtkonstrukt als auch separiert für Innen- und Außenbereich durchgeführt. Betrachtet wurden jeweils die Parameter pro Quadratmillimeter. Somit wurden folgende Parameter betrachtet:

- Fett/ mm^2 im Gesamtkonstrukt
- Fett/ mm^2 im Innenbereich
- Fett/ mm^2 im Außenbereich
- Gefäße/ mm^2 im Gesamtkonstrukt
- Gefäße/ mm^2 im Innenbereich
- Gefäße/ mm^2 im Außenbereich

2.8 Materialien

Im Folgenden findet sich eine tabellarische Darstellung aller verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien sowie die dazugehörigen Firmen und Hersteller.

2.8.1 Reagenzien

- Atipamezol (Firma Pfizer, Berlin, Deutschland)
- Basal Medium PGM2 (Firma Lonza, Walkersville, United States of America)
- Baytril (Firma Provet AG, Lyssach, Schweiz)
- Bovines Serum Albumin BSA (Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Dexamethason (Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Digest-all™ 3 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- DMSO (Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 DMEM/Ham's F-12 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Eisenhämatoxilin (Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Endothelial-cell-growth medium 2 (EGM™-2 SingleQuots™ Kit; Lonza, Walkersville, United States of America)
- Erythrozyten-Lyse Puffer (0.115 M NH₄Cl, 0.013M Na₂CO₃, 0.001 M EDTA, pH 7.4; Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Ethanol 70 % (Hauseigene Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)
- Ethanol 96 % (Hauseigene Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)
- Fentanyl (Firma Janssen-Cilag, Baar, Schweiz)
- Fetal-bovine-serum FBS (Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Flumazenil (Firma Hameln Pharma Plus, Hameln, Deutschland)
- Formalin 4 % (Eigenherstellung, 11ml 37 % Formalin, 100ml PBS)
- Hautdesinfektionsmittel Cutasept (Firma BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland)

-
- Indomethacin (Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
 - Insulin (bovines Insulin; PromoCell, Heidelberg, Deutschland)
 - 3-Isobutyl-1-Methylxanthin IBMX (Firma Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland)
 - Kollagenase NB4 (Firma Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland)
 - Kollagenase Puffer (Hepes 0.1 M, NaCl 0.12 M, KCl 0.05 M, CaCl₂ 0.001 M, Glukose 0.005 M, 1.5 % BSA; Hauseigene Apotheke Klinikum Würzburg)
 - Medetomidin (Firma Pfizer, Berlin, Deutschland)
 - Metacam (Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland)
 - Midazolam (Firma Ratiopharm, Ulm, Deutschland)
 - mouse-serum M5905 (Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
 - Naloxon (Firma Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland)
 - Paraffin (Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
 - Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
 - Permanent AP Red Kit (Zytomed-Systems, Berlin, Deutschland)
 - Phosphat-gepuffertem Kochsalzlösung PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
 - Phosphorwolframsäure (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)
 - Preadipocyte-growth-medium 2 PGM-2 (Lonza, Walkersville, United States of America)
 - rabbit anti-human Clone SP20 (Zytomed-Systems, Berlin, Deutschland)
 - Thrombinpuffer (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)
 - TissueCol[®]- Kit 1.0 Immuno (Baxter, Unterschleissheim, Germany)
 - Trasylol (Firma Bayer, Leverkusen, Deutschland)

- Trichrom-Lösung nach Ladewig (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)
- Trypanblau-Lösung 4 % (Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Xylol (Firma Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland)
- Waschpuffer (Firma Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)
- Zytochem Plus (AP) Polymer anti-rabbit (ZUC031-006; Zytomed-Systems, Berlin, Deutschland)

2.8.2 Verbrauchsmaterial

- Bepanthen Augensalbe (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)
- Biopsiestanze (Firma Stiefel Laboratories, Sligo, Ireland)
- Deckgläser (Firma Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)
- Einmalskalpell (Firma FEATHER Safety Razor Co Ltd., Osaka, Japan)
- Falcons PP-Test tubes, 50ml sterile (Firma Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
- Leukostrip (Firma Smith & Nephew GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Objektträger Thermo Scientific Superfrost plus (Firma Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)
- P25 Kulturflaschen Nunc Flasks Nunclon 25 cm² (Firma Nunc, Roskilde, Dänemark)
- P75 Kulturflaschen Tissue Culture Flask 75 cm² (Firma Sarstedt, Newton, United States of America)
- Petrischale 60x15mm (Firma Sarstedt, Newton, United States of America)
- Pipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml (Firma BD Falcon, Erembodegem, Belgien)

2.8.3 Werkzeuge und Geräte

- Autoclav (Firma LTF Labortechnik GmbH & Co. KG; Wasserburg, Deutschland)
- Lochzange (Firma Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)

- Magnetrührgerät (Firma IKA, Staufen, Deutschland)
- Mikrochirurgisches Besteck (Firma Braun, Melsungen, Deutschland)
- Leica Durchlichtmikroskop 600B inkl. Software DFC 425 C Applikation Suite 357 (Firma Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Mikrotom Hyrax (Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- OP-Mikroskops OPMI-1F (Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Paraffinofen (Firma Memmert, Schwabach, Deutschland)
- Pipettus Pipetboy (Firma Ibs Tecnomara, Fernwald, Deutschland)
- Präzisionswaage (Firma Scaltec, Göttingen, Deutschland)
- Schüttler (Firma GFL, Burgwedel, Deutschland)
- Tissue-Processor ASP 300 (Firma Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland)
- Wärmeplatte (Firma Labocom, Hofheim-Wallau, Deutschland)
- Wasserbad (Firma Histo Line Laboratories, Pantigliate, Italien)
- Zählkammer (Firma Hycor, Amstelveen, Niederlande)
- Zellsieb Cell Strainer 100 µm Nylon (Firma BD Falcon, Erembodegem, Belgien)
- Zentrifuge (Firma Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

2.8.4 Software

- Adobe Photoshop CS5® (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland)
- SPSS Statistics 22® (IBM, Armonk, United States of America)

3 Ergebnisse

Aufgrund des bereits erwähnten Prozessierungszwischenfalls liegen bei Gruppe 1 nur vier Schnitte vor. Bei allen anderen Gruppen liegen je fünf Schnitte vor. Die Gruppen werden im Folgenden hinsichtlich ihrer Morphologie beschrieben sowie histomorphometrisch quantifiziert. Hierfür wurde für jedes Konstrukt der gleiche histologische Schnitt verwendet. Die Nomenklatur der Konstruktbereiche ist folgende: Innenbereich (innerhalb des Kreises mit einem Durchmesser von 3,2 mm), Außenbereich (innerhalb des konstruktbegrenzenden Vielecks) und Umgebungsbereich (außerhalb des konstruktbegrenzenden Vielecks).

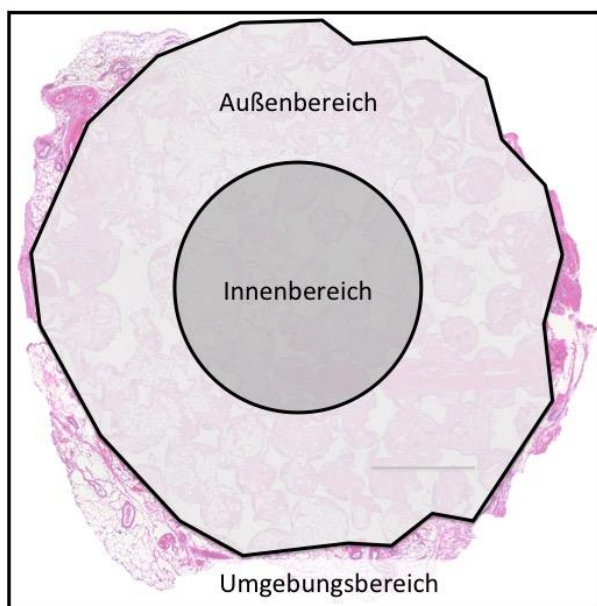


Abbildung 5: Konstruktbereiche

Histologischer Schnitt eines Konstrukts. Der Innenbereich wurde definiert als Kreis von ca. 3,2mm Durchmesser mit dem näherungsweise bestimmten Konstruktmittelpunkt als Kreismittelpunkt. Zur Definition des Außenbereich wurde ein Polygon um die Konstruktänder gelegt um diese von mitexplantiertem Bindegewebe zu differenzieren. Hierzu waren die histologisch identifizierbaren Ränder des PU-Schaums wegweisende Anhaltspunkte.

3.1 Morphologische und histologische Beschreibung

Makroskopisch stellten sich alle Konstrukte volumenstabil dar. Jedes Konstrukt enthält einen Anschnitt der Vasa femoralia und eine runde Komposition. Die Konstrukte jeder Gruppe zeigten in der histologischen Aufarbeitung Fettgewebsverbände sowie die zugehörigen kapillären Netzwerke. Unterschiede zeigten sich bezüglich des Umfangs der Adipo- und Angiogenese. Ebenso zeigte sich stets ein bindegewebiger Umbau sowie die Desintegration des PU-Trägermaterials. Bzgl. Letzterer konnte kein klarer Einflussfaktoren identifiziert

werden, da die Ausprägung der Desintegration des PU-Trägermaterials innerhalb der einzelnen Gruppen stark variierte.

Wichtige histologische Betrachtungsparameter waren: Ausmaß des bindegewebigen Umbaus, Adipo- und Angiogenese im Gesamtkonstrukt sowie im Innen- und Außenbereich, Fibrinmorphologie und Homogenität der Beobachtungen innerhalb der Gruppe.

Exemplarische Abbildungen und ausgewählte Vergrößerungen sind zur Visualisierung der Morphologie dargestellt.

3.1.1 Gruppe 1, ASC, ohne Vorkultivierung

Bei Betrachtung der Gesamtkonstrukte ist ein fundierter bindegewebiger Umbau zu beobachten. Im Außenbereich ist die Entwicklung von Fettgewebsverbänden mit größtenteils reifen Adipozyten zu beobachten. Diese sind wohl als einzelne, unabhängige Zellverbände als auch als Teil von dem Konstrukt umgebenden Fettgewebsverbänden sichtbar. Im Innenbereich sind in Teilen der ausgewerteten Konstrukte in Fibrin eingebettete Kolonien von Adipozyten mit Siegelringform vorzufinden. Letztere Beobachtung ist jedoch inhomogen innerhalb der Gruppe. Der Fibringehalt ist geringer, je größer die Fettgewebsverbände sind. Insbesondere im Außenbereich sind die Fibrinanteile nahezu vollständig abgebaut. Die Konstrukte sind gut vaskularisiert, größere Fettgewebsverbände werden von großlumigen Gefäßen begleitet, während einzelne Adipozyten in direktem Kontakt zu Kapillaren stehen.

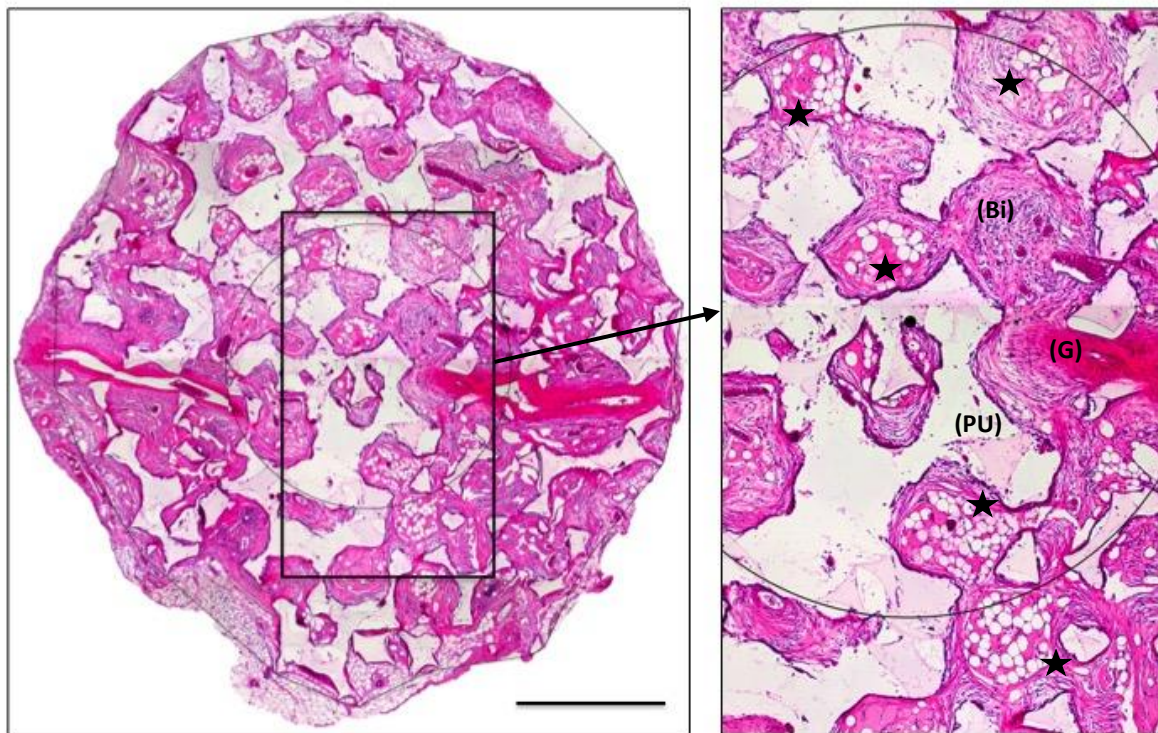


Abbildung 6: Histologischer Schnitt von Gruppe 1 (ASC, ohne Vorkultivierung)

Links: Gesamtübersicht eines histologischen Schnittes mit Trichrom-Färbung nach Ladewig, der abgebildete Maßstab entspricht 1000 μm . **Rechts:** Vergrößerung des im linken Bild enthaltenen Rechtecks. Der darin sichtbare Kreis grenzt den Innenbereich des Konstrukts von 3,2 mm Durchmesser vom Außenbereich des Konstrukts ab. Sichtbar sind mehrere Ansammlung von Adipozyten in Siegelringform (Sterne), Bindegewebe (Bi), ein Anschnitt der Vasa femoralia (G) sowie PU-Schaum (PU).

3.1.2 Gruppe 2, SVF, ohne Vorkultivierung

In der Gesamtbetrachtung sind die Konstrukte ebenfalls fundiert mit Bindegewebe durchzogen. Im Außenbereich zeigen sich zum Teil große, mit dem Umgebungsbereich verbundene Fettpolster mit reifen, siegelringförmigen sowie unreifen Adipozyten. Zum Innenbereich hin finden sich diese Gruppierungen von Fettzellen in Fibrinresten eingebettet. Die Morphologie der Adipozyten ist hier überwiegend fortgeschritten. Die Adipozyten stehen in engem Kontakt zu Blutgefäßen. Die Vaskularisierung ist stark ausgeprägt mit mittel- und großlumigen Gefäßen.

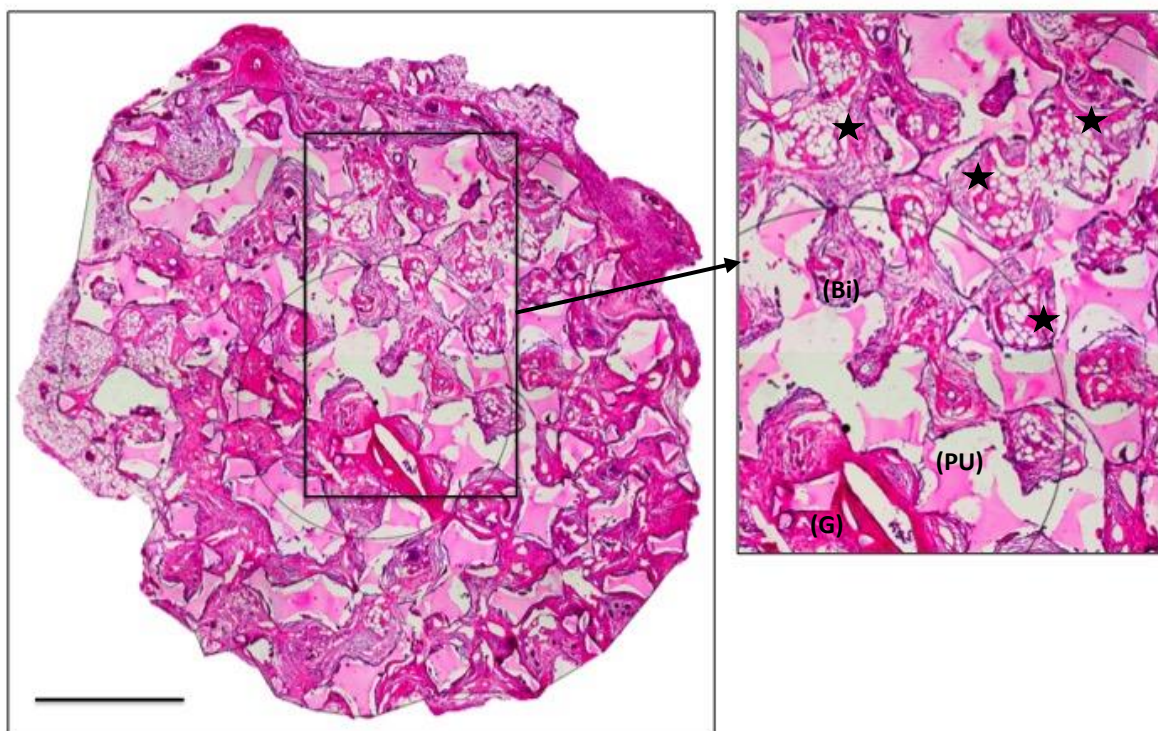


Abbildung 7: Histologischer Schnitt von Gruppe 2 (SVF, ohne Vorkultivierung)

Links: Gesamtübersicht eines histologischen Schnittes mit Trichrom Färbung nach Ladewig, der abgebildete Maßstab entspricht 1000 µm. **Rechts:** Vergrößerung des im linken Bild enthaltenen Rechtecks. Der darin sichtbare Kreis grenzt den Innenbereich des Konstrukts von 3,2 mm Durchmesser vom Außenbereich des Konstrukts ab. Sichtbar sind mehrere Ansammlung von Adipozyten in Siegelringform (Sterne), Bindegewebe (Bi), ein Anschnitt der Vasa femoralia (G) sowie PU-Schaum (PU).

