

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

Abteilung für Handchirurgie, Plastische Chirurgie und Ästhetische Chirurgie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Riccardo E. Giunta

# **In vivo Tracking von Mikrofetttransplantaten**



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Katarzyna Błażków-Schmalzbauer M.A.  
aus Grajewo  
2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Riccardo E. Giunta

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Rainer Grantzow  
PD Dr. rer. nat. Markus Rehberg

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Claus J. Deglmann

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2017

*Der Wert davon, dass man zeitweilig eine strenge Wissenschaft streng betrieben hat, beruht nicht gerade auf deren Ergebnissen: denn diese werden, im Verhältnis zum Meere des Wissenswerten, ein verschwindend kleiner Tropfen sein. Aber es ergibt einen Zuwachs an Energie, an Schlussvermögen, an Zähigkeit der Ausdauer; man hat gelernt, einen Zweck zweckmäßig zu erreichen. Insofern ist es sehr schätzbar, in Hinsicht auf Alles, was man später treibt, einmal ein wissenschaftlicher Mensch gewesen zu sein.*

*[Friedrich Nietzsche]*

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Weichteildefekte: Korrektur- und Rekonstruktionsalternativen.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Fettgewebetransplantation .....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Geschichte der Fetttransplantation .....	9
1.2.2 Indikation zur Fetttransplantation.....	10
<b>1.3 Fettgewebe .....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Aufbau des Fettgewebes .....	11
1.3.2 Embryogenese .....	12
1.3.3 Differenzierung der Adipozyten.....	12
1.3.4 Funktionen des Fettgewebes.....	14
<b>1.4 Adipozytentracking .....</b>	<b>14</b>
1.4.1 Quantum Dots .....	15
1.4.2 Indocyaningrün.....	17
<b>1.5 Fragestellung und Zielsetzung.....</b>	<b>18</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Chemikalien.....	19
2.1.2 Arzneimittel.....	19
2.1.3 Materialien.....	19
2.1.4 Geräte .....	20
2.1.5 Software .....	20
2.1.6 Tiere und Tierbedarf .....	20
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Gewinnung von Fettgewebecluster.....	21
2.2.2 Gewinnung von mesenchymalen Vorläuferzellen .....	22
2.2.3 Histologische Methoden .....	23
2.2.3.1 Vitalitätsbeobachtung mittels Trypanblau .....	23
2.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	23

2.2.4 Fluoreszenzdetektion .....	24
2.2.4.1 Lasermikroskopie .....	24
2.2.4.2 IVIS® Lumina Imaging System .....	26
2.2.5 Tracereigenschaften .....	28
2.2.5.1 Tracerstabilität in vivo von QDots und Indocyaningrün .....	28
2.2.5.2 Indirekter Adhäsionstest.....	29
2.2.6 <i>In vitro</i> Vorversuche.....	29
2.2.6.1 Vorversuch für die Inkubationskonzentration .....	30
2.2.6.2 Vorversuch für die Inkubationszeit .....	31
2.2.6.3 Vorversuch für die Inkubationstemperatur .....	31
2.2.6.4 Vorversuch für das Inkubationsmedium .....	32
2.2.6.5 Vorversuch für die Vorläuferzellen .....	32
2.2.7 <i>In vivo</i> Versuche.....	32
2.2.7.1 Tiermodell .....	32
2.2.7.1.1 Haltung.....	33
2.2.7.1.2 Ernährung.....	33
2.2.7.1.3 Anästhesie.....	33
2.2.7.1.4 Euthanasie .....	36
2.2.7.2 Gewebebegewinnung .....	36
2.2.7.3 Vorläuferzellentransplantation.....	36
2.2.7.4 Adipozytenclustertransplantationen.....	36
2.2.7.4.1 Transplantation von vitalen Adipozytencluster .....	37
2.2.7.4.2 Transplantation von avitalisierten Adipozytencluster.....	38
2.2.7.4.3 Transplantation von Adipozytencluster nach Kühlaufbewahrung .....	39
2.2.8 Statistische Auswertung .....	39
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Histologie der Adipozytencluster .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Histologie der Präadipozyten .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3 Testung der Tracereigenschaften .....</b>	<b>43</b>

3.3.1	Testung der Tracerstabilität <i>in vivo</i> : QDots versus Indocyaningrün.....	43
3.3.1.1	Enterale Ausscheidungen .....	45
3.3.2	Indirekter Adhäsionstest für QDots .....	45
<b>3.4</b>	<b>Lasermikroskopie</b> .....	<b>46</b>
<b>3.5</b>	<b><i>In vitro</i> Parameterbestimmungen für Inkubationen der Adipozytencluster mit QDots</b> .....	<b>49</b>
3.5.1	Inkubationskonzentration: Parameterbestimmung .....	49
3.5.2	Inkubationszeit: Parameterbestimmung.....	51
3.5.3	Inkubationstemperatur: Parameterbestimmung .....	53
3.5.4	Inkubationsmedium: Parameterbestimmung.....	55
<b>3.6</b>	<b><i>In vivo</i> Versuche</b> .....	<b>57</b>
3.6.1	Volumenbestimmung.....	57
3.6.1.1	Transplantation von vitalen Adipozytencluster.....	57
3.6.1.2	Transplantation von avitalisierten Adipozytencluster .....	60
3.6.2	Fluoreszenzdetektion .....	61
3.6.2.1	Präadipozytentransplantationen.....	61
3.6.2.2	Transplantation von vitalen Adipozytencluster.....	64
3.6.2.3	Transplantation von avitalisierten Adipozytencluster .....	68
3.6.2.4	Transplantationen von Adipozytencluster nach Kühlaufbewahrung.....	70
3.6.3	Morphologie.....	72
3.6.3.1	Präadipozytentransplantation.....	72
3.6.3.2	Transplantation von vitalen Adipozytencluster.....	74
3.6.3.3	Transplantation von avitalisierten Adipozytencluster .....	79
3.6.3.4	Transplantationen von Adipozytencluster nach Kühlaufbewahrung.....	81
3.6.4	Histologie .....	84
3.6.4.1	Präadipozytentransplantation.....	84
3.6.4.2	Transplantation von vitalen Adipozytencluster .....	85
3.6.4.3	Transplantation von avitalisierten Adipozytencluster.....	88
3.6.4.4	Transplantationen von Adipozytencluster nach Kühlaufbewahrung .....	89

<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>91</b>
<b>4.1 Vorteile und Nachteile der Fettgewebetransplantation.....</b>	<b>91</b>
<b>4.2 Adipozytencluster als Transplantationseinheit.....</b>	<b>94</b>
4.2.1 Gewinnung der Adipozytencluster .....	95
4.2.2 Aufbereitung der Adipozytencluster .....	96
4.2.3 Transplantation von Adipozytencluster .....	98
4.2.4 Beurteilung der Adipozytencluster .....	99
4.2.5 Präadipozyten .....	100
<b>4.3 QDots als Tracer für Adipozytenclustertransplantate .....</b>	<b>101</b>
4.3.1 <i>In vivo</i> Verfolgung der Adipozytenclustertransplantate .....	101
4.3.2 QDots als Vitalitätsmarker .....	104
4.3.3 Toxizität der QDots.....	104
<b>4.4 Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>106</b>
4.4.1 Lasermikroskopie .....	106
4.4.2 Tracereigenschaften.....	107
4.4.3 <i>In vitro</i> Versuche.....	108
4.4.4 <i>In vivo</i> Versuche.....	109
4.4.4.1 Präadipozyten .....	109
4.4.4.2 Vitale versus avitalisierte Adipozytenclustertransplantationen.....	111
4.4.4.3 Adipozytenclustertransplantation nach Kühlauflbewahrung.....	115
<b>4.5 Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>116</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>118</b>
<b>6. ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>120</b>
<b>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>122</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>127</b>
<b>9. DANKSAGUNG .....</b>	<b>142</b>

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Weichteildefekte: Korrektur- und Rekonstruktionsalternativen

Die Korrektur und Rekonstruktion von Weichteildefekten stellt eine der Aufgaben der plastischen Chirurgie dar. Die Korrektur von Weichteildefekten kann im Rahmen eines rekonstruktiven (Mammawiederaufbau, Narbenminderung) oder eines ästhetischen (Faltenreduktion) Eingriffs durchgeführt werden.

Defekte von Weichteilgeweben können entweder angeboren (Poland-, Amazonensyndrom) oder erworben sein. Die Genese der erworbenen Defekte schließt traumatische (z.B. Gewebedefekte nach einem Unfall, Narbengewebe) und iatrogene (postoperative Gewebedefizit nach Tumorentfernung z.B. bei Mammakarzinom) Ursachen ein. Nicht zuletzt spielen Weichteildefekte, die in der Folge des Alterungsprozesses als Verlust der Hautelastizität (Falten) oder Umverteilung des Fettgewebes, eine wichtige Rolle und stellen einen hohen ästhetischen Anspruch an die plastische Chirurgie. Es wird nach einem Stoff gesucht, der eine optimale Weichteilgewebeaugmentation mit einer einfachen Anwendbarkeit, einer guten biologischen Verträglichkeit [9] und einem natürlichen Aussehen [9, 47] ermöglicht. Zusätzlich soll das Füllmaterial nicht-toxisch und kostengünstig [9] sein. Es sollte ein Material ermittelt werden, das sowohl eine Rekonstruktion der größeren Weichteildefekte und somit eine Alternative zu dem bis jetzt angewandtem aufwendigem Verfahren der freien (Gluteal-, deep inferior epigastric artery perforato-, freier Rectus abdominis-Lappen) oder der gestielten (Latissimus dorsi-, Rectus abdominis- Lappen) Lappenplastiken bietet als auch eine Korrektur der Konturdefekte im Sinne eines Fillers ermöglicht.

Im Laufe der Zeit wurden viele Materialien entwickelt, die die Korrektur und Rekonstruktion von Weichteil- und Konturdefekten ermöglichen. Es gibt jedoch aktuell keinen Füllstoff, der alle Voraussetzungen des perfekten Füllmaterials erfüllt und ultimativ eingesetzt werden kann.

Die Fettgewebetransplantation gehört zu den autologen Weichteilaugmentationsverfahren. Das Fettgewebe erfüllt viele Kriterien des optimalen Korrektur- und Rekonstruktionsmaterials und ist unter anderem nicht-toxisch, biokompatibel, ausreichend vorhanden und leicht zu gewinnen [9].

Im Vergleich zu den alloplastischen Transplantaten (Silikon, Teflon, etc.), die zur Rekonstruktion von Weichteildefekten vermehrt eingesetzt werden, weisen die autologen Füllmaterialien keine Fremdkörperreaktion, weniger Kapselbildungen oder Infektionen auf [77].

Die freie autologe Fettgewebetransplantation kann möglicherweise einen Ersatz für die gestielten oder freien Lappenplastiken, die zwar auch eine autologe Form, jedoch eine viel aufwändigere operative Option darstellen, bieten.

## **1.2 Fettgewebetransplantation**

### **1.2.1 Geschichte der Fetttransplantation**

Die erste Fettgewebetransplantation, die Autotransplantation des Omentum, wurde im Jahr 1889 von van der Meulen durchgeführt [6]. Die erste freie autologe Fettgewebetransplantation wurde von Neuber 1893 beschrieben [99]. Er transplantierte kleine („Bohnen- oder Mandelgröße“) vom Oberarm entnommene Fettgewebestücke in ein Gesicht, das durch Tuberkulose osteitis entstellt war. Im Jahr 1895 wurde durch Czerny eine Brust durch ein großes Lipom ersetzt [26]. Czerny stellte fest, dass die transplantierte Brust eine dunklere Farbe und ein kleineres Volumen im Gegensatz zur kontralateralen Seite aufwies. Lexer beobachtete (1909) bessere Ergebnisse bei der Verwendung von größeren (12x12 cm) als von kleineren freien Fetttransplantaten [68].

Im Gegensatz dazu publizierte Peer [91, 92] 1956, dass die Verwendung von multiplen kleinen Fetttransplantaten zu besseren Ergebnissen führt. Peer stellte eine Theorie auf, die heute untermauert wurde [30]: Das Überleben der Transplantate hängt von der Durchblutung ab, weshalb kleinere Transplantate ein besseres Überleben aufweisen. Nach seinen Beobachtungen verlor das transplantierte Fettgewebe nach 1 Jahr ca. 45% des ursprünglichen Volumens und nach einem Zeitraum von 8 Monaten nach der Transplantation bleibt das Fettgewebe mikroskopisch unverändert.

Die Fettgewebetransplantation in Form einer Injektion wurde schon von Brunning im Jahr 1914 angewandt [110]. Die Liposuktion zur Behandlung der Cellulitis wurde das erste Mal von Fischer [110] im Jahr 1974 beschrieben und im Jahr 1975 durchgeführt. Eine genaue Datierung der ersten Injektion des Fettgewebes nach

einer Liposuktion zur Korrektur des Weichteildefekts ist umstritten. Man findet die Beschreibung der Methode der Fetttransplantation nach einer Liposuktion mit kleinen Abweichungen in vielen Studien und es gab mehrere Autoren, die sich als Pioniere der Methode bezeichnet haben, u.a. Bircoll (1982) [7] oder Illouz (1983) [56]. In den 90-er Jahren mit den Arbeiten von Coleman [19, 20] hat die autologe Fettgewebettransplantation ihren bisherigen Höhepunkt erreicht und hat zu erneuten Diskussionen und neuen Forschungsansätzen geführt.

### 1.2.2 Indikation zur Fetttransplantation

Zur Indikationsstellung der Fetttransplantation werden die aus dem Jahr 2009 von Gutowski beschriebenen Evidenz-basierten Kriterien hinzugezogen [46, 99]. In der im Jahr 2016 erschienenen Leitlinie „Autologe Fetttransplantation“ wurden die Indikationen zur Fetttransplantation erneut zusammengefasst und aktualisiert [97].

Indikation	Evidenzlevel
ästhetische und rekonstruktive Brustchirurgie	II, IV, V
Gesäßaugmentationen und Korrektur von Konturdeformitäten	IV, V
Gesichtsweichteilaugmentationen und Defektkorrekturen im Gesicht, inklusive HIV assoziierte Veränderungen	II, IV
Handverjüngung	II, IV
Lippenaugmentation	II, IV
Penisvergrößerung und „Aesthetic improvement“	IV, V
Hautverjüngung	IV, V
Narbentherapie, Verbrennungsnarben	IV, V
Genitalchirurgie/Transsexualität	V
HNO: Stimmlippenaugmentation	III
Urologie: Sphinkteraugmentation bei Belastungsinkontinenz (negatives Ergebnis)	II

**Tabelle 1:** Indikationen und Evidenzlevel der autologen Fetttransplantation aus dem Jahr 2009 nach Gutowski [99]. Evidenzlevel [99]:

- Ila: Evidenz aufgrund wenigstens einer hochwertigen Studie ohne Randomisierung;
- Ilb: Evidenz aufgrund wenigstens einer individuellen Kohortenstudie (randomisiert-kontrollierte Studien)
- IIla: Evidenz aufgrund systematischer Reviews von Fall-Kontroll-Studien
- III: Evidenz aufgrund individueller Fall-Kontroll-Studien, Kohortenstudien
- IV: Evidenz aufgrund Fallberichte, Fallsammlungen
- V: Expertenmeinung

## 1.3 Fettgewebe

### 1.3.1 Aufbau des Fettgewebes

Das Fettgewebe gehört zum retikulären Bindegewebe und kann in weißes und braunes Fettgewebe aufgeteilt werden.

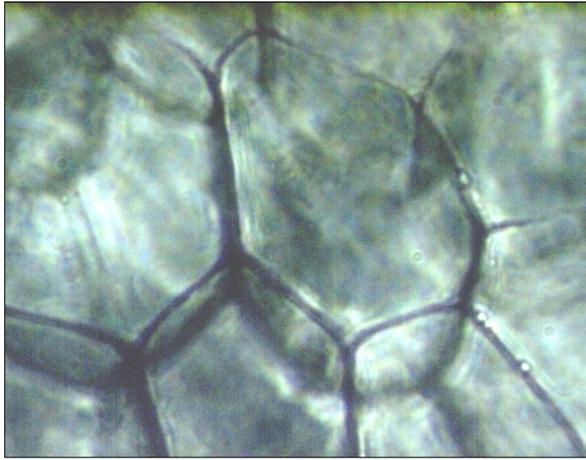
Das braune plurivakuoläre Fettgewebe kommt bei adulten Personen nur rudimentär vor, z. B. im Bereich der Nieren, der Aorta und in den Achselhöhlen [27]. Das braune Fettgewebe ist stark durchblutet und direkt sympathisch innerviert. Braunes Fettgewebe ist überwiegend durch einen hohen Gehalt an Mitochondrien für die Thermogenese zuständig.

Bei den Erwachsenen ist das weiße Fettgewebe die überwiegend vorkommende Fettgewebeform [9]. Das weiße Fettgewebe wird als Speicherfett bezeichnet und hat eine Halbwertszeit von etwa 8 Tagen. Bei normalgewichtigen Frauen beträgt das Fettgewebe 25%, bei normalgewichtigen Männern 10-15% des Körpergewichts [130].

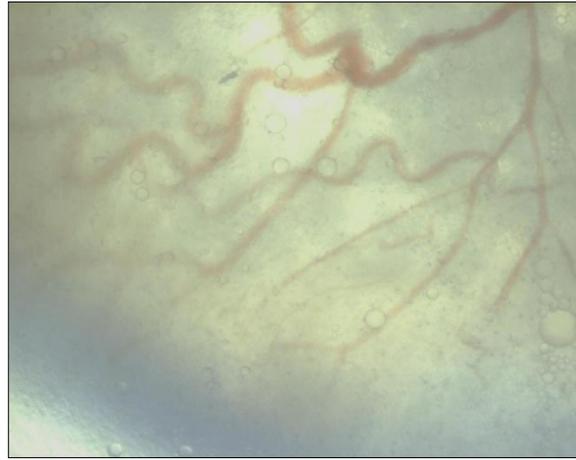
Das weiße Fettgewebe besteht aus mehreren Fettgewebsläppchen. Ein Fettgewebsläppchen wird aus mehreren Adipozyten (Fettzellen) mit umgebendem Bindegewebe gebildet. Das Fettgewebe wird durch die Adipozyten (etwa 50%) und eine stromal-vaskuläre Fraktion (Vorläuferzellen, Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten, das Bindegewebe, etc.) gebildet.

Die Adipozyten, deren Größe bei Menschen 50 bis 150  $\mu\text{m}$  beträgt, sind von einer basallaminaähnlichen Struktur und retikulären Kollagenfasern (Typ III) umgeben. Die weißen Fettzellen sind univakuolär und viel größer als braune Fettzellen. Die Größe eines Adipozyten wird von der inneren Lipidvakuole bestimmt, die sowohl das Zytoplasma als auch die Zellorganellen, u.a. den Zellkern und die Mitochondrien auf den Zellrand verdrängt. Die Fettvakuole liegt im Zytosol frei, ist nicht membranbegrenzt und wird nur von Vimentinfilamenten (v.a. bei unreifen Adipozyten) umspinnen [130].

Das weiße Fettgewebe weist eine gute Durchblutung auf: Jeder Adipozyt wird mindestens von einer Blutkapillare versorgt [3].



**Abb. 1:** Murines Fettgewebe (nativ, mit Filter, Vergr. 320x).



**Abb. 2:** Vaskularisation eines murinen Adipozyten 7 Wochen nach der Transplantation (nativ, Vergr. 100x).

### 1.3.2 Embryogenese

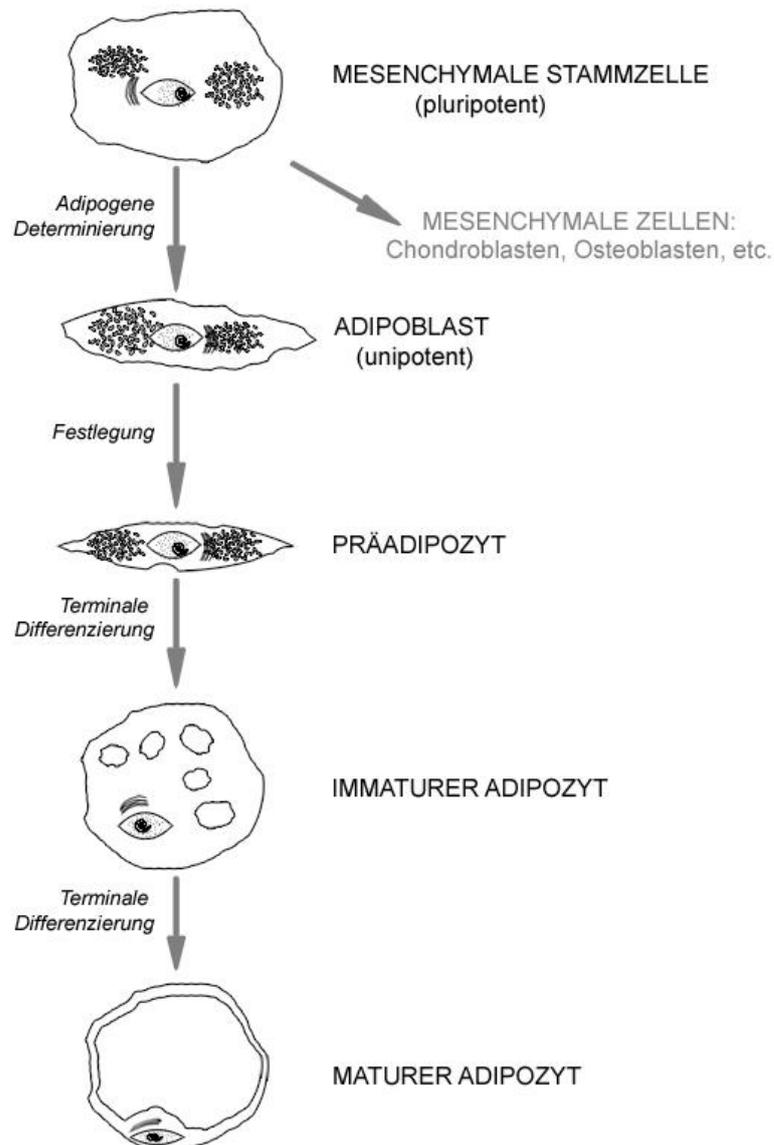
Das Fettgewebe wird in der 4-8 SSW angelegt und kann erstmals im Zeitraum zwischen 14. und 16. SSW beobachtet werden. Die Embryogenese des Fettgewebes ist sehr eng mit der Angiogenese verbunden: Die Kapillaren sprossen gleichzeitig mit dem Beginn der Entstehung des Fettes. Entlang der Kapillare kann man alle Entwicklungsstadien des Fettes beobachten [37].

### 1.3.3 Differenzierung der Adipozyten

Die ersten Versuche die Differenzierung von Fettzellen zu beschreiben reichen in das Jahr 1926 zurück. Wasserman [128] beschrieb unterschiedliche Vorstufen der Fettzellen und führt den Begriff Präadipozyten ein. Danach folgten viele Arbeiten, die durch neue Elemente in der Beschreibung der Entwicklungsstufen der Fettzellen zum Verständnis der Differenzierung beitragen, unter anderem die Arbeiten von Wertheimer und Shapiro aus dem Jahr 1948 [131] oder von Hauberger aus dem Jahr 1955 [49]. Die ersten Versuche, die Fettvorstufen in einer Kultur zu züchten, wurden von Smith im Jahr 1971 [117] dokumentiert und in den Jahren 1975 und 1979 beschrieben Green und Kehinde die erste Präadipozyten-Zelllinie [44, 45].

Das Fettgewebe enthält neben den muren Zellen alle Vorstufen der Adipozyten, die sich unter Anregung eines bestimmten Signals zu Adipozyten differenzieren können [1]. Die Differenzierung zu Adipozyten kann in jeder Lebensphase unter Einfluss bestimmter Faktoren: Wachstumsfaktoren, Insulin, Glukokortikoiden, IGF-I, PDGF, IL-2, etc. erfolgen. Aus den multipotenten mesenchymalen Stammzellen

werden neben Chondro-, Myo-, Osteoblasten, etc. auch monopotente Adipoblasten determiniert, die dann zu Präadipozyten festgelegt werden. An der terminalen Differenzierung von Präadipozyten bis zu murenen Adipozyten nehmen viele Transkriptionsfaktoren und Hormone teil. In der Entwicklung zu reifen Adipozyten verändert sich die Zellmorphologie: Die Zelle wird immer rundlicher und die zuerst multiplen Fetteinschlüsse (Lipoblast) verbinden sich zu einer Fettvakuole [37].



**Abb. 3:** Vereinfachte Darstellung der adipogenen Differenzierung. Die Differenzierung von einer pluripotenten mesenchymalen Vorläuferzelle zu einem murenen Adipozyten basiert auf der Darstellung von Ailhaud [1]. Auf der Skizze wurden die Faktoren, Hormone und Signalmoleküle, die die Differenzierung ermöglichen nicht dargestellt.

### **1.3.4 Funktionen des Fettgewebes**

Das Fettgewebe erfüllt unterschiedliche Aufgaben und Funktionen. Die wichtigste Funktion des Fettes ist die Speicherfunktion: In den Adipozyten werden die Lipide (u.a. Lipogenese) gespeichert, die bei Bedarf wieder freigesetzt werden können (Lipolyse) und dem Körper ohne Nahrungszufuhr Energie liefern können.

Neben den Lipiden werden in den Adipozyten fettlösliche Vitamine (Vitamin A, D, E und K) und Wasser gespeichert. Das Speicherfett kommt vor allem subkutan und viszeral vor.

Das Fettgewebe erfüllt auch eine isolierende Funktion und schützt den Körper vor Wärmeverlust.

Eine andere wichtige Aufgabe des Fettgewebes ist die mechanische Funktion, wie z.B. in den Augenorbitae, auf den Fußsohlen oder an den Gelenken. Das sogenannte Baufett bietet einen mechanischen Schutz und isoliert auch die inneren Organe z.B. die Nieren vor äußeren Einflüssen.

Das Fettgewebe setzt viele Stoffe wie z.B. Lipoproteinlipase, Angiotensinogen, Zytokine, Leptin, Adiponektin, Resistin frei und erfüllt somit eine sekretorische Funktion.

Durch das Vorhandensein vieler mesenchymalen Vorläuferzellen in der stromal-vaskulären Fraktion des Fettgewebes besitzt das Fett eine regenerative Funktion [87, 100]. Die Möglichkeiten und Grenzen dieser Funktion werden aktuell intensiv untersucht. Dadurch ergeben sich verschiedene Einsatzmöglichkeiten in der rekonstruktiven Fettgewebetransplantation.

### **1.4 Adipozytentracking**

Um den Verbleib von Fetttransplantaten im Rahmen der Untersuchung verfolgen zu können, kann entweder durch posthume Untersuchungen des entnommenen Transplantats in zeitlichen Abständen [102] oder ein *in vivo* Tracking durchgeführt werden. In fast allen Studien ist eine online Verfolgung nicht möglich und die Transplantate werden post mortem meistens mithilfe eines Markierstoffs untersucht [32, 102].

Rieck et al. [101, 102] haben die Fetttransplantate mit PKH 26 markiert. Es wurden Einzelzellsuspensionen, Adipozyten und Präadipozyten, die mit Collagenase angedaut wurden, mit PKH 26 markiert und Lewis Ratten injiziert. Nach 6 Monaten wurde ein follow up durchgeführt, indem die Fetttransplantate entnommen und *ex vivo* mittels Makro- und Mikroskopie untersucht wurden. Es konnte eine Größenminderung und ein Vakuolenverlust der transplantierten Zellen festgestellt werden. Bei PKH 26 handelte es sich um einen Tracer, der zum Markieren von Einzelsuspensionen eingesetzt werden kann, jedoch keine *in vivo* online Untersuchungen ermöglicht.

Hemrich et al. [50] beschreiben die Verwendung von PKH 26, CM-Dil und CFSE als Tracer für humane Präadipozyten. Die Fluoreszenz des Markers wurde nach 35 Tagen *in vitro* überprüft: PKH 26 wies ca. 4%, CFSE ca. 3-4% und CM-Dil auch ca. 3-4% der Restfluoreszenz auf. Die untersuchten Tracer vor allem CM-Dil und CFSE sind für *in vivo* Versuche wegen der deutlichen Toxizität (weniger bei PKH 26) ungeeignet.

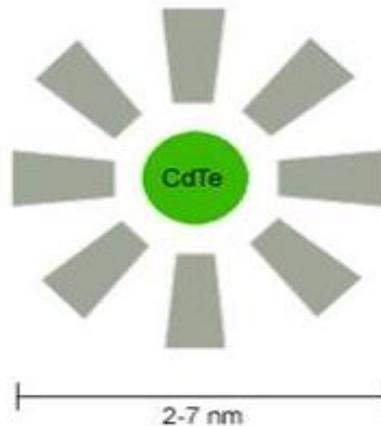
Online *in vivo* Tracking ermöglicht die zeitlichen Verläufe und die Interaktion zwischen dem Transplantat und dem umgebenden Gewebe (z.B. Einsprossen der Blutgefäße) besser zu beurteilen. Ziel unserer Studie war die Eignung von QDots als online Tracer für Adipozytenclustertransplantate zu überprüfen. Die Bedingungen für eine Inkubation der Adipozytencluster mit QDots wurde evaluiert und die QDots mit Indocyaningrün verglichen.

#### **1.4.1 Quantum Dots**

Quantum Dots (QDots) sind kleine (typische Größe <10 nm) fluoreszierende kolloidale halbleitende Nanokristalle, die ursprünglich für die Tumorforschung entwickelt und angewendet wurden [5, 129]. Die QDots ermöglichen durch ihre besonderen optischen Eigenschaften mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren der Nanomoleküle eine Markierung und Verfolgung des Zielgewebes *in vivo* [2, 5, 75, 95, 105, 129].

Alle QDots enthalten einen Kern, der aus Schwermetallpartikeln (z.B. Cadmiumtellurid oder Cadmiumsulfid) besteht und unterschiedlichen Liganden, die um den Kern gelagert sind. An die Liganden können verschiedene Substanzen

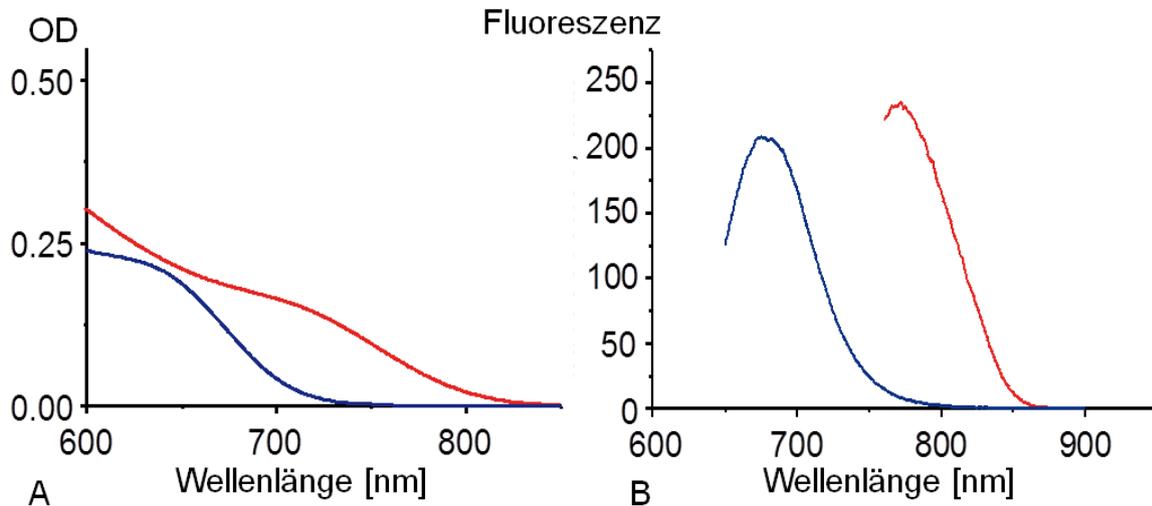
konjugiert werden, wodurch man die Eigenschaften der QDots modifizieren kann. Durch die Modifikationen der Liganden- oder Mizellenbildung wird das Einsatzspektrum der QDots erweitert [28, 40, 142].



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der CdTe-QDots. Der Durchmesser der fluoreszierenden Nanopartikeln ist kleiner als 10 nm. Der Kern besteht aus Cadmiumtellurid. Um den Kern aus Schwermetall lagern sich Liganden an.

Durch den „*Quantum Confinement Effect*“ können optische Eigenschaften, also sowohl die absorbierte als auch die emittierte Wellenlänge durch Veränderung der QDots-Größe und QDots-Zusammensetzung verändert werden [129]. Durch die Bestimmung der Kerngröße wird die Wellenlänge festgelegt: Je kleiner der Kern desto kurzwelliger ist die emittierte Wellenlänge. Man kann durch die Veränderung der Kernzusammensetzung ein Fluoreszenzspektrum von Ultraviolett (1 nm-380 nm) bis Infrarot (780 nm-1 mm) erreichen.

In unseren Versuchen benutzten wir CdTe-QDots, die direkt im Wasser synthetisiert wurden [105]. Die QDots wurden von Mercaptopropionsäure ummantelt, wodurch die Partikel einerseits stabilisiert wurden und andererseits eine negative Ladung durch eine Carboxylgruppe erhalten haben. Die QDots wurden vom Department für Physik und CeNS an der LMU München hergestellt. Es wurden CdTe-QDots 675, 770 und 790 (die Bezeichnung, z.B. 675 steht für das Emissionsmaximum in nm) benutzt.



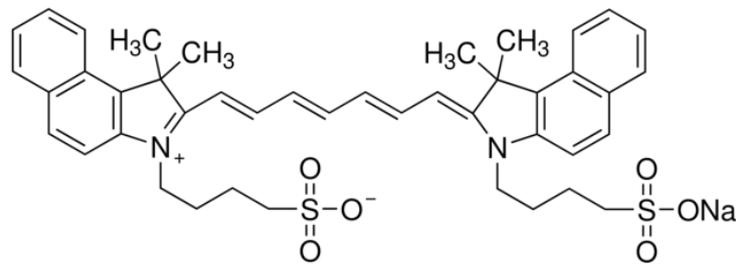
**Abb. 5:** Absorptions- (A) und Emissionsspektrum (B) der QDots 675 (blau) und QDots 770 (rot). Die QDots 675 werden bei 633 nm und die QDots 770 bei 740 nm angeregt. OD: optische Dichte.

Die intravenös injizierten QDots reichern sich v.a. in den Kupferzellen der Leber [5] an, geringer auch in der Niere, Milz und Knochenmark [105]. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend biliär und die QDots, deren Größe 30 kDa nicht überschreitet, werden renal ausgeschieden [105].

### 1.4.2 Indocyaningrün

Indocyaningrün (ICG, Cardiogreen) ist ein negativ geladener, fluoreszierender Polymethinfarbstoff, der unter anderem für die Fluoreszenzangiographie genutzt wird. Ähnlich wie bei QDots liegt das Absorptions- und Fluoreszenzmaximum des Indocyaningrüns im Nahinfrarotbereich. Das Absorptionsspektrum liegt im Bereich zwischen 600 nm-900 nm und das Emissionsspektrum zwischen 750 nm und 950 nm. Das Fluoreszenzmaximum liegt bei über 800 nm.

Intravenös appliziertes ICG bindet an Proteine (v.a. Plasmaproteine) und wird biliär ausgeschieden.



**Abb. 6:** Chemische Formel des Indocyaningrüns (Quelle: Sigma-Aldrich). Das Absorptionsspektrum beträgt: 600 nm-900 nm, das Emissionsspektrum: 750 nm und 950 nm. Das Fluoreszenzmaximum liegt bei über 800 nm.

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Mit den *in vitro* Versuchen wurde zuerst ein Modell vorbereitet, dass danach im *in vivo* Tierversuch umgesetzt wurde. Folgende Fragen wurden untersucht:

### In Vitro:

- Eignung von QDots als Tracer für Adipozytencluster: Praktische Umsetzung und Etablierung.
- Eignung von QDots für Präadipozytentracing.
- Eignung von QDots als Vitalitätsmarker für Adipozyten.

### In Vivo:

- Können QDots als *in vivo* Tracer für Adipozytencluster eingesetzt werden?
- Wie lange können QDots detektiert werden?
- Vergleich der *in vivo* Tracer: QDots und Indocyaningrün.
- Vergleich zwischen frischem, avitalisiertem und kühllaufbewahrtem Adipozytencluster in online Tracing mithilfe QDots.

Ziel dieser Dissertation war die Überprüfung der Eignung von QDots als *in vivo* Tracer für Adipozytencluster.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

- Quantum Dots: Department für Physik und CeNS, LMU (München, Deutschland)
  - QDots 790 (CdTe-QDots): d=7 nm; Exzitation: 740 nm
  - QDots 770 (CdTe 91e-QDots): d=6,6 nm; Exzitation: 740 nm
  - QDots 675 (CdTe 93a-QDots): d=4,1 nm; Exzitation: 633 nm;
- Indocyaningrün: Fluka (Milwaukee, USA)
- Isotone NaCl 0,9% Spüllösung: B. Braun (Melsungen, Deutschland)
- Ringerlactat: B. Braun (Melsungen, Deutschland)
- Glucose 5%: B. Braun (Melsungen, Deutschland)
- Gemischte Collagenase NB ( Typ I und II): Serva, (Heidelberg, Deutschland)
- Trypanblau 0,4% Lösung, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- Hämaalaun: Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Eosin 2%: Chroma (Münster, Deutschland)
- Eukitt: Kindler GmbH & Co. (Freiburg, Deutschland)

#### 2.1.2 Arzneimittel

- Isoflurane®: cp Pharma (Burgdorf, Deutschland)
- Bepanthere® Augensalbe: Roche (Grenzach-Whylen, Deutschland)
- Rimadyl® (Carprofen) Injektionslösung: Pfizer (Berlin, Deutschland)
- Metamizol® Injektionslösung: CT-Arzneimittel (Berlin-Reinickendorf, Deutschland)
- Dermabond®: Ethicon, Johnson & Johnson Company (Norderstedt, Deutschland)

#### 2.1.3 Materialien

- 6-Well-Platten: Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Zellkulturschalen: TPP (Trasadingen, Schweiz)

- Safe-Lock Eppendorf Tubes, 1,5 ml: Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- 0,2 µm steriler Membranfilter, Millipore (Billerica, USA)
- Pipetten: Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Spritzen und Kanülen: Heiland (Hamburg, Deutschland)
- BD® Micro-Fine + 1ml U40 INSULIN 10 x 10 0,30 mm x 8 mm: BD Medical (Heidelberg, Deutschland)
- Strauß-Kanülen orange 1,8 x 43 mm (15 G x 1¾"): Dispomed Witt oHG (Gelnhausen, Deutschland)
- Lab-Tek 8-Kammer mit Deckgläser: Nalge Nunc (Naperville, USA)

#### **2.1.4 Geräte**

- IVIS® Lumina: Caliper Life Science (Rüsselsheim, Deutschland)
- LSM 700®: C. Zeiss (Jena, Deutschland)
- Axiovert 200 Mikroskop: C. Zeiss (Jena, Deutschland)
- Thermomixer: Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Zentrifugen: Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Shaver Philishave C486: Philips (Hamburg, Deutschland)
- Shandon Excelsior: Thermo Electron Corporation (Marietta, USA)

#### **2.1.5 Software**

- Living Image 3.0: Caliper Life Science (Rüsselsheim, Deutschland)
- LSM Image Browser: C. Zeiss (Jena, Deutschland)
- MikroWin 2000: Berchtold (Tuttlingen, Deutschland)
- ZEN 2009 LE Software: C. Zeiss (Jena, Deutschland)
- PASW Statistics 18: IBM (Armonk, USA)

#### **2.1.6 Tiere und Tierbedarf**

- Balb/c- Mäuse: Janvier (Le Genest-St-Isle, Frankreich)
- Käfig Typ II, lang: Techniplast ICV System (Buguggiate, Italien)
- Spezialdiät: Ssniff (Soest, Deutschland)
- Holzgranulat: Abedd (Koeflach, Österreich)
- Zellstoff: Techniplast (Buguggiate, Italien)
- Maushaus: Techniplast (Buguggiate, Italien)
- Nagertunnel: Abedd (Koeflach, Österreich)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von Fettgewebeclustern

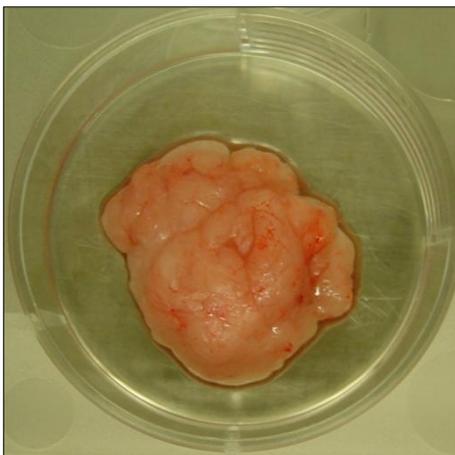
Fettgewebe wurde von weiblichen ca. 1 Jahr alten, balb/c-Mäusen subkutan, perigonadal, abdominal und inguinal unter sterilen Bedingungen entnommen (Abb. 7-8). Das Fettgewebe wurde mit einer Schere ohne Quetschung des Gewebes auf eine Größe zwischen 0,05 und 0,1 g (Abb. 10-11) mechanisch zerkleinert. Nach der Zerkleinerung wurden die Adipozytencluster bei Raumtemperatur (24 °C) in NaCl 0,9% kurzfristig gepoolt. Anschließend wurden die Adipozytencluster entsprechend den weiteren Vorhaben auf Zellkulturschalen oder Safe-lock Tubes aufgeteilt.



**Abb. 7:** Perigonadales Fettgewebe in situ einer balb/c-Maus.



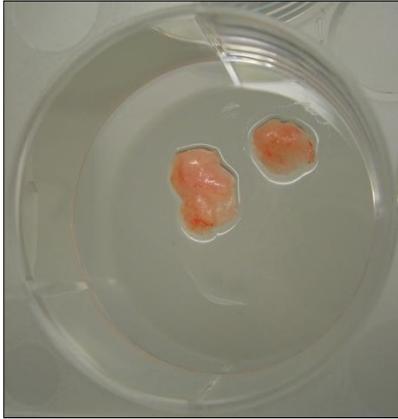
**Abb. 8:** Frisch isoliertes murines Fettgewebe.



**Abb. 9:** Frisch isoliertes murines Fettgewebe vor der mechanischen Dissoziation



**Abb. 10:** und nach der mechanischen Dissoziation.

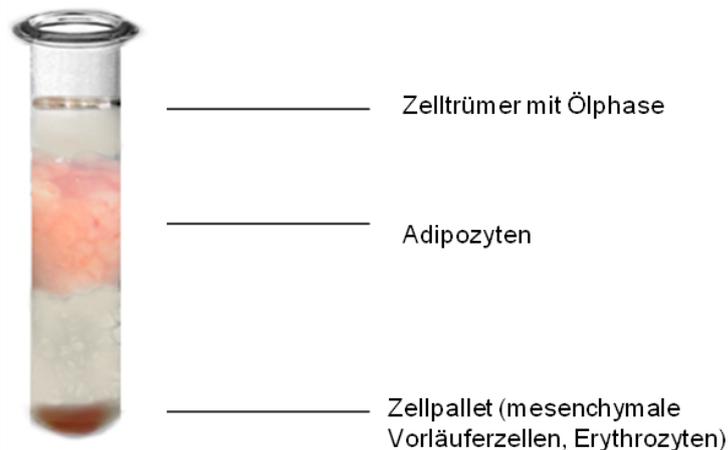


**Abb. 11:** Frisch isoliertes Fettgewebecluster einer balb/c-Maus nach der mechanischen Dissoziation. Das Fettgewebe wurde in Cluster zwischen 0,05 und 0,1 g mechanisch zerkleinert.

### 2.2.2 Gewinnung von mesenchymalen Vorläuferzellen

Die Isolierung der verwendeten Vorläuferzellen erfolgte modifiziert nach dem Protokoll von Rodbell et al. [104] für Präadipozyten: Fettgewebe wurde von weiblichen ca. 1 Jahr-alten, balb/c-Mäusen subkutan, perigonadal, abdominal und inguinal entnommen. Das Gewebe (ca. 1 g) wurde steril mechanisch zerkleinert (bis auf Clustergröße von 0,05-0,1 g) und in NaCl 0,9% kurzfristig bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2 mg Collagenase wurden in 1 ml NaCl 0,9% ( $PZ \geq 0,10$  U/ml) gelöst und steril mit  $0,2 \mu\text{m}$  Filter filtriert. Ca. 1 g des mechanisch dissoziierten Fettgewebes wurde in 5 ml Collagenase-Lösung überführt und in 1,5 ml-Tubes in einem Thermomixer bei  $37^\circ\text{C}$  und bei 400 rpm 1 h lang inkubiert. Die oberste Schicht der Proben (vitale und nekrotische Fettzellen, und Ölphase) und die Collagenase-Lösung wurden verworfen. Die Proben wurden dreimal mit NaCl 0,9% gewaschen und bei 2000 rpm zentrifugiert (1 min und  $21^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde jeweils abgesaugt und verworfen.



**Abb. 12:** Schematische Darstellung des Fettgewebes nach Collagenase-Digestion nach Illouz [57]. Die oberste Schicht bilden nekrotische Zellen, die mittlere Schicht besteht aus vitalen Adipozyten und die untere Schicht enthält mesenchymale Vorläuferzellen mit Erythrozyten.

