

Adipose Tissue Engineering in Fibrin

von Susanne Dietl

Inaugural–Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Adipose Tissue Engineering in Fibrin

von Susanne Dietl
aus Pirna

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. C. Knospe

Angefertigt am Universitätsklinikum Würzburg
Zentrum für Operative Medizin
Hand-, Plastische- und Wiederherstellungschirurgie

Mentor: Prof. Dr. T. Blunk

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Prof. Dr. Clemens Knospe

Korreferent: PD. Dr. Marlon Schneider

Tag der Promotion: 06.02.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Fettgewebe	3
2.1.1. Aufbau und Struktur von Fettgewebe	3
2.1.2. Funktionen von Fettgewebe	4
2.1.3. Adipogenese	5
2.1.4. Vaskularisierung von Fettgewebe	6
2.2. Adipose tissue engineering	8
2.2.1. Zellen für das Adipose tissue engineering	11
2.2.2. Zellkultur in 2D und 3D	12
2.2.3. Fibringel als Matrix für das Adipose tissue engineering	14
3. Material und Methoden	16
3.1. Zellkultur	16
3.1.1. Zellkulturmedien	16
3.1.2. Isolation von SVF-Zellen und ASC aus Fettgewebe	17
3.1.3. 2D-Zellkultur	17
3.1.4. 3D-Sphäroide	18
3.1.5. MVEC	19
3.1.6. Fibringelkonstrukte	20
3.2. Analytik	22
3.2.1. Triglycerid Assay	22
3.2.2. DNA Assay	23
3.2.3. Leptin ELISA	25
3.2.4. Quantitative Polymerase Ketten Reaktion	25
3.2.5. Lebend-Tod Färbung	26
3.2.6. Fettflächenmessung	27
3.3. Histologie	27
3.3.1. Herstellung von Gefrierschnittpräparaten	27

3.3.2. Herstellung von Paraffinschnittpräparaten	28
3.3.3. Histologische Färbungen	29
3.4. Tierversuche	31
3.4.1. Versuchstiere	31
3.4.2. Implantation der Fibringelkonstrukte	32
3.4.3. Explantation der Fibringelkonstrukte	33
3.4.4. Histomorphometrie	33
3.5. Statistik	34
4. Ergebnisse	35
4.1. Adipogene Differenzierung von ASC in einer 2D- und 3D-Kultur in vitro	35
4.2. Adipogene Differenzierung von ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden in Fibrin in vitro	37
4.3. Endotheliale Differenzierung von ASC-Sphäroiden in Fibringel in vitro	43
4.4. ASC-MVEC Co-Kulturen in Fibringel in vitro	45
4.5. Stabilität sowie Fett- und Gefäßdichte von besiedelten Fibringelen in vivo	47
4.6. Adipogene Differenzierung von ASC-Einzelzellen und –Sphäroiden in vivo	51
4.7. Adipogene Differenzierung und Vaskulogenese von SVF-Zellen in vivo	56
5. Diskussion	60
5.1. 2D- und 3D-Zellkultur im Vergleich	60
5.2. Adipogene Differenzierung von ASC-Einzelzellen und –Sphäroiden in Fibrin in vitro	62
5.3. Prävasikularisierung der Fibrinkonstrukte	64
5.4. Validierung verschiedener Fibringele in vivo	65
5.5. ASC-Einzelzellen und –Sphäroide in Fibrin in vivo	68
5.6. SVF-Zellen in Fibrin für das Adipose tissue engineering	69
5.7. Ausblick	71
6. Zusammenfassung	74

7. Summary	76
8. Literaturverzeichnis	78
9. Anhang	93
9.1. Abkürzungsverzeichnis	93
9.2. Abbildungsverzeichnis	96
9.3. Tabellenverzeichnis	97
9.4. Danksagung	98

1. Einleitung

Der Fortschritt in der Forschung des *tissue engineerings* sowie verbesserte chirurgische Möglichkeiten haben neue therapeutische Konzepte für den Ersatz von Weichteilgewebe, wie Fett, vorangetrieben. Für große Weichteilgewebedefekte oder sehr komplizierte Verletzungen sind die derzeitigen Behandlungsoptionen noch sehr eingeschränkt und gehen mit deutlichen Nachteilen einher [1, 2]. Ziel des *adipose tissue engineerings* ist es transplantierbare Weichteilkonstrukte als funktionellen Gewebeersatz herzustellen, um den dringenden klinischen Bedarf zu decken. Bisherige Ansätze im *adipose tissue engineering* sind aber immer noch mit dem Problem der Volumenstabilität der generierten Gewebekonstrukte und mit der Etablierung geeigneter Vaskularisierungsstrategien für die Fettgewebekonstrukte konfrontiert [3-5].

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Bedingungen der Fibrin-Konstruktherstellung wie etwa die Kulturform der Zellen, die Art der Zellen, verschiedene Fibringelformulierungen und Prävaskularisierungsstrategien im Hinblick auf die Fettgewebeentwicklung in vitro und in vivo zu evaluieren, um ein volumenstabiles Fettgewebekonstrukt, welches sowohl für die in vitro Forschung als auch für eine spätere klinische Anwendung in der rekonstruktiven Medizin geeignet ist, herzustellen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden folgende Einzelziele bearbeitet:

Die Vorteile einer Sphäroidkultur gegenüber einer konventionellen 2D-Kultur konnten bereits anhand von 3T3-L1 Mauspräadipozyten in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden [6]. Es sollte überprüft werden, ob dies auch für humane primäre Zellen wie den mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe, den *adipose-derived stem cells* (ASC) gilt. Hierfür wurden ASC 3D-Sphäroide im Vergleich zu einer ASC 2D-Kultur hinsichtlich ihrer Adipogeneseigenschaften in vitro untersucht. Da Sphäroide erfolgreich als sogenannte *building blocks* für das *organ printing* eingesetzt werden [7, 8], wurde überprüft, ob Sphäroide auch als Gewebebausteine in einem Fibringel

zur Herstellung von Fettgewebekonstrukten geeignet sind. Dazu wurden die Adipogeneseeigenschaften von 3D-Sphäroiden und Einzelzellen in Fibringel in vitro und in vivo vergleichend untersucht. Zusätzlich wurden in vergleichenden in vivo Versuchen noch verschiedene Fibringelkompositionen ausgetestet, um das optimale Fibringel für die in vivo Anwendung zu evaluieren.

Eine rasche und ausreichende Vaskularisierung von künstlich hergestellten Gewebekonstrukten stellt immer noch eine große Herausforderung für das *tissue engineering* dar. Die Prävaskularisierung von Konstrukten könnte dieses Problem lösen [9]. Die Möglichkeit der Besiedelung der Fibringele sowohl mit mikrovaskulären Endothelzellen (*microvascular endothelial cells*, MVEC) als auch mit MVEC gemeinsam mit ASC zur Entwicklung von prävaskularisierten Konstrukten wurde hierzu untersucht.

In jüngster Zeit weckt die stromal-vaskuläre Fraktion (SVF) des Fettgewebes als neue, alternative Zellquelle für das *adipose tissue engineering* immer mehr das Interesse der Forschungsgemeinschaft [10]. Ob die SVF als neue Zellquelle für die Herstellung von Fibringelkonstrukten für das *adipose tissue engineering* geeignet ist und wie sich die SVF-Zellen im Vergleich zu ASC im Fibringel hinsichtlich ihrer Adipogenesefähigkeiten verhalten, sollte durch in vivo Experimente evaluiert werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Fettgewebe

2.1.1. Aufbau und Struktur von Fettgewebe

Es sind zwei verschiedene Typen von Fett in Säugetieren zu unterscheiden: Das braune und das weiße Fettgewebe. Das braune Fettgewebe ist nur im Säuglingsalter vorhanden und dient der Wärmeproduktion [25, 26]. Die aktuelle Forschung im Bezug auf Fettgewebe konzentriert sich, wie auch in dieser Arbeit, auf das weiße Fett. Daher ist bei Fett bzw. Fettgewebe in dieser Arbeit immer weißes Fettgewebe gemeint. Normalerweise bestehen bei Männern etwa 10-20% und bei Frauen 20-30% der Körpermasse aus Fett. Es kann in subkutanen (~80%) und viszerales (~20%) Fett eingeteilt werden [27]. Es ist in verschiedenen Depots über den ganzen Körper verteilt und hat dementsprechend unterschiedliche molekulare und physiologische Eigenschaften [25, 28]. Fettgewebe ist ein lockeres, hochvaskularisiertes Bindegewebe, dessen Masse zu 35-70% aus maturen Adipozyten besteht, die aber nur 25% der gesamten Zellzahl im Fettgewebe ausmachen. Neben den Adipozyten, enthält Fettgewebe die stromal-vaskuläre Fraktion, welche aus Makrophagen, Fibroblasten, Perizyten, Blutzellen, Endothelzellen, Fettvorläuferzellen zusammengesetzt ist [27]. Mature Adipozyten enthalten einen einzigen großen Fetttropfen, der 90% des Zellvolumens ausmacht, so dass der Zellkern flach nach außen an die Zellwand gedrückt wird und die typische univakuoläre Siegelring-Form entsteht. Bei sich entwickelnden Fettzellen hingegen können multiple kleine Fetttropfchen gefunden werden. Fettgewebe reagiert schnell auf Veränderungen im Nährstoffangebot mit Hyperplasie und Hypertrophie, wobei die Hypertrophie der Zellen in Vordergrund steht. Nur wenn die bestehenden Fettzellen eine kritische Größe

erreicht haben, kommt es zur Hyperplasie der Zellen [27, 29]. Die Räume zwischen den Zellen sind mit extrazellulär Matrix (ECM) gefüllt, welche von den Adipozyten selbst und der SVF produziert wird. Die ECM ist nicht nur ein Stützgerüst für die Zellen, sondern hat auch einen großen Einfluss auf die Differenzierung und Migration der Zellen durch Interaktionen mit deren Oberflächenrezeptoren [30-32].

2.1.2. Funktionen von Fettgewebe

Fettgewebe stellt vor allem ein Energiedepot des Körpers dar. Diese Energie, gespeichert in Form von Triglyceriden, wird während einer Nahrungskarenz in Form von freien Fettsäuren von verschiedenen Organen wie etwa Muskeln, Leber und Nieren verarbeitet. Neben dieser Rolle im Energiestoffwechsel dient Fettgewebe dem Körper noch als Isolierung gegen Wärmeverluste und an bestimmten Stellen des Körpers auch als mechanischer Schutz [27, 33, 34]. Mittlerweile weiß man aber, dass das Fettgewebe auch einen großen Einfluss auf viele physiologische Prozesse hat. Nicht nur der Energiestoffwechsel sondern auch das Fortpflanzungs- und Immunsystem, die Blutgerinnung, Fibrinolyse und Angiogenese werden beeinflusst. Hierfür sind sowohl die sogenannten Adipokine, zu denen Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Enzyme und Komplementfaktoren zählen, als auch Matrixproteine verantwortlich [27, 35, 36]. So hemmt z.B. das Hormon Leptin über einen negativen Feedbackmechanismus das Auftreten des Hungergefühls und regt den Energieverbrauch des Körpers an. Andere von Adipozyten sezernierte Faktoren, die den Energiestoffwechsel beeinflussen sind Adiponektin, das fatty acid binding protein 4 (FABP4), Apolipoprotein E, Glukokortikoide und noch viele weitere. Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6), Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) oder Angiotensinogen gehören zu den sezernierten Stoffen, die die Regulierung der Gefäßintegrität beeinflussen, und daher eine Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose spielen. Zu den sezernierten Wachstumsfaktoren zählen *insulin-like growth factor 1* (IGF-1),

nerve growth factor (NGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *transforming growth factor beta* (TGF- β) und *leukemia inhibitory factor* (LIF) [27, 37, 38].

2.1.3. Adipogenese

Die adipogene Differenzierung, oder auch Adipogenese genannt, findet nicht nur während der embryonalen Entwicklung sondern über die ganze Lebensspanne statt. Hierbei werden proliferierende, mesenchymale, fibroblastenähnliche Vorläuferzellen, die in der SVF beinhaltet sind, zu maturen Adipozyten, die mit Fett gefüllt sind. Nicht nur die Veränderung der Morphologie der Zellen oder die Zusammensetzung der ECM, sondern auch Veränderungen im Zellstoffwechsel sind dabei involviert [30, 39]. Die Adipogenese kann in zwei Phasen eingeteilt werden: die Determination und die terminale Differenzierung. In der ersten Phase, der Determination, werden aus pluripotenten Stammzellen sogenannte Präadipozyten, welche morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden sind. Jedoch besitzen die Präadipozyten keine Pluripotenz mehr [25]. Wie dieser Mechanismus funktioniert und von wem er kontrolliert wird, ist weitestgehend noch nicht bekannt [40]. In der zweiten Phase, der terminalen Differenzierung, nehmen die Präadipozyten die typischen Charakteristiken maturer Adipozyten an. Dank Untersuchungen an präadipozytären Mauszelllinien, wie 3T3-L1, humanen Präadipozyten und mesenchymalen Stammzellen ist dieser Teil der Differenzierung sehr gut erforscht und verstanden [25, 41]. Viele verschiedene Transkriptionsfaktoren spielen eine zentrale Rolle in diesem Prozess. Hier sind vor allem Mitglieder der *CCAAT/enhancer binding proteins* (CEBP)- und der Peroxisom Proliferator Aktivierende Rezeptoren (PPAR)- Familie zu nennen [25, 41, 42]. So kommt es in der sehr frühen Phase der terminalen adipogenen Differenzierung zur Expression vorallem von CEBP- β und CEBP- δ , welche wiederum für die Hochregulierung von PPAR- γ und CEBP- α verantwortlich sind. PPAR- γ und CEBP- α sind die zentralen Schlüsselfaktoren der Adipogenese [25, 43]. Die

dauerhafte Expression von PPAR- γ und CEBP- α ist für den typischen Phänotyp maturer Adipozyten verantwortlich [41, 44]. So triggern PPAR- γ und CEBP- α die Expression vieler anderer für Adipozyten spezifische Gene wie z.B. Glucosetransporter Typ 4 (GLUT4), FABP4, Leptin und weiterer [43]. Natürlich gibt es noch viele andere Faktoren, die eine Rolle während der Adipogenese spielen, auf die allerdings hier nicht weiter eingegangen werden soll. In der in vitro Zellkultur ist es möglich durch Verwendung von Induktoren die adipogene Differenzierung herbeizuführen. Die Zusammensetzung dieser Induktionscocktails variiert abhängig von den verschiedenen Zellkulturmodellen, beinhaltet aber in der Regel Insulin oder IGF-1, ein Glukokortikoid z.B. Dexamethason, einen Trigger, der die intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) Konzentrationen steigert, wie z.B. 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), und auch noch häufig einen PPAR- γ Liganden z.B. Indomethazin [30, 45]. Insulin und auch IGF-1 führen direkt zur Hochregulation der zentralen Schlüsselfaktoren der Adipogenese, nämlich von PPAR- γ und CEBP- α [46-48]. Dexamethason führt zur Expression von CEBP- δ und IBMX führt durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels zur Expression von CEBP- β , beides Faktoren der sehr frühen Adipogenese [49-52]. Indomethazin hingegen fungiert als direkter PPAR- γ Agonist [53].

2.1.4. Vaskularisierung von Fettgewebe

Fettgewebe wird durch ein engmaschiges Gefäßnetz versorgt, so dass jede einzelne Fettzelle an eine oder mehr Kapillaren angeschlossen ist [54, 55]. Da Fettgewebe im Laufe des Lebens ständigen Expansions- und Regressionprozessen unterworfen ist, muss sich dementsprechend das dazugehörige Gefäßnetz umbauen und neu bilden. Das heißt, dass die Angiogenese eng mit der Adipogenese verknüpft ist [56]. Während der embryonalen Entwicklung kommt es zur Neuformation von Gefäßen, indem sich bestimmte Vorläuferzellen zu Endothelzellen differenzieren. Dieser Vorgang wird Vaskulogenese genannt [57]. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der

Angiogenese um die Bildung neuer Gefäße aus bereits bestehenden. Dies geschieht in der Regel durch Ausknospung von Endothelzellen. Allerdings hat man in den letzten Jahren endotheliale Vorläuferzellen auch in adultem Knochenmark und im Blut gefunden, so dass man davon ausgeht, dass Vaskulogenese nicht nur in der embryonalen Entwicklung stattfindet, sondern auch eine Neovaskularisierung während des Erwachsenenlebens erlaubt [58]. Während der Angiogenese kommt es zu einem intensiven *cross-talk* zwischen vaskulären und periendothelialen Zellen sowie der extrazellulären Umgebung. Die Angiogenese wird durch eine gut abgestimmte Balance von pro- und antiangiogenen Faktoren, dem sogenannten angiogenen *switch*, geregelt [59]. So kommt es z.B. unter Hypoxie zur Dominanz von proangiogenen Faktoren und zur Aktivierung von ruhenden Endothelzellen, welche eine weitere Gefäßverästelung bedingen [57, 60]. Es gibt immer mehr Hinweise, dass (Prä-) Adipozyten und endotheliale Zellen über parakrine Signalwege, extrazellulär Komponenten und auch über direkte Zell zu Zell-Kontakte miteinander kommunizieren, um die Vaskularisierung des Fettgewebes voranzutreiben und zu steuern. Es ist bekannt, dass reife Adipozyten proangiogene Faktoren wie VEGF, IGF-1 und *basic fibroblast growth factor* (bFGF) produzieren [54, 55]. Aber auch ASC zeigen eine vermehrte Sekretion proangiogener Faktoren, wenn die geeigneten molekularen Stimuli, wie z.B. Hypoxie, vorhanden sind [61, 62]. Zudem sind auch Adipokine wie z.B. Leptin in die Modulation der Gefäßversorgung des Fettgewebes eingebunden. So konnte in vitro gezeigt werden, dass Leptin *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) zu Migration, Proliferation und *tube formation* veranlasst [63]. Des Weiteren stimuliert Leptin die Expression von VEGF und aktiviert Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2) und MMP-9. Diese Matrixmetalloproteinasen sind für den Ab- und Umbau der ECM verantwortlich, so dass Platz für die neu aussprossenden Gefäße geschaffen werden kann [54, 55, 64, 65].

2.2. Adipose tissue engineering

Ziel des *tissue engineering*s ist die Herstellung von transplantierbaren und physiologisch funktionierenden Geweben und Organen. Diese werden in der Medizin u.a. für Rekonstruktionen nach Gewebedefekten, zur Erhaltung von Organfunktionen oder für den Ersatz von Organen benötigt. Die artifizielle Herstellung von lebenden Geweben und Organen stellt aber auch biologische Modelle für Diagnostik- und Forschungszwecke bereit. Somit könnte die Anzahl von Tierversuchen verringert werden [11, 12]. Auch können durch das *tissue engineering* Erkenntnisse über die Entwicklung und Funktionen von Geweben gewonnen werden, welche möglicherweise auch für die Krebsforschung wichtig sein könnten [13]. Durch *adipose tissue engineering* im Speziellen sollen Fettgewebstransplantate für die rekonstruktive und plastische Chirurgie hergestellt werden. Auf Grund des Verlustes von Weichteilgewebe durch Unfälle, Operationen oder genetische Defekte werden Fettgewebstransplantate in der rekonstruktiven Medizin benötigt. Hier sind vor allem Rekonstruktionen nach Tumorresektionen zu nennen. Zudem würde Fettgewebe das ideale Füllmaterial für die plastische und ästhetische Chirurgie darstellen [14]. Des Weiteren könnten Probleme mit der Verträglichkeit, der Immunantwort und so, mit der Abstoßungsreaktion des Patienten, durch die Verwendung von autologen Fettgewebekonstrukten vermieden werden. Bisherige Methoden zur Anwendung von autologem Fettgewebe waren bisher aus verschiedensten Gründen nicht so erfolgreich wie gewünscht. So ist bei der Verwendung von muren Fettzellen aus Liposuktionen die Herstellung von Injektionspräparaten schwierig, da die muren Adipozyten dabei auf Grund ihrer Fragilität zerstört werden und verloren gehen. Nach Injektion treten dann zudem häufig Zysten, lokale Nekrosen und Absorption der Zellen auf, so dass die Behandlung wiederholt werden muss. Bei der Verwendung von Fettgewebstransplantaten kommt es in vielen Fällen wegen eines ungenügenden Gefäßanschlusses und somit einer schlechten Versorgung des Transplantates mit Sauerstoff und Nährstoffen zur Resorption [3, 14, 15]. Die Verwendung von Lappenplastiken umgeht die geschilderten Probleme. Allerdings ist das Verfahren sehr

kompliziert und kostenintensiv und führt bei den Patienten zu einer erhöhten Morbidität der Entnahmenstelle [3, 16]. Die Entwicklung von autologen Fettgewebstrukturen könnte daher eine neue Perspektive für die Rekonstruktion von Weichteilgewebedefekten bieten. Im *adipose tissue engineering* gibt es unterschiedliche Herangehensweisen zur Herstellung autologen funktionalen Fettgewebes. Meist werden *scaffolds*, die als Zellträger dienen, mit Fettvorläuferzellen besiedelt, in der Regel in vitro vorkultiviert und dann in vivo implantiert. Die verwendeten Zellträger sollten biokompatibel und abbaubar sein. Sie können aus synthetischen Polymeren, wie z.B. Polylactid-co-Glycolid (PLGA), hergestellt sein oder aus natürlichen Substanzen wie Kollagen oder Seide. Sowohl das Trägermaterial an sich als auch dessen physikalische Eigenschaften, wie die Porengröße und die Festigkeit, haben einen großen Einfluss auf das Verhalten der verwendeten Zellen. Daher müssen zur Entwicklung eines voll funktionsfähigen Gewebes die eingesetzten *scaffolds* für die jeweilig spezifische Anwendung optimiert werden. Neben diesen Materialien werden im Fett *tissue engineering* häufig auch Hydrogele als Zellträger verwendet. Vorteil der Gele ist, dass diese auch injizierbar sind und somit durch minimal invasive Verfahren implantiert werden können. Allerdings können auch durch Aushärtung der Gele in vitro feste, transplantierbare Gewebekonstrukte hergestellt werden. Zudem lassen sich diese Hydrogele gut mit stabilen Gerüsten zur Erhöhung der mechanischen Stabilität kombinieren. Synthetische Hydrogele aus Polyethylenglycol (PEG) und dessen Derivate oder aber auch natürliche Polymere wie Fibrin, Alginate oder Kollagen finden im *tissue engineering* eine häufige Anwendung [3, 14, 15]. Neben der Auswahl eines geeigneten Trägermaterials spielen die Zellen, die verwendet werden sollen, eine wichtige Rolle. Hier sind vor allem die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe (ASC) und die SVF zu nennen, beides Zellfraktionen, die aus dem Fettgewebe leicht isoliert werden können. Während die SVF direkt eingesetzt wird und eine sehr heterogene Zellpopulation darstellt, handelt es sich bei den ASC um eine homogene Zellpopulation, die durch Adhärenz an Zellkulturplatten und Vermehrung der adhärennten Zellen selektiert wird. Da beide Zellfraktionen leicht aus autologem Fettgewebe

gewonnen werden können, sind sie nicht immunogen. Zudem können sie durch einen hormonellen Cocktail adipogen induziert werden [3, 17, 18].

Eine der größten Herausforderungen im *tissue engineering* ist die ausreichende Vaskularisierung des hergestellten Gewebes zur Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Gerade Fettgewebe ist metabolisch sehr aktiv und somit stark vaskularisiert. Daher ist eine suffiziente Vaskularisierung von Fettgewebekonstrukten von größter Bedeutung. Findet keine rasche und gleichmäßige Blutgefäßversorgung statt, kommt es auf Grund von Nährstoff- und Sauerstoffmangel zu Nekrose, Resorption und ungleichmäßiger Differenzierung der Zellen [3, 19]. Derzeit gibt es unterschiedliche Ansätze, um die Vaskularisierung von Gewebekonstrukten zu verbessern. So soll z.B. die Beschaffenheit der *scaffolds* oder die Verwendung von angiogenen Faktoren im Konstrukt die Vaskularisierung der Transplantate verbessern und beschleunigen. Durch die in vitro Prävaskularisierung hingegen soll schon während der in vitro Kultivierung ein präformiertes Gefäßnetz im Gewebekonstrukt gebildet werden. Die Bildung eines prävaskulären Netzwerkes im Transplantat kann z.B. durch die Co-Kultivierung von ASC und endothelialen Zellen bewerkstelligt werden oder durch die Verwendung eines heterogenen Zellgemisches wie der SVF [3, 19-21]. Dieses Gefäßnetz muss dann in vivo nur noch Anschluss an das Gefäßsystem des Empfängers finden und bietet daher die Möglichkeit das gesamte Transplantat sehr rasch ausreichend zu durchbluten [22]. Da die Entwicklung von vaskularisiertem Fettgewebe ein hoch komplexer Vorgang ist und vom Zusammenspiel verschiedener involvierter Zellen abhängt, stellt die artifizielle Herstellung eines vaskularisierten Gewebekonstruktes eine große Herausforderung dar. Es muss das passende System hinsichtlich Material, in vitro Kultivierungsbedingungen und Art der verwendeten Zellen gefunden werden, welches eine funktionierende Adipogenese und die Bildung eines Gefäßnetzes ermöglicht [23, 24].

