

**Optimierung der Proliferation und Differenzierung humaner Präadipozyten durch
den Einsatz von humanem Serum**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Sevinc Kocaarslan geb. Haydarlioglu

aus

Arnsberg

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Dr. univ. med. Prof. h.c. mult. Norbert Pallua

Frau Professorin
Dr. med. Benita Hermanns-Sachweh

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Mai 2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

1	Einleitung	1
1.1	Problematik der Behandlung von Weichgewebsdefekten.....	1
1.2	Fettgewebe und seine Bedeutung als Weichgewebsfüllmaterial	1
1.3	Gewebetechnologische Herstellung von Fettgewebe.....	3
1.4	Wachstum und Differenzierung menschlicher Fettgewebsvorläuferzellen	4
1.4.1	Regulation der adipogenen Differenzierung	6
1.4.2	Einfluss des serumhaltigen Mediums auf die Präadipozytenkultivierung	8
1.5	Fragestellung	9
2	Materialien	10
2.1	Technische Geräte	10
2.2	Enzyme, Lösungen und Zusätze	11
2.3	Kulturmedien.....	12
2.4	Testansätze	12
2.5	Sonstiges	13
3	Methoden	14
3.1	Definierung des optimalen Spendergewebes	14
3.1.1	Isolierung humaner Präadipozyten aus exzidiertem Fettgewebe und Liposuktionsmaterial.....	14
3.2	Herstellung des Kulturmediums aus plättchen-reduziertem humanem Plasma	16
3.3	In-vitro-Kultivierung humaner Präadipozyten durch Zusatz von plättchen-reduziertem humanem Serum	17
3.3.1	Mikroskopische Untersuchungsmethoden	19
3.3.2	Biochemische Untersuchungsmethoden	21
3.4	Statistik.....	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Ergebnisse zur Definierung des optimalen Spendergewebes	23
4.2	In-vitro-Ergebnisse zur Kultivierung humaner Präadipozyten in serumhaltigen Medium (humanes Serum versus FCS)	25
4.2.1	Einfluss der Fibronektinbeschichtung auf die Zelladhärenz und Differenzierung	26
4.2.2	Rolle des Kulturmediums und Serums in Bezug auf die Proliferation und Differenzierung humaner Präadipozyten	27
4.2.3	Proliferation und Differenzierung humaner Präadipozyten in Passage 130	30
4.2.4	Einfluss der Langzeitkultivierung auf die Proliferation und Differenzierung	31
5	Diskussion	34
5.1	Die Bedeutung des Spendergewebes für die Präadipozytenkultur	35
5.2	Vorteile der Verwendung von humanem Serum als Mediumzusatz.....	37

6	Zusammenfassung	41
7	Abbildungsverzeichnis	42
8	Literaturverzeichnis	44
9	Publikationen	57
10	Danksagung	59
11	Erklärung zur Datenaufbewahrung	60

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADD1	adipocyte determination and differentiation factor 1
bFGF	basic fibroblast growth factor
C/EBP	CCAT enhancer binding protein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CPD	Citrat, Phosphat, Dextrose
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
EGF	epidermal Growth Factor
FCS	Fetal calf serum
F12	Ham's F12
GPDH	Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase
HEPES	4-Hydroxyethylpiperazin-1-Ethansulfonsäure
hS	humanes Serum
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IGF	insulin-like growth factor
NAD	β -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	NAD in reduzierter Form
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
SREBP	sterol regulatory element binding protein
Tab.	Tabelle
TZD	Thiazolidindione

1 Einleitung

1.1 Problematik der Behandlung von Weichgewebsdefekten

Die Rekonstruktion von Weichgewebsdefekten spielt in der Plastischen Chirurgie eine wichtige Rolle. Das Weichgewebe dient zum einen der Körperformung und zum anderen als mechanischer Schutz für Muskeln, Sehnen und Knochen. Weichgewebsdefekte beeinträchtigen sowohl die Ästhetik als auch die Funktion des Körpers. Es gibt zahlreiche Patienten die unter den entstehenden Weichgewebsverlusten einer posttraumatischen Verletzung (z.B. tiefe Verbrennungswunden, tiefe Operationsnarben) oder einer Tumoroperation (z.B. bei Mammakarzinomen) leiden. Auch kongenitale Fehlbildungen wie z.B. das Poland-Syndrom (Fokin und Robiscsek 2002) und das Romberg-Syndrom (Finch und Dawe 2003) gehen mit Substanzdefekten einher, die einer Korrektur durch plastisch-chirurgische Verfahren bedürfen.

1.2 Fettgewebe und seine Bedeutung als Weichgewebsfüllmaterial

Viele Verfahren in der Plastischen Chirurgie können zur Korrektur von Substanzdefekten herangezogen werden. Eine Möglichkeit der Defektdeckung stellt die Lappenplastik dar, bei der Gewebsblöcke an den Ort des Substanzdefektes versetzt werden. Dieses Verfahren führt immer zu Hebedefekten am Spenderareal, zudem ist die Anzahl der verfügbaren Lappenplastiken limitiert. Eine weitere Behandlungsmöglichkeit von Weichgewebsdefekten besteht in der Benutzung von synthetischen Materialien (z.B. Silikon und Gore-Tex). Diese lösen meist Fremdkörperreaktionen aus und sind zudem sehr teuer. Bei Materialien biologischer Herkunft (z.B. Kollagen) dagegen kommt es nach einiger Zeit zur Schrumpfung des Implantats im Empfängerareal (Dzubow und Goldman 1998). Fettgewebe als Füllmaterial zu benutzen, wurde zum ersten Mal von Neuber in Betracht gezogen. Er transplantierte das vom Oberarm entnommene autogene Fettgewebe in einen narbigen Defekt im Gesicht. Neuber berichtete schon damals über Komplikationen wie z.B. Infektionen und Fettnekrosen und betonte, dass diese Komplikationen durch Verwendung kleinerer Fetttransplantate verringert werden könnten (Neuber, 1893). Seither wurde die Fettgewebstransplantation in der Plastischen Chirurgie und in anderen

chirurgischen Teildisziplinen eingesetzt (Langenskiöld et al. 1986; Pinski und Roenigk 1992; de Pedroza 2000; Rowshan et al. 2008). Die Transplantation von Fettgewebe war allerdings nicht immer erfolgreich. Viele berichteten über frühzeitige Nekrosen, Schrumpfungen und Fibrosierungen des Transplantats (Peer 1956; Rossatti 1960; van Akkerveeken et al. 1986). Auch über eine Hypertrophie der Fettimplantate wird in der Literatur berichtet (Miller und Popp 2002). Die wichtigste Hypothese über den Volumenverlust des transplantierten Fettgewebes postulierte Peer (Peer 1950). In der von ihm formulierten „cell survival theory“ betonte Peer, dass das Fettgewebe den freien Transfer nur übersteht, wenn die verpflanzten Fettzellverbände (die sich nach seinen Aussagen im Randbereich befinden) durch frühen Anschluss an die Blutzirkulation überleben. Abgestorbene Fettzellverbände werden nicht durch neue Adipozyten ersetzt. Das nekrotische Fettgewebe bewirkt eine chronische Fremdkörperreaktion mit Fibrosierung des Transplantats und Bildung degenerativer Ölzysten (Peer 1956; Rosatti 1960; Nguyen et al. 1990; von Heimburg et al. 1994). Peer bestätigte außerdem Neubers Aussagen, dass der freie Transfer mehrerer kleiner Fettfragmente besser sei als ein en block Transplantat. Dies bestätigten auch Smahel und Ellenbogen (Ellenbogen 1986; Smahel 1989), die den Vorteil kleinerer Fetttransplantate im frühen Gefäßanschluss und der guten nutritiven Versorgung durch Diffusion sahen. In den Siebziger Jahren bewirkte eine neue Technik der Fettgewebsentnahme, die Aspirationslipektomie, einen Aufschwung in der Fettgewebstransplantation (Fischer 1976). Nun war es möglich, durch Absaugen gewonnenes Fettgewebe in Weichgewebsdefekte einzubringen (Illouz 1986). Allerdings enttäuschte auch dieses Verfahren die Anwender, da entweder eine starke Resorption (Ersek 1991; Kononas et al. 1993; Eremia und Newton 2000) oder eine Verformung des transplantierten Fettgewebes beobachtet wurden (von Heimburg und Pallua 2001). Einige Chirurgen versuchten durch wiederholte Fettinjektionen die Ergebnisse zu verbessern (Schmeller und Meier-Vollrath 2003), andere wiederum setzten dem Aspirat vor der Transplantation verschiedene Substanzen wie z.B. Insulin und Steroidhormone zu (Silkiss und Baylis 1987; Bircoll und Novack 1987). Eppley et al. (Eppley und Sadove 1991; Eppley et al. 1992) berichten über erfolgreiche Ergebnisse durch Einbringen von basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) mittels Dextranperlen in das transplantierte Fettgewebe. Histologische Untersuchungen an den Transplantaten zeigten eine ausgedehnte Kollagenformierung und eine größere Einheitlichkeit bezüglich der Zellgröße der Adipozyten. Es bleibt allerdings offen, ob der Zusatz von

bFGF die Reparatur der durch Aspiration geschädigten Adipozyten bewirkt oder eine Differenzierung von Fettgewebsvorläuferzellen induziert hat. Coleman und Lewis machten die Aspirationstechnik für den großen Volumenverlust der Transplantate verantwortlich. Sie zeigten, dass durch Anwendung der richtigen Entnahmetechnik gute Langzeitergebnisse erzielt werden können (Coleman 1997; Lewis 1993). Laut Lewis und Sommer et al. hängt der erfolgreiche Ausgang eines Fetttransfers von folgenden Faktoren ab: Nadel bzw. Kanülendurchmesser, Anteile von Blutresten, die Verwendung von Tumesenzlösung, das Entnahmeverfahren (Spritze oder Absaugmaschine), der Waschvorgang, die Injektionsmethode und die Vaskularisation des Empfängerareals (Lewis 1993; Sommer et al. 2000). Coleman vermutete, dass die Aspirationslipektomie mittels Absaugmaschinen und feiner spitzer Kanülen die Fettzellen beschädigt und führte die Liposuktion mit einer selbst entworfenen Spritze durch, die mit einer stumpfen Nadel versehen war (Coleman 1997). Shiffman und Mirafati demonstrierten allerdings, dass weder feine Kanülen noch spitze Nadeln die Fettzellen während des Absaugens beschädigen, jedoch die Liposuktion mit einer Absaugmaschine und einem negativen Vakuumdruck von – 700 mmHg die Fettzellen schwer beschädigt (Shiffman und Mirafati 2001). Der freie Transfer von Liposuktionsgewebe gilt immer noch als der Goldstandard der Fettgewebstransplantationen. Trotz der Versuche vieler Gruppen, durch Modifikationen der Entnahme bzw. Injektionsverfahren die Ergebnisse zu verbessern, sind die Langzeitergebnisse transplanter Fettgewebe unbefriedigend.

1.3 Gewebetechnologische Herstellung von Fettgewebe

Einen neuen Lösungsansatz zur Behandlung von Gewebsdefekten könnte die Gewebezüchtung, das sog. Tissue Engineering bieten. Tissue Engineering bedeutet Züchtung von lebendem menschlichem Gewebe im Labor. Lebende, gesunde Zellen werden dem Körper entnommen, in spezialisierten Labors durch natürliche Teilungsprozesse vermehrt und anschließend dem Patienten wieder implantiert. Somit kommen komplett lebende Gewebeersatzmaterialien, bestehend aus patienteneigenen, potentiell Gewebe-bildenden Zellen und einer für die Zellen vitalen Gerüstsubstanz (Matrix) zum Einsatz. Das Tissue Engineering bietet viele Vorteile. Zum einen kann durch Verwendung autologer Zellen eine immunologische Reaktion und Infektübertragung vermieden werden, zum anderen ermöglicht die Vermehrung der Zellen ex vivo die Minimierung der Biopsiemenge und Verringerung des

Entnahmedefektes der Spenderstelle. Des Weiteren ermöglicht die Synthese von extrazellulärer Matrix des Gewebes eine feste Integration in den Defekt, dadurch wird das Risiko der Implantatlockerung verringert. Ausserdem ermöglicht die Verwendung präformierter Biomaterialien die ex-vivo-Gestaltung von dreidimensionalen Konstrukten zum Ersatz von komplexen Gewebedefekten. Die menschliche Haut ist das erste gewebe technologisch hergestellte Organ (Gallico et al. 1984). Auch biotechnologisch hergestelltes Knorpelgewebe ist derzeit kommerziell erhältlich (Oliveira et al. 2008). Die Forschung der gewebe technologischen Entwicklung von Fettgewebe befindet sich jedoch in den Anfängen. Es gibt nur einige wenige Forschungsgruppen, denen es bisher gelungen ist, ansatzweise ein solches Konstrukt zu entwickeln (Hemrich et al. 2008; Stillaert et al. 2006; von Heimburg et al. 2003, von Heimburg et al. 2001a; von Heimburg et al. 2001b).

1.4 Wachstum und Differenzierung menschlicher Fettgewebsvorläuferzellen

Für die gewebe technologische Herstellung von Fettgewebe ist es notwendig, undifferenzierte Zellen, die als Vorläufer von Fettzellen im Fettgewebe vorkommen, zu isolieren, diese ex vivo zu vermehren und auf vorgeformte Biomaterialien aufzutragen, die nach Implantation den Gewebsdefekt mit differenzierten Fettzellen ausfüllen.

Den Ursprung der Fettgewebsvorläuferzelle stellt die multipotente Stammzelle dar. Aus dieser können sich Adipozyten, Osteozyten, Myozyten und Chondrozyten entwickeln (siehe Abb. 1).

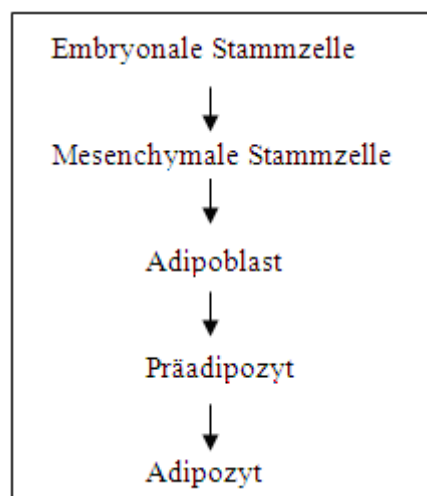


Abbildung 1: Adipozytenlinie nach Ailhaud et al. (G. Ailhaud et al. 1992)

Morphologisch wurden Fettgewebsvorläuferzellen als fibroblastenähnliche Zellen mit zentralem Kern und spindelförmigen Zytoplasmaausläufern beschrieben (Van et al. 1976; Björntorp et al. 1978). Diese Zellen enthalten noch keine Lipideinlagerungen.

Werden die Fettgewebsvorläuferzellen jedoch entsprechend stimuliert, reifen sie zu Fettzellen heran. Während der adipogenen Konversion verlieren die Präadipozyten ihre fibroblastenähnliche Morphologie. Die reife Fettzelle weist dann eine typische Siegelringform auf. Das Zytoplasma wird von einer konfluierenden Lipidvakuole ausgefüllt, wobei der Zellkern an den Rand verdrängt wird (siehe Abb. 2).



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Differenzierung von Präadipozyten zur reifen Fettzelle

Die ersten tierexperimentellen Versuche bezüglich des freien Transfers von unreifen Fettzellen wurden von Hausberger (Hausberger 1955) durchgeführt. Er beobachtete nach der Transplantation von unreifem Fettgewebe neugeborener Ratten eine beginnende Lipidspeicherung im Transplantat. Das aus dem Transplantat entstandene Fettgewebe besaß 83% des Volumens der nicht transplantierten Gegenseite.

Die Transplantation von Fettgewebsvorläuferzellen aus reifem Fettgewebe gelang 1982 Van et al. Er transplantierte die aus reifem Fettgewebe der Ratte isolierten und anschließend kultivierten Fettgewebsvorläuferzellen nach Markierung mit (3H)-Thymidin in dieselbe Ratte. Nach sechs Monaten konnte er am Empfängerbett den Zuwachs von Fettpolstern erkennen, die aus den transplantierten Vorläuferzellen entstanden waren (Van und Roncari 1982). Der erfolgreiche freie Transfer von unreifen Fettzellen lässt vermuten, dass Fettgewebsvorläuferzellen aufgrund eines reduzierten Stoffwechsels eine größere Ischämietoleranz besitzen und sich für eine Transplantation besser eignen als reife Fettzellen. Diese Vermutung konnte durch die Forschungsgruppe um von Heimbürg et al. (von Heimbürg et al. 2005) bestätigt werden.