### 2.2.3 Histologische Methoden

Sowohl das frisch entnommene Fettgewebe als auch die Adipozytencluster und isolierten Vorläuferzellen, als auch die entnommenen Adipozytencluster- und Vorläuferzellgemischtransplantate wurden histologisch aufbereitet und lichtmikroskopisch beurteilt. Bei den Adipozytencluster wurden sowohl makro- als auch mikroskopische (Nativpräparate und Paraffinschnitte) Beobachtungen durchgeführt. Mithilfe Trypanblau sollte die Vitalität der Zellen in einem Adipozytencluster und der Präadipozyten beurteilt werden.

#### 2.2.3.1 Vitalitätsbeobachtung mittels Trypanblau

Trypanblau ( $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ ) ist ein saurer Farbstoff, der zur Vitalitätsbestimmung verwendet werden kann. Eine intakte Zellmembran ist für Trypanblau nicht durchlässig. Somit werden die vitalen Zellen nicht angefärbt. Die avitalen Adipozyten und Präadipozyten nehmen Trypanblau auf, wodurch sie unter dem Lichtmikroskop blau erscheinen.

#### 2.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit dem Hämalaun nach Mayer werden basophile Strukturen, wie DNA reiche Zellkerne und das raue endoplasmatische Retikulum dunkelblau eingefärbt. Eosin ist ein saurer Farbstoff, der das Zytoplasma rot einfärbt.

Die frischen Präparate für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden nach der Entnahme in Formalin eingelegt. Danach wurden sie maschinell (Shandon Excelsior) in Paraffin eingebettet und in 4,5-5  $\mu\text{m}$  Schichten geschnitten (Leica). Die HE-Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Entparaffinieren
  - Xylol I 15 min
  - Xylol II 15 min
  - Alkohol absolut 5 min
  - Alkohol 95% 5 min
  - Alkohol 70% 5 min
  - Destilliertes Wasser kurz
  
- b) HE-Färbung
  - Hämalaun 20-30 sec
  - fließend wässern 10 min
  - Eosin 2% 9-10 min
  - fließend wässern 3 min
  - Alkohol 70% 3 min
  - Alkohol 96% 3 min
  - Alkohol absolut 5 min
  - Xylol I 10 min
  - Xylol II 10 min

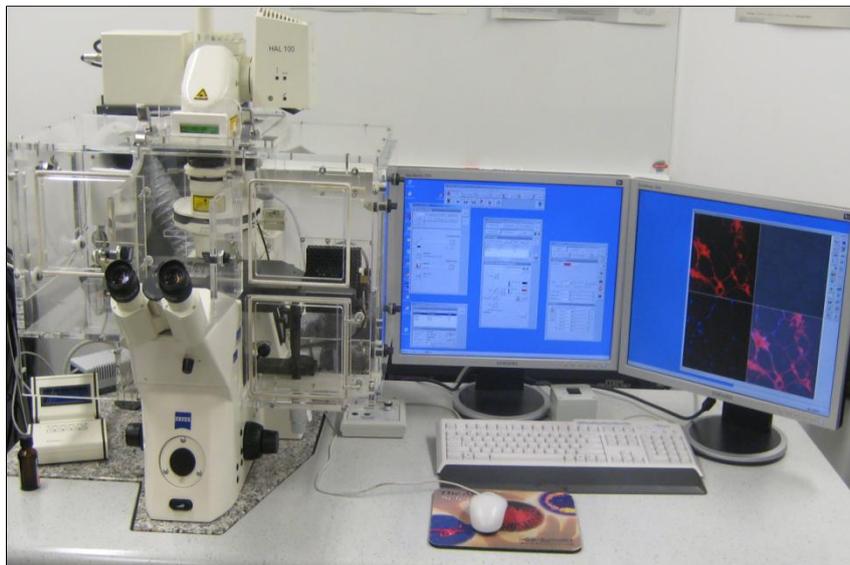
Nach der Färbung wurden die Schnitte 30 min lang getrocknet und danach mit Eukitt der Firma Kindler versiegelt.

## **2.2.4 Fluoreszenzdetektion**

### **2.2.4.1 Lasermikroskopie**

Zur Detektion der intra- und extrazellulären QDots-Verteilung wurde eine Gruppe der Adipozytencluster mit kurzwelligem ( $\lambda=636\text{ nm}$ ) CdTe-QDots 675 mit einer Konzentration von 21,9  $\mu\text{mol/l}$  1 h lang bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollgruppe fungierten unbehandelte Adipozytencluster. Die Adipozytencluster wurden zur

Untersuchung in Lab-Tek 8-Kammern platziert. Die Beurteilung der Proben erfolgte mit dem Lasermikroskop Firma C. Zeiss: LSM 710 META® (Abb. 13). Für die konfokale Laserscanningmikroskopie wurden Wellenlängen von 364 nm (Argon), 488 nm (Argon), 543 nm (Helium-neon laser 1) und 633 nm (Helium-neon laser 2) und ein Vergrößerungsobjektiv von 63x/1,40 Öl DIC benutzt.



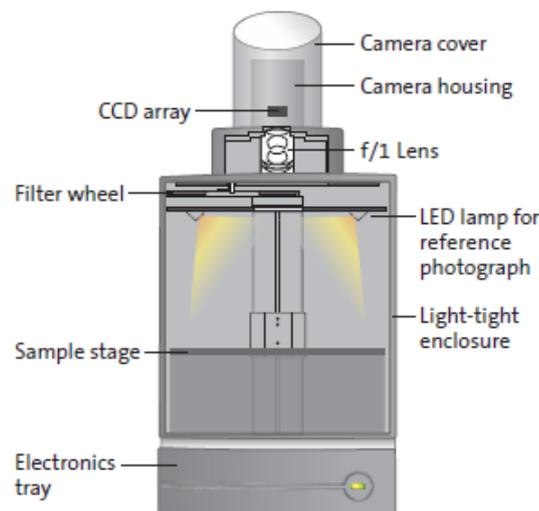
**Abb. 13:** Lasermikroskop von C. Zeiss, LSM 710 META®.

Sowohl den mit QDots 675 inkubierten Adipozytencluster als auch der Kontrollgruppe wurde zur Markierung der Zellkerne 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Dapi®) in einer Konzentration von 1 mg/ml zugegeben. Die Detektion der Fluoreszenz der QDots 675 wurde durch Anregung mit 633 nm und mit einem Longpass-Filter mit 650 nm durchgeführt. Die Fluoreszenz von DAPI wurde mit Anregung von 364 nm und mit einem Bandpass-Filter mit einem Bereich zwischen 385 und 470 nm detektiert. Die Aufnahmen wurden mittels AxioVision® 4.6 Software analysiert, mit LSM Image Browser Release 4.2® und ZEN 2009 LE Software® der Firma C. Zeiss ausgewertet.

Für die lasermikroskopische Beurteilung wurde ein Gesichtsfeld (field of view) von 112,5 µm x 112,5 µm ausgewählt. Im ersten Kanal wurde die Fluoreszenz der QDots 675 angeregt mit einer Wellenlänge von 633 nm und mit einem Longpass-Filter mit 650 nm. Die mit QDots 675 inkubierten Adipozytencluster zeigten ein Fluoreszenzsignal.

### 2.2.4.2 IVIS® Lumina Imaging System

Das IVIS® Lumina Imaging System ist ein System, das mittels CCD-Kamera eine Detektion der Fluoreszenz oder der Biolumineszenz sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ermöglicht.



**Abb. 14:** IVIS® Lumina Imaging System von Xenogen (Quelle: Beschreibung des IVIS® Lumina Imaging Systems von Xenogen Corporation, 2006) mit CCD Kamera und Messkammer. Mit dem System kann Fluoreszenz und Lumineszenz sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einfach ermittelt werden. Die gemessenen Daten können danach mithilfe dazu gehörender Living Image Software von Xenogen ausgewertet werden.

Das System ist komplex aufgebaut und besteht vor allem aus:

- 13x13 mm großer CCD-Kamera, die mittels hoher Auflösung (1024x1024 Pixel) eine sehr gute Bildqualität und somit eine genaue Lokalisierung des Signals ermöglicht,
- einer lichtdichten Kammer, in der die optimale Bedingungen für Bildaufnahmen mittels elektrisch gesteuerter beheizter Bühne mit 4 Höhen des Messfeldes (5; 7,5; 10 und 12,5 cm), Filterrad, Sammellinse (f/0.95-f/16), Blendenstufen, LED-Lampe, 8-stufigen Emissionsfilter und 12-stufiger Exzitationsfilter geschaffen sind,
- integrierter Isoflurananästhesie, die ermöglicht während der Messung die Anästhesie der Tiere aufrechtzuerhalten.

Die dazu gehörende Living Image Software® von Firma Xenogen ermöglicht die Aufnahme, Auswertung und Archivierung der Aufnahmen.

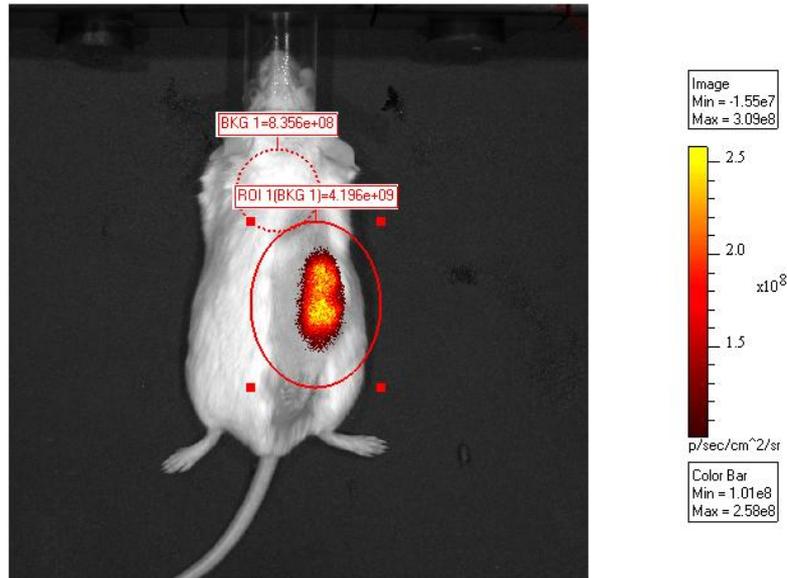
Die Fluoreszenzstärke wurde in Form von Fluoreszenz [p/sec] *in vitro* als auch *in vivo* mittels eines IVIS® Lumina Imaging System (Abb. 15) ermittelt. Das System ermöglichte mittels der CCD-Kamera eine Detektion des Fluoreszenzsignals.

Die *in vitro* Proben und die anästhesierten Tiere wurden in die lichtdichte Kammer des IVIS® Lumina Systems in einer Entfernung von 10 oder 12,5 cm (field of view: C oder D) platziert. Bei Verwendung eines Exzitationsfilters: ICG 705-780 nm und eines Emissionsfilters: ICG 810-885 nm wurde mit einer Beleuchtungszeit von 1 s das Fluoreszenzsignal aufgenommen.



**Abb. 15:** IVIS® Lumina Imaging System besteht aus einer lichtdichten Messkammer, die mit einer CCD-Kamera, die Fluoreszenzsignal ermittelt und einer Isoflurananästhesiekammer, die eine Narkose der Tiere vor und während der Messung ermöglicht.

Die aufgenommene Fluoreszenzsignalstärke wurde mithilfe der Living Image 3.0 Software® ausgewertet. Von dem festgelegten signalaufweisenden Bereich (ROI=regions of interest) wurde ein Hintergrundgeräusch (BKG=background ROI) subtrahiert. Das Signal wurde als total flux in Photon pro Sekunde [p/sec] angegeben (Abb. 16).



**Abb. 16:** Fluoreszenzsignalermittlung mithilfe Living Image 3.0 Software®. Mithilfe ROI (regions of interest) wird das Fluoreszenzsignal gemessen. Von ROI-Bereich wird ein Hintergrundgeräusch (BKG) subtrahiert und das Fluoreszenzsignal in photon/sec ermittelt.

## 2.2.5 Tracereigenschaften

### 2.2.5.1 Tracerstabilität in vivo von QDots und Indocyaningrün

Es wurden QDots 790-Lösungen ohne Adipozytencluster subkutan bei balb/c-Mäusen injiziert (n=3) und über 51 Tage *in vivo* beobachtet. Dabei wurden je 0,5 ml der QDots 790-Lösung (9 nM) bei 3 balb/c-Mäusen subkutan mit einer DB® Micro-Fine + Spritze (Kanülenlänge: 8 mm, Kanülenstärke: 0,3 mm) injiziert.

Als weiterer Tracer wurden Injektionen mit Indocyaningrün (Cardiogreen®) durchgeführt (n=3) und die Fluoreszenzstärke über 51 Tage *in vivo* verfolgt. Es wurden je 0,5 ml Indocyaningrün-Lösung (39 nM, in NaCl 0,9%) subkutan mit einer DB® Micro-Fine + Spritze (Kanülenlänge: 8 mm, Kanülenstärke: 0,3 mm) Firma BD Medical injiziert. In einem *in vitro* Vorversuch wurde eine Konzentration von 39 nM für das Indocyaningrün festgelegt.

Es wurden neben den regelmäßigen Signaldetektionen mit IVIS® Lumina Imaging System [in p/sec] auch Kotproben und Urinproben mittels Fluoreszenzsignaldetektionen regelmäßig untersucht um die enteralen, bzw. renalen Ausscheidungen der Tracersubstanzen zu überprüfen.

### 2.2.5.2 Indirekter Adhäsionstest

Adipozytencluster wurden entnommen und in drei Gruppen aufgeteilt:

**Gruppe A** (n=4): Adipozytencluster wurden bei 37 °C mit 9 nM QDots 790-Lösung für 60 min inkubiert.

**Gruppe B** (n=4): Fettgewebe wurde 30 min bei -20 °C aufbewahrt und danach bei 37 °C 30 min lang aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden sie bei gleichen Bedingungen wie die Gruppe A mit QDots 790 inkubiert.

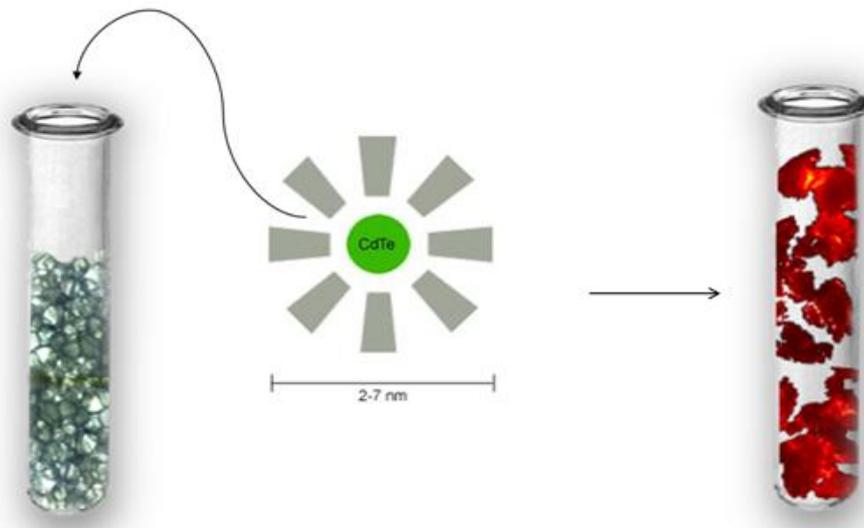
**Gruppe C** (n=4): Die Adipozytencluster wurden thermisch avitalisiert, indem sie bei 400 rpm über 15 min auf 90 °C erhitzt wurden. Danach wurden die Proben abgekühlt und mit QDots 790 unter gleichen Bedingungen wie die Gruppe A inkubiert.

Das Fluoreszenzsignal der drei Gruppen wurde direkt nach der Inkubation und nach einer zweifachen Waschprozedur mittels IVIS® Lumina Imaging System ermittelt.

### 2.2.6 *In vitro* Vorversuche

Zur Optimierung der *in vivo* Bedingungen, wurden zunächst *in vitro* Vorversuche mit QDots durchgeführt.

Adipozytencluster wurden nach ihre Gewinnung auf Zellkulturschalen aufgeteilt und mit 1 ml NaCl 0,9% und zugefügten QDots 790 (Medium) und QDots 770 (Konzentration, Zeit, Temperatur) inkubiert. Der Einfluss der Inkubationszeit, der -temperatur, des -mediums und der -konzentration auf die Fluoreszenzsignalstärke wurde beobachtet.

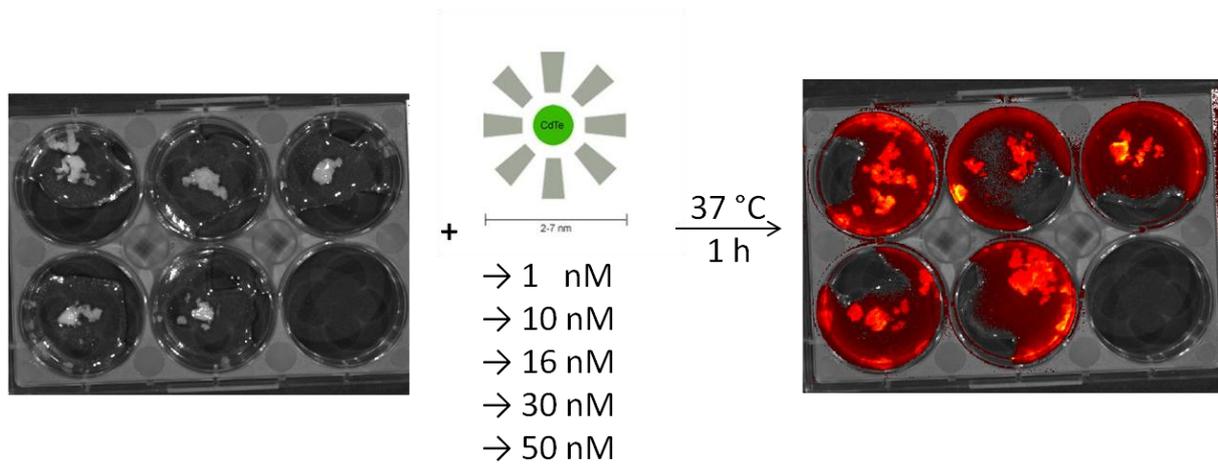


**Abb. 17:** Schematische Darstellung einer Inkubation der Adipozytencluster mit QDots. Die gewonnene Adipozytencluster wurden mit 1 ml QDots in unterschiedlichen Konzentrationen, Temperaturen, Zeiten und Medien inkubiert.

Um die Fluoreszenzsignalstärke zu beurteilen, wurden nach der Inkubation alle Adipozytencluster vor der Messung mit dem IVIS® Lumina Imaging System mit 1-2 ml NaCl 0,9% zweimal gewaschen. Nach der zweimaligen Waschprozedur wurde das Fluoreszenzsignal der Adipozytencluster ermittelt.

#### 2.2.6.1 Vorversuch für die Inkubationskonzentration

Frisch entnommene Adipozytencluster (0,05-0,1 g) wurden auf 6-well-Zellkulturschalen verteilt (Abb. 18) und in 5 Gruppen (jeweils n=5) aufgeteilt. Es folgte eine einstündige Inkubation mit 1 ml QDots 770 bei 37 °C in den **Konzentrationen [in nM]: 1, 10, 16, 30 und 50**. Nach der Inkubation wurden die Proben einer zweimaligen Waschprozedur mit NaCl 0,9% unterzogen. Die Fluoreszenzsignalstärke wurde mit dem IVIS® Lumina Imaging System ermittelt, wobei die gesamten 6-well-Zellkulturschalen in das IVIS® Lumina Imaging System verbracht wurden.



**Abb. 18:** QDots-Konzentrationsbestimmung. Die Adipozytencluster wurden bei 37 °C mit QDots 770 in unterschiedlicher Konzentration (1, 10, 16, 30 und 50 nM) eine Stunde lang inkubiert.

### 2.2.6.2 Vorversuch für die Inkubationszeit

Adipozytencluster wurden auf Tubes mit je 1 ml 16 nM QDots 770-Lösung aufgeteilt und bei 37 °C inkubiert (n=30). Das Fluoreszenzsignal wurde nach **15, 30, 60, 90, 120 und 180 min** (je n=5) gemessen. Zur Messung wurden die Proben auf 6-Well-Platten verteilt (Platten 1-5: Adipozytencluster mit QDots-Lösung, Platte 6: Kontrolle: QDots-Lösung ohne Adipozytencluster).

Zunächst wurde eine IVIS® Imaging Messung bei allen Proben mit der inkubierten QDots-Lösung durchgeführt. Anschließend wurde eine zweimalige Waschprozedur der Proben mit je ca. 1 ml NaCl 0,9 % durchgeführt und eine erneute Messung vorgenommen.

### 2.2.6.3 Vorversuch für die Inkubationstemperatur

Es wurden 15 Proben (n=15) mit Adipozytencluster vorbereitet. Adipozytencluster wurden mit je 1 ml 16 nM QDots 770-Lösung (in NaCl 0,9%) bei **4 °C (n=5), bei RT: 24 °C (n=5) und bei 37 °C (n=5)** inkubiert. Nach 60 min wurden die Proben zur Messung auf 6-Well-Platten verteilt (Platte 1-5: Adipozytencluster mit QDots-Lösung, Platte 6: Kontrolle: QDots-Lösung ohne Adipozytencluster). Zunächst wurde eine IVIS® Imaging Messung bei allen Proben mit der inkubierten QDots-Lösung durchgeführt. Anschließend wurde eine zweimalige Waschprozedur der Proben mit je ca. 1 ml NaCl 0,9% durchgeführt und eine erneute Messung vorgenommen.

Das Signal der QDots wurde bei den Adipozytenclustern nach 2 Stunden Aufbewahrung in 1 ml NaCl 0,9% erneut gemessen. Die Aufbewahrungstemperatur wurde analog der vorherigen Inkubationstemperatur gewählt.

#### **2.2.6.4 Vorversuch für das Inkubationsmedium**

QDots 790 wurden in der Konzentration 9 nM in **NaCl 0,9% (n=3), Glucose 5% (n=3) und Ringerlactat (n=3)** gelöst. Adipozytencluster (je n=3) wurden in den drei Lösungen bei 24 °C für 24 h inkubiert. Nach definierten Zeitintervallen (10, 30, 60, 120, 180 min und 24 h) wurde das Fluoreszenzsignal der Proben ohne Waschprozedur gemessen.

Nach 24 h erfolgte eine Waschprozedur mit der Inkubationslösung ohne QDots (NaCl 0,9%, Glucose 5% oder Ringerlactat). Danach wurde die Signalstärke nach 10, 30, 60 und 80 min ermittelt. Für die Zeit zwischen den Messungen wurden die Proben im jeweiligen Medium bei 24 °C belassen.

#### **2.2.6.5 Vorversuch für die Vorläuferzellen**

Die isolierten Vorläuferzellen (ca. 0,1 ml) wurden nach dem Waschprozedere (s. 2.2.2) bei gleichen Bedingungen wie die Adipozytencluster inkubiert: In 1 ml 16 nM QDots 675-Lösung bei 37 °C zwischen 60 und 120 min lang.

Nach der Inkubation, um die an der Oberfläche haftenden QDots zu entfernen, wurden die Präadipozyten einer 3-fachen Waschprozedur mit 1 ml NaCl 0,9% unterzogen.

### **2.2.7 *In vivo* Versuche**

#### **2.2.7.1 Tiermodell**

Weibliche balb/c-Mäuse wurden von der Firma Janvier, Charles River, Frankreich (Züchtung von Winkelmann) bezogen. Das Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern mit der Tierversuchsantragsnummer: 55.2-1-54-2531-53-08 genehmigt.

### **2.2.7.1.1 Haltung**

Die Mäuse wurden im Tierstall der Pharmazeutischen Biologie-Biotechnologie, des Pharmazeutischen Instituts der LMU gehalten.

Die Tiere wurden in klimatisierten Räumen (21 °C, Luftfeuchtigkeit: 60%) mit 12-Stunden Tag/Nacht-Lichtrhythmus untergebracht. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden in Käfigen Typ II mit einer Besetzungsdichte von maximal 5 Tieren gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte unter SPF-Bedingungen. Die Käfige wurden mit Holzgranulat als Einstreu, Maushäusern, Nagertunneln und Zellstoff ausgestattet und regelmäßig autoklaviert. Ein Wechsel der Käfige wurde ein bis zwei Mal wöchentlich durchgeführt. Viertel- bis halbjährlich erfolgte eine Überprüfung der Tiere nach den Richtlinien der FELASA durch ein externes Labor (Harlan-Winkelmann, Borcheln).

### **2.2.7.1.2 Ernährung**

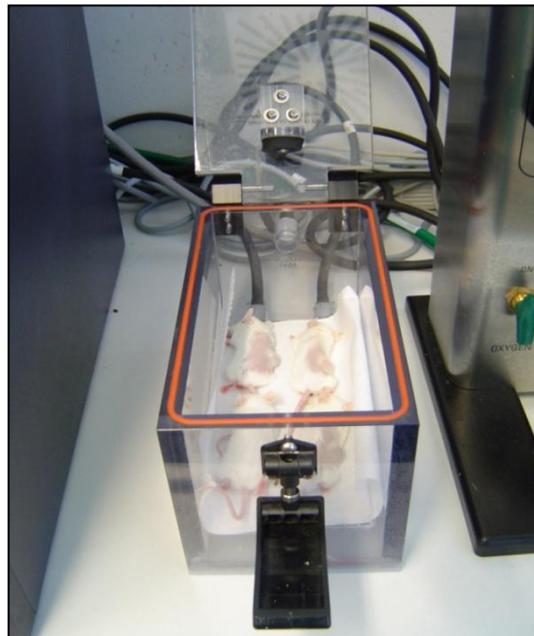
Die Mäuse wurden nach dem Einsetzen im Alter zwischen 6 und 8 Wochen auf Standardfutter der Firma Sniff und ein Spezialfutter mit 20%- und 30%-Fettgehalt umgestellt. Das Normalfutter, Spezialfutter und Wasser (unbehandeltes Trinkwasser, Wechsel der Tränkeflaschen alle 2-3 Tage) wurde autoklaviert und den Tieren ad libitum gereicht.

### **2.2.7.1.3 Anästhesie**

Alle *in vivo* Injektionen und Messungen wurden in einer Isoflurannarkose durchgeführt. Die Anästhesiedauer betrug bei den Kontrollmessungen der Fluoreszenzstärke wenige Minuten. Bei den Injektionen wurde die Anästhesie für einen Zeitraum von 15-20 min aufrechterhalten. Direkt vor den Injektionen wurde bei den Tieren die Reflexantwort untersucht, um die Narkosentiefe und das Schmerzempfinden zu beurteilen. Bei den *in vivo* Injektionen und Transplantationen mit Adipozytenclustern erhielten die Tiere zur Prävention von Wundschmerzen orale Analgetika (Metamizol 200 mg/kg KG und Carprofen 5-10 mg/kg KG), welche in Abhängigkeit des erwarteten Schmerzens am Injektionstag, bzw. an den folgenden Tagen verabreicht worden sind.

Die Narkosen wurden in einer Induktionsbox (Abb. 19) eingeleitet. Die Induktionsbox wurde zuerst mit Sauerstofffluß von 4 l/min und einer Isoflurankonzentration von 3%-4% über etwa 2 min angeflutet. Danach wurde die Konzentration des Isoflurans auf 2% reduziert und die Tiere (max. 4) wurden in der Induktionsbox platziert. Die Isoflurankonzentration wurde der Atemfrequenz und somit der Narkosetiefe der Tiere angepasst.

Nachdem die Tiere anästhesiert wurden (unter Überwachung der Atemfrequenz), wurden sie in die IVIS-Messkammer transferiert und mit der Gesichtsmaske beatmet (Abb. 21). Die IVIS-Messkammer wurde auf 37 °C vorgewärmt und die Zirkulationspumpe wurde auf 7/8 l/min gestellt. Der Sauerstofffluß wurde auf 1,5 l/min und die Isoflurankonzentration auf 1,5-2% eingestellt. Die Isoflurankonzentration und der Sauerstofffluß in der IVIS-Messkammer und somit die Anästhesieerhaltung wurden immer entsprechend der Atemfrequenz angepasst. Vor dem Einsetzen der Tiere in die IVIS-Kammer wurden die Augen der Tiere mit Bepanthen®-Salbe behandelt.



**Abb. 19:** Narkoseeinleitung in der Induktionsbox. Vor der Messung des Fluoreszenzsignals wurden die balb/c-Mäuse mittels Gasanästhesie narkotisiert. Die Isoflurankonzentration wurde im Verlauf der Narkose von 3-4% auf 2% reduziert, der Sauerstofffluß betrug 4 l/min.



**Abb. 20:** Anästhesie in der IVIS-Messkammer. Nach der Einleitung der Narkose wurden die Tiere mit einer Gesichtsmaske mit einem Sauerstofffluß von 1,5 l/min und einer Isoflurankonzentration von 1,5-2% narkotisiert.



**Abb. 21:** Isoflurananästhesie über eine Gesichtsmaske in der IVIS-Messkammer. Die Überwachung der Narkostiefe erfolgte mithilfe der Atemfrequenz.

Die Anästhesieausleitung wurde durch ein Unterbrechen des Isofluran- und Sauerstoffflusses durchgeführt. Nachdem die ausgeleiteten Tiere nach wenigen Minuten wach wurden, wurden sie wieder in ihre Käfige eingesetzt und 10-15 min lang überwacht.

#### **2.2.7.1.4 Euthanasie**

Für die Gewinnung der Adipozytencluster und bei der Beendigung einer Versuchsreihe wurden die balb/c-Mäuse mit Kohlenstoffdioxid lege artis euthanasiert.

#### **2.2.7.2 Gewebegewinnung**

Für die Gewinnung der Adipozytencluster und der Vorläuferzellen wurden die Tiere (ab ca. 30 g Körpergewicht) als Gewebespende euthanasiert. Von einer Maus mit etwa 30 g Körpergewicht konnte zwischen 1-2 g Fettgewebe gewonnen werden (s. 2.2.1). Die Adipozytencluster und die Vorläuferzellgemische für die *in vivo* Versuche wurden analog aufbereitet wie für *in vitro* Versuche (s. 2.2.1/2.2.2).

Für alle subkutanen Injektionen und Transplantationen wurde der rechte Bereich zwischen Flanke und Schulter ausgewählt. Die Injektions- und Transplantationsstellen wurden mit einem elektrischen Rasierer enthaart.

#### **2.2.7.3 Vorläuferzellentransplantation**

Die Präadipozyten wurden wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben, gewonnen. Aus dem 5,2 g Fettgewebe wurden etwa 0,1 ml zelluläre Bestandteile unter anderem die Präadipozyten isoliert. Das Zellsediment wurde nicht weiter selektiert. Nach der Inkubation der Präadipozyten mit QDots 675 und nach 3-facher Waschprozedur wurde das Zellsediment (0,1 ml) in 1 ml NaCl 0,9% suspensiert. Je 0,25 ml der Lösung wurden mit einer DB® Micro-Fine + Spritze (Kanülenlänge: 8 mm, Kanülenstärke: 0,3 mm) subkutan 5 balb/c-Mäusen verabreicht. Das Fluoreszenzsignal der Injektionen (n=5) wurde über 12 Tage in regelmäßigen Abständen (Tag 1, 2, 5, 8, 10 und 12) detektiert.

#### **2.2.7.4 Adipozytenclustertransplantationen**

Die Adipozytenclustertransplantationen wurden mehrmals mit unterschiedlichen QDots-Arten und verschiedenen Vergleichsgruppen durchgeführt. Es wurde ein Vergleich durchgeführt zwischen:

- vitalen Adipozytenclustertransplantaten mit QDots (n=3) und vitalen Adipozytenclustertransplantaten mit Indocyaningrün (n=3) über 51 Tage (s. 2.2.7.4.1).
- Vitalen Adipozytenclustertransplantaten (n=6) und avitalisierten Adipozytenclustertransplantaten (n=6) über 51 Tage (s. 2.2.7.4.2).
- vitalen Adipozytenclustertransplantaten (n=10) und Adipozytenclustertransplantaten nach Kühlaufbewahrung (n=5) über 12 Tage (s. 2.2.7.4.3).

Die Beurteilung allen Adipozytenclustertransplantate und Präadipozyten (s. 2.2.7.3) wurden ermittelt durch:

- Fluoreszenzdetektion (Ermittlung und Vergleich der Signalstärke mittels IVIS® Lumina Imaging System)
- Morphologie (Volumen, makroskopische Beschaffenheit, Vaskularisation, etc.)
- Histologie (Einbetten in Paraffin und Färbung mit Hämatoxylin-Eosin)

Das Volumen der Adipozytenclustertransplantate wurde mithilfe der Formel für Rotationsellipsoid berechnet:  $\text{Volumen [ml]} = \text{Höhe} \times \text{Breite} \times \text{Tiefe} \times 0,5$ .

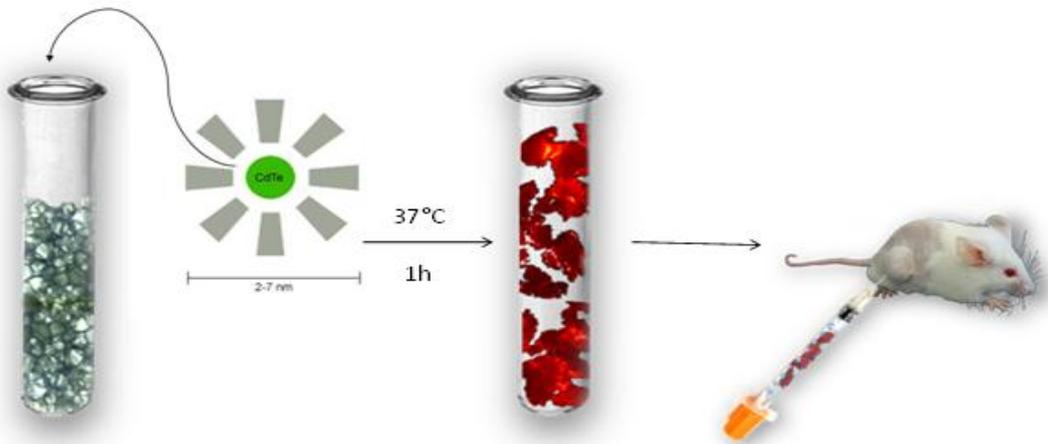
#### **2.2.7.4.1 Transplantation von vitalen Adipozytencluster**

Adipozytencluster wurden wie unter 2.2.1 beschrieben vorbereitet.

Sie wurden mit 9 nM QDots 790 60 min lang in 37 °C inkubiert und nach der Inkubation zweifach mit NaCl 0,9% gewaschen. Für die Transplantationen wurden Strauß-Kanülen [1,8 x 43 mm (15 G x 1¾")] der Firma Dispomed Witt oHG verwendet. Die Adipozytencluster, je 1 ml, wurden 3 balb/c-Mäusen subkutan injiziert. Die Einstichstelle lag 1-2 cm entfernt von der Transplantationsstelle (subkutan Untertunnelung) um einen Rücklauf der Adipozytencluster zu vermeiden. Im Anschluss an die Adipozytenclustertransplantation wurde eine 0,5 ml NaCl 0,9% Injektion durchgeführt. Die Einstichstelle wurde mit dem Gewebekleber Dermabond® verschlossen. Der Erfolg der Transplantation wurde in gleicher Narkose mit der Fluoreszenzdetektion mittels IVIS® Lumina Imaging System überprüft. Die Adipozytencluster wurden in der ersten Woche täglich mit dem IVIS® Lumina Imaging System detektiert. Danach wurden die Kontrollen in regelmäßigen zeitlichen Abständen: nach 11, 17, 24, 31, 38, 44 und 51 Tagen durchgeführt.

Unter gleichen Bedingungen wurden die Transplantationen der Adipozytencluster mit Indocyaningrün durchgeführt. Die Adipozytencluster wurden 1 h lang bei 37 °C mit 39 nM Indocyaningrün inkubiert und danach zweifach gewaschen. Die Transplantationen (je 1 ml Adipozytencluster mit der Nachinjektion von 0,5 ml NaCl 0,9%, n=3) und die Signaldetektion erfolgte bei 3 Mäusen analog wie bei Adipozytenclustern mit QDots.

Alle balb/c-Mäuse mit Adipozytenclustertransplantationen erhielten über 6 Tage post transplantationem einen Tropfen Carprofen p.o. (ca. 5-10 mg/kg KG) zur Schmerzprophylaxe.



**Abb. 22:** Adipozytenclustertransplantation. Die entnommene Adipozytencluster wurden zuerst mit QDots 790 bei 37 °C über 1 Stunde inkubiert, nach der Inkubation 2-fach gewaschen und je 1 ml oder 0,5 ml subkutan mit einer 15 G-Kanüle injiziert.

#### 2.2.7.4.2 Transplantation von avitalisierten Adipozytencluster

Die Adipozytencluster wurden wie in dem Punkt 2.2.1 beschrieben entnommen, danach wurden sie für 15 min bei 1400 rpm in einem Thermomixer bis auf 80 °C erhitzt. Nach der thermischen Avitalisierung und Abkühlung bis auf Raumtemperatur (24 °C) wurde eine Gruppe der Adipozytencluster (n=3) mit 9 nM QDots 790-Lösung und eine Gruppe (n=3) mit 39 nM Indocyaningrün-Lösung 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation und zweifacher Waschprozedur wurden Injektionen mit 1 ml avitalisierten Adipozytencluster mit QDots (n=3) und Injektionen mit avitalisierten Adipozytencluster mit Indocyaningrün (n=3) vorbereitet. Die Injektionen wurden mit je 0,5 ml NaCl 0,9% nachgespült. Bei einer Maus erfolgte eine Injektion

mit nur 0,4 ml von dem avitalisierten Adipozytencluster mit Indocyaningrün. Die Injektionen und die Detektionen mit den avitalisierten Adipozytencluster erfolgten analog zu den Injektionen mit vitalen Cluster.

Alle Tiere wurden analgetisch über 6 Tage post transplantationem mit einen Tropfen Carprofen p.o. (ca. 5-10 mg/kg KG) behandelt.

#### **2.2.7.4.3 Transplantation von Adipozytencluster nach Kühlaufbewahrung**

In diesem Versuch wurden die frisch gewonnenen Adipozytencluster mit denen, die über 40 Tage bei -21 °C aufbewahrt wurden, verglichen.

Das Fettgewebe wurde entnommen und direkt danach in einem Tube bei -21 °C eingefroren. Vor der Transplantation (nach 40 Tagen) wurde das Fettgewebe aufgetaut und mechanisch dissoziiert, bis auf die Größe der Adipozytencluster. Sowohl die frisch entnommenen Adipozytencluster (n=10) als auch die aufgetauten (n=5) wurden mit QDots 675 bei 37 °C über 1 Stunde lang inkubiert und zweifach gewaschen.

Es wurden Analog zu dem Versuch 2.2.7.4.1 Injektionen mit je reduzierter Menge von 0,5 ml Adipozytencluster vorbereitet. Bei 10 balb/c-Mäuse wurden 0,5 ml frischer Adipozytencluster, bei 5 Mäusen 0,5 ml Adipozytencluster nach Kühlaufbewahrung s.c. mit 15 G-Strauß-Kanüle injiziert. Die Tiere wurden analgetisch mit einem Tropfen Metamizol p.o. (ca. 200 mg/kg KG) behandelt.

Die Signalstärke wurde sofort nach der Injektion als auch an den Tagen: 2, 3, 5, 8, 10 und 12 mit dem IVIS® Lumina Imager System ermittelt.

#### **2.2.8 Statistische Auswertung**

Die Werte werden als Mittelwert mit Standardabweichung (+/-) angegeben. Die statistische Auswertung mit der graphischen Darstellung wurde mithilfe von Microsoft Office Exel 2007 und der PASW Statistics 18 durchgeführt.

Als Tag 1 wurde bei der Auswertung immer der Tag der Injektion oder der Transplantation bezeichnet. Bei der Angabe der relativen Werte wurde mit 100% immer der Ausgangswert, der am Transplantationstag (Tag 1) ermittelt wurde, festgelegt.

Die Signifikanz für die unabhängigen Stichproben wurde bei mehreren Stichproben mithilfe der einfaktorieller ANOVA nach Kruskal-Wallis (k-Stichproben) bei zwei Stichproben mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests berechnet.

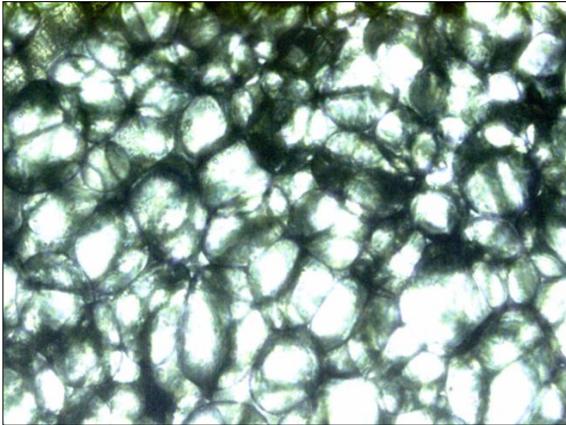
Die Signifikanz der abhängigen Stichproben wurde bei einer Stichprobe mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests berechnet.

Als signifikant (\*) unterschiedlich wurden die Gruppen bezeichnet in denen  $p \leq 0,05$ , als hochsignifikant (\*\*) in denen  $p \leq 0,01$  ist.

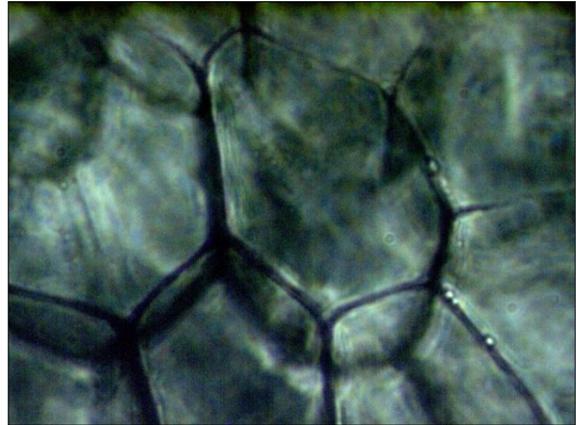
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Histologie der Adipozytencluster

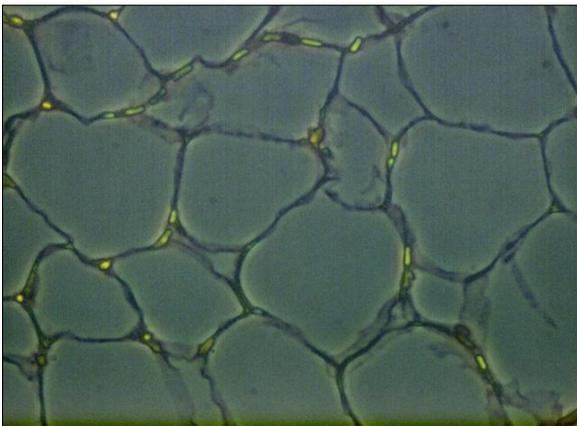
Die mikroskopische Beurteilung der Adipozytencluster erfolgte zunächst nativ: Es konnte ein intaktes Mischbild von 3-dimensionalen Adipozytenkonglomeraten mit mesenchymalen Vorläuferzellen, Blutkapillaren und Bindegewebestrukturen festgestellt werden.



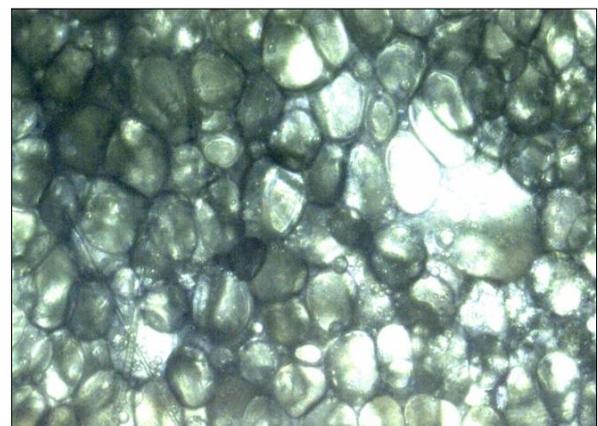
**Abb. 23:** Adipozyten in einem murinen Adipozytencluster (nativ, Vergr. 25x).



**Abb. 24:** Muriner Adipozyt in einem Adipozytencluster (nativ, Vergr. 320x).



**Abb. 25:** Murine Adipozyten (Paraffinschnitte, Filter, Vergr. 128x).

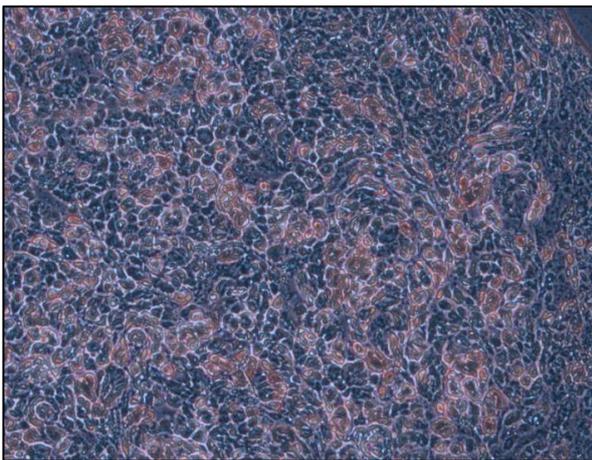


**Abb. 26:** Adipozytencluster (Trypanblau, Vergr. 6x) Die Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Adipozyten ist in einem Adipozytencluster nicht möglich. Die Methode ist nur für Einzelzellsuspension anwendbar.

