Untersuchungen zur Kryokonservierung humaner Adipozyten zur mehrzeitigen autologen Transplantation

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

vorgelegt von

Ingo Stoffels
aus Geldern

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr.med. Dr.univ.med. Prof.h.c. (RC) Norbert Pallua

Herr Universitätsprofessor
Dr.med. Joachim Weis

Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern

…in Liebe und Dankbarkeit...

Wer nicht gelegentlich auch einmal kausalwidrige Dinge zu denken vermag, wird seine Wissenschaft nie um eine neue Idee bereichern können.

Max Planck

Forschung ist das simple Vergnügen,
etwas zu finden, was man vorher nicht wusste.

Richard v. Weizsäcker

Einleitung 1
1.1 Der Weichgewebsdefekt 1
1.1.1 Verfahren der Weichgewebsaugmentation 1
1.2 Fettgewebstransplantation 2
1.2.1 Historischer Abriss 2
1.2.2 Aktuelle Verwendung 4
2 Grundlagen 7
2.1 Fettgewebe 7
2.1.1 Übersicht 7
2.1.1.1 Embryologie 7
2.1.1.2 Struktur 8
2.1.1.3 Aufgabe / Funktion 10
2.2 Kryokonservierung 12
2.2.1 Bedeutung der Kryokonservierung 12
2.2.2 Schädigungsmechanismen 13
2.2.3 Gefrierschutzadditive 16
2.2.3.1 Niedermolekulare Additive 16
2.2.3.2 Makromolekulare Gefrierschutzadditive 17
2.2.4 Kryokonservierung von Zellen und Zellverbänden 19
3 Fragestellung 21
4 Material & Methoden 22
4.1 Patientengut 22
4.2 Protokoll „Lipo-Filling“ 23
4.3 Versuche 25
4.3.1 Färbungen 25
4.3.1.1 Trypanblau 25
4.3.1.2 Fluoresceindiacetat/Ethidiumbromid 26
4.3.2 MTT 27
4.3.2.1 MTT-Toxizitätstest 29
4.3.3 XTT 29
4.3.3.1 XTT-Toxizitätstest 31
4.3.4 Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase 32
4.3.5 Mikroskopie 34

4.3.5.1 Lichtmikroskopie ... 34
4.3.5.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie ... 34
4.4 Kryokonservierung ... 34
4.4.1 Hydroxyethylstärke ... 35
4.4.2 Glycerol ... 36
4.4.3 Dextran ... 37
4.4.4 Polyvinylpyrrolidon ... 37
4.5 Statistik ... 38
5 Ergebnisse ... 39
5.1 Färbungen ... 39
5.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie ... 40
5.3 Lagerung ohne Kryokonservierung ... 48
5.4 Kryokonservierung ohne Kryoprotektiv ... 50
5.4.1 MTT ... 50
5.4.2 XTT ... 52
5.4.3 GPDH ... 54
5.5 Kroyokonservierung mit Kryoprotektiv ... 56
5.5.1 Hydroxyethylstärke ... 56
5.5.1.1 MTT ... 56
5.5.1.2 XTT ... 57
5.5.1.3 GPDH ... 59
5.5.1.4 Vergleich ... 61
5.5.2 Glycerin ... 63
5.5.2.1 MTT ... 63
5.5.2.2 XTT ... 65
5.5.2.3 GPDH ... 67
5.5.2.4 Vergleich ... 68
5.5.3 Glycerin, Dextran, Polyvinylpyrrolidon ... 70
5.5.3.1 MTT ... 70
5.5.3.2 XTT ... 72
5.5.3.3 GPDH ... 73
5.5.3.4 Vergleich ... 75
5.6 Vergleich der Kryoprotektive ... 77
5.6.1 Kontrolle versus Hydroxyethylstärke ... 77

5.6.1.1 MTT 77
5.6.1.2 XTT 78
5.6.1.3 GPDH 80
5.6.2 Kontrolle versus Glycerin 82
5.6.2.1 MTT 82
5.6.2.2 XTT 84
5.6.2.3 GPDH 86
5.6.3 Kontrolle versus Glycerin, Dextran, Polyvinylpyrrolidon 88
5.6.3.1 MTT 88
5.6.3.2 XTT 90
5.6.3.3 GPDH 91
5.6.4 Hydroxyethylstärke versus Glycerin 93
5.6.4.1 MTT 93
5.6.4.2 XTT 95
5.6.4.3 GPDH 96
5.6.5 Hydroxyethylstärke verus Glycerin, Dextran, Polyvinylpyrrolidon 98
5.6.5.1 MTT 98
5.6.5.2 XTT 100
5.6.5.3 GPDH 102
5.6.6 Glycerin versus Glycerin, Dextran, Polyvinylpyrrolidon 104
5.6.6.1 MTT 104
5.6.6.2 XTT 106
5.6.6.3 GPDH 108
5.7 Vergleich I-IV 110
5.7.1 MTT 110
5.7.2 XTT 111
5.7.3 GPDH 112
6 Diskussion 113
6.1 Färbungen 113
6.2 Elektronenmikroskopie 114
6.3 MTT 114
6.4 XTT 115
6.5 GPDH 116
6.6 Lagerung ohne Kryokonservierung 117

6.7 Kryokonservierung ohne Kryoprotektiv 119
6.8 Kryokonservierung mit Kryoprotektiv 121
6.8.1 Kontrolle versus Hydroxyethylstärke 121
6.8.2 Kontrolle versus Glycerin 122
6.8.3 Kontrolle versus Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidon 124
6.8.4 Hydroxyethylstärke versus Glycerin 126
6.8.5 Hydroxyethylstärke versus Glycerin Dextran und Polyvinylpyrrolidon 127
6.8.6 Glycerin versus Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidon 128
6.9 Abschließende Beurteilung 129
7 Zusammenfassung 133
8 Literaturverzeichnis 135
9 Anhang 157
9.1 Protokolle 157
9.2 Tabellen 161
9.2.1 MTT 161
9.2.2 XTT 163
9.2.3 GPDH 165
9.3 Materialien 167
9.3.1 Chemikalien 167
9.3.2 Geräte 167
9.3.3 Laborbedarf 168
9.4 Förderungen 170
9.5 Publikationen 171
9.6 Danksagungen 173
9.7 Curriculum vitae 174

Einleitung

1.1 Der Weichgewebsdefekt

Weichgewebsdefekte des menschlichen Körpers haben oft schwerwiegende Folgen für das ästhetisch-plastische Gesamtbild eines Menschen. Diese Weichteildefekte können vielfältige Ursachen haben. Neben angeborenen (z.B. Poland-Syndrom [245]) und progredienten Gewebedefekten (z.B. Lipatrophie, Romberg-Syndrom [218]) existiert die bedeutende Gruppe der erweiterten Substanzdefekte [302]. Diese beruhen vor allem auf den Folgen von Verletzungen und Operationen.

Während die angeborenen und idiopathischen Defekte durch Nichtanlage, Nichtausbildung und Rückbildung fehlen, kann es bei einem Trauma zu einer Wundheilung mit Ausbildung einer Defektheilung kommen. Die Haut wird bei diesen Traumen durch Granulationsgewebe mit anschließender Epithelisierung verschlossen und das entstandene Ersatzgewebe gleicht sich im Verlauf der Zeit der Umgebung an. Hierzu gegenteilig verhält es sich mit Verletzungen des Koriums und des Weichgewebes (Muskel, Fettgewebe und Faszie). An diesen Strukturen bleiben die Defekte dauerhaft sichtbar. Funktionell und ästhetisch kommt es zu Verlusten.

Vor allem die sichtbaren und entstellenden Defekte sind das Gebiet, dem sich die Weichgewebsaugmentation und damit die Plastische Chirurgie widmen.

1.1.1 Verfahren der Weichgewebsaugmentation

Eine Möglichkeit, die vorhandenen Gewebedefekte zu behandeln, ist der Plastischen Chirurgie mit der Gewebeaugmentation gegeben. Hierzu stehen aktuell eine Vielzahl verschiedener Verfahren zur Verfügung.

Das ideale Füllmaterial sollte folgende Eigenschaften vereinen: nicht-toxisch, nicht-infektiös, nicht-immunogen, nicht-wandernd, nicht-karzinogen, haltbar, einfach zu handhaben, ausreichend verfügbar und preisgünstig [152].

Mit Hilfe dieser Grundsätze wurde versucht, das ideale Füllmaterial zu entwickeln. Zum Einsatz kamen und kommen teilweise noch, autogenes Kollagen (Isolagen®) [80], allogenes Kollagen (Dermalogen®) [144], aber auch bovines Kollagen (Zyderm®) [60]. Weitere Materialien sind das Fibrel [256], Silikonkugeln (Bioplastique™) [72,77], Polymethylmethacrylat (Artecoll®) [164], Polytetraflourethylen (SoftForm®) [159], flüssiges

Silikon [6] und Gore-Tex Fäden [262]. Jedoch erfüllt keines der erwähnten Materialien alle gestellten Anforderungen [302].

Das autologe Gewebe scheint daher derzeit das beste Material zur Versorgung von Weichgewebsdefekten zu sein, denn das zu transplantierende Gewebe sollte dem ursprünglichen Gewebe in möglichst vielen Punkten entsprechen [200]. Von den vorhandenen Gewebearten hat das Fettgewebe die meisten Vorteile. Es ist durch die Liposuktion leicht zu gewinnen, in den meisten Fällen reichlich vorhanden, ein autologes Transplantat, verursacht keine immunologischen Komplikationen, kann unter alle Falten und Vertiefungen bzw. Impressionen implantiert werden, ist weich und formbar, eine Wiederholung der Implantation ist möglich und die Kosten sind vergleichsweise niedrig [163,302].

1.2 Fettgewebstransplantation

1.2.1 Historischer Abriss

Die erste Beschreibung einer Autotransplantation humanen Fettes wurde 1889 von Van der Meulen getätigt [299]. In der von ihm beschriebenen Operation wurde das Omentum zusammen mit freiem Fett zwischen Leber und Diaphragma transplantiert. Neuber war 1893 der Erste, der freies Fett zur Füllung von Weichgewebsdefekten transplantierte [222]. Neuber war es auch, der herausfand, dass nur kleine Transplantate auf Dauer einen Erfolg zeigen.

Im Jahr 1910 schrieb Lexer das erste Mal über die Verwendung eines Fetttransplantates zur Anwendung im Bereich des Gesichtes [169]. Er füllte mit einem 12 x 12 cm Stück Gewebe eine Vertiefung im infraorbitalen Bereich eines Patienten. Bei einem weiteren Patienten verwendete er ein solches Transplantat zum Aufbau des Kinns.

Weitere Berichte zeigen ebenfalls Anwendungsbereiche im Gesicht auf. So werden Behandlungen von Vertiefungen und Narben im Bereich des Zygomaticus-Bogens, des Musculus temporalis [210], der Malar-Region [70,71], des Frontal-Bereichs, des Parotis-Bereiches [307] und der Orbital-Region [275,296] beschrieben. Ebenso wie die Behandlung von halbseitigen und vollständigen Gesichts-Atrophien [19,69,71,136,162,167,193,210-213,216,219,230,280,308,313].

Aber nicht nur im Gesicht fand und findet die Fettgewebstransplantation Anwendung. Die Fallbeschreibung von Czerny aus dem Jahre 1895 zeigt die erste Verwendung

von Fettgewebe zur Brustrekonstruktion auf [54]. Und auch hier finden sich weitere Autoren, die über die Verwendung von freiem Fettgewebe zur Teil- oder Voll-Rekonstruktion der Brust berichten [103,115,143,168,286,312].

Nicht nur aus plastisch-ästhetischen Gründen wurde eine freie autologe Fettgewebetransplantation vorgenommen. Es finden sich Beschreibungen über die Anwendungen in der Orthopädie, zur Füllung von osteomyelitischen und aseptischen Knochendefekten oder zur Behandlung der Gelenks-Ankylose [a] [34,36,43,78,85,99,116,121,133,145,161,187,233,257,265]. In der Neurochirugie findet der genannte Gewebetransfer Anwendung in der Behandlung von Defekten des Schädels [250,251], der Dura und des Gehirns [157,250]. Fettgewebe wurde auch verwendet, um Nerven nach Neurolyse zu umhüllen [9,64,117,147].

Thoraxchirurgen haben das Fett in der Behandlung von Thoraxwand-, Pleura- und Lungendefekten zum Einsatz gebracht [8,156,165,223,288,295].

Andere Chirurgen wiederum haben das Autotransplantat zur Behandlung von Augen-Enukleationen [11,12,142,160,174,301,314], chronischen Frontalsinusitiden [32,86,93,107,191,240,292], Defekten nach Mastoid-Eingriffen [14,16,59,95,171,287] und kosmetischen Defekten des Ohres [66,155] verwendet.

In der Allgemeinchirurgie kommt es ebenfalls zur Verwendung von Fettgewebetransplantaten. Für intraabdominelle parenchymatöse Blutungen [31,242], peritoneale Adhäsionen [123,181,188,258] und abdominale Wanddefekte [42] wurde Fettgewebe benützt. Weitere Anwendungsbereiche waren die Tenolyse [67,241], perinovaginale Wunden [88], Prostatektomiedefekte [68], Narben [98] und subdermale Augmentationen [52].

Das Verhalten der transplantierten Fettzellen ist seit jeher ein kontrovers diskutiertes Faktum. Die wissenschaftliche Auseinandersetzung wird von zwei Theorien bestimmt. Die „host cell replacement theory“ von Illouz aus dem Jahre 1988 propagiert das Absterben aller transplantierten Zellen und die anschließende Einwanderung von Histiozyten und deren Umwandlung in Adipozyten durch die Aufnahme der Lipidreste aus dem Zelldetritus [132]. Die zweite, derzeit bevorzugte Theorie von Peer sagt aus, dass die verpflanzten Fettzellen diesen Vorgang zum Teil überleben - „cell survival theory“ - und somit einen Augmentationseffekt zur Folge haben [239,309].

[a] Ankylose, knöcherne oder kapsuläre Gelenkversteifung mit vollständigem Bewegungsverlust

1.2.2 Aktuelle Verwendung

In der aktuellen Literatur wird regelmäßig über den Einsatz von freien autologen Fettgewebstransplantaten berichtet. Dabei sind die Indikationen weit gestreut:

a) Austausch von fettigem Gewebe
    a. fehlende Fettpolster: buccal oder periorbital [68,201]
    b. „Divots“ durch Liposuktion oder Panniculitis [58]
    c. Atrophien induziert durch Steroide oder Insulin [5]
b) Narben
    a. Erkrankungen: Akne, Lupus oder Tuberkulose [4,76]
    b. Trauma oder chirurgische Narben [15,58]
c) Konturverbesserung
    a. Kinn [75]
    b. Wangenknochen[261]
    c. Kieferlinien[261]
    d. Brust [15,106]
    e. Muskel [15,225]
    f. Bein [15]
d) atrophische Veränderungen an
    a. Augenlidern [38]
    b. Lippen [18]
    c. Händen [15,48]
    d. Wangen [239]
    e. Stimmlippen [207]
    f. Ohrläppchen [91]
    g. bestrahlte Haut [39]
e) Furchen und Linien
    a. Glabella-Linien [74]
    b. „Krähen-Füsschen“ [91]
    c. naso-labial Falte [74]
f) autologes Füllmaterial
    a. Penisaufbau [118]
    b. Vulvaaufbau [118]

g) allogene Füllmaterialien
    a. Kanten durch Silikon- oder Akryl-Implantate [58]
h) funktioneller Gewebeersatz
    a. Sphinkterinkontinenz [272]

Wie diese Liste verdeutlicht, liegen die Indikationen überwiegend im Bereich der ästhetisch-plastischen Chirurgie.

Die Gewinnung der Transplantate erfolgt durch eine Vielzahl verschiedener Techniken [40,50,148,228,269].

Es sollte allerdings berücksichtigt werden, dass das verwendete Verfahren möglichst atraumatisch für die zu transplantierenden Fettzellen sein muss [226]. Dieser Forderung widerspricht die Verwendung von Fett, das bei einer regulären Liposuktion mit Absaugsystemen durch einen hohen Sog gewonnen wurde.

Die Verwendung einer 10 ml Spritze hat sich in diesem Zusammenhang als sehr günstig für die Limitierung des Sogs erwiesen [3]. Zusammen mit einer einfachen 3,5 inch/14-Gauge Nadel mit 45° Bogen an der Spitze oder einer Coleman-Kanüle Typ I [50] ist die Gewinnung geeigneter Transplantate sehr gut möglich [190].

Die Herkunftsorte des Fettgewebes sind hauptsächlich die Oberschenkel (innen und außen), Abdomen und Hüften [91], Gesäß und Knie [3].



Abbildung 1; Liposuktions-Besteck nach Coleman[49]. *Aspirationskanüle Nr. 1, Applikationskanüle groß, Applikationskanüle klein, Spritze 10ml, Zentrifugationskolben, v.l.n.r.*

Auch in der sich anschließenden „Weiterverarbeitung“ bestehen gravierende Unterschiede. So werden durch einige Autoren „Waschverfahren“ beschrieben, die vorhandene inflammatorische Mediatoren entfernen sollen [207], andere postulieren eine Konzentrierung der Adipozyten [38,76] und wieder andere beschreiben den Zusatz verschiedener Substanzen wie Vitamin E, Steroidhormone [20-22,70], Insulin [71,131,224] oder „fibroblast growth factor“ [73]. Im Bezug auf diese Verfahren muss allerdings festgestellt werden, dass sie keine signifikant besseren Ergebnisse bringen [40,302].
Als richtig und wichtig sollte der Schritt der Trennung der „Fettläppchen“ von Blut und Zellresten bzw. Lipiden angesehen werden [50]. Hierzu kann eine Zentrifuge dienen, die mit einer kurzen und schonenden Prozedur [27,30,40] das Aspirat in drei Fraktionen aufteilt. Im Überstand finden sich die Zellreste und die Lipidtröpfchen der zerstörten Adipozyten, im Unterstand lagert sich das eventuell vorhandene Blut ab und in der mittleren Sektion befinden sich die Adipozyten in den Fettläppchen [27].
Diese Fettzellen können nun transplantiert werden. Am häufigsten beschrieben ist die Transplantation in die Subdermis [97]. In der Literatur wird hierzu bevorzugt die Verwendung von stumpfe Injektionsnadeln der Größen 14-18 Gauge beschrieben [273].

Das derzeitige Hauptproblem der Fettgewebstransplantation ist der Verlust von ca. 50 bis 70% des primären Augmentationsergebnisses [76,148,226,238,239,303,304]. Eine Wiederholung der Behandlung scheint unter diesen Voraussetzungen unumgänglich, um ein dauerhaft zufriedenstellendes Ergebnis erzielen zu können [218].

Eine vorübergehende Lösung dieses Problems könnte die Kryokonservierung und die dadurch sehr gut zu ermöglichende, mehrzeitige Transplantation des Fettgewebes darstellen.

2 Grundlagen

2.1 Fettgewebe

2.1.1 Übersicht

Fettgewebe, das vor allem aus Fettzellen (Adipozyten) besteht, macht beim normalgewichtigen erwachsenen Mann ca. 10-20% und bei der erwachsenen Frau ca. 15-25% des Körpergewichtes aus [23,65,297]. Die Adipozyten finden sich einzeln, häufiger aber in kleineren oder größeren Gruppen.

Fett ist ein metabolisch aktives Gewebe hinsichtlich Aufnahme von Fettsäuren und intrazellulärer Synthese, Speicherung und Mobilisierung von Neutralfetten.

Fettgewebe kommt in zwei Formen vor, als weißes und als braunes Fettgewebe. Im adulten Organismus liegt im Wesentlichen weißes Fettgewebe vor, das als Speichergewebe für Neutralfette (Speicherfett), als mechanisch wichtiges Füllgewebe (Baufett) und als Kälteschutzgewebe (subkutanes Fettgewebe) dient. Braunes Fettgewebe kommt noch vermehrt beim Säugling und im besonderen Maße bei bestimmten Tierspezies (Nagetiere und Winterschläfer) vor. Im adulten Organismus befindet sich braunes Fettgewebe nur noch an wenigen Orten (z.B. im Mediastinum und um die Aorta). Braune Fettzellen können durch Oxidation von Fettsäuren Wärme produzieren.

Ein schlanker Erwachsener hat durchschnittlich 8 kg Fettgewebe (etwa 25 x 10^9 Fettzellen); rechnerisch ist dies bei einem mittleren Energieverbrauch von 8400 kJ pro Tag ein Energiereservoir für 37 Tage. Jede Fettzelle enthält durchschnittlich 0,3 µg Fett, das bis zu maximal 1,6 µg zunehmen kann [264].

2.1.1.1 Embryologie

Fettzellen entstehen vor allem pränatal (ab der 4. – 8. Embryonalwoche) [65] und postnatal in den ersten zwei Lebensjahren aber auch präpubertal. Ihre Herkunft geht auf pluripotente mesenchymale Stammzellen, Adipoblasten [37] zurück, die jedoch morphologisch kaum zu erfassen sind, da keine Marker bekannt sind, durch die sie sich von anderen mesenchymalen Zellen unterscheiden lassen. (Lediglich ein PCR-Scan könnte frühzeitig einen Unterschied aufzeigen.) Sie befinden sich vor allem in der Umgebung von Blutgefäßen.

Auch über die Umwandlung von Adipoblasten zu frühen Präadipozyten ist wenig bekannt. Verbunden ist dieser Vorgang jedoch mit dem Auftreten von Lipoproteinlipase und einzelnen Lipidtropfen auf einer Seite der Zelle, denen sich später weitere auf der Entgegengesetzten hinzufügen. Nach wenigstens einer Zellteilung beginnt dann unter hormonellem Einwirken und dem Einfluss verschiedener Serumfaktoren die weitere Differenzierung der Zelle. Wirksame Hormone sind vor allem das Wachstumshormon [96,104,305] und Glukokortikoide [92,101,111,217,252,259,289] sowie das Insulin [41,100,111,217,259,289] und Trijodthyronin [61,108,111,252,267,271,289,310], aber auch IGF-I [61,227,249,276], EGF [112,180,267,300], TGF-β [170,243,270,278,300], PDGF [112,114,221,267], IL-2 [100,140,231,237]. Es entstehen späte Präadipozyten und danach Adipozyten, die sich nicht mehr teilen [102]. Während der Adipozytenbildung verschmelzen die anfänglich isoliert gelegenen Fettanansammlungen in der Zelle zu einem großen, für univakuoläre Fettzellen typischen Fettropfen.
Die ersten Fettzellen des menschlichen Fötus entstehen im buccalen Bereich des Gesichts [244].

2.1.1.2 Struktur

Fettzellen treten einzeln oder in Gruppen im faserarmen (lockeren) Bindegewebe auf und sind damit nahezu ubiquitär im Organismus verbreitet. Fettgewebe im engeren Sinn besteht aus einer größeren Anzahl von Fettzellen, die sich zu läppchenartigen Zellverbänden organisieren. Dabei wird jede einzelne Fettzelle von einer Basallamina und von retikulären Bindegewebsfasern umschlossen [244].
Lichtmikroskopisch besitzen die einzeln liegenden Fettzellen meist eine rundliche polyglonale Form. Die Zelle wird im Wesentlichen von einem großen Fettropfen ausgefüllt, der das Zytoplasma in einen schmalen peripheren Saum verlagert und den Zellkern abplattet und an den Rand drängt. Je nach Größe des Fettropfens haben Fettzellen einen Durchmesser zwischen 70 und 120 µm [65].
Univakuoläres Fettgewebe ist reich vaskularisiert. Durchschnittlich rechnet man mit einer Kapillare auf eine Fettzelle. Dies ist ein Beweis für die hohe Stoffwechselaktivität der Zellen [264].

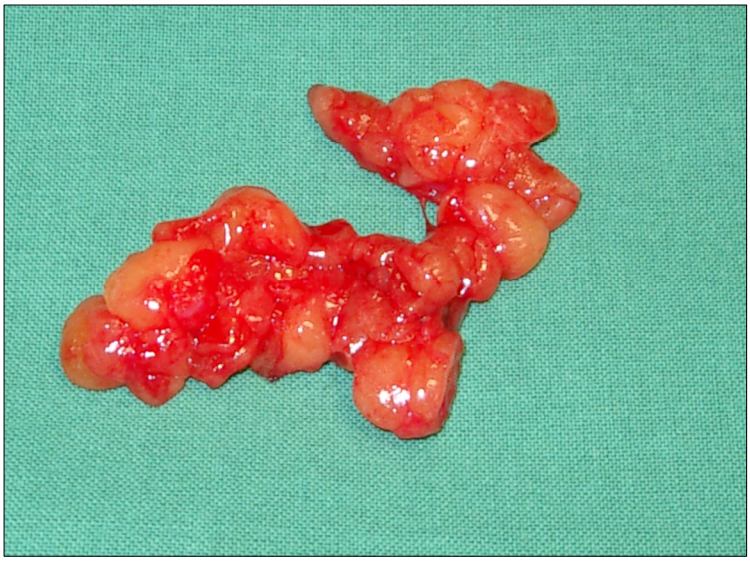

Abbildung 2*; Fettgewebeläppchen nach Aspiration mit Coleman-Kanüle Nr. 1*

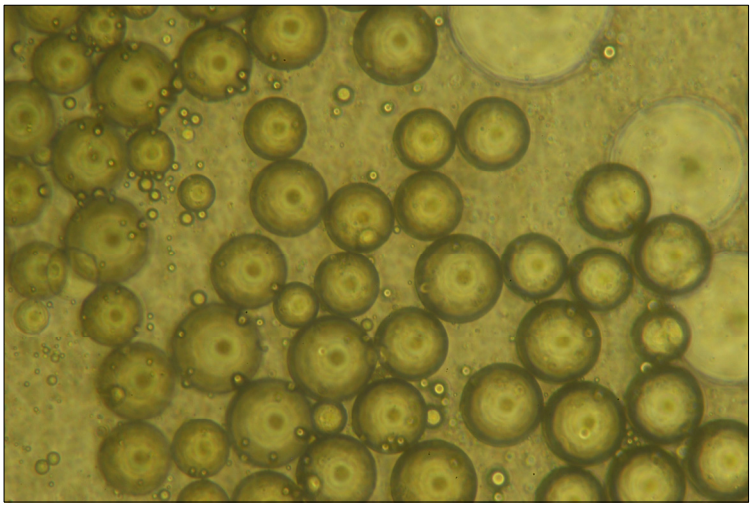

Abbildung 3*; Adipozyten (Verg.: x100)*

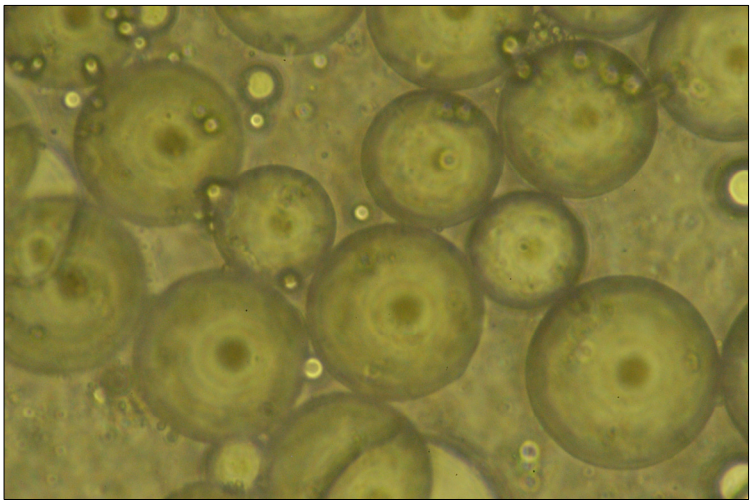

Abbildung 4*; Adipozyten (Vergr.: x500)*

2.1.1.3 Aufgabe / Funktion

Neben seiner Bedeutung als Kälteschutz (subkutanes Fettgewebe) hat Fettgewebe mechanische Funktionen (sog. Baufett) und bildet vor allem ein Energiedepot (sog. Speicherfett). Weißes Baufett kommt subkutan im Handteller und Fußsohle, im Bereich von Kniegelenk und Gesäß, als Orbitalfett und Wangenfettpfropf vor. Fettgewebe hat hier mechanische (polsternde) Funktionen. Dieses Baufett wird nur bei extremen Hungerzuständen oder extremer Abmagerung im Verlauf schwerer Erkrankungen (Kachexie) abgebaut.
Das übrige Fettgewebe stellt die Speicherform von weißem Fett dar. Es kommt vermehrt subkutan, im großen Netz und um den Dickdarm vor. Dieses Fett ist ein wichtiger Energiespeicher des Organismus. Bei einem Überangebot von Nährstoffen (vor allem Fett) wird vermehrt Fett in Fettzellen gespeichert (Volumenzunahme des Fettgewebes).

Weitere Aufgaben/Funktionen:

a) Drüsenfunktion: u. a. Östrogen [264], Leptin [35,44], TNFα [124], Angiotensin II [56]
b) Wasserspeicher [264]
c) Aufnahme von Fettsäuren und Speicherung von Triglyzeriden [45]
d) Aufnahme und Metabolisierung von Glucose [45,192]
e) Mobilisierung von Triglyceriden, Freisetzung von Fettsäuren [102]
f) mechanischer Schutz innerer Organe [264]
g) Isolierung des Körpers und Schutz vor Wärmeverlusten [65]
h) Körperformung [302]

Die Funktionen des Fettes im Stoffwechsel sind bis heute nicht vollständig geklärt.

Zusammengefasst bedeutet dies: Fettzellen sind metabolisch sehr aktiv; ständig laufen Lipogenese und Lipolyse nebeneinander ab (Halbwertszeit für den Fettumsatz im Depotfett 2-3 Wochen [264]); die Regulation der metabolischen Aktivität der Fettzellen ist vor allem dem Wechselspiel zwischen lipolytisch (Katecholamine, Glukagon) und antilipolytisch (Insulin) wirksamen Hormonen unterworfen. Hinzu kommt die durch Noradrenalin vermittelte Lipolyse durch das sympathische Nervensystem.

Bezüglich der Funktion unterscheiden sich die Adipozyten und ihre Vorläuferzellen nicht nur an den gleichen Körperregionen unterschiedlicher Individuen, sondern auch an verschiedenen Regionen desselben Individuums [23-25,89,109,110,113,306]. Eine Zunahme des Alters verändert ebenfalls die Sensitivität der Zellen für bestimmte Botenstoffe [25].

Eine weitere Beobachtung zeigt, dass Präadipozyten, entnommen von unterschiedlichen Regionen eines Körpers, auf Stimulation unterschiedlich, entsprechend ihrer spezifischen Funktion, reagieren [2].

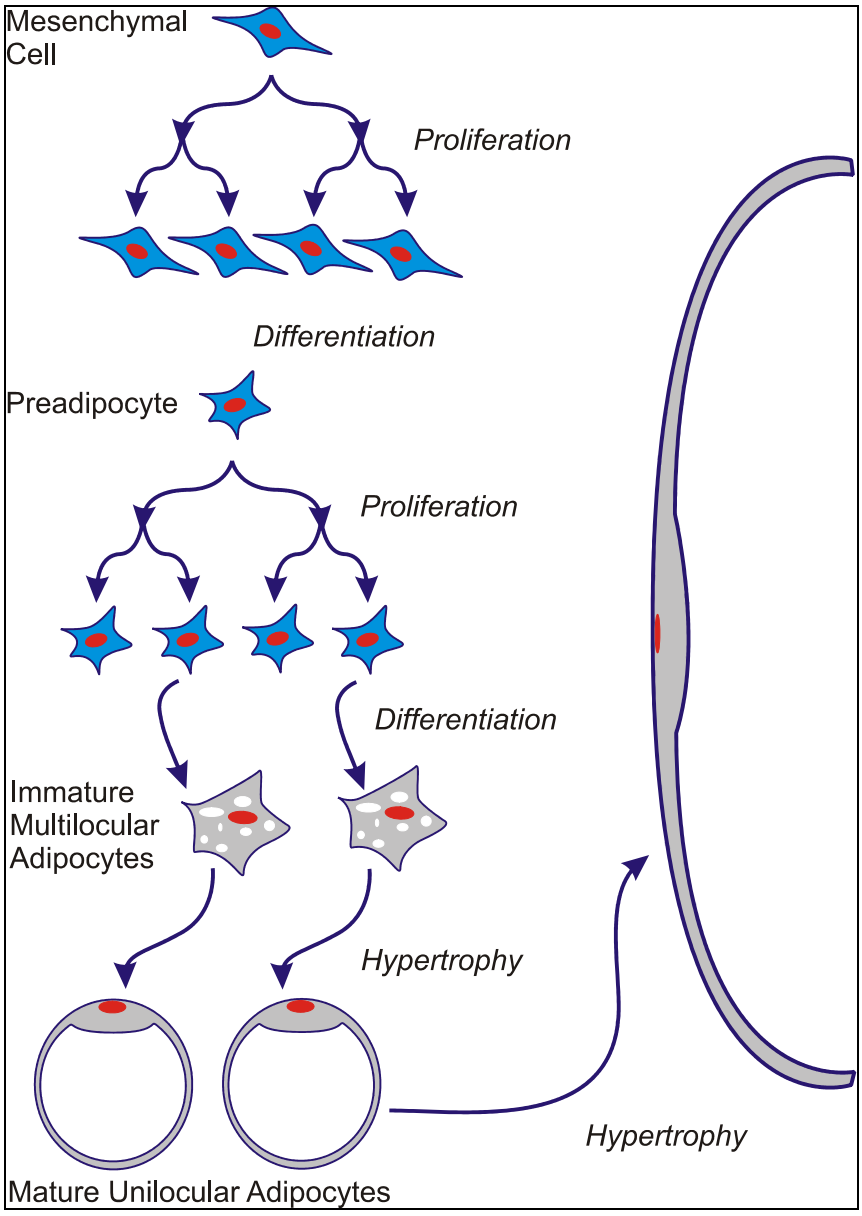

Abbildung 5: ***Adipogenese*** *(University of Illinois, USA [229])*

2.2 Kryokonservierung[b]

2.2.1 Bedeutung der Kryokonservierung

Die Kryobiologie ist eine multidiziplinäre Wissenschaft, die sich mit dem physikalischen und biologischen Verhalten von Zellen und Geweben bei niedrigen Temperaturen (besonders unter dem Gefrierpunkt von Wasser, 0°C) und bei gleichzeitiger Erhaltung der Vitalität beim Auftauen, beschäftigt. Der Metabolismus der lebenden Zellen wird bei niedrigen Temperaturen deutlich herabgesetzt [196], eine Tatsache, die die „Lang-Zeit-Lagerung" von Zellen und Geweben für wissenschaftliche Forschung ermöglicht, aber auch im medizinisch-klinischen Alltag bei Bluttransfusionen, Knochenmarktransplantationen und In-vitro-Fertilisationen Anwendung findet [90].

Die Schritte der Kryopreservation können wie folgt zusammengefasst werden:

1) Zugabe der kryoprotektiven Reagenzien
2) Kühlen der Zellen/Gewebe bis zur Lagerungstemperatur
3) Lagerung der Zellen
4) Aufwärmen der Zellen
5) Entfernen der kryoprotektiven Reagenzien von den Zellen/Gewebe

Als einfachstes System können frei suspendierte Zellen betrachtet werden. Hierbei befinden sich Zellen in einer Lösung, in der sie sich frei bewegen und ausdehnen bzw. schrumpfen können. Das Anwendungsspektrum der Kryokonservierung suspendierter Zellen ist sehr umfassend und wird in Zellkulturlabors routinemäßig ausgenutzt. Zunehmend wird aber auch versucht, komplexere Systeme wie Zellverbände, Gewebe oder komplette Organe zu kryokonservieren. Als Beispiel für Gewebe können Herzklappen, Blutgefäße oder Oozyten angeführt werden [10,53,202,236,260,283,294]. Auch Spalthaut und kultivierte Epidermiszellen können kryokonserviert werden [128,139,149,220,315,316]. Bei Organen wie Leber [26,183,184] oder Niere [137,154] gelingt bisweilen keine längerfristige erfolgreiche Konservierung durch Kälte [138].

[b] Kryokonservierung: Kry-: Wortteil mit der Bedeutung Frost, Eiskälte; von gr. krúoç.

2.2.2 Schädigungsmechanismen

Um die basalen Vorgänge und die sich hieraus ergebenden Schädigungsmechanismen bei der Kryokonservierung erklären zu können, soll zunächst ein einfaches System betrachtet werden [234]. Hierzu bietet sich eine isotone Kochsalzlösung an (**Abbildung 6**). Wird diese Lösung abgekühlt, so kommt es in der Regel zur so genannten „Unterkühlung". Dies bedeutet, dass die Lösung nicht bei ihrer Gleichgewichtserstarrungstemperatur mit der Kristallisation beginnt, sondern zunächst weiter abkühlt, ohne dass sich Kristalle ausbilden. Schließlich wird die Wahrscheinlichkeit für eine Nukleation in diesem thermodynamisch instabilen Zustand immer höher und es bilden sich Eiskristalle.

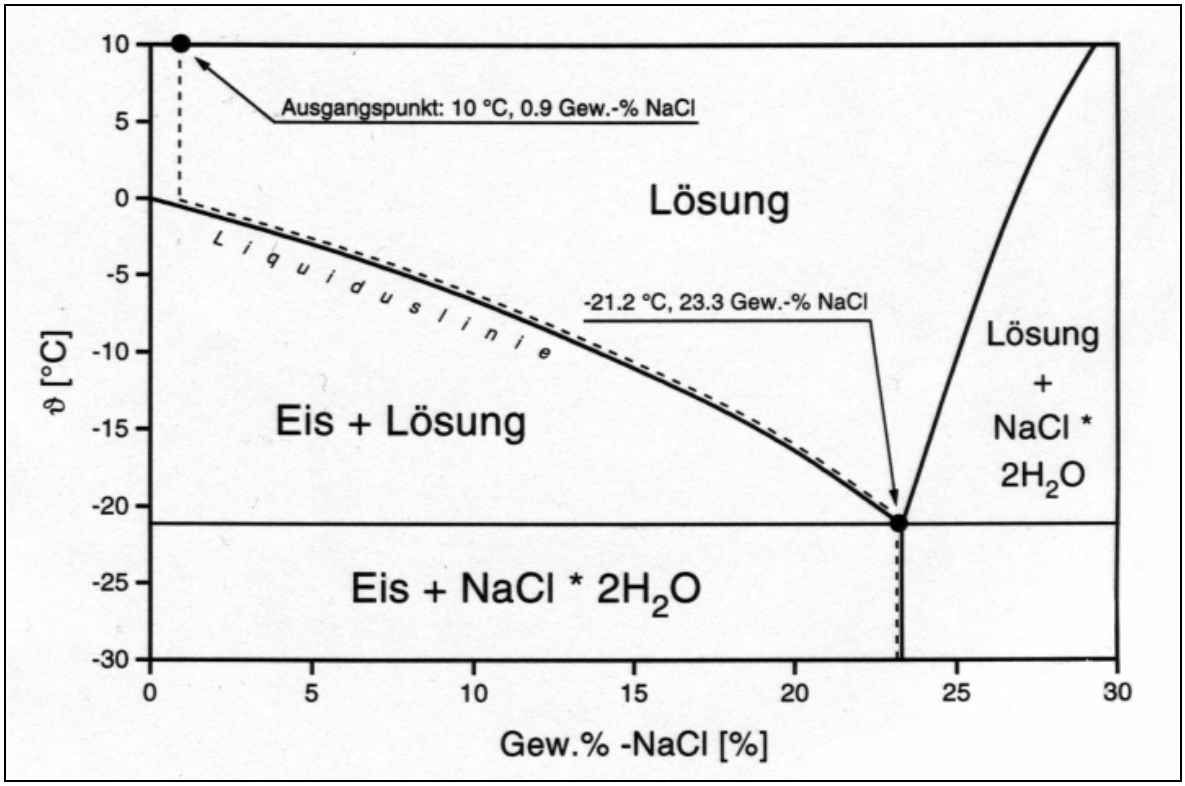

Abbildung 6: *Phasendiagramm für das System NaCl-H_2O* [234]

In die Eiskristalle werden praktisch keine gelösten Teilchen eingebaut; sie bestehen aus nahezu reinem Wasser. Dadurch kommt es zu einem Konzentrationsanstieg der Salze in der noch nicht erstarrten Lösung zwischen den Eiskristallen. Die Zellen, die sich ebenfalls in der flüssigen Phase befinden, erfahren so einen osmotischen Gradienten. Da die Zellmembran semipermeabel ist, d. h. für Wasser durchlässig,

nicht aber für die gelösten Salze, kommt es zu einem Schrumpfen der Zellen, da das Wasser über die Zellmembran ausströmt.

Entgegen des populären Glaubens, die Herausforderung der Kryokonservierung seien die niedrigen Temperaturen während der Lagerung, ist die richtige Erklärung für die Schäden während der Lagerung eine Andere. Es ist vielmehr eine „Zwischenzone“ bei -15 bis -60°C, die die Zellen zweimal durchqueren müssen [94]. Einmal während des Einfriervorganges und ein weiteres Mal beim Auftauen [196]. Wenn die Zellen auf ca. -5°C herabgekühlt wurden, sind sowohl die Zellen selbst, als auch das sie umgebende Medium „unterkühlt“ und ungefroren. Zwischen -5°C und -15°C kommt es zur Eisbildung im Medium.

Das unterkühlte Wasser in den Zellen hat per definitionem ein größeres chemisches Potential als das teilweise gefrorene Medium [94].

In Abhängigkeit von der Kühlrate können prinzipiell zwei Schädigungsmechanismen auftreten. Bei zu geringen Kühlraten bewirkt der lange Zeit einwirkende osmotische Gradient ein zu starkes Schrumpfen der Zelle und die im Zellinneren erreichte hohe Salzkonzentration führt zu irreversiblen Schädigungen der Zelle. Bei zu hohen Kühlraten verbleibt ein relativ hoher Wasseranteil in der Zelle, da der Zelle nicht genügend Zeit bleibt, den osmotischen Gradienten durch Wasserabgabe auszugleichen. Durch diesen hohen Wasseranteil besteht eine hochgradige Wahrscheinlichkeit für intrazelluläre Eisbildung, die ebenfalls zellschädigende Wirkung hat. Bei der Entwicklung eines geeigneten Kryokonservierungsprotokolles muss deshalb ein mittlerer Kühlratenbereich gefunden werden, bei dem die Zellen weder zu stark schrumpfen noch intrazelluläres Eis bilden. Diese beiden Schädigungsmechanismen wurden von Mazur in der so genannten „Zwei-Faktoren-Hypothese“ zusammengefasst [197].