3.1.3 Gruppe 3, ASC, mit Vorkultivierung

Die Schnitte sind mit dichtem Bindegewebe durchzogen, vereinzelt finden sich Stellen, die weder PU-Reste noch Bindegewebe enthalten. Ebenso zeigen sich große Bindegewebsflächen ohne Fettgewebe. Im Außenbereich sind Fettpolster reifen und unreifen Adipozyten, welche in Kontakt mit der Konstruktumgebung stehen, sichtbar. Zum Innenbereich hin und im Innenbereich selbst sind Fettzellen von Bindegewebe umschlossen. Es finden sich insgesamt wenig Fibrinansammlungen. Eine suffiziente Vaskularisierung der Konstrukte mit Gefäßen unterschiedlichen Lumens hat stattgefunden.

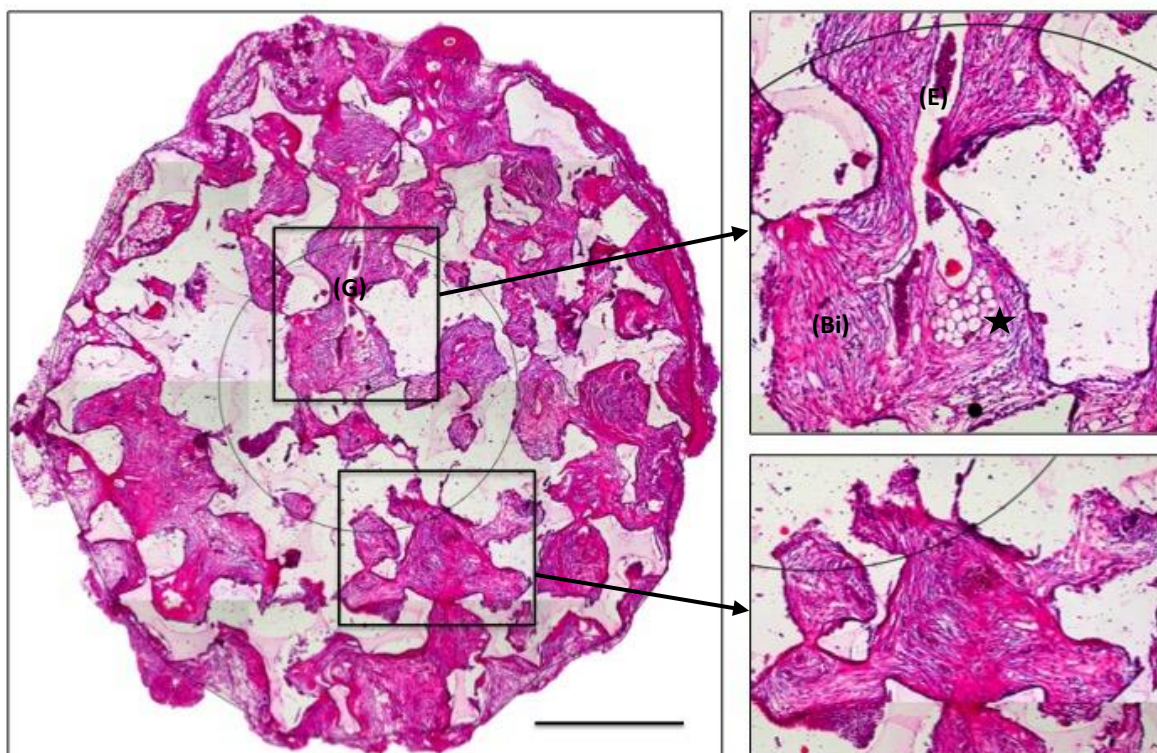


Abbildung 8: Histologischer Schnitt von Gruppe 3 (ASC, mit Vorkultivierung)

Links: Gesamtübersicht eines histologischen Schnittes mit Trichrom Färbung nach Ladewig, der abgebildete Maßstab entspricht 1000 μm . **Rechts, oben:** Vergrößerung des im linken Bild enthaltenen, oberen Rechtecks. Der darin sichtbare Kreis grenzt den Innenbereich des Konstrukts von 3,2 mm Durchmesser vom Außenbereich des Konstrukts ab. **Rechts, unten:** Vergrößerung des im linken Bild enthaltenen Rechtecks. Der darin sichtbare Kreis grenzt den Innenbereich des Konstrukts von 3,2 mm Durchmesser vom Außenbereich des Konstrukts ab.

Sichtbar sind kleine Ansammlung von Adipozyten in Siegelringform (Stern), große Mengen Bindegewebe (Bi), sowie ein mit Erythrozyten (E) gefüllter Abschnitt der Vasa femoralia (G).

3.1.4 Gruppe 4, SVF, mit Vorkultivierung

Die Schnitte sind stark mit Bindegewebe durchsetzt, wobei in einem Fall große Stellen vorzufinden sind, die weder PU-Reste noch Bindegewebe enthalten. Im Außenbereich wie im Innenbereich zeigen sich vereinzelte reife und unreife Adipozyten. Diese sind auffällig häufig in Fibrin eingebettet sowie selten in Kolonien angeordnet. Insgesamt finden sich größere Fibrinverbände. Es hat eine auffallend ausgeprägte Vaskularisierung stattgefunden, sowohl im Kontext mit Fettgewebe als auch innerhalb der bindegewebigen Strukturen.

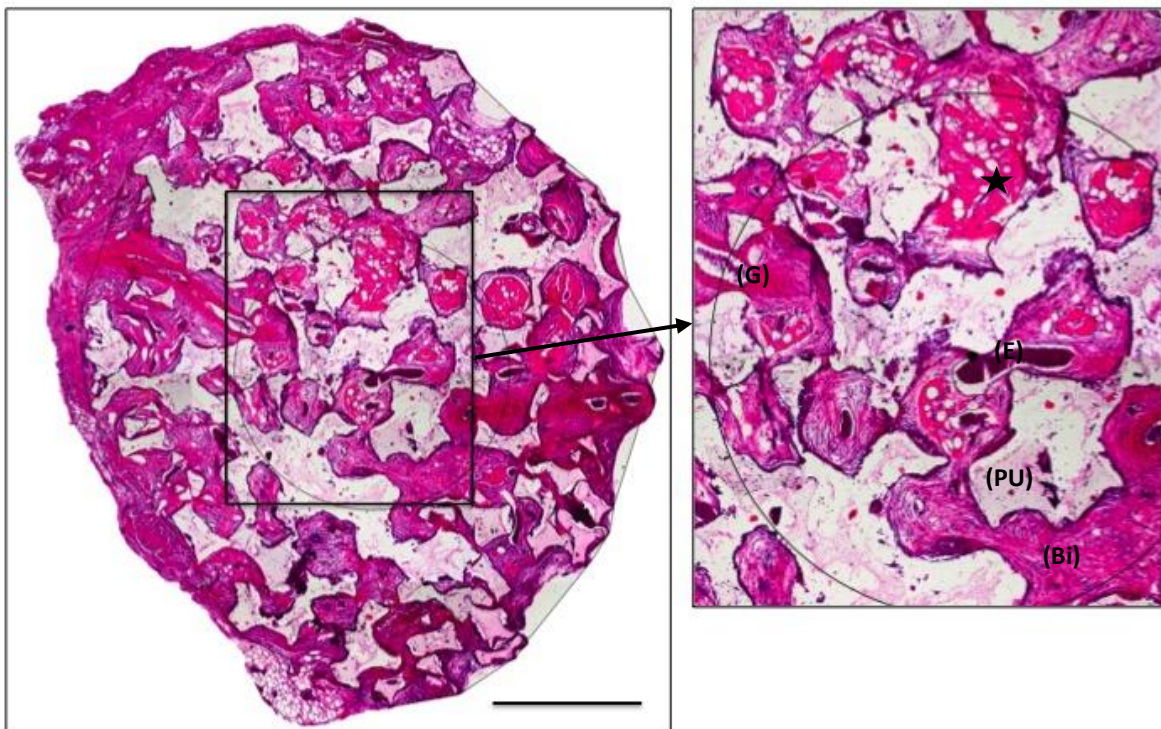


Abbildung 9: Histologischer Schnitt von Gruppe 4 (SVF, mit Vorkulturkultivierung)

Links: Gesamtübersicht eines histologischen Schnittes mit Trichrom Färbung nach Ladewig, der abgebildete Maßstab entspricht 1000 μm . **Rechts:** Vergrößerung des im linken Bild enthaltenen Rechtecks. Der darin sichtbare Kreis grenzt den Innenbereich des Konstrukts von 3,2 mm Durchmesser vom Außenbereich des Konstrukts ab. Sichtbar sind vereinzelte Adipozyten in Siegelringform (Sterne), Bindegewebe (Bi), ein Anschnitt der Vasa femoralia (G) mit Erythrozyten (E) sowie PU-Schaum (PU).

3.1.5 Vimentin-Antikörperfärbung

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte zeigten wenige Strukturen positiv für humanes Vimentin. Bei diesen Strukturen handelte es sich um Anteile von nicht-adipozytären Bindegewebe.

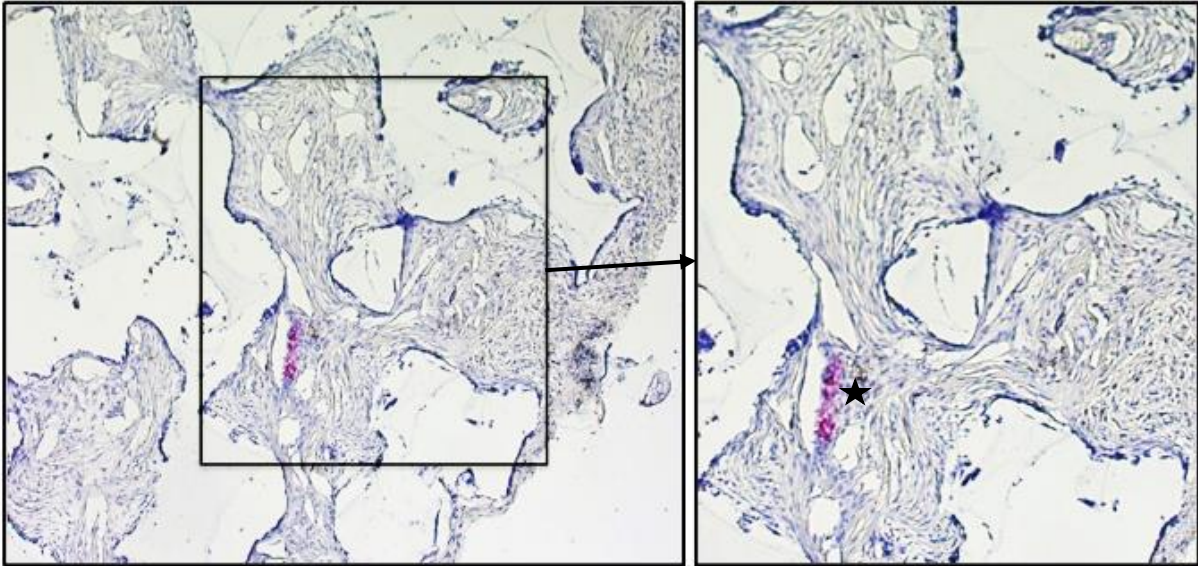


Abbildung 10: Beispielhaft dargestellte Immunhistochemie mit anti-human Vimentin Färbung (Gruppe 3, ASC mit adipogener Induktion)

Links: Gesamtübersicht eines histologischen Schnittes mit anti-human Vimentin Färbung
Rechts: Vergrößerung des im linken Bild enthaltenen Rechtecks. Sichtbar sind lediglich vereinzelte Vimentin-positive und somit human Gewebsverbände (Stern).

3.2 Histomorphometrische Analyse

Für die histomorphometrische Quantifizierung wurden Adipozyten und vaskuläre Strukturen gezählt und im Bezug zur Gesamtfläche gesetzt. Die somit errechneten Parameter sind Adipozyten und Gefäße pro Quadratmillimeter.

3.2.1.1 Adipogenese

Bei Betrachtung der quantitativen Analysen zeigt sich, dass generell drei Gruppen ähnliches Potential zur Adipogenese aufweisen: Nicht-vorkultivierte, nicht-induzierte ASC (Gruppe 1), vorkultivierte, induzierte ASC (Gruppe 3) sowie nicht-vorkultivierte, nicht-induzierte SVF (Gruppe 2). Letztere weisen bezüglich Adipogenese das höchste Potential auf. Dies lässt sich im Gesamtkonstrukt sowie im Außenbereich beobachten. Im Innenbereich ist dieser Trend der Überlegenheit von nicht-vorkultivierten, nicht-induzierten SVF nicht darstellbar, allerdings weist die Gruppe 1 (nicht-vorkultivierte, nicht-induzierte ASC) eine deutlich breitere Streuung der Werte auf (vgl. Abbildung 11).

Im Vergleich beider vorkultivierter Zelllinien (Gruppe 3 und Gruppe 4) zeigte sich eine verminderte Adipogenese der vorkultivierten, induzierten SVF (Gruppe 4). Im Gesamtkonstrukt ist dies ohne, im Außenbereich mit statistischer Signifikanz (Fett/mm² im Außenbereich; $p=0,009$). Diese Beobachtung ist im Innenbereich umgekehrt, mit statistisch nicht signifikanter Überlegenheit der vorkultivierten, induzierten SVF (Gruppe 4).

Bei Betrachtung der Auswirkung der Vorkultivierung und der konsekutiven Induktion zeigt sich, dass diese die Formation von Fettgewebe zu kompromittieren scheint. Innerhalb der gleichen Zelllinie (ASC und SVF) beherbergen vorkultivierte Konstrukte weniger Adipozyten pro Quadratmillimeter als ihre nicht-vorkultivierten, nicht-induzierten Vergleichskonstrukte (vgl. Abbildung 11). Statistisch signifikante Unterschiede findet man hierbei in folgenden Konstellationen: Innerhalb der Zelllinie der SVF sind nicht-vorkultivierten Konstrukte (Gruppe 2) stärker mit Fett durchsetzt als vorkultivierte (Gruppe 4). Dies lässt sich sowohl im Gesamtkonstrukt (Fett/mm² im Gesamtkonstrukt; $p=0,009$), als auch im Außenbereich feststellen (Fett/mm² im Außenbereich; $p=0,009$). Innerhalb der Zelllinie der ASC (Gruppe 1 und Gruppe 3) lässt sich dies lediglich im Innenbereich feststellen (Fett/mm² im Innenbereich; $p=0,05$).

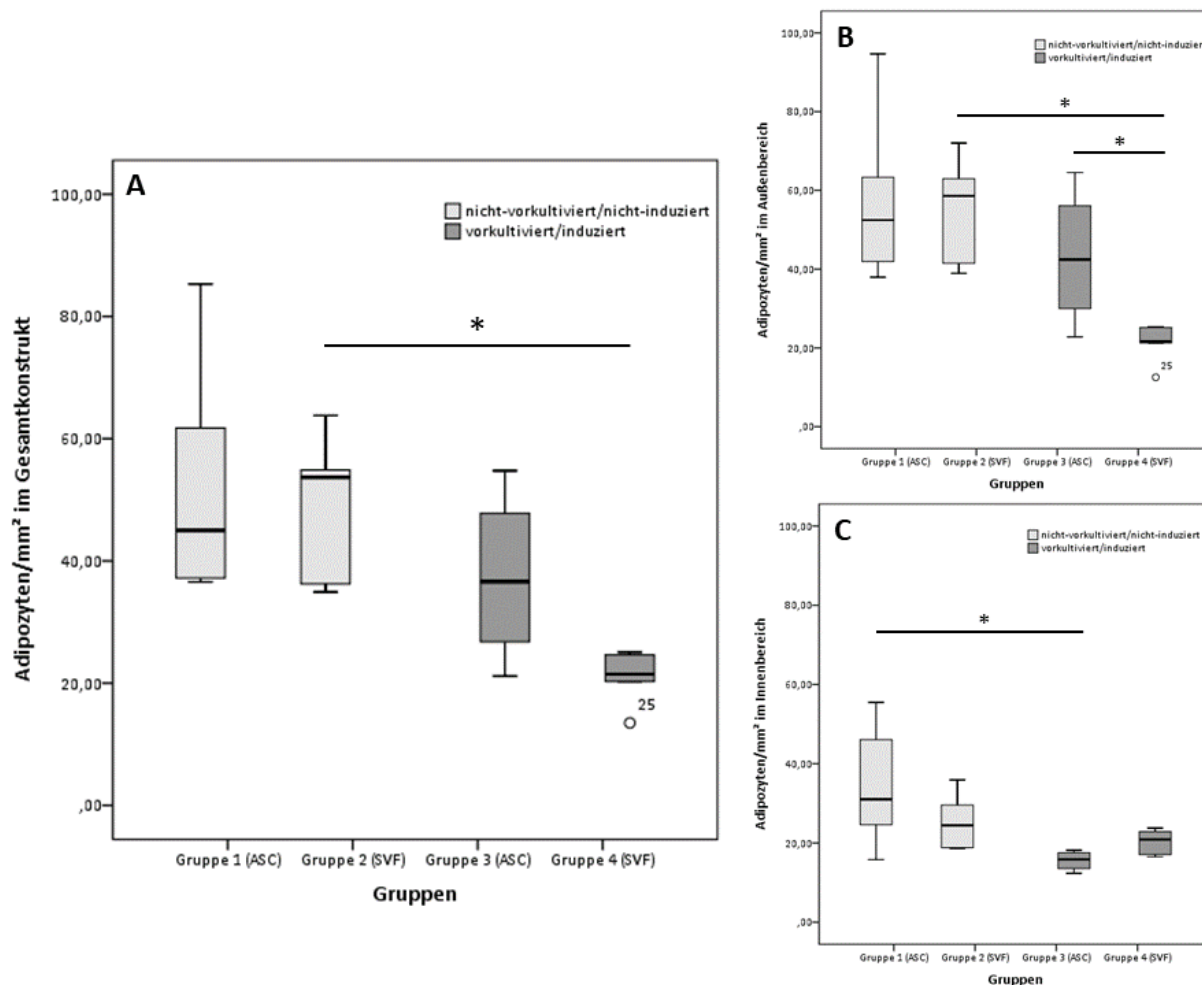


Abbildung 11: Histomorphometrische Quantifizierung der Fettgewebsentstehung in Tissu®Col-/PU-Konstrukten nach fünf Wochen in-vivo.