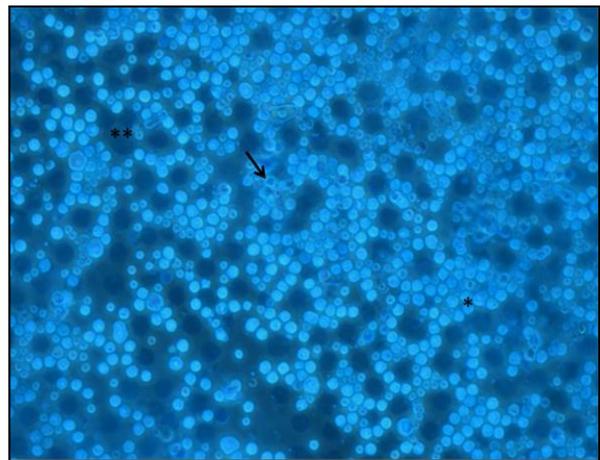
Die Färbung mit Trypanblau wird zur Beurteilung der Einzelzellsuspensionen angewandt und wurde in unseren Versuchen nur experimentell für die Adipozytencluster verwendet. Es konnte beobachtet werden, dass nur vereinzelte Zellen, die überwiegend am Rand des Clusters platziert waren, durch eine Blaufärbung imponierten. Eine Unterscheidung zwischen den vitalen und den avitalen Zellen war jedoch in einem Adipozytencluster nicht möglich.

### 3.2 Histologie der Präadipozyten

Nach der Fettgewebeisolierung konnten mikroskopisch mesenchymale Vorläuferzellen mit den Präadipozyten beobachtet werden. Durch den Verzicht auf die Lyseverfahren konnten in den Proben auch viele Erythrozyten nachgewiesen werden.



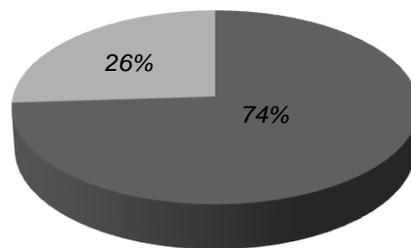
**Abb. 27:** Mesenchymale Vorläuferzellen mit Erythrozyten (nativ, Filter, Vergr. 25x).



**Abb. 28:** Mesenchymale Vorläuferzelle (nativ mit Trypanblau, Vergr. 60x), \* vitale Vorläuferzellen, \*\* avitale Vorläuferzellen, ↗ Erythrozyten.

Nach der Färbung des Vorläuferzellgemisches mit Trypanblau konnten die avitalen von den vitalen Zellen abgegrenzt werden. Die Trypanblaufärbung ergab einen Anteil von 74% vitalen Zellen.

■ vitale Vorläuferzellen ■ avitale Vorläuferzellen



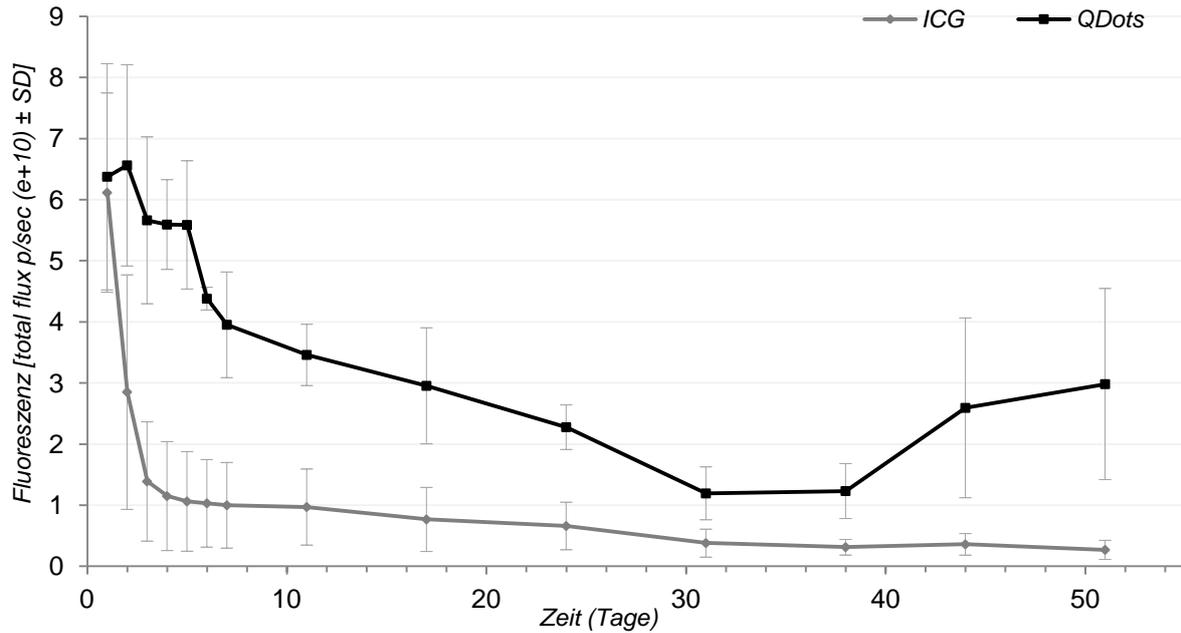
**Abb. 29:** Relative Relation zwischen den vitalen und den avitalen mesenchymalen Vorläuferzellengemischen nach der Fettgewebeisolation mithilfe der Collagenase. Nach der Färbung der Vorläuferzellen mit Trypanblau konnten die vitalen Zellen gut von den avitalen abgegrenzt werden.

### 3.3 Testung der Tracereigenschaften

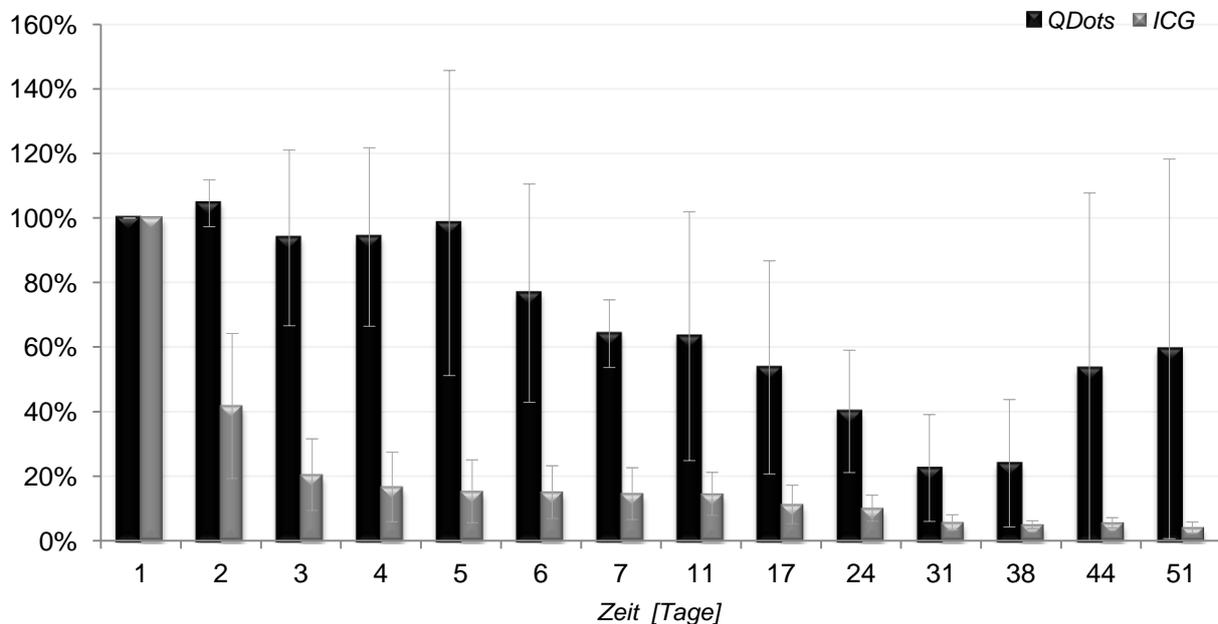
#### 3.3.1 Testung der Tracerstabilität *in vivo*: QDots versus Indocyaningrün

In einer Beobachtungszeit von 51 Tagen war sowohl für die QDots 790 (n=3) als auch für das Indocyaningrün (n=3) durchgehend ein Fluoreszenzsignal detektierbar. Indocyaningrün zeigte eine kontinuierliche starke Signalabnahme: Vom  $6,115 \times 10^{10} \pm 1,63$  p/sec (100%: Mittelwert am Tag 1) bis auf  $0,269 \times 10^{10} \pm 0,15$  p/sec (4% des Initialsignals: Mittelwert am Tag 51).

Das Signal der QDots 790 nahm von  $6,376 \times 10^{10} \pm 1,85$  p/sec (100%: Mittelwert am Tag 1) bis auf  $1,193 \times 10^{10} \pm 0,43$  p/sec (23% des Initialsignals) am Tag 31 ab. Nach dem 31. Tag wurde in der QDots-Gruppe eine Signalzunahme bis auf  $2,98 \times 10^{10} \pm 1,56$  p/sec detektiert, welche eine große Standardabweichung aufweist und somit Rückschlüsse auf die Fehlmessung erlaubt.



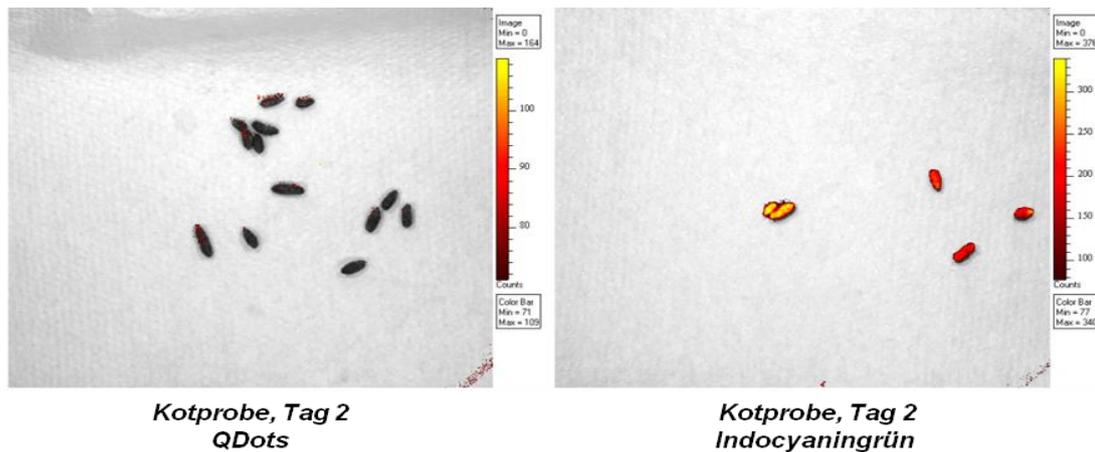
**Abb. 30:** Absolutes Fluoreszenzsignal in total flux [p/sec] *in vivo*: QDots 790 (schwarz, n=3) versus Indocyaningrün (grau, n=3). Beide Tracer zeigen eine kontinuierliche Fluoreszenzsignalabnahme bis Tag 31.



**Abb. 31:** Relativer Verlauf *in vivo*: QDots 790 (schwarz) versus Indocyaningrün (grau). Werte ermittelte am Tag 1 wurden als 100% festgelegt. Am 51. Tag konnte 59% des Initialsignals der QDots und 4% des Initialsignals des Indocyaningrün nachgewiesen werden.

### 3.3.1.1 Enterale Ausscheidungen

In der Gruppe mit Indocyaningrüninjektionen konnte eine enterale (biliäre) Ausscheidung des Tracers (Abb. 32) beobachtet werden. Für die subkutan injizierten QDots 790 konnte weder eine renale noch eine biliär Ausscheidung nachgewiesen werden. Eine Quantifizierung der Ausscheidung war nicht möglich.



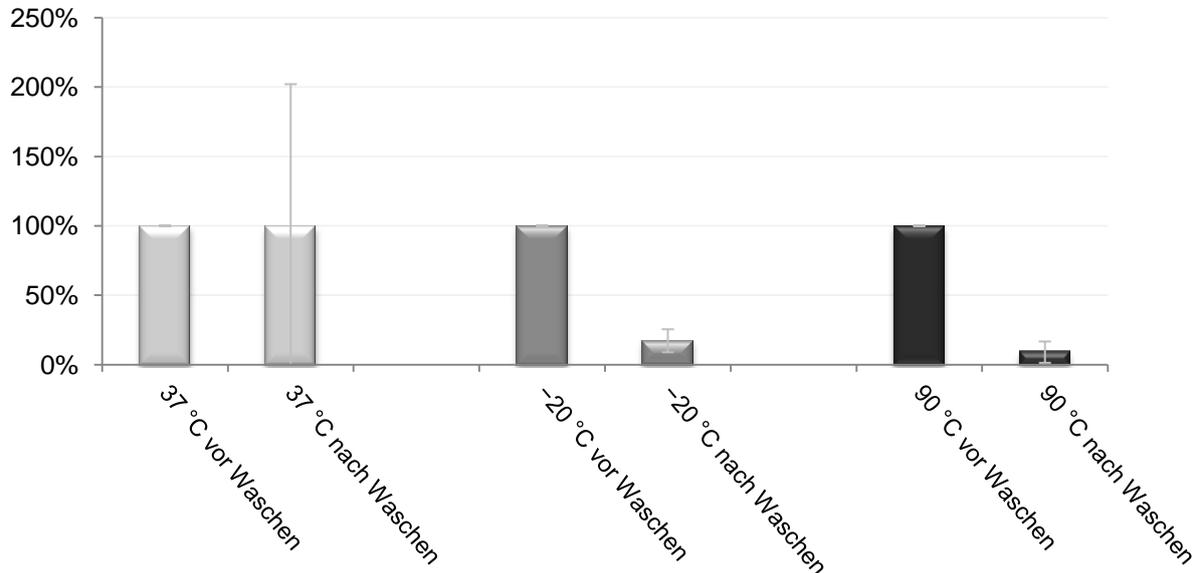
**Abb. 32:** Tracernachweis in Kotproben am 2. Tag, links: QDots 790; rechts: Indocyaningrün. Bei den subkutanen Injektionen der QDots konnte weder eine renale noch eine biliär Ausscheidung beobachtet werden.

### 3.3.2 Indirekter Adhäsionstest für QDots

Der indirekte Adhäsionstest zeigte, dass das Fluoreszenzsignal in der Gruppe der vitalen, bei 37 °C inkubierten Adipozytencluster (n=4) mit  $4,61 \times 10^9 \pm 2,47$  p/sec den höchsten Absolutwert aufweist. Das Fluoreszenzsignal bei den thermisch avitalisierten (in 90 °C inkubierten) Adipozytencluster (n=4) betrug  $2,48 \times 10^9 \pm 2,09$  p/sec. In der Gruppe der bei -20 °C aufbewahrten danach aufgetauten und mit QDots inkubierten Adipozytencluster (n=4) konnte ein Signal von  $2,5 \times 10^9 \pm 1,16$  p/sec detektiert werden. Zwischen den drei Gruppen (vitalen, avitalisierten und kühl aufbewahrten Adipozytencluster) konnten keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,368$  Kruskal-Wallis-Test) festgestellt werden.

Das Initialsignal am 1. Tag wurde auf 100% festgelegt. Nach der Waschprozedur betrug das Fluoreszenzsignal in der Gruppe der vitalen bei 37 °C inkubierten Adipozytencluster fast 100% des Initialsignals. Die, in -20 °C aufbewahrten Adipozytencluster verloren 83% und die bei 90 °C avitalisierten Adipozytencluster

91% des Fluoreszenzsignals durch die Waschprozedur (Abb. 33). Mit der Waschprozedur wurden nicht ortsständig gebundene oder nicht intrazellulär aufgenommene QDots entfernt.



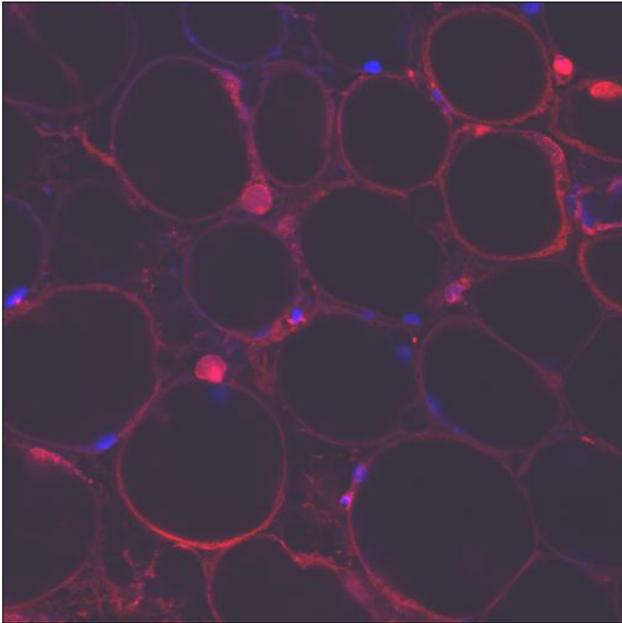
**Abb. 33:** Relative Darstellung der Signalstabilität der mit QDots 790 inkubierten vitalen (n=4), bei -20 °C aufbewahrten (n=4) und den avitalisierten (n=4) Adipozytencluster vor (links) und nach (rechts) dem Waschprozedere *in vitro*. Als 100% wurden jeweils die am Tag 1 ermittelten Werte festgelegt. Die bei 37 °C inkubierten Adipozytencluster zeigten kaum einen Signalverlust.

Der geringe Signalverlust durch die Waschprozedur in der Gruppe der vitalen bei 37 °C inkubierten Adipozytencluster impliziert indirekt eine intrazelluläre QDots Verteilung. Um direkt die Adhäsion der QDots zu überprüfen wurde eine Lasermikroskopie durchgeführt (s. 3.4).

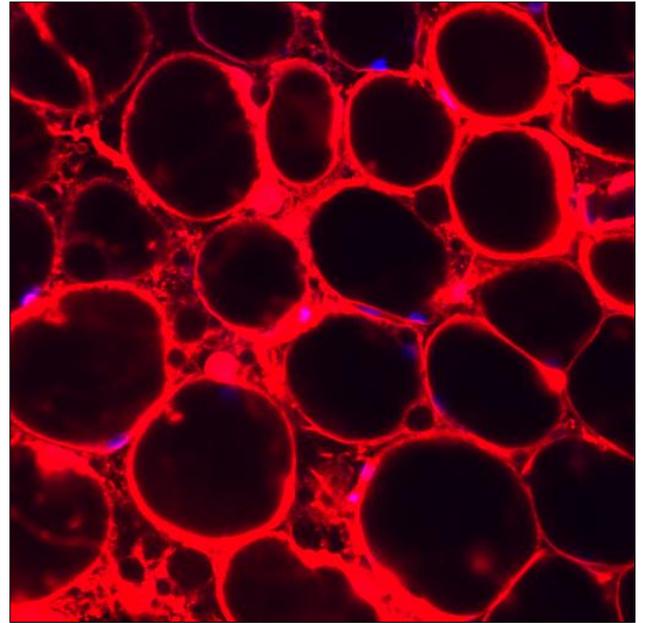
### 3.4 Lasermikroskopie

Mithilfe der Lesermikroskopie konnte mit 2D- und 3D- (Field of view: x=318.2 µm; y=318.2 µm; z=23.4 µm) Darstellung der intrazellulären Lokalisation der QDots in Adipozytencluster nachgewiesen werden. QDots lagern sich an die Basallamina, in der extrazellulären Matrix und im Zytoplasma der Adipozyten an (Abb. 34-37) und zeigen eine Affinität sowohl zur Vakuol- als auch Zellmembran. In der Fettvakuole konnten keine QDots beobachtet werden.

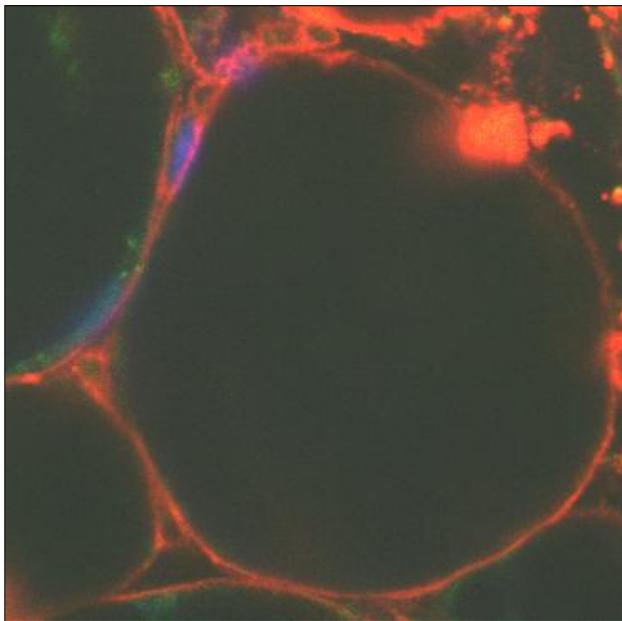
Mit der DAPI-Färbung konnten unter einer Anregung mit einer Wellenlänge von 364 nm und mit einem bandpass-Filter zwischen 385 nm und 470 nm, die Zellkerne, die blau imponieren, dargestellt werden (Abb. 35-38).



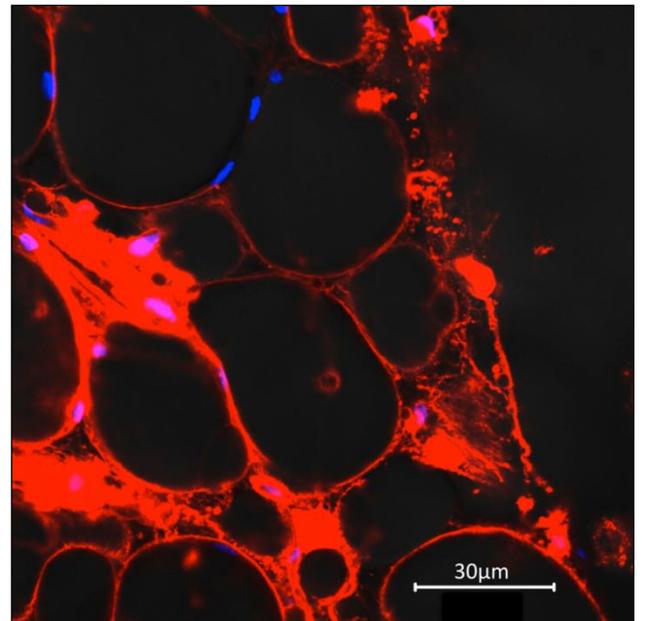
**Abb. 34:** Lasermikroskopische Darstellung der mit QDots 675 inkubierten Adipozytencluster (Anregung bei 673 nm). Die Zellkerne wurden mit DAPI-Färbung gekennzeichnet (blau).



**Abb. 35:** In der lasermikroskopischen Beurteilung kann man unter Anregung bei 637 nm eine Anreicherung der QDots 675 im Zytoplasma und in der extrazellulären Matrix erkennen.

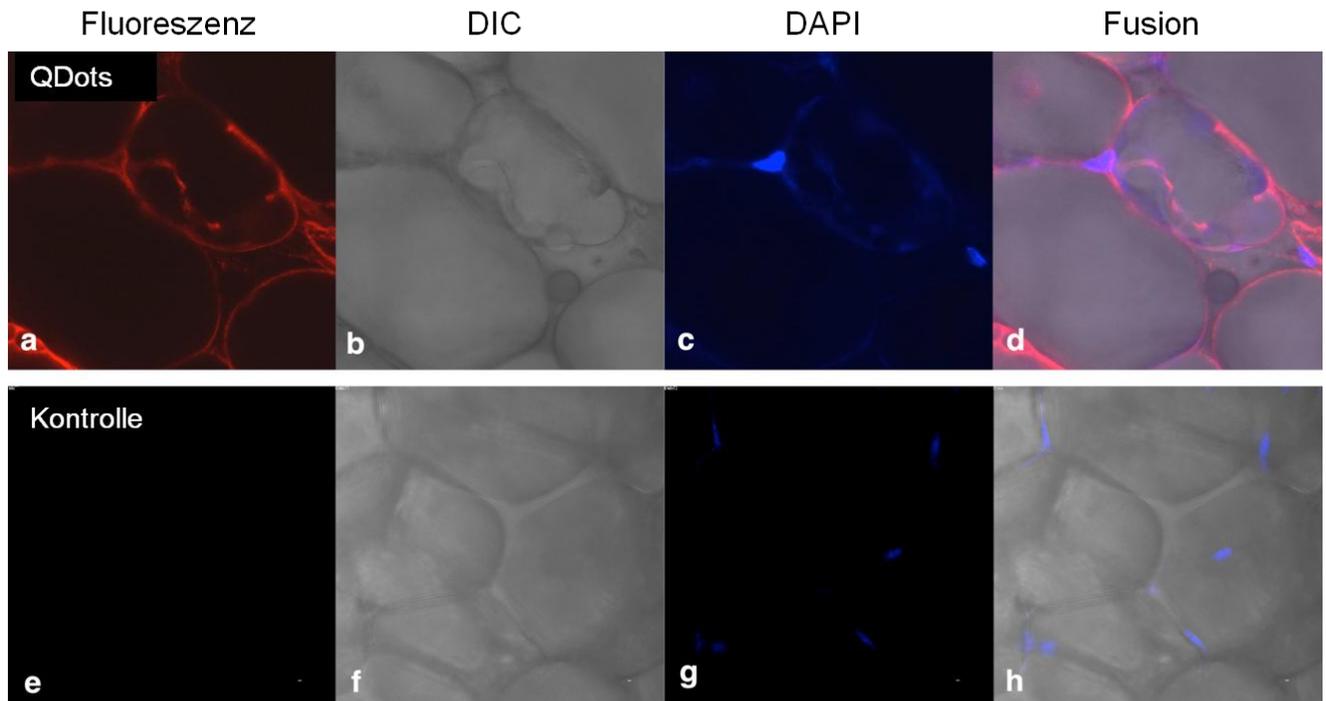


**Abb. 36:** Lasermikroskopische Darstellung des einzelnen mit QDots 675 inkubierten Adipozyten (Anregung bei 637 nm). Blau: Zellkernfärbung mit DAPI.



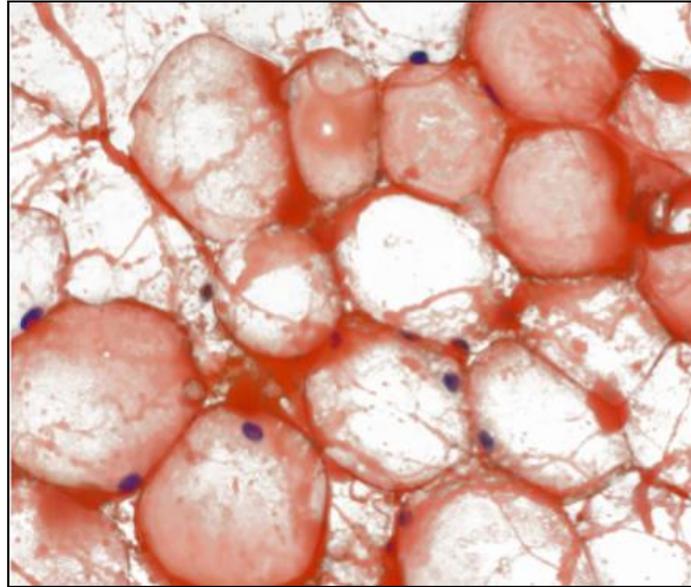
**Abb. 37:** Anreicherung der QDots 675 in der extrazellulären Matrix. Blau: Zellkernfärbung mit DAPI.

Im direkten Vergleich (Abb. 38) zwischen Adipozytencluster mit und ohne QDots (Kontrollgruppe) konnte, bei unveränderten Lasermikroskopeinstellungen, eine Eigenfluoreszenz der Adipozyten ausgeschlossen werden (keine Fluoreszenz bei den Adipozytencluster ohne QDots).



**Abb. 38:** Lasermikroskopische Adipozytendarstellung mit QDots 675 (a-d) und Kontrolle ohne QDots (e-h), 2D, Field of view: 112,5  $\mu\text{m}$  x 112,5  $\mu\text{m}$ , Fluoreszenz in rot: LP 650 nm, Anregung 633 nm, DIC.

1. Fluoreszenz: Adipozytencluster mit QDots 675 (a) und ohne QDots (e)
2. DIC: Kontrastunterschiede der Adipozytencluster nativ (b, f)
3. DAPI: Adipozytencluster mit DAPI-Zellkernfärbung (blau), BP 385-470 nm, Anregung mit 364 nm (c) und Kontrolle: Adipozytencluster mit DAPI-Zellkernfärbung (blau) ohne QDots (g)
4. Fusion: Fusion von a-c (d) und e-g (h)



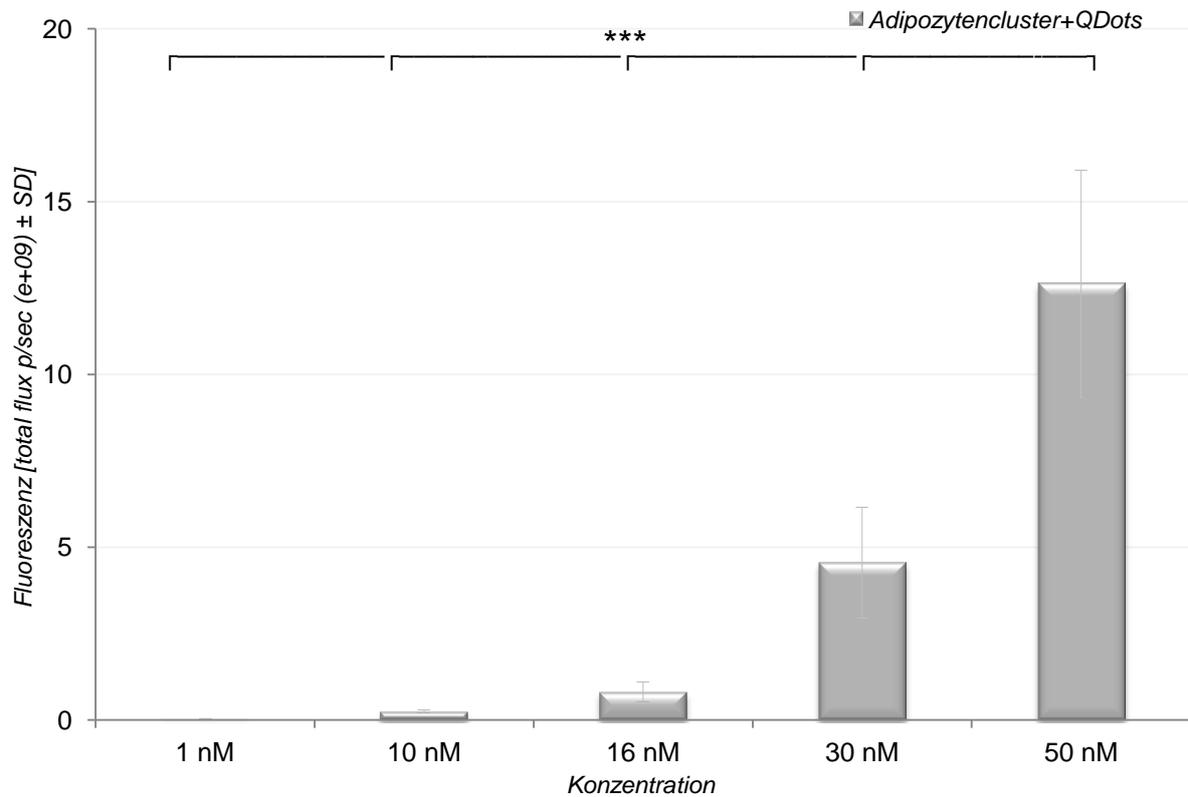
**Abb. 39:** 3D-Rekonstruktion des mit QDots 675 inkubierten Adipozytenclusters. Die QDots sind intrazellulär und extrazellulär eingelagert (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert. Field of view: x=318.2  $\mu\text{m}$ ; y=318.2  $\mu\text{m}$ ; z=23.4  $\mu\text{m}$ . ZEN 2009 LE Software.

### **3.5 *In vitro* Parameterbestimmungen für Inkubationen der Adipozytencluster mit QDots**

#### **3.5.1 Inkubationskonzentration: Parameterbestimmung**

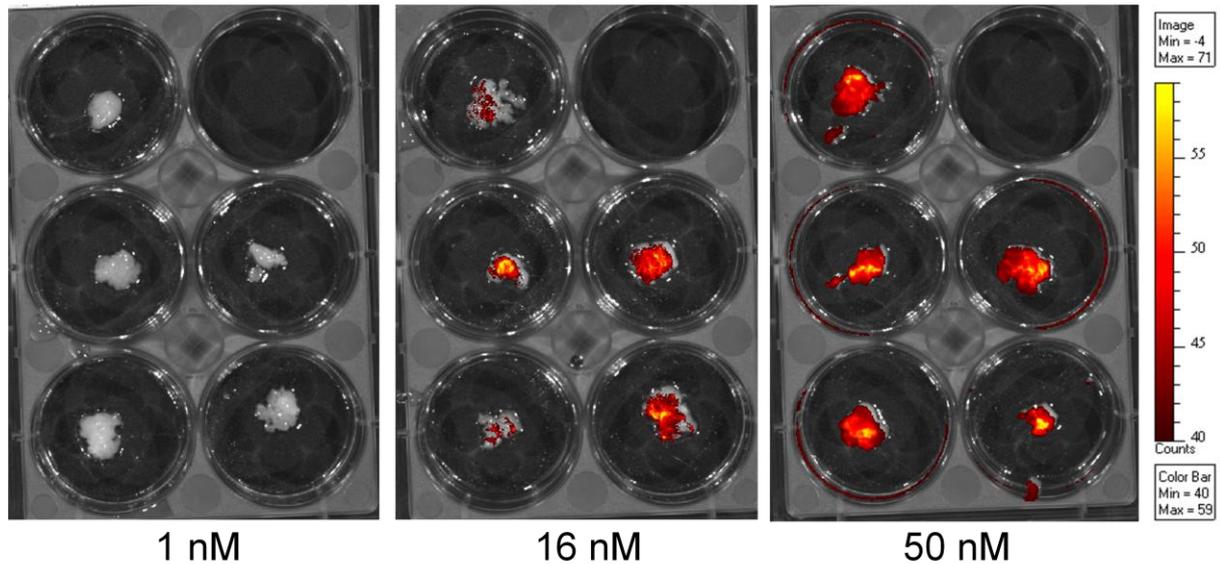
Als eine Inkubationskonzentration wurde die niedrigste in NaCl 0,9% gelöste QDots-Konzentration ausgewählt, bei der eine gute Fluoreszenzsignaldetektion erreicht wurde.

Die Signalstärke [in p/sec] steigt proportional zur QDots-Konzentration an und betrug bei 1 nM der QDots 770:  $0,0342 \times 10^9 \pm 0,007$ ; bei 10 nM:  $0,255 \times 10^9 \pm 0,0382$ ; bei 16 nM:  $0,817 \times 10^9 \pm 0,281$ ; bei 30 nM:  $4,554 \times 10^9 \pm 1,604$  und bei 50 nM:  $12,617 \times 10^9 \pm 3,294$ . Die Unterschiede in der Fluoreszenzsignalstärke sind hoch signifikant [ $p < 0,001$  Kruskal-Wallis-Test].



**Abb. 40:** Fluoreszenzsignal der QDots 770 *in vitro* in unterschiedlicher Konzentration. Nach einer Stunde Inkubation der Adipozytencluster bei 37 °C mit 1 ml QDots 770 in unterschiedlichen Konzentrationen (in nM: 1, 10, 16, 30 und 50) konnten signifikante Unterschiede [ $p < 0,001$  Kruskal-Wallis-Test] in der Fluoreszenzsignalstärke beobachtet werden.

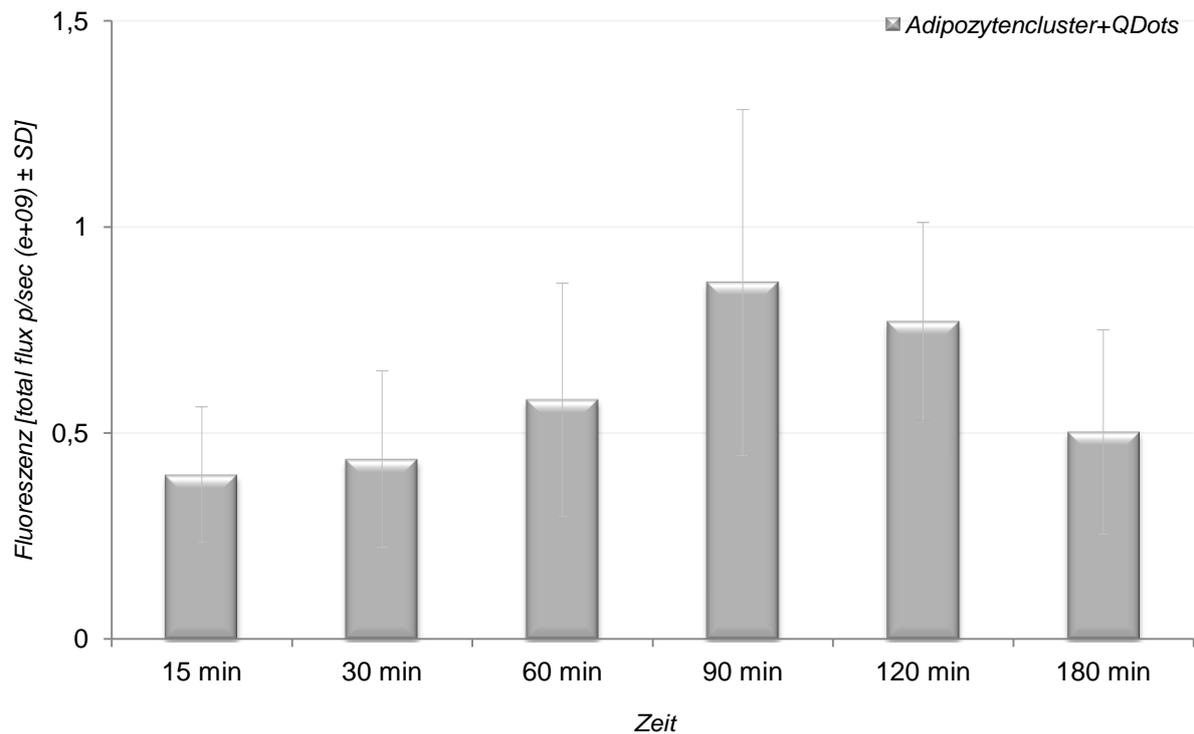
In den Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass die notwendige QDots-Inkubationskonzentration von der Art der QDots abhängig ist. Zur Vermeidung eventueller toxischer Wirkung wurde eine möglichst niedrige Dosierung für *in vivo* Versuche gewählt.



**Abb. 41:** Fluoreszenzdetektion der mit QDots 770 inkubierten Adipozytencluster *in vitro* in unterschiedlicher Konzentration (in nM: 1, 16 und 50) mittels IVIS® Lumina Imaging System. Die Fluoreszenzsignalstärke steigt proportional zur Konzentration der QDots an.

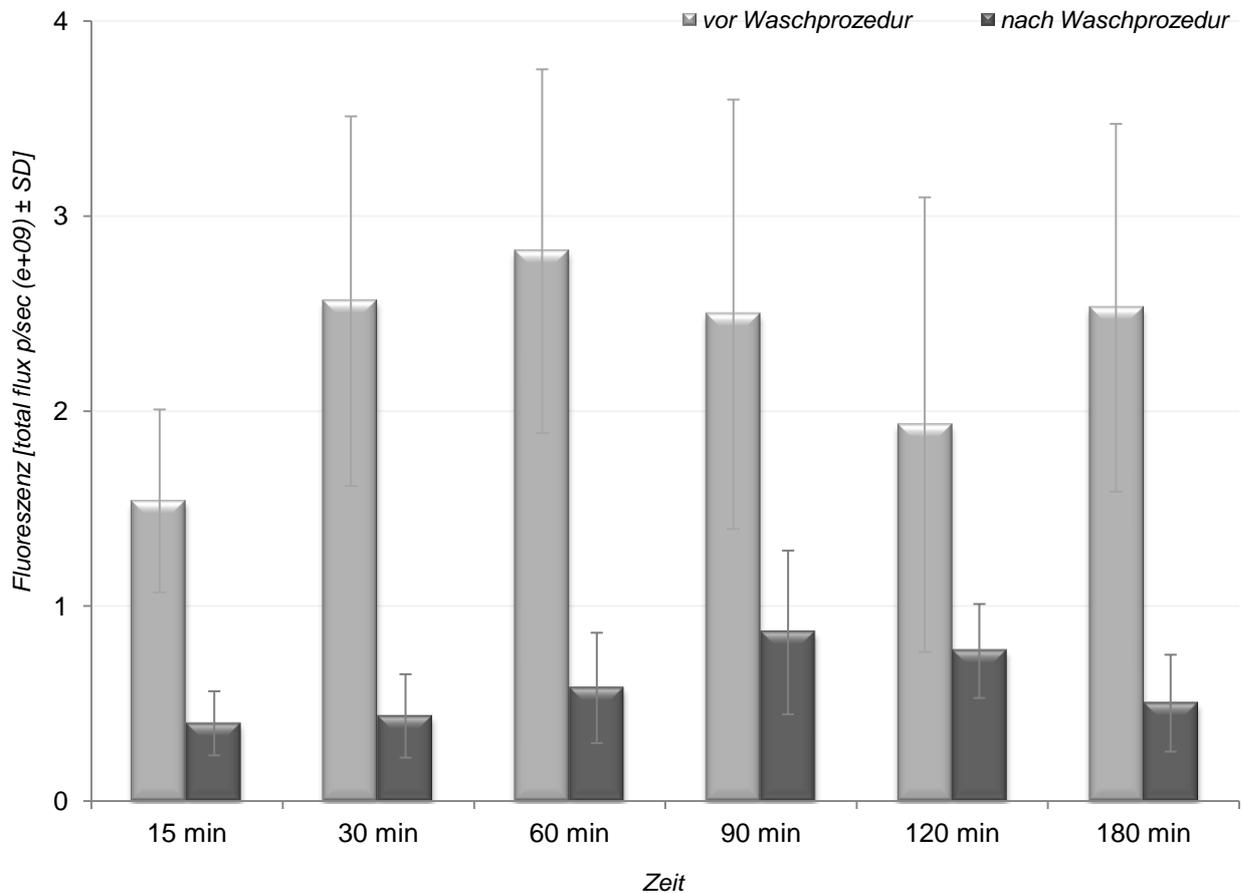
### 3.5.2 Inkubationszeit: Parameterbestimmung

Die beste Detektion des Fluoreszenzsignals wurde zwischen 60 ( $0,58 \times 10^9 \pm 0,28$  p/sec) und 120 min ( $0,77 \times 10^9 \pm 0,24$  p/sec) nach Beginn der Inkubation festgestellt. Die maximale Fluoreszenzstärke der Adipozytencluster mit QDots 770 wurde nach 90 Min erreicht und betrug  $0,87 \times 10^9 \pm 0,42$  p/sec.



**Abb. 42:** Fluoreszenzsignal der mit QDots 770 inkubierten Adipozytencluster *in vitro* in der Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (in min: 15, 30, 60, 90, 120 und 180). Die beste Detektion des Signals war zwischen 60 und 120 min möglich. Die Ergebnisse waren nicht signifikant unterschiedlich [ $p = 0,169$  Kruskal-Wallis-Test].

Die beste Signalstabilität, d.h. der geringste Signalverlust durch die zweifache Waschprozedur, wurde im Bereich zwischen 90 ( $0,87 \times 10^9 \pm 0,41$  p/sec) und 120 min ( $0,77 \times 10^9 \pm 0,24$  p/sec) festgestellt. Bei einer Inkubation über 120 min nahm die Signalstabilität wieder ab (Abb. 42, 43).

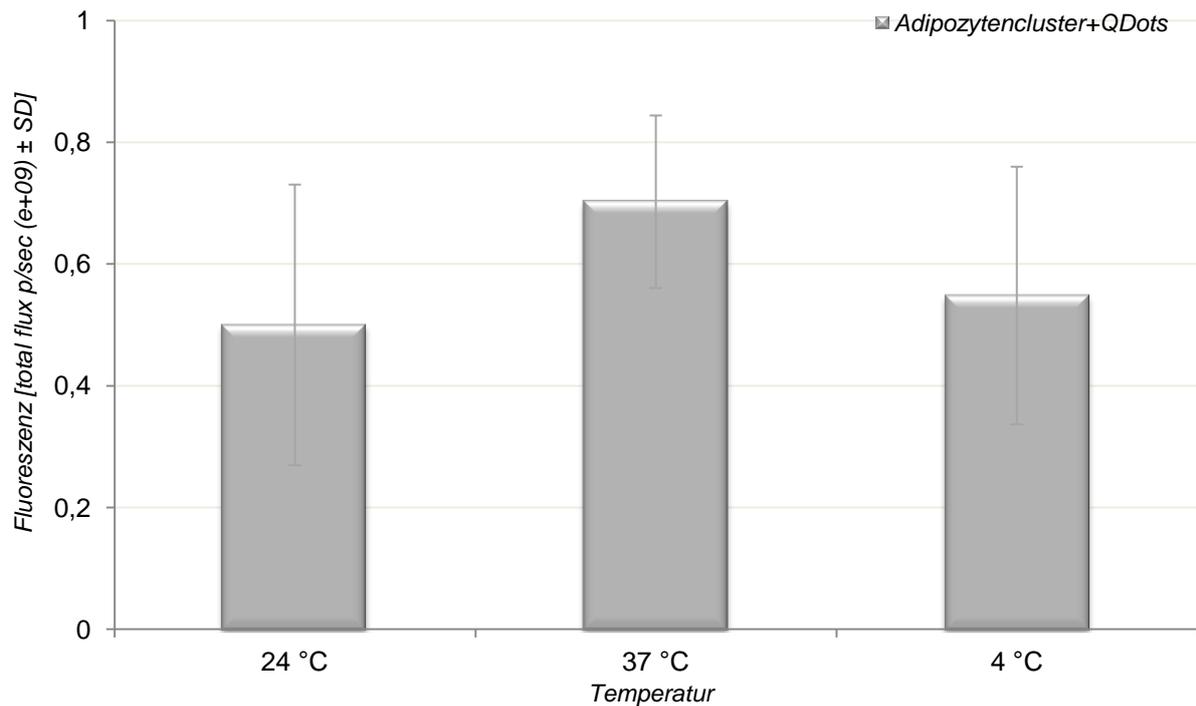


**Abb. 43:** Fluoreszenzsignal der mit QDots 770 inkubierten Adipozytencluster *in vitro* mit unterschiedlicher Inkubationsdauer vor (hellgrau) und nach (dunkelgrau) dem Waschprozedere.