2.2.1. Zellen für das Adipose tissue engineering

Der Erfolg von artifiziell hergestellten Fettgewebekonstrukten hängt auch maßgeblich von den verwendeten Zellen ab. Da das Ziel schlussendlich die klinische Anwendbarkeit ist, sollten die Zellen autolog und damit nicht immunogen sein. Des Weiteren sollten die Zellen auch in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen und einfach zu gewinnen sein [3, 66]. Mature Adipozyten erfüllen diese Kriterien, sind aber auf Grund ihres Auftriebs und ihrer Fragilität, welche von ihrem hohen Fettgehalt und ihrer speziellen Morphologie herrühren, für die konventionelle Zellkultur nicht geeignet. Zudem haben diese Zellen ihre Proliferationsfähigkeit verloren [67, 68]. Eine alternative Zellquelle für die regenerative Medizin stellen hier Stammzellen dar. Dabei sind embryonale und adulte Stammzellen von einander zu unterscheiden [69, 70]. Embryonale Stammzellen sind pluripotent und besitzen eine hohe Proliferationsfähigkeit. Auf Grund von ethischen Bedenken und gesetzlichen Regelungen ist die Verwendung humaner embryonaler Stammzellen in der Forschung aber sehr limitiert [71-73]. Bei der Verwendung adulter Stammzellen hingegen kommen derartige ethische Bedenken oder gesetzliche Reglementierungen nicht zum Tragen. Diese adulten Stammzellen werden aus reifem Gewebe wie Knochenmark, Muskel, Fett, Leber und anderen Organen gewonnen, sind multipotent und besitzen eine hohe Proliferationsfähigkeit [73-75]. Zunächst wurde das Knochenmark als Quelle für adulte Stammzellen herangezogen, welche als *bone marrow stem cells* (BMSC) bezeichnet werden. Allerdings ist die Ausbeute an BMSC aus dem Knochenmark nur gering und auch die Gewinnung der BMSC ist schwierig und zudem risikoreich und schmerzhaft für den Spender [72, 75, 76]. In den letzten Jahren hat man erkannt, dass auch aus Fettgewebe mesenchymale Stammzellen wie ASC gewonnen werden können [66, 77]. Im Gegensatz zu anderen mesenchymalen Stammzellen sind ASC leicht und in sehr großer Zahl verfügbar, da sie aus Routineeingriffen, wie Liposuktionen, Abdominoplastiken und anderen plastischen Eingriffen isoliert werden können [78-80]. Sie sind genau wie BMSC multipotent und können in eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen, wie

Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Myozyten, Endothelzellen und Nervenzellen differenzieren [81, 82]. Durch den Verdau nativen Fettgewebes kann die SVF isoliert werden [83, 84]. Sie setzt sich aus ASC, Endothelzellen, Perizyten, Fibroblasten und anderen Zellen zusammen [10, 18]. Die ASC können dann aus diesem Zellpool, auf Grund ihrer Adhärenz Zellkulturplatten, durch konventionelle 2D in vitro Kultur selektiert werden [3, 85]. Auch nach mehrmaligem Passagieren bleibt ihnen ihre multipotente Differenzierbarkeit erhalten [86, 87]. In jüngster Zeit rückt die SVF immer mehr in den Fokus der Forschung für regenerative Medizin. Sie bietet den Vorteil aus nur einer Zellquelle einen heterogenen Zellpool gewinnen zu können. Vor allem im Hinblick auf die Vaskularisierung von artifiziell hergestellten Gewebekonstrukten scheint die SVF eine vielversprechende Zellpopulation zu sein. So wurden die SVF Zellen schon erfolgreich zur Wundheilung, Knorpelreperatur und zur Herstellung vaskularisierter Knochenersatzplastiken, sowohl in vitro als auch in vivo, eingesetzt [88-92]. Im *tissue engineering* von Fett gibt es bisher nur einzelne Untersuchungen zur Verwendung der SVF in vitro und in vivo [20, 93].

2.2.2. Zellkultur in 2D und 3D

In der Regel wachsen bei der konventionellen in vitro Zellkultur die Zellen flach als Monolayer auf einer Plastikplatte. Da aber natürliches, sich in einem Organismus befindliches Gewebe dreidimensional strukturiert ist, ist es offensichtlich, dass dieses konventionelle Kultursystem das zelluläre Umfeld, das in vivo existiert, nicht adäquat widerspiegeln kann [94, 95]. Während die Kultur von Zellen in 2D einfach und schnell durchzuführen ist, kann hierbei die Komplexität des in vivo Mikroumfeldes nicht dargestellt werden, so dass viele gewebespezifische Aspekte unter diesen vereinfachten Bedingungen verloren gehen. Dazu gehören der Einfluss der Extrazellulärmatrix, mechanische und biochemische Signale und die Zell zu Zell-Kommunikation auf dreidimensionaler Ebene. Man benötigt Zellkultur-Modelle, die das komplexe und dynamische Mikroumfeld lebender Gewebe besser nachahmen. Die

Forschungen der letzten 20 Jahre zeigen, dass Zellen, die dreidimensional kultiviert werden, die Kluft zwischen Zellkultur, Tiermodellen und physiologischem Gewebe schließen könnten [96, 97]. Eine Vielzahl von Studien an unterschiedlichen Zelltypen und mit unterschiedlichen Kultursystemen hat einen deutlichen Unterschied zwischen 2D- und 3D-Kulturmodellen hinsichtlich Zellfunktion und Zellverhalten zeigen können. Die Unterschiede wurden bei Morphologie, Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Zellen deutlich [95-99]. Einer der Vorteile der 3D-Kultursysteme ist das Vorhandensein einer ausgeprägten ECM. Diese spielt eine wichtige Rolle für die Spezifität des Mikroumfeldes, nicht nur durch ihre mechanischen Eigenschaften, sondern auch durch die Bindungsfähigkeit von Wachstumsfaktoren, Enzymen und anderer Moleküle [97, 100]. Daher ist die ECM für viele zelluläre Funktionen von großer Bedeutung, wie es z.B. auch schon für die Differenzierung von Fettgewebe gezeigt wurde [101, 102]. Nur Zell zu Zell- und Zell-ECM-Interaktionen gemeinsam ermöglichen ein wirkliches 3D-Kommunikationsnetzwerk, welches eine Schlüsselrolle bei der Zelldifferenzierung und -funktion spielt [7, 96, 97]. Es gibt verschiedene 3D-Kultursysteme, die heutzutage zur Anwendung kommen. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von scaffolds oder Hydrogelen, die mit Zellen besiedelt werden [3, 103]. Nachteilig hierbei ist z.B., dass die Zell zu Zell-Interaktionen, auf Grund fehlender Interzellularkontakte, zumindest zu Beginn der Kultur, immer noch sehr limitiert sind. Dieser Nachteil kann bei der Verwendung von Sphäroid-Kultursystemen wie der *liquid overlay* Technik oder der *hanging drop* Methode umgangen werden. Denn sofort nach Zusammenfindung der Zellen und der Bildung eines Sphäroids, ist ein direkter Zell zu Zell-Kontakt auf dreidimensionaler Ebene möglich [7, 104]. Sphäroide können auch im *tissue engineering* und in der regenerativen Medizin eingesetzt werden. Sie können direkt mittels Stammzelltherapie in die Läsion des Patienten transferiert werden oder eingebettet in Hydrogele wie z.B. Fibrin injiziert oder implantiert werden [7, 9, 105, 106]. Zudem ist beschrieben, dass Sphäroide auch als sogenannte *building blocks* zur Herstellung komplexer Gewebe in der *organ printing* Technik

verwendet werden können. Hierbei werden Sphäroide wie Bausteine aneinander gesetzt um dreidimensionale Gewebe herzustellen [7, 8].

2.2.3. Fibringel als Matrix für das Adipose tissue engineering

Mit Zellen besiedelte Hydrogele wie Fibrin sind zur Anwendung als *scaffolds* im *tissue engineering* sehr geeignet. Zum Einen können sie in fluider Form durch einen minimal invasiven Eingriff direkt in einen bestehenden Defekt injiziert werden, sich in die Form des Defektes einpassen und dort in situ gelieren, was die Narbenbildung und die Infektionsgefahr reduziert [107]. Zum Anderen kann man aus ihnen aber auch Konstrukte herstellen, die vor der Implantation für eine bestimmte Zeit, je nach Verwendung, in Kultur genommen werden können. Dank ihrer guten Biokompatibilität, ihrer Fähigkeit Zellen gleichmäßig in sich aufzunehmen und Matrixkomponenten zu binden, eignen sich Hydrogele im allgemeinen sehr gut für *tissue engineering* Zwecke. Auf Grund ihres hohen Wassergehaltes und ihrer mechanischen Eigenschaft, die der Textur von Weichteilgewebe entspricht, können Hydrogele das Mikroumfeld von Weichteilgewebe sehr gut rekapitulieren [108, 109]. Hydrogele können sowohl aus synthetischen Materialien, wie Polyethylenglykol oder PEG-Diacrylat (PEGDA), als auch aus natürlichen Polymeren hergestellt werden [107, 110]. Hydrogele aus natürlichen Polymeren, wie Kollagen, Alginat, Hyaluronsäure oder Fibrin, wurden bereits erfolgreich im *adipose tissue engineering* sowohl in vitro als auch in vivo eingesetzt [109, 111-114]. Fibrin im Speziellen, ist ein natürliches Polymer, welches am Ende der Blutgerinnungskaskade ein Blutgerinnsel bildet. Es hat eine gute Biokompatibilität und wurde u.a. schon im Bioengineering von Knochen, Knorpel, Fett, Haut und Sehnen verwendet [108, 115, 116]. Es wurde auch gezeigt, dass Fibrin die Angiogenese fördert, in dem es die endotheliale Entwicklung vorantreibt [117]. Das dreidimensionale Fibrinnetzwerk entsteht durch eine enzymatische Abspaltung, wobei durch Thrombin aus Fibrinogen das Fibrin entsteht. Die Festigkeit der so

entstandenen clots variiert in Abhängigkeit von der Fibrinogenkonzentration [116, 118, 119]. Da Fibrinogen ein Blutbestandteil der Gerinnungskaskade ist, kann Fibrin autolog aus Plasma gewonnen werden. So können Immunreaktionen und Infektionen nach autologer Implantation vermieden werden [108]. Neben seinen vielen vorteilhaften Eigenschaften besitzt Fibrin aber nur eine geringe mechanische Festigkeit und ist sehr schnell abbaubar, was den Einsatz als volumenstabiles *scaffold* nicht möglich macht [3, 120]. Allerdings konnte unsere Arbeitsgruppe durch Veränderung des Fibrinogengehaltes, des Ionengehaltes und des pH-Wertes, ein langzeitstabiles Fibringel entwickeln, welches sich für die Anwendung im *tissue engineering* von Knorpel bereits als geeignet herausstellte [121]. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend sollte, wie bereits erwähnt, in dieser Arbeit die Eignung des langzeitstabilen Fibringels für das *adipose tissue engineering* untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank und mit sterilen Utensilien durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte in einem Brutschrank inkubiert.

3.1.1. Zellkulturmedien

Vor Versuchsbeginn wurde zur Aufzucht und zum Passagieren der ASC ein Aufzuchtmedium aus DMEM/F-12 mit 10% fetalem Kälberserum (FBS, Lot 41G7795K) und 1% Penicillin-Streptomycin liquid (P/S), alles wurde von Life-technologies (Darmstadt) bezogen, verwendet.

Bei Versuchsbeginn wurde auf ein Basalmedium, bestehend aus PBM-2 (Lonza, Köln) plus 10% FBS und 1% P/S (beides Life-technologies, Darmstadt), gewechselt (im Weiteren als preadipocyte growth medium = PGM bezeichnet). Zur adipogenen Differenzierung der Zellen wurde ein adipogenes Induktionsmedium (AIM) aus PGM plus 1,7 mM Insulin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 500 µM IBMX (Serva, Heidelberg), 1 µM Dexamethason und 200 µM Indomethazin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) als Hormoncocktail verwendet.

Für die Aufzucht und die Versuche mit adulten humanen mikrovaskulären Endothelzellen (adult human dermal blood microvascular endothelial cells, MVEC, Lot 0000122821, Lonza, Verviers, Belgien) wurde das endothelial basal medium 2, versetzt mit 5% FBS, GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B), Hydrocortison, Vitamin C, EGF, VEGF, IGF und bFGF, (Lonza, Verviers, Belgien), im Weiteren endothelial growth medium (EGM) genannt, verwendet.

3.1.2. Isolation von SVF-Zellen und ASC aus Fettgewebe

Zur Durchführung der Experimente wurden SVF-Zellen und ASC aus humanem Fettgewebe isoliert. Für die Gewinnung der Zellen wurde abdominales Fett weiblicher Spender mit einem Durchschnittsalter von 36,3 Jahren (+/- 11,9) und einem BMI von 29,3 (+/- 3,3) aus Liposuktionen verwendet. Zu je 25 ml Fett wurden 15 ml eines sterilen 0,1% Collagenasepuffers (11,9 g HEPES; 3,5 g NaCl; 1,8 g KCl; 75 mg CaCl₂ und 0,495 g Glucose (alles von Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in 500 ml ddH₂O gelöst; pH 7,4) der 1,5% bovines Serum Albumin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) enthielt, hinzugefügt und bei 37 °C auf einem Orbitalschüttler bei 100 rpm für 1-2 Std. inkubiert. Um die verschiedenen Zellfraktionen von einander zu trennen, wurde zweimal nacheinander das verdaute Fettgewebe bei 311 g für 10 Min. zentrifugiert und die oben aufschwimmende gelbe Fettschicht abgesaugt. Nachdem das entstandene Pellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und durch ein 100 µm Zellsieb filtriert wurde, um unverdautes Gewebe zu entfernen, schloss sich ein dritter Zentrifugationsschritt mit 700 g für 10 Min. an. Das erhaltene Zellpellet, die sogenannte SVF, wurde in Aufzuchtmedium aus DMEM/F-12, 10% FBS (Lot 41G7795K, Lonza, Köln) und 1% Penicillin-Streptomycin liquid (Life-technologies, Darmstadt) suspendiert und entweder direkt in Zellkulturflaschen zur Aufzucht ausgesät oder zur Kryokonservierung mit 5% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versetzt und in flüssigem Stickstoff bei -196 °C weggefroren.

3.1.3. 2D-Zellkultur

Die durch den enzymatischen Verdau des Fettgewebes erhaltene SVF wurde zur Isolation der ASC in sterile Zellkulturflaschen mit Aufzuchtmedium ausgesät. 24 Std. nach Aussaat wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zwei-

dreimal mit phosphate-buffered saline (PBS, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen, um nicht anhaftende Zellen und Erythrozyten zu entfernen, und neues Aufzuchtmedium wurde hinzu gegeben. Generell wurde das Medium jeden zweiten bis dritten Tag gewechselt. Die so gewonnenen ASC wurden mit Passage 0 bezeichnet. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreicht hatten, wurden diese, nach einem Waschschrift mit PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), mit Trypsin-EDTA 0,25% (Life-technologies, Darmstadt) abgelöst, in Aufzuchtmedium suspendiert und 10 Min. bei 311 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in einem bestimmten Volumen an Medium suspendiert und mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer Zählkammer die Lebendzellzahl bestimmt. Sollten diese Zellen weiter expandiert werden, so wurden sie mit einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert (Abb. 1). Die Zellen wurden maximal bis zur Passage 4 expandiert. Für die Verwendung der Zellen in den später hergestellten Konstrukten wurden definierte Zellmengen aus der Suspension entnommen, zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt, so dass das reine Zellpellet zur Konstruktherstellung verwendet werden konnte.

3.1.4. 3D-Sphäroide

Zur Herstellung dreidimensionaler Zell-Sphäroide wurde die liquid-overlay Technik verwendet. Hierzu wurden die Kavitäten von 96 well plates mit 1,5% steriler Agaroselösung (Agarose for routine use von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, gelöst in DMEM/F-12 von Life-technologies, Darmstadt) beschichtet und vor Verwendung 2 Std. bei Raumtemperatur getrocknet. Die wells der äußersten Reihen wurden jeweils mit 200 µl PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 1% P/S (Life-technologies, Darmstadt) als Verdunstungsschutz gefüllt. Da in unseren Versuchen Sphäroide aus 5.000 Einzelzellen verwendet wurden, sind pro beschichteter Kavität 5.000 Zellen in 100 µl PGM eingesetzt worden. Nachdem die Kulturplatten 24 Std. auf einem Orbitalschüttler mit 50 rpm inkubiert wurden, hatten sich bereits stabile Sphäroide gebildet, die für die

Versuche verwendet werden konnten (Abb. 1). Die Sphäroide wurden mittels Multikanalpipette aus den Kavitäten gesaugt und in einer Petrischale mit PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gesammelt. Die benötigte Anzahl wurde dann mit einer Pasteurpipette aus Glas aus der Petrischale in ein Eppendorf Gefäß überführt und der Mediumüberstand wurde vorsichtig abgesaugt. Die 3D-Sphäroide konnten nun für die Herstellung der Konstrukte verwendet werden.

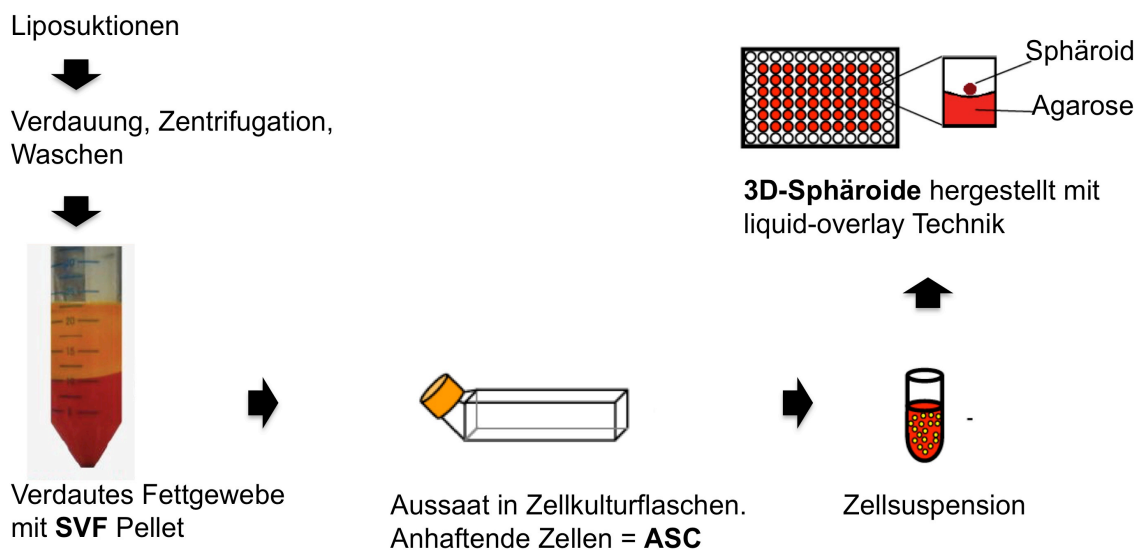


Abb. 1: Schema Zellkultur.

Aus Liposuktionen wurde mittels eines Verdauungs- und mehreren Zentrifugations- und Waschschritten die SVF isoliert. Durch Aussaat der SVF in Zellkulturflaschen konnten die ASC durch Adhärenz isoliert und expandiert werden. Aus einer ASC Zellsuspension konnten dann mit liquid-overlay Technik ASC-Sphäroide hergestellt werden.

3.1.5. MVEC

Zur Generierung von prävasikularisierten Konstrukten wurden MVEC (Lot 0000122821, Lonza ,Verviers, Belgien) verwendet. Die Zellen wurden in einer

Dichte von 5000 Zellen/cm² in sterilen Zellkulturflaschen unter Verwendung von EGM ausgesät und expandiert. Bei Erreichen von 90% Konfluenz wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin-EDTA (Life-technologies, Darmstadt) nach einem Waschschrift mit PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), abgelöst, in EGM suspendiert und 10 Min. bei 311 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in einem definierten Volumen suspendiert und mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer Zählkammer die lebend Zellzahl bestimmt. Sollten diese Zellen weiter expandiert werden, so wurden sie mit einer Dichte von 5000 Zellen/cm² ausgesät und bis zur Konfluenz weiter kultiviert. Die Zellen wurden maximal bis zur Passage 4 expandiert. Für die Verwendung der Zellen in den Konstrukten wurde eine bestimmte Zellmenge aus der Suspension entnommen, zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt, so dass das reine Zellpellet verwendet werden konnte.

3.1.6. Fibringelkonstrukte

In den in vitro Versuchen zur Adipogenese von ASC wurde ein modifiziertes langzeitstabiles Fibringel zur Herstellung der Konstrukte verwendet. Die Herstellung der Fibringelkonstrukte erfolgte mit Hilfe einer Fibrinogen- und einer Thrombinkomponente nach folgendem Schema: In einer sterilen Aprotininlösung (10.000 KIE/ml), welche aus Aprotinin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gelöst in 25% NaCl (B. Braun, Melsungen und Sigma-Aldrich, Taufkirchen) hergestellt worden war, wurde bovines Fibrinogen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) so gelöst, dass eine sterile 100 mg/ml Fibrinogenlösung entstand. Sollten Konstrukte mit einer anderen Fibrinogenkonzentration hergestellt werden, wurde mittels Verdünnungsreihe die dementsprechende Fibrinogenlösung produziert (Tab. 1). Als zweite Komponente wurde eine sterile Thrombinlösung (in der Regel mit 200 U/ml) hergestellt. Dazu wurde thrombine from bovine plasma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einem thrombin dilution buffer (TDB; 4,44 mg/ml CaCl₂, 10 mg/ml NaCl, 3,0 mg/ml Glycin und steriles Aqua ad iniectionabilia, Sigma-Aldrich, Taufkirchen und B. Braun, Melsungen)

gelöst. Zur Fertigung der Gele wurde je ein steriler Glasring (Innendurchmesser 5 mm) in eine Kavität einer 12 well Platte gestellt. In jeden Ring wurden 20 µl der Fibrinogenlösung vorgelegt. Je nach Konstrukt wurde entweder das Zellpellet der Einzelzellen oder die abgezählten Sphäroide in 20 µl Thrombinlösung suspendiert, in eine Pipettenspitze möglichst ohne Luftblasen aufgenommen und unter zügigem mehrmaligem Auf- und Abpipettieren mit dem vorgelegten Fibrinogen gemischt ohne den Glasring zu verrücken. Zum Aushärten der Fibringele wurden diese 45-60 Min. bei 37 °C gelagert. Nach dem Entfernen der Glasringe wurden pro well und Gel 2 ml des entsprechenden Mediums dazu pipettiert und die Gele mit einem Spatel vorsichtig vom Boden gelöst. Die entstandenen Konstrukte hatten eine Höhe von 2 mm, einen Durchmesser von 5 mm und ein Volumen von 40 mm³ (Abb. 2). Während der weiteren Kultivierung standen die Kulturplatten mit den Fibringelen auf einem Orbitalschüttler bei 50 rpm.

Für die in vivo Versuche wurden auch Konstrukte mit einer Fibrinkomponente eines kommerziell erhältlichen Fibrinklebers (Tissucol-Kit 1,0 Immuno von Baxter, Unterschleißheim) hergestellt (Tab. 1). Die Konstrukte wurden nach oben beschriebener Prozedur mit 200 U/ml Thrombin hergestellt.

Fibrinkonzentration im Konstrukt	50 mg/ml	25 mg/ml	12,5 mg/ml	Fibrinkleber 35-55 mg/ml
Zur Herstellung verwendete Fibrinogenlösung	100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	Tissucol 1,0 70-110 mg/ml
Zur Herstellung verwendete Thrombinlösung	5 bzw. 200 U/ml	200 U/ml	200 U/ml	200 U/ml

Tab. 1: Zusammensetzung hergestellter Fibrinkonstrukte.

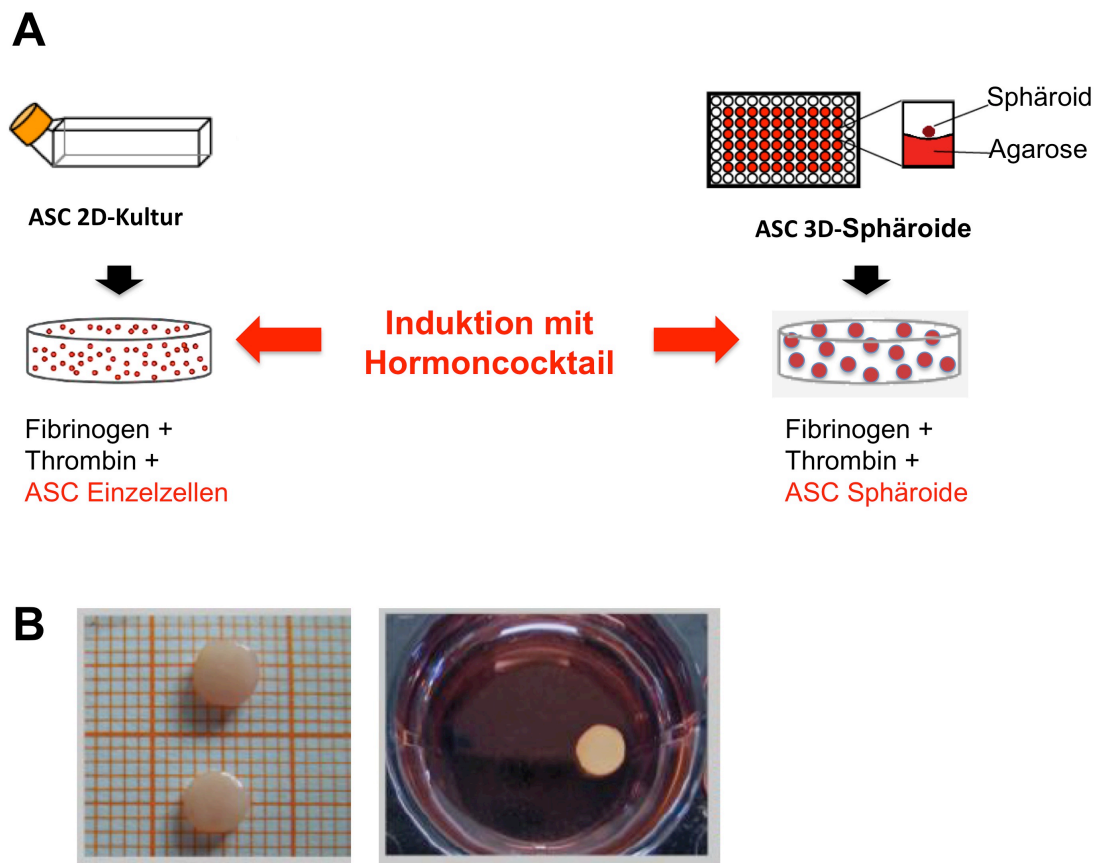


Abb. 2: Herstellung der Fibringelkonstrukte.

(A) Schema der Fibringelkonstruktherstellung mit ASC-Einzelzellen und –Sphäroiden. (B) Fertig generierte Fibringele mit 5 mm Durchmesser und einer Höhe von 2 mm.

