

**Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und
Wiederherstellungschirurgie der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Rainer H. Meffert

**Bioaktiv funktionalisierbare Hyaluronsäure-Polyglycidol-Hydrogele unter
Verwendung von ASCs aus dem Fettgewebe zur Rekonstruktion von
Weichgewebsdefekten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Silvia Bernuth

aus Karl-Marx-Stadt

Würzburg, den 27. April 2020

Referent: Univ.- Prof. Dr. med. Torsten Blunk

Korreferent: apl. Prof. Dr. rer. Nat. Uwe Gbureck

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Tissue Engineering | |
| 1.2 Stammzellen | |
| 1.3 Adipose Derived Stem Cells – ASC | |
| 1.4 Fett | |
| 1.4.1 Weißes Fettgewebe | |
| 1.4.2 Braunes Fettgewebe | |
| 1.4.3 Adipogenese | |
| 1.5 Liposuktion | |
| 1.6 Resektion von Fettgewebe | |
| 1.7 Scaffolds | |
| 1.8 Hyaluron-basierte Scaffolds für das Tissue Engineering von Fettgewebe | |
| 1.9 Bioaktive Scaffolds | |
| 2. Zielsetzung | 15 |
| 3. Material und Methoden | 16 |
| 3.1 Material | |
| 3.1.1 Laborgeräte | |
| 3.1.2 Verbrauchsmaterialien | |
| 3.1.3 Chemikalien | |
| 3.1.4 Puffer und Lösungen | |
| 3.1.5 Zellkulturmedien | |
| 3.1.6 Induktoren zur adipogenen Differenzierung | |
| 3.1.7 Kits und Multikomponenten-Systeme | |
| 3.1.8 Peptide, Antikörper und Oligonukleotide | |
| 3.2 Methoden | |
| 3.2.1 Gewinnung von Fettgewebe für die Isolation von ASCs | |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.2.2 | SVF-Isolation | |
| 3.2.3 | 2D Zellkultur | |
| 3.2.4 | Herstellung und 3D Zellkultur der Hyaluronsäure-Polyglycidol-Hydrogele | |
| 3.2.5 | Adipogene Differenzierung | |
| 3.2.6 | Bestimmung der Größe, makroskopische Beschreibung und Fotodokumentation | |
| 3.2.7 | Zellvitalität der 3D Zellkultur mit dem Live/Dead-Assay | |
| 3.2.8 | Quantitative Bestimmung des DNA-Gehaltes | |
| 3.2.9 | Quantitative Bestimmung des Triglycerid-Gehaltes | |
| 3.2.10 | Histologische Untersuchung der Adipogenese | |
| 3.2.11 | Real-time quantitative reverse transcription PCR | |
| 3.2.12 | Statistische Untersuchungen | |
| 4. | Ergebnisse | 39 |
| 4.1. | Vergleich der Effizienz unterschiedlicher ASC-Gewinnungsmethoden | |
| 4.2. | Zellzahl SVF/ASC | |
| 4.3. | Adipogene Differenzierung der 2D-Kulturen | |
| 4.4. | Hyaluronsäure-Polyglycidol-Hydrogele | |
| 4.5. | Makroskopische Erscheinung | |
| 4.6. | Zellzahl und Vitalität der ASCs in der 3D-HA-PG-Hydrogelkultur | |
| 4.7. | Adipogene Differenzierung der ASCs in der 3D-HA-PG-Hydrogelkultur | |
| 5. | Diskussion | 65 |
| 5.1. | Effizienz unterschiedlicher Gewinnungsmethoden | |
| 5.2. | Vitalität und Adipogenese der ASCs aus unterschiedlichen Gewinnungsmethoden | |
| 5.3. | Hyaluronsäure-basierte-Polyglycidol-Hydrogele | |
| 5.4. | Untersuchung der Vitalität und adipogenen Differenzierung von ASCs in der 3D HA-PG-Hydrogelkultur | |
| 6. | Schlussfolgerung | 75 |
| 7. | Zusammenfassung | 76 |

Literaturverzeichnis

78

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| ASC | Adipose Derived Stem Cells |
| BM-NC | Bone marrow nucleated cells - Kernhaltige Knochenmarkszellen |
| C/EBPs | CCAAT/Enhancer-Binding Proteine |
| CD | Cluster of differentiation – immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| ESZ | Embryonale Stammzellen |
| g | Erdbeschleunigung |
| HA | Hyaluronsäure |
| HA-PG | Hyaluronsäure-basierte mit Polyglycidol verlinkte Hydrogele |
| HLA-DR | Humane Leukozytenantigen-DR |
| IKVAV | Peptidsequenz (Ile-Lys-Val-Ala-Val) aus dem Laminin |
| iPSZ | induzierte pluripotente Stammzellen |
| hMSZ | humane Mesenchymale Stammzellen |
| ORO Färbung | Oil-Red-O-Färbung |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PG | Polyglycidol-Acrylat |
| PMMA | Polymethylmethacrylat |
| PPAR γ | Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma |
| RGD | Peptidsequenz (Arg-Gly-Asp) des Fibronectin |
| SVF | Stromal vaskuläre Fraktion |
| U | Unit |
| TE | Tissue Engineering |

TG Triglyceridgehalt

YIGSR Peptidsequenz (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) aus dem Laminin

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | | |
|--------------|---|-------|
| Abbildung 1 | Therapiepotenzial von ASCs | 6 |
| Abbildung 2 | A: Stumpfe Liposuktionskanüle; B: Chirurgischer Sauger ATMOS Record 55 | 27 |
| Abbildung 3 | Omnifix® Spritze (60 ml) von B. Braun und stumpfe Liposuktionskanüle | 27 |
| Abbildung 4 | Reseziertes subkutanen Fettgewebe | 28 |
| Abbildung 5 | A: Menge an SVF-Zellen Fett je Gewinnungsmethode; B: DNA-Masse je Gewinnungsmethode | 40 |
| Abbildung 6 | Durchschnittliche DNA-Masse in Passage 0 nach Isolation | 40 |
| Abbildung 7 | Proliferation der ASCs an Hand der DNA-Masse der unterschiedlichen Gewinnungsmethoden über drei Passagen | 42 |
| Abbildung 8 | Absoluter Triglycerid-Gehalt nach 14 und 21 Tagen Induktion der verschiedenen Gewinnungsmethoden | 43 |
| Abbildung 9 | Triglycerid-Masse pro μg DNA nach 14 und 21 Tagen Induktion der verschiedenen Gewinnungsmethoden | 44 |
| Abbildung 10 | Histologische Darstellung der 2D-Kulturen aller Gewinnungsmethoden an Tag 0 und nach 21 Tagen | 45 |
| Abbildung 11 | Größe der modifizierten und unmodifizierten HA-PG-Hydrogele an Tag 0 und Tag 21 | 49 |
| Abbildung 12 | Makroskopische Images der unmodifizierten HA-PG-Hydrogele und der mit YIGSR modifizierten HA-PG-Hydrogele | 50 |
| Abbildung 13 | DNA-Masse in unmodifizierten und modifizierten HA-PG-Hydrogelen in unterschiedlichen Konzentrationen | 52 |
| Abbildung 14 | Vitalitätsuntersuchung mittels Live/Dead-Assay der 3D-Kulturen | 54-55 |
| Abbildung 15 | TG-Masse in unmodifizierten und modifizierten HA-PG-Hydrogelen in unterschiedlichen Konzentrationen | 57 |
| Abbildung 16 | TG-Masse pro μg DNA in unmodifizierten und modifizierten HA-PG-Hydrogelen in unterschiedlichen Konzentrationen | 59 |

| | | |
|--------------|---|-------|
| Abbildung 17 | Zellagglomeratbildung | 61 |
| Abbildung 18 | Adipogenese der ASCs in modifizierten und nicht-modifizierten HA-PG- Hydrogelen | 62-63 |
| Abbildung 19 | Expression der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PPAR γ und des adipogenen Spätmarkers aP2 in unmodifizierten und modifizierten HA-PG-Hydrogele in unterschiedlichen Konzentrationen | 64 |
| Tabelle 1 | Definitionskriterien für mesenchymale Stammzellen | 3 |
| Tabelle 2 | Unterschiede der Oberflächenantigene zwischen Knochenmark und Fettgewebe | 5 |
| Tabelle 3 | Oligonukleotide (Real time qRT-PCR) | 25 |
| Tabelle 4 | Tabellarische Aufgliederung der makroskopische Charakteristika der modifizierten und unmodifizierten HA-PG-Hydrogele | 48 |

1. Einleitung

Das Bestreben Defekte und Deformitäten nach traumatischen Verletzungen, Tumorsektionen oder aus ästhetischen Gesichtspunkten auszugleichen und möglichst wirklichkeitsgetreu zu rekonstruieren, besteht seit je her. Der Wunsch verloren gegangenes Gewebe in seiner Komplexität wiederherzustellen, brachte verschiedenste Ansätze unterschiedlicher Fachdisziplinen hervor. Chirurgische Ansätze basieren zum Beispiel auf der Transposition oder Transplantation von körpereigenem Gewebe. Dies geht jedoch immer mit einer mehr oder minder ausgeprägten funktionellen oder ästhetischen Hebemorbidity der Entnahmestelle einher¹⁻³. Ein weiterer Ansatz besteht darin xenogene Materialien wie Prothesen, Implantate oder injizierbare Substanzen zu nutzen. Während Prothesen oder Implantate vor allem aus synthetischen Materialien bestehen, z. Bsp. Silikon, Legierungen, Keramik oder Polymethylmethacrylat (PMMA) und somit eine zumindest geringe Immunreaktion hervorbringen sowie präformiert sind, können injizierbare Materialien aus Substanzen bestehen, welche im menschlichen Körper vorkommen oder ihm entnommen wurden, wie zum Beispiel Hyaluronsäure oder Eigenfett. Diese Materialien haben den Vorteil eher geringe Immunreaktionen auszulösen^{4,5}. Sie eignen sich jedoch vor allem zur Rekonstruktion von kleineren Defekten und bedürfen in vielen Fällen mehrfacher Applikationen. Dies tritt vor allem beim Eigenfetttransfer (Lipotransfer) auf. Auf Grund der hohen Resorptionsrate des transferierten Fettes von 30 - 70%, welche am ehesten durch die mechanische Schädigung der Adipozyten während der Liposuktion und der geringen Toleranz gegenüber Hypoxie von Adipozyten⁶ sowie durch die eingeschränkte Anbindung des Transplantates an das kapilläre Gefäßsystem mit den daraus resultierenden ischämischen Folgen wie Fettgewebsnekrosen, Ölzysten und Volumenverlust einhergehen^{2,3}, sind bisher multiple Lipotransfersitzungen von Nöten. Dies resultiert zum einem in einem erhöhten Zeitaufwand und verminderter Patientenzufriedenheit, und zum anderen erhöht es summativ die perioperativen Risiken des Patienten.

Als Alternative zu den zuvor genannten Möglichkeiten wären natürliche und synthetische Trägermaterialien denkbar, welche mit autologen Zellen besiedelt werden und je nach benötigtem Umfang in vitro präkultiviert oder direkt in den Weichteildefekt implantiert werden.

1.1 Tissue Engineering

Das Tissue Engineering (TE) beschäftigt sich mit der Entwicklung von artifiziell hergestelltem Gewebeersatz. Dieser sollte idealerweise biokompatibel, immunologisch inert und volumenstabil sein. Um dies zu ermöglichen ist es notwendig das Zusammenspiel von lebenden Zellen, geeigneten biochemischen Signalstoffen (wie z. Bsp.: Wachstumsfaktoren oder Zytokine), biokompatiblen Trägermaterialien und physikalischen Faktoren (wie zum Bsp.: Scherkräfte) in Einklang zu bringen.

Die ersten Erfolge konnten auf der Grundlage von bradytrophen Geweben wie der Epidermis und dem Knorpel erzielt werden⁹⁻¹². Diese haben den Vorteil, dass sie zum einen hauptsächlich aus nur einem differenzierten Zelltyp (Keratinocyten, respektive Chondrozyten) bestehen und zum anderen durch Diffusion ernährt werden. Die Rekonstruktion komplexer Gewebe stellt weitaus größere Herausforderungen an das TE: die Erstellung eines dreidimensionalen Gerüsts (Scaffold), welches verschiedenste gewebespezifische Zellpopulationen beherbergt, interzelluläre Kommunikation und die Ausbildung einer spezifischen extrazellulären Matrix (ECM) ermöglicht, Neovaskularisation und die Ausbildung eines Gefäßnetzes fördert und im Rahmen der physiologischen Umbauprozesse letztendlich in körpereigenes Gewebe umgewandelt wird.

Die Nutzung von Stammzellen bietet sich für die Regeneration oder De-novo-Konstruktion von Geweben am ehesten an. Sie weisen Merkmale auf, die reife differenzierte Zellen nicht mehr haben, wie den teilungsbedingten Selbsterhalt und die Vermehrung ihrer Selbst sowie die Fähigkeit in unterschiedliche Zellarten zu differenzieren¹³.

1.2 Stammzellen

Es gibt für das TE drei relevante Arten von Stammzellen: embryonale Stammzellen (ESZ), induzierte pluripotente Stammzellen (iPSZ) und adulte Stammzellen. ESZ sind pluripotent und können sich in jedes somatische Gewebe differenzieren. Die Gewinnung und Nutzung ist jedoch ethisch höchst bedenklich und durch das Embryonenschutzgesetz und das Stammzellgesetz in Deutschland verboten^{7, 8}. Im Jahr 2006 wurden erstmals

durch die japanische Arbeitsgruppe um Yamanaka differenzierte somatische Zellen durch embryonale Transkriptionsfaktoren zu pluripotenten Stammzellen induziert ¹⁶. iPSZ versprechen ein enorm mannigfaltiges genetisches Potential, jedoch wirft die Generierung und Nutzung genetisch manipulierter Zellen weiterhin vielschichtige ethische und medizinische Fragestellungen auf und sind deshalb aktuell nicht uneingeschränkt nutzbar ^{10, 11}.

Adulte Stammzellen sind gewebe- oder organspezifische Stammzellen, die dem Gewebe- oder Organerhalt und teils auch deren Regeneration dienen ¹⁹. Sie sind multipotent und können sich somit nicht mehr in jede Zelle des Organismus differenzieren. Man unterteilt sie in hämatopoetische, nicht-hämatopoetische oder mesenchymale und neuronale Stammzellen. Im Folgenden soll ausschließlich auf mesenchymale Stammzellen (MSC) eingegangen werden, da diese in Form von „Adipose Derived Stem Cells“ (ASCs) für die experimentelle Studie genutzt wurden.

MSCs sind multipotente, plastik-adhärenente Stammzellen mesodermalen Ursprungs, die aus unterschiedlichsten Geweben isoliert werden können. Als zweite Vorläuferzellentität des Knochenmarkes wurden sie erstmalig durch Friedenstein et al. 1968 beschrieben ²⁰ und von Caplan 1991 der Terminus „Mesenchymal Stem Cell“ geprägt ²¹. Über die letzten Dekaden konnten aus verschiedensten Geweben MSCs mit ähnlichen Charakteristika isoliert werden ²², die den Definitionskriterien für MSCs der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie entsprechen (siehe Tabelle 1) ²³.

Tabelle 1: Definitionskriterien für mesenchymale Stammzellen ²³

| | | |
|--|---------------------------|--------------------------|
| 1. Plastik-Adhärenz unter Standard-Kulturbedingungen | | |
| 2. Phentyp | Positiv ($\geq 95\% +$) | Negativ ($\leq 2\% +$) |
| | CD 105 | CD 45 |
| | CD 73 | CD 34 |
| | CD 90 | CD 14 oder 11b |
| | | CD 79 α oder 19 |
| | | HLA-DR |
| 3. In vitro Differenzierung in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten | | |

Lange Zeit wurden MSC hauptsächlich aus dem Knochenmark gewonnen. Dies geht jedoch nur durch einen invasiven Eingriff, der ausschließlich der Gewinnung dieser Zellen dient. Für die Spender ist dies nicht nur schmerzhaft, sondern geht mit einem peri- und postoperativen Morbiditätsrisiko einher. Zudem können durch dieses Verfahren nur geringe Stammzellmengen gewonnen werden.

Angesichts dessen und im Rahmen des steigenden Bedarfes an MSCs für das TE sowie im Rahmen klinischer Anwendungen, wurde nach weiteren Ressourcen von MSCs gesucht.

Zuk et al. konnte 2001 erstmalig pluripotente Stammzellen aus dem Aspirat einer Liposuktion isolieren^{17,18}. Die Gewinnung von MSCs aus dem Fettgewebe, als „Adipose Derived Stem Cells“ (ASC) bezeichnet²⁶, vereinfacht die Generierung von MSCs für das Tissue Engineering erheblich²⁵, da diese im Rahmen einer Liposuktion oder aus reseziertem subkutanen Fettgewebe gewonnen werden können. Das Lipoaspirat sowie das resezierte Fettgewebe sind dabei nur Neben- oder Abfallprodukte des eigentlichen chirurgischen Eingriffes. Ein zusätzliches Spenderrisiko besteht dementsprechend nicht. Ein weiterer Vorteil ist die große Menge an ASCs, die in einem einzigen Eingriff gewonnen werden kann²⁷.

1.3 Adipose Derived Stem Cells - ASC

Wird das Lipoaspirat oder das resezierte Fettgewebe unter Standardbedingungen verdaut und anschließend zur Separierung der zellulären Bestandteile zentrifugiert, erhält man die Stromale Vaskuläre Fraktion (SVF). Sie beschreibt den zellulären Anteil des bei der Liposuktion oder Resektion und Digestion von Fettgewebe gewonnen Material. Oedayrajsingh-Varma et al. konnten bei der subkutanen Liposuktion ca. $0,5 - 2,0 \times 10^6$ kernhaltige Zellen pro Gramm nachweisen²⁸. Die SVF bildet eine heterogene Zellpopulation. Diesbezüglich konnten in verschiedenen Studien Endothelzellen (10 – 20 %), Granulozyten (10 – 15 %), Monozyten (5 – 15 %), Lymphozyten (10 – 15 %), Perizyten (3 – 5 %), hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (< 0,1 %) ^{29–32} und ein Anteil von ca. 1 – 10 % mesenchymaler Stammzellen²⁸ ermittelt werden. Kultiviert man die SVF unter Standardbedingungen erhält man plastikadhärente, mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe, die „Adipose Derived Stem Cells“ (ASC)²⁶.

ASCs sind multipotent und können durch Zugabe von linienspezifischen Faktoren u. a. chondrogen, osteogen, adipogen und myogen differenziert werden ²⁴. Charakteristisch ähneln sie den MSCs aus dem Knochenmark als spindelförmige Zellen mit MSC spezifischen Oberflächenantigenen. Unterschiede zu den MSCs zeigen sie unter anderem in der dynamischen Expression von CD34 und CD105. ASC der unkultivierten SVF sind CD34⁺ und CD105^{low}. Werden sie plastik-adhärenz kultiviert, ändert sich das Bild der exprimierten Oberflächenantigene in CD34⁻ und CD105⁺ (siehe Tabelle 2) ³²⁻³⁴.

Tabelle 2: Unterschiede der Oberflächenantigene zwischen Knochenmark und Fettgewebe ³⁴

| | SVF | BM-NC | ASC | MSC |
|-------|-----|-------|-----|-----|
| CD34 | + | ± | ± | - |
| CD45 | + | ++ | - | - |
| CD13 | ± | ++ | ++ | ++ |
| CD73 | ± | ± | ++ | ++ |
| CD90 | ± | ± | ++ | ++ |
| CD105 | ± | ± | ++ | ++ |
| CD10 | | | ++ | ± |
| CD36 | | | + | - |
| CD106 | | | ± | + |

++ =>70%, +=>30 - 70%, ± =>2-30%, - =<2%. BM-NC – kernhaltige Knochenmarkzellen.

Während der letzten Jahre hat sich der Forschungsbereich um ASCs umfangreich erweitert. Neben der Differenzierung in mesenchymale Gewebe wie Knorpel, Knochen, Muskel und Fettgewebe konnte die Möglichkeit zur Transdifferenzierung in ektodermale und endodermale Gewebe wie epitheliale, endotheliale, endokrine und neuronale Zellen gezeigt werden ³⁴⁻³⁷. Des Weiteren konnten anti-entzündliche und immunmodulatorische Effekte nachgewiesen werden (Abb. 1, <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/deed.de>) ³⁵. Die Nutzung von ASCs für das TE von Fettgewebe bietet sich von Natur aus an. Aus diesem Grund wurde sich im Rahmen dieser Arbeit für die Verwendung von ASCs entschieden.

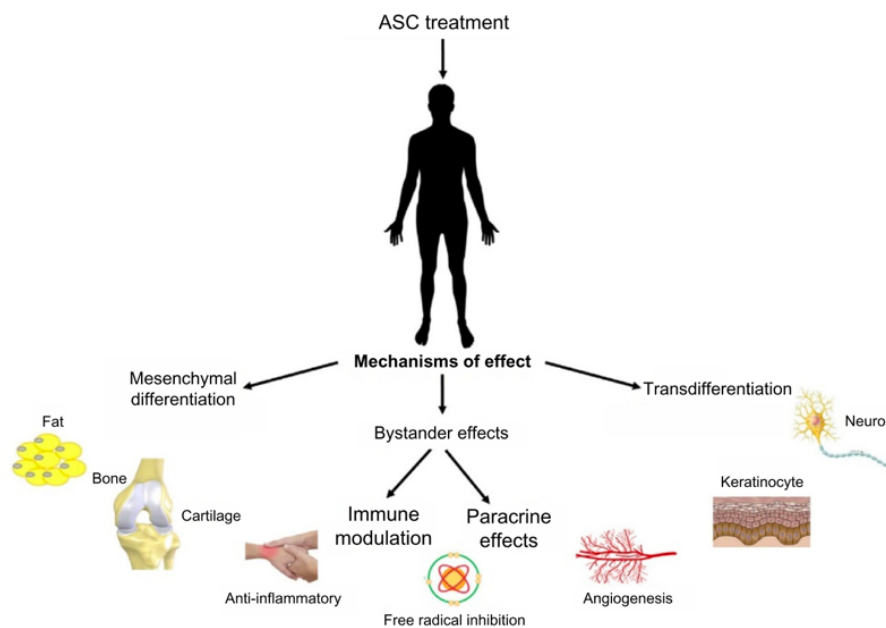


Abb. 1: Therapiepotenzial von ASCs ³⁵

1.4 Fett

Phenotypisch ist das Fettgewebe ein mesenchymales Weichgewebe mesodermalen Ursprungs, das dem retikulären Bindegewebe angehört. Fettgewebe kann beim Menschen in zwei Subformen eingeteilt werden, braunes und weißes Fettgewebe.

1.4.1 Weißes Fettgewebe

Das weiße Fettgewebe nimmt ca. 10 - 25 Prozent des Gesamtgewichtes des gesunden, normalgewichtigen, adulten, menschlichen Körpers ein. Dabei scheint die Anzahl an weißen Adipozyten im adulten Menschen prädestiniert und wird bis zum Ende der Pubertät komplettiert. Danach wird die absolute Anzahl der Adipozyten beim gesunden erwachsenen Menschen nicht mehr verändert, jedoch findet eine jährliche Regeneration von ca. 10 Prozent der Zellen statt ^{31, 32}. Unabhängig von der Zellzahl kann das Körperfettvolumen enorm variieren. Dies wird durch eine Hypertrophie der Zellen bewältigt und kann auf die übermäßige Speicherung von Triglyceriden zurückgeführt werden. Ursachen exzessiver Triglyceridspeicherung sind vor allem das Überangebot von Kohlenhydraten oder Fettsäuren durch Überernährung. Bei dauerhaftem Überangebot

von überschüssiger Energie kommt es zu einer zusätzlichen hyperplastischen Zunahme der Fettgewebsmasse durch eine Zunahme der Zellzahl^{33,34}.

Das weiße Fettgewebe weist lokale Unterschiede geschlechtsspezifisch im Volumen aber auch geschlechtsunabhängig bezüglich der Triglyceridsynthese, Lipolyse und apokrinen Funktion auf⁴². Viszerales Fettgewebe fungiert dabei stärker als endokrines und somit metabolisch aktiveres Gewebe als subkutanes Fettgewebe. Zudem wird es mit einem höheren Risiko in Verbindung gebracht, kardiovaskuläre Schäden und Insulinresistenzen zu beeinflussen⁴³.

Das Fettgewebe wird durch unterschiedliche Zellarten wie Adipozyten, Präadipozyten, Stammzellen, Makrophagen, Mastzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten und glatte Muskelzellen aufgebaut und ist von einer bindegewebsartigen extrazellulären Matrix umgeben. Den größten Volumenanteil bilden reife Adipozyten mit > 90 Prozent, die durch metabolisch bedingte Hypertrophie und massive Einlagerung von intrazellulären Triglyceriden ein Gewicht von 0,7 - 0,8 µg/Zelle erreichen können⁴³.

Das Fettgewebe spielt eine herausragende Rolle im Energiestoffwechsel, indem es überschüssige Energie in Form von Triglyceriden speichert und bei Bedarf wieder freigibt. Des Weiteren ist es ein höchst aktives endokrines und parakrines Organ. Es beeinflusst den Energiestoffwechsel, die Insulinsensitivität, die Appetitregulation, immunologische Reaktionen und vaskuläre Erkrankungen. Vom Fettgewebe ausgeschüttete Hormone und Faktoren sind beispielsweise Leptin, Adipsin, Angiotensinogen, Prostaglandine, Resistin, Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-6, -8, -10, Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1, Interferon- γ -induzierende Protein 10, Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor, Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist, Alkalinephosphatase und Adiponectin⁴⁴⁻⁴⁹. Beispielsweise wird von Makrophagen des Fettgewebes im Rahmen einer immunologischen Reaktion das proinflammatorische Zytokin TNF- α , das Einfluss auf die Insulinsensitivität und damit auf den Glukosestoffwechsel nimmt, ausgeschüttet⁵⁰. Weiteren Einfluss nimmt das Fettgewebe auf die Blutdruck- und Appetitregulierung^{51, 52}. Leptin, das durch Adipozyten produziert wird, nimmt über Rezeptoren im Hypothalamus, der Leber und den Ovarien modulierenden Einfluss auf die Körperfettmasse, die Insulinfunktion, die Steroidproduktion und das hämatopoetische und immunologische System⁵³. Zusätzlich hat Fettgewebe mechanische Eigenschaften und bildet in Form von Baufett Schutzhüllen

um empfindliche Organe wie zum Beispiel den Bulbus oculi ⁵⁴ und einen isolierenden Temperaturschutzmantel.

1.4.2 Braunes Fettgewebe

Das braunfarbene Fettgewebe dient hauptsächlich der zitterfreien Wärmeproduktion während des Säuglingsalters. Es wandelt über das Uncoupling-Protein-1 (UCP-1) durch Oxidation von Fettsäuren chemisch gespeicherte Energie in Wärme um ⁵⁴. Der Großteil wird im Laufe der Zeit durch weißes Fettgewebe ersetzt. In der supraklavikulären und spinalen Region lassen sich auch noch bei gesunden Erwachsenen Depots brauner Fettzellen nachweisen ⁵⁵⁻⁵⁷. Das braune Fettgewebe ist histologisch durch eine hohe Dichte an Mitochondrien und viele kleine Lipidtropfen charakterisiert. Im Gegensatz zur Maus trägt es beim adulten Menschen jedoch keine genetischen Charakteristika des klassischen braunen Fettgewebes, sondern ähnelt vielmehr einer dritten Fettzellart, dem beigefarbenen Adipozyten. Das beigefarbene Fettgewebe stellt eine Zwischenform zwischen braunem und weißem Fettgewebe dar. Es trägt Charakteristika von beiden Fettgewebstypen und kann in Abwesenheit von thermischen Stimuli der Energiespeicherung dienen. Wird es jedoch durch Kälte angeregt, produziert es Wärme ^{34, 47}.