Der Unterschied in der Signalstärke nach der Waschprozedur zwischen den unterschiedlich lang inkubierten Gruppen erwies sich als nicht signifikant [ $p = 0,169$  Kruskal-Wallis-Test]. Im Bezug auf die potentielle Belastung der Adipozytencluster durch die lange Aufbewahrung *ex vivo* und die potentielle Zelltoxizität der QDots wurde für die Inkubationen der Bereich zwischen 60 und 120 min gewählt.

### 3.5.3 Inkubationstemperatur: Parameterbestimmung

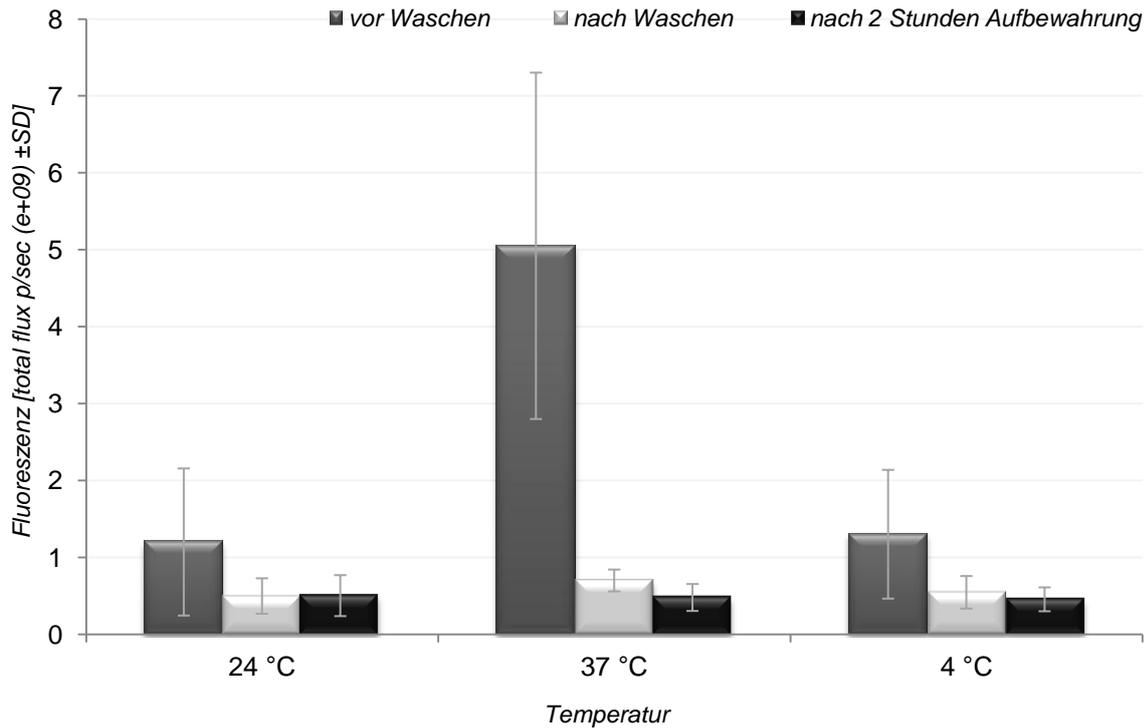
Es zeigten sich keine signifikanten [ $p = 0,395$  Kruskal-Wallis-Test] Unterschiede in der Signalstärke zwischen den unterschiedlichen Inkubationstemperaturen (je  $n=5$ ): 24 °C (RT), 37 °C und 4 °C.



**Abb. 44:** Absolute Darstellung des Fluoreszenzsignals von mit QDots 770 inkubierten Adipozytencluster *in vitro* bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen: RT/24 °C (n=5), 37 °C (n=5) und 4 °C (n=5). Die Differenzen waren nicht signifikant unterschiedlich [p = 0,395 Kruskal-Wallis-Test].

Trotz des stärksten Signalverlustes durch die Waschprozedur, wiesen die bei 37 °C inkubierten Adipozytencluster mit  $0,70 \times 10^9 \pm 0,14$  p/sec den höchsten Absolutwert auf.

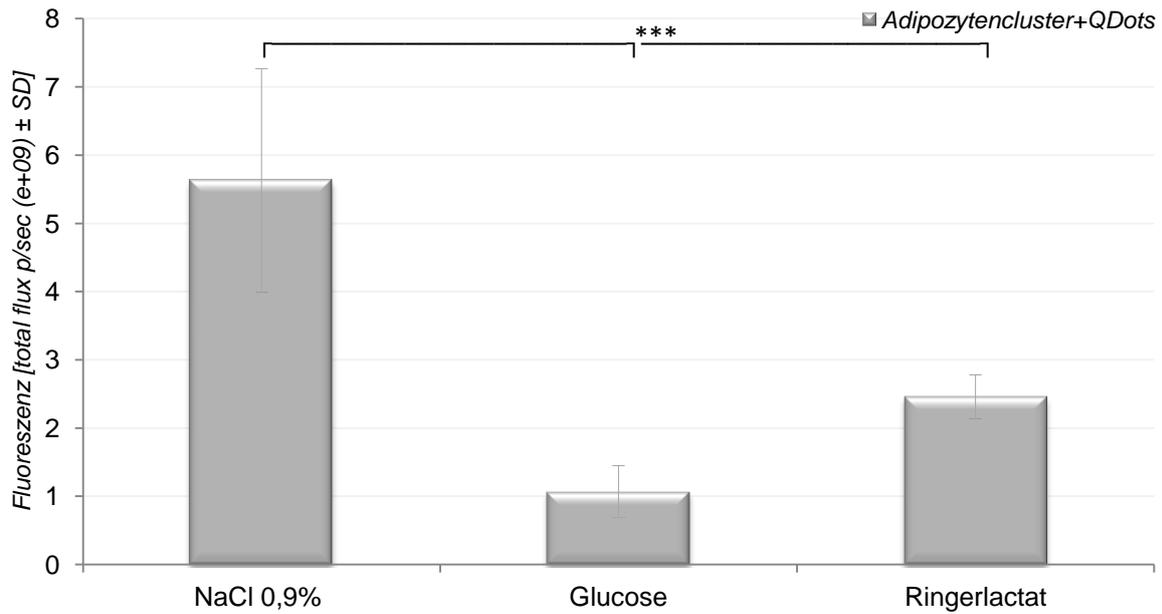
Nach 2 Stunden Aufbewahrung der mit QDots inkubierten Adipozytencluster konnte keine Fluoreszenzsignalabnahme bei Raumtemperatur beobachtet werden, bei 37 °C und 4 °C konnte eine leichte Signalreduktion festgestellt werden (Abb. 45).



**Abb. 45:** Absolute Darstellung des Fluoreszenzsignals von mit QDots 770 inkubierten Adipozytencluster *in vitro* bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen: RT/24 °C (n=5), 37 °C (n=5) und 4 °C (n=5) vor dem Waschen (dunkelgrau), nach dem Waschen (hellgrau) und nach 2 Stunden Aufbewahrung (schwarz).

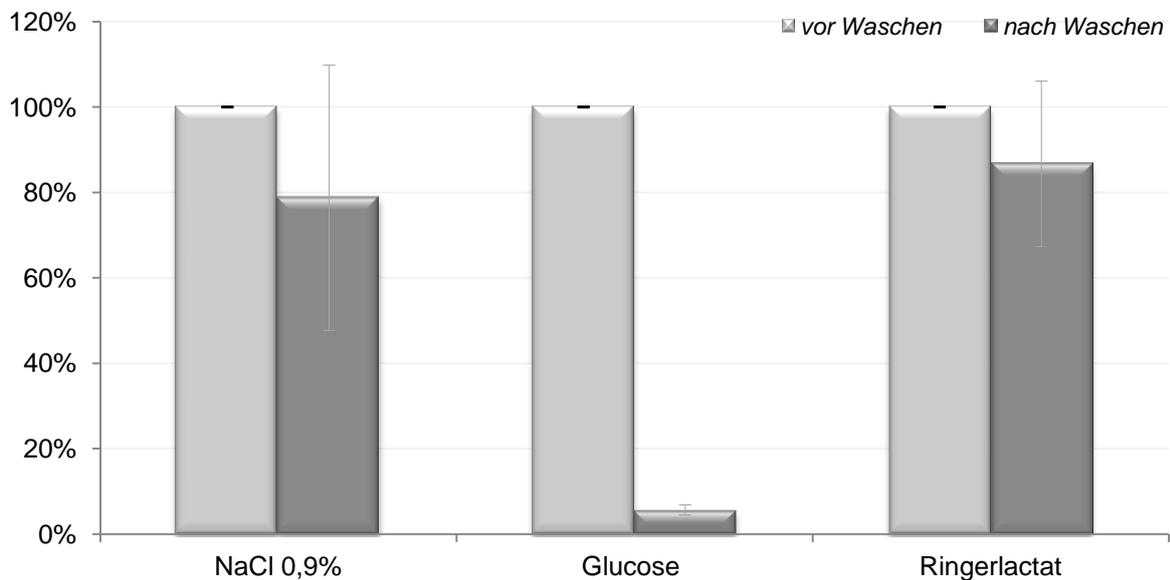
### 3.5.4 Inkubationsmedium: Parameterbestimmung

Die Inkubationsmedien zeigten nach der Waschprozedur einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Fluoreszenzstärke [ $p = 0,027$  Kruskal-Wallis-Test]. Es konnte gezeigt werden, dass NaCl 0,9% mit einem absoluten Mittelwert von  $5,63 \times 10^9 \pm 1,64$  p/sec am besten für die QDots-Inkubation geeignet ist (Abb. 46).



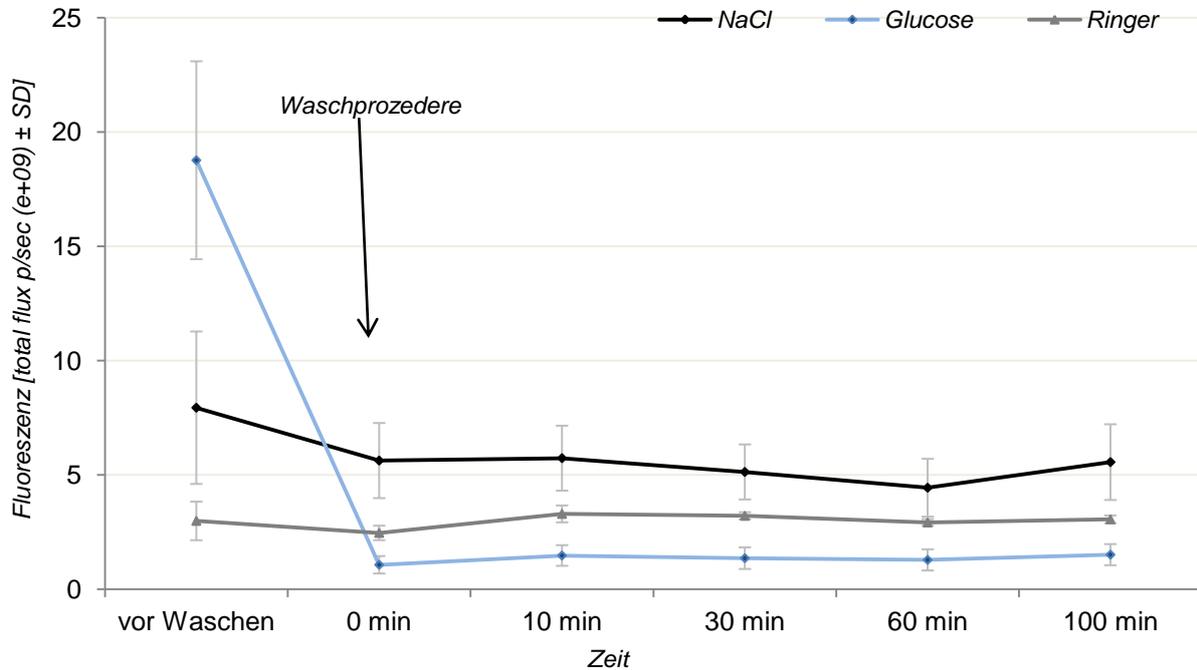
**Abb. 46:** Darstellung des Fluoreszenzsignals der mit QDots 790 inkubierten Adipozytencluster *in vitro* in unterschiedlichen Medien. Die Unterschiede waren signifikant [ $p < 0,05$  Kruskal-Wallis-Test].

Durch die zweifache Waschprozedur nimmt die Signalstärke in allen Medien ab: In NaCl 0,9% um 21%, in der Glucose um 94% und in der Ringerlösung um 13%.



**Abb. 47:** Relative Darstellung der Signalstabilität der mit QDots 790 inkubierten Adipozytencluster *in vitro* in unterschiedlichen Medien (je  $n=3$ ) vor (hellgrau) und nach (dunkelgrau) dem Waschprozedere. In der Glucose 5% zeigte sich eine starke Signalabnahme (um 94%) nach dem Waschprozedere. Als 100% wurden am Tag 1 ermittelte Werte festgelegt.

Nach der zweifachen Waschprozedur bleibt das Signal in den drei Medien stabil. Es konnte eine fast unveränderte Signalstärke in den ersten 100 min nach der Waschprozedur detektiert werden.



**Abb. 48:** Signalstabilität der mit QDots 790 inkubierten Adipozytencluster *in vitro* in unterschiedlichen Medien (je n=3) im zeitlichen Verlauf. Nach dem Waschprozedere wurde die Signalstärke regelmäßig über 100 min detektiert. In allen Medien blieb das Fluoreszenzsignal konstant stabil.

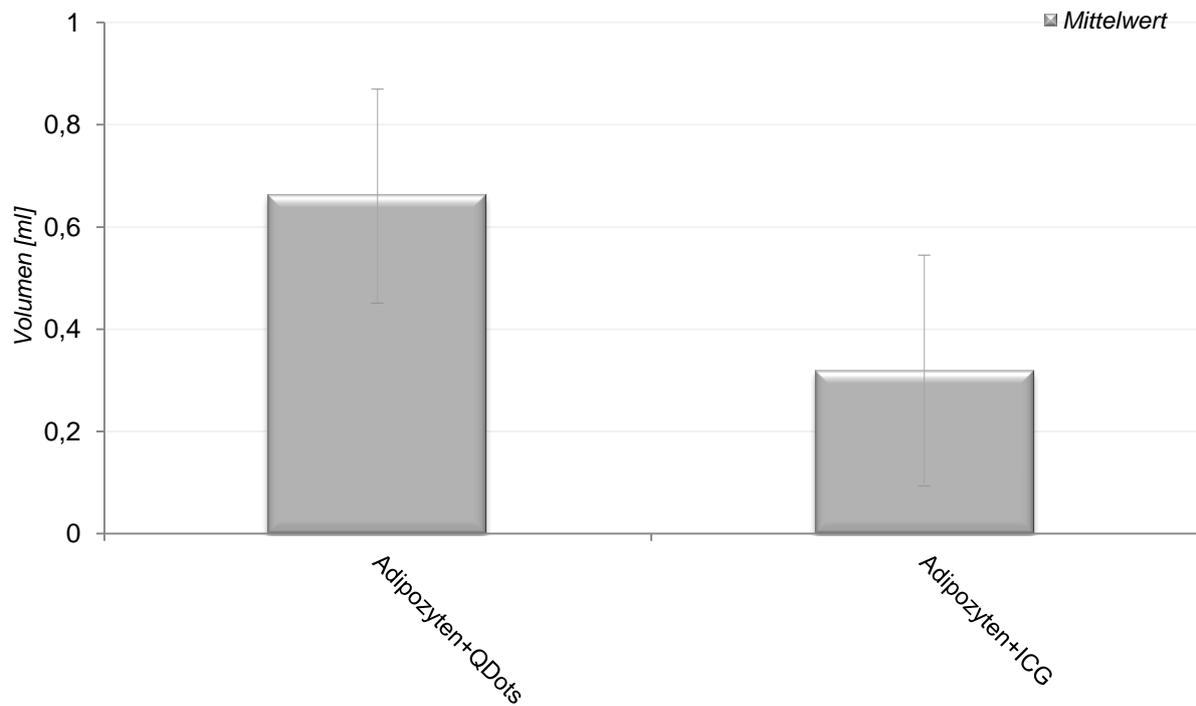
### 3.6 *In vivo* Versuche

#### 3.6.1. Volumenbestimmung

##### 3.6.1.1 Transplantation von vitalen Adipozytencluster

Nach 51 Tagen konnten bei den vitalen Adipozytenclustertransplantaten *in vivo* kaum quantitative Unterschiede im Transplantatvolumen zwischen der Gruppe der Adipozytencluster mit QDots 790 und der Gruppe mit Indocyaningrün festgestellt werden. In beiden Gruppen konnte makroskopisch eine Organisation der transplantierten Adipozytencluster zu einer einheitlichen, klar abgrenzbaren, subkutan frei verschiebbaren Struktur beobachtet werden. Alle Adipozytenclustertransplantate zeigten eine Volumenabnahme. Der Volumenunterschied zwischen den beiden Gruppen erwies sich als nicht signifikant [ $p=0,99$  Kolmogorov-Smirnov-Test]: Von den transplantierten 1ml Adipozytenclustern

(mit minimalen NaCl-Resten) konnte nach 51 Tagen ein mittleres Volumen von 0,66 ml bei Adipozytenclustern mit QDots 790 und 0,32 ml bei Adipozytenclustern mit Indocyaningrün gemessen werden. In der Gruppe der Adipozytencluster mit Indocyaningrün, konnte ein Transplantat nach 30 Tagen *in vivo* nicht mehr geortet werden.



**Abb. 49:** Volumen der Adipozytenclustertransplantate mit QDots 790 (n=3) versus Adipozytenclustertransplantate mit Indocyaningrün (n=3) am 51. Tag post transplantationem. Der Volumenunterschied war nicht signifikant [ $p=0,99$  Kolmogorov-Smirnov-Test].



**Abb. 50:** Adipozytenclustertransplantat (1ml) mit QDots 790 nach 51 Tagen post transplantationem. Eine klar abgrenzbare, frei verschiebbare Struktur konnte beobachtet werden.



**Abb. 51:** Adipozytenclustertransplantat (0,5 ml) mit QDots 675 am 12. Tag post transplantationem. Das Volumen der Adipozytenclustertransplantate wurde gemessen und mithilfe der Formel für Rotationsellipsoid berechnet:  
Volumen [ml]= Höhe x Breite x Tiefe x 0,5.



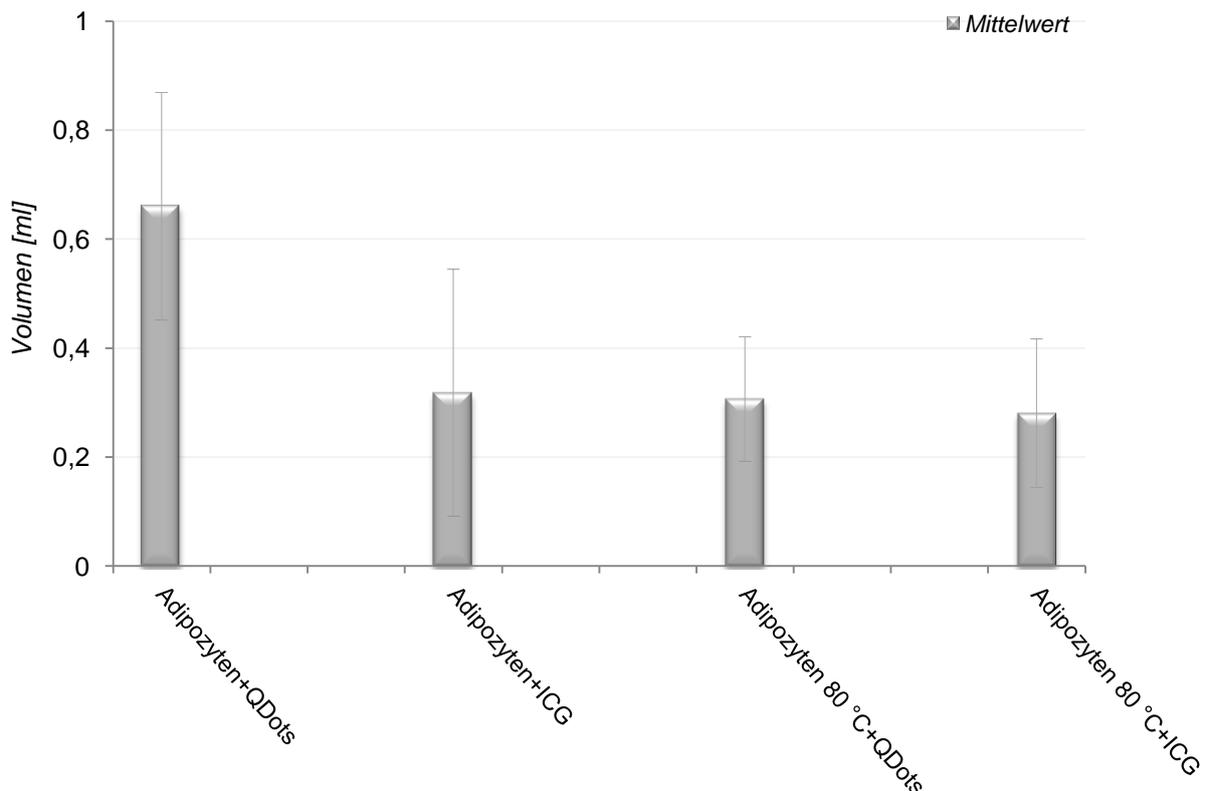
**Abb. 52:** Adipozytenclustertransplantat (0,5 ml) mit QDots 675 am 12. Tag post transplantationem.

### 3.6.1.2 Transplantation von avitalisierten Adipozytenclustern

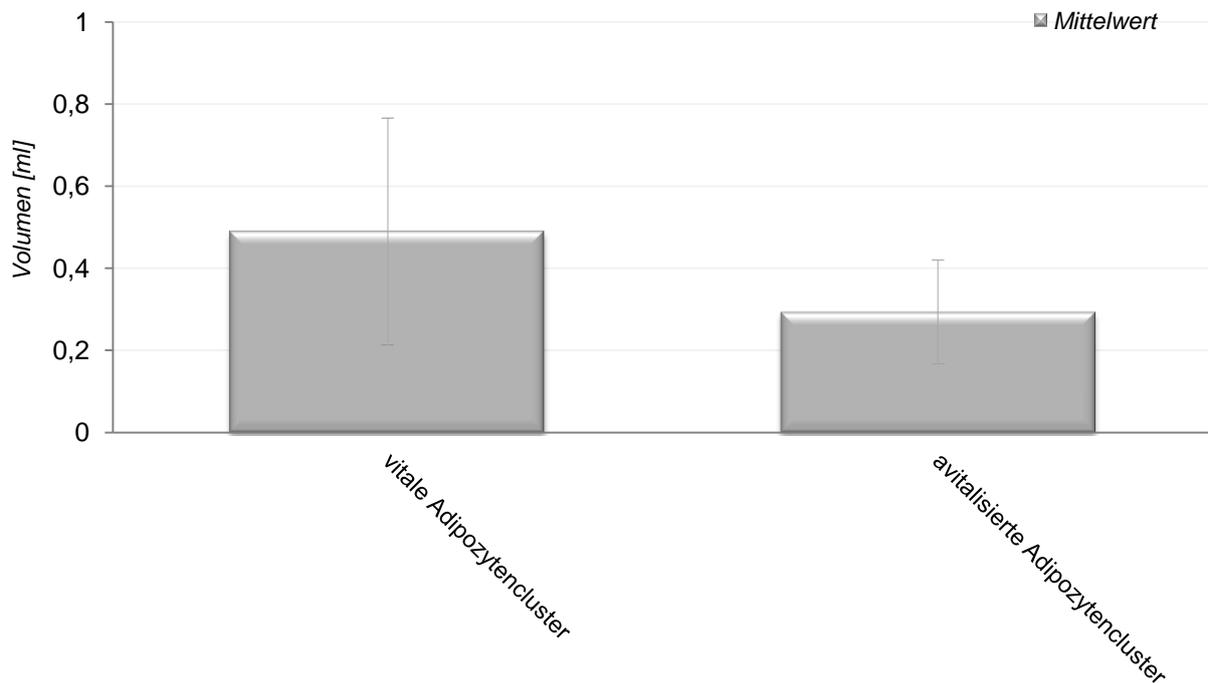
Bei den avitalisierten Adipozytenclustertransplantationen konnten *in vivo* keine signifikanten Unterschiede in der Transplantatgröße zwischen der Gruppe der Adipozytencluster mit QDots 790 und der Gruppe mit Indocyaningrün festgestellt werden (Abb. 53). So wie bei den vitalen Transplantaten, haben sich die avitalisierten Adipozytencluster in beiden Gruppen zu einer abgrenzbaren, subkutan frei verschiebbarer Struktur organisiert.

Nach der Messung zeigten alle avitalisierten Adipozytenclustertransplantate eine Volumenabnahme, die der Volumenabnahme der vitalen Adipozytenclustertransplantaten ähnelt (Abb. 53-54).

Sowohl der Volumenunterschied zwischen den beiden avitalisierten Gruppen als auch der zwischen vitalen und avitalisierten Transplantaten erwies sich als nicht signifikant [ $p = 0,39$  Kruskal-Wallis-Test].



**Abb. 53:** Volumenvergleich der vitalen und der avitalisierten Adipozytenclustertransplantaten (80 °C) mit QDots versus Indocyaningrün (je  $n=3$ ) am 51. Tag post transplantationem. Der Unterschied zwischen allen Gruppen war nicht signifikant [ $p = 0,39$  Kruskal-Wallis-Test].

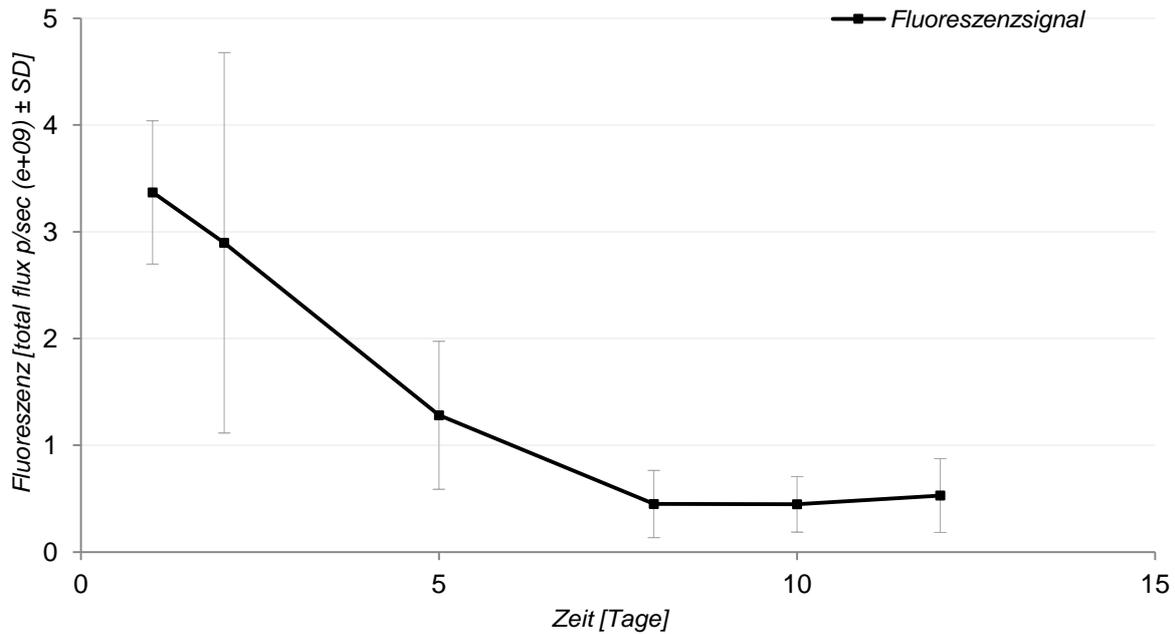


**Abb. 54:** Volumenvergleich der vitalen (n=6) und der avitalisierten (n=6) Adipozytenclustertransplantate am 51. Tag post transplantationem.

### 3.6.2 Fluoreszenzdetektion

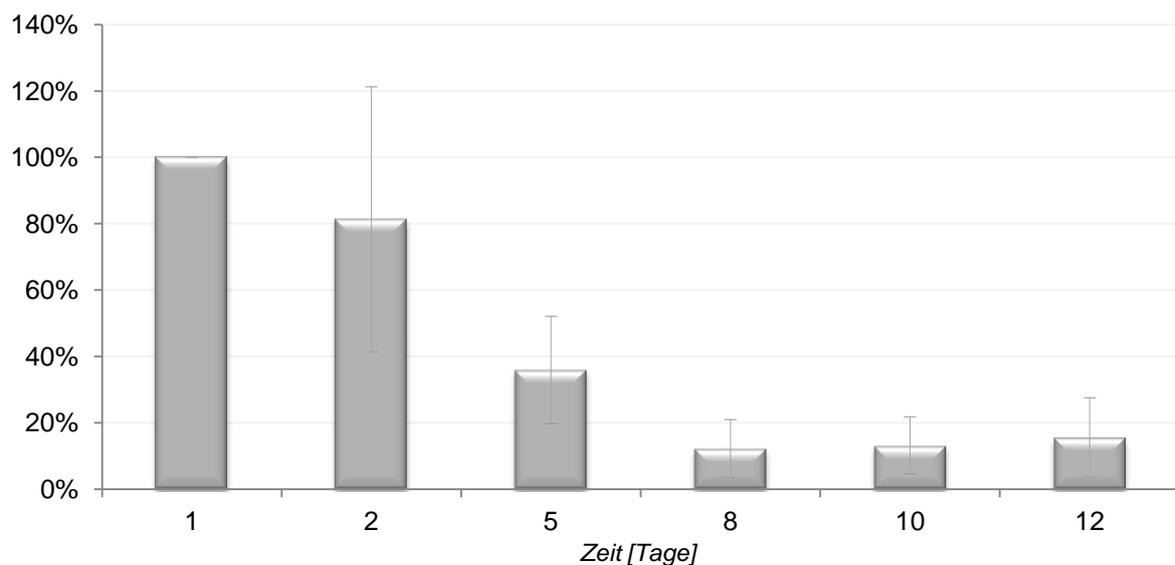
#### 3.6.2.1 Präadipozytentransplantationen

Die Präadipozytentransplantationen mit QDots 675 wurden nach der Transplantation in die Maus über 12 Tage beobachtet. Am 1. Tag konnte ein Fluoreszenzsignal von  $3,368 \times 10^9 \pm 0,67$  p/sec nachgewiesen werden.



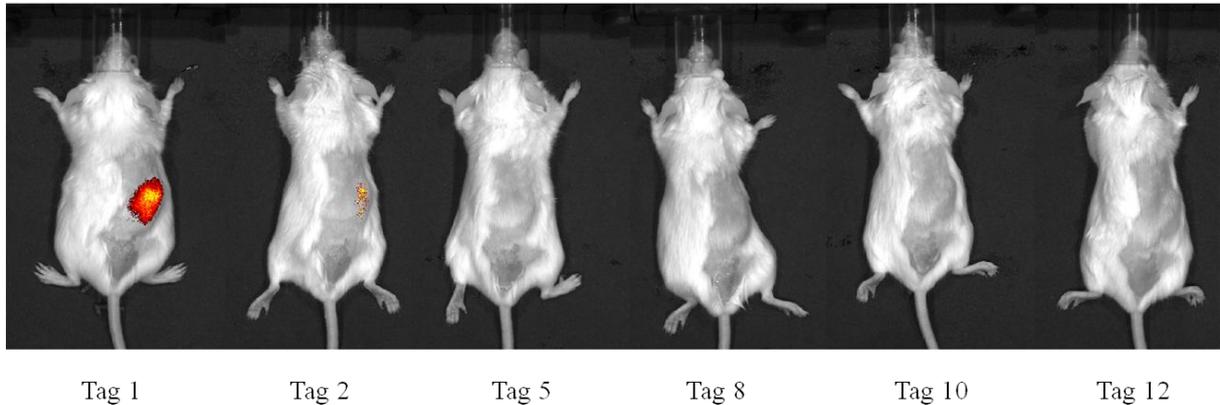
**Abb. 55:** Darstellung des Fluoreszenzsignals der mit QDots 675 inkubierten Präadipozyten im zeitlichen Verlauf nach Transplantation in die balb/c-Maus (n=5). In den ersten 8 Tagen nach der Präadipozytentransplantation konnte eine Abnahme des Fluoreszenzsignals *in vivo* beobachtet werden. Nach dem 8. Tag blieb das Fluoreszenzsignal zwar sehr schwach detektierbar, jedoch stabil.

Im Verlauf nahm die Fluoreszenzstärke kontinuierlich ab und am 12. Tag konnten 16% ( $0,53 \times 10^9 \pm 0,35$  p/sec) des Anfangssignals nachgewiesen werden (Abb. 56). Ab dem 8. Tag nach der Transplantation blieb das Fluoreszenzsignal stabil.



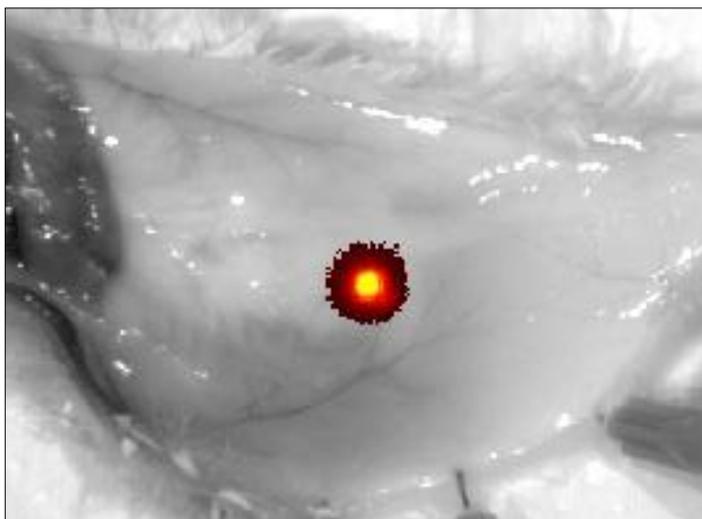
**Abb. 56:** Relative Fluoreszenzsignalabnahme der mit QDots 675 inkubierten Präadipozyten *in vivo* (n=5). Am 1. Tag ermittelte Fluoreszenzsignal wurde auf 100% gesetzt, nach 12 Tagen konnten 16% des Anfangssignals detektiert werden.

Nach dem 2. Tag post transplantationem konnte das Fluoreszenzsignal des Transplantats mittels IVIS® Lumina nicht mehr transkutan *in vivo* optisch (Abb. 57) dargestellt werden. Die Detektion des Fluoreszenzsignals (Abb. 58) war jedoch möglich.



**Abb. 57:** *In vivo* Messung des Fluoreszenzsignals von den mit QDots 675 inkubierten Präadipozyten (n=5) mittels IVIS® Lumina Imaging System im zeitlichen Verlauf. Nach dem 2. Tag post transplantationem konnte das Fluoreszenzsignal mittels Living Image 3.0 Software detektiert, jedoch nicht optisch dargestellt werden.

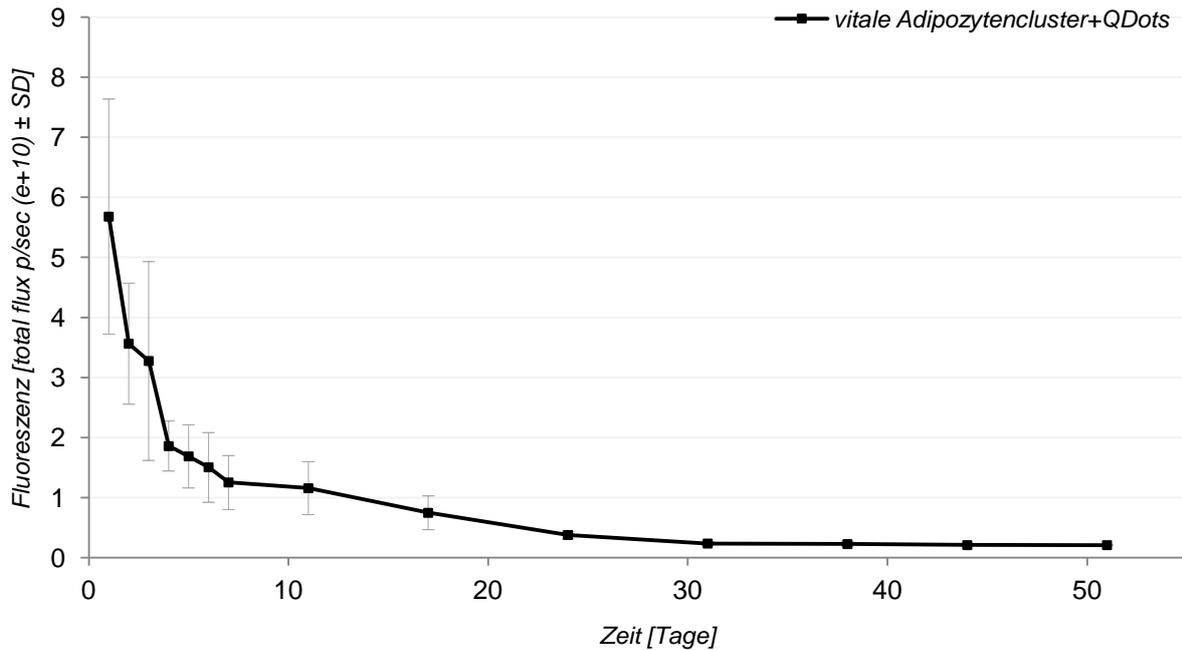
Post mortem, nach der Sektion konnte das Fluoreszenzsignal des Präadipozytentransplantates auch am 12. Tag optisch dargestellt werden (Abb. 58).



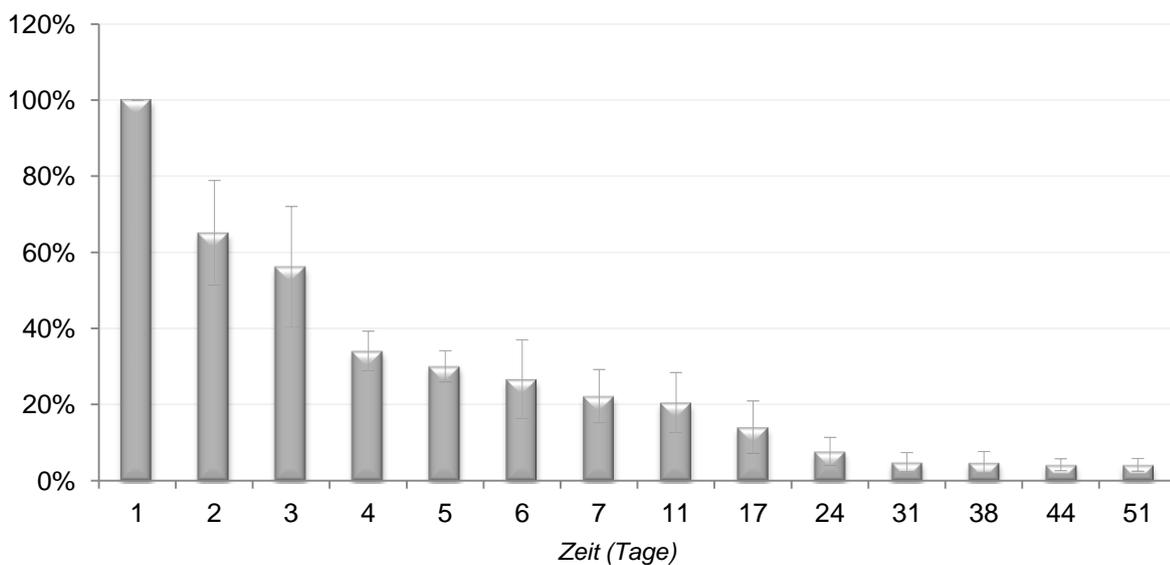
**Abb. 58:** Fluoreszenzsignal-darstellung von mit QDots 675 inkubierten Präadipozytentransplantat mittels IVIS® Lumina am 12. Tag post transplantationem durch direkte Gewebenachweis post mortem.

### 3.6.2.2 Transplantation von vitalen Adipozytenclustern

Vitale Adipozytenclustertransplantationen mit 9 nM QDots 790 konnten nach Transplantation in balb/c-Mäuse im Zeitraum von 51 Tage *in vivo* detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal nahm von  $5,679 \times 10^{10} \pm 1,95$  p/sec (100%) bis auf  $0,21 \times 10^{10} \pm 0,006$  p/sec (4% des Initialsignals, Tag 51) kontinuierlich ab.

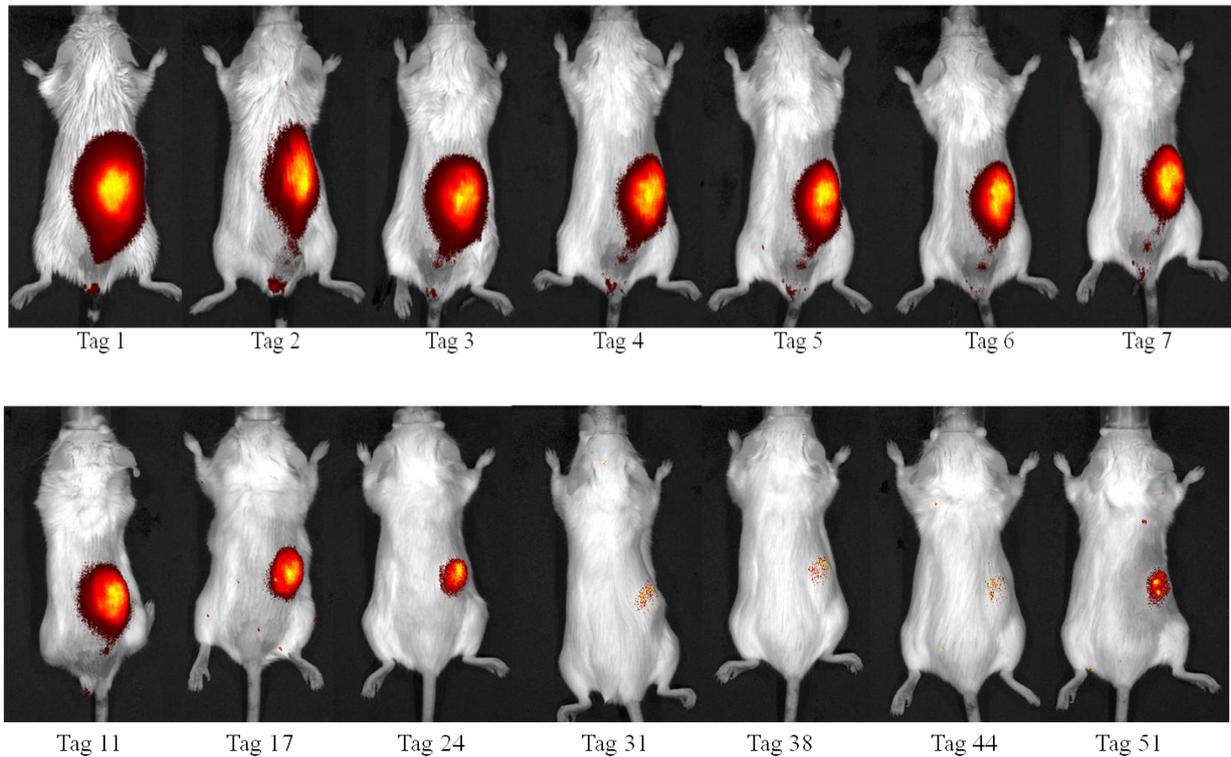


**Abb. 59:** Fluoreszenzsignal der vitalen Adipozytencluster mit QDots 790 (n=3) *in vivo*. Innerhalb der 51 Tage konnte, bei kontinuierlicher Abnahme, ein Fluoreszenzsignal detektiert werden.