3.2. Analytik

3.2.1. Triglycerid Assay

Der Triglyceridgehalt der verschiedenen Konstrukte wurde mit Hilfe eines Triglycerid Assays (TGA) unter Verwendung des Serum Triglycerid Determination Kits (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gemessen. Für jede untersuchte Gruppe lag der Stichprobenumfang generell bei $n=3$. Eine Kalibriergerade mit Glycerol Standard Solution (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

wurde bei jeder Messung mitgeführt (Tab. 2). Die Proben wurden mit PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen, jeweils in einem Eppendorfgefäß mit 500 µl einer 0,5% Thesitlösung (Thesit Substanz (Gepepharm, Hennef) aufgenommen und mittels TissuLyser (Qiagen, Hilden) und Ultraschall zerschlagen. Nun wurden Standards und Proben im Doppelansatz zu je 20 µl in eine 96 well Platte pipettiert und zu jedem well 200 µl des Arbeitsreagenzes, bestehend aus vier Teilen Glycerolreagenz und einem Teil Triglyceridreagenz, zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min. bei Raumtemperatur wird ein violetter Farbumschlag sichtbar. Die Vermessung der Proben wurde mittels MRX Microplate Reader bei 570 nm und der Software Biolinx (beides Dynatech Laboratories, Texas, USA) durchgeführt.

µl Glycerol- Standard (0,26 mg/ml)	µl Thesitlösung (1%)	µl ddH ₂ O	µg Glycerol (in 20 µl)	Entspricht µg Triolein (in 20 µl)
0	40	40	0	0
3	40	37	0,195	1,875
5	40	35	0,325	3,125
10	40	30	0,65	6,25
20	40	20	1,3	12,5
30	40	10	1,95	18,75
40	40	0	2,6	25

Tab. 2: Zusammensetzung der Standards im TGA.

3.2.2. DNA Assay

Um die gemessenen Triglyceridwerte auf einen entsprechenden DNA Wert und damit auf die Zellzahl normalisieren zu können, wurde ein auf Fluoreszenz

basierender DNA Assay durchgeführt. Eine Kalibriergerade mit einer DNA-Standardreihe (Deoxyribonucleic acid–cellulose double-stranded from calf thymus von Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde bei jeder Messung mitgeführt (Tab. 3). Für jede untersuchte Gruppe lag der Stichprobenumfang generell bei $n=3$. Die Proben wurden mit PBS gewaschen, jeweils in 500 μl P-Saline Puffer (193,4 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 540 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 74,4 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 11,68 g NaCl auf 100 ml ddH₂O aufgefüllt; pH 7,4) aufgenommen und mittels TissuLyser (Qiagen, Hilden) und Ultraschall zerschlagen. Nun wurden Standards und Proben im Doppelansatz zu je 10 μl in eine schwarze 96 well Platte pipettiert und zu jedem well 200 μl der Hoechst-Worksolution bestehend aus 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258 von Polysciences Inc., Eppelheim gelöst in 10XTEN-Puffer (2,9 g NaCl, 0,186 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 97 mg Trizma-base und 0,661 g Trizma-HCL, alle bezogen von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, in 500 ml ddH₂O; pH 7,4) zugegeben. Die Vermessung der Proben wurde direkt nach Zugabe der Farbstofflösung am Fluorescence Reader Genios pro (Tecan, Crailsheim) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm mit dem Programm Magellan (Tecan, Crailsheim) durchgeführt.

μl DNA-Standard (26,6 $\mu\text{g/ml}$)	μl P-Saline Puffer
0	100
2	98
5	95
10	90
20	80
40	60
60	40
80	20

Tab. 3: Zusammensetzung der Standards im DNA Assay.

3.2.3. Leptin ELISA

Der Quantikine Human Leptin Immunoassay (R&D, Abingdon, UK) wurde verwendet, um das von Adipozyten sezernierte Hormon Leptin in den Zellkulturmedien zu messen. Der ELISA wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt und wird im Folgenden kurz beschrieben. Als Untersuchungsproben wurden die Zellkulturüberstände an Tag 21 abgenommen und bei 13200 rpm zentrifugiert. Eine Leptinstandardreihe wurde mitgeführt. Nachdem in jede benötigte Kavität 100 µl des Diluent RD1-19 pipettiert wurde und jeweils 100 µl des Standards oder der Probe hinzugefügt worden war, schloss sich eine Inkubationszeit von 2 Std. bei Raumtemperatur an. Nach viermaligem Waschen der Kavitäten mit dem dazugehörigen Waschpuffer, wurde in jedes well 200 µl des Leptin Conjugats gegeben, welches man 1 Std. bei Raumtemperatur inkubieren ließ. Die Inkubation wurde durch viermaliges Waschen abgebrochen und jede Kavität wurde mit 200 µl der Substrate Solution befüllt, welche lichtgeschützt 30 Min. bei Raumtemperatur inkubierte. Die Reaktion wurde mit je 50 µl der Stop Solution angehalten. Die Messung der optischen Dichte erfolgte innerhalb der nächsten 30 Min. und wurde mit dem MRX Microplate Reader bei 450 nm und der Software Biolinx (beides Dynatech Laboratories, Texas, USA) durchgeführt.

3.2.4. Quantitative Polymerase Ketten Reaktion

Zur Untersuchung der Genexpression verschiedener adipogener Markergene wurde eine quantitative Polymerase Ketten Reaktion (qPCR) durchgeführt. Hierzu wurden die Konstrukte in PBS gewaschen, jeweils in 1 ml Trizol Reagent (Life-technologies, Darmstadt) aufgenommen und mittels TissueLyser homogenisiert. Die RNA wurde nach Herstellerangabe mit Chloroform (Merck, Darmstadt) und 2-Propanol für die Molekularbiologie (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) isoliert. Die RNA-Konzentration der erhaltenen Flüssigkeit wurde

am NanoDrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) gemessen. Das ImProm II Reverse Transcription System (Promega, Mannheim) wurde nach Herstellerangabe für die darauffolgende reverse Transkription der totalen RNA in cDNA verwendet. Die real time qPCR wurde ebenso nach Herstellerangabe mit dem MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec, Köln) an einer DNA Engine Opticon 2 (MJ Research, St. Bruno, Kanada) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 95 °C für 15 Min. gefolgt von 40 Zyklen jeweils bei 95 °C für 15 Sek., 55 °C für 30 Sek. und 72 °C für 30 Sek. Bei jedem PCR Lauf wurde eine Schmelzkurvenanalyse von 74 °C bis 89 °C mitgeführt. Verwendet wurden Primer für PPAR- γ , CEBP- α , FABP4 und Glut4, wobei β -Actin und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als housekeeping genes dienten (QuantiTect Primer Assay Hs_PPAR_1_SG,- CEBPA_1_SG,- FABP4_2_SG,- SLC2A4_1_SG,- ACTB_2_SG,- GAPDH_2_SG ; Qiagen, Hilden). Zur Auswertung der relativen Expression der Zielgene im Verhältnis zu einem Kalibrator wurde die $-2^{\Delta\Delta CT}$ bzw. Livak Methode verwendet. Als Kalibrator wurde die Genexpression der Einzelzellkonstrukte an Tag 0 verwendet.

3.2.5. Lebend-Tod Färbung

Das Live/Dead Cell Staining Kit II von PromoCell (Heidelberg) wurde zur Untersuchung der Lebensfähigkeit der Zellen im Fibringel verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden 5 Std. nach Konstruktherstellung und nach 6 Tagen in Kultur entnommen. Eine Todkontrolle wurde zu beiden Zeitpunkten mitgeführt. Nach dem Waschen der Konstrukte mit PBS wurden diese mit der nach Herstellerangaben gefertigten Färbelösung (2 μ M Calcein AM, 4 μ M EthDIII in PBS) komplett bedeckt und für 30-45 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konstrukte wurden gewaschen und mit PBS überschichtet. Mit einem konfokalen Mikroskop (Axiovert 100M und der Software LSM 510, Carl Zeiss, Jena) stellten sich lebende Zellen bei einer Anregungswellenlänge von

488 nm und einer Emissionswellenlänge von 505-550 nm Bandpass (BP) grün dar. Bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm und einer Emissionswellenlänge von 560 nm Langpass (LP) wurden tote Zellen, bei denen das Ethidium Homodimer III mit der DNA interkaliert, rot dargestellt. Für Aufnahmen von Sphäroiden im Konstrukt wurden auch Z-Stacks angefertigt.

3.2.6. Fettflächenmessung

Mikroskopische Aufnahmen von Oil Red O (ORO) gefärbten Gefrierschnitten wurden mit mindestens $n=3$ zur Fettflächenmessung verwendet. Die Vermessung wurde unter Verwendung der cellSens Dimension Software (Olympus, Hamburg) durchgeführt. Die mit ORO gefärbten roten Anteile wurden im Verhältnis zur Gesamtfläche des Objektes vermessen.

3.3. Histologie

3.3.1. Herstellung von Gefrierschnittpräparaten

3.3.1.1. Sphäroide

Die Sphäroide wurden in 4% gepuffertem Formalin (Merck, Darmstadt) für 30 min. fixiert, mit Oil Red O gefärbt und mit PBS gewaschen. Dann wurden die gefärbten Sphäroide direkt, möglichst ohne anhaftende Flüssigkeit, in TissueTek O.C.T.^{TDM} Compound (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) eingebettet und bei -80 °C bis zum Schneiden gelagert. Die Schnitte wurden an einem Kryotom (eingestellt auf -20°C) mit einer Schnittdicke von 5-8 µm angefertigt.

3.3.1.2. Fibringelkonstrukte

Die geernteten Fibringelkonstrukte wurden über Nacht in 4% gepufferten Formalin (Merck, Darmstadt) fixiert. Hierauf schloss sich eine Dehydrierungsreihe mit aufsteigenden (10-60%) Sucroslösungen (Sucrose, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) an. Die trocken getupften Gele wurden nun in TissueTek O.C.T.^{TDM} Compound (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) eingebettet und bei -80 °C gelagert. Es wurden Gefrierschnitte an einem Kryotom eingestellt auf -20 °C mit 8-10 µm angefertigt.

3.3.2. Herstellung von Paraffinschnittpräparaten

Die Explantate aus den in vivo Versuchen wurden über Nacht in gepuffertem Formalin 4% fixiert, daraufhin gründlich in Leitungswasser gespült, mittels aufsteigender Alkoholreihe (50%-abs. Alkohol) entwässert und in 100% Xylol (m-Xylene, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) überführt. Hierauf wurden die Proben in Paraffin eingebettet und die Paraffinblöcke bei -20 °C bis zum Schneiden gelagert. Es wurden Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von 3 µm hergestellt. Die Schnitte wurden bis zum nächsten Tag im Trockenschrank gelagert.

3.3.2.1. Entparaffinieren

Vor dem Färben mussten die Präparate entparaffiniert werden. Dies geschah nach einem Inkubationsschritt mit Xylol mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe (abs.-50%) bis zum Wässern mit ddH₂O.

3.3.3. Histologische Färbungen

3.3.3.1. Oil Red O

Diese Färbung wird zur Darstellung von Fettgewebe verwendet. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 0,5 g Oil Red O (ORO, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in 100 ml 2-Propanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 66,6 ml H₂O gelöst und filtriert. Die Färbelösung wurde dazu verwendet 2D-Kulturzellen direkt im well oder geerntete Sphäroide vor dem Einbetten in TissueTek O.C.T.^{TDM} Compound (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufien) zu färben. Nach einem Waschschrift mit PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) wurden die Zellen 4 Std. bei Raumtemperatur mit der Färbelösung bedeckt. Das Abnehmen der ORO Lösung und ein Waschschrift beendeten den Färbeprozess. Als Gegenfärbung wurde in den Gefrierschnittpräparaten der Sphäroide die Kernfärbung der HE Färbung verwendet. Die Oil Red O Präparate wurden mit Glycerol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingedeckt.

3.3.3.2. Hämatoxylin Eosin

Die Hämatoxylin Eosin (HE) Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll:
Nach dem Entparaffinieren wurden die Objektträger für die Kernfärbung 4 Min. in Mayers Haematoxylin Solution (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) belassen. Darauf folgte das Bläuen der Präparate für 10 Min. unter fließend kaltem Leitungswasser. Nach einem kurzen Spülen der Objektträger in ddH₂O, schloss sich die Eosin Färbung (Bio-Optica, Mailand, Italien) für 2 Min. an. Die Färbung wurde durch spülen in ddH₂O beendet. Die Präparate wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe (50%-abs.) bis zum Xylol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wieder entwässert und wasserunlöslich mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

3.3.3.3. Immunhistochemie-Anti humanes Vimentin

Zur besseren Unterscheidung der transplantierten humanen Zellen von den murinen Zellen der Wirtstiere wurde eine immunhistochemische Färbung gegen humanes Vimentin durchgeführt. Zunächst schlossen sich dem Entparaffinieren eine Antigendemaskierung durch Kochen der Präparate in Citratpuffer (10,5 g Zitronensäure-Monohydrat, von Sigma-Aldrich, Taufkirchen und 5,1 g NaOH von Merck, Darmstadt, in 2,5 l ddH₂O; pH 6) für 10 Min. bei 120°C im Dampfkochtopf an. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur schloss sich ein 2 minütiger Waschschrift in 1:20 verdünntem Zytomed Systems Wash Buffer 20 X (Zytomed Systems, Berlin) an. Hierauf erfolgte die Inkubation mit dem primär Antikörper rabbit anti-vimentin (Zytomed Systems, Berlin) für 1 Std. bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschriften mit dem oben genannten Puffer wurden die Objektträger für 30 Min. mit dem AP Polymer anti-rabbit (Zytomed Systems, Berlin) bedeckt. Weiterem Waschen schloss sich das Bedecken der Präparate mit dem Permanent AP Red Kit (Zytomed Systems, Berlin) unter Sichtkontrolle für 5-15 Min. bis zu einem Farbumschlag an. Diese Reaktion wurde mit kurzem Spülen in ddH₂O gestoppt. Als Kernfärbung diente die in der HE Färbung beschriebene vierminütige Hämatoxylin Färbung (s.o.). Die Präparate wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe (50%-abs.) bis zum Xylol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wieder entwässert und wasserunlöslich mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Als Negativ-Kontrollen dienten genauso prozessierte Präparate ohne Inkubation mit Primär-Antikörper.

3.3.3.4. Immunhistochemie-Anti humanes CD 31

Zur Darstellung humaner Endothelzellen wurden mit MVEC und MVEC+ASC besiedelte Gelkonstrukte immunhistochemisch evaluiert. Hierzu wurden Gefrierschnitte der Endothelzellkonstrukte in PBS (Phosphate Buffered Saline Dulbecco A, Oxoid, Wesel) gewaschen und dann für 20 Min. in einer

blockingsolution aus PBS mit 1% BSA (bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) bei Raumtemperatur belassen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der 1:100 verdünnte mouse anti-human CD 31 (Dako, Hamburg) über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die slides drei Mal mit PBS gewaschen und der 1:100 verdünnte Pcl rabbit anti-mouse HRP Antikörper (Dako, Hamburg) wurde für 1 Std. bei Raumtemperatur darauf gegeben. Nach Abwaschen des sekundären Antikörpers wurden die Objektträger mit Liquid DAB (BioGenex, Hamburg) unter Sichtkontrolle bis zum Farbumschlag 2-8 Min. bedeckt. Als Kernfärbung diente die in der HE Färbung beschriebene vierminütige Hämatoxylin Färbung (s.o.). Die Präparate wurden mit Glycergel Mounting Medium (Dako, Hamburg) eingedeckt.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Gefrierschnitte der Endothelzellkonstrukte in PBS (Phosphate Buffered Saline Dulbecco A, Oxoid, Wesel) gewaschen und dann für 20 Min. in einer blockingsolution aus PBS mit 1% BSA (bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) bei Raumtemperatur belassen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der 1:100 verdünnte mouse anti-human CD 31 (Dako, Hamburg) über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die slides drei Mal mit PBS gewaschen und der 1:400 verdünnte donkey anti-mouse IgG Cy3 Antikörper (Dianova, Hamburg), wurde für 1Std. bei Raumtemperatur darauf gegeben. Nach Abwaschen des sekundären Antikörpers wurden die Objektträger mit Fluoroshield with DAPI (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingedeckt.

3.4. Tierversuche

3.4.1. Versuchstiere

Für die in vivo Versuche wurden weibliche NMRI-Fox 1 nu Tiere der Firma Harlan (Horst, Niederlande) im Alter von 8-9 Wochen verwendet. Es handelt

sich um athymische Tiere, welche sich für Xenotransplantationen eignen. Sie wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in „individually ventilated cages“ (IVC) bei 23 °C und 48 % Luftfeuchte gehalten. Futter und Wasser stand den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Bevor die Versuche gestartet wurden, blieben die Tiere 1 Woche nach Lieferung im Tierstall zum Akklimatisieren. Alle Versuche wurden nach Genehmigung des Versuchsvorhabens und unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.4.2. Implantation der Fibringelkonstrukte

Zur Implantation der hergestellten Fibringelkonstrukte wurden die Versuchstiere zunächst präoperativ klinisch evaluiert, um eventuelle Morbiditäten auszuschließen. Die Narkose der Tiere wurde mit 3,5 % Isofluran eingeleitet. Zur Erhaltung der Narkose bekamen sie 2 % Isofluran. Präoperativ wurde ihnen als Schmerzmittel Tramal (Tramadol, Grünenthal GmbH) s.c. in einer Dosierung von 10-15 mg/kg KG verabreicht. Nach Hautdesinfektion (Cutasept F®, Bode Chemie GmbH, Hamburg) und dem Auftragen einer Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe®, Bayer, Leverkusen) wurden auf Höhe der Schulterblätter die Fibrinkonstrukte beidseits subkutan implantiert (je zwei Gele/Tier). Hierzu wurde, nach gesetztem Hautschnitt, eine subkutane Tasche präpariert und die Gele mit einem nicht resorbierbaren Faden (Prolene, Ethicon, Norderstedt) an der Muskelfaszie fixiert (Abb. 3). Der Hautschnitt wurde mit einem nicht resorbierbaren Faden mittels Einzelhefte wieder verschlossen. Die Wunde wurde noch mit einer antibiotischen Salbe (Fucidine® Salbe, Leo Pharma, Neu-Isenburg) postoperativ versorgt.

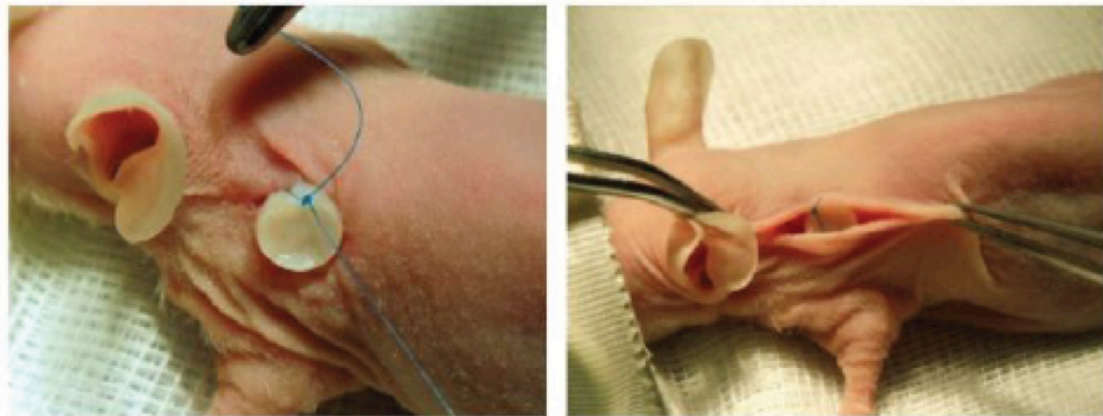


Abb. 3: Implantation der Fibringelkonstrukte.

Mit einem nicht resorbierbaren Faden wurden die Gele an der Muskelfaszie der Schulterpartie einer narkotisierten Nacktmaus fixiert und in die zuvor präparierte Hauttasche eingeschoben. Bilder gedruckt mit freundlicher Genehmigung von [20].

3.4.3. Explantation der Fibringelkonstrukte

Die Versuchstiere wurden mit 5% Isofluran in Narkose gelegt. Bei Erreichen eines maximal tiefen Narkosestadiums wurden die Tiere mittels Genickbruch getötet. Hierauf wurden die Konstrukte auf Höhe der beiden Schultern mit dem umgebenden Gewebe (Muskel und Haut) entnommen und in 4% gepuffertes Formalin (Merck, Darmstadt) überführt, um über Nacht fixiert zu werden.

3.4.4. Histomorphometrie

Zur Auswertung der Tierversuche wurden die Mittelschnitte der Explantate verwendet. An ihnen wurde die Fläche der Konstrukte, die Fettfläche im Konstrukt und die Anzahl der Gefäßanschnitte ermittelt. Das Vermessen der Gel- und Fettfläche erfolgte mit Hilfe der ImageJ Software. Die Anzahl der Gefäße wurde ausgezählt.

3.5. Statistik

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde die Software GraphPad Prism® (La Jolla, Californien, USA) verwendet. Ausgewertet wurden die Daten anhand von Mittelwerten mit Standardabweichung. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Zur statistischen Auswertung fanden der Mann-Whitney t-Test und one way ANOVA Dunns Multiple Comparison Test Anwendung.

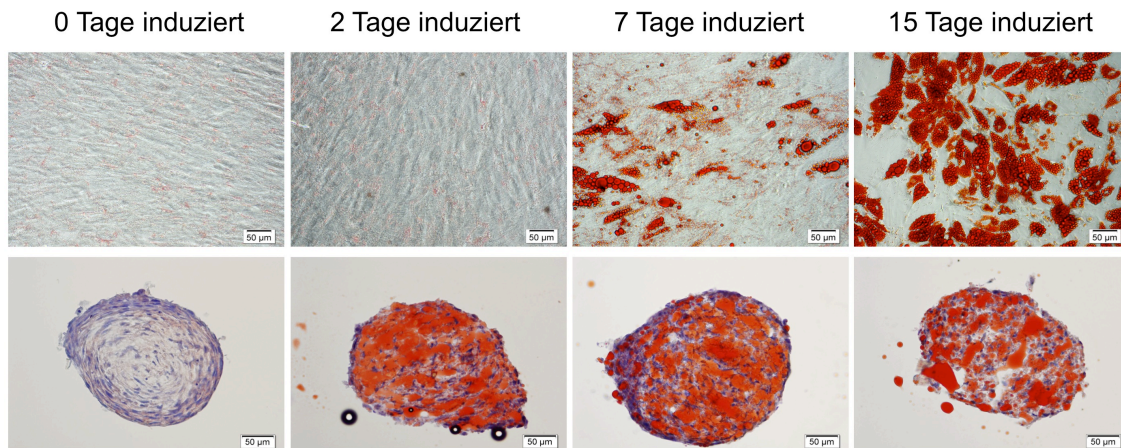
4. Ergebnisse

4.1. Adipogene Differenzierung von ASC in einer 2D- und 3D-Kultur in vitro

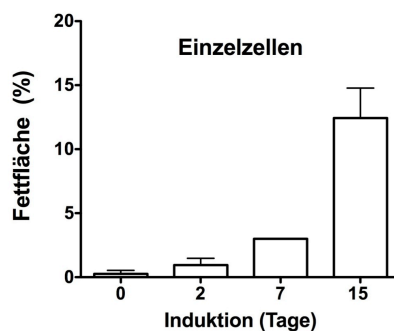
Zu Beginn dieser Arbeit wurde überprüft, inwieweit sich die Dimensionalität der Zellkultur, also eine Kultivierung konventionell in 2D auf einer Zellkulturplatte oder in 3D als Sphäroidkultur, auf die adipogene Differenzierbarkeit von ASC auswirkt. Nach Isolation von ASC aus frischen Liposuktionsaspiraten, wurden mittels *liquid-overlay* Technik ASC-Sphäroide hergestellt. Diese wurden daraufhin in adipogenem Induktionsmedium (= AIM), differenziert. Zum Vergleich wurden ASC auch als Einzelzellmonolayer in AIM kultiviert. Nach einer Induktionsdauer von 2, 7, und 15 Tagen wurde der Fortschritt der Adipogenese beider Kulturvarianten mittels Fettflächenmessung und einer Oil Red O Färbung zur Darstellung des eingelagerten Fetts verglichen. Die Auswertung ergab, sowohl optisch durch die Oil Red O Färbung als auch durch die Quantifizierung der Fettfläche, dass 3D-kultivierte ASC-Sphäroide eine höhere Sensitivität gegenüber einer adipogenen Induktion zeigten im Vergleich zu den 2D-kultivierten ASC-Einzelzellen. Denn während die Sphäroide bereits nach hormoneller Kurzzeitinduktion (≤ 7 Tage) eine deutliche Lipideinlagerungen zeigten, war bei 2D-gezüchteten adhärennten Einzelzellen erst nach Langzeitinduktion (> 7 Tage) eine zufriedenstellende Fettproduktion zu verzeichnen. Besonders zu erwähnen ist die Tatsache, dass in der 3D-Kultur bereits nach zweitägiger Induktion eine vergleichbare Fetteinlagerung wie nach 15-tägiger Induktion stattgefunden hatte. In der konventionellen 2D-Kultur hingegen konnte nach zweitägiger Induktion keine sichtbare Fettakkumulation nach Färbung mit Oil Red O dargestellt werden. Die Fettakkumulation in der 2D-Kultur erwies sich als abhängig von der Induktionsdauer; je länger die Induktionsdauer war, desto mehr Lipideinlagerungen konnten gefunden werden

(Abb. 4). Die Dimensionalität der Zellkultur hatte demnach in dieser Untersuchung einen deutlichen Einfluss auf die Adipogeneseigenschaften der Zellen.

A



B



C

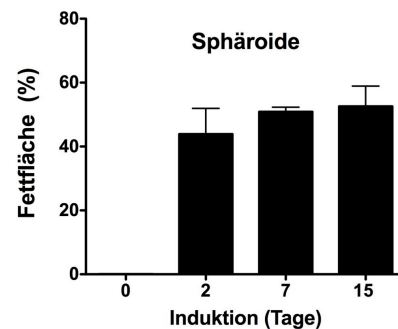


Abb. 4: Adipogene Differenzierung von ASC in 2D und 3D.

ASC wurden in 2D-Kultur als Monolayer und in 3D-Kultur als Sphäroide in AIM kultiviert. Die Induktionsdauer belief sich je nach Gruppe auf 0 (= nicht induzierte Kontrolle), 2, 7 bis zu 15 Tage. Der Fortschritt der adipogenen Differenzierung der Zellen aller Gruppen wurde dann an Tag 15 mittels Oil Red O Färbung evaluiert. (A) Oil Red O gefärbte ASC-Einzelzellen (obere Reihe) und ASC-Sphäroide (untere Reihe). (B) Prozentuale Fettfläche Oil Red O gefärbter ASC-Einzelzellen; dargestellt als Mittelwerte (n=4) mit Standardabweichung. (C) Prozentuale Fettfläche Oil Red O gefärbter ASC-Sphäroide; dargestellt als Mittelwerte (n=4) mit Standardabweichung.