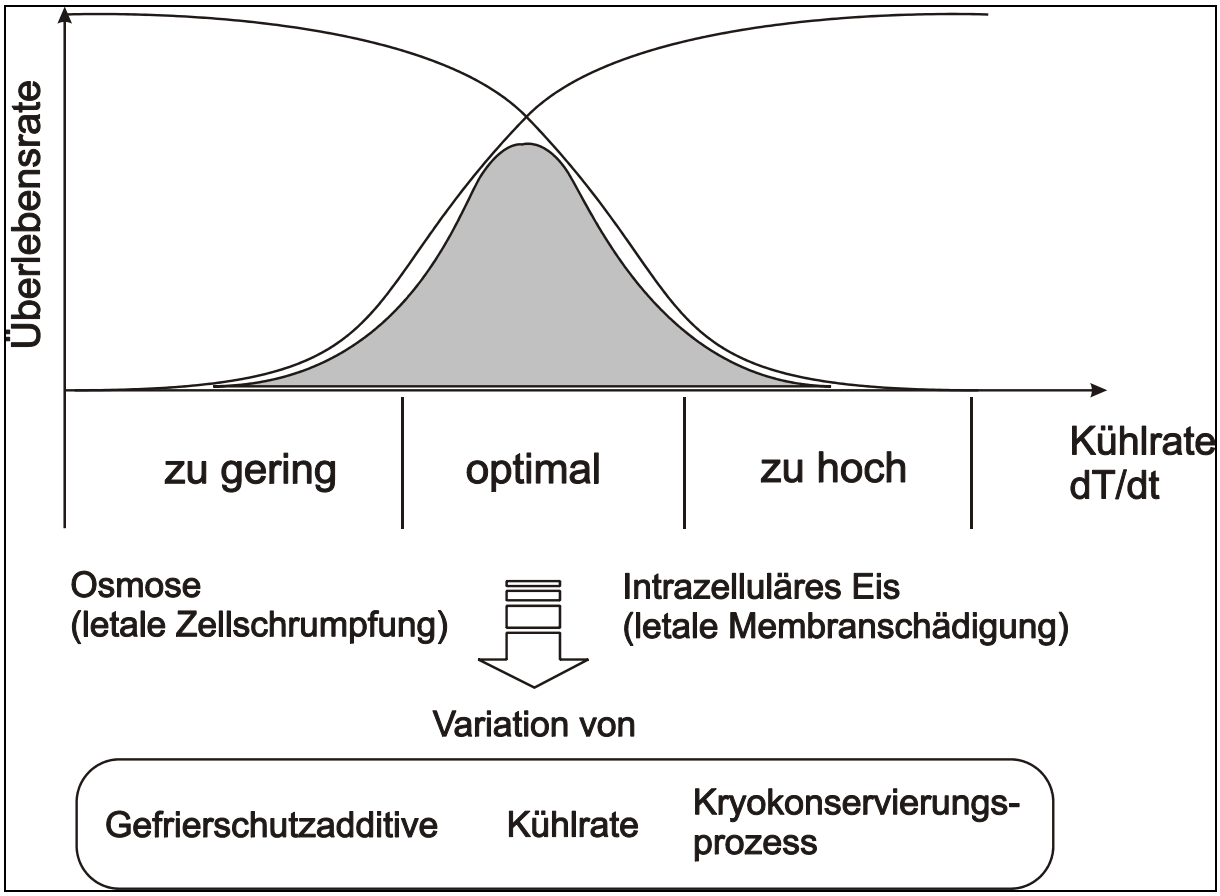

Abbildung 7: ***Zwei-Faktoren-Hypothese nach Mazur (1972).*** *Es gibt einen optimalen Kühlbereich, der sowohl Schädigung durch zu langsame Kühlraten (letale Zellschrumpfung) als auch zu hohe Kühlraten (intrazelluläre Eiskristallbildung) vermindert. Durch Variation der Parameter lässt sich der für eine bestimmte Zellart optimale Kühlraten Bereich finden und realisieren.*[234]

Ein weiterer kritischer Schritt bei der Kryokonservierung von Zellen ist das Auftauen. Erfolgt das Auftauen mit einer zu geringen Rate, so besteht die Gefahr der Rekristallisation. Dies bedeutet, dass Kristalle, die während des Abkühlvorgangs beim Erreichen einer bestimmten Temperatur ihr Wachstum eingestellt haben, beim Wiedererwärmen erneut weiter wachsen können, wodurch Salze eventuell weiter aufkonzentrieren. Zudem kann das Problem der Devitrifikation [c] auftreten. Das ursprünglich glasartig erstarrte Gemisch im Inneren der Zelle beginnt im Laufe des Auftauens zu kristallisieren und schädigt durch intrazelluläre Eiskristallbildung die Zelle irreversibel.

[c] Vitrifizierung ist das Festwerden einer Flüssigkeit durch Erhöhung ihrer Viskosität während sie abgekühlt wird – wobei eine Kristallisation ausbleibt und somit ein amorphes Material entsteht. Das kann entweder durch extrem schnelles Abkühlen oder durch Zusätze, die die Kristallisation verhindern, erreicht werden; vom lateinischen vitrum (Glas)

Mahadevan untersuchte in einer umfangreichen Studie die optimale Auftautemperatur. Raten zwischen 9,2°C und 2140°C/min wurden mit Heizgeräten, Körperwärme, Raumtemperatur (5°C, 20°C und 37°C) und in Wasserbädern (5°C, 20°C, 37°C, 55°C und 75°C) angewendet. Die Resultate der Studie zeigten, dass das langsamere Erwärmen der Zellen bei einer Lufttemperatur von 20°C oder 35°C eine höhere Überlebensrate der kryokonservierten Zellen zur Folge hatte [186].
Da die optimalen Kühlraten im allgemeinen in einer isotonen Zellsuspension so hoch sind, dass sie technisch nur für sehr kleine Probenvolumina zu realisieren sind, setzt man Gefrierschutzadditive (Kryoprotektive) ein.

2.2.3 Gefrierschutzadditive

Durch die Zugabe von Gefrierschutzadditiven lässt sich die maximal erzielbare Überlebensrate steigern. Zudem wird der Bereich der optimalen Kühlrate zu niedrigeren und damit leichter realisierbaren Werten verschoben und zugleich der Bereich des Optimums verbreitert [119].
Gefrierschutzadditive werden in niedermolekulare und makromolekulare Additive unterteilt:

2.2.3.1 Niedermolekulare Additive

Niedermolekulare Additive sind dadurch gekennzeichnet, dass sie aufgrund ihres kleinen Molekulargewichts die Zellmembran passieren und so in die Zelle eindringen können. Dort ersetzen sie einen Teil des intrazellulären Wassers.
Der kausale Zusammenhang, warum diese Additive einen positiven Effekt auf die Zellüberlebensraten haben, ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch verschiedene Erklärungsversuche, die wissenschaftlich akzeptiert sind. Lovelock begründet die protektiven Eigenschaften permeierender Additive zum ersten Mal mit der Gefrierpunktserniedrigung, die diese Substanzen erzeugen [175,176]. Hierdurch werden zellschädigende Salzkonzentrationen erst bei niedrigeren Temperaturen erreicht, und die Zelle schrumpft weniger [195]. Zudem wird die Salzkonzentration in der noch nicht erstarrten Restlösung herabgesetzt [311]. Die Verlangsamung der Eiskristallisationskinetik setzt die Wahrscheinlichkeit für intrazelluläre Eisbildung herab. Ein weiterer Benefit der niedermolekularen Kryoprotektive ist die Stabilisierung der Zellmembran [120].

Die wohl am meisten verbreiteten Gefrierschutzadditive dieser Gruppe sind Dimethylsulfoxid (DMSO) und Glyzerin [28,175-178,205,246]. Sie werden für die Kryokonservierung der unterschiedlichsten Zellarten eingesetzt wie z.B. rote Blutkörperchen [182], Blutstammzellen [13], Endothelzellen [28], Keratinozyten [253,254], Spermatozoen [79,189,232] oder Eizellen [28,135,298]. Aber auch weniger bekannte Kryoprotektive wie Propandiol, Ethandiol (Ethylenglykol) oder Butandiol sind erfolgreich eingesetzt worden [28,277].

Die meisten Gefrierschutzadditive besitzen auch zellschädigende Eigenschaften. Bei ihrer Zugabe und beim Entfernen treten osmotische Gradienten auf, da die Membran für das Additiv weniger durchlässig ist als für Wasser. Die Zelle schrumpft oder schwillt, abhängig von der Zugabe oder der Entfernung des Additivs [198,268]. Kommt es in diesem Zusammenhang zum Überschreiten der Toleranzgrenzen der Zelle, so wird diese, ähnlich wie bei der Kryokonservierung, geschädigt [166]. Zum anderen können die Additive selbst zelltoxische Eigenschaften besitzen [81], die die Zellen trotz einer angepassten osmotischen Belastung schädigen. Dieser Effekt kann durch möglichst geringe Einwirkzeiten der Additive auf die Zellen vermindert werden. Dies steht allerdings im Widerspruch zu den vorher erwähnten Forderungen einer schonenden Zugabe bzw. Entfernung der Additive, da dies im allgemeinen eine schrittweise Erhöhung/Erniedrigung der Additivkonzentration beinhaltet, was zu einer Verlängerung der Kontaktzeiten führt. Ein geeignetes Protokoll berücksichtigt diese beiden entgegengesetzten Effekte.

2.2.3.2 Makromolekulare Gefrierschutzadditive

Makromolekulare Additive können aufgrund ihres hohen Molekulargewichts die Zellmembran nicht passieren. Die Schutzmechanismen sind bislang noch nicht endgültig geklärt. Farrant [84] begründet die Wirkungsweise u. a. mit den kolligativen Eigenschaften[d] dieser Substanzen.

Nicht-permeierende Kryoprotektive können die Zellmembraneigenschaften ändern [194]. Die Zellmembranen sollen durch die Zugabe der Additive permeabler für gelöste

[d] Eine kolligative Eigenschaft (von lat. colligere „sammeln“) bezeichnet in der Chemie eine Eigenschaft, welche nur von der Teilchenzahl, nicht aber von der Art der Teilchen bzw. deren chemischer Zusammensetzung abhängt. Beispiele hierfür sind die Siedepunkterhöhung und die Gefrierpunkterniedrigung im Falle des idealen Verhaltens einer Substanz (kein Elektrolyt) in einer Lösung, wobei hier der Van 't Hoff-Faktor maßgebend ist. Ursache ist, dass die gelösten Substanzen das chemische Potenzial des Lösungsmittels verringern. Auch bei Dampfdruck und osmotischem Druck handelt es sich um kolligative Eigenschaften.

Stoffe werden, so dass die osmotischen Zellreaktionen reduziert werden [203,204]. Zudem bewirken die Additive ähnlich wie die niedermolekularen Additive eine Herabsetzung der extrazellulären Salzkonzentration. Die Erhöhung der Lösungsviskosität vermindert das Diffusionsvermögen, was ebenfalls die Schrumpfung der Zellen während der Eisbildung herabsetzt. Körber [150] erwähnt zudem die absorptiven Eigenschaften der Makromoleküle, die so einen Teil des Wassers am Kristallisieren hindern [81,83]. Ein weiterer Mechanismus beruht auf einer potentiellen Membran- und Proteinstabilisierung [119,290].
Beispiele für makromolekulare Additive sind Hydroxyethylstärke (HES) [151], Polyvinylpyrrolidone (PVP) [185] oder Dextran[87,105,137,153]. HES ist bisher erfolgreich für die Kryokonservierung von Erythrozyten [235,279] und Knochenmarkstammzellen [263] eingesetzt worden. Außerdem hat HES den großen Vorteil, dass es aufgrund seiner Organismusverträglichkeit nach dem Auftauen nicht unbedingt ausgewaschen werden muss; d.h. mit HES kryokonservierte Zellen, die für eine Retransfusion bzw. Retransplantation in den Patienten gedacht sind, bedürfen nach dem Auftauen keiner weiteren Bearbeitung [208,209].

Zusammenfassend kann man urteilen, dass eine Vielzahl verschiedener Zellen einer ebenso großen Vielfalt unterschiedlicher und differenzierter Methoden zur Kryokonservierung bedarf. Die biophysikalischen und biologischen Grenzen der „Kältekonservierung“ sollten im Rahmen der folgenden Prinzipien definiert werden:

- Die Zellen müssen so eingefroren werden, dass kaum oder besser keine intrazelluläre Flüssigkeit gefriert [195].

- Die Zellen müssen in einer Weise aufgetaut werden, dass die ungefrorene intrazelluläre Flüssigkeit während des Auftauprozesses dauerhaft ungefroren bleibt und dass kleine Eiskristalle, die während des Einfriervorgangs entstanden sind, während des Auftauens klein bleiben [195].

- Auch unter Beachtung der oben aufgestellten Forderungen, wird eine große Zahl der Zellen diesen Vorgang ohne kryoprotektive Substanzen nicht unbeschädigt überleben. Die Additive müssen vor dem Einfrieren zugegeben und nach dem Auftauen entfernt werden, ohne durch ihre Anwesenheit ein

osmotisch wirksames Limit zu überschreiten. Die Substanzkonzentration selbst darf nicht toxisch sein [94].

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es auch unter Einhaltung der oben aufgestellten Forderungen zu einer Schädigung der Zellen kommen kann. Denn das Milieu, das die Zellmembran den Vorgang des Gefrierens unbeschadet überstehen lässt, sorgt nicht zwangsläufig auch dafür, dass die Zellorganellen dieses Geschehen tolerieren [94].

2.2.4 Kryokonservierung von Zellen und Zellverbänden

Die Kryokonservierung isolierter Zellen in mit Schutzadditiven versehenen Lösungen ist heute weitgehend möglich. Allerdings konnten bis heute keine geeigneten Verfahren entwickelt werden, die es ermöglichen, komplexere multizelluläre Systeme zu kryokonservieren [234]. Der Unterschied zwischen frei suspendierten Zellen und Zellen in Gewebeverbänden ist ihre räumliche Fixierung durch Zell-Zell-Kontakte. Da sich die Zellen nicht frei ausdehnen oder schrumpfen können und ihnen nur eine begrenzte Fläche zum Ausgleich osmotischer Gradienten zur Verfügung steht, werden speziellere Verfahren benötigt. Bei Geweben tritt zudem das Problem auf, dass im Inneren liegende Zellen Masse und Energie nicht direkt mit dem umgebenden Medium, sondern nur mit den umliegenden Zellen und dem Interstitium austauschen können. Es gibt grundsätzlich zwei Wege, auf denen die Kryoprotektive in die inneren Gewebeschichten gelangen können: Zell-Zell und Zell-Interstitium-Transport [62,63]. Das Kryoprotektiv diffundiert hierbei sowohl durch das Interstitium als auch von Zelle zu Zelle. Je nach Gewebetyp und –aufbau ergeben sich spezifische Diffusionszeiten, die zwischen einigen Sekunden und einigen Stunden differieren können [138]. Insbesondere die Zellen im Inneren sind durch die kleineren Diffusionsraten im Gewebe geringeren osmotischen Gradienten ausgesetzt, was wiederum zellschonend ist. Gleichzeitig sind aber wiederum längere Zeiten erforderlich, um die Gleichgewichtskonzentration des Kryoprotektives in allen Zellen zu erreichen. Dies ist wegen der möglichen Toxizität des Additivs kritisch [26].

Bei der Erstellung eines Protokolls für die mögliche Zugabe des Additivs muss zum einen die Konzentration möglichst niedrig gehalten werden, damit die außen liegenden Zellen nicht zu hohen Konzentrationen ausgesetzt sind. Zum anderen muss die Konzentration aber auch hoch genug sein, um die innen liegenden Zellen mit der minimal notwendigen Konzentration des Kryoprotektives, nach einer

möglichst kurzen Diffusionszeit, zu versorgen [234] (**Abbildung 8**). Zu diesem Zweck werden niedrigvisköse, wenig toxische Kryoprotektive und besondere Perfusionsverfahren entwickelt [82].

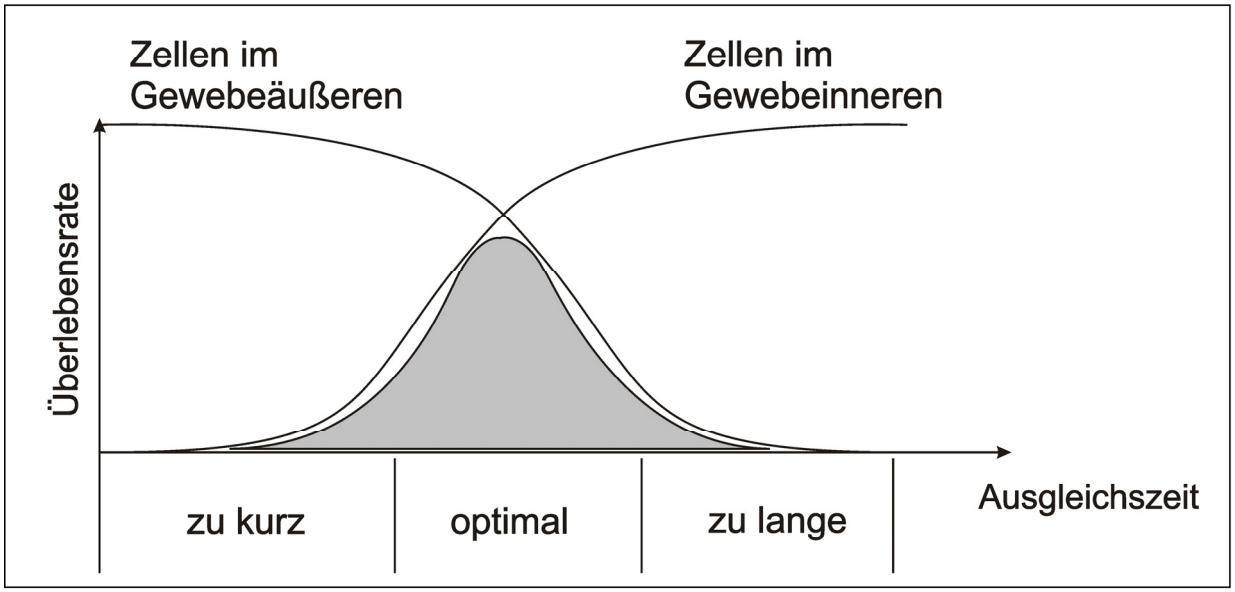

Abbildung 8: ***Einfluss der Zeit, die einem Gewebe zum Ausgleich des osmotischen Gradienten zur Verfügung steht, auf die Zellüberlebensrate.*** *Bei zu kurzer Ausgleichszeit sind die Konzentrationen im Gewebeinneren zu klein, um während der Kryokonservierung ausreichenden Schutz gewährleisten zu können. Bei zu langer Ausgleichszeit werden die Zellen, die außen liegen, durch die Toxizität des Additivs geschädigt.*[234]

Analog zu den Gradienten im Transport der schützenden Additive, treten auch Unterschiede bezüglich des Energietransports auf [154,199]. Dadurch wird es schwierig, hohe Kühl- und Erwärmungsraten insbesondere im Gewebeinneren zu realisieren. Die thermischen Gradienten erzeugen unter Umständen zudem so hohe mechanische Spannungen, dass Schäden im Gewebe entstehen können [82,83].

Neben den veränderten Bedingungen für Stoff- und Energietransport in Geweben werden zudem intrinsische Unterschiede zwischen isolierten Zellen und Zellverbänden diskutiert. Dazu zählen unterschiedliche Membranpermeabilitäten oder unterschiedlich hohe Affinitäten, intrazelluläres Eis zu bilden [130,158]. Acker vertritt die These, dass sich das entstehende intrazelluläre Eis gut durch die Zell-Zell-Kontakte im Gewebe ausbreiten kann [1].

Ein weiterer Faktor sind die Unterschiede der zu konservierenden Zellen, im Bezug auf ihre optimale Konservierbarkeit mit kryonischen Möglichkeiten. Wie aus dem vorangegangenen Text zu erkennen ist, lassen sich nicht alle Zellarten mit der gleichen Methode optimal einfrieren [125].

3 Fragestellung

Trotz günstiger Vorraussetzungen ist die Transplantation von Fettgewebe leider nicht frei von Problemen. Das sicher schwerwiegendste ist die Problematik des Volumenverlustes nach Implantation. Wie schon in „Einleitung“ und „Grundlagen“ angeführt, gibt es hierfür mehrere mögliche Gründe.

Zusammengefasst: die Versorgung der Zellen mit Blut, respektive mit Nährstoffen, findet nicht in dem Maße statt, wie sie vom Fettgewebe benötigt würde. Die Adipozyten nekrotisieren und werden durch Abbauvorgänge des Organismus (z.B. Makrophagen) entfernt.

Eine Wiederholung der „Lipofilling-Behandlung“ ist unter diesen Voraussetzungen kaum zu vermeiden.

Um dies möglichst komfortabel für den Patienten zu gestalten, wird schon seit einigen Jahren das Verfahren der Kryokonservierung angewendet. Die meisten Mediziner, die diese Möglichkeit der Aufbewahrung nutzen, verwenden hierzu einen handelsüblichen Gefrierschrank mit einer Lagerungstemperatur von -18°C bis -20°C. Das gewonnene, und bei der ersten Behandlung nicht verwendete Fettgewebe wird in den Spritzen in den Gefrierschrank verbracht und dort bis zur „Wiederholungsbehandlung“ zwischengelagert.

Die ursächliche Motivation für diese Arbeit entstand aus der Frage: Wie überleben die Adipozyten diesen Schritt der Kryokonservierung und inwiefern kann man ein vermutetes „Nicht-Überleben“ der Zellen durch geeignete Kryokonservierungsprotokolle verhindern?

4 Material & Methoden

4.1 Patientengut

Die Proben wurden ausschließlich von Patienten entnommen, die sich elektiven plastisch-chirurgischen Eingriffen in der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie des Universitätsklinikums Aachen (Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Dr.med.univ. Prof.h.c. (RC) N. Pallua) unterzogen.

Das Patientenkollektiv bestand aus 24 Patientinnen (39,9 Jahre +/- 12,75). Hiervon wurden Proben von 9 Patientinnen (45,17 Jahre +/- 11,42) für die Vorversuche verwendet. Weitere 10 Proben (41,89 Jahre +/- 9,65) wurden für die Etablierung und Modifikation der MTT-, XTT- und GPDH-Tests, sowie für die Erprobung der Kryokonservierung und der verwendeten Kryoprotektive benützt. Die verbleibenden 5 Proben (40,2 Jahre +/- 5,84) wurden jeweils in 70 Einzelproben aufgeteilt und über den Versuchszeitraum von einem Jahr, mittels der verwendeten Testverfahren analysiert.

Die Entnahme der Proben wurde von Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. N. Pallua durchgeführt und erfolgte übereinstimmend mit dem Protokoll „Lipo-Filling“.

Der gültige Ethik-Antrag wurde im Rahmen des EU-Projektes EU/G5RD-CT-1999-00111 gestellt.

LF-Nr.	Sex	Alter	Locus
1	w	32	Oberschenkel/Hüfte
2	w	43	Hüfte
3	w	37	Mamma
4	w	27	Abdomen
5	w	51	Mamma
6	w	57	Oberschenkel
7	w	60	Mamma
8	w	49	Abdomen
9	w	58	Hüfte
10	w	37	Abdomen
11	w	56	Abdomen
12	w	35	Hüfte/Gesäß
13	w	47	Oberschenkel
14	w	18	Mamma
15	w	49	Oberschenkel

16	w	28	Abdomen
17	w	18	Mamma
18	w	42	Abdomen
19	w	13	Abdomen
20	w	43	Hüfte/Oberschenkel
21	w	49	Abdomen
22	w	36	Abdomen
23	w	32	Abdomen
24	w	41	Abdomen
Mittelwert		**39,92**	
Standardabweichung		**13,02**	

Tabelle 1: *Patientenproben; Alter in Jahren und Locus der Proben*

4.2 Protokoll „Lipo-Filling“

Das Verfahren der Probenentnahme erfolgte in Anlehnung an die von Coleman beschriebene Methode [47,49-51].

Protokoll „Lipo-Filling“

1. Liposuction nach „Coleman“
2. Zentrifugation der Liposuctionsspritzen für 5 min
3. bei 490 U/min (50xg) – Minifuge T; Heraeus
4. Ablassen des Unterstandes (Blut, Zelldetritus)
5. Aufnehmen des Überstandes (Lipide)
6. Transplantation

Herstellung einer Einzelzellsuspension

7. Entnahme eines „Fettläppchens“ (50 mg)
8. Überführung in ein Eppendorf-Cup
9. Zugabe der Collagenase-Lösung 500µl (1,5 % BSA, 0,2 % Collagenase CLS)
10. Inkubation für 45 min bei 37°C
11. Zugabe von 1,5 ml Adipozyten-Anwachs Medium
12. Zentrifugation im Eppendorf Cup bei 500 U/min (28xg) für 2 min
13. Absaugen des Unterstands

Hierbei wird das Fettgewebe mit einer Coleman-Kanüle (byron medical) und einer 10 ml Spritze entnommen. Vor der Weiterverwendung werden die gewonnen Spritzen mit 50 x g für 5 min zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationschritt kann der

Unterstand bestehend aus Blut und Zelldetritus abgelassen, der Überstand, der hauptsächlich aus lipidhaltiger Flüssigkeit besteht, abgesaugt werden.
An diesem Punkt des Protokolls kann das Gewebe transplantiert werden. Hierzu werden die gewonnen „Fettläppchen“ mit einem Adapter in 1ml Spritzen überführt und über eine Infiltrationskanüle appliziert.
Ebenfalls an diesem Punkt erfolgte die Übernahme der Zellen zur Analyse ins Labor.
Zu Beginn jedes Versuches erfolgte die Herstellung einer Einzelzellsuspension, die alle weiteren Versuche auf Zellintegrität und Aktivität ermöglicht. Hierzu wurden 50 mg Fettgewebe in ein Eppendorf-Cup überführt und mit einer 0,2%igen Collagenase-Lösung für 45 min bei 37° C inkubiert.
Zur Beendigung des „Collagenase-Verdaus“ erfolgte die Zugabe von 1,5 ml Adipozyten-Anwachs-Medium (AAM) und eine anschließende Zentrifugation mit 28 x g für 2 min. Abschließend wurde der Unterstand mit einer stumpfen Kanüle und einer 1 ml Spritze abgesaugt und die Adipozyten in AAM resuspendiert.

4.3 Versuche

4.3.1 Färbungen

4.3.1.1 Trypanblau ($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$)

Eine Methode zur Überprüfung des Zustands von Zellen ist die Anfärbung mit Trypanblau. Bei vitalen Zellen kann der Farbstoff die Zellwand nicht durchdringen und gelangt so nicht in das Zytoplasma. Wenn Zellen nach der Farbstoffzugabe unter dem Mikroskop blau angefärbt erscheinen, spricht dies für eine Schädigung bzw. für einen Zelluntergang durch toxische oder auch traumatische Prozesse.
Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann. Die Farbstoffaufnahme der Zellen ist stark pH-abhängig. Die maximale Aufnahme findet bei pH 7,5 statt.

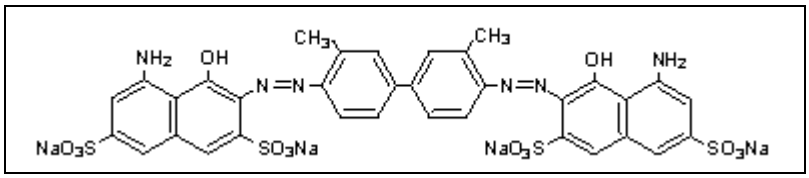

Abbildung 9: ***Strukturformel Trypanblau (Sigma)***

In den Versuchen wurden die Adipozyten am Punkt 6. des Lipofilling-Protokolles entnommen. Zusammen mit 3,6 ml PBS (37°C) und 2,7 ml der 0,5%igen Trypanblau-Lösung (37°C) wurden 100 µl des Zellüberstandes für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die sofortige Auszählung mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer.

Lebende Zellen dürfen nicht angefärbt sein, während tote Zellen durchgängig blau angefärbt sind. Auch diejenigen Zellen, die nur schwach blau angefärbt sind, werden als nicht vital gewertet.

4.3.1.2 Fluoresceindiacetat/Ethidiumbromid

Fluoresceindiacetat (FDA) ist ein Fluorchrom, welches erfolgreich in der flowcytometrischen Analyse zur Lebend/Tot-Bestimmung eingesetzt wird.

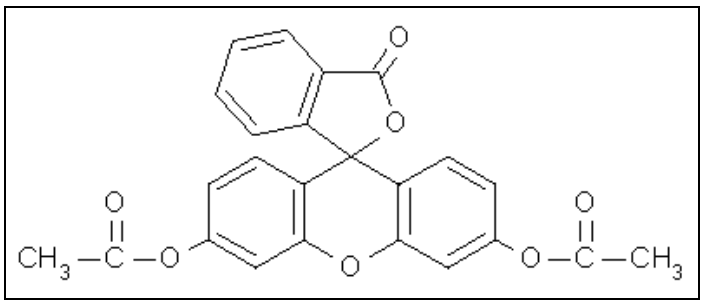

Abbildung 10: ***Strukturformel Fluoresceindiacetat (Sigma)***

Es ist ein fluorogenes Substrat, dessen Wirkungsmechanismus auf einer biochemischen Reaktion beruht, die nur vitale Zellen durchführen können. Vitale Zellen enthalten Esterasen, die fluorogene Substrate wie Fluoresceindiacetat hydrolytisch spalten. Auf diese Weise wird der Farbstoff Fluorescein freigesetzt, der in der Zelle fluoreszenzoptisch nachgewiesen werden kann.
Wird Fluorescein mit Blaulicht (480 nm) angeregt, emittiert es grünes Licht (520 nm). Das bedeutet, vitale Zellen fluoreszieren unter Blaulichtanregung grün, tote Zellen werden nicht farbig dargestellt.

Ethidiumbromid ist ein DNS-Fluorochrom. Es kann nur in Zellen mit geschädigter Cytoplasmamembran eindringen und reagiert dort mit den Nukleinsäuren.
Unter Blauanregung (480nm) ruft es eine rote Fluoreszenz der gefärbten Zellen hervor. Zellen mit intakter Membran sind nicht zu erkennen.

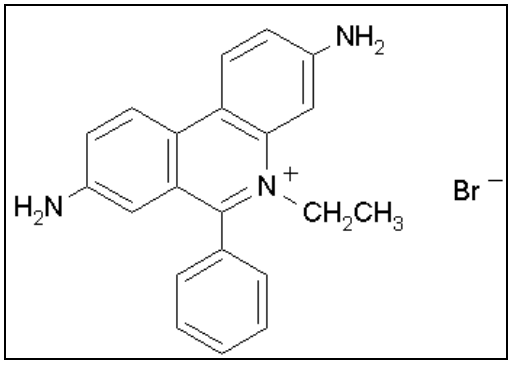

Abbildung 11: ***Strukturformel Ethidiumbromid (Sigma)***

Für die Anwendung des Tests wurden am Punkt 6. des Lipofilling-Protokolls Adipozyten entnommen. Diese wurden für 10 Minuten in ein Adipozyten-Anwachsmedium überführt, bevor die Zugabe von 2,5 µl Fluoresceindiacetats (5 mg/ml) und 2,5 µl Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) erfolgte. Im weiteren Verlauf wurde die Einzelzellsuspension für 3 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 10 µl in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer überführt. Die Betrachtung unter dem UV-Mikroskop und die Auszählung der vitalen Zellen schließt den Versuch ab.

4.3.2 MTT ($C_{18}H_{16}BrN_5S$)

Der MTT-Test bietet die Möglichkeit eine kolorimetrische, nicht radioaktive Bestimmung der Zellaktivität durchzuführen [248].

Nur mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen sind in der Lage das MTT-Tetrazoliumsalz (3-[4,5-Dimetylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) durch Spaltung des Tetrazoliumringes in MTT-Formazan umzuwandeln [215]. Diese Reduktion des löslichen gelben Tetrazoliumsalzes führt zu einem blauen, unlöslichen Formazan. Die Absorption des enstandenen Formazans wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm bestimmt.

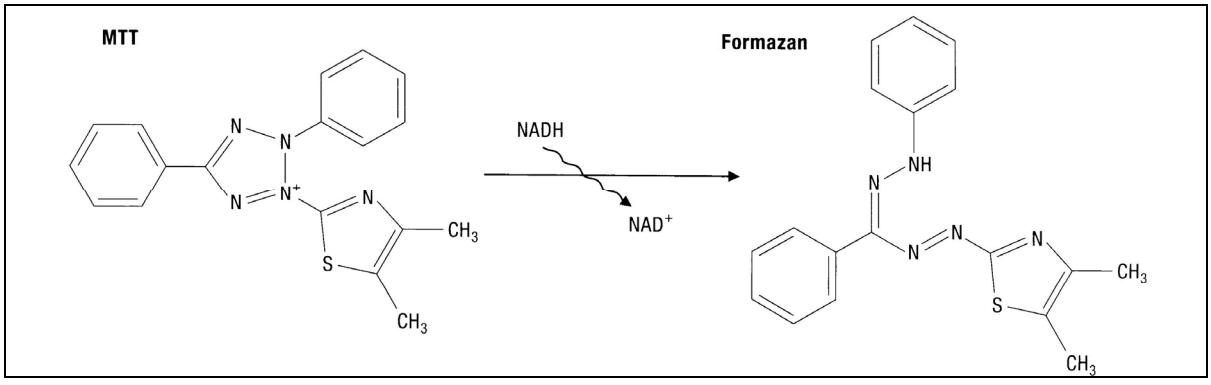

Abbildung 12: *Bildung eines blauen Formazansalzes*

Die Spaltung des Farbstoffes ist direkt proportional zur Zellzahl, steigt aber nicht linear mit der Funktion der Zeit. Durch MTT kann die Zellaktivität unabhängig von der Proliferation gemessen werden.

Verwendet wurde das MTT-Kit der Firma Roche, welches zur Verwendung mit Adipozyten modifiziert wurde.
Die durch das „Lipofilling-Protokoll“ gewonnenen Adipozyten wurden in 200 µl PBS-Puffer und 80 µl MTT-Lösung überführt. Für 300 Minuten erfolgte eine Inkubation bei 37°C in einem Schüttel-Wasserbad.
Zur Trennung der Adipozyten vom vorhandenen Puffer/MTT-Gemisch wurden die Eppendorf-Cups für 2 Minuten bei 500 U/min (28 x g) zentrifugiert. Es folgte die Absaugung des Unterstandes und die Zugabe von 60 µl SDS (3%ig) und 300 µl Isopropanol/HCl zur Lyse der Zellen und dem damit verbundenen Freisetzen des entstandenen Formazansalzes. Die Eppendorf-Cups wurden für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend intensiv mit einem Vortex geschüttelt.
Dann erfolgte die Überführung des Inhalts auf eine 96 Well-Platte. Pro Probe wurden drei parallele Messungen vorgenommen, deren Ergebnis als Mittelwert, das Endresultat der Probe ergab.

4.3.2.1 MTT-Toxizitätstest

Um die Toxizität des MTT auf die Adipozyten zu evaluieren, wurde ein Versuch über einen Zeitraum von 8 Stunden durchgeführt. Die photometrische Messung erfolgte alle 60 Minuten. Zur Anwendung kam das oben beschriebene „MTT-Protokoll – modifiziert“. Für die weiteren MTT-Tests wurde eine Testzeit von 5 Stunden festgelegt.

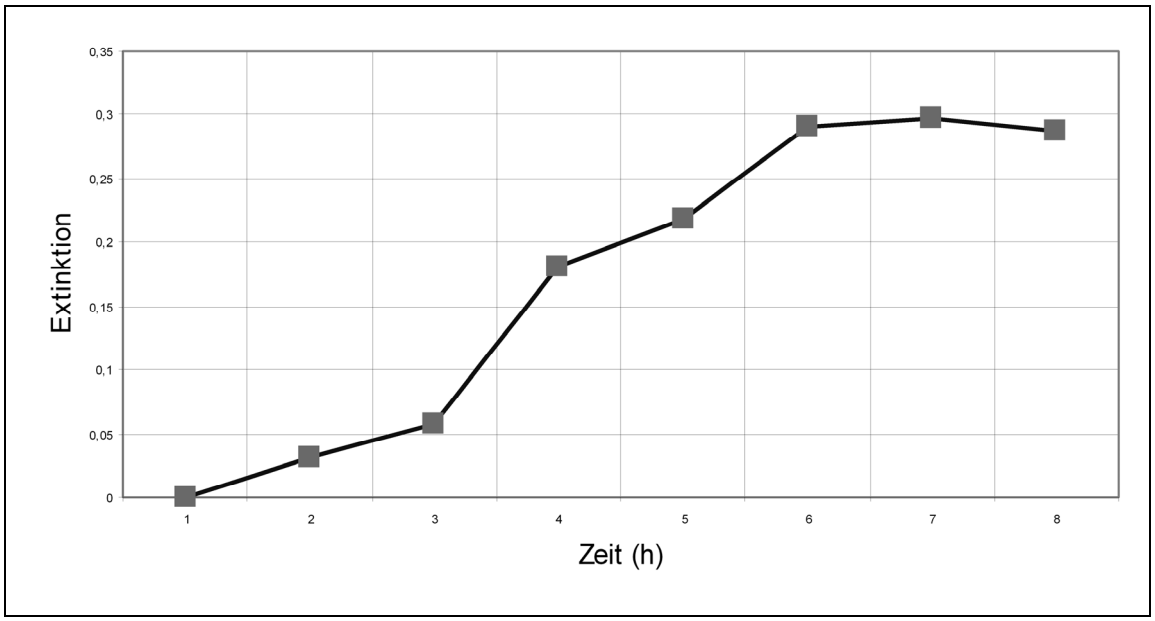

Abbildung 13: *MTT-Toxizitätstest, Extinktion im zeitlichen Verlauf über 8 Stunden.*

4.3.3 XTT ($C_{22}H_{16}N_7O_{13}S_2Na$)

XTT(Bis-(2methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Natriumsalz) ist ein dem MTT ähnliches gelbes Tetrazoliumsalz, das nach dem Stand aktueller Forschung in der Majorität bei der Metabolisierung durch membrangebundene zytosolische Dehydrogenasen und zu einem geringen Teil, wie beim MTT, durch intramitochondrialen Dehydrogenasen, einen wasserlöslichen orangen Formazan-Farbstoff bildet [17,29,179,255,285]. XTT hat gegenüber dem cytotoxischen MTT den Vorteil, dass es wasserlöslich ist und das es selbst nicht zytotoxisch für die Zellen ist [179,255,285].

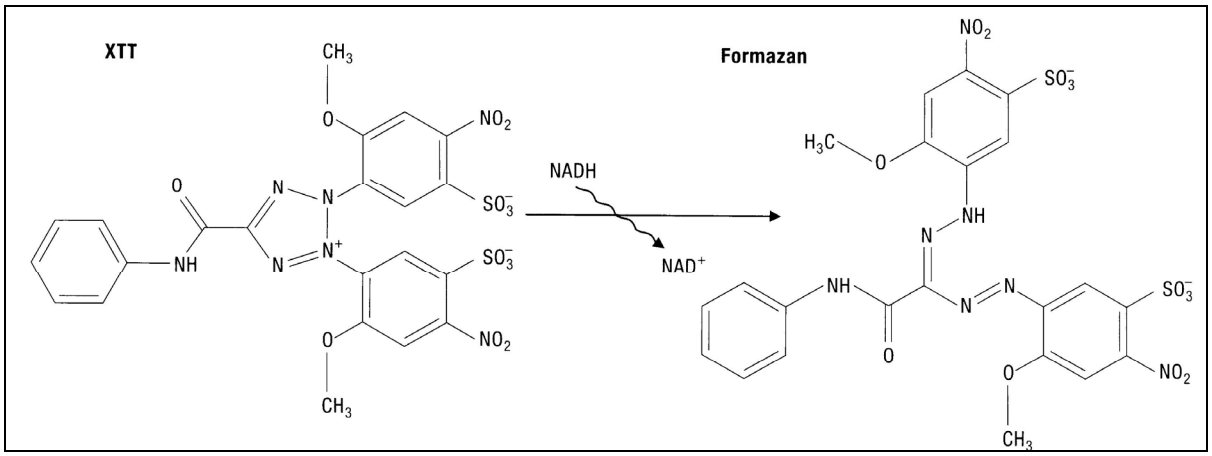

Abbildung 14: ***XTT, Entstehung eines gelblichen Formazansalzes***

Die Intensität der Farbe ist proportional zur Zahl der metabolisch aktiven Zellen [179].
Die Absorption des entstandenen Formazans wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 470 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm bestimmt.

Das XTT-Versuchsprotokoll verwendet ebenfalls die Adipozyten am Punkt 6. des Lipofilling-Protokolls. Zusammen mit dem PBS (200 µl) wurden 80 µl XTT-Lösung zu den Zellen gegeben. Diese XTT-Lösung wurde vor Versuchsbeginn aus XTT-Reagenz (in RPMI 1640; 1 mg/ml) und einer „Electron-coupling-Reagenz“ hergestellt. Diese „Electron-coupling-Reagenz“ besteht aus PMS (N-methyl dibenzopyrazine-methyl-sulfat) 1,25 mM, gelöst in PBS-Puffer.
Dieser Ansatz wurde für 300 Minuten in einem Schüttel-Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Eppendorf-Cups bei 500 U/min (28g) für 2 Minuten zentrifugiert und der Unterstand abgesaugt. Dieser Unterstand enthielt das gebildete orange Formazansalz und wird auf die 96-Well-Platte überführt. Es wurden drei Messungen pro Probe bei 470 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm ausgeführt. Das Ergebnis der Probe ist der Mittelwert dieser drei Parallel-Messungen.

4.3.3.1 XTT-Toxizitätstest

Laut Angaben des Herstellers ist der XTT-Test nicht zytotoxisch, da es jedoch keinerlei Aussagen und Versuche für die Verwendung mit Adipozyten gab, wurde diese Messung durchgeführt.

Verfahren wurde nach dem oben beschriebenen XTT-Protokoll. Wie auch beim MTT-Toxizitätstest wurde ein zeitlicher Verlauf von 8 Stunden gewählt mit einem Messintervall von 60 Minuten.

Für die regulären Tests mit XTT wurde eine Testzeit von 5 Stunden bestimmt.

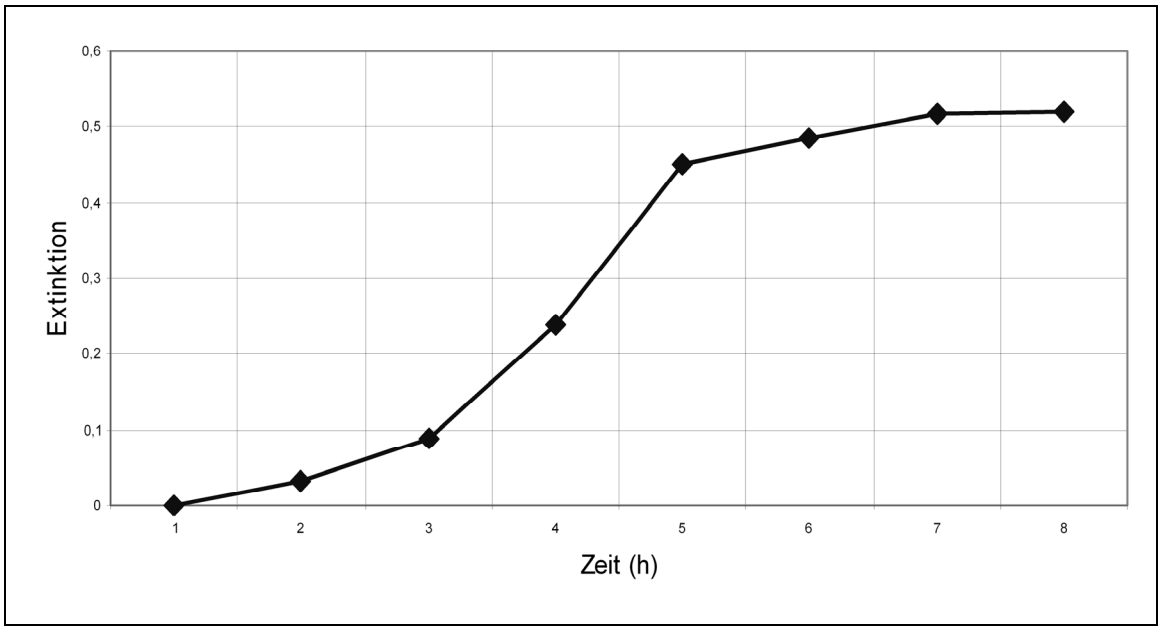

Abbildung 15: *XTT-Toxizitätstest, Extinktion im zeitlichen Verlauf über 8 Stunden.*

4.3.4 Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase

In der Leber wird Glycerol-3-phosphat durch direkte Phosphorylierung von Glycerol gewonnen, während es im Muskel und in Adipozyten durch Reduktion von Dihydroxyaceton-Phosphat (DHAP), einem Zwischenprodukt des Glycerol-Stoffwechselweges, mit NADH entsteht [110-112].

Dementsprechend findet auch ohne Glucose keine Lipidsynthese im Muskel oder im Fettgewebe statt, selbst wenn dort eine hohe Konzentration an Fettsäuren vorliegt[300].

Das Enzym, welches diese reversible Reaktion zwischen Dihydroxyaceton-Phosphat und Glycerol-3-phosphat, unterstützt durch das Koenzym NAD^+, katalysiert, ist die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase: GPDH (EC. 1.1.1.8) [5].

Eine Form der GPDH (EC. 1.1.1.8) findet sich im Zytosol der Fett- und Muskelzellen, eine andere GPDH (EC. 1.1.99.5) ist in die Mitochondrien integriert und dort, mit dem Koenzym FAD, für die umgekehrte Reaktion von Glycerol-3-phosphat zu Dihydroxyaceton-Phosphat verantwortlich [146]. Damit obliegt diesen beiden Enzymen der Substrataustausch des Glycerol-Phosphat-Kreislaufs (**Abbildung 16**).