Graph A: Die Auszählung erfolgte in Adipozyten/mm² im Gesamtkonstrukt. Unabhängig von der Vorkultur zeigen ASC (Gruppe 1 und 3) sowie nicht-vorkultivierte, nicht-induzierte SVF (Gruppe 2) eine fundierte und vergleichbare Adipogenese. Letztere Gruppe 3 weist das höchste adipogenetische Potential auf. Vorkultivierte, induzierte SVF Konstrukte (Gruppe 4) zeigen einen signifikanten Nachteil im adipogenetischen Potential im Vergleich zu nicht-vorkultivierten, nicht-induzierten SVF Konstrukten (Gruppe 2) ($p=0,009$).

Graph B: Die Auszählung erfolgte in Adipozyten/mm² im Außenbereich des Konstrukts (vgl. hierzu Abbildung 5). Die Beobachtungen aus der Auszählung des Gesamtkonstruktes (Graph A) bestätigen sich auch im Außenbereich, insbesondere der signifikante Nachteil von vorkultivierten und induzierten SVF Konstrukten (Gruppe 4) zu Ihren nicht-vorkultivierten, nicht-induzierten Vergleichskonstrukten (Gruppe 2) ($p=0,009$). Weiterhin zeigt sich im Außenbereich ein signifikanter Nachteil von vorkultivierten, induzierten SVF Konstrukten (Gruppe 4) im Vergleich zu Ihren vorkultivierten, induzierten ASC Vergleichsgruppe (Gruppe 3) ($p=0,009$).

Graph C: Die Auszählung erfolgte in Adipozyten/mm² im Innenbereich, mit einem Durchmesser von 3,2 mm (vgl. hierzu Abbildung 5). Die im Gesamtkonstrukt und Außenbereich sichtbaren Trends für den Vergleich von nicht-vorkultivierten, nicht-induzierten und vorkultivierten, induzierten SVF (Gruppe 2 und 4) lässt sich im Innenbereich ebenfalls beobachten. Insbesondere für den Vergleich von nicht-vorkultivierten, nicht-induzierten und vorkultivierten, induzierten ASC (Gruppe 1 und 3) ($p=0,05$).

Abkürzungen: ASC: adipose-derived stromal and stem cells (ASC) cells; SVF: Stroma-Vaskuläre-Fraktion

3.2.1.2 Angiogenese

Bei Evaluation der Vaskularisierung der Konstrukte nach Implantation mit AV-Durchflussgefäß zeigt sich, dass generell alle Konstrukte unabhängig von Vorkultur oder Zelllinie eine fundierte Vaskularisierung erfahren haben. Hierbei heben sich die Gruppen mit vorkultivierten Zelllinien, allen voran vorkultivierte SVF-Zellen (Gruppe 4) ab (vgl. Abbildung 12). Diese Beobachtungen sind jedoch nicht statistisch signifikant. Des Weiteren scheint die Zellfraktion der SVF, unabhängig der Vorkultivierung eine statistisch nicht-signifikant bessere Vaskularisierungstendenz zu haben als ihre jeweiligen Vergleichsgruppen mit ASC (Gruppe 1 und Gruppe 2 sowie Gruppe 3 und Gruppe 4). In Gruppe 1 (nicht-vorkultivierte ASC) ist eine breite Streuung der Ergebnisse zu beobachten.

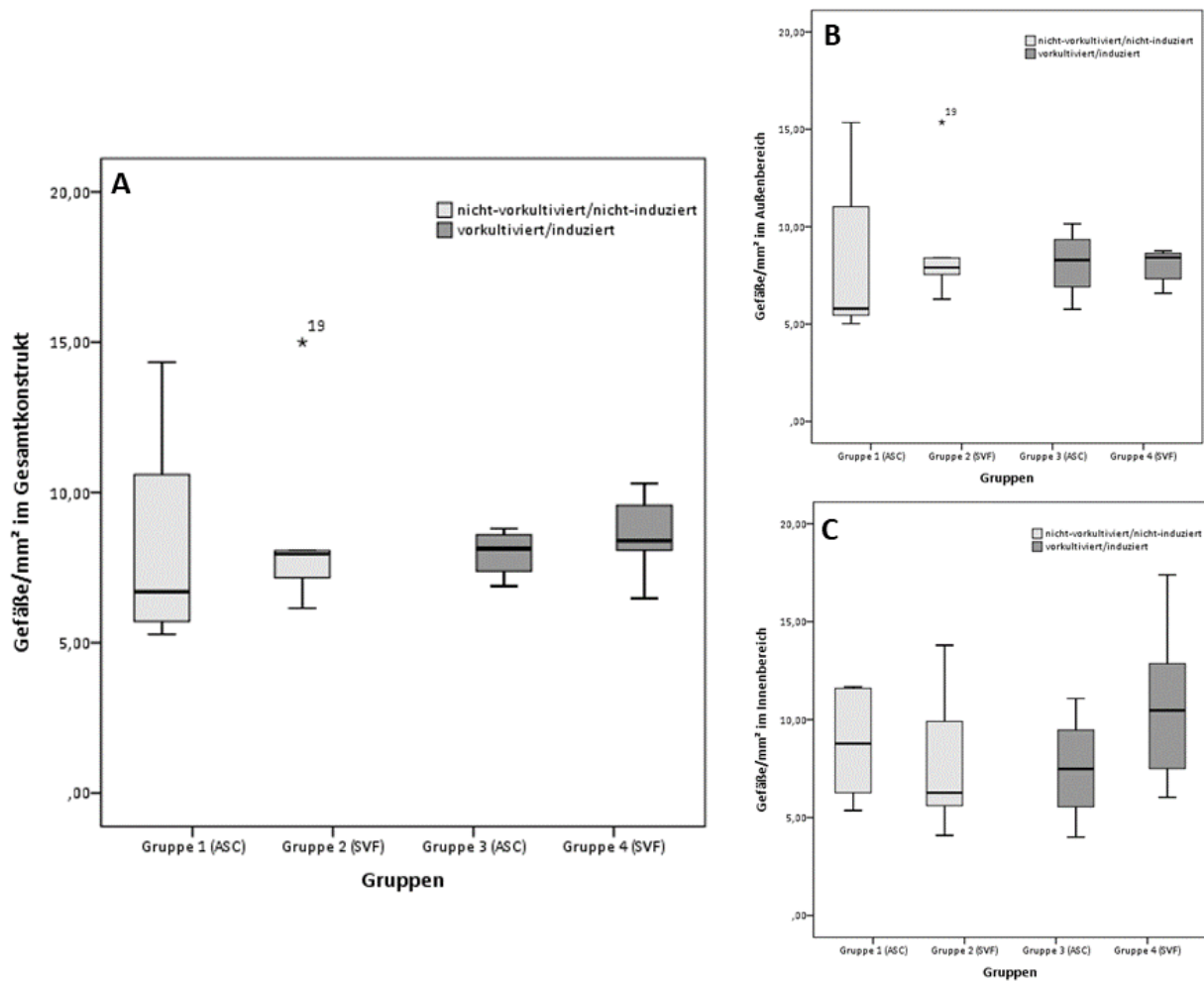


Abbildung 12: Histomorphometrische Quantifizierung der Angiogenese in Tissu®Col-/PU-Konstrukten nach fünf Wochen in-vivo.

Graph A: Die Auszählung erfolgte in Blutgefäße/mm² im Gesamtkonstrukt. Generell zeigt sich eine fundierte Angiogenese in allen Gruppen mit nicht-signifikanter Überlegenheit der SVF gegenüber den ASC (Gruppe 1 vs. Gruppe 2; Gruppe 3 vs. Gruppe 4) sowie nicht-signifikanter Überlegenheit von vorkultivierten und induzierten Gruppen (Gruppe 3 und 4).

Graph B: Die Auszählung erfolgte in Blutgefäße/mm² im Außenbereich. Alle Gruppen zeigten eine fundierte Vaskularisierung im Außenbereich.

Graph C: Die Auszählung erfolgte in Blutgefäße/mm² im Innenbereich, mit einem Durchmesser von 3,2 mm. Alle Gruppen zeigten eine fundierte Vaskularisierung im Innenbereich.

Abkürzungen: ASC: adipose-derived stromal and stem cells; SVF: Stroma-Vaskuläre-Fraktion

4 Diskussion

Wir haben in dieser Arbeit erfolgreich die Generierung gut vaskularisierter, makroskopisch volumenstabiler Fettgewebstrukturen demonstriert. Durch die Vaskularisierungsstrategie des AV-Durchflussgefäßes ist dieses Konstrukt sekundär transplantierbar und ermöglicht mikrochirurgische Defektdeckung.

Im Hinblick auf die von Patrick et al. postulierten Eigenschaften von Produkten des Tissue-Engineering (vgl. Punkt 1.2) (C. W. Patrick et al., 2008) besteht das aus dieser Arbeit entstandene Konstrukt aus (1) mit ASC oder SVF besiedelten (2) PU-/TissuCol®-Trägermaterial, welche gruppenabhängig (3) mit pro-angiogenetischen und pro-adipogenetischen Faktoren vorkultiviert wurden. Abschließend (4) wurde eben jenes Produkt des Tissue-Engineering chirurgisch vaskularisiert.

4.1 SVF als alternativer Mediator des Adipose-Tissue-Engineering

Die Vorteile der SVF im Adipose-Tissue-Engineering wurden bereits zu Beginn dieser Arbeit dargelegt (vgl. Punkt 1.2.1.2). Zusammenfassend handelt es sich um eine im Vergleich zu ASC einfachere zu gewinnende Zellfraktion ohne Notwendigkeit der aufwendigen Prozessierung und Passagierung und somit eine günstigere Alternative, welche mittels automatisierten Systemen gewonnen werden kann (Aronowitz et al., 2016). Die Basis der theoretischen Überlegungen zur Physiologie der Gewebeentstehung ist hierbei das Mediatorenmodell (Griessl et al., 2018; Storck et al., 2017).

4.1.1 Physiologische Besonderheiten in der Verwendung der SVF im Vergleich zu ASC

4.1.1.1 Die Rolle der Makrophagen

Bei dem im Mediatorenmodell angesprochenen dynamischen Prozess der Desintegration von humanen Zellen und der Integration von murinen Zellen (vgl. Punkt 1.4 sowie Punkt 4.2) spielen Makrophagen mit ihren Fähigkeiten, extrazelluläre Matrix zu restrukturieren und Vaskularisierung anzustoßen eine wichtige Rolle (Anghelina et al., 2004, 2006; Debels et al., 2013; Moldovan, 2002). Makrophagen haben eine essenzielle Funktion beim Abbau von Extrazellulärmatrix und bei der Neovaskularisation, wobei sie tunnelähnliche Strukturen bilden, an welchen sich die Entstehung von kapillären Strukturen und Fettgewebe orientiert (Anghelina et al., 2004, 2006).

Die Rolle von Makrophagen im Tissue-Engineering generell und indirekt in der Theorie der mediatorenbasierten Gewebeerneuerung zeigten Debels et al. 2013: In einem Tierversuch mit Silikongebilden wurde die Makrophagenaktivität entweder mittels Zymosan, einem pro-inflammatorischen Homoglykan, angestoßen, oder mittels Clodronat, einem Bisphosphonat, unterdrückt. Nach zwei Wochen in-vivo zeigte sich in der Zymosan-Gruppe die höchste Anzahl an Makrophagen, welche sowohl den Gewebeumbau als auch die Proliferation von Vorläuferzellen, ungeachtet ob diese humanen oder murinen Ursprungs sind, unterstützen. Nach vier bis sechs Wochen nahm die Anzahl an Makrophagen konsekutiv ab, während neues, vaskularisiertes Fettgewebe entstand. In der makrophagendepletierten Gruppe (Clodronat-Gruppe) zeigte sich lediglich eine schwache Adipo- und Angiogenese. Dies zeigt den enormen Einfluss von Makrophagen im Kontext des Tissue-Engineering (Debels et al., 2013). Dieser Zusammenhang zwischen Makrophagenaktivität und Neovaskularisation zeigte sich auch in anderen Fachgebieten (Sakurai et al., 2003).

4.1.1.2 Immunologische Eigenschaften von ASC und SVF

4.1.1.2.1 Immunologische Eigenschaften der ASC

Die immunologischen Eigenschaften von ASC sind dahingehend bemerkenswert, dass sie aufgrund des auf ihrer Oberfläche fehlenden Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC-II) keine Immunreaktion beim Spender hervorrufen und somit allogent transplantiert werden können (McIntosh et al., 2006).

Des Weiteren besitzen Stammzellen im Allgemeinen immunmodulatorische Kapazität: Diese Eigenschaften wurden für MSC, sozusagen den Vorgängern der ASC, von Aggarwal et al. 2005 beschrieben: Sie schaffen ein anti-inflammatorisches Milieu, indem sie u. a. mit dendritischen (DC), T-, sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) interagieren. Dadurch sinkt die Aktivität von pro-inflammatorischen Zellen und deren Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und Interferon-gamma (INF- γ). Des Weiteren induzieren MSC regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und vermehrte Sekretion von anti-inflammatorischen Interleukin-4 und -10 (IL-4, IL-10) (S. Aggarwal et al., 2005).

Bestätigt wurde dies für aus dem Fettgewebe stammende ASC, welche bei Kokultur mit Lymphozyten zweier verschiedener Spender im Rahmen einer „two-way mixed lymphocyte reaction“ (MLR) die Proliferation der Lymphozyten als Reaktion auf die Antigene des MHC-inkompatiblen Kulturpartners unterdrückten. Eine Trennung von ASC und Lymphozyten durch eine semipermeable Membran zeigte vergleichbare Effekte, was impliziert, dass diese nicht

allein auf Zell-Zell-Interaktionen, sondern auch auf löslichen Botenstoffen beruhen (Puissant et al., 2005). Cui et al. konnten Prostaglandin-E2 (PG-E2) als einen wichtigen anti-inflammatorischen Faktor identifizieren (Cui et al., 2007). Die Induktion von CD25+, regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), welche Immunreaktion unterdrücken können, konnte ebenfalls für ASC bestätigt werden. Hierzu wurden die Stammzellen mit peripheren, mononukleären Blutzellen (PMNC, bestehend aus T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen) kokultiviert (Crop et al., 2010b). Dieser Effekt lässt sich vor allem bei Zellkulturen mit O_2 -Konzentrationen um 5 %, wie sie im Fettgewebe natürlicherweise vorkommen, beobachten (Frazier et al., 2014). Darüber hinaus verstärkt sich unter inflammatorischen Bedingungen (Kokultur von ASC mit pro-inflammatorischen Zytokinen) die immunsuppressive Aktivität der Stammzellen (Crop et al., 2010a).

Diese immunomodulatorischen Fähigkeiten der ASC finden seit wenigen Jahren auch im klinischen Setting Anwendung: In einer Phase-II-Studie mit unter Morbus Crohn und assoziierten Fisteln leidenden Patienten konnten Cho et al. bei 83,3 % der Patienten einen seit zwei Jahren anhaltenden, vollständigen Verschluss der Fisteln nach Injektion von mit ASC angereichertem Fibrinkleber zeigen. Diese Effekte schreiben die Autoren einerseits der ASC-abhängigen Immunmodulation sowie deren Sekretion von Wachstumsfaktoren und der dadurch initiierten Wundheilung zu (Cho et al., 2015). Dies konnte kürzlich auch für perianale Fisteln reproduziert werden (Philandrianos et al., 2018). Diese immunomodulatorischen Effekte der ASC zeigten sich auch bei der intraartikulären SVF-Injektion bei Osteoarthritis-Patienten durch eine lang anhaltende Verbesserung von Schmerzscores und eine Verminderung des Analgetikagebrauchs (Michalek et al., 2019). Hillers et al. beschreibt nach Injektion von „adipose-derived stromal vascular fraction“ (ADSVF), einem SVF-Äquivalent, eine Verbesserung der Stimmfunktion durch anti-fibrotische Effekte bei Patienten mit Stimmbandvernarbungen (Hillers et al., 2018).