1.4.1 Regulation der adipogenen Differenzierung

Die adipogene Differenzierung unterliegt dem Einfluss vieler Hormone und Wachstumsfaktoren. In vitro Studien an menschlichen Fettgewebsvorläuferzellen zeigten, dass die wichtigsten Induktoren der Fettzelldifferenzierung Insulin und Glukokortikoide sind. Hauner konnte in Studien an humanen Präadipozyten demonstrieren, dass die Fettgewebsvorläuferzellen in insulinfreiem Medium ihr fibroblastenähnliches Aussehen behalten und nicht differenzieren. Die alleinige Zugabe von Insulin führte zu einer 10 bis 20 % igen adipogenen Konversion der humanen Präadipozyten. Erst die Zugabe von Glukokortikoiden bewirkte eine höhere Differenzierungsrate (Hauner et al. 1987; Hauner et al. 1989). Für die Differenzierung von kultivierten Präadipozyten zu Adipozyten sind Dexamethason, Insulin und der Phosphodiesterase I-Inhibitor Isobutylmethylxanthin (IBMX) Bestandteil gängiger Differenzierungsmedien. IBMX führt über die Hemmung der Phosphodiesterase zur Zunahme des intrazellulären cAMP. Dexamethason ist für die Induktion des differenzierungsspezifischen und antiproliferativ wirkenden Transkriptionsfaktors C/EBP α erforderlich. Insulin stimuliert über Transmembranproteine wie den IGF-Rezeptor eine komplizierte intrazelluläre Kaskade, die den Transkriptionsfaktor PPAR γ aktiviert. Begünstigt wird dieser Mechanismus durch sogenannte PPAR γ -Liganden. Die bekanntesten synthetischen Verbindungen, die als Liganden von PPAR γ fungieren, sind verschiedene Thiazolidindione (TZD), die auch als Insulin-sensitizer bekannt sind. Die beiden essenziellen Transkriptionsfaktoren der adipogenen Differenzierung C/EBP α und PPAR γ werden in der frühen Phase der Differenzierung induziert. Diese Transkriptionsfaktoren bewirken unter anderem, dass Adipozyten spezifische Proteine herstellen, die sich bei Präadipozyten noch nicht nachweisen lassen, d.h. sie prägen den Phänotyp der ausgereiften Fettzellen (Rosen et al. 1999; Brun und Spiegelman 1997). Darüber hinaus beeinflussen sich diese Transkriptionsfaktoren auch gegenseitig.

Wird z.B. ADD-1/SREBP-1, ein weiterer für die Differenzierung wichtiger Transkriptionsfaktor aktiviert, führt das zu vermehrter Bildung von PPAR γ . Und damit letzterer voll wirksam werden kann, wird über Umwege auch gleich die Bildung von PPAR γ -Liganden mit angeregt (Kim et al. 1998).

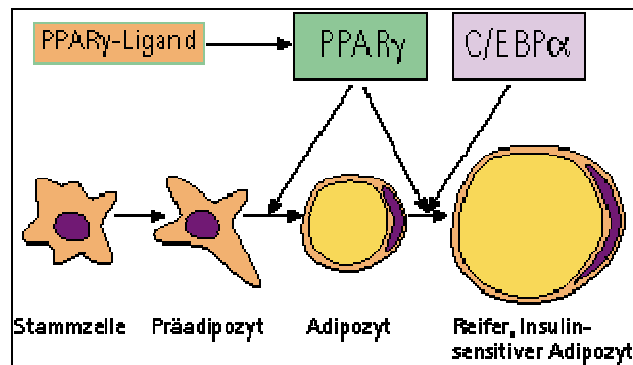


Abbildung 3: Adipogenese (vereinfachtes Schema): PPAR γ ist essentiell für die Initiierung des Differenzierungsprozesses von Adipozyten. Die Ausprägung des reifen Insulin-sensitiven Phänotyps von Fettzellen wird gemeinsam durch die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und C/EBP α induziert (mod. nach B. Lowell 1999).

Der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren und Cytokine, die im Serum enthalten sind, auf die menschliche Fettzellneubildung blieb lange Zeit unerforscht.

Petruschke (Petruschke 1994) demonstrierte als erster unter serumfreien Kulturbedingungen die Einwirkung verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Kultivierung humaner Präadipozyten. Es stellte sich heraus, dass bei Zusatz von Epidermal Growth Factor (EGF) eine bis zu achtfache Steigerung der Proliferationsrate erreicht werden kann, allerdings führte EGF zu einer starken Hemmung der Differenzierung humaner Präadipozyten. Aus der Literatur ist bekannt, dass Platelet derived growth factor (PDGF) einer der potentesten mitogenen Bestandteile im Serum ist (Ross et al. 1978). PDGF wird in Thrombozyten gespeichert und bei der Gerinnung freigesetzt. Der PDGF-Gehalt von plättchenarmem Plasma ist demzufolge als gering zu betrachten (Ross et al. 1974, Antoniades und Scher 1977). Die differenzierungshemmenden Wirkungen der Wachstumsfaktoren Platelet derived growth factor (PDGF) und Fibroblast growth factor (FGF) fallen, verglichen mit EGF, schwächer aus (Hauner et al. 1995). Diese Studien an humanen Fettgewebsvorläuferzellen zeigen, dass proliferationssteigernde Wachstumsfaktoren in der Regel eine differenzierungshemmende Wirkung haben.

Neben Wachstumsfaktoren haben auch Bestandteile der Extrazellulärmatrix einen Einfluss auf die Adipogenese, z.B. können Präadipozyten ohne aktive Synthese von Kollagen nicht zu reifen Adipozyten differenzieren (Ibrahimi et al. 1992). Fibronektin, als weiterer Bestandteil der Extrazellulärmatrix, ist verantwortlich für die Zelladhäsion und Interaktion der Zellen mit anderen Oberflächenglykanen.

1.4.2 Einfluss des serumhaltigen Mediums auf die Präadipozytenkultivierung

Die gewebe-technologische Herstellung eines dreidimensionalen Fettgewebskonstruktes erfordert nach der Isolierung eine optimale Proliferation und Differenzierung humaner Fettgewebsvorläuferzellen. Dies ist nur dann möglich, wenn die in Kultur geführten Zellen ausreichend mit Nährstoffen, proliferations- und differenzierungsfördernden Zusätzen versorgt werden. Der wichtigste Mediumzusatz in der Zellkultur ist, aufgrund seiner hohen Konzentration an Wachstumsfaktoren, das Serum. Das in der Zellkultur meist eingesetzte Serum ist das fötale Kälberserum (FCS). Allerdings zeigen in vitro Studien, dass eine lange Proliferationsdauer in FCS supplementierten Medien die Fähigkeit der adipogenen Konversion der Fettgewebsvorläuferzellen zu reifen Fettzellen irreversibel reduziert (Hauner 1991; Hauner et al. 1989; Hauner et al. 1998). Dieser Effekt ist am ehesten auf Serumbestandteile im fötalen Kälberserum zurückzuführen. Die meisten Studien untersuchen die Differenzierungskapazität von Fettgewebsvorläuferzellen direkt nach ihrer Isolierung aus dem Fettgewebe. Wenn man allerdings bedenkt, dass eine lange Kultivierungsdauer die Differenzierungsfähigkeit der Präadipozyten reduziert, muss man nach anderen Kultivierungsmöglichkeiten suchen, um eine starke Zellvermehrung zu ermöglichen ohne die Differenzierungskapazität einzuschränken. Ein gut etabliertes Kultivierungsprotokoll zur Untersuchung der Physiologie von Fettgewebsvorläuferzellen sieht für die Proliferation Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/Ham's F12 (1:1) plus 5% oder 10% FCS und für die Differenzierung serumfreies DMEM/F12 supplementiert mit Dexamethason, Insulin, Isobutylmethylxanthine und anderen differenzierungsfördernden Substanzen vor. Neben der differenzierungshemmenden Wirkung bei langer Kultivierungsdauer, ist ein weiterer Nachteil der Verwendung von FCS als Serumszusatz das potentielle Risiko einer Übertragung von Prionen (Gruber et al. 1996; Lupi 2002; Reichl et al. 2002).

Die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) gehört zu den durch Prionen übertragbaren neurodegenerativen Erkrankungen. Die ersten BSE-Fälle wurden 1986 in England beobachtet. Man führte die Infektion der Rinder auf die Verfütterung von Tierkörperprodukten aus an Scrapie erkrankten Schafen zurück (Prusiner 1991).

Nach derzeitigem Kenntnisstand kann eine Kontamination des Kälberserums mit Erregern von BSE nicht sicher ausgeschlossen werden. Somit besteht auch die Gefahr der Kontamination des gezüchteten Fettgewebes. Eine Möglichkeit diese potentielle Infektionsquelle zu umgehen wäre der Ersatz von fötalem Kälberserum durch humanes Serum. Bisher wurden Studien zu den Auswirkungen von humanem Serum auf die adipogene Konversion von 3T3-Präadipozyten veröffentlicht (Hauner und Löffler 1986). Es liegen bisher noch keine Studien vor, die den Einfluss von humanem Serum auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten humaner Präadipozyten untersucht haben. Ein großer Fortschritt in der Fettgewebstechnologie wäre erreicht, wenn humanes Serum als Mediumzusatz in der Zellkultur von Fettgewebsvorläuferzellen FCS ersetzen könnte.

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Aspekte des Tissue Engineering von Fettgewebe untersucht werden:

- Ermittlung des optimalen Spenderfettgewebes (Exzidat vs. Aspirat unter Berücksichtigung der Entnahmestelle) mit der höchsten Ausbeute an Präadipozyten.
- Bestimmung des Verlustes an stromalen Zellen nach 24 stündiger Lagerung.
- Einfluss von FCS und humanem Serum auf die Zellkultivierung und Differenzierung humaner Präadipozyten in vitro.
- Einfluss der Kulturmedien DMEM/F12 und OPTIMEM auf das Zellwachstum und die adipogene Konversion.
- Auswirkungen der Fibronektinbeschichtung auf die in vitro Proliferation und Differenzierung humaner Präadipozyten.

2 Materialien

2.1 Technische Geräte

- Begasungsbrutschrank (Heraeus)
- Laminar-Airflow (Flow Laboratories GmbH)
- Laborwaage (Sartorius)
- Laborfeinwaage (Sartorius basic)
- Phasenkontrastmikroskop (Telaval 31-Zeiss)
- Zählkammer (neubauer improved)
- Wasserschüttelbad (GFL 1092/1083)
- Schüttelgerät (Reax 2000 – Heidolph)
- Autoklav (Melag Autoklav 23)
- Zentrifugenröhrchen (10 ml, 50 ml konisch – Costar)
- Pipettierhilfe (Pipetboy-Tecnomara)
- Gewebekulturflaschen 25 ml (Greiner)
- Gewebekulturschalen 35mm (Falcon)
- Petrischalen 150mm (Falcon)
- Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml – Greiner)
- Eppendorf cups 1.5 ml (Sarstedt)
- Eppendor fzentrifuge (Biofuge A, Heraeus)
- Elisa-Reader mit HP-Printer (Dynex Technologies)
- Homogenisator (Potter S)
- Digitalkamera (D100, Nikon)
- Glaszylinder (Borosilikatglas – Braun)
- Teflonkolben (Braun)
- Serumfilter (Millex GV 22µm – Millipore)
- 250µm-Nylon Sieb (Verseidag Techfab GmbH)
- Pasteurpipetten (230mm – Brand)
- Cryofuge 8500 (Heraeus)

2.2 Enzyme, Lösungen und Zusätze

- Collagenase CLS Typ I 0.2% (Biochrom)
- Trypsin, 0.05% EDTA, 0.02% in PBS (Boehringer Mannheim GmbH)
- Trypanblau 0.5% in Aqua bidest. (Sigma)
- Fötale Kälberserum (Biochrom)
- Human Serum from Platelet Poor Plasma (Sigma)
- AB-male Serum (Sigma)
- Dexamethason (Sigma)
- Insulin (Roche)
- Transferrin (Sigma)
- Trijodthyronin (Sigma)
- Isobutylmethylxanthine (IBMX – Sigma)
- Penicillin (PAA Laboratories)
- Streptomycin (PAA Laboratories)
- Pioglitazon (Takeda Pharmaceuticals)
- Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM – Biochrom)
- OPTIMEM 1 serum reduced Medium mit Glutamax (Invitrogen)
- Fibronectin (BD Biosciences)
- Ham`s F12 (Biochrom)
- Medium 199 (Biochrom)
- PBS, Phosphat buffered saline (Biochrom)
- Coomassie-Blau (Merck)
- 2-Mercaptoethanol (Merck)
- Dihydroxyacetonphosphat (DHAP – Sigma)
- NADH (N-8129)
- Oil Red O (Merck)
- HEPES (Sigma)
- BSA (PAA Technologies)
- Biotin
- D-Panhotenat

2.3 Kulturmedien

Anheftmedium	M 199 + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
Wachstumsmedium A	DMEM/F12 (1:1) + 5% FCS (bzw. 5% humanes Serum) + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
Wachstumsmedium B	OPTIMEM + 5% FCS (bzw. 5% humanes Serum) + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
Differenzierungsmedium I (für die ersten 5 Tage)	DMEM/F12 (1:1) + 0.1 µg/ml Pioglitazon + 0.5 mM IBMX + 10 ⁻⁶ M Dexamethason + 66 nM Insulin + 1 nM Trijodthyronin + 10 µg/ml Transferrin + 100 U/ml Penicillin + 1 nM Trijodthyronin + 10 µg/ml Transferrin + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
Differenzierungsmedium II (für weitere 9 Tage)	DMEM/F12 (1:1) + 10 ⁻⁶ M Dexamethason + 66 nM Insulin + 1 nM Trijodthyronin + 10 µg/ml Transferrin + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin

2.4 Testansätze

Für die GPDH-Bestimmung

- Assay-Puffer: 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7.5
- Tram-Puffer : 1 M Tram, 25 mM EDTA
- 2-Mercaptoethanol-Lösung: 5 mM Mercaptoethanol
- DHAP-Lösung: 20 mM DHAP
- NADH-Lösung: 12 mM NADH

Für die Proteinbestimmung

- Coomassie Blau-Lösung: 0.001% Coomassie-Brilliantblau, 4.7% Ethanol, 8.5% Phosphorsäure auf einen Liter Aqua bidest. Verdünnen
- 0.3 M NaOH zur Zellaufschließung

2.5 Sonstiges

- Human PDGF-AB Immunoassay (R&D Systems)
- CPD-Beutel zum Abnehmen und Lagern von Humanblut (Baxter)
- Einwegspritzen (5 ml, 10 ml, 20 ml)
- Auswerteprogramm (Revelation)

3 Methoden

3.1 Definierung des optimalen Spendergewebes

Um eine hohe Ausbeute humaner Präadipozyten aus dem Fettgewebe zu erreichen, benötigt man ein gutes Spendergewebe. Es gibt zwei unterschiedliche chirurgische Entnahmemethoden des Fettgewebes. Die erste Methode erfolgt durch Exzision von zusammenhängenden Gewebstücken (z.B. nach Bauchdeckenplastiken). Die Fettabsaugung stellt die zweite Entnahmemethode dar. Hierbei werden viele kleine Fettfragmente über eine hohle Liposuktionskanüle durch Unterdruck in ein Gefäß gesogen. In der ersten Versuchsreihe sollte die Ausbeute humaner Präadipozyten pro Gramm Fettgewebe ermittelt werden. Verglichen wurde die Ausbeute an Präadipozyten zwischen frisch exzidiertem Fettgewebe und frisch durch Absaugung gewonnenem Fettgewebe (innerhalb von 60 Minuten nach Entnahme). Eine weitere Bestimmung der Präadipozytenausbeute erfolgte nach 24 Stunden Lagerung derselben Gewebeproben in DMEM/F12 bei 4°C.

3.1.1 Isolierung humaner Präadipozyten aus exzidiertem Fettgewebe und Liposuktionsmaterial

Die zur Isolierung humaner Präadipozyten verwendeten Fettgewebeproben (Liposuktionsmaterial n=10, Exzidat n= 10) stammten von 4 männlichen und 13 weiblichen gesunden Erwachsenen (Durchschnittsalter: 37 ± 9 Jahre, Body mass index (BMI): 25.2 ± 4.6 kg/m²), die sich in der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie der RWTH Aachen einer Elektivoperation unterzogen hatten (z.B. Abdominoplastik, Mammareduktionsplastik). Die Liposuktion erfolgte nach einer Methode von Sydney Coleman. Hierbei wird das subkutane Fettgewebe mit einem manuell erzeugten Unterdruck durch eine 10-cc- Spritze abgesaugt (Coleman, 1997). Unmittelbar nach Entnahme der Fettgewebeproben, wurden diese in sterilen Behältern ins Labor transportiert. Ein Teil des Fettgewebes wurde sofort präpariert, um die Präadipozyten zu isolieren. Der Rest wurde in einem mit DMEM/F12 aufgefüllten sterilen Behälter 24 Stunden bei 4°C gelagert.

Die Verarbeitung des Fettgewebes erfolgte nach einer Modifizierung der Verfahren von Rodbell (M. Rodbell 1964) und Björntorp (P. Björntorp et al. 1980).

Zunächst wurden die frischen Fettgewebeproben unter der Laminar-Airflow mehrfach mit 0,9% NaCl gespült, um sie von Blutresten zu befreien. Anschließend wurden aus den Fettproben bindegewebige Stränge und sichtbare Blutgefäße entfernt. Nach Abwiegen des Fettgewebes in einer vorgewogenen Kulturschale, wurde es bis zum Erhalt kleinerer Fettfragmente (2-5 mm) mit Schere und Pinzette zerkleinert (das Zerkleinern entfällt beim Liposuktionsmaterial). Das Feuchtgewicht der Fettgewebeproben betrug jeweils 10 gr.

Nach der Präparation wurden die Fettfragmente zur Auflösung restlicher bindegewebiger Strukturen in eine sterilfiltrierte Kollagenaselösung (0,2% (w/v) Kollagenase CLS Typ I, 1,5% (w/v) bovines Serumalbumin (BSA) gelöst in Kollagenasepuffer (100 mM HEPES, 120 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 50 mM Glucose, pH 7.4)) überführt und für 45 Minuten ins Bewegungsbad gelegt (Schüttelfrequenz 250/min, bei 37°C). Das Verhältnis zwischen Fettgewebe und Enzymlösung betrug jeweils 1:1. Das Abstoppen der Digestion erfolgte durch Zugabe von DMEM/F12 supplementiert mit 10% FCS (Verhältnis Enzymlösung zu Stopmedium 1:2). Das verdaute Fettgewebe wurde nun durch ein Filter mit 250µm gegeben, um Restbestandteile an Bindegewebssträngen aus der Fettlösung zu entfernen. Nach Filtration wurde die trübe Zellsuspension 7 Minuten lang bei 700 g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere weißliche Phase (reife Fettzellen und freigesetzte Fette) mittels Pasteurpipetten entfernt und verworfen. Das Pellet, bestehend aus Präadipozyten und Blutzellen, wurde in Anheftmedium (M199) resuspendiert, in Kulturflaschen (25 cm²) mit einer Dichte von 0.2 gr/cm² ausgesät und für 24 Stunden in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% Luft, H₂O gesättigt) gelegt. Die besiedelten Kulturflaschen wurden am folgenden Tag zweimal mit 0,9% NaCl gewaschen, um die restlichen Erythrozyten zu entfernen. Durch Trypsinierung wurden die angehefteten Präadipozyten von der Kulturplatte abgelöst und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Somit wurde die Ausbeute stromaler Zellen pro Gramm Fettgewebe bestimmt.