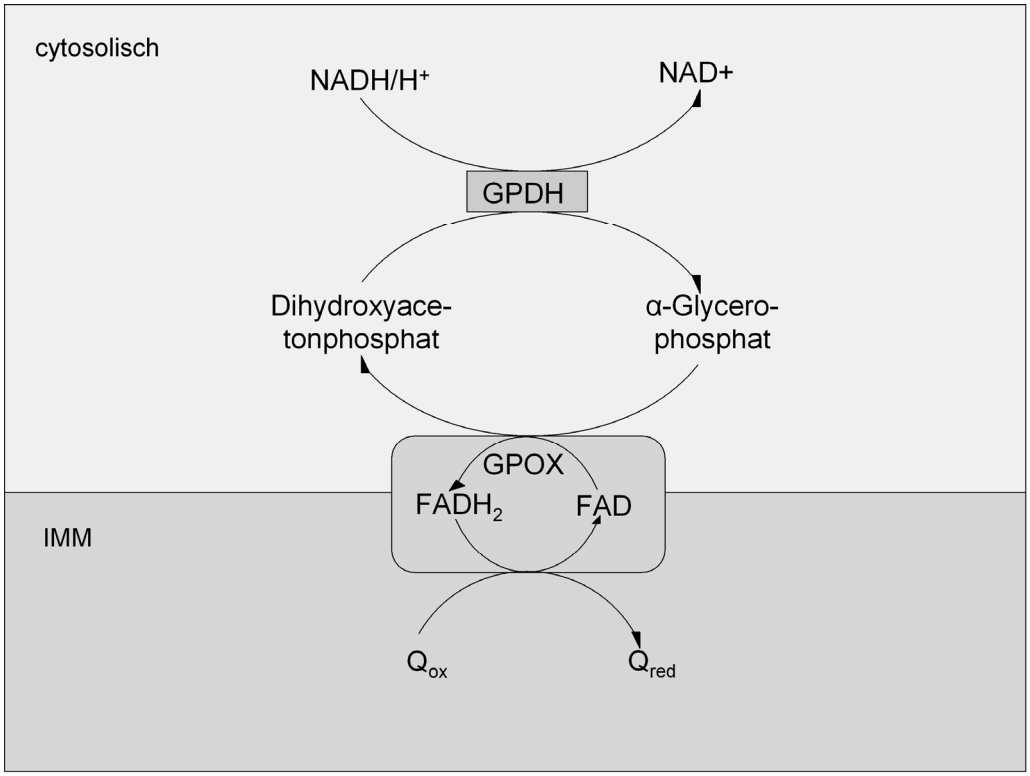

Abbildung 16: ***Glycerol-Phosphat-Kreislauf.*** *Eine Form der GPDH (EC. 1.1.1.8) findet sich im Zytosol der Fett- und Muskelzellen, eine andere GPDH (EC. 1.1.99.5) ist in die Mitochondrien integriert und dort, mit dem Koenzym FAD, für die umgekehrte Reaktion von Glycerol-3-phosphat zu Dihydroxyaceton-phosphat verantwortlich. (modifiziert nach Löffler[172])*

Im Rahmen dieser Arbeit kommt nur die Messung der zytosolischen GPDH zur Anwendung.
Unter der Annahme, dass durch das Kryokonservieren Zellen beschädigt beziehungsweise zerstört werden, kann davon ausgegangen werden, dass zytosolisches GPDH freigesetzt wird. Diese freie GPDH kann indirekt durch photometrische Messungen bestimmt werden. Da eine direkte Bestimmung der GPDH nicht möglich ist, bedient man sich des Koenzyms NAD^+. Es ist photometrisch möglich, die Oxidation des NADH zu NAD^+ zu messen.
Grundlage für diesen Teilversuch ist das Protokoll „GPDH-Test Adipozyten - modifiziert“.

Die Messung frischer Adipozyten:
Zur Bestimmung des freien GPDH bei frischen Adipozyten nach Liposuktion wurde 0,5g Fettgewebe in 1000 µl PBS-Puffer aufgenommen. Der sich bildende Unterstand wurde mit einer stumpfen Kanüle abgesaugt und in ein Eppendorf-Cup überführt. Anschließend erfolgte für 5 min eine Zentrifugation mit 13000 u/min.

Die Messung kryokonservierter Adipozyten:
Die Bestimmung des GPDH nach Kryokonservierung erfolgte analog zum oben beschriebenen Schema. Nach dem Auftauen der Kryoröhrchen wurde der Unterstand (Medium+Kryoprotektiv) mit einer stumpfen Kanüle abgesaugt und in ein Eppendorf-Cup überführt. Es erfolgte ebenfalls eine Zentrifugation (5 min, 13000 U/min).
Der durch die Zentrifugation gebildete Überstand enthält das Enzym. Von diesem wurden 100 µl in einen vorbereiteten Küvettenansatz gegeben. Der Ansatz besteht aus Pufferlösungen (Tram- und Assay-Puffer), 2-Mercaptoethanol, NADH und Wasser.
Aus diesem Ansatz wurden nun je 200 µl in eine 96-Well-Platte überführt. Durch die Zugabe von 20 µl DHAP wurde die Enzymreaktion gestartet und der Verlauf durch eine photometrische Messung bei 340 nm über 5 Minuten beobachtet.
Gemessen wurde neben der optischen Dichte (OD) des NADH pro Messpunkt, die Abnahme der OD pro Minute. Dadurch ist eine Bestimmung der vorhandenen Enzymmenge möglich. Je mehr Enzym sich in der Lösung befand, desto mehr Zellen

müssen durch mechanische Beanspruchung oder durch die Kryokonservierung beschädigt und zerstört worden sein.
Die gemessenen GPDH-Einheiten werden also als ein indirekter Indikator für die Integrität der Adipozyten gewertet.

4.3.5 Mikroskopie

4.3.5.1 Lichtmikroskopie

Die Verwendung der Lichtmikroskopie erfolgt im Rahmen dieser Arbeit zur Zellzählung bei Farbtests.

4.3.5.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die Erstellung von elektronenmikroskopischen Bildern der frischen und kryokonservierten Zellen erfolgte durch die Abteilung Elektronenmikroskopie des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Aachen.

4.4 Kryokonservierung

Parallel zur Bestimmung der Überlebensrate der frischen Zellen mit Hilfe der Färbetests, der Vitalitäts-Analyse durch MTT und XTT und einer Zellintegritäts-Untersuchung mit der GPDH-Messung erfolgte die Kryokonservierung der Adipozyten.
Hierzu wurden folgende Versuchsreihen gebildet

- Temperaturstufen: -20°C (1) und -80°C (2)
- Zeitpunkte: frisch (a), 48h (b), 7d (c), 14d (d), 1m (e), 6m (f), 1y (g)
- Kryoprotektive: Kontrolle (I), HES 10% (II), Glycerol 10% (III), Glycerol 10%/Dextran 3%/PVP 7% (IV)

Es wurden pro Patientenprobe 70 Einzelproben aufbereitet und eingefroren.
Den vorbereiteten Proben, jeweils 0,05 g Fett, wurden jeweils 2 ml der kryoprotektiven Lösung zugegeben. Diese Lösungen wurden alle auf der Basis des Adipozyten-Anwachs-Mediums hergestellt.

Das Einfrieren der Cryoviales erfolgte in einem Strata-Kühler, mit einer Kühlrate von 1°C/min. Nach diesem Vorgang wurden die Proben bis zur weiteren Untersuchung in Aufbewahrungsboxen überführt und jeweils bei -20°C und -80°C gelagert.

Wie oben beschrieben kamen folgende CPAs zur Anwendung:

4.4.1 Hydroxyethylstärke (HES)

HES ist ein extrazelluläres Kryoprotektiv, welches weder toxisch ist, noch antigene Eigenschaften besitzt [151]. Die durchschnittliche Molekülmasse beträgt mehrere 100.000 Dalton und ist damit deutlich höher, als die der Kryoprotektive DMSO (78,13 D) und Glycerol (92,10 D).

Die sich durch die Hydroxyethylstärke verändernden physio-chemischen Eigenschaften der Lösung sind vor allem die Viskosität, die Devitrifikation, der glassförmige Übergang [87], die mikroskopische Morphologie, die Kapazität Wasser zu binden, der Schutz vor Eiskristallbildung, die Löslichkeit, der osmotische Druck und die Interaktion mit biologischen Membranen [281,282].

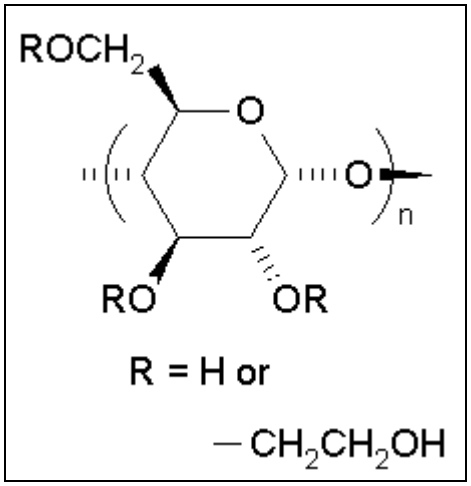

Abbildung 17: ***Hydroxyethylstärke (Sigma)***

4.4.2 Glycerol

Glycerol (1,2,3-propantriol; MW: 92,09 kD) ist zusammen mit Me_2SO, dass am weitesten verbreitete Kryoprotektiv. Es ist eine visköse, stark hydrophile und süßlich[e] schmeckende Flüssigkeit. Der kryoprotektive Effekt des Glycerols wurde zeitlich schon weit vor der ersten Beschreibung im Jahre 1949 entdeckt [246].

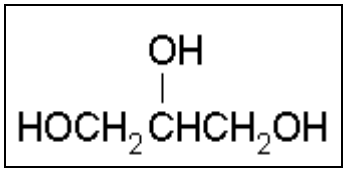

Abbildung 18: ***Glycerol (Sigma)***

Keith [141] beobachtete 1913, dass die Zugabe von 5% – 42% Glycerol zu einer E. coli Suspension ein Langzeit-Überleben bei -20°C ermöglichte.
Heute liegen die verwendeten Konzentrationen zwischen 2% und 55% (Median ~ 10%) und werden bei humanen Spermatozoen [94], Viren [46,206,284], Bakterien [126,127], Mykoplasmen [247], Pilzen [33,57] und Algen [55,214,293] benutzt.

[e] Vgl. von griech. glykys = süß

4.4.3 Dextran

Dextran (MW: 1-200 x 10^4) ist ein wasserlösliches Polysaccharid, das extrazellulär von Leuconostoc mesenteroides enzymatisch aus Saccharose aufgebaut wird und meist aus D-Glucoseestern besteht. Es ist ein stark verzweigtes Makromolekül mit 1,4- und 1,6-Bindungen zwischen den Glucosepyranose-Resten.

Dextran wird in einer Konzentration von 5%-15% (Median ~ 9%) verwendet. Der Grad der Polymerisation des Dextrans kann die kryoprotektiven Eigenschaften verändern. Das Optimum des MW liegt bei 250 – 1000 kD; ein MW von 20 – 100 kD hat hingegen keine Eigenschaften, die beim Kryokonservieren von Bedeutung sind.

Zur Anwendung kommt Dextran beim Kryokonservieren von Bakterien [7], Erythrozyten [7] und Cornea-Transplantaten [105].

4.4.4 Polyvinylpyrrolidon

Polyvinylpyrrolidon wird mittels Polymerisation aus dem Monomer Vinyl-pyrrolidon hergestellt. Der Ausgangsstoff Vinylpyrrolidon ist als kanzerogen der Kategorie 3 eingestuft, das Polymer ist jedoch für den Menschen unbedenklich.

PVP ist ein hygroskopisches, amorphes Pulver mit weißer bis hellgelber Farbe. Aufgrund seiner amorphen Struktur besitzt PVP keinen Schmelzpunkt, sondern nur eine Glasübergangstemperatur, welche bei ca. 160°C liegt.

Polyvinylpyrrolidon (PVP) ist eines der gebräuchlichsten Polymere der Medizin, da es die Eigenschaften Wasserlöslichkeit und geringe Toxizität vereint [122,173]. PVP gehört zu den nicht-permeierenden Kryoprotektiven [185].

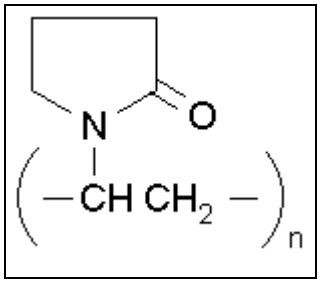

Abbildung 19: ***(Poly)vinylpyrrolidon(e)***

4.5 Statistik

Die gemessenen und errechneten Werte sind als Mittelwert +/- Standardfehler (SE) oder wenn angegeben +/- Standardabweichung (SD) dargestellt.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe von verbundenen t-Tests festgestellt.

Zur Sicherung der Signifikanz der verschiedenen Gruppen im zeitlichen Verlauf wurde eine „Analysis of variance“-Berechnung (ANOVA) mit dem SAS-System durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$ festgesetzt.

Die Erstellung dieser Berechnungen erfolgte, im Rahmen einer Konsultation des Instituts für Medizinische Statistik (Direktor: Univ.-Prof. Dr.rer.nat. R.-D. Hilgers), durch Herrn Dipl.-Stat. S. Stanzel.

5 Ergebnisse

5.1 Färbungen

Die Färbungen mit Trypanblau und FAD/EB erfolgten immer zu Beginn einer neuen Versuchsreihe, jeweils nach 48 Stunden Kryokonservierung bei -20°C, ohne Kryoprotektiv. Deutlich wird der hochsignifikante Verlust der Zellintegrität; 70,82% der Zellen sind nach Verwendung der Färbemethode markiert.

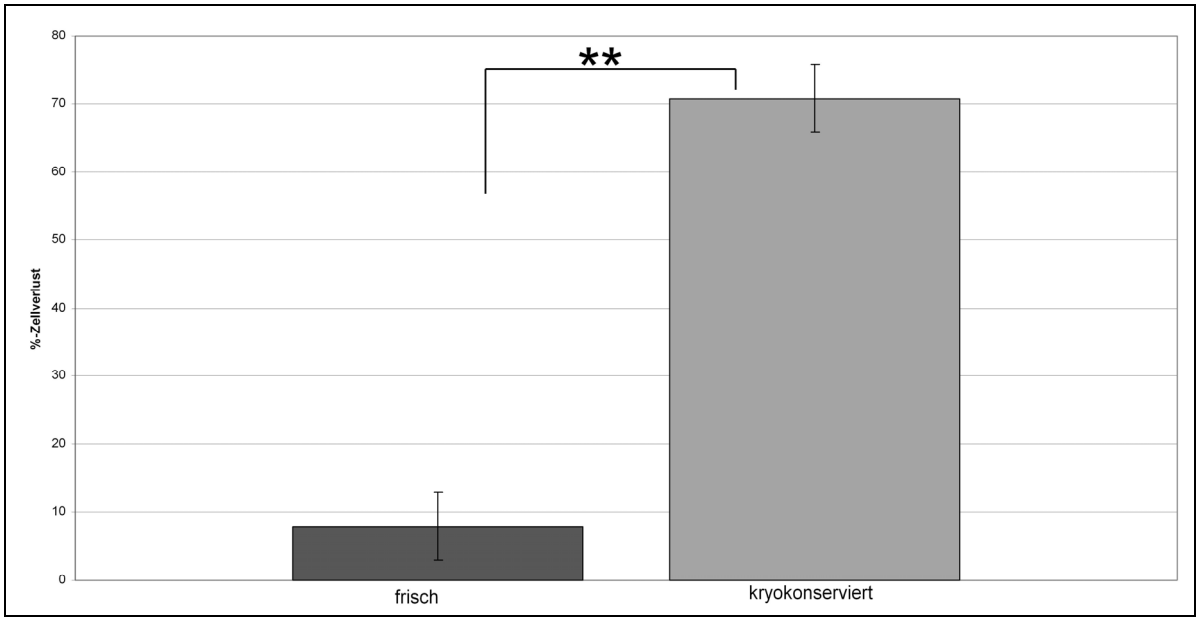

Abbildung 20: ***Trypanblau-Färbung nach 48 Stunden Kryokonservierung bei -20°C ohne Kryoprotektiv; Kühlrate 1°C/min***

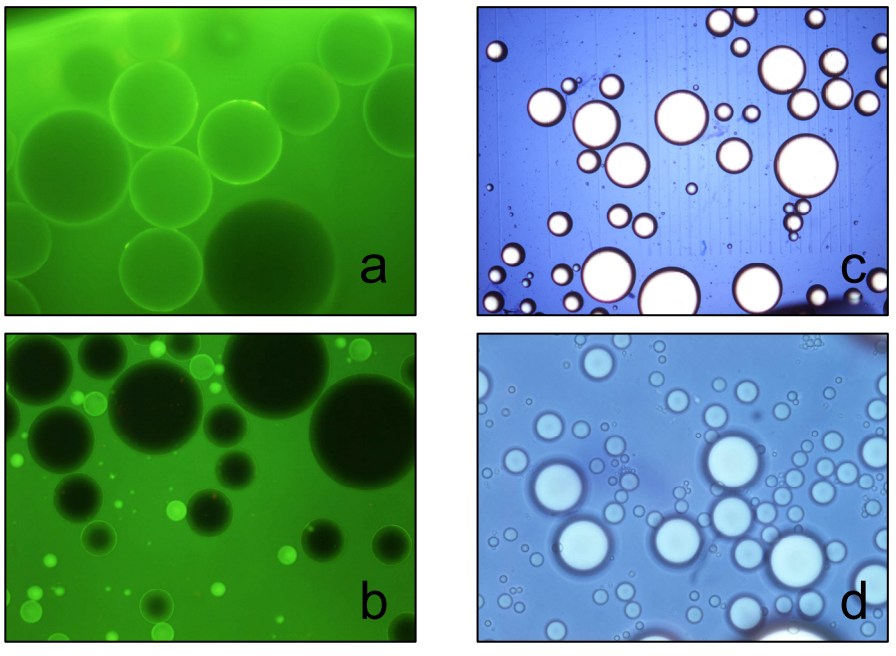

Abbildung 21:

Bild a
Adipozyten frisch FAD/EB Färbung

Bild b:
Adipozyten kryokonserviert FAD/EB Färbung

Bild c:
Adipozyten frisch Trypanblaufärbung

Bild d:
Adipozyten kryokonserviert Trypanblaufärbung

5.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie



Abbildung 22: LF-EM1, frisch,* Vergr.*: x30600, Neg.Nr.:39356

geschlossenes Interstitium mit anliegenden Fettresten

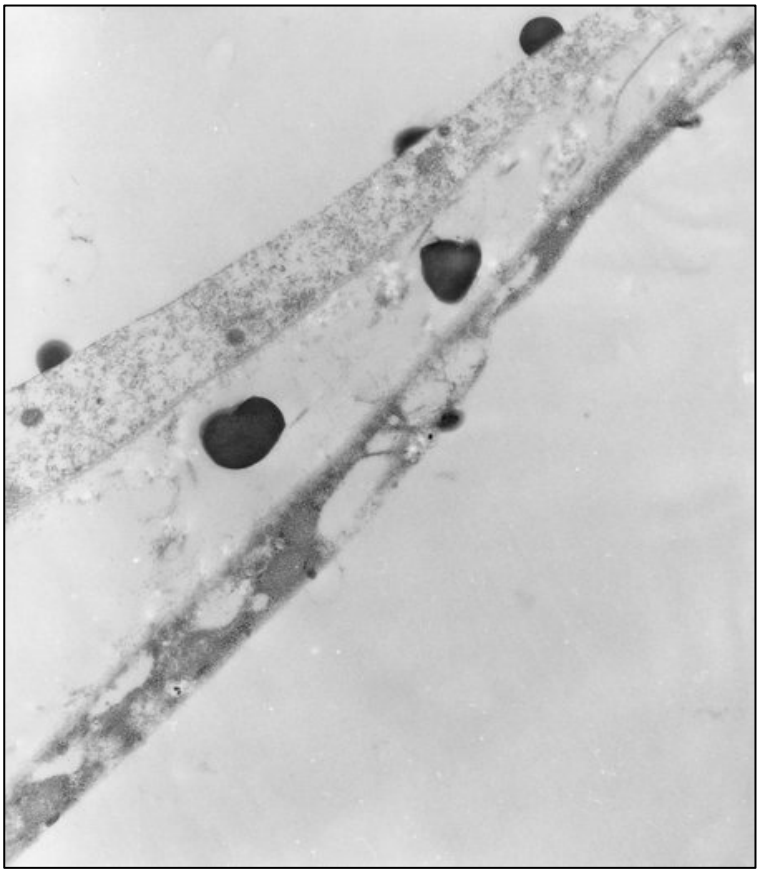

Abbildung 23:LF-EM2, 48h bei -20°C ohne Kryoprotektiv, Vergr.: x18000, Nr.:39419

Fettreste im Zellinterstitium



Abbildung 24: LF-EM1, frisch,* Vergr.: x30600, *Neg.Nr.:39360

geschlossenes Interstitium

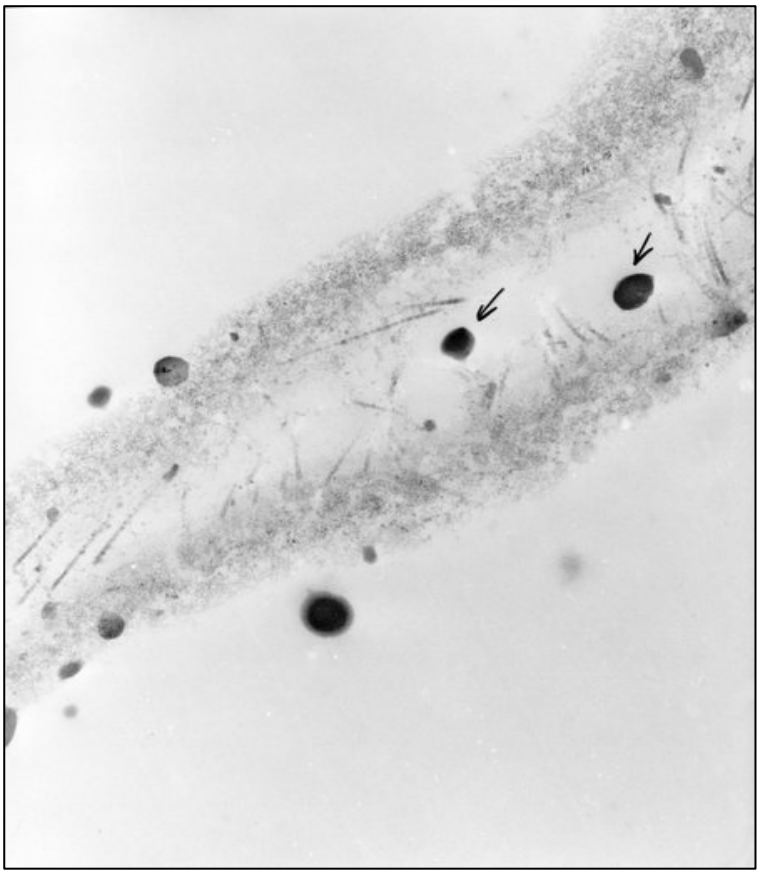

Abbildung 25: LF-EM2, 48h bei -20°C ohne Kryoprotektiv, Vergr.: x23400, Neg.Nr.39417:

Fettanteile im Interstitium (Pfeile) und Auflösung der Zellmembran; einzelne Kollagenfasern sichtbar



Abbildung 26: LF-EM1, frisch, Vergr.: x30600, Neg.Nr.:39362

Interstitium intakt, Vakuolen und Mitochondrien zeigen keinen Defekt

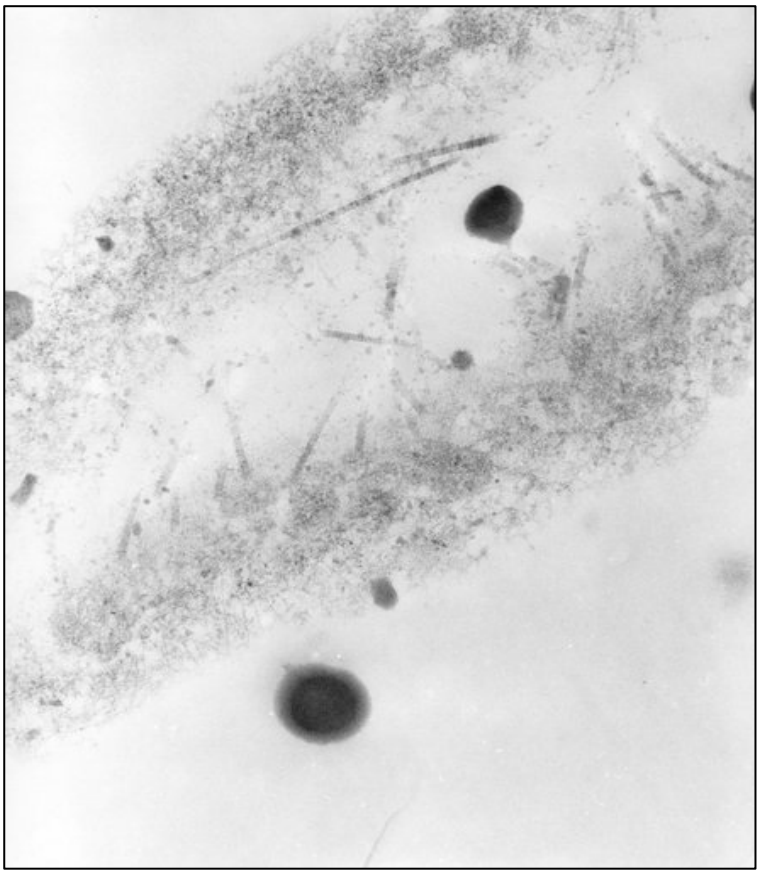

Abbildung 27: LF-EM2, 48h bei -20°C ohne Kryoprotektiv, Vergr.: x40000, Neg.Nr.:39416

beide Zellen befinden sich in der Auflösung, Lipide im Zellinterstitium und Kollagenfasern ragen in den entstandenen Spalt

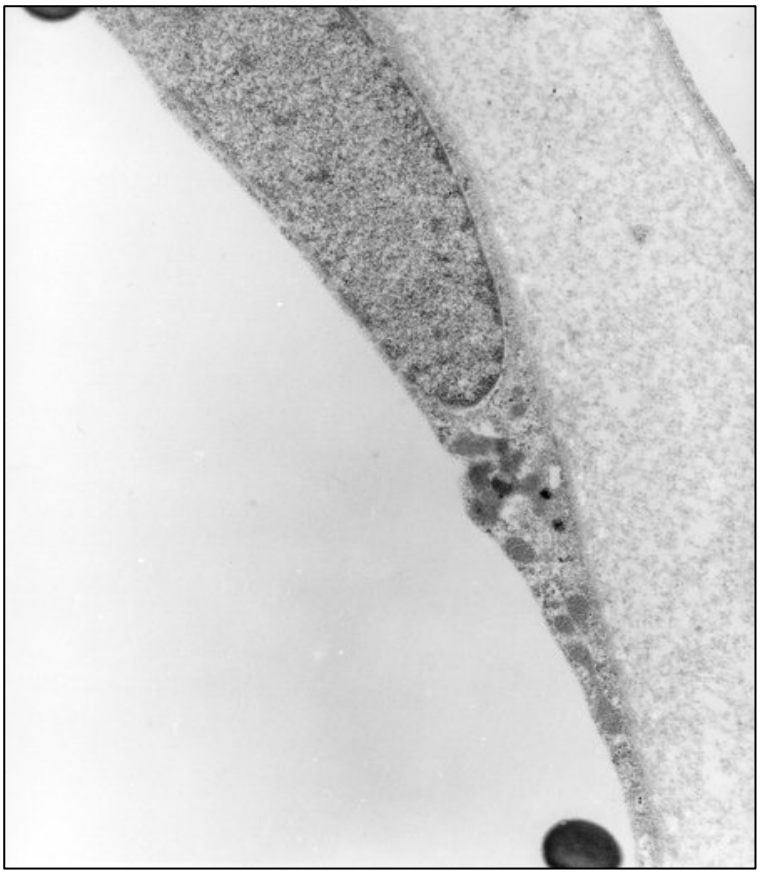

Abbildung 28: LF-EM1, frisch, Vergr.: x14400, Neg.Nr.:39346

Fettzelle intakt

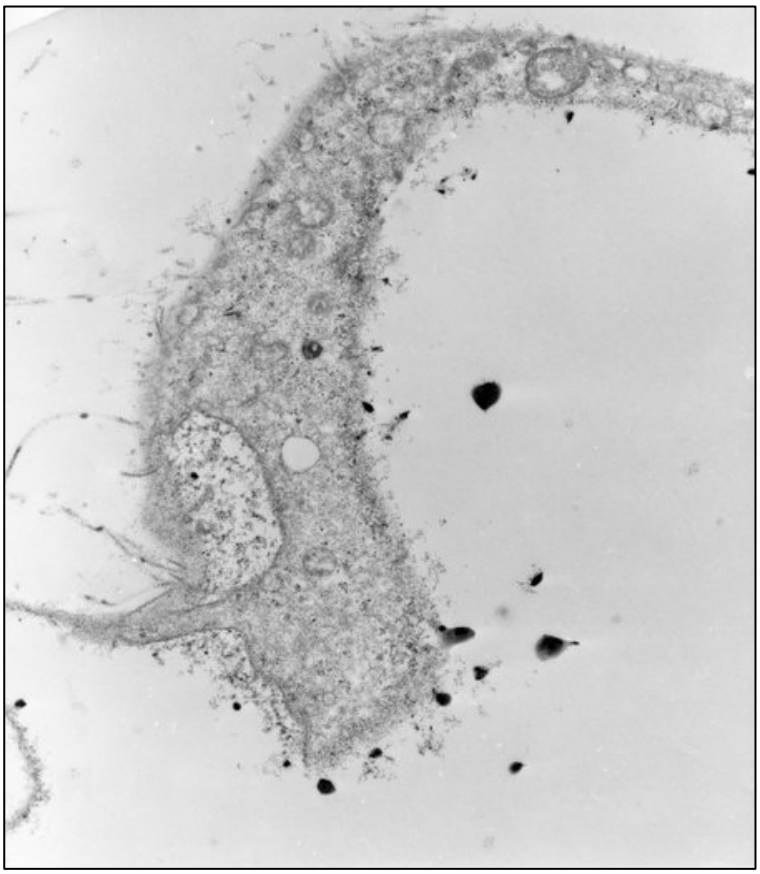

Abbildung 29: LF-EM2, 48h bei -20°C ohne Kryoprotektiv, Vergr.: x14400, Neg.Nr.:39411

die Zelle befindet sich in Auflösung

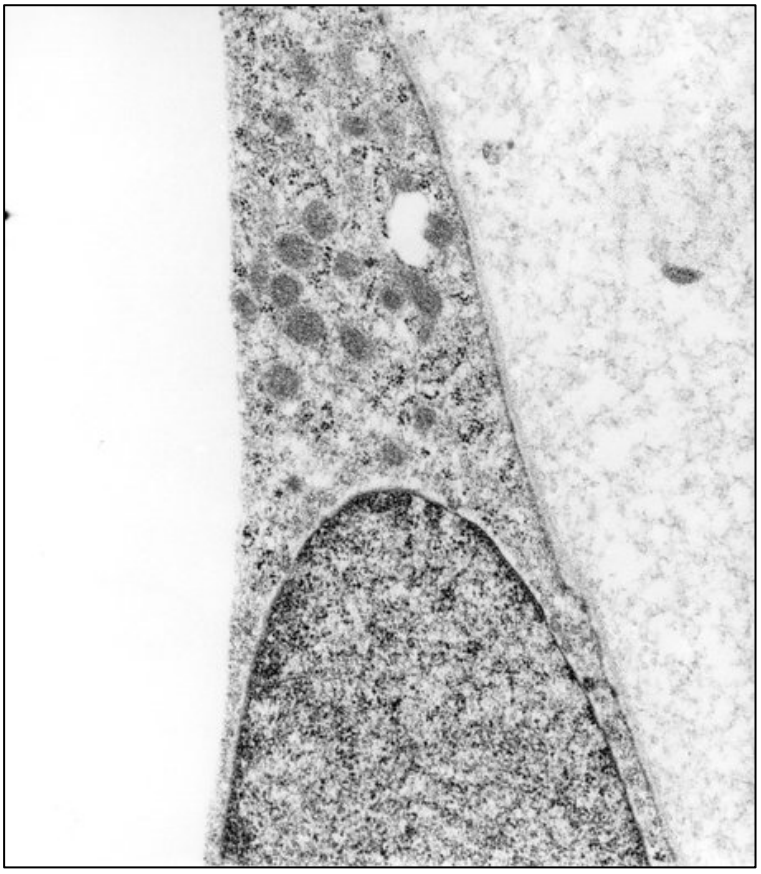

Abbildung 30: LF-EM1, frisch, Vergr.: x30600, Neg.Nr.:39353

Zellkern intakt, Ribosomen ohne pathologischen Befund

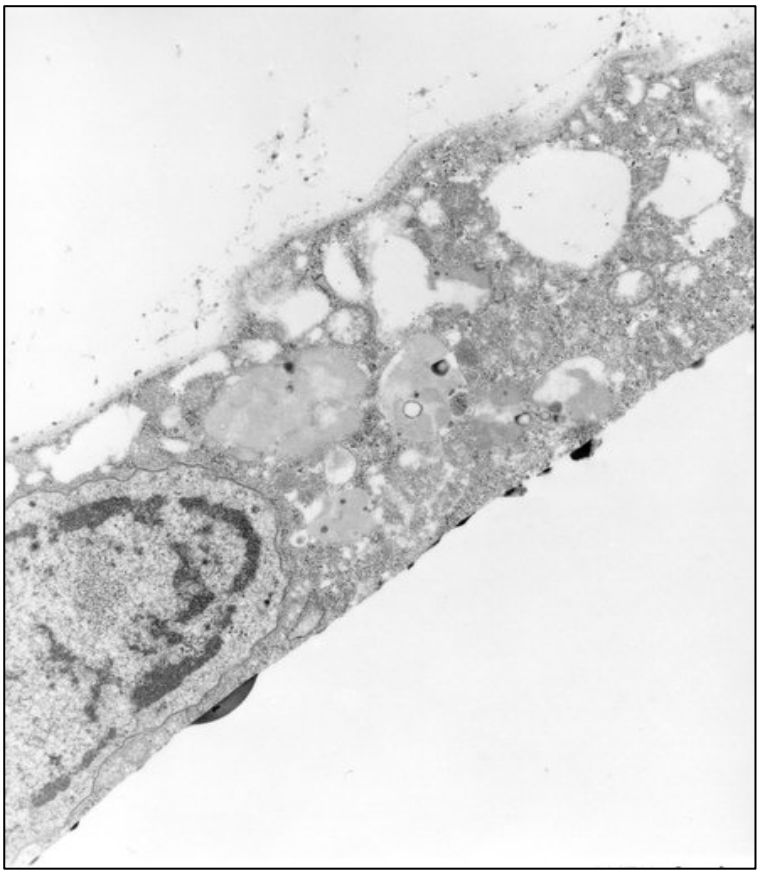

Abbildung 31: LF-EM2, 48h bei -20°C ohne Kryoprotektiv, Vergr.: x14400, Neg.Nr.:39406

Zellkern in Auflösung, Vakuolisierung der Zellmembran, defekte Mitochondrien



Abbildung 32: LF-EM1, frisch, Vergr.: x8300, Neg.Nr.:39349

Zelle intakt, Kern und Mitochondrien zeigen keine pathologischen Befunde

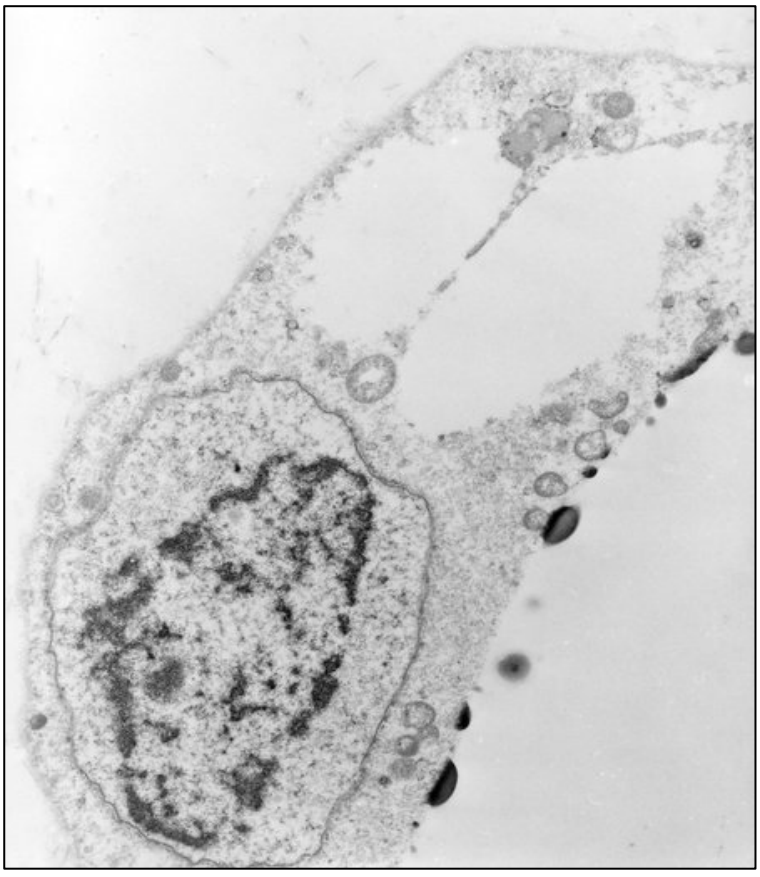

Abbildung 33: LF-EM2, 48h bei -20°C ohne Kryoprotektiv, Vergr.: x6500, Neg.Nr.:39420

defekte Fettzelle, Kernhüllenablösung, Mitochondrien zerstört

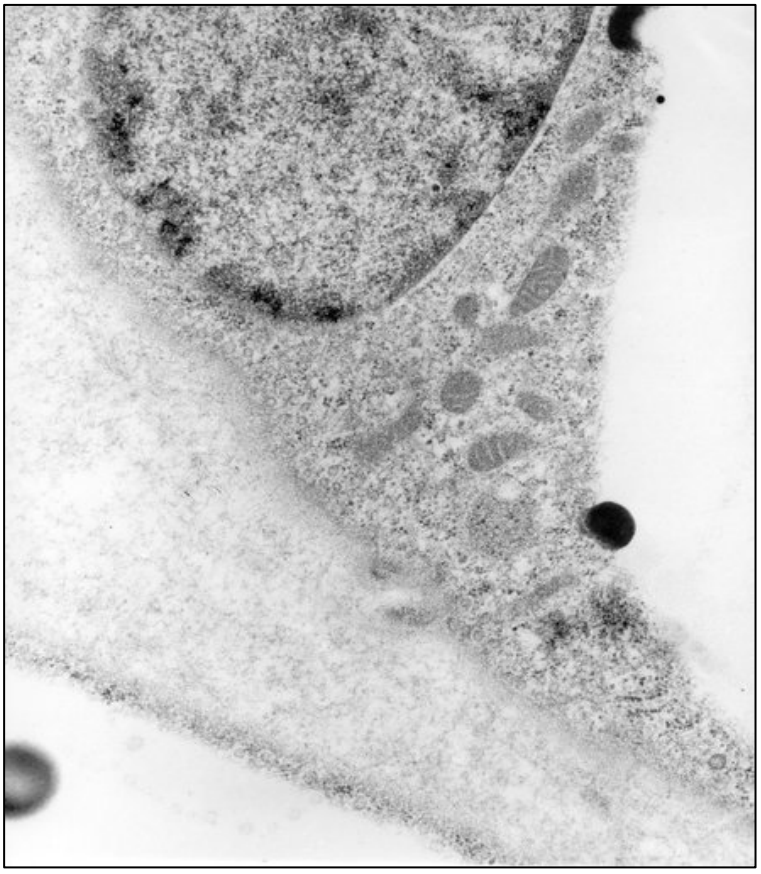

Abbildung 34: LF-EM1, frisch, Vergr.: x30600, Neg.Nr.:39350

Zelle ohne pathologische Zeichen, Mitochondrien intakt, Kernhülle unbeschädigt

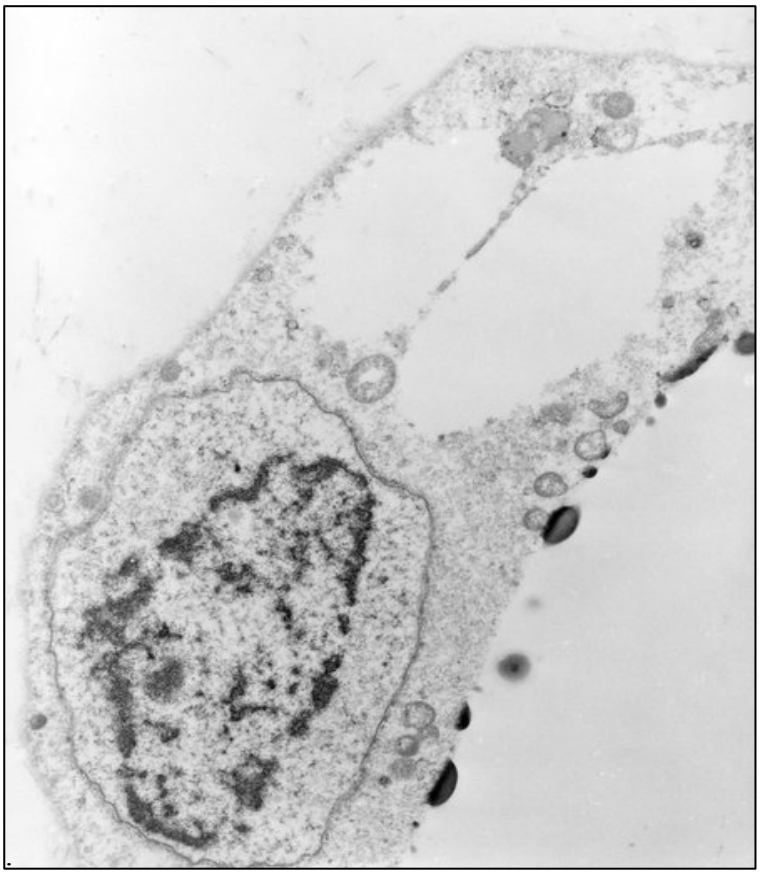

Abbildung 35: LF-EM2, 48h bei -20°C ohne Kryoprotektiv, Vergr.: x11000, Neg.Nr.:39421

Zelle zerstört, Mitochondrien defekt, Vakuolenbildung

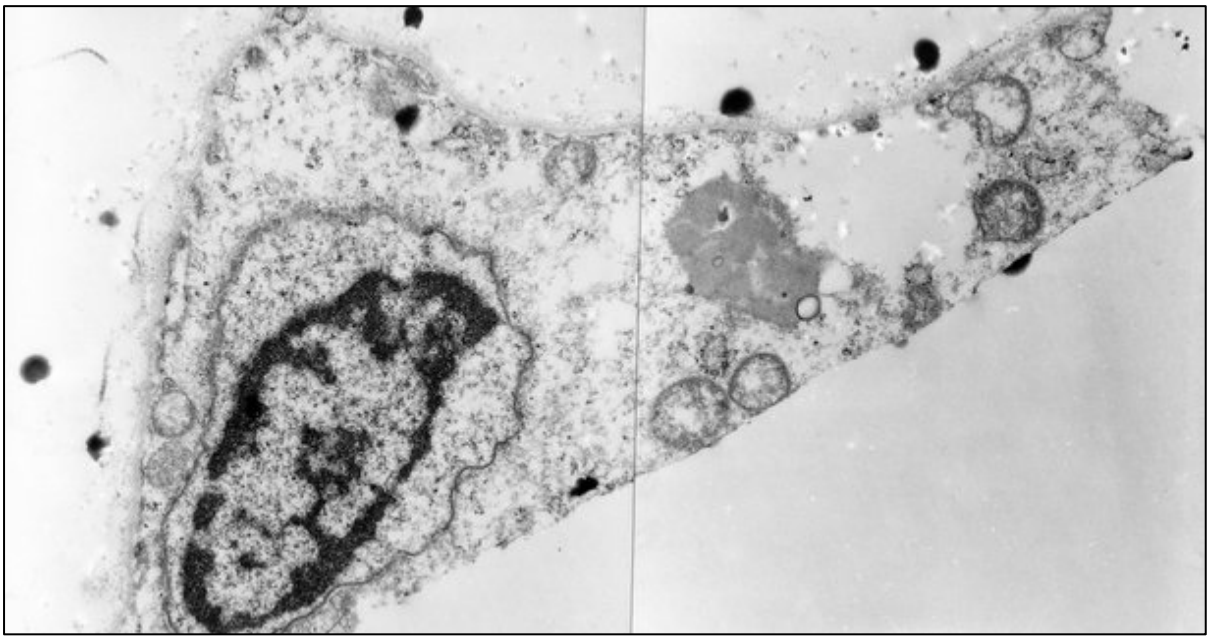

Abbildung 36: LF-EM2, 48h bei -20°C ohne Kryoprotektiv, Vergr.: x23400, Neg.Nr.:39414+39415

Adipozyt im Stadium der Auflösung, Lösung der Kernhülle, Mitochondrien zerstört

5.3 Lagerung ohne Kryokonservierung

Im Rahmen der Hauptversuche wurde, im Gegensatz zu den Vorversuchen, auch das Überleben der Adipozyten bei anderen Temperaturstufen als den oben genannten analysiert.