4.1.1.2.2 Immunologische Eigenschaften der SVF

Wie bereits erwähnt, exprimieren ASC keinen MHC-II-Komplex, einer der Hauptgründe, warum ASC bei allogenen Transplantationen nicht vom Immunsystem des Empfängers attackiert werden. Zusammen mit weiteren Oberflächenmarkern, darunter u. a. CD45 (common-leukocyte-antigen) sowie CD86 (co-stimulatory molecule), kommt der MHC-II-Komplex auf Zellen der SVF vor (McIntosh et al., 2006). Dies impliziert, dass die SVF entweder antigenpräsentierende Zellen (APC) enthält oder die in der SVF enthaltenen, unpassagierten

ASC initial diese Marker exprimieren und erst im Zuge der Zellkultur verlieren. Im Rahmen einer Kokultur mit PBMC (one-way MLR) zeigen frisch isolierte SVF-Zellen Immunreaktionen, die mit zunehmender Passagierung (was im Rahmen der ASC-Isolation durchgeführt wird) abnehmen bzw. vollständig verschwinden (McIntosh et al., 2006). Zur Evaluation der immunsuppressiven Kapazität der SVF führten McIntosh et al. einen two-way MLR assay durch. Hierbei zeigen SVF-Zellen eine deutlich geringere Suppression von T-Zell-Proliferation als ASC (McIntosh et al., 2006). Folglich können die SVF, ihre Zellen und die sezernierten Zytokine bei allogenen Transplantationen Quelle von Inflammationen sein (McIntosh et al., 2006).

4.1.2 Vergleich der Zelllinien

4.1.2.1.1 Adipogenese

Im Vergleich der Adipogenese der Gruppen, in welchen die jeweiligen Zellen (ASC oder SVF) als Quelle parakriner Faktoren zur Unterstützung der Gewebsentwicklung fungieren und im Verlauf nicht mehr nachweisbar sind (Freiman et al., 2018; Griessl et al., 2018; Han et al., 2015; Mizuno et al., 2012; Stillaert et al., 2007; Storck et al., 2017; Volz et al., 2016; von Heimbürg et al., 2001) zeigte sich eine Überlegenheit von nicht-vorkultivierten, nicht-induzierten SVF im Vergleich zu ASC (ohne statistische Signifikanz).

Mögliche Kausalitäten für die Überlegenheit unbehandelter (nicht-vorkultivierter, nicht-induzierter) SVF gegenüber ASC werden im Folgenden diskutiert:

Die Isolierung und Passagierung der ASC aus der SVF kann das parakrine Mediatorenprofil der Zellen ändern und somit deren lokalen Einfluss einschränken (Mizuno et al., 2012; Oses et al., 2017). Als Beispiel kann hier der unter Punkt 1.2.1.2 beschriebene Verlust des Oberflächenmarkers CD34 im Zuge der ASC-Isolierung genannt werden: Die verbesserte Differenzierungskapazität CD34-negativer Stammzellen (somit der ASC) impliziert, dass der CD34-Verlust eine Prägung der ASC zu einer bestimmten Zellabstammung (z. B.: adipogen oder osteogen) beinhaltet (Suga et al., 2009). Die Sekretion von VEGF in Abhängigkeit der Expression von CD34 wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben, was den Einfluss der Isolierung und Passagierung auf das Sekretionsprofil hervorhebt (Kim et al., 2016; Suga et al., 2009).

Ein weiterer Erklärungsansatz ist der Einfluss der Makrophagen (vgl. Punkt 4.1.1.1.). In der SVF sind zu ca. 10 % Monozyten und Makrophagen enthalten, was unter Punkt 1.2.1.2 bereits

dargelegt wurde (Bourin et al., 2013; Dykstra et al., 2017). Somit wird einerseits durch Restrukturierung der Extrazellulärmatrix und Unterstützung der Neovaskularisation die Entwicklung von Empfängerewebe angestoßen (Anghelina et al., 2004, 2006; Debels et al., 2013; Moldovan, 2002).

Andererseits exprimieren die Zellen der SVF im Gegensatz zu ASC u. a. CD45 (common-leukocyte-antigen), CD86 (co-stimulatory molecule) und MHC-II-Komplex auf deren Oberfläche (McIntosh et al., 2006), passend zu den darin enthaltenen antigenpräsentierenden Zellen (APC) (vgl. Punkt 1.2.1.2). Diese Oberflächenmarker verlieren die Stammzellen im Zuge der ASC-Isolation und -Passagierung (vgl. Punkt 4.1.1.2) (Bourin et al., 2013). McIntosh et al. zeigten darüber hinaus mittels one-way MLR, dass frisch isolierte SVF-Zellen Immunreaktionen hervorrufen können (McIntosh et al., 2006). In Zusammenschau mit den unter Punkt 4.1.1.1 erläuterten Ergebnissen der Zymosan-Gruppe von Debels et al. (Debels et al., 2013) kann dies bei der Verwendung der SVF ein ähnliches pro-inflammatorisches Milieu an der Implantationsstelle hervorrufen und somit das Einwandern von Makrophagen der NMRI-Foxn1^{nu}-/Foxn1^{nu}-Mäuse, welche nicht von der Gendepletion des Mausmodells betroffen sind, unterstützen (Charles River Laboratories International, 2020).

Die Überlegenheit der unbehandelten SVF (Gruppe 2) gegenüber den passagierten ASC lässt sich somit durch die Anwesenheit von Makrophagen und die lokale Inflammation am Implantationsort erklären.

Noch deutlichere Unterschiede zeigten sich im Vergleich von vorkultivierten, induzierten SVF und unbehandelten SVF (Gruppe 3 und Gruppe 4; vgl. Abbildung 11). Dies lässt folgende kausale Überlegungen zu: Einerseits scheint die nicht-vorkultivierte SVF eine balancierte Mediatorenfreisetzung zur Unterstützung von Adipo- und Angiogenese zu generieren. Die Vergleichsgruppe von vorkultivierten, induzierten SVF scheint aufgrund der vorkulturbedingten Veränderung des parakrinen Profils (Mizuno et al., 2012; Oses et al., 2017; Rehman et al., 2004; Yoshimura et al., 2006) eine Einwanderung von Zellen des Transplantatempfängers zu erschweren. Andererseits ist ein vorkulturbedingter Shift der Zellzusammensetzung (durch Proliferationen, Differenzierung einer Zelllinie und konsekutiver Apoptose der Anderen) anzunehmen (Bourin et al., 2013; Dykstra et al., 2017). Dies legt eine verminderte Makrophagenkonzentration und verminderte Inflammationsreaktion nahe, was wiederum die Gewebeentwicklung kompromittiert (Anghelina et al., 2004, 2006; Debels et al., 2013; Moldovan, 2002).

4.1.2.1.2 Angiogenese

Die unter Punkt 1.2.1.1.1 beschriebenen Erkenntnisse bzgl. der Differenzierungskapazität von ASC zu CD31-positiven Zellen (Planat-Benard et al., 2004) rückt unter Annahme des Mediatorenmodells (Griessler et al., 2018; Storck et al., 2017) in den Hintergrund. Allerdings wurde die parakrine Aktivität der ASC mit Sezernierung von VEGF bereits von Planat-Benard 2004 sowie von verschiedenen Autoren beschrieben (Fraser et al., 2006; Planat-Benard et al., 2004; Rehman et al., 2004) und scheint abhängig von der Kinetik der Veränderung der Oberflächenmarker, u. a. CD34, zu sein (Kim et al., 2016; Suga et al., 2009). Ebenso zeigten Ell et al. in einer Kokultivierung von ASC und endothelialen Vorläuferzellen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte VEGF-Sekretion (Ell et al., 2017). Diese Kokultur zweier Zellreihen besitzt eine relative Ähnlichkeit zur SVF, in der ebenfalls CD31-positive endotheliale Vorläuferzellen enthalten sind (Bourin et al., 2013; Ell et al., 2017) und unterstützt die Theorie des mediatorenbasierten hohen Vaskularisierungspotentials der SVF.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass Adipozyten größtenteils in engem Kontakt zu Blutgefäßen stehen, was bereits in früheren Arbeiten beschrieben wurde und auf die parallele Entwicklung von Fettgewebe und Blutgefäßen zurückgeführt wird (Crandall et al., 1997; Hausman et al., 2004; Weiser et al., 2008). Ausgehend von der Mediatorentheorie ist dies eine passende Beobachtung: Die von den eingebrachten Zellen ausgeschütteten parakrinen Faktoren müssen gleichzeitig Angio- und Adipogenese unterstützen, sich somit die Waage halten.

Im Vergleich der verschiedenen Gruppen zeigte sich durchweg eine fundierte Angiogenese, mit einer generell leichten Überlegenheit der SVF. Passend zu bisherigen Erkenntnissen aus der Forschung mit ASC zeigen auch die nicht-induzierten, nicht-vorkultivierten Konstrukte die Entstehung eines kapillären Netzwerks, was auf autokrine Sekretion von pro-angiogenetischen Faktoren hinweist (Fraser et al., 2006; Rehman et al., 2004). Im Gegensatz zu bisherigen Arbeiten zeigt sich, dass die unter Punkt 1.2.2 beschriebene Kompromittierung der Entstehung von CD31-positiven, prävasculären Strukturen durch die Vorkultivierung und adipogene Induktion (Wittmann et al., 2015) in dieser Arbeit nicht zutrifft, die adipogene Induktion somit ohne Einfluss auf die Vaskularisation ist. Das autokrine Sekretionsprofil der eingebrachten Zellen bzgl. des Vaskularisierungspotentials (im Gegensatz zum pro-adipogenetischem Sekretionsprofil) scheint von sieben-tägiger adipogener Induktion unbeeinflusst zu sein.

Statistisch nicht signifikante Überlegenheit zeigte sich in der Angiogenese der SVF. Dies lässt, passend zu den o. g. Ergebnissen von Ell et al. (Ell et al., 2017), die Schlussfolgerung zu, dass die in der SVF zusätzlich enthaltenen endothelialen Progenitorzellen die Mediatorenkonzentration und/oder deren Wirkung verstärken. Darüber hinaus trifft die Theorie der Annahme eines positiven Einflusses der Makrophagen, welche initial humanen und im Verlauf murinen Ursprungs sind (wie unter Punkt 4.1.1 und Punkt 4.2 beschrieben), auch für die Angiogenese zu (Debels et al., 2013; McIntosh et al., 2006). Der physiologische Mechanismus wurde von Moldovan et al. wie folgt beschrieben: Makrophagen bauen die Extrazellulärmatrix ab und bilden somit tunnelähnliche Strukturen, welche im weiteren Verlauf von „circulating progenitor endothelial cells“ (CPEC) oder „transdifferentiated EC“ ausgekleidet werden, wodurch ein kapilläres Netzwerk entsteht (Moldovan, 2002). Darüber hinaus spielen pro-angiogenetische Faktoren, u. a. VEGF, eine Rolle in der Regulation der makrophagenvermittelten Angiogenese, insbesondere in hypoxischen Milieus (Allavena et al., 2008; Balkwill et al., 2001; zitiert nach Debels et al., 2013; Murdoch et al., 2005; Salcedo et al., 1999).

4.1.2.1.3 Fazit zum Vergleich der Zelllinien

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit sowie der unter Punkt 4.1.1.1 aufgeführten Arbeiten von Anghelina et al. und Debels 2013 zeigt sich, dass neben dem Sekretionsprofil („secretome“) der eingebrachten Zellen (SVF oder ASC) und dessen Veränderung durch die Vorkultivierung Makrophagen eine wichtige Rolle spielen (Debels et al., 2013). Diese finden sich einerseits in der eingebrachten SVF (Bourin et al., 2013), andererseits ist eine mediatorengetriggerte Rekrutierung von Makrophagen des – in dieser Arbeit – murinen Empfängers möglich (Anghelina et al., 2006; Debels et al., 2013).

4.2 Ursprung der Zellen

Wie bereits unter Punkt 1.4 beschrieben, zeigen jüngere Studien, dass zwei in ihrer Physiologie grundlegend verschiedene Theorien bezüglich der Gewebeentstehung möglich sind: Die Ausdifferenzierung eingebrachter Vorläuferzellen (Bausteinprinzip) sowie die mediatorengetriggerte Einwanderung von Zellen des Transplantatempfängers (Mediatorenmodell) (Bauer-Kreisel et al., 2010; Gimble et al., 2007; Tsuji et al., 2009; Volz et al., 2016).

Zwar ist der Vergleich bisheriger Studien aufgrund der abweichenden Methodik schwierig, dennoch fällt auf, dass bei kürzeren Implantationszeiträumen (vier Wochen oder weniger) rein humane Zellverbände bzw. Koexistenz von humanen und murinen Zellen beobachtet wurden (Wiggenhauser et al., 2012; Wittmann et al., 2015). Von Heimbürg et al. zeigten, dass die Zellularität (Zellen/Gesichtsfeld) Vimentin-positiver Zellen abnimmt, je länger die Konstrukte in-vivo implantiert waren (von Heimbürg et al., 2001). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Wittmann et al. ist in dieser Arbeit die Menge Vimentin-positiver Zellen verschwindend gering (Griessler et al., 2018; Wittmann et al., 2015). Es zeigt sich lediglich eine schwache Anfärbung von Bindegewebsstrukturen, was am ehesten abgebautem, humanen Restgewebe entspricht (vgl. Abbildung 10).

Zusammenfassend legt dies einen langsam ablaufenden Umbauprozess nahe, welcher je nach Explantationszeitpunkt der verschiedenen Studien noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Im Zuge dessen werden implantierte Zellen abgebaut und modulieren die Integration von Zellen des Transplantatempfängers (Griessler et al., 2018). Im Falle dieser Arbeit liegt nahe, dass der Explantationszeitpunkt von fünf Wochen eine Momentaufnahme kurz vor vollständiger Desintegration der humanen Zellen darstellt und nahezu vollständig abgeschlossen ist (siehe Abbildung 13). In Bezug auf die kontroversen Theorien bezüglich des Schicksals der eingebrachten Zellen unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Theorie, dass ASC bzw. SVF als Ursprung parakriner Faktoren, beispielweise IGF, VEGF, bFGF und HGF (Mizuno et al., 2012; Volz et al., 2016) für das schrittweise Einwachsen von adipogenen und endothelialen Zellen in das Konstrukt dienen (Freiman et al., 2018; Han et al., 2015; Stillaert et al., 2007; Storck et al., 2017).

Tabelle 5: Vergleich von in-vivo-Studien

Vergleich von in-vivo-Studien bzgl. der eingebrachten Zellen, Trägermaterialien, Implantationstechniken und -zeiträume, dem Ursprung der Zellen (festgestellt nach histologischer Aufarbeitung. **Abkürzungen:** ASC: adipose-derived stromal and stem cells; hAPC: human adipose tissue derived precursor cells; SVF: stromal vascular fraction; PU: polyurethane; PCL: polycaprolactone; s.c.: subcutaneous; AV-ft: arterio-venous flow-through; k. A.: keine Angabe; „<<“: wesentlich weniger/mehr von; „+“: mittels anti-human-Vimentin evaluiert; „#“: mittels anti-human-MHC-I-Antikörpern evaluiert; „§“: nur wenige Bindegewebsstrukturen positiv für humanes Vimentin (Griessl et al., 2018, Appendix, Tabelle 1)

Studie	Zellen	Trägermaterial	Implantationstechnik	In-vivo Zeitraum	Zellursprung	Quellenangabe
Aktuelle Arbeit	ASC SVF	PU / TissuCol®	AV-ft	5	murin ^{+,§}	(Griessl et al., 2018)
Storck et al. 2017	ASC	PU / stable fibrin	AV-ft	12	murin [†]	(Storck et al., 2017)
Wittmann et al. 2015	SVF	stable fibrin / TissuCol® ohne scaffold	s.c.	4	Koexistenz (murin << human) [†]	(Wittmann et al., 2015)
Wittmann et al. 2013	ASC	PU / stable fibrin	AV-ft	5	murin [†]	(Wittmann et al., 2016)
Wiggenhauser et al. 2012	hAPC	PU / PCL / stable fibrin	AV-ft 2/4 Wochen	2 oder 4	human [#]	(Wiggenhauser et al., 2012)
Stillaert et al. 2007	SVF	k. A.	k. A.	6 oder 9	murin [†]	(Stillaert et al., 2007)

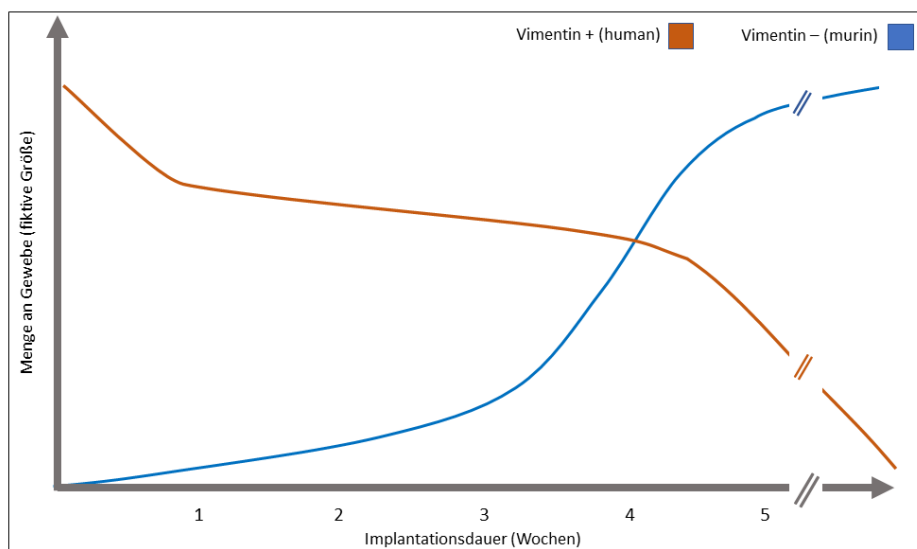


Abbildung 13: Fiktive Vorstellung der Abbaudynamik

Humane, Vimentin-positive Zellen (hier rot dargestellt) werden über den Implantationszeitraum von bis zu fünf Wochen konsekutiv abgebaut. Währenddessen wandern murine, Vimentin-negative Zellen (hier blau dargestellt) ein und bilden das neu entstehende Gewebe.