4.2. Adipogene Differenzierung von ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden in Fibrin in vitro

Um zu überprüfen, welchen Einfluss eine artifizielle Fibrinmatrix auf die Differenzierbarkeit von ASC hat und ob die erhöhte Sensitivität der 3D-Sphäroide gegenüber adipogenen Induktionsreizen auch in einer Fibrinmatrix zu finden ist, wurden Fibringele mit ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden besiedelt (300.000 Zellen/Gel), in AIM kultiviert und die Adipogeneseigenschaften untersucht. Als Gele dienten langzeitstabile Fibringele (40 mm³, 50 mg/ml Fibrin) [121], die vor Beginn der Versuche so modifiziert wurden, dass sowohl eine gleichmäßige Sphäroid- als auch Einzelzellverteilung im Konstrukt möglich war. So konnte durch die Verwendung einer Thrombinlösung mit 200 U/ml anstatt 5 U/ml die Gelierzeit der Fibringelkonstrukte verkürzt werden und ein Absinken der Sphäroide verhindert werden (Abb. 5). Diese Fibringele werden im Weiteren als modifizierte langzeitstabile Fibringele bezeichnet.

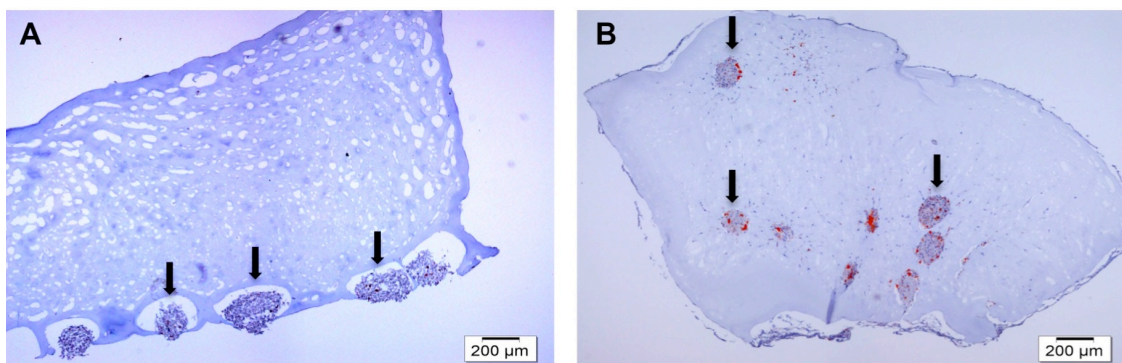


Abb. 5: Langzeitstabile Fibringele besiedelt mit ASC-Sphäroiden.

In Anlehnung an Eyrich et al. wurden langzeitstabile Fibringele hergestellt und mit ASC-Sphäroiden besiedelt (5.000 Zellen/Sphäroid). (A) Oil Red O gefärbtes langzeitstabiles Fibrinkonstrukt hergestellt nach Eyrich (5 U/ml Thrombin) mit inhomogen verteilten ASC-Sphäroiden (↓). (B). Oil Red O gefärbtes modifiziertes langzeitstabiles Fibrinkonstrukt (200 U/ml Thrombin) mit weitgehend homogen verteilten ASC-Sphäroiden (↓).

Zu Beginn wurde die Vitalität der Zellen im modifizierten langzeitstabilen Fibringel mittels *live-dead*-Färbung evaluiert. Dabei konnte ein viabilitätsmindernder Effekt des Fibringels auf die eingesetzten ASC-Einzelzellen und -Sphäroide ausgeschlossen werden (Abb. 6). Somit wurden die weiteren Untersuchungen mit dem modifizierten langzeitstabilen Fibringel durchgeführt.

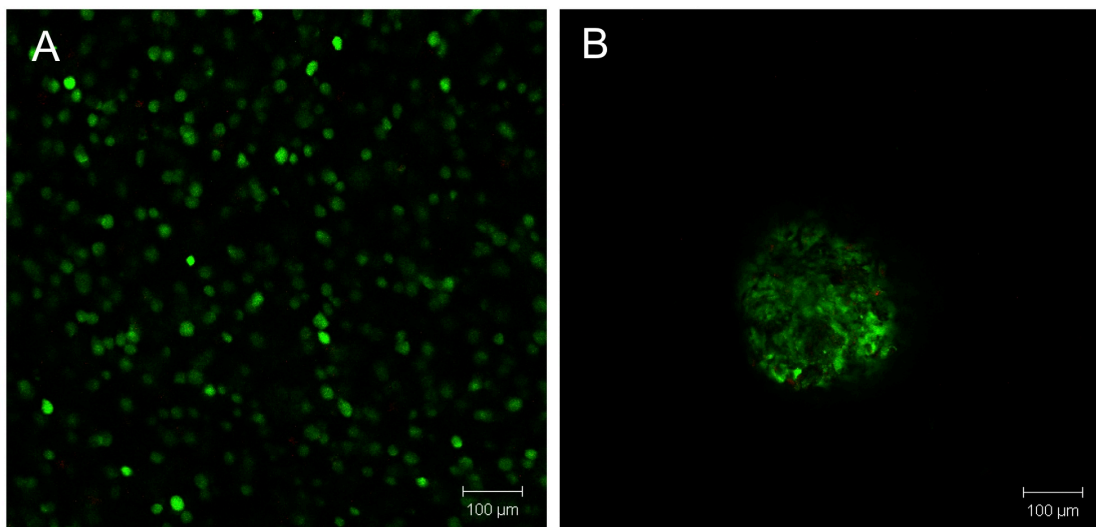
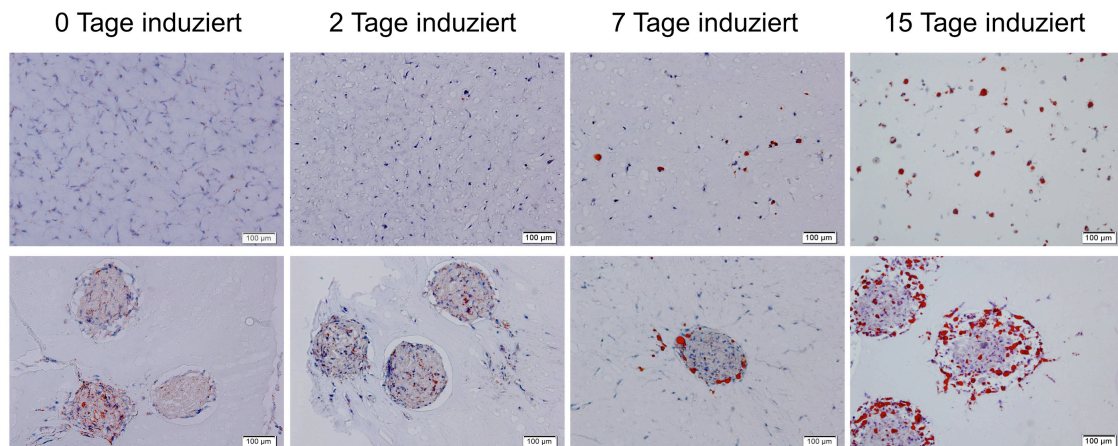


Abb. 6: *Live-Dead*-Färbung von ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden in Fibrin.

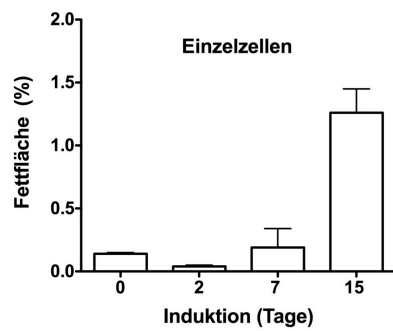
Modifizierte langzeitstabile Fibringele (50 mg/ml Fibrin) wurden mit ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden besiedelt und in AIM kultiviert. An Tag 6 wurden die Zellen mittels Live/Dead Cell Staining Kit II und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie evaluiert. Lebende Zellen zeigen hierbei eine grüne, tote Zellen eine rote Fluoreszenz. Als Todkontrollen wurden mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt (nicht gezeigt). (A) ASC-Einzelzellen. (B) ASC-Sphäroide.

Zur weiteren Untersuchung der ASC-Einzelzellen und ASC-Sphäroide hinsichtlich ihrer adipogenen Differenzierbarkeit im modifizierten langzeitstabilen Fibringel wurden Analysen sowohl auf RNA-Ebene mittels qPCR, als auch auf Protein-Ebene mittels Leptin ELISA, Triglycerid Assay und Oil Red O Färbung durchgeführt. Hierbei ergaben sich im Gegensatz zu dem oben dargestellten Vergleich der beiden Kulturformen (Monolayer und Sphäroid ohne Fibrinmatrix) überraschenderweise keine signifikanten Unterschiede in der adipogenen Differenzierbarkeit zwischen Einzelzellen und Sphäroiden, wenn die Zellen in einem Fibringel eingebettet waren. Denn ohne Fibrinmatrix zeigte sich, dass die Sphäroidkultur bereits nach zweitägiger Induktion eine suffiziente Fetteinlagerung aufwies, wobei dies in der 2D-Kultur erst nach einer Induktionsdauer von mehr als 7 Tagen der Fall war. Im Fibringel eingebettet zeigten die Sphäroide wie auch die Einzelzellen erst ab einer Induktionsdauer von mehr als 7 Tagen eine deutliche Fetteinlagerung (Abb. 7).

A



B



C

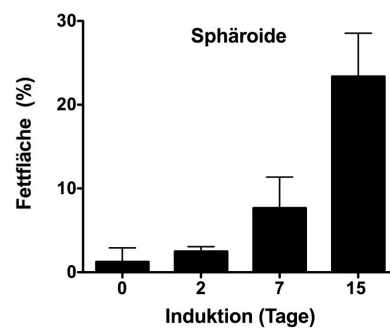


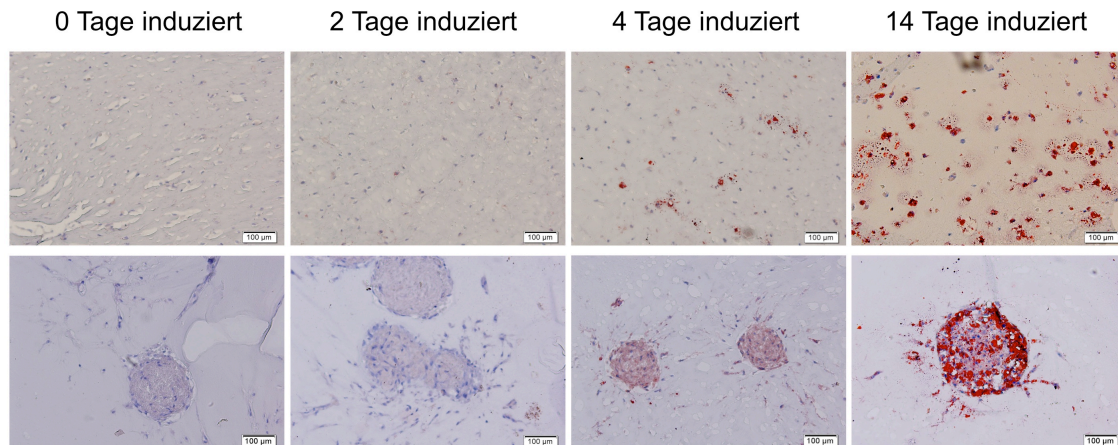
Abb. 7: Adipogene Differenzierung von ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden in Fibrin.

Modifizierte langzeitstabile Fibringele (50 mg/ml Fibrin) wurden mit ASC-Einzelzellen und – Sphäroiden (300.000 Zellen/Gel) besiedelt und 0 (= nicht induzierte Kontrolle), 2, 7 und bis zu 15 Tage in AIM kultiviert. Die adipogene Differenzierung der Zellen wurde an Tag 15 mittels Oil Red O Färbung und einer Fettflächenmessung evaluiert. (A) Oil Red O gefärbte Gele mit ASC-Einzelzellen (obere Reihe) und ASC-Sphäroiden (untere Reihe). (B) Prozentuale Fettfläche (bezogen auf die Gesamtfläche des Bildausschnittes) mit ASC-Einzelzellen besiedelter und Oil Red O gefärbter Fibringele; dargestellt als Mittelwerte (n=4) mit Standardabweichung. (C) Prozentuale Fettfläche (bezogen auf die Gesamtfläche der Sphäroide im Bildausschnitt) mit ASC-Sphäroiden besiedelter und Oil Red O gefärbter Fibringele; dargestellt als Mittelwerte (n=4) mit Standardabweichung.

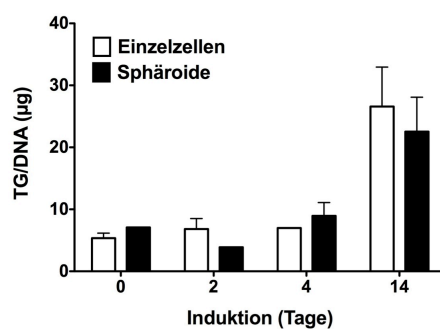
Auch erneut durchgeführte Versuche, die mittels Oil Red O-Färbungen, Leptin ELISA und Triglycerid Assay evaluiert wurden, zeigten, dass eine Kurzzeitinduktion von ASC-Einzelzellen und –Sphäroiden in Fibrin keine zufriedenstellende Fettproduktion zur Folge hatte. Erst durch Langzeitinduktion

ließ sich eine suffiziente Adipogenese erzielen (Abb. 8). Beide Kulturformen zeigten unter gleichen Bedingungen vergleichbare Werte hinsichtlich der Fetteinlagerung als auch der Leptinsekretion.

A



B



C

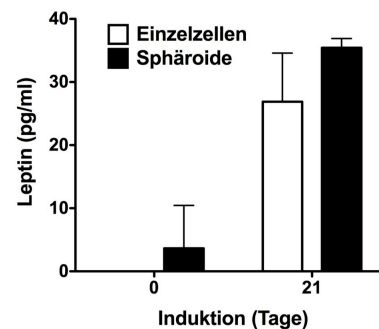


Abb. 8: Triglyceridgehalt und Leptinsekretion von ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden in modifizierten langzeitstabilen Fibringelen.

Modifizierte langzeitstabile Fibringele (50 mg/ml Fibrin) wurden mit ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden besiedelt (300.000 Zellen/Gel) und 0 (= nicht induzierte Kontrolle), 2, 4, 14 und permanent bis zu 21 Tage in AIM kultiviert. Die adipogene Differenzierung der Zellen wurde dann an Tag 14 mittels TGA und an Tag 21 mittels Leptin ELISA evaluiert. (A) Oil Red O gefärbte Gele mit ASC-Einzelzellen (obere Reihe) und ASC-Sphäroiden (untere Reihe). (B) Triglyceridgehalt gemessen an Tag 0, 2, 4 und 14; dargestellt als Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung. (C) Leptinkonzentration gemessen an Tag 0 und 21 mittels ELISA; dargestellt als Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

Ebenso zeigte die Untersuchung verschiedener Schlüssellgene der Adipogenese mittels qPCR keine Unterschiede in der adipogenen Differenzierbarkeit der 3D-Sphäroidkultur und der 2D-Einzelzellkultur in der Fibrinmatrix. In beiden Kulturformen kam es gleichermaßen zu einer stetigen Hochregulation der Fettzellgene im Verlauf der Induktionsdauer (Abb. 9).

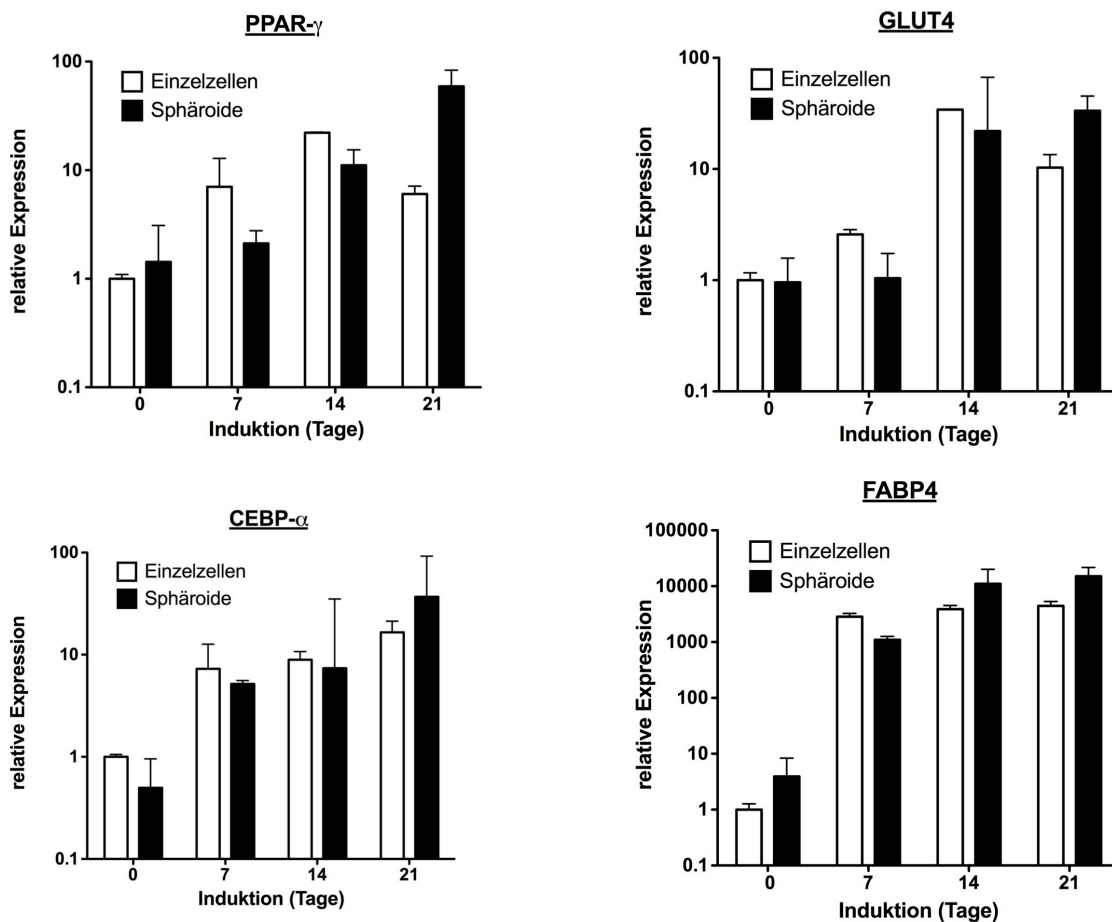


Abb. 9: Expression adipogener Markergene von ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden in modifizierten langzeitstabilen Fibringelen.

Modifizierte langzeitstabile Fibringele (40 mm^3 , 50 mg/ml Fibrin) wurden mit ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden besiedelt ($300.000 \text{ Zellen/Gel}$) und bis zu 21 Tage in adipogenem Induktionsmedium kultiviert. Als Kontrolle dienten in reinem preadipocyte growth medium kultivierte Gele mit ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden (Daten nicht gezeigt). An Tag 7, 14 und 21 wurde mittels qPCR die Expression typischer Fettzellgene wie PPAR- γ , CEBP- α , FABP4 und GLUT4 evaluiert. Als housekeeping gene wurde GAPDH verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels $\Delta\Delta \text{ Ct}$ -Methode. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=3$) mit Standardabweichung.

Um auszuschließen, dass durch die Verwendung hoher Zellzahlen in den mit Einzelzellen besiedelten Gelen eine vergleichbare Situation hinsichtlich der Zell zu Zell-Kontakte wie in den Sphäroidkonstrukten herrschte, wurden auch Gele mit geringeren Zellzahlen (150.000 Zellen/Gel) besiedelt. Hierdurch sollte gezielt der Einfluss der Zell zu Zell-Kontakte auf die Adipogenese der ASC im Fibrinkonstrukt evaluiert werden. Wie in den Versuchen zuvor konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen der Einzelzell- und Sphäroidkultur festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt war festzustellen, dass sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene beide Kulturformen in der Fibrinmatrix die gleiche adipogene Kapazität und Sensitivität besaßen. Des Weiteren präsentierte sich in beiden Kulturformen die adipogene Differenzierbarkeit direkt proportional zur Induktionsdauer (Abb. 7-9).

4.3. Endotheliale Differenzierung von ASC-Sphäroiden in Fibringel in vitro

Da ASC die Fähigkeit besitzen, in Endothelzellen zu differenzieren [122], wurde überprüft, ob ASC-Sphäroide in Fibringel Gefäßanlagen zeigen. Hierzu wurden mit ASC-Sphäroiden besiedelte modifizierte langzeitstabile Fibringele nach 7- und 14-tägiger adipogener Induktion histologisch auf Zellaussprossungen (sogenannte *sprouts*) und endothel- bzw. gefäßähnliche Strukturen untersucht. Die mikroskopische Aufarbeitung zeigte in der Tat ein ausgeprägtes Sprouten sowohl der adipogen induzierten als auch der nicht induzierten ASC. Jedoch handelte es sich bei den *sprouts* nicht um gefäßähnliche Strukturen, sondern um aussprossende ASC. Denn diese Zellaussprossungen wiesen fettzelltypische Fettvakuolen auf, die mittels Oil Red O Färbung bestätigt werden konnten. Auch in der immunhistochemischen Evaluation mittels CD31 Färbung konnten keine Hinweise auf eine endotheliale Differenzierung der *sprouts* gefunden werden. Die Evaluation nicht adipogen induzierter ASC-Sphäroide zeigte das gleiche Bild (Abb. 10).

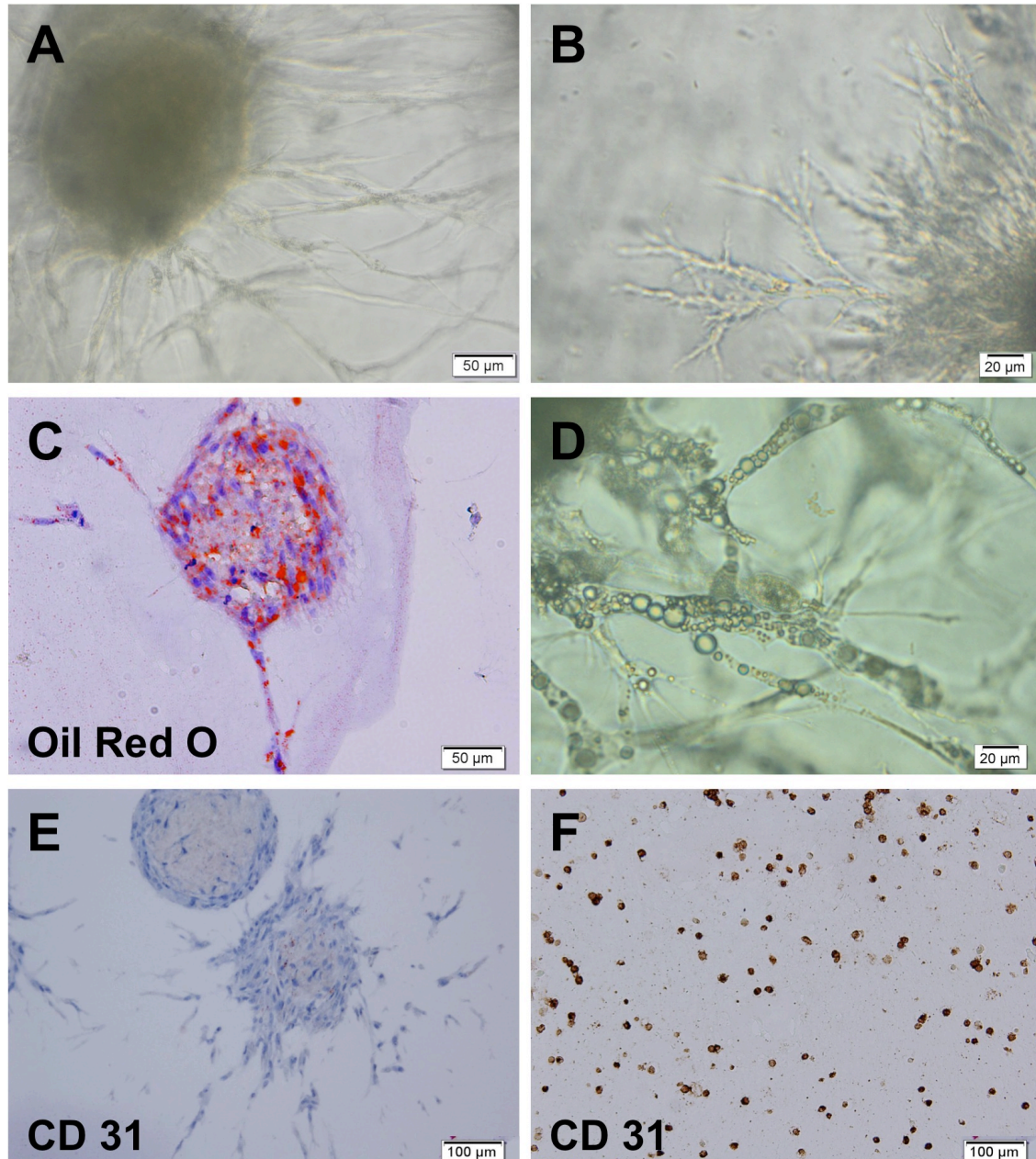


Abb. 10: In Fibringel kultivierte ASC-Sphäroide und MVEC.

Modifizierte langzeitstabile Fibringele (50 mg/ml Fibrin) wurden mit ASC-Sphäroiden besiedelt (300.000 Zellen/Gel) und bis zu 14 Tage in AIM kultiviert. Im Anschluss wurden die Gele histologisch (Durchlichtmikroskopie, Oil Red O und CD31 Färbung) aufgearbeitet. Zur Kontrolle wurden auch Gele mit nicht adipogen induzierten ASC-Sphäroiden mitgeführt, die in reinem PGM kultiviert wurden. Mikroskopische Durchlichtaufnahmen eines (A) 7 Tage lang adipogen induzierten ASC-Sphäroids und eines (B) nicht induzierten ASC-Sphäroids. (C u. D) Oil Red O Färbung bzw. Durchlichtmikroskopie eines 14 Tage lang induzierten ASC-Sphäroids. (E) Immunhistochemische CD31 Färbung eines 7 Tage lang in AIM kultivierten Fibrinkonstruktes. (F) In Fibringel kultivierte MVEC dienen als CD31-Positivkontrolle.

4.4. ASC-MVEC Co-Kulturen in Fibringel in vitro

Da die ASC in den vorausgegangenen Versuchen keine eigenen prävasculären *sprouts* zeigten, erschien die Co-Kultur von ASC zusammen mit MVEC ein rationaler Ansatz zur Herstellung prävascularisierter Fibrinkonstrukte. Hierzu wurden Fibringele mit ASC-Einzelzellen und MVEC co-besiedelt und mit unterschiedlichen Medien in Kultur genommen. Verwendet wurden 1:1 Mischmedien aus PGM/EGM für nicht induzierte Proben und AIM/EGM für induzierte Kulturen. Nach 14 Tagen wurden die Konstrukte histologisch evaluiert. Während die ASC-Einzelzellen ein ausgeprägtes *sprouting* zeigten und ein dichtes Netz aus sich verästelnden Zellausläufern ausbildeten, behielten die MVEC eine runde Zellmorphologie bei und zeigten weder sproutende Zellausläufer noch eine Formation von *tubes*, so dass keinerlei Hinweise auf die Ausbildung einer Prävascularisierung der Konstrukte detektiert werden konnten (Abb. 11).

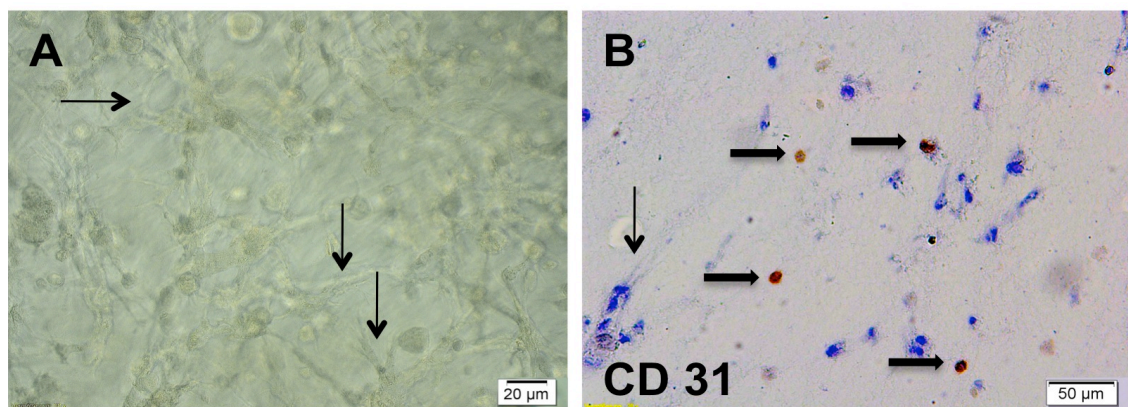


Abb. 11: In Fibrin co-kultivierte ASC und MVEC.

Modifizierte langzeitstabile Fibringele (50 mg/ml Fibrin) wurden mit ASC-Einzelzellen (150.000 Zellen/Gel) und MVEC (150.000 Zellen/Gel) co-besiedelt und u.a. in einem Mischmedium aus PGM und EGM kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Gele durchlichtmikroskopisch und immunhistochemisch untersucht. (A) Durchlichtaufnahme eines co-besiedelten Gels. sproutende ASC-Einzelzellen (→). (B) CD 31 Färbung (braun). Sproutende ASC-Einzelzellen (→) und CD 31 exprimierende MVEC (➔).

Da in den Co-Kulturversuchen keine Gefäßformation stattzufinden schien und Auswirkungen des Kulturmediums und der Fibrinformulierung auf die darin befindlichen Zellen beschrieben sind [123-125], wurden die Effekte verschiedener Kulturmedien und verschiedener Fibrinformulierungen getestet. So sollten die optimalen Voraussetzungen für eine Bildung von prävasculären *sprouts* der MVEC in Fibrin evaluiert werden. Hierzu wurden MVEC in verschiedene Fibringelformulierungen (Fibringel mit 50 mg/ml Fibrin u. 5 U Thrombin, modifizierte langzeitstabile Fibringele mit 12,5; 25 u. 50 mg/ml Fibrin u. Tissucol) inokuliert und in unterschiedlichen Kulturmedien (PGM/EGM, AIM/EGM u. reines EGM) bis zu 25 Tagen kultiviert. Bei der histologischen Aufarbeitung der verschiedenen Konstrukte zeigten sich jedoch keine Unterschiede im Verhalten bzw. in der Morphologie der MVEC. Weder durch die verschiedenen Fibringelkonzentrationen noch durch die unterschiedlichen Kulturmedien konnte ein Einfluss auf die Zellmorphologie beobachtet werden. Unabhängig von beiden Bedingungen zeigten MVEC eine rundliche Morphologie ohne Aussprossungen oder *tubeformations*, d.h. auch in weicheren Fibringelen und mit reinem EGM konnte keine Bildung von *tubes* und damit keine Prävaskularisierung der Konstrukte erzielt werden (Abb. 12).

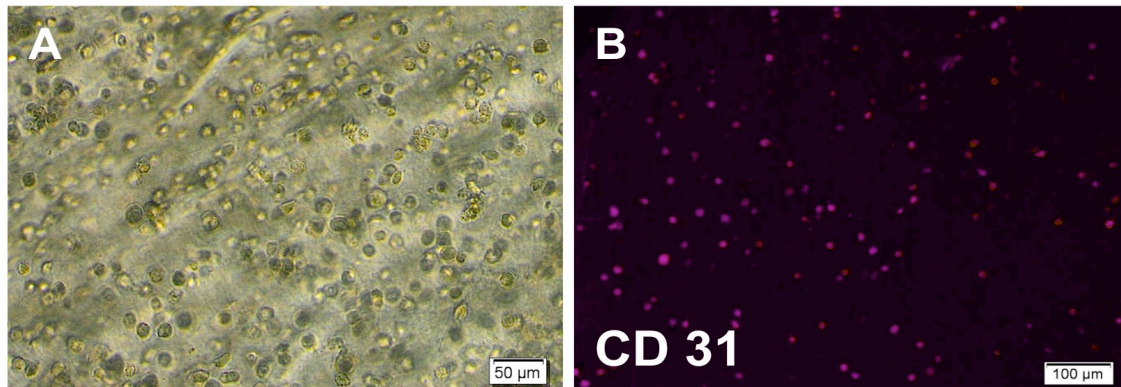


Abb. 12: Morphologie von MVEC in Fibringelen.

300.000 MVEC wurden in Fibringele verschiedener Härte (Fibringel mit 50 mg/ml Fibrin u. 5 U Thrombin, modifizierte langzeitstabile Fibringele mit 12,5 u. 25 mg/ml Fibrin u. Tissucol) inokuliert und in PGM/EGM, AIM/EGM oder reinem EGM kultiviert. Nach 4, 7, 10 und 25 Tagen wurden die Gele histomorphologisch und immunhistochemisch untersucht. (A) In AIM/EGM kultiviertes modifiziertes langzeitstabiles Fibringel (25 mg/ml Fibrin) mit MVEC an Tag 10 (Durchlichtmikroskopie). (B) In EGM kultiviertes Tissucolgel mit MVEC an Tag 25 (CD31 Färbung).

4.5. Stabilität sowie Fett- und Gefäßdichte von besiedelten Fibringelen in vivo

Um zu prüfen, welche Fibringelformulierung in vivo die besten Bedingungen für ein erfolgreiches Fettgewebeengineering bietet, wurden verschiedene Fibringele (modifiziertes langzeitstabiles Fibringel mit 25 und 50 mg/ml Fibrin sowie der Fibrinkleber Tissucol von Baxter; alle 40 mm³) mit ASC-Sphäroiden besiedelt und in immuninkompetente Mäuse subkutan transplantiert. Nach vier Wochen wurden die Gele wieder explantiert und nicht nur hinsichtlich ihrer Stabilität, sondern auch hinsichtlich ihres Fett- und Gefäßdurchsatzes histologisch untersucht. Hierzu wurden die prozentuale Fettfläche und die Anzahl der Gefäßanschnitte/mm² ausgewertet. Hierbei zeigte sich, dass die modifizierten langzeitstabilen Fibringele mit 50 mg/ml Fibrin gefolgt von den

modifizierten langzeitstabilen Gelen mit 25 mg/ml Fibrin die größte Stabilität besaßen. Am Ende des Versuches, also nach vier Wochen in vivo, besaßen die Gele noch durchschnittlich 38 bzw. 22% vom ursprünglichen Durchmesser. Die Konstrukte aus Tissucol boten keine ausreichende Stabilität über diesen Zeitraum und waren bei Explantation bereits größtenteils abgebaut. Ihr Gelfdurchmesser lag am Ende durchschnittlich nur noch bei 2% vom Ausgangswert (Abb. 13). Die Stabilität der Gele zeigte sich also abhängig von der Fibrinkonzentration.

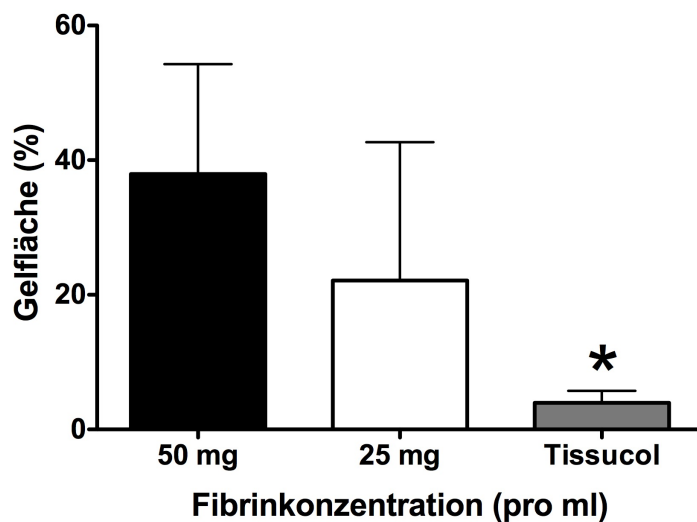


Abb. 13: In vivo Stabilität modifizierter langzeitstabiler Fibringele.

Mit ASC-Sphäroiden besiedelte modifizierte langzeitstabile Fibringele (50 und 25 mg/ml Fibrin, 40 mm³; jeweils n=8) und Tissucol (40 mm³; n=7) wurden subkutan in die Schulterpartien 8 Wochen alter NMRI/nu Mäuse transplantiert. Vier Wochen später wurden die Gele wieder explantiert und histologisch evaluiert. Zur Quantifizierung der Gele wurden die Medianschnitte der residualen Explantate histomorphometrisch vermessen. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichung, * p < 0,05.

Während dieser Untersuchungen konnte ebenso festgestellt werden, dass die Durchsetzung der Gele mit Fett und Gefäßen ebenfalls von der Fibrinkonzentration der Gele abhängig schien. Während die modifizierten langzeitstabilen Gele mit 50 mg/ml Fibrin so gut wie keine muren Fettzellen oder Gefäße aufwiesen, zeigten die modifizierten langzeitstabilen Gele mit 25 mg/ml Fibrin eine intermediäre und die mit Tissucol hergestellten Gele eine fast vollständige Durchsetzung mit muren Adipozyten und Gefäßen. Das heißt je weicher das transplantierte Konstrukt war, desto mehr schien es eine Adipogenese und Vaskulogenese zuzulassen (Abb. 14). Zudem fiel vor allem in den Fibrinkonstrukten mit 25 mg/ml Fibrin auf, dass die muren Adipozyten, die darin zu finden waren, besonders im Randbereich der Hydrogele anzutreffen waren.

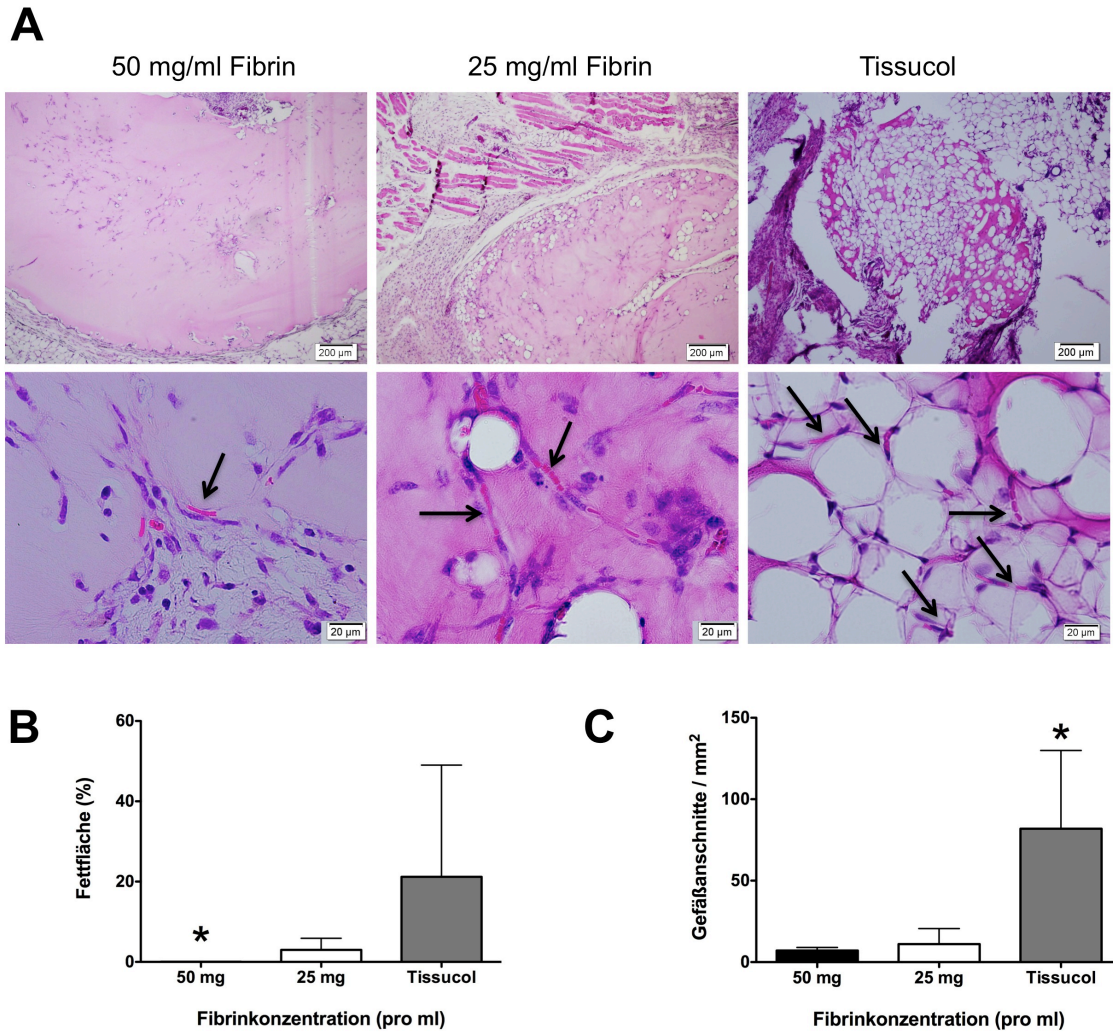


Abb. 14: Adipogenese und Vaskulogenese in modifizierten langzeitstabilen Fibringelen in vivo.

Mit ASC-Sphäroiden besiedelte modifizierte langzeitstabile Fibringele (50 und 25 mg/ml Fibrin, 40 mm³; jeweils n=8) und Tissucol (40 mm³; n=7) wurden subkutan in die Schulterpartien 8 Wochen alter NMRI/nu Mäuse transplantiert. Vier Wochen später wurden die Gele wieder explantiert, die Fettfläche und Gefäßanschnitte wurden histologisch quantifiziert. (A) HE gefärbte Medianschnitte. Gefäße (→). (B) Mittelwerte mit Standardabweichung der prozentualen Fettfläche (modifizierte langzeitstabile Fibringele 50 u. 25 mg/ml Fibrin, 40 mm³; jeweils n=8 und Tissucol 40 mm³; n=7). (C) Mittelwerte mit Standardabweichung der Gefäßanschnitte/mm² (modifizierte langzeitstabile Fibringele 50 u. 25 mg/ml Fibrin, 40 mm³; jeweils n=8 und Tissucol 40 mm³; n=7), * p < 0,05.

4.6. Adipogene Differenzierung von ASC-Einzelzellen und –Sphäroiden in vivo

In den zu Beginn der Arbeit durchgeführten in vitro Versuchen hatte sich gezeigt, dass in Fibringel kultivierte ASC nach 7-tägiger hormoneller Induktion eine suffiziente adipogene Differenzierung aufwiesen. Da zum Einen das Tissucol Konstrukt in den vorhergehenden in vivo Versuchen die signifikant geringste Volumenstabilität und gegenüber dem 25 mg/ml Fibringel keinen signifikant höheren Fettgehalt aufwies und zum Anderen das 50 mg/ml Fibrinkonstrukt den signifikant geringsten Fettgehalt aller drei Transplantate zeigte, schien als Trägermatrix für weitere in vivo Versuche das modifizierte langzeitstabile Fibringel mit 25 mg/ml Fibrin geeignet zu sein. Denn es war in vivo nicht nur langzeit-formstabil, sondern ließ auch Adipogenese und Vaskularisation ausreichend zu. Um die Adipogenese und Vaskularisation adipogen induzierter ASC in vivo im Detail zu untersuchen, wurden daher modifizierte langzeitstabile Fibringle (25 mg/ml Fibrin) mit ASC-Einzelzellen und –Sphäroiden besiedelt und nach 7-tägiger in vitro Kultur in AIM in NMRI/nu Versuchstiere transplantiert. Nach 28 Tagen wurden die Xenotransplantate wieder entnommen und histologisch sowie immunhistochemisch aufgearbeitet. Wie in den zuvor durchgeführten Versuchen zur Volumenstabilität der Fibringle zeigten sich die verwendeten Gele mit 25 mg/ml Fibrin nach Ablauf der vierwöchigen in vivo Periode noch stabil. Sie waren bei Explantation gut auffindbar und besaßen weiterhin eine akzeptable Größe. Auch konnten mature Fettzellen und neuformierte Gefäße beobachtet werden. Obgleich sowohl die Einzelzellen als auch die Sphäroide bei Herstellung der Gele homogen verteilt waren, fanden sich jedoch nur im Randbereich der Explantate mature Fettzellen. Dies konnte auch schon in den Untersuchungen zur in vivo Gelstabilität beobachtet werden. Die zentral gelegenen Zellen zeigten währenddessen keine Fettvakuolen auf. Die immunhistochemische Aufarbeitung der Gele mittels Anti-Human-Vimentin Färbung zeigte, dass sowohl die neuformierten Gefäße als auch die maturen Fettzellen nicht

humanen, sondern murinen Ursprungs waren. Bei den maturen Adipozyten handelte es sich daher um von außen in das Fibringel eingewanderte murine Fettzellen. Die durch positive Vimentinfärbung identifizierten humanen ASC, mit welchen die Gele besiedelt worden waren, ließen hingegen keinerlei Fettvakuolen und damit keine histologisch verifizierbare adipogene Differenzierung erkennen. Gele die zur Kontrolle mit nicht adipogen induzierte ASC besiedelt und transplantiert wurden, zeigten interessanterweise den gleichen Fettgehalt wie Gele, die mit ASC besiedelt und in AIM kultiviert worden waren (Abb. 15). Auch dies lässt vermuten, dass die Zahl der maturen Adipozyten nicht von der Besiedelung und Vorkultivierung, sondern von der Invadierung muriner Fettzellen abhängig war. Insgesamt konnte kein Unterschied hinsichtlich der Adipogenese und der Vaskularisierung des Konstruktes zwischen Einzelzellen und Sphäroiden festgestellt werden.

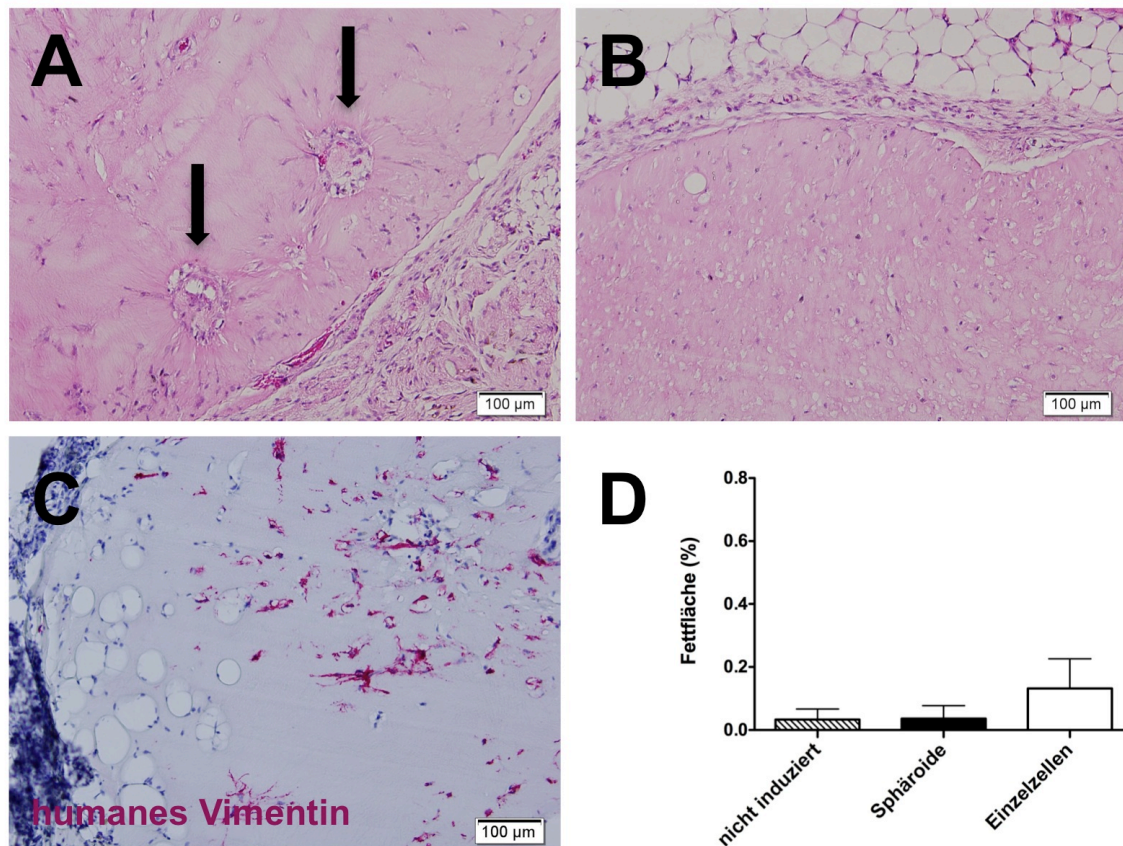


Abb. 15: Adipogenese von ASC-Einzelzellen und –Sphäroiden in Fibrin in vivo.

Modifizierte langzeitstabile Fibringele mit 25 mg/ml Fibrin wurden mit ASC-Einzelzellen (1 Mio. Zellen/Gel, n=6) und -Sphäroiden (1 Mio. Zellen/Gel, n=5) besiedelt und für 7 Tage in AIM kultiviert. Vier Wochen nach subkutaner Transplantation in die Schulterpartien 8 Wochen alter NMRI/nu Mäuse wurden die Gele explantiert und histologisch evaluiert. Zur Kontrolle wurden auch Gele (1 Mio. Zellen/Gel, n=4) mit nicht adipogen induzierten ASC mitgeführt. (A) HE gefärbte ASC-Sphäroide (↓). (B) HE gefärbte ASC-Einzelzellen. (C) Anti-Human-Vimentin gefärbte sproutende ASC-Sphäroide. (D) Prozentuale Fettfläche als Mittelwerte mit Standardabweichung.

Weitere Untersuchungen sollten den Einfluss der eingesetzten Zellzahl auf die in vivo Adipogenese evaluieren. Hierzu wurden modifizierte langzeitstabile Fibringelkonstrukte mit 25 mg/ml Fibrin ohne ASC sowie mit 1 und 2,5 Mio. induzierten ASC als Einzelzellen transplantiert. Durch die histologische Auswertung zeigte sich hier ein indirekt proportionales Verhältnis zwischen transplantierten ASC und murenen Fettzellen. Je mehr ASC in die Gele inokuliert wurden, desto weniger mature Fettzellen konnte nach vier Wochen in vivo in den Transplantaten gefunden werden. Interessanterweise schien es sogar so, dass vor allem an Stellen mit einer niedrigen lokalen Konzentration an ASC matures Fett zu finden war (Abb. 16). Die Gele, die zur Kontrolle ohne ASC transplantiert wurden, zeigten den höchsten Fettgehalt (Abb. 17).

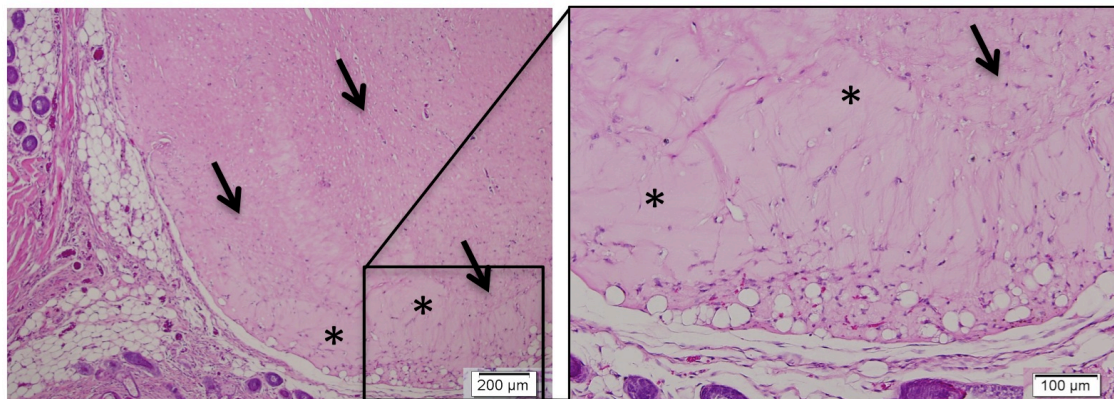


Abb. 16: Induzierte ASC und mature Fettzellen in transplantiertem Fibringel.

Mit 1 Mio. induzierten ASC-Einzelzellen besiedeltes modifiziertes langzeitstabilisiertes Fibringel (25 mg/ml Fibrin) vier Wochen nach Transplantation. Bereiche im Fibringel mit einer ausreichenden Besiedelung (→) und mit unbesiedelten Bereichen (*). In unbesiedelten Bereichen sind mature Fettzellen zu finden. In Bereichen mit einer Ausreichenden Besiedelung des Gels mit ASC (→) sind keine murenen Fettzellen zu finden.

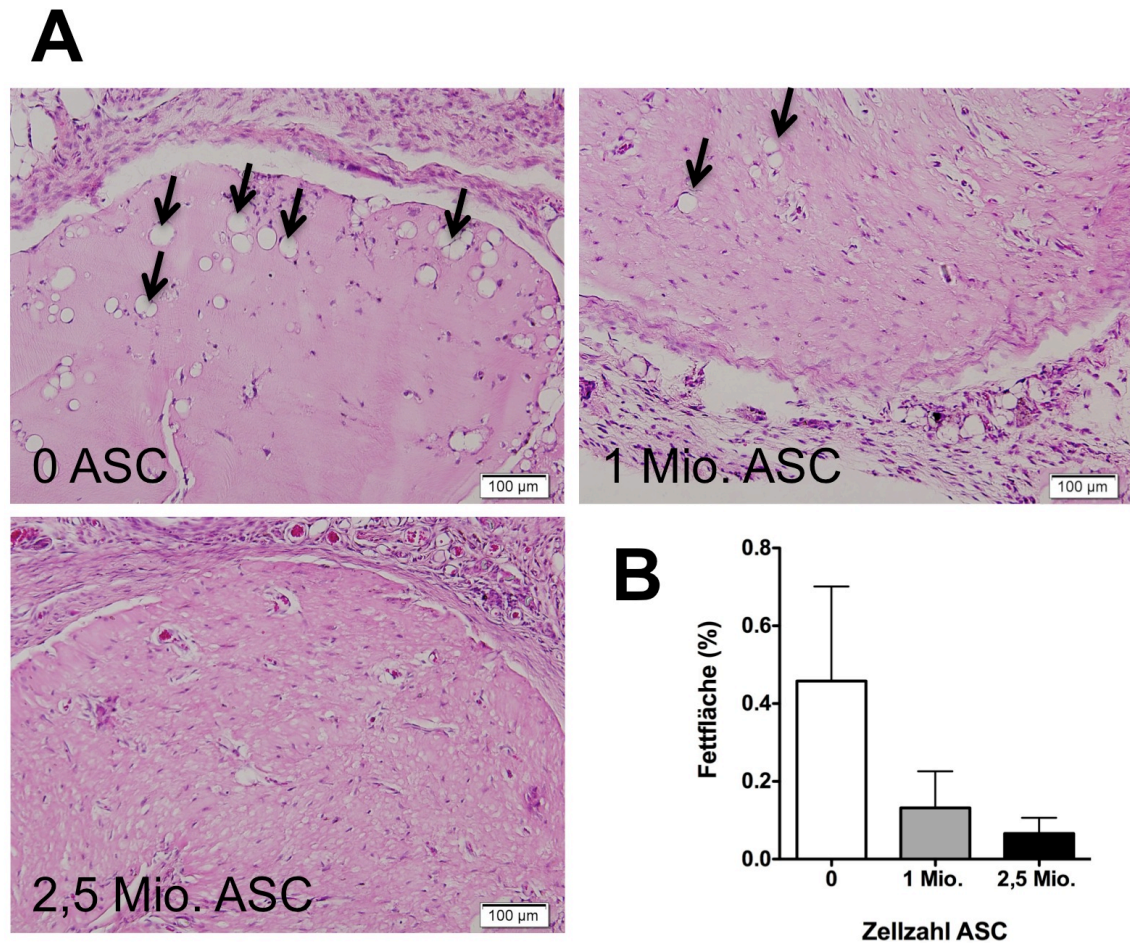


Abb. 17: Korrelation zwischen Fettfläche und verwendeter ASC-Zellzahl im Fibringel.

Modifizierte langzeitstabile Fibringele mit 25 mg/ml Fibrin wurden mit verschiedenen Konzentrationen von ASC-Einzelzellen (0, 1 Mio. u. 2,5 Mio. Zellen/Gel, jeweils n=6) besiedelt und für 7 Tage in AIM kultiviert. Vier Wochen nach subkutaner Transplantation in die Schulterpartien 8 Wochen alter NMRI/nu Mäuse wurden die Gele explantiert und histologisch evaluiert. (A) HE gefärbte Explantate. Mature Fettzellen (→). (B) Prozentuale Fettfläche als Mittelwert mit Standardabweichung.

Auch diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Zahl der maturen Adipozyten in den Konstrukten nicht von der Besiedelung und Vorkultivierung, sondern von der Invadierung muriner Zellen abhängig war. Insgesamt war die Fett- und Gefäßbildung in den Transplantaten aber eher unbefriedigend.

4.7. Adipogene Differenzierung und Vaskulogenese von SVF-Zellen in vivo

In den bisher durchgeführten Versuchen zeigten in Fibrin kultivierte ASC nach 7-tägiger hormoneller Induktion in vitro zwar eine deutliche Adipogenese, jedoch schien diese post transplantationem in vivo nicht weitergeführt zu werden. Um zu prüfen, ob für eine erfolgreiche in vivo Adipogenese weitere „Supportivzellen“ nötig sind, wurden modifizierte langzeitstabile Fibringele (25 mg/ml Fibrin) mit frisch isolierten SVF-Einzelzellen besiedelt und nach 7-tägiger hormoneller Induktion in NMRI/nu Mäuse transplantiert. Zur Kontrolle wurden auch Gele mit adipogen induzierten ASC-Einzelzellen mitgeführt. Nach vier Wochen wurden die Gelkonstrukte wieder explantiert und histologisch und immunhistochemisch evaluiert. In den mit ASC inokulierten Kontrollgelen bot sich das gleiche Bild wie in Versuchen zuvor. Es waren kaum mature Adipozyten zu finden. Die mit SVF-Zellen besiedelten Gele zeigten hingegen eine zufriedenstellende Durchsetzung mit maturen Adipozyten. Es fanden sich zahlreiche, homogen im Gel verteilte mature Fettzellen, die, wie die immunhistochemische Evaluation zeigte, humanen Ursprungs waren. Insgesamt zeigten die mit SVF-Zellen besiedelten Gele eine signifikant höhere prozentuale Fettfläche im Vergleich zu den mit ASC besiedelten Konstrukten (Abb. 18).

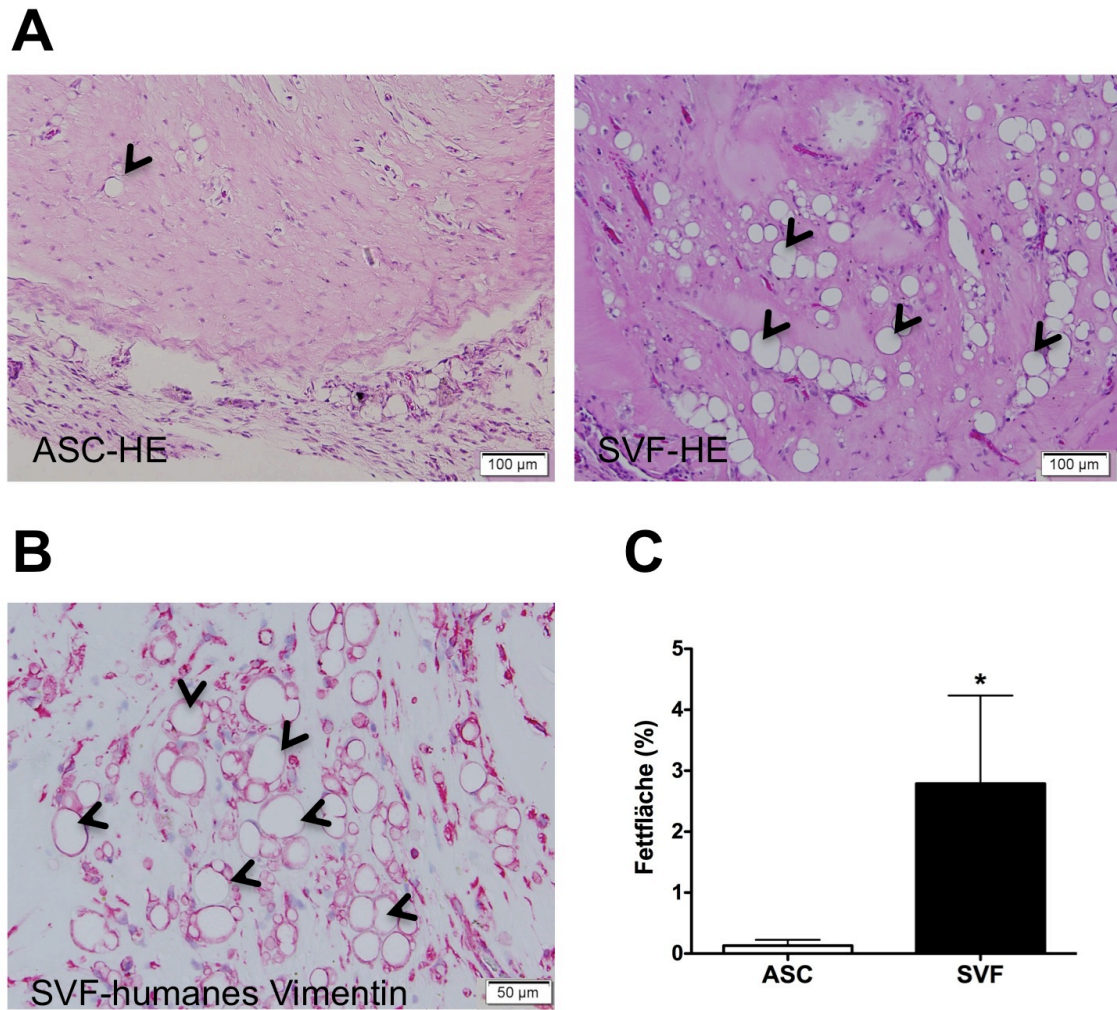


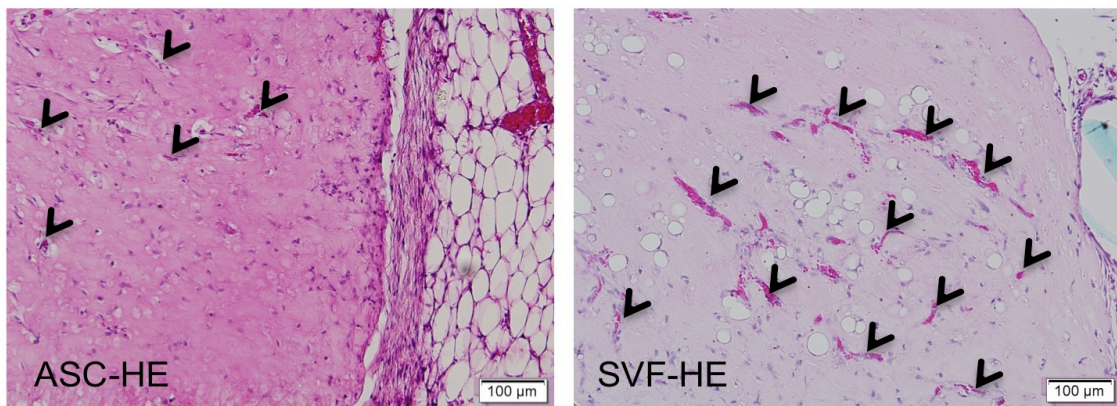
Abb. 18: Adipogenese von ASC und SVF-Zellen in langzeitstabilen Fibringelen in vivo.

Modifizierte langzeitstabile Fibringele mit 25 mg/ml Fibrin wurden mit frisch isolierten SVF-Einzelzellen (1 Mio. Zellen/Gel, n=5) besiedelt und für 7 Tage in AIM kultiviert. Vier Wochen nach subkutaner Transplantation in die Schulterpartien 8 Wochen alter NMRI/nu Mäuse wurden die Gele explantiert und histologisch evaluiert. Zur Kontrolle wurden auch Gele (1 Mio. Zellen/Gel, n=6) mit adipogen induzierten ASC mitgeführt. (A) HE gefärbte Explantate. Mature Fettzellen (>). (B) Anti-Human-Vimentin Färbung (rot). Mature Fettzellen humanen Ursprungs (>). (C) Prozentuale Fettfläche dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichung, * $p < 0,05$.

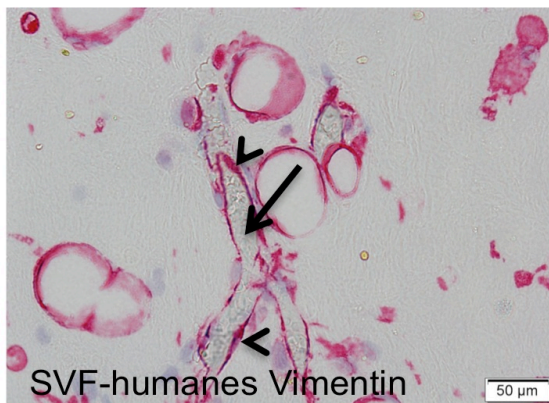
Auch die zahlreichen im Gel detektierbaren Gefäße färbten sich Anti-human Vimentin positiv. Sie sind somit als Resultat der in das Fibringel eingebrachten humanen SVF-Zellen und als nicht vom Wirt stammend anzusehen. Die

Tatsache, dass Erythrozyten in den Gefäßen detektiert werden konnten, ließ sogar den Anschluss der neu formierten Gefäße an das Gefäßsystem der Wirtstiere erkennen (Abb. 19). Im Ganzen konnte zudem eine signifikant höhere Anzahl von Gefäßen in den mit SVF Zellen besiedelten Fibrinkonstrukten im Vergleich zu den mit ASC besiedelten Gelen verzeichnet werden (Abb. 19).

A



B



C

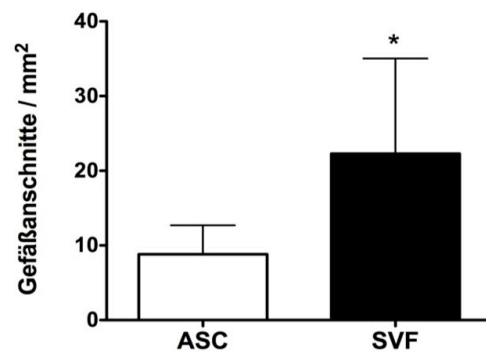


Abb. 19: Vaskulogenese von ASC und SVF-Zellen in langzeitstabilen Fibringelen in vivo.

Die Gefäßversorgung der mit ASC- und SVF-Zellen besiedelten Fibringele wurden nach Explantation histologisch evaluiert. Zur Quantifizierung wurde die Anzahl der Gefäßanschnitte/mm² an Medianschnitten ausgezählt. (A) HE gefärbte Explantate. Gefäße (>). (B) Anti-human Vimentin Färbung (rot). Gefäße humanen Ursprungs (>), Erythrozyten (→). (D) Mittelwerte mit Standardabweichung der Gefäßanschnitte/mm² (n=5), * p < 0,05.

Insgesamt konnte also mit modifizierten langzeitstabilen Fibringelen, welche mit SVF Zellen besiedelt und hormonell kurzzeitinduziert (≤ 7 Tage) wurden, ein artifiziell hergestelltes, deutlich mit maturen Adipozyten durchsetztes und gut vaskularisiertes Konstrukt in vivo etabliert werden. Im Vergleich zur Verwendung der ASC konnte durch die Verwendung der SVF als Zellquelle eine deutlich bessere Adipogenese in den Konstrukten bei gleichzeitig verbesserter Vaskularisierung erzielt werden.

5. Diskussion

Der Ersatz von Weichteilgewebedefekten, insbesondere von Fettgewebe, ist auch heute noch nur unzufriedenstellend lösbar. Die Rekonstruktion der durch Trauma, Verbrennung oder Resektion entstandenen Defekte erfolgt in der Regel durch autologe Lappenplastiken oder Fremdmaterialien wie z.B. Silikonimplantate und weist zahlreiche Nachteile auf. Lappenplastiken werden über die Zeit, auf Grund einer unzureichenden Versorgung des transplantierten Gewebes, teilweise wieder resorbiert (bis zu 60%) [3]. Implantate können reißen, verrutschen, sind nicht biokompatibel und können allergische Reaktionen hervorrufen [3, 15, 126]. Eine vielversprechende Alternative zu diesen derzeit verfügbaren Behandlungsmethoden bietet der Ansatz des *tissue engineerings*. Ziel ist hierbei, durch die Transplantation von mit autologen Stammzellen besiedelten biokompatiblen Matrices, in vivo funktionsfähiges Gewebe zu regenerieren, das Form und Volumen dauerhaft behält [127-129]. Ziel dieser Arbeit war es, mit adipogen differenzierbaren mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe besiedelte Fibrinkonstrukte herzustellen und ihre adipogene Kapazität in vitro und in vivo zu evaluieren. Letztendlich gelang es, durch Transplantation von modifizierten langzeitstabilen Fibringelen, welche mit Zellen der stromal-vaskulären Fraktion als neuer Zellquelle besiedelt waren, in vivo ein formstabiles, gut vaskularisiertes und mit maturen Fettzellen durchsetztes Gewebekonstrukt herzustellen.

5.1. 2D- und 3D-Zellkultur im Vergleich

Ein essentieller Bestandteil von Geweben ist die extrazelluläre Matrix, in die die Zellen im Gewebeverbund eingebettet sind. Die ECM ist hierbei nicht nur für die dreidimensionale Struktur der Gewebe verantwortlich, sondern ist auch über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen für die Funktion der Zellen, d.h. für Proliferation, Migration und Zelldifferenzierung verschiedenster Zelltypen von

entscheidender Bedeutung [96, 130]. Diese und andere Aspekte eines dreidimensionalen Gewebes kann eine konventionelle 2D-Kultur nicht nachbilden. Deshalb ist eine 3D-Zellkultivierung *in vitro*, die ein physiologisch funktionierendes und lebendes Gewebe besser nachbildet als eine konventionelle 2D-Kultur, ein rationaler Ansatz für die Herstellung von Gewebekonstrukten mittels *tissue engineering* [96]. So konnten beispielsweise die Studien von Fischbach et al. zeigen, dass 3D-kultivierte 3T3-L1 Präadipozyten die morphologischen und funktionellen Eigenschaften lebenden Fettgewebes besser als 2D-kultivierte Zellen repräsentieren [131]. Da in unserer Arbeitsgruppe bereits ein 3D-Sphäroidmodell unter Verwendung von 3T3-L1 Mauspräadipozyten etabliert wurde und gezeigt werden konnte, dass die 3D-Sphäroidkultur insgesamt eine größere adipogene Fähigkeit aufwies [6], sollten zu Beginn dieser Arbeit die adipogenen Fähigkeiten humaner ASC verschiedener Spender in einer konventionellen 2D-Kultur vergleichend zu einer 3D-Sphäroidkultur untersucht werden. Tatsächlich wiesen die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu 2D- und 3D-kultivierten ASC *in vitro* vergleichbare Resultate wie die der Präadipozytenzelllinie 3T3-L1 auf. Die in den durchgeführten Versuchen zu dreidimensionalen Sphäroiden geformte ASC bewiesen eine größere Sensitivität gegenüber einer adipogenen Induktion als 2D-kultivierte ASC-Einzelzellen. Schon nach hormoneller Kurzzeitinduktion, also bereits nach zweitägiger Induktion, ließen die Sphäroide eine deutliche *in vitro* Adipogenese erkennen, während dies bei 2D-kultivierten Zellen erst nach 15-tägiger Induktion der Fall war. Auch andere Forschergruppen konnten bisher zeigen, dass die Sphäroidkultur das natürliche Mikroumfeld eines Gewebes besser wiedergibt als eine 2D-Kultur und daher vorteilhaft für das *Tissue Engineering* und den therapeutischen Einsatz von Stammzellen sein kann. So konnten Cheng et al. zeigen, dass ASC-Sphäroide mehr ECM Moleküle wie Laminin und Fibronectin im Vergleich zu einer 2D-Kultur produzieren. Auch eine verbesserte Differenzierungsfähigkeit der Sphäroide gegenüber der 2D-Kultur, wie es sich in unseren Resultaten zeigte, konnte die Arbeitsgruppe nachweisen. So ergab nach neurogener und hepatogener Induktion die RT-PCR signifikant höhere Messwerte der Markergene Nestin und Albumin in der Sphäroidkultur im

Vergleich zur 2D-Kultur [132]. Vergleichbare Resultate hat die Forschergruppe um Zhang zeigen können. Sie konnten eine signifikante Verbesserung der multipotenten Differenzierungsfähigkeiten von ASC durch die Kultivierung als Sphäroide nachweisen. Auch eine Verstärkung der Stammzeleigenschaften und damit ein verbessertes therapeutisches Potenzial der ASC-Sphäroide im Vergleich zu konventionell kultivierten ASC konnte dokumentiert werden [133]. Des Weiteren erzielten in Untersuchungen von Liu et al. ASC-Sphäroide eine verbesserte Heilung von Myokardinfarkten im Tiermodell als Einzelzellen [134].

5.2. Adipogene Differenzierung von ASC-Einzelzellen und –Sphäroiden in Fibrin in vitro

Auf Grund der eigenen Untersuchungsergebnisse und der Ergebnisse anderer Forschergruppen zu ASC-Sphäroiden im Vergleich zu ASC-Einzelzellen sollte die Eignung von Sphäroiden als Zellbausteinen, sogenannten *building blocks*, für das *adipose tissue engineering* untersucht werden. Als Trägermatrix für die Fettgewebekonstrukte wurde ein Fibringel verwendet, welches sich auf Grund z.B. seiner Biokompatibilität und seiner dem Fettgewebe ähnlichen Textur hierfür sehr gut eignet. Aber auch die autologe Gewinnung von Fibrinogen aus Plasma macht es für das *tissue engineering* attraktiv, da so Abstoßungsreaktionen und Infektionen vermieden werden können [108]. Einer der Hauptnachteile des Fibrins ist seine geringe mechanische Belastbarkeit und mangelnde Volumenstabilität [3]. Eyrich et al. konnten durch die Veränderung des Fibrinogengehaltes, des pH-Wertes und der Calciumchloridkonzentration ein langzeitstabiles Fibringel herstellen, welches mechanisch belastbar und weniger rasch abbaubar war, so dass es auch für das *tissue engineering* von Knorpel geeignet war [121]. In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde zunächst in vitro untersucht, ob dieses langzeitstabile Fibringel auch für die Herstellung von Fettgewebekonstrukten geeignet ist. Dazu wurde die Vitalität der Zellen und die Adipogenese der ASC in diesem Gel analysiert. Die Vitalität der Zellen war im Gel nicht beeinträchtigt, eine adipogene Differenzierung der Zellen war

bereits nach 7 Tagen auf histologischer und molekularer Ebene nachweisbar. Somit schien das langzeitstabile Fibringel auch für das *in vitro tissue engineering* von Fettgewebe geeignet zu sein. Da die Sphäroide *in vitro* ohne Fibrinmatrix insgesamt eine höhere Sensitivität gegenüber der adipogenen Induktion zeigten (Differenzierung bereits nach zweitägiger Induktion), wurde die adipogene Differenzierungsfähigkeit der Sphäroide auch im langzeitstabilen Fibringel untersucht. Dabei war eine suffiziente Adipogenese der Sphäroide nach 2-tägiger Induktion nicht mehr darstellbar. Die Sphäroide waren nach Einbettung in das Fibringel wie die Einzelzellen erst nach längerer Induktionsdauer differenzierbar. Auch bei einer vorangegangenen Induktion außerhalb der Fibrinmatrix und einer späteren Überführung der induzierten Zellen in das Gel, konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Adipogenese zwischen der 2D- und 3D-Kultur im Fibringel gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Dass verschiedene Fibrinformulierungen einen Einfluss auf die darin enthaltenen Zellen haben, wurde bereits in mehreren Studien beschrieben. So konnte nachgewiesen werden, dass mit steigendem Fibrinogengehalt die Proliferationsrate von Fibroblasten im Fibringel sinkt [125]. Aber auch die Thrombinkomponente beeinflusst die im Fibrin enthaltenen Zellen. Durch eine Erhöhung der Thrombinkonzentration entsteht ein feineres Fibrinnetz wodurch sich die Morphologie der Zellen verändert. So zeigen die Zellen hierbei eine weniger kompakte, sondern verlängerte Zellform, wie Rowe et. al. zeigen konnten. [135]. Ein weiterer Faktor, der die Zellen im Fibringel beeinflusst, ist der pH-Wert während des Gelierens des Gels. Untersuchungen von Collen et al. ergaben, dass das Gelieren bei einem pH-Wert von 7,0 in dickeren Fibrinfasern und einem trüben Gel resultierte, welches allerdings MVEC die Ausbildung eines vaskulären Netzes ermöglichte [136]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen handelt es sich möglicherweise um einen inhibitorischen Effekt der Fibrinmatrix auf die Sensitivität der ASC-Sphäroide gegenüber adipogenen Induktionsreizen und damit auf deren adipogene Differenzierungsfähigkeiten. Schmal et. al. haben in ihren Untersuchungen

ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Differenzierung von Chondrozyten durch eine Fibrinmatrix feststellen können [137].