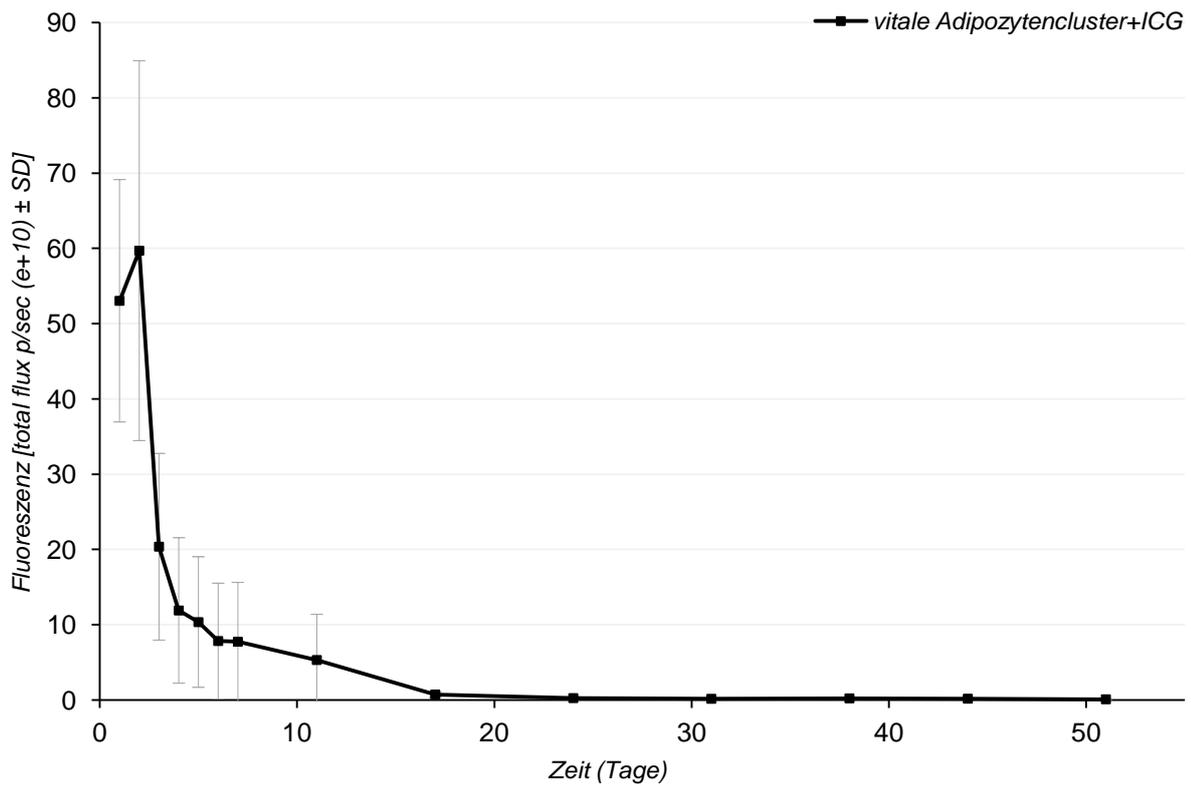
**Abb. 60:** Relative Fluoreszenzsignalabnahme der Adipozytencluster mit QDots 790 (n=3). Am 51. Tag konnte 4% des Initialsignals nachgewiesen werden.

Die Detektion des Fluoreszenzsignals *in vivo* war bis zum 51. Tag möglich (Abb. 61).

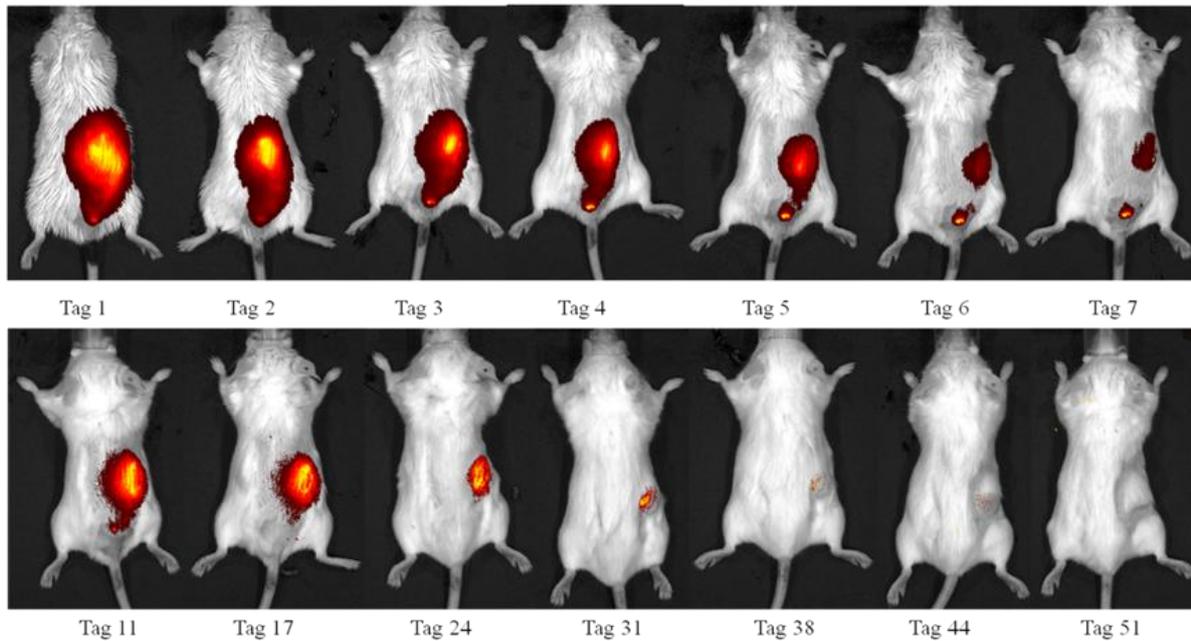


**Abb. 61:** Fluoreszenzdetektion von Adipozytenclustertransplantaten mit QDots 790 *in vivo*. Bei den anästhesierten balb/c-Mäusen konnte mittels IVIS® Lumina Imaging System ein Fluoreszenzsignal im zeitlichen Verlauf detektiert werden. Danach konnte mithilfe Living Image 3.0 das Signal berechnet werden.

Vitale Adipozytenclustertransplantationen mit Indocyaningrün wurden analog zu den Adipozytenclustertransplantationen mit QDots im Zeitraum von 51 Tage *in vivo* detektiert. Die *in vivo* Detektion des Signals mit Indocyaningrün war im Vergleich zur QDots-Gruppe nur bis zum 17. Tag post transplantationem qualitativ möglich (Abb. 61, 63). Das Fluoreszenzsignal nahm von  $53,51 \times 10^{10} \pm 16,30$  p/sec (100%) bis auf  $0,25 \times 10^{10} \pm 0,11$  p/sec (0,45% des Initialsignals, Tag 51) kontinuierlich ab.

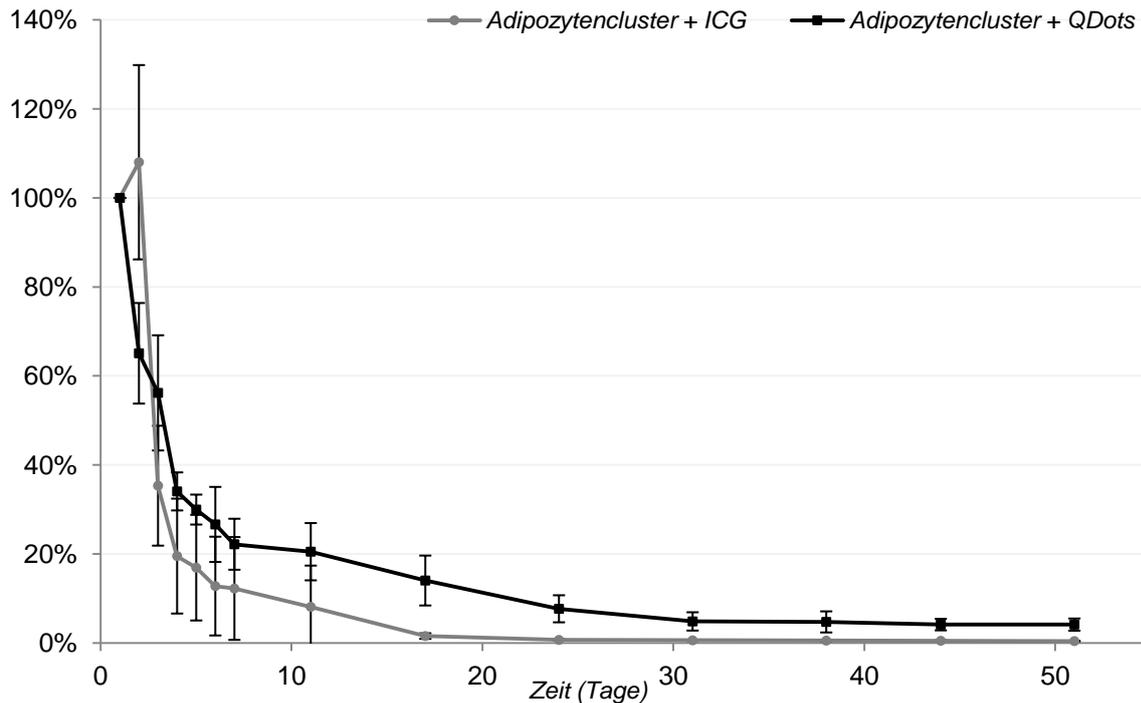


**Abb. 62:** Fluoreszenzsignal der Adipozytencluster mit Indocyaningrün *in vivo* nach Transplantation in balb/c-Mäuse (n=3). Die Signalabnahme ist stärker als bei den mit QDots inkubierten Adipozytenclustern. Nach dem 17. Tag post transplantationem ist das Fluoreszenzsignal kaum noch messbar.



**Abb. 63:** Fluoreszenzdetektion von Adipozytenclustertransplantaten mit Indocyaningrün *in vivo* mittels IVIS® Lumina Imaging System. Bei den anästhesierten balb/c- Mäusen konnte ein Fluoreszenzsignal im zeitlichen Verlauf detektiert werden. Danach konnte mithilfe Living Image 3.0 das Signal berechnet werden.

In dem direkten Vergleich des Fluoreszenzsignals von Adipozytenclustern mit QDots versus Indocyaningrün konnte eine in den ersten vier Tagen stärker ausgeprägte Signalabnahme in der Indocyaningrün-Gruppe gemessen werden. In den Tagen 4 bis 17 konnte eine ähnliche Fluoreszenzsignalabnahme in beiden Gruppen detektiert werden. Nach dem 17. Tag war das Signal in der Indocyaningrün-Gruppe kaum messbar (Abb. 63), in der QDots-Gruppe konnte das Signal noch bis zu 31. Tag ermittelt werden (Abb. 61).

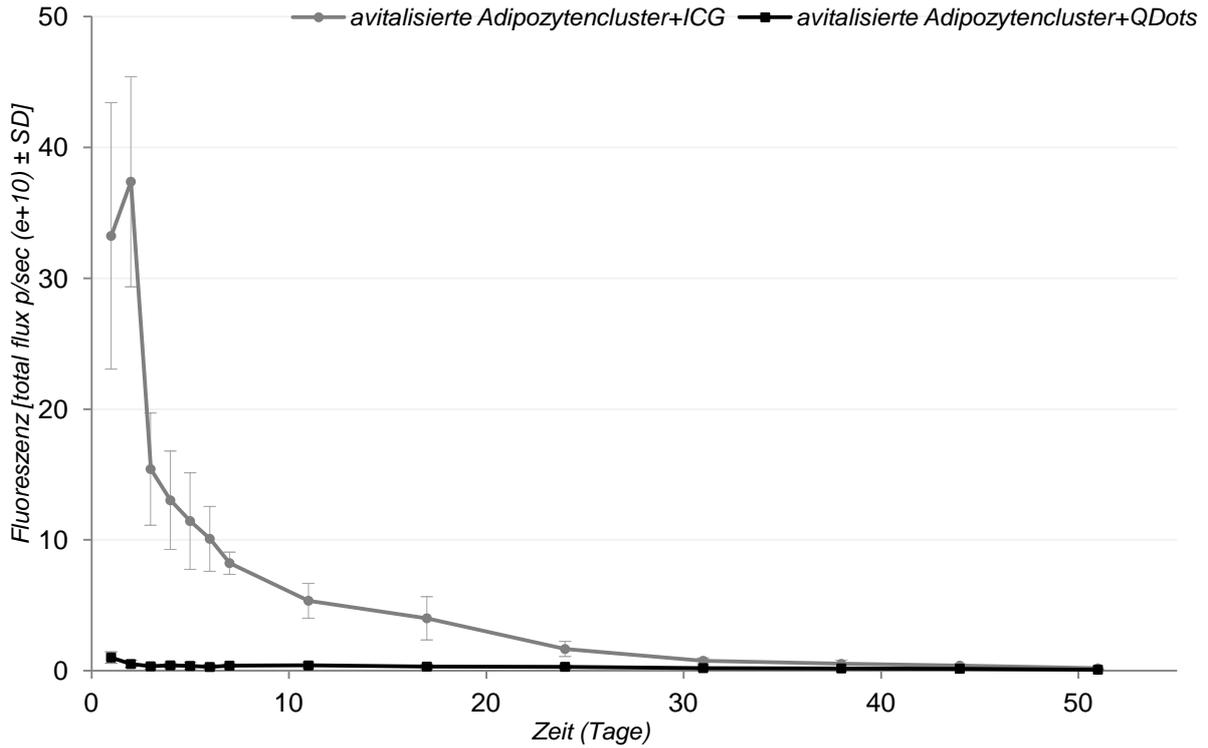


**Abb. 64:** Relative Darstellung der Fluoreszenzdetektion von Adipozytenclustertransplantaten mit QDots 790 (schwarz, n=3) versus Indocyaningrün (grau, n=3) *in vivo*.

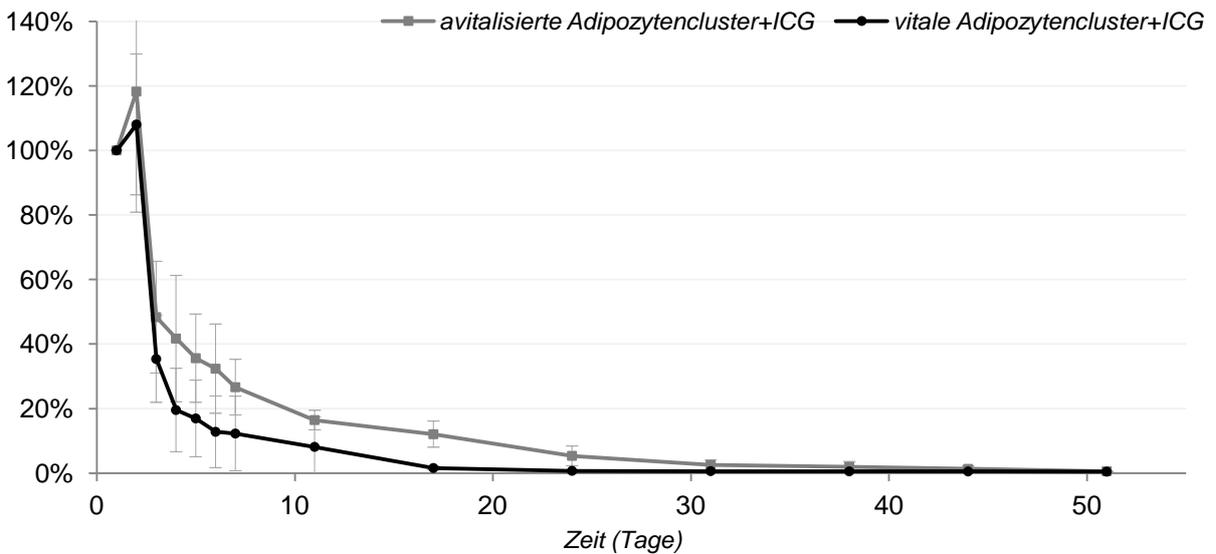
### 3.6.2.3 Transplantation von avitalisierten Adipozytenclustern

In der Gruppe der avitalisierten Adipozytencluster mit QDots konnte innerhalb der 51 Tage ein niedriges absolutes Signal detektiert werden: Am 1. Tag betrug es  $1,01 \times 10^{10} \pm 0,44$  p/sec und am 51. Tag  $0,08 \times 10^{10} \pm 0,06$  p/sec. Bei einer Maus war das Signal am 51. Tag nicht mehr detektierbar.

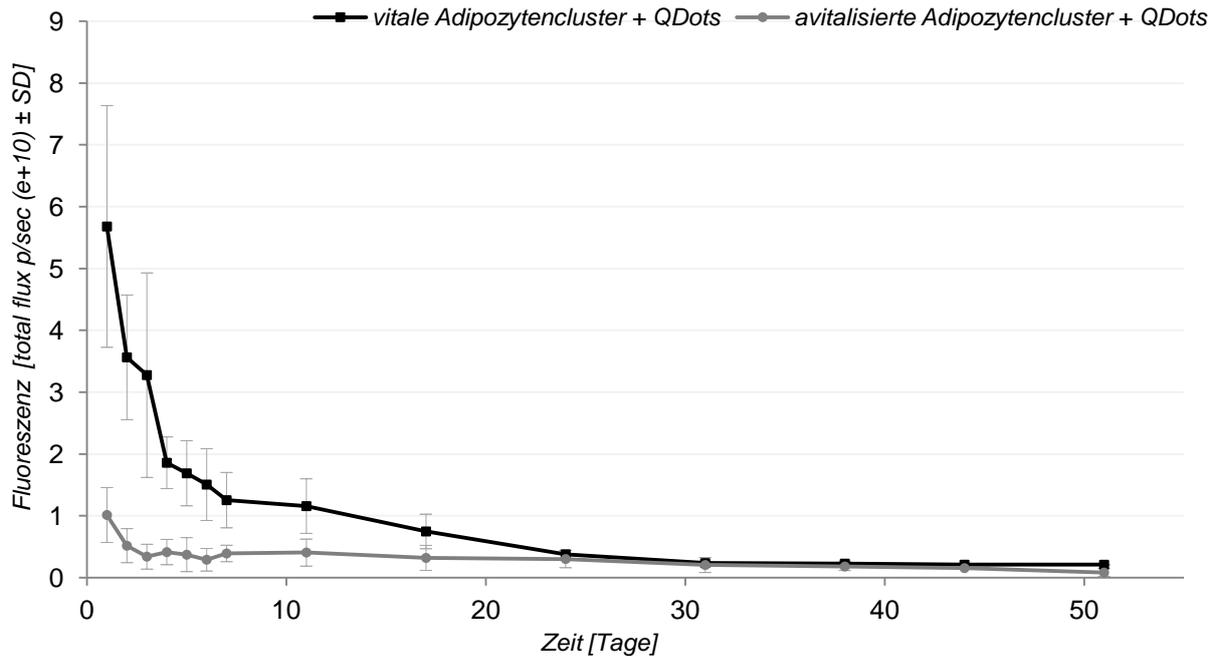
In der Gruppe der avitalisierten Adipozytencluster mit Indocyaningrün konnte in den ersten 17 Tagen ein Fluoreszenzsignal ausreichend detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal in der Gruppe der avitalisierten Adipozytencluster mit Indocyaningrün zeigt eine Analogie zu dem Fluoreszenzsignal der Gruppe mit vitalen Adipozytenclustern mit Indocyaningrün (Abb. 66).



**Abb. 65:** Absolute Fluoreszenzstärke der avitalisierten Adipozytenclustertransplantate mit QDots 790 (schwarz, n=3) versus Indocyaningrün (grau, n=3) *in vivo*. Das Signal ist bei den mit QDots inkubierten avitalisierten Adipozytencluster schwächer als bei der Vergleichsgruppe mit Indocyaningrün.



**Abb. 66:** Relative Darstellung der Fluoreszenzstärke der vitalen (schwarz, n=3) und der avitalisierten Adipozytencluster (grau, n=3) mit Indocyaningrün. Das Fluoreszenzsignal der avitalisierten Adipozytencluster mit Indocyaningrün zeigt eine Analogie zum Verlauf des Fluoreszenzsignals der vitalen Adipozytencluster mit Indocyaningrün.



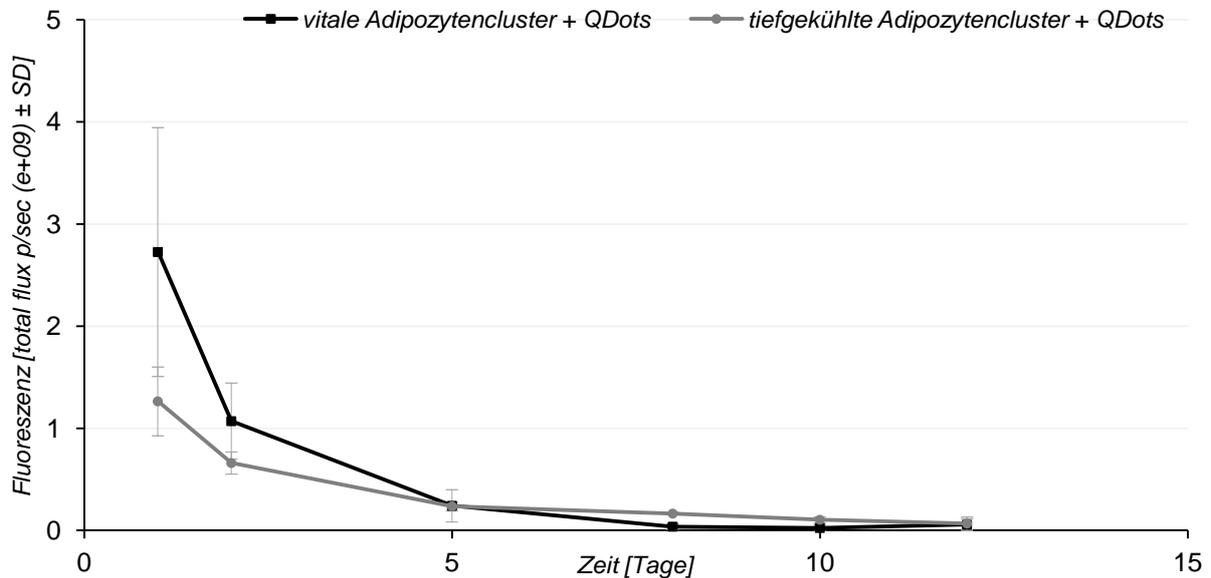
**Abb. 67:** Absolutes Fluoreszenzsignal der vitalen (schwarz, n=3) und der avitalisierten (grau, n=3) mit QDots 790 inkubierten Adipozytencluster *in vivo*. Das Signal ist in der vitalen Gruppe deutlich stärker als bei den avitalisierten Adipozytencluster.

### 3.6.2.4 Transplantationen von Adipozytenclustern nach Kühlaufbewahrung

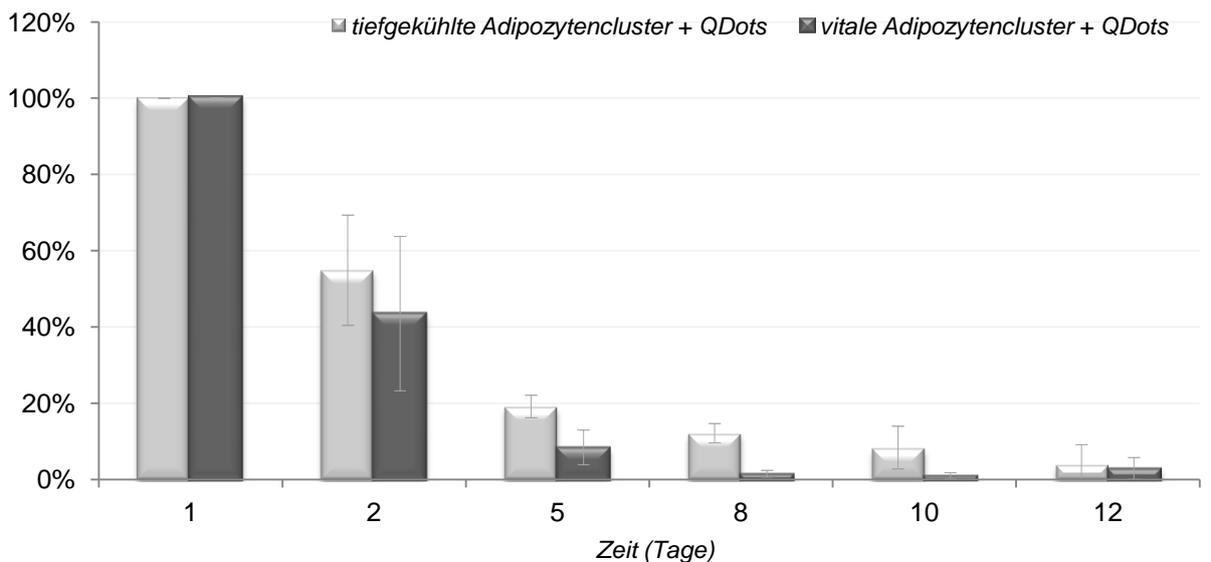
Da sich am 5. Tag post transplantationem sowohl in der Gruppe der frischen Adipozytenclustertransplantationen die Injektionsstelle bei 3 Tieren als auch in der Gruppe der kühlauflbewahrten Adipozytencluster (bei -21 °C) die Injektionsstelle bei 3 Tieren leicht entzündet hat, wurden die Tiere aus dem Versuch rausgenommen. Somit konnte ab dem Tag 5 (Tag: 8, 10 und 12) das Fluoreszenzsignal in der Gruppe der kühlauflbewahrten Adipozytencluster nur bei 2 Tieren und in der Vergleichsgruppe mit der frisch gewonnenen Adipozytencluster bei 7 Tiere detektiert werden. Am Tag 1, 2 und 5 wurde das Fluoreszenzsignal bei 5 Tieren in der Gruppe der eingefrorenen Adipozytencluster und bei 10 Tieren in der Gruppe der frisch gewonnenen Adipozytencluster gemessen.

Sowohl in der Gruppe der frisch gewonnenen als auch in der Gruppe der über 40 Tage bei -21 °C aufbewahrten Adipozytencluster konnte über 12 Tage eine starke Signalabnahme beobachtet werden (Abb. 68). Die frischen Adipozytencluster mit 16 nM QDots 675 zeigen eine Signalabnahme von 97% innerhalb den 12 Tagen, die eingefrorenen Adipozytencluster von 96% (Abb. 68).

Im Vergleich zu der Gruppe der frischen Adipozytencluster mit QDots 790 (s. 3.6.2.2), die am 11. Tag post transplantationem immer noch 20% des Initialsignals aufgewiesen haben, zeigten die mit QDots 675 inkubierten Adipozytencluster eine viel stärkere Signalabnahme.



**Abb. 68:** Fluoreszenzsignal *in vivo* der frischen (schwarz) und der kühlauflbewahrten (grau) Adipozytencluster inkubiert mit QDots 675 in den ersten 12 Tagen nach der Transplantation. Das Fluoreszenzsignal nimmt in beiden Gruppen sehr stark ab. Die beiden Kurven verlaufen analog zueinander.



**Abb. 69:** Relativer Vergleich zwischen den frischen (dunkelgrau) und den tiefgekühlten (hellgrau) mit QDots 675 inkubierten Adipozytencluster. Das Fluoreszenzsignal zeigt bei den frischen Transplantaten eine stärkere Abnahme als bei den tiefgekühlten Adipozytenclustertransplantaten.

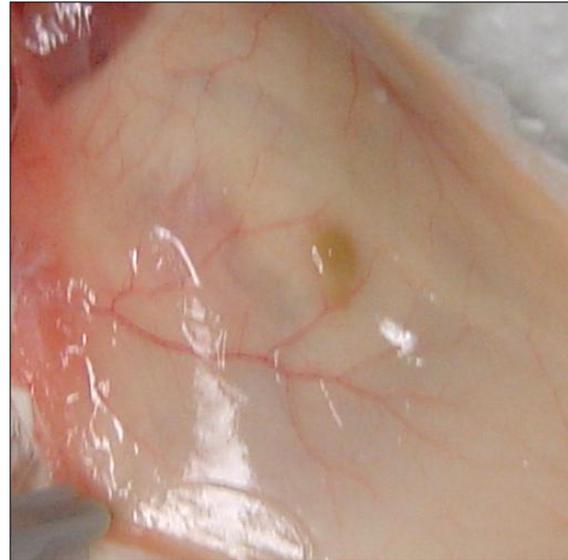
### **3.6.3 Morphologie**

#### **3.6.3.1 Präadipozytentransplantation**

*In vivo* konnte in den ersten 12 Tagen Beobachtung keine Volumenzunahme festgestellt werden. Bei der Sektion am 12. Tag nach der Präadipozytentransplantation, zeigte sich eine im Millimeterbereich liegende, durch feine Bindegewebe umschlossene subkutan liegende, kompakte Struktur, die von restlichem Subkutangewebe abgrenzbar war. Eine von fünf Präadipozytentransplantationen zeigte eine fragliche Neovaskularisation (Abb. 70), bei vier Injektionen konnte keine Neoangiogenese nach 12 Tagen post transplantationem beobachtet werden.



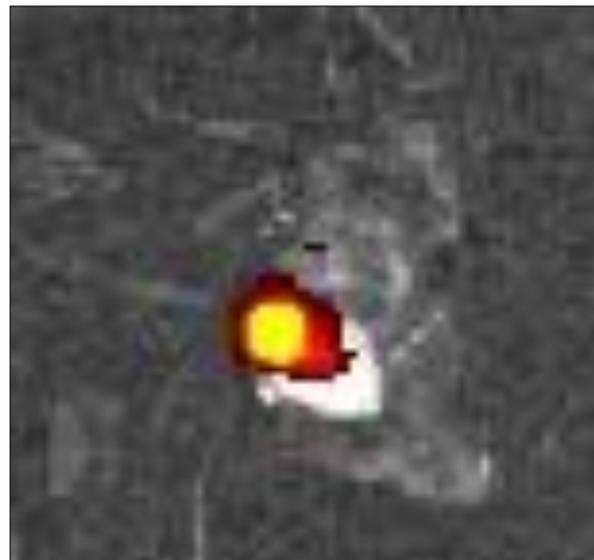
**Abb. 70:** Neovaskularisation des Präadipozyten-transplantates am 12. Tag post transplantationem.



**Abb. 71:** Mit QDots 675 inkubiertes Präadipozytentransplantat am 12. Tag post transplantationem.



**Abb. 72:** Frisch exstirpiertes Präadipozyten-transplantat am 12. Tag post transplantationem. Kompakte Struktur umschlossen durch feines Bindegewebe.



**Abb. 73:** Mittels IVIS® Lumina System detektiertes Fluoreszenzsignal des gleichen Präadipozytentransplantates (Abb. 72) am 12. Tag post transplantationem.

### **3.6.3.2 Transplantation von vitalen Adipozytenclustern**

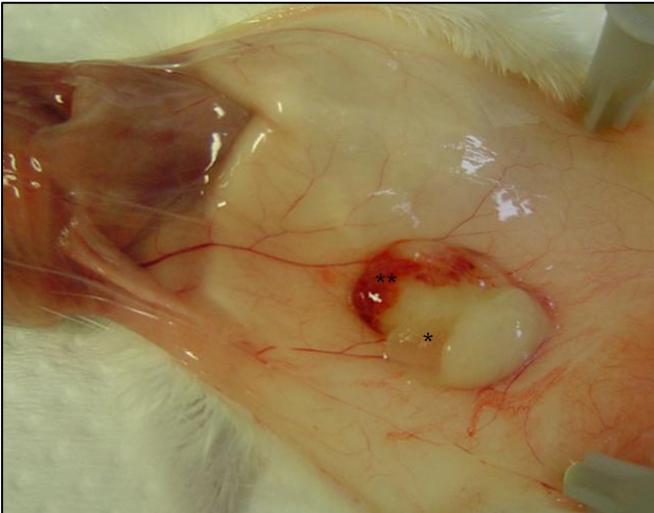
Makroskopisch wird die Morphologie der Adipozytenclustertransplantate nach 51 Tage sowohl in der QDots- als auch in der Indocyaningrüngruppe untersucht (Abb. 74-78). In der Sektion konnte beobachtet werden, dass die Adipozytencluster sich nach der Transplantation zu einer kompakten Struktur organisierten, die von dem umliegenden Gewebe klar abgrenzbar und frei verschiebbar war. Die Transplantate wurden in der QDots-Gruppe am Tag: 5 (n=3, QDots 675), 12 (n=7, QDots 675) und 51 (n=3, QDots 790) exstirpiert. Am Tag 12 konnten bei zwei Tieren die Transplantate nicht abgegrenzt werden.

In der Indocyaningrüngruppe wurden die Transplantate am Tag 51 (n=3) exstirpiert. Ein Transplantat konnte nicht aufgespürt werden.

Bereits am 5. Tag post transplantationem konnte in den Adipozytenclustertransplantaten mit QDots die Bildung von kleinen Ölzysten (Abb. 75) beobachtet werden. Die am 5. Tag gewonnenen Adipozytenclustertransplantate mit QDots 675 (n=3) zeigten eine Zunahme der Neovaskularisation (Abb. 74).

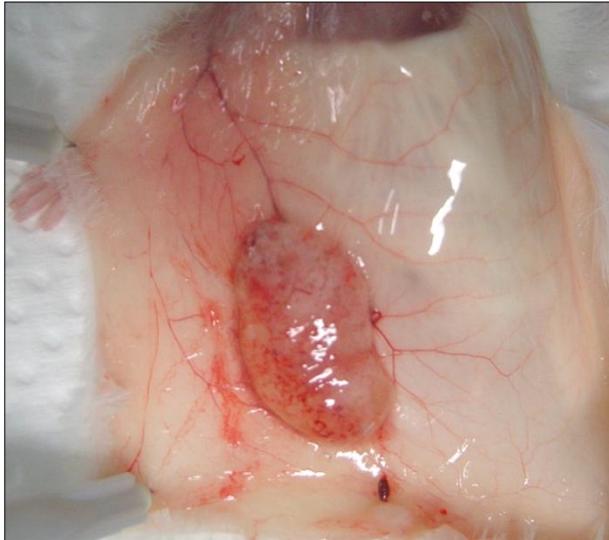


**Abb. 74:** Mit QDots 675 inkubiertes vitales Adipozytenclustertransplantat am 5. Tag post transplantationem. Ein Neovaskularisationsbeginn (↗) ist darstellbar. \* Einblutung.



**Abb. 75:** Mit QDots 675 inkubiertes Adipozytenclustertransplantat am 5. Tag post transplantationem. Die Bildung einer Ölzyste (\*) konnte beobachtet werden. \*\* Einblutung.

Die am 12. Tag post transplantationem beobachteten Adipozytenclustertransplantate zeigten eine deutliche Bildung von Neovaskularisation (Abb. 76, 78). Es zeigte sich eine Ölzystenbildung, die teilweise multipel in den Transplantaten vorhanden waren (Abb. 77, 78).



**Abb. 76:** Neovaskularisationsbildung des mit QDots 675 inkubierten Adipozytenclustertransplantats nach 12 Tagen post transplantationem.



**Abb. 77:** Ölzystenbildung bei dem am 12. Tag post transplantationem exstirpierten Adipozytenclustertransplantat.



**Abb. 78:** Mit QDots 675 inkubiertes Adipozytenclustertransplantat am 12. Tag post transplantationem mit starker Neovaskularisation (↗) Ölzyste (\*).

Nach 51 Tagen konnte in der Gruppe der Adipozytenclustertransplantate mit QDots eine teils ausgeprägte Vaskularisation des Adipozytenclustertransplantats

beobachtet werden. Die Adipozytenclustertransplantate mit Indocyaningrün wiesen ebenso eine deutliche Bildung der Vaskularisation auf.

Die Adipozytenclustertransplantate veränderten sich makroskopisch zugunsten einer einheitlichen großen zystischen prall-elastischen Struktur.



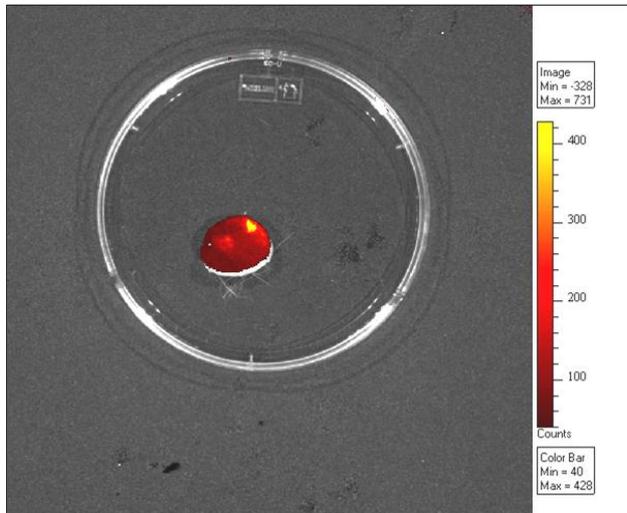
**Abb. 79:** Zystisches Adipozytenclustertransplantat inkubiert mit QDots 790 am 51. Tag post transplantationem.



**Abb. 80:** Adipozytenclustertransplantat mit QDots 790 mit Einblutung am 51. Tag. Injektionsstelle (↗).



**Abb. 81:** Extirpiertes Adipozytenclustertransplantat mit QDots 790 am 51. Tag post transplantationem.



**Abb. 82:** Fluoreszenzdarstellung des gleichen extirpierten Transplantats (Abb. 81) mittels IVIS® Lumina Imaging System.

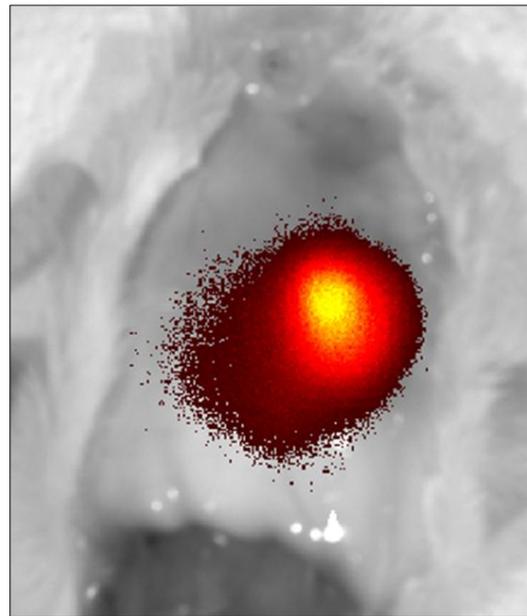
Makroskopisch zeigten die Adipozytenclustertransplantate mit Indocyaningrün am 51. Tag post transplantationem auch eine klar abgrenzbare, überwiegend zystische Struktur mit einer starken Neovaskularisation (Abb. 83-84, 86).



**Abb. 83:** Adipozytenclustertransplantat mit Indocyaningrün am 51. Tag. Makroskopisch konnten keine Unterschiede zwischen der mit Indocyaningrün und der mit QDots inkubierten Adipozytencluster festgestellt werden. Bildung der Neovaskularisation (↗).



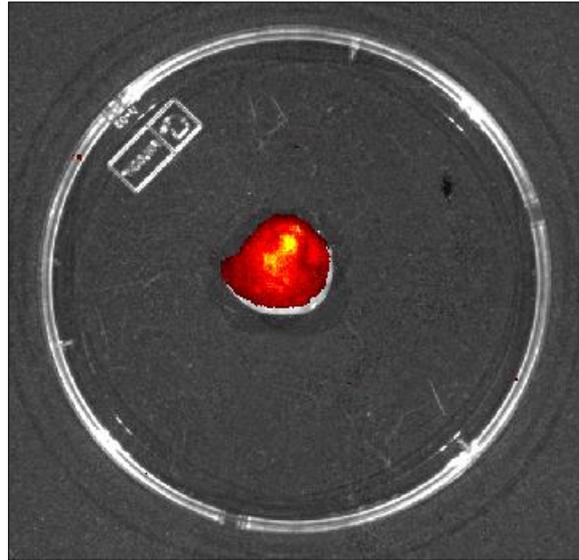
**Abb. 84:** Adipozytenclustertransplantat mit Indocyaningrün am 51. Tag post transplantationem.



**Abb. 85:** Darstellung des Fluoreszenzsignals des gleichen Transplantats (Abb. 84) mittels IVIS® Lumina Imaging System am 51. Tag post transplantationem.



**Abb. 86:** Exstirpiertes Adipozytenclustertransplantat mit Indocyaningrün nach 51 Tagen.

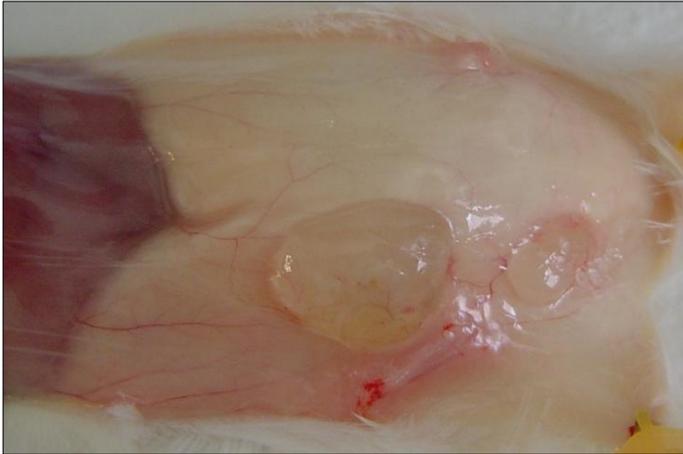


**Abb. 87:** Fluoreszenzsignal des gleichen Transplantats (Abb. 86) mittels IVIS® Lumina Imaging System.

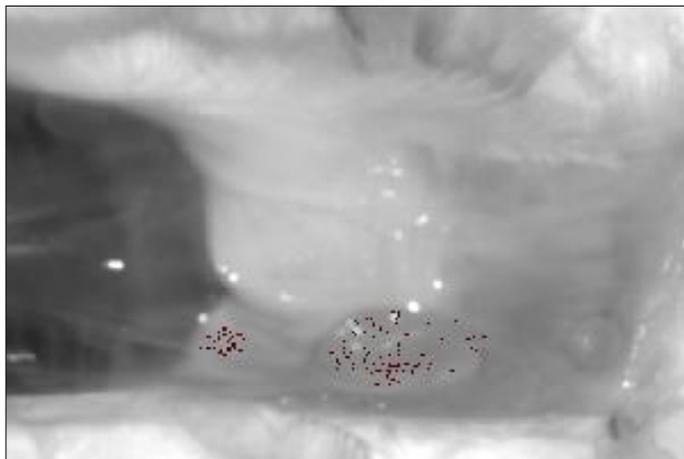
### 3.6.3.3 Transplantation von avitalisierten Adipozytenclustern

Sowohl in der Gruppe der avitalisierten Adipozytencluster mit QDots als auch mit Indocyaningrün zeigte sich ein gleiches makroskopisches Bild der Adipozytenclustertransplantate (Abb. 88, 90).

Die Adipozytenclustertransplantate wurden in beiden Gruppen nach 51 Tagen exstirpiert, es zeigten sich zystische Strukturen, die klar subkutan abgrenzbar waren. In Abgrenzung zu den vitalen Adipozytenclustertransplantaten wiesen die avitalisierte Transplantate makroskopisch keine Neovaskularisation auf.



**Abb. 88:** Avitalisiertes Adipozytenclustertransplantat inkubiert mit QDots 790 am 51. Tag post transplantationem. Es zeigt sich eine zystische Formation mit fehlender Neovaskularisation.



**Abb. 89:** Fluoreszenzsignaldarstellung des avitalisierten Adipozytenclustertransplantats mit QDots 790 mittels IVIS® Lumina Imaging System am 51. Tag post transplantationem. Es konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden.



**Abb. 90:** Avitalisiertes Adipozytenclustertransplantat inkubiert mit Indocyaningrün am 51. Tag post transplantationem. Makroskopisch zeigte sich kein Unterschied zwischen der mit QDots und der mit Indocyaningrün inkubierten Adipozytencluster.

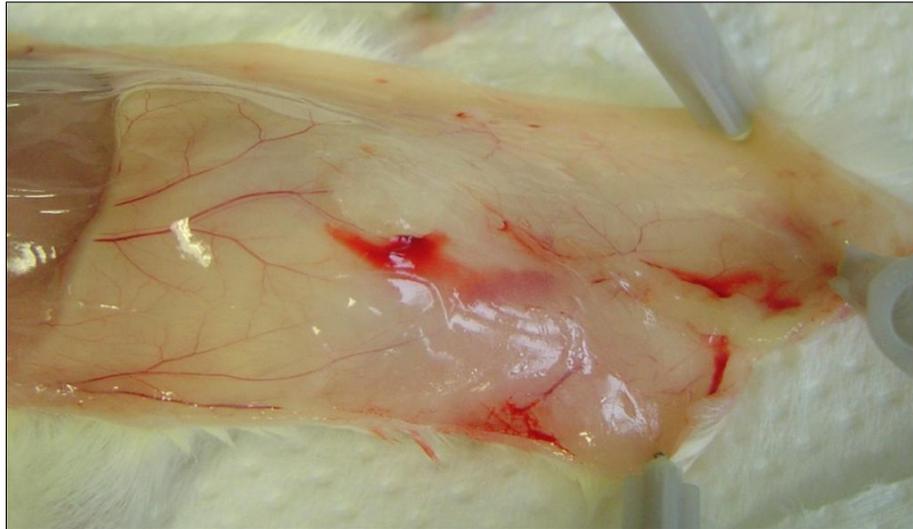
### 3.6.3.4 Transplantationen von Adipozytenclustern nach Kühlaufbewahrung

Makroskopisch zeichneten sich die über 40 Tage gefrorenen und aufgetauten Adipozytenclustertransplantate sowohl nach 5 als auch nach 12 Tagen post transplantationem durch eine viel weichere bzw. öligere (Abb. 91-92, 94-95) und weniger kompakte Konsistenz als die frischen Adipozytencluster aus. Die bei -21 °C aufbewahrten Transplantate sind von umliegendem Gewebe schlechter abgrenzbar. Die Exstirpation der Transplantate war durch die Konsistenzbeschaffheiten erschwert.