Die Zellen wurden für 7 Tage bei 04°C, 20°C und 37°C gelagert und es erfolgte eine tägliche Aktivitätsbestimmung mittels des MTT- und XTT-Tests nach dem oben beschriebenen Protokoll.

Die Ergebnisse zeigen, sowohl im MTT- als auch im XTT-Test, eine stetige Abnahme der Aktivität. Allerdings sind deutliche Unterschiede zwischen den Temperaturstufen zu erkennen. Einen hoch signifikanten Unterschied zeigen die Temperaturstufen 04°C und 37°C.

In der MTT-Bestimmung (**Abbildung 37**) zeigen die Proben, die bei 20°C gelagert wurden, in den ersten zwei Tagen ähnliche Aktivitätsverluste wie die bei 04°C gelagerten Proben und verlieren erst in den Tagen drei bis sechs deutlich an Vitalität.

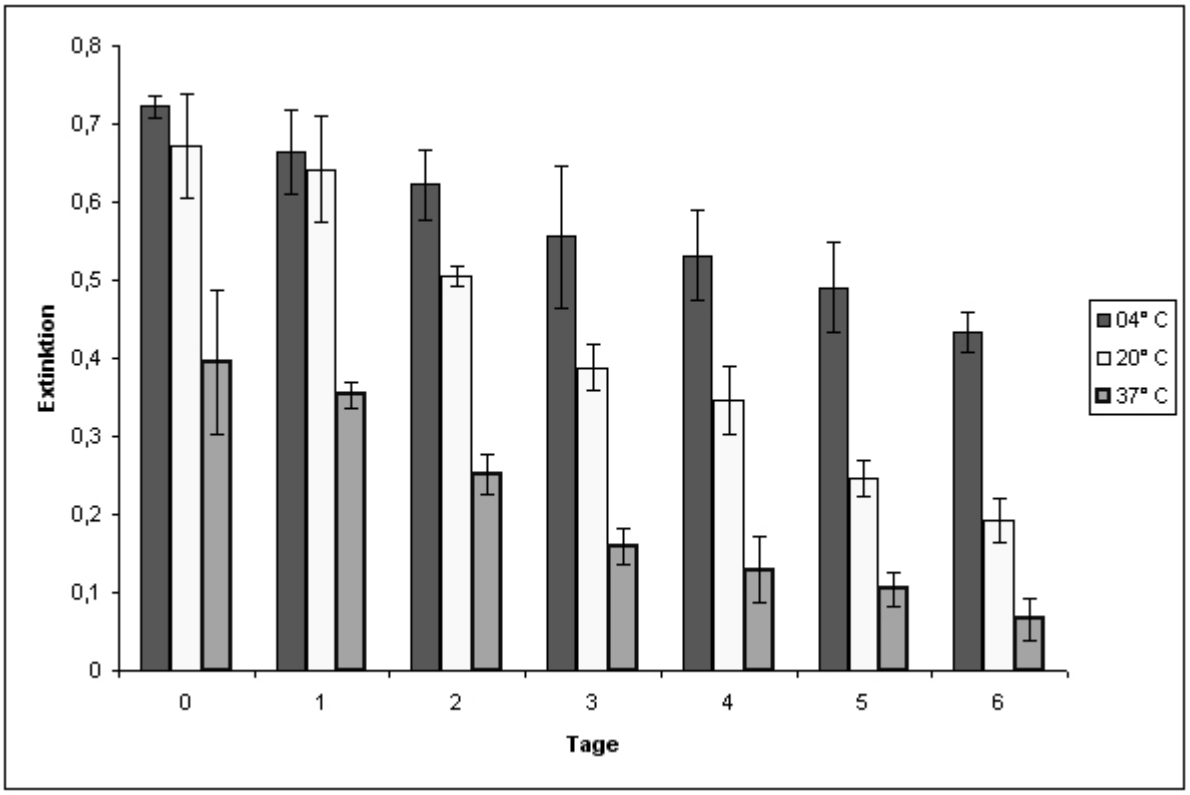

Abbildung 37: ***MTT - Aktivitätsbestimmungen im Verlauf von 7 Tagen nach Lagerung des Fettgewebes bei 04°C, 20°C und 37°C.***

Ein solcher Vitalitätsverlust wie in der MTT-Messung beschrieben, kann in der XTT-Bestimmung (**Abbildung 38**) nicht nachgewiesen werden. Hier sind die Aktivitätseinbußen zu Beginn geringer ausgeprägt. Erst die Messungen an den Tagen 5 und 6 zeigen einen signifikanten Unterschied.

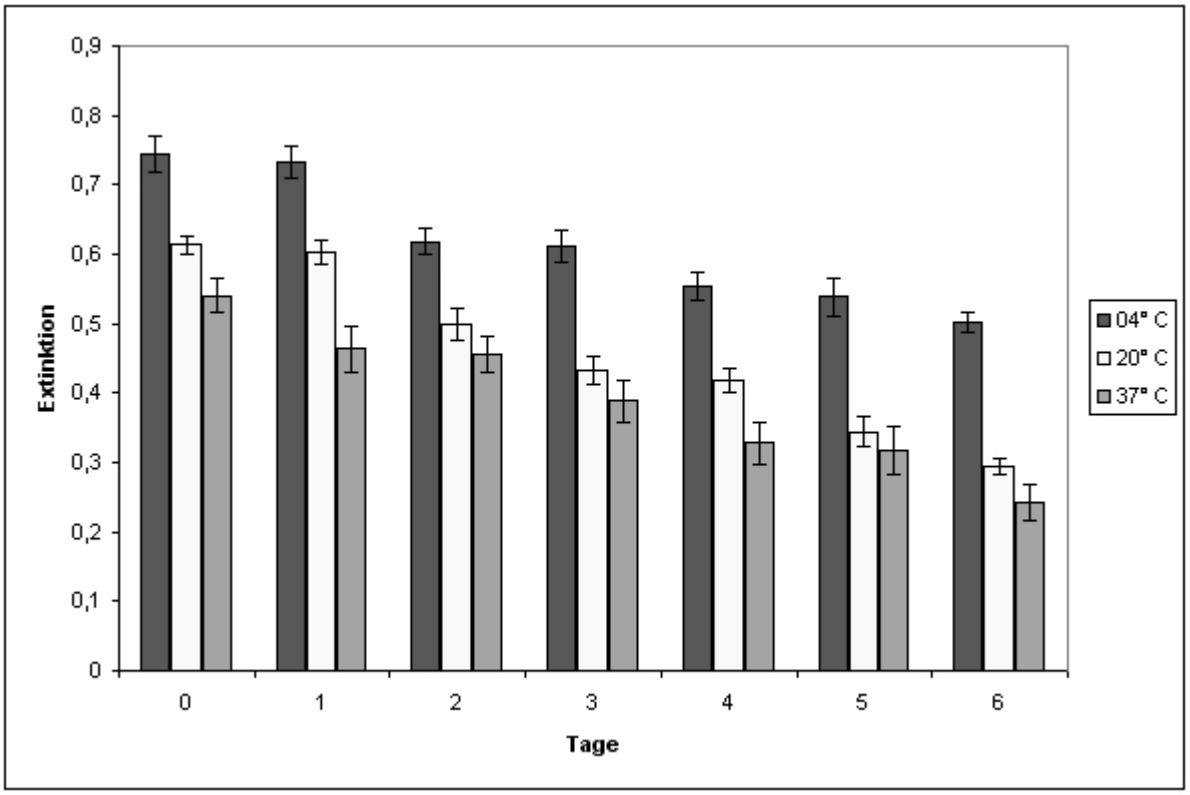

Abbildung 38: ***XTT - Aktivitätsbestimmungen im Verlauf von 7 Tagen nach Lagerung des Fettgewebes bei 04°C, 20°C und 37°C***

5.4 Kryokonservierung ohne Kryoprotektiv

5.4.1 MTT

Die Aktivitätsmessungen, mit dem MTT-Test, an den Adipozyten, die ein Jahr ohne Kryoprotektiv bei -20°C eingefroren wurden, zeigen schon nach 48 Stunden einen hoch signifikanten Verlust (**Abbildung 39**).

Im Verlauf der Messzeitpunkte ist ein weiterer Aktivitätsverlust zu beobachten, jedoch ist dieser nicht signifikant.

Ähnliche Ergebnisse zeigt die MTT-Messung bei den Zellen, die ein Jahr bei -80°C ohne Kryoprotektiv gelagert wurden (**Abbildung 40**). Der Verlust innerhalb der ersten 48 Stunden ist hoch signifikant.

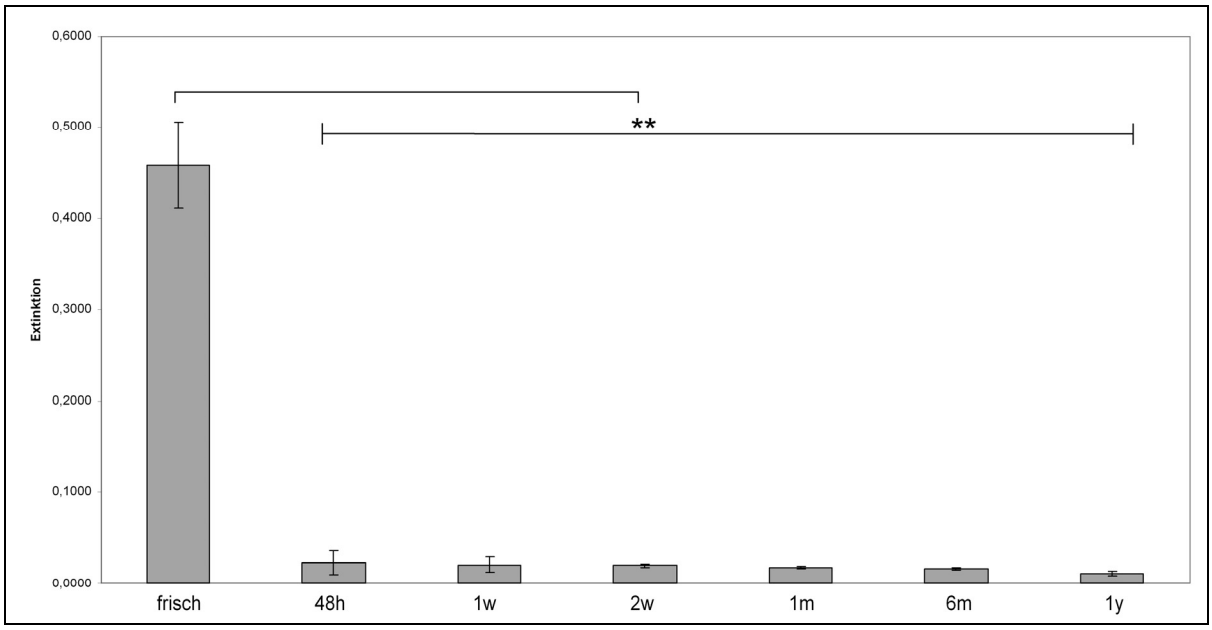

Abbildung 39: ***MTT-Verlauf über ein Jahr, ohne Kryoprotektiv, bei einer Lagerungstemperatur von -20°C; Signifikanz: p < 0,01***

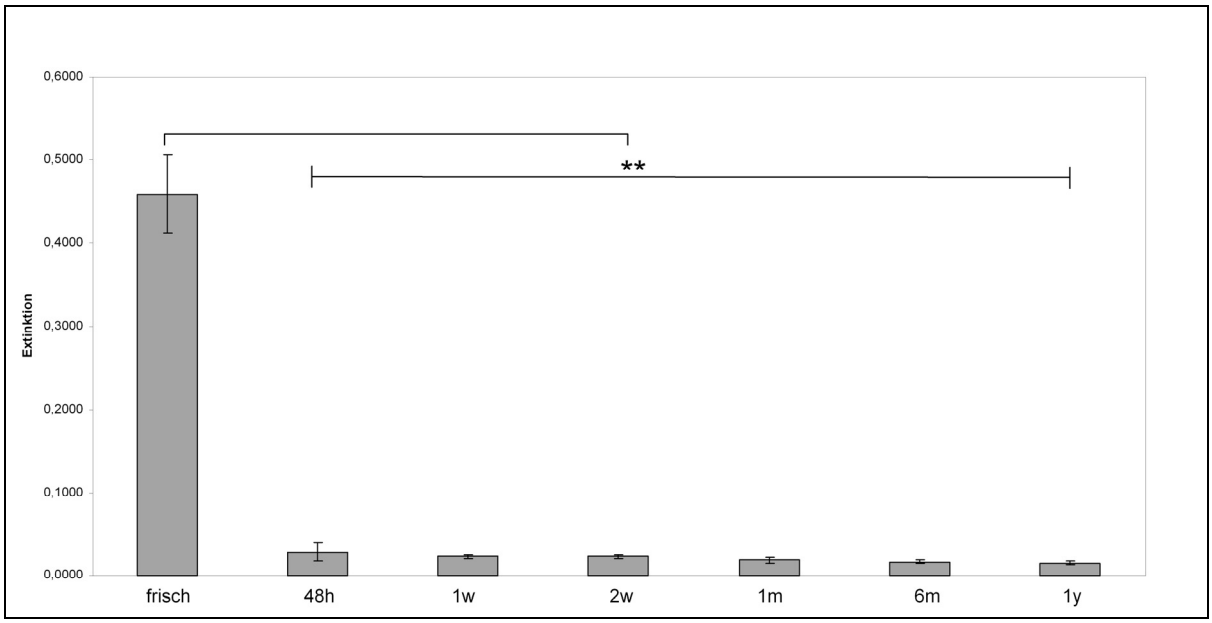

Abbildung 40: ***MTT-Verlauf über ein Jahr, ohne Kryoprotektiv, bei einer Lagerungstemperatur von -80°C; Signifikanz: p < 0,01***

Auch der direkte Vergleich der Temperaturstufen -20° und -80°C (**Abbildung 41**) zeigt den schon in der Einzelbetrachtung dargebotenen Effekt des Vitalitätsverlustes innerhalb der ersten 48 Stunden.

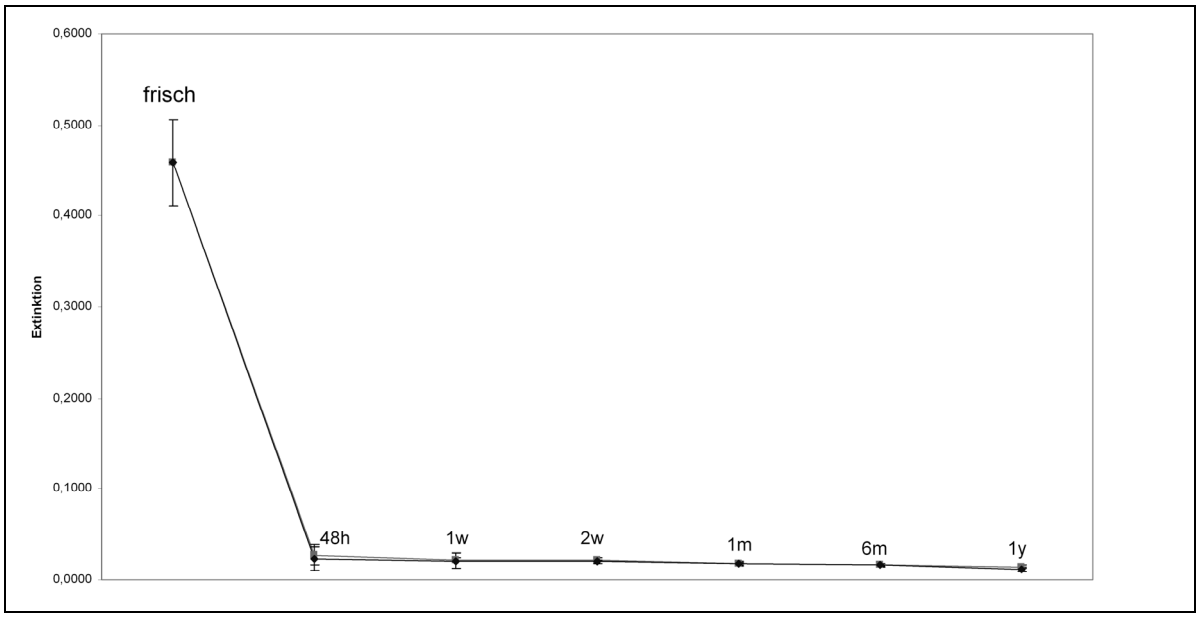

Abbildung 41: ***Aktivitätsverlauf mit MTT über ein Jahr, ohne Kryoprotektiv, Vergleich der Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C***

5.4.2 XTT

Die Untersuchung dieser Zellen mittels des XTT-Tests zeigt gleichfalls einen hochsignifikanten Verlust innerhalb der ersten 48 Stunden nach Beginn der Kryo-Lagerung. Sowohl die Kryokonservierung bei -20°C (**Abbildung 42**), als auch jene bei -80°C (**Abbildung 43**) weisen einen Verlust der enzymatischen Aktivität auf.
Im zeitlichen Verlauf konnte keine signifikante Veränderung beobachtet werden.

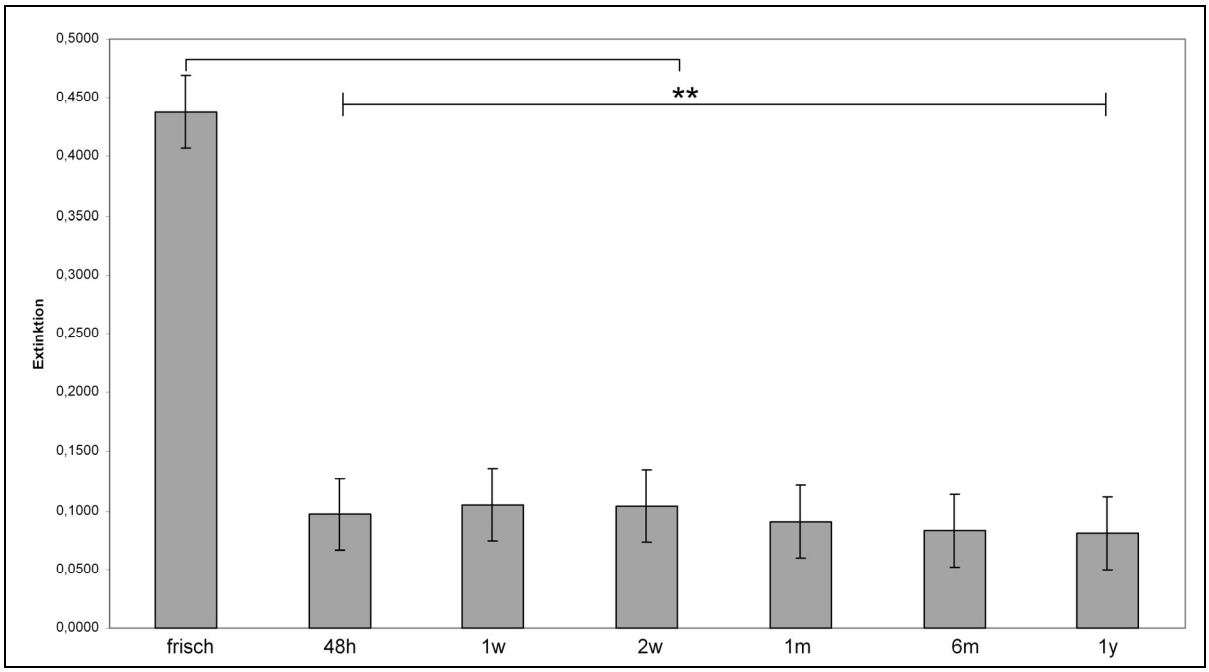

Abbildung 42: ***XTT-Verlauf über ein Jahr, ohne Kryoprotektiv, bei einer Lagerungstemperatur von -20°C; Signifikanz: p < 0,01***

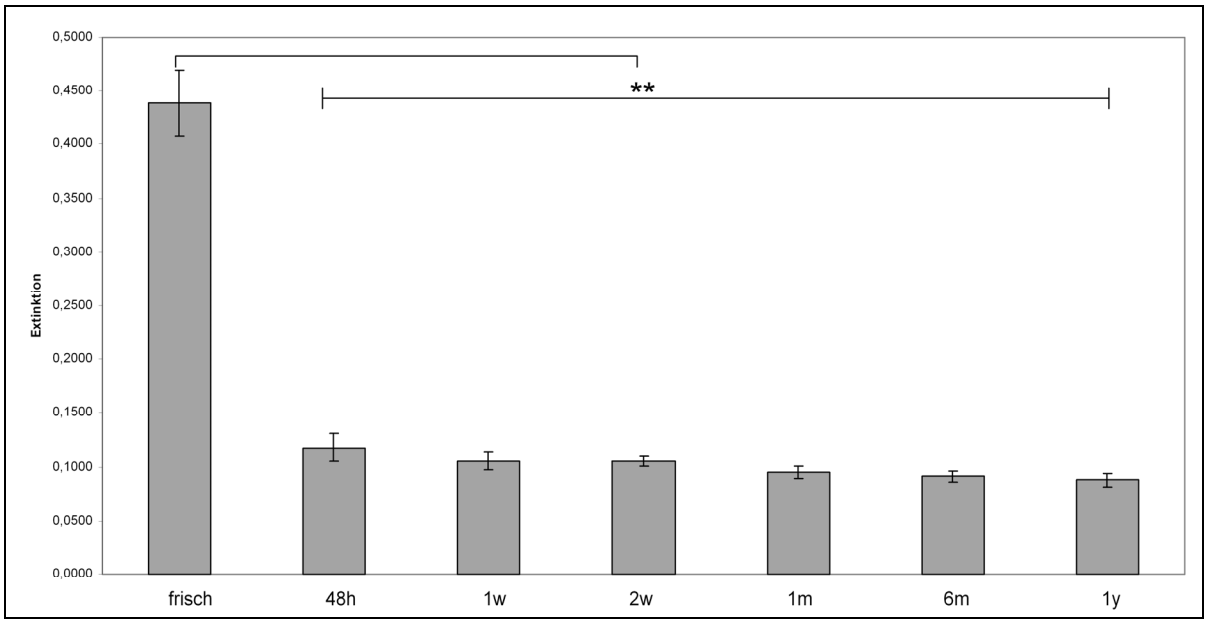

Abbildung 43: ***XTT-Verlauf über ein Jahr, ohne Kryoprotektiv, bei einer Lagerungstemperatur von -80°C; Signifikanz: p < 0,01***

Der Vergleich der beiden Temperaturstufen (**Abbildung 44**) verdeutlicht zum einen, erneut den Verlust zu Beginn der Versuchsreihe, und zum anderen zeigt auch der XTT-Test (Vergleich MTT-Test; **Abbildung 41**) lediglich nach 48 Stunden einen diskreten Unterschied zwischen den Lagerungstemperaturen.

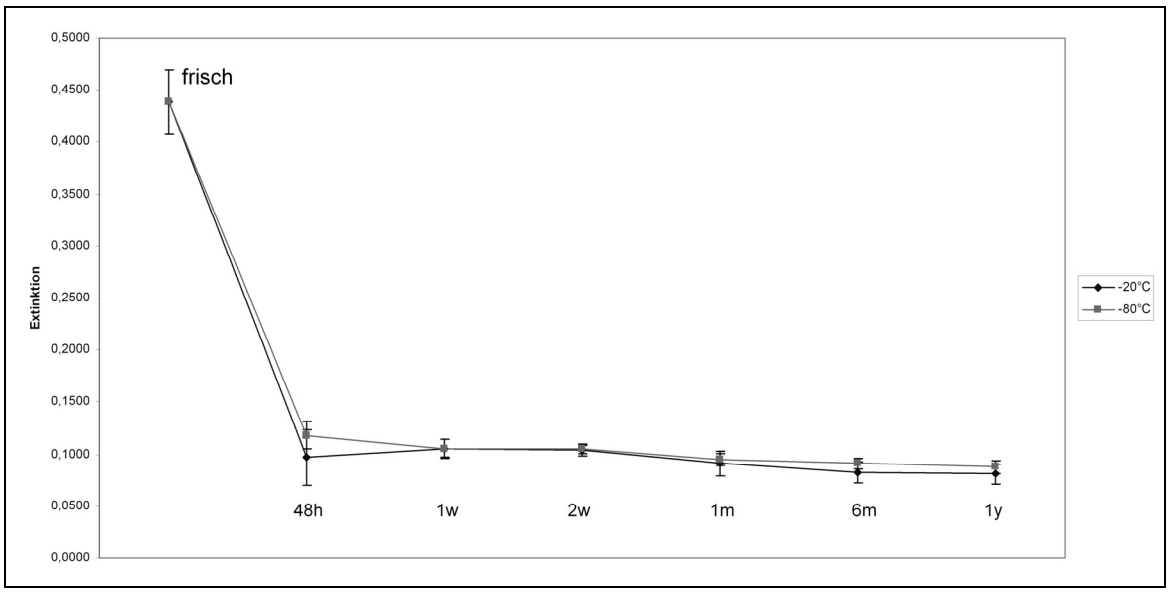

Abbildung 44: ***Aktivitätsverlauf mit XTT über ein Jahr, ohne Kryoprotektiv, Vergleich der Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C***

5.4.3 GPDH

Die Messung des freien GPDH, ohne Verwendung eines Kryoprotektives und bei einer Lagerungstemperatur von -20°C (**Abbildung 45**), zeigte einen hochsignifikanten Anstieg nach 48 Stunden. Im weiteren Verlauf der Zeit, konnte zu allen Zeitpunkten, erneut ein nicht signifikanter Anstieg des freien GPDH nachgewiesen werden.

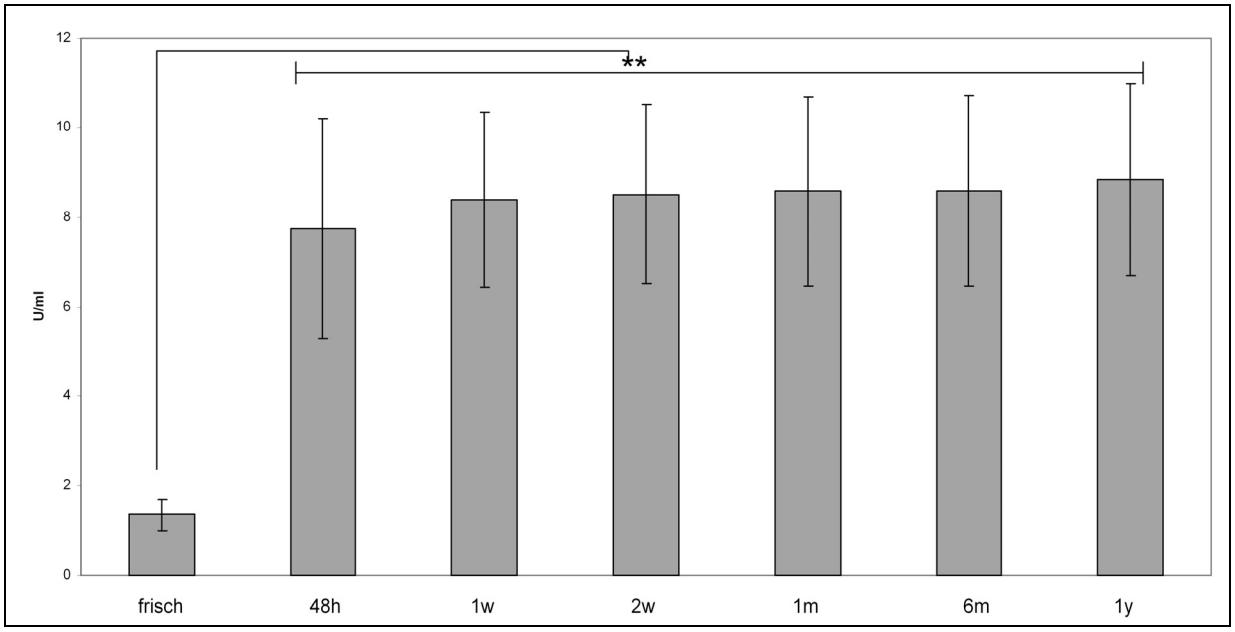

Abbildung 45: ***GPDH-Verlauf über ein Jahr, ohne Kryoprotektiv, bei einer Lagerungstemperatur von -20°C; Signifikanz: p < 0,01***

Bei einer Kryokonservierungstemperatur von -80°C und ohne Verwendung eines Protektives (**Abbildung 46**), zeigte sich erneut eine hochsignifikante Zunahme des freien GPDH.

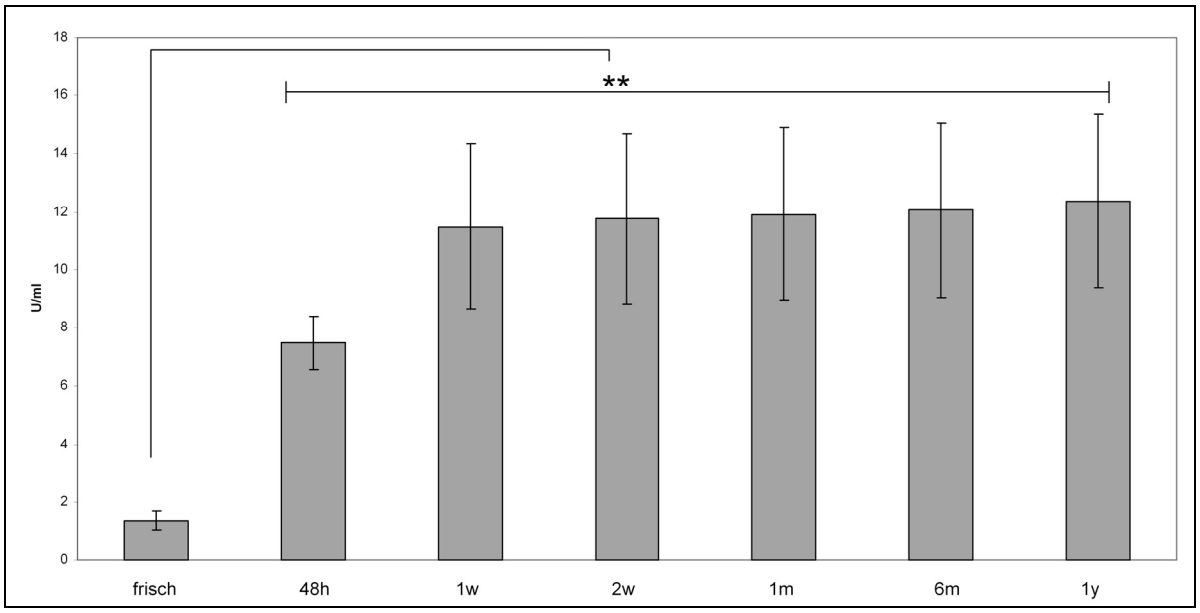

Abbildung 46: *GPDH-Verlauf über ein Jahr, ohne Kryoprotektiv, bei einer Lagerungstemperatur von -80°C; Signifikanz: p < 0,01*

Der Vergleich der verwendeten Temperaturen zeigt, im Bezug auf die Bestimmung des GPDH, wiederum den hochsignifikanten Anstieg bei der Messung nach 48 Stunden. In den zeitlich folgenden Analysen konnte erstmals, beginnend mit der Messung nach 7 Tagen, eine signifikante Differenz zwischen -20°C und -80°C dargestellt werden. Diese Diskrepanz bleibt bis zum Beobachtungsende, nach einem Jahr, fast unverändert.

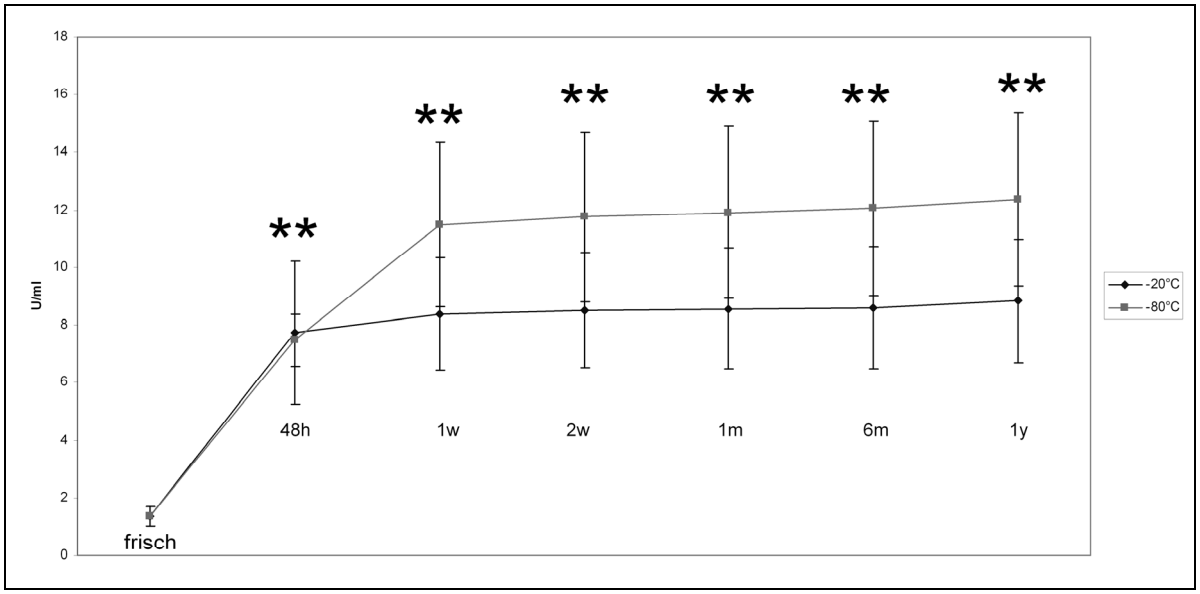

Abbildung 47: *Vergleich des Aktivitätsverlauf des freien GPDH über ein Jahr, ohne Kryoprotektiv, Vergleich der Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C; Signifikanz: p < 0,01*

5.5 Kroyokonservierung mit Kryoprotektiv

5.5.1 Hydroxyethylstärke

5.5.1.1 MTT

Die **Abbildung 48** zeigt den hochsignifikanten Verlust der zellulären, durch den MTT-Test dargestellten, mitochondrialen enzymatischen Aktivität, innerhalb der ersten 48 Stunden nach Kryokonservierung mit Hydroxyethylstärke als Protektiv und einer Temperatur von -20°C. Der Verlauf bei einer Konservierung mit -80°C (**Abbildung 49**) zeigt kaum Differenzen im Vergleich zur Lagerung bei -20°C (**Abbildung 48**). Im direkten Vergleich der beiden Temperaturstufen (**Abbildung 50**) ist am Ende der Messreihe lediglich ein diskreter Unterschied zu Gunsten einer Lagerung bei -80°C zu erkennen.

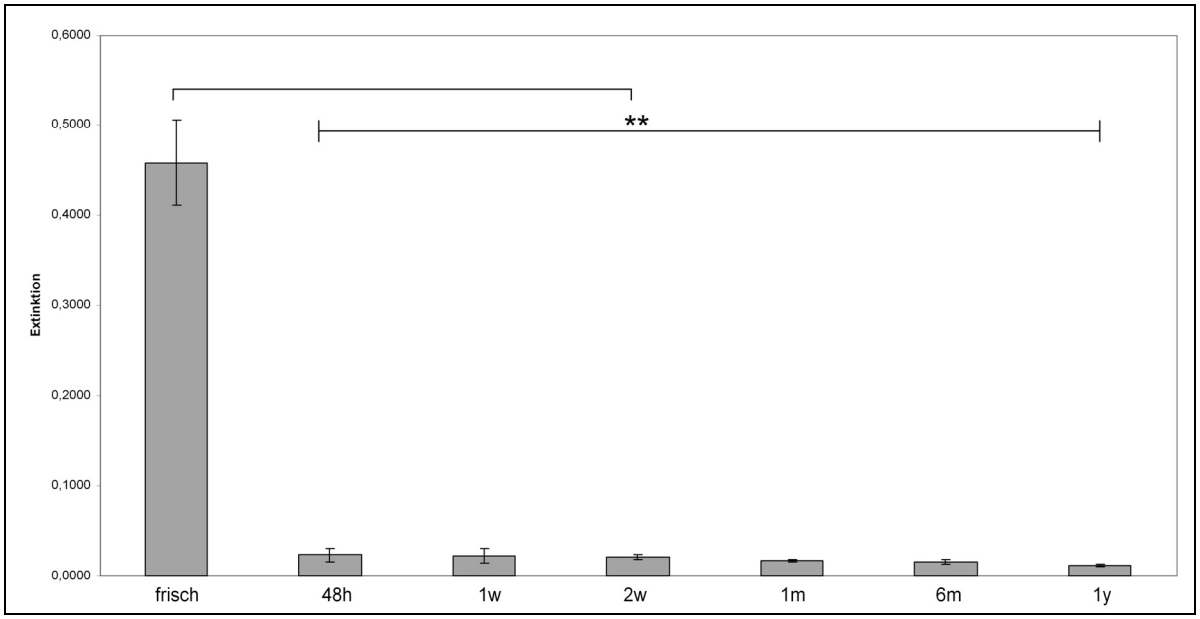

Abbildung 48: *MTT-Aktivität über ein Jahr bei Verwendung von HES (II) als Kryoprotektiv und einer Lagerungstemperatur von -20°C ; Signifikanz: p < 0,01*

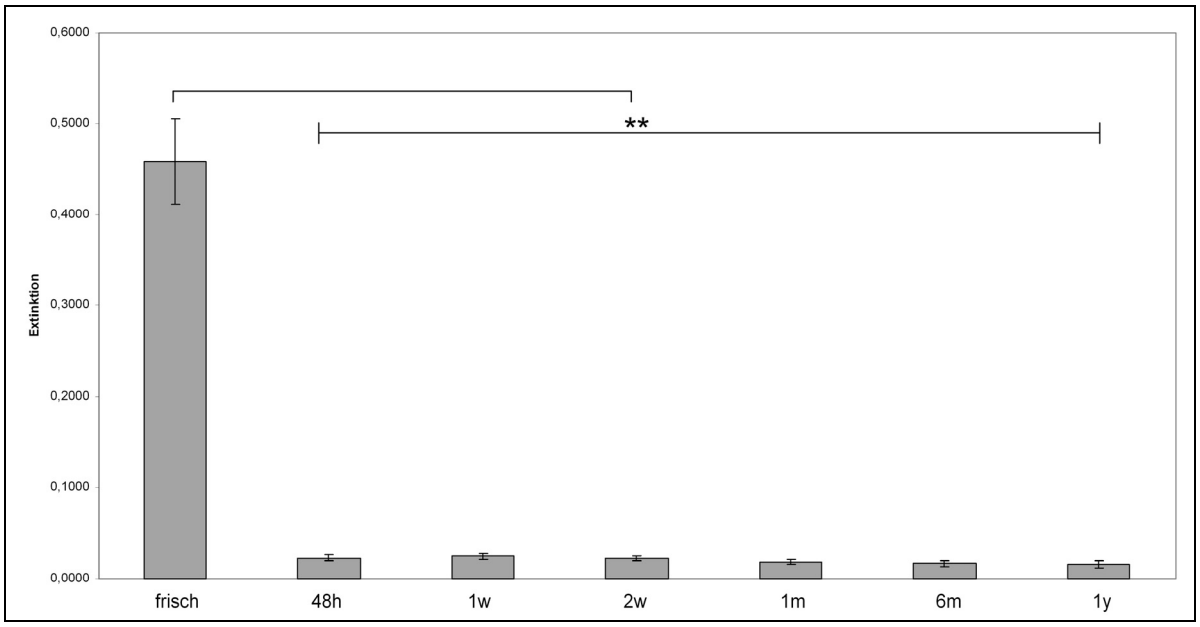

Abbildung 49: ***MTT-Aktivität über ein Jahr bei Verwendung von HES (II) als Kryoprotektiv und einer Lagerungstemperatur von -80°C; Signifikanz: p < 0,01***

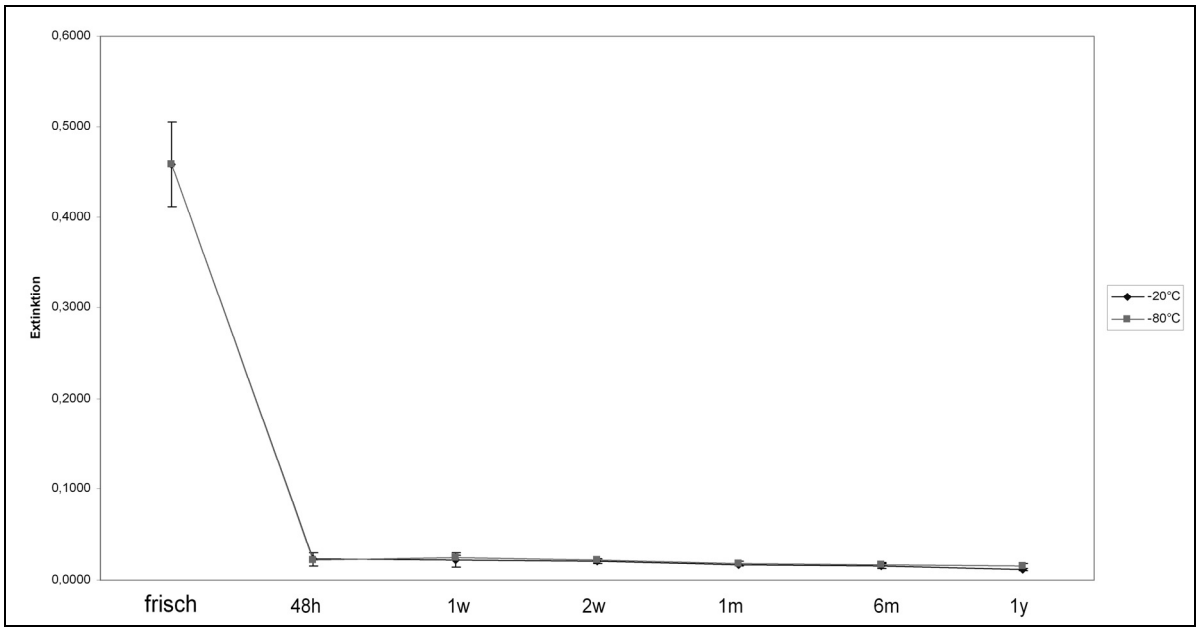

Abbildung 50: ***Vergleich MTT-Aktivität bei Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C unter Verwendung von HES als Kryoprotektiv über ein Jahr.***

5.5.1.2 XTT

Die Messung der intrazellulären enzymatischen Aktivität, mittels XTT-Test (**Abbildung 51 und 52**), zeigt kaum Unterschiede im Vergleich zur MTT-Messung (**Abbildung 48 und 49**). Zu beobachten ist ebenfalls ein hochsignifikanter Verlust der Aktivität nach 48 Stunden, der sich im Verlauf der Messungen deutlich vermindert fortsetzt.

Der direkte Vergleich der Konservierungs-Temperaturen (**Abbildung 53**) zeigt bereits ab den Messpunkten nach einem Monat eine marginale Differenz zu Gunsten der Lagerung bei -80°C, die im Vergleich zur MTT-Messung, am Ende der Messreihe, (**Abbildung 50**) geringfügig deutlicher ausfällt.

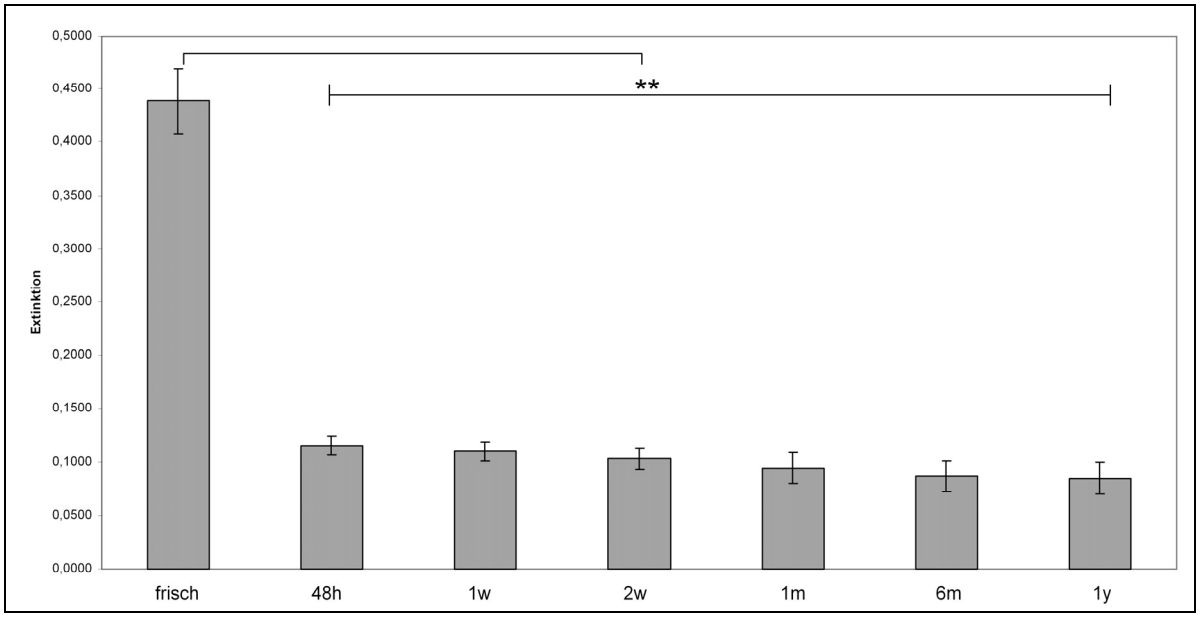

Abbildung 51: *XTT-Aktivität über ein Jahr bei Verwendung von HES (II) als Kryoprotektiv und einer Lagerungstemperatur von -20°C; Signifikanz: p < 0,01*

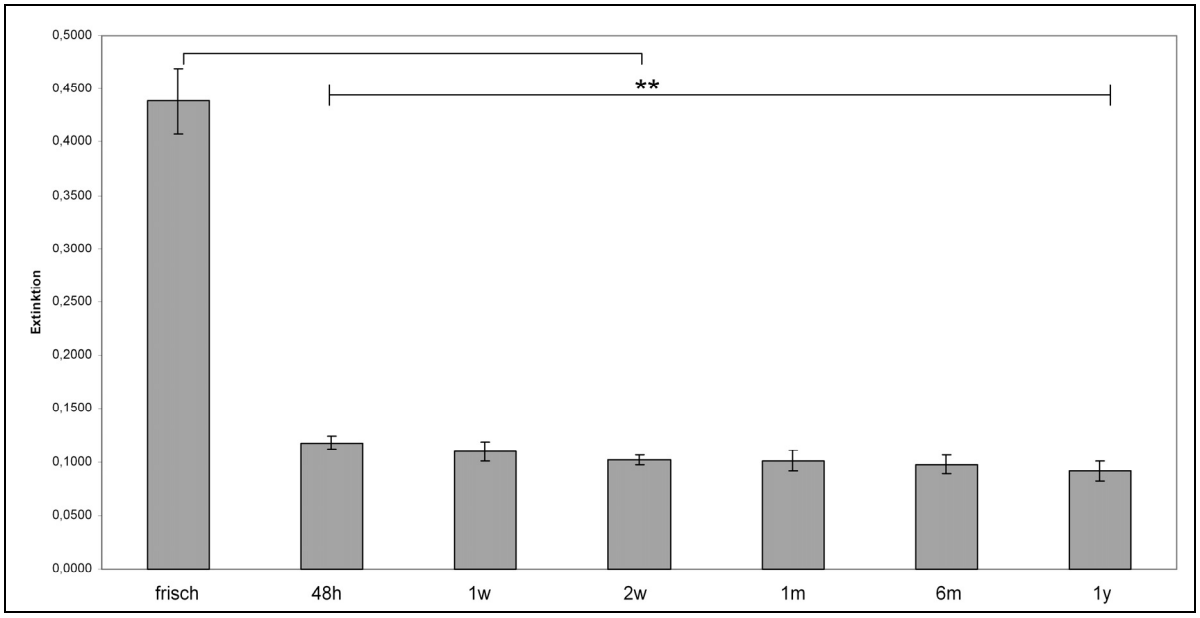

Abbildung 52: *XTT-Aktivität über ein Jahr bei Verwendung von HES (II) als Kryoprotektiv und einer Lagerungstemperatur von -80°C; Signifikanz: p < 0,01*

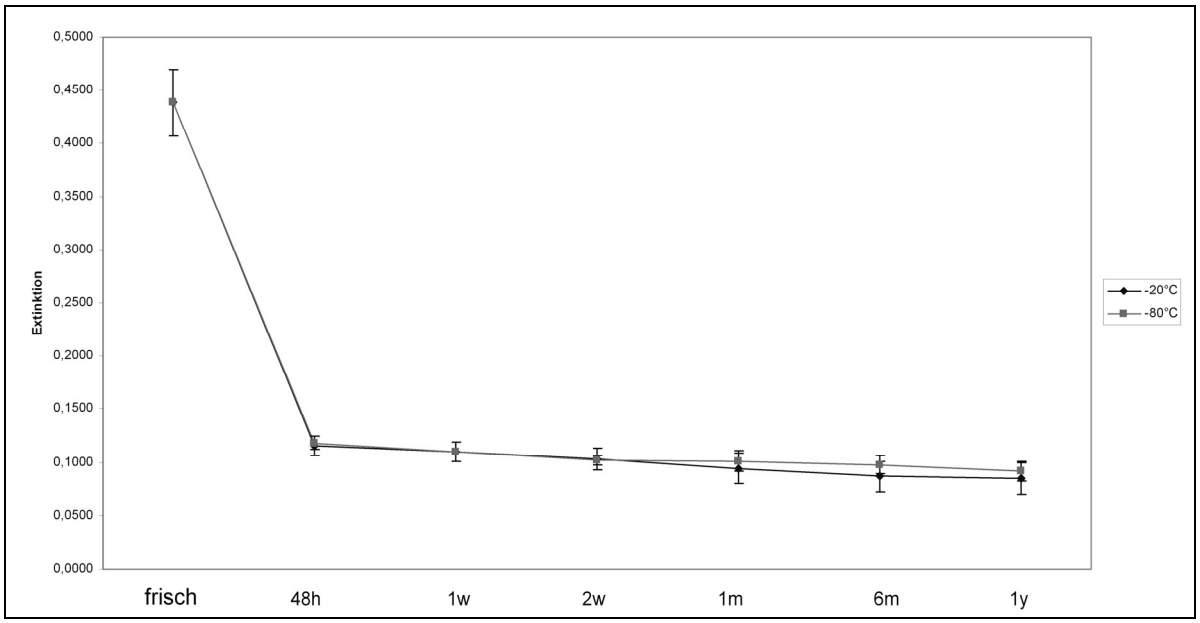

Abbildung 53: ***Vergleich XTT-Aktivität bei Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C unter Verwendung von HES als Kryoprotektiv über ein Jahr.***

5.5.1.3 GPDH

Die Bestimmung der freien GPDH zeigt ebenfalls eine hochsignifikante Zunahme, sowohl bei einer Lagerungstemperatur von -20°C (**Abbildung 54**) als auch bei -80°C (**Abbildung 55**). Im Vergleich der beiden Konservierungstemperaturen (**Abbildung 56**) wird jedoch neuerlich eine Differenz deutlich. Die Gegenüberstellung der Temperaturen bei den MTT- (**Abbildung 50**) und XTT-Messungen (**Abbildung 53**) zeigte jeweils nur eine diskrete Differenz zu Gunsten der Konservierung bei -80°C. Dieser Unterschied wird in der Glycerin-3-posphat-Dehydrogenase-Bestimmung (**Abbildung 56**) jedoch deutlich sichtbarer. Bereits bei den Messpunkten nach 48 Stunden Kryokonservierung ist eine Differenz erkennbar, die sich im Verlauf der Messreihe weiter vergrößert und ab den Messpunkten nach 1 Monat nicht weiter verändert.

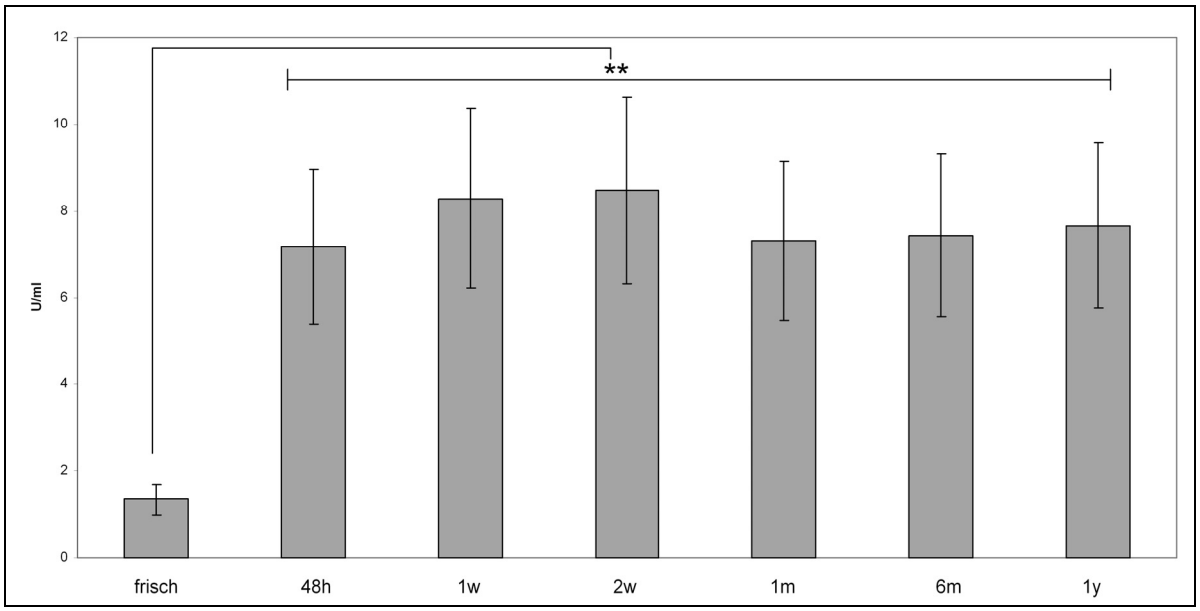

Abbildung 54: ***GPDH-Verlauf über ein Jahr, bei Verwendung von HES als Kryoprotektiv, bei einer Lagerungstemperatur von -20°C; Signifikanz: p < 0,01***

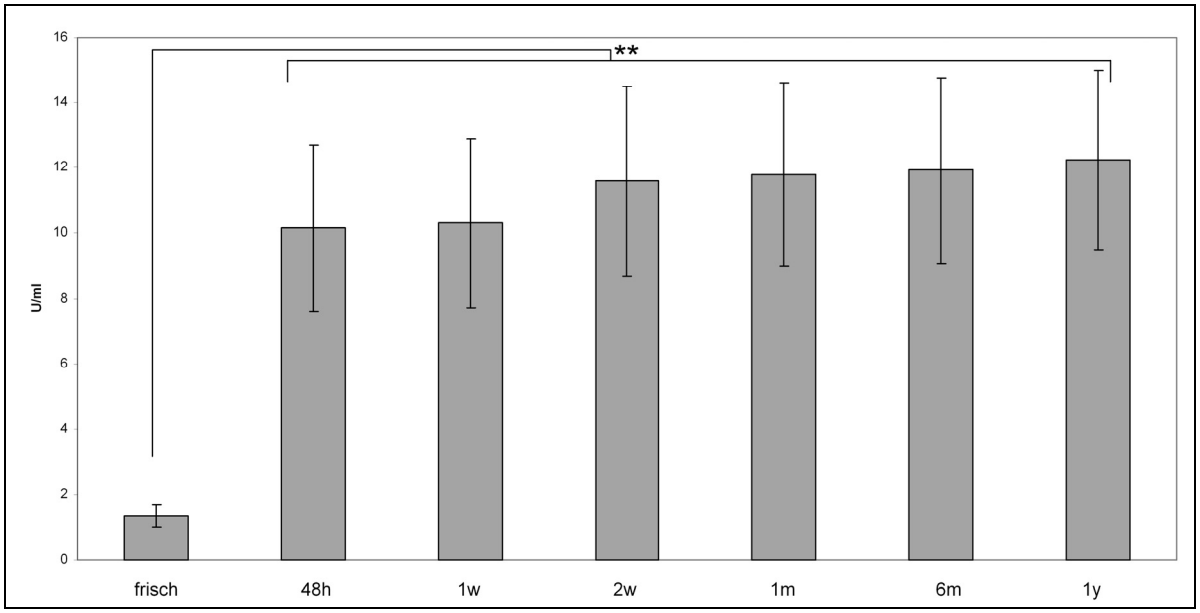

Abbildung 55: ***GPDH-Verlauf über ein Jahr, bei Verwendung von HES als Kryoprotektiv, bei einer Lagerungstemperatur von -80°C; Signifikanz: p < 0,01***

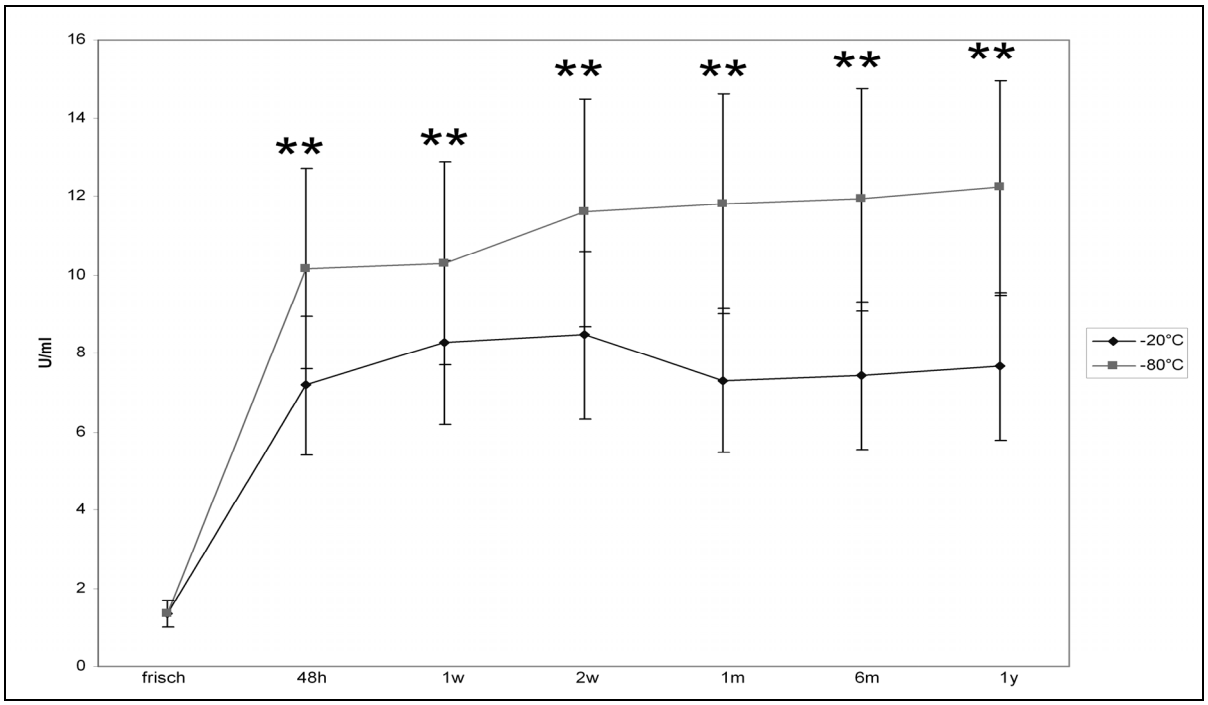

Abbildung 56: ***Vergleich des Aktivitätsverlauf des freien GPDH über ein Jahr, unter Verwendung von HES (II) als Kryoprotektiv, bei -20°C und -80°C; Signifikanz: p < 0,01***

5.5.1.4 Vergleich

Die **Abbildungen 57** und **58** sollen in einer Grafik jeweils den Vergleich der Ergebnisse aus den Messungen von MTT, XTT und GPDH, getrennt nach Lagerungstemperatur, ermöglichen.

Insofern ist es eine Zusammenfassung der vorausgegangenen Analysen. Im Vergleich zu den Abbildungen zuvor, in denen jeweils gleiche Bestimmungsmethoden bei unterschiedlichen Temperaturen verglichen wurden, ist hier ein direkter Vergleich nicht indiziert. MTT und XTT bedienen sich wie in 4.3.2 und 4.3.3. ausgeführt, unterschiedlicher Enzyme. Jedoch bleibt zusammenfassend der hochsignifikante Abfall bzw. Anstieg nach 48 Stunden sowie eine jeweilig kontinuierliche Veränderung über den Verlauf der Messreihe zu vermerken.

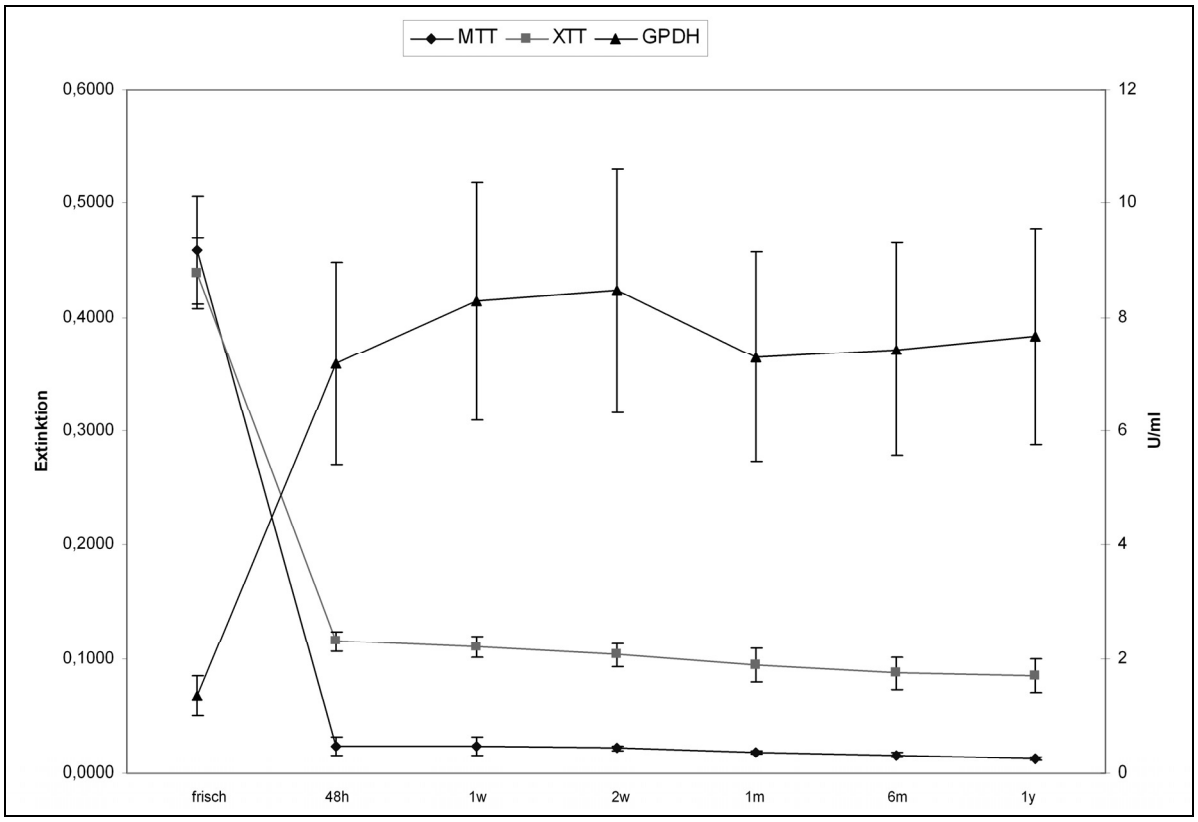

Abbildung 57: ***Vergleich von MTT-, XTT- und GPDH-Verlauf über ein Jahr, Kryoprotektiv: HES, bei einer Lagerungstemperatur von -20°C***

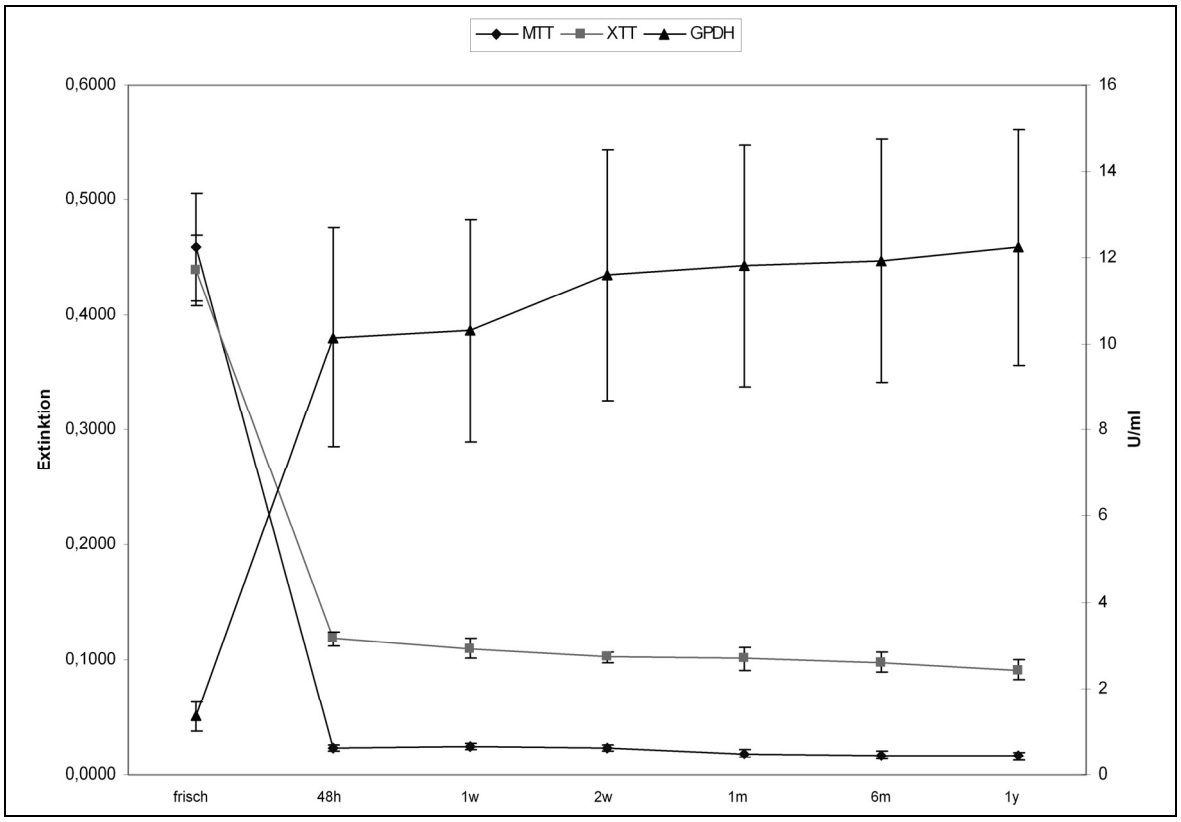

Abbildung 58: ***Vergleich von MTT-, XTT- und GPDH-Verlauf über ein Jahr, Kryoprotektiv: HES, bei einer Lagerungstemperatur von -80°C***

5.5.2 Glycerin

5.5.2.1 MTT

Der MTT-Test, bei Verwendung von Glycerin als Kryoprotektiv, zeigt vergleichbare Ergebnisse wie 5.3.1 (HES). Sowohl bei -20°C (**Abbildung 59**) als auch bei -80°C (**Abbildung 60**), als Konservierungstemperatur, kommt es zu einem hochsignifikanten Verlust nach 48 Stunden.

Ebenso der direkte Vergleich der beiden Temperaturen (**Abbildung 61**) über den Verlauf der Messreihe. Mit Ausnahme der Messpunkte nach einer Woche. Hier zeigt sich erneut ein diskreter Vorteil zu Gunsten der kälteren Konservierung bei -80°C.

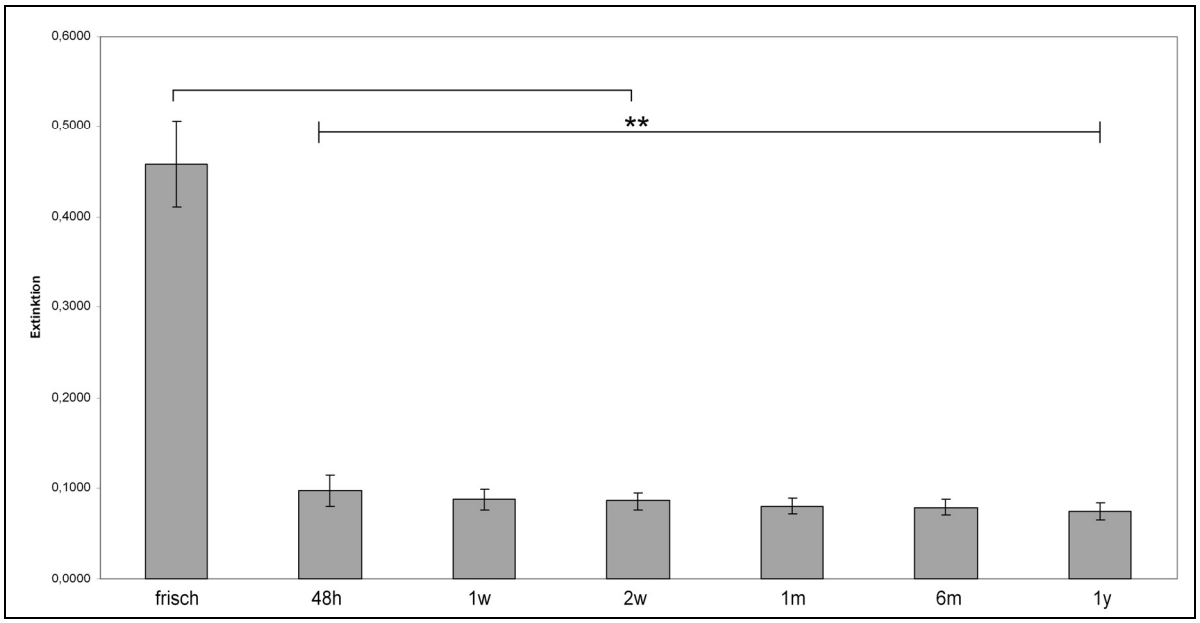

Abbildung 59: ***MTT-Aktivität über ein Jahr bei Verwendung von Glycerin (III) als Kryoprotektiv und einer Lagerungstemperatur von -20°C; Signifikanz: p < 0,01***

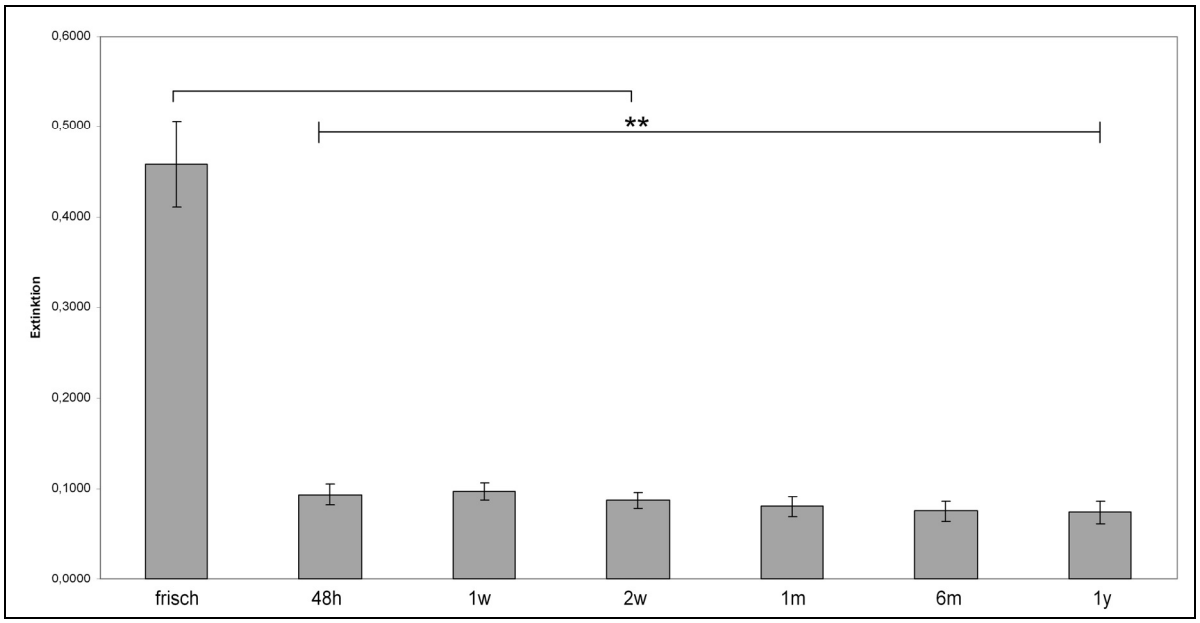

Abbildung 60: ***MTT-Aktivität über ein Jahr bei Verwendung von Glycerin (III) als Kryoprotektiv und einer Lagerungstemperatur von -80°C; Signifikanz: p < 0,01***

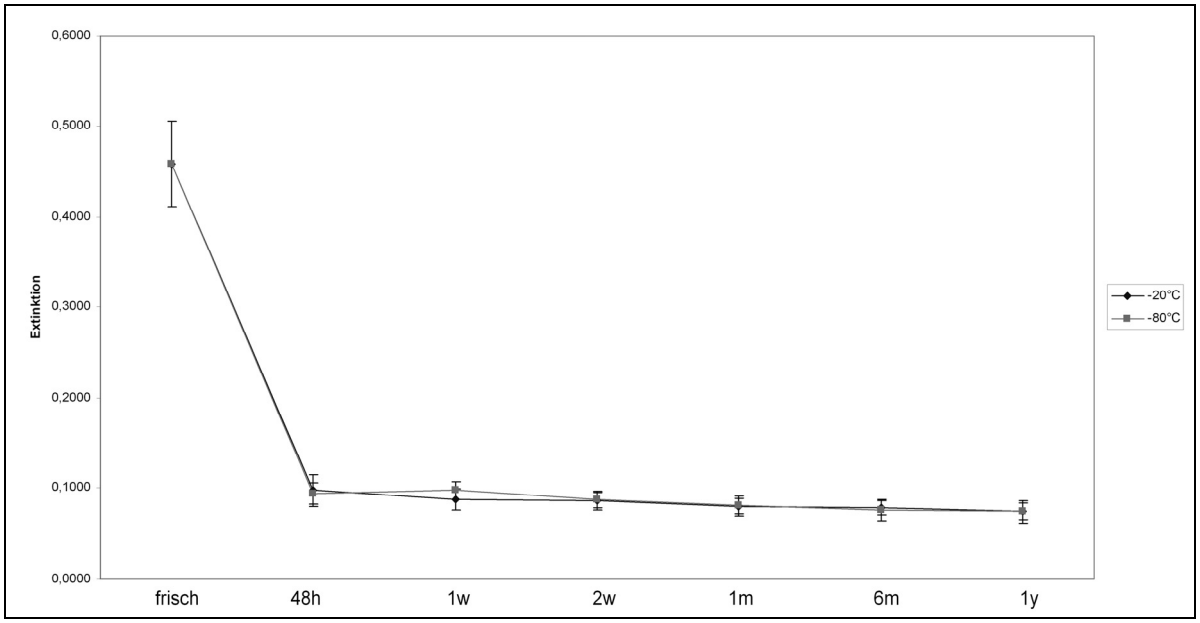

Abbildung 61: ***Vergleich der MTT-Aktivität bei Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C unter Verwendung von Glycerin (III) als Kryoprotektiv über ein Jahr.***

5.5.2.2 XTT

Der Vergleich der MTT-Messungen ist ebenfalls auf die XTT-Messungen zu übertragen. Unverändert deutlich sichtbar ist der Aktivitätsverlust nach 48 Stunden, sowie die weitere kontinuierliche Abnahme der enzymatischen Aktivität über den zeitlichen Verlauf der Messungen, sowohl bei -20°C (**Abbildung 62**), als auch bei -80°C (**Abbildung 63**). Der direkte Vergleich dieser beiden Messreihen (**Abbildung 64**) zeigt zum wiederholten Male einen geringeren Aktivitätsverlust, beginnend mit den Messpunkten nach zwei Wochen Kryokonservierung, zu Gunsten der Lagerung bei -80°C.

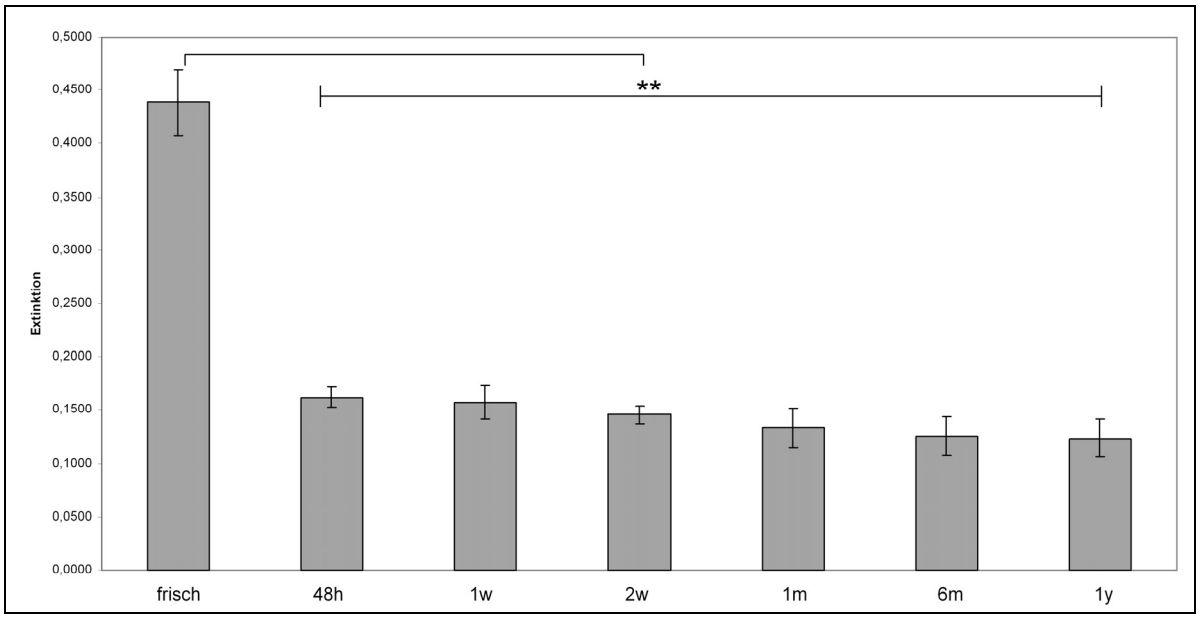

Abbildung 62: ***XTT-Aktivität über ein Jahr bei Verwendung von Glycerin (III) als Kryoprotektiv und einer Lagerungstemperatur von -20°C; Signifikanz: p < 0,01***

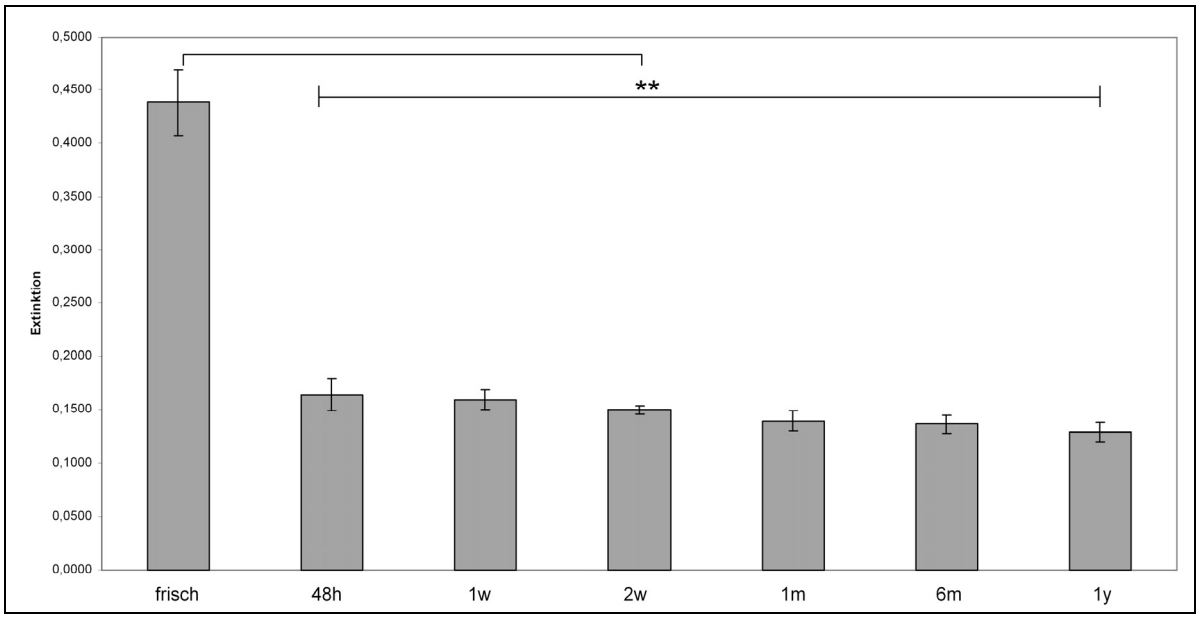

Abbildung 63: ***XTT-Aktivität über ein Jahr bei Verwendung von Glycerin (III) als Kryoprotektiv und einer Lagerungstemperatur von -20°C; Signifikanz: p < 0,01***

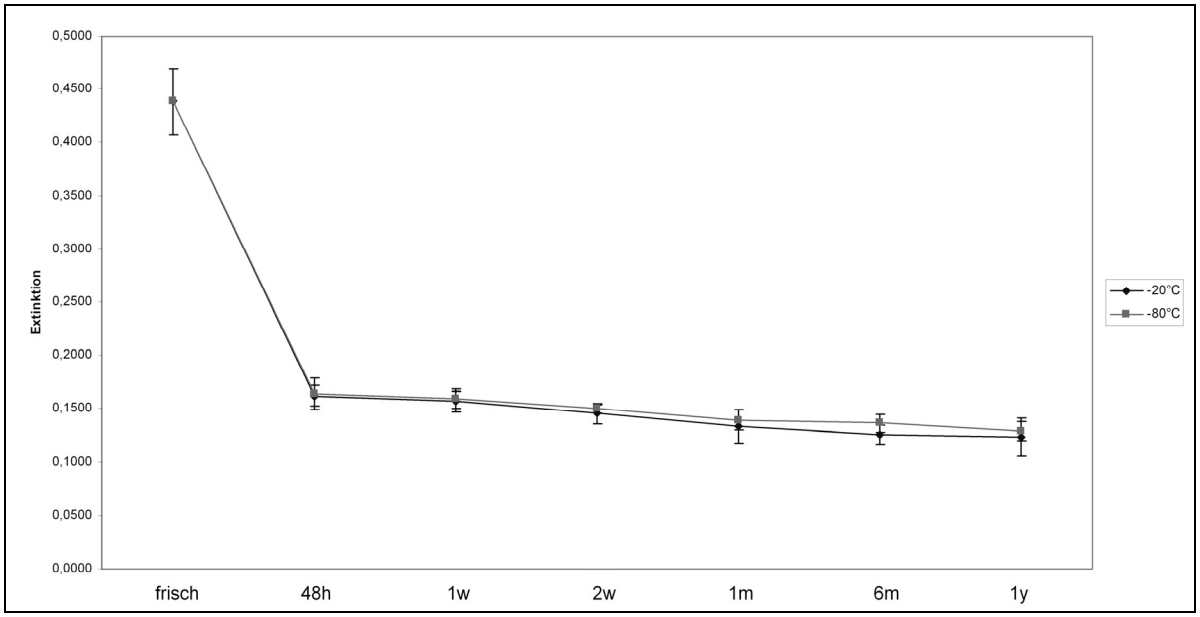

Abbildung 64: ***Vergleich der XTT-Aktivität bei Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C unter Verwendung von Glycerin (III) als Kryoprotektiv über ein Jahr.***

5.5.2.3 GPDH

Ebenfalls im Verlauf vergleichbar ist die GPDH-Bestimmung. Es bleibt weiterhin der hochsignifikante Anstieg nach 48 Stunden sowie die deutlich geringere kontinuierliche Zunahme im zeitlichen Verlauf. Jedoch zeigt sich im direkten Vergleich der **Abbildungen 56 und 67** ein differenter Verlauf der Graphen. Die **Abbildung 67** zeigt einen geringeren Unterschied zwischen den Temperaturstufen -20°C und -80°C.

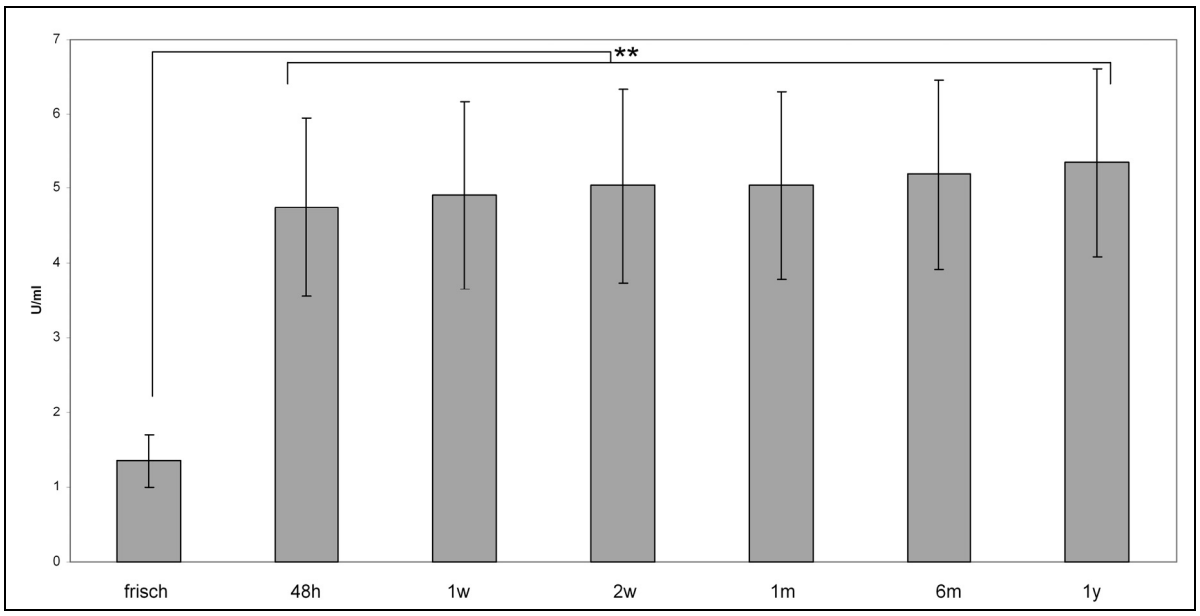

Abbildung 65: ***GPDH-Verlauf über ein Jahr, bei Verwendung von Glycerin (III) als Kryoprotektiv, bei einer Lagerungstemperatur von -20°C; Signifikanz: p < 0,01***

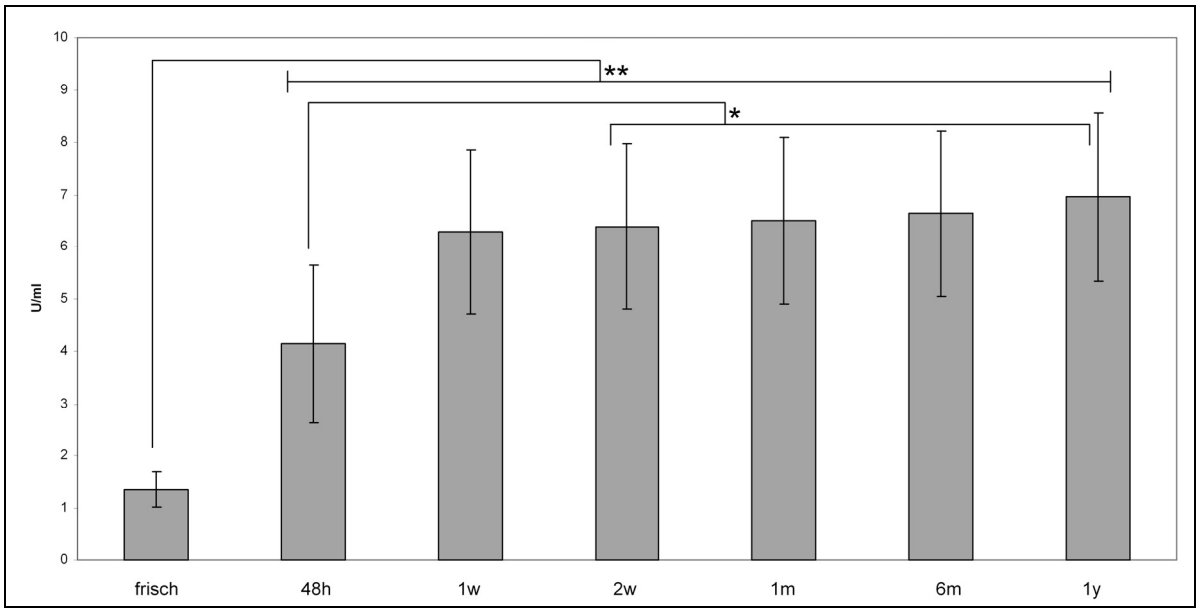

Abbildung 66: ***GPDH-Verlauf über ein Jahr, bei Verwendung von Glycerin (III) als Kryoprotektiv, bei einer Lagerungstemperatur von -80°C; Signifikanz: ** p < 0,01, * p< 0,05***

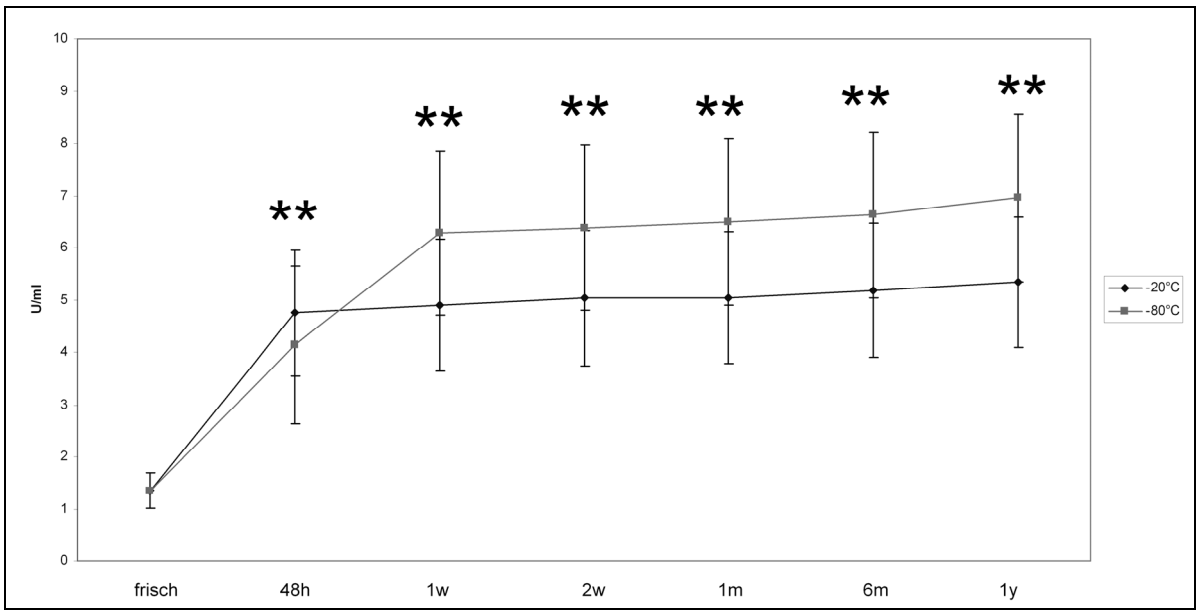

Abbildung 67: ***Vergleich des Aktivitätsverlauf des freien GPDH über ein Jahr, unter Verwendung von Glycerin (III) als Kryoprotektiv, bei Lagerungstemperaturen von -20°C und -80°C.***

5.5.2.4 Vergleich

Der Vergleich der Messparameter MTT, XTT und GPDH zeigt bei Verwendung von Glycerin als Protektiv bei -80°C (**Abbildung 69**) Konservierungstemperatur einen sichtbar flacheren Verlauf der Graphen, sowohl die Verminderung der Aktivität bei MTT und XTT, als auch die Zunahme der messbaren freien Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase, im Vergleich zur Lagerung bei -20°C (**Abbildung 68**).

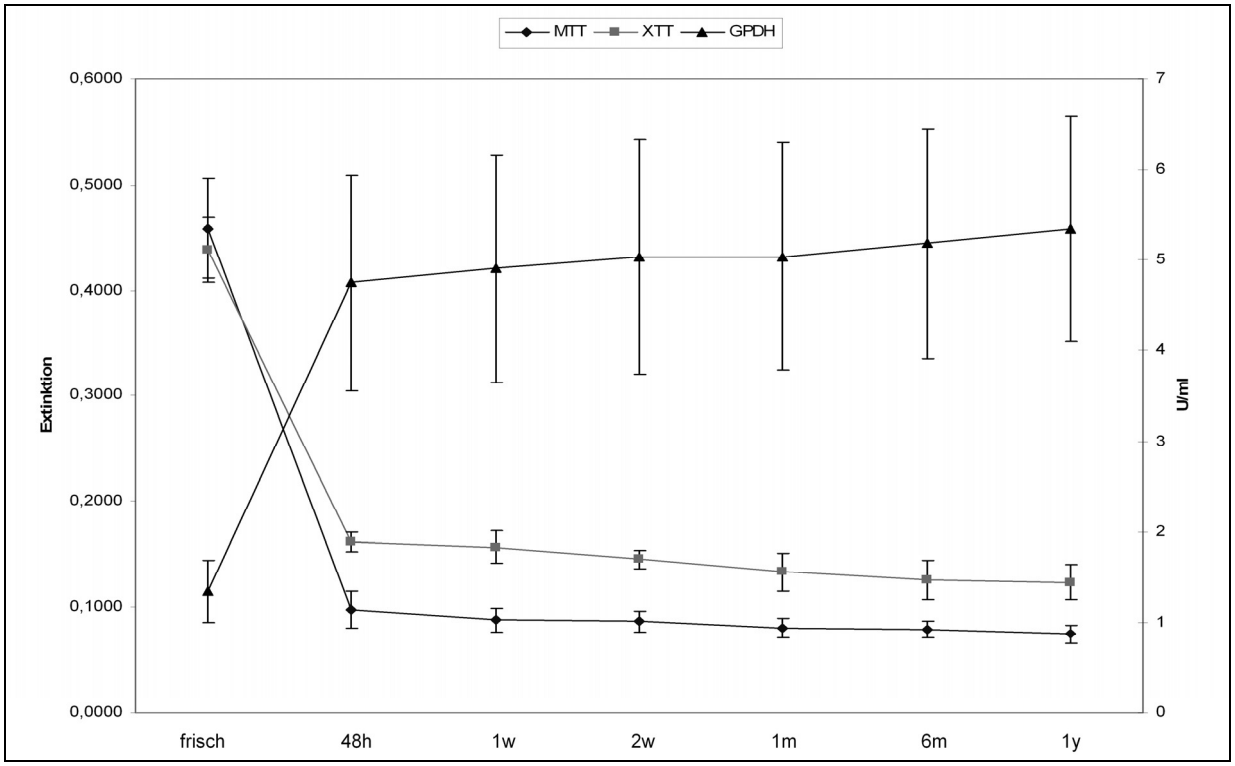

Abbildung 68: ***Vergleich von MTT-, XTT- und GPDH-Verlauf über ein Jahr, Kryoprotektiv: Glycerin, bei einer Lagerungstemperatur von -20°C***

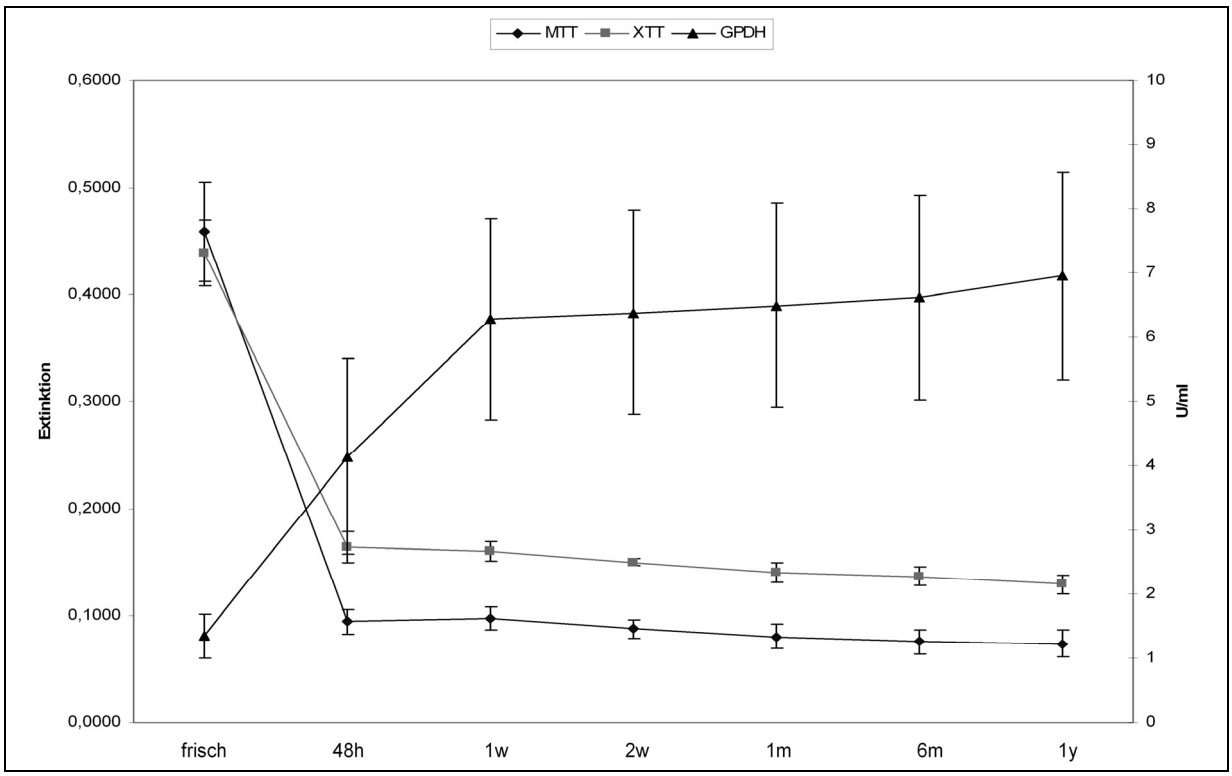

Abbildung 69: ***Vergleich von MTT-, XTT- und GPDH-Verlauf über ein Jahr, Kryoprotektiv: Glycerin, bei einer Lagerungstemperatur von -80°C***

5.5.3 Glycerin, Dextran, Polyvinylpyrrolidon

5.5.3.1 MTT

Auch bei Verwendung der experimentellen Zusammenstellung von Glycerin, Dextran und PVP zeigt sich in der MTT-Messung ein hochsignifikanter Verlust der enzymatischen Aktivität nach 48 Stunden Kryokonservierung bei -20°C (**Abbildung 70**). Ein vergleichbares Verhalten zeigt die **Abbildung 71** im Bezug auf die Konservierung bei -80°C.

Der direkte Vergleich der beiden Temperaturstufen (**Abbildung 72**) zeigt ebenfalls keine deutlichen Unterschiede zwischen -20°C und -80°C.

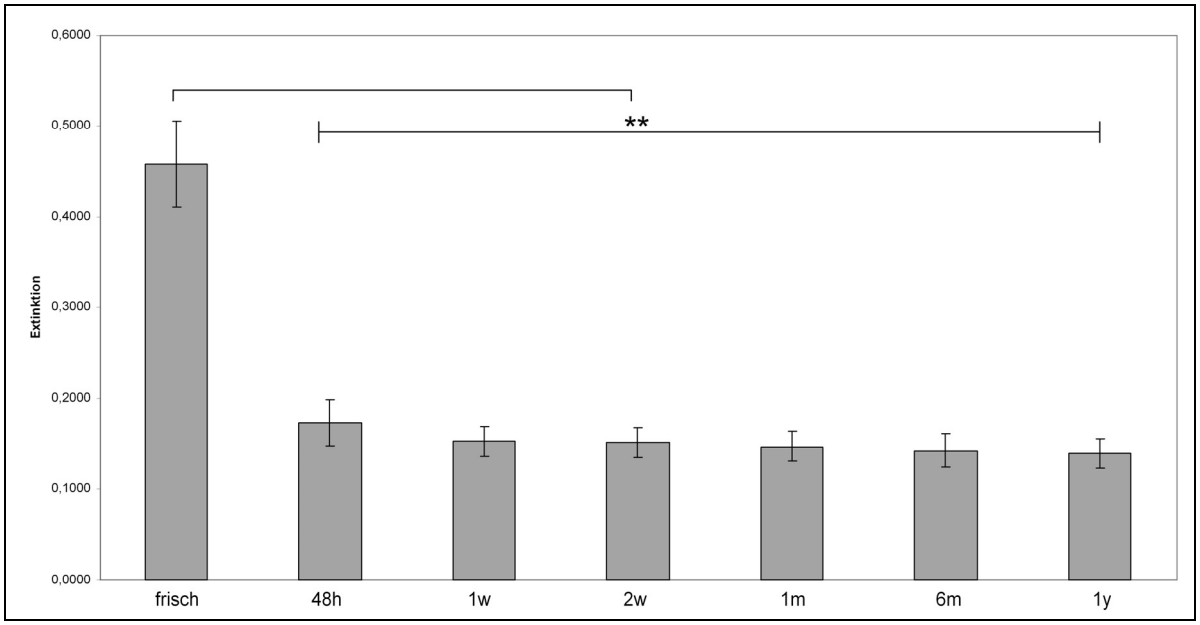

Abbildung 70: ***MTT-Aktivität über ein Jahr bei Verwendung von Glycerin/Dextran/PVP (IV) als Kryoprotektiv und einer Lagerungstemperatur von -20°C; Signifikanz: p < 0,01***

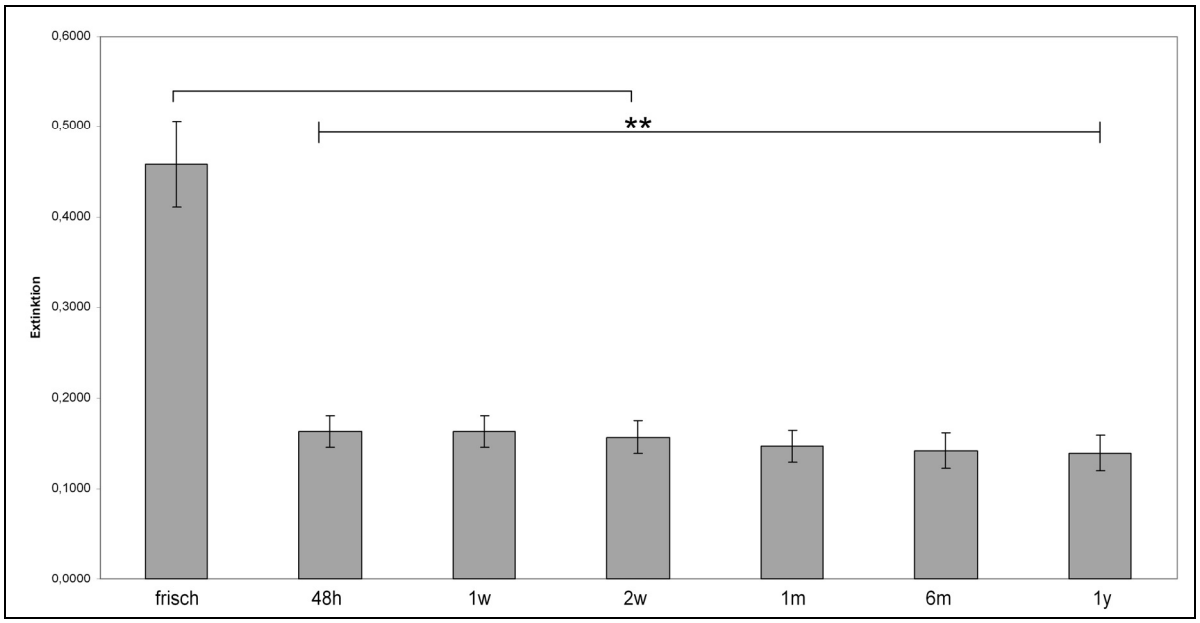

Abbildung 71: ***MTT-Aktivität über ein Jahr bei Verwendung von Glycerin/Dextran/PVP (IV) als Kryoprotektiv und einer Lagerungstemperatur von -80°C; Signifikanz: p < 0,01***

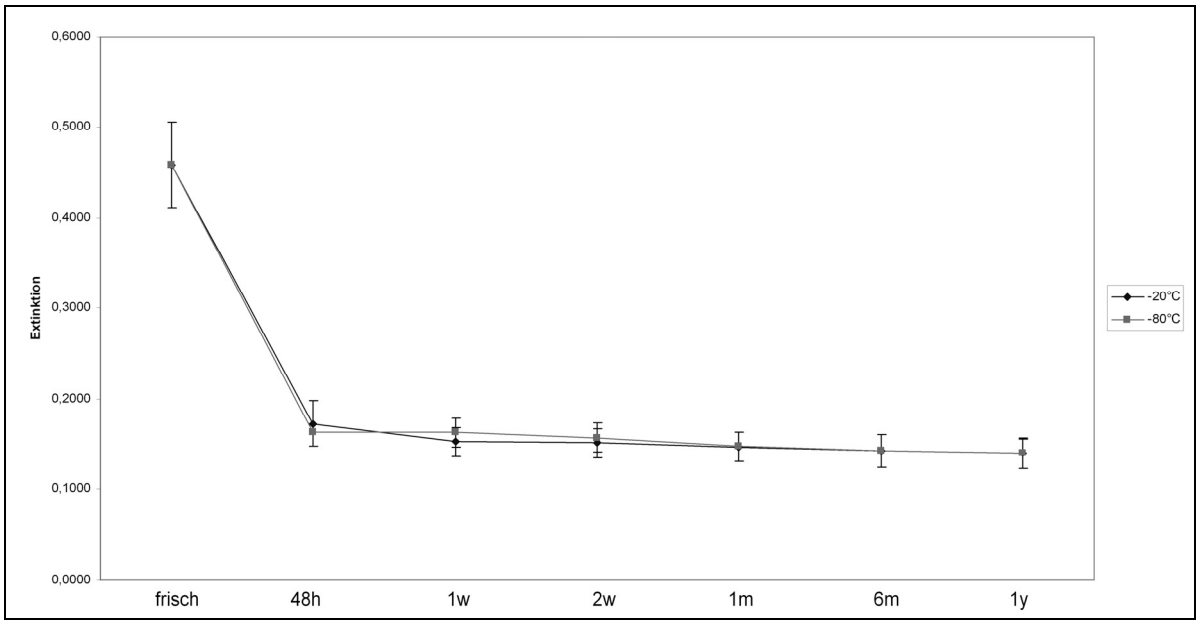

Abbildung 72: ***Vergleich der MTT-Aktivität bei Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C unter Verwendung von Glycerin/Dextran/PVP (IV) als Kryoprotektiv über ein Jahr.***

5.5.3.2 XTT

Die Bestimmung der intrazellulären enzymatischen Aktivität durch den XTT-Test zeigt erneut einen hochsignifikanten Verlust nach 48 Stunden; sowohl bei -20°C (**Abbildung 73**), als auch bei -80°C (**Abbildung 74**). Weiterhin ist ein kontinuierliches Absinken der Aktivität im Verlauf des Versuchs zu beobachten.

Der Vergleich der beiden Temperaturen (**Abbildung 75**) zeigt über den Beobachtungszeitraum von einem Jahr einen diskreten Vorteil für die Lagerung bei -80°C.

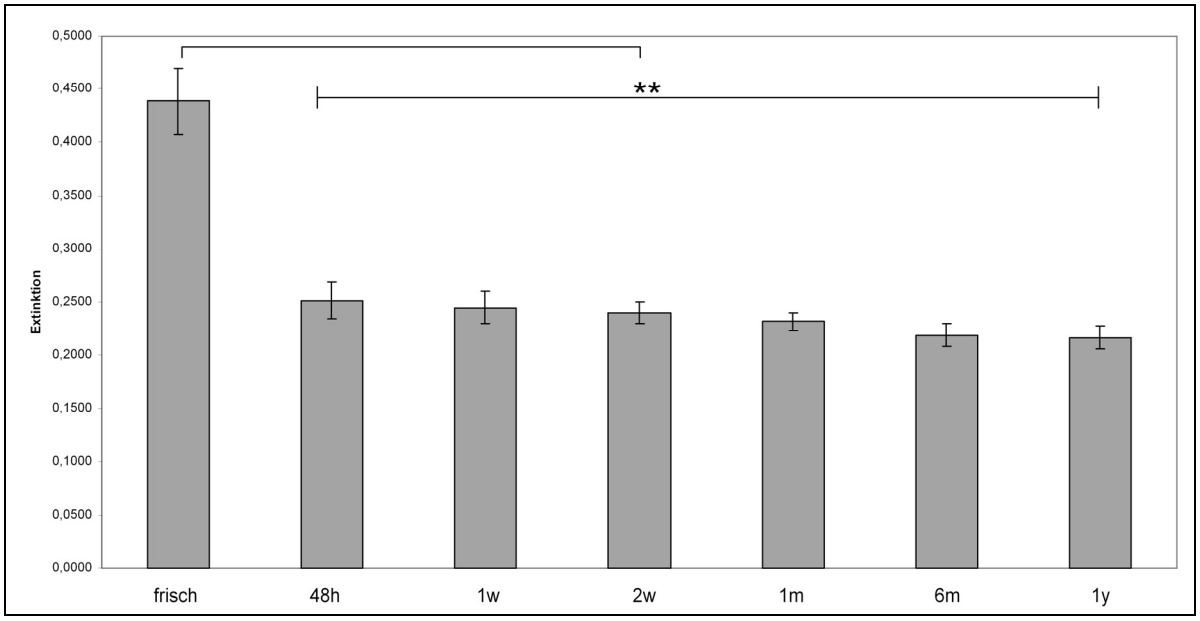

Abbildung 73: ***XTT-Aktivität über ein Jahr bei Verwendung von Glycerin/Dextran/PVP (IV) als Kryoprotektiv und einer Lagerungstemperatur von -20°C; Signifikanz: p < 0,01***

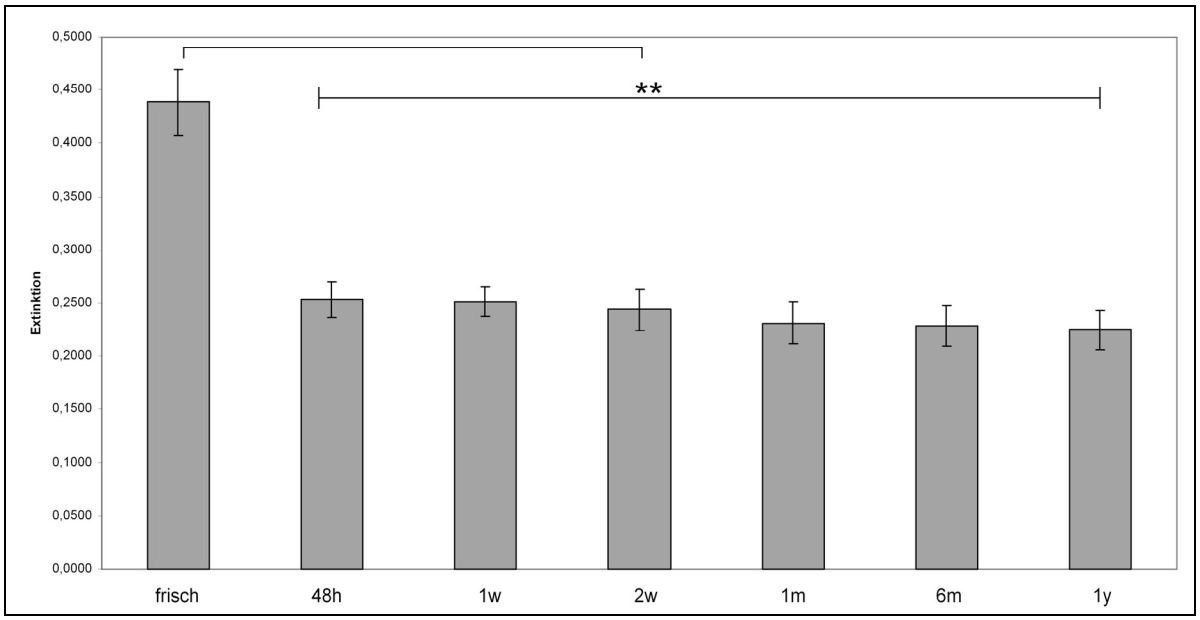

Abbildung 74: ***XTT-Aktivität über ein Jahr bei Verwendung von Glycerin/Dextran/PVP (IV) als Kryoprotektiv und einer Lagerungstemperatur von -80°C; Signifikanz: p < 0,01***

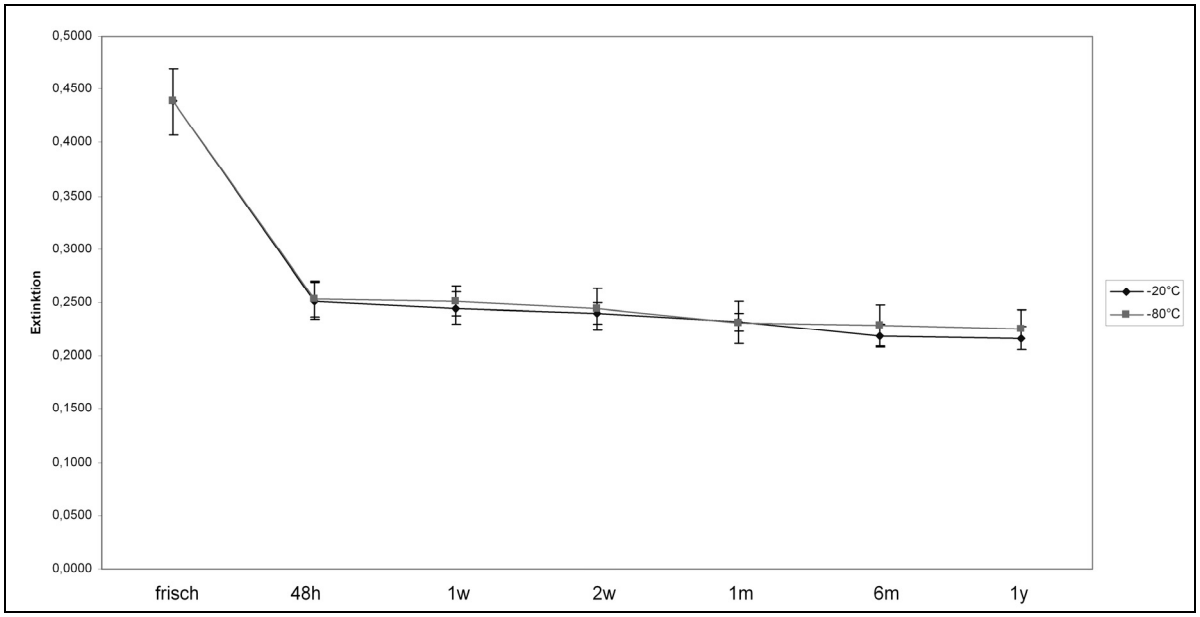

Abbildung 75: ***Vergleich der XTT-Aktivität bei Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C unter Verwendung von Glycerin/Dextran/PVP (IV) als Kryoprotektiv über ein Jahr.***

5.5.3.3 GPDH

Der Indikator für die Integrität der Zellmembran, das GPDH, zeigt vergleichbare Ergebnisse: Eine hochsignifikante Zunahme des freien GPDH nach 48 Stunden mit im Verlauf progressiver Entwicklung.

Im Vergleich zur Lagerung bei -20°C (**Abbildung 76**), zeigt sich in der Beobachtung der Zellen bei einer Konservierungstemperatur von -80°C (**Abbildung 77**) erneut der hochsignifikante Verlust nach 48 Stunden und zusätzlich eine deutliche Differenz im nominellen Wert des freien GPDH ebenfalls bereits nach 48 Stunden (**Abbildung 78**).

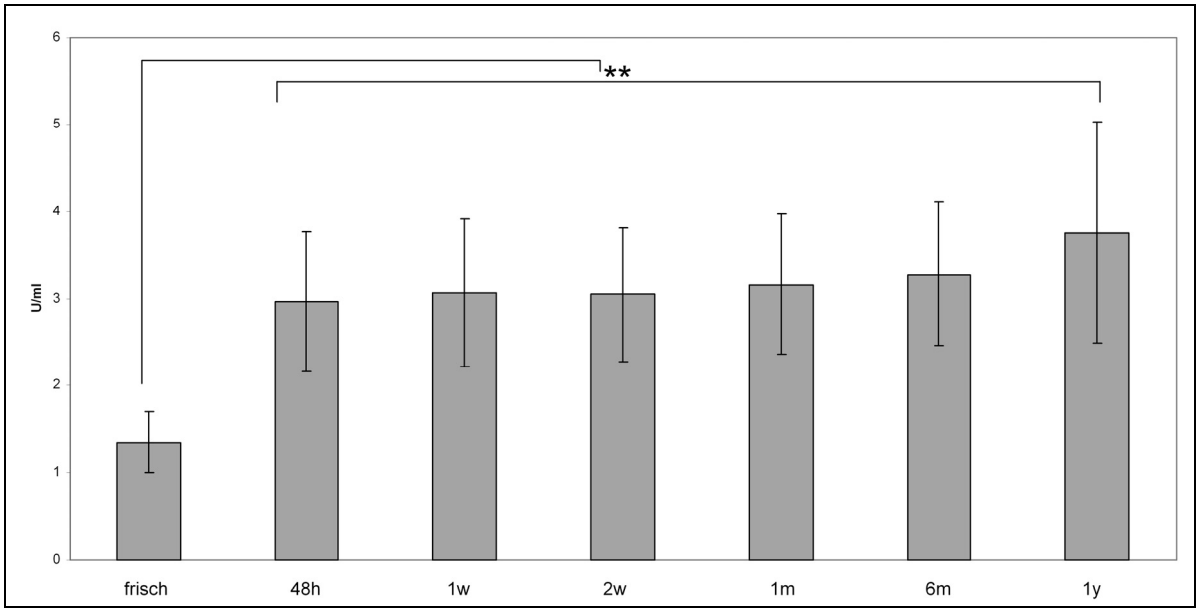

Abbildung 76: ***GPDH-Verlauf über ein Jahr, bei Verwendung von Glycerin/Dextran/PVP (IV) als Kryoprotektiv, bei einer Lagerungstemperatur von -20°C; Signifikanz: p < 0,01***

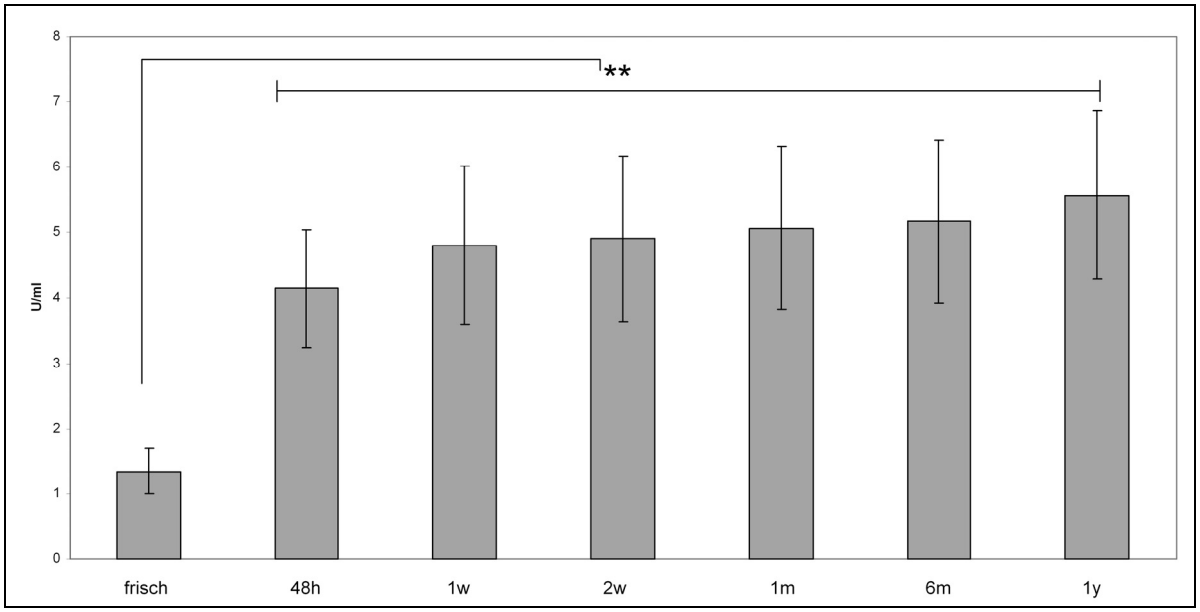

Abbildung 77: ***GPDH-Verlauf über ein Jahr, bei Verwendung von Glycerin/Dextran/PVP (IV) als Kryoprotektiv, bei einer Lagerungstemperatur von -80°C; Signifikanz: p < 0,01***

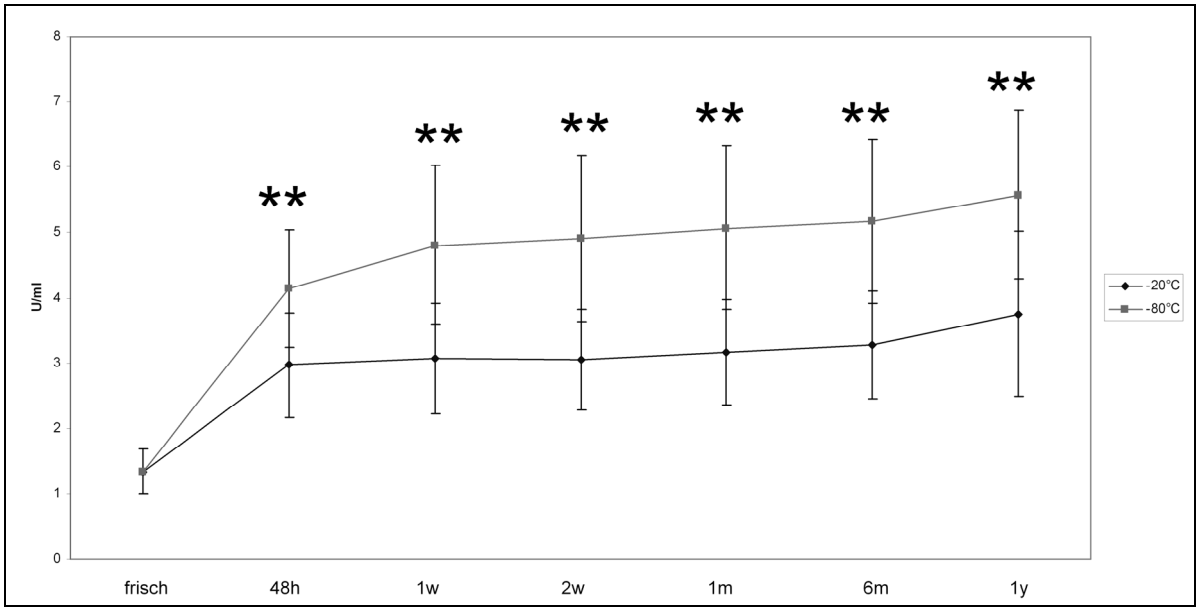

Abbildung 78: ***Vergleich des Aktivitätsverlauf des freien GPDH über ein Jahr, unter Verwendung von Glycerin/Dextran/PVP (IV) als Kryoprotektiv, bei Lagerungstemperaturen von -20°C und -80°C; Signifikanz: p < 0,01***

5.5.3.4 Vergleich

Der Vergleich der MTT-, XTT- und GPDH-Bestimmungen bei Verwendung einer Konservierungstemperatur von -20°C (**Abbildung 79**) zeigt die bereits beschriebenen Veränderungen nach 48 Stunden und die kontinuierliche Abnahme der enzymatischen Aktivität (MTT, XTT) und die Zunahme des freien GPDH.

Erneut wird, im Vergleich der Konservierungstemperaturen (**Abbildung 80**), der flachere Verlauf der GPDH-Kurve bei -20°C deutlich.

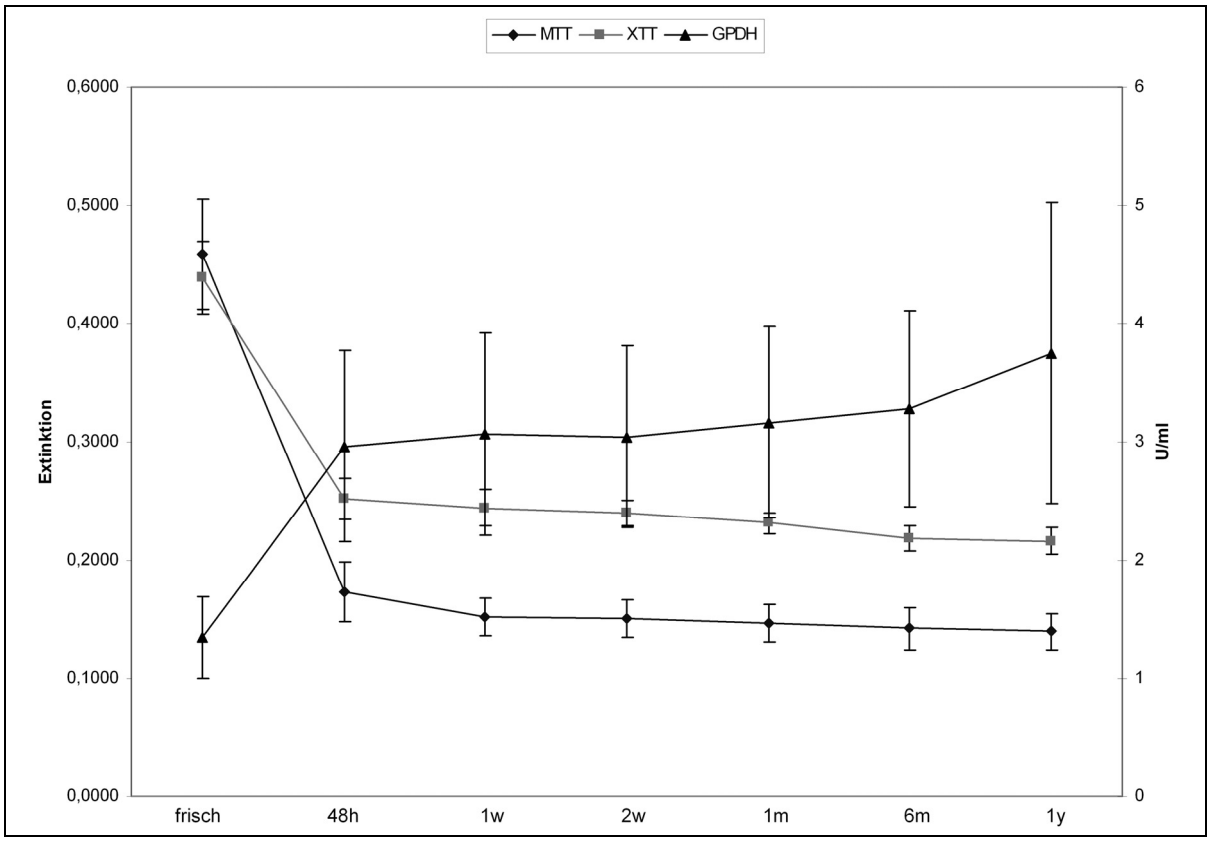

Abbildung 79: ***Vergleich von MTT-, XTT- und GPDH-Verlauf über ein Jahr, Kryoprotektiv: Glycerin/Dextran/PVP, bei einer Lagerungstemperatur von -20°C***

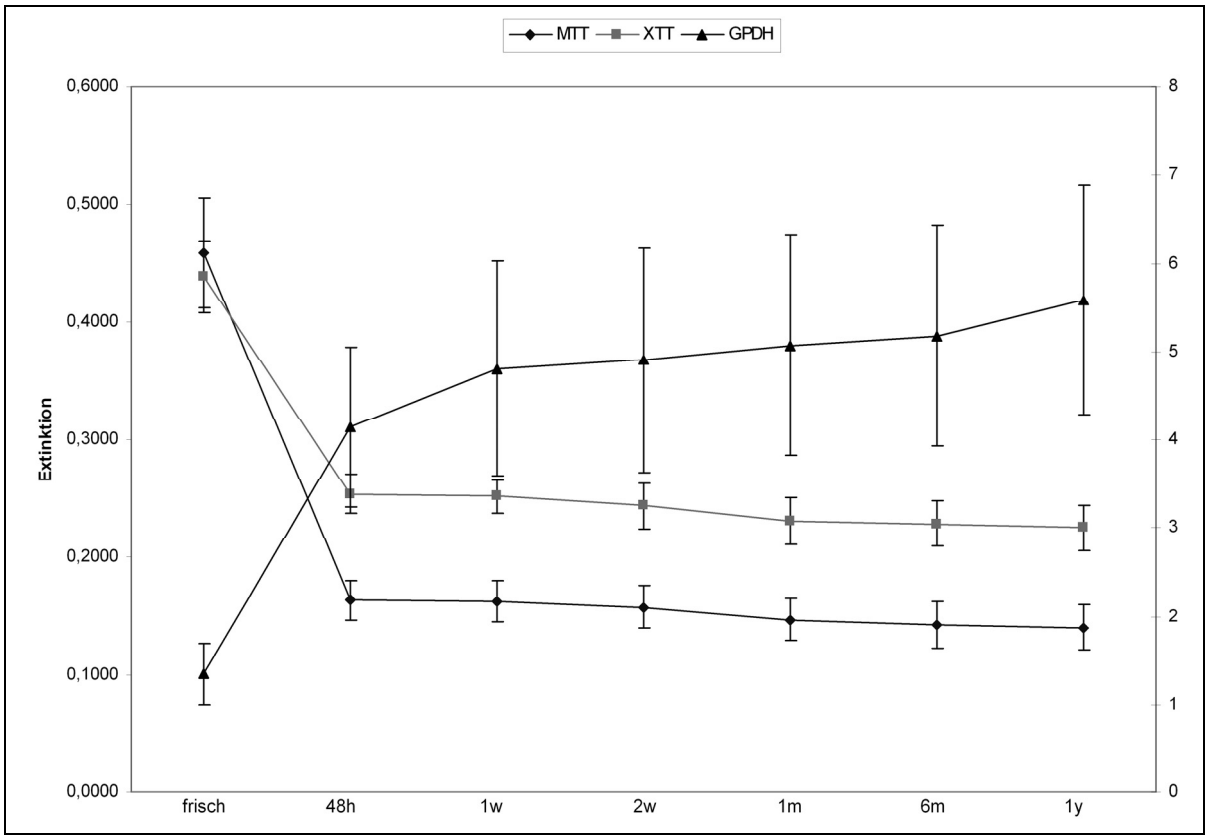

Abbildung 80: *Vergleich von MTT-, XTT- und GPDH-Verlauf über ein Jahr, Kryoprotektiv: Glycerin/Dextran/PVP, bei einer Lagerungstemperatur von -80°C*

5.6 Vergleich der Kryoprotektive

5.6.1 Kontrolle versus Hydroxyethylstärke

5.6.1.1 MTT

Der Vergleich der Kontrolle mit Hydroxyethylstärke zeigt, bei einer Konservierungstemperatur von -20°C, keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf die mit dem MTT-Test gemessene mitochondriale enzymatische Aktivität.

Deutlich wird erneut der hochsignifikante Abfall der enzymatischen Tätigkeit im Vergleich zur frischen Probe. Die Kontroll-Gruppe hat nach 48 Stunden noch eine Aktivität von 5,1% und die HES-Gruppe von 5,0%. Nach einem Jahr liegt die Aktivität der Kontroll-Gruppe bei 2,6% und die HES-Gruppe bei 2,5%. Damit verändert sich die Differenz zwischen den beiden Gruppen zu Ungunsten der HES-Gruppe; nach 48 Stunden lag die Differenz der Aktivität bei 1,71%, nach einem Jahr ist sie auf 3,28% angewachsen.

Die Ergebnisse des Vergleichs der identischen Protektive, bei einer Lagerungstemperatur von -80°C zeigen Ähnliches. Eine hochsignifikante Differenz zwischen frischer Probe und kryokonserviertem Material und keine Signifikanz zwischen den beobachteten Gruppen. Im Vergleich zur Lagerung bei -20°C findet sich jedoch ein diskreter Vorteil der Lagerung bei -80°C. Der Aktivitätsverlust der Kontroll-Gruppe liegt nach 48 Stunden bei 93,9% und bei der HES-Gruppe bei 94,4%; nach einem Jahr hat die Kontrollegruppe noch eine Aktivität von 3,2% und die HES-Gruppe eine von 3,6%, im Verhältnis zur frischen Probe. Zu Beginn der Messungen, nach 48 Stunden, war die Kontroll-Gruppe um 19,28% aktiver als die HES-Gruppe. Dieses Verhältnis hat sich nach einem Jahr zur HES-Gruppe hin verändert, welche 2,6% höhere Aktivität aufweist.

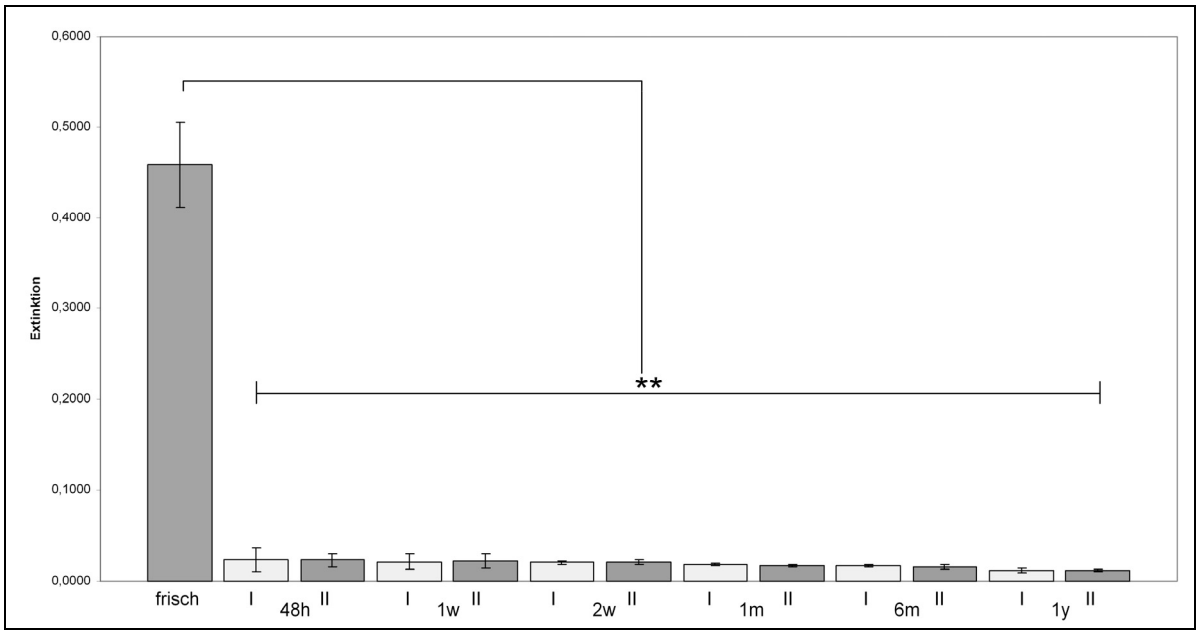

Abbildung 81: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Hydroxyethylstärke (II) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz p < 0,01***

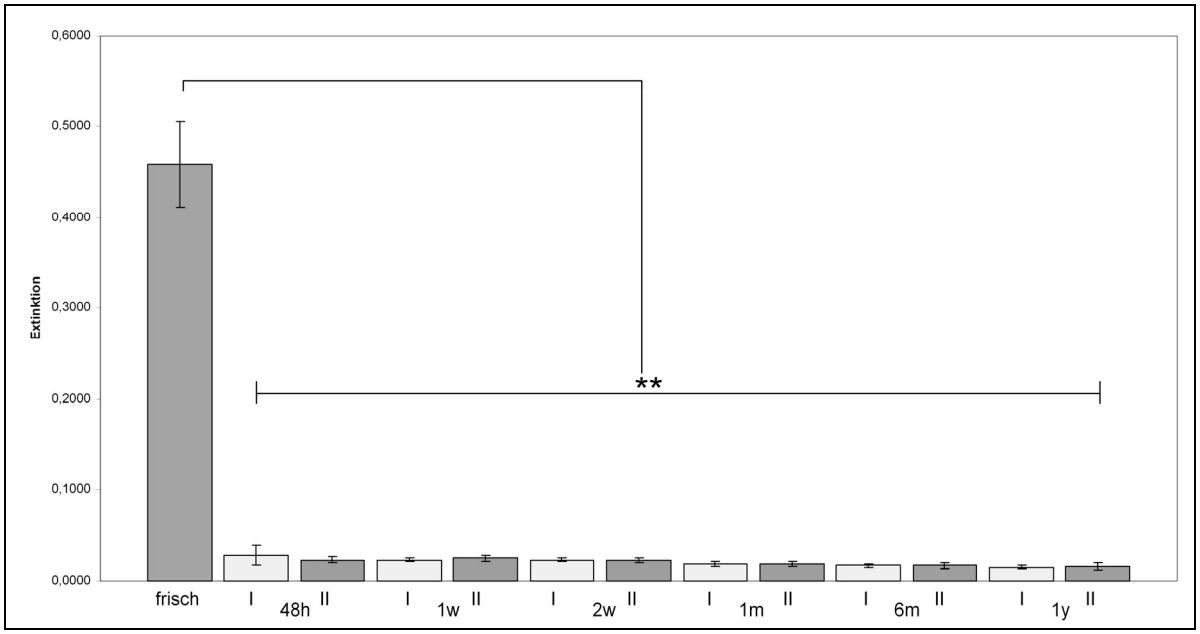

Abbildung 82: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Hydroxyethylstärke (II) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz p < 0,01***

5.6.1.2 XTT

Die Bestimmung der zytosolischen enzymatischen Aktivität mit dem XTT-Test zeigt im Vergleich zur MTT-Messung analoge Ergebnisse. Zwischen der Kontroll-Gruppe und der HES-Gruppe ist kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Der Verlust nach 48 Stunden liegt bei der Kontroll-Gruppe bei 78,0% und bei der HES-Gruppe

bei 73,7%. Nach einem Jahr zeigt die Kontroll-Gruppe einen Verlust von 81,5% und die HES-Gruppe von 80,6%. Die Aktivitäts-Differenz zwischen diesen beiden Gruppen hat sich von 0,34% (48 Stunden) auf 3,73% (ein Jahr), zu Gunsten der HES-Gruppe, verändert.

Die Konservierung bei -80°C zeigt ebenfalls keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Lagerung bei -20°C. Die Aktivität liegt nach 48 Stunden Kryokonservierung bei 22,8% für die Kontroll-Gruppe und 26,3% für die HES-Gruppe; nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes zeigt sich eine Aktivität von 18,5% in der Kontroll-Gruppe und in der HES-Gruppe eine enzymatische Aktivität von 19,4% im Verhältnis zur Ausgangsgruppe (frische Probe). Im Vergleich zur Lagerung bei -20°C hat sich die Aktivitäts-Differenz bei einer Lagerungstemperatur von -80°C entgegengesetzt verändert. Nach 48 Stunden Beobachtung war die enzymatische Aktivität der HES-Gruppe um 16,1% höher, als die der Kontroll-Gruppe; nach einem Jahr lag die nichtsignifikante Differenz nur noch bei 4,69%.

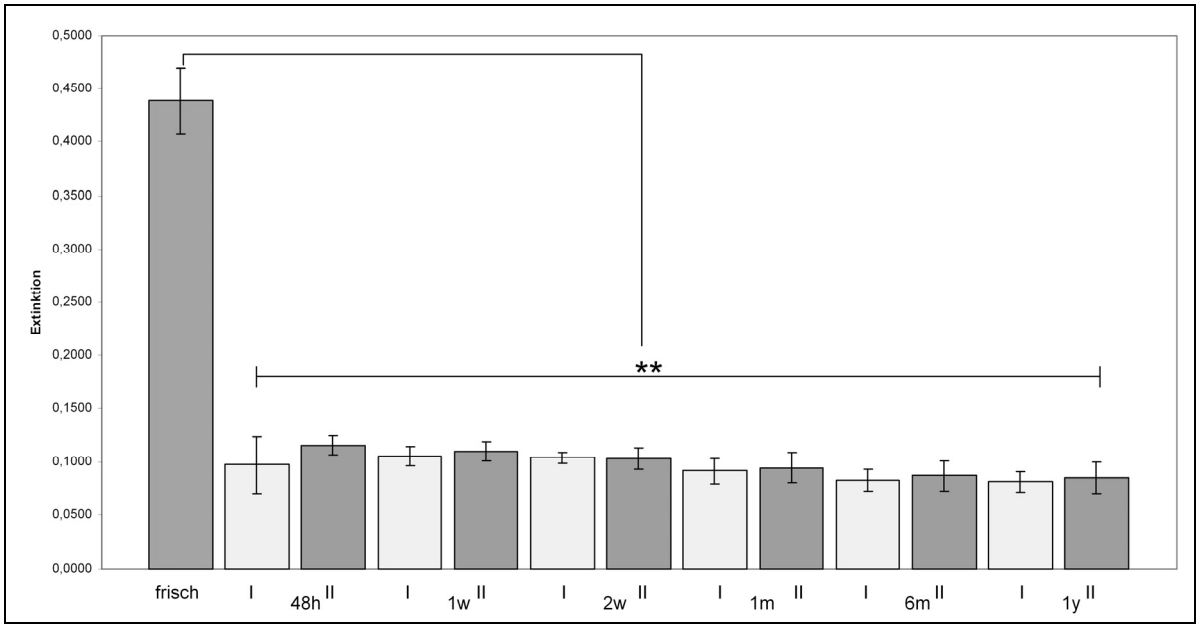

Abbildung 83: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Hydroxyethylstärke (II) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz p < 0,01***

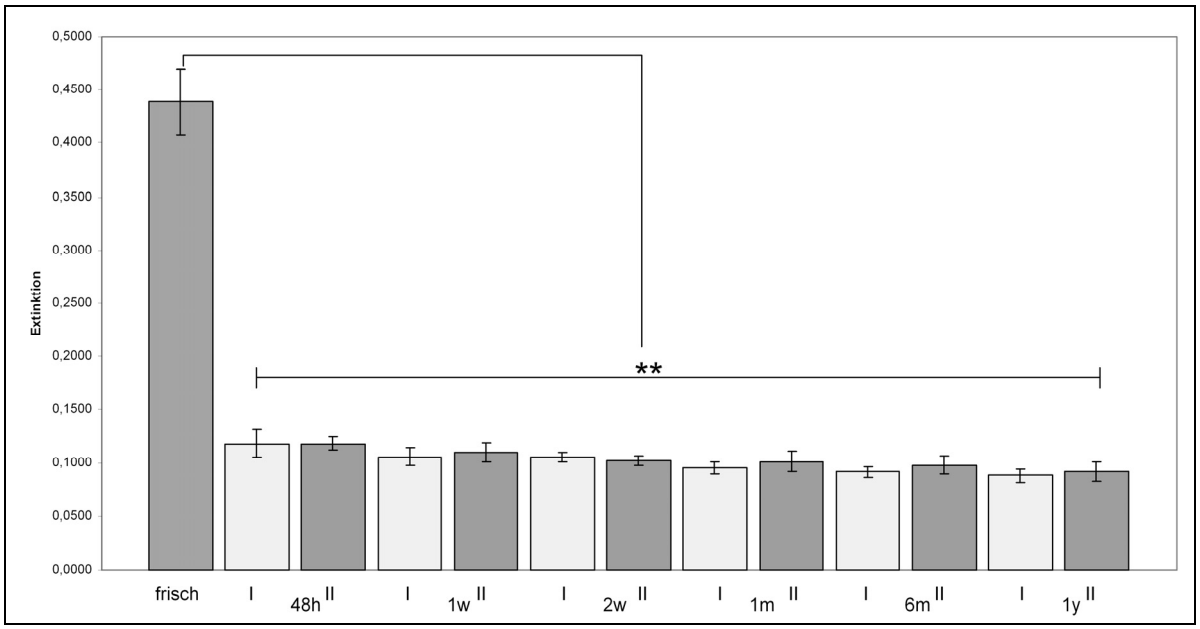

Abbildung 84: *Vergleich von Kontrolle (I) und Hydroxyethylstärke (II) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz p < 0,01*

5.6.1.3 GPDH

Die Bestimmung der freien Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, als Maß für die Destruktion der Adipozytenmembran, zeigt nach 48 Stunden, bei -20°C eine hochsignifikante Zunahme. Der direkte Vergleich der verwendeten Kryoprotektive zeigt nach 48 Stunden bei der Kontroll-Gruppe eine Zunahme des messbaren GPDH um 574,40% und in der HES-Gruppe einen Anstieg um 531,20%. Im Verlauf eines Jahres stiegen diese Werte weiter an: Kontroll-Gruppe 656,80% und HES-Gruppe 577,30%. Der direkte Vergleich zeigt nach 48 Stunden, 7,16% mehr freies GPDH in der Kontroll-Gruppe als in der HES-Gruppe. Dieser Unterschied ist nach einem Jahr auf 13,23% angewachsen.

Bei einer Konservierungstemperatur von -80°C steigt das freie GPDH, nach 48 Stunden, in der Kontroll-Gruppe um 556,50% und in der HES-Gruppe um 754,40%. Im Verlaufe eines Jahres gleichen sich die Werte langsam an: die Kontroll-Gruppe hat 919,50% und die HES-Gruppe 908,70% mehr freies GPDH als die frische Probe. Die Differenz der beiden Gruppen, im Bezug auf die freie GPDH, hat sich von 26,23% auf 1,18% angeglichen.

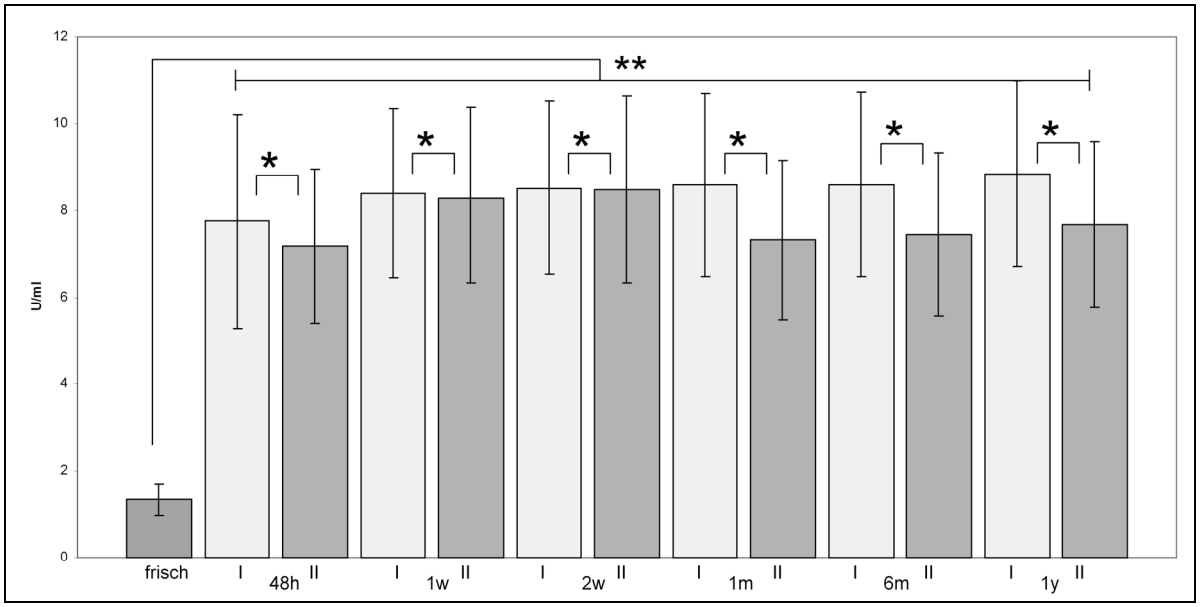

Abbildung 85: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Hydroxyethylstärke (II) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz: ** p < 0,01, * p <0,05***

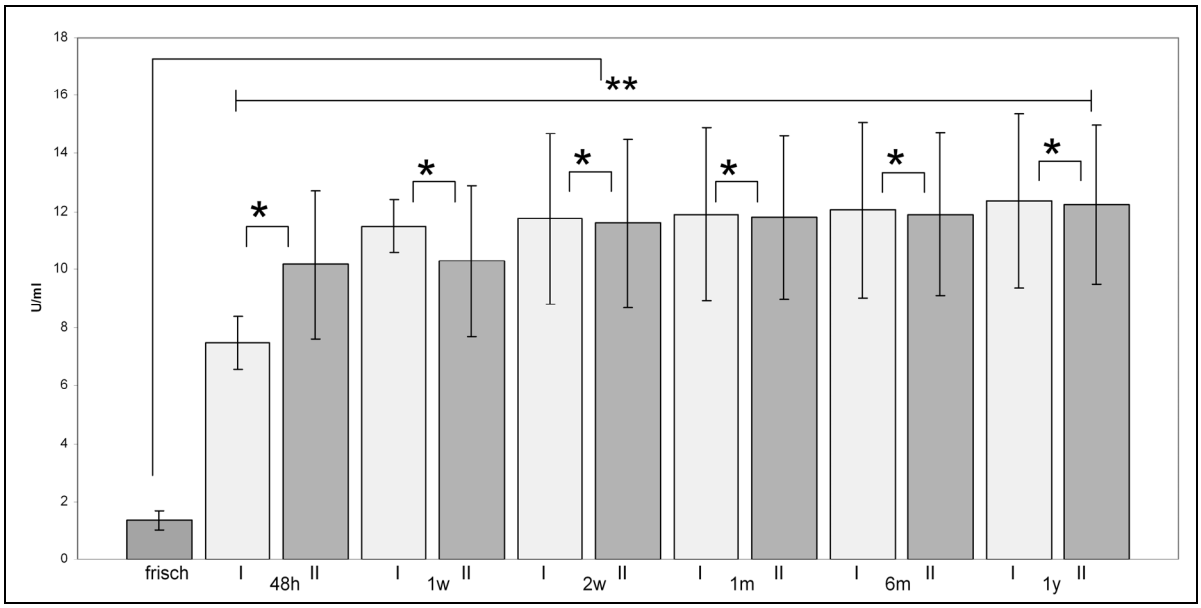

Abbildung 86: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Hydroxyethylstärke (II) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz: ** p < 0,01, * p <0,05***

5.6.2 Kontrolle versus Glycerin

5.6.2.1 MTT

Der Vergleich von Glycerin als Kryoprotektiv mit der Kontroll-Gruppe zeigt, im Verlauf des gesamten Beobachtungszeitraumes einen hochsignifikanten Unterschied. Nach 48 Stunden Konservierung bei -20°C weisen die Glycerinproben noch eine Aktivität von 21,23% im Vergleich zur frischen Probe auf. Die Kontroll-Gruppe liegt, wie schon zuvor beim direkten Vergleich mit der Hydroxyethylstärke bei 5,1% vom Ausgangswert. Damit liegt die gemessene enzymatische Aktivität der Glycerin-Gruppe um 76% höher, als die der Kontroll-Gruppe. Der Vergleich der beiden Gruppen nach einem Jahr zeigt erneut einen hochsignifikanten Vorteil zu Gunsten der Glycerin-Gruppe. Die gemessene Aktivitäts-Differenz liegt bei 83,60%. Im Vergleich zur 48 Stunden Messung (76,0%) hat sich die Differenz progressiv entwickelt.

Im Vergleich zur frischen Probe, hat sich die enzymatische Aktivität nach einem Jahr, jedoch verringert. Die Glycerin-Gruppe hat noch eine Aktivität von 16,22% und die Kontroll-Gruppe von 2,60%.

Die Messung der MTT-Parameter bei einer Konservierungstemperatur von -80°C zeigt analoge Ergebnisse. Die Glycerin-Gruppe hat nach 48 Stunden noch eine Aktivität von 20,54% und die Kontroll-Gruppe von 6,10% im Vergleich zur frischen Probe. Der direkte Vergleich der beiden Gruppen zeigt erneut die hochsignifikante Differenz. Die mit Glycerin kryokonservierte Gruppe weist eine um 70,28% höhere Aktivität auf, als die Kontroll-Gruppe.

Ein direkter Vergleich der Kontroll-Gruppen von -20°C und -80°C nach 48 Stunden zeigt eine 16,43% höhere enzymatische Aktivität in der Kontroll-Gruppe, die bei -80°C gelagert wurde.

Ebenfalls vergleichbare Ergebnisse zeigen sich bei der Betrachtung der Messwerte nach einem Jahr. Die Aktivität der Glycerin-Probe liegt 79,73% höher als die der Kontroll-Gruppe. Gleichfalls wurde bereits in der -20°C Messung, der generelle Aktivitätsverlust im Vergleich zur frischen Probe, beschrieben. Kontroll-Gruppe 3,20% und Glycerin-Gruppe 16,13% im Vergleich zur frischen Probe. Ein erneuter Vergleich der Kontroll-Gruppen, diesmal bei -80°C, zeigt erneut ein besseres Ergebnis (18,67%) zu Gunsten der bei -80°C konservierten Proben.

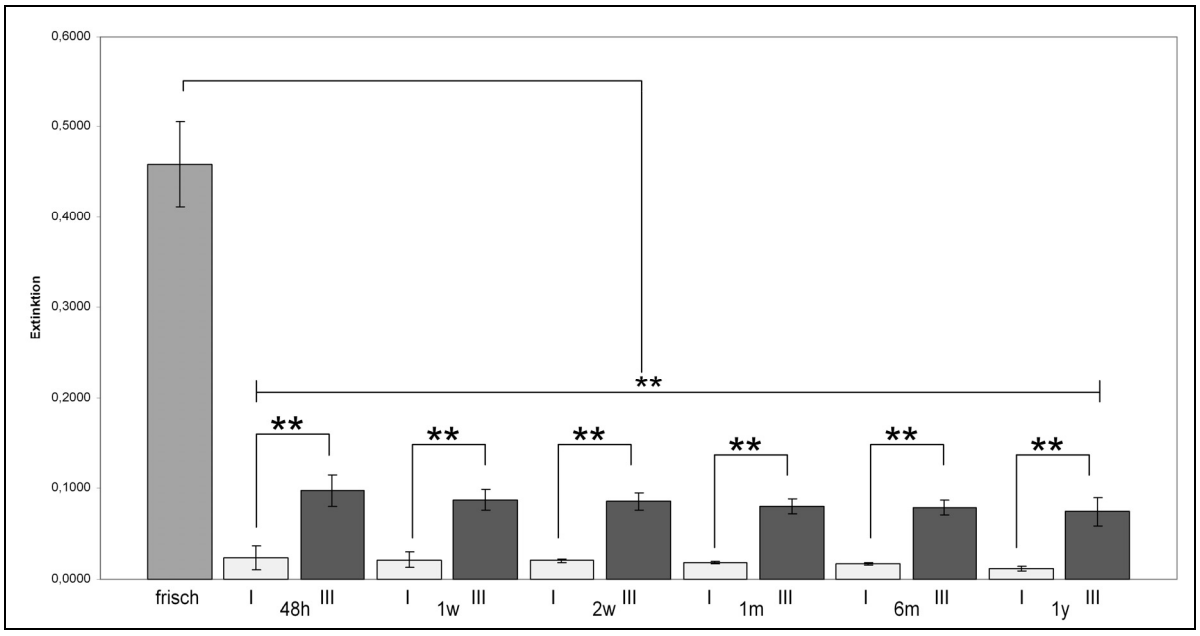

Abbildung 87: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin (III) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01***

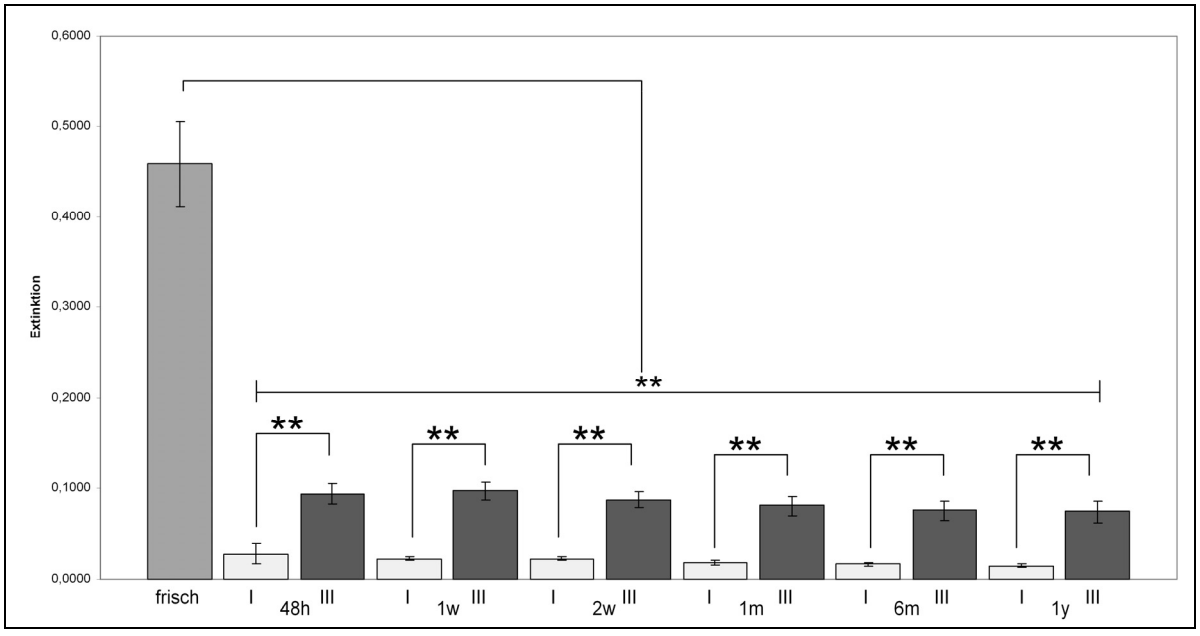

Abbildung 88: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin (III) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01***

5.6.2.2 XTT

Der Vergleich der Kontroll-Gruppe mit der Glycerin-Gruppe unter Zuhilfenahme der Aktivitätsbestimmung der zytosolischen Enzyme zeigt erneut den bekannten hochsignifikanten Verlust nach 48 Stunden im Vergleich zur frischen Probe. Die Kontroll-Gruppe hat noch eine Aktivität von 24,86% und die Glycerin-Gruppe von 36,98% im Vergleich zur Ausgangs-Probe. Nach einem Jahr weist dieser Vergleich in der Kontroll-Gruppe noch eine Aktivität von 18,50% und in der Glycerin-Gruppe von 28,18% auf.

Der direkte Vergleich des Kryoprotektives mit der Kontroll-Gruppe zeigt nach 48 Stunden Lagerung bei -20°C eine Aktivitätsminderung der Kontroll-Gruppe von 40,32% im Vergleich zur Glycerin-Gruppe. Nach einem Jahr liegt die Aktivität der Kontroll-Gruppe bei 34,47% im Vergleich zur Kryoprotektiv-Gruppe.

Das Gesamtbild der XTT-Ergebnisse, der Proben, die bei -80°C gelagert wurden, ist der Konservierung bei -20°C sehr ähnlich. Die Aktivität der Glycerin-Gruppe ist nach 48 Stunden Lagerung nur 28,17% höher als die der Kontroll-Gruppe. Nach einem Jahr liegt diese Differenz bei 31,94%.

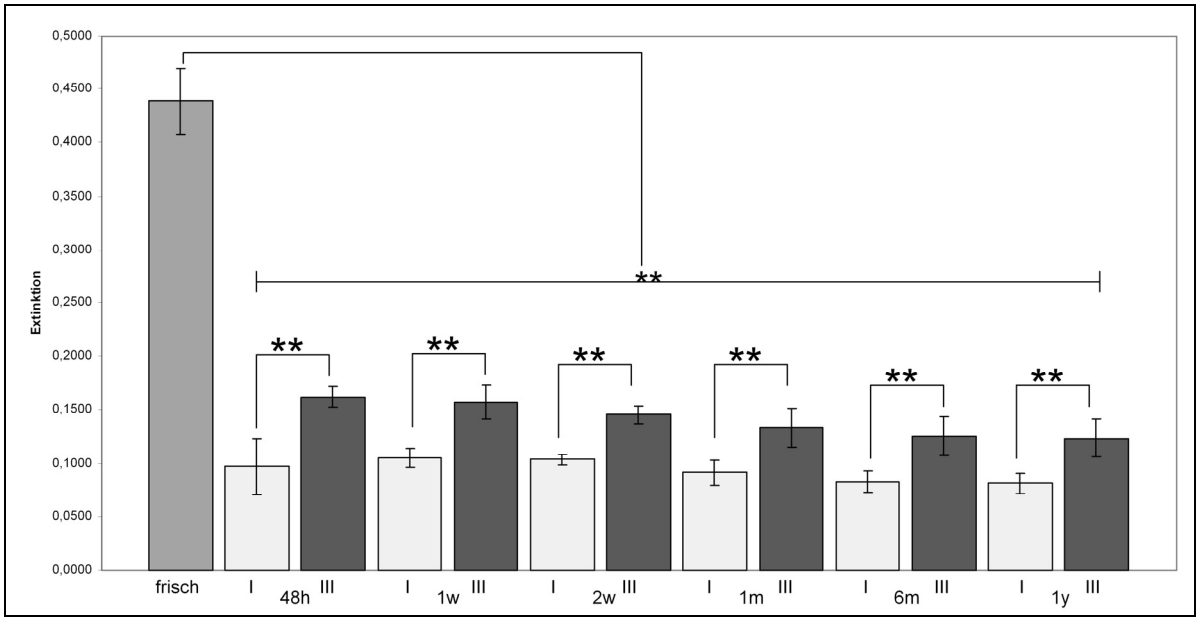

Abbildung 89: *Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin (III) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01*

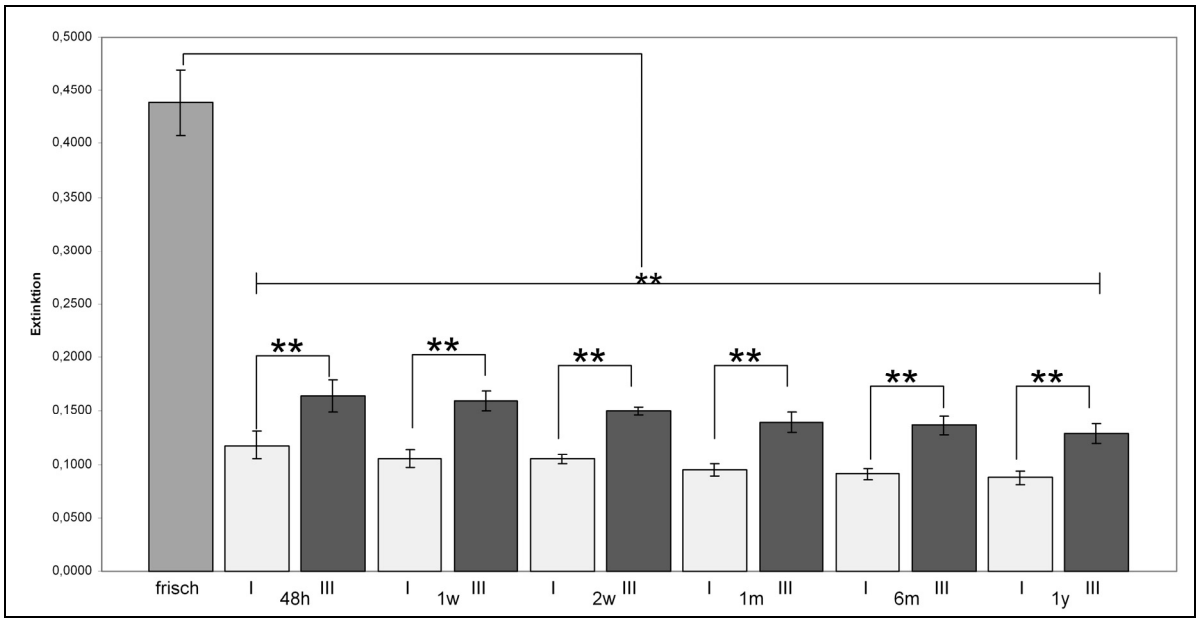

Abbildung 90: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin (III) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01***

5.6.2.3 GPDH

Die Bestimmung der freien GPDH zeigt analog zu den MTT und XTT Messungen eine hochsignifikante Veränderung. Im Vergleich zur Ausgangsprobe, Lagerung bei -20°C, ist in der Kontroll-Gruppe die Menge des freien GPDH um 574,76% und in der Glycerin-Gruppe um 353,16% erhöht. Der direkte Vergleich der Kontroll-Gruppe mit dem Protektiv Glycerin zeigt eine um 38,56% erhöhte Freisetzung in der Kontrolle. Diese Differenz liegt nach einem Jahr bei 39,51%.

Bei einer Konservierungstemperatur von -80°C liegt die Menge des freien GPDH in der Glycerin-Gruppe, nach 48 Stunden, 39,31% unter jener, der Kontroll-Gruppe. Im Verlauf eines Jahres steigt diese Differenz auf 43,76% an. Der Vergleich der Ausgangsprobe, mit der Kontroll-Gruppe, Konservierung mit -80°C, zeigt sich nach 48 Stunden eine Zunahme der GPDH um 565,50% und nach einem Jahr um 919,50%. In der Glycerin-Gruppe steigt die Menge der freien GPDH von 337,69% nach 48 Stunden auf 517,12% nach einem Jahr Lagerung, im Vergleich zur frischen Probe.

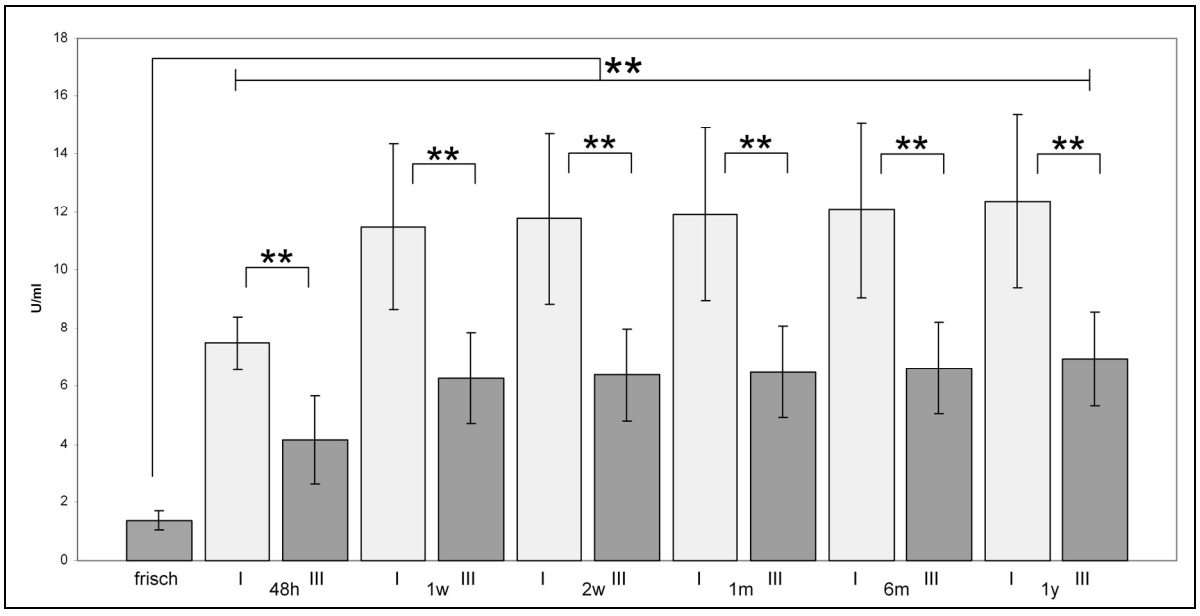

Abbildung 91: *Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin (III) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01*

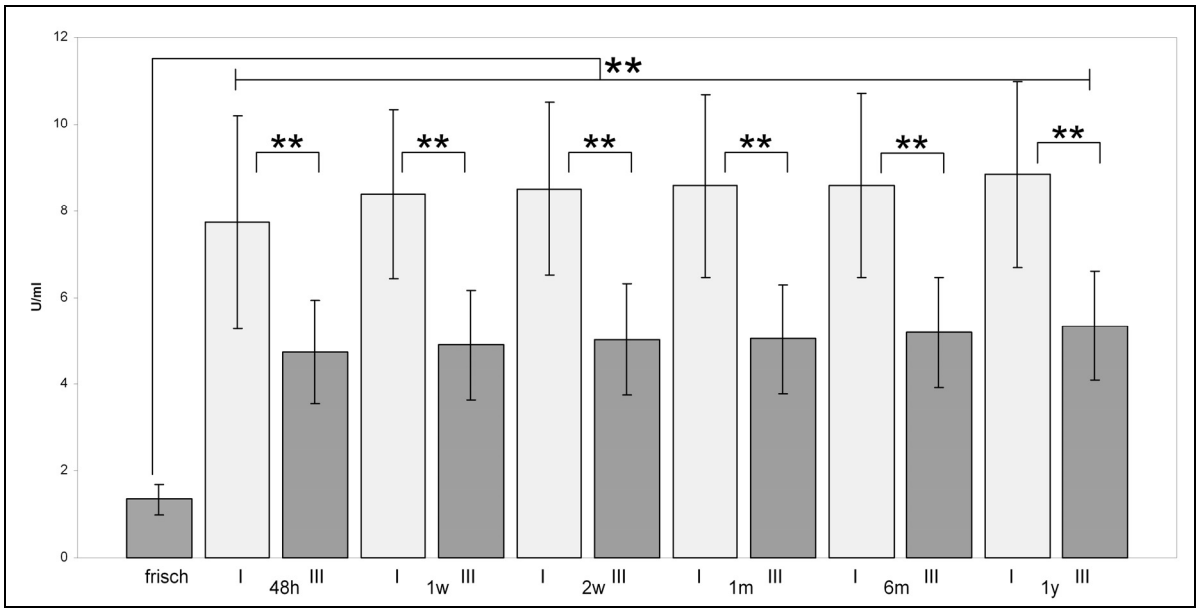

Abbildung 92: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin (III) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01***

5.6.3 Kontrolle versus Glycerin, Dextran, Polyvinylpyrrolidon

5.6.3.1 MTT

Der Vergleich der Kontrolle mit der Kryoprotektivmischung aus Glycerin, Dextran und Polyvinylopyrrolidonen zeigt, sowohl nach 48 Stunden als auch nach einem Jahr Lagerung, bei -20°C, einen hochsignifikanten Unterschied. Nach 48 Stunden ist die Aktivität der mitochondrialen Enzyme, in der Kontroll-Gruppe auf 5,10% und in der Protektiv-Gruppe auf 37,72% im Vergleich zur frischen Probe abgesunken. Damit liegt die Aktivität der Protektiv-Gruppe um 86,47% höher, als die der Kontroll-Gruppe. Nach einem Jahr hat die Kontroll-Gruppe noch eine Aktivität von 2,60% und die Protektiv-Mischung von 30,40%, ebenfalls verglichen mit der frischen Probe. Das direkte Verhältnis der beiden Gruppen hat sich weiter vergrößert; die Kontroll-Gruppe hat im Vergleich zur Protektiv-Mischung nur noch eine Aktivität von 8,75%, spiegelbildlich liegt die Aktivität der Protektiv-Gruppe um 91,25% über jener der Kontrolle.

Der Vergleich der identischen Protektiv-Mischung mit der Kontrolle, bei einer Konservierungstemperatur von -80°C, zeigt ebenfalls eine hochsignifikante Differenz. Im Vergleich zur frischen Probe liegt die Aktivität der Kontroll-Probe bei 6,10% und die Protektiv-Mischung bei 35,66%. Nach einem Jahr ist die Aktivität der Kontroll-Gruppe auf 3,20% und die der Protektiv-Gruppe auf 30,57% gesunken.

Die direkte Gegenüberstellung der beiden Gruppen nach 48 Stunden zeigt ebenfalls einen hochsignifikanten Unterschied. Die Aktivität der Protektiv-Gruppe liegt 82,84% über der, der Kontroll-Gruppe; nach einem Jahr hat sich diese Differenz ausgeweitet. Die Mischung aus Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonn ist im Vergleich zur Kontroll-Gruppe 89,30% aktiver.