4.3 Methodik im Kontext mediatorenbasierter Gewebsentwicklung

4.3.1 Vorkultur

Die grundsätzlichen Überlegungen bezüglich Vorkultivierung und Induktion sowie deren Zusammensetzung wurde bereits unter Punkt 1.2.2 erwähnt. Hierbei sei nochmals auf die Unterscheidung zwischen reiner Vorkultivierung mit beispielsweise „growth medium“ (PGM-2 und/oder EGM-2) sowie Vorkultivierung und Induktion (PGM-2, EGM-2 mit zusätzlichen Faktoren mit Einfluss auf den PPAR γ - und C/EBP α -Signaltransduktionsweg) hingewiesen (Volz et al., 2016). Hierbei ist die Abgrenzung gegenüber vorherigen Studien wichtig. Während Wittmann et al. zwischen direkter Implantation, Implantation nach Vorkultivierung (PGM-2, EGM-2) sowie Implantation mit Vorkultivierung und Induktion (PGM-2, EGM-2 mit Insulin, Dexamethason, IBMX und Indomethacin) unterschied (Wittmann et al., 2015), differenzierten Storck et al. zwischen in „growth medium“ vorkultivierten Zellen (PBM-2 und 10 % FBS) und zusätzlich induzierten Zellen (Storck et al., 2017). In dieser Arbeit wurde zwischen direkter Implantation ohne Vorkultur oder Induktion und Implantation nach Vorkultur und Induktion unterschieden (Griessler et al., 2018). Abbildung 14 gibt eine Übersicht über die Vorkultivierungsstrategien:

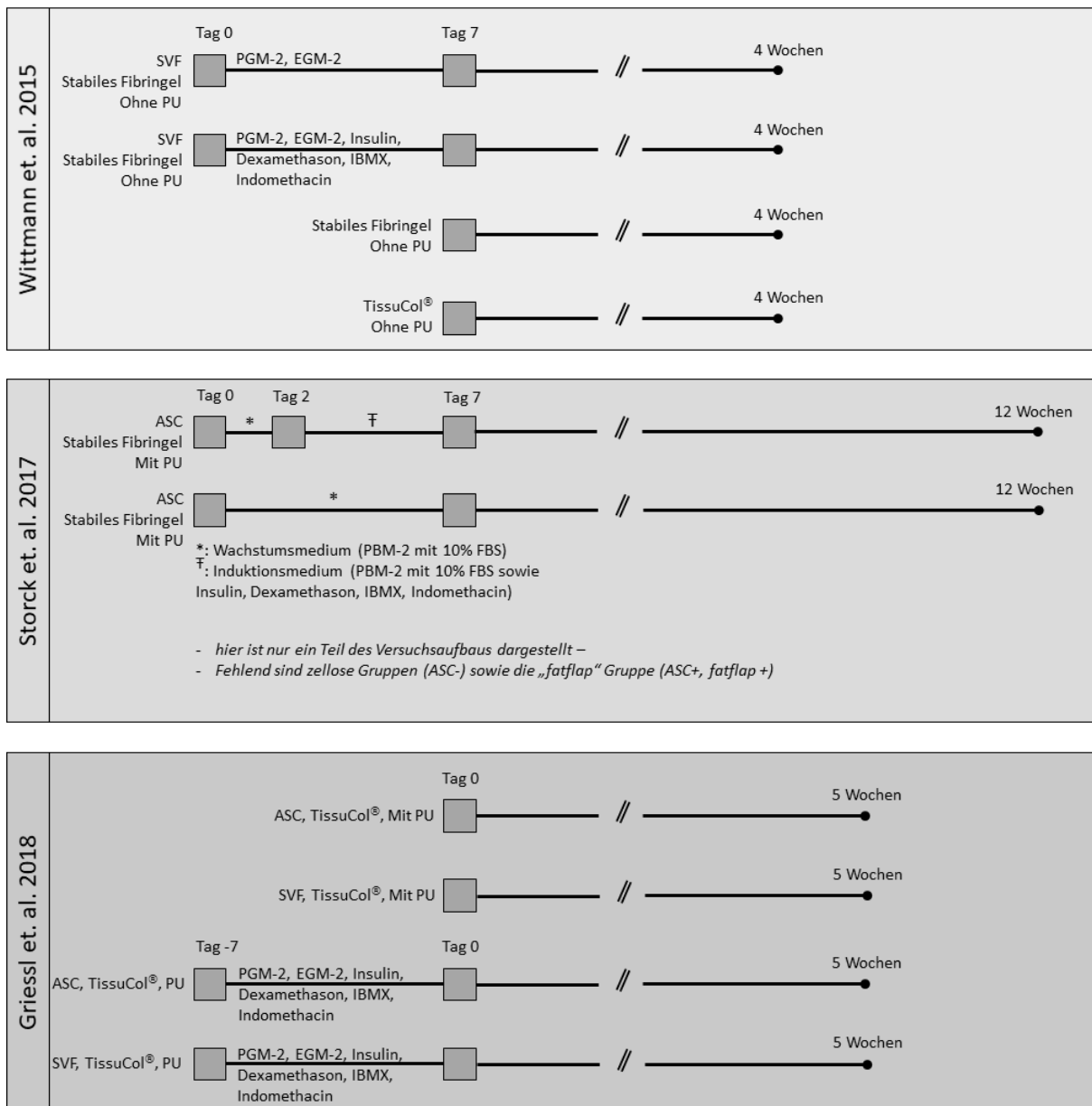


Abbildung 14: Vergleich von Versuchsaufbauten (in Ausschnitten)

Wittmann 2015 verzichteten auf klassische Träger wie zum Beispiel PU-Schwämme und verwendeten stabile Fibringele versetzt mit SVF-Zellen, welche entweder in einem pro-angiogenen und adipogenetischen Medium aus PGM-2 und EGM-2, oder zusätzlich mittels Insulin, Dexamethason, IBMX und Indomethacin vorkultiviert wurden. Der Implantationszeitraum betrug vier Wochen. Ebenso wurden zellulose Versuchsreihen aus reinen Fibrinkonstrukten im Mausmodell evaluiert (Wittmann et al., 2015). **Storck 2017** verwendeten PU-basierte Konstrukte mit in stabilem Fibringel gebetteten ASC, welche entweder mit einem pro-adipogenetischen Medium aus PBM-2 und 10 % fetal-bovine-serum (FBS), oder zusätzlich mittels Insulin, Dexamethason, IBMX und Indomethacin vorkultiviert wurden. Der Implantationszeitraum betrug zwölf Wochen (Storck et al., 2017). Der Versuchsaufbau von **Griessl 2018** ist im Material- und Methoden-Teil dieser Arbeit erläutert. Zusammenfassend wurden PU-basierte Konstrukte mit in TissuCol® gebetteten ASC oder SVF direkt in das Mausmodell implantiert oder mittels eines pro-adipogenetischen und pro-angiogenetischen Mediums unter Zusatz von induktiven Faktoren (Insulin, Dexamethason, IBMX und Indomethacin) vorkultiviert. Der Implantationszeitraum betrug fünf Wochen (Griessl et al., 2018) (Dieser Abbildung liegen Daten und Versuchsaufbauten der Quellen von Wittmann et al., 2015, Storck et al., 2017 und Griessl et al., 2018 zugrunde).

Unter Annahme des Bausteinprinzips (vgl. Punkt 4.2) war der primäre Gedanke der Vorkultur die Differenzierung der eingebrachten Zellen auf eine pro-angiogenetische und pro-adipogenetische Entwicklung. Die Untersuchungen von Weiser et al. und Fischbach et al. implizierten, dass die im Tissue-Engineering verwendeten Zellen einen initialen „commitment step“ nicht verpassen dürfen und somit eine Vorkultivierung dringend notwendig ist (Fischbach et al., 2004; Weiser et al., 2008). Storck et al. relativierten diese Theorie und zeigten mittels Anti-human-Vimentin-Färbung, dass ASC sowie induktive Vorkultur als Mediatoren der Einwanderung von Zellen des Empfängers dienen (Storck et al., 2017). Unter Annahme dieses Mediatorenmodells (Griessler et al., 2018; Storck et al., 2017) wurde in dieser Arbeit die Notwendigkeit einer Vorkultur und Induktion in Frage gestellt, da der beschriebene „commitment step“ im Kontext des Bausteinprinzips zwar relevant, im Kontext des Mediatorenmodells jedoch fraglich nötig ist.

In dieser Arbeit lässt sich feststellen, dass auch ohne Vorkultivierung und Induktion eine suffiziente Adipogenese stattfindet (Gruppe 1 und 2). Diese ist der durch Vorkultur und Induktion beeinflussten Fettgewebsentwicklung (Gruppe 3 und 4) überlegen (vgl. Abbildung 12). Dies bestätigt sich insbesondere im Vergleich zwischen unbehandelten und vorkultivierten/induzierten SVF-Zellen. Weiterhin zeigt sich, dass Vorkultivierung und Induktion auf die Entstehung von kapillären Netzwerken einen, wenn auch minimalen, positiven Einfluss haben (vgl. Abbildung 12).

Diese Ergebnisse scheinen auf den ersten Blick gegensätzlich zu den Schlussfolgerungen aus früheren Ergebnissen, die einen positiven Einfluss der adipogenen Induktion auf die Entstehung von Fettgewebe und einen negativen Einfluss auf die Angiogenese nahelegten (vgl. Punkt 1.2.2) (Wittmann et al., 2015). Jedoch ist kritisch anzumerken, dass der Versuchsaufbau bzgl. der verwendeten Trägermaterialien, der Hydrogele und die Implantationsdauer im Detail unterschiedlich sind, was einen direkten Vergleich schwierig macht (vgl. Abbildung 14) (Wittmann et al., 2015). Darüber hinaus unterscheiden sich die Arbeiten in der Zellherkunft und somit grundlegend in der Theorie bzgl. der Physiologie der Gewebeentstehung (vgl. Punkt 4.2) (Griessler et al., 2018).

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit müssen somit die bisherigen Erkenntnisse bezüglich Vorkultivierung in einem neuen Kontext gesehen werden:

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass auch ohne Vorbehandlung der eingebrachten, mediatorenzernierenden Zellen (ASC oder SVF) ausreichende Stimuli zur Entstehung von vaskularisierten Fettgewebsverbänden vorhanden sind. Durch Vorkultivierung verändert sich mit den CD-Profilen der Zellen im Zuge der Vorkultur das Profil der sezernierten Faktoren (Rehman et al., 2004; Yoshimura et al., 2006). Die Folge ist, dass sich weniger „host-derived fat cells“ im Konstrukt ansiedeln. Die Entstehung eines fundierten kapillären Netzwerks scheint davon nur minimal beeinträchtigt. Somit kann auf eine zeit- und kostenintensive Vorkultivierung verzichtet werden.

4.3.2 Auswahl der Trägermaterialien (PU und Fibrin)

Während, wie bereits unter Punkt 1.2.3 erwähnt, PU-Schwämme als bioresorbierbare, volumenstabile Strukturen evaluiert wurden (Wittmann et al., 2016), und darauf erfolgreich mit stabiler Fibrinformulierung und ASC in-vivo implantiert wurden (Storck et al., 2017), demonstrierten Wittmann et al. die Überlegenheit von TissuCol®-Fibrinformulierungen gegenüber den stabilen Formulierungen (Wittmann et al., 2015). Um somit Vitalität der SVF und Volumenstabilität der Konstrukte zu garantieren, kombinierten wir formerhaltende PU-Scaffolds mit zellfreundlichem, schnell abbaubaren TissuCol®.

Die Kombination von PU-basierenden Trägermaterialien und TissuCol®-Fibrinformulierungen hat im Bereich der ASC vielversprechende Ergebnisse hervorgebracht, wurde jedoch in Kombination mit der Zelllinie der SVF noch nicht in-vivo evaluiert (Storck et al., 2017; Wittmann et al., 2015; Wittmann et al., 2016).

Dies hat sich ebenfalls in dieser Arbeit als zielführende Kombination erwiesen, insbesondere war das verwendete Fibrin bei zunehmender Zahl an Adipozyten im Verband eines Fettpolsters in geringerem Umfang nachweisbar, je stärker die Adipogenese war. Somit unterstützt diese Fibrinformulierung den Umbauprozess zur Desintegration eingebrachter Zellen und die Entstehung empfängereigener Zellverbände.

Die gewünschten Eigenschaften der Kombination dieser Trägermaterialien bezüglich Volumenstabilität wurden bereits durch vorherige Arbeiten dargestellt (Wittmann et al., 2015), ebenso zeigten sich in dieser Arbeit makroskopische Volumen- und Formstabilität.

4.4 Limitationen

4.4.1 Vergleichbarkeit

Viele Studien inkl. dieser Arbeit unterscheiden sich bezüglich Trägermaterialien (PU und Fibrin), Zellauswahl (3T3-L1-Präadipozyten, ASC, SVF) und insbesondere der Vorkultur (vgl. Punkt 4.3.1 sowie Abbildung 14), was die generelle Vergleichbarkeit schwierig gestaltet. Deutlich erkennbar wird dies in Anbetracht der Ergebnisse, die sich zum Teil stark unterscheiden, einerseits im Einfluss der induktionsfaktorhaltigen Zellkultur, andererseits in der Herkunft der Zellen (Griessl et al., 2018; Storck et al., 2017; Wittmann et al., 2015).

4.4.2 Methodik

4.4.2.1 Implantationsstrategie

Bei der Betrachtung der Schnitte fällt auf, dass zwei verschiedene Morphologien von Gruppierungen von Adipozyten beschrieben werden können: Einerseits jene, die im Außenbereich des Konstrukts zu sehen sind, welche meist in Verbindung zu Fettpolstern außerhalb des definierten Konstruktbereichs (Umgebungsbereich) stehen. Darin sind sowohl reife, große Adipozyten als auch kleinere enthalten. Im Einklang mit den Ergebnissen der Vimentin-Antikörper-Färbung lässt dies die Vermutung zu, dass diese Zellen aus der Umgebung eingewachsen sind. Wiggenhauser et. al. haben hierzu in einem in-vivo-Experiment Silikonfolie um die implantierten Konstrukte installiert, um diese vor dem umgebenden Gewebe abzuschirmen (Wiggenhauser et al., 2012). Auch wenn diese nicht-bioabbaubaren Materialien, wie bereits erwähnt, verschiedene Nachteile mit sich bringen, ist dies ein interessanter Ansatz, um Objektivierbarkeit und Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Im Gegensatz zu dieser möglicherweise durch lokale Migration bedingten Adipogenese zeigen sich Ansammlungen von großen, reifen, siegelringförmigen Fettzellen eingebettet in Fibrin, welche aufgrund ihrer Lokalisation im Fibrin im Inneren des Konstruktes sowie Ihrer Vimentin-Negativität am ehesten hämatogene, migrierte Wirtszellen sind oder dem perivaskulären Fett des eingebrachten AV-Bundles entspringen.

Einerseits ist die Fragestellung nach der lokalen Herkunft der Zellen (von der Umgebung eingewachsen vs. hämatogen vs. perivaskuläres Fettgewebe) im Falle autologer Transplantationen zweitrangig, da die Ergebnisse der Entstehung von vaskularisierten Fettgewebsverbänden, unabhängig von der Herkunft, die entscheidende Zielgröße sind. Andererseits könnte die Zellherkunft für die klinische Anwendung eine Rolle spielen: Die

Transplantation eines präfabrizierten Lappens in ein fettreiches oder fettarmes Milieu hat einen Einfluss auf die Adipogenese des Konstrukts.

4.4.2.2 Weiterführende Methodik

Bezüglich der Theorie der Desintegration des eingebrachten Spendergewebes und der Integration von Empfängergewebe (vgl. Punkt 4.2) lässt sich in dieser wie in vielen Vorarbeiten nur eine Momentaufnahme darstellen. Um den Prozess und die Kinetik von Integration und Desintegration und somit Rückschlüsse auf die Einflussfaktoren zu erhalten, wäre eine Analyse der Gewebeveränderung vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Implantation wünschenswert. Ebenso sollte im Hinblick auf die Ergebnisse von Debels et al. das Ausmaß der Entzündung in einem Konstrukt zu einem bestimmten Zeitpunkt erfasst und, beispielsweise mittels CD-Differenzierung, die Anwesenheit von Makrophagen evaluiert werden (Debels et al., 2013).

4.4.3 Langzeit-Volumenstabilität

Die Volumenstabilität wurde bereits in Vorversuchen analysiert, jedoch waren diese Versuche immer in kurzfristigen Zeiträumen angesiedelt. Ein in-vivo-Versuch über den o. g. Zeitraum der PU-Desintegration (1–1,5 Jahre) hat bisher noch nicht stattgefunden (Wittmann et al., 2015; Wittmann et al., 2016) und wäre wünschenswert.