1.4.3 Adipogenese

Die Adipogenese beschreibt die Differenzierung einer mesenchymalen Stammzelle in eine reife Fettzelle (Adipozyt) und ist mit morphologischen und genetischen Veränderungen der Zelle assoziiert ²⁶. Sie wird in zwei Phasen unterteilt: die Determinierung und die endgültige Differenzierung. Während der Determinierung entscheiden sich die pluripotenten Stammzellen für die adipogene Zelllinie und entwickeln sich zu Vorläuferzellen, den Präadipozyten. Dabei verlieren sie ihre Pluripotenz, behalten jedoch ihr fibrozytenartiges Aussehen bei. Im Rahmen der Determinierung kommt es außerdem zu einem Proliferationsstopp und anschließend zur mitotischen Zellteilung der Präadipozyten ⁵⁹.

In der darauffolgenden Differenzierung entwickeln sich die Vorläuferzellen zu reifen differenzierten Zellen, den Adipozyten, indem sie die zellspezifischen Charakteristika annehmen. Dabei geht die Zelle in einen erneuten Zellzyklusarrest und es kommt zur

Aktivierung von adipogenen Genen ⁵⁹. Eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, unter denen der Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptor Gamma (PPAR γ) und die CCAAT/Enhancer-Binding Proteine (C/EBPs) wahrscheinlich die entscheidenden sind, sind dabei involviert. Weitere positive Stimulatoren wie der Insulin-like-Growth-Faktor-1, die Single Transduktoren und Transkriptionsaktivatoren (STATs), der Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor, das Sterol-Regulatory-Element-Binding-Protein-1 (SREBP1), Fettsäuren, Prostaglandine und Glucocorticoide sowie die Wingless und INT-1-Proteine (Wnts), Zellzyklusproteine, Krüppel-like-Faktoren (KLFs), CLOCK-Gen-Proteine, verschiedene Interferon regulierende Faktoren, die GATA bindenden Proteine-2 und -3 und der B-Zell-Faktor 1 ⁵⁹. Zusätzlich beeinflussen extrazelluläre Faktoren ⁶⁰ sowie Alter, Geschlecht und Lebensstil ^{40, 55} die Adipogenese in unterschiedlichem Maße ⁶².

Zur Gewinnung von ASCs bieten sich verschiedene Möglichkeiten an, diese aus dem Fettgewebe zu extrahieren ohne zusätzliche Risiken für den Spender.

1.5 Liposuktion

Die Liposuktion ist eine minimalinvasive Methode Fett aus dem Unterhautfettgewebe durch einen extern aufgebauten Sog über stumpfe Kanülen abzusaugen. Laut der American Society for Aesthetic Plastic Surgery war sie 2016 die häufigste durchgeführte ästhetische Operation in den USA ⁶³. Die Liposuktionstechnik im heutigen Sinne wurde erstmals durch die amerikanischen Chirurgen Fischer und Fischer aus Paris 1976 beschrieben ⁶⁴. Seither wurde das Grundprinzip der Technik beibehalten, jedoch erfolgten im Laufe der Jahre Weiterentwicklungen der Methodik und Technik um die Effizienz zu steigern und das Operationsrisiko bzw. die Komplikationen zu senken. Technische Fortschritte wie der Ultraschall (ultrasound assisted liposuction), Laser (laser assisted liposuction), Hochfrequenz-Impulse (radiofrequency assisted liposuction), Wasserstrahlen (water assisted liposuction) und die Oszillation (power assisted liposuction) kamen in den letzten Jahren unterstützend zur traditionellen Technik hinzu ⁶⁵.

1.6 Resektion von Fettgewebe

Eine weitere Möglichkeit ASCs zu gewinnen, stellt die Resektion und Digestion von subkutanem Fettgewebe dar. Dies kann beispielsweise aus dem Resektat eines ästhetischen Eingriffes, wie zum Beispiel einer Abdominoplastik, gewonnen werden.

Bezüglich der Effizienz beider Verfahren bringt die Literatur unterschiedliche Tendenzen hervor. Einige Forschungsgruppen fanden keinen Unterschied in der Menge an funktionsfähigen Zellen der SVF weder bezüglich der Gewinnungsmethode (Resektion und Liposuktion) noch dem anatomischen Gewinnungsareal^{28,66}. Andere Arbeitsgruppen wiederum zeigten, dass aus reseziertem Fettgewebe weniger funktionstüchtige Progenitorzellen als im Rahmen einer Liposuktion gewonnen werden können⁶⁷. Ähnlich divergierend sind die Ergebnisse zur gewonnenen Zellzahl. Jurgens et al. zeigte, dass die Menge an gewonnenen ASCs aus dem subkutanen Fettgewebe des Abdomens größer ist als aus der Hüfte und Oberschenkel⁶⁸. Gegenteilig dazu konnten Tsekouras et al. zeigen, dass der Anteil an Zellen der SVF und ASCs nach Liposuktion im Bereich des äußeren Oberschenkel höher war⁶⁹.

Auf Grund der herausragenden Eignung von ASCs als Quelle mesenchymaler Stammzellen, nicht nur für das Tissue Engineering, ist der Bedarf tendenziell steigend. Da jedoch multiple Faktoren die Güte der Gewinnung beeinflussen und in der Literatur die Art und Lokalisation der Gewinnung von ASCs stark variieren, erscheint es sinnvoll, die am naheliegendsten Techniken, die Liposuktion und mechanische Gewinnung, auf ihre Effizienz und Funktionalität der ASCs zu untersuchen. Es soll dabei in dieser Arbeit die klassische maschinelle Liposuktion mittels Unterdruck (Suction assisted Liposuction) sowie die Liposuktion mittels Spritze betrachtet werden.

1.7 Scaffolds

Als Scaffolds werden temporäre, die Struktur vorgebende Matrices für Zellen und Gewebe bezeichnet ⁷⁰. Sie sollten resorbierbar, jedoch temporär volumenstabil sein. Des Weiteren sollten sie porös sein, um morphologische Veränderungen von Zellen und die Ausbildung vom ECM zu erlauben. Außerdem sollten sie die Diffusion von Nähr- und Abfallprodukten sowie die Einbindung und Präsentation von bioaktiven Stoffen ermöglichen, Zelladhäsion und –migration fördern und die mechanische Flexibilität oder Rigidität des zu imitierenden Gewebe ermöglichen ⁷¹. Des Weiteren sollten sie einfach reproduzierbar, dem gewünschten Gewebe entsprechend, im 3D-Format herstellbar sein ^{66, 67}. Um eine geeignete Umgebung für Vorläuferzellen zu schaffen und die Ausbildung von reifem Fettgewebe zu fördern, wäre es günstig, wenn die Trägermatrix neben den oben genannten Eigenschaften Zytokine, Wachstumsfaktoren oder bioaktive Moleküle bereitstellen könnte ⁷⁴.

Bisher zeigten poröse Trägermatrices wie resorbierbare Polymere aus Polylactat (PLA) ⁷⁵, Polyglycolsäure (PGA) oder Mischverbindungen dieser, Poly(lactid-co-glycol)-säure (PLA/PGA/PLGA) ⁷⁶, sowie Kollagene ^{75, 77}, Seide ⁷⁵ oder Hyaluronsäureester ⁷⁸ aber auch Hydrogele basierend auf Polyethylenglycol (PEG) ⁷⁹, Fibrin ⁸⁰ und Hyaluronsäure (HA) ⁸¹ sowie dezellularisierte Fettgewebmatrices (DAT) ^{82, 83, 84}, eine gute Eignung für das Tissue Engineering.

1.8 Hyaluron-basierte Scaffolds für das Tissue Engineering von Fettgewebe

Die Literatur bietet bereits ein vielfältiges Bild an klinischen Bereichen in denen Hydrogele auf Hyaluronsäurebasis eingesetzt werden und zukünftig eingesetzt werden könnten. Dazu zählen auffüllende Materialien in der ästhetischen ^{41, 42}, orofazialen ⁸⁷ und rekonstruktiven Chirurgie ⁸⁸, Wundauflagen in der Verbrennungsmedizin und bei chronischen sowie komplizierten Wunden ^{89, 90}, im Rahmen der Rekonstruktion und Regeneration von Knorpel- und Knochendefekten ⁹¹⁻⁹³, Nervenzellen ⁹⁴, Weichgewebe ⁹⁵, glatter Muskelzellen ⁹⁶ und der Kornea ⁹⁷ aber auch als Trägersubstanzen für bioaktive Moleküle und Zellen ⁹⁸.

Hyaluronsäure (HA) oder auch Hyaluronan ist ein lineares Glycosaminoglycan, dessen Grundgerüst ein langkettiges Polysaccharid aus zwei Glukosederivaten, β -1,4-D-Glucuronsäure und β -1,3-N-Acetyl-D-Glucosamin bildet. Sie ist ein essenzieller Bestandteil der Extrazellulärmatrix des Bindegewebes aber auch weiterer Strukturen wie der Haut, dem Bulbus oculi, dem Knorpel, der Herzklappen oder der Nabelschnur.

HA bindet an verschiedene zelluläre Oberflächenproteine und beeinflusst darüber verschiedenste physiologische Funktionen wie die Organentwicklung, Zellproliferation, Zellalterung, Zellmigration, Entzündungsreaktionen, das Immunsystem, Apoptose und Tumorgenese⁹⁹⁻¹⁰¹. Des Weiteren wird angenommen, dass HA Einfluss auf die Insulinsensitivität von Adipozyten und Muskelzellen bei Diät-assoziiertem Diabetes mellitus nimmt¹⁰¹.

Für das Tissue Engineering von Fettgewebe könnte HA eine ausgesprochen gute Grundlage darstellen. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass während der Adipogenese zum einen die HA-Synthese gesteigert wird und zum anderen das Vorhandensein von HA in der ECM für die Adipogenese von großer Bedeutung ist¹⁰². Eine Arbeitsgruppe aus Taiwan zeigte, dass es durch Zugabe von HA zum Kulturmedium zu einer verlängerten Lebenszeit, verringerten Alterung und gesteigerten adipogenen Differenzierung von ASCs kommt⁸¹. Des Weiteren führt die Anwesenheit von HA bei Endothelzellen und Makrophagen zur Expression des Chemokine und Chemotaxis-Reizes CXCL1^{103, 104}. Daraus schlussfolgernd besteht die Annahme, dass durch das von Präadipozyten ausgeschüttete Chemokine CXCL1 ebenfalls ein Chemotaxis-Reiz an ASCs gesandt wird¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Auf Grund seiner vorteilhaften Charakteristika wie Wasser einzubinden, welches mit einer Quellneigung einhergeht, der Resorbierbarkeit, der einfachen Herstellbarkeit, der Möglichkeit der minimal invasiven klinischen Anwendung und die der Extrazellulärmatrix ähnlichen strukturellen Eigenschaften, eignet sich HA besonders für die Verwendung als Hydrogel im TE. Die oben genannten Eigenschaften sowie die Stabilität der HA können dabei durch Crosslinker, funktionelle Gruppen und deren Dichte beeinflusst^{98, 107} und damit die klinische Anwendungsbreite erheblich erweitert werden. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass die Proliferation und adipogene Differenzierung von ASCs positiv in HA-Scaffolds beeinflusst wird¹⁰⁸.

1.9 Bioaktive Scaffolds

Als Crosslinker wurde in dieser Arbeit Polyglycidol-Acrylat (PG) verwendet. Dies ist ein synthetisches Polymer und strukturell dem bereits vielfältig verwendeten Polyethylenglycol (PEG) ähnlich. In der Vergangenheit konnte PEG ebenfalls mit HA gekoppelt werden und wurde als ein viskoelastisches, dreidimensionales, kovalent verlinktes Polymer mit einem über 90 prozentigen Wasseranteil beschrieben¹⁰⁹. Diese Charakteristika simulieren eine architektonische Umgebung, die dem Weichgewebe stark ähnelt und eine Diffusion von Nährstoffen und Abfallprodukten zulässt¹¹⁰. Ein Nachteil von PEG-Hydrogelen ist, dass es keine Möglichkeit zur Adhäsion für Zellen bietet¹¹¹. Aus diesem Grund begann man die Hydrogele mit bioaktiven Gruppen und Wachstumsfaktoren zu funktionalisieren. In der Vergangenheit wurden die günstigen Auswirkungen eingebundener funktioneller Gruppen in PEG-Hydrogelen auf die Proliferation, Funktionalität und Differenzierung von Zellen vielfach untersucht. Beispielsweise erhöhte die Einbindung der Peptidsequenz IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) in PEG-Hydrogele das Überleben, verringerte die Apoptose und erhöhte die Funktionalität von Insulin-produzierenden β -Zellen. Dies konnte durch die Kombination der Peptidsequenzen YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) und IKVAV sogar noch gesteigert werden¹¹². IKVAV, YIGSR wie auch RGD (Arg-Gly-Asp) sind Peptidsequenzen aus Zelladhäsionsproteinen der Extrazellulärmatrix. RGD ist in multiplen Proteinen wie den Matrixproteinen Fibronectin und Laminin (α 1-Kette) enthalten¹¹³. IKVAV (α 1-Kette) und YIGSR (β 1-Kette) entstammen dem Laminin¹¹⁴. Bereits 1987 konnte eine Arbeitsgruppe aus Bethesda zeigen, dass YIGSR einen positiven Einfluss auf die Migration und Adhäsion von Zellen hat¹¹⁵. Später zeigten Patel et al., dass Präadipozyten eher an mit YIGSR modifizierten PEG-Oberflächen haften als an unmodifizierten PEG-Oberflächen¹⁰⁹. Auch bieten RGD funktionalisierte PEG-Hydrogeloberflächen Zellen eher eine Umgebung zum Adhären und Ausbreiten¹¹⁰. Dies könnte über den Integrin-Signalweg zur einer Reduktion der Apoptose und einer Steigerung der Funktionalität zum Beispiel von humanen mesenchymalen Stammzellen führen¹¹⁶.

Bioaktive Funktionalisierungen sind jedoch bei PEG nur limitiert möglich, da sowohl bei linearem als auch bei verzweigtem PEG nur Bindungsstellen für funktionelle Gruppen an den distalen Enden der Polymerketten vorhanden sind. Im Gegensatz zu PEG hat PG eine

zusätzliche Hydroxylgruppe an jeder sich wiederholenden Einheit. Diese ermöglichen die Bindung von multiplen funktionellen Gruppen ¹¹⁷ und die daraus resultierende Möglichkeit der Schaffung einer biofunktionalen Architektur ¹¹⁸. Wie auch PEG ist auch PG hydrophil, biokompatibel und chemisch leicht modifizierbar. In verschiedenen Arbeiten wurden Hydrogele aus PG bereits genutzt um die Zelladhäsion und -einbindung zu fördern oder als Zellträger zu dienen ^{92,119,120}. Dies wurde bisher vor allem im Rahmen des Tissue Engineering von Knorpel genutzt. Auch das TE von Fettgewebe könnte von einer bioaktiven Modifikation des Scaffolds profitieren. Auf Grund der günstigen Charakteristika von Hyaluronsäure für die Nutzung als Hydrogelbasis scheinen biofunktionalisierte, mit Polyglycidol-verlinkte, Hyaluronsäure-basierte Hydrogele dementsprechend eine vielversprechende Alternative für das Tissue Engineering von Fettgewebe.

2. Zielsetzung

Das Tissue Engineering von Fettgewebe könnte einen wichtigen Beitrag zur Behandlung von Weichgewebsdefekten leisten. Besonders mit humanen mesenchymalen Stammzellen besiedelte Scaffolds bieten dafür eine vielversprechende Grundlage.

Ziel dieser Arbeit war es, in zwei Teilbereichen, zum einen die Effizienz verschiedener Gewinnungsmethoden von mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe zu untersuchen und zum anderen ein neuartiges Hyaluronsäure-basiertes Hydrogel auf die Eignung als Zellträgermatrix für ASCs im Rahmen des Tissue Engineering von Fettgewebe zu erproben.

Dabei sollten im ersten Teilbereich zwei verschiedene Liposuktionsmethoden sowie eine mechanische Gewinnungsmethode von ASCs aus dem subkutanen Fettgewebe des Abdomens untersucht werden. Es wurde dafür die Effizienz der Gewinnungsmethode sowie die Funktionalität der ASCs in der 2-D-Kultur verglichen.

Im zweiten Teilbereich sollten thiolmodifizierte HA-basierte Hydrogele unter Verwendung des synthetischen Polymers Polyglycidol-Acrylat als Crosslinker auf ihre Eignung als Scaffolds für das Tissue Engineering von Fettgewebe untersucht werden. Der Vorteil des PG-Crosslinkers ist die Möglichkeit multiple funktionelle Gruppen zu binden um die extrazelluläre Umgebung durch Adhäsionsmoleküle und exogene Stimuli zu verbessern. Für diese Arbeit sollten dazu HA-basierte PG-Hydrogele erstellt und diese mit ASCs besiedelt werden. Es sollte die Eignung der HA-PG-Hydrogele als Trägermatrix unter Erhalt der Funktionalität sowie der adipogenen Differenzierung der inkorporierten ASCs gezeigt werden. Zusätzlich wurden die HA-PG-Hydrogele mit den Peptidsequenzen IKVAV, YIGSR und RGD biofunktionalisiert, mit dem Hintergrund die Zelladhäsion sowie die adipogene Differenzierung positiv zu beeinflussen. Die mögliche Beeinflussung der ASCs durch die biofunktionalisierte Umgebung der modifizierten HA-PG-Hydrogele sollte ebenfalls untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

| | |
|--|--|
| Präzisionswaage PA413C | Ohaus, Zürich, Schweiz |
| Einweg-Absaugbehälter | Medela Medizintechnik, Dietersheim, Deutschland |
| Chirurgischer Sauger ATMOS Rekord 55 | ATMOS Medizin Technik, Lenzkrieh, Deutschland |
| CO ₂ Inkubator NU-5510E | NuAire™, Plymouth, Minnesota, USA |
| Digitalkamera DP71 | Olympus, Hamburg, Deutschland |
| Digitalkamera XC30 | Olympus, Hamburg, Deutschland |
| Fluoreszenzspektrometer Tecan GENios pro | Tecan, Crailsheim, Deutschland |
| Gefrierschrank | Liebherr, Biberach, Deutschland |
| Kryotom Cryostat CM 3050 S | Leica, Wetzlar, Deutschland |
| Kühlschrank Liebherr FSK 5000 | Liebherr, Biberach, Deutschland |
| Mastercycler® Gradient | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Mehrkanalpipette Eppendorf Research 30-300 µl | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Mikroskop BX51 | Olympus, Hamburg, Deutschland |
| Mikroskop invertiert IX51 | Olympus, Hamburg, Deutschland |
| Mikrozentrifuge Sigma 1-14 | Sigma Zentrifugen, Newton, Shropshire, UK |
| Nanodrop 2000c Spektrofotometer | Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |

| | |
|---|---|
| pH-Meter HI2210 | Hanna Instrumente, Kehl am Rhein, Deutschland |
| Pipetten Eppendorf Research 10-100 µl und 100-1000 µl | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Pipettierhelfer accu-jet® pro | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland |
| Plattformschüttler | Heidolph, Schwabach, Deutschland |
| Real-Time PCR Detektionssystem CFX96™ | Bio-Rad, München, Deutschland |
| Sicherheitswerkbank Herasafe | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Thermomixer | Ditabis, Pforzheim, Deutschland |
| TissueLyser | Qaigen, Hilden, Deutschland |
| Ultraschall Homogenisator | Bandelin electronics GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland |
| Wasserbad | Memmert, Schwabach, Deutschland |
| Zentrifuge Rotina 420 R | Hettich, Tuttingen, Deutschland |

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--|
| Cryovials 2ml | Simport, Beloeil, Quebec, Kanada |
| Deckglas | Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland |
| Durchflusszytometrie Reagenzröhrchen aus Polypropylen 75 ml x 12mm | Hartenstein Laborbedarf |
| Falcon™ Zellsieb 100 µm | BD Biosciences, Franklin Lakes, USA |

| | |
|---|---|
| Gewebekulturplatten 6 Well, 12 Well | Greiner Bio-One AG, Kremsmünster, Österreich |
| Gewebekulturplatte 96 Well | TPP AG, Trasadingen, Schweiz |
| Gewebekulturplatte 24 Well | Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Glas-Pasteurpipetten | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland |
| Insulinspritzen | B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Kanülen | BD Biosciences, Franklin Lakes, USA |
| Liposuktionskanülen (Durchmesser 0,6 cm, 30 cm Länge) | Medicon eG, Tuttlingen, Deutschland |
| Omnifix® Spritze 60ml | B. Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Mikrotomklingen | Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan |
| Nalgene™ Flaschenaufsatzfilter | Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Objektträger Super Frost® | R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland |
| PCR-Streifen mit 8 Gefäßen | Biozym Scientific, Hessisch Oldenburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen mit Filter 10 µl, 20 µl, 100µl 200 µl, 1000 µl | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Pipettenspitzen 20 µl, 1000 µl | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |

| | |
|--|--|
| Pipettenspitzen 200 μ l, 300 μ l, 1000 μ l | Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Polypropylen Röhrchen 15 ml, 50 ml | Greiner Bio-One AG, Kremsmünster, Österreich |
| Probenbehälter aus Polyethylen 2,5 ml | Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland |
| Puderfreie Nitril Untersuchungshandschuhe | Medline Industries Inc., Mundelein, IL, USA |
| Reagenzreservoir | VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA |
| SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml, 2,0 ml | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml | Greiner Bio-One AG, Kremsmünster, Österreich |
| Spritzen 10 ml, 20 ml | BD Biosciences, Franklin Lakes, USA |
| Spritzenfilter 0,2 μ l | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| Verschlussfolie Parafilm [®] | VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA |
| Zellkulturflaschen T75, T175 | Greiner Bio-One AG, Kremsmünster, Österreich |

3.1.3 Chemikalien

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien und Lösungen sind ausschließlich von den Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich (München, Deutschland). Neben diesen wurden die folgenden benutzt:

| | |
|--|--|
| Aqua ad injectabilia | B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Dimethyl Sulfoxide (DMSO) | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| DMEM/F12 (+L-Glutamin) | Gibco® Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Fetale Bovine Serum | Gibco® Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Glycerol-Standard | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Glycosil® (Hyaluronsäure, thiolysiert) | ESI-BIO, Alameda, Kalifornien, USA |
| Kollagenase NB4 (des Clostridium histolyticum) | Serva, Heidelberg, Deutschland |
| Mayer`s Hämatoxylin | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Papain | Worthington, Lakewood, New Jersey, USA |
| Penicillin-Streptomycin | Gibco® Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Phosphat gepufferte Salzlösung Tabletten (Dulbecco A) | Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Polyglycidol-Acrylat | Arbeitsgruppe Groll am Lehrstuhl Für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde der Universität Würzburg |
| Präadipozyten Basalmedium (PGM-2™) | Lonza, Basel, Schweiz |

| | |
|-------------------------------|---|
| Terralin® Flüssigdesinfektion | Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland |
| Thesit® Gel | Gepepharm GmbH, Hennef, Deutschland |
| Tissue-Tek® | Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande |
| Trypsin-EDTA 0,25% (1x) | Gibco® Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA |
| TRIzol® Reagent | Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA |

3.1.4 Puffer und Lösungen

| | |
|---|---|
| Erythrolyse-Puffer | 500 ml ddH ₂ O 4,14 g NH ₄ CL (18,6 mM) 0,69 g Na ₂ CO ₃ (9,4 mM) 0,15 g EDTA (3,4 mM) |
| Hoechst 33258 Standardlösung Arbeitslösung | 0,1 mg/ml in ddH ₂ O 0,1 µl/ml in 1x TEN Puffer |
| Kollagenase Puffer (pH 7,4) | 100 mM HEPES 120 mM NaCl 50 mM KCl 1 mM CaCl ₂ 5 mM Glukose frisch dazu: 0,1 % Kollagenase NB4 0,1 % BSA |

| | |
|--|---|
| Oil Red O Färbelösung | 0,5 g Oil Red O 100 ml Isopropyl-Alkohol 66,6 ml ddH ₂ O |
| Papainase-Puffer | 10 ml PBE-Puffer 30 U Papain Stocklösung 8,5 mg L-Cystein |
| PBE-Puffer (pH 6,5) | Phosphat gepufferte Salzlösung, 1 % Bovine Serum Albumin, 2 mM EDTA |
| 1x Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) | 1 PBS (Dulbecco A) Tablette in 100 ml ddH ₂ O |
| Phosphat Saline Puffer (pH 7,4) | 50 mM Phosphat Puffer 2 mM Na ₂ EDTA 2 x H ₂ O 2 M NaCl |
| 1x TEN Puffer (pH 7,4) | 10 mM Tris 0,1 M NaCl 1 mM EDTA |
| 1x und 2x Thesit-Lösung (0,5 % bzw. 1 %) | 99,5 % H ₂ O 0,5 % bzw. 1 % Thesit-Gel |

3.1.5 Zellkulturmedien

| | |
|-----------------|--|
| Wachstumsmedium | Präadipozyten Basalmedium (PGM-2™) 1 % Penicillin/Streptomycin 10 % Fetal Bovin Serum |
|-----------------|--|

| | |
|------------------|--|
| Einfrriermedium | DMEM/F12 10 % Fetal Bovin Serum 1 % Penicillin/Streptomycin 5 % DMSO |
| Induktionsmedium | Präadipozyten Basalmedium (PGM-2™) 1 % Penicillin/Streptomycin 10 % Fetal Bovine Serum 1 µl/ml Insulin 1 µl/ml Dexamethason 4 µl/ml Indometacin 20 µl/ml IBMX |
| Basalmedium | DMEM/F12 (+L-Glutamin) 1 % 1 % Penicillin/Streptomycin 10 % Fetale Bovine Serum |

3.1.6 Induktoren zur adipogenen Differenzierung

| | |
|---|---|
| Dexamethason-Stock | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA 3,925 mg/ml in EtOH lösen (10 mM) |
| Humaninsulin-Stock | PromoCell, Heidelberg, Deutschland 10 mg/ml in 30 mM HCL (1,7 mM) |
| 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)- Stock | Serva, Heidelberg, Deutschland 5,55 mg/ml in ddH ₂ O (25 mM) + eine Spatelspitze Na ₂ CO ₃ |
| Indometacin-Stock | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA 17,89 mg/ml in EtOH lösen (50 mM) |

3.1.7 Kits und Multikomponenten-Systeme

| | |
|---|---------------------------------------|
| ImProm-II TM Reverse Transcription System | Promega, Madison, Wisconsin, USA |
| Live/Dead Zell Färbekit | PromoKine, Heidelberg, Deutschland |
| MESA GREEN qPCR TM MasterMix Plus für SYBR [®] | Eurogentec, Seraing, Belgien |

| | |
|--------------------------------------|---|
| Serum Triglyceride Bestimmungskit | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| TissuCol [®] Kit 1.0 Immuno | Baxter, Unterschleissheim, Deutschland |

3.1.8 Peptide und Oligonukleotide

| | |
|-----------------|------------------------------------|
| CGIKVAVAG(CG-8) | GeneCust, Dudelange, Luxembourg |
| CGYIGSRG(CG-8) | GeneCust, Dudelange, Luxembourg |
| CGRGDSG(CG-7) | GeneCust, Dudelange, Luxembourg |

Tab. 3: Oligonukleotide (Real time qRT-PCR)

| Primer | Hersteller | Katalognummer |
|---|--|-------------------|
| PPARγ | QuantiTect [®] Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland | QT00029841 |
| C/EPBα | QuantiTect [®] Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland | QT01667694 |
| aP2 | QuantiTect [®] Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland | QT00203357 |
| Housekeeper EF1α | Forward: 5'-ccccgacacacatttg-3' Reverse: 5'-tgactttccatgaacc-3' | Biomers GmbH, Ulm |

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung von Fettgewebe für die Isolation von ASCs

Um Fettgewebe für die Isolation von ASCs zu gewinnen, stehen verschiedene Gewinnungsmethoden zur Verfügung. Es wurden drei verschiedenen Gewinnungsmethoden auf ihre Effizienz im Sinne des Zellzahlertrages und der Viabilität der gewonnenen ASCs untersucht.