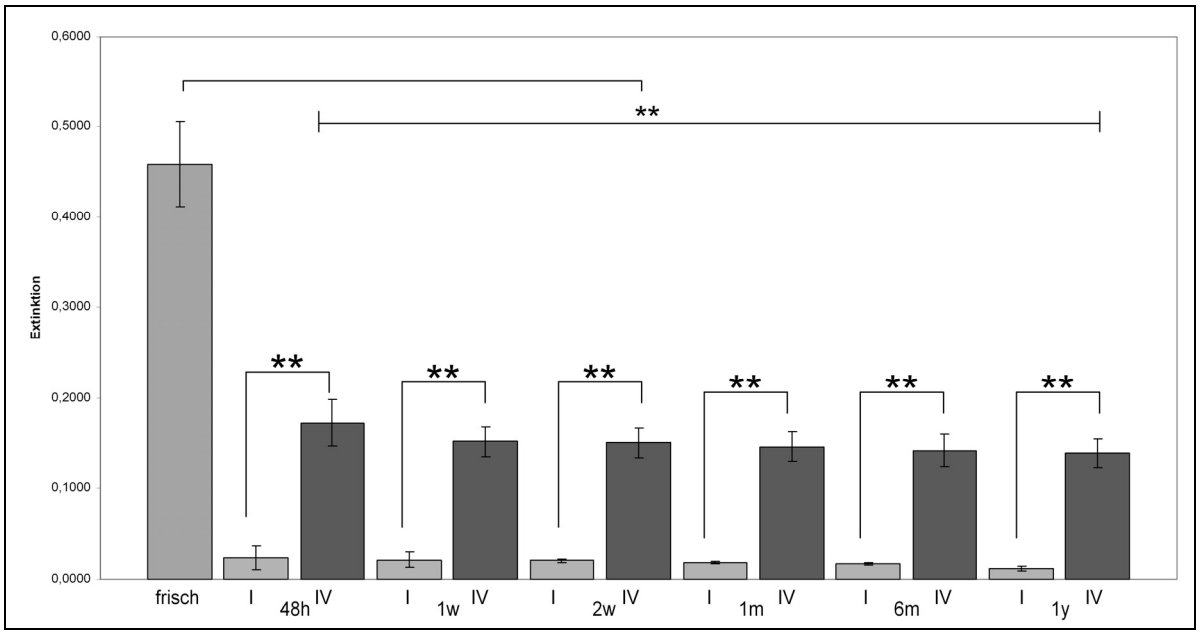

Abbildung 93: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01***

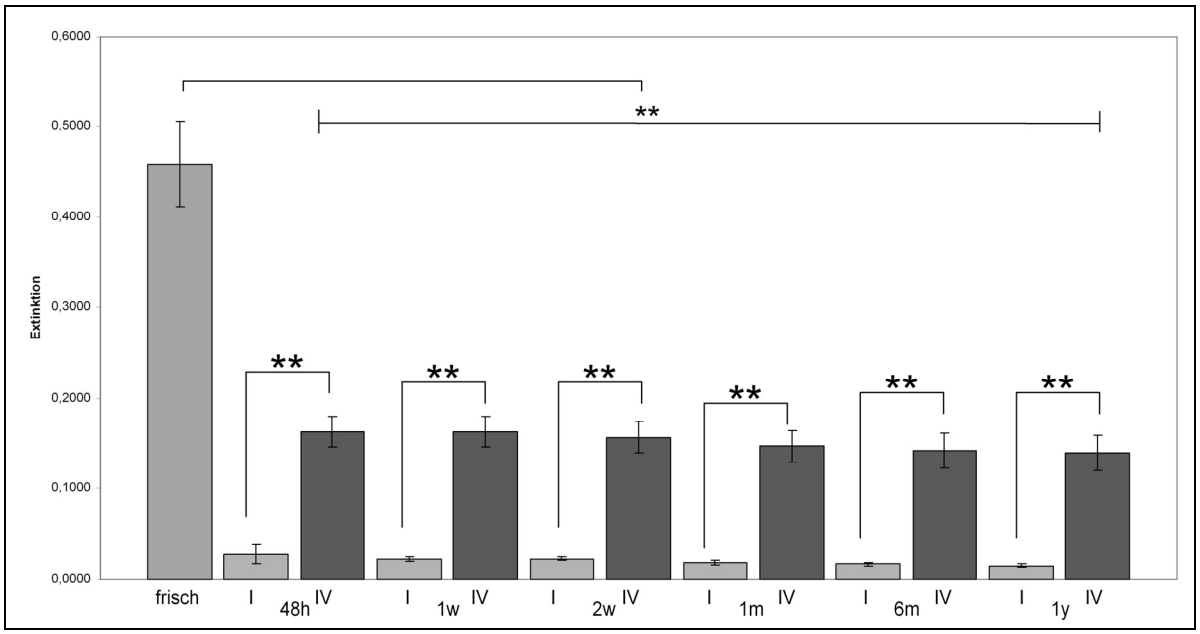

Abbildung 94: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01***

5.6.3.2 XTT

Der Vergleich der entsprechenden Protektiv-Mischung mit der Kontroll-Gruppe, mittels des XTT-Tests, erbringt ein der MTT-Bestimmung vergleichbares Ergebnis.
Nach 48 Stunden liegt die Aktivität der zytosolischen Enzyme, im Vergleich zur frischen Probe, Konservierung bei -20°C, in der Kontroll-Gruppe bei 24,86% und in der Protektiv-Gruppe bei 57,31%. Nach einem Jahr liegt die Aktivität der Kontroll-Gruppe bei 18,50% und die Protektiv-Mischung bei 49,41%. Der direkte Vergleich der Kontroll-Gruppe mit der Mischung aus Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen zeigt nach 48 Stunden einen hochsignifikanten Unterschied, die Aktivität der Protektiv-Mischung ist, um 61,53% höher. Nach einem Jahr liegt dieser Unterschied bei 62,60%.
Im identischen Vergleich, bei einer Lagerungstemperatur von -80°C, ist der Unterschied zwischen der frischen Probe und der Kontroll-Gruppe bzw. Protektiv-Mischung hochsignifikant. Nach 48 Stunden Kryokonservierung hat die Kontroll-Gruppe eine Aktivität von 26,87% und die Protektiv-Gruppe von 57,89%. Nach Ablauf eines Jahres liegt die enzymatische Aktivität der Kontroll-Gruppe bei 20,03% und die der Protektiv-Gruppe bei 51,28%, im Vergleich zur frischen Probe. Der direkte Vergleich der Gruppen zeigt, dass die Kontroll-Gruppe nach 48 Stunden 57,89% weniger enzymatische Aktivität aufweist, als die Protektiv-Gruppe; nach einem Jahr ist diese Minderaktivität auf 60,94% angestiegen.

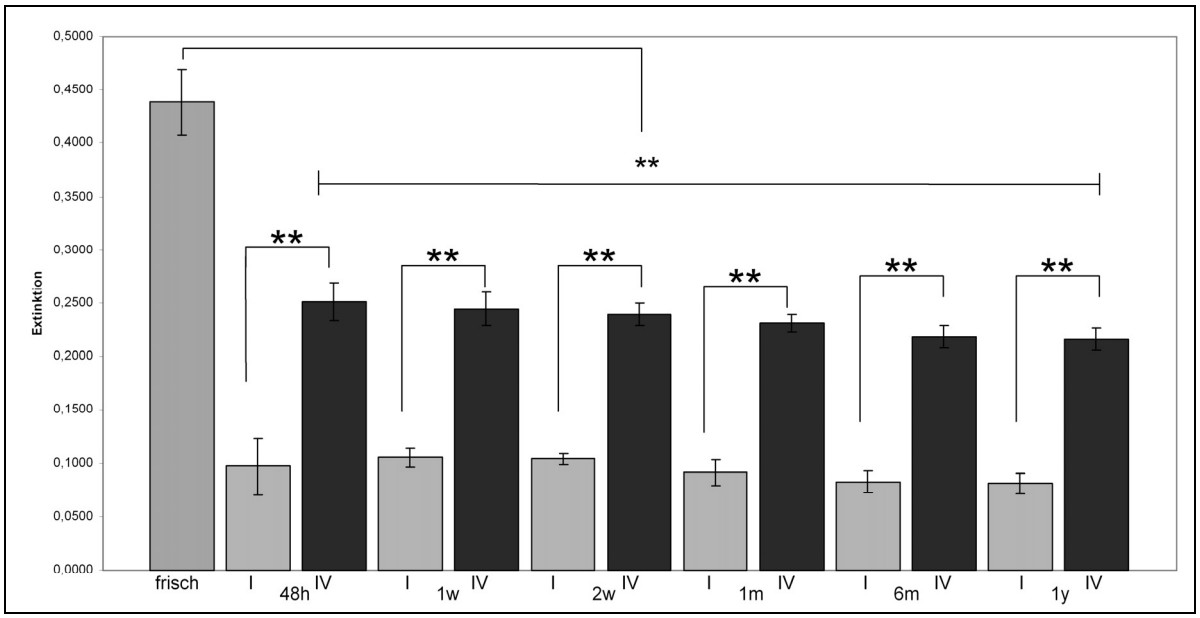

Abbildung 95: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01***

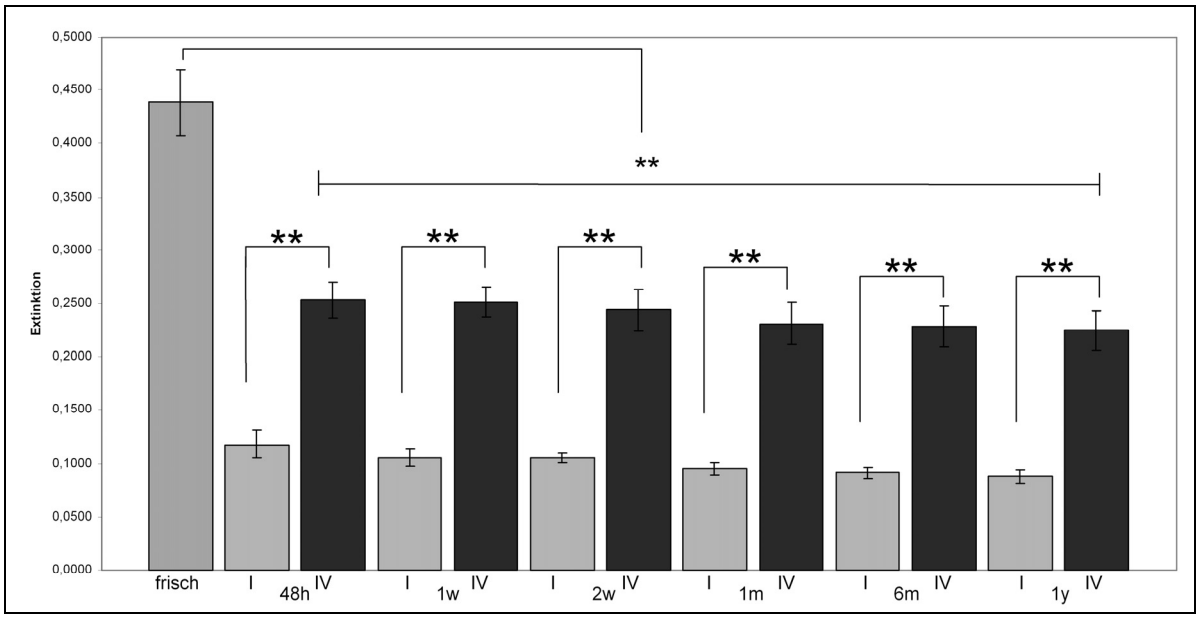

Abbildung 96: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01***

5.6.3.3 GPDH

Die indirekte Bestimmung der Zellmembranschädigung durch die Messung der freien Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase zeigte ebenfalls nach 48 Stunden einen hochsignifikanten Unterschied. In der Kontroll-Gruppe wurden, bei einer Lagerungstemperatur von -20°C, 574,70% und in der Protektiv-Gruppe 220,42% mehr GPDH freigesetzt als in der frischen Probe; nach einem Jahr waren in der

Kontroll-Gruppe 656,80% und in der Protektiv-Gruppe 278,99% mehr GPDH messbar.

Im direkten Vergleich der beiden Gruppen, wurde bei der Kontroll-Gruppe 61,25% mehr freies GPDH gemessen, als bei der Protektiv-Mischung. Im Verlauf eines Jahres ist dieser Vergleichswert auf 57,52% gesunken.

Die Messung der freien GPDH bei einer Konservierungstemperatur von -80°C zeigt erneut einen hochsignifikanten Unterschied; sowohl zwischen der frischen Probe und der Kontroll-Gruppe bzw. Protektiv-Gruppe über den gesamten Zeitraum der Messungen, als auch zwischen der Kontroll-Gruppe und der Protektiv-Mischung. Nach 48 Stunden ist die Menge der freien Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase in der Kontroll-Gruppe um 556,50% und in der Protektiv-Gruppe um 307,84% angestiegen; nach 12 Monaten ist in der Kontroll-Gruppe 919,50% und in der Protektiv-Gruppe 414,72% mehr freies GPDH nachweisbar, als in der frischen Probe. Im direkten Vergleich konnte, nach 48 Stunden, eine um 44,68% höhere GPDH Freisetzung in der Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden; nach einem Jahr konnte in der Kontroll-Gruppe 54,90% mehr Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase gemessen werden.

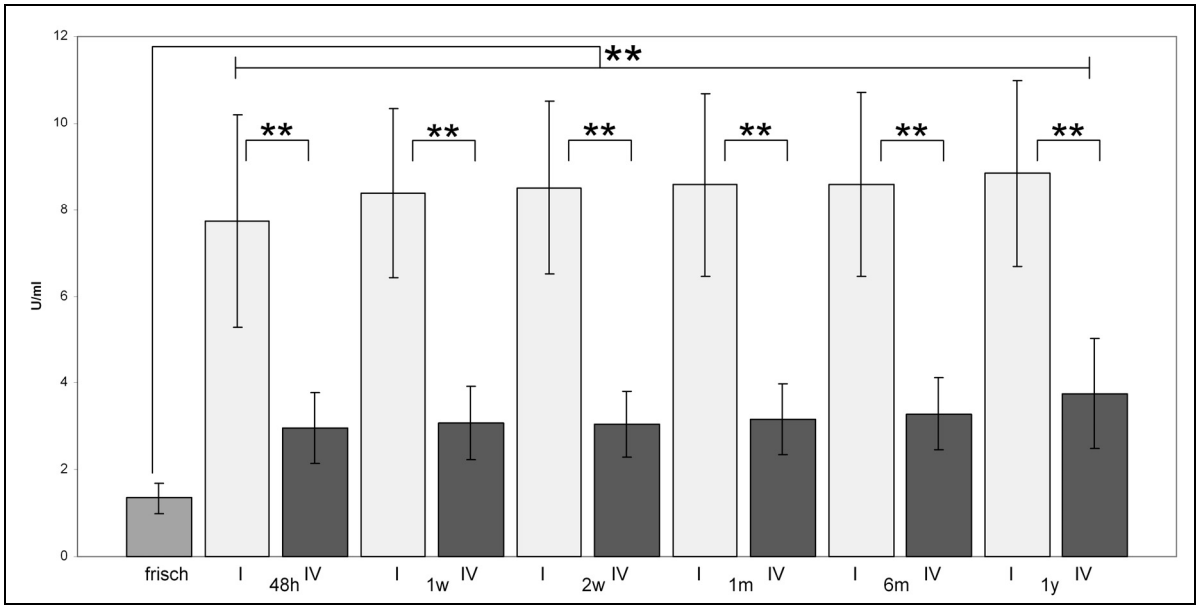

Abbildung 97: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01***

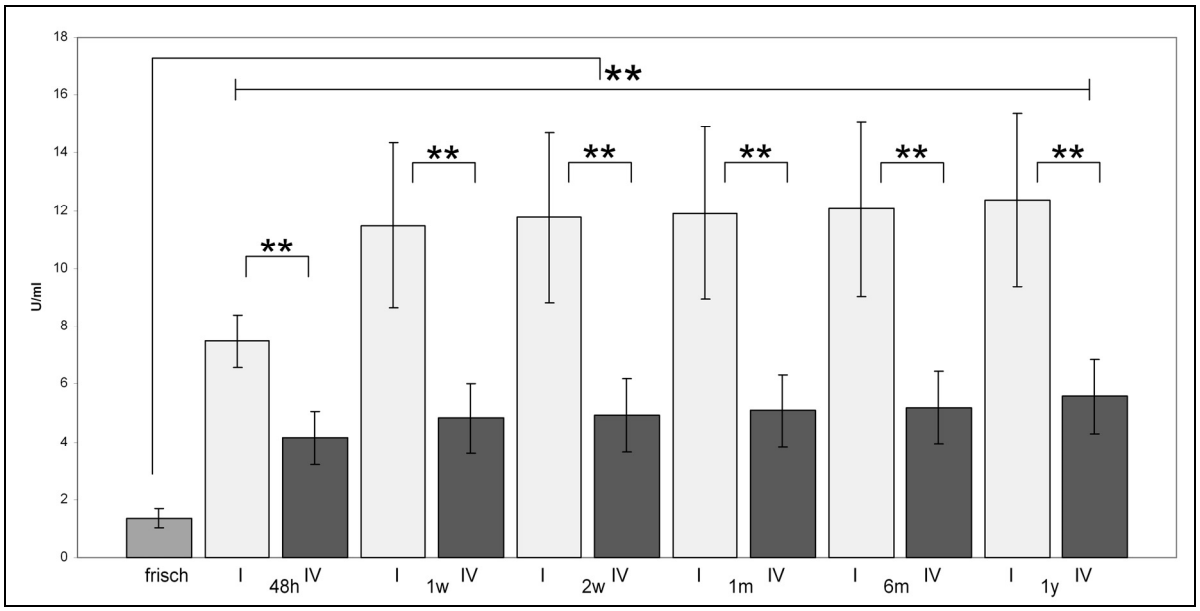

Abbildung 98: ***Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01***

5.6.4 Hydroxyethylstärke versus Glycerin

5.6.4.1 MTT

Der direkte Vergleich der beiden Kryoprotektive Hydroxyethylstärke und Glycerin zeigt zum einen, erneut einen hochsignifikanten Unterschied zwischen der frischen Probe und den kryokonservierten Proben und zum anderen eine hochsignifikante Differenz, der enzymatischen Aktivität, nach Kryokonservierung zwischen diesen beiden Protektiven. Nach 48 Stunden Konservierung, bei -20°C, hat die Glycerin-Gruppe eine Aktivität von 21,23% und die HES-Gruppe von 5,00%, im Vergleich zur frischen Probe. Nach einem Jahr ist die Aktivität der Glycerin-Gruppe auf 16,22% und die der HES-Gruppe auf 2,50% gesunken. Im direkten Vergleich zeigt sich nach 48 Stunden Kryokonservierung eine um 76,39% höhere Aktivität in der Glycerin-Gruppe, als in der äquivalenten HES-Gruppe (23,61%). Nach 12 Monaten ist diese Aktivitäts-Differenz weiter angewachsen. Verglichen mit der Glycerin-Gruppe weist die HES-Gruppe nur noch eine Aktivität von 15,86% auf.

In der entsprechenden Untersuchung, bei -80°C Konservierungstemperatur, zeigt sich ebenfalls der hochsignifikante Unterschied zwischen Glycerin und Hydroxyethylstärke als Kryoprotektiv. Nach 48 Stunden Lagerung liegt die mitochondriale enzymatische Aktivität der Glycerin-Gruppe 76,01% über jener der

HES-Gruppe (23,99%). Nach einem Jahr liegt die Aktivität der HES-Gruppe, verglichen mit der Glycerin-Gruppe (79,19%), bei 20,81%.

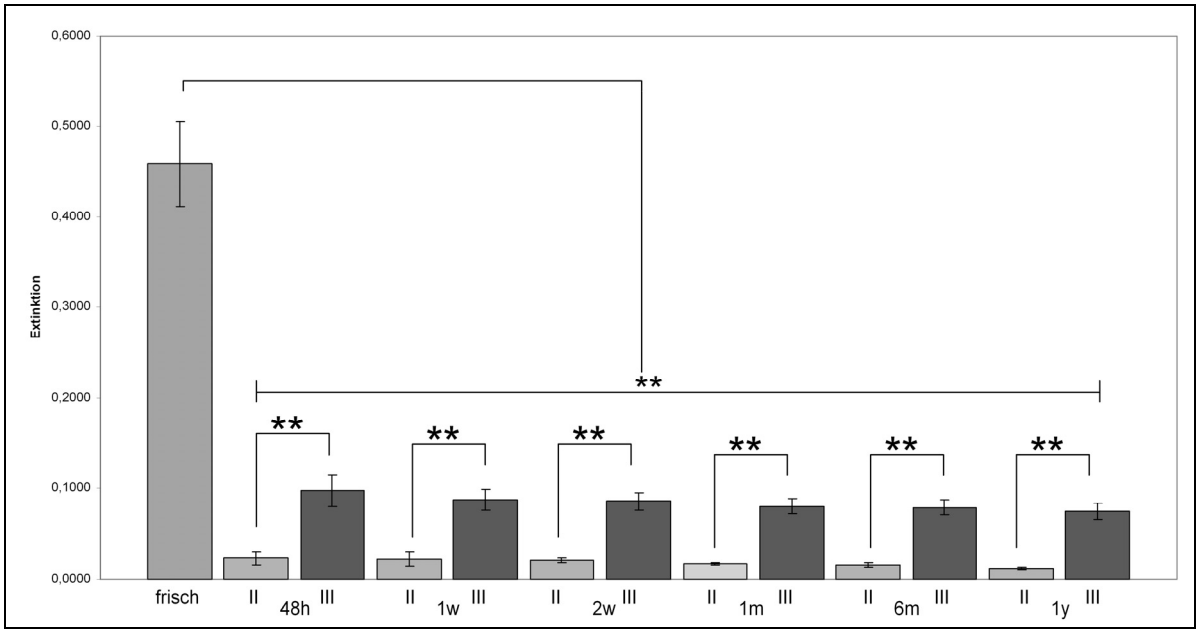

Abbildung 99: ***Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Glycerin (III) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01***

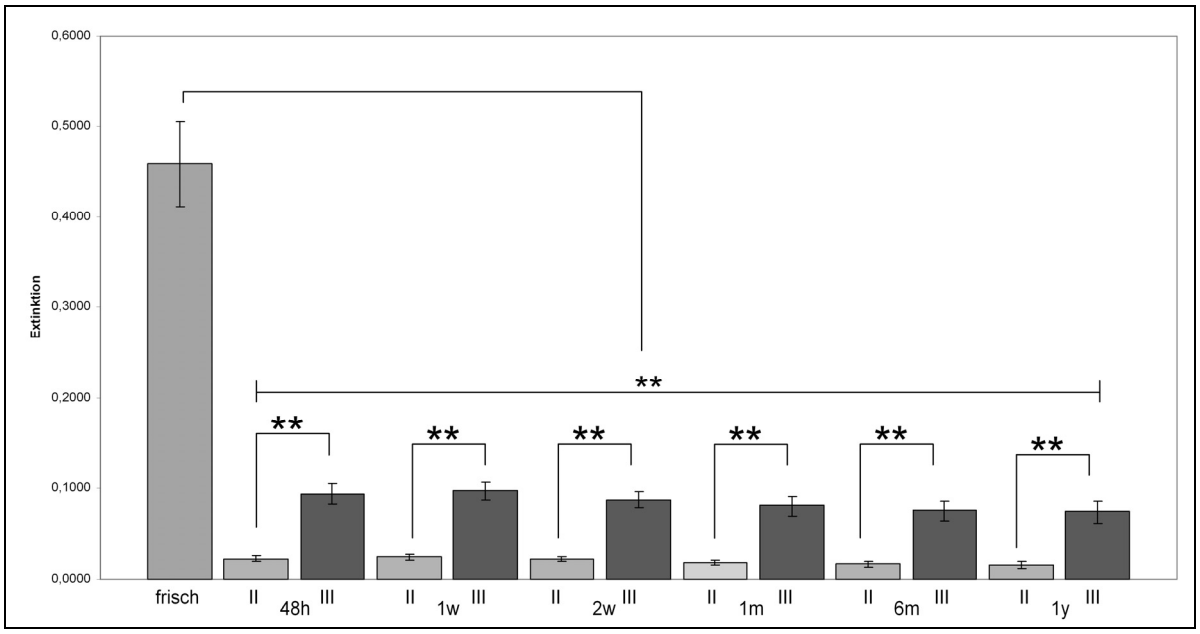

Abbildung 100: ***Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Glycerin (III) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01***

5.6.4.2 XTT

Die Messung der enzymatischen Aktivität im Zytosol der Zelle zeigt weiterhin den hochsignifikanten Verlust nach 48 Stunden Kryokonservierung bei -20°C. Die HES-Gruppe hat im Vergleich zur frischen Probe noch eine Aktivität von 26,30% und die Glycerin-Gruppe von 36,98%. Nach einem Jahr Lagerung ist in der HES-Gruppe noch eine Aktivität von 19,34% und in der Glycerin-Gruppe von 28,18% bestimmbar. Der unmittelbare Vergleich der beiden Kryoprotektive zeigt eine um 28,85% höhere Aktivität in der Glycerin Gruppe nach 48 Stunden und nach einem Jahr eine Differenz-Aktivität von 31,39% im Vergleich zur HES-Gruppe.

Die direkte Gegenüberstellung der beiden Protektive bei einer Konservierungstemperatur von -80°C zeigt ebenfalls den hochsignifikanten Verlust, verglichen mit der frischen Probe, nach 48 Stunden Lagerung. Die HES-Gruppe weist nach 48 Stunden eine Aktivität von 27,00% und die Glycerin-Gruppe von 37,41% auf; nach einem Jahr hat die HES-Gruppe eine Aktivität von 21,60% und die Glycerin-Gruppe von 29,43%. Ebenso kann erneut ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den beiden Kryoprotektiven nachgewiesen werden. Die Aktivität der Glycerin-Gruppe liegt nach 48 Stunden Lagerung um 27,93% und nach einem Jahr um 29,30% höher als in der entsprechenden HES-Gruppe.

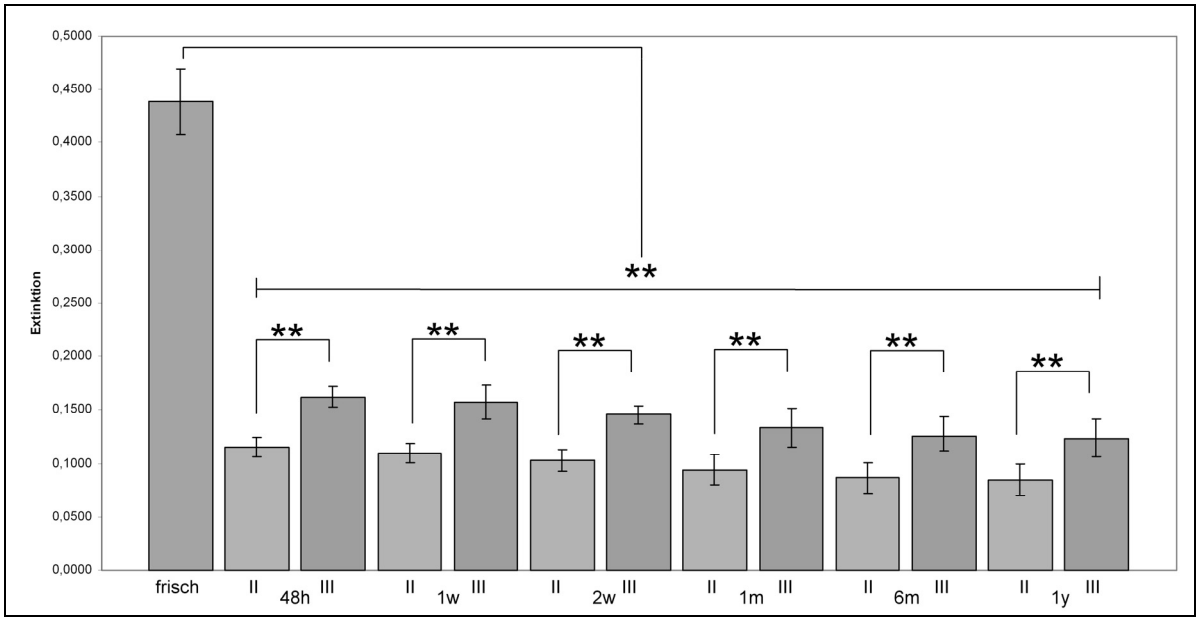

Abbildung 101: ***Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Glycerin (III) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01***

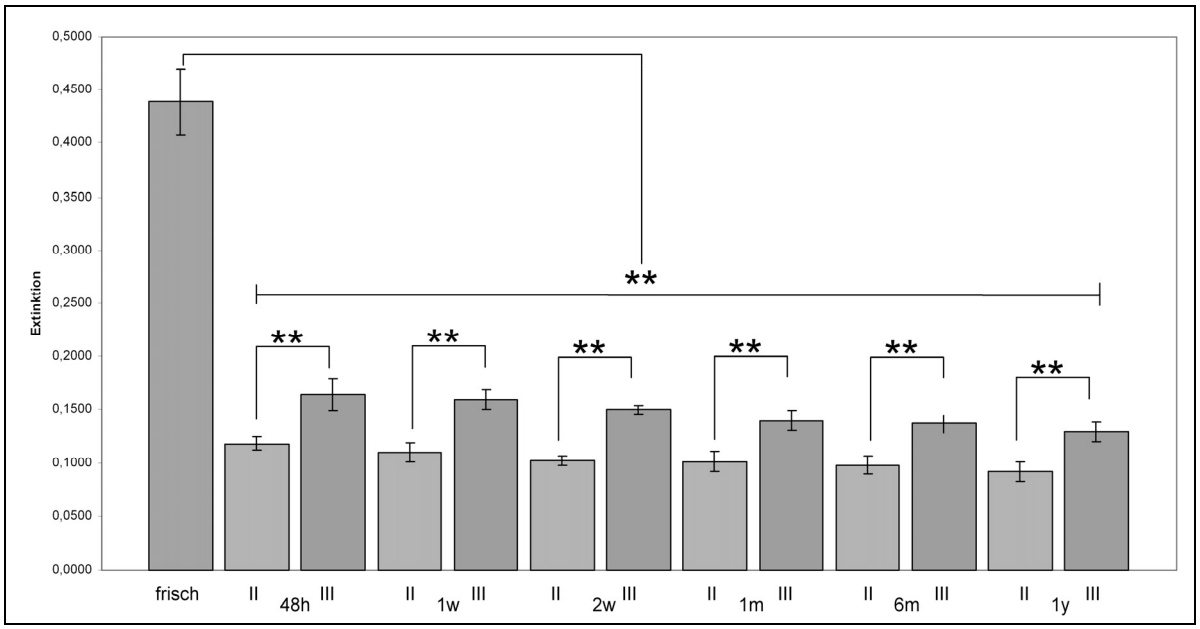

Abbildung 102: *Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Glycerin (III) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01*

5.6.4.3 GPDH

Die Bestimmung der freien GPDH zeigt ebenfalls einen hochsignifikanten Verlust innerhalb der ersten 48 Stunden, sowohl in der HES-Gruppe, als auch in der Glycerin-Gruppe. Nach 48 Stunden liegt die Menge der freien Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase in der HES-Gruppe 531,20% und in der Glycerin-Gruppe 353,16% über der in der frischen Probe gemessenen Menge. Nach 12 Monaten sind diese Werte jeweils auf 577,30% (HES-Gruppe) und 397,30% (Glycerin-Gruppe) angestiegen. Ebenso lässt sich erneut ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den beiden Kryoprotektiven Hydroxyethylstärke und Glycerin beobachten. In der Glycerin-Gruppe ist nach 48 Stunden Lagerung 38,82% weniger GPDH messbar, als in der entsprechenden HES-Gruppe; nach Ablauf eines Jahres sind noch 30,26% weniger GPDH bestimmbar.

Bei einer Lagerungstemperatur von -80°C ist in der Glycerin-Gruppe nach 48 Stunden 55,23% weniger GPDH und in der Glycerin-Gruppe nach einem Jahr 43,09% weniger GPDH, verglichen mit den entsprechenden HES-Gruppen, messbar.

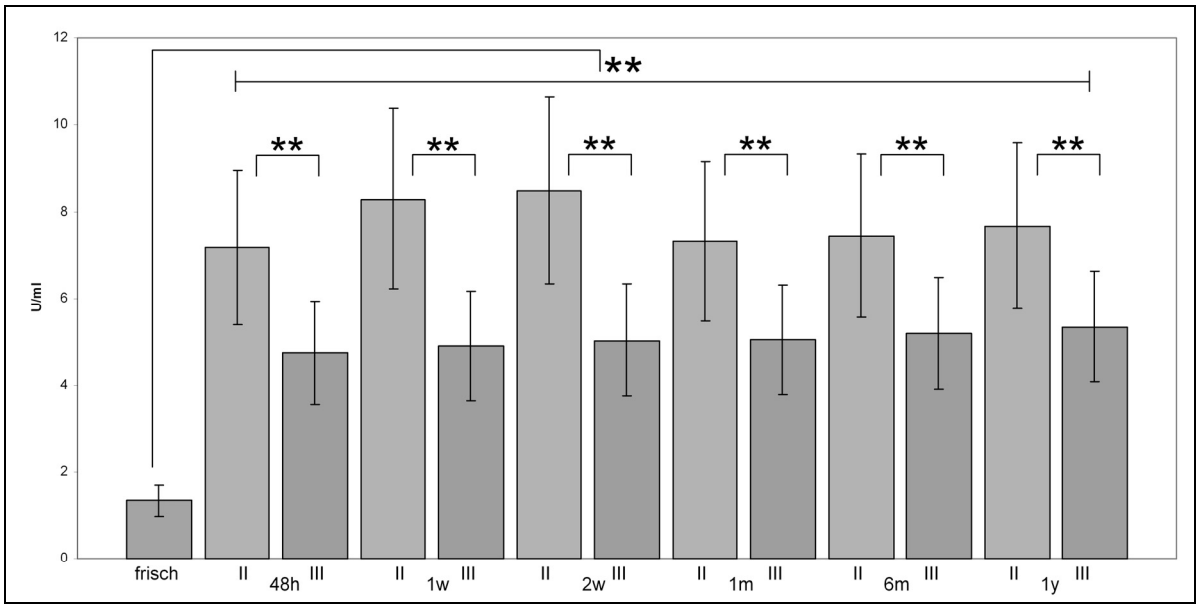

Abbildung 103: ***Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Glycerin (III) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01***

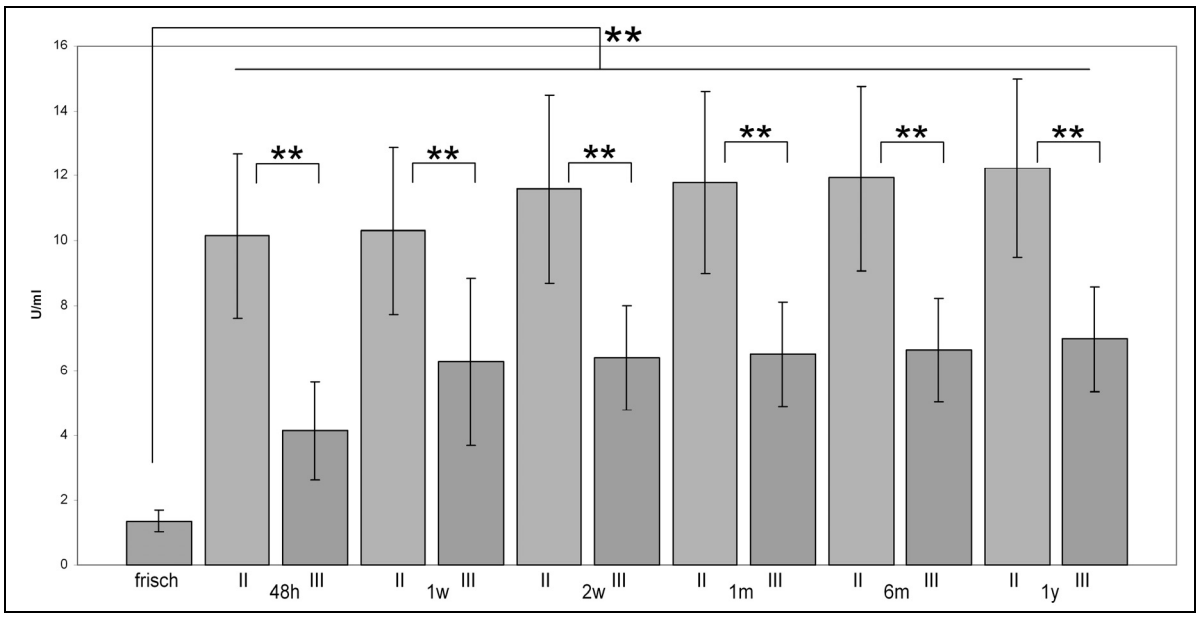

Abbildung 104: ***Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Glycerin (III) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01***

5.6.5 Hydroxyethylstärke verus Glycerin, Dextran, Polyvinylpyrrolidon

5.6.5.1 MTT

Der Vergleich des Kryoprotektives Hydroxyethylstärke mit der kryoprotektiven Mischung aus Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen zeigt auf der einen Seite den wiederholt beschrieben hochsignifikanten Verlust nach 48 Stunden Lagerung, im Vergleich zur frischen Probe und auf der anderen Seite ist erneut ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Protektiven zu sehen. Nach 48 Stunden Konservierung bei -20°C hat die HES-Gruppe eine Aktivität von 5,00% und die Protektiv-Mischung von 37,72%, verglichen mit der frischen Probe. Nach einem Jahr ist der Aktivitätsgrad der HES-Gruppe auf 2,50% und der Aktivitätsgrad der Protektiv-Mischung auf 30,40% abgesunken. Im direkten Vergleich wird dieser Unterschied nochmals deutlicher. Nach 48 Stunden Konservierung besitzen die Zellen, die mit der Protektiv-Mischung kryokonserviert wurden 86,70% mehr Aktivität als die Zellen, die mit Hydroxyethylstärke protektiv behandelt wurden. Nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes von einem Jahr liegt der Aktivitätsgrad der HES-Gruppe bei 8,46%, verglichen mit der Protektiv-Mischung; diese verglichen mit der HES-Gruppe zeigt eine „Mehr-Aktivität“ von 91,54%.

Bei der Analyse der Proben, die bei -80°C kryokonserviert wurden, zeigt sich neben dem oben beschriebenen hochsignifikanten Verlust nach 48 Stunden, verglichen mit der frischen Probe, eine hochsignifikante Differenz zwischen den beobachteten Kryoprotektiven bzw. Kryoprotektivmischungen. Nach 48 Stunden Lagerung findet sich in der Protektiv-Mischung eine Enzymaktivität die 86,19% über jener der entsprechenden HES-Gruppe (13,81%) liegt. Nach 12 Monaten liegt diese Aktivität bei 89,02% und die HES-Gruppe weist bezogen hierauf eine mitochondriale enzymatische Aktivität von 10,48% auf.

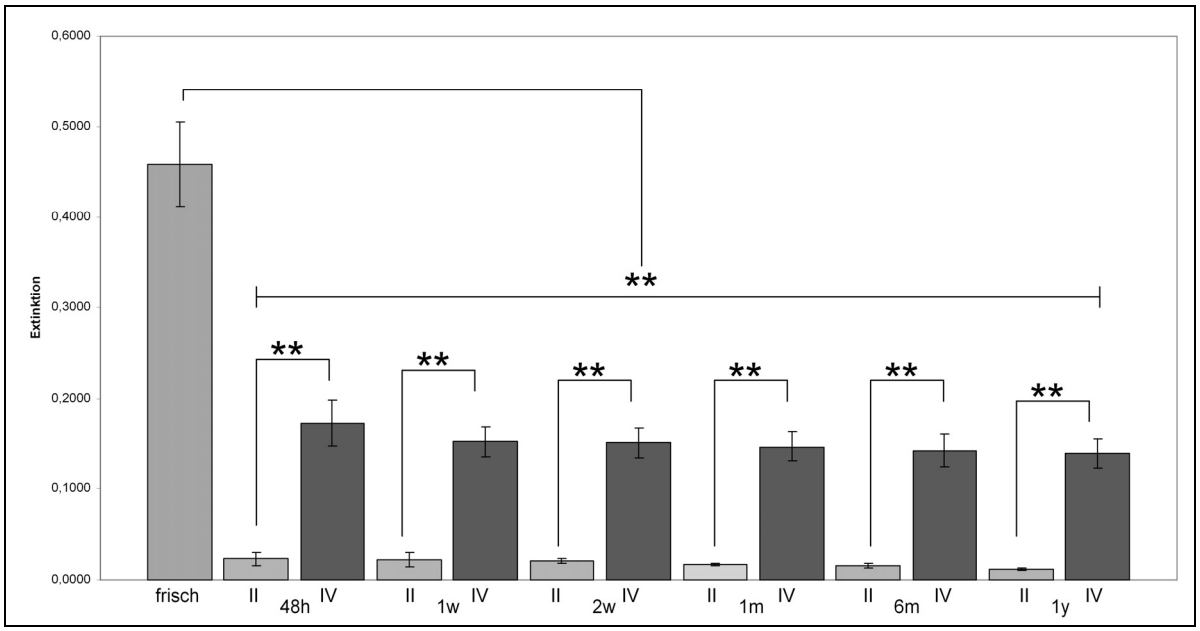

Abbildung 105: ***Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01***

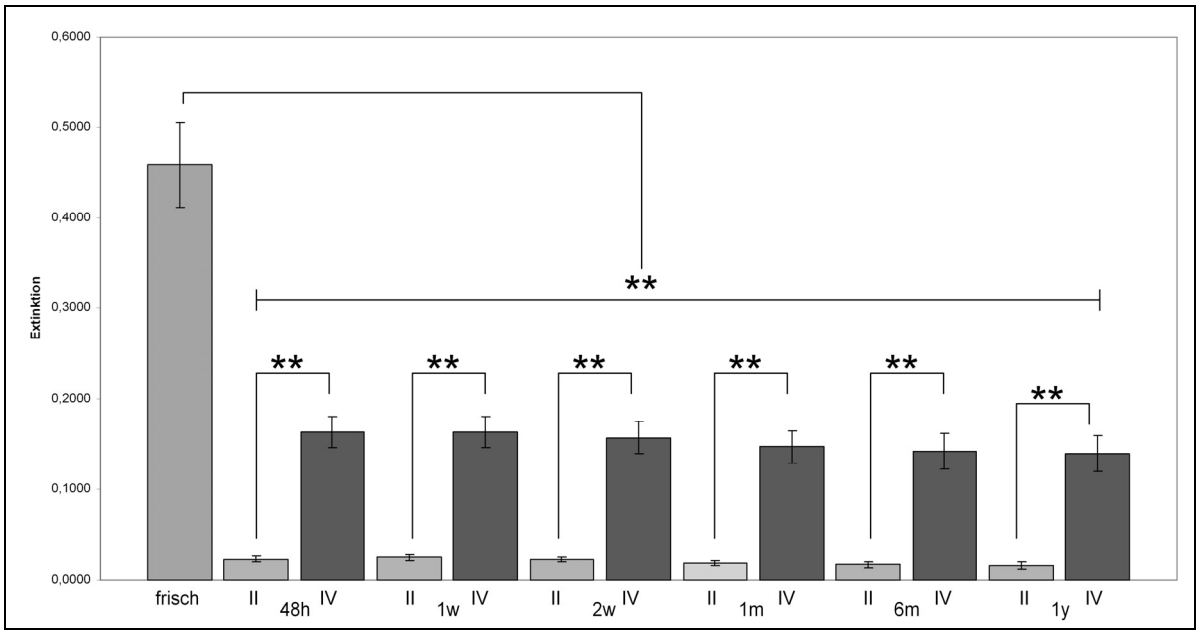

Abbildung 106: ***Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01***

5.6.5.2 XTT

Die Messung der enzymatischen Aktivität im Zytosol der Zelle, beim Vergleich der Protektive Hydroxyethylstärke und einer Mischung aus Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen, zeigt ebenfalls den bekannten hochsignifikanten Verlust nach 48 Stunden in beiden beobachten Gruppen; in der HES-Gruppe konnte eine Aktivität von 26,30% und in der Protektiv-Mischung von 57,31% ermittelt werden. Nach einem Jahr liegen diese Aktivitätsgrade für die HES-Gruppe bei 19,34% und für die Protektiv-Mischung bei 49,41%, verglichen zur frischen Probe.

Im unmittelbaren Vergleich der beiden Gruppen kann ebenfalls ein hochsignifikanter Unterschied dargestellt werden. Der erste Messpunkt, 48 Stunden Kryokonservierung bei -20°C, zeigt für die HES-Gruppe eine Aktivität von 45,87% verglichen mit der Protektiv-Mischung, diese weist zu diesem Zeitpunkt 54,13% mehr Aktivität auf, als die beschriebene HES-Gruppe. Am letzten Messpunkt, nach 12 Monaten, kann in den Zellen der Protektiv-Mischung 60,85% mehr enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, als im Zytosol der Adipozyten, die mit Hydroxyethylstärke (39,15%) kryokonserviert wurden.

Parallel zum oben beschriebenen Teilversuch wurden die Zellen auch bei -80°C gelagert. Der hochsignifikante Verlust der Aktivität, nach 48 Stunden, ist weiterhin zu beobachten. Die HES-Gruppe zeigt eine Aktivität von 27,00% und die Protektiv-Mischung von 57,84%, verglichen zur frischen Probe; nach einem Jahr kann in den Zellen der HES-Gruppe eine Aktivität von 21,60% und in denen der Protektiv-Mischung von 51,28% gemessen werden.

Bei der Gegenüberstellung der beiden Protektivgruppen bzw. –mischungen lässt sich nach 48 Stunden Kryokonservierung in den Adipozyten der Protektiv-Mischung 57,84% mehr Aktivität als in der entsprechenden Probe der HES-Gruppe nachweisen. Nach einem Jahr kann in den Proben der Protektiv-Mischung eine enzymatische Aktivität gemessen werden, die 59,43% über jener der HES-Gruppe liegt.