4.4.4 ASC, SVF und Tumorgenese

Die bereits erwähnten Eigenschaften der ASC, die Hemmung des körpereigenen immunologischen Schutzsystems gegen unkontrollierte Zellreaktion und -proliferation oder die Sekretion bestimmter Faktoren (wie z. B. VEGF bei der Angiogenese) kann, neben den gewünschten Effekten im Bereich des Tissue-Engineering, auch negative Effekte beinhalten. Beispielsweise konnten Wei et al. sowohl die Entstehung als auch das Fortschreiten von Brust- und Kolonkarzinomen durch zelluläre Interaktion zwischen Tumor- und ASC-Zellen zeigen. Involviert ist u. a. die durch Interaktion veränderte sekretorische Aktivität von IL-6, was zu Aktivierung pro-karzinogener Genexpression wie beispielsweise des „signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3)- Signalweges führt (H. J. Wei et al., 2015). In einer in-vivo-Mausstudie zeigten Wang et al. die Progression von Osteosarkomzellen unter lokalem Einfluss von ASC. Auch in dieser Studie ergab sich ein kausaler Zusammenhang der Tumorzellprogression mit der Aktivierung von STAT3 (Wang et al., 2017). Dieser, in Regulation von Zellwachstum und Apoptose involvierte Transkriptionsfaktor verstärkt bei Überaktivität

die Malignität von Tumoren. Hierbei sind diverse zelluläre Regulationsmechanismen involviert, beispielsweise die erhöhte Expression von VEGF und somit Tumor-Angiogenese (B. B. Aggarwal et al., 2009; Niu et al., 2002). Orecchioni et al. beschreiben in einer Studie mit Mammakarzinomzellen das Zusammenspiel von CD34-positiven Vorläuferzellen im Fettgewebe (entweder unpassagierte ASC oder endotheliale Progenitoren) als potente Kombination für die Entstehung von Tumoren. Während ASC beispielsweise das lokale Tumorwachstum beschleunigen, können endotheliale Vorläuferzellen die Bildung von Lymphknoten- und soliden Metastasen fördern (Orecchioni et al., 2013). Ähnliche Ergebnisse beschreiben Padura et al.: Nach Koinjektion von Brusttumorzellen und CD34-positiven Zellen aus menschlichem Fettgewebe in ein Mausmodell zeigte sich vermehrtes Tumorwachstum mit menschlichen, CD34-positiven Endothelzellen innerhalb der Tumore sowie prominentere Metastasierung. Die Gruppe führte die verstärkte Tumorentwicklung hauptsächlich auf lokale, nicht systemisch-lösliche Einflussfaktoren zurück (Martin-Padura et al., 2012).

Ein weiterer Faktor, der die Malignität von Tumoren unter Einfluss von ASC verstärken kann, ist deren Metastasierungswahrscheinlichkeit. Rowan et al. zeigten in einem Mausmodell, dass gemeinsame Applikation von ASC und dreifach-negativen MDA-MB-31-Brustzelltumorzellen (Tumorzellen, die weder Progesteron-, Östrogen- noch HER-2-Rezeptoren exprimieren) einen Zuwachs von pro-metastatischen Faktoren, wie Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) bedingt. Dieses Protein ist bei der Zersetzung von Extrazellulärmatrix beteiligt und dadurch in physiologischen Prozessen wie Wundheilung, Angiogenese sowie in pathologischen Prozessen wie Tumormetastasierung involviert (Rowan et al., 2014; Van den Steen et al., 2002). Bei einer weiteren Studie dieser Gruppe mit Cal-27-Plattenepithelkarzinom-Zellen ließ sich zwar weder in-vitro noch in-vivo ein durch ASC-Kokultur intensiviertes Tumorwachstum feststellen. Allerdings zeigten die Plattenepithelzellen unter ASC-Einfluss deutliche Tendenz zur Mikrometastasierung ins Gehirn (beurteilt mittels quantitativer Echtzeit-PCR). Vermehrte Expression von MMP-9 im Primärtumor sowie weitere Faktoren konnten hier ebenso detektiert werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ASC den frühen Metastasierungsprozess, zum Beispiel durch Loslösen der metastasierenden Tumorzellen vom Primärtumor, unterstützen (Rowan et al., 2016).

Jedoch scheint die pure An- bzw. Abwesenheit von ASC nicht der alleinige Triggerfaktor zu sein. Hillers et al. demonstrierten kürzlich, dass die Eigenschaften von ASC selbst (hinsichtlich Proliferations- und Differenzierungskapazität) sowie der Einfluss von ASC auf Tumorzellen

abhängig vom Stoffwechsel des ASC-Spenders zu sein scheint. ASC, welche aus adipösen Mäusen gewonnen wurden, zeigten das Wachstum größerer, invasiverer Tumore, was die Autoren der vermehrten Sezernierung von insulin-like growth factor-1 (IGF-1) zuwiesen (Hillers et al., 2018).

Im Gegensatz zu den besorgniserregenden in-vitro und in-vivo-Studien und den daraus resultierenden, möglichen pro-kanzerogenen Effekten von ASC, zeigten sich im klinischen Setting größtenteils unproblematische Transplantationen: Myckatyn et. al. stellten in einer Fall-Kontroll-Studie keine erhöhten Rezidiv-Raten für Patientinnen nach Mastektomie und sofortiger Brustrekonstruktion mittels Fetttransfer fest. Allerdings sind diese Daten durch das Fehlen von Informationen über die erfolgte Fetttransfer-Technik limitiert (Myckatyn et al., 2017). In einer Metaanalyse von über 4.000 Patienten aus 59 Studien konnten Krastev et al. kein erhöhtes Risiko für Lokalrezidive nach autologem Fetttransfer feststellen (Krastev et al., 2018). Allerdings sind die genannten Studien nicht mit reinen stammzellbasierten Rekonstruktionsmethoden durchgeführt worden. Auch im transplantierten autologen Fett sind ASC enthalten, allerdings in weitaus geringerer Konzentration mit folglich geringerem Einfluss auf mögliche residuale Tumorzellen. Bei alleiniger klinischer Anwendung von ASC- und SVF-Zellen zeigten sich ebenfalls keine Nebeneffekte, insbesondere zeigte sich keine Tumorgenese (Dykstra et al., 2017).

Jedoch ist der Einfluss von ASC- und SVF-Zellen auf residuale Tumorzellen nach fettgewebs- und/oder stammzellbasierten Rekonstruktionen nicht abschließend geklärt. Vor allem bestehen große Unterschiede in Abhängigkeit vom Primärtumor, dem Mikromilieu der Zellkultur und dessen Veränderung durch parakrine Aktivität der ASC, sowie Eigenschaften der ASC-Spender wie zum Beispiel body-mass-index (BMI) (Rowan et al., 2014; Rowan et al., 2016).

Die Diskrepanz zwischen in-vitro-Ergebnissen und klinischen Studien und die somit einhergehende Unsicherheit fassten Koellensperger et al. nach eingehender Untersuchung des Einflusses von ASC- auf Brustkrebs-Zellen zusammen (Koellensperger et al., 2017):

*"(...) ADSCs may strongly increase the risk of breast cancer tumor growth and metastasis in-vivo if administered to the vicinity of premalignant or malignant mammary cells."*² (Koellensperger et al., 2017).

Aufgrund dessen ist sowohl die Aufklärung und Einverständnis des Patienten, als auch die gründliche Untersuchung auf mögliche unvollständig entfernte bzw. unentdeckte Tumore wichtig (Koellensperger et al., 2017):

*"(...), it seems crucial to rigorously screen all patients for premalignant or residual lesions prior to the injection of fat, stem cell-augmented fat, or isolated ADSCs in the breast or adjacent tissues, to avoid a potential co-localization of ADSCs and BRCA."*³ (Koellensperger et al., 2017).

² (...) ADSC können das Risiko von in-vivo-Wachstum und Metastasierung von Brustkrebs stark steigern, falls sie in die Umgebung von prämaligen oder malignen Zellen der Brustdrüse appliziert werden (Übersetzung des Autors, Koellensperger et.al., 2017, Seite 17).

³ (...), scheint es essenziell, alle Patienten konsequent auf prämalige oder verbliebene Läsionen zu untersuchen, bevor Fett, mit Stammzellen angereichertes Fett oder isolierte ADSC in die Brust oder angrenzendes Gewebe injiziert wird, um ein mögliches Nebeneinander von ADSC und BRCA zu vermeiden (Übersetzung des Autors, Koellensperger et.al., 2017, Seite 18).

4.5 Ausblick

Im Hinblick auf die unter Punkt 4.1.1 und Punkt 4.1.1.2 aufgeführten Erkenntnisse liegt die Frage nahe, ob tatsächlich lediglich das Sekretionsprofil („secretome“) der eingebrachten Zellen (SVF oder ASC) bzw. dessen Veränderung durch die Vorkultivierung relevant ist, oder auch lokale Inflammation und die mediatorengetriggerte Rekrutierung von Makrophagen des – in dieser Arbeit – murinen Empfängers (Anghelina et al., 2006; Debels et al., 2013).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Forschung sich im Hinblick auf die klinische Translation der Erkenntnisse an einer möglichst einfachen, im therapeutischen Setting rasch und kostengünstig anwendbaren Lösung orientieren sollte. Somit ist die SVF ohne „Vorbehandlung“ aufgrund ihrer Zellzusammensetzung (Bourin et al., 2013), Inflammationskapazität (Anghelina et al., 2006; Debels et al., 2013) und ihrem Potential zu Adipo- und Angiogenese (vgl. Abbildungen 11 und 12; Punkt 4.1.2) die vielversprechendste Zellquelle für weitere Forschungsansätze.

Im Hinblick auf die Limitationen, insbesondere in Bezug auf die schwierige Vergleichbarkeit der einzelnen Studien, ist eine Standardisierung der Prozesse und des Materials und der Methoden wünschenswert. Wie schon Patrick et al. erwähnten, erschwert die Variation von Tiermodellen die Vergleichbarkeit der Daten rund um das Adipose-Tissue-Engineering, doch trifft dies vor allem auch auf Zellen, Vorkultur und Auswertungskonzepte zu (C. W. Patrick et al., 2008).

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit haben wir erfolgreich das bisherige Wissen von „adipose-derived stromal and stem cells (ASC)“-basiertem Tissue-Engineering auf eine andere Zellformulierung übertragen. Diese, die Stroma-Vaskuläre-Fraktion (SVF), beinhaltet die bisher verwendeten ASC. Im Gewinnungsprozess wird jedoch auf aufwendige Isolierung und Passagierung verzichtet. Somit enthält die SVF auch Zellen anderer Funktion, wie zum Beispiel vaskuläre Vorläuferzellen und Makrophagen (Bourin et al., 2013; Dykstra et al., 2017).

Zellbasierte Arbeiten im Bereich des Adipose-Tissue-Engineering unterscheiden sich in der Theorie des Zellursprungs: Fungieren eingebrachte Zellen als „Baustein“ der Gewebsentwicklung oder als Mediatoren, die das Einsprossen von Zellen des Empfängers und deren Entwicklung in organisierte Gewebeverbände dirigieren? Auf dem Weg zur klinischen Translation der in-vitro- und in-vivo-Versuche ist das Verständnis dieser grundlegend unterschiedlichen Physiologie der Gewebsentwicklung entscheidend.

In dieser Arbeit konnte mittels Vimentin-Färbung die in vorherigen Arbeiten angedeutete Mediatoren-Theorie erneut gestützt werden (Griessler et al., 2018; Stillaert et al., 2007; Storck et al., 2017). Argumente bezüglich der nötigen Differenzierung der eingebrachten Zellen zu deren Zielzelllinien rücken somit in den Hintergrund. Im Hinblick auf die klinische Translation, dem Streben nach einem durch Tissue-Engineering von autologen Fettstammzellen hergestellten, gestielten und sekundär transplantierbaren Gewebelappen, greifen unter Annahme des Mediatorenmodells mehrere Mechanismen Hand in Hand: Einerseits ein dynamischer Prozess, gelenkt durch Makrophagen und deren Fähigkeit zur Desintegration von Extrazellulärmatrix und konsekutiver Bildung von tunnelähnlichen Strukturen (Anghelina et al., 2004, 2006; Debels et al., 2013; Moldovan, 2002). Diese dient als Vorbereitung einer Neoangiogenese durch Zellen des Transplantatempfängers, getriggert durch passager anwesende Mediatoren-freisetzende Stammzellen (Anghelina et al., 2004, 2006; Debels et al., 2013; Griessler et al., 2018; Sakurai et al., 2003; Stillaert et al., 2007; Storck et al., 2017; Wittmann et al., 2015). Diese Neoangiogenese ist wiederum essenziell für die Entstehung von neuem, langfristig volumenstabilen Gewebe (Crandall et al., 1997; Hausman et al., 2004; Weiser et al., 2008).

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass sich reine, unbehandelte SVF-Zellen, gestützt durch den lokalen Einfluss von Makrophagen, als Ursprungsort parakriner Mediatoren zur Angio- und Adipogenese eignen und somit eine zeit- und kosteneffiziente Alternative darstellen (Griessl et al., 2018). Die Einfachheit der Isolation der SVF aus einem Liposuktionsprodukt, insbesondere mit automatisierten, klinisch anwendbaren Geräten (Aronowitz et al., 2016) und die somit wegfallende Passagierung der ASC-Zellen, birgt die Basis für die klinische Praktikabilität im Bereich des Tissue-Engineering. In anderen Fachbereichen hat diese klinische Praktikabilität bereits den Alltag erreicht (Cho et al., 2015; Gonzalez-Rey et al., 2010; Hillers et al., 2018; Michalek et al., 2019; Philandrianos et al., 2018).

In einer theoretischen Überlegung könnte ein derartiges klinisches Setting wie folgt ablaufen und wurde bereits in anderen Fragestellungen ebenso angewandt (Hillers et al., 2018): In einer initialen Sitzung wird dem Patienten, welcher beispielsweise eine Defektdeckung im Gesichtsbereich nach Trauma benötigt, minimalinvasiv Fett abgesaugt. Das Lipoaspirationsprodukt wird durch entsprechende, kommerziell erhältliche Geräte, wie zum Beispiel dem Celution® System der Firma Cytori, in 1,5 Stunden zur SVF prozessiert (Fraser et al., 2014; Hillers et al., 2018). Die gewonnene SVF wird dann auf zuvor an die Defektgröße und Form angepasste Trägermaterialien aufgebracht, diese werden implantiert und durch eine sekundär explantierbare Gefäßversorgung des Patienten perfundiert. Wenige Wochen später kann das Konstrukt über den gleichen operativen Zugang inklusive Blutversorgung geerntet und am benötigten Ort integriert werden, um eine volumenstabile Korrektur des Defekts zu erreichen. Während die Implantation derartiger Konstrukte im Tiermodell von unserer Arbeitsgruppe, wie bereits erwähnt, mehrfach erfolgreich durchgeführt wurde, zeigten Freiman et al. die Generierung eines derartigen Lappens in-vivo sowie dessen anschließende Transplantation zur Deckung von freiliegenden Knochen- und Sehnenanteilen am Knöchel und Bauchwanddefekten im Rattenmodell (Freiman et al., 2018).

6 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. B., Kunnumakkara, A. B., Harikumar, K. B., Gupta, S. R., Tharakan, S. T., Koca, C., Dey, S. and Sung, B. (2009). Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci*, 1171, 59-76. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04911.x
- Aggarwal, S. and Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815-1822. doi:10.1182/blood-2004-04-1559
- Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. and Mantovani, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev*, 222, 155-161. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00607.x
- Anghelina, M., Krishnan, P., Moldovan, L. and Moldovan, N. I. (2004). Monocytes and macrophages form branched cell columns in matrigel: implications for a role in neovascularization. *Stem Cells Dev*, 13(6), 665-676. doi:10.1089/scd.2004.13.665
- Anghelina, M., Krishnan, P., Moldovan, L. and Moldovan, N. I. (2006). Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles. *Am J Pathol*, 168(2), 529-541. doi:10.2353/ajpath.2006.050255
- Aronowitz, J. A., Lockhart, R. A., Hakakian, C. S. and Birnbaum, Z. E. (2016). Adipose Stromal Vascular Fraction Isolation: A Head-to-Head Comparison of 4 Cell Separation Systems #2. *Ann Plast Surg*, 77(3), 354-362. doi:10.1097/SAP.0000000000000831
- Awad, H. A., Halvorsen, Y. D., Gimble, J. M. and Guilak, F. (2003). Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng*, 9(6), 1301-1312. doi:10.1089/10763270360728215
- Balkwill, F. and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357(9255), 539-545. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0
- Basu, J., Genheimer, C. W., Rivera, E. A., Payne, R., Mihalko, K., Guthrie, K., Bruce, A. T., Robbins, N., McCoy, D., Sangha, N., Ilagan, R., Knight, T., Spencer, T., Wagner, B. J., Jayo, M. J., Jain, D., Ludlow, J. W. and Halberstadt, C. (2011). Functional evaluation of primary renal cell/biomaterial neo-kidney augment prototypes for renal tissue engineering. *Cell Transplant*, 20(11-12), 1771-1790. doi:10.3727/096368911X566172
- Bauer-Kreisel, P., Goepferich, A. and Blunk, T. (2010). Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(7-8), 798-813. doi:10.1016/j.addr.2010.04.003
- Bellas, E., Lo, T. J., Fournier, E. P., Brown, J. E., Abbott, R. D., Gil, E. S., Marra, K. G., Rubin, J. P., Leisk, G. G. and Kaplan, D. L. (2015). Injectable silk foams for soft tissue regeneration. *Adv Healthc Mater*, 4(3), 452-459. doi:10.1002/adhm.201400506
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K. and Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15(6), 641-648. doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.006
- Bucky, L. P. and Percec, I. (2008). The science of autologous fat grafting: views on current and future approaches to neoadipogenesis. *Aesthet Surg J*, 28(3), 313-321; quiz 322-314. doi:10.1016/j.asj.2008.02.004
- Bunnell, B. A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B. and Ripoll, C. (2008). Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45(2), 115-120. doi:10.1016/j.ymeth.2008.03.006

- Burghartz, M., Gehrke, T., Storck, K., Staudenmaier, R., Mandlik, V., Schurr, C., Hoang, N., Hagen, R. and Kleinsasser, N. (2015). Vascularization of engineered cartilage constructs in a mouse model. *Cell Tissue Res*, 359(2), 479-487. doi:10.1007/s00441-014-2026-2
- Chan, E. C., Kuo, S. M., Kong, A. M., Morrison, W. A., Dusting, G. J., Mitchell, G. M., Lim, S. Y. and Liu, G. S. (2016). Three Dimensional Collagen Scaffold Promotes Intrinsic Vascularisation for Tissue Engineering Applications. *PLoS One*, 11(2), e0149799. doi:10.1371/journal.pone.0149799
- Charles River Laboratories International, I. Immunodeficient Mice from Charles River Europe. PDF on Webpage. Retrieved from <https://p.widencdn.net/takzie/RM-immunodeficient-mice-poster> on 04.04.2020
- Cho, Y. B., Park, K. J., Yoon, S. N., Song, K. H., Kim, D. S., Jung, S. H., Kim, M., Jeong, H. Y. and Yu, C. S. (2015). Long-term results of adipose-derived stem cell therapy for the treatment of Crohn's fistula. *Stem Cells Transl Med*, 4(5), 532-537. doi:10.5966/sctm.2014-0199
- Crandall, D. L., Hausman, G. J. and Kral, J. G. (1997). A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation*, 4(2), 211-232. doi:10.3109/10739689709146786
- Cronin, K. J., Messina, A., Knight, K. R., Cooper-White, J. J., Stevens, G. W., Penington, A. J. and Morrison, W. A. (2004). New murine model of spontaneous autologous tissue engineering, combining an arteriovenous pedicle with matrix materials. *Plast Reconstr Surg*, 113(1), 260-269. doi:10.1097/01.PRS.0000095942.71618.9D
- Crop, M. J., Baan, C. C., Korevaar, S. S., Ijzermans, J. N., Pescatori, M., Stubbs, A. P., van Ijcken, W. F., Dahlke, M. H., Eggenhofer, E., Weimar, W. and Hoogduijn, M. J. (2010a). Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*, 162(3), 474-486. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04256.x
- Crop, M. J., Baan, C. C., Korevaar, S. S., Ijzermans, J. N., Weimar, W. and Hoogduijn, M. J. (2010b). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation. *Stem Cells Dev*, 19(12), 1843-1853. doi:10.1089/scd.2009.0368
- Cui, L., Yin, S., Liu, W., Li, N., Zhang, W. and Cao, Y. (2007). Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng*, 13(6), 1185-1195. doi:10.1089/ten.2006.0315
- Debels, H., Galea, L., Han, X. L., Palmer, J., van Rooijen, N., Morrison, W. and Abberton, K. (2013). Macrophages play a key role in angiogenesis and adipogenesis in a mouse tissue engineering model. *Tissue Eng Part A*, 19(23-24), 2615-2625. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0071
- Deng, M., Gu, Y., Liu, Z., Qi, Y., Ma, G. E. and Kang, N. (2015). Endothelial Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells on Polyglycolic Acid/Polylactic Acid Mesh. *Stem Cells Int*, 2015, 350718. doi:10.1155/2015/350718
- Deslex, S., Negrel, R., Vannier, C., Etienne, J. and Ailhaud, G. (1987). Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes*, 11(1), 19-27.
- Dhanasekaran, M., Indumathi, S., Harikrishnan, R., Mishra, R., Lissa, R. P., Rajkumar, J. S. and Sudarsanam, D. (2013). Human omentum fat-derived mesenchymal stem cells transdifferentiates into pancreatic islet-like cluster. *Cell Biochem Funct*, 31(7), 612-619. doi:10.1002/cbf.2948
- Dieudonne, M. N., Pecquery, R., Leneuve, M. C. and Giudicelli, Y. (2000). Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor

- and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *Endocrinology*, 141(2), 649-656. doi:10.1210/endo.141.2.7293
- Dragoo, J. L., Samimi, B., Zhu, M., Hame, S. L., Thomas, B. J., Lieberman, J. R., Hedrick, M. H. and Benhaim, P. (2003). Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br*, 85(5), 740-747.
- Dykstra, J. A., Facile, T., Patrick, R. J., Francis, K. R., Milanovich, S., Weimer, J. M. and Kota, D. J. (2017). Concise Review: Fat and Furious: Harnessing the Full Potential of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction. *Stem Cells Transl Med*, 6(4), 1096-1108. doi:10.1002/sctm.16-0337
- Ell, J., Regn, S., Buchberger, A. M., von Bomhard, A., Stark, T., Schantz, J. T. and Storck, K. (2017). Donor-dependent variances of human adipose-derived stem cells in respect to the in-vitro endothelial cell differentiation capability. *Adipocyte*, 6(1), 20-32. doi:10.1080/21623945.2016.1273299
- Eremia, S. and Newman, N. (2000). Long-term follow-up after autologous fat grafting: analysis of results from 116 patients followed at least 12 months after receiving the last of a minimum of two treatments. *Dermatol Surg*, 26(12), 1150-1158.
- Erickson, G. R., Gimble, J. M., Franklin, D. M., Rice, H. E., Awad, H. and Guilak, F. (2002). Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(2), 763-769. doi:10.1006/bbrc.2001.6270
- Ersek, R. A. (1991). Transplantation of purified autologous fat: a 3-year follow-up is disappointing. *Plast Reconstr Surg*, 87(2), 219-227; discussion 228.
- Eyrich, D., Brandl, F., Appel, B., Wiese, H., Maier, G., Wenzel, M., Staudenmaier, R., Goepferich, A. and Blunk, T. (2007). Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials*, 28(1), 55-65. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.08.027
- Farmer, S. R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, 4(4), 263-273. doi:10.1016/j.cmet.2006.07.001
- Fischbach, C., Spruss, T., Weiser, B., Neubauer, M., Becker, C., Hacker, M., Gopferich, A. and Blunk, T. (2004). Generation of mature fat pads in vitro and in vivo utilizing 3-D long-term culture of 3T3-L1 preadipocytes. *Exp Cell Res*, 300(1), 54-64. doi:10.1016/j.yexcr.2004.05.036
- Fraser, J. K., Hicok, K. C., Shanahan, R., Zhu, M., Miller, S. and Arm, D. M. (2014). The Celution(R) System: Automated Processing of Adipose-Derived Regenerative Cells in a Functionally Closed System. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 3(1), 38-45. doi:10.1089/wound.2012.0408
- Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z. and Hedrick, M. H. (2006). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 24(4), 150-154. doi:10.1016/j.tibtech.2006.01.010
- Frazier, T. P., McLachlan, J. B., Gimble, J. M., Tucker, H. A. and Rowan, B. G. (2014). Human adipose-derived stromal/stem cells induce functional CD4+CD25+FoxP3+CD127-regulatory T cells under low oxygen culture conditions. *Stem Cells Dev*, 23(9), 968-977. doi:10.1089/scd.2013.0152
- Freiman, A., Shandalov, Y., Rosenfeld, D., Shor, E., Ben-David, D., Meretzki, S., Levenberg, S. and Egozi, D. (2018). Engineering vascularized flaps using adipose-derived microvascular endothelial cells and mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 12(1), e130-e141. doi:10.1002/term.2436
- Frueh, F. S., Spater, T., Lindenblatt, N., Calcagni, M., Giovanoli, P., Scheuer, C., Menger, M. D. and Laschke, M. W. (2017a). Adipose Tissue-Derived Microvascular Fragments Improve Vascularization, Lymphangiogenesis, and Integration of Dermal Skin Substitutes. *J Invest Dermatol*, 137(1), 217-227. doi:10.1016/j.jid.2016.08.010

- Frueh, F. S., Spater, T., Scheuer, C., Menger, M. D. and Laschke, M. W. (2017b). Isolation of Murine Adipose Tissue-derived Microvascular Fragments as Vascularization Units for Tissue Engineering. *J Vis Exp*(122). doi:10.3791/55721
- Gimble, J. M., Katz, A. J. and Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, 100(9), 1249-1260. doi:10.1161/01.RES.0000265074.83288.09
- Gonzalez-Rey, E., Gonzalez, M. A., Varela, N., O'Valle, F., Hernandez-Cortes, P., Rico, L., Buscher, D. and Delgado, M. (2010). Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 69(1), 241-248. doi:10.1136/ard.2008.101881
- Grande, D. A., Breitbart, A. S., Mason, J., Paulino, C., Laser, J. and Schwartz, R. E. (1999). Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions. *Clin Orthop Relat Res*(367 Suppl), S176-185. doi:10.1097/00003086-199910001-00019
- Griessler, M., Buchberger, A. M., Regn, S., Kreutzer, K. and Storck, K. (2018). Uncultivated stromal vascular fraction is equivalent to adipose-derived stem and stromal cells on porous polyurethane scaffolds forming adipose tissue in vivo. *Laryngoscope*, 128(6), E206-E213. doi:10.1002/lary.27124
- Groen, J. W., Negenborn, V. L., Twisk, D., Rizopoulos, D., Ket, J. C. F., Smit, J. M. and Mullender, M. G. (2016). Autologous fat grafting in onco-plastic breast reconstruction: A systematic review on oncological and radiological safety, complications, volume retention and patient/surgeon satisfaction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 69(6), 742-764. doi:10.1016/j.bjps.2016.03.019
- Halvorsen, Y. C., Wilkison, W. O. and Gimble, J. M. (2000). Adipose-derived stromal cells--their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24 Suppl 4, S41-44. doi:10.1038/sj.ijo.0801503
- Han, T. T., Toutounji, S., Amsden, B. G. and Flynn, L. E. (2015). Adipose-derived stromal cells mediate in vivo adipogenesis, angiogenesis and inflammation in decellularized adipose tissue bioscaffolds. *Biomaterials*, 72, 125-137. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.08.053
- Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R. and Pfeiffer, E. F. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*, 84(5), 1663-1670. doi:10.1172/JCI114345
- Hauner, H., Schmid, P. and Pfeiffer, E. F. (1987). Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 64(4), 832-835. doi:10.1210/jcem-64-4-832
- Hausman, G. J. and Richardson, R. L. (2004). Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci*, 82(3), 925-934. doi:10.2527/2004.823925x
- Herly, M., Orholt, M., Glovinski, P. V., Pipper, C. B., Broholm, H., Poulsgaard, L., Fugleholm, K., Thomsen, C. and Drzewiecki, K. T. (2017). Quantifying Long-Term Retention of Excised Fat Grafts: A Longitudinal, Retrospective Cohort Study of 108 Patients Followed for Up to 8.4 Years. *Plast Reconstr Surg*, 139(5), 1223-1232. doi:10.1097/PRS.0000000000003237
- Hillers, L. E., D'Amato, J. V., Chamberlin, T., Paderta, G. and Arendt, L. M. (2018). Obesity-Activated Adipose-Derived Stromal Cells Promote Breast Cancer Growth and Invasion. *Neoplasia*, 20(11), 1161-1174. doi:10.1016/j.neo.2018.09.004
- Huber, B., Volz, A. C. and Kluger, P. J. (2015). Understanding the effects of mature adipocytes and endothelial cells on fatty acid metabolism and vascular tone in physiological fatty tissue for vascularized adipose tissue engineering. *Cell Tissue Res*, 362(2), 269-279. doi:10.1007/s00441-015-2274-9

- Ismail, T., Burgin, J., Todorov, A., Osinga, R., Menzi, N., Largo, R. D., Haug, M., Martin, I., Scherberich, A. and Schaefer, D. J. (2017). Low osmolality and shear stress during liposuction impair cell viability in autologous fat grafting. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 70(5), 596-605. doi:10.1016/j.bjps.2017.01.023
- Jackson Laboratory and Green, E. L. (1966). *Biology of the laboratory mouse* (2. ed.). New York u.a.: McGraw-Hill.
- Katz, A. J., Llull, R., Hedrick, M. H. and Futrell, J. W. (1999). Emerging approaches to the tissue engineering of fat. *Clin Plast Surg*, 26(4), 587-603, viii.
- Kazemi, D., Shams Asenjan, K., Dehdilani, N. and Parsa, H. (2017). Canine articular cartilage regeneration using mesenchymal stem cells seeded on platelet rich fibrin: Macroscopic and histological assessments. *Bone Joint Res*, 6(2), 98-107. doi:10.1302/2046-3758.62.BJR-2016-0188.R1
- Kim, J. H., Choi, S. C., Park, C. Y., Park, J. H., Choi, J. H., Joo, H. J., Hong, S. J. and Lim, D. S. (2016). Transplantation of Immortalized CD34+ and CD34- Adipose-Derived Stem Cells Improve Cardiac Function and Mitigate Systemic Pro-Inflammatory Responses. *PLoS One*, 11(2), e0147853. doi:10.1371/journal.pone.0147853
- Koellensperger, E., Bonnert, L. C., Zoernig, I., Marme, F., Sandmann, S., Germann, G., Gramley, F. and Leimer, U. (2017). The impact of human adipose tissue-derived stem cells on breast cancer cells: implications for cell-assisted lipotransfers in breast reconstruction. *Stem Cell Res Ther*, 8(1), 121. doi:10.1186/s13287-017-0579-1
- Krastev, T. K., Schop, S. J., Hommes, J., Piatkowski, A. A., Heuts, E. M. and van der Hulst, R. (2018). Meta-analysis of the oncological safety of autologous fat transfer after breast cancer. *Br J Surg*, 105(9), 1082-1097. doi:10.1002/bjs.10887
- Laschke, M. W., Kleer, S., Scheuer, C., Schuler, S., Garcia, P., Eglin, D., Alini, M. and Menger, M. D. (2012). Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater*, 24, 266-277. doi:10.22203/ecm.v024a19
- Lin, S. D., Huang, S. H., Lin, Y. N., Wu, S. H., Chang, H. W., Lin, T. M., Chai, C. Y. and Lai, C. S. (2011). Engineering adipose tissue from uncultured human adipose stromal vascular fraction on collagen matrix and gelatin sponge scaffolds. *Tissue Eng Part A*, 17(11-12), 1489-1498. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0688
- Lindroos, B., Suuronen, R. and Miettinen, S. (2011). The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev Rep*, 7(2), 269-291. doi:10.1007/s12015-010-9193-7
- Marino, G., Rosso, F., Ferdinando, P., Grimaldi, A., De Biasio, G., Cafiero, G., Barbarisi, M. and Barbarisi, A. (2012). Growth and endothelial differentiation of adipose stem cells on polycaprolactone. *J Biomed Mater Res A*, 100(3), 543-548. doi:10.1002/jbm.a.33296
- Martin-Padura, I., Gregato, G., Marighetti, P., Mancuso, P., Calleri, A., Corsini, C., Pruneri, G., Manzotti, M., Lohsiriwat, V., Rietjens, M., Petit, J. Y. and Bertolini, F. (2012). The white adipose tissue used in lipotransfer procedures is a rich reservoir of CD34+ progenitors able to promote cancer progression. *Cancer Res*, 72(1), 325-334. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1739
- McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Mitchell, J. B., Floyd, Z. E., Hammill, L., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Ting, J. P., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X. and Gimble, J. M. (2006). The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*, 24(5), 1246-1253. doi:10.1634/stemcells.2005-0235
- Michalek, J., Vrablikova, A., Darinskas, A., Lukac, L., Prucha, J., Skopalik, J., Travnik, J., Cibulka, M. and Dudasova, Z. (2019). Stromal vascular fraction cell therapy for osteoarthritis in elderly: Multicenter case-control study. *J Clin Orthop Trauma*, 10(1), 76-80. doi:10.1016/j.jcot.2018.11.010