5.3. Prävascularisierung der Fibrinkonstrukte

Das Fettgewebe zählt zu den hochvaskularisierten Geweben und wird von einem dichten Netz an Kapillaren durchzogen (≥ 1 Kapillare/Fettzelle) [56]. So scheint die in der Regel zu beobachtende Volumenreduktion bei autolog transplantierten Lappenplastiken ihre Ursache in einer inadäquaten Gefäßversorgung zu haben [85, 147]. Da durch Diffusion lediglich über Distanzen von 100-200 μm eine suffiziente Gewebsversorgung stattfinden kann [148], stellt eine adäquate Vaskularisation engineerter Gewebekonstrukte für eine erfolgreiche in vivo Transplantation eine Grundvoraussetzung und zugleich eine der größten Herausforderungen des *tissue engineering* dar [142]. Während der in vitro Kultivierung der ASC-Sphäroide und der ASC-Einzelzellen im Fibringel konnte ein typisches zentrifugales Migrationsmuster, das sogenannte *sprouting* festgestellt werden [140]. Da diese endothelzellähnlichen *sprouts* auch als *vascular like structures* angesehen werden [141, 142] und ASC auch die Fähigkeit besitzen endothelial zu differenzieren [122, 143, 144] wurden diese *sprouts* im Hinblick auf prävasculäre Strukturen untersucht. Hier zeigte sich, dass es sich in diesem Fall um aussprossende ASC-Fortsätze handelte, die keine Expression von CD31 erkennen ließen. Vielmehr beinhalteten die Zellaussprossungen fettzelltypische Fettvakuolen die mit Oil Red O anfärbbar waren, so dass die Fortsätze als ASC-Ausläufer identifiziert werden konnten und es sich nicht um prävasculäre Strukturen handelte. Verschiedene Studien zeigen, dass eine endotheliale Differenzierung von ASC in der Regel durch Wachstumsfaktoren im Zusammenspiel mit Matrigel, Hypoxie oder Scherkräften zustande kommt [58, 144-146]. Um prävascularisierte Konstrukte zu generieren wurden daher verschiedene Prävascularisierungsstrategien im Fibringel untersucht. Die hierfür durchgeführte Co-kultivierung von ASC zusammen mit MVEC brachte keine prävascularisierten Fibrinkonstrukte hervor. Die ASC

zeigten ein deutliches *sprouting* ohne Expression von CD31, wohingegen die MVEC keinerlei *sprouting* oder *tubeformation* aufzeigten. Dies war unabhängig von der Verwendung verschiedener Fibringelformulierungen. Denn die Veränderung des Fibrinogengehaltes und damit der Stabilität der Konstrukte zeigte keinen Einfluss auf die Morphologie der Endothelzellen. Allerdings wurde in allen Fibringelformulierungen immer die selbe Menge an Aprotinin verwendet. So scheint Aprotinin aber eine hemmende Wirkung auf die Bildung von prävasculären Strukturen von MVEC in Fibrin zu besitzen, wie Untersuchungen von Collen et al. zeigen konnten [136, 149]. Ein Verzicht auf Aprotinin bei der Herstellung der Konstrukte, wäre ein Ansatzpunkt, um das zukünftig nochmals zu evaluieren. Auch die Testung verschiedener Kulturmedien, wie die 1:1 Mischmedien aus PGM/EGM, AIM/EGM und EGM alleine, führte zu keiner Prävascularisierung in den co-besiedelten Gelen. Andere Gruppen haben zudem gezeigt, dass die Formation von vaskulären Strukturen auch von der Art der verwendeten Zellen, z.B. reife Zellen oder Vorläuferzellen, [124] und dem Zusammenspiel mehrerer Zelltypen abhängig ist [150]. Möglicherweise wäre eine Verwendung von endothelialen Vorläuferzellen oder der Einsatz einer weiteren Zellart wie Fibroblasten oder Perizyten in den co-besiedelten Fibringelen von Vorteil. Auch wäre eine weitere Veränderung der Fibringelformulierung ein untersuchenswerter Ansatz, um eine Prävascularisierung der Fibrinkonstrukte zu erreichen. Da jedoch die Verwendung von SVF-Zellen in meinen Versuchen zu einer suffizienten Gefäßversorgung der Konstrukte geführt hat, bleibt die Frage, ob derartige Untersuchungsansätze weiterhin lohnenswert sind.

5.4. Validierung verschiedener Fibringle in vivo

Um die in vitro hergestellten Fettgewebekonstrukte auch unter in vivo Bedingungen zu analysieren, wurden zunächst Analysen zur Volumenstabilität der Fibrinmatrix in vivo vorgenommen. Denn eine der Anforderungen an eine zelltragende Matrix ist ein bestimmtes Maß an zeitlicher und mechanischer

Stabilität, um die Bildung einer belastbaren gewebespezifischen ECM zu ermöglichen [3]. Fibrin ist in vielerlei Hinsicht, wie z.B. Festigkeit und Biokompatibilität, eine ideale Trägermatrix für das *tissue engineering* adipogenen Gewebes [140, 151]. Fibrin bietet neben seiner Biokompatibilität auch den Vorteil, sowohl flüssig, so wie z.B. Tissucol von Baxter, als auch fest verarbeitet werden zu können. Vorteil einer flüssigen Konsistenz ist die Injizierbarkeit des Gels. Dies geht nicht nur mit einem geringeren Gewebetrauma, sondern auch mit einer erheblich reduzierten Narbenbildung einher. Die Hauptnachteile fibrinhaltiger Matrices sind die geringe Stabilität und Haltbarkeit in vivo [152]. Bei Einsatz tissue engineerter Fettgewebstrukturen sollten die Transplantate idealerweise bis zu ihrer vollständigen Integration in den Organismus ausreichend stabil sein, um den ursprünglichen Zustand des defekten Gewebes hinsichtlich Volumen und Kontur zu rekonstruieren. Deshalb wurden unterschiedliche, mit ASC besiedelte, Fibrinformulierungen (modifiziert langzeitstabil, Tissucol) in vivo auf ihre Volumenstabilität, Adipogeneseeigenschaften und Vaskularisierung hin untersucht. Wie sich in den durchgeführten Experimenten zeigte, waren transplantierte Tissucol Konstrukte sehr gut mit muren Fettzellen und Gefäßen durchsetzt, jedoch zeigten sich die Transplantate nur wenig volumenstabil. Die modifizierten langzeitstabilen Gele hingegen schnitten mit ihrer höheren Volumenpersistenz hinsichtlich Stabilität hier wesentlich besser ab. Diese verbesserte Langzeitstabilität konnte bereits in einer in vitro Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden [153]. Gleichzeitig konnte mit dem höheren Grad an Stabilität jedoch eine erniedrigte Formation muren Fettgewebes und neuer Gefäße beobachtet werden, so dass davon auszugehen ist, dass die Festigkeit der Konstrukte einen inhibierenden Einfluss auf die Adipogenese und Neovaskularisation besitzt. Diese Ergebnisse konnten in weiterführenden in vivo Versuchen unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden [20]. Ein guter Kompromiss zwischen Formstabilität auf der einen und Adipogenese und Vaskularisation auf der anderen Seite, waren hier die hergestellten modifizierten langzeitstabilen Gele mit einer verminderten Fibrinkonzentration von 25 mg/ml (ursprünglich bei Eylich et al. 50 mg/ml). So konnte auch in

bereits vorausgegangenen in vitro Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass zum Einen, wie bereits erwähnt, die in vitro Stabilität des langzeitstabilen Geles im Vergleich zu einem Tissucol-Gel verbessert ist und zum Anderen höhere Leptinspiegel in langzeitstabilen Konstrukten im Vergleich zu Tissucol-Konstrukten nachweisbar waren [153]. Die immunhistochemische Analyse der transplantierten Konstrukte ergab, dass die in den Gelen detektierbaren muren Fettzellen und Gefäße murinen Ursprungs waren und bei den ins Gel inokulierten ASC keinerlei adipogene Differenzierung in vivo weiter stattfand. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Wittmann et al. in einer vergleichenden in vivo Studie von Konstrukten, welche aus einem formgebenden Polyurethan-Schaum und einem Fbringel (langzeitstabil bzw. Tissucol) kombiniert waren. So konnten nach fünf Wochen in vivo keine humanen ASC mehr in den Konstrukten detektiert werden. Bereits veröffentlichte Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass sowohl das *scaffold* als auch die Präkonditionierung/Präkultivierung der ASC einen Einfluss auf die in vivo Entwicklung von artifiziell hergestellten Fettgewebekonstrukten hat [111, 139]. Ursache könnte wie oben bereits beschrieben, möglicherweise ein inhibitorischer Effekt der Fbrinmatrix auf die adipogene Differenzierung der ASC sein. Auch Schmal et. al haben in ihren Untersuchungen einen negativen Einfluss auf die Differenzierung von Chondrozyten durch eine Fbrinmatrix festgestellt [137]. Ebenso die Induktionsdauer während der in vitro Präkultivierung der Gewebekonstrukte könnte einen Einfluss auf die in vivo Adipogenese gehabt haben. So konnten Weiser et al. anhand von 3T3-L1 Zellen zeigen, dass die Präkultivierungsstrategien eine große Rolle für den Erfolg einer in vivo Fettgewebeentwicklung spielt [138]. Möglicherweise könnte durch eine Verlängerung der in vitro Induktionszeit ein verbessertes Ergebnis hinsichtlich der Adipogenese der ASC im Fbringel in vivo erzielt werden. Darüber hinaus schienen die in die Gele eingearbeiteten ASC einen inhibierenden Effekt auf einwandernde murine Zellen zu besitzen, da Fbringele ohne Zellbesiedelung oder Stellen in Gewebekonstrukten mit einer niedrigen lokalen ASC-Dichte mehr mature murine Fettzellen zeigten (vgl. Abb. 12). Im Hinblick darauf wäre z.B. ein völlig anderer Ansatz nicht durch die Besiedelung

der Gele mit Zellen eine Neuentwicklung von Gewebe zu erreichen, sondern durch Injektion oder Transplantation des Fibrins alleine eine Gewebeneuformation vom Empfänger selbst ausgehend zu induzieren. Dies könnte z.B. auch durch die Einarbeitung von Wachstumsfaktoren unterstützt werden, ähnlich wie es bereits mit Matrigel oder einer Collagen Matrix versucht wurde [154, 155].

5.5. ASC-Einzelzellen und –Sphäroide in Fibrin in vivo

Um die Fähigkeit zur Fettgewebekonstruktion inklusive der Ausbildung eines vaskulären Netzes zu untersuchen wurden in dieser Arbeit vergleichende in vivo Untersuchungen im Mausmodell anhand von ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden im zuvor evaluierten Fibringel mit einer Fibrinkonzentration von 25 mg/ml durchgeführt. Nach einer Induktionszeit von 7 Tagen wurden die Konstrukte transplantiert und nach vier Wochen in vivo wieder explantiert. Die histologischen und histomorphometrischen Analysen ergaben hinsichtlich der Adipogenese und Vaskulogenese keinen Unterschied zwischen einer Einzelzell- und Sphäroidbesiedelung. Insgesamt war das Ergebnis nicht zufriedenstellend, da die ASC sowohl als Einzelzellen als auch als Sphäroide keine nennenswerte Fettakkumulation zeigten. Quantitativ ergab die Auswertung eine vergleichbare Fettfläche wie sie bei den nicht induzierten Kontrollgelen gefunden werden konnte, sodass folglich keine Adipogenese der ASC nach Induktion im in vivo Mausmodell stattzufinden schien. Möglicherweise wäre eine andere in vitro Präkultivierungsstrategie hierbei von Vorteil gewesen. Denn die Dauer der adipogenen Vorkultur hat einen großen Einfluss auf die erfolgreiche Entwicklung von Fettgewebekonstrukten in vivo, wie Weiser et al. nachweisen konnten. So lag die optimale Vorkulturdauer bei 9 Tagen [138]. Tsuij et al. konnten zeigen, dass z.B. die Verwendung von bFGF während der ASC Vorkultur deren Poliferationsfähigkeit verstärkt und gleichzeitig deren Differenzierungsfähigkeit zu maturen Adipozyten senkt [139].

Auch durch die Besiedelung der Konstrukte mit steigenden Zellzahlen, wie 1 und 2,5 Mio. Zellen, konnte keine verbesserte Adipogenese erreicht werden. Im Gegenteil, so konnte die signifikant größte Fettfläche in den Konstrukten gefunden werden, welche zur Kontrolle ohne Zellen implantiert worden waren. Denn in diesen Konstrukten war Raum zum Einwandern von Fettzellen der Wirtstiere, welche dann zu maturen Adipozyten differenzierten. Je dichter die Fibringele mit Zellen besiedelt waren, desto geringer war die messbare Fettfläche in den Konstrukten. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Resultaten von Torio-Padron et al., dessen Gruppe mit erhöhter Zellzahl in einem Fibringel eine verbesserte Fettgewebekonstruktion zeigen konnte [111]. Diese Unterschiede in den Ergebnissen könnten durch die Verwendung einer anderen Fibrinmatrix der Forschergruppe um Torio-Padron zustande gekommen sein. So modifizierte die Gruppe einen handelsüblichen Fibrinkleber zur Verwendung in ihren Versuchen. Aber auch eine andere Vorkultivierungsstrategie, nämlich die Verwendung undifferenzierter Präadipozyten im Versuchsaufbau, könnte die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

5.6. SVF-Zellen in Fibrin für das Adipose tissue engineering

Nachdem sich in den in vivo Versuchen mit ASC im Fibringel keine zufriedenstellende Adipogenese und Vaskulogenese erreichen ließ, wurde eine neue, alternative Zellquelle zur Herstellung von Fettgewebekonstrukten in vivo untersucht. Die hierzu verwendeten Zellen der stromal-vaskulären Fraktion wurden aus Liposuktionspräparaten isoliert. Da sich im Fettgewebe neben maturen Fettzellen und ASC auch Endothelzellen, Perizyten, Immunzellen, Fibroblasten und andere undifferenzierte Vorläuferzellen finden, handelt es sich bei der SVF um eine heterogene Zellmischung [156]. Diese Heterogenität könnte bei der Histogenese von Vorteil sein. Denn dieser Prozess ist durch ein komplexes örtliches und zeitliches Zusammenspiel exzitatorischer und inhibitorischer Signale geregelt [98] und es sind nicht nur die ECM und die

löslichen Botenstoffe, sondern auch Zell-Zell-Interaktionen in diesen Prozess involviert [7]. Zudem wurde die erfolgreiche Verwendung von SVF-Zellen in einer Kollagen-, Gelatine- und Fibrinmatrix für das *adipose tissue engineering* in vitro bereits beschrieben. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die SVF-Zellen auf einer Kollagen- und Gelatinematrix auch ohne Vorkultivierung während der vierwöchigen in vitro Kulturdauer sehr gut proliferierten, vital waren und ohne Induktion adipogen differenzierten [93]. Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte die adipogene und endotheliale Differenzierbarkeit der SVF in dem Fibrinkleber Tissucol von Baxter. In einer dreiwöchigen in vitro Kultur zeigten sich die Zellen im Fibrinkleber stets vital und wiesen eine deutliche Proliferation auf. Unter Verwendung von Induktionsmedien konnten die SVF-Zellen sowohl adipogen als auch endothelial differenziert werden [157]. Da die Ergebnisse der in vitro Studien zur Verwendung der SVF für das *adipose tissue engineering* vielversprechend schienen, wurde in dieser Arbeit, nach unserem Wissen erstmalig, die SVF in einem langzeitstabilen Fibrinringel in vivo hinsichtlich ihrer Adipogenese- und Vaskulogenesefähigkeiten untersucht. Die Besiedelung von modifizierten langzeitstabilen Gelen (25 mg/ml Fibrin) mit dem heterogenen Zellgemisch der SVF und eine hormonelle adipogene Kurzzeitinduktion (7 Tage) ermöglichte die Etablierung eines formstabilen und gut vaskularisierten engineernten Gewebekonstruktes, welches, im Vergleich zu den ASC Konstrukten, mit zahlreichen maturen Adipozyten durchsetzt war. Die immunhistochemische Analyse der Gele zeigte, dass sowohl die sich in den Gelen befindlichen maturen Adipozyten als auch die blutleitenden Gefäße humanen Ursprungs waren. Auch ein erfolgreicher Anschluss der Transplantate an das Gefäßnetz der Wirtstiere konnte nachgewiesen werden, da in allen explantierten Gelen durchblutete humane Gefäße gefunden wurden. Vermutlich ist die Zusammensetzung mit verschiedensten Zelltypen und Vorläuferzellen der SVF für die erfolgreiche Adipogenese und Vaskulogenese der Konstrukte verantwortlich [10, 17, 18]. Aufbauend auf diesen während meiner Dissertation entstandenen Ergebnissen wurden weitere in vivo Untersuchungen zur SVF in Fibrin in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich durchgeführt. Hierbei wurde unter anderem zur Herstellung von artifiziellen Fettgewebekonstrukten noch andere

Fibrinmatrices wie Tissucol besiedelt mit SVF-Zellen getestet. Die Untersuchungen bewiesen wieder, dass die SVF-Zellen für das *adipose tissue engineering* in vivo in einer Fibrinmatrix geeignet sind. Es konnte ein gut vaskularisiertes und mit maturen Adipozyten durchsetztes Gewebekonstrukt hergestellt werden. Diese Ergebnisse konnten dann 2015 unter dem Titel „Engineering Vascularized Adipose Tissue Using the Stromal-Vascular Fraction and Fibrin Hydrogels“ im Journal „Tissue Eng Part A“ veröffentlicht werden [20]. Möglicherweise wäre es lohnenswert zur Herstellung von artifiziellen Fettgewebstrukturen auch noch Kombinationen aus stabilen Stützmaterialien zusammen mit Fibrin besiedelt mit SVF-Zellen zu testen, ähnlich wie es bereits für ASC in einer Fibrin/Polyurethanschäum Matrix untersucht wurde [153]. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit durch die Optimierung der Fibrinmatrix und der Verwendung einer neuen, heterogenen Zellquelle (SVF) die Etablierung eines formstabilen Gewebekonstruktes, welches gut vaskularisiert und an das Blutgefäßsystem des Wirtstieres angeschlossen war, und zudem mit zahlreichen maturen Adipozyten durchsetzt war in vivo erreicht werden.

5.7. Ausblick

Bei der Entwicklung von Gewebekonstrukten, die für einen klinischen Einsatz gedacht sind, müssen das als *scaffold* verwendete Biomaterial und die ex vivo kultivierten Zellen vor einer klinischen Anwendung viele regulatorische Hürden und Sicherheitsbedenken überwinden. So kann der Transfer der artifiziell hergestellten Gewebe vom Labor in den klinischen Gebrauch durch die Verwendung bereits zugelassener Materialien und möglichst nicht manipulierter autologer Zellen erleichtert werden [158, 159]. Die Verwendung von Fibrin und SVF-Zellen im in dieser Arbeit etablierten Modell bietet zahlreiche Vorteile im Hinblick auf eine Zulassung und klinische Anwendung. Fibrin als Matrix ist nicht nur biokompatibel, biodegradibel und autolog gewinnbar [160, 161], sondern es gibt bereits für die Anwendung beim Menschen zugelassene und kommerziell

verfügbare Fibrinlösungen wie z.B. den Fibrinkleber Tissucol von Baxter. Die Verwendung eines Fibrinklebers würde zudem durch seine Injizierbarkeit minimal invasive chirurgische Eingriffe ermöglichen. Die Verwendung von ASC und SVF-Zellen als Zellquellen erleichtert den Transfer in die klinische Anwendung, da diese autolog über Liposuktion gewonnen werden können und dieser Eingriff mit einer nur geringen Belastung für den Patienten und mit einem geringen medizinischen Aufwand im Vergleich zur Gewinnung von BMSC verbunden ist [162]. Der Einsatz der nur minimal manipulierten SVF-Zellen statt der in der Kulturflasche herangezogenen und expandierten ASC für die Generierung von Fettgewebekonstrukten bietet weitere Vorteile; denn bei der SVF entfällt gegenüber einer Gewinnung von ASC die zeitaufwändige Vorkultivierung der Zellen im Labor. Außerdem konnte durch die Verwendung der heterogenen SVF mit nur einer einzelnen Zellquelle ein gut vaskularisiertes Fettgewebekonstrukt generiert werden. Durch die Optimierung dieses Ansatzes wäre eine *one step surgery* möglich. Das heißt in nur einem Operationsschritt könnten die Zellen gewonnen, in die Matrix inkorporiert und direkt ohne Kultur im Labor dem Patienten wieder implantiert werden. Für eine klinische Anwendung werden größere Konstrukte mit mehr Volumen benötigt, welche in Langzeitstudien in Groß-Tiermodellen untersucht werden müssten. Dennoch können die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse richtungweisend für weitere Schritte hin zu einem erfolgreichen *adipose tissue engineering* sein.

Auch in der Veterinärmedizin entwickeln sich in den letzten Jahren sowohl die experimentelle als auch die klinische Stammzellforschung weiterhin rasch voran. Klinisch werden vor allem Sehnen- und Gelenk-/Knorpelschäden bei Pferden und Hunden stammzelltherapeutisch behandelt. Häufig werden hierbei aber immer noch Stammzellen aus dem Knochenmark und nur selten ASC oder SVF-Zellen verwendet [163]. Da diese aber leichter, in größeren Mengen, mit einem geringeren Risiko für den Patienten und kostengünstiger gewonnen werden können, wäre der Einsatz der ASC und SVF-Zellen auch in der Veterinärmedizin von Vorteil. Und obwohl es bereits Firmen gibt, die eine ASC-Stammzelltherapie für Tiere anbieten, gibt es bisher nur eine sehr geringe Anzahl an klinischen Studien zur Verwendung von ASC in der Veterinär-

Stammzelltherapie. Es sind unbedingt weitere Studien notwendig, um die Möglichkeiten für einen Einsatz von ASC in der Tiermedizin zu evaluieren und deren tatsächliches Potenzial zu erfassen [164]. So könnten ASC-Sphäroide auch in der Stammzelltherapie beim Tier Anwendung finden und durch ihre sensitivere Differenzierungsfähigkeit die Kulturdauer im Labor verkürzen und auch einen größeren therapeutischen Nutzen haben. Aber auch SVF-Zellen haben großes Potenzial für die Verwendung in der Veterinärmedizin. Denn beim Einsatz der SVF-Zellen entfällt gegenüber einer Gewinnung von ASC die zeitaufwändige Vorkultivierung der Zellen im Labor, so dass auch hier eine *one step surgery* möglich wird. Und wie diese Arbeit zeigte, konnte mit nur einer einzelnen Zellquelle, der SVF, in vivo ein gut vaskularisiertes Gewebekonstrukt generiert werden. Möglicherweise hat die SVF auch beim Einsatz in der Stammzelltherapie eine bessere therapeutische Wirkung. Diese Arbeit hat gezeigt, dass der Einsatz von 3D-Sphäroiden und SVF-Zellen lohnenswert sein kann. Diese Ergebnisse könnten auch für die veterinärmedizinische Stammzelltherapie gelten. Es ist denkbar, dass die intraläsionale Injektion von ASC-Sphäroiden oder SVF-Zellen bei Sehnen- oder Knorpelschäden ein verbessertes therapeutisches *outcome* ermöglicht. Aber nicht nur der klinische Einsatz von artifiziell hergestellten Gewebekonstrukten ist veterinärmedizinisch relevant, sondern auch der experimentelle und diagnostische Einsatz. Denn durch die Generierung physiologisch funktionierender Gewebe im Labor können biologische Modelle für die Forschung bereitgestellt werden, sodass die Anzahl der Tierversuche verringert werden könnte. So kann das *tissue engineering* auch einen Beitrag zum Tierschutz leisten.

6. Zusammenfassung

Es besteht ein stetig wachsender Bedarf an geeigneten Implantaten in der rekonstruktiven Medizin, um Weichteildefekte adäquat ersetzen zu können. Die bisher hierbei angewendeten Wiederherstellungsmethoden, wie z.B. Lappenplastiken und künstliche Implantate, sind teilweise mit gravierenden Nachteilen behaftet. Daher werden innovative Methoden und Entwicklungen, die einen dauerhaften und autologen Weichteilersatz ermöglichen, dringend benötigt [3, 15, 165]. Ziel des *adipose tissue engineering* ist die Herstellung eines autologen und physiologisch funktionierenden Gewebeersatzes für Rekonstruktionen nach Gewebedefekten oder aber auch zur Bereitstellung biologischer Modelle [11, 12]. Die Herausforderungen im Fettgewebe Engineering sind sowohl die langfristige in vivo Volumenstabilität als auch die rasche und ausreichende Blutgefäßversorgung der Konstrukte, um eine dauerhafte Geweberegeneration zu gewährleisten [21, 147, 166]. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Herstellung eines dreidimensionalen, volumenstabilen und prä-/vaskularisierten Fettgewebekonstruktes, welches sowohl für die in vitro Forschung als auch für eine klinische Anwendung in der rekonstruktiven Medizin geeignet ist. Hierfür wurden zunächst die Adipogenesefähigkeiten von ASC nach Induktion mittels Hormoncocktail in einer konventionellen 2D-Kultur und einer 3D-Sphäroidkultur vergleichend untersucht. Die 3D-Kultur zeigte hierbei eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber dem adipogenen Induktionscocktail. In einem modifizierten langzeitstabilen Fibringel, welches sowohl mit ASC-Einzelnzellen als auch ASC-Sphäroiden besiedelt wurde, konnte für beide Zellkulturen gleichermaßen eine erfolgreiche Adipogenese nachgewiesen werden. So konnte in vitro durch die Verwendung der optimierten Fibrinmatrix besiedelt mit ASC ein volumenstabiles Fettgewebekonstrukt generiert werden. Um in diesen Konstrukten auch prävasculäre Strukturen herzustellen, welche für einen raschen Gefäßanschluss in vivo wichtig sind, wurden unterschiedliche Fibrinmatrices mit ASC, MVEC und MVEC/ASC Co-Kulturen besiedelt. Unter Verwendung

verschiedener Kulturmedien konnten in den Konstrukten keine prävasculären Strukturen nachgewiesen werden. Es schlossen sich in vivo Untersuchungen in Mausmodellen zur Evaluation verschiedener Fibrinmatrices besiedelt mit ASC an. Es wurde die in vivo Volumenstabilität der Fibrinmatrices und die in den Konstrukten stattgefundene Adipogenese und Vaskulogenese untersucht. Es zeigte sich, dass das Fibringel mit 25 mg/ml Fibrin ausreichend volumenstabil war und zugleich Adipogenese und Vaskulogenese ermöglichte. Die vergleichenden in vivo Untersuchungen von Einzelzellen und Sphäroiden im Fibringel ergaben keine Unterschiede hinsichtlich der Fettgewebeentwicklung. Die IHC-Färbung zeigte, dass die in den Konstrukten befindlichen Fettzellen und Gefäße nicht humanen Ursprungs waren, sondern von einwandernden Wirtszellen stammten. In einer weiteren in vivo Studie wurde der Einsatz der stromal-vaskulären Fraktion als neue Zellquelle für das *adipose tissue engineering* zur Herstellung von vaskularisierten Fettgewebekonstrukten untersucht. Die Verwendung dieses heterogenen Zellgemisches verbesserte die Entwicklung von Fettzellen und Gefäßen im Konstrukt signifikant im Vergleich zu mit ASC besiedelten Gelen. Darüberhinaus zeigte die immunhistochemische Analyse, dass die enthaltenen Adipozyten und Gefäße von den humanen SVF-Zellen stammten. Insgesamt konnte in dieser Arbeit durch die Verwendung des optimierten Fibringels besiedelt mit SVF-Zellen erfolgreich ein artifiziell hergestelltes Fettgewebekonstrukt in vivo etabliert werden, welches an das Gefäßsystem des Wirtstieres angeschlossen war. Unseres Wissens nach ist dies das erste Mal, dass ein langzeitstabiles Fibringel besiedelt mit SVF-Zellen zu einem gut vaskularisierten mit maturen Adipozyten durchsetzten Konstrukt in vivo generiert werden konnte. Dieses Resultat könnte richtungsweisend für die Entwicklung von engineereten Fettgewebekonstrukten für die regenerative und plastische Medizin sein.