Als Ausgangsgewebe diente humanes, abdominelles, subkutanes Fettgewebe nach elektiver Abdominoplastik von vier weiblichen Spendern. Subkutane Fettgewebe wurde zu gleichen Teilen geteilt, sodass für jede Gewinnungsmethode die gleiche Grundmenge an Fettgewebe zur Verfügung stand. Für die Nutzung von Fettgeweben von humanen Spendern zur Isolation von ASCs bestand ein Ethikvotum 141/14.

Folgend werden die drei Gewinnungsmethoden beschrieben. Zwei dieser Methoden gehören übergeordnet zur Liposuktion. Alle Methoden wurden unter sterilen Bedingungen und durch dieselbe Person intraoperativ durchgeführt.

Liposuktion

Maschinelle Liposuktion (ML)

Mit 0,6 bar kontinuierlichen Unterdrucks wurde der Fettgewebslappen mit dem chirurgischen Sauger ATMOS Record 55 und einer stumpfen Liposuktionskanüle von Medicon mit einer Länge von 30 cm und einem Durchmesser von 0,6 cm gleichmäßig und standardisiert abgesaugt. Das abgesaugte Material wurde durch das Liposuktionsgerät in einem sterilen Auffangbehälter gesammelt und im nächsten Schritt der SVF-Isolation zugeführt.



Abb.2: A: Stumpfe Liposuktionskanüle; B: Chirurgischer Sauger ATMOS Record 55; C: Abgesaugtes Fett

Liposuktion mit einer Liposuktionsspritze (SL)

Der dafür separierte Fettgewebslappen wurde mit einer Omnifix® Spritze (60 ml) von B. Braun und einer stumpfen Liposuktionskanüle der Länge 30 cm und von 0,6 cm Durchmesser standardisiert abgesaugt. Das abgesaugte Material wurde steril gesammelt, in 50 ml Probenröhrchen überführt und der SVF-Isolation zugeführt.



Abb. 3: Omnifix® Spritze (60 ml) von B. Braun und stumpfe Liposuktionskanüle

Gewinnung von Fettgewebe mittels mechanischer Zerkleinerung

Das subkutane Fettgewebe wurde unter sterilen Bedingungen im OP-Saal von der Haut grob mit einer Schere abgetrennt, zerkleinert und in 50 ml Polypropylen Röhrchen überführt. Es wurde dann im Labor in der Sicherheitswerkbank weiter zerkleinert und in Probenröhrchen zur SVF Isolation überführt.

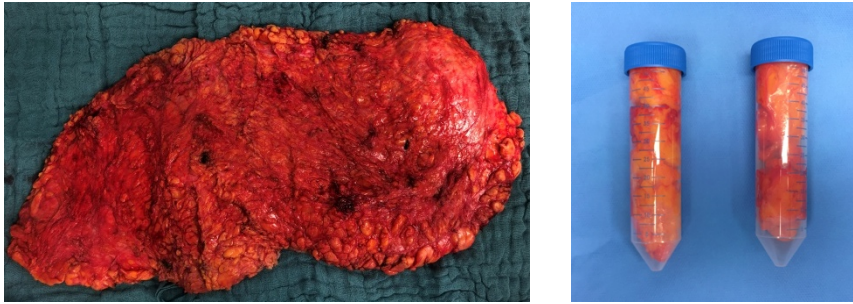


Abb. 4: Reseziertes subkutanen Fettgewebe

3.2.2 SVF-Isolation

Das sterile Fettgewebe wurde zu je 25 ml in 50 ml Polypropylen-Röhrchen aliquotiert. Die Probenröhrchen wurden mit Kollagenase-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Für den Verdau wurden Röhrchen für zwei Stunden auf den Plattformschüttler mit 100 rpm im CO₂ Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dabei wurden sie in 15 Minutenabständen geschüttelt, sodass sich das Fett mit dem Kollagenase-Puffer gleichmäßig vermischte. Anschließend wurden die groben Fettanteile bei 311 x g für zehn Minuten abzentrifugiert und verworfen. Die Polypropylen-Röhrchen wurden anschließend erneut auf 50 ml mit sterilem PBS aufgefüllt und bei 311 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Das restliche oberflächliche Fett und der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Die Suspension wurde danach durch ein 100 µm Nylon Cell Strainer gegeben, um gröbere Bestandteile heraus zu filtern. Das Filtrat wurde anschließend bei 700 x g für zehn Minuten pelletiert. Die Zellpellets der SVF wurden danach in Basalmedium aufgenommen, 10 Min. in Erythrolyse-Puffer inkubiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer unter dem inversen Mikroskop bestimmt. Danach konnte die SVF-Zellsuspension entweder einem Versuch zugeführt werden oder bis zum Gebrauch im Stickstofftank aufbewahrt werden. Für die permanente Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen in Einfriermedium zu 1 Million Zellen aufgenommen und in 2 ml Cryovials eingefroren.

3.2.3 2D Zellkultur

Die kryokonservierte SVF wurde zum Auftauen zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt und in das bereits vorgewärmte Kulturmedium in 175 ml Kulturflaschen gegeben. Dabei wurden 5000 Zellen pro cm² ausgesät. Durch die Eigenschaft der Plastikadhärenz der ASCs separierten sich diese von den übrigen zellulären Bestandteilen der SVF. Das Basalmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert, bis zur Konfluenz in den Flaschen herangezogen und anschließend passagiert.

Für das Passagieren der Zellen wurde das Basalmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin für 5 Min. gelöst. Die Reaktion wurde mit der doppelten Menge serumhaltigem Basalmedium gestoppt, die Zellen in Probenröhrchen überführt und anschließend bei 311 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in frischem Basalmedium resuspendiert. Danach erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer unter dem inversen Mikroskop. Anschließend wurden die Zellen wieder mit einer Menge von 5000 Zellen pro cm² in die 175 ml Kulturflaschen gegeben.

Zur Untersuchung der Funktionalität der ASCs der verschiedenen Gewinnungsmethoden wurden Proliferationsassays und histologische Untersuchung der 2D-Kulturen in Passage 0, 1, 2 und 3 angefertigt. Des Weiteren erfolgte in Passage 3 die adipogene Differenzierung der ASCs in der 2D Kultur für 14 und 21 Tage mit anschließender Bestimmung des DNA- und Triglycerid-Gehaltes, sowie einer erneuten histologischen Untersuchung.

Für die 3D Kulturen wurden die ASCs in Passage 3 in den Hydrogel-Versuchen eingesetzt.

Für den Proliferations-Assay der drei ASC-Gewinnungsmethoden wurde pro Methode ein DNA-Assay von Tag 0, 1, 2, 5 und 7 in Passage 1 angefertigt. Des Weiteren wurden DNA-Assays der Tage 0, 2, 5 und 7 der Passagen 2 und 3 durchgeführt. Pro Tag und Gewinnungsart wurden drei biologische Replikate (n=3) erstellt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 5000 ASCs/ cm² pro Well ausgesät. Die ASCs wurden anschließend in Basalmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert.

An den jeweiligen Tagen wurden die ASCs für den DNA-Assay geerntet und dieser nach später beschriebenen Protokoll durchgeführt. Des Weiteren wurden pro Gruppe und Evaluationstag 2 - 3 Wells für die histologische Analyse vorbereitet. Dafür wurden die ASCs ebenfalls mit PBS gewaschen, mit Formalin 3,7 % für 10 Min. fixiert, anschließend mit PBS gewaschen und mit Oil-Red-O (ORO) und Hämatoxylin gefärbt.

3.2.4 Herstellung und 3D Zellkultur der Hyaluronsäure-Polyglycidol-Hydrogele

Die Hyaluronsäure-basierten-Polyglycidol-Gele hatten ein Volumen von 40 μl und bestanden aus einem 4:1 Verhältnis Hyaluronsäure (HA) und Polyglycidol-Acrylat (PG-ACR). Des Weiteren wurden 800.000 ASCs pro Gel verwendet.

Die PG-ACR-Suspension wurde von den Kollegen der Arbeitsgruppe Groll des Lehrstuhles für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde der Universität Würzburg synthetisiert und uns zur Verfügung gestellt. Sie enthielt zu 20 % mit Acrylat funktionalisiertes lineares Polyglycidol ($M_n = 4200 \text{ Da}$), in einer Konzentration von 29,4 mg/ml der Stock-Lösung, sowie den Stabilisator Phenothiazin. Um eine reine PG-ACR-Lösung aus der PG-ACR-Phenothiazin-Suspension zu gewinnen, wurde die Suspension bei 14.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, damit sich das Phenothiazin am SafeSeal Reagiergefäß absetzt. Aus dem Überstand wurde die benötigte Menge entnommen und steril filtriert.

Für ein 40 μl Hydrogel benötigte man 1,883 μl PG-ACR-Lösung (55,36 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Diese wurde mit PBS auf 8 μl aufgefüllt. Für die Peptid-funktionalisierten Hydrogele wurde das Peptid in der benötigten Konzentration der PG-ACR-Lösung zugefügt und für ein bis zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die PG-ACR-Lösung, entsprechend den zu untersuchenden Gruppen in Reaktionsgefäße aliquotiert.

Für die Herstellung der Hyaluronsäurekomponente wurde Glycosil® verwendet. Dies ist eine kommerziell erhältliche thiolmodifizierte Hyaluronsäure. Hierfür wurde 1 ml steriles Wasser dem Glycosil®-Reaktionsgefäß, welches 1 mg an thiolmodifizierter Hyaluronsäure enthielt, zugeführt und für 45 Minuten auf dem Plattformschüttler inkubiert.

Für die Hydrogel-Versuche wurden die ASCs bis Passage drei proliferiert. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsinierung aus den Kulturflaschen herausgelöst, gezählt, in PBS aufgenommen und in der entsprechenden Menge in die zu untersuchenden Gruppen aufgeteilt. Danach wurden die Zellsuspensionen erneut bei 311 x g zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in der gruppenspezifischen Menge Hyaluronsäure aufgenommen.

Für die Hydrogelherstellung wurde nun die Zell-HA-Suspension mit der PG-ACR-Lösung im Verhältnis 4:1 vermischt. Anschließend wurden jeweils 40 μl des Gemisches

in Glasringe mit einem Innendurchmesser von 5 mm pipettiert. Zur Aushärtung der Gele wurden diese für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt und danach mit Wachstumsmedium bedeckt. Die Glasschablonen wurden nach 24 Stunden entfernt. Als Kontrollgruppen zu den PG-ACR-Hydrogelen verwendeten wir Fibringele. Für die Herstellung eines 40 µl Fibringel wurden das TissuCol® Kit 1.0 Immuno verwendet. Das TissuCol-Fibrinogen sowie die Thrombin-L Lösung wurde in einem Verhältnis von 1:1 vermischt und 800.000 Zellen pro Gel hinzugefügt. Die Suspension wurde ebenfalls in Glasringe mit einem Innendurchmesser von 5 mm pipettiert. Die Gele wurden auf gleiche Weise zum Polymerisieren für 45 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt und danach mit 2 ml Wachstumsmedium bedeckt. Die Glasschablonen konnten nach einer Stunde entfernt werden.

3.2.5 Adipogene Differenzierung

Für die 2D Kulturen des ASC-Gewinnungsmethoden-Vergleichs sowie für die 3D HA-PG-Kulturen erfolgte die adipogene Differenzierung nach der dritten Passage der ASC-Kultivierung. Die 2D und 3D Kulturen wurden dazu initial für zwei Tage in Wachstumsmedium präkultiviert. Danach wurden die Konstrukte/Zellen adipogen induziert. Der Tag zwei der Präkultivierung wurde damit zu Tag null der adipogenen Induktion (d0). Die 2D und 3D Kulturen wurden kontinuierlich für 21 Tage mit Induktionsmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (d21).

Für die 2D Kultur-Versuche wurden pro Gewinnungsmethode, Analyseart und Analysetag je 3 biologische Replikate (n=3) geplant. Jedes n bestand aus zwei Wells einer 24-Well-Platte. Pro Well wurden 25.000 ASC/cm² ausgesät. Jeden zweiten Tag erfolgte der Wechsel des Induktionsmediums. Zusätzlich wurde eine nicht-induzierte Kontrollgruppe mitgeführt. Es erfolgte die Ernte und anschließende Analyse (DNA-, Triglycerid-Assay und histologische Untersuchung) an Tag 0, Tag 14 und Tag 21 der Induktion.

Für die 3D Kulturen wurden ebenfalls 3 biologische Replikate (n=3) pro Untersuchungsgruppe, Analysetag und Analyseart hergestellt. Jedes n bestand aus einem Hydrogel. Des Weiteren wurden 3D Kontroll-Kulturen hergestellt. Alle Gruppen wurden

während der Präkultivierungszeit in Wachstumsmedium kultiviert und anschließend für 21 Tage mit adipogenem Induktionsmedium induziert.

Der Mediumwechsel erfolgte ebenfalls alle zwei Tage. An Tag 0 sowie Tag 21 wurden die entsprechenden 3D Kulturen geerntet und den anschließenden Analysen (Bestimmung der Größe und makroskopische Beschreibung, Live/Dead-, DNA-, Triglycerid-Assay, histologische Untersuchung) zugeführt. Bei einigen funktionalisierten HA-PG-Gelen wurden zusätzlich noch eine quantitative Real-time qRT-PCR adipogene Transkriptionsfaktoren angefertigt.

3.2.6 Bestimmung der Größe, makroskopische Beschreibung und Fotodokumentation

Nachdem die Hydrogele an Tag null und Tag 21 geerntet wurden, wurden sie mit der Schiebelehre gemessen und fotografiert. Des Weiteren wurden ihr makroskopisches Erscheinungsbild durch subjektive Beschreibung der Form (ihre runde Ausgangsform beibehaltend), Konsistenz (weich/fest), makroskopischen Homogenität und Reproduzierbarkeit (morphologische Gleichmäßigkeit der Replikate) dokumentiert.

Danach wurden die Hydrogele den einzelnen Analysemethoden (Live/Dead-Assay, DNA-Assay, Triglycerid-Assay, Triglycerid-Färbung von histologischen Schnitten) zugeführt.

3.2.7 Zellvitalität der 3D Zellkultur mit dem Live/Dead-Assay

Der Live/Dead-Assay wurde zur Darstellung von lebenden und toten Zellen in den 3D-Kulturen herangezogen. Die 3D-Kulturen wurden dazu mit PBS zweimalig auf dem Schüttler gewaschen. Danach wurde das Live/Dead Färbekit von PromoKine verwendet und je ein Gel in 1 ml der Ethidiumbromid-Calcein-Lösung (2 μ M Calcein-acetoxymethalester, 4 μ M Ethidiumbromid Homodimer III (EthD-III) in 4 ml PBS) eingebettet und für 30 Minuten auf dem Schüttler unter Lichtausschluss inkubiert.

Nach der Inkubation wurde je ein Gel auf einen Objektträger gelegt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop BX51 (Olympus) betrachtet. Die toten Zellen konnten durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA durch UV-Licht einer

Exzitationswellenlänge von 510-550 nm angeregt und mit einem Filter einer Emissionswellenlänge von 590 nm leuchtend rotfarben dargestellt werden. In den lebenden Zellen bindet Calcein nach der Spaltung durch intrazelluläre Esterasen an Kalziumionen und fluoresziert daraufhin grünfarben (Exzitationswellenlänge 460 - 490 nm, Emissionswellenlänge 520 nm).

Die Darstellung der 3D Kulturen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wurde durch eine Fotodokumentation mit der an das Mikroskop angeschlossenen DP71 Digitalkamera und dem Programm CellSens (beides Olympus) durchgeführt.

3.2.8 Quantitative Bestimmung des DNA-Gehaltes

Der DNA-Assay diente der quantitativen Bestimmung des DNA-Gehaltes der 2D und 3D Kulturen inklusive der Kontroll-Gruppen. Die Bestimmung erfolgte in den 2D Kulturen an Tag 0, Tag 14 und Tag 21 der Induktion und in den 3D Kulturen an Tag 0 und Tag 21.

In den 2D Kulturen wurden die ASCs an den jeweiligen Tagen geerntet. Dafür wurde das Basalmedium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach erfolgt das Lösen der ASCs mit Trypsin über fünf Minuten. Die Reaktion wurde in der doppelten Menge serumhaltigem Basalmedium gestoppt. Anschließend wurde der Inhalt zweier Wells für 1 n zusammengeführt und in 2 ml Reagiergefäße überführt. Die Zellen wurden daraufhin für sieben Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 250 µl Phosphat-Saline-Puffer aufgenommen. Bis zur Weiterverarbeitung im Rahmen des DNA-Assay wurden die Proben bei -80 °C kryokonserviert.

Die 3D Kulturen wurden ebenfalls zweimal auf dem Schüttler mit PBS gespült. Jedes Gel wurde daraufhin in 500 µl sterilem PBE/L-Cystein-Puffer (500 µl PBE + 425 µg L-Cystein) für den Papainase - Verdau aufgenommen, mit einer Stahlkugel versetzt und mit dem TissueLyser (Quagen) zerkleinert (5 Minuten bei 25 Hz). Danach wurden die Proben mit dem Papainase-PBE-Puffer-Gemisch versetzt. Dafür wurde zu jedem HA-PG-Hydrogel/L-Cystein-Puffer-Gemisch je 500 µl steriler PBE/L-Cystein-

Puffer (500 µl PBE + 425 µg L-Cystein) + 3 U Papain-Stocklösung zugeführt. Danach wurden die Proben für 16 Stunden bei 60 °C im Thermomixer (Ditabis) verdaut.

Alle 2D und 3D Kultur-Proben wurden anschließend mit dem Ultraschall - Homogenisator (Bandelin) 3 x 3 Zyklen von 3 Sekunden sonifiziert. Für den Assay wurden von jeder Probe zwei technische Replikate erstellt. Für die Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde der interkalierende Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33258 genutzt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit dem Fluoreszenzspektrometer Tecan GENios (Tecan) bei einer Exzitationswellenlänge von 365 nm und eine Emissionswellenlänge von 458 nm gemessen. Die DNA-Werte wurden mit Hilfe einer Standardgeraden (aus doppelsträngiger DNA, Kälberthymus) errechnet.

3.2.9 Quantitative Bestimmung des Triglycerid-Gehaltes

In den 2D Kulturen wurden die ASCs an den jeweiligen Tagen geerntet. Dafür wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 125 µl 1x Thesit (0,5 %) aufgenommen und mit einem Zellschaber vorsichtig von der Platte gelöst. Es wurden daraufhin 2 Wells zu einem n (2 Wells = 1 n) zusammengeführt und in 2 ml Reagiergefäße überführt.

Die 3D Hydrogel-Kulturen wurden zweimal auf dem Schüttler mit PBS gewaschen. Jedes Gel wurde daraufhin in 250 µl Thesit-Lösung (0,5 %) aufgenommen und mit einer Stahlkugel versetzt und mit dem TissueLyser (Qiagen) zerkleinert (5 Minuten bei 25 Hz).

Alle 2D- und 3D-Kultur-Proben wurden anschließend mit dem Ultraschall - Homogenisator (Bandelin) mit 3 x 3 Zyklen von 3 Sekunden Länge sonifiziert. Für den Assay wurden von jeder Probe zwei technische Replikate erstellt. Der Assay wurde nach der Herstelleranleitung durchgeführt.

Für die Bestimmung des Triglycerid-Gehaltes der 2D und 3D Kulturen wurde das Serum Triglyceride Bestimmungskit der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Dabei wurden durch eine Lipase die Triglyceride in Glycerol und freie Fettsäuren gespalten. Das so

entstandene Glycerol wurde durch eine gekoppelte enzymatische Reaktion des Quinoneimine Farbstoffes sichtbar gemacht. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes liegt bei 540 nm und wurde mit dem spektrofotometrischen MRX Microplate Reader (Dynatech Laboratories) gemessen. Dabei ist die Höhe der Absorption direkt proportional zu der Menge des enthaltenen Glycerols. Die berechnete Glycerolmenge wurde auf den DNA-Gehalt einer Probe normalisiert.

3.2.10 Histologische Untersuchung der Adipogenese

Um die Fettvakuolen der differenzierten Adipozyten darzustellen, wurden die Triglyceride der 2D und 3D Hydrogel-Kulturen mit einer Oil-Red-O-Lösung (ORO) gefärbt.

Zur Färbung der Triglyceride der 2D Kulturen wurden diese in den Well-Platten mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung mit Formalin 3,7 % für 20 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen erneut 3 x mit PBS gewaschen. Nach einem weiteren Waschschriff mit destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit ORO für 7 Minuten, gefolgt von 3 x Waschen mit destilliertem Wasser. Die Zellkerne wurden daraufhin für 3 Minuten mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend unter kaltem Leitungswasser der Farbstoff entwickelt. Um die gefärbten Präparate vor Austrocknung und Rissen zu schützen, wurden sie mit PBS bedeckt und bei 4 °C gelagert. Die Phasenkontrastbilder wurden mit dem inversen Mikroskop IX51 von Olympus und der XC30 Digitalkamera (Olympus) aufgenommen.

Die Färbung der 3D Kulturen erfolgte an Kryoschnitten. Für die Herstellung der Kryoschnitte wurden die 3D Kulturen zweimalig mit PBS gewaschen und anschließend über Nacht in 3,7 % Formalin fixiert. Danach wurden die 3D Kulturen in Tissue-Tek® inkubiert und bei 4 °C über Nacht dehydratisiert. Am Folgetag wurde die 3D Kulturen erneut in 2,5 ml Probenbehälter in Tissue-Tek® eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Anschließend wurden die Gele für mind. 24 h bei -80 °C aufbewahrt um das vollständige Durchfrieren der Proben zu garantieren.

Für die histologische Triglyceridfärbung wurden Kryoschnitte von 8 - 10 µm Dicke mit dem Kryotom Kryostat CM 3050 S (Leica) bei einer Kammertemperatur von -23 bis -25 °C der gefrostenen 3D Hydrogel-Kulturen angefertigt. Es wurden von jedem Hydrogel

mehrere Schnitte angefertigt und in konsekutiver Reihenfolge auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden daraufhin bis zur ORO-Färbung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die ORO-Färbung wurden die Kryoschnitte zuerst für 2 Minuten in PBS gewaschen um das Tissue-Tek[®] zu entfernen. Danach erfolgte die Überführung in die ORO-Lösung für 7 Minuten. Anschließend wurden die Kryoschnitte 3 x für 2 Minuten in PBS gewaschen. Um die Zellkerne darzustellen, erfolgte daraufhin die Färbung mit Hämatoxylin für 3 Minuten. Nach der Entwicklung des Farbstoffes für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser, wurden die gefärbten Schnitte mit Glycergel Mounting Medium bedeckt. Die Bilder wurden mit dem Hellfeldmikroskop BX51 und der dazugehörigen Digitalkamera DP71 beides von Olympus aufgenommen.

3.2.11 Real-time quantitative reverse transcription PCR (Real-time qRT-PCR)

Um die Genexpression der Transkriptionsfaktoren PPAR γ , CEBP α und des späten Markers der Adipogenese aP2 auf mRNA-Ebene darzustellen, wurde von den modifizierten (mit den Peptidsequenzen IKVAV, YIGSR und RGD einer Konzentration von 0,5 mM) sowie der unmodifizierten 3D HA-PG-Kulturen (w/o) an Tag 0 sowie Tag 21 der Induktion eine Realtime qRT-PCR angefertigt. Dazu wurden die 3D Kulturen nach der Ernte und 2 x Waschen mit PBS wie in der Produktanleitung beschrieben in TRIzol[®] Reagent aufgenommen. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem NanoDrop 2000c Spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific) fotometrisch bestimmt.

Der absolute RNA-Gehalt wurde von 3 biologischen Replikaten (n=3) jeder Gruppe ermittelt. Initial wurde die cDNA-Strang-Synthese mit dem ImProm-II[™] Reverse Transcription System der Firma Promega durchgeführt. Danach erfolgte die Real-Time qRT-PCR. Dafür wurde die MESA GREEN qPCR[™] MasterMix Plus MeteorTaq Polymerase (Eurogentec) sowie das CFX96[™] Real-Time System der Firma Bio-Rad genutzt. Für die Amplifikation wurde die spezifischen Primer für PPAR γ , C/EPB α und aP2 (QuantiTec[®] Primer Assay, QuaiGen) unter den folgenden Zyklusbedingungen genutzt: 15 Minuten bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefolgt von 40 Zyklen: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 Sekunden, danach für 30 Sekunden bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ und für 30 Sekunden bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend wurde noch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die mRNA konnte daraufhin auf das Housekeeping

Gen EF1 α normalisiert werden. Um den Anstieg der Expressionslevel zu bestimmen wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode genutzt. Danach wurden die Expressionsniveaus der einzelnen Proben im relativen Verhältnis zu den Tag 0 Proben bestimmt.

3.2.12 Statistische Untersuchungen

Alle quantitativen Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung aufgeführt. Die statistische Signifikanz wurde durch die Analyse der Varianz (two-way analysis of variance (ANOVA)) mit anschließendem Tukey-Vergleichs- Test errechnet. Der p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software GraphPad Prism 6 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Vergleich der Effizienz unterschiedlicher ASC-Gewinnungsmethoden

Um subkutanen Fettgewebe für die Isolation von ASCs zu gewinnen, stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, zum einen die Resektion und manuelle, mechanische Zerkleinerung, zum anderen die Liposuktion. Um die Effizienz der Verfahren bezüglich der gewonnenen Zellzahl und Funktionalität der Zellen zu vergleichen, wurden drei Verfahren an subkutanem Fettgewebe von 4 Spendern ($n = 4$) gegeneinander getestet. Dabei wurden zum einen die Gewinnung durch Resektion und manuelle mechanische Zerkleinerung (MZ) des Fettgewebes und zum anderen zwei verschiedenen Liposuktionsarten (Liposuktion bei 0,6 bar mit dem chirurgischen Sauger ATMOS Record 55 (ML) und die Liposuktion mittels Spritze (SL)) gegeneinander geprüft. Die Gewinnung und Weiterverarbeitung sowie die laborchemischen Analysen erfolgten standardisiert durch eine Person.

4.2 Zellzahl SVF/ASC

Die Ermittlung der Zellzahl der stromal-vaskulären Fraktion (SVF) jeder Gewinnungsmethode erfolgte am Tag der Gewinnung und Isolation nach Erylyse und Auszählung in der Neubauerkammer. Durchschnittlich konnten bei der maschinellen Liposuktion durch den chirurgischen Sauger ATMOS record 55 0,06 Mio. Zellen/ml, 0,08 Mio. Zellen/ ml durch Spritzenliposuktion und 0,02 Mio. Zellen/ml SVF aus dem resezierten Fettgewebe isoliert werden.