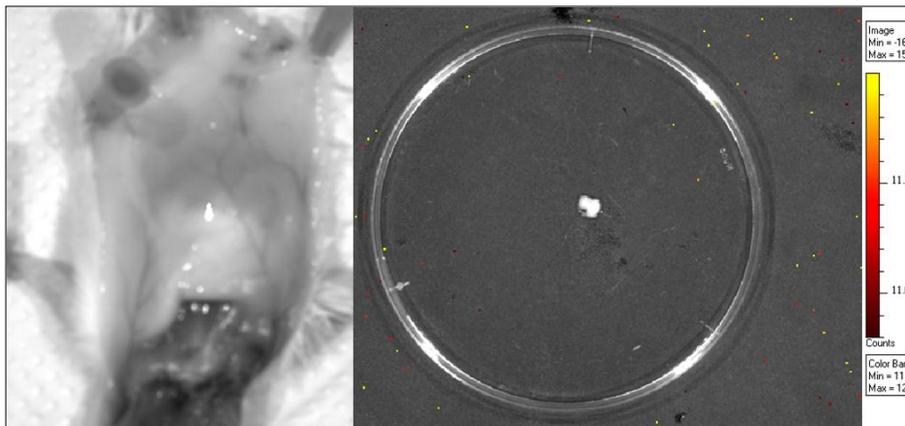
Die Neovaskularisation ist im Vergleich zur frischen Adipozytenclustertransplantate schlechter ausgeprägt (Abb. 94).



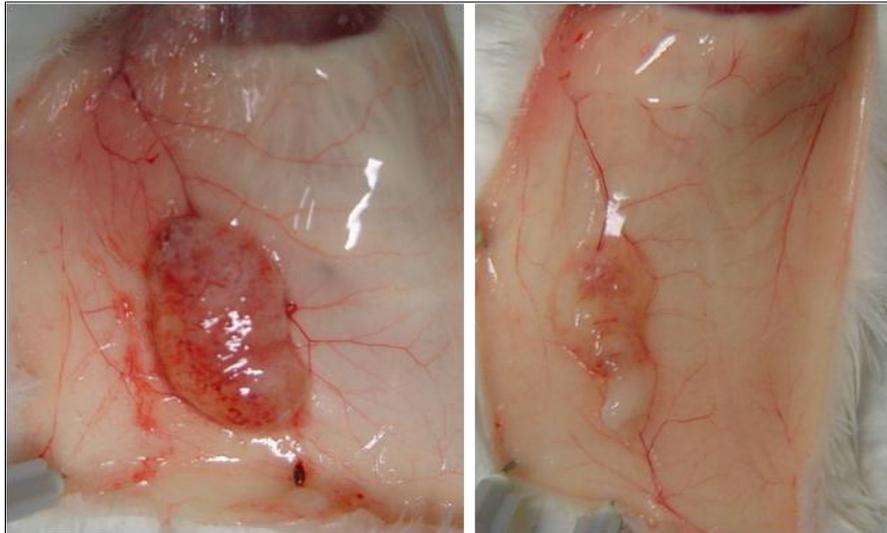
**Abb. 91:** Adipozytenclustertransplantat (links) und Transplantat mit tiefgekühlten Adipozytencluster (rechts) mit QDots am 5. Tag post transplantationem.



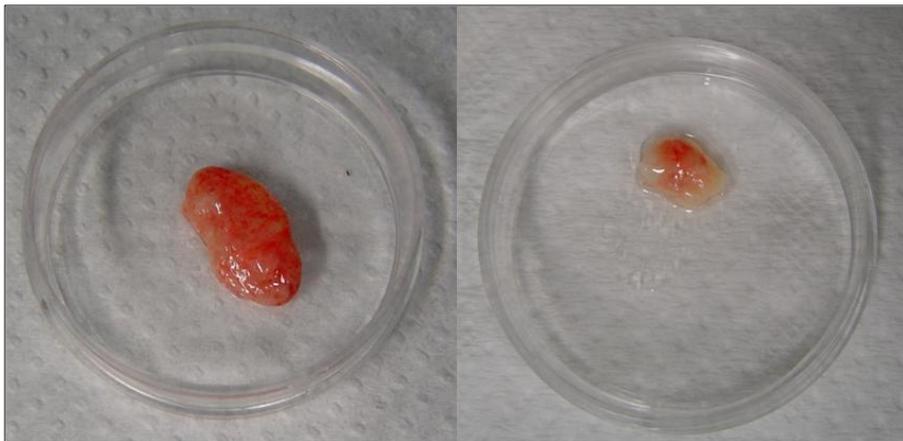
**Abb. 92:** Schwer abgrenzbares Adipozytenclustertransplantat mit tiefgekühlten und mit QDots 675 inkubierten Adipozytencluster am 5. Tag post transplantationem.



**Abb. 93:** Fluoreszenzsignal des tiefgekühlten Adipozytenclustertransplantats mit QDots 675 in situ (links) und nach der Exstirpation (rechts) mittels IVIS® Lumina Imaging System am 5. Tag post transplantationem.



**Abb. 94:** Adipozytenclustertransplantat mit frischen (links) und tiefgekühlten (rechts) Adipozytencluster mit QDots 675 am 12.Tag. Die frischen Transplantate zeigen eine bessere Vaskularisation.

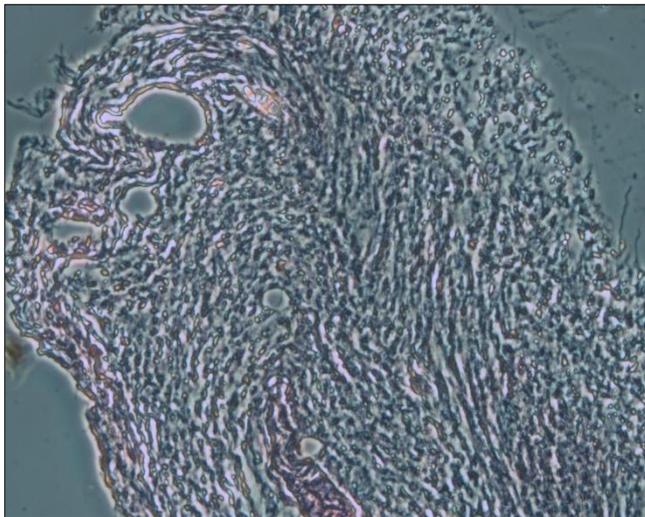


**Abb. 95:** Exstirpiertes Adipozytenclustertransplantat mit frischen (links) und tiefgekühlten Adipozytencluster (rechts) mit QDots 675 am 12. Tag. Die tiefgekühlten Transplantate zeigen eine weniger kompakte, öligere Konsistenz.

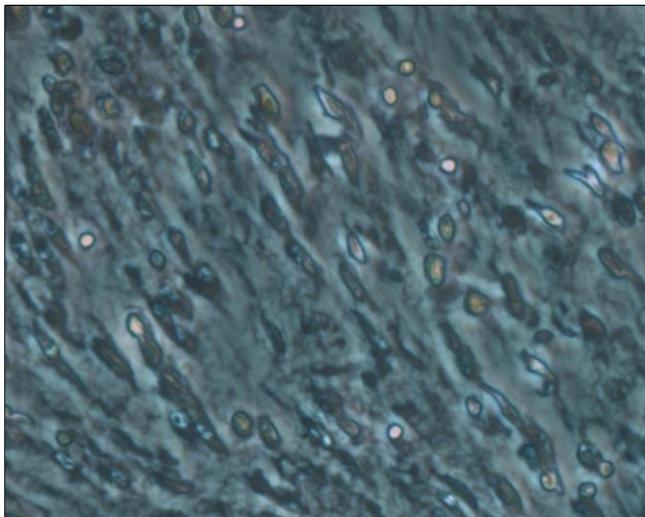
### 3.6.4 Histologie

#### 3.6.4.1 Präadipozytentransplantation

Histologisch konnte mit HE-Färbung eine Struktur von regelmäßig angeordneten Bindegewebezellen mit zahlreichen Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Nach 12 Tagen konnten keine adulten Adipozyten mit Fettvakuolenbildung festgestellt werden.



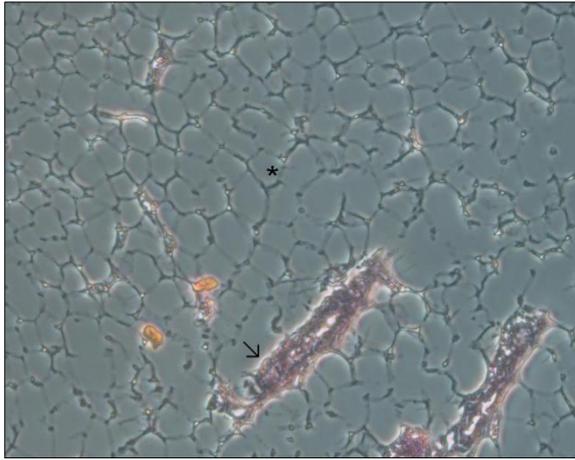
**Abb. 96:** Histologie des Präadipozytentransplantats am 12. Tag post transplantationem (HE-Färbung, Filter, Vergr. 60x).



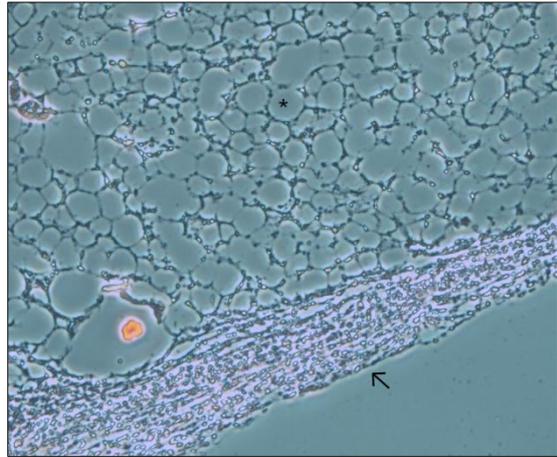
**Abb. 97:** Präadipozytentransplantat nach 12 Tagen post transplantationem (HE-Färbung, Filter, Vergr. 250x).

### **3.6.4.2 Transplantation von vitalen Adipozytenclustern**

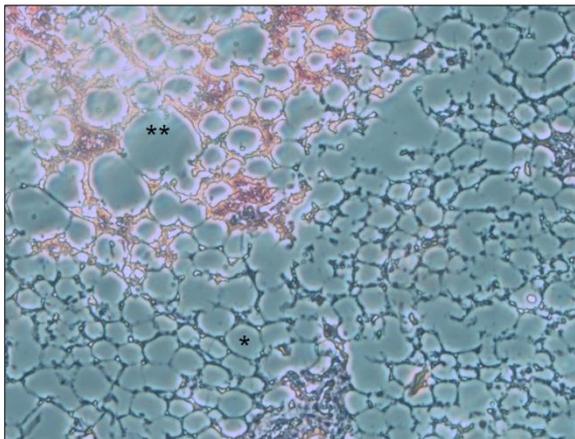
Histologisch konnte mit HE-Färbung eine einheitliche Struktur der Transplantate festgestellt werden: Das Innere der Adipozytenclustertransplantate besteht überwiegend aus intakten Adipozyten (Abb. 98-101). Die Fettvakuolen lagern sich vor allem um die intakten Adipozyten im Äußeren des Transplantats ab (Abb. 100-101). Im Laufe der Zeit verbinden sich die einzelnen kleinen Fettzysten zu einer großen Ölzyste. Das Verhältnis intakter Adipozyten versus Ölzyste nimmt allmählich zugunsten der Ölzyste zu (Abb. 101-102). Das Äußere des Adipozytenclustertransplantats wird fast durchgehend von Bindegewebe gebildet, das das Transplantat umgibt und eine Art Kapsel (Abb. 99, 102) bildet. In dem Bindegewebe konnten Makrophagen beobachtet werden. In dem Transplantat konnte ab dem 5. Tag zwischen den Adipozyten Blutkapillaren nachgewiesen werden (Abb. 98). Mikroskopisch konnten zwischen den Transplantaten, die am Tag 5 und am Tag 12 exstirpiert wurden, keine morphologischen Unterschiede beobachtet werden.



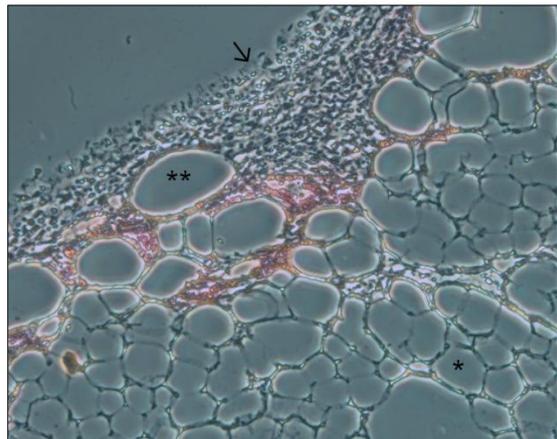
**Abb. 98:** Adipozytenclustertransplantat mit QDots 675 am 5. Tag post transplantationem, vitale Adipozyten (\*) und quer angeschnittene Kapillaren (↴) (HE-Färbung, Filter, Vergr. 60x).



**Abb. 99:** Adipozytenclustertransplantat mit QDots 675 am 5. Tag post transplantationem. Das Transplantat mit den vitalen Adipozyten (\*) ist von einer Kapsel (↴) umgeben (HE-Färbung, Filter, Vergr. 60x).

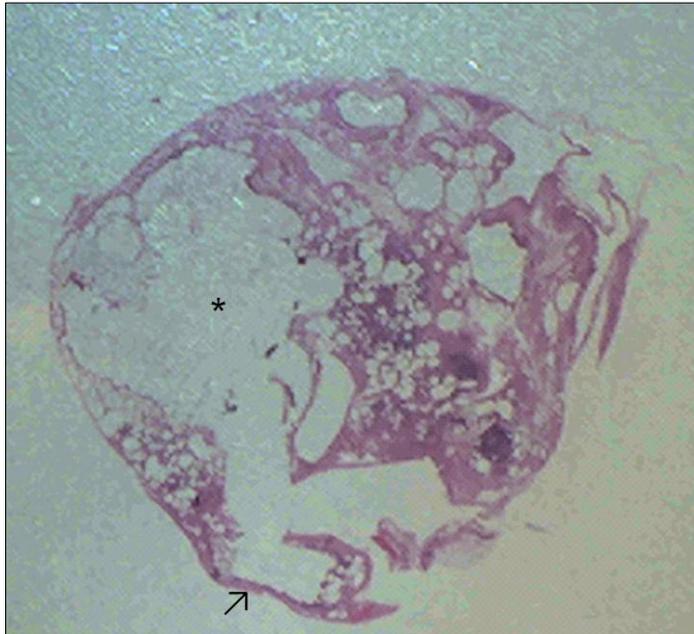


**Abb. 100:** Adipozytenclustertransplantat mit QDots 675 am 5. Tag post transplantationem. Adipozyten (\*), Fettvakuolen (\*\*) (HE-Färbung Filter, Vergr. 60x).



**Abb. 101:** Adipozytenclustertransplantat mit QDots 770 am 12. Tag post transplantationem. Adipozyten (\*), Fettvakuole (\*\*), Transplantatkapsel (↴) (HE-Färbung, Filter, Vergr. 60x).

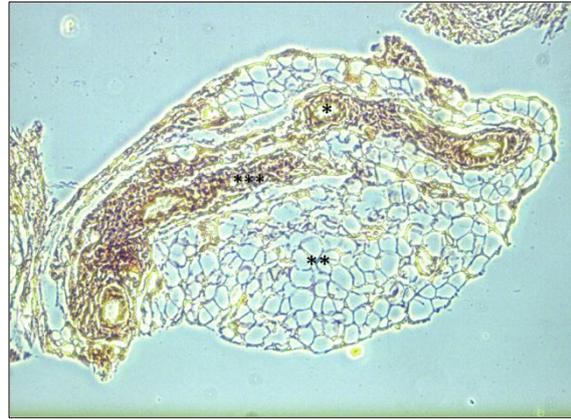
In den nach 51 Tagen gewonnenen Transplantaten bildete die Ölzyste einen hohen Anteil des Transplantatvolumens (Abb. 102). Mikroskopisch konnte bei den Adipozytenclustertransplantaten mit Indocyaningrün nach 51 Tagen kein Unterschied zu den Adipozytenclustertransplantaten mit QDots festgestellt werden.



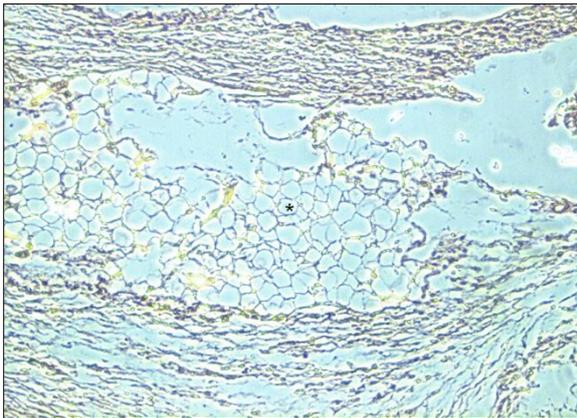
**Abb. 102:** Adipozytenclustertransplantat mit QDots 790 am 51. Tag post transplantationem. Eine Ölzyste (\*) bildet einen großen Anteil des Transplantats. Das Transplantat ist von einer Transplantatkapsel (↗) umgeben (HE-Färbung, Vergr. 10x).



**Abb. 103:** Adipozytenclustertransplantat mit QDots 790 am 51. Tag post transplantationem. Adipozyt (\*), Ölzyste (\*\*), Fettvakuole (\*\*\*) (HE-Färbung, Filter, Vergr. 60x).



**Abb. 104:** Adipozytenclustertransplantat mit QDots 790 am 51. Tag post transplantationem. Kapillare (\*), Adipozyten (\*\*), Bindegewebe (\*\*\*) (HE-Färbung, Filter, Vergr. 60x).



**Abb. 105:** Adipozytenclustertransplantat mit Indocyaningrün am 51. Tag post transplantationem. Adipozyt (\*) (HE-Färbung, Filter, Vergr. 60x).

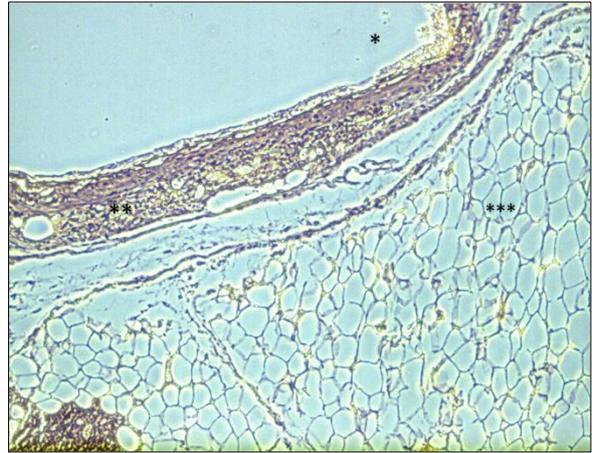
### 3.6.4.3 Transplantation von avitalisierten Adipozytenclustern

Die avitalisierten Adipozytencluster inkubiert mit QDots oder mit Indocyaningrün wiesen keinen morphologischen Unterschied auf. Histologisch konnte man jedoch klare Unterschiede zu den vitalen Adipozytenclustertransplantaten aufzeigen.

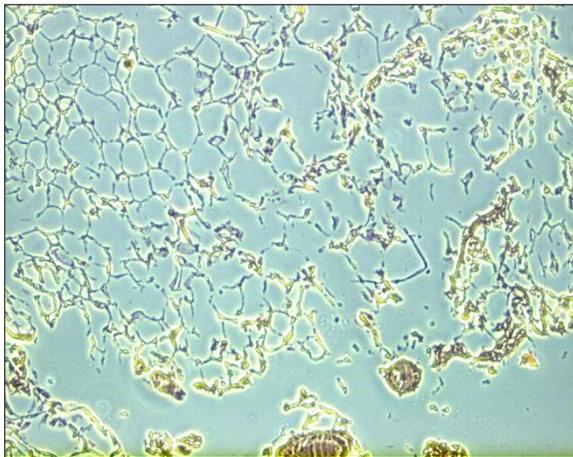
Der Großteil der Clusterstruktur nach Transplantation von avitalisierten Adipozyten wurde von einer Ölzyste, die überwiegend aus Fett und teilweise aus Adipozyten besteht, gebildet (Abb. 106-108). Die Ölzyste ist von einer Kapsel, die aus Bindegewebezellen mit u.a. Makrophagen aufgebaut ist, umschlossen. Die Zystenkapself enthält viele Fettvakuolen (Abb. 109).



**Abb. 106:** Avitalisiertes Adipozytenclustertransplantat inkubiert mit QDots 790 nach 51 Tagen post transplantationem. Den größten Anteil bildet eine Ölzyste (\*), die von einer Kapsel umgeben ist (HE-Färbung, Vergr. 10x).



**Abb. 107:** Avitalisiertes Adipozytenclustertransplantat mit QDots 790. Ölzyste (\*), ZystenkapSEL (\*\*), Adipozyten (\*\*\*) (HE-Färbung, Filter, Vergr. 60x).



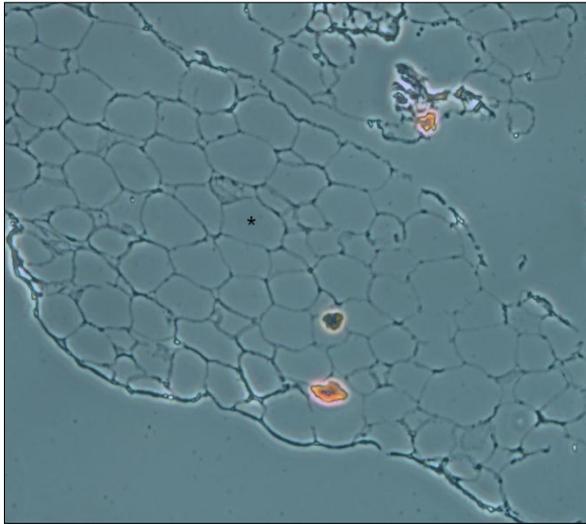
**Abb. 108:** Das Ölzysteninnere mit Adipozyten bei avitalisierten Adipozytenclustertransplantaten mit QDots 790 nach 51 Tagen post transplantationem (HE-Färbung, Filter, Vergr. 60x).



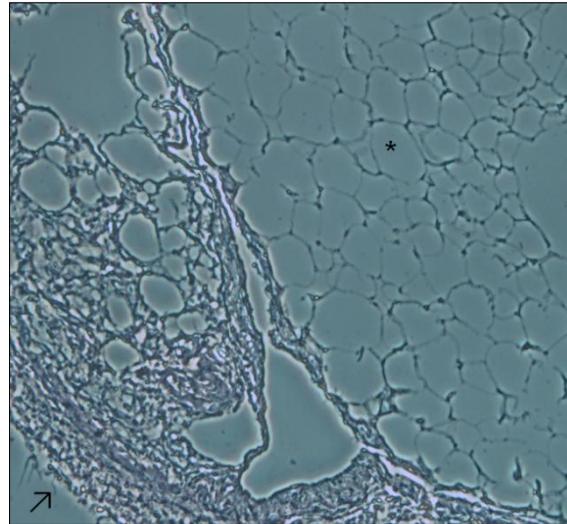
**Abb. 109:** ÖlzystenkapSEL mit Fettvakuolen des avitalisierten Adipozytenclustertransplantats mit QDots 790 am 51. Tag post transplantationem (HE-Färbung, Filter, Vergr. 60x).

#### 3.6.4.4 Transplantationen von Adipozytenclustern nach Kühlaufbewahrung

In der mikroskopischen Beurteilung der kühlauflbewahrten Adipozytencluster konnten keine Unterschiede zu den frischen Adipozytencluster festgestellt werden. Die Präparate bestehen aus intakten Adipozyten, Fettvakuolen und Bindegewebe mit mesenchymalen Vorläuferzellen, die sich überwiegend im äußeren Bereich des Transplantats zu einer Kapsel verbinden.



**Abb. 110:** Adipozytenclustertransplantat mit kühl Laufbewahrten Adipozytencluster mit QDots 675 am 12. Tag post transplantationem. Histologisch konnten keine Unterschiede zu den vitalen Adipozytenclustertransplantationen festgestellt werden. Intakte Adipozyten (\*) (HE-Färbung, Filter, Vergr. 60x).



**Abb. 111:** Adipozytenclustertransplantat mit kühl Laufbewahrten Adipozytencluster mit QDots 675 am 12. Tag post transplantationem. Das Transplantat besteht aus intakten Adipozyten (\*), die von einer Kapsel (↗) umgeben sind (HE-Färbung, Filter, Vergr. 60x).

## **4. DISKUSSION**

Die Fettgewebetransplantation spielt sowohl in der plastischen als auch in der rekonstruktiven Chirurgie eine immer wichtigere Rolle [18, 56, 58, 61, 97]. Weichteildefekte und Konturunregelmäßigkeiten können mit einer Transplantation des Fettgewebes aufgefüllt und somit verbessert werden. Die Verwendung des autologen Fettgewebes in der plastischen Chirurgie könnte in der Zukunft sowohl für rekonstruktive als auch für kosmetische Zwecke vermehrt eingesetzt werden. Ein natürlich aussehendes postoperatives Ergebnis [47] bei einem weniger traumatischen Eingriff [23] trägt dazu bei, dass die Fettgewebetransplantation eine Alternative teilweise sogar einen Ersatz für andere weichteilrekonstruktive Verfahren, wie z.B. Lappenplastiken bietet.

### **4.1. Vorteile und Nachteile der Fettgewebetransplantation**

In den meisten Fällen ist das Fettgewebe, das entnommen werden kann ausreichend vorhanden und kann problemlos und kostengünstig gewonnen werden [8]. Es ist im Vergleich mit den meisten operativen weichteildefekt ersetzenden Verfahren, z.B. den Lappenplastiken, ein sowohl technisch als auch zeitlich weniger aufwendigeres Verfahren und somit ein Verfahren mit niedrigerer Morbidität [61].

Im Vergleich mit anderen Verfahren ist eine freie autologe Fettgewebetransplantation besser verträglich und weist keinerlei Allergische- oder Abstoßungsreaktionen auf [8]. Neben des Risikos der allergischen Reaktion zeigen die alloplastischen Augmentationsprodukte wie z.B. Silikonimplantate im Vergleich mit einer Fettgewebetransplantation eine erhöhte Migrationstendenz [77, 136] und eine verstärkte Bildung der Kapselbildung [120].

Der große Vorteil der Fettgewebetransplantation, vor allem gegenüber der Weichteilaugmentation mittels freien oder gestielten Lappen, besteht darin, dass es sich um eine avaskuläre Transplantation handelt und man die mikrochirurgischen Folgekomplikationen, wie Thrombosen [16] oder Abflussstauung somit vermeiden kann.

Nach einer Karzinomentfernung bei Mammakarzinomen können die autologen Transplantate besser als die allogenen eingesetzt werden, da die Nachsorgeuntersuchungen und somit die Kontrollierbarkeit mittels Sonographie, MRT oder

Mammographie [25, 55, 59, 61] eine bessere Beurteilbarkeit und Behandlung erlaubt [23, 61].

Die nach der autologen Gewebstransplantation auftretenden Veränderungen in der Brust sollten durch regelmäßige Kontrollen [23] monitort werden, somit können Kalzifikationen von Karzinomen abgegrenzt werden [23]. Eine Screeninguntersuchung ist zwar erschwert [55], es ist jedoch sowohl die Diagnosestellung auch als die Behandlung nach der Fettgewebettransplantation gut möglich [46]. Nach einer Fettgewebettransplantation ist eine adjuvante Therapie, z.B. Radiatio laut Kanchwala et al. nach der Ausbildung der Vaskularisation des Fetttransplantates ohne Schäden des transplantierten Fettgewebes möglich [61].

Eine Tumorinduktion durch autologe Fettgewebettransplantation ist bis dato ein offener Aspekt [25, 55, 59, 61]. Es sind in der Literatur zwei Fälle über ein Auftreten eines Mammakarzinoms nach einer Fettgewebettransplantation beschrieben [46]. In der Frage nach der Tumorinduktion muss man klar zwischen reinem Fettgewebe und dem mit Stammzellen angereicherten Fettgewebe unterscheiden. Einige Studien zeigen, dass bei stammzellenangereicherten Fettgewebe ein Karzinom induziert werden kann [53, 60, 70, 139]. Eindeutige Nachweise dafür liegen jedoch nicht vor. Auch bei anderen Augmentationsverfahren mit Fettgewebe, wie bei freien oder gestielten Lappen, werden die ortsständige Stammzellen mittransplantiert, ohne das ein erhöhtes Risiko für Tumorinduktion nachgewiesen werden konnte [46, 100].

In einer große Langzeitstudie von Illouz et al. [59] konnte keine Korrelation zwischen einer Fettgewebettransplantation und einem erhöhten Tumorrisiko nachgewiesen werden und aktuell wird eine Tumorinduktion sowohl durch stammzellangereicherte als auch durch nicht angereicherte Fetttransplantationen nicht angenommen [100].

Einen wichtigen Punkt stellt eine adäquate präoperative Aufklärung der Patienten über die offene Studienlage [97, 100] zum Thema Tumorinduktion und mögliche daraus resultierende Folgen dar. Da es sich bei einer Fettgewebettransplantation stets um einen elektiven Eingriff handelt, sollten sowohl die allgemeinchirurgischen auch als die ästhetischen Komplikationen des Eingriffs mit den Patienten ausführlich besprochen und die schwierigsten Verläufe geschildert werden.

Neben den allgemeinen postoperativen Komplikationen wie Infektion-, Hämatom-, Ödembildung und Schmerzen [11, 13, 22, 23, 33, 55, 107], wurden in 3 Fällen

schwerwiegende postoperative Komplikationen beschrieben. Bei zwei Patienten kam es nach der Fettinjektion im Gesichtsbereich zur Bildung von cerebralen und okularen Embolien [29, 36] und bei einem Patienten wurde über eine Sepsis berichtet [124]. Das Auftreten der Embolien kann durch eine Nutzung von stumpfen Injektionskanülen reduziert, bzw. vermieden werden [107].

Zu den Nachteilen der autologen Fettgewebetransplantation gehört die eingeschränkte Kontrollierbarkeit der Injektionen und somit der Form, wodurch Überkorrekturen, Clumping und Konturunregelmäßigkeiten entstehen können [22]. Das ästhetische Ergebnis kann durch die Migration [20] oder durch Indurationen [55] des Fetttransplantats beeinträchtigt werden.

Die im Verlauf auftretende Volumenreduktion des Transplantats beeinflusst stark die kosmetischen Resultate der Transplantation. Die Aussagen der Studien zur Volumenreduktion und Resorptionsraten sind sehr different und die Persistenz der vitalen Zellen variiert zwischen 10% [34] über 20-25% [38, 73, 76] bis auf 80% [93]. Die Überlebensrate des transplantierten Fettes wird bei den meisten Autoren zwischen 40%-60% angegeben [8, 64, 83, 90, 92, 118, 132].

Bis dato stellt jedoch die Frage nach dem Volumenverlust und dem Zusammenhang zwischen dem Überleben, bzw. dem Verhalten des Fettgewebes nach der Transplantation und dem Volumen des Transplantats einen offenen Aspekt dar.

Es haben sich zwei Hauptklärungsmodelle für das Überleben der autologen Fetttransplantate etabliert [6]. Beide Modelle wurden von Peer 1955 aufgestellt [89]. Im Laufe der Zeit wurden sie zwar abgewandelt, der Ansatz blieb jedoch erhalten. Die „*cell survival theory*“ [89, 90] beschreibt, dass das Überleben des Fetttransplantats vom Überleben des einzelnen Adipozyten abhängt. In der „*replacement theory*“ [6, 89] wird das transplantierte Fettgewebe durch die sie abbauende Gewebemakrophagen ersetzt. Bis dato ist es nicht eindeutig geklärt, ob das transplantierte Fettgewebe in gewissem Anteil persistiert oder ob die transplantierten Adipozyten absterben und an Stelle dessen im Verlauf neue Adipozyten aus den Vorläuferzellen entstehen und das Volumen des Fetttransplantates bilden [102].

Die Fettgewebetransplantation stellt seit Jahrzehnten ein wichtiges Thema der plastischen Chirurgie dar. Der Frage nach dem Überleben des transplantierten Fettgewebes wird in vielen *in vivo* Studien erneut nachgegangen.

Diese Frage stellt auch den Ausgangspunkt unseres Vorhabens dar. Durch online Zelltracking *in vivo* sollte ein Modell zur Evaluierung der Mikrofettttransplantation etabliert werden. Es wurden entsprechende Forschungsschwerpunkte behandelt:

- Entwicklung eines neuen Modells für Adipozytenclustertransplantate
- QDots als Tracer für online Imaging für Adipozytencluster *in vivo*.

## **4.2 Adipozytencluster als Transplantationseinheit**

Die Neuartigkeit unserer Methode besteht in der Verwendung von Adipozytenclustern. Es gibt vereinzelt Studien, die die Adipozytencluster als Transplantationseinheit benutzen [84, 98]. In den bisher durchgeführten Studien wurden entweder isolierte Adipozyten [102], isolierte Präadipozyten [50, 101, 126], Zellgemische [21, 102, 109], oder mit Stammzellen angereicherte Zellgemische [53] angewandt.

Als Adipozytencluster wird eine Weichteileinheit bezeichnet, die nach der mechanischen Gewinnung nicht mehr isoliert oder prozessiert wurde. Die gewonnenen Adipozytencluster, die sowohl aus adulten Adipozyten als auch mesenchymalen Vorläuferzellen, u.a. Präadipozyten bestehen, verbleiben im Verband in der gewohnten Matrix. Aus unserer Sicht ergibt sich aus dem Verzicht auf weitere Verarbeitungsprozesse ein Vorteil gegenüber den isolierten Zellen. Die Transplantation von Adipozytenclustern entspricht aktuell der *in vivo* Situation bei Mikrofettttransplantation und ist somit besser auf die klinische Situation übertragbar. Die klinische Durchführbarkeit der Transplantationen ist erleichtert, wenn das gewonnene Material keinen weiteren, oft technisch komplizierten Prozessen unterzogen werden muss. Durch die Verwendung weiterer Verarbeitungsprozesse könnte es zu Veränderungen des Fetttransplantates im Sinne eines Arzneimittels kommen [41, 97]. Somit müsste die Anwendung des prozessierten Fettgewebes unter Umständen durch eine Erlaubnis nach dem Arzneimittelgesetz geregelt werden [41, 97]. Ein anderer wichtige Vorteil der Adipozytencluster besteht im Vorhandensein von zusätzlichen Signalstoffen (z.B. Wachstumsfaktoren), die das

Überleben der Transplantate unter anderem durch ihre angiogene Fähigkeiten unterstützen und durch die Zellisolation verloren gehen würden.

Nachteile bei den Adipozytenclustertransplantaten im Vergleich zu isolierten Einzelzellsuspensionen ergeben sich durch die Schwierigkeit der Anwendung üblicher Zellkulturmethoden, wie der Flowzytometrie oder wie Assays, etc. Die exakte Zelldifferenzierung oder eine Größenbestimmung der Zellen ist in einem Adipozytencluster nur eingeschränkt möglich. Zudem ist die mikroskopische Beurteilung oder die Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau nur bedingt möglich und die Ergebnisse können teilweise nur ungenügend quantifiziert werden.

#### **4.2.1 Gewinnung der Adipozytencluster**

Die murinen Adipozytencluster wurden durch Exzision gewonnen. Es liegen bis dato keine ausreichenden Belege dafür vor, dass die Liposuction eine geringere Apoptoserate aufweist und somit ein schonenderes Verfahren ist als die Exzision. Der Einfluß der Exzision und der Liposuction auf das Überleben der Adipozyten, bzw. Adipozytengemisches wurde bis heute nicht ausreichend ermittelt und die Studien zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Bei Kononas et al. [65] stellte sich die chirurgische Entnahme („*surgically removed*“) sowohl in Bezug auf das Volumen als auch auf die histologische Eigenschaften als eine bessere Form der Fettgewinnung dar. Nach der chirurgischen Entnahme waren sowohl das Gewicht auch als das Volumen neun Monate post transplantationem signifikant größer als nach der Liposuction. Die histologische Beurteilung zeigte bei den durch eine Liposuction gewonnenen („*suctioned*“), am Oberschenkel entnommen (mit 3 mm-Kanüle, perkutan) Adipozytengemischen mehr Fibrosen und Zysten. Auch in der Studie von Piasecki et al. [94] konnten signifikant mehr vitale Zellen nach einer Exzision als nach einer Lipoaspiration beobachtet werden. Bei Nguyen et al. [82] zeigten die operativ entnommenen Fettzellgemische kleinere Verluste des Fettgehaltes und weniger fibrotische Veränderungen als die aspirierten Zellen. Von dem Aspirat wiesen nur 10% der Adipozyten eine intakte Zellmembran auf. Marques et al. [72] ziehen auch die Exzision vor. Bei Pu et al. [98] konnte in der Menge an vitalen Fettzellen kein Unterschied zwischen Exzision und Lipoaspiration festgestellt werden.

Viele Autoren bevorzugen für eine atraumatische Gewinnung eine Aspiration mit unterschiedlichen Kanülen [83, 85]. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen einer mechanischen Liposuktion und einer manueller Aspiration mittels einer Spritze [85, 116]. Bei größeren Fettdepots jedoch, wie bei Menschen vorhanden, hat sich die Lipoaspiration als beste Form der Fettgewinnung herauskristallisiert [20, 21, 72, 94, 137, 138]. Die Lipoaspiration ist ein Eingriff, der deutlich weniger invasiv als eine operative Fettgewebeexzision durchgeführt wird. In der Literatur sind mehrere Lipoaspirationstechniken und dessen Optimierungen beschrieben [21, 43, 62, 94, 100], das Grundverfahren basiert jedoch auf der von Coleman [18, 20, 21] entwickelten Methode. Ein wichtiger Faktor einer atraumatischen Aspiration ist ein niedriger Sog [43, 83, 100]. Bei einer Gewinnung von Präadipozyten ist die Aspiration der Exzision vorzuziehen [126].

In unserer Studie haben wir die Exzision des Fettgewebes bei den Mäusen gewählt, da bei einem Gewicht von 29 g [ $\pm$  5 g] eine atraumatische Lipoaspiration nicht möglich ist [94]. Nur durch eine Exzision konnte eine en block Gewinnung (im Sinne von Adipozytenclustern) erreicht werden. Das Fettgewebe wurde in unserer Studie an unterschiedlichen Stellen exzidiert. Es gibt zwar einige Studien, die der Entnahmestelle eine Rolle zuschreiben [54, 71], die meisten Autoren sind sich jedoch einig und bevorzugen aus rein technischen Gründen die Stellen an denen das Fettgewebe reichlich vorhanden ist [71].

#### **4.2.2 Aufbereitung der Adipozytencluster**

Die von uns benutzten Adipozytencluster wurden in Hinsicht auf die bessere klinische Anwendbarkeit und fehlenden Beweise ohne Zusatz von Medikamenten oder Wachstumsfaktoren vorbereitet und transplantiert. Ein Zusatz von Interleukin 8 [112], Adrenalin [111], Lidocain [111], Insulin [14, 82] oder hyperbarer Oxygenierung [113] haben keine signifikante Besserung der Situation des transplantierten Fettgewebes gezeigt. Manche Medikamente reduzieren sogar die Überlebensrate des transplantierten Gewebes [57, 64, 103] und sollten durch andere Medikamente ersetzt werden, z.B. bei Verwendung eines Lokalanästhetikums sollte Lidocain dem Prilocain [64] vorgezogen werden.

Eine höhere Überlebensrate der Transplantate konnte in mehreren Studien durch Einsatz von Wachstumsfaktoren (Insulin-like Growth Factor 1, Fibroblast Growth

Factor, Vascular Endothelial Growth Factor) [32, 100, 141] erreicht werden. Die Mechanismen, die das Überleben der Fetttransplantate fördern sind bis dato nicht eindeutig ermittelt. Die positive Wirkung der Wachstumsfaktoren greift vermutlich auf die Verbesserung der Angiogenese [100] zurück, eindeutige Belege dafür liegen jedoch nicht vor. Die Anwendung der Wachstumsfaktoren in der Humanmedizin soll sehr streng indiziert und kontrolliert eingesetzt werden, da eine tumorinduzierte Wirkung nicht ausgeschlossen ist. Insgesamt stellt sich die aktuelle Studienlage zur Verwendung von Medikamenten, Hormonen, etc. unklar dar, weshalb bei uns und in vielen anderen Studien [19, 22] auf die Anwendung von Zusatzstoffen verzichtet wurde.

Um die optimalen Parameter für die *in vivo* Versuche festzulegen, wurden die Adipozyten in den *in vitro* Versuchen unterschiedlich aufbereitet. Alle Proben wurden aber sowohl für *in vitro* als auch für *in vivo* Versuche im NaCl 0,9% vor der Weiterverarbeitung gewaschen, bzw. im NaCl 0,9% bei 24 °C aufbewahrt. Sommer et al. [118] präsentiert, dass das entnommene Fettgewebe, auch wenn sie selber keine Unterschiede durch das Waschverfahren feststellen konnten, von den meisten Autoren gewaschen wird. Von uns wurde diese Maßnahme durchgeführt, da es das Überleben des Transplantates verlängern soll [63]. Einerseits wird durch das Waschen das Blut und das zerstörte Restgewebe entfernt und somit das Risiko der Infektion minimiert [10, 56, 57], andererseits wird der Austrocknung und somit der Zerstörung des Fettgewebes durch die Luftexposition vorgebeugt [57, 63]. Marques et al. [72] zeigten, dass durch Waschen die Entzündungsmediatoren eliminiert werden und somit das Überleben des Fetttransplantates verbessert wird. Manche Autoren benutzen kein Waschverfahren, da sie eine Entfernung von Gewebeflüssigkeit mit Mediatoren, Hormonen, etc. vermeiden wollen [20, 65, 76].

Mit Ausnahme des Versuchs zur Ermittlung der Inkubationsmedien (s. 2.2.6.4) haben wir sowohl für das Waschen als auch für die Aufbewahrung des Fettgewebes wie die meisten Autoren [67, 84, 85, 108, 109] NaCl 0,9% benutzt. Nur in der Studie von Chajchir et al. [12] wird von der Verwendung des NaCl 0,9% abgeraten, da NaCl 0,9% zur Veränderung der Morphologie des Fettgewebes und Verlust von Fibrin führt. Smith et al. [116] vergleichen sechs unterschiedliche Aufbereitungsverfahren und stellen fest, dass es keine Unterschiede zwischen Aufbewahrungsmedien (NaCl 0,9% und Ringerlactat) und zwischen unterschiedlichen Wasch- und Zentrifugationsverfahren gibt.

Da das Zentrifugieren unabhängig von der Anzahl der Umdrehungen und der Zeit keinerlei Vorteile im Bezug auf das Überleben des Fettgewebes [8, 61, 106, 116] zeigt und bei Adipozytencluster keinen Sinn ergibt, haben wir auf das Verfahren verzichtet. Eine Zentrifugation als Reinigungsverfahren [88] birgt die Gefahr mit sich das Fettgewebe zu zerstören und kann zum Verlust der Vorläuferzellen [63], die sich aufgrund der höherer Dichte absondern und absetzen, führen.

#### **4.2.3 Transplantation von Adipozytenclustern**

Direkt nach der Aufbereitung (bis auf die kühlauflbewahrten Adipozytencluster) wurden die Adipozytencluster durch eine Injektion transplantiert. Wetmore et al. [132] zeigten, dass es keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf Volumen und histologischer Beurteilung zwischen Injektion und Implantation gibt. Da die Injektion ein weniger invasives Vorgehen darstellt als die operative Implantation und auf die klinische Situation besser übertragbar ist, wurden die Adipozytencluster mit einer Strauß-Kanüle mit 15 G injiziert. In den Studien werden unterschiedliche Kanülengrößen meistens zwischen 14 G und 18 G [22, 33, 34, 38] verwendet. Die Kanülengröße wird in Abhängigkeit vom Injektionsort [24] festgelegt. Die von uns verwendete Kanüle ist mit einem Durchmesser von 15 G für eine murine Injektion groß, es ist jedoch die kleinstmögliche Kanülengröße mit der eine Injektion von Adipozytenclustern möglich war. Die Injektionen wurden immer mit Anästhesie durchgeführt und die Tiere erhielten postoperativ Analgetika. Die Injektionsstelle wurde immer mit einem Hautkleber verschlossen um den Austritt des Transplantats zu vermeiden. Die Adipozytencluster wurden subkutan injiziert. Die subkutane Durchblutung ist bei einer Maus gut ausgebildet, was eine Voraussetzung für eine gelungene Fettgewebettransplantation darstellt [82, 134]. Subkutan kann das Transplantat gut beobachtet und das Volumen des Adipozytentransplantats gut gemessen werden. Die subkutanen Injektionen werden auch im klinischen Alltag durchgeführt. Nicht zuletzt ist der Grund einer subkutanen Injektion die geringe Invasivität und somit die bestmögliche Schonung der Tiere. Die Adipozytencluster wurden ca. 1-2 cm entfernt von der Einstichstelle injiziert. Durch diese Untertunnelung und retrograde Injektion konnte ein Austritt der injizierten Adipozytencluster vermieden, bzw. stark reduziert werden [22, 63]. Da bei Mäusen kaum Subkutangewebe vorhanden ist, wurden die Injektionen technisch bedingt nicht in multiplen Schichten [100] durchgeführt. Die Transplantate wurden in

„drop-to-drop“ oder perlenschnurartiger Technik [21, 31, 38, 59] eingebracht, was zur Verbesserung der Durchblutung und somit des Überlebens des Transplantates beitragen soll. Da es sich in fast allen Studien [15, 23, 63, 90] gezeigt hat, dass die kleinen Transplantate durch den besseren Kontakt zu Empfängergeweben bessere Vaskularisationsmöglichkeit entwickelt, haben wir kleine Mengen von max. 1ml [84] Adipozytenclustern injiziert. Da große Transplantate oft zentrale Nekrosen [57, 122] bilden, die durch eine Minderdurchblutung des zentralen Areal entstehen, reduzierten wir im Verlauf die Transplantatmenge auf 0,5 ml.