- Mildmay-White, A. and Khan, W. (2017). Cell Surface Markers on Adipose-Derived Stem Cells: A Systematic Review. *Curr Stem Cell Res Ther*, 12(6), 484-492. doi:10.2174/1574888X11666160429122133
- Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X. and Gimble, J. M. (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, 24(2), 376-385. doi:10.1634/stemcells.2005-0234
- Mizuno, H., Tobita, M. and Uysal, A. C. (2012). Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*, 30(5), 804-810. doi:10.1002/stem.1076
- Mizuno, H., Zuk, P. A., Zhu, M., Lorenz, H. P., Benhaim, P. and Hedrick, M. H. (2002). Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg*, 109(1), 199-209; discussion 210-191. doi:10.1097/00006534-200201000-00030
- Moldovan, N. I. (2002). Role of monocytes and macrophages in adult angiogenesis: a light at the tunnel's end. *J Hematother Stem Cell Res*, 11(2), 179-194. doi:10.1089/152581602753658394
- Moreno-Navarrete, J. M. and Fernández-Real, J. M. (2012). Adipocyte Differentiation. In M. E. Symonds (Ed.), *Adipose Tissue Biology* (pp. 17-38). New York, NY: Springer New York.
- Murdoch, C., Muthana, M. and Lewis, C. E. (2005). Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol*, 175(10), 6257-6263. doi:10.4049/jimmunol.175.10.6257
- Myckatyn, T. M., Wagner, I. J., Mehrara, B. J., Crosby, M. A., Park, J. E., Qaqish, B. F., Moore, D. T., Busch, E. L., Silva, A. K., Kaur, S., Ollila, D. W. and Lee, C. N. (2017). Cancer Risk after Fat Transfer: A Multicenter Case-Cohort Study. *Plast Reconstr Surg*, 139(1), 11-18. doi:10.1097/PRS.0000000000002838
- Nam, Y., Rim, Y. A., Lee, J. and Ju, J. H. (2018). Current Therapeutic Strategies for Stem Cell-Based Cartilage Regeneration. *Stem Cells Int*, 2018, 8490489. doi:10.1155/2018/8490489
- Nguyen, A., Pasyk, K. A., Bouvier, T. N., Hassett, C. A. and Argenta, L. C. (1990). Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg*, 85(3), 378-386; discussion 387-379.
- Niu, G., Wright, K. L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., Heller, R., Ellis, L. M., Karras, J., Bromberg, J., Pardoll, D., Jove, R. and Yu, H. (2002). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 21(13), 2000-2008. doi:10.1038/sj.onc.1205260
- Orecchioni, S., Gregato, G., Martin-Padura, I., Reggiani, F., Braidotti, P., Mancuso, P., Calleri, A., Quarna, J., Marighetti, P., Aldeni, C., Pruneri, G., Martella, S., Manconi, A., Petit, J. Y., Rietjens, M. and Bertolini, F. (2013). Complementary populations of human adipose CD34+ progenitor cells promote growth, angiogenesis, and metastasis of breast cancer. *Cancer Res*, 73(19), 5880-5891. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0821
- Oses, C., Olivares, B., Ezquer, M., Acosta, C., Bosch, P., Donoso, M., Leniz, P. and Ezquer, F. (2017). Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. *PLoS One*, 12(5), e0178011. doi:10.1371/journal.pone.0178011
- Patrick, C. W., Jr. (2001). Tissue engineering strategies for adipose tissue repair. *Anat Rec*, 263(4), 361-366. doi:10.1002/ar.1113
- Patrick, C. W., Uthamanthil, R., Beahm, E. and Frye, C. (2008). Animal models for adipose tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 14(2), 167-178. doi:10.1089/ten.teb.2007.0402

- Petersen, E. D., Zenchak, J. R., Lossia, O. V. and Hochgeschwender, U. (2018). Neural Stem Cells Derived Directly from Adipose Tissue. *Stem Cells Dev*, 27(9), 637-647. doi:10.1089/scd.2017.0195
- Philandrianos, C., Serrero, M., Grimaud, F., Magalon, J., Visee, C., Velier, M., Francois, P., Orsoni, P., Magalon, G., Grimaud, J. C., Desjeux, A., Veran, J. and Sabatier, F. (2018). First clinical case report of local microinjection of autologous fat and adipose-derived stromal vascular fraction for perianal fistula in Crohn's disease. *Stem Cell Res Ther*, 9(1), 4. doi:10.1186/s13287-017-0736-6
- Planat-Benard, V., Silvestre, J. S., Cousin, B., Andre, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., Tedgui, A., Levy, B., Penicaud, L. and Casteilla, L. (2004). Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 109(5), 656-663. doi:10.1161/01.CIR.0000114522.38265.61
- Puissant, B., Barreau, C., Bourin, P., Clavel, C., Corre, J., Bousquet, C., Taureau, C., Cousin, B., Abbal, M., Laharrague, P., Penicaud, L., Casteilla, L. and Blancher, A. (2005). Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*, 129(1), 118-129. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x
- Radisic, M., Euloth, M., Yang, L., Langer, R., Freed, L. E. and Vunjak-Novakovic, G. (2003). High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Bioeng*, 82(4), 403-414. doi:10.1002/bit.10594
- Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., Pell, C. L., Johnstone, B. H., Considine, R. V. and March, K. L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109(10), 1292-1298. doi:10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1
- Reis, L. A., Chiu, L. L., Feric, N., Fu, L. and Radisic, M. (2016). Biomaterials in myocardial tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, 10(1), 11-28. doi:10.1002/term.1944
- Rodrigues, I. C. P., Kaasi, A., Maciel Filho, R., Jardini, A. L. and Gabriel, L. P. (2018). Cardiac tissue engineering: current state-of-the-art materials, cells and tissue formation. *Einstein (Sao Paulo)*, 16(3), eRB4538. doi:10.1590/S1679-45082018RB4538
- Rodriguez, J., Pratta, A. S., Abbassi, N., Fabre, H., Rodriguez, F., Debard, C., Adobati, J., Boucher, F., Mallein-Gerin, F., Auxenfans, C., Damour, O. and Mojallal, A. (2017). Evaluation of Three Devices for the Isolation of the Stromal Vascular Fraction from Adipose Tissue and for ASC Culture: A Comparative Study. *Stem Cells Int*, 2017, 9289213. doi:10.1155/2017/9289213
- Romeis, B., Mulisch, M. and Aescht, E. (2010). *Romeis Mikroskopische Technik* (18. Aufl. ed.). Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Rota, I. A. and Dhalla, F. (2017). FOXN1 deficient nude severe combined immunodeficiency. *Orphanet J Rare Dis*, 12(1), 6. doi:10.1186/s13023-016-0557-1
- Rowan, B. G., Gimble, J. M., Sheng, M., Anbalagan, M., Jones, R. K., Frazier, T. P., Asher, M., Lacayo, E. A., Friedlander, P. L., Kutner, R. and Chiu, E. S. (2014). Human adipose tissue-derived stromal/stem cells promote migration and early metastasis of triple negative breast cancer xenografts. *PLoS One*, 9(2), e89595. doi:10.1371/journal.pone.0089595
- Rowan, B. G., Lacayo, E. A., Sheng, M., Anbalagan, M., Gimble, J. M., Jones, R. K., Joseph, W. J., Friedlander, P. L. and Chiu, E. S. (2016). Human Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells Promote Migration and Early Metastasis of Head and Neck Cancer Xenografts. *Aesthet Surg J*, 36(1), 93-104. doi:10.1093/asj/sjv090
- Ruiz, J. C., Ludlow, J. W., Sherwood, S., Yu, G., Wu, X. and Gimble, J. M. (2010). Differentiated human adipose-derived stem cells exhibit hepatogenic capability in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*, 225(2), 429-436. doi:10.1002/jcp.22216

- Sakurai, E., Anand, A., Ambati, B. K., van Rooijen, N. and Ambati, J. (2003). Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(8), 3578-3585. doi:10.1167/iovs.03-0097
- Salcedo, R., Wasserman, K., Young, H. A., Grimm, M. C., Howard, O. M., Anver, M. R., Kleinman, H. K., Murphy, W. J. and Oppenheim, J. J. (1999). Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol*, 154(4), 1125-1135. doi:10.1016/s0002-9440(10)65365-5
- Saxer, F., Scherberich, A., Todorov, A., Studer, P., Miot, S., Schreiner, S., Guven, S., Tchang, L. A., Haug, M., Heberer, M., Schaefer, D. J., Rikli, D., Martin, I. and Jakob, M. (2016). Implantation of Stromal Vascular Fraction Progenitors at Bone Fracture Sites: From a Rat Model to a First-in-Man Study. *Stem Cells*, 34(12), 2956-2966. doi:10.1002/stem.2478
- Scherberich, A., Di Maggio, N. D. and McNagny, K. M. (2013). A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue. *World J Stem Cells*, 5(1), 1-8. doi:10.4252/wjsc.v5.i1.1
- Shim, Y. H. and Zhang, R. H. (2017). Literature Review to Optimize the Autologous Fat Transplantation Procedure and Recent Technologies to Improve Graft Viability and Overall Outcome: A Systematic and Retrospective Analytic Approach. *Aesthetic Plast Surg*, 41(4), 815-831. doi:10.1007/s00266-017-0793-3
- Silva, K. R., Cortes, I., Liechocki, S., Carneiro, J. R., Souza, A. A., Borojevic, R., Maya-Monteiro, C. M. and Baptista, L. S. (2017). Characterization of stromal vascular fraction and adipose stem cells from subcutaneous, preperitoneal and visceral morbidly obese human adipose tissue depots. *PLoS One*, 12(3), e0174115. doi:10.1371/journal.pone.0174115
- Silva, K. R., Liechocki, S., Carneiro, J. R., Claudio-da-Silva, C., Maya-Monteiro, C. M., Borojevic, R. and Baptista, L. S. (2015). Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women. *Stem Cell Res Ther*, 6, 72. doi:10.1186/s13287-015-0029-x
- Smahel, J. (1989). Experimental implantation of adipose tissue fragments. *Br J Plast Surg*, 42(2), 207-211. doi:10.1016/0007-1226(89)90205-1
- Stillaert, F., Findlay, M., Palmer, J., Idrizi, R., Cheang, S., Messina, A., Abberton, K., Morrison, W. and Thompson, E. W. (2007). Host rather than graft origin of Matrigel-induced adipose tissue in the murine tissue-engineering chamber. *Tissue Eng*, 13(9), 2291-2300. doi:10.1089/ten.2006.0382
- Storck, K., Fischer, R., Buchberger, M., Haller, B. and Regn, S. (2017). Delivered adipose-derived stromal cells improve host-derived adipose tissue formation in composite constructs in vivo. *Laryngoscope*, 127(12), E428-E436. doi:10.1002/lary.26694
- Suga, H., Matsumoto, D., Eto, H., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., Araki, J. and Yoshimura, K. (2009). Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 18(8), 1201-1210. doi:10.1089/scd.2009.0003
- Suzuki, E., Fujita, D., Takahashi, M., Oba, S. and Nishimatsu, H. (2015). Adipose tissue-derived stem cells as a therapeutic tool for cardiovascular disease. *World J Cardiol*, 7(8), 454-465. doi:10.4330/wjc.v7.i8.454
- Tasher, D. and Dalal, I. (2012). The genetic basis of severe combined immunodeficiency and its variants. *Appl Clin Genet*, 5, 67-80. doi:10.2147/TACG.S18693
- Torio-Padron, N., Baerlecken, N., Momeni, A., Stark, G. B. and Borges, J. (2007). Engineering of adipose tissue by injection of human preadipocytes in fibrin. *Aesthetic Plast Surg*, 31(3), 285-293. doi:10.1007/s00266-006-0221-6

- Tribe, H. C., McEwan, J., Taylor, H., Oreffo, R. O. C. and Tare, R. S. (2017). Mesenchymal Stem Cells: Potential Role in the Treatment of Osteochondral Lesions of the Ankle. *Biotechnol J*, 12(12). doi:10.1002/biot.201700070
- Tsuji, W., Inamoto, T., Yamashiro, H., Ueno, T., Kato, H., Kimura, Y., Tabata, Y. and Toi, M. (2009). Adipogenesis induced by human adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*, 15(1), 83-93. doi:10.1089/ten.tea.2007.0297
- Vaidya, H. J., Briones Leon, A. and Blackburn, C. C. (2016). FOXN1 in thymus organogenesis and development. *Eur J Immunol*, 46(8), 1826-1837. doi:10.1002/eji.201545814
- Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P. M., Dwek, R. A. and Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 37(6), 375-536. doi:10.1080/10409230290771546
- van Dongen, J. A., Tuin, A. J., Spiekman, M., Jansma, J., van der Lei, B. and Harmsen, M. C. (2018). Comparison of intraoperative procedures for isolation of clinical grade stromal vascular fraction for regenerative purposes: a systematic review. *J Tissue Eng Regen Med*, 12(1), e261-e274. doi:10.1002/term.2407
- Vogt, P. M. (2011). *Praxis der Plastischen Chirurgie: Plastisch-rekonstruktive Operationen - Plastisch-ästhetische Operationen - Handchirurgie - Verbrennungschirurgie*: Springer.
- Volz, A. C., Huber, B. and Kluger, P. J. (2016). Adipose-derived stem cell differentiation as a basic tool for vascularized adipose tissue engineering. *Differentiation*, 92(1-2), 52-64. doi:10.1016/j.diff.2016.02.003
- Volz, A. C., Huber, B., Schwandt, A. M. and Kluger, P. J. (2017). EGF and hydrocortisone as critical factors for the co-culture of adipogenic differentiated ASCs and endothelial cells. *Differentiation*, 95, 21-30. doi:10.1016/j.diff.2017.01.002
- von Heimburg, D., Hemmrich, K., Zachariah, S., Staiger, H. and Pallua, N. (2005). Oxygen consumption in undifferentiated versus differentiated adipogenic mesenchymal precursor cells. *Respir Physiol Neurobiol*, 146(2-3), 107-116. doi:10.1016/j.resp.2004.12.013
- von Heimburg, D., Zachariah, S., Heschel, I., Kuhling, H., Schoof, H., Hafemann, B. and Pallua, N. (2001). Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 22(5), 429-438. doi:10.1016/s0142-9612(00)00186-1
- Walton, R. L., Beahm, E. K. and Wu, L. (2004). De novo adipose formation in a vascularized engineered construct. *Microsurgery*, 24(5), 378-384. doi:10.1002/micr.20056
- Wang, Y., Chu, Y., Yue, B., Ma, X., Zhang, G., Xiang, H., Liu, Y., Wang, T., Wu, X. and Chen, B. (2017). Adipose-derived mesenchymal stem cells promote osteosarcoma proliferation and metastasis by activating the STAT3 pathway. *Oncotarget*, 8(14), 23803-23816. doi:10.18632/oncotarget.15866
- Wei, H. J., Zeng, R., Lu, J. H., Lai, W. F., Chen, W. H., Liu, H. Y., Chang, Y. T. and Deng, W. P. (2015). Adipose-derived stem cells promote tumor initiation and accelerate tumor growth by interleukin-6 production. *Oncotarget*, 6(10), 7713-7726. doi:10.18632/oncotarget.3481
- Wei, Y., Sun, X., Wang, W. and Hu, Y. (2007). Adipose-derived stem cells and chondrogenesis. *Cytotherapy*, 9(8), 712-716. doi:10.1080/14653240701620596
- Weichman, K. E., Broer, P. N., Tanna, N., Wilson, S. C., Allan, A., Levine, J. P., Ahn, C., Choi, M., Karp, N. S. and Allen, R. (2013). The role of autologous fat grafting in secondary microsurgical breast reconstruction. *Ann Plast Surg*, 71(1), 24-30. doi:10.1097/SAP.0b013e3182920ad0
- Weiser, B., Prantl, L., Schubert, T. E., Zellner, J., Fischbach-Teschl, C., Spruss, T., Seitz, A. K., Tessmar, J., Goepferich, A. and Blunk, T. (2008). In vivo development and long-

- term survival of engineered adipose tissue depend on in vitro precultivation strategy. *Tissue Eng Part A*, 14(2), 275-284. doi:10.1089/tea.2007.0130
- Wiese, H. and Meier, G. (2005). DE Patent No. WO/2006/032501. Patent No.: WO/2006/032501.
- Wiggenhauser, P. S., Muller, D. F., Melchels, F. P., Egana, J. T., Storck, K., Mayer, H., Leuthner, P., Skodacek, D., Hopfner, U., Machens, H. G., Staudenmaier, R. and Schantz, J. T. (2012). Engineering of vascularized adipose constructs. *Cell Tissue Res*, 347(3), 747-757. doi:10.1007/s00441-011-1226-2
- Wittmann, K., Dietl, S., Ludwig, N., Berberich, O., Hoefner, C., Storck, K., Blunk, T. and Bauer-Kreisel, P. (2015). Engineering vascularized adipose tissue using the stromal-vascular fraction and fibrin hydrogels. *Tissue Eng Part A*, 21(7-8), 1343-1353. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0299
- Wittmann, K., Storck, K., Muhr, C., Mayer, H., Regn, S., Staudenmaier, R., Wiese, H., Maier, G., Bauer-Kreisel, P. and Blunk, T. (2016). Development of volume-stable adipose tissue constructs using polycaprolactone-based polyurethane scaffolds and fibrin hydrogels. *J Tissue Eng Regen Med*, 10(10), E409-E418. doi:10.1002/term.1830
- Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., Sato, K., Inoue, K., Nagase, T., Koshima, I. and Gonda, K. (2006). Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*, 208(1), 64-76. doi:10.1002/jcp.20636
- Zhan, W., Tan, S. S. and Lu, F. (2016). Adipose-Derived Stem Cell Delivery for Adipose Tissue Engineering: Current Status and Potential Applications in a Tissue Engineering Chamber Model. *Stem Cell Rev Rep*, 12(4), 484-491. doi:10.1007/s12015-016-9653-9
- Zimmerlin, L., Rubin, J. P., Pfeifer, M. E., Moore, L. R., Donnenberg, V. S. and Donnenberg, A. D. (2013). Human adipose stromal vascular cell delivery in a fibrin spray. *Cytotherapy*, 15(1), 102-108. doi:10.1016/j.jcyt.2012.10.009
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P. and Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13(12), 4279-4295. doi:10.1091/mbc.e02-02-0105
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P. and Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2), 211-228. doi:10.1089/107632701300062859

7 Danksagung

Ein herzliches „Vergelt’s Gott“ an alle Personen, die das Zustandekommen dieser Arbeit unterstützt haben, sei es durch:

Aktive Beteiligung am Projekt, danke an:

PD Dr. K. Storck (geb. Hauber), für die Einführung in die Welt der Wissenschaft, das Projekt, die Betreuung und die gemeinsame Forschung

Prof. Dr. Rainer Staudenmaier, für die Betreuung der Arbeit als „Doktorvater“

Dr. S. Regn, dafür, dass du mir immer mit Rat und Tat zur Seite standest

Dr. R. Fischer, für die ersten, wichtigen Schritte

Prof. Dr. T. Blunk und PD Dr. K. Wittmann, für die professionelle Kooperation

Oder durch die wertvolle, moralische Unterstützung, danke An:

meine Familie, Marianne, Peter, Wolfgang und Nora Grießl

meine Partnerin, Maria B. Huber