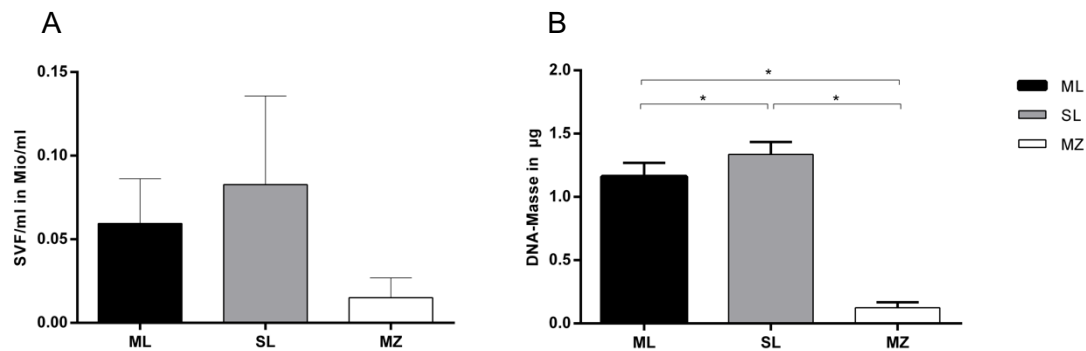


Abb. 5: A: SVF-Zellen pro Milliliter (Mio/ml) Fett je Gewinnungs-methode nach Isolation (d0) von 4 Spendern; B: DNA-Masse in µg pro 250 µl je Gewinnungsmethode nach Isolation (d0) beispielhaft an einem Spender (n=3). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

Anschließend wurde je die gleiche Anzahl SVF-Zellen in 175 ml Kulturflaschen ausgesät und kultiviert. Zusätzlich erfolgten Proliferationsassays von Passage 0 bis 3, bei denen nach einem, zwei, fünf und sieben Tagen die Zellen geerntet und ein DNA-Assay durchgeführt wurde. Bei allen Gewinnungsmethoden zeigte sich ein Abfall der DNA-Masse (in µg pro 250 µl) vom Tag der Isolation (d0) zu Tag 1 (d1). Dieser war signifikant bei der maschinellen und Spritzenliposuktion (siehe Abb. 6).

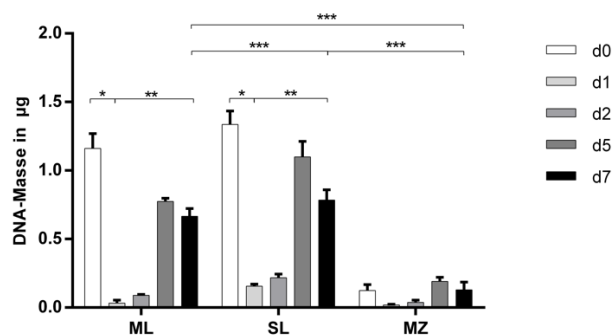


Abb. 6: Proliferation anhand der DNA-Masse in µg pro 250 µl von Zellen aus unterschiedlichen Gewinnungsmethoden, Passage 0, n = 3. d0 – d7 entsprachen dem Tag der Isolation bis zum siebten Tag nach Isolation. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

Im Einzelnen fiel die DNA-Masse (μg pro 250 μl) von Tag 0 auf Tag 1 bei der maschinellen Liposuktion von 1,16 μg auf 0,03 μg (2,6 %), bei der Spritzenliposuktion von 1,34 μg auf 0,16 μg (11,2 %) und bei der mechanischen Zerkleinerung von 0,12 μg auf 0,02 μg (16,7 %). Der DNA-Abfall war in den Gruppen der Liposuktion signifikant. Die DNA-Masse-Werte von d1 repräsentieren die Menge an plastikadhärenten ASCs aus der isolierten SVF. Anschließend kam es in allen Gruppen zu einer Zunahme der DNA-Masse im Sinne einer Proliferation der ASCs. Der Anstieg der DNA-Masse von d1 auf d5 war in allen Gruppen am größten und erreichte einen signifikanten Zellzuwachs von d1 auf d7 bei den beiden Liposuktionsmethoden mit einem Anstieg der DNA-Masse von 0,03 μg auf 0,67 μg bei der ML und 0,16 μg auf 0,78 μg bei der SL. Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Unterschied der DNA-Masse nach 7 Tagen Proliferation zwischen den Gewinnungsmethoden (siehe Abb. 6). Tendenziell zeigte sich bei allen 4 Spenderproben ein ähnlicher Verlauf der Proliferation der Zellen wie zuvor beispielhaft an einer Spenderprobe dargestellt.

Anschließend erfolgte von zwei Spenderproben ein Proliferationsassay ($n = 3$). In den folgenden Passagen (P 1 – 3) zeigte sich ein homogenes Bild zwischen den Gewinnungsmethoden. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der DNA-Masse von d0 zu d7 in allen Gewinnungsgruppen sowie allen drei Passagen (Abb. 7 A – C). Tendenziell zeigte sich bei der Spritzenliposuktion der größte Anstieg der DNA-Masse in allen drei Passagen. Aufgeschlüsselt kam es durchschnittlich zu einem Anstieg der DNA-Masse von d0 bis d7 in Passage 1 in der Gruppe der maschinellen Liposuktion von 2,44 μg auf 3,17 μg (+ 30 %), in der Gruppe der Liposuktion durch die Spritze von 1,4 μg auf 3,66 μg (+ 161 %) und in der Gruppe der mechanischen Zerkleinerung von 1,79 μg auf 2,66 μg (+ 48 %). In Passage 2 zeigte sich ein ähnliches Bild, in der Gruppe der maschinellen Liposuktion stieg die DNA-Masse von 1,26 μg auf 2,94 μg (+ 133 %), in der Gruppe der Liposuktion durch die Spritze von 1,57 μg auf 4,02 μg (+ 156 %) und in der Gruppe der mechanischen Zerkleinerung von 1,87 μg auf 3,33 μg (+ 78 %). Der Anstieg der DNA-Masse in Passage 3 verhielt sich ähnlich zu den beiden Passagen zuvor mit Werten von 1,67 μg auf 4,02 μg (+ 141 %) in der Gruppe der maschinellen Liposuktion, von 1,61 μg auf 5,81 μg (+ 260 %) in der Gruppe der Liposuktion durch die Spritze und von 1,76 μg auf 4,42 μg (+ 151 %) in der Gruppe der mechanischen Zerkleinerung. Des Weiteren

zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gewinnungsmethoden an Tag 7. Hier zeigte sich die SL in allen Passagen am proliferativsten (siehe Abb. 7).

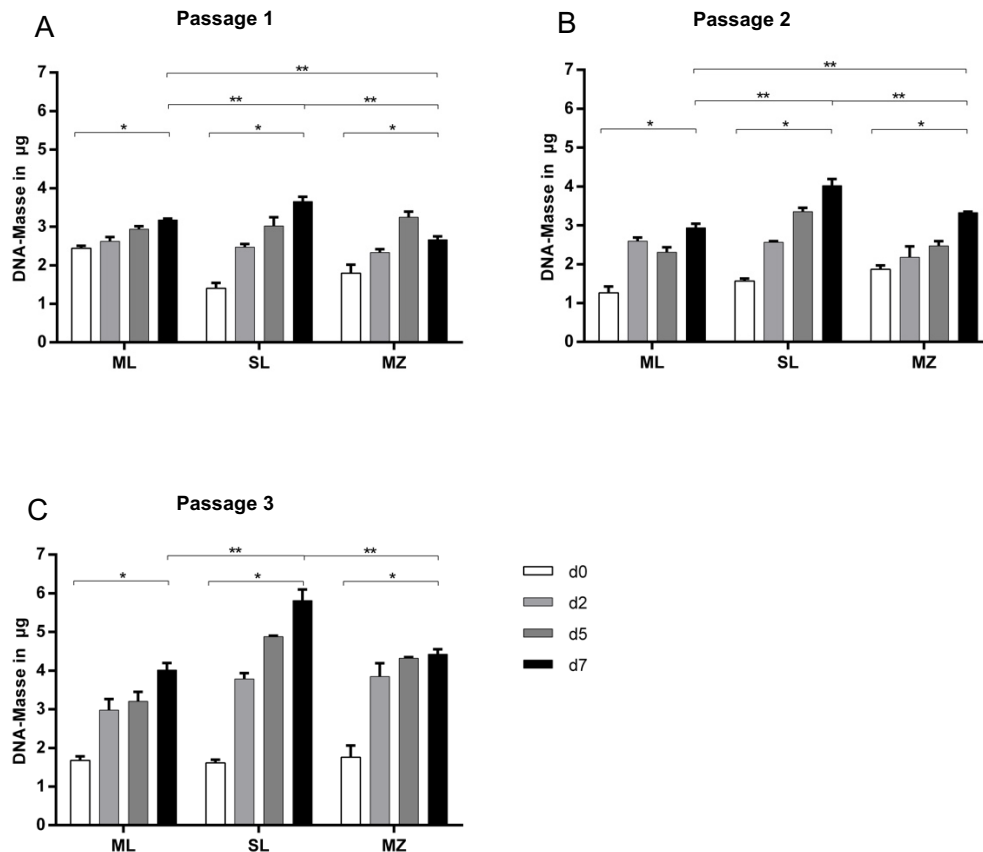


Abb. 7: Proliferation der ASCs an Hand der DNA-Masse in μg pro 250 μl der unterschiedlichen Gewinnungsmethoden über drei Passagen (A - C) eines beispielhaften Spenders ($n = 3$). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

4.3 Adipogene Differenzierung der 2D-Kulturen

Um die Funktionalität der Zellen aus den verschiedenen Gewinnungsgruppen zu überprüfen, wurden in Passage 3 die ASC in 2D-Kulturen für 14 und 21 Tage von jeweils zwei Spenderproben ($n = 3$) adipogen induziert und differenziert. Zusätzlich zu den DNA-Assays erfolgten der quantitative Nachweis von Triglyceriden (TG) mittels Triglycerid-Assay sowie eine histologische Triglycerid-Färbung (Oil-Red-O).

Bezüglich der absoluten TG-Masse (in μg) nach 14 und 21 Tagen Induktion zeigte sich in allen Gruppen der Gewinnungsmethoden ein ähnliches Bild. Es kam bei allen Methoden zu einem Anstieg der TG-Masse. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der TG-Masse der d0-Gruppen und den induzierten d14- und d21-Gruppen innerhalb der SL-Methode nach 14 und 21 Tagen und der ML-Methode nach 21 Tagen (siehe Abb. 8 A und B). Nach 14 Tagen Induktion stieg der TG-Gehalt von 9,9 μg auf 40,7 μg in der ML-Gruppe, 4,5 μg auf 46,7 μg in der SL-Gruppe und 6,2 μg auf 41,7 μg in der MZ-Gruppe. Nach 21 Tagen Induktion stieg die TG-Masse noch einmal erheblich an von 12,6 μg auf 151,0 μg in der ML-Gruppe, 12,8 μg auf 131,6 μg in der SL-Gruppe und 11,2 μg auf 77,7 μg in der MZ-Gruppe. Des Weiteren konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den induzierten und nicht induzierten Gruppen nach 21 Tagen in den Gruppen der maschinellen und Spritzenliposuktion gesehen werden (siehe Abb. 8 B). Zwischen den Gewinnungsmethoden ergab sich weder in den induzierten noch in den nicht-induzierten Gruppen ein signifikanter Unterschied (siehe Abb. 8).

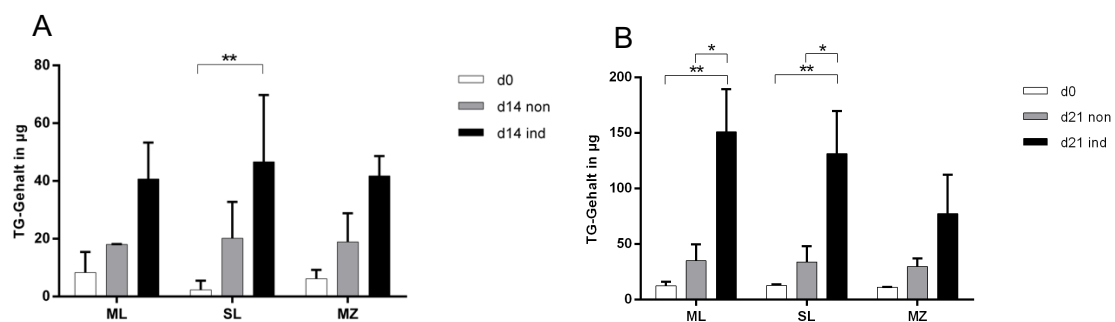


Abb. 8: Absoluter Triglycerid-Gehalt (in $\mu\text{g}/\text{ml}$) nach 14 (A) und 21 (B) Tagen Induktion der ASCs aus verschiedenen Gewinnungsmethoden ($n = 3$). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

Bezüglich der relativen TG-Masse bezogen auf die DNA-Masse der Probe zeigte sich kein signifikanter, jedoch ein tendenzieller Anstieg der TG-Werte der induzierten Gruppen aller Gewinnungsmethoden von d0 zu d14 und d21. Dabei erhöhte sich die TG-Masse nach 14 Tagen Induktion signifikant in der ML-Gruppe auf 24,4 $\mu\text{g TG}/\mu\text{g DNA}$, in der SL-Gruppe auf 20,3 $\mu\text{g TG}/\mu\text{g DNA}$ sowie in der MZ-Gruppe auf 33,9 $\mu\text{g TG}/\mu\text{g DNA}$ (Abb. 9 A). Nach 21 Tagen Induktion zeigte sich ein ganz ähnliches Bild. Auch

hier kam es zu einem Anstieg der TG-Masse pro DNA in allen Gewinnungsgruppen mit (Abb. 9 B).

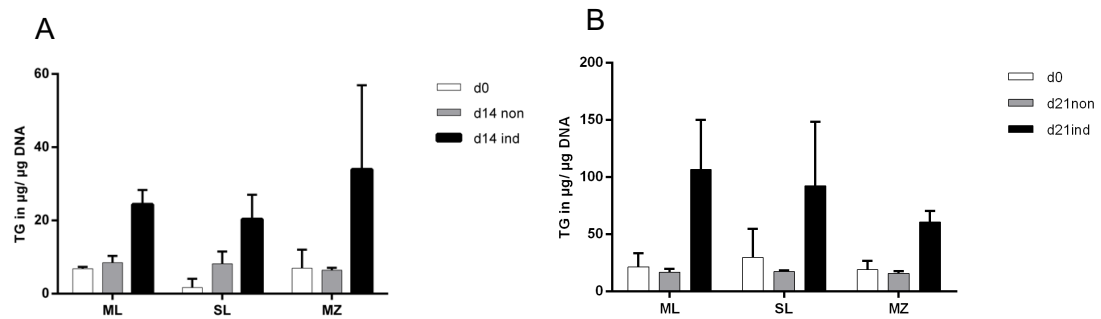


Abb. 9: Triglycerid-Masse pro $\mu\text{g DNA}$ nach 14 (A) und 21 (B) Tagen Induktion der ASCs aus verschiedenen Gewinnungsmethoden ($n = 3$). Es zeigten sich tendenziell in allen induzierten Gruppen Erhöhungen der relativen TG-Masse. Es kam jedoch in keiner Gruppe zu einem signifikanten Anstieg.

Histologisch konnten diese Ergebnisse mittels Oil-Red-O-Färbung (ORO) der 2D-Kulturen verifiziert werden. In allen Gewinnungsgruppen sah man eine deutliche Zunahme der orange-roten intrazellulären Triglycerid - Tropfen nach 14 und 21 Tagen adipogener Induktion (Abb. 10 C, F, I). Im Gegensatz dazu zeigten die histologischen Bilder der nicht induzierten Gruppen meist keine oder nur sehr wenige Triglycerid – Tropfen (siehe Abb. 10 B, E, H).

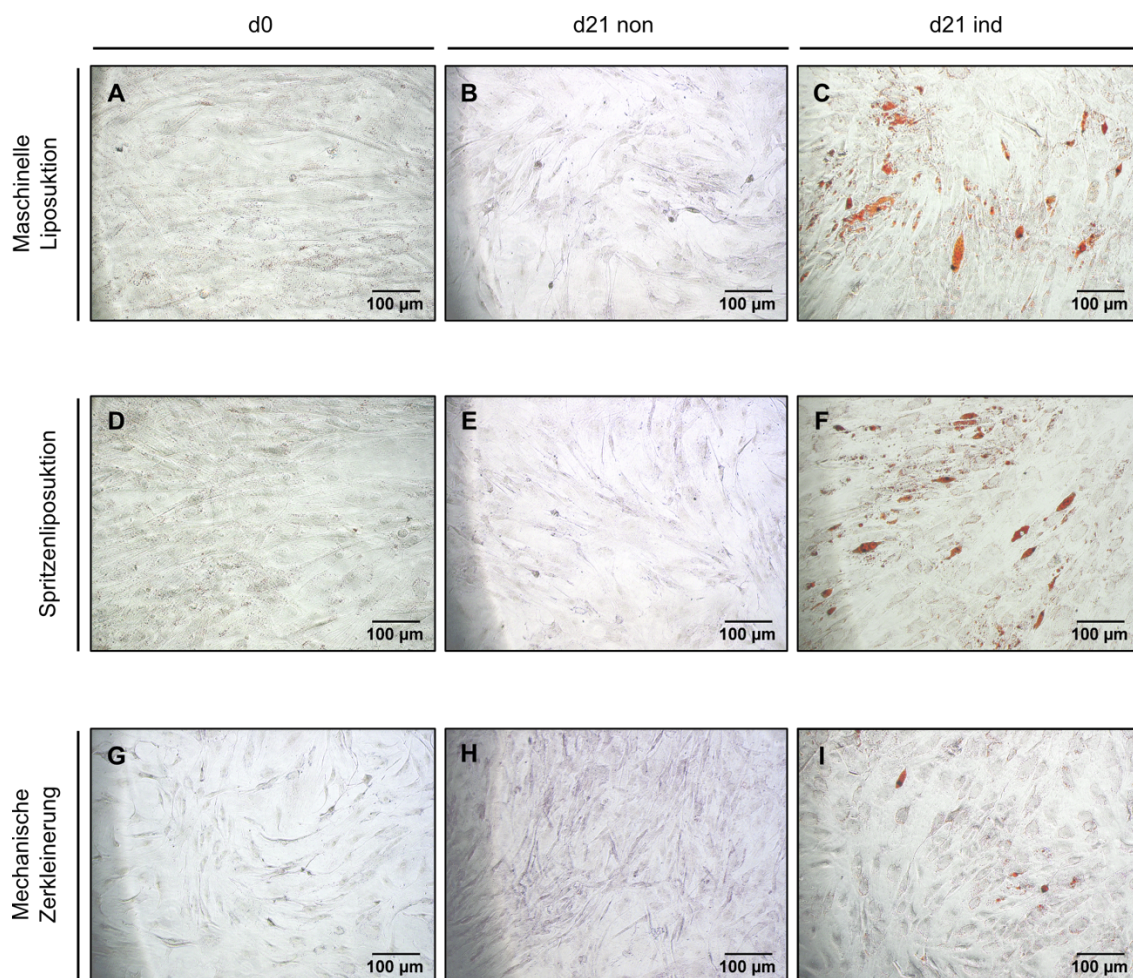


Abb. 10: Histologische Darstellung der 2D-Kulturen aller Gewinnungsmethoden an Tag 0 (d0) der Induktion, nach 21 Tagen Kultivierung mit Basalmedium ohne Induktion (d21 non) und nach 21 Tagen adipogener Induktion (d21 ind) von ASCs eines beispielhaften Spenders. Es zeigte sich in allen Gruppen die Bildung von intrazellulären Triglyceridtropfen nach adipogener Induktion (C, F, I), in den Liposuktionsgruppen jedoch tendenziell ausgeprägter (C und F).

4.4 Hyaluronsäure-Polyglycidol-Hydrogele

Für das Tissue Engineering von Fettgewebe bieten Hyaluronsäure (HA)-basierte Scaffolds eine gute Grundlage, da HA positiv zur Adipogenese beitragen kann. Um die adhäsiven Eigenschaften von HA-Scaffolds für Zellen zu verbessern, sollte ein Crosslinker zur Herstellung von Hydrogelen verwendet werden, der multiple freie Bindungsstellen besitzt, um daran biofunktionelle Gruppen zu binden. Diese Eigenschaften besitzt das verwendete Polyglycidol-Acrylat (PG). Es wurden HA-PG-Hydrogele hergestellt und diese auf ihre Biokompatibilität getestet. Des Weiteren konnten erste Versuche mit eingebundenen funktionellen Gruppen der ECM des Fettgewebes erfolgen. Diese biofunktionalisierten Hydrogele wurden ebenfalls auf ihre Biokompatibilität und Eignung zur Fettgewebsherstellung untersucht. Zur Biofunktionalisierung der Hydrogele konnten im Rahmen dieser Arbeit die Peptidsequenzen Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) und Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR), beide aus dem Laminin stammend, sowie Arg-Gly-Asp (RGD), eine Sequenz des Fibronektins eingebunden werden. Dies erfolgte zum Teil in unterschiedlichen Konzentrationen der Peptidsequenzen. Für jede Peptidsequenz erfolgte eine Versuchsreihe mit ASCs von einem Spender. Als Kontrollgruppe wurden Fibringele herangezogen und diese gleichfalls mit ASCs besiedelt und deren Funktionalität und adipogene Differenzierung untersucht.

4.5 Makroskopische Erscheinung

Das makroskopische Erscheinungsbild der HA-PG-Hydrogele während der Versuchszeit wurde am Tag 0 (d0) der Induktion sowie nach 21 Tagen (d21) durch fotografische Aufnahmen, Größenbestimmung und eine subjektive Beschreibung der Form (ihre runde Ausgangsform beibehaltend), Konsistenz (weich/fest), makroskopischen Homogenität und Reproduzierbarkeit (morphologische Gleichmäßigkeit der Replikate) dokumentiert. Alle Beurteilungen erfolgten durch denselben Untersucher um die Vergleichbarkeit zu behalten.

Der überwiegende Anteil der HA-PG-Hydrogele zeigte sich formstabil, reproduzierbar und homogen im Erscheinungsbild. Im Allgemeinen stellten sich die mit

Induktionsmedium behandelten HA-PG-Gele eher weich in ihrer Konsistenz dar, wohingegen die Hydrogele der Kontrollgruppen an d0 und nach 21 Tagen in Basalmedium tendenziell eine festere Konsistenz aufwiesen. Zum größten Teil zeigten sich alle HA-PG-Gele homogen in ihrem Aussehen, außer die nicht-induzierten mit YIGSR modifizierten Kontrollgruppen der Konzentrationen 1 mM und 2 mM, welche makroskopisch einen kompakten Kern mit umsäumenden Gelhof nach Tag 21 aufwiesen. Die Fibrin-Kontrollgele zeigten ebenfalls reproduzierbar mit einem homogenen Erscheinungsbild (Tab. 4).

Tab. 4: Tabellarische Aufgliederung der makroskopischen Charakteristika der mit den Peptidsequenzen IKVAV, YIGSR und RGD modifizierten und unmodifizierten HA-PG-Hydrogele.

Makroskopische Charakteristika

| | | Formstabil | Homogen | Reproduzierbarkeit | Konsistenz | |
|-------------------------------|--|------------|---------|--------------------|------------|------|
| | | | | | Weich | Fest |
| HA-PG w/o | d0 (n=2) | | x | x | | x |
| | d21 non (n=3) | x | x | x | | x |
| | d21 ind (n=3) | x | x | x | x | |
| RGD 0,5 mM | d0 (n=2) | | | | | |
| | d21 non (n=3) | x | | | | |
| | d21 ind (n=3) | x | x | x | x | |
| RGD 1 mM | d0 (n=2) | | x | | | |
| | d21 non (n=3) | x | x | x | x | |
| | d21 ind (n=3) | x | x | x | x | |
| IKVAV 0,5 mM | d0 (n=2) | | x | x | | x |
| | d21 non (n=2) | x | x | x | | x |
| | d21 ind (n=4) | x | x | x | x | |
| IKVAV 1 mM | d0 | | | | | |
| | d21 non (n=1) d21 ind (n=1) | x | x | x | x | x |
| IKVAV 2 mM | d0 | | | | | |
| | d21 non (n=1) d21 ind (n=2) | x | x | x | x | x |
| YIGSR 0,5 mM | d0 (n=2) | | x | x | | x |
| | d21 non (n=3) | x | x | x | | x |
| | d21 ind (n=6) | x | x | x | x | |
| YIGSR 1 mM | d0 | | | | | |
| | d21 non (n=3) d21 ind (n=3) | x | x | x | x | x |
| YIGSR 2 mM | d0 | | | | | |
| | d21 non (n=3) d21 ind (n=3) | x | | x | x | x |
| Fibrin | d0 | | | | | |
| | d21 non (n=3) | | x | x | | x |
| | d21 ind (n=3) | x | x | x | | x |

Alle Hydrogele wurden in präformierten Glasringen mit einem Innendurchmesser von 5 mm hergestellt und zwei Tage präkultiviert. Die Größenbestimmung erfolgte erstmalig am Tag 0 der Induktion. Hier zeigte sich generell eine Reduktion des Durchmessers auf ca. 4,4 – 4,6 mm. Die unmodifizierten mit ASCs besiedelten HA-PG-Hydrogele hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 4,6 mm an Tag 0 der Induktion. Sie vergrößerten sich durchschnittlich während 21 Tagen Induktion auf 5,2 mm sowie in der nicht-induzierten Gruppe über 21 Tage auf 4,8 mm. In den mit Peptidsequenzen modifizierten Gruppen stieg die Größe nach 21 Tagen Induktion ebenfalls auf 5,1 mm an. Die nicht-induzierten Gruppen zeigten dagegen eher ein inhomogenes Bild. In den mit den Peptidsequenzen RGD und YIGSR der Konzentration 0,5 mM modifizierten HA-PG-Hydrogel-Gruppen stieg die Größe ebenfalls an. In allen anderen Gruppen schrumpften die nicht induzierten Konstrukte über 21 Tage (Abb. 11).

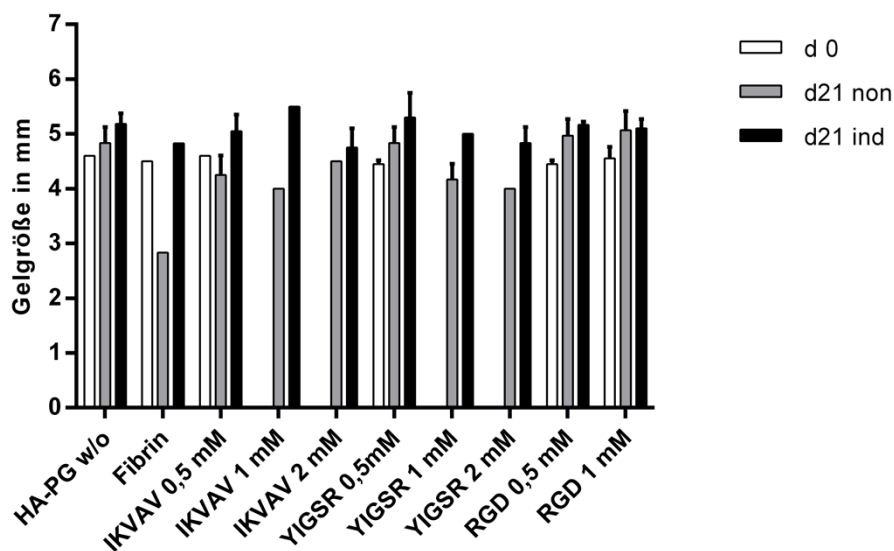


Abb. 11: Größe (in mm) der modifizierten und unmodifizierten HA-PG-Hydrogele an Tag 0 und Tag 21.

Nachfolgend werden exemplarische Beispielbilder der Hydrogele gezeigt. Die HA-PG-Hydrogele zeigten sich formstabil, makroskopisch homogen und reproduzierbar (Abb. 12 A – C). In ihrer Konsistenz wurden sie nach Induktion tendenziell weicher. Im Gegensatz dazu zeigten die mit YIGSR 2mM modifizierten Hydrogele nach 21 Tagen

Basalmedium makroskopisch einen kompakten Kern und einen Gelhof (Abb. 12 H). Außerdem zeigten sich die induzierten mit YIGSR modifizierten Gele nach 21 Tagen vergleichsweise weich (Abb. 12 F und I).

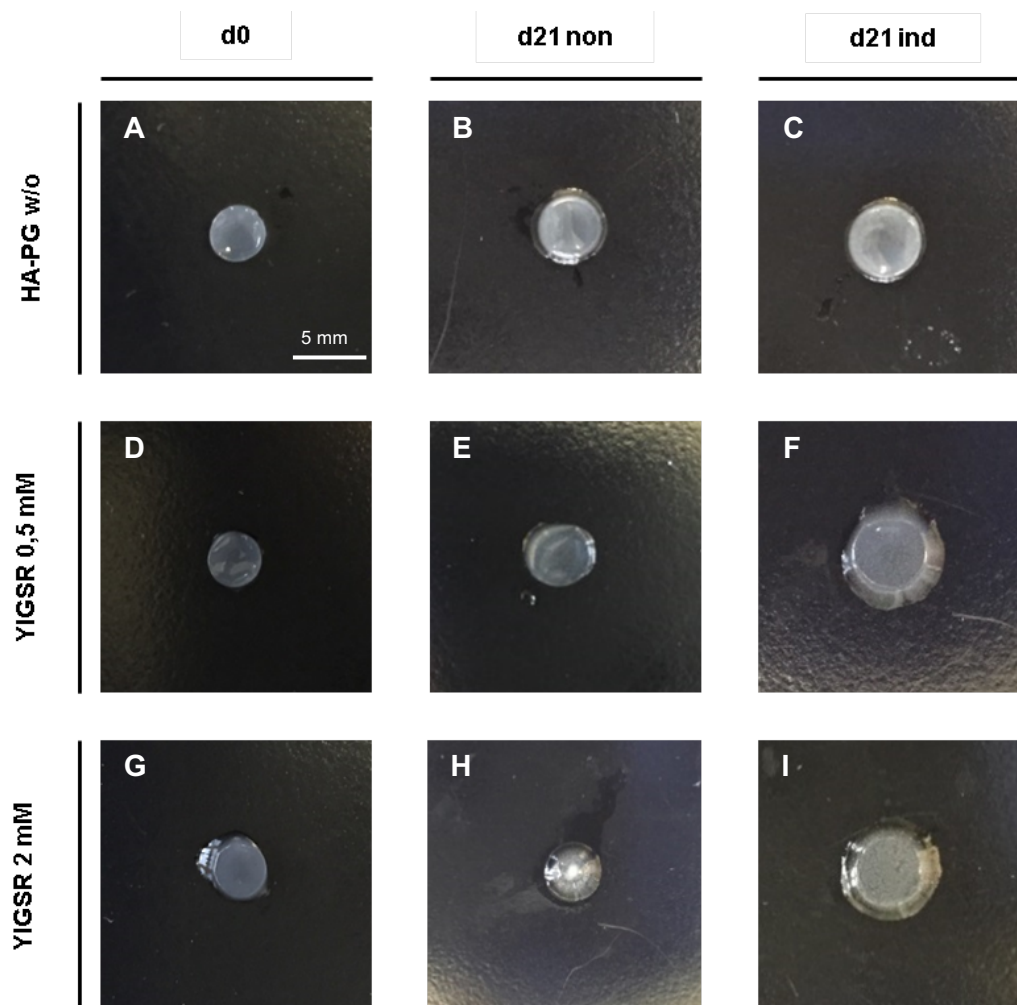


Abb. 12: Makroskopische Images der unmodifizierten HA-PG-Hydrogele und der mit YIGSR modifizierten HA-PG-Hydrogele an Tag 0, Tag 21 der Induktion und nach 21 Tagen Basalmedium. Es zeigten sich die homogenen und formstabilen Gele der HA-PG w/o Gruppe (A – C). Des Weiteren zeigt sich in der YIGSR 2mM in der nichtinduzierten Gruppe (d21 non) die Ausbildung eines kompakten Kernes und eines Gelhofes (H) sowie in beiden Konzentrationen (0,5mM und 2mM) in den induzierten Gruppen (d21 ind) ein eher weiches Gel (F und I).

4.6 Zellzahl und Vitalität der ASCs in der 3D-HA-PG-Hydrogelkultur

Die Möglichkeit die HA-PG-Gele auf Grund der zusätzlichen freien Bindungsstellen zu modifizieren, könnte den Vorteil bringen, verschiedenste Peptide der Extrazellulärmatrix einzubinden und somit den Zellen als adhäsiven und funktionellen Reiz anzubieten. Im Rahmen dieser Arbeit inkorporierten wir die Peptidsequenzen Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) und Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR), beide aus dem Laminin stammend, sowie Arg-Gly-Asp (RGD), eine Sequenz des Fibronektins, um erste Versuche bezüglich der Auswirkung auf die Hydrogele an sich und die 3D-Kultur mit ASCs zu unternehmen. Dies erfolgte zum Teil in unterschiedlichen Konzentrationen der Peptidsequenzen. Auf Grund der enormen Größe der einzelnen Versuche erfolgte für jede Peptidsequenz eine Versuchsreihe mit ASCs von einem Spender. Insgesamt wurden ASCs von 3 Spendern verwendet. Zusätzlich erfolgte die Kontrolle der Viabilität der Zelle durch eine Fibrinkontrollgruppe.

Nach der Besiedlung der HA-PG-Gele mit ca. 800.000 Zellen/ 40 µl HA-PG wurden, nach zwei Tagen Kultivierung in Basalmedium, die induzierten und nicht-induzierten Gruppen an d0 sowie d21 der Induktion geerntet und anschließend den Analysemethoden zugeführt.

In den nicht-modifizierten HA-PG-Hydrogelen betrug die durchschnittliche DNA-Masse an d0 der Induktion 11,1 µg pro Hydrogel. Zwischen den modifizierten Gruppen und den nicht-modifizierten Gruppen bestand an Tag null kein signifikanter Unterschied in der DNA-Masse.

Über die folgenden 21 Tage Kultivierung kam es in fast allen nicht-induzierten Gruppen, außer der IKVAV 1 mM - Gruppe, zu einer signifikanten Reduktion der absoluten DNA-Masse pro Hydrogel (Abb. 13 A – C). Innerhalb der nicht-induzierten Gruppen der unterschiedlichen Peptid-Konzentration sowie der nicht-modifizierten HA-PG-Gruppen kam es zu keinen signifikanten Unterschieden der DNA-Masse (Abb. 13 A - C).

Nach 21 Tagen adipogener Induktion reduzierte sich die DNA-Masse pro Hydrogel verglichen mit d0 ebenfalls in fast allen Gruppen, jedoch zu meist nicht signifikant. Die Ausnahme bildeten die Gruppen IKVAV 1 mM und RGD 0,5 mM. Deren DNA-Masse stieg nach 21 Tagen Induktion an. Im Konzentrationsvergleich innerhalb der einzelnen

peptidmodifizierten Gruppen zeigte sich jedoch nur ein signifikanter Unterschied der DNA-Masse zwischen IKVAV 1 mM und 2 mM nach 21 Tagen Induktion (Abb. 13 A und C). Außerdem zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den induzierten Gruppen IKVAV 1mM und 2mM, den unmodifizierten HA-PG und RGD 0,5mM sowie den unmodifizierten HA-PG und RGD 1mM. Zusätzlich erfolgte die Vitalitätsuntersuchung der ASCs in Fibrinkonstrukten. Hier zeigte sich ein signifikanter Abfall der DNA-Masse nach 21 Tagen in den induzierten wie auch nicht-induzierten Hydrogelen.

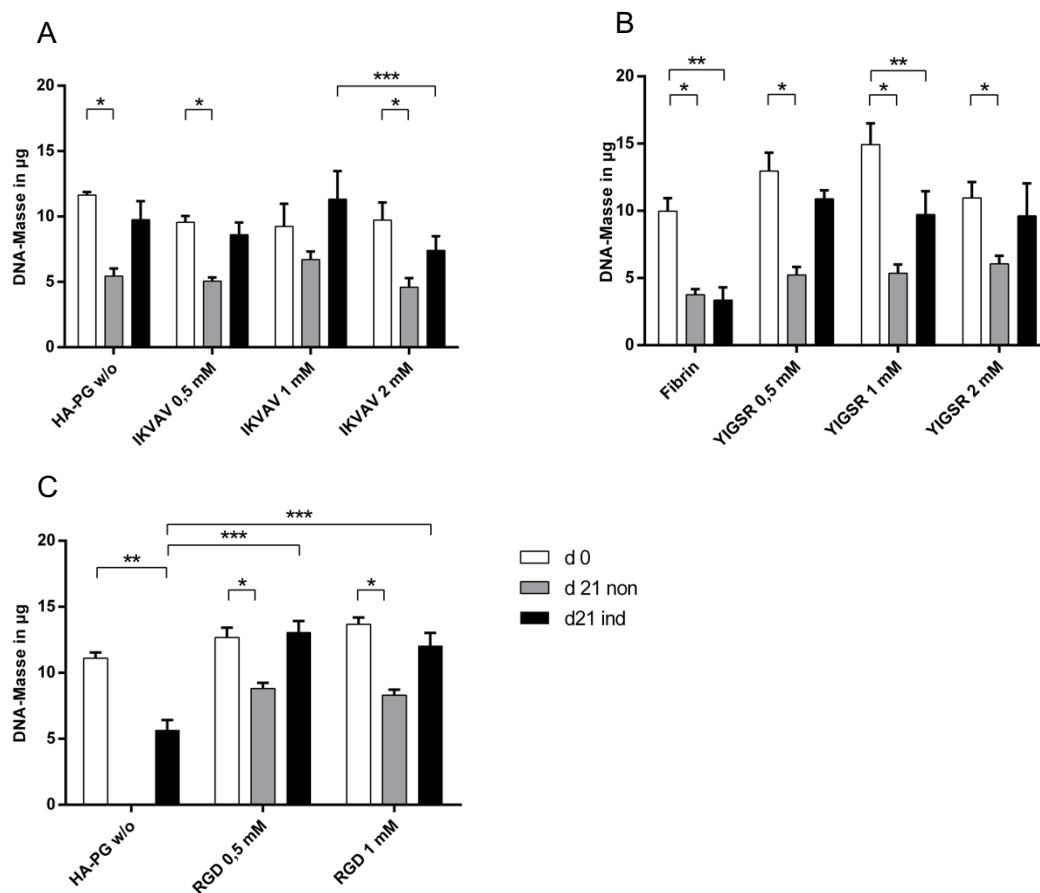
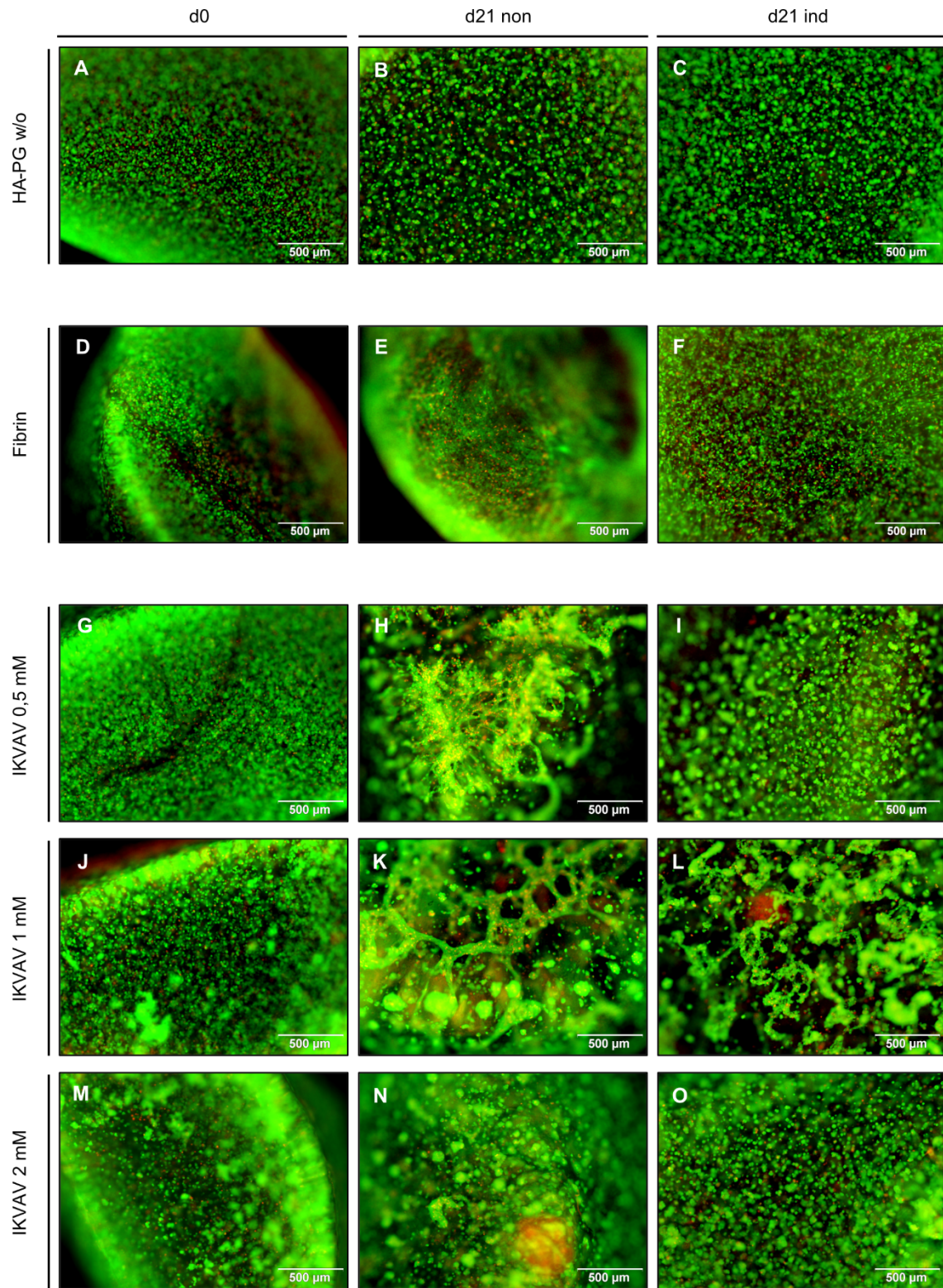


Abb. 13: DNA-Masse (in µg pro 250 µl) der ASCs in modifizierten HA-PG-Hydrogelen verglichen mit unmodifizierten HA-PG-Hydrogelen und Fibrin-Konstrukten an Tag 0 und Tag 21 der Induktion sowie nach 21 Tagen Basalmedium mit ASCs (n = 3). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

Um Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen in den 3D-Kulturen ziehen zu können, wurde ein Live/Dead-Assay durchgeführt. Grundsätzlich zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung lebender Zellen in allen Gruppen an Tag 0 sowie nach 21 Tagen, welche durch die grün fluoreszierende Calcein-Färbung dargestellt wird. Die Anzahl der toten Zellen, durch Ethidiumbromid rot fluoreszierend, stellte sich im Vergleich dazu in allen Gruppen geringer dar, jedoch ebenfalls gleichmäßig verteilt. In den nicht-induzierten mit IKVAV 0,5 mM und 1 mM modifizierten Hydrogelen scheint die Verteilung der Zellen straßenartig

(Abb. 14 E und H). Noch ausgeprägter zeigte sich die Agglomeration der Zellen in den nicht-induzierten mit YIGSR modifizierten Hydrogelen der Konzentrationen 1 mM und 2 mM (Abb. 14 R und U). Dies konnte bereits makroskopisch als kernförmige Struktur der Gele gesehen werden (Abb. 14 H). In den Fibrin-Kontrollgruppen zeigten sich ebenfalls größtenteils lebende, gleichmäßig verteilte Zellen.



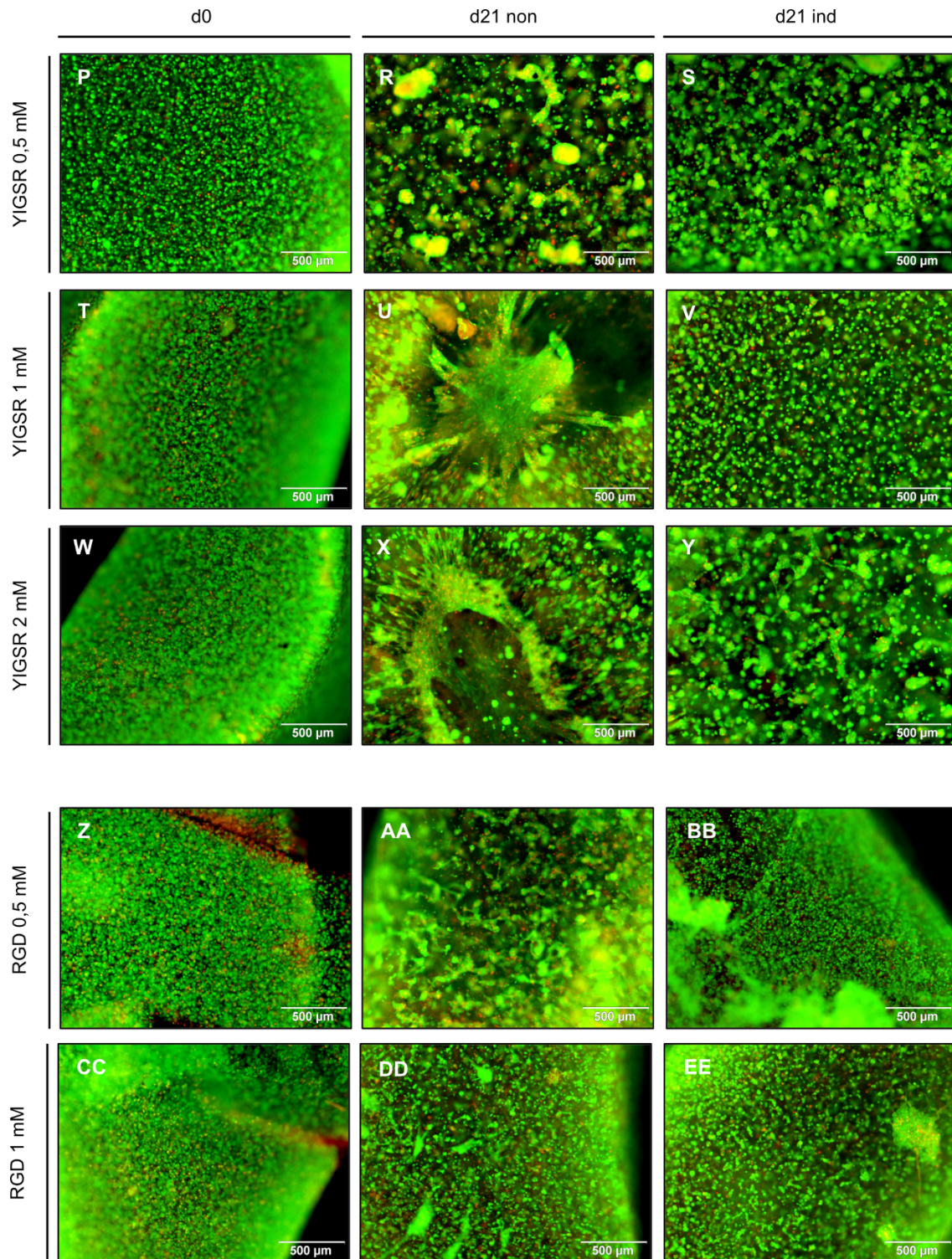


Abb. 14: Vitalitätsuntersuchung mittels Live/Dead-Assay der 3D-Kulturen aller getesteten Gruppen an Tag 0 und 21 Tagen Induktion sowie Kultur in Basalmedium. Grünfarben werden die mit Calcein gefärbten lebenden Zellen dargestellt. Rotfarben zeigt sich der die DNA-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid der toten Zellen.

4.7 Adipogene Differenzierung der ASCs in der 3D-HA-PG-Hydrogelkultur

Um die adipogene Differenzierung der ASCs nach 21 Tagen darzustellen, wurde an d0 und d21 der Induktion eine quantitative Analyse der Triglycerid-Masse (TG) durch einen Triglycerid-Assays, eine histologische Darstellung der intrazellulären Triglyceride an Kryoschnitten der HA-PG-Hydrogele mittels einer Oil-Red-O-Färbung (ORO-Färbung) angefertigt und die adipogene Differenzierung auf mRNA - Ebene durch die Veränderung der Expression der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PPAR γ und dem adipogenen Spätmarker aP2 überprüft.

Auch hier erfolgte auf Grund der enormen Größe der einzelnen Versuche für jede Peptidsequenz eine Versuchsreihe mit ASCs von einem Spender. Insgesamt wurden ASCs von 3 Spendern verwendet. Im Rahmen des Versuches mit der Peptidsequenz RGD konnten zusätzlich die Peptide IKVAV und YIGSR, jedoch nur in der Konzentration von 0,5 mM, hinzugenommen werden.

Im Vergleich der TG-Masse mit dem TG-Assay zeigte sich ein signifikanter Anstieg der TG-Masse von d0 auf d21 unter adipogener Induktion in allen Peptid-modifizierten Gruppen (Abb. 15 A – D). Bei den unmodifizierten HA-PG-Hydrogelen (PG w/o) hingegen zeigte sich ein heterogenes Bild nach 21 Tagen Induktion. Während es in einem Versuch ebenfalls zu einem signifikanten Unterschied kam, konnte das in einen zweiten Versuch nicht bestätigt werden (Abb. 15 A und C). Weitere zu erwartende signifikante Unterschiede zeigte der Vergleich zwischen den induzierten und nicht-induzierten Gruppen nach 21 Tagen unabhängig von der Modifikation (Abb. 15 A, B und D). Ein ähnliches Bild zeigte sich in den Gruppen IKVAV 0,5 mM und YIGSR 0,5 mM. Auch hier kam es in einem Versuch zu einem signifikanten Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 21, in einem zweiten Versuch konnte dies nicht erneut gezeigt werden (Abb. 15 A, B und C). Außerdem kam es in einem Versuch zu signifikanten Unterschieden zwischen den Konzentrationen der modifizierten Gruppen. Zum Beispiel konnten signifikante Unterschiede zwischen der induzierten Gruppe IKVAV 0,5 mM und allen weiteren induzierten Gruppen dieses Versuches gezeigt werden (Abb. 15 A). Ähnliches galt für den Konzentrationsversuch mit RGD. Hier kam es zu einem signifikanten Unterschied zwischen der induzierten HA-PG w/o und beiden induzierten RGD-

Konzentrationsgruppen (0,5 mM und 1 mM). Jedoch kam es zu keinem signifikantem Unterschied nach 21 Tagen Induktion zwischen den RGD-Konzentrationen 0,5 mM und 1 mM (Abb. 15 D). Im Konzentrationsvergleich der Peptidsequenz YIGSR zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen an Tag 21 der Induktion. Tendenziell lag die absolute TG-Masse nach 21 Tagen Induktion in allen YIGSR Konzentration auf gleichem Niveau wie die IKVAV 0,5 mM Gruppe.

In der Fibrin-Kontrollgruppe konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg der TG-Masse nach 21 Tagen Induktion gezeigt werden. Jedoch war dieser im Vergleich zu den weiteren induzierten Gruppen des Versuches signifikant geringer (Abb. 15 B).

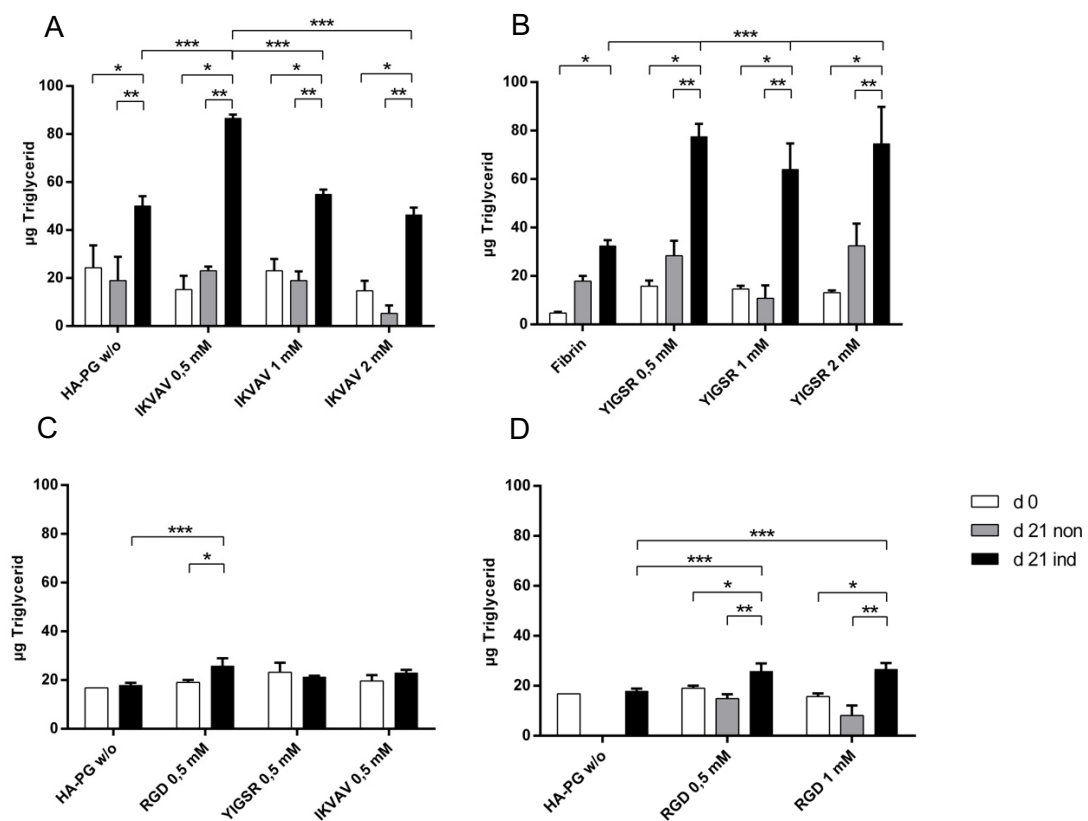


Abb. 15: TG-Masse (in $\mu\text{g/ml}$) in modifizierten HA-PG-Hydrogelen verglichen mit unmodifizierten HA-PG-Hydrogelen und Fibrin-Konstrukten an Tag 0 und Tag 21 der Induktion sowie nach 21 Tagen Basalmedium mit ASCs ($n = 3$). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

Bezüglich der quantitativen Triglycerid-Masse normalisiert auf die DNA-Masse (TG/DNA) zeigte sich bei den HA-PG-Hydrogelen ein signifikanter Anstieg des TG/DNA nach 21 Tagen adipogener Induktion. Im Unterschied zu den absoluten TG-Werten kam es bei beiden Versuchen der adipogenen Differenzierung der ASCs in den unmodifizierten HA-PG-Hydrogelen zu einem signifikanten Anstieg der TG/DNA (Abb. 16 A, C und D). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den modifizierten Hydrogelen. Bis auf die Gruppe RGD 0,5 mM kam es in allen anderen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg des TG/DNA nach 21 Tagen Induktion (Abb. 16 A - D).

Die nicht-induzierten Gruppen zeigten in dem TG-Assay nach 21 Tagen Kultivierung ein heterogenes Bild. Ein signifikanter Unterschied zu den induzierten Gruppen konnte nur bei einigen Gruppen, wie zum Beispiel IKVAV 0,5 mM und 2 mM oder YIGSR 1 mM, nachgewiesen werden (Abb. 16 A, B und D).

Im Vergleich der unmodifizierten HA-PG-Hydrogele zu den modifizierten Hydrogelen nach Differenzierung wies nur die IKVAV 0,5 mM Gruppe einen signifikant höheren TG/DNA Anstieg auf (Abb. 16 A). Jedoch konnte dieses Ergebnis nur an einem Spender nachgewiesen werden. An einem weiteren zeigten die unmodifizierten HA-PG-Hydrogele signifikante höhere TG/DNA-Werte zu allen modifizierten Gruppen nach adipogener Induktion.

Im Konzentrationsvergleich der modifizierten Gruppen nach Induktion zeigte sich ein signifikanter Unterschied der IKVAV 0,5 mM Gruppe mit deutlich höherem TG/DNA zu den weiteren IKVAV-Konzentrationen (Abb. 16 A). Im Gegensatz dazu kam es innerhalb der YIGSR- und RGD-Gruppen zu keinem signifikanten Unterschied des TG/DNA nach Induktion (Abb. 16 B und D).

In der Fibrin-Kontrollgruppe zeigte sich ebenfalls eine deutliche Adipogenese nach 21 Tagen Induktion der Zellen.

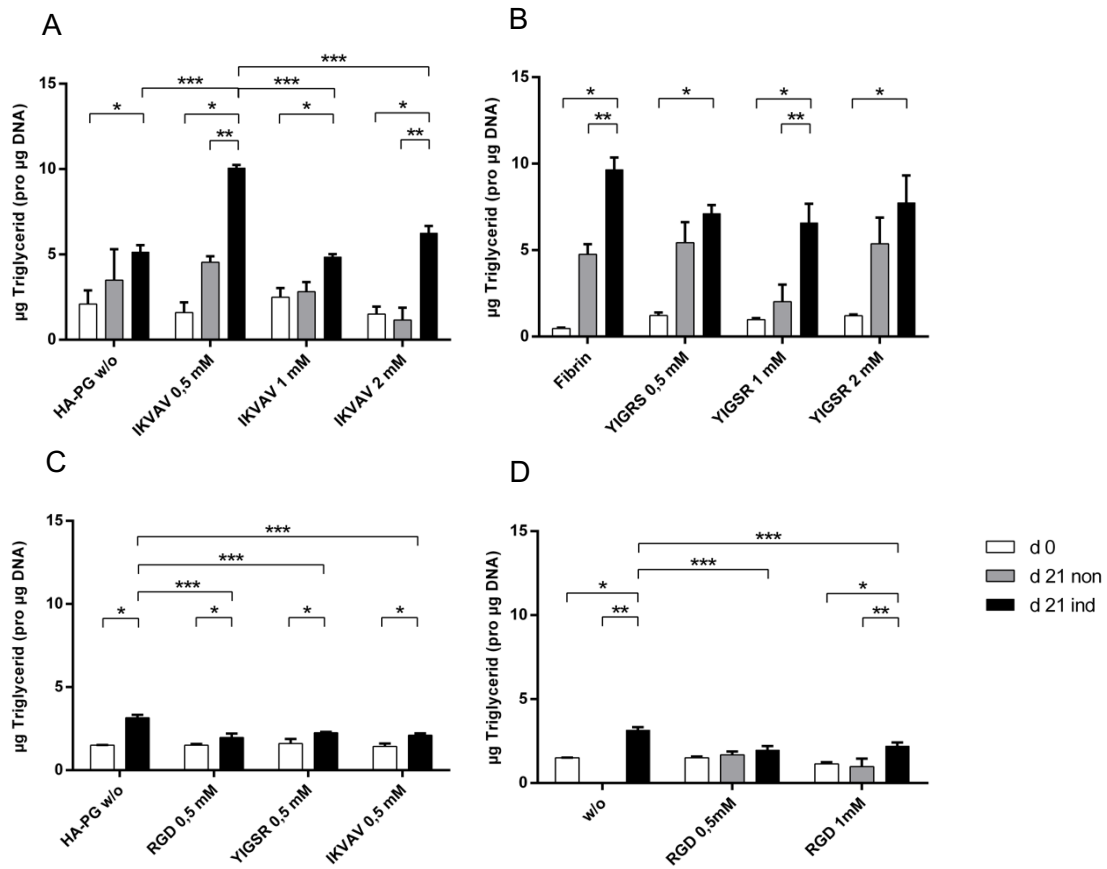


Abb. 16: TG-Masse (in μg) pro μg DNA in modifizierten HA-PG-Hydrogelen in unterschiedlichen Konzentrationen verglichen mit unmodifizierten HA-PG-Hydrogelen und Fibrin-Konstrukten an Tag 0 und Tag 21 der Induktion sowie nach 21 Tagen Basalmedium mit ASCs ($n = 3$). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

Bildmorphologisch konnten diese Ergebnisse durch die ORO-Färbung von Kryoschnitten der Hydrogele bestätigt werden. Um die Viabilität der Spenderzellen zu prüfen, wurde eine Kontrollgruppe in Fibrin-Gelen angefertigt. Hier zeigten sich in allen Gelen die Zellen gleichmäßig verteilt und nach 21 Tagen adipogener Induktion mit Lipidtropfen in den meisten Zellen (Abb. 18 D - F). In den nicht-modifizierten HA-PG-Hydrogelen zeigte sich in allen drei Gruppen (Tag 0 der Induktion, Tag 21 der Induktion und Tag 21 unter Basalmedium) eine gleichmäßige Verteilung der Zellen. Zusätzlich kam es tendenziell zu einer Verringerung der Gesamtzahl der Zellen. In der nicht-induzierten Gruppe sah man nach

21 Tagen Kultivierung mit Basalmedium kaum eine bis keine Zelle mit enthaltenen Lipidtropfen. In der induzierten Gruppe jedoch enthielt ein großer Anteil der Zellen orangefarbene Lipidtropfen (Abb. 18 A - C).

Die modifizierten Hydrogele zeigten ein eher polymorphes Bild. In den mit IKVAV modifizierten Gruppen gestaltete sich das Schneiden der Gele der 2 mM Gruppe schwierig, da diese Hydrogele möglicherweise beim Dehydratisieren und/ oder Frosten rissen

(Abb. 18 M – O). Damit ergab sich kein einziges Schnittbild, das einen intakten Schnitt eines Hydrogels enthielt. Des Weiteren zeigte sich bei den nicht-induzierten Hydrogelen nach 21 Tagen v. a. in den Konzentrationen 0,5 mM und 1 mM der mit IKVAV-modifizierten Hydrogelen eine Tendenz zur Zellagglomeratbildung. Im Gegensatz dazu wiesen alle Gruppen an Tag 0 sowie alle induzierten Hydrogele nach 21 Tagen eine weitestgehend gleichmäßige Verteilung der Zellen auf. Bezüglich der Lipidbildung nach 21 Tagen zeigten sich auch in den mit IKVAV-modifizierten Gruppen nach 21 Tagen Kultivierung mit Basalmedium wenige bis keine Zellen mit enthaltenen Lipidtropfen, jedoch multiple intrazelluläre Lipidanreicherungen in der Gruppe der induzierten Zellen. Die Schnittbilder der mit YIGSR modifizierten Hydrogele wiesen zum einen ebenfalls Risse in den Schnitten der 2 mM Gruppe auf. Zum anderen kam es in den nicht-induzierten Gelen nach 21 Tagen Basalmedium zu ausgeprägter Zusammenrottung der Zellen mit Ausbildung eines kompakten Zellagglomerates in der Mitte der Gele. Diese Agglomeratbildung konnte bereits makroskopische als Kern mit Gelhof registriert werden und konnte mikroskopisch verifiziert werden (Abb. 17). Des Weiteren zeigten

sich die Zellen eher kleiner als in allen anderen Hydrogelgruppen. Lipidtropfenbildung konnten auch hier in den meisten Zellen nach 21 adipogener Induktion gesehen werden.

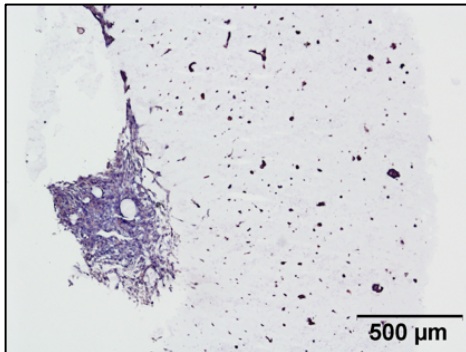
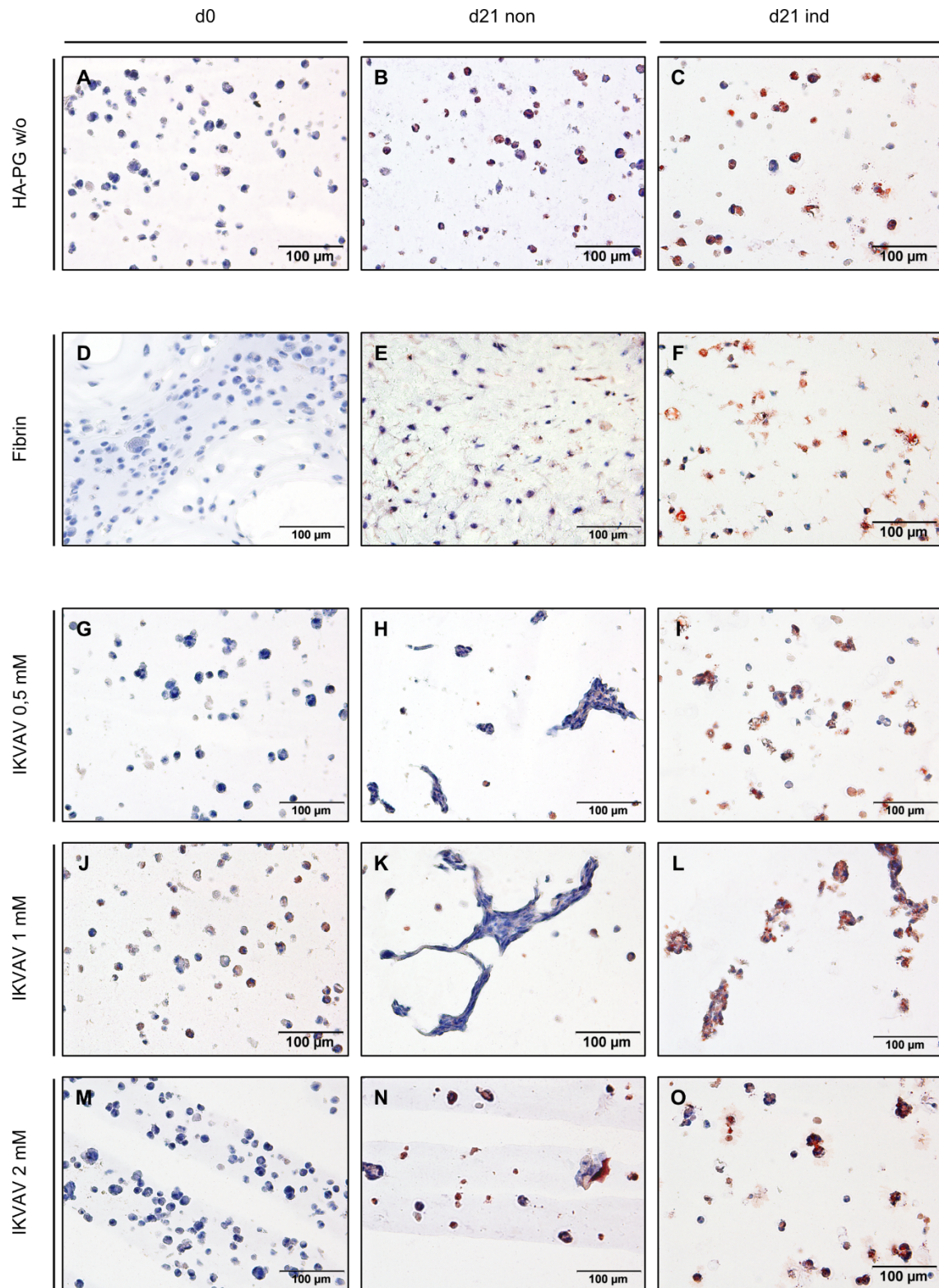


Abb.17: Zellagglomeratbildung in der Hydrogelmitte in den mit 1mM und 2mM YIGSR modifizierten Hydrogelen nach 21 Tagen Kultur in Basalmedium.

In den mit RGD modifizierten Hydrogelen zeigten sich eine gleichmäßige Verteilung der Zellen sowie eine Abnahme der Zellzahl nach 21 Tagen in allen Gruppen. Auch hier kam es v. a. nach 21 Tagen Induktion zur Ausbildung von Lipidtropfen in einem Großteil der Zellen.



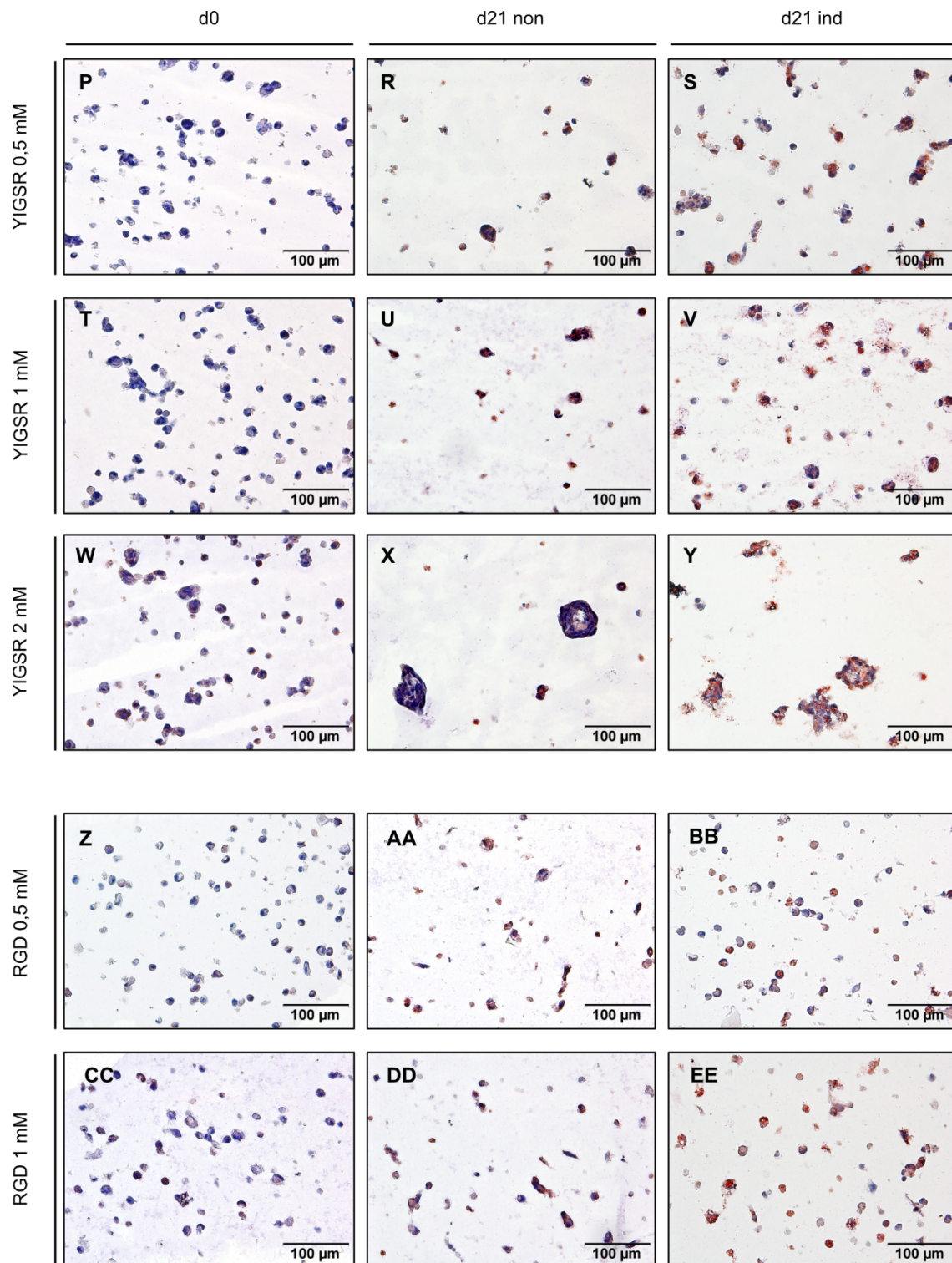


Abb. 18: Adipogenese von ASCs in modifizierten und nicht-modifizierten HA-PG-Hydrogelen nach Kryoschnittherstellung. Orangefarben zeigen sich die intrazellulären Triglyceride nach ORO-Färbung. Blaufarben bilden sich die mit Hämatoxylin gefärbten Zellkerne ab. In allen induzierten Gruppen konnte die stattgefunden Adipogenese durch die orangefarbenen Triglyceridtropfen aufgezeigt werden.

Auf mRNA Ebene konnte die Adipogenese nach 21 Tagen Induktion zusätzlich durch die Hochregulation der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PPAR γ und dem adipogenen Spätmarker aP2 verifiziert werden. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der relativen Expression zwischen d0 und d21 der Induktion in den nicht-modifizierten und modifizierten HA-PG-Hydrogelgruppen, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen HA-PG- Hydrogelgruppen. Ebenfalls konnte kein signifikanter Unterschied der relativen Expression zwischen d0 und d21 ohne Induktion nachgewiesen werden.

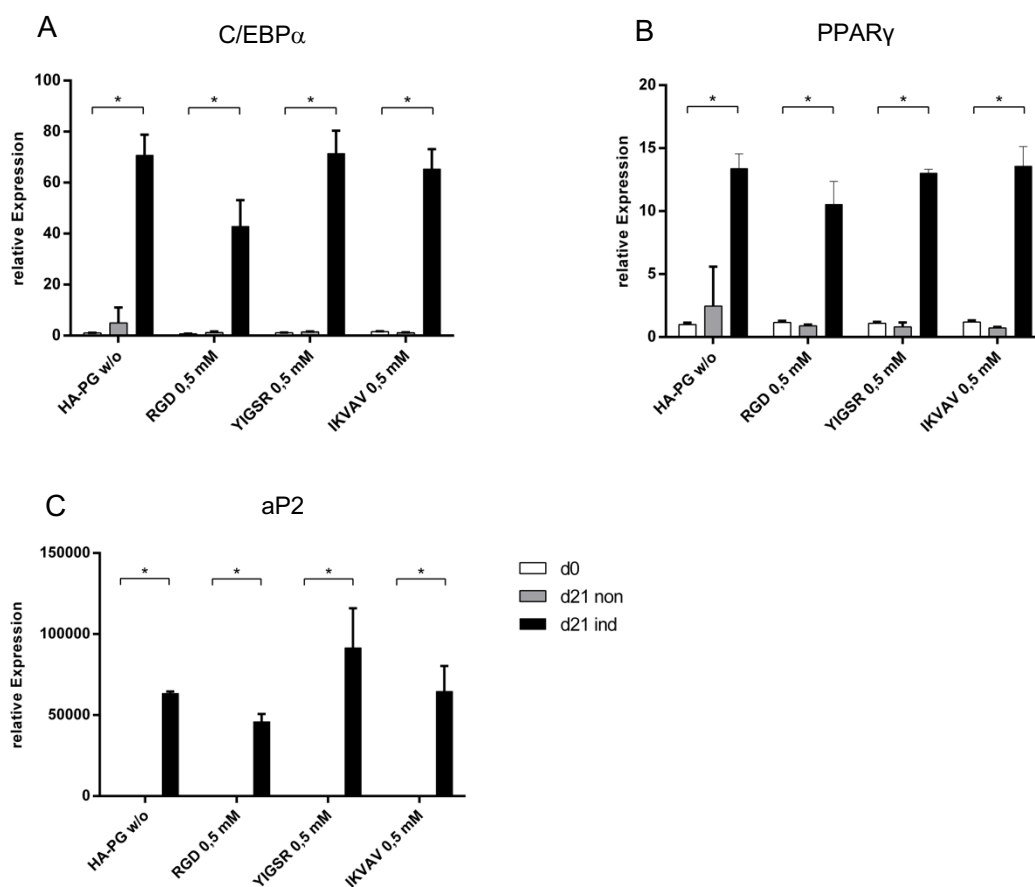


Abb. 19: Expression der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PPAR γ und des adipogenen Spätmarkers aP2 in modifizierten HA-PG-Hydrogelen in unterschiedlichen Konzentrationen verglichen mit unmodifizierten HA-PG-Hydrogelen und Fibrin-Konstrukten an Tag 0 und Tag 21 der Induktion sowie nach 21 Tagen Basalmedium mit ASCs (n = 3). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

5. Diskussion

Das Tissue Engineering von Weichgewebe zur Rekonstruktion von komplexen Weichteildefekten ist ein langwährendes Anliegen und von vielseitigen Herausforderungen geprägt. In dieser Arbeit wurden zwei Einflussfaktoren betrachtet. Zum einen wurde die Effizienz unterschiedlicher Gewinnungsmethoden von ASCs untersucht, zum anderen ein biofunktionalisierbares Hydrogel auf seine Eignung als Zellträgermatrix zur Herstellung von Fettgewebe getestet.

5.1 Effizienz unterschiedlicher Gewinnungsmethoden

Im Rahmen der Gewinnung und Isolation von ASCs wurden drei unterschiedliche Gewinnungsmethoden untersucht und miteinander verglichen. Bezogen auf die SVF zeigten sich hier die Liposuktionstechniken am ergiebigsten. Numerisch war die Liposuktion mit der Spritze am effizientesten, jedoch bestand zur maschinellen Liposuktion kein signifikanter Unterschied. Im Gegensatz dazu konnten aus dem resezierten Fettgewebe nur weniger als die Hälfte an SVF-Zellen isoliert werden. In der Literatur sind die Daten der gewonnenen Zellzahlen unterschiedlicher Gewinnungsmethoden tendenziell ähnlich, jedoch variieren die Gewinnungs- und Isolationsmethoden und damit die Resultatdaten. In den Arbeitsgruppen von Schreml et al.¹²¹ und Heimburg et al.⁶⁷ konnten ebenfalls mehr Zellen durch die Liposuktion nachgewiesen werden. Jedoch sind die absoluten Zellzahlen nicht direkt miteinander vergleichbar, da die Bezugsgrößen variieren. Beispielsweise beziehen sich die Zellzahlen in der vorliegenden Arbeit auf das entnommene Volumen an Fett und in der Arbeit von Heimburg et al. auf die Masse. Des Weiteren wurden bei der Liposuktion unterschiedlich große Spritzen verwendet, was zu unterschiedlich großen Negativkräften durch den erzeugten Unterdruck auf das Gewebe und die Zellen geführt haben könnte. Auch bei der maschinellen Liposuktion variieren die Ausgangsbedingungen. Beispielsweise wurden in der Arbeitsgruppe um Mojallal et al. unterschiedliche Unterdrücke in Rahmen der maschinellen Liposuktion untersucht. Hier zeigte sich die Spritzenliposuktion in der Gewinnung von SVF der maschinellen Liposuktion unterlegen. Die höchsten Zellzahlen wurden bei einem Unterdruck von 350 mmHG ermittelt¹²². In der vorliegenden Arbeit

verwendeten wir Unterdrücke von 600 mmHG. Zusätzlich variieren die Isolationsprotokolle, sodass auch dies die Zellzahl beeinflusst haben könnte.

5.2 Vitalität und Adipogenese der ASC aus unterschiedlichen Gewinnungsmethoden

In den anschließend durchgeführten Vitalitätsprüfungen zeigte sich an Tag 1 in Passage 0 ein erwartungsgemäß drastischer Abfall der DNA-Masse. Dies kann auf die Plastikadhärenz der ASCs zurückgeführt werden und wird zur Separierung aus der SVF genutzt. Alle weiteren Zellentitäten der SVF besitzen diese Eigenschaft nicht und werden beim ersten Mediumwechsel ausgewaschen. Beispielhaft an Ergebnissen eines Versuches mit Zellen eines Spenders zeigte sich an Tag 1 die Spritzenliposuktion (SL) mit 0,16 µg (pro Probe von 250 µl) die höchsten Absolutwerte der DNA-Masse. Die maschinelle Liposuktion (ML) sowie die mechanische Zerkleinerung (MZ) von reseziertem Fettgewebe zeigten deutlich geringere Absolutwerte der DNA-Masse mit 0,02 µg der MZ und 0,03 µg der ML. Betrachtet man jedoch den relativen Anteil, der am Tag 1 verbliebenen DNA-Masse der ASCs bezogen auf die DNA-Masse des jeweils isolierten SVF-Volumens, bietet sich ein anderes Bild. Hier zeigte sich die mechanische Zerkleinerung von reseziertem Fettgewebe mit einem Anteil an ASCs von 16,7 % der isolierten SVF am ergiebigsten. Bei den Liposuktionstechniken konnte durch die Spritzenliposuktion ein Anteil an ASCs von 11,2 % der SVF und bei der maschinellen Liposuktion ein Anteil von 2,6 % der SVF ermittelt werden. Dementsprechend bestand eine deutliche Diskrepanz zwischen den isolierten SVF-Volumen und dem darin befindlichen ASC-Anteil. Andere Ergebnisse wurden in der Vergangenheit berichtet. Fraser et al. konnte weder zwischen verschiedenen Spenderregionen noch durch unterschiedliche Gewinnungsmethoden Differenzen in der gewonnenen Zellzahl der ASCs sehen¹²³.

Die in dieser Arbeit variierenden Zellzahlen zeigen die Komplexität der Beurteilung der Effizienz verschiedener Gewinnungsmethoden. Trotz des hohen Anteils an ASCs an isolierter SVF bei der MZ ist diese Methode im Rahmen klinischer Anwendungsmöglichkeiten von ASCs wie zum Beispiel dem Lipotransfer eher impraktikabel, da es nicht nur der Notwendigkeit der labortechnischen Aufbereitung bedarf, sondern auch ein größeres Stück Fettgewebe reseziert werden muss. Im Gegensatz

dazu ist die Liposuktion im Allgemeinen die minimalinvasivere Methode der ASC-Gewinnung. Auch die Aufbereitung kann automatisiert im OP erfolgen. Doi et al. konnten zeigen, dass die automatisierte Aufbereitung und Isolation von SVF vergleichbare Zellzahlen und -funktion der SVF gegenüber der manuellen Isolation im Rahmen einer labortechnischen Aufbereitung ergibt ¹²⁴. Werden die ASCs nicht für klinische Anwendungen benötigt und können, wie in dieser Arbeit, aus bereits resezierten subkutanen Fettgewebslappen extrahiert werden, bieten sich die Liposuktion und MZ gleichermaßen an. Es scheint durchaus sinnvoll die Effizienz der ML mit negativen Drücken von 350 mmHg, wie in der Arbeit von Mojallal et al. ¹²² gegenüber der MZ zu vergleichen, um gegebenenfalls die Effizienz der ASC Gewinnung noch zu steigern. Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die Menge an isolierter SVF, respektive ASCs, nicht allein von der Gewinnungsmethode, sondern auch von spenderspezifischen Faktoren wie zum Beispiel dem Alter des Spenders abhängig sein kann ^{5, 6, 68, 35}.

Im weiteren Verlauf zeigten alle Gewinnungsmethoden einen Anstieg der DNA-Masse über die ersten 7 Tage, welcher bei beiden Liposuktionsmethoden signifikant war (Abb. 8). In den folgenden Passagen (P1-3) proliferierten die ASC aller drei Gewinnungsmethoden tendenziell gleich stark, wobei bei der Spritzenliposuktion bezogen auf die absoluten DNA-Werte der stärkste Anstieg zu verzeichnen war (Abb. 7). Ähnliche Ergebnisse konnte auch Schneider et al. aufzeigen, wobei es zu keinem Unterschied in der Proliferation von ASCs aus resezierten Gewebe und durch Liposuktion gewonnenen ASCs kam ¹²⁶. Es konnte sogar bei beiden Gewinnungsmethoden eine Steigerung der Proliferationsfähigkeit in den zunehmenden Passagen registriert werden. ASCs aus allen drei Gewinnungsmethoden konnten adipogen differenziert werden und zeigten in der quantitativen Analyse mittels Triglycerid-Assay einen Anstieg der absoluten Triglycerid-Masse nach 14 und 21 Tagen Induktion zu Tag 0. Signifikant war dieser vor allem in den Gruppen der Liposuktion nach 21 Tagen (Abb. 8 B). Dies konnte histologisch durch die Färbung von intrazellulären Lipidtropfen mittels Oil-Red-O Färbung bestätigt werden. Zwischen den Gewinnungsmethoden zeigte sich tendenziell ein Unterschied zwischen der Liposuktion und der MZ. Nach 21 Tagen adipogener Induktion konnten im quantitativen sowie histologischen Nachweis mehr Triglycerid nach Liposuktion gezeigt werden (Abb. 10 Bild C, F und I). Dies korreliert mit Daten aus

der Literatur. Iyyanki et al. konnte ebenfalls zeigen, dass ASCs gewonnen aus verschiedene Gewinnungsmethoden, adipogen differenzierbar sind ¹²⁷.

In den letzten Jahren wurden auch andere Liposuktionstechniken neben der in dieser Arbeit verwendeten klassischen Liposuktion, die auf einem extern erzeugten Unterdruck basiert und maschinell wie auch über eine Spritze ¹²⁸ erfolgen kann, bezüglich ASC-Ausbeute und -Funktionalität untersucht. Vor allem die Ultraschall-, Wasserstrahl- aber auch die Laser-unterstützte Liposuktion zeigten keine signifikanten Unterschiede zur klassischen Liposuktion an gewonnenen ASCs, sowie eine gleichwertig gut Funktion ¹²⁹⁻¹³².

Außerdem werden in der aktuellen Literatur Möglichkeiten untersucht, die Menge an isolierten ASCs aus dem Lipoaspirat zu erhöhen. So konnte Chen et al. die doppelte Menge an SVF bei einem Unterdruck von -30 kPa verglichen zu einem Unterdruck von -55 kPa bei der Liposuktion erzielen. Zusätzlich zeigten die ASC eine bessere Vitalität ¹³³. Weitere Ertragssteigerungen konnten mit Variationen der Isolationsprotokolle, zum Beispiel durch den Einsatz von orbitalen Schüttlern ¹³⁴, mechanischer Distorsion ¹³⁵ oder der Optimierung der Füllmenge der Zentrifugenröhrchen ¹³⁶ erzielt werden.

5.3 Hyaluronsäure-basierte-Polyglycidol-Hydrogele

Um die Rekonstruktion von Weichgewebdefekten zu ermöglichen, könnten sich in Zukunft Trägermaterialien, sogenannte Scaffolds, anbieten, die mit hMSZ besiedelt werden, die wiederum in die benötigten Zellarten induziert werden. Dafür wäre ein Scaffold hilfreich, welches leicht produzierbar, volumenstabil, porös sowie biokompatibel wäre und dem physiologischen Umgebungsmilieu entspricht. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Hyaluronsäure eine sehr gute Grundlage im Tissue Engineering von Fettgewebe darstellt. Neben der ausgesprochenen Hydrophilie sowie der Einbindung von Wassermolekülen und der daraus resultierenden strukturellen Ähnlichkeit zur Extrazellulärmatrix konnte der positive Einfluss von HA auf die Proliferation und Differenzierung von ASCs gezeigt werden ¹⁰⁸.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HA-PG-Hydrogele basieren auf dem im menschlichen Körper ubiquitär vorhandenem Hyaluron, das mit dem synthetischen Polymer Polyglycidol verlinkt wurde. Polyglycidol ist ein strukturelles und

multifunktionales Analogon des PEG ¹¹⁹. PEG-HA-Hydrogele sind viskoelastische, dreidimensionale Polymere mit einem über 90 prozentigen Wasseranteil ¹⁰⁹. Sie simulieren eine dem Weichgewebe entsprechende Umgebung, die eine Diffusion von Nährstoffen und Abfallprodukten zulässt ¹¹⁰. Ein Nachteil von PEG-Hydrogelen ist, dass es keine Möglichkeit der Adhäsion für Zellen bietet ¹¹¹ und nur wenige Bindungsstellen um funktionelle Gruppen einzubinden. Der Crosslinker Polyglycidol besitzt die herausragende Eigenschaft multiple Bindungsstellen zu haben, welche mit funktionellen Gruppen besetzt werden können. Dadurch könnten Zelladhäsion-verbessernde funktionelle Gruppe eingebunden und das Scaffold dem extrazellulären Raum des gewünschten Gewebes angepasst werden. Es könnte damit den Zellen eine natürlichere Umgebung bieten.

Für diese Arbeit wurden HA-PG-Hydrogele verwendet, um sie für die Eignung als Scaffolds für ASCs und deren adipogene Differenzierung zu untersuchen. Zusätzlich wurden sie mit funktionellen Gruppen, adipogenen Peptidsequenzen, modifiziert und ebenfalls auf ihre Eignung zur Inkorporation von ASCs und deren adipogene Differenzierung untersucht.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich das Polyglycidol durchaus geeignet um reproduzierbar Hydrogele auf Hyaluronsäurebasis herzustellen. Es polymerisierte zu weichen bis festeren aber formstabilen und makroskopisch homogenen Konstrukten. Des Weiteren ließen sich die Hydrogele mit ASCs besiedeln, welche sich auch nach dem Vernetzen des Geles gleichmäßig im Gel verteilten (Tab. 4, Abb. 12 A - C und Abb. 14 A - C).

Zusätzlich wurden die HA-PG-Hydrogele mit funktionellen, die Zelladhäsion fördernden Gruppen der Extrazellulärmatrix des Fettgewebes (den Peptidsequenzen IKVAV, YIGSR und RGD) modifiziert. Auch hierunter vernetzten die meisten Hydrogele reproduzierbar zu weichen bis festeren, formstabilen Konstrukten. Bis auf die mit YIGSR-modifizierten Gele in den Peptidkonzentrationen 1 mM und 2 mM zeigten sich die Gele ebenfalls makroskopisch homogen und nach Besiedelung mit gleichmäßig verteilten Zellen. Bei den beiden oben genannten Gruppen wiesen die Gele nach 21 Tagen makroskopisch teilweise kompakte Kerne mit Gelhof nach Zellbesiedelung auf (Abb. 12 H, Abb. 14 R und U, Abb. 17). Möglicherweise deutet dies auf eine verstärkte Interaktion des YIGSR-Peptides in den höheren Konzentrationen bei der Vernetzung des Hydrogeles hin.

Dadurch zeigte sich eine Tendenz zur Kontraktion der Hydrogele und möglicherweise zu einer Umstrukturierung der Mikrostruktur. Die physikalische Barriere zur Verhinderung der Agglomeration der Zellen könnte hierdurch herabgesetzt worden sein. Des Weiteren wäre es möglich, dass das Peptid im Hydrogel nicht gleichmäßig verteilt war und somit für die Zellen keine gleichmäßig verteilten Adhäsionsmöglichkeiten bieten konnte. Möglicherweise hätte dann das an einer Stelle konzentrierte Peptid einen größeren Adhäsionsreiz ergeben, woraufhin sich die Zelle daran hafteten. Allerdings zeigten sich die Zellen in den nicht modifizierten Gelen ebenfalls gleichmäßig verteilt, was eher auf eine Barriereminderung durch eine Mikrostrukturveränderung des Geles hinweist, als auf den Einfluss der Adhäsion durch das Peptid. Bei allen anderen Gruppen zeigten sich über die Untersuchungszeit von 21 Tagen makroskopisch keine deutlichen Veränderungen der Gele. Tendenziell nahmen die Hydrogele nach adipogener Induktion leicht an Größe zu und wurden etwas weicher. Die makroskopische Untersuchung erfolgte jedoch rein subjektiv nach Ermessen des Untersuchers und konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht objektiviert werden.

5.4 Untersuchung der Vitalität und adipogenen Differenzierung von ASCs in der 3D HA-PG-Hydrogelkultur

Die HA-PG-Hydrogele wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Biokompatibilität durch die Besiedlung mit ASCs untersucht. Es erfolgten zum einen ein Live/Dead-Assay und die Messung der absoluten DNA-Masse mittels DNA-Assay nach 21 Tagen zur Bestimmung der Zellvitalität. Zum anderen wurden die ASCs über 21 Tage adipogen differenziert und die Adipogenese mittels histologischer Färbung der intrazellulären Triglyceride, quantitativ mittels Triglycerid-Assay und auf mRNA-Ebene durch die Expression adipogener Transkriptionsfaktoren bestimmt.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten HA-PG-Gele zeigten sich durchaus geeignet als Trägermatrix für ASCs. Zwei Tage nach Besiedlung der Hydrogele konnte im Live/Dead-Assay eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in allen Gelen gesehen werden (Abb. 14 d0). Des Weiteren zeigte sich der überwiegende Teil der Zellen vital (grünfarben). In den korrespondierenden Bestimmungen der DNA-Masse fand sich in allen untersuchten Gruppen (unmodifiziert und modifiziert) an Tag 0 die absolute DNA-Masse auf einem ähnlichen Niveau ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 13).

Nach 21 Tagen lag weiterhin im Live/Dead Assay eine gleichmäßige Verteilung der überwiegend vitalen Zellen in den unmodifizierten HA-PG-Gelen vor. Die Anzahl der vitalen Zellen schien tendenziell reduziert (Abb. 14 d21 non und d21 ind). Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in der Literatur mit HA-PG-Hydrogelen und hMSZ unter chondrogener Differenzierung gezeigt werden ⁹². Zusätzlich erfolgte ein korrespondierenden DNA-Assay. Hier zeigte sich die DNA-Masse vor allem in der nicht-induzierten Gruppe signifikant reduziert (Abb. 13). In den induzierten Gruppen waren an Tag 21 die DNA-Masse-Werte heterogen und tendenziell nicht so stark reduziert wie in den nicht-induzierten Gruppen. Die Heterogenität ist am wahrscheinlichsten auf spenderspezifische Differenzen zurückzuführen. Nicht nur der Ertrag von ASCs, sondern auch die Funktion variiert maßgeblich. Eine Übersichtsarbeit von Varghese et al. kristallisiert dabei vor allem das Alter, den BMI und Diabetes mellitus als Komorbidität als stark beeinflussende Faktoren heraus ¹³⁷. Bei der enormen Zellzahl an ASCs, die pro

Versuch benötigt wurden, war es im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich, genauere Ursachen durch weitere Versuche zu eruieren.

Betrachtet man die mit Peptidsequenzen funktionalisierten HA-PG-Gele im Live/Dead-Assay, zeigte sich ein ganz ähnliches Bild zu den unmodifizierten HA-PG-Gelen. Nach 21 Tagen konnten auch hier überwiegend vitale (grünfarbene) Zellen gesehen werden. Tendenziell nahm jedoch der Anteil an toten Zellen (rotfarben) vor allem in den nicht-induzierten Gruppen zu. Des Weiteren kam es zu Veränderungen des Verteilungsmusters der Zellen. In den induzierten Gruppen zeigte sich eine relativ gleichmäßige Verteilung mit stellenweiser Zellhaufenbildung, vor allem in der Konzentration 1 mM der mit IKVAV modifizierten Gele. Im Gegensatz dazu kam es in den nicht-induzierten funktionalisierten Gelen zu einer Agglomeration der Zellen mit Zellstraßenbildung bis hin zur Ausbildung eines kompakten Zellagglomerates in den mit YIGSR modifizierten Gelen. Diese Agglomeratbildung konnte bereits makroskopische als Kern mit Gelhof registriert werden (Abb. 14 R und U). Wie zuvor bereits erwähnt, könnte dies möglicherweise auf eine verstärkte Interaktion der Peptide mit dem Hydrogel und eine darauf basierende Tendenz zur Kontraktion und Umstrukturierung der Mikrostruktur der Hydrogele hinweisen. Betrachtet man die korrespondierenden Untersuchungen auf DNA-Ebene, sank die DNA-Masse in den nicht-induzierten Gruppen signifikant. Trotz der Modifikation der Gele mit Peptidsequenzen, die die Adhärenz der Zellen zum Gel erhöhen sollten, scheint vor allen die adipogene Induktion der ASCs die Bedingungen für die Zellen verbessert und ihr Überleben gefördert zu haben. Die Kultur der Zellen in Basismedium führte in den modifizierten Gelen über 21 Tage zu einer signifikanten Reduktion der DNA-Masse. Im Vergleich zu den unmodifizierten HA-PG-Gelen zeigte sich kein relevanter Unterschied in der DNA-Masse und somit der Zellvitalität weder in den induzierten noch nicht-induzierten Gruppen (Abb. 13). Die Modifikation der HA-PG-Gele mit Zelladhärenz-steigernden Peptiden brachte in dieser Arbeit keine stabilisierende Regulierung der Zellvitalität. In der Literatur wurden unterschiedliche Tendenzen beschrieben. In der Arbeit von Molitor konnte die Einbindung von IKVAV in PEG-verlinkte Hyaluronsäure-basierte Hydrogele keine signifikante Verbesserung des Zellüberlebens zeigen¹³⁸. Im Gegensatz dazu zeigte eine Arbeit von Jongpaiboonkit et al. höhere Vitalitätsraten vom hMSZs unter Einbindung von IKVAV und RGDSP in PEG-Hydrogele¹³⁹.

Um die adipogene Differenzierung der inkorporierten ASCs in den Hydrogelen zu untersuchen, wurden diese über 21 Tage adipogen differenziert. Die Überprüfung der Adipogenese erfolgte histologisch an Kryoschnitten der Hydrogele mittels Triglycerid-Färbung, quantitativ mit einem Triglycerid-Assay und zusätzlich auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR. In den unmodifizierten HA-PG-Gelen zeigte sich nach 21 Tagen adipogener Induktion im Gegensatz zu der nicht-induzierten Gruppe eine deutliche TG-Bildung. In den histologischen Schnitten (Abb. 18 C) sind in dem Großteil der Zellen intrazelluläre Triglyceridtropfen (orange-rotfarben) zu erkennen. Dies konnte durch das korrespondierende TG-Assay bestätigt werden. Hier zeigte sich nicht nur eine signifikante Zunahme der absoluten TG-Werte von Tag null, sondern ebenfalls ein signifikant höherer absoluter TG-Wert zur nicht-induzierten Gruppe (Abb. 15 A und C). Auch nach Normalisierung der absoluten TG-Masse auf die DNA-Masse der Probe zeigte sich eine signifikante Steigerung der Triglyceride nach 21 Tagen Induktion (Abb. 16 A und C).

In den peptidmodifizierten Gruppen zeigte sich nach 21 Tagen Induktion histologisch ein sehr ähnliches und gleichmäßiges Bild. In allen Gruppen konnte im Großteil der Zellen orange-rotfarbene Triglyceridtropfen nach Induktion gesehen werden (Abb. 18 d21 ind). Dabei stach keine Gruppe mit einem besonders hohen TG-Anteil hervor. Im Vergleich zu den unmodifizierten Gelen konnte ebenfalls kein deutlicher Unterschied in der Menge der Lipidtropfen gesehen werden. Auf Grundlage der histologischen Bilder sind die ASCs in den HA-PG-Hydrogelen gut adipogen differenzierbar mit deutlich sichtbarer Lipidtropfenbildung. Auch in den modifizierten Gelen war dies gut möglich. Eine augenscheinliche Zunahme der Adipogenese durch die Modifikation der Hydrogele mit funktionellen Gruppen ergab sich jedoch in dieser Arbeit nicht. Im Gegensatz dazu konnte in der Literatur bereits eine Zunahme der Adipogenese durch Einbindung von YIGSR in PEG-Hydrogele gezeigt werden¹⁴⁰. Jedoch wurden in der Studie von Brandl et al. reine PEG-Hydrogele verwendet, die ohne die Einbindung eines Adhäsionsmoleküls, wie dem YIGSR, keine Möglichkeit der Adhäsion für Zellen bieten würden.

Betrachtet man die absoluten TG-Werte des korrespondierenden Assays zeigte sich ein heterogenes Bild. In der mit 0,5 mM IKVAV sowie aller mit YIGSR modifizierten Gruppen stellt sich ein größerer Anstieg der absoluten TG-Masse im Vergleich zu allen

weiteren modifizierten sowie den unmodifizierten Gruppen dar. Im Gegensatz dazu zeigten die mit RGD modifizierte Gruppe eher niedrigere absolute TG-Werte. Trotz dessen zeigte sich in allen untersuchten Gruppen ein signifikanter Anstieg der absoluten TG-Masse über 21 Tage und ein signifikanter Unterschied zu den nicht-induzierten Gruppen (Abb. 15). Die Unterschiede der TG-Werte in den modifizierten Gruppen im TG-Assay sind in den histologischen Bildern nur bedingt nachvollziehbar gewesen. Am ehesten könnte das an den Differenzen zwischen den Spenderzellen liegen, da auf Grund der enormen Menge an benötigten ASCs pro Versuch, jede Peptidgruppe mit Zellen von einem Spender untersucht wurde.

Im Vergleich der Gruppen nach Normalisierung der absoluten TG-Masse auf die DNA-Masse der Proben zeigten sich außer bei der Fibrin-Kontrollgruppe, in der eine deutlich höhere TG-Masse pro Zelle vorzuliegen schien, keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 16).

Die in den vorherig beschriebenen Untersuchungen bestätigte Adipogenese der ASCs in den unmodifizierten und modifizierten HA-PG-Gelen konnte ebenfalls auf mRNA-Ebene durch eine quantitative RT-PCR verifiziert werden (Abb. 19). Hier zeigten sich nach 21 Tagen adipogener Induktion eine deutlich signifikante Hochregulation der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PPAR γ sowie des adipogenen Spätmarkers aP2. Die Hochregulation der zuvor genannten Transkriptionsfaktoren spielt eine entscheidende Rolle in der Adipogenese zum reifen Adipozyt^{7, 22} und kann somit als Nachweis auf genetischer Ebene genutzt werden. Einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen an Tag 21 gab es dabei nicht.

Zusammenfassend konnte die Adipogenese der ASCs in den 3D-HA-PG-Hydrogelkultur in allen untersuchten Gruppen bestätigt werden.

6. Schlussfolgerung

Das Tissue Engineering von Fettgewebe könnte einen bedeutenden Baustein in der zukünftigen Behandlung von Weichgewebsdefekten darstellen. Besonders die Nutzung von hydrogelartigen Scaffolds als Trägermatrizes für Stammzellen wie auch differenzierte Zellen bietet eine vielversprechende Grundlage.

Dafür wurden in der vorliegenden Arbeit drei Gewinnungsmethoden von ASCs aus dem subkutanen Fettgewebe untersucht. Es zeigte sich eine deutlich höhere Effizienz der Liposuktionstechniken gegenüber der mechanischen Gewinnungsmethode mit signifikant höheren Zellzahlen der gewonnenen SVF. Die Viabilitätsuntersuchungen zeigten eine ähnliche Tendenz. ASCs aller drei Gewinnungsmethoden proliferierten zwar tendenziell gleich gut, jedoch konnte in den histologischen Untersuchungen eine deutlich bessere Adipogenese der ASCs nach Liposuktion gezeigt werden. Ein ähnlicher Trend zeigte sich in den quantitativen Triglycerid-Assays. Zur Gewinnung von ASCs scheint die Liposuktion eine durchaus sinnvolle Methode, da sie ein großes Volumen an Fett generiert, welches zur intraoperativen Weiterverarbeitung im Rahmen von klinischen Therapieansätzen sowie labortechnisch zur Gewinnung von ASCs genutzt werden kann. Als weiterer Gegenstand dieser Arbeit wurde die Biokompatibilität eines Hyaluronsäure-basierten Hydrogels untersucht. Der Crosslinker Polyglycidol eignete sich in dieser Arbeit sehr gut zur Herstellung von Hydrogelen und der 3D Kultur mit ASCs. Auch konnten diese erfolgreich adipogen differenziert werden. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits nach Chondrogenese von hMSZ in Polyglycidol-verlinkten HA-Hydrogelen gezeigt werden ⁹². Durch die Inkorporation der funktionellen Gruppen IKVAV, YIGSR und RGD aus der adipogenen Extrazellulärmatrix, welche die Adhärenz sowie die Adipogenese fördern sollten, konnte in dieser Arbeit jedoch keine Steigerung der Viabilität der Zellen gezeigt werden. In Zukunft wäre es sicher sinnvoll weitere Untersuchungen bezüglich der in dieser Arbeit verwendeten funktionellen Gruppen, der Kombination verschiedener funktioneller Gruppen in einem Hydrogel oder andere, die Adhärenz und Adipogenese fördernde Gruppen durchzuführen.

7. Zusammenfassung

In der Plastischen Chirurgie erfordert die Rekonstruktion von ästhetisch anspruchsvollen Bereichen in vielen Fällen die Wiederherstellung von subkutanem Fettgewebe. Neben chirurgischen Rekonstruktionen könnte das Tissue Engineering von Fettgewebe einen wertvollen Beitrag leisten. Jedoch bringt es vielschichtige Herausforderungen mit sich und ist zum aktuellen Zeitpunkt nur limitiert möglich. Ein Ansatz ist die Schaffung einer Trägermatrix zur Besiedelung und Differenzierung von Stammzellen. Auf dieser Basis sollten in der vorliegenden Arbeit zwei Teilbereiche untersucht werden. In dem ersten Teilbereich erfolgten Untersuchungen verschiedener Gewinnungsmethoden von ASCs aus dem subkutanen Fettgewebe bezogen auf ihr Effizienz. Die untersuchten Liposuktionstechniken zeigten eine deutlich höhere Effizienz gegenüber der mechanischen Gewinnungsmethode bezogen auf die gewonnene Zellzahl. In den Viabilitätsuntersuchungen zeigte sich eine ähnliche Tendenz. ASCs aller drei Gewinnungsmethoden proliferierten durchaus gleich gut, jedoch zeigten die histologischen und quantitativen Adipogeneseuntersuchungen tendenziell mehr Lipidbildung bei den Liposuktionstechniken.

Das übergeordnete Ziel des zweiten Abschnittes dieser Arbeit war es eine Trägermatrix auf Hyaluronsäure-Basis mit dem vielseitig modifizierbarem Crosslinker Polyglycidol zu untersuchen, sie mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe zu besiedeln und diese adipogen zu differenzieren. Des Weiteren erfolgten erste Versuche die Hydrogele mit funktionellen Gruppen zu modifizieren um eine Verbesserung der Adhäsion der Zellen im Hydrogel zu erreichen. Die unmodifizierten Hydrogele waren zu jeder Zeit stabil in ihrer Form und zeigten nach Besiedelung mit ASCs eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Gel. Auch ließ sich die Adipogenese histologisch visualisieren und biochemisch bestätigen. Die inkorporierten Peptide brachten eine peptidabhängige und konzentrationsabhängige Veränderung der Zellverteilung im Hydrogel. Eine Steigerung der Funktionalität der Zellen bezogen auf das Überleben und die Adipogenese konnte in diesen ersten Versuchen noch nicht gezeigt werden.

Generell zeigt sich eine Eignung der hyaluronsäurebasierten mit Polyglycidol-verlinkten Hydrogele für das Tissue Engineering von Fettgewebe. Weitere Untersuchungen bezüglich der Modifikation der Hydrogele mit adhäsiven und adipogenen funktionellen

Gruppen bietet sich daher an und könnte ein fettgewebsähnliches Umgebungsmilieu hervorbringen.

Literaturverzeichnis

1. Blondeel PN, Vanderstraeten GG, Monstrey SJ, Van Landuyt K, Tonnard P, Lysens R, Boeckx WD, Matton G. The donor site morbidity of free DIEP flaps and free TRAM flaps for breast reconstruction. *Br J Plast Surg*. 1997;50(5):322-330. doi:10.1016/S0007-1226(97)90540-3.
2. Kimata Y, Uchiyama K, Ebihara S, Sakuraba M, Iida H, Nakatsuka T, Harii K. Anterolateral thigh flap donor-site complications and morbidity. *Plast Reconstr Surg*. 2000;106(3):584-589. doi:10.1097/00006534-200009010-00009.
3. Adams WP, Lipschitz AH, Ansari M, Kenkel JM, Rohrich RJ. Functional Donor Site Morbidity Following Latissimus Dorsi Muscle Flap Transfer. *Ann Plast Surg*. 2004;53(1):6-11. doi:10.1097/01.sap.0000106430.56501.b5.
4. Ialenti A, Rosa M. Hyaluronic acid modulates acute and chronic inflammation. *Agents Actions*. 1994;43(1-2):44-47. doi:10.1007/BF02005763.
5. Alijotas-Reig J, Hindié M, Kandhaya-Pillai R, Miro-Mur F. Bioengineered hyaluronic acid elicited a nonantigenic T cell activation: Implications from cosmetic medicine and surgery to nanomedicine. *J Biomed Mater Res Part A*. 2010;95A(1):180-190. doi:10.1002/jbm.a.32794.
6. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular Angiogenesis and Apoptosis in the Survival of Free Fat Grafts. *Laryngoscope*. 2000;110(8):1333-1338. doi:10.1097/00005537-200008000-00021.
7. Gutowski KA, ASPS Fat Graft Task Force. Current Applications and Safety of Autologous Fat Grafts: A Report of the ASPS Fat Graft Task Force. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(1):272-280. doi:10.1097/PRS.0b013e3181a09506.
8. Tabit CJ, Slack GC, Fan K, Wan DC, Bradley JP. Fat Grafting Versus Adipose-Derived Stem Cell Therapy: Distinguishing Indications, Techniques, and Outcomes. *Aesth Plast Surg*. 2012;36(3):704-713. doi:10.1007/s00266-011-9835-4.
9. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889-895. doi:10.1056/NEJM199410063311401.

10. Rheinwatd JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinized colonies from single cells. *Cell*. 1975;6(3):331-343. doi:10.1016/S0092-8674(75)80001-8.
11. Dunkelman NS, Zimmer MP, LeBaron RG, Pavelec R, Kwan M, Purchio AF. Cartilage production by rabbit articular chondrocytes on polyglycolic acid scaffolds in a closed bioreactor system. *Biotechnol Bioeng*. 1995;46(4):299-305. doi:10.1002/bit.260460402.
12. Chu CR, Coutts RD, Yoshioka M, Harwood FL, Monosov AZ, Amiel D. Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): A tissue-engineering study. *J Biomed Mater Res*. 1995;29(9):1147-1154. doi:10.1002/jbm.820290915.
13. Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(36):6052-6063. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.07.033.
14. Bundesrepublik Deutschland. Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen (Stammzellgesetz - StZG). 2002;BGBl(I.S. 2277):1-5.
15. Bundesrepublik Deutschland. Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz - ESchG). 1990;BGBl(I.S.2228):1-4.
16. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
17. Wilson KD, Wu JC. Induced Pluripotent Stem Cells. *Handb Stem Cells, Two-Volume Set*. 2015;313(16):1613-1614. doi:10.1016/B978-0-12-385942-6.00018-4.
18. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(4):268-277. doi:10.1038/nrc3034.
19. Twardzik T, Rapp UR. Somatische Stammzellen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*. 2002;45:79-84. doi:10.1007/s00103-001-0345-4.

20. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic Transplants of bone marrow. Analysis of Precursor Cells For Osteogenic and Hematopoietic Tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230-247.
21. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res*. 1991;9:641-650.
doi:10.3727/096368910X.
22. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. *Stem Cells*. 2012;30:804-810.
doi:10.1002/2012.
23. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
doi:10.1080/14653240600855905.
24. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-228.
doi:10.1089/107632701300062859.
25. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-4295.
doi:10.1091/mbc.E02-02-0105.
26. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45(2):115-120.
doi:10.1016/j.ymeth.2008.03.006.
27. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006;24(4):150-154.
doi:10.1016/j.tibtech.2006.01.010.
28. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJPF, van Milligen FJ. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8(2):166-177.
doi:10.1080/14653240600621125.

29. Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho C-H, Kim I, Koh GY. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2010;115(5):957-964. doi:10.1182/blood-2009-05-219923.
30. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic Potential of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in Vitro and in Vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290(2):763–769. doi:10.1006/bbrc.2001.6270.
31. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Péault B, Rubin JP, Donnenberg AD. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytom Part A*. 2010;77A:22-30. doi:10.1002/cyto.a.20813.
32. Maumus M, Peyrafitte J-A, D'angelo R, Fournier-Wirth C, Bouloumié A, Casteilla L, Sengenès C, Bourin P. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes*. 2011;35(10):1141-1153. doi:10.1038/ijo.2010.269.
33. Braun J, Kurtz A, Barutcu N, Bodo J, Thiel A, Dong J. Concerted Regulation of CD34 and CD105 Accompanies Mesenchymal Stromal Cell Derivation from Human Adventitial Stromal Cell. *Stem Cells Dev*. 2013;22(5):815-827. doi:10.1089/scd.2012.0263.
34. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. *Cytotherapy*. 2013;15(6):641-648. doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.006.
35. Feisst V, Meidinger S, Locke M. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning Adv Appl*. 2015;8:149-162. doi:10.2147/SCCAA.S64373.
36. Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev Reports*. 2011;7(2):269-291. doi:10.1007/s12015-010-9193-7.

37. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: Tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012;2012:1-11. doi:10.1155/2012/812693.
38. Knittle JL, Timmers K, Ginsberg-Fellner F, Brown RE, Katz DP. The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J Clin Invest.* 1979;63(2):239-246. doi:10.1172/JCI109295.
39. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz B a, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 2008;453(7196):783-787. doi:10.1038/nature06902.
40. Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonina T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(42):18226-18231. doi:10.1073/pnas.1005259107.
41. MacKellar J, Cushman SW, Periwal V. Waves of adipose tissue growth in the genetically obese Zucker fatty rat. *PLoS One.* 2010;5(1):e8197. doi:10.1371/journal.pone.0008197.
42. Tchkonina T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, Kirkland JL. Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots. *Cell Metab.* 2013;17(5):644-656. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.008.
43. Krotkiewski M, Björntorp P, Sjöström L, Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest.* 1983;72(3):1150-1162. doi:10.1172/JCI111040.
44. Kim S, Moustaid-Moussa N. Secretory, Endocrine and Autocrine/Paracrine Function of the Adipocyte. *J Nutr.* 2000;130(12):3110S-3115S. doi:10.1093/jn/130.12.3110S.
45. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:1293-1307. doi:10.1101/gad.14.11.1293.

46. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Metab.* 2001;280(6):E827-E847. doi:10.1152/ajpendo.2001.280.6.E827.
47. Hutley L, Shurety W, Newell F, McGeary R, Pelton N, Grant J, Herington A, Cameron D, Whitehead J, Prins J. Fibroblast Growth Factor 1: A Key Regulator of Human Adipogenesis. *Diabetes.* 2004;53(12):3097-3106. doi:10.2337/diabetes.53.12.3097.
48. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(3):1023-1033. doi:10.1210/jc.2006-1055.
49. Ali AT, Penny CB, Paiker JE, van Niekerk C, Smit A, Ferris WF, Crowther NJ. Alkaline phosphatase is involved in the control of adipogenesis in the murine preadipocyte cell line, 3T3-L1. *Clin Chim Acta.* 2005;354(1-2):101-109. doi:10.1016/J.CCCN.2004.11.026.
50. Hotamisligil G, Shargill N, Spiegelman B. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (80-).* 1993;259(5091):87-91. doi:10.1126/science.7678183.
51. Karastergiou K, Mohamed-Ali V. The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;318(1-2):69-78. doi:10.1016/j.mce.2009.11.011.
52. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998;395(6704):763-770. doi:10.1038/27376.
53. Gregoire FM, Smas CM, S. SH. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev.* 1998;78(3):783-809. doi:10.1152/physrev.1998.78.3.783.
54. Rosen ED, Spiegelman BM. What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell.* 2014;156(1-2):20-44. doi:10.1016/j.cell.2013.12.012.
55. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng Y-H, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR, From. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1509-1517. doi:10.1056/NEJMoa0810780.Identification.

56. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommelrig JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJJ. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1500-1508. doi:10.1056/NEJMoa0808718.
57. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto N-J, Enerbäck S, Nuutila P. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1518-1525. doi:10.1056/NEJMoa0808949.
58. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, Khandekar M, Virtanen K a, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-376. doi:10.1016/j.cell.2012.05.016.
59. Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(3):107-114. doi:10.1016/j.tem.2008.11.005.
60. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(12):885-896. doi:10.1038/nrm2066.
61. MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: Forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(1):5-11. doi:10.1016/S1043-2760(01)00517-3.
62. Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol*. 2013;92(6-7):229-236. doi:10.1016/j.ejcb.2013.06.001.
63. The American Society for Aesthetic Plastic Surgery. *The Authoritative Source for Current U.S. Statistics on Cosmetic Surgery Expanded Data for 2016: Multi-Year Comparisons, 37 Cosmetic Procedures Multi-Specialty Data Cosmetic Surgery National Data Bank Statistics.*; 2016.
64. Fischer A, Fischer GM. Revised technique for cellulitis fat reduction in riding breeches deformity. *Bull Int Acad Cosmet Surg*. 1977;2:40-41.
65. Shridharani S, Broyles J, Matarasso A. Liposuction devices: technology update. *Med Devices Evid Res*. 2014;7:241. doi:10.2147/MDER.S47322.
66. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Subcutaneous Adipose Tissue-Derived Stem Cell Utility Is Independent of Anatomical Harvest Site. *Biores Open Access*. 2015;4(1):131-145. doi:10.1089/biores.2014.0059.

-
67. von Heimburg D, Hemmrich K, Haydarlioglu S, Staiger H, Pallua N. Comparison of Viable Cell Yield from Excised versus Aspirated Adipose Tissue. *Cells Tissues Organs*. 2004;178(2):87-92. doi:10.1159/000081719.
68. Jurgens WJFM, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, ZandiehDoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, Ritt MJPF, van Milligen FJ. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res*. 2008;332(3):415-426. doi:10.1007/s00441-007-0555-7.
69. Tsekouras A, Mantas D, Tsilimigras DI, Moris D, Kontos M, Zografos GC. Comparison of the Viability and Yield of Adipose-Derived Stem Cells (ASCs) from Different Donor Areas. *In Vivo (Brooklyn)*. 2017;31(6):1229-1234. doi:10.21873/invivo.11196.
70. Murugan R, Ramakrishna S. Design Strategies of Tissue Engineering Scaffolds with Controlled Fiber Orientation. *Tissue Eng*. 2007;13(8):1845-1866. doi:10.1089/ten.2006.0078.
71. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2011;2(1):403-430. doi:10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.
72. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today*. 2011;14(3):88-95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
73. Chen G, Ushida T, Tateishi T. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromol Biosci*. 2002;2(2):67-77. doi:10.1002/1616-5195(20020201)2:2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F.
74. Brett E, Chung N, Tripp Leavitt W, Momeni A, Longaker MT, Wan DC. A Review of Cell-Based Strategies for Soft Tissue Reconstruction. *Tissue Eng Part B*. 2017;23(4):336-346. doi:10.1089/ten.teb.2016.0455.
75. Mauney JR, Nguyen T, Gillen K, Kirker-Head C, Gimble JM, Kaplan DL. Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28(35):5280-5290. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.08.017.

-
76. Patrick CW, Chauvin PB, Hogley J, Reece GP. Preadipocyte Seeded PLGA Scaffolds for Adipose Tissue Engineering. *Tissue Eng.* 1999;5(2):139-151. doi:10.1089/ten.1999.5.139.
 77. Von Heimburg D, Kuberka M, Rendchen R, Hemmrich K, Rau G, Pallua N. Preadipocyte-Loaded Collagen Scaffolds with Enlarged Pore Size for Improved Soft Tissue Engineering. *Int J Artif Organs.* 2003;26(12):1064-1076. doi:10.1177/039139880302601204.
 78. Hemmrich K, Von Heimburg D, Rendchen R, Di Bartolo C, Milella E, Pallua N. Implantation of preadipocyte-loaded hyaluronic acid-based scaffolds into nude mice to evaluate potential for soft tissue engineering. *Biomaterials.* 2005;26:7025-7037. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.065.
 79. Nicodemus GD, Bryant SJ. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(2):149-165. doi:10.1089/ten.teb.2007.0332.
 80. Wittmann K, Dietl S, Ludwig N, Berberich O, Hoefner C, Storck K, Blunk T, Bauer-Kreisel P. Engineering Vascularized Adipose Tissue Using the Stromal-Vascular Fraction and Fibrin Hydrogels. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(7-8):1343-1353. doi:10.1089/ten.tea.2014.0299.
 81. Chen P-Y, Huang LLH, Hsieh H-J. Hyaluronan preserves the proliferation and differentiation potentials of long-term cultured murine adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;360(1):1-6. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.211.
 82. Han TTY, Toutounji S, Amsden BG, Flynn LE. Adipose-derived stromal cells mediate in vivo adipogenesis, angiogenesis and inflammation in decellularized adipose tissue bioscaffolds. *Biomaterials.* 2015;72:125-137. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.08.053.
 83. Bauer-Kreisel P, Goepferich A, Blunk T. Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(7-8):798-813. doi:10.1016/j.addr.2010.04.003.

84. Yu C, Kornmuller A, Brown C, Hoare T, Flynn LE. Decellularized adipose tissue microcarriers as a dynamic culture platform for human adipose-derived stem/stromal cell expansion. *Biomaterials*. 2017;120:66-80. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.12.017.
85. Chang CS, Chang BL, Lanni M, Wilson AJ, Beer J, Percec I. Perioral Rejuvenation: A Prospective, Quantitative Dynamic Three-Dimensional Analysis of a Dual Modality Treatment. *Aesthetic Surg J*. 2018;38(11):1225-1236. doi:10.1093/asj/sjy060.
86. Mustak H, Fiaschetti D, Gupta A, Goldberg R. Eyebrow Contouring with Hyaluronic Acid Gel Filler Injections. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2018;11(2):38-40.
87. Trbakovic A, Hedenqvist P, Mellgren T, Ley C, Hilborn J, Ossipov D, Ekman S, Johansson CB, Jensen-Waern M, Thor A. A new synthetic granular calcium phosphate compound induces new bone in a sinus lift rabbit model. *J Dent*. 2018;70:31-39. doi:10.1016/j.jdent.2017.12.009.
88. Won H-R, Kim YS, Won J-E, Shin YS, Kim C-H. The Application of Fibrin/Hyaluronic Acid–Poly(l-Lactic-co-Glycolic Acid) Construct in Augmentation Rhinoplasty. *Tissue Eng Regen Med*. 2018;15(2):223-230. doi:10.1007/s13770-017-0095-5.
89. Kosaraju R, Rennert RC, Maan ZN, Duscher D, Barrera J, Whittam AJ, Januszyk M, Rajadas J, Rodrigues M, Gurtner GC. Adipose-Derived Stem Cell-Seeded Hydrogels Increase Endogenous Progenitor Cell Recruitment and Neovascularization in Wounds. *Tissue Eng Part A*. 2016;22(3-4):295-305. doi:10.1089/ten.tea.2015.0277.
90. Zhu C, Lei H, Fan D, Duan Z, Li X, Li Y, Cao J, Wang S, Yu Y. Novel enzymatic crosslinked hydrogels that mimic extracellular matrix for skin wound healing. *J Mater Sci*. 2018;53(8):5909-5928. doi:10.1007/s10853-017-1956-y.
91. Chen Y, Sui J, Wang Q, Yin Y, Liu J, Wang Q, Han X, Sun Y, Fan Y, Zhang X. Injectable self-crosslinking HA-SH/Col I blend hydrogels for in vitro construction of engineered cartilage. *Carbohydr Polym*. 2018;190(October 2017):57-66. doi:10.1016/j.carbpol.2018.02.057.

92. Stichler S, Böck T, Paxton N, Bertlein S, Levato R, Schill V, Smolan W, Malda J, Teßmar J, Blunk T, Groll J. Double printing of hyaluronic acid/poly(glycidol) hybrid hydrogels with poly(ϵ -caprolactone) for MSC chondrogenesis. *Biofabrication*. 2017;9(4):0-23. doi:10.1088/1758-5090/aa8cb7.
93. Townsend JM, Andrews BT, Feng Y, Wang J, Nudo RJ, Van Kampen E, Gehrke SH, Berklund CJ, Detamore MS. Superior calvarial bone regeneration using pentenoate-functionalized hyaluronic acid hydrogels with devitalized tendon particles. *Acta Biomater*. 2018;71:148-155. doi:10.1016/j.actbio.2018.02.013.
94. Thompson RE, Pardieck J, Smith L, Kenny P, Crawford L, Shoichet M, Sakiyama-Elbert S. Effect of hyaluronic acid hydrogels containing astrocyte-derived extracellular matrix and/or V2a interneurons on histologic outcomes following spinal cord injury. *Biomaterials*. 2018;162:208-223. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.02.013.
95. Deng Y, Ren J, Chen G, Li G, Wu X, Wang G, Gu G, Li J. Injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for abdominal tissue regeneration. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-13. doi:10.1038/s41598-017-02962-z.
96. Remuzzi A, Mantero S, Colombo M, Morigi M, Binda E, Camozzi D, Imberti B. Vascular Smooth Muscle Cells on Hyaluronic Acid: Culture and Mechanical Characterization of an Engineered Vascular Construct. *Tissue Eng*. 2004;10(5-6):699-710. doi:10.1089/1076327041348347.
97. Espandar L. Adipose-Derived Stem Cells on Hyaluronic Acid-Derived Scaffold. *Arch Ophthalmol*. 2012;130(2):202. doi:10.1001/archophthalmol.2011.1398.
98. Collins MN, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering-A review. *Carbohydr Polym*. 2013;92(2):1262-1279. doi:10.1016/J.CARBPOL.2012.10.028.
99. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. *Physiol Rev*. 2011;91:221-264. doi:10.1152/physrev.00052.2009.
100. Solis MA, Chen Y, Wong TY, Bittencourt VZ, Lin Y, Huang LLH. Hyaluronan Regulates Cell Behavior: A Potential Niche Matrix for Stem Cells. *Biochem Res Int*. 2012;2012:1-11. doi:10.1155/2012/346972.

101. Kang L, Lantier L, Kennedy A, Bonner JS, Mayes WH, Bracy DP, Bookbinder LH, Hasty AH, Thompson CB, Wasserman DH. Hyaluronan Accumulates With High-Fat Feeding and Contributes to Insulin Resistance. *Diabetes*. 2013;62(6):1888-1896. doi:10.2337/db12-1502.
102. Ji E, Jung MY, Park JH, Kim S, Seo CR, Park KW, Lee EK, Yeom CH, Lee S. Inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells and suppression of abdominal fat accumulation in high-fat diet-feeding C57BL/6J mice after downregulation of hyaluronic acid. *Int J Obes*. 2014;38(8):1035-1043. doi:10.1038/ijo.2013.202.
103. McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest*. 1996;98(10):2403-2413. doi:10.1172/JCI119054.
104. Takahashi Y, Li L, Kamiryō M, Asteriou T, Moustakas A, Yamashita H, Heldin P. Hyaluronan Fragments Induce Endothelial Cell Differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent Manner. *J Biol Chem*. 2005;280(25):24195-24204. doi:10.1074/jbc.M411913200.
105. Kabir SM, Lee E-S, Son D-S. Chemokine network during adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Adipocyte*. 2014;3(2):97-106. doi:10.4161/adip.28110.
106. Zhang T, Tseng C, Zhang Y, Sirin O, Corn PG, Li-Ning-Tapia EM, Troncoso P, Davis J, Pettaway C, Ward J, Frazier ML, Logothetis C, Kolonin MG. CXCL1 mediates obesity-associated adipose stromal cell trafficking and function in the tumour microenvironment. *Nat Commun*. 2016;7:11674. doi:10.1038/ncomms11674.
107. Zhu Y, Kruglikov IL, Akgul Y, Scherer PE. Hyaluronan in adipogenesis, adipose tissue physiology and systemic metabolism. *Matrix Biol*. 2019;78-79:284-291. doi:10.1016/j.matbio.2018.02.012.
108. Flynn LE, Prestwich GD, Semple JL, Woodhouse KA. Proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells on naturally derived scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29(12):1862-1871. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.12.028.
109. Patel PN, Gobin AS, West JL, Patrick CW. Poly(ethylene glycol) Hydrogel System Supports Preadipocyte Viability, Adhesion, and Proliferation. *Tissue Eng*. 2005;11(9-10):1498-1505. doi:10.1089/ten.2005.11.1498.

110. Zhu J, Beamish JA, Tang C, Kottke-Marchant K, Marchant RE. Extracellular Matrix-like Cell-Adhesive Hydrogels from RGD-Containing Poly(ethylene glycol) Diacrylate. *Macromolecules*. 2006;39(4):1305-1307. doi:10.1021/ma052333s.
111. Hubbell JA. Hydrogel systems for barriers and local drug delivery in the control of wound healing. *J Control Release*. 1996;39(2-3):305-313. doi:10.1016/0168-3659(95)00162-X.
112. Weber LM, Hayda KN, Haskins K, Anseth KS. The effects of cell–matrix interactions on encapsulated β -cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides. *Biomaterials*. 2007;28(19):3004-3011. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.03.005.
113. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12(1):697-715. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.697.
114. Yamada KM. Adhesive recognition sequences. *J Biol Chem*. 1991;266(20):12809-12812.
115. Graf J, Iwamoto Y, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, Robey FA, Yamada Y. Identification of an amino acid sequence in laminin mediating cell attachment, chemotaxis, and receptor binding. *Cell*. 1987;48(6):989-996. doi:10.1016/0092-8674(87)90707-0.
116. Nuttelman CR, Tripodi MC, Anseth KS. Synthetic hydrogel niches that promote hMSC viability. *Matrix Biol*. 2005;24(3):208-218. doi:10.1016/j.matbio.2005.03.004.
117. Erberich M, Keul H, Möller M. Polyglycidols with Two Orthogonal Protective Groups: Preparation, Selective Deprotection, and Functionalization. *Macromolecules*. 2007;40(9):3070-3079. doi:10.1021/ma0627875.
118. Calderón M, Welker P, Licha K, Fichtner I, Graeser R, Haag R, Kratz F. Development of efficient acid cleavable multifunctional prodrugs derived from dendritic polyglycerol with a poly(ethylene glycol) shell. *J Control Release*. 2011;151(3):295-301. doi:10.1016/j.jconrel.2011.01.017.

119. Stichler S, Jungst T, Schamel M, Zilkowski I, Kuhlmann M, Böck T, Blunk T, Teßmar J, Groll J. Thiol-ene Clickable Poly(glycidol) Hydrogels for Biofabrication. *Ann Biomed Eng.* 2017;45(1):273-285. doi:10.1007/s10439-016-1633-3.
120. Wu C, Strehmel C, Achazi K, Chiappisi L, Dervede J, Lensen MC, Gradzielski M, Ansorge-Schumacher MB, Haag R. Enzymatically Cross-Linked Hyperbranched Polyglycerol Hydrogels as Scaffolds for Living Cells. *Biomacromolecules.* 2014;15(11):3881-3890. doi:10.1021/bm500705x.
121. Schreml S, Babilas P, Fruth S, Orsó E, Schmitz G, Mueller MB, Nerlich M, Prantl L. Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. *Cytotherapy.* 2009;11(7):947-957. doi:10.3109/14653240903204322.
122. Mojallal A, Auxenfans C, Lequeux C, Braye F, Damour O. Influence of negative pressure when harvesting adipose tissue on cell yield of the stromal–vascular fraction. *Biomed Mater Eng.* 2008;18(4-5):193-197. doi:10.3233/BME-2008-0524.
123. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Zhu M, Wheeler ES. Differences in stem and progenitor cell yield in different subcutaneous adipose tissue depots. *Cytotherapy.* 2007;9(5):459-467. doi:10.1080/14653240701358460.
124. Doi K, Tanaka S, Iida H, Eto H, Kato H, Aoi N, Kuno S, Hirohi T, Yoshimura K. Stromal vascular fraction isolated from lipo-aspirates using an automated processing system: bench and bed analysis. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013;7(11):864-870. doi:10.1002/term.1478.
125. Yang HJ, Kim KJ, Kim MK, Lee SJ, Ryu YH, Seo BF, Oh DY, Ahn ST, Lee HY, Rhie JW. The stem cell potential and multipotency of human adipose tissue-derived stem cells vary by cell donor and are different from those of other types of stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2014;199(5-6):373-383. doi:10.1159/000369969.
126. Schneider S, Unger M, Van Griensven M, Balmayor ER. Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine. *Eur J Med Res.* 2017;22(17):1-11. doi:10.1186/s40001-017-0258-9.

127. Iyyanki T, Hubenak J, Liu J, Chang EI, Beahm EK, Zhang Q. Harvesting technique affects adipose-derived stem cell yield. *Aesthetic Surg J*. 2015;35(4):467-476. doi:10.1093/asj/sju055.
128. Coleman SR. The technique of periorbital lipoinfiltration. *Oper Tech Plast Reconstr Surg*. 1994;1(3):120-126. doi:10.1016/S1071-0949(10)80002-2.
129. Duscher D, Pollhammer MS, Wenny R, Shamiyeh A, Schmidt M, Huemer GM. Barbed Sutures in Body-Contouring: Outcome Analysis of 695 Procedures in 623 Patients and Technical Advances. *Aesthetic Plast Surg*. 2016;40(6):815-821. doi:10.1007/s00266-016-0701-2.
130. Duscher D, Maan ZN, Luan A, Aitzetmüller MM, Brett EA, Atashroo D, Whittam AJ, Hu MS, Walmsley GG, Houschyar KS, Schilling AF, Machens H-G, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC. Ultrasound-assisted liposuction provides a source for functional adipose-derived stromal cells. *Cytotherapy*. 2017;19(12):1491-1500. doi:10.1016/j.jcyt.2017.07.013.
131. Yildiz K, Tasli PN, Sahin F, Guneren E. Comparison of cellular alterations in fat cells harvested with laser-assisted liposuction and suction-assisted liposuction. *J Craniofac Surg*. 2016;27(3):631-635. doi:10.1097/SCS.0000000000002589.
132. Taha S, Saller MM, Haas E, Farkas Z, Aszodi A, Giunta R, Volkmer E. Adipose-derived stem/progenitor cells from lipoaspirates: A comparison between the Lipivage200-5 liposuction system and the Body-Jet liposuction system. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2020;73(1):166-175. doi:10.1016/j.bjps.2019.06.025.
133. Chen YW, Wang JR, Liao X, Li SH, Xiao LL, Cheng B, Xie GH, Song JX, Liu HW. Effect of suction pressures on cell yield and functionality of the adipose-derived stromal vascular fraction. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2017;70(2):257-266. doi:10.1016/J.BJPS.2016.10.028.
134. Tevlin R, McArdle A, Brett E, Chung MT, Paik K, Seo EY, Walmsley GG, Duldulao CR, Atashroo D, Zielins E, Vistnes S, Chan CKF, Wan DC, Longaker MT. A Novel Method of Human Adipose-Derived Stem Cell Isolation with Resultant Increased Cell Yield. *Plast Reconstr Surg*. 2016;138(6):983e-996e. doi:10.1097/PRS.0000000000002790.

-
135. Alstrup T, Eijken M, Bohn AB, Møller B, Damsgaard TE. Isolation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Enzymatic Digestion in Combination with Mechanical Distortion to Increase Adipose Tissue-Derived Stem Cell Yield from Human Aspirated Fat. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2019;48(1):e68. doi:10.1002/cpsc.68.
 136. Li Z, Mu D, Liu C, Xin M, Fu S, Li S, Qi J, Wang Q, Luan J. The cell yields and biological characteristics of stromal/stem cells from lipoaspirate with different digestion loading ratio. *Cytotechnology.* January 2020:1-13. doi:10.1007/s10616-020-00369-9.
 137. Varghese J, Griffin M, Mosahebi A, Butler P. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):45. doi:10.1186/s13287-017-0483-8.
 138. Molitor E von. Tissue Engineering von Fettgewebe Adipogenese von mesenchymalen Stammzellen in unterschiedlichen Hydrogelsystemen. 2014. Bachelorthesis der Fakultät für Molekulare und Technische Medizin der Hochschule Furtwangen.
 139. Jongpaiboonkit L, King WJ, Murphy WL. Screening for 3D Environments That Support Human Mesenchymal Stem Cell Viability Using Hydrogel Arrays. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(2):343-353.
 140. Brandl FP, Seitz AK, Teßmar JKV, Blunk T, Göpferich AM. Enzymatically degradable poly(ethylene glycol) based hydrogels for adipose tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31(14):3957-3966. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.128.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Rainer H. Meffert möchte ich danken, dass er mir die Durchführung der Arbeit in der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie der Universität Würzburg ermöglicht hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk für die außerordentlich gute Betreuung, motivierende Unterstützung und das Vertrauen in meine Arbeit.

Bei Frau Dr. Miriam Wiesner, Christiane Höfner, Dr. Thomas Böck, Oliver Berberich und allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich ganz herzlich für die tolle Betreuung im Labor, ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Versuchsplanung und Versuchsdurchführung bedanken.

Mein Dank gilt auch allen Patienten, die sich bereit erklärten an dieser Studie teilzunehmen.

Außerdem bedanke ich mich ganz besonders bei meinen Eltern, meiner Schwester, meiner Omi, Stefan und Konrad, die mich in allen Lebenslagen unterstützen, für mich da sind und mir dies ermöglicht haben. Es ist unmöglich meine Dankbarkeit in Worte zu fassen.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Kneist S., Grimmer S., Harzendorf A., Udhardt A., Senf K., Borutta A.: Mundgesundheit von Patienten mit Frühkindlicher Karies. ZWR 117 (3):74-81(2008)

Bernuth S, Germer CT, Jakubietz MG, Schmidt K, Jakubietz RG: Brachioplastik nach massivem Gewichtsverlust. Chirurgische Praxis. 2019. 85(3):429-435.

Jakubietz RG, Erguen S, Bernuth S, Meffert RH, Gilbert F, Jakubietz M: An anatomical study on the Stener-type lesion of the radial collateral ligament of the metacarpophalangeal joint of the thumb. J Hand Surg Eur Vol. 2019 Nov 19:1753193419887344.

Jakubietz RG, Bernuth S, Schmidt K, Meffert RH, Jakubietz MG: The Fascia-Only Reverse Posterior Interosseous Artery Flap. J Hand Surg Am. 2019 Mar;44(3):249.e1-249.e5.