Das 24 Stunden im Medium gelagerte Fettgewebe wurde auf die gleiche Art und Weise präpariert und die Ausbeute der Präadipozyten pro Gramm Fettgewebe bestimmt.

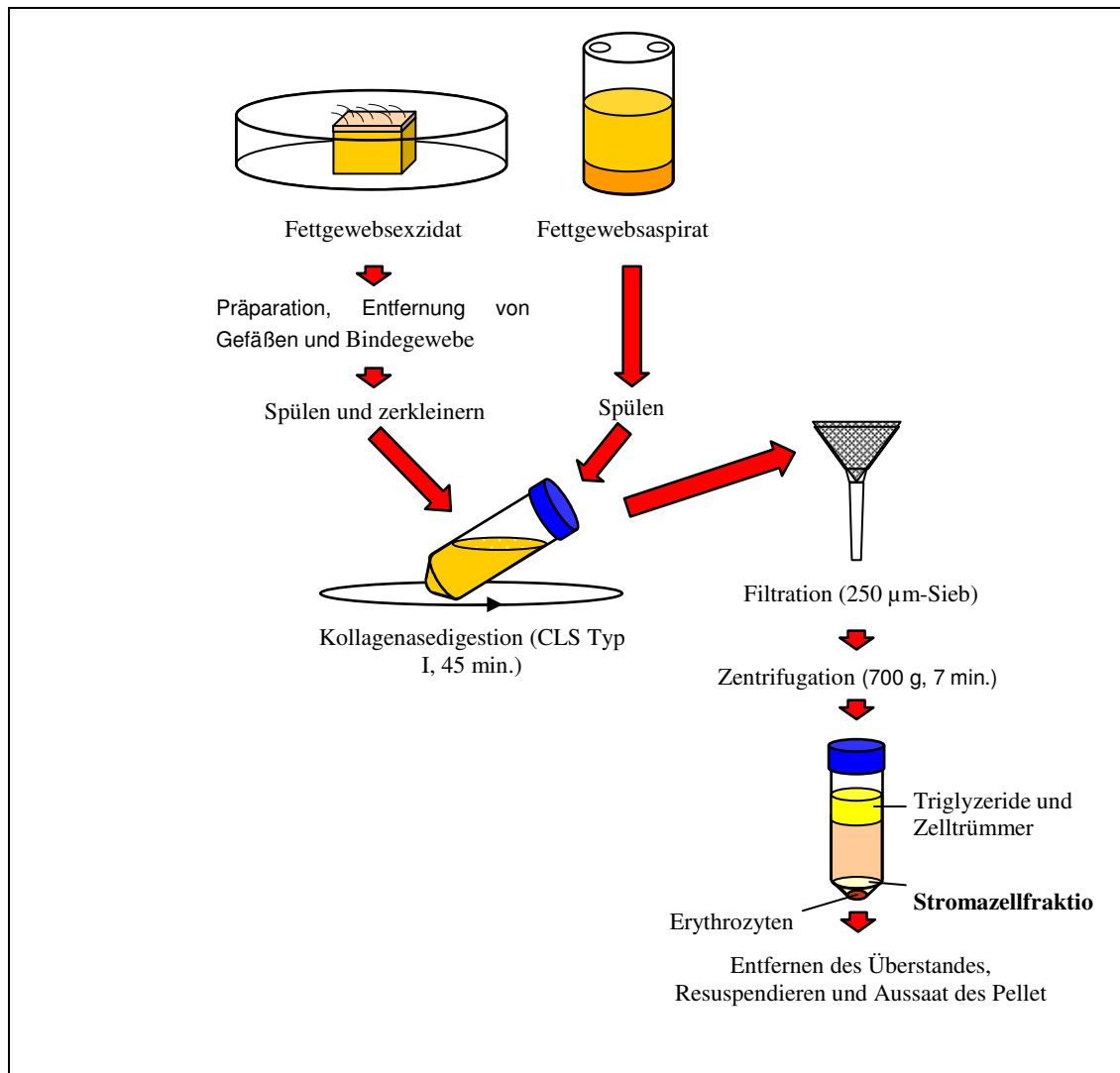


Abbildung 4: Schema der Isolierung der stromalen Fraktion aus humanem Fettgewebe. Links Fettgewebsexzidat, rechts Fettgewebsaspirat (nach Liposuktion)

3.2 Herstellung des Kulturmediums aus plättchen-reduziertem humanem Plasma

Zur Herstellung von humanem Serum als Mediumzusatz wurden freiwilligen Blutspendern in der Abteilung für Transfusionsmedizin der RWTH Aachen 450 ml Vollblut entnommen. Alle Blutspender hatten die Blutgruppe AB, um Komplementreaktionen zwischen den Präadipozyten und den Serumbestandteilen so gering wie möglich zu halten.

Nach der Blutentnahme wurden die Blutbeutel (mit CPD angereichert) für 2,5 Stunden auf Kühlplatten gelegt, um sie auf Raumtemperatur herunterzukühlen. Anschließend wurden die Beutel bei 4000 g für 30 Minuten zentrifugiert (Haereus cryofuge 8500), um die Erythrozyten vom Plasma zu trennen. Das Plasma wurde dann über einen Separator (Fresenius Biotrans) in einen neuen Beutel abgepresst. Das auf diese Weise hergestellte Plasma enthielt 5000-10000 Thrombozyten/ μ l und war somit plättchenarm. Die Menge des in den Thrombozyten enthaltenen Mitogens PDGF, welches die Differenzierung der Präadipozyten in der Zellkultur hemmt, wurde auf diese Weise gering gehalten. Das Plasma wurde anschließend im Wasserbad bei 56°C Temperatur 20 Minuten lang hitzeinaktiviert. Zur Gerinnung wurde das Plasma, nach Zusatz einer definierten Menge Medium (DMEM/F12 oder OPTIMEM), in einer Glasflasche im Brutschrank bei 37°C und 5% CO² über Nacht stehen lassen. Am nächsten Tag wurde das Plasma-Mediumgemisch bei 700g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein Serumfilter (Porengröße 22 μ m) gegeben. Nach Zugabe von Penicillin und Streptomycin wurde das serumhaltige Medium zur Zellkultivierung verwendet. Die Volumenreduktion, die bei der Umwandlung von Plasma zu Serum entsteht, wurde bei der Herstellung des serumhaltigen Mediums berücksichtigt. Es wurde soviel Plasma zum Medium hinzugefügt bis eine Serumendkonzentration von 5% im Medium erreicht wurde. In allen Serumproben waren die Gerinnungsfaktoren II, V, VIII, XIII und Fibrinogen unterhalb der Nachweisgrenze.

3.3 In-vitro-Kultivierung humaner Präadipozyten durch Zusatz von plättchen-reduziertem humanem Serum

Präadipozyten aus frisch lipektomiertem Subkutangewebe (Exzidat oder Aspirat) gesunder Erwachsener (Alter: 25-52), die sich einem elektiven Eingriff unterzogen, wurden isoliert (siehe 2.1.1). Um den Kollagenaseverdau zu stoppen, wurde dem Stopmedium(DMEM/F12 supplemtiert mit 15mmol l⁻¹ HEPES, 14mmol l⁻¹ NaHCO₃, 33 μ mol l⁻¹ biotin, 17Mmol l⁻¹ D-pantothenat) je nach Weiterkultivierung der Zellen entweder 10% humanes Serum oder 10% FCS hinzugefügt. Nach Filtration (250 μ m) und Zentrifugation (7 Minuten bei 700g) wurden die Zellen im serumfreien Anheftmedium (M199 mit 100 U ml⁻¹ Penicillin, 100 μ g ml⁻¹ Streptomycin) resuspendiert und in mit Fibronektin beschichteten und unbeschichteten Kulturflaschen (25cm²) mit einer Aussaatdichte von 20000 Zellen/cm² ausgesät. Zur

Fibronectinbeschichtung wurden zuvor die Kulturflaschen mit 125µl der Fibronectinlösung (0,2mg in 1ml Aqua bidest) beschichtet. Anschließend wurde die Fibronectinlösung wieder abgesaugt und die Kulturflaschen zur Trocknung für eine Stunde unter der Laminar-Airflow stehen lassen. Die besiedelten Kulturflaschen wurden in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% Luft, H₂O gesättigt) gelegt. Am nächsten Tag wurde das Anheftmedium (M199) abgesaugt. Die Zellen wurden vorsichtig mit NaCl² gewaschen, um restliche Erythrozyten zu entfernen. Anschließend wurden die Kulturflaschen mit dem Wachstumsmedium DMEM/F12 oder OPTIMEM (angereichert mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin), supplementiert mit 5% FCS, 5% humanem Serum und serumfrei, beschichtet. Die Proliferation und Differenzierung der Präadipozyten wurden folgendermaßen durchgeführt: Die ausgesäten Präadipozyten wurden bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium (DMEM/F12 oder OPTIMEM supplementiert mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Dieses Wachstumsmedium enthielt entweder 5% fötales Kälberserum (FCS) oder 5% humanes Serum (hS) oder gar kein Serum. Das Wachstumsmedium wurde bis zur Konfluenz der Präadipozyten jeden dritten Tag erneuert. Die adipogene Konversion wurde für 14 Tage durch Austausch des Wachstumsmediums gegen das Differenzierungsmedium induziert. Das Differenzierungsmedium enthielt DMEM/F12 oder OPTIMEM ohne Serumzusatz, supplementiert mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 66 nM Insulin, 100 nM Dexamethason, 0,5 mM IBMX, 0,1 µg/ml Pioglitazon, 1nM Trijod-L-Thyronin und 10 µg/ml humanem Transferrin. Die Differenzierung wurde für fünf Tage in diesem Medium induziert, anschließend wurden die Präadipozyten im gleichen Differenzierungsmedium, jedoch ohne Zusatz von IBMX und Pioglitazon, für weitere neun Tage differenziert.

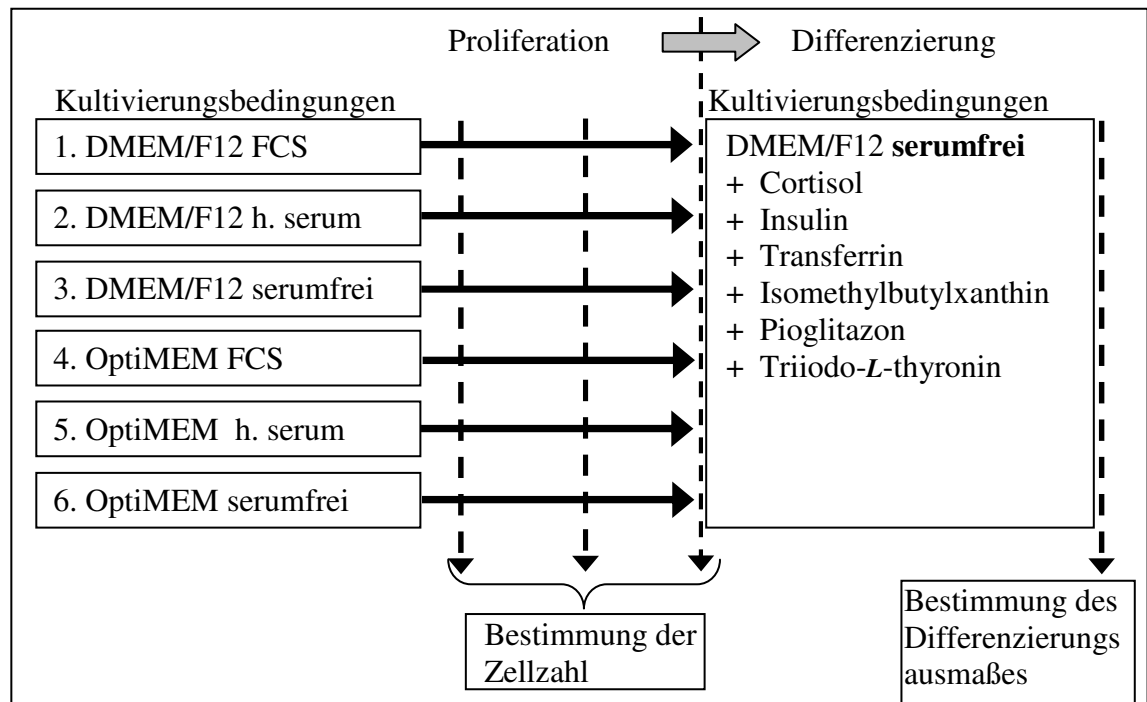


Abbildung 5: Kultivierungsschema der isolierten Präadipozyten

3.3.1 Mikroskopische Untersuchungsmethoden

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche mikroskopischen Arbeiten mit einem Phasenkontrastmikroskop (Telaval 31-Zeiss) durchgeführt und die Beobachtungen mit einer angeschlossenen Photoeinrichtung (Digitalkamera D100, Nikon) dokumentiert.

Die morphologischen Kriterien für die Differenzierung waren zum einen der Anstieg der lipidgefüllten Zellen und zum anderen die äußere Erscheinungsform der differenzierten (runde Form) Zellen im Vergleich zu den undifferenzierten (lange, schlanke Ausläufer) Zellen.

3.3.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl während der Proliferation und zur Ermittlung der differenzierten Zellen gegenüber undifferenzierten Zellen wurden die Zellen unter dem Mikroskop bei einer 100 fachen Vergrößerung ausgezählt. Hierbei wurden die Zellen in sechs zufällig eingestellten Gesichtsfeldern ausgezählt und daraus die Gesamtzellzahl pro Kulturflasche (Gesamtfläche 25 cm²) berechnet. Diese Methode war besonders für die Bestimmung der differenzierten Zellen im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen geeignet. Dabei wurden lipidgefüllte, differenzierte Zellen und

undifferenzierte Zellen pro Gesichtsfeld (6 Gesichtsfelder/Kulturflasche) mikroskopisch ausgezählt und anschließend der prozentuale Anteil der differenzierten Zellen an der Gesamtzellzahl berechnet. Als weiteres Verfahren zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zählung in der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Zählkammer besteht aus acht großen Quadraten mit definierter Fläche und Volumen. Nach Ablösen der Zellen mittels Trypsin/EDTA (0,05/0,02 %), wurde die Zählkammer mit einem Aliquot (50µl) gefüllt. Nach Auszählen der jeweils vier großen Quadrate wurde die Zellkonzentration pro Milliliter und die Gesamtzellzahl der Suspension errechnet. Für die Bestimmung der Zelldichte im Kulturgefäß wurde auf Zellen/cm² zurückgerechnet. Mit dieser Methode wurden in den Versuchen die Zahl der Stromazellen pro Gramm entnommenen Fettgewebes (Exzidat versus Aspirat) und die Zellzahl der subkonfluenten Zellen in den Kulturflaschen (Passagenzählung) bestimmt.

3.3.1.2 Trypanblaufärbung

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion leicht an Proteine bindet. Während bei vitalen Zellen der Farbstoff die Zellwand nicht durchdringen kann, gelangt Trypanblau bei toten Zellen ungehindert ins Zytoplasma. Diese Zellen stellen sich dann als durchgängig blau angefärbt dar. Die Trypanblaufärbung wurde zur Vitalitätsprüfung der stromalen Zellen nach ihrer Isolierung aus menschlichen Fettgewebeproben angewandt. Der Zellsuspension wurde ein Aliquot (50µl) entnommen und mit Trypanblau 1:1 vermischt. Nach 2-5 Minuten wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl der vitalen Zellen im Verhältnis zu den toten Zellen (blau gefärbt) bestimmt.

3.3.1.3 Red Oil O Färbung

Bei dieser Färbemethode werden die Lipidvakuolen in der Zelle rot angefärbt. Der Färbemechanismus beruht auf besserer Löslichkeit des Fettfarbstoffes in den Lipiden des Gewebes gegenüber dem Lösungsmittel, in dem es angeboten wird.

Anschließend kann der Anteil lipidhaltiger Zellen bestimmt werden. 0,5g Oil-Red-O-Farbstoff wurden in 100 ml 99%igem Isopropanol gelöst. 6ml dieser Lösung wurden mit 4 ml Aqua bidest. verdünnt und nach 24 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur filtriert. Die Zellen wurden nach Waschen mit PBS²- in 10%igem Formaldehyd für 5

Stunden fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit der Färbelösung für zwei Stunden angefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen erneut mit PBS²- gewaschen und in 10%iges Formaldehyd überführt. Der Anteil lipidhaltiger Zellen konnte durch mikroskopisches Auszählen ermittelt werden.

3.3.2 Biochemische Untersuchungsmethoden

3.3.2.1 Bestimmung der Glycerin-3-Phosphat- Dehydrogenase

Die Bestimmung des Anteils der differenzierten Präadipozyten erfolgte durch Messung des Enzyms Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, welches in lipidgefüllten Zellen vorkommt. GPDH kommt als Enzym im Fettmetabolismus vor und wird als ein wichtiger Marker in der Fettzelldifferenzierung exprimiert (Rosen und Spiegelman 2000). Unter Verbrauch von NADH katalysiert das Enzym die reversible Reduktion des Dihydroacetonphosphats zum Glycerin-3-Phosphat. Die GPDH-Aktivität korreliert dabei mit der Anzahl lipidgefüllter Zellen. Die Messung der Enzymaktivität (Pairault und Green 1979) wurde am 14.Tag nach Differenzierungsbeginn durchgeführt. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen zweimal mit kalter PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einem definierten Volumen eines Assay-Puffers (600µl/Kulturgefäß) mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes abgekratzt und in ein gekühltes Eppendorf-Cup (1,5ml) überführt. Die Zellen wurden mit einem Homogenisator (Potter S) für 10x 3 Sekunden (1000 U/min) homogenisiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine Zentrifugation der Lysate bei 13.500 U/min. Der Überstand wurde zur Messung der GPDH-Aktivität verwendet. Der Testansatz enthielt 100µl Tram-Puffer, 100µl Assay-Puffer, 20µl 2-Mercaptoethanol, 20µl NADH-Lösung. Es wurden 100µl Zellhomogenat zugegeben und mit 620µl Aqua bidest verdünnt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20µl Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gestartet. Die photometrische Extinktionsmessung wurde bei 340nm durchgeführt. Aus diesen Daten wurden mittels eines integrierten Auswerteprogramms (Revelation) die Enzymaktivitäten in mU/ml errechnet. In Bezug auf den Proteingehalt wurde die spezifische Enzymaktivität in mU/mg angegeben.

3.3.2.2 Proteinbestimmung

Die Messung des Proteingehaltes wurde nach einer Modifikation der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit kalter PBS-Lösung gewaschen. Nach Abkratzen der Zellen in einem definierten Volumen PBS-Lösung (600µl/Kulturgefäß) wurde zur Lyse die gleiche Menge an 0,3 M NaOH hinzugefügt. In 1,5 ml Eppendorf-Cups wurde die Zellsuspension 5 Minuten lang mit wiederholtem Einsatz des Vortex inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Der Testansatz bestand aus 900µl Commassie-Blau-Lösung (0,001% Commassie-Brillantblau, 4,7% Ethanol, 8,5% Phosphorsäure auf 1 Liter verdünnt) und 100µl Proteinlösung. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Extinktion mit einem Photometer bei 595 nm bestimmt. Die Proteinmenge in mg/ml wurde aus den gemessenen Extinktionen und der Standardkurve mittels eines integrierten Auswerteprogramms errechnet.

3.4 Statistik

Aus den einzelnen Messdaten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Zur Analyse der Mittelwerte auf Signifikanzunterschiede für die Daten aus der Versuchsreihe zur Ermittlung des optimalen Spenderfettgewebes (Exzidat vs. Aspirat) fand der One way RM Anova Anwendung. Unterschiede von $p < 0.05$ wurden als signifikant betrachtet. Für alle weiteren Versuchsreihen wurde der Student t-Test als Signifikanztest verwendet. Für signifikante Unterschiede wurde ein p-Wert von < 0.05 und für hochsignifikante Unterschiede ein p-Wert von < 0.01 gewählt.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse zur Definierung des optimalen Spendergewebes

Prädipozyten wurden aus Fettgewebsexzidaten oder aus Liposuktionsmaterial aus dem Subkutangewebe von Patienten isoliert, die sich einem elektiven Eingriff in der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie unterzogen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Herkunft des für die Prädipozytenisolierung verwendeten Fettgewebes

Entnahmestellen des Fettgewebes	Anzahl der Patienten	
	Exzidat	Aspirat
Abdomen	5	4
Brust	4	4
Gesäß	1	2

Die isolierten Prädipozyten wurden für 24 Stunden kultiviert, anschließend wurden die angehefteten Zellen mittels Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe unter Methoden 3.1.1). Die Auszählung ergab eine Zellausbeute zwischen 80000 und 350000 Prädipozyten pro ein Gramm frischem Fettgewebe. Nach 24 stündiger Lagerung der Fettgewebeproben lag die Anzahl der angehefteten stromalen Zellen pro 1 Gramm Fettgewebe zwischen 50000 und 350000. Insgesamt war die Ausbeute an Prädipozyten, die aus dem Liposuktionsmaterial isoliert wurden (innerhalb von 60 Minuten nach Entnahme und nach 24 stündiger Lagerung), höher als die Anzahl der angehefteten Prädipozyten aus dem Fettgewebsexzidat. Der Unterschied war vor allem nach 24 stündiger Lagerung der Fettgewebeproben signifikant (siehe Abbildung 6). Die 24 stündige Lagerung führte sowohl beim exzidierten als auch beim aspirierten Fettgewebe zu einem Verlust von Prädipozyten. Beim Fettgewebsexzidat war der Verlust von Prädipozyten nach 24 Stunden Lagerung hochsignifikant. Im Vergleich dazu war die Zellausbeute beim Liposuktionsmaterial nach 24 Stunden Lagerung wenig verringert (siehe Abbildung 6). Bezüglich der unterschiedlichen Entnahmestellen, kann man sagen, dass die höchste Ausbeute stromaler Zellen aus dem frischen Liposuktionsgewebe vom Abdomen

gewonnen wurde. Die niedrigste Zellausbeute wurde beim exzidierten und 24 Stunden gelagerten Fettgewebe aus dem Abdomen beobachtet. Der Unterschied bezüglich der Zellausbeute zwischen Liposuktionsgewebe und Exzidat wird vor allem beim Fettgewebe aus dem Abdomen deutlich. Der Zellverlust nach 24 stündiger Lagerung ist beim exzidiertem Fettgewebe aus der Brust signifikant ($p < 0.05$).

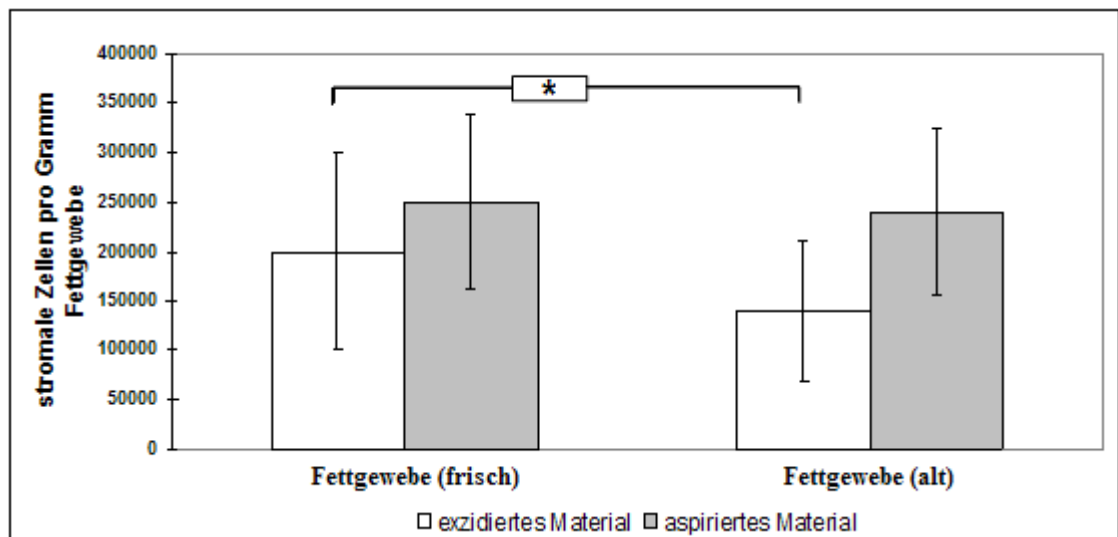


Abbildung 6: Präadipozyten wurden aus Fettgewebsexzidaten und Liposuktionsmaterial isoliert. Die Präadipozytenisolierung erfolgte entweder innerhalb von 60 Minuten nach Fettgewebsentnahme (frisch) oder nach 24 Stunden Lagerung (alt) der Fettgewebssprobe in DMEM/F12 (1:1) *, $p < 0.05$

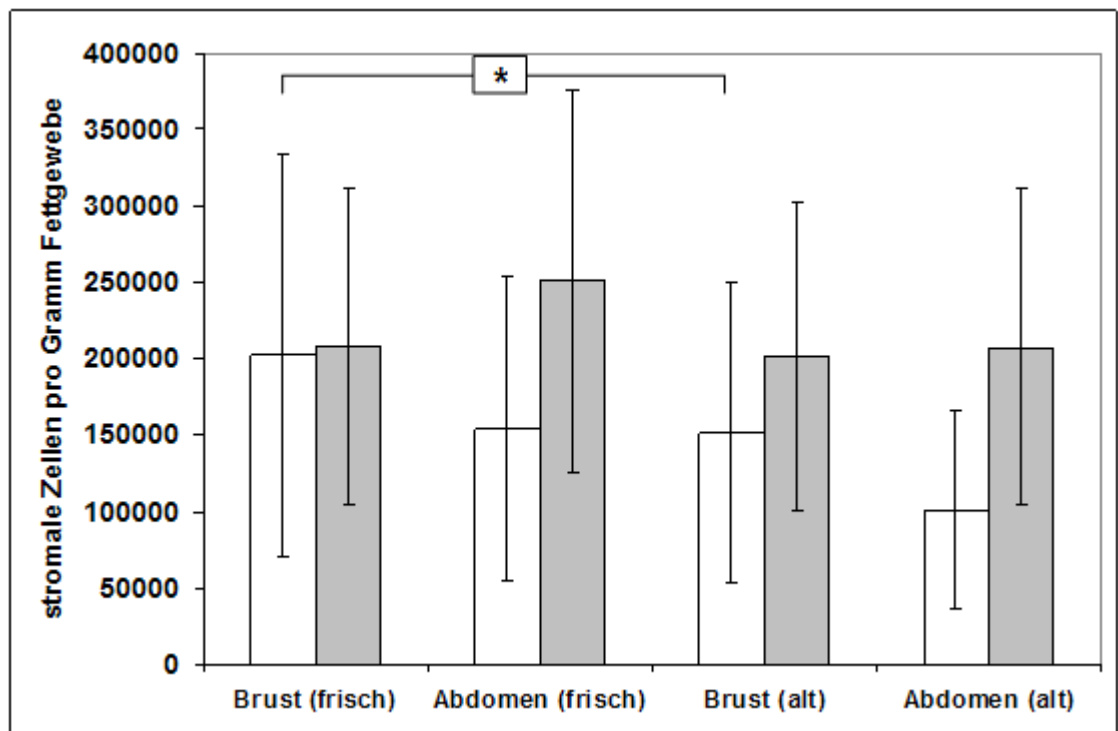


Abbildung 7: Vergleich der stromalen Zellen pro Gramm Fettgewebe bezüglich der Entnahmestellen Brust und Abdomen *, $p < 0.05$

4.2 In-vitro-Ergebnisse zur Kultivierung humaner Präadipozyten in serumhaltigen Medium (humanes Serum versus FCS)

Um die Kultivierung und Differenzierung humaner Präadipozyten zu optimieren, wurden unterschiedliche Kulturbedingungen miteinander verglichen (siehe Abbildung 3, Methoden). Dazu wurden Präadipozyten aus subkutanen Fettgewebeproben isoliert und Primärkulturen angelegt (siehe Methoden). Die Vitalitätsprüfung der isolierten Zellen mittels Trypanblaufärbung ergab, dass der Anteil vitaler Zellen regelmäßig über 90% lag. Die frisch isolierten Zellen wurden zunächst im serumfreien Anheftmedium (M 199 supplementiert mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin), mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm², in Kulturflaschen ausgesät. In Vorversuchen erwies sich das serumfreie Anheftmedium als die optimale Bedingung für die Adhäsion der stromalen Zellen. Nach einer Inokulationszeit von 20-24 Stunden wurden die adhärennten Zellen vorsichtig mit NaCl₂ gewaschen, um Zelldetritus und Blutzellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in die jeweiligen Kulturmedien überführt. Das Kulturmedium für den Proliferationszeitraum bestand entweder aus DMEM/F12 (1:1) oder OPTIMEM. Diese Medien enthielten als Serumzusatz 5% fötales Kälberserum (FCS) oder 5% humanes Serum (hS) oder gar keinen Serumzusatz. Während der Proliferationsphase besaßen die Präadipozyten eine sternförmige Form mit einem zentrierten Kern (siehe Abbildung 8).

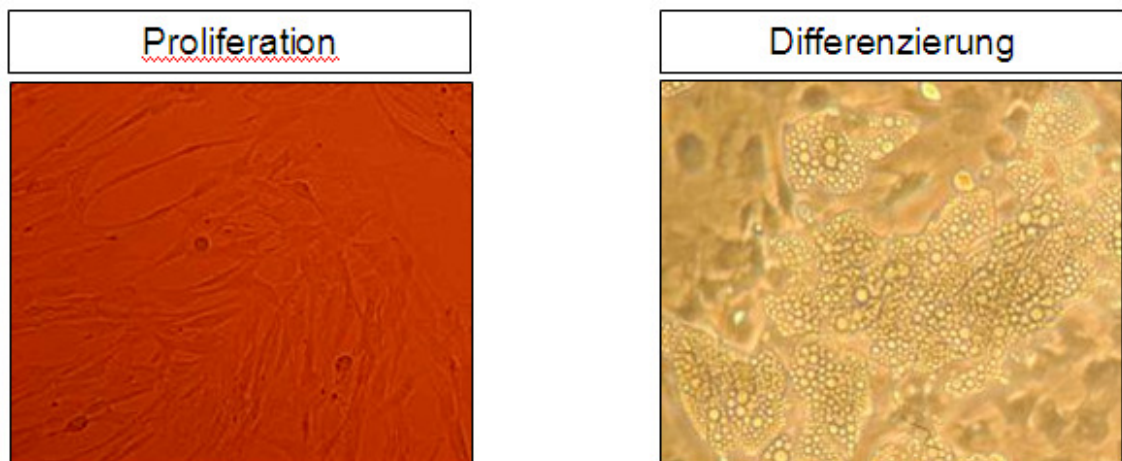


Abbildung 8: (links) Charakteristisch für die Proliferationsphase sind die langen Zellausläufer und der zentrierte Zellkern (100 fache Vergrößerung). (rechts) lipidgefüllte, abgerundete Präadipozyten nach 14 Tagen Differenzierung (100 fache Vergrößerung)

Nach Erreichung der Konfluenz wurden die Zellen ins Differenzierungsmedium I überführt. Nach einer 5-tägigen Inkubationszeit, wurden die Präadipozyten für weitere

neun Tage im Differenzierungsmedium II kultiviert, welches nicht mit IBMX und Pioglitazon angereichert war. In diesem Zeitraum verloren die Präadipozyten allmählich ihre sternförmige Struktur und nahmen eine runde Form an. Das Cytoplasma der differenzierten Zellen füllte sich mit Lipidvakuolen (siehe Abbildung 8). Nach 14 Tagen Differenzierung erfolgte die photometrische Bestimmung der GPDH-Aktivität bezogen auf die Proteinmenge. Während der Proliferations- und Differenzierungsphase erfolgten in regelmäßigen Abständen Zellzählungen (Gesichtsfeldmethode oder mit der Neubauer-Zählkammer)

4.2.1 Einfluss der Fibronectinbeschichtung auf die Zelladhärenz und Differenzierung

Um den Einfluss der Fibronectinbeschichtung auf die Zellzahl der adhärenenten Zellen und die Differenzierung humaner Präadipozyten zu bestimmen, wurden die zu beimpfenden Kulturflaschen mit Fibronectin beschichtet (siehe Methoden). Für diesen Versuch stammten die Präadipozyten aus Fettgewebeproben von sieben gesunden Frauen (Alter zwischen 35 und 51 Jahren). Das humane Serum als Mediumzusatz stammte von fünf gesunden Blutspendern (Alter: 25 – 55 Jahre). Jedes dieser Serumproben wurde als Mediumzusatz bei allen Fettgewebeproben getestet. Nach Aussaat der Präadipozyten (im serumfreien Anheftmedium) in Fibronectinbeschichtete und unbeschichtete Kulturflaschen wurde die Zellzahl der adhärenenten Zellen einen Tag nach der Inokulation ermittelt. Es zeigte sich hierbei, dass die Fibronectinbeschichtung die Anzahl der adhärenenten Zellen signifikant erhöht ($+32.6\% \pm 11.8\%$ verglichen mit den unbeschichteten Kulturflaschen). Anschließend wurden die Präadipozyten in verschiedenen Mediumbedingungen (mit verschiedenen Serumzusätzen) bis zur Konfluenz kultiviert. 14 Tage nach Differenzierungsbeginn wurde die GPDH-Aktivität ermittelt, um den Einfluss der Fibronectinbeschichtung auf die Differenzierung der Präadipozyten zu quantifizieren.

Das Ergebnis der GPDH-Messung zeigte eine signifikante Verbesserung der Differenzierung humaner Präadipozyten in allen Kulturbedingungen (siehe Abbildung 9).

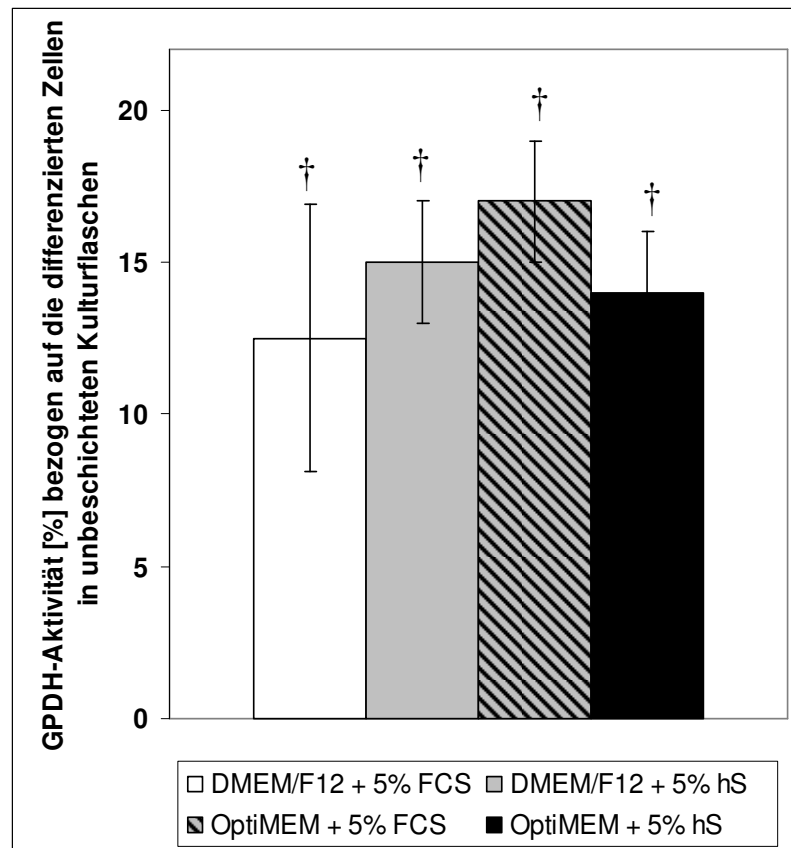


Abbildung 9: GPDH-Aktivität 14 Tage nach Differenzierungsbeginn in verschiedenen Kulturbedingungen. †, $p < 0.001$ im Vergleich zu der Null-Linie (GPDH-Aktivität der differenzierten Zellen desselben Spenders und der gleichen Kulturbedingung ohne Fibronectinbeschichtung)

4.2.2 Rolle des Kulturmediums und Serums in Bezug auf die Proliferation und Differenzierung humaner Präadipozyten

In dieser Versuchreihe wurden Präadipozyten aus den Fettgewebsproben von sieben Frauen im Alter von 25 bis 52 Jahren isoliert. Die aus jeder einzelnen Fettgewebsprobe isolierten Präadipozyten wurden im Medium, welches mit dem Serum zweier Probanden (Alter: 27 und 28 Jahre) supplementiert wurde, kultiviert. Jede Serumprobe wurde individuell an den stromalen Zellen der sieben Fettgewebsproben getestet. Als Kulturmedien wurden DMEM/F12 und OPTIMEM eingesetzt. Die isolierten Fettgewebsvorläuferzellen wurden acht Tage lang in unterschiedlichen Kulturbedingungen bis zur Präkonfluenz kultiviert (siehe Abbildung 5, Methoden) und

anschließend unter dem Mikroskop gezählt. Verglichen mit der Standard-Kulturbedingung DMEM/F12 + 5% FCS, die gleich 100% gesetzt wurde, war die Anzahl der Präadipozyten im serumfreien Medium um 40-43% signifikant erniedrigt. Dabei spielte es keine Rolle, ob DMEM/F12 oder OPTIMEM als Medium gewählt wurde (siehe Abbildung 10). Die Bedingungen OPTIMEM plus FCS und DMEM/F12 plus humanem Serum zeigten im Vergleich zur Standardbedingung DMEM/F12 + FCS eine Zellzahl von $85 \pm 13\%$ und $88 \pm 19\%$. Diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

Im Vergleich dazu kam es bei der Bedingung OPTIMEM plus humanes Serum zu einem hochsignifikanten Abfall in der Zellzahl auf $76 \pm 8\%$ (siehe Abbildung 10).

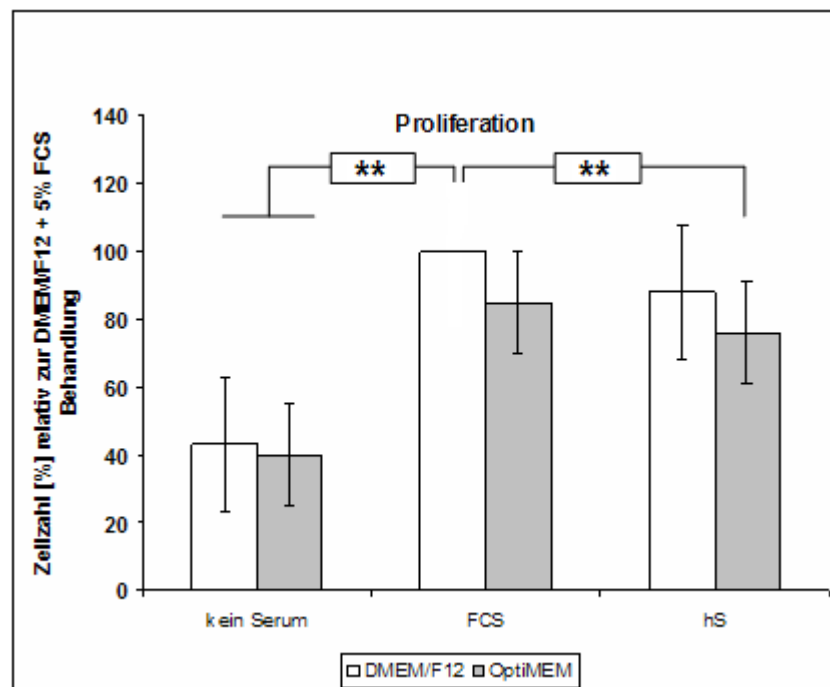


Abbildung 10: Präadipozyten wurden acht Tage in unterschiedlichen Kulturbedingungen kultiviert und unter dem Mikroskop ausgezählt.**, $p < 0.01$ bezogen auf die Standardmethode DMEM/F12 + 5% FCS

Die Präadipozyten wurden bis zur Konfluenz in Passage 0 in den jeweiligen Kulturbedingungen geführt. Die adipogene Konversion wurde durch Überführen der Zellen in serumfreies Differenzierungsmedium induziert (siehe Material und Methoden). Nach 14 Tagen wurde der Ausmaß der Differenzierung mittels Zellzählung (differenzierte Zellen versus undifferenzierte Zellen) und GPDH-Messung ermittelt.

Die Ergebnisse zur Differenzierung ergaben, dass die Standardbedingung (DMEM/F12 plus FCS während der Proliferation) die schwächste Differenzierung ($39\% \pm 13\%$ differenzierte Zellen) von allen Kulturbedingungen hatte (siehe Abbildung 11). Im Vergleich dazu zeigten die Präadipozyten, die in der Proliferationsphase in serumfreiem Medium kultiviert wurden, eine hohe Differenzierungskapazität, besonders wenn das Kulturmedium vorher aus OPTIMEM bestand ($82\% \pm 11\%$ differenzierte Zellen, $54\% \pm 16\%$ differenzierte Zellen in DMEM/F12). Alle anderen Kulturbedingungen (OPTIMEM + FCS: $67\% \pm 19\%$, DMEM/F12 + hS: $54\% \pm 14\%$, OPTIMEM + hS: $58\% \pm 16\%$) zeigten im Vergleich zu der Standardbedingung DMEM/F12 + FCS signifikant höhere Zahlen an differenzierten Zellen (siehe Abbildung 11).

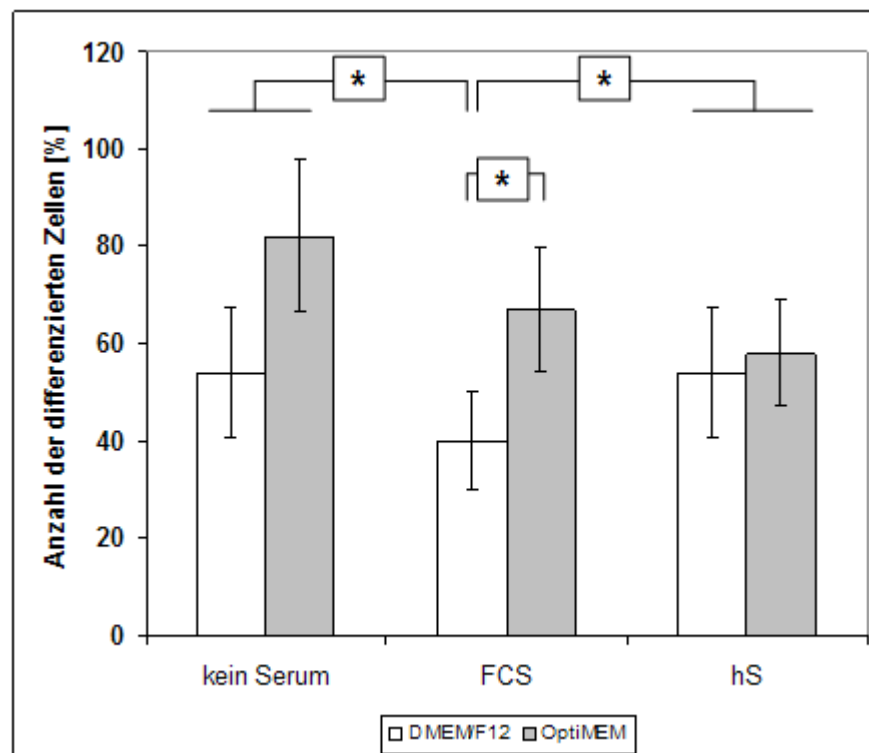


Abbildung 11: Anzahl der differenzierten Zellen nach 14 Tagen Differenzierung im serumfreien Differenzierungsmedium. Die Bezeichnungen „serumfrei“, „FCS“, und „hS“ beziehen sich auf die Kultivierungsbedingungen in der Proliferationsphase. *, $p < 0.05$ verglichen mit der Standardmethode DMEM/F12 + 5% FCS

4.2.3 Proliferation und Differenzierung humaner Präadipozyten in Passage 1

Für diesen Versuch wurden stromale Zellen aus dem Subkutangewebe einer 35-jährigen gesunden Frau isoliert. Die für die Kultivierung verwendeten Serumproben stammten von 20 Blutspendern im Alter von 21 bis 63 Jahren. Die Präadipozyten wurden mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in mit Fibronektin beschichtete Kulturflaschen ausgesät. Als Kulturmedium diente DMEM/F12 supplementiert mit FCS oder humanem Serum. Jede der 20 Serumproben wurde auf ihren Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der stromalen Zellen des Spendergewebes untersucht. Die Zellauszählungen am 3. und 8. Proliferationstag ergaben einen Anstieg der Zellzahl von 40.000 Zellen/cm² am 3. Proliferationstag bis zu 70.000-80.000 Zellen/cm² am 8. Proliferationstag. In Bezug auf die Zellzahl, zwischen den mit FCS- und humanem Serum kultivierten Zellen, gab es keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 12).

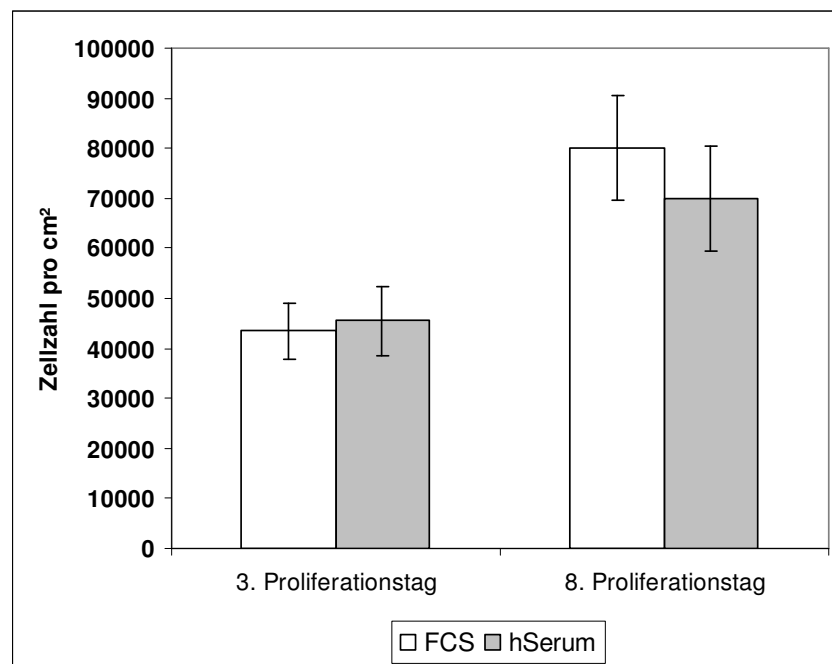


Abbildung 12: Präadipozyten wurden in DMEM/F12 supplementiert mit FCS oder hS kultiviert.

Nach Erreichen der Präkonfluenz wurden die Zellen trypsiniert und mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² erneut ausgesät. Bis zur Konfluenz wurde jeden dritten Tag das Kulturmedium erneuert. Nach Induktion der adipogenen Konversion erfolgte am 14. Differenzierungstag die Auszählung der differenzierten Zellen und GPDH-Messung.

Die Differenzierungsergebnisse zeigten einen hochsignifikanten Unterschied bezüglich des Differenzierungsausmaßes zwischen den mit FCS geführten Präadipozyten und den mit humanem Serum kultivierten Präadipozyten.

Der prozentuale Anteil der differenzierten Zellen betrug in der hS-Gruppe $41\% \pm 9\%$ und in der FCS-Gruppe $29\% \pm 1\%$ (siehe Abbildung 13 links). Dieses Ergebnis wurde durch die GPDH-Messung bestätigt (siehe Abbildung 13 rechts).

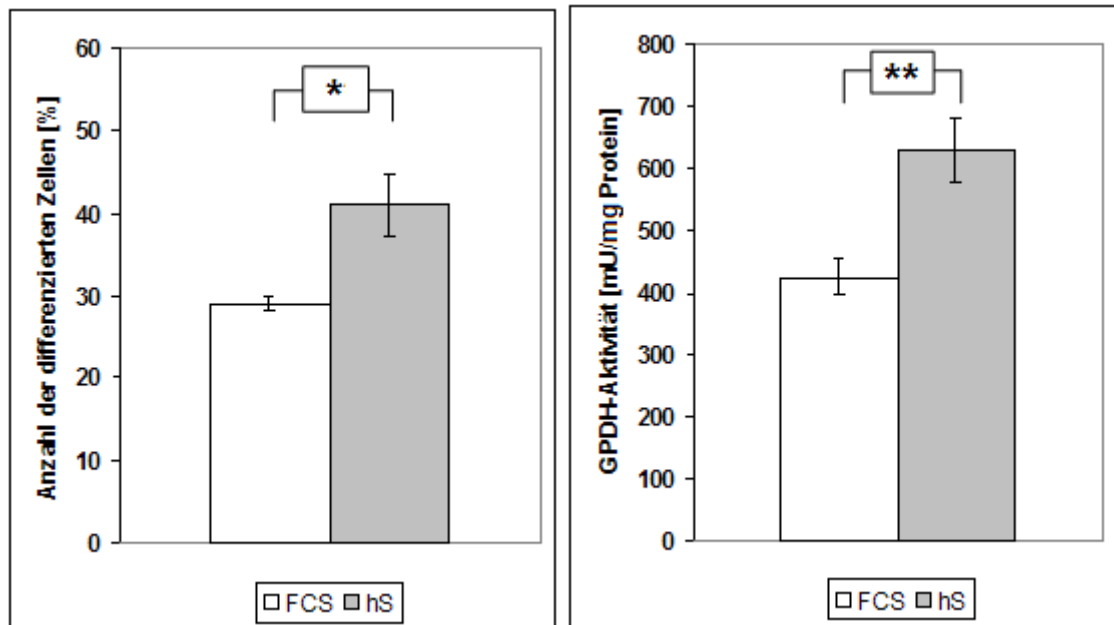


Abbildung 13: (links) Bestimmung der Zahl der differenzierten Zellen 14 Tage nach Differenzierungsbeginn in P1*, $p < 0.05$. (rechts) Bestimmung der GPDH-Aktivität am 14. Differenzierungstag in P1**, $p < 0.01$

4.2.4 Einfluss der Langzeitkultivierung auf die Proliferation und Differenzierung

In dieser Versuchsreihe sollte der Einfluss humaner Seren auf die Proliferation und Differenzierung menschlicher Fettgewebsvorläuferzellen untersucht werden, die über längere Zeit kultiviert wurden (bis Passage 3).

Die isolierten Präadipozyten stammten aus der Fettgewebsprobe einer 47-jährigen gesunden Frau. Die isolierten Zellen wurden in serumhaltigen Medium (DMEM/F12 + FCS oder hS) und in, mit Fibronektin beschichteten, Kulturflaschen bis Passage 3 kultiviert. Die humanen Seren stammten von fünf gesunden Blutspendern. Die Aussaatdichte betrug bei jeder neuen Passage 20.000 Zellen/cm².

Zur Quantifizierung der Proliferation erfolgte in jeder Passage am 3. Proliferationsstag eine Zellzählung unter dem Mikroskop. Die Ergebnisse der Proliferationszählung ergaben, dass die Anzahl der Zellen pro cm² im FCS- haltigen Medium konstant höher waren als im hS- haltigen Medium. Dieser Unterschied war nur in Passage 2 signifikant (siehe Abbildung 14).

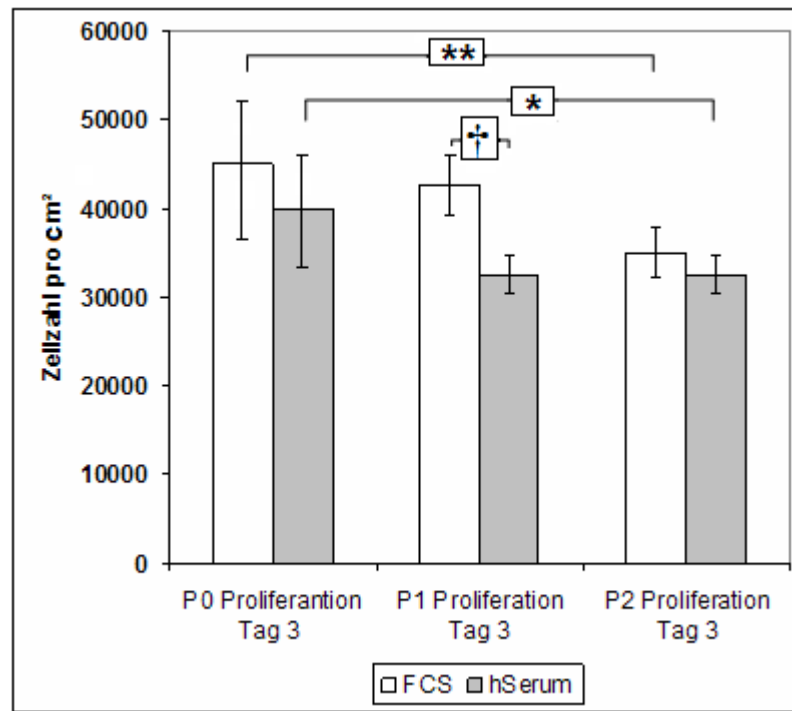


Abbildung 14: Proliferationsverhalten humaner Präadipozyten in unterschiedlichen Kulturbedingungen über drei Passagen. Die Aussaatdichte betrug zu Beginn jeder Passage 20.000 Zellen/cm². Die Zellzählung erfolgte jeweils am 3. Proliferationsstag. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, †, $p < 0.001$

Des Weiteren wurde eine konstante Abnahme der Proliferationsfähigkeit von Passage 0 bis Passage 3 beobachtet. Dies betraf hauptsächlich die FCS-Kultivierung (siehe Abbildung 14). In Passage 3 wurden die Zellen bis zur Konfluenz in den jeweiligen Kulturbedingungen geführt. 14 Tage nach Differenzierungsbeginn ergab die Zählung der differenzierten Zellen, dass nur $2\% \pm 0.7\%$ der in FCS kultivierten Zellen differenziert waren. Im Vergleich dazu waren $43\% \pm 3\%$ der Zellen, die in humanem Serum kultiviert wurden, differenziert (siehe Abbildung 15 links).

Die hochsignifikanten Unterschiede bezüglich der GPDH-Aktivität zwischen FCS- und hS kultivierten Zellen unterstreichen diese Aussage (siehe Abbildung 15 rechts).

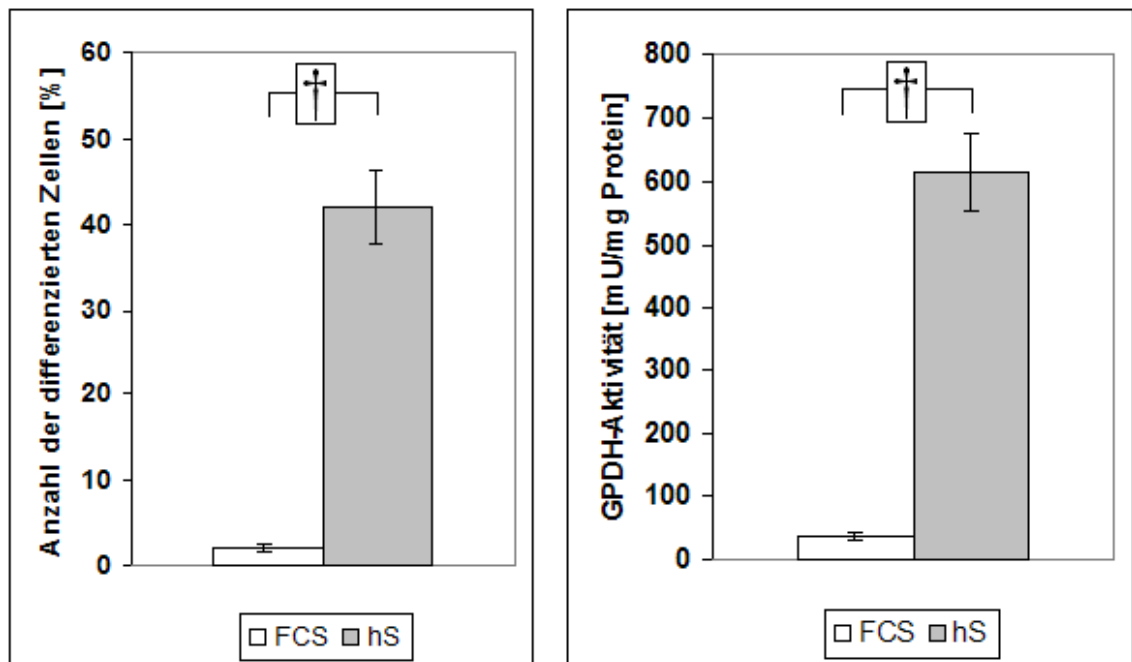


Abbildung 15: (links) Anzahl der differenzierten Zellen am 14. Differenzierungstag in Passage 3. ,† p < 0.001. (rechts) GPDH-Aktivität der differenzierten Zellen am 14. Differenzierungstag in Passage 3. ,† p < 0.001

5 Diskussion

Neben der Entwicklung von Knochen, Knorpel und anderer mesenchymaler Gewebearten beschäftigt sich die Gewebetechnologie mit der Herstellung von Fettgewebe zur Behandlung von Weichgewebsdefekten. Es gibt viele Studien, die sich mit dem Ausgang von transplantierten Fettgewebsblöcken und Liposuktionstransplantaten befassen (Bircoll und Novack 1987; Matsudo und Toledo 1988; Nguyen et al. 1990; Saunders et al. 1981; Watson 1959). Obwohl der Volumenverlust von Transplantaten aus chirurgisch exzidierten Fettgewebsblöcken geringer ist als aus abgesaugtem Fettgewebe (Kononas et al. 1993), ist bei beiden Transplantaten ein signifikanter Volumenverlust zu verzeichnen. Ein zusätzliches Problem stellt die Fibrosierung des Transplantates und die Bildung von Ölzysten dar. Von Peer et al. durchgeführte histologische Untersuchungen an Fettgewebstransplantaten zeigen, dass der Erfolg einer Fettgewebstransplantation hauptsächlich von der Anzahl der überlebenden Adipozyten im Transplantat abhängt (Peer 1950; Peer 1956). Es liegt daher nahe, Alternativen zur herkömmlichen Defektdeckung mit Fettgewebstransplantaten zu finden. Zell basierte Therapien wie die Gewebetechnologie benötigen eine leicht verfügbare Quelle an autologen und pluripotenten Stammzellen. Das Knochenmark ist sicherlich eine mögliche Quelle für mesenchymale Stammzellen, die die Fähigkeit haben zu adipogenen, osteogenen, myogenen und chondrogenen Zellen zu differenzieren. Jedoch ist die Entnahme von Stammzellen aus dem Knochenmark oft schmerzhaft und kompliziert, des Weiteren benötigen diese Stammzellen für das Wachstum spezifische Seren und Zusätze. Im Gegensatz dazu können Präadipozyten, welche sich aus Stammzellen entwickeln und sich neben reifen Adipozyten im Fettgewebe befinden, in größeren Mengen aus dem subkutanen Fettgewebe gewonnen werden. Eine einfache Entnahmemethode stellt die Liposuktion dar, die unter Lokalanästhesie durchgeführt werden kann und für den Patienten mit weniger Unannehmlichkeiten verbunden ist als ein operativer Eingriff unter Vollnarkose. Diese adipogenen Zellen besitzen ein großes Potential zu adipogenen (Gronthos et al. 2001; Zuk et al. 2002; Zuk et al. 2001), osteogenen (Halvorsen et al. 2001b; Ogawa et al. 2004; Zuk et al. 2002), myogenen (Sasao et al. 2003; Zuk et al. 2002; Zuk et al. 2001) und chondrogenen Zellen (Awad et al. 2003; Erickson et al. 2002; Ogawa et al. 2004) zu differenzieren und eignen sich daher hervorragend für Zell basierte Therapien wie das Tissue Engineering.

5.1 Die Bedeutung des Spendergewebes für die Präadipozytenkultur

Ein Ziel dieser Studie bestand darin das optimale Spendergewebe zu definieren, welches die bestmögliche Präadipozytenausbeute liefert. Hierfür wurde exzidiertes subkutanes Fettgewebe gegen abgesaugtes subkutanes Fettgewebe verglichen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich Liposuktionsgewebe als Spendematerial für Präadipozyten besser eignet als exzidiertes Fettgewebe. Die hohe Präadipozytenausbeute aus dem Liposuktionsgewebe zeigt, dass die stromale Zellfraktion im Fettgewebe durch die Absaugmethode nicht zerstört wird. Obwohl diese Aussage mit den biochemischen Untersuchungen zellulärer Schädigung nach Entnahme von Fettgewebe mittels Liposuktion übereinstimmt (Lalikos et al. 1997), sind in der Literatur auch gegensätzliche Meinungen zu finden. Huss et al. behauptet, dass die Anzahl der isolierten stromalen Zellen aus exzidiertem Fettgewebe signifikant höher ist als aus Liposuktionsgewebe (Huss und Kratz 2002). Des Weiteren ist zu bemerken, dass sich die Angaben verschiedener Forschungsgruppen zur Ausbeute stromaler Zellen aus dem Fettgewebe deutlich voneinander unterscheiden. Von Harmelen et al. fanden heraus, dass ein Gramm Fettgewebe 289.632 ± 120.369 stromale Zellen enthält. Dabei variiert die Zellzahl zwischen 50.000 und 606.000 Zellen pro Gramm Fettgewebe (von Harmelen et al. 2003). Obwohl die obere Zellzahlgrenze höher ist als die in der vorliegenden Studie, stimmen die Ergebnisse mit denen dieser Studie überein. Im Gegensatz dazu berichten Halvorsen et al., dass ein Gramm Fettgewebe, unabhängig davon ob es sich um exzidiertes oder aspiriertes Fettgewebe handelt, 86.000 ± 14.000 stromale Zellen liefert (Halvorsen et al. 2001a). Aust et al. isolierten 404.000 ± 206.000 stromale Zellen pro ein Milliliter Liposuktionsgewebe (Aust et al. 2004). Wenn man bedenkt, dass 1 ml Fettgewebe weniger wiegt als 1 gr. wäre die Zellausbeute pro Gramm sogar höher. Es muss sicherlich berücksichtigt werden, dass die Prozedur der Zellisolierung unter den Forschungsgruppen leicht variieren kann. Auch ist die Dichte stromaler Zellen nicht am ganzen Körper konstant. Die hohe Zellausbeute, die Aust erreicht hat, könnte darauf zurückgeführt werden, dass er Fettgewebe aus Hüfte und Taille analysiert hat, wohingegen in dieser Studie Fettgewebe aus Bauch und Brust untersucht wurde. Hierbei wurden regionale Unterschiede zwischen dem abdominalen Fettgewebe und dem Fettgewebe aus der Brust gefunden. Es bleibt dennoch unklar, warum die Zellausbeute zwischen den einzelnen Forschungsgruppen so variiert. Ein weiteres Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Überlebensrate humaner

Präadipozyten nach 24-stündiger Lagerung. Viele Chirurgen in Privatpraxen oder kleinen Kliniken, die eine autologe Transplantation von Fettgewebsvorläuferzellen vornehmen möchten, können aufgrund von fehlendem Equipment keine Zellisolierung durchführen. Daher benötigen diese Ärzte einen Transport bzw.- Lagerungsmöglichkeit, die ihnen erlaubt, Fettgewebs- und Liposuktionsproben in ein für Zellkulturen spezialisiertes Labor zu bringen. Wenn man bedenkt, dass für eine effektive Transplantation eine gute Proliferation und sogar eine Induktion der Differenzierung der Präadipozyten benötigt werden, gewinnt die Zellkultur als intermediäres Element immer mehr an Bedeutung. Ein weiterer Grund der Untersuchungen zur Zellausbeute pro Gramm Fettgewebe und zur Überlebensrate humaner Präadipozyten nach Lagerung war der Gebrauch von Präadipozyten für Forschungszwecke. Diese Studie hat unter anderem das Ziel, Forschern, die sich mit Fettgewebe und Fettgewebsvorläuferzellen beschäftigen, eine Anleitung zu geben, wie sie die Zellausbeute erhöhen (z.B. Isolierung von Präadipozyten aus abdominalem Liposuktionsgewebe) oder das Fettgewebe lagern können, wenn die Isolierung der Präadipozyten nicht unmittelbar nach Entnahme durchgeführt werden kann. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die höchste Ausbeute stromaler Zellen aus frischem Liposuktionsgewebe aus dem Abdomen gewonnen wurde. Im Gegensatz dazu lieferte das 24 Stunden gelagerte Fettgewebsexzidat aus dem Abdomen die niedrigste Zellausbeute. Die 24-stündige Lagerung führte beim Fettgewebsexzidat zu einem größeren Verlust an Präadipozyten als beim Liposuktionsgewebe. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Präadipozyten im Liposuktionsgewebe einen besseren Kontakt zum Kulturmedium haben, in dem sie über Nacht gelagert wurden. Dadurch werden sie besser mit Nährstoffen versorgt. Im Vergleich dazu haben exzidierte Fettgewebsproben einen unzureichenden Kontakt zum umgebenden Kulturmedium. Dadurch wird der Zelltod innerhalb größerer Fettgewebsstücke begünstigt. Eine ähnliche Situation ist auch in vivo zu beobachten. Eine insuffiziente Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff führt dazu, dass das transplantierte Fettgewebe zum größten Teil absorbiert und durch fibröses Gewebe und Ölzysten ersetzt wird (Peer 1956). Reife Fettzellen, die keinen Gefäßanschluss innerhalb der ersten vier Tage nach der Transplantation erreichen, sterben ab (Smahel et al. 1990, von Heimburg und Pallua 2001). Jede Nekrose ist eine Gefahr für das umliegende Gewebe, da sie Infektionen begünstigt. Daher ist es sinnvoller, isolierte Fettgewebsvorläuferzellen zu implantieren als den freien Transfer von Liposuktionsgewebe und Fettgewebsblöcken anzustreben. Im Gegensatz zu reifen

Fettzellen stellen Fettgewebsvorläuferzellen eine vielversprechende Quelle für die Weichgewebstechnologie dar (von Heimbürg et al. 2001, Smahel et al. 1990, von Heimbürg et al. 2001b), da sie die Fähigkeit haben zu proliferieren und nach Reimplantation zu reifen Fettzellen zu differenzieren. Ausserdem überleben Präadipozyten eine Transplantation unbeschädigter als Adipozyten und zeigen eine bessere Anheftungs- und Akkumulationstendenz am Empfängerort (Billings und May 1989). Zweifellos besteht ein relevanter Volumenverlust des Transplantats, wenn Liposuktionsgewebe oder Fettgewebsblöcke transplantiert werden (Kononas et al. 1993). Mit der Verwendung von isolierten Präadipozyten zur Defektdeckung kann man sicher sein, dass das Implantat aus lebenden und hochpotenten Zellen besteht. Des Weiteren kann durch Zellwachstum *in vitro* die zu reimplantierende Gewebemenge effektiv erhöht und der Volumenverlust dadurch verringert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass verschiedene Aspekte wie z.B. Lagerung der Zellen, Gewebeart usw. berücksichtigt werden müssen, wenn Fettgewebsvorläuferzellen für gewebe technologische Zwecke verwendet werden. Für die Behandlung von mittelgroßen und kleineren Gewebsdefekten durch den Transfer von autologen Präadipozyten in kleineren Kliniken oder Privatpraxen, ist Liposuktionsmaterial, speziell aus dem Abdomen, das bessere Spendergewebe als Fettgewebsexzidate.

5.2 Vorteile der Verwendung von humanem Serum als Mediumzusatz

Eine adäquate Rekonstruktion von Weichgewebsdefekten, die durch Trauma, Tumoren Operationen oder kongenitale Fehlbildungen entstanden sind, ist erforderlich. Der Ausgang dreidimensionaler Zellkonstrukte, die mit Präadipozyten besiedelt sind, hängt von zwei wichtigen Faktoren, nämlich der Proliferation und Differenzierung ab. Die adipogene Konversion humaner Präadipozyten ist ein gut regulierter Prozess, der von verschiedenen Faktoren abhängt und beeinflusst wird. Zum einen spielt der Entnahmeort für die Zellen eine wichtige Rolle. Es stellte sich heraus, dass aus dem subkutanen Fettgewebe isolierte Präadipozyten die beste Differenzierungsfähigkeit besitzen (Tchkonina et al. 2002). Daher wurden für die Experimente dieser Studie nur subkutane Fettgewebeproben von Abdominoplastiken verwendet. Zum anderen sind für *in vitro* Versuche die Kulturbedingungen von entscheidender Bedeutung, um die Proliferation und Differenzierung zu steigern. Fötales Kälberserum (FCS) wurde aufgrund seines hohen Anteils an Wachstumsfaktoren und Nährstoffen und seiner guten

zellulären Proliferation seit Jahrzehnten als Mediumzusatz in der Zellkultur eingesetzt (Freshney 1987). Je nach Forschungsgruppe, wird ein Serumzusatz von 5% oder 10% empfohlen. Aufkommende moralische und ethische Bedenken über die Gewinnung von FCS von neugeborenen Kälbern stellte den Gebrauch von Rinderprodukten in Frage (Jochems et al. 2002). Hohe Produktionskosten, begrenzte Erhältlichkeit und starke Variabilität von FCS sind weitere Argumente, die eine Suche nach Alternativen zu FCS begründen (Barnes und Sato 1980a; Barnes und Sato 1980b; Jayme und Blackman 1985; Jayme et al 1988). Zu guter Letzt sorgten Schlagzeilen über die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) und andere Prionenerkrankungen für eine angeregte Diskussion über die Sicherheit von Kälberprodukten. Sowohl die Gefahr einer Infektionsübertragung als auch die durch Fremdproteinkontakt der Zellen ausgelösten immunologischen Prozesse nach einer Transplantation rückten in den Mittelpunkt der Öffentlichkeit (Johnson et al. 1991; Johnson et al. 1990; Mizushima und Cohen 1985; Toldbod et al. 2003). Bezüglich der Präadipozytenkultivierung muss ein weiterer Faktor berücksichtigt werden. Wie auch diese Studie zeigt, bewirkt FCS zwar eine gute Proliferation der Präadipozyten führt jedoch zu einer irreversiblen Reduktion der adipogenen Konversion. Daher ist der Einsatz von FCS in Zellkulturen für die Gewebetechnologie nicht erstrebenswert. Einige Autoren empfehlen die Kombination aus FCS und humanem Serum als Mediumzusatz, wenn durch alleinigen Einsatz von humanem Serum die Zellen nicht lebensfähig sind (Hauner und Löffler 1986), schwach proliferieren (Gargett et al. 2000) oder sich nicht an den Boden des Kulturgefäßes anheften (Choi et al. 1980). Diese Kombination beider Seren kann nicht als Lösung angesehen werden, solange durch den Einsatz von FCS immer noch immunologische Probleme präsent sind. Bisher wird nach möglichen Alternativen gesucht, um FCS zu ersetzen oder ein Kultursystem zu entwickeln, welches ganz auf den Einsatz von Serum verzichtet (Gstraunthaler 2003; Kawada et al. 1990; Tezel und Del Priore 1998). Durch ein serumfreies Kultursystem würden sich die Probleme einer Kontamination mit Rinderproteinen erübrigen. Das serumfreie System ist jedoch in den meisten Fällen nicht so potent wie serumhaltige Medien (Ethier 1986; Koller et al. 1998) und benötigt den Zusatz von Wachstumsfaktoren, um eine gleichwertige Proliferation zu erreichen (Kawada et al. 1990). Auch der Einsatz künstlich hergestellter Seren, die tierische Proteine (Ultrosor G) oder pflanzliche Proteine (Prolifix S6) enthalten, um das Wachstum der Zellen und die Differenzierung anzuregen (Anselme et al. 2002), sind problematisch, da sie ihrerseits immunologische Reaktionen und sogar

die Abstoßung des Transplantats verursachen können. Weitere Alternativen für FCS in der Kultivierung humaner Zellen sind (a) allogenes Serum, (b) autologes Serum, oder (c) gepooltes humanes Serum. Einige Studien an verschiedenen Zelltypen zeigten eine Überlegenheit von humanem Serum in der Zellkultivierung im Vergleich zu FCS (Gruber et al. 1996; Hankey et al. 2001; McAlinden und Wilson 2000; Yamamoto et al. 2003), da sie die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit der Zellen bewahrt (Katsura et al. 2002). Bisher existieren noch keine Studien über die Auswirkungen von humanem Serum auf die Proliferation und Differenzierung humaner Präadipozyten verglichen mit FCS. Die vorliegende Studie kann in zwei Versuche unterteilt werden. Zunächst wurde die Variabilität humaner Präadipozyten, die aus verschiedenen Fettgewebeproben isoliert wurden, an einer humanen Serumprobe analysiert. Dieser Versuch wurde für zwei Serumproben getrennt durchgeführt (Abb.10+11). Anschließend wurden humane Serumproben von 20 Patienten (Abb.12+13) und von 5 Patienten (Abb.14+15) an einer repräsentativen Präadipozytenprobe individuell miteinander verglichen. Das Ergebnis dieser Versuche ergab, dass humanes Serum im Vergleich zu FCS auch über längere Kultivierungsdauer eine gute Proliferation und Differenzierung ermöglicht und sich für die Aufzucht humaner Präadipozyten für gewebetechnologische Zwecke optimal eignet. Die Tatsache, dass Präadipozyten nicht nur in reife Fettzellen differenzieren, sondern die Fähigkeit haben auch in andere Zelltypen wie Osteoblasten, Chondrozyten, Myoblasten und neuronähnliche Zellen und Endothelzellen zu differenzieren (Zuk et al. 2002; Zuk et al. 2001), bestärkt die Wichtigkeit und die Bedeutung dieser Ergebnisse für die Gewebetechnologie. Das in dieser Studie angewendete Standardprotokoll mit humanem Serum als Mediumzusatz erlaubte sowohl eine ausreichende Proliferation als auch die Entfaltung der Differenzierungskapazität. Die Auswirkungen eines serumfreien Systems auf Proliferations – und Differenzierungskapazität humaner Präadipozyten ergaben in den Versuchen einen deutlichen Mangel an Zellwachstum bei guter Differenzierungsfähigkeit. Die Ergebnisse bezüglich der Fibronectinbeschichtung zeigen, dass Fibronectin nicht nur die Zahl der angehefteten Zellen erhöht, sondern auch die Differenzierungsfähigkeit humaner Präadipozyten zu reifen Fettzellen positiv beeinflusst. Die Vorteile von Fibronectin bezüglich der erhöhten Zellausbeute stimmen mit den Angaben einiger Autoren überein (Jiao et al. 2000; Klee et al. 2003; Wyre und Downes 2002). In Bezug auf die Differenzierung herrschen gegensätzliche Meinungen darüber, ob Fibronectin die Differenzierung von Fettgewebsvorläuferzellen eher

begünstigt oder hemmt. Die Ergebnisse dieser Studie ergaben eine Verbesserung der Differenzierung durch die Fibronektinbeschichtung um 10-20% (Abb.9). Dieses Resultat stimmt mit den Aussagen von Hauner et al. überein. (Hauner et al 1998). In der Literatur befinden sich jedoch auch Berichte darüber, dass die Zugabe von Fibronektin zum Kulturmedium keinen Einfluss auf die Differenzierung hat (Varzaneh et al. 1994) oder sogar die adipogene Konversion der Präadipozyten zu reifen Fettzellen hemmt (Gregoire et al. 1998; Selvarajan et al. 2001; Spiegelman und Ginty, 1983). Proliferation und Differenzierung müssen als eine Einheit betrachtet und als solche bewertet werden. Wie Abbildung 14 zeigt, ist DMEM/F12 + FCS eine optimale Kombination für eine extensive Proliferation, jedoch hat dieses Mediumgemisch die schlechteste Differenzierungsrate unter allen getesteten Kulturbedingungen. Daher müssen sowohl das Kulturmedium als auch das Serum so aufeinander abgestimmt sein, dass man eine optimale Kombination aus Zellwachstum und Differenzierung erhält. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann man empfehlen, DMEM/F12 durch OPTIMEM zu ersetzen, wenn FCS als Serumzusatz verwendet wird. Für ein Kultursystem mit Zusatz von allogenem oder autologem Serum können beide Kulturmedien benutzt werden, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Medien vorliegen. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass der Gebrauch von humanem Serum für die Proliferation und Differenzierung humaner Präadipozyten neue und vielversprechende Perspektiven für die gewebetechnologische Herstellung von Fettgewebe eröffnet, da sowohl eine gute in vitro Proliferation als auch eine ausreichende Induktion der Differenzierung gewährleistet werden.

6 Zusammenfassung

Die Korrektur von Weichgewebsdefekten gehört nach wie vor zu den Aufgaben und Herausforderungen in der Plastischen und Rekonstruktiven Chirurgie. Das Tissue Engineering, basierend auf der Transplantation von kultivierten, autologen Fettgewebsvorläuferzellen, sog. Präadipozyten, bietet hier eine geeignete Behandlungsmöglichkeit. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die in vitro Kultivierung humaner Präadipozyten zu optimieren. Hierzu wurden Versuche zur Ermittlung des optimalen Spendergewebes (Fettgewebsexzidat vs. Aspirat) und des geeigneten Kulturmediums (OptiMEM vs. DMEM) durchgeführt. Zudem wurde die Auswirkung der Fibronectinbeschichtung auf die Präadipozytenkultivierung analysiert. In einem weiteren Versuch wurden die Auswirkungen von FCS und humanem Serum auf die Proliferation und Differenzierung humaner Präadipozyten untersucht. Hinsichtlich der Effizienz isolierter Präadipozyten erwies sich das Fettgewebsaspirat, auch nach 24-stündiger Lagerung, als das ideale Spendergewebe. Humanes Serum als Mediumzusatz konnte sich bezüglich der Proliferations- und Differenzierungskapazität, vor allem nach längerer Kultivierungsdauer, dem fötalen Kälberserum durchsetzen. Die Fibronectinbeschichtung hatte sowohl auf die Zellausbeute als auch auf die Differenzierung durchweg einen positiven Einfluss. Die Kultivierung humaner Präadipozyten in humanem Serum bietet neue Perspektiven für den Einsatz von Fettgewebsvorläuferzellen zur Herstellung eines biotechnologischen Konstruktes als Weichgewebsfüllmaterial. Die Ergebnisse dieser Arbeit ermutigen dazu, die in der Zellkultur erzielten Resultate nun in ein autologes in vivo-Modell zu implementieren und zu überprüfen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adipozytenlinie nach Ailhaud et al. (G. Ailhaud et al. 1992)	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Differenzierung von Präadipozyten zur reifen Fettzelle.....	5
Abbildung 3: Adipogenese (vereinfachtes Schema): PPAR γ ist essentiell für die Initiierung des Differenzierungsprozesses von Adipozyten. Die Ausprägung des reifen Insulin-sensitiven Phänotyps von Fettzellen wird gemeinsam durch die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und C/EBP α induziert (mod. nach B. Lowell 1999).....	7
Abbildung 4: Schema der Isolierung der stromalen Fraktion aus humanem Fettgewebe. Links Fettgewebsexzidat, rechts Fettgewebsaspirat (nach Liposuktion).....	16
Abbildung 5: Kultivierungsschema der isolierten Präadipozyten.....	19
Abbildung 6: Präadipozyten wurden aus Fettgewebsexzidaten und Liposuktionsmaterial isoliert. Die Präadipozytenisolierung erfolgte entweder innerhalb von 60 Minuten nach Fettgewebsentnahme (frisch) oder nach 24 Stunden Lagerung (alt) der Fettgewebsprobe in DMEM/F12 (1:1) *, $p < 0.05$	24
Abbildung 7: Vergleich der stromalen Zellen pro Gramm Fettgewebe bezüglich der Entnahmestellen Brust und Abdomen *, $p < 0.05$	24
Abbildung 8: (links) Charakteristisch für die Proliferationsphase sind die langen Zellausläufer und der zentrierte Zellkern (100 fache Vergrößerung). (rechts) Lipidgefüllte, abgerundete Präadipozyten nach 14 Tagen Differenzierung (100 fache Vergrößerung)	25
Abbildung 9: GPDH-Aktivität 14 Tage nach Differenzierungsbeginn in verschiedenen Kulturbedingungen. †, $p < 0.001$ im Vergleich zu der Null- Linie (GPDH-Aktivität der differenzierten Zellen desselben Spenders und der gleichen Kulturbedingung ohne Fibronectinbeschichtung	27
Abbildung 10: Präadipozyten wurden acht Tage in unterschiedlichen Kulturbedingungen kultiviert und unter dem Mikroskop ausgezählt. **, $p < 0.01$ bezogen auf die Standardmethode DMEM/F12 + 5% FCS	28
Abbildung 11: Anzahl der differenzierten Zellen nach 14 Tagen Differenzierung im serumfreien Differenzierungsmedium. Die Bezeichnungen „serumfrei“, „FCS“, und „hS“ beziehen sich auf die Kultivierungsbedingungen in der Proliferationsphase. *, $p < 0.05$ verglichen mit der Standardmethode DMEM/F12 + 5% FCS	29
Abbildung 12: Präadipozyten wurden in DMEM/F12 supplementiert mit FCS oder hS kultiviert.	30

Abbildung 13: (links) Bestimmung der Zahl der differenzierten Zellen 14 Tage nach Differenzierungsbeginn in P1 *, $p < 0.05$. (rechts) Bestimmung der GPDH-Aktivität am 14. Differenzierungstag in P1**, $p < 0.01$ 31

Abbildung 14: Proliferationsverhalten humaner Präadipozyten in unterschiedlichen Kulturbedingungen über drei Passagen. Die Aussaatdichte betrug zu Beginn jeder Passage 20.000 Zellen/cm². Die Zellzählung erfolgte jeweils am 3. Proliferationsstag. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, †, $p < 0.001$ 32

Abbildung 15: (links) Anzahl der differenzierten Zellen am 14. Differenzierungstag in Passage 3. , † $p < 0.001$. (rechts) GPDH-Aktivität der differenzierten Zellen am 14. Differenzierungstag in Passage 3. , † $p < 0.001$ 33

8 Literaturverzeichnis

Anselme, K., Broux, O., Noel, B., Bouxin, B., Bascoulergue, G., Dudermel, A. F., Bianchi, F., Jeanfils, J., and Hardouin, P. (2002). In Vitro Control of Human Bone Marrow Stromal Cells for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng* 8:941-953

Antoniades HN, Scher CD. (1977). Radioimmunoassay of a human serum growth factor for Balb/c-3T3 cells: derivation from platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*.74:1973-7.

Aust, L., Devlin, B., Foster, S. J., Halvorsen, Y. D., Hicok, K. C., du Laney, T., Sen, A., Willingmyre, G. D., and Gimble, J. M. (2004). Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 6:7-14.

Awad, H. A., Halvorsen, Y. D., Gimble, J. M., and Guilak, F. (2003). Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng* 9:1301-1312.

Barnes, D., and Sato, G. (1980a). Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal Biochem* 102:255-270.

Barnes, D., and Sato, G. (1980b). Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* 22:649-655.

Billings, E., Jr., and May, J. W., Jr. (1989). Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 83:368-381.

Bircoll, M., and Novack, B. H. (1987). Autologous fat transplantation employing liposuction techniques. *Ann Plast Surg* 18:327-329.

Björntorp, P., Karlsson, M., Pettersson, P., and Sypniewska, G. (1980). Differentiation and function of rat adipocyte precursor cells in primary culture. *J Lipid Res* 21:714-723.

Björntorp P, Karlsson M, Pertoft H, Pettersson P, Sjöström L, Smith U.(1978).Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J Lipid Res.* 19:316-24.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Brun RP, Spiegelman BM. (1997). PPAR γ and the molecular control of adipogenesis. *J Endocrinol* 155:217-218

Choi, Y. C., Morris, G. M., Lee, F. S., and Sokoloff, L. (1980). The effect of serum on monolayer cell culture of mammalian articular chondrocytes. *Connect Tissue Res* 7:105-112.

Coleman, S. (1997). Facial recontouring with lipostructure. *Clin Plast Surg* 347-367.

de Pedroza, LV. (2000). *Dermatol Surg.* 26(12):1145-9

Dzubow, L., and Goldman, G. (1998). Introduction to soft tissue augmentation: a historical perspective. In *Tissue augmentation in clinical practice*, A. Klein, ed. (Basel, Marcel Dekker), pp. 1-22.

Ellenbogen R. (1986). Free autogenous pearl fat grafts in the face--a preliminary report of a rediscovered technique. *Ann Plast Surg.*16(3):179-94.

Eppley, BL, Sadove, AM. (1991).A physicochemical approach to improving free fat graft survival: preliminary observations. *Aesthetic Plast Surg.*15(3):215-8.

Eppley, BL, Sidner, RA, Platis, JM, Sadove, AM. (1992).Bioactivation of free-fat transfers: a potential new approach to improving graft survival. *Plast Reconstr Surg.*90(6):1022-30.

Eremia S, Newman N. (2000). Long-term follow-up after autologous fat grafting: analysis of results from 116 patients followed at least 12 months after receiving the last of a minimum of two treatments. *Dermatol Surg*.26(12):1150-8.

Erickson, G. R., Gimble, J. M., Franklin, D. M., Rice, H. E., Awad, H., and Guilak, F. (2002). Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 290:763-769.

Ersek RA. (1991).Transplantation of purified autologous fat: a 3-year follow-up is disappointing. *Plast Reconstr Surg*. 87(2):219-27; discussion 228.

Ethier, S. P. (1986). Serum-free culture conditions for the growth of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 22: 485-490.

Fajas, L. (2003). Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann Med* 35:79-85.

Finch, G. D., and Dawe, C. J. (2003). Hemiatrophy. *J Pediatr Orthop* 23:99-101.

Fokin, A. A., and Robicsek, F. (2002). Poland's syndrome revisited. *Ann Thorac Surg* 74:2218-2225.

Freshney, R. I. (1987). Culture of animal cells: A manual of basic technique, 2nd edn (New York, Alan, R. Liss Inc.).

Gallico GG 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H.(1984). Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med*. 16;311(7):448-51.

Gargett, C. E., Bucak, K., and Rogers, P. A. (2000). Isolation, characterization and long-term culture of human myometrial microvascular endothelial cells. *Hum Reprod* 15:293-301.

Gregoire, F. M., Smas, C. M., and Sul, H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809.

Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W., and Gimble, J. M. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189:54-63.

Gruber, R., Sittinger, M., and Bujia, J. (1996). Untersuchungen zur In-vitro-Kultivierung von Humanchondrozyten bei Einsatz von autologem Humanserum als Mediumzusatz: Minimierung des möglichen Risikos einer Infektion mit Erregern von Prionen-Erkrankungen. *Laryngo-Rhino-Otol* 75:105-108.

Gstraunthaler, G. (2003). Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *Altex* 20:275-281.

Hankey, D. P., McCabe, R. E., Doherty, M. J., Nolan, P. C., McAlinden, M. G., Nelson, J., and Wilson, D. J. (2001). Enhancement of human osteoblast proliferation and phenotypic expression when cultured in human serum. *Acta Orthop Scand* 72:395-403.

Halvorsen, Y. D., Bond, A., Sen, A., Franklin, D. M., Lea-Currie, Y. R., Sujkowski, D., Ellis, P. N., Wilkison, W. O., and Gimble, J. M. (2001a). Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism* 50:407-413.

Halvorsen, Y. D., Franklin, D., Bond, A. L., Hitt, D. C., Auchter, C., Boskey, A. L., Paschalis, E. P., Wilkison, W. O., and Gimble, J. M. (2001b). Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7:729-741.