#### **4.2.4 Beurteilung der Adipozytencluster**

Bis dato gibt es keinen ultimativen Test zur Beurteilung der Vitalität der Adipozyten *in vitro* [51].

Die frisch entnommenen Adipozytencluster wurden histologisch beurteilt. In einem Adipozytencluster ermöglicht eine lichtmikroskopische Beurteilung zwar die Darstellung der Zellverhältnisse, der Vaskularisation, etc. untereinander, eine genaue Qualifizierung und Quantifizierung der Zellen in einem Cluster ist jedoch nicht möglich.

Mithilfe von Trypanblau [8, 94] wurde die Vitalitätsbestimmung der Zellen im Adipozytencluster versucht. Die Trypanblaufärbung ist eine für Adipozyten unspezifische Färbung, die bei isolierten und suspensierten Zellen angewandt wird. Die Färbung erlaubt nur eine orientierende Einschätzung, da bei einer längeren Wirkungszeit das Trypanblau zu Zellapoptose führen und somit die Ergebnisse falsch negativ beeinflussen kann [51].

Eine Vitalitätsbeurteilung mittels Trypanblau in einem Adipozytencluster war nicht möglich: Das Trypanblau braucht unterschiedliche Zeitintervalle um die Zellen, die im Inneren und die am Rand des Adipozytencluster platziert sind anzufärben. Durch die längere Einwirkzeit des Trypanblau sind die randplatzierten Zellen stärker dem Farbstoff ausgesetzt, was zur Nekrose der Zellen führen und somit die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung stark beeinflussen kann. Die Quantifizierung der vitalen versus der avitalen Zellen mittels Trypanblau ist in einem Adipozytencluster nicht möglich. Um die Anzahl der vitalen Adipozyten in einem Cluster bestimmen zu können, müssten die isolierten Zellen mit Trypanblau angefärbt werden. Durch einen

Isolierungsprozess werden die Adipozyten ihre Vitalität weiter verschlechtern, weshalb das Ergebnis keine Rückschlüsse auf den Adipozytencluster erlaubt.

Bei einem Adipozytencluster ist sowohl die histologische Beurteilung als auch die Vitalitätsbeurteilung mit Trypanblau nicht sinnvoll anwendbar, da durch die Überlagerung der Zellen in einem Cluster keine Quantifizierung der vitalen, bzw. den avitalen Zellen möglich ist.

#### **4.2.5 Präadipozyten**

Ein Gramm humanes Fettgewebe enthält mehr als 350.000 Präadipozyten [126] und in den zahlreichen Studien, die die Präadipozyten mit den Adipozyten vergleichen [21, 62, 79, 119] konnten einige Vorteile der Präadipozyten in Bezug auf die Transplantationserfolge gezeigt werden: Die Präadipozyten sind widerstandsfähiger [6, 21, 101], zeigen ein längeres Überleben ohne Ernährung [126], einen niedrigeren Sauerstoffbedarf [133] und eine höhere Toleranzschwelle gegenüber Ischämie [101], durch u.a. ein besseres Überleben der initialen hypoxischen Phase [35] als die Adipozyten. Die transplantierten mesenchymalen Vorläuferzellen können sich einerseits zu Adipozyten und andererseits zu endothelialen Zellen weiterdifferenzieren, wodurch sie die Angiogenese und somit das Überleben des Gewebes verbessern [78, 96, 138].

Die mesenchymalen Vorläuferzellen können entweder rein, ohne reife Zellen oder als Mischinjektion aus Präadipozyten angereicherten Adipozyten transplantiert werden [53].

Die Konturdefizite, die kein volumenauffüllendes Vorgehen brauchen, können nur mit Präadipozytentransplantationen korrigiert werden [101]. Da jedoch die Volumenzunahme, Form und Größe der transplantierten Präadipozyten schwer voraussagbar ist, werden häufiger Mischinjektionen, die eine bessere Steuerbarkeit des kosmetischen Ergebnisses zeigen, benutzt [101]. Da der Volumeneffekt bei einer reinen Präadipozyteninjektion nicht ausreicht, empfehlen Herold et al. [53] stammzellangereicherte Transplantationen sowohl zur Mammaaugmentation als auch zur Behandlung der Wunden und der Narben. Yoshimura et al. [137, 138] konnten bei den mit mesenchymalen Vorläuferzellen angereicherten Lipoaspiraten keine signifikant besseren Ergebnisse sowohl bei der fazialen Atrophie als auch bei

der Mammaaugmentation erreichen. Bei der Mammaaugmentation mit stammzellangereicherten Fetttransplantation konnten im Verlauf kleine zystischen Formationen und Mikrokalzifikationen und somit das potentiell verstärkte Risiko für Mammakarzinominduktion beobachtet werden [137].

Die Präadipozyten in unserer Arbeit wurden modifiziert nach Rieck [101] gewonnen, aber nach der Gewinnung wurde das Zellsediment nicht weiter verarbeitet. Es wurde anders als bei Yoshimura et al. [138], wo die Erythrozyten durch eine hypotone Lösung aus dem Vorläuferzellengemisch entfernt wurden, auf die weitere Isolierung der Präadipozyten durch mechanische (z. B. Sieb) oder enzymatische (z. B. Lyse-puffer) Prozesse verzichtet um einerseits die mögliche Apoptose der Präadipozyten zu vermeiden und andererseits um die bessere Übertragbarkeit auf eine klinische Anwendbarkeit zu gewährleisten.

Um die Anzahl der mesenchymalen Vorläuferzellen in einem Adipozytencluster bestimmen zu können, wurden die Zellen mit Collagenase isoliert und mit Trypanblau angefärbt. Um die potentielle Nekroserate der Zellen zu senken, wurde auf Lyseverfahren und weitere Verarbeitungsprozesse verzichtet. Die histologische Beurteilung wurde durch Verzicht auf die Weiterverarbeitung der mesenchymalen Vorläuferzellen erschwert. Durch Vorhandensein von Erythrozyten und anderen Bindegewebestrukturen war eine ausreichende Qualifizierung (vital versus avital, Abgrenzung von Epithelzellen und Erythrozyten, etc.) und Quantifizierung der Vorläuferzellen nur bedingt möglich. Hier liegt eine deutliche Einschränkung in der Aussagekraft dieser Ergebnisse vor.

### **4.3 QDots als Tracer für Adipozytenclustertransplantate**

#### **4.3.1 *In vivo* Verfolgung der Adipozytenclustertransplantate**

Ein Weg um das Überleben von Adipozytenclustertransplantaten verfolgen zu können, ist die Beobachtung der Transplantate *in vivo*. Bis dato wurden meistens klinische Studien ohne objektivierte Ergebnisse [63] wie Patientenfotos mit Beschreibungen [11, 13, 15, 33, 66, 73], Patientenbeurteilungen (z.B. nach Zufriedenheit) [39], case reports [36], retrospektive Review [61], Literatur Review [71] zur Beurteilung des transplantierten Fettgewebes hinzugezogen.

Die Messung des Volumens als Outcome-Kriterium für den Erfolg des Fetttransfers stellt eine von den ältesten [26, 90] und sehr häufig verwendeten Meßmethoden [65, 114] dar. Die Einbeziehung der Volumenmessung als Beurteilungskriterium für eine Fetttransplantation, im Sinne eines gewissen Grades an Vergleichbarkeit der Ergebnisse verlangt jedoch nach einer strengen Auswahl der Transplantatlokalisierung. Nur eine der direkten Messung zugängliche Transplantatlokalisierung und eine Stelle, die frei vom nativen Fett ist, erlauben eindeutige Aussagen zur Quantität des transplantierten Fettes. Bei vielen Autoren wird das Fett in Bereiche transplantiert, die bereits natives Fett erhalten, z.B. Mamma [59, 61]. Durch Vorhandensein des nativen Fettes, ist die Volumenbeurteilung des Fetttransfers eindeutig eingeschränkt. Die Differenz zwischen dem bestehenden und dem transplantierten Fett kann direkt nicht genau und mithilfe der indirekten Meßmethoden wie Ultraschall, MRT oder CT nur eingeschränkt gemessen werden [59, 102]. Eine geeignete Lokalisation des Fetttransfers, wie bei Kononas et al. [65] oder in unseren Versuchen subkutan im Rückenbereich ermöglicht ohne aufwendige Testverfahren eine gute *in vivo* Volumendetektion. Die Volumenmessung als Outcome-Kriterium für die Füllerfunktion des Fettes ist sehr gut geeignet, jedoch die Frage nach dem Volumenverlust und dem Zusammenhang zwischen dem Überleben, bzw. dem Verhalten des Fettgewebes nach der Transplantation und dem Volumen des Transplantats stellt keinen direkten Zusammenhang dar.

Es gibt bislang jedoch keine entsprechenden Tracersubstanzen mithilfe dessen man das Fettgewebe markieren und somit das Vorhandensein und das Überleben des transplantierten Fettgewebes *in vivo* verfolgen könnte [4].

Rieck et al. [101, 102] haben die Fetttransplantate mit PKH 26 markiert. PKH 26 ist ein Tracer, der zum Markieren von einer Einzelsuspension eingesetzt werden kann, jedoch keine *in vivo* online Untersuchungen ermöglicht.

Hemrich et al. [50] markieren die humanen Präadipozyten mit PKH 26, CM-Dil und CFSE. Nach 35 Tagen konnte nur noch eine schwache Fluoreszenz *in vitro* gemessen werden. Wegen der deutlichen Toxizität sind die Marker, v.a. CM-Dil und CFSE für *in vivo* Versuche weniger geeignet.

Laut Rennekampff et al. [100] ist eine Quantifizierung des Transplantates mit einem Evidenzgrad III mittels MRT möglich. Andere Autoren weisen die Fetttransplantate

entweder mithilfe des MRT [52, 55, 59, 86, 121, 137] oder des CT [59, 125, 137] nach. Laut Hyakusoku et al. [55] kann transplantiertes Fettgewebe in der Mamma mittels Mammographie oder Ultraschall beurteilt werden.

Die bildgebenden Verfahren wie MRT, CT oder 3D-Fotografie können als Screeningsuntersuchungen nach einer Fetttransplantation eingesetzt werden, die Beurteilung des Fetttransplantats ist jedoch mit den Verfahren sehr eingeschränkt möglich, da oft die Unterscheidung zwischen dem transplantierten und dem bestehenden Fettgewebe nicht möglich ist. Für die Beurteilung der Vitalität und des Überlebens des Fetttransplantats ist MRT oder CT nicht geeignet [102].

Die Neuartigkeit unserer Methode bestand in der Verwendung von QDots als Tracer für die Adipozytencluster. Durch die fluoreszierenden Eigenschaften dieses Halbleiters kann verschiedenes Gewebe [75, 95, 105, 142] geortet werden. Diese Eigenschaft wurde auch für das transplantierte Fettgewebe angewendet. Yukawa et al. [140] benutzten die CdSe/ZnS-QDots mit kationischen Liposom für die Markierung von mesenchymalen Vorläuferzellen. Die Eigenschaften der QDots können durch Targeting mit Liganden, Oberflächenproteinen, Antikörpern, etc. verändert werden [2, 75]. Dadurch kann die Affinität der QDots zu unterschiedlichen Geweben festgelegt werden. Somit können beispielweise einzelne Tumore markiert werden. Adipozyten wurden bis dato noch nicht mit QDots markiert.

In unserer Studie wurden unkonjugierte direkt im Wasser synthetisierte [105] CdTe-QDots benutzt. Es wurden zuerst die Verwendung, der Einfluss und die allgemeine Eigenschaften der QDots auf die Adipozyten untersucht.

Trotz der negativen Ladung der QDots, die durch die Carboxylgruppe entsteht und der durch die Phospholipide negativ geladenen Adipozytenzellmembran, passieren die Nanopartikel die Zellmembran und werden im Zytoplasma der Adipozyten, wie von uns in der Lasermikroskopie nachgewiesen werden konnte, aufgenommen. Die Aufnahme ins Zellinnere passiert entweder passiv oder mithilfe von Proteinen *via* „piggy back“-Mechanismen. Sowohl im Zellkern auch als in der Fettvakuole konnte keine QDots-Aufnahme beobachtet werden. Die QDots-Größe von über 4 nm kann ein Passagenhindernis der QDots für Zellkerne darstellen [80]. Bei Yukawa et al. [140] lagerten sich die QDots im Lysosom, Cytoplasma und Perinuclearregion der mesenchymalen Vorläuferzellen an, aber nicht im Zellkern.

Bei Hardman et al. [48] werden die QDots die Größe kleiner 2,2 nm aufweisen im Zellkern beobachtet.

#### **4.3.2 QDots als Vitalitätsmarker**

Ob die QDots einen geeigneten Vitalitätsmarker für die Adipozytencluster darstellen, sollte im indirekten Vergleich der Adhäsion der QDots an vitalen und avitalisierten Adipozytencluster festgestellt werden.

*In vitro*, direkt nach der Inkubation zeigten die thermisch avitalisierten (bei 90 °C) und danach mit QDots inkubierten Adipozytencluster ein viel stärkeres Fluoreszenzsignal als die vitalen Adipozytencluster. Nach dem zweimaligen Waschprozedere mit NaCl 0,9% ist das Signal stark abgefallen und war bei den avitalisierten eindeutig kleiner als bei den vitalen Adipozytencluster. Damit wird impliziert, dass die QDots zwar besser an die zerstörten zytoplasmatischen Zellbestandteile der avitalisierten Adipozytencluster adhäreren, jedoch durch Waschprozedere entfernt werden können.

*In vivo* war die absolute Fluoreszenzsignalstärke bei den avitalisierten Adipozytenclustern sowohl in der QDots- als auch in der Indocyaningrün-Gruppe schwächer als bei den vitalen Adipozytenclustern. Die vitalen Adipozytencluster nehmen zwar mehr QDots oder Indocyaningrün auf, es ist jedoch schwer möglich eine Aussage zur Korrelation zwischen Vitalität der Zellen in einem Transplantat und der Fluoreszenzsignalstärke zu machen. Aus dem Grund kann kein Zusammenhang zwischen dem Fluoreszenzsignal der QDots und der Vitalität des Adipozytencluster hergestellt werden. Es lag auch eine Abnahme der Fluoreszenz im Verlauf vor, die als „*leaking*“ bezeichnet werden kann und die Beurteilung zusätzlich einschränkt.

#### **4.3.3 Toxizität der QDots**

Die Zytotoxizität der QDots ist bis dato nicht ausreichend untersucht. Manche Autoren sprechen von einer potentiellen Toxizität der QDots [48]. Die Beurteilung der Toxizität der QDots ist bei den unterschiedlichen Arten der QDots (unterschiedliche Größe, Beschichtung, Konjugate, Ladung, etc.), die die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften bestimmen, den unterschiedlichen Applikationswegen und den vielfachen Umweltbedingungen erschwert [48].

In der konfokalen Lasermikroskopie konnten kurzzeitig keine Zeichen des Zellerfalls als Ausdruck der Zytotoxizität nachgewiesen werden. Bei Yong et al. [135] konnten keine histologischen Organveränderungen bei Verwendung von CdSe/Te/CdS-QDots im Mausmodell, auch bei höheren Konzentrationen, beobachtet werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass eine zu hohe Dosierung, zu hohe Konzentration oder zu lange Inkubationszeit ein erhöhtes Risiko für eine Zytotoxizität durch Abbau der Einzelkomponenten der QDots (Cd, Te, Se) darstellt [17, 48, 95, 105]. Die Inkubationsbedingungen wurden im Hinblick auf die Fluoreszenzsignalstärke und potentielle Toxizität, die bei höheren Konzentrationen der QDots oder längerer Inkubationszeit eine Rolle spielen könnte, ausgewählt. Es wurden Parameter ausgewählt, die bei niedriger Konzentration (16 nM für QDots 770 und 9 nM für QDots 790) oder kurzer Zeit (60 min) eine gute Fluoreszenzsignalstärke aufwiesen. Laut Cho et al. [17] ergeben sich zelltoxische Eigenschaften der CdTe-QDots konzentrationsunabhängig bei intrazellulärem Kadmium. Bei Yukawa et al. [140] jedoch ist die Zytotoxizität der mit Lipofectaminen konjugierten QDots 655 auf die mesenchymalen Vorläuferzellen stark von der Konzentration abhängig: Ab 2,0 nM und vor allem über 4,0 nM zeigte sich die QDots zytotoxisch, unter 0,8 nM konnte keine Toxizität beobachtet werden.

Potentiell können Schwermetalle, die durch Abbau der QDots freigesetzt werden, in den Organen (Leber, Niere) akkumulieren und langfristig karzinogen wirken. Die Applikation von CdTe-QDots (15 mg/kg KG) zeigten nach drei Monaten bei der Maus keine pathologischen Veränderungen an der Leber, der Milz, dem Herz oder der Niere [135]. Die Halbwertszeit von Kadmium beträgt jedoch zwanzig Jahre und die Langzeitdaten fehlen noch.

Die meisten Studien zur Überprüfung der Toxizität der QDots wurden durch die Auswertung der intravenösen Injektionen von QDots durchgeführt [105]. Direkte Zellinkubationen mit QDots und dessen Auswirkungen auf die Zellen wurden selten beschrieben.

Es konnte gezeigt werden, dass die Größe der QDots eine wichtige Rolle in der Beurteilung der Toxizität spielt: Größere QDots (> 5 nm) lagern sich im Zytoplasma der Zellen an, kleinere QDots (2-3 nm) dringen bis in den Zellkern hinein [48]. Die QDots, die das Nukleusinnere passieren, werden als toxischer angesehen. Bei den CdTe-QDots, die größer als 5 nm sind und sich ausschließlich im Zytoplasma

ablageren, konnten keine histologischen Veränderungen der wichtigen Organe festgestellt werden [48, 105, 135].

Die Art der Liganden und die an der Oberfläche der QDots konjugierten Substanzen kann die toxischen Eigenschaften der QDots beeinflussen [48]. Die Toxizität der einzelnen Kernkomponenten z.B. Kadmium kann man durch Ummantelung des QDots-Kerns reduzieren [105]. Langzeitstudien zur Beurteilung der Pharmakodynamik und Toxizität der QDots stehen noch aus.

## **4.4 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.4.1 Lasermikroskopie**

Die Verwendung der QDots als Adipozytentracer musste zuerst mithilfe der Lasermikroskopie und der Beurteilung der Lokalisation der QDots in einem Adipozytencluster überprüft werden. Da das Fettgewebe eine sehr schwache Eigenfluoreszenz aufweist [101], war das mit QDots markierte Gewebe sehr gut zu beurteilen. Der lasermikroskopische Nachweis der QDots-Aufnahme in die muren Adipozyten wurde mit CdTe-QDots ohne Veränderung der chemischen oder physikalischen Eigenschaften, wie Koppelung an Trägerpeptide, Veränderung der Ladung oder Konjugation durchgeführt. Die durch Carboxylgruppen negativ geladenen QDots konnten die durch Phospholipiden negativ geladene Zellmembran passieren und wurden in das Zellinnere über verschiedenen Mechanismen wie beispielweise *via* "piggy back"-Mechanismus oder passiv aufgenommen. Vermutlich durch die hydrophile Eigenschaften der CdTe-QDots lagern sich die Moleküle nicht in der Fettvakuole, sondern im Zytoplasma der Adipozyten ab. Es konnte keine Aufnahme der QDots in den Kern der Adipozyten wie bei Nabiev et al. [80] beobachtet werden, was mit der QDots-Größe zusammenhängt. QDots, deren Größe 4 nm [80] oder wie bei Hardman et al. [48] beschrieben 2,2 nm überschreitet, können in den Zellkern nach derzeitigem Erkenntnisstand nicht eindringen.

Die Lokalisation der QDots im Zytoplasma bringt große Vorteile gegenüber der Anreicherung in der Fettvakuole: Durch die Nekrose der Adipozyten wird der Inhalt der Fettvakuolen freigesetzt und somit könnte das Fluoreszenzsignal der im Fett erhaltenen QDots auch nach einer Nekrose der Zellen gleich stark ermittelt werden. Das Zytoplasma der nekrotischen Adipozyten und die in ihm enthaltenen QDots

werden durch Makrophagen aufgenommen und abtransportiert, somit werden die QDots ausgeschieden und das Fluoreszenzsignal reduziert.

Die für die Lasermikroskopie benutzte hohe Konzentration an QDots diente der besseren Nachweisbarkeit der QDots-Lokalisation durch hohe Sättigung der Inkubation. Während der Untersuchung konnte keine akute Zytotoxizität aufgrund der hohen Konzentration detektiert werden, es ist jedoch davon auszugehen, dass eine hohe Konzentration von QDots im Laufe der Zeit eine Apoptose der Adipozyten verursacht.

#### **4.4.2 Tracereigenschaften**

Einige Tracereigenschaften wurden *in vitro* und *in vivo* bestimmt. Ein indirekter Adhäsionstest zeigte, dass *in vitro* die QDots als Tracer an allen sowohl vitalen als auch avitalisierten, als auch kühlauflbewahrten (-20 °C) Adipozytencluster zwar anhaften, jedoch nach anschließendem Waschen vor allem bei den avitalisierten Adipozytencluster die Signalstärke sehr stark abnimmt. Das ist als indirekter Hinweis zu werten, dass bei avitalisierten Zellen die QDots adhären und bei den vitalen Zellen intrazellulär aufgenommen werden, da sie nicht abgewaschen werden.

Ein wichtiger Faktor, der als Voraussetzung für die *in vivo* Versuche erfüllt werden musste, ist die Signalstabilität der inkubierten Adipozytencluster. Wir konnten *in vitro* für die Anfangszeit post transplantationem nachweisen, dass die Fluoreszenzsignalstärke in ersten 100 min weitgehend unverändert bleibt.

In der *in vivo* Langzeituntersuchung konnte gezeigt werden, dass die QDots-Stabilität besser als die Indocyaningrün-Stabilität ist. Indocyaningrün wird biliär ausgeschieden. In unseren Versuchen konnte weder eine biliäre noch eine renale Elimination der QDots über 51 Tage nachgewiesen werden. Es werden zwar die intravenös injizierten QDots renal und über retikuloendotheliales System ausgeschieden [105], wir konnten jedoch weder eine biliäre noch eine renale Ausscheidung messen.

Das Fluoreszenzsignal der QDots nimmt konstant im Laufe der Zeit ab, was hypothetisch durch die langsame Verteilung des Markers im Sinne der Diffusion und vermutlich konstanten Phagozytose und Abtransport durch die Makrophagen erklärt

werden kann. Rieck et al. [101] verzeichnen auch bei PKH 26 einen unklaren Verlust des Fluoreszenzsignals im Verlauf.

Ungeklärt bleibt die Tatsache, dass das Fluoreszenzsignal des QDots ab dem 38. Tag wieder ansteigt. Dies wurde als „*Pooling*“ oder Messfehler interpretiert.

#### **4.4.3 *In vitro* Versuche**

Illouz [57] hat im Jahr 1988 geschrieben: „*The adipocyte is a very fragile cell which has a short life span outside of the body. It is able to live a little longer if it is mixed with normal saline and kept at a moderate temperature. However, it does not tolerate excessive manipulation and major trauma (grinding), and, most importantly, it is very sensitive to infection.*“. Aufgrund dieser Empfindlichkeit, mussten die adäquaten Inkubationsparameter der Adipozytencluster mit QDots *in vitro* orientierend ermittelt werden, um sie dann in *in vivo* Versuchen einsetzen zu können. Als adäquater Parameter wurde ein Parameter, bzw. ein Bereich ausgewählt, in dem das Fluoreszenzsignal am besten detektierbar war. Für die Festlegung der Konzentration und der Inkubationszeit wurde der möglichst niedrigste Bereich, in dem das Fluoreszenzsignal gut detektierbar war, gewählt, um die potentielle Zelltoxizität der QDots (s. 4.3.3) zu vermeiden.

Ein sehr wichtiger Faktor als Voraussetzung für die *in vivo* Versuche ist die Signalstabilität der inkubierten Adipozytencluster. Es konnte nachgewiesen werden (s. 3.5.4), dass die Fluoreszenzsignalstärke *in vitro* in den ersten 100 min unverändert bleibt. Indirekt weist das darauf hin, dass bei den festgelegten Inkubationsbedingungen die QDots in die Zellen aufgenommen wurden und im Adipozytencluster verbleiben. Somit ist die Voraussetzung für die Stabilität des gemessenen Fluoreszenzsignals für *in vivo* Versuche gegeben. Um zu ermitteln, ob das Fluoreszenzsignal weiterhin *in vivo* stabil bleibt oder im Laufe der Zeit an Intensität durch Abbau, Ausscheidung, etc. abnimmt, wurden einige Langzeituntersuchungen *in vivo* durchgeführt.

Die Inkubationsbedingungen sind variabel und hängen von der Art der QDots ab. In unseren Versuchen wurde die Parameterbestimmung ressourcenbedingt jeweils auf eine Art der QDots festgelegt.

Bei allen QDots-Arten steigt die Fluoreszenzsignalstärke proportional zur QDots-Konzentration. Aufgrund der potentiellen Toxizität wurde eine niedrige Konzentration der QDots von 16 nM (QDots 770) und 9 nM (QDots 790) für die Adipozytenclusterinkubation gewählt.

Eine ausreichende Sättigung der Adipozytencluster mit QDots wurde nach ca. 60 und 90 min erreicht. 60 min wurden als Inkubationszeit für ein ausreichendes Fluoreszenzsignal gewählt.

Die Inkubation der Adipozytencluster mit QDots wird durch die Inkubationstemperatur (4 °C, 24 °C und 37 °C) in unseren Versuchen, möglicherweise Methode bedingt, nicht signifikant beeinflusst. Im Bereich zwischen 4 °C-37 °C werden die Eigenschaften sowohl von QDots, z.B. Aggregation der QDots bei niedrigen oder hohen Temperaturen, als auch von Adipozytencluster, z.B. Veränderung der Zellmembranpermeabilität und somit Veränderung der QDots-Aufnahme in die Zelle, nicht signifikant verändert. Da bei 37 °C inkubierten Adipozytencluster die beste absolute Fluoreszenzsignalstärke detektiert werden konnte, wurde diese Temperatur als Inkubationstemperatur festgelegt.

Der Einfluss des Mediums (NaCl 0,9%, Glucose und Ringerlactat) auf die Inkubation und somit die Detektion der Fluoreszenzsignalstärke zeigte signifikante Unterschiede. NaCl 0,9% erwies sich als geeignetes Medium. Auch in den Studien, die den Einfluss des Mediums auf die aufbewahrten Adipozyten untersuchten, wurde NaCl 0,9% als das beste Aufbewahrungsmedium hervorgehoben [67, 84, 85, 108, 109]. Es gibt nur vereinzelt Autoren die Ringerlactat [4, 66, 71, 72, 94] oder sogar Glucose 5% [38] bevorzugen.

In weiteren Untersuchungen sollte einerseits der Einfluss des Mediums auf das Überleben der Adipozytencluster und andererseits die Ursache und die eventuelle Korrelation zwischen Mediumart und Art der QDots ermittelt werden.

#### **4.4.4 *In vivo* Versuche**

##### **4.4.4.1 Präadipozyten**

Für die Präadipozyteninjektionen wurden die Inkubationsparameter benutzt, die für die Adipozytencluster als adäquate Parameter (Inkubationskonzentration von 16 nM,

-temperatur von 37 °C und -zeit zwischen 60 und 120 min) für QDots 675 ermittelt wurden. Bei Yukawa et al. [140] haben sich zwar QDots-Konzentrationen ab 2 nM als zytotoxisch erwiesen, es wurden jedoch andere QDots (QDots 655) benutzt. Zudem wurde das Reagenz „Lipofectamine“ angewendet, was auch toxisch wirken kann.

Die mesenchymalen Vorläuferzellen lassen sich zwar mit den QDots inkubieren, das Fluoreszenzsignal nimmt jedoch rasch ab und ist nach dem 2. Tag post transplantationem mithilfe der *in vivo* Tracing nur noch schwach detektierbar. Da die Präadipozyten nur den Randbereich der Arbeit darstellten und ausschließlich als Vorversuch durchgeführt wurde, bedarf es einer weiteren Abklärung mittels Lasermikroskopie und einer Reihe an *in vitro* Versuchen in denen die optimalen Inkubationsbedingungen für Präadipozyten festgelegt werden, um weitere Aussagen über *in vivo* Tracing und Fluoreszenzsignalbeurteilung machen zu können.

Da die Detektion des Fluoreszenzsignals am 12. Tag auf 16% des Initialsignals abgenommen hat, wurde der Versuch beendet. In der makroskopischen Beurteilung konnte keine Weiterdifferenzierung der Vorläuferzellen festgestellt werden.

Rieck et al. [101] beobachteten auch einen Signalverlust der mit PKH 26 inkubierten Präadipozyten. Die Vitalität der Zellen konnte nur anhand von Zellstruktur und Wachstumsbeurteilung festgestellt werden und nicht anhand des Signals. Rieck et al. [101] interpretierten den Signalabfall mit dem Wachstum der Zellen: Je größer die Zelle desto stärker die Verteilung und somit schwächer das Signal. Da die Präadipozyten nur 12 Tage beobachtet wurden und das Fluoreszenzsignal schon ab dem 2. Tag post transplantationem abnahm, kann diese Theorie in unserem Fall nicht zutreffen. Der Zeitraum von 12 Tagen ist zu kurz um die Entwicklung der Präadipozyten zu beurteilen. Green et al. [45] beobachtete eine Bildung des Fettgewebes („*pad*“) zwar schon nach 1-2 Wochen, jedoch andere Autoren [101] beobachten erst nach Monaten eine Volumenzunahme und Weiterdifferenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten.

Im Vergleich zu der Vaskularisation bei den adulten Adipozyten, die schon am 5. Tag post transplantationem gut ausgebildet war, konnte bei uns im Zeitraum von 12 Tagen keine Neovaskularisation der Präadipozytentransplantate beobachtet werden.

Um eine potentielle Apoptose der Präadipozyten vorzubeugen, müssen die Inkubationsbedingungen neu festgelegt und das Überleben und die Entwicklung der Präadipozyten in einer *in vivo* Langzeitstudie überprüft werden.

#### **4.4.4.2 Vitale versus avitalisierte Adipozytenclustertransplantationen**

Sowohl die vitalen als auch die avitalisierten Adipozytenclustertransplantationen wurden über 51 Tage *in vivo* beobachtet.

Die Transplantationen der avitalisierten Adipozytencluster wurden als Kontrolle durchgeführt: Einerseits um die Autofluoreszenz des Tracers (QDots oder Indocyaningrün) auszuschließen, andererseits um die Traceraffinität zu den avitalisierten Adipozytenclustertransplantate zu beurteilen und nicht zuletzt um die Entwicklung der vitalen versus der avitalisierten Adipozytencluster zu beurteilen.

Die avitalisierten Adipozytencluster zeigten eine reduzierte absolute Fluoreszenzsignalstärke im Vergleich zu den vitalen Adipozytenclustertransplantationen sowohl in der Gruppe mit QDots als auch in der Gruppe mit Indocyaningrün (s. 3.6.2.2 versus 3.6.2.3). Es kann somit angenommen werden, dass die avitalisierten Adipozytencluster weniger QDots oder Indocyaningrün aufnehmen als die vitalen, was für einen aktiven Mechanismus und eine intrazelluläre Aufnahme spricht.

In allen untersuchten Gruppen kann eine Abnahme des Fluoreszenzsignals beobachtet werden, was entweder mit Untergang der Adipozytencluster oder mit einer Reduktion des Tracers im Sinne eines „Leakings“ durch Phagozytose, Ausscheidung, etc. zusammenhängen kann.

Die QDots zeigen sowohl in der Gruppe der vitalen als auch der avitalisierten Adipozytencluster eine langsamere Fluoreszenzsignalreduktion als Indocyaningrün, was mit der oben (s. 3.3.1.1) beschriebenen Ausscheidung des Indocyaningrüns zusammenhängt.

Das Fluoreszenzsignal der avitalisierten Adipozytencluster mit Indocyaningrün zeigt eine Analogie zu dem Fluoreszenzsignal der vitalen Adipozytencluster mit Indocyaningrün. Im Vergleich zu dem Indocyaningrün-Fluoreszenzsignal ohne Adipozytencluster besteht jedoch keine Korrelation im Fluoreszenzsignalverlauf, was

gegen die Autofluoreszenz spricht und als eine passive Aufnahme des Farbstoffs durch Zellbestandteile interpretiert werden könnte.

Der vor allem in den Indocyaningrün-Gruppen primär auftretende Anstieg des Fluoreszenzsignals im Laufe der Zeit könnte auf das „*Pooling*“, das durch das Organisieren der Transplantate in eine kugelförmige Struktur zustande kommt, zurückzuführen sein. Die ursprünglich perlenkettenartige Injektion der Adipozytencluster organisierte sich im Laufe der Zeit durch die Bewegung der Tiere [115] zu einer kompakten runden Struktur, was in unserer histologischen Untersuchung gezeigt wurde. Somit könnte der Anstieg der ermittelten Fluoreszenzstärke durch das „*Pooling*“ beeinflusst worden sein.

In allen untersuchten Gruppen sowohl mit QDots als auch mit Indocyaningrün konnte das Fluoreszenzsignal nur an den Stellen des Transplantats und nicht in der Umgebung ermittelt werden, was auf eine gute Tracerstabilität der inkubierten Adipozytencluster deutet.

Makroskopisch konnten die Transplantate über 51 Tage in allen Gruppen gut beobachtet werden. Nachdem eine leichte Volumenabnahme des 1 ml-großen Adipozytenclustertransplantats festgestellt wurde, wurde in weiteren Versuchen die Transplantatgröße auf 0,5 ml reduziert: Die kleineren Transplantate sollten ein höheres Überleben durch bessere Vaskularisation aufweisen [15, 23, 63, 90, 122].

Für die kleineren Transplantate kann eine Versorgung anfangs durch Osmose [56, 65] und Mitversorgung von benachbartem Gewebe und später durch Vaskularisation gewährleistet werden. Die Transplantation von kleineren Mengen an Adipozytencluster führt zu weniger Ischämie und somit zu kleineren Resorptionsraten und weniger Apoptose [42, 64, 81, 90, 100, 127].

In der Beurteilung der Vaskularisation konnten makroskopisch eindeutige Unterschiede zwischen den vitalen und den avitalisierten Transplantaten festgestellt werden: Die vitalen Adipozytencluster zeigten teils bereits am 5. Tag post transplantationem ein Einsprossen der Blutgefäße und nach 51 Tagen eine gute Vaskularisation der Transplantate. Im Gegensatz dazu konnte bei den avitalisierten Transplantaten keine Vaskularisation nach 51 Tagen festgestellt werden.

Bei Langer et al. [67] konnte *in vivo* mittels skinfold chamber schon am ersten Tag post transplantationem im Randbereich und am dritten Tag im Zentralbereich eine gute Durchblutung beobachtet werden. Am 12. und 21. Tag konnten sie eine nochmalige Steigerung der Vaskularisation feststellen. Bei Nishimura et al. [84] konnte mittels high-power field Mikroskopie und Immunhistochemie eine gute Revaskularisation ab dem 7. Tag post transplantationem beobachtet werden, nach dem 30. Tag konnte ein Vaskularisationsplateau festgestellt werden. Der Beginn und der Verlauf der Vaskularisation in den Transplantaten differiert zwar ein wenig in unterschiedlichen Studien, es ist jedoch unumstritten, dass Vaskularisation die entscheidende Rolle für das Überleben des Transplantates spielt. Yamaguchi et al. [134] haben gezeigt, indem sie die Vaskularisation des Transplantats inhibiert haben, dass sowohl das Volumen als auch die Funktion der Zellen des Transplantats herabgesetzt wird.

Die Volumenabnahme zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den vitalen und den avitalisierten Adipozytenclustertransplantaten: Nach 51 Tagen konnte 49% des Volumens der vitalen Adipozytencluster und 29% des Volumens der avitalisierten Adipozytencluster detektiert werden. In der Studie von Kononas et al. [65] und vielen anderen Autoren (s. 4.1) wurden für die vitalen Transplantate ähnliche Ergebnisse erzielt.

Die von außen beobachtete Morphologie in den beiden Gruppen wies keine Differenzen auf. Diese Beobachtung zeigt, dass die Adipozytencluster unabhängig von der Vitalität der Zellen eine Funktion des Füllers erfüllen [123]. Smahel et al. [115] zeigten, dass auch nekrotisches Material (bei denen 60%) oder die Ölzysten eine erfolgreiche Augmentation erreichen lassen und somit die Volumenfunktion erfüllen.

Nach der Transplantation organisierten sich sowohl die vitalen als auch die avitalisierten Adipozytenclustertransplantate zu einer klar abgrenzbaren, subkutan frei verschiebbaren runden Struktur, die vermutlich durch die Bewegung der Tiere diese Form annahm [115] („*Pooling*“).

Nach der Exstirpation stellten sich die Transplantate makroskopisch different dar: In den vitalen Adipozytenclustertransplantaten kamen anfänglich multiple kleine Ölzysten vor, die sich im zeitlichen Verlauf zugunsten einer zystischen prall-

elastischen Struktur entwickelten, die einen erheblichen Anteil des Transplantats bildeten. Die avitalisierten Adipozytenclustertransplantate stellten sich als eine große Ölzyste dar.

Die Volumenabnahme und die morphologischen Merkmale, z.B. Vaskularisation der vitalen und die nicht vorhandene Vaskularisation der avitalisierten Adipozytenclustertransplantate zeigten keinen Unterschied zwischen der QDots- und der Indocyaningrün-Gruppe. Deswegen wird von uns eine Unabhängigkeit des Transplantationsergebnisses vom Tracer angenommen.

In der mikroskopischen Beurteilung konnten ebenso Differenzen zwischen vitalen und avitalisierten Adipozytenclustertransplantaten festgestellt werden. Die vitalen Transplantate zeigten nach 51 Tagen post transplantationem ein Mischbild aus Adipozyten, Vorläuferzellen, Bindegewebestrukturen, Blutkapillaren und Ölzyste, die ca. 50% des Transplantatvolumens ausmachte. Im avitalisierten Adipozytenclustertransplantaten bildet die Ölzyste den größten Anteil des Transplantatvolumens. Im Gegensatz zu den vitalen konnte bei den avitalisierten Transplantaten keine Neovaskularisation dargestellt werden.

Die vitalen Adipozytenclustertransplantate zeigten ein ähnliches histologisches Bild wie bei Wetmore et al. [132] oder anderen Autoren [23, 24, 116] mit einer Bildung einer das Transplantat umfassenden fibrotischen Kapsel, die sowohl von vitalen Zellen als auch zystischen und nekrotischen Strukturen besteht. Im zeitlichen Verlauf konnte eine Veränderung des Transplantats zugunsten der Ölzyste beobachtet werden, was für das Absterben von Teilen des Transplantates spricht. Zwischen den Zellen konnten wie bei Thanik et al. [122] Blutkapillaren dargestellt werden.

Anders in der Gruppe der avitalisierten Adipozytenclustertransplantate: Hier wurde der Hauptteil des Transplantates von einer Ölzyste, die von einer Kapsel umschlossen ist, gebildet.

In der histologischen Untersuchung konnten sowohl in der Gruppe der vitalen als auch in der Gruppe der avitalisierten Adipozytenclustertransplantate keine Unterschiede zwischen der mit QDots und der mit Indocyaningrün inkubierten Adipozytencluster festgestellt werden.

#### 4.4.4.3 Adipozytenclustertransplantation nach Kühlaufbewahrung

Um gute Ergebnisse zu erzielen werden in der klinischen Anwendung die Fettgewebetransplantationen in mehreren Sitzungen durchgeführt. Einerseits wird dadurch eine bessere Perfusion andererseits eine bessere Kontrollierbarkeit der Form gewährleistet [57]. Um eine gute Füllfunktion zu erreichen benutzen viele Autoren neben der Rezidivinjektionen eine Überkorrektur des transplantierten Volumens [15]. Die vorgeschlagenen Mengen des überkorrigierten Volumens, das nötig ist um gute Ergebnisse zu erzielen, differieren von 10% bis 50% [15, 57, 61, 73].

Um die Invasivität der Rezidiveingriffe zu minimieren, wäre das Fettgewebe einmal zu entnehmen und bis zu den Rezidivtransplantationen aufzubewahren. Die Möglichkeit der Aufbewahrung des Fettgewebes und der Einfluss dessen auf die Adipozyten wurden mehrmals untersucht. Die Ergebnisse bezüglich der Vitalität der Fettzellen stellten sich sehr different dar. Shoshani et al. [114] konnten weder einen signifikanten Volumen- noch Gewichtunterschied zwischen frischem und gefrorenem Fettgewebe nach 15 Wochen feststellen. Auch andere Autoren [38, 71, 107, 108, 118] zeigten gute Ergebnisse des Überlebens des eingefrorenen Fettgewebes.

Matsumo et al. [74] zeigten, dass zwischen den in Raumtemperatur, bei 4 °C und bei -80 °C aufbewahrten Fettgewebe zwar keine anatomischen Unterschiede bestehen, jedoch bei 4 °C in den ersten vier Stunden die meisten Adipozyten apoptische Veränderungen aufweisen. Die Ausbeute ist sowohl was Adipozyten als auch die Vorläuferzellen betrifft bei frischem Fett am höchsten. Andere Autoren [47, 69, 88] erreichen ebenso die besten Ergebnisse mit frischem Fettgewebe und zeigen, dass je länger und je kälter das Fettgewebe aufbewahrt wird, umso mehr die Überlebensrate sinkt.

Die Methoden der Aufbewahrung des entnommenen Fettgewebes sind unterschiedlich. Die Adipozytencluster wurden bei uns wie bei vielen Autoren empfohlen [107, 108] bei -21 °C aufbewahrt. Der Zeitraum für die Aufbewahrung des Fettgewebes unterscheidet sich bei den verschiedenen Autoren stark. Bei Wolter et al. [133] nimmt die Zahl der vitalen Adipozyten im Laufe des Zeit ab. Bei Schmeller et al. [107] wird das Fettgewebe bei -28 °C bis 2 Jahren ohne

Beeinträchtigung aufbewahrt. In Bezug auf die klinische Anwendbarkeit wurde das Fettgewebe bei uns über 40 Tage aufbewahrt.

Für die Aufbewahrung wurde das Fettgewebe schonend eingefroren [108] und aufgetaut [38, 107] um die Apoptose der Zellen durch schnelle Zustandsänderungen und somit eine Denaturierung [107] zu reduzieren. Wolter et al. [133] zeigten, dass die starke Apoptose der Fettzellen, die bei -20 °C aufbewahrt werden, überwiegend durch den Prozess des Einfrierens und des Auftauens und somit durch entstehenden osmotischen Stress hervorgerufen wird. Da Einfrieren in Stickstoff noch extremeren osmotischen Stress und somit höhere Wahrscheinlichkeit der Apoptose der Adipozyten hervorruft [24], wurde trotz partiell guter Studienlage [38, 71] auf das Verfahren verzichtet.

*In vivo*, nach der Transplantation zeigten die kühllaufbewahrten Transplantate nur ein geringgradig schwächeres absolutes QDots-Fluoreszenzsignal und fast die gleiche Fluoreszenzsignalabnahme in den ersten 12 Tagen im Vergleich zu den vitalen Transplantaten. Das makroskopische Bild stellte sich jedoch different dar: Sowohl die Volumenermittlung als auch die Exstirpation der eingefrorenen Transplantate war durch die morphologische Beschaffenheit der Transplantate erschwert. Die Transplantate wiesen eine viel weichere, öligere, deutlich weniger kompakte Konsistenz als die vitalen oder avitalisierten Adipozytenclustertransplantate auf. Die Bildung der Vaskularisation ist schlechter ausgebildet wie bei den vitalen Adipozytenclustertransplantaten. Anders wie makroskopisch, konnten in der histologischen Beurteilung nach den ersten 12 Tagen keine Unterschiede zu dem vitalen Transplantat festgestellt werden. Die Anwendung der kühllaufbewahrten Adipozytencluster scheint möglich, verlangt jedoch Langzeitbeobachtungen.

#### **4.5 Schlussfolgerung und Ausblick**

Ziel dieser Dissertation war eine Überprüfung der Eignung von QDots als *in vivo* Tracer für Adipozytencluster. Mit dem erstmaligen erfolgreichen *in vitro* Einsatz der negativ geladenen QDots als Adipozytentracer wurde die Voraussetzung für eine *in vivo* Anwendung etabliert. Die QDots konnten zum ersten Mal als *in vivo* online Tracer für Adipozytencluster eingesetzt werden. Auch der Einsatz der QDots für *in vivo* Tracing von Präadipozyten wurde in der Arbeit im Rahmen einer Vorstudie durchgeführt. Sowohl die Eignung der QDots als Präadipozytenmarker als auch die

makro- und mikroskopische Entwicklung der transplantierten Präadipozyten haben für die klinische Praxis eine wichtige Bedeutung und nicht zuletzt wird deswegen eine weitere Evaluation mit einer Langzeitstudie benötigt.