7. Summary

There is a tremendous demand for suitable implants in reconstructive medicine to replace soft tissue defects adequately. The previously applied restoration methods such as flaps and artificial implants are afflicted with some serious disadvantages. Thus innovative methods and developments which allow a lasting and autologous soft tissue replacement are urgently required [3, 15, 165]. The aim of adipose tissue engineering is to provide an autologous, functional tissue substitute for reconstruction purposes and to establish biological models for diagnostic and research purposes [11, 12]. The challenges in adipose tissue engineering are long-term in vivo volume maintenance as well as rapid and adequate blood supply of the constructs to ensure permanent tissue regeneration [21, 147, 166]. Hence the goal of this thesis was to develop a three-dimensional, volume stable and pre-/vascularized adipose tissue construct which is suitable for in vitro research as well as for clinical use in reconstructive medicine. After induction with a hormonal cocktail the adipogenic differentiation capability of ASC cultured in 2D-cell layers or in 3D-spheroids was compared. A significantly enhanced adipogenic response to the hormonal induction cocktail was shown for the 3D-culture model. Successful adipogenesis of single cells and spheroids was also shown by embedding ASC in a modified long-term stable fibrin with both culture forms (single cells vs. spheroids) differentiating equally in this matrix. Thus using the optimized fibrin gel and ASC volume stable adipose constructs could be developed in vitro. In order to improve the vascularization of the constructs upon implantation the development of prevascular endothelial structures in the constructs in vitro was investigated by adding MVEC and varying media composition and fibrin concentration. However no prevascular tube formation was detected under these conditions in the fibrin matrix. To evaluate the in vivo development of adipose tissue in ASC-fibrin constructs studies in a nude mouse model were performed. Thereby different fibrin formulations seeded with single ASC or spheroids were investigated with regard to volume stability and adipogenesis

and angiogenesis within the construct after 4 weeks in vivo. With increasing the fibrin concentration the volume stability of the constructs was improved but as a consequence adipogenesis and vaskulogenesis was reduced. A fibrin gel formulation with 25 mg/ml fibrin turned out to provide sufficient volume stability and to sustain adipogenesis and bloodvessel formation. Comparing the performance of implanted single cells vs. spheroids in fibrin regarding adipose tissue formation no difference could be observed. The emerging adipocytes and blood vessels within the constructs in both cases were shown not to originate from the implanted ASC, but were of host-origin deriving from invading host cells. In a further in vivo study therefore the feasibility of the entire stromal-vascular fraction of adipose tissue as a new cell source for the development of vascularized adipose tissue was examined. By using this heterogeneous cell population the development of adipocytes and bloodvessels was significantly improved compared to constructs inoculated with ASC and was shown to originate from the implanted SVF cells. In conclusion, by using an optimized fibrin formulation and the SVF, a vascularized adipose tissue construct, which was connected to the host vascular system, was successfully established in vivo. To our knowledge this is the first report using long-term stable fibrin gels seeded with SVF cells that led to a vascularized and with mature adipocytes filled construct in vivo. Thus the SVF as a new alternative cell source in combination with an optimized fibrin formulation as cell carrier was shown to be highly promising for the development of vascularized adipose tissue constructs for regenerative medicine and plastic surgery.

8. Literaturverzeichnis

1. Tremolada C, Palmieri G, Ricordi C. Adipocyte transplantation and stem cells: plastic surgery meets regenerative medicine. *Cell Transplant.* 2010;19:1217-1223.
2. Brayfield C, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells for soft tissue regeneration. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2010;42:124-128.
3. Bauer-Kreisel P, Goepferich A, Blunk T. Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62:798-813.
4. Johnson PC, Mikos AG, Fisher JP, Jansen JA. Strategic directions in tissue engineering. *Tissue Eng.* 2007;13:2827-2837.
5. Choi JH, Gimble JM, Lee K et al. Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16:413-426.
6. Weiser B. Adipose tissue engineering - Precultivation strategies towards clinical applications & A novel 3-D model of adipogenesis for basic research. [dissertation]. University of Regensburg; 2008.
7. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J.* 2008;3:1172-1184.
8. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials.* 2009;30:2164-2174.
9. Verseijden F, Posthumus-van Sluijs SJ, Farrell E et al. Prevascular structures promote vascularization in engineered human adipose tissue constructs upon implantation. *Cell Transplant.* 2010;19:1007-1020.
10. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012;2012:812693.
11. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260:920-926.
12. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2006;10:569-576.

13. Tilkorn DJ, Lokmic Z, Chaffer CL, Mitchell GM, Morrison WA, Thompson EW. Disparate companions: tissue engineering meets cancer research. *Cells Tissues Organs*. 2010;192:141-157.
14. Weiser B, Neubauer M, Göpferich A, Blunk T. Tissue Engineering, Fat. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. 2008:2725.
15. Gomillion CT, Burg KJ. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27:6052-6063.
16. Findlay MW, Messina A, Thompson EW, Morrison WA. Long-term persistence of tissue-engineered adipose flaps in a murine model to 1 year: an update. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124:1077-1084.
17. Li H, Zimmerlin L, Marra KG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Rubin JP. Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations. *Plast Reconstr Surg*. 2011;128:663-672.
18. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*. 2006;208:64-76.
19. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2008;26:434-441.
20. Wittmann K, Dietl S, Ludwig N et al. Engineering Vascularized Adipose Tissue Using the Stromal-Vascular Fraction and Fibrin Hydrogels. *Tissue Eng Part A*. 2015
21. Lokmic Z, Mitchell GM. Engineering the microcirculation. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14:87-103.
22. Laschke MW, Harder Y, Amon M et al. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng*. 2006;12:2093-2104.
23. Kang JH, Gimble JM, Kaplan DL. In vitro 3D model for human vascularized adipose tissue. *Tissue Eng Part A*. 2009;15:2227-2236.
24. Kirkpatrick CJ, Fuchs S, Unger RE. Co-culture systems for vascularization--learning from nature. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63:291-299.
25. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:885-896.

26. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, Andre M, Penicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res*. 2006;312:727-736.
27. Fruhbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol*. 2008;456:1-22.
28. Van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism*. 2004;53:632-637.
29. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011;121:2094-2101.
30. Avram MM, Avram AS, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:472-492.
31. Kubo Y, Kaidzu S, Nakajima I, Takenouchi K, Nakamura F. Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2000;36:38-44.
32. Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:1277-1292.
33. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11:327-332.
34. Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z. Endocrinology of adipose tissue - an update. *Horm Metab Res*. 2007;39:314-321.
35. Lago F, Gomez R, Gomez-Reino JJ, Dieguez C, Gualillo O. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci*. 2009;34:500-510.
36. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc*. 2001;60:329-339.
37. Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol*. 2007;2:31-56.

38. Fruhbeck G. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2004;2:197-208.
39. Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20:107-114.
40. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res*. 2012;53:227-246.
41. Feve B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005;19:483-499.
42. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*. 2000;130:3122S-3126S.
43. Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ. Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124:2681-2686.
44. Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett*. 2010;584:3242-3249.
45. MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13:5-11.
46. Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C, Rubin CS. Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 1988;263:9402-9408.
47. Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D et al. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. *Diabetes*. 1999;48:699-705.
48. Miki H, Yamauchi T, Suzuki R et al. Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2001;21:2521-2532.
49. Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS. Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 1999;274:12632-12641.
50. Shi XM, Blair HC, Yang X, McDonald JM, Cao X. Tandem repeat of C/EBP binding sites mediates PPARgamma2 gene transcription in

glucocorticoid-induced adipocyte differentiation. *J Cell Biochem.* 2000;76:518-527.

51. Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 2001;276:18464-18471.

52. Katafuchi T, Garbers DL, Albanesi JP. CNP/GC-B system: a new regulator of adipogenesis. *Peptides.* 2010;31:1906-1911.

53. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 1997;272:3406-3410.

54. Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest.* 2007;117:2362-2368.

55. Lijnen HR. Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res.* 2008;78:286-293.

56. Christiaens V, Lijnen HR. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;318:2-9.

57. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011;473:298-307.

58. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation.* 2004;110:349-355.

59. Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG. Nonclassic endogenous novel [corrected] regulators of angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2007;59:185-205.

60. Herbert SP, Stainier DY. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:551-564.

61. Rehman J, Traktuev D, Li J et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004;109:1292-1298.

62. Kilroy GE, Foster SJ, Wu X et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol.* 2007;212:702-709.

63. Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*. 1998;281:1683-1686.
64. Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C, Thyberg J, Cao Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:6390-6395.
65. Suganami E, Takagi H, Ohashi H et al. Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. *Diabetes*. 2004;53:2443-2448.
66. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100:1249-1260.
67. Patrick CWJ. Tissue engineering strategies for adipose tissue repair. *Anat Rec*. 2001;263:361-366.
68. Katz AJ, Llull R, Hedrick MH, Futrell JW. Emerging approaches to the tissue engineering of fat. *Clin Plast Surg*. 1999;26:587-603, viii.
69. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008;2:169-183.
70. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell*. 2010;21:1783-1787.
71. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2003;5:362-369.
72. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005;87:125-128.
73. Spencer ND, Gimble JM, Lopez MJ. Mesenchymal stromal cells: past, present, and future. *Vet Surg*. 2011;40:129-139.
74. Guilak F, Lott KE, Awad HA et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol*. 2006;206:229-237.
75. Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg*. 2009;79:235-244.

76. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:568-584.
77. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211-228.
78. Gimble JM, Guilak F, Bunnell BA. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1:19.
79. Dubois SG, Floyd EZ, Zvonic S et al. Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens. *Methods Mol Biol.* 2008;449:69-79.
80. Wilson A, Butler PE, Seifalian AM. Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review. *Cell Prolif.* 2011;44:86-98.
81. Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2005;40:229-242.
82. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* 2007;25:818-827.
83. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008;45:115-120.
84. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal-vaskuläre Fraktion 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.* 2013;15:641-648.
85. Patrick CWJ. Adipose tissue engineering: the future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection. *Semin Surg Oncol.* 2000;19:302-311.
86. Wall ME, Bernacki SH, Lobo EG. Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2007;13:1291-1298.

87. Gonda K, Shigeura T, Sato T et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121:401-410.
88. Klar AS, Guven S, Biedermann T et al. Tissue-engineered dermo-epidermal skin grafts prevascularized with adipose-derived cells. *Biomaterials*. 2014;35:5065-5078.
89. Chlapanidas T, Farago S, Mingotto F et al. Regenerated silk fibroin scaffold and infrapatellar adipose stromal-vaskuläre Fraktion as feeder-layer: a new product for cartilage advanced therapy. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:1725-1733.
90. Muller AM, Mehrkens A, Schafer DJ et al. Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal-vaskuläre Fraktion of human adipose tissue. *Eur Cell Mater*. 2010;19:127-135.
91. Scherberich A, Muller AM, Schafer DJ, Banfi A, Martin I. Adipose tissue-derived progenitors for engineering osteogenic and vasculogenic grafts. *J Cell Physiol*. 2010;225:348-353.
92. Mehrkens A, Saxer F, Guven S et al. Intraoperative engineering of osteogenic grafts combining freshly harvested, human adipose-derived cells and physiological doses of bone morphogenetic protein-2. *Eur Cell Mater*. 2012;24:308-319.
93. Lin SD, Huang SH, Lin YN et al. Engineering adipose tissue from uncultured human adipose stromal-vaskuläre Fraktion on collagen matrix and gelatin sponge scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:1489-1498.
94. Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature*. 2003;424:870-872.
95. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 2007;130:601-610.
96. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:839-845.
97. Mazzoleni G, Di Lorenzo D, Steimberg N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr*. 2009;4:13-22.

98. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:211-224.
99. Green JA, Yamada KM. Three-dimensional microenvironments modulate fibroblast signaling responses. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:1293-1298.
100. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 2003;200:423-428.
101. O'Connor KC, Song H, Rosenzweig N, Jansen DA. Extracellular matrix substrata alter adipocyte yield and lipogenesis in primary cultures of stromal-vascular cells from human adipose. *Biotechnol Lett.* 2003;25:1967-1972.
102. Chun TH, Hotary KB, Sabeh F, Saltiel AR, Allen ED, Weiss SJ. A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell.* 2006;125:577-591.
103. Khetani SR, Bhatia SN. Engineering tissues for in vitro applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2006;17:524-531.
104. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen.* 2004;9:273-285.
105. Ota K, Saito S, Hamasaki K, Tanaka N, Orita K. Transplantation of xenogeneic hepatocytes: three-dimensionally cultured hepatocyte (spheroid) transplantation into the spleen. *Transplant Proc.* 1996;28:1430-1432.
106. Laib AM, Bartol A, Alajati A, Korff T, Weber H, Augustin HG. Spheroid-based human endothelial cell microvessel formation in vivo. *Nat Protoc.* 2009;4:1202-1215.
107. Young DA, Christman KL. Injectable biomaterials for adipose tissue engineering. *Biomed Mater.* 2012;7:024104.
108. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14:199-215.
109. Nicodemus GD, Bryant SJ. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14:149-165.
110. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials.* 2003;24:4337-4351.

111. Torio-Padron N, Baerlecken N, Momeni A, Stark GB, Borges J. Engineering of adipose tissue by injection of human preadipocytes in fibrin. *Aesthetic Plast Surg.* 2007;31:285-293.
112. Hemmrich K, von Heimburg D, Rendchen R, Di Bartolo C, Milella E, Pallua N. Implantation of preadipocyte-loaded hyaluronic acid-based scaffolds into nude mice to evaluate potential for soft tissue engineering. *Biomaterials.* 2005;26:7025-7037.
113. Gentleman E, Nauman EA, Livesay GA, Dee KC. Collagen composite biomaterials resist contraction while allowing development of adipocytic soft tissue in vitro. *Tissue Eng.* 2006;12:1639-1649.
114. Casadei A, Epis R, Ferroni L et al. Adipose tissue regeneration: a state of the art. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:462543.
115. Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2005;203:465-470.
116. Brown AC, Barker TH. Fibrin-based biomaterials: modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomater.* 2014;10:1502-1514.
117. Borges J, Mueller MC, Padron NT, Tegtmeier F, Lang EM, Stark GB. Engineered adipose tissue supplied by functional microvessels. *Tissue Eng.* 2003;9:1263-1270.
118. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:11-30.
119. de la Puente P, Ludena D. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Exp Cell Res.* 2014;322:1-11.
120. Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP et al. Fibrin gel -- advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001;19:424-430.
121. Eyrich D, Brandl F, Appel B et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials.* 2007;28:55-65.
122. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve

postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332:370-379.

123. Varzaneh FE, Shillabeer G, Wong KL, Lau DC. Extracellular matrix components secreted by microvascular endothelial cells stimulate preadipocyte differentiation in vitro. *Metabolism.* 1994;43:906-912.

124. Strassburg S, Nienhueser H, Stark GB, Finkenzeller G, Torio-Padron N. Human adipose-derived stem cells enhance the angiogenic potential of endothelial progenitor cells, but not of human umbilical vein endothelial cells. *Tissue Eng Part A.* 2013;19:166-174.

125. Cox S, Cole M, Tawil B. Behavior of human dermal fibroblasts in three-dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentration. *Tissue Eng.* 2004;10:942-954.

126. Findlay MW, Dolderer JH, Trost N et al. Tissue-engineered breast reconstruction: bridging the gap toward large-volume tissue engineering in humans. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128:1206-1215.

127. Schenke-Layland K, Rofail F, Heydarkhan S et al. The use of three-dimensional nanostructures to instruct cells to produce extracellular matrix for regenerative medicine strategies. *Biomaterials.* 2009;30:4665-4675.

128. Hunt NC, Grover LM. Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. *Biotechnol Lett.* 2010;32:733-742.

129. Cho SW, Kim SS, Rhie JW, Cho HM, Choi CY, Kim BS. Engineering of volume-stable adipose tissues. *Biomaterials.* 2005;26:3577-3585.

130. Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14:526-532.

131. Fischbach C, Spruss T, Weiser B et al. Generation of mature fat pads in vitro and in vivo utilizing 3-D long-term culture of 3T3-L1 preadipocytes. *Exp Cell Res.* 2004;300:54-64.

132. Cheng NC, Wang S, Young TH. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials.* 2012;33:1748-1758.

133. Zhang S, Liu P, Chen L, Wang Y, Wang Z, Zhang B. The effects of spheroid formation of adipose-derived stem cells in a microgravity bioreactor on stemness properties and therapeutic potential. *Biomaterials*. 2015;41:15-25.
134. Liu BH, Yeh HY, Lin YC et al. Spheroid formation and enhanced cardiomyogenic potential of adipose-derived stem cells grown on chitosan. *Biores Open Access*. 2013;2:28-39.
135. Rowe SL, Lee S, Stegemann JP. Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. *Acta Biomater*. 2007;3:59-67.
136. Collen A, Koolwijk P, Kroon M, van Hinsbergh VW. Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillary-like tubules by human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis*. 1998;2:153-165.
137. Schmal H, Mehlhorn AT, Kurze C et al. [In vitro study on the influence of fibrin in cartilage constructs based on PGA fleece materials]. *Orthopade*. 2008;37:424-434.
138. Weiser B, Prantl L, Schubert TE et al. In vivo development and long-term survival of engineered adipose tissue depend on in vitro precultivation strategy. *Tissue Eng Part A*. 2008;14:275-284.
139. Tsuji W, Inamoto T, Yamashiro H et al. Adipogenesis induced by human adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2009;15:83-93.
140. Borges J, Muller MC, Momeni A, Stark GB, Torio-Padron N. In vitro analysis of the interactions between preadipocytes and endothelial cells in a 3D fibrin matrix. *Minim Invasive Ther Allied Technol*. 2007;16:141-148.
141. Natesan S, Zhang G, Baer DG, Walters TJ, Christy RJ, Suggs LJ. A bilayer construct controls adipose-derived stem cell differentiation into endothelial cells and pericytes without growth factor stimulation. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:941-953.
142. Verseijden F, Posthumus-van Sluijs SJ, Pavljasevic P, Hofer SO, van Osch GJ, Farrell E. Adult human bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells support the formation of prevascular-like structures from endothelial cells in vitro. *Tissue Eng Part A*. 2010;16:101-114.

143. Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *J Surg Res*. 2009;152:157-166.
144. Hutton DL, Logsdon EA, Moore EM, Mac Gabhann F, Gimble JM, Grayson WL. Vascular morphogenesis of adipose-derived stem cells is mediated by heterotypic cell-cell interactions. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:1729-1740.
145. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109:656-663.
146. Thangarajah H, Vial IN, Chang E et al. IFATS collection: Adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia. *Stem Cells*. 2009;27:266-274.
147. Tanzi MC, Fare S. Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches. *Expert Rev Med Devices*. 2009;6:533-551.
148. Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumura D. Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol*. 2005;23:821-823.
149. Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F et al. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood*. 2003;101:1810-1817.
150. Sanchez Munoz I, Granados R, Holguin Holgado P, Garcia Vela JA, Casares C, Casares M. THE USE OF ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELLS AND HUMAN UMBILICAL VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS ON A FIBRIN MATRIX FOR ENDOTHELIALIZED SKIN SUBSTITUTE. *Tissue Eng Part A*. 2014
151. Verseijden F, Posthumus-van Sluijs SJ, van Neck JW, Hofer SO, Hovius SE, van Osch GJ. Comparing scaffold-free and fibrin-based adipose-derived stromal cell constructs for adipose tissue engineering: an in vitro and in vivo study. *Cell Transplant*. 2012;21:2283-2297.
152. Eyrich D, Gopferich A, Blunk T. Fibrin in tissue engineering. *Adv Exp Med Biol*. 2006;585:379-392.

153. Wittmann K, Storck K, Muhr C et al. Development of volume-stable adipose tissue constructs using polycaprolactone-based polyurethane scaffolds and fibrin hydrogels. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013
154. Tabata Y, Miyao M, Inamoto T et al. De novo formation of adipose tissue by controlled release of basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng*. 2000;6:279-289.
155. Vashi AV, Abberton KM, Thomas GP et al. Adipose tissue engineering based on the controlled release of fibroblast growth factor-2 in a collagen matrix. *Tissue Eng*. 2006;12:3035-3043.
156. Koh YJ, Koh BI, Kim H et al. Stromal-vaskuläre Fraktion from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:1141-1150.
157. Zimmerlin L, Rubin JP, Pfeifer ME, Moore LR, Donnenberg VS, Donnenberg AD. Human adipose stromal vascular cell delivery in a fibrin spray. *Cytotherapy*. 2013;15:102-108.
158. Evans CH, Palmer GD, Pascher A et al. Facilitated endogenous repair: making tissue engineering simple, practical, and economical. *Tissue Eng*. 2007;13:1987-1993.
159. Kokai LE, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl Res*. 2014;163:399-408.
160. Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*. 2003;24:2497-2502.
161. Ye Q, Zund G, Benedikt P et al. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000;17:587-591.
162. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch*. 2009;76:56-66.
163. Fortier LA, Travis AJ. Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2:9.

164. Marx C, Silveira MD, Beyer Nardi N. Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. *Stem Cells Dev.* 2015;24:803-813.
165. Kakagia D, Pallua N. Autologous Fat Grafting: In Search of the Optimal Technique. *Surg Innov.* 2014;21(3):327-336.
166. Dolderer JH, Medved F, Haas RM, Siegel-Axel DI, Schiller SM, Schaller HE. [Angiogenesis and vascularisation in adipose tissue engineering]. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2013;45:99-107.

9. Anhang

9.1. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
abs.	absolut
AIM	Adipogenes Induktionsmedium
ASC	adipose derived stem cells
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMSC	bone marrow stem cells
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CEBP	CCAAT/enhancer binding protein
ddH ₂ O	double-distilled water
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
ECM	Extrazellulär Matrix
EGF	endothelial growth factor
EGM	endothelial growth medium
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EthDIII	Ethidium Homodimer III
FABP4	fatty acid binding protein 4
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	Glucosetransporter Typ 4
HE	Hämatoxylin/Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperaziny)-Ethansulfonsäure
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells

IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IGF	insulin-like growth factor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KIE	Kallikrein Inhibitor Einheiten
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MMP	Matrixmetalloproteinase
MVEC	microvascular endothelial cells
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat-Dihydrat
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Dinatrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	nerve growth factor
ORO	Oil Red O
P/S	Penicillin-Streptomycin liquid
PAI	Plasminogenaktivatorinhibitor
PBM-2	Preadipocyte Basal Medium-2
PBS	phosphate-buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
PEGDA	PEG-Diacrylat
PGM	preadipocyte growth medium
PLGA	Polylactid-Co-Glycolid
PPAR	Peroxisom Proliferator Aktivierte Rezeptoren
qPCR	quantitative Polymerase Ketten Reaktion
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
SVF	Stromal-vaskuläre Fraktion
TDB	thrombin dilution buffer
TGA	Triglycerid Assay

TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	vascular endothelial growth factor

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema Zellkultur.	19
Abb. 2: Herstellung der Fibringelkonstrukte.	22
Abb. 3: Implantation der Fibringelkonstrukte.	33
Abb. 4: Adipogene Differenzierung von ASC in 2D und 3D.	36
Abb. 5: Langzeitstabile Fibringele besiedelt mit ASC-Sphäroiden.	37
Abb. 6: Live-Dead-Färbung von ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden in Fibrin.	38
Abb. 7: Adipogene Differenzierung von ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden in Fibrin.	40
Abb. 8: Triglyceridgehalt und Leptinsekretion von ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden in modifizierten langzeitstabilen Fibringelen.	41
Abb. 9: Expression adipogener Markergene von ASC-Einzelzellen und -Sphäroiden in modifizierten langzeitstabilen Fibringelen.	42
Abb. 10: In Fibringel kultivierte ASC-Sphäroide und MVEC.	44
Abb. 11: In Fibrin co-kultivierte ASC und MVEC.	45
Abb. 12: Morphologie von MVEC in Fibringelen.	47
Abb. 13: In vivo Stabilität modifizierter langzeitstabiler Fibringele.	48
Abb. 14: Adipogenese und Vaskulogenese in modifizierten langzeitstabilen Fibringelen in vivo.	50
Abb. 15: Adipogenese von ASC-Einzelzellen und –Sphäroiden in Fibrin in vivo.	53
Abb. 16: Induzierte ASC und mature Fettzellen in transplantiertem Fibringel.	54
Abb. 17: Korrelation zwischen Fettfläche und verwendeter ASC-Zellzahl im Fibringel.	55
Abb. 18: Adipogenese von ASC und SVF-Zellen in langzeitstabilen Fibringelen in vivo.	57
Abb. 19: Vaskulogenese von ASC und SVF-Zellen in langzeitstabilen Fibringelen in vivo.	58

9.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung hergestellter Fibrinkonstrukte.	21
Tab. 2: Zusammensetzung der Standards im TGA.	23
Tab. 3: Zusammensetzung der Standards im DNA Assay.	24

9.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei allen bedanken, die mich die letzten Jahre begleitet und unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. Clemens Knospe, der mich während meiner Arbeit betreut hat und mir stets hilfsbereit und immer mit freundlichen Worten zur Seite stand.

Ebenso bedanke ich mich im Besonderen bei Herrn Prof. Dr. Torsten Blunk für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Seine intensive und kompetente Betreuung und seine freundliche und motivierende Art haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Petra Bauer-Kreisel danke ich für ihre vielen Ratschläge und Hinweise. Ohne ihre vielfältige Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Bei allen Kollegen aus der Forschungsgruppe möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und die schöne gemeinsame Zeit im Labor bedanken. Hier gilt mein Dank besonders Dr. Christian Muhr, der mir beim Start in das wissenschaftliche Arbeiten stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinem Mann Sebastian bedanken, der mich immer motivierte und anspornte. Meiner Familie danke ich, dass sie mir immer den Rücken freigehalten hat, so dass ich diese Arbeit fertigstellen konnte.