Hauner H, Löffler G.(1986). Adipogenic factors in human serum promote the adipose conversion of 3T3-L1 fibroblasts. *Int J Obes*.10:323-30.

Hauner, H. (1991). Differentiation of human adipocyte precursor cells under chemically defined culture conditions. In *Progress in Obesity Research 1990*, Y. Oomura, S. Tarui, S. Inoue, and T. Shimazu, eds. (London, John Libbey), pp. 213-218.

Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R., and Pfeiffer, E. F. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 84:1663-1670.

Hauner, H., Shurk, T., and Wabitsch, M. (1998). Cultures of Human Adipose Precursor Cells. In *Methods in Molecular Biology*, G. Ailhaud, ed. (Totowa, NJ, Humana Press Inc.), pp. 239-247.

Hausberger FX.(1955). Quantitative studies on the development of autotransplants of immature adipose tissue of rats. *Anat Rec.*122:507-15.

Hemmrich K, Van de Sijpe K, Rhodes NP, Hunt JA, Di Bartolo C, Pallua N, Blondeel P, von Heimburg D. (2008). Autologous in vivo adipose tissue engineering in hyaluronan-based gels--a pilot study. *J Surg Res.* 144:82-8.

Huss, F. R., and Kratz, G. (2002). Adipose tissue processed for lipoinjection shows increased cellular survival in vitro when tissue engineering principles are applied. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg* 36:166-171.

Ibrahimi A, Bonino F, Bardon S, Ailhaud G, Dani C. (1992). Essential role of collagens for terminal differentiation of preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 187:1314-22.

Illouz YG. (1986). The fat cell "graft": a new technique to fill depressions. *Plast Reconstr Surg.*78(1):122-3.

Jayme, D. W., and Blackman, K. E. (1985). Culture media for propagation of mammalian cells, viruses, and other biologicals. *Adv Biotechnol Processes* 5:1-30.

Jayme, D. W., Epstein, D. A., and Conrad, D. R. (1988). Fetal bovine serum alternatives. *Nature* 334:547-548.

Jiao, Y., Ma, X., Yu, S., and Shao, M. (2000). [Fibronectin in adhesion, spreading and proliferation of mandibular condylar cartilage cells on cytodex-3 microcarrier]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 18:75-77.

Jochems, C. E., van der Valk, J. B., Stafleu, F. R., and Baumans, V. (2002). The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim* 30:219-227.

Johnson, L. F., deSerres, S., Herzog, S. R., Peterson, H. D., and Meyer, A. A. (1991). Antigenic cross-reactivity between media supplements for cultured keratinocyte grafts. *J Burn Care Rehabil* 12:306-312.

Johnson, M. C., Meyer, A. A., deSerres, S., Herzog, S., and Peterson, H. D. (1990). Persistence of fetal bovine serum proteins in human keratinocytes. *J Burn Care Rehabil* 11:504-509.

Katsura, N., Ikai, I., Mitaka, T., Shiotani, T., Yamanokuchi, S., Sugimoto, S., Kanazawa, A., Terajima, H., Mochizuki, Y., and Yamaoka, Y. (2002). Long-term culture of primary human hepatocytes with preservation of proliferative capacity and differentiated functions. *J Surg Res* 106:115-123.

Kawada, T., Aoki, N., Kawai, R., and Sugimoto, E. (1990). Proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in a completely defined serum-free medium. *Cell Biol Int Rep* 14:567-574.

Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. (1998). ADD1/SREBP1 activates PPAR γ through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4333-4337.

Klee, D., Ademovic, Z., Bosserhoff, A., Hoecker, H., Maziolis, G., and Erli, H. J. (2003). Surface modification of poly(vinylidene fluoride) to improve the osteoblast adhesion. *Biomaterials* 24:3663-3670.

Koller, M. R., Maher, R. J., Manchel, I., Oxender, M., and Smith, A. K. (1998). Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media. *J Hematother* 7:413-423.

Kononas, T. C., Bucky, L. P., Hurley, C., and May, J. W. J. (1993). The fate of suctioned and surgically removed fat after reimplantation for soft-tissue augmentation: a volumetric and histologic study in the rabbit. *Plast Reconstr Surg* 91:763-768.

Lalikos, J. F., Li, Y. Q., Roth, T. P., Doyle, J. W., Matory, W. E., and Lawrence, W. T. (1997). Biochemical assessment of cellular damage after adipocyte harvest. *J Surg Res* 70:95-100.

Langenskiöld A, Videman T, Nevalainen T. (1986). The fate of fat transplants in operations for partial closure of the growth plate. Clinical examples and an experimental study. *J Bone Joint Surg Br*.68:234-8.

Lewis CM. (1993). The current status of autologous fat grafting. *Aesthetic Plast Surg*.17:109-12.

Lowell BB. (1999). PPAR γ : An essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell* 99:239-242.

Lupi, O. (2002). Prions in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 46:790-793.

Matsudo, P. K., and Toledo, L. S. (1988). Experience of injected fat grafting. *Aesthetic Plast Surg* 12:35-38.

McAlinden, M. G., and Wilson, D. J. (2000). Comparison of cancellous bone-derived cell proliferation in autologous human and fetal bovine serum. *Cell Transplant* 9:445-451.

Miller JJ, Popp JC. (2002). Fat hypertrophy after autologous fat transfer. *Ophthal Plast Reconstr Surg*.18:228-31

Mizushima, Y., and Cohen, E. P. (1985). A study on an artifact introduced by fetal bovine serum-supplemented medium. *Hokkaido Igaku Zasshi* 60:321-326.

Neuber, G. (1893). Fetttransplantation. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie* 22:66.

Nguyen, A., Pasyk, K. A., Bouvier, T. N., Hassett, C. A., and Argenta, L. C. (1990). Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg* 85:378-386.

Ogawa, R., Mizuno, H., Watanabe, A., Migita, M., Shimada, T., and Hyakusoku, H. (2004). Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 313:871-877.

Oliveira SM, Mijares DQ, Turner G, Amaral IF, Barbosa MA, Teixeira CC.(2008). Engineering Endochondral Bone: In Vivo Studies. *Tissue Eng Part A*. Aug 31.

Pairault, J., and Green, H. (1979). A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc Natl Acad Scie* 76:5138-5142.

Peer, L. (1950). Loss of weight and volume in human fat grafts with postulation of a cell survival theory. *Plast Reconstr Surg* 5:217-230.

Peer, L. (1956). The neglected free fat graft. *Am J Surg* 18:233-250.

Petruschke T, Röhrig K, Hauner H. (1994). Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits the differentiation of human adipocyte precursor cells in primary culture. *Int J Obes Relat Metab Disord*.18:532-6.

Pinski KS, Roenigk HH Jr. (1992). Autologous fat transplantation. Long-term follow-up. *J Dermatol Surg Oncol*.18:179-84.

Prusiner SB, Torchia M, Westaway D. (1991). Molecular biology and genetics of prions--implications for sheep scrapie, "mad cows" and the BSE epidemic. Historical background. *Cornell Vet.* 81:85-101.

Reichl, H., Balen, A., and Jansen, C. A. (2002). Prion transmission in blood and urine: what are the implications for recombinant and urinary-derived gonadotrophins? *Hum Reprod* 17:2501-2508.

Rodbell M. (1964). Localization of Lipoprotein Lipase in fat cells of rat adipose tissue. *J Biol Chem.* 239:753-5.

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al. (1999). PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4:611-617.

Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. (1974). A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71:1207-10.

Ross R, Nist C, Kariya B, Rivest MJ, Raines E, Callis J. (1978). Physiological quiescence in plasma-derived serum: influence of platelet-derived growth factor on cell growth in culture. *J Cell Physiol.* 97:497-508.

Rossatti, B. (1960). Revascularisation and phagocytosis in free fat autografts: an experimental study. *Br J Plast Surg* 13:35-41.

Rowshan HH, Hart K, Arnold JP, Thompson SH, Baur D, Keith K, Skidmore P. (2008). Treatment of human immunodeficiency virus-associated facial lipodystrophy syndrome with dermafat graft transfer to the nasolabial fold areas: a case report and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 66:1932-8.

Sasao, N., Hirayama, E., and Kim, J. (2003). Characterization of heterokaryons between skeletal myoblasts and preadipocytes: myogenic potential of 3T3-L1 preadipocytes. *Eur J Cell Biol* 82:97-103.

Saunders, M., Keller, J., Dunsker, S., and Mayfield, F. (1981). Survival of autologous fat grafts in humans and in mice. *Connective Tiss Res* 8:85-91.

Schmeller W, Meier-Vollrath I.(2003). [Autologous fat grafting]
Hautarzt. 54(12):1185-9.

Selvarajan, S., Lund, L. R., Takeuchi, T., Craik, C. S., and Werb, Z. (2001). A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. *Nat Cell Biol* 3:267-275.

Shiffman MA, Mirrafati S. (2001). Fat transfer techniques: the effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature.*Dermatol Surg*.27:819-26.

Silkiss RZ, Baylis HI. (1987). Autogenous fat grafting by injection.
Ophthal Plast Reconstr Surg. 3:71-5.

Smahel, J. (1989). Experimental implantation of adipose tissue fragments. *Br J Plast Surg* 42:207-211.

Smahel, J., Meyer, V., and Schütz, K. (1990). Vascular augmentation of free adipose tissue grafts. *Eur J Plast Surg* 13:163-168.

Sommer B, Sattler G.(2000).Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatol Surg*.26:1159-66.

Spiegelman, B. M., and Ginty, C. A. (1983). Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3 adipocytes. *Cell* 35:657-666.

Stillaert FB, Blondeel P, Hamdi M, Abberton K, Thompson E, Morrison WA.(2006). Adipose tissue induction in vivo. *Adv Exp Med Biol*. 585:403-12. Review.

Tchkonia, T., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Tchoukalova, Y., Karagiannides, I., Forse, R. A., DePonte, M., Stevenson, M., Guo, W., Han, J., *et al.* (2002). Fat depot

origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R1286-1296.

Tezel, T. H., and Del Priore, L. V. (1998). Serum-free media for culturing and serial-passaging of adult human retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 66:807-815.

Tholpady, S. S., Katz, A. J., and Ogle, R. C. (2003). Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *Anat Rec* 272A:398-402.

Toldbod, H. E., Agger, R., Bolund, L., and Hokland, M. (2003). Potent influence of bovine serum proteins in experimental dendritic cell-based vaccination protocols. *Scand J Immunol* 58:43-50.

Van Akkerveeken PF, Van de Kraan W, Muller JW.(1986).The fate of the free fat graft. A prospective clinical study using CT scanning. *Spine*. 11:501-4.

Van RL, Roncari DA.(1982). Complete differentiation in vivo of implanted cultured adipocyte precursors from adult rats. *Cell Tissue Res*.225:557-66.

Van RL, Bayliss CE, Roncari DA.(1976).Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest*. 58:699-704.

Varzaneh, F. E., Shillabeer, G., Wong, K. L., and Lau, D. C. (1994). Extracellular matrix components secreted by microvascular endothelial cells stimulate preadipocyte differentiation in vitro. *Metabolism* 43:906-912.

von Harmelen, V., Skurk, T., Röhrig, K., Lee, Y.-M., Halbleib, M., Aprath-Husmann, I., and Hauner, H. (2003). Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes* 27:889-895.

von Heimburg D, Hemmrich K, Zachariah S, Staiger H, Pallua N.(2005).Oxygen consumption in undifferentiated versus differentiated adipogenic mesenchymal precursor cells. *Respir Physiol Neurobiol*. 146:107-16.

von Heimburg, D., Kuberka, M., Rendchen, R., Hemmrich, K., Rau, G., and Pallua, N. (2003). Preadipocyte-loaded collagen scaffolds with enlarged pore size for improved soft tissue engineering. *Int J Artif Organs* 26:1064-1076.

von Heimburg, D., and Pallua, N. (2001). Two-year histological outcome of facial lipofilling. *Ann Plast Surg* 46:644-646.

von Heimburg, D., Zachariah, S., Heschel, I., Kühling, H., Schoof, H., Hafemann, B., and Pallua, N. (2001). Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo. *Biomaterials* 22:429-438.

von Heimburg, D., Ulrich, D., Hemmrich, K., and Pallua, N. (2001a). Soft tissue engineering by implantation of autologous adipose precursor cells into the rabbit ear-pathophysiology in adipose tissue transplantation. *Clin Exp Plast Surg* 33:127-132.

von Heimburg, D., Zachariah, S., Low, A., and Pallua, N. (2001b). Influence of different biodegradable carriers on the in vivo behavior of human adipose precursor cells. *Plast Reconstr Surg* 108:411-420.

Watson, J. (1959). Some observations on free fat grafts: With reference to their use in mammoplasty. *Br.J.Plast.Surg.* 12, 263-274. *Br J Plast Surg* 12:263-274.

Wyre, R. M., and Downes, S. (2002). The role of protein adsorption on chondrocyte adhesion to a heterocyclic methacrylate polymer system. *Biomaterials* 23:357-364.

Yamamoto, N., Isobe, M., Negishi, A., Yoshimasu, H., Shimokawa, H., Ohya, K., Amagasa, T., and Kasugai, S. (2003). Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells. *J Med Dent Sci* 50:63-69.

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., and Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-4295.

Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-228.

9 Publikationen

Publikationen

D. von Heimbürg, K. Hemmrich, K. Cierpka, **S. Haydarlioglu**, N. Pallua. Optimization of the differentiation of preadipocytes in vitro. Differentiation, 73, 28 – 35, 2005

D. von Heimbürg, K. Hemmrich, **S. Haydarlioglu**, H. Staiger, N. Pallua. Comparison of Viable Cell Yield from excised versus Aspirated Adipose Tissue. Cells Tissue Organs, 178, 87 – 92, 2004

Zitierfähige Abstracts

K. Hemmrich, D. von Heimbürg, **S. Haydarlioglu**, N. Pallua. Die Kultivierung humaner Präadipozyten im autologen Serum bietet neue Perspektiven für die Rekonstruktion von Weichgewebsdefekten. Plastische Chirurgie 3 (Suppl. 1): 54, 2003

K. Hemmrich, **S. Haydarlioglu**, D. von Heimbürg, H. Staiger, N. Pallua. Comparison of viable Cell Yield from excised Adipose Tissue versus aspirated Adipose Tissue. Eur J Plast Sur, Vol. 2003

K. Hemmrich, **S. Haydarlioglu**, D. von Heimbürg, N. Pallua. Optimized Culturing and Differentiation of human Preadipocytes in human Serum offers new Chances for Adipose Tissue Engineering, Int J Art Org, Vol. 26, 2003 3 (Suppl. 1): 46, 2003

Vorträge

K. Hemmrich, M. Meersch, **S. Haydarlioglu**, D. von Heimbürg, N. Pallua. Rekonstruktion von Weichgewebsschäden durch Präadipozyten – in vitro und in vivo Aspekte. 122. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München 04/2005

K. Hemmrich, **S. Haydarlioglu**, D. von Heimbürg, N. Pallua. Stem Cells from Adipose Tissue cultured in human Serum offer new Chances for Tissue Engineering to treat extended Defects. VIII. Maastricht Medical Students Research Conference, 3.2004 (Vortragspreis)

K. Hemmrich, D. von Heimbürg, **S. Haydarlioglu**, N. Pallua. Die Kultivierung humaner Präadipozyten im autologen Serum bietet neue Perspektiven für die Rekonstruktion von Weichgewebsdefekten. 8. Jahrestagung der Vereinigung Deutscher Ästhetisch-Plastischer Chirurgen, Freiburg, 4. – 5.10.2003

K. Hemmrich, **S. Haydarlioglu**, D. von Heimbürg, N. Pallua. Comparison of viable Cell Yield from excised Adipose Tissue versus aspirated Adipose Tissue. VII. European Conference of Scientists and Plastic Surgeons (ECSAPS) Genf, Schweiz, 19. – 20.9.2003

K. Hemmrich, D. von Heimbürg, **S. Haydarlioglu**, N. Pallua. Optimized Culturing and Differentiation of human Preadipocytes in human Serum offers new Chances for Adipose Tissue Engineering. XXX. European Society of Artificial Organs ESAO Aachen, 3. – 6.9.2003

10 Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Prof. h.c. mult. Norbert Pallua danke ich für dieses interessante Thema und die Möglichkeit der Nutzung sämtlicher Mittel und Einrichtungen im Forschungslabor.

Herrn Prof. Dr. med. Dennis von Heimburg danke ich an dieser Stelle recht herzlich für die wertvollen Anregungen und die Betreuung zu Beginn dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. rer. nat. Harald Staiger gilt mein Dank für seine tatkräftige und fachlich fundierte Unterstützung.

Herrn PD Dr. med. Karsten Hemmrich danke ich besonders für die konstruktive Zusammenarbeit auf fachlicher, sowie menschlicher Ebene. Sein unerschöpfliches Engagement und seine Bemühungen leisteten einen wichtigen Beitrag für das Vorankommen dieser Dissertation.

Frau Prof. Benita Hermanns-Sachweh danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Des Weiteren gebührt mein Dank Frau Tanja Wollersheim und Herrn Dr. rer. nat. Georg Serov für die umfangreiche Einarbeitung in die Methoden der Zellkultur und ihre große Hilfe bei der praktischen Durchführung der Arbeit.

Für die Bereitstellung der Plasmaproben und für die hervorragende Zusammenarbeit danke ich Herrn Bauch und Frau Dr. Velten und den Mitarbeitern des Institutes für Transfusionsmedizin der RWTH Aachen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann Hayrettin Kocaarslan für ihre jahrelange Unterstützung und unermüdliche Geduld.

11 Erklärung zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei mir, **Sevinc Kocaarslan, Nordstrasse 55, 04105 Leipzig**, hinterlegt sind.