Mithilfe des von uns angewandten Modells konnte neben den makroskopischen und histologischen Untersuchungen eine online Verfolgung in verschiedenen Transplantaten durchgeführt und verglichen werden. Durch die Bildung der Kontrollgruppe mit den avitalisierten Adipozytencluster wurden neben den morphologischen und histologischen Beobachtungen der Transplantate, die Eignung der QDots als Vitalitätsmarker für Adipozyten untersucht. Bei den vitalen Adipozytenclustertransplantaten konnte zwar in dem beobachteten Zeitraum von 51 Tagen ein stärkeres Fluoreszenzsignal als bei den avitalisierten detektiert werden, eine Korrelation zwischen der Vitalität der Adipozytencluster und der Fluoreszenzsignalstärke lässt sich jedoch anhand der Untersuchungen nicht ermitteln. Die Erforschung der Korrelation zwischen der Vitalität der Adipozytencluster und des Fluoreszenzsignals bleibt somit ein offener Aspekt, der weitere Untersuchungen erfordert und gleichzeitig die größte Herausforderung für Folgeversuche darstellt. Durch eine Modifikation der QDots-Eigenschaften mithilfe z.B. eines an die Liganden gekoppelten Konjugates, durch Mizellenbildung oder durch Ankoppelung an einen Vektor, könnte das Einsatzspektrum der QDots verändert und somit auf die Vitalität der Adipozytencluster angepasst werden.

Ein durch eine Langzeitstudie bestätigter Nachweis der QDots als Vitalitätstracer in einer *in vivo* online Untersuchung, würde einen Durchbruch in der Verfolgung des transplantierten Fettgewebes darstellen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Transplantation des autologen Fettgewebes spielt in der plastischen Chirurgie sowohl für die rekonstruktiven als auch für die kosmetischen Indikationen eine immer wichtigere Rolle. Die Nachverfolgung des Verbleibs und des Überlebens des transplantierten Fettgewebes war bis dato *in vivo* jedoch nicht möglich.

Ziel unserer Studie war die Etablierung eines Modells, das mithilfe eines Tracers eine *in vivo* online Verfolgung des transplantierten Fettgewebes ermöglicht. Um die Übertragbarkeit auf die klinische Situation zu verbessern, wurden Adipozytencluster statt isolierten Adipozyten oder Präadipozyten als Transplantationseinheit verwendet.

Die Neuartigkeit unserer Methode bestand darin, dass die QDots als *in vivo* Tracer für Fettgewebe eingesetzt wurden. QDots sind speziell hergestellte Nanokristalle, welche im Gewebe mittels einer nahe-infrarot Fluoreszenzanregung detektiert und *in vivo* beobachtet werden können. In unserer Studie konnten wir erstmalig zeigen, dass die negativ geladenen QDots sich an die Basallamina, in der extrazellulären Matrix und im Zytoplasma der Adipozyten anlagern und somit als *in vivo* Tracer für die Adipozytencluster fungieren. Nachdem wir die Bedingungen für die Verwendung der QDots *in vitro* überprüft haben und die adäquate Inkubationsmedium, -zeit, -temperatur, -konzentration, und die Signalstabilität getestet haben, etablierten wir die Funktionalität der Methode *in vivo* in einem balb/c-Mausmodell.

Als Kontrollgruppe zu den QDots wurde Indocyaningrün als *in vivo* Tracer für die Adipozytencluster verwendet. Es konnte weder ein morphologischer noch ein histologischer Unterschied zwischen Transplantaten mit QDots und mit Indocyaningrün beobachtet werden, was auf eine Unabhängigkeit des Adipozytenclustertransplantats vom Tracer hinweist. Durch Anwendung der Kontrollgruppe mit Indocyaningrün konnte ein direkter Vergleich der *in vivo* Tracer mit Beurteilung der Tracereigenschaften wie Fluoreszenzsignalverlauf, Abbau oder Eigenfluoreszenz durchgeführt werden.

Neben der Fluoreszenzdetektion der mit QDots inkubierten und transplantierten Adipozytencluster *in vivo*, wurden morphologische und histologische Untersuchungen, sowie eine Volumenbestimmung der Adipozytenclustertransplantate durchgeführt.

Als Kontrollgruppe zu den vitalen Adipozytenclustertransplantaten wurden avitalisierte Adipozytencluster angewendet und über 51 Tage beobachtet.

Bei den vitalen Adipozytenclustertransplantaten konnten in dem beobachteten Zeitraum ein stärkeres Fluoreszenzsignal als bei den avitalisierten detektiert werden. Die Volumenbestimmung und die makroskopische Beurteilung der beiden Gruppen zeigten keine signifikanten Differenzen auf und deuten auf die Unabhängigkeit der Vitalität des Adipozytenclustertransplantats von seiner Füllerfunktion hin. Die histologische Beurteilung wies ausgeprägte Unterschiede in beiden Gruppen auf: Nicht nur die zelluläre Zusammensetzung der Transplantate (Verhältnis der zystischen Anteilen zu intakten Zellen) sondern vor allem die Vaskularisation stellte sich unterschiedlich dar. Die avitalisierten Transplantate wiesen im Gegensatz zu vitalen Transplantaten keine Neoangiogenese auf, was einen entscheidenden Faktor in der Fettgewebettransplantation darstellt.

Um einen weiteren klinischen Aspekt zu untersuchen, wurden neben den Transplantationen frischer vitalen Adipozytencluster auch die Transplantationen der Adipozytencluster nach einer Kühlaufbewahrung durchgeführt.

Über die ersten 12 Tage konnte bei den bei -21 °C über 40 Tage kühlauflbewahrten Adipozytenclustern nur ein geringgradig schwächeres absolutes Fluoreszenzsignal und ein analoger Fluoreszenzsignalabfall wie in der Gruppe der vitalen Adipozytencluster beobachtet werden. Das histologische Bild zeigte keine signifikanten Unterschiede zu vitalen Adipozytenclustertransplantaten, die makroskopische Beschaffenheit stellten sich jedoch different dar: Im Gegensatz zu den vitalen Adipozytencluster, die sich im Verlauf zur kompakten, frei verschiebbaren Struktur organisierten, war die Konsistenz der kühlauflbewahrten Adipozytencluster viel weicher, weniger kompakt und schlechter abgrenzbar vom umliegenden Gewebe. Die Vaskularisation der kühlauflbewahrten Adipozytenclustertransplantate war eindeutig schlechter ausgebildet als bei den vitalen Transplantaten.

Die erstmalige Verwendung der QDots als *in vivo* online Tracer der Adipozytenclustertransplantate bietet neue Perspektiven und Möglichkeiten in der Fettgewebettransplantation, verlangt jedoch nach weiteren Langzeitstudien, die unter anderem die Toxizität der QDots oder die Korrelation zwischen der Vitalität der Adipozytencluster und dem Fluoreszenzsignal untersuchen.

## 6. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ASC	Adipose-derived Stem Cells
BKG	Background ROI (Hintergrundgeräusch)
BP	Bandpass
CCD	Charge-coupled device
CdTe	Kadmium Tellurid
CdSe	Kadmium Selenid
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIC	Differential interference contrast (Kontrastunterschiede)
et al.	Et alteri (und andere)
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICG	Indocyaningrün, Cardiogreen
IGF-I	Insulin-like growth factor 1
IL-2	Interleukin 2
i.v.	Intravenös
KG	Körpergewicht
LP	Longpass
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natrium Chloride
nM	nmol/l
OD	Optische Dichte
QDots	Quantum Dots
PDGF	Platelet-derived growth factor
p.o.	Per os
p/sec	Photon pro Sekunde
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
ROI	Regions of interest
RT	Raumtemperatur
s.	Siehe
s.c.	Subkutan
SD	Standard deviation (Standardabweichung)

SPF	Specific-pathogen-free
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vergr.	Vergrößerung

## 7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b><u>Abb. 1:</u></b> Murines Fettgewebe .....	12
<b><u>Abb. 2:</u></b> Vaskularisation eines murinen Adipozyten.....	12
<b><u>Abb. 3:</u></b> Vereinfachte Darstellung der adipogenen Differenzierung .....	13
<b><u>Abb. 4:</u></b> Schematische Darstellung der CdTe-QDots.....	16
<b><u>Abb. 5:</u></b> Absorptions- und Emissionsspektrum der QDots 675 und QDots 770 .....	17
<b><u>Abb. 6:</u></b> Chemische Formel des Indocyaningrüns. ....	18
<b><u>Abb. 7:</u></b> Perigonadales Fettgewebe in situ einer balb/c-Maus. ....	21
<b><u>Abb. 8:</u></b> Frisch isoliertes murines Fettgewebe. ....	21
<b><u>Abb. 9:</u></b> Isoliertes murines Fettgewebe vor der mechanischen Dissoziation .....	21
<b><u>Abb. 10:</u></b> Isoliertes murines Fettgewebe nach der mechanischen Dissoziation.....	21
<b><u>Abb. 11:</u></b> Isoliertes Fettgewebecluster nach der mechanischen Dissoziation.....	22
<b><u>Abb. 12:</u></b> Darstellung des Fettgewebes nach Collagenase-Digestion .....	23
<b><u>Abb. 13:</u></b> Lasermikroskop von C. Zeiss, LSM 710 META®. ....	25
<b><u>Abb. 14:</u></b> IVIS® Lumina Imaging System von Xenogen.....	26
<b><u>Abb. 15:</u></b> IVIS® Lumina Imaging System.....	27
<b><u>Abb. 16:</u></b> Fluoreszenzsignalermittlung mithilfe Living Image 3.0 Software®.....	28
<b><u>Abb. 17:</u></b> Darstellung einer Inkubation der Adipozytencluster mit QDots.....	30
<b><u>Abb. 18:</u></b> QDots-Konzentrationsbestimmung.....	31
<b><u>Abb. 19:</u></b> Narkoseeinleitung in der Induktionsbox.....	34
<b><u>Abb. 20:</u></b> Anästhesie in der IVIS-Messkammer. ....	35
<b><u>Abb. 21:</u></b> Isoflurananästhesie .....	35
<b><u>Abb. 22:</u></b> Adipozytenclustertransplantation.....	38
<b><u>Abb. 23:</u></b> Adipozyten in einem murinen Adipozytencluster .....	41
<b><u>Abb. 24:</u></b> Muriner Adipozyt in einem Adipozytencluster.....	41
<b><u>Abb. 25:</u></b> Murine Adipozyten.....	41
<b><u>Abb. 26:</u></b> Adipozytencluster .....	41
<b><u>Abb. 27:</u></b> Mesenchymale Vorläuferzellen mit Erythrozyten.....	42
<b><u>Abb. 28:</u></b> Mesenchymale Vorläuferzelle .....	42
<b><u>Abb. 29:</u></b> Relation zwischen vitalen und avitalen Vorläuferzellengemischen.....	43
<b><u>Abb. 30:</u></b> Absolutes Fluoreszenzsignal <i>in vivo</i> : QDots versus Indocyaningrün.....	44
<b><u>Abb. 31:</u></b> Relativer Verlauf <i>in vivo</i> : QDots versus Indocyaningrün.....	44
<b><u>Abb. 32:</u></b> Tracernachweis in Kotproben.....	45

<b><u>Abb. 33:</u></b> Signalstabilität der vitalen, bei -20 °C aufbewahrten und den avitalisierten Adipozytencluster vor und nach dem Waschprozedere <i>in vitro</i> . .....	46
<b><u>Abb. 34:</u></b> Lasermikroskopische Darstellung der Adipozytencluster .....	47
<b><u>Abb. 35:</u></b> Lasermikroskopische Beurteilung.....	47
<b><u>Abb. 36:</u></b> Lasermikroskopische Darstellung des einzelnen Adipozyten .....	47
<b><u>Abb. 37:</u></b> Anreicherung der QDots in der extrazellulären Matrix. ....	47
<b><u>Abb. 38:</u></b> Lasermikroskopische Adipozytendarstellung.....	48
<b><u>Abb. 39:</u></b> 3D-Rekonstruktion des Adipozytenclusters.....	49
<b><u>Abb. 40:</u></b> Fluoreszenzsignal der QDots <i>in vitro</i> in unterschiedlicher Konzentration. .	50
<b><u>Abb. 41:</u></b> Fluoreszenzdetektion der Adipozytencluster <i>in vitro</i> in unterschiedlicher Konzentration.....	51
<b><u>Abb. 42:</u></b> Fluoreszenzsignal der Adipozytencluster <i>in vitro</i> in der Abhängigkeit von der Inkubationsdauer .....	52
<b><u>Abb. 43:</u></b> Fluoreszenzsignal der Adipozytencluster <i>in vitro</i> mit unterschiedlicher Inkubationsdauer .....	53
<b><u>Abb. 44:</u></b> Fluoreszenzsignal von Adipozytencluster <i>in vitro</i> bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen. ....	54
<b><u>Abb. 45:</u></b> Fluoreszenzsignal von Adipozytencluster <i>in vitro</i> bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen vor dem Waschen, nach dem Waschen und nach 2 Stunden Aufbewahrung .....	55
<b><u>Abb. 46:</u></b> Fluoreszenzsignal der Adipozytencluster <i>in vitro</i> in unterschiedlichen Medien.....	56
<b><u>Abb. 47:</u></b> Signalstabilität der Adipozytencluster <i>in vitro</i> in unterschiedlichen Medien vor und nach dem Waschprozedere.....	56
<b><u>Abb. 48:</u></b> Signalstabilität der Adipozytencluster <i>in vitro</i> in unterschiedlichen Medien im zeitlichen Verlauf.....	57
<b><u>Abb. 49:</u></b> Volumen der Adipozytenclustertransplantate mit QDots versus Indocyaningrün .....	58
<b><u>Abb. 50:</u></b> Adipozytenclustertransplantat nach 51 Tagen post transplantationem.....	59
<b><u>Abb. 51:</u></b> Adipozytenclustertransplantat am 12. Tag post transplantationem .....	59
<b><u>Abb. 52:</u></b> Adipozytenclustertransplantat am 12. Tag post transplantationem .....	59
<b><u>Abb. 53:</u></b> Volumenvergleich der vitalen und der avitalisierten Adipozytenclustertransplantaten.....	60

<b><u>Abb. 54:</u></b> Volumenvergleich der vitalen und der avitalisierten Adipozytenclustertransplantate am 51. Tag post transplantationem.....	61
<b><u>Abb. 55:</u></b> Fluoreszenzsignal der Präadipozyten im zeitlichen Verlauf.....	62
<b><u>Abb. 56:</u></b> Fluoreszenzsignalabnahme der Präadipozyten <i>in vivo</i> .....	62
<b><u>Abb. 57:</u></b> <i>In vivo</i> Messung des Fluoreszenzsignals von den Präadipozyten.....	63
<b><u>Abb. 58:</u></b> Fluoreszenzsignalardarstellung von Präadipozytentransplantat .....	63
<b><u>Abb. 59:</u></b> Fluoreszenzsignal der vitalen Adipozytencluster .....	64
<b><u>Abb. 60:</u></b> Fluoreszenzsignalabnahme der Adipozytencluster .....	64
<b><u>Abb. 61:</u></b> Fluoreszenzdetektion von Adipozytenclustertransplantaten.....	65
<b><u>Abb. 62:</u></b> Fluoreszenzsignal der Adipozytencluster mit Indocyaningrün <i>in vivo</i> .....	66
<b><u>Abb. 63:</u></b> Fluoreszenzdetektion von Adipozytenclustertransplantaten mit Indocyaningrün <i>in vivo</i> .....	67
<b><u>Abb. 64:</u></b> Fluoreszenzdetektion von Adipozytenclustertransplantaten mit QDots versus Indocyaningrün <i>in vivo</i> .....	68
<b><u>Abb. 65:</u></b> Fluoreszenzstärke der avitalisierten Adipozytenclustertransplantate mit QDots versus Indocyaningrün <i>in vivo</i> .....	69
<b><u>Abb. 66:</u></b> Fluoreszenzstärke der vitalen und der avitalisierten Adipozytencluster mit Indocyaningrün. ....	69
<b><u>Abb. 67:</u></b> Fluoreszenzsignal der vitalen und der avitalisierten Adipozytencluster <i>in vivo</i> .....	70
<b><u>Abb. 68:</u></b> Fluoreszenzsignal <i>in vivo</i> der frischen und der kühlauflbewahrten Adipozytencluster .....	71
<b><u>Abb. 69:</u></b> Vergleich zwischen den frischen und den tiefgekühlten Adipozytenclustern .....	71
<b><u>Abb. 70:</u></b> Neovaskularisation des Präadipozytentransplantates .....	73
<b><u>Abb. 71:</u></b> Präadipozytentransplantat am 12. Tag post transplantationem.....	73
<b><u>Abb. 72:</u></b> Präadipozytentransplantat am 12. Tag post transplantationem.....	73
<b><u>Abb. 73:</u></b> Detektiertes Fluoreszenzsignal des Präadipozytentransplantates .....	73
<b><u>Abb. 74:</u></b> Vitales Adipozytenclustertransplantat am 5. Tag post transplantationem..	75
<b><u>Abb. 75:</u></b> Adipozytenclustertransplantat am 5. Tag post transplantationem .....	75
<b><u>Abb. 76:</u></b> Neovaskularisationsbildung des Adipozytenclustertransplantats .....	76
<b><u>Abb. 77:</u></b> Ölzystenbildung bei dem am 12. Tag post transplantationem exstirpierten Adipozytenclustertransplantat.....	76
<b><u>Abb. 78:</u></b> Adipozytenclustertransplantat am 12. Tag post transplantationem .....	76

<b><u>Abb. 79:</u></b> Zystisches Adipozytenclustertransplantat.....	77
<b><u>Abb. 80:</u></b> Adipozytenclustertransplantat am 51. Tag .....	77
<b><u>Abb. 81:</u></b> Exstirpiertes Adipozytenclustertransplantat.....	77
<b><u>Abb. 82:</u></b> Fluoreszenzdarstellung des exstirpierten Transplantats.....	77
<b><u>Abb. 83:</u></b> Adipozytenclustertransplantat mit Indocyaningrün .....	78
<b><u>Abb. 84:</u></b> Adipozytenclustertransplantat mit Indocyaningrün .....	78
<b><u>Abb. 85:</u></b> Fluoreszenzsignal des Transplantats .....	78
<b><u>Abb. 86:</u></b> Adipozytenclustertransplantat mit Indocyaningrün nach 51 Tagen.....	79
<b><u>Abb. 87:</u></b> Fluoreszenzsignal des Transplantats .....	79
<b><u>Abb. 88:</u></b> Avitalisiertes Adipozytenclustertransplantat .....	80
<b><u>Abb. 89:</u></b> Fluoreszenzsignal Darstellung des avitalisierten Adipozytenclustertransplantats.....	80
<b><u>Abb. 90:</u></b> Avitalisiertes Adipozytenclustertransplantat. ....	80
<b><u>Abb. 91:</u></b> Adipozytenclustertransplantat und Transplantat mit tiefgekühlten Adipozytencluster .....	81
<b><u>Abb. 92:</u></b> Adipozytenclustertransplantat mit tiefgekühlten Adipozytencluster .....	82
<b><u>Abb. 93:</u></b> Fluoreszenzsignal des tiefgekühlten Adipozytenclustertransplantats .....	82
<b><u>Abb. 94:</u></b> Adipozytenclustertransplantat mit frischen und tiefgekühlten Adipozytencluster .....	83
<b><u>Abb. 95:</u></b> Adipozytenclustertransplantat mit frischen und tiefgekühlten Adipozytencluster .....	83
<b><u>Abb. 96:</u></b> Histologie des Präadipozytentransplantats.....	84
<b><u>Abb. 97:</u></b> Präadipozytentransplantat nach 12 Tagen post transplantationem.....	84
<b><u>Abb. 98:</u></b> Adipozytenclustertransplantat am 5. Tag post transplantationem .....	86
<b><u>Abb. 99:</u></b> Adipozytenclustertransplantat am 5. Tag post transplantationem .....	86
<b><u>Abb. 100:</u></b> Adipozytenclustertransplantat am 5. Tag post transplantationem. ....	86
<b><u>Abb. 101:</u></b> Adipozytenclustertransplantat am 12. Tag post transplantationem .....	86
<b><u>Abb. 102:</u></b> Adipozytenclustertransplantat am 51. Tag post transplantationem .....	87
<b><u>Abb. 103:</u></b> Adipozytenclustertransplantat am 51. Tag post transplantationem .....	88
<b><u>Abb. 104:</u></b> Adipozytenclustertransplantat am 51. Tag post transplantationem. ....	88
<b><u>Abb. 105:</u></b> Adipozytenclustertransplantat mit Indocyaningrün am 51. Tag post transplantationem. ....	88
<b><u>Abb. 106:</u></b> Avitalisiertes Adipozytenclustertransplantat .....	89
<b><u>Abb. 107:</u></b> Avitalisiertes Adipozytenclustertransplantat .....	89

**Abb. 108:** Das Ölzysteninnere mit Adipozyten bei avitalisierten  
Adipozytenclustertransplantaten..... 89

**Abb. 109:** Ölzystenkapselform mit Fettvakuolen des avitalisierten  
Adipozytenclustertransplantats..... 89

**Abb. 110:** Adipozytenclustertransplantat mit kühlauflaufbewahrten Adipozytencluster . 90

**Abb. 111:** Adipozytenclustertransplantat mit kühlauflaufbewahrten Adipozytencluster . 90

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ailhaud, G., P. Grimaldi, and R. Negrel, Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr*, 1992. 12: p. 207-33.
2. Akerman, M.E., et al., Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(20): p. 12617-21.
3. Ballard, K.W., Functional characteristics of the microcirculation in white adipose tissue. *Microvasc Res*, 1978. 16(1): p. 1-18.
4. Baran, C.N., et al., The behavior of fat grafts in recipient areas with enhanced vascularity. *Plast Reconstr Surg*, 2002. 109(5): p. 1646-51; 1652.
5. Bentolila, L.A., et al., Quantum dots for molecular imaging and cancer medicine. *Discov Med*, 2005. 5(26): p. 213-8.
6. Billings, E., Jr. and J.W. May, Jr., Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*, 1989. 83(2): p. 368-81.
7. Bircoll, M. and B.H. Novack, Autologous fat transplantation employing liposuction techniques. *Ann Plast Surg*, 1987. 18(4): p. 327-9.
8. Boschert, M.T., et al., Analysis of lipocyte viability after liposuction. *Plast Reconstr Surg*, 2002. 109(2): p. 761-5; discussion 766-7.
9. Bucky, L.P. and I. Percec, The science of autologous fat grafting: views on current and future approaches to neoadipogenesis. *Aesthet Surg J*, 2008. 28(3): p. 313-21; quiz 322-4.
10. Carraway, J.H. and C.G. Mellow, Syringe aspiration and fat concentration: a simple technique for autologous fat injection. *Ann Plast Surg*, 1990. 24(3): p. 293-6; discussion; 297.

11. Chajchir, A., Fat injection: long-term follow-Up. *Aesthetic Plast Surg*, 1996. 20(4): p. 291-6.
12. Chajchir, A. and I. Benzaquen, Fat-grafting injection for soft-tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg*, 1989. 84(6): p. 921-34; discussion 935.
13. Chajchir, A. and I. Benzaquen, Liposuction fat grafts in face wrinkles and hemifacial atrophy. *Aesthetic Plast Surg*, 1986. 10(2): p. 115-7.
14. Chajchir, A., I. Benzaquen, and E. Moretti, Comparative experimental study of autologous adipose tissue processed by different techniques. *Aesthetic Plast Surg*, 1993. 17(2): p. 113-5.
15. Chajchir, A., et al., Fat injection. *Aesthetic Plast Surg*, 1990. 14(2): p. 127-36.
16. Cho, K.O., Intermittent occlusion of the popliteal vein by a gastrocnemius rotational muscle flap. A report of two cases. *J Bone Joint Surg Am*, 2002. 84-A(9): p. 1659-63.
17. Cho, S.J., et al., Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. *Langmuir*, 2007. 23(4): p. 1974-80.
18. Coleman, S.R., Facial augmentation with structural fat grafting. *Clin Plast Surg*, 2006. 33(4): p. 567-77.
19. Coleman, S.R., Facial recontouring with lipostructure. *Clin Plast Surg*, 1997. 24(2): p. 347-67.
20. Coleman, S.R., Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg*, 1995. 19(5): p. 421-5.
21. Coleman, S.R., Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg*, 2006. 118(3 Suppl): p. 108S-120S.

22. Coleman, S.R., The technique of periorbital lipoinfiltration. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery* 1994. 1(3): p. 120-126.
23. Coleman, S.R. and A.P. Saboeiro, Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg*, 2007. 119(3): p. 775-85; discussion 786-7.
24. Coleman, W.P., 3rd, et al., Autologous collagen? Lipocytic dermal augmentation. A histopathologic study. *J Dermatol Surg Oncol*, 1993. 19(11): p. 1032-40.
25. Cotrufo, S., A. Mandal, and E.M. Mithoff, Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg*, 2008. 121(2): p. 701.
26. Czerny, V., Plastischer Ersatz der Brustdrüse durch ein Lipom. . *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie*, 1895: p. 72.
27. Drenkhahn, D.H., ed. *Anatomie Band 1*. Urban & Fisher. Vol. 16. Auflage. 2003. 127-128.
28. Dubertret, B., et al., In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, 2002. 298(5599): p. 1759-62.
29. Egido, J.A., et al., Middle cerebral artery embolism and unilateral visual loss after autologous fat injection into the glabellar area. *Stroke*, 1993. 24(4): p. 615-6.
30. Ellenbogen, R., Autologous fat injection. *Plast Reconstr Surg*, 1991. 88(3): p. 543-4.
31. Ellenbogen, R., Free autogenous pearl fat grafts in the face--a preliminary report of a rediscovered technique. *Ann Plast Surg*, 1986. 16(3): p. 179-94.
32. Eppley, B.L., et al., Bioactivation of free-fat transfers: a potential new approach to improving graft survival. *Plast Reconstr Surg*, 1992. 90(6): p. 1022-30.

33. Eremia, S. and N. Newman, Long-term follow-up after autologous fat grafting: analysis of results from 116 patients followed at least 12 months after receiving the last of a minimum of two treatments. *Dermatol Surg*, 2000. 26(12): p. 1150-8.
34. Ersek, R.A., Transplantation of purified autologous fat: a 3-year follow-up is disappointing. *Plast Reconstr Surg*, 1991. 87(2): p. 219-27; discussion 228.
35. Fagrell, D., et al., Fat cylinder transplantation: an experimental comparative study of three different kinds of fat transplants. *Plast Reconstr Surg*, 1996. 98(1): p. 90-6; discussion 97-8.
36. Feinendegen, D.L., et al., Autologous fat injection for soft tissue augmentation in the face: a safe procedure? *Aesthetic Plast Surg*, 1998. 22(3): p. 163-7.
37. Fischer-Posovszky, P.W., M., Entwicklung und Funktion des Fettgewebes *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2004. 8(152): p. 834-842.
38. Fournier, P.F., Fat grafting: my technique. *Dermatol Surg*, 2000. 26(12): p. 1117-28.
39. Gamboa, G.M. and W.A. Ross, Autologous fat transfer in aesthetic facial recontouring. *Ann Plast Surg*, 2013. 70(5): p. 513-6.
40. Gaponik, N. and A.L. Rogach, Thiol-capped CdTe nanocrystals: progress and perspectives of the related research fields. *Phys Chem Chem Phys*, 2010. 12(31): p. 8685-93.
41. Giunta, R.E., et al., [Consensus of the Deutsche Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Asthetischen Chirurgen (DGPRAC) on Autologous Fat Grafting]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 2016. 48(6): p. 337-339.
42. Goldberg, I., et al., A biochemical and histological comparison of vascularized and free fat grafts in the rabbit. *Ann Plast Surg*, 1993. 30(4): p. 334-40.

43. Gonzalez, A.M., et al., An alternative method for harvest and processing fat grafts: an in vitro study of cell viability and survival. *Plast Reconstr Surg*, 2007. 120(1): p. 285-94.
44. Green, H. and O. Kehinde, An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 1975. 5(1): p. 19-27.
45. Green, H. and O. Kehinde, Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J Cell Physiol*, 1979. 101(1): p. 169-71.
46. Gutowski, K.A., Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force. *Plast Reconstr Surg*, 2009. 124(1): p. 272-80.
47. Hanke, C.W., Fat transplantation: indications, techniques, results. *Dermatol Surg*, 2000. 26(12): p. 1106.
48. Hardman, R., A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect*, 2006. 114(2): p. 165-72.
49. Hausberger, F.X., Quantitative studies on the development of autotransplants of immature adipose tissue of rats. *Anat Rec*, 1955. 122(4): p. 507-15.
50. Hemmrich, K., et al., Applicability of the dyes CFSE, CM-Dil and PKH26 for tracking of human preadipocytes to evaluate adipose tissue engineering. *Cells Tissues Organs*, 2006. 184(3-4): p. 117-27.
51. Herold, C., et al., Autologous fat transplantation - animal models and methods for in vitro analysis of viability GMS German Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, 2012. 2.

52. Herold, C., et al., MRI-based breast volumetry-evaluation of three different software solutions. *J Digit Imaging*, 2010. 23(5): p. 603-10.
53. Herold, C., et al., [Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells in reconstructive surgery]. *GMS German Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 2012. 2.
54. Hudson, D.A., E.V. Lambert, and C.E. Bloch, Site selection for fat autotransplantation: some observations. *Aesthetic Plast Surg*, 1990. 14(3): p. 195-7.
55. Hyakusoku, H., et al., Complications after autologous fat injection to the breast. *Plast Reconstr Surg*, 2009. 123(1): p. 360-70; discussion 371-2.
56. Illouz, Y.G., The fat cell "graft": a new technique to fill depressions. *Plast Reconstr Surg*, 1986. 78(1): p. 122-3.
57. Illouz, Y.G., Present results of fat injection. *Aesthetic Plast Surg*, 1988. 12(3): p. 175-81.
58. Illouz, Y.G., Study of subcutaneous fat. *Aesthetic Plast Surg*, 1990. 14(3): p. 165-77.
59. Illouz, Y.G. and A. Sterodimas, Autologous fat transplantation to the breast: a personal technique with 25 years of experience. *Aesthetic Plast Surg*, 2009. 33(5): p. 706-15.
60. Iyengar, P., et al., Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene*, 2003. 22(41): p. 6408-23.
61. Kanchwala, S.K., et al., Autologous fat grafting to the reconstructed breast: the management of acquired contour deformities. *Plast Reconstr Surg*, 2009. 124(2): p. 409-18.

62. Katz, B.E., M.C. Bruck, and W.P. Coleman, 3rd, The benefits of powered liposuction versus traditional liposuction: a paired comparison analysis. *Dermatol Surg*, 2001. 27(10): p. 863-7.
63. Kaufman, M.R., et al., Autologous fat transfer for facial recontouring: is there science behind the art? *Plast Reconstr Surg*, 2007. 119(7): p. 2287-96.
64. Keck, M., J. Janke, and K. Ueberreiter, [The influence of different local anaesthetics on the viability of preadipocytes]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 2007. 39(3): p. 215-9.
65. Kononas, T.C., et al., The fate of suctioned and surgically removed fat after reimplantation for soft-tissue augmentation: a volumetric and histologic study in the rabbit. *Plast Reconstr Surg*, 1993. 91(5): p. 763-8.
66. Kuran, I. and B. Tumerdem, A new simple method used to prepare fat for injection. *Aesthetic Plast Surg*, 2005. 29(1): p. 18-22; discussion 23.
67. Langer, S., et al., Revascularization of transplanted adipose tissue: a study in the dorsal skinfold chamber of hamsters. *Ann Plast Surg*, 2002. 48(1): p. 53-9.
68. Lexer, Freie Fettransplantation. *Deutsch med Wochensch*, 1910. 36(No. 13): p. 640.
69. Lidagoster, M.I., et al., Comparison of autologous fat transfer in fresh, refrigerated, and frozen specimens: an animal model. *Ann Plast Surg*, 2000. 44(5): p. 512-5.
70. Manabe, Y., et al., Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions. *J Pathol*, 2003. 201(2): p. 221-8.
71. Markey, A.C. and R.G. Glogau, Autologous fat grafting: comparison of techniques. *Dermatol Surg*, 2000. 26(12): p. 1135-9.

72. Marques, A., et al., Autologous fat grafts: a quantitative and morphometric study in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 1994. 28(4): p. 241-7.
73. Matsudo, P.K. and L.S. Toledo, Experience of injected fat grafting. *Aesthetic Plast Surg*, 1988. 12(1): p. 35-8.
74. Matsumoto, D., et al., Influences of preservation at various temperatures on liposuction aspirates. *Plast Reconstr Surg*, 2007. 120(6): p. 1510-7.
75. Michalet, X., et al., Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 2005. 307(5709): p. 538-44.
76. Mikus, J.L., J.A. Koufman, and S.E. Kilpatrick, Fate of liposuctioned and purified autologous fat injections in the canine vocal fold. *Laryngoscope*, 1995. 105(1): p. 17-22.
77. Milojevic, B., Complications after silicone injection therapy in aesthetic plastic surgery. *Aesthetic Plast Surg*, 1982. 6(4): p. 203-6.
78. Miranville, A., et al., Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*, 2004. 110(3): p. 349-55.
79. Mizuno, H. and H. Hyakusoku, Fat grafting to the breast and adipose-derived stem cells: recent scientific consensus and controversy. *Aesthet Surg J*, 2010. 30(3): p. 381-7.
80. Nabiev, I., et al., Nonfunctionalized nanocrystals can exploit a cell's active transport machinery delivering them to specific nuclear and cytoplasmic compartments. *Nano Lett*, 2007. 7(11): p. 3452-61.
81. Neuber, G., Fetttransplantation. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie*, 1893. 22(66).

82. Nguyen, A., et al., Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg*, 1990. 85(3): p. 378-86; discussion 387-9.
83. Niechajev, I. and O. Sevcuk, Long-term results of fat transplantation: clinical and histologic studies. *Plast Reconstr Surg*, 1994. 94(3): p. 496-506.
84. Nishimura, T., et al., Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *Laryngoscope*, 2000. 110(8): p. 1333-8.
85. Novaes, F., N. dos Reis, and R. Baroudi, Counting method of live fat cells used in lipoinjection procedures. *Aesthetic Plast Surg*, 1998. 22(1): p. 12-5.
86. Ogawa, R., et al., Fat grafting to the breast. *Plast Reconstr Surg*, 2008. 121(2): p. 702-3.
87. Otto, T.C. and M.D. Lane, Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005. 40(4): p. 229-42.
88. Pallua, N. and T. Wolter, [Liposuction]. *Chirurg*, 2011. 82(9): p. 759-60, 762-4, 766.
89. Peer, L.A., Cell survival theory versus replacement theory. *Plast Reconstr Surg (1946)*, 1955. 16(3): p. 161-8.
90. Peer, L.A., Loss of weight and volume in human fat grafts with postulation of acell survival theory . *Plast Reconstr Surg*, 1950.
91. Peer, L.A., The neglected free fat graft. *Plast Reconstr Surg (1946)*, 1956. 18(4): p. 233-50.
92. Peer, L.A., The neglected free fat graft, its behavior and clinical use. *Am J Surg*, 1956. 92(1): p. 40-7.

93. Pereira, L.H. and H.N. Radwanski, Fat grafting of the buttocks and lower limbs. *Aesthetic Plast Surg*, 1996. 20(5): p. 409-16.
94. Piasecki, J.H., et al., An experimental model for improving fat graft viability and purity. *Plast Reconstr Surg*, 2007. 119(5): p. 1571-83.
95. Pinaud, F., et al., Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. *Biomaterials*, 2006. 27(9): p. 1679-87.
96. Planat-Benard, V., et al., Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 2004. 109(5): p. 656-63.
97. Prantl, L., et al., [Current Perceptions of Lipofilling on the Basis of the New Guideline on "Autologous Fat Grafting"]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 2016. 48(6): p. 330-336.
98. Pu, L.L., et al., The viability of fatty tissues within adipose aspirates after conventional liposuction: a comprehensive study. *Ann Plast Surg*, 2005. 54(3): p. 288-92; discussion 292.
99. Rennekampff, H.-O., Reimers, K., Gabka, C. J., Germann, G., Giunta, R. E., Knobloch, K., Machens, H. G., Pallua, N., Ueberreiter, K., von Heimburg, D., Vogt, P. M., Möglichkeiten und Grenzen der autologen Fetttransplantation — „„ Consensus Meeting ““ der DGPR Ä C in Hannover. Consensus Statement, 2009.
100. Rennekampff, H.O., et al., [Current perspective and limitations of autologous fat transplantation--"consensus meeting" of the German Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgeons at Hannover; September 2009]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 2010. 42(2): p. 137-42.
101. Rieck, B. and S. Schlaak, In vivo tracking of rat preadipocytes after autologous transplantation. *Ann Plast Surg*, 2003. 51(3): p. 294-300.

102. Rieck, B. and S. Schlaak, Measurement in vivo of the survival rate in autologous adipocyte transplantation. *Plast Reconstr Surg*, 2003. 111(7): p. 2315-23.
103. Rittes, P.G., J.C. Rittes, and M.F. Carriel Amary, Injection of phosphatidylcholine in fat tissue: experimental study of local action in rabbits. *Aesthetic Plast Surg*, 2006. 30(4): p. 474-8.
104. Rodbell, M., Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem*, 1964. 239: p. 375-80.
105. Rogach, A.L. and M. Ogris, Near-infrared-emitting semiconductor quantum dots for tumor imaging and targeting. *Curr Opin Mol Ther*, 2010. 12(3): p. 331-9.
106. Rohrich, R.J., E.S. Sorokin, and S.A. Brown, In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast Reconstr Surg*, 2004. 113(1): p. 391-5; discussion 396-7.
107. Schmeller, W. and I. Meier-Vollrath, [Autologous fat grafting]. *Hautarzt*, 2003. 54(12): p. 1185-9.
108. Schuller-Petrovic, S., Improving the aesthetic aspect of soft tissue defects on the face using autologous fat transplantation. *Facial Plast Surg*, 1997. 13(2): p. 119-24.
109. Shiffman, M.A. and S. Mirrafati, Fat transfer techniques: the effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature. *Dermatol Surg*, 2001. 27(9): p. 819-26.
110. Shiffmann, ed. *Autologous Fat Transfer. Art, Science, and Clinical Practice*. 2010, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

111. Shoshani, O., et al., The effect of lidocaine and adrenaline on the viability of injected adipose tissue--an experimental study in nude mice. *J Drugs Dermatol*, 2005. 4(3): p. 311-6.
112. Shoshani, O., et al., The effect of interleukin-8 on the viability of injected adipose tissue in nude mice. *Plast Reconstr Surg*, 2005. 115(3): p. 853-9.
113. Shoshani, O., et al., The effect of hyperbaric oxygenation on the viability of human fat injected into nude mice. *Plast Reconstr Surg*, 2000. 106(6): p. 1390-6; discussion 1397-8.
114. Shoshani, O., et al., The role of frozen storage in preserving adipose tissue obtained by suction-assisted lipectomy for repeated fat injection procedures. *Dermatol Surg*, 2001. 27(7): p. 645-7.
115. Smahel, J., Experimental implantation of adipose tissue fragments. *Br J Plast Surg*, 1989. 42(2): p. 207-11.
116. Smith, P., et al., Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival. *Plast Reconstr Surg*, 2006. 117(6): p. 1836-44.
117. Smith, U., Morphologic studies of human subcutaneous adipose tissue in vitro. *Anat Rec*, 1971. 169(1): p. 97-104.
118. Sommer, B. and G. Sattler, Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatol Surg*, 2000. 26(12): p. 1159-66.
119. Sterodimas, A., et al., Autologous fat transplantation versus adipose-derived stem cell-enriched lipografts: a study. *Aesthet Surg J*, 2011. 31(6): p. 682-93.
120. Stock, W. and K. Wolf, Die Kapselbildung bei silikon-Implantaten Langenbecks *Archiv für Chirurgie* 1989. 369(60): p. 303-308.

121. Stromqvist, B., et al., Cauda equina syndrome caused by migrating fat graft after lumbar spinal decompression. A case report demonstrated with magnetic resonance imaging. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1991. 16(1): p. 100-1.
122. Thanik, V.D., et al., A murine model for studying diffusely injected human fat. *Plast Reconstr Surg*, 2009. 124(1): p. 74-81.
123. Ullmann, Y., et al., Searching for the favorable donor site for fat injection: in vivo study using the nude mice model. *Dermatol Surg*, 2005. 31(10): p. 1304-7.
124. Valdatta, L., et al., A case of life-threatening sepsis after breast augmentation by fat injection. *Aesthetic Plast Surg*, 2001. 25(5): p. 347-9.
125. Van Akkerveeken, P.F., W. Van de Kraan, and J.W. Muller, The fate of the free fat graft. A prospective clinical study using CT scanning. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1986. 11(5): p. 501-4.
126. von Heimburg, D., et al., Comparison of viable cell yield from excised versus aspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs*, 2004. 178(2): p. 87-92.
127. von Heimburg, D., et al., Free transplantation of fat autografts expanded by tissue expanders in rats. *Br J Plast Surg*, 1994. 47(7): p. 470-6.
128. Wassermann, F., Die Fettorgane des Menschen. . *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 1926. 3: p. 235-328.
129. Watson, A., X. Wu, and M. Bruchez, Lighting up cells with quantum dots. *Biotechniques*, 2003. 34(2): p. 296-300, 302-3.
130. Welsch, ed. *Histologie*.
131. Wertheimer, E. and B. Shapiro, The physiology of adipose tissue. *Physiol Rev*, 1948. 28(4): p. 451-64.

132. Wetmore, S.J., Injection of fat for soft tissue augmentation. *Laryngoscope*, 1989. 99(1): p. 50-7.
133. Wolter, T.P., et al., Cryopreservation of mature human adipocytes: in vitro measurement of viability. *Ann Plast Surg*, 2005. 55(4): p. 408-13.
134. Yamaguchi, M., et al., Revascularization determines volume retention and gene expression by fat grafts in mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2005. 230(10): p. 742-8.
135. Yong, K.T., et al., Biocompatible near-infrared quantum dots as ultrasensitive probes for long-term in vivo imaging applications. *Small*, 2009. 5(17): p. 1997-2004.
136. Yoshida, S.H., et al., Silicone breast implants: immunotoxic and epidemiologic issues. *Life Sci*, 1995. 56(16): p. 1299-310.
137. Yoshimura, K., et al., Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg*, 2008. 32(1): p. 48-55; discussion 56-7.
138. Yoshimura, K., et al., Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg*, 2008. 34(9): p. 1178-85.
139. Yu, J.M., et al., Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev*, 2008. 17(3): p. 463-73.
140. Yukawa, H., et al., Quantum dots for labeling adipose tissue-derived stem cells. *Cell Transplant*, 2009. 18(5): p. 591-9.
141. Yuksel, E., et al., Increased free fat-graft survival with the long-term, local delivery of insulin, insulin-like growth factor-I, and basic fibroblast growth factor by PLGA/PEG microspheres. *Plast Reconstr Surg*, 2000. 105(5): p. 1712-20.

142. Zintchenko, A., et al., Drug nanocarriers labeled with near-infrared-emitting quantum dots (quantoplexes): imaging fast dynamics of distribution in living animals. *Mol Ther*, 2009. 17(11): p. 1849-56.

## 9. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. R. Giunta und Herrn Prof. Dr. R. Baumeister möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. E. Wagner danke ich für die herzliche Aufnahme als Doktorandin in seinem Labor und die Ermöglichung der Nutzung seiner Einrichtung.

Herrn Prof. Dr. A. Rogach danke ich für die Möglichkeit der Nutzung und Bereitstellung der QDots.

Mein größter Dank gilt Herrn Dr. Claus Deglmann für die ausgezeichnete Betreuung. Claus, deine Hilfsbereitschaft, hervorragende Unterstützung während der ganzen Arbeit, die konstruktiven, anregenden Gespräche und deinen Optimismus, der mich immer wieder zu weiteren Versuchen ermutigte, werde ich dir nie vergessen. Danke, dass du dir immer Zeit, auch nach den langen, anstrengenden Arbeitstagen in der Klinik, genommen hast um mir zu helfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Günther und Herrn Prof. Dr. Manfred Ogris. Mit eurer Erfahrung und tollen Ideen habt ihr mich immer unterstützt. Ihr hattet immer ein offenes Ohr und sehr viel Geduld mit mir. Mit eurer Kreativität und Begeisterung für die Forschung habt ihr mir neue Wege gezeigt, in der Umsetzung geholfen und zur Entstehung der Arbeit sehr viel beigetragen. Danke!

Dem Team des Labors: Janette, Gelja, Anna, Miriam, Ursula, Melinda, Markus und Wolfgang danke ich für die Hilfe im Labor und mit den Tieren! Ihr habt mir sehr geholfen! Unsere langen Gespräche in der Küche werden mir immer in Erinnerung bleiben.

Meiner Kollegin Sarah, die mich bei vielen Versuchen unterstützt hat, danke ich sehr.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann für die unermüdliche Unterstützung über diese Arbeit hinaus. Wilfried, du hast mir immer den größten Halt geboten und hast mich bei jedem Projekt bekräftigt. Du hast immer meine Ideen unterstützt und mich immer in meinem Vorhaben ermutigt. Ohne dich wäre sowohl diese Arbeit als auch viele anderen Projekte in dieser Form nicht möglich. Danke für alles!

# Eidesstattliche Versicherung

Błażków-Schmalzbauer, Katarzyna

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

In vivo Tracking von Mikrofetttransplantaten

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 02.03.2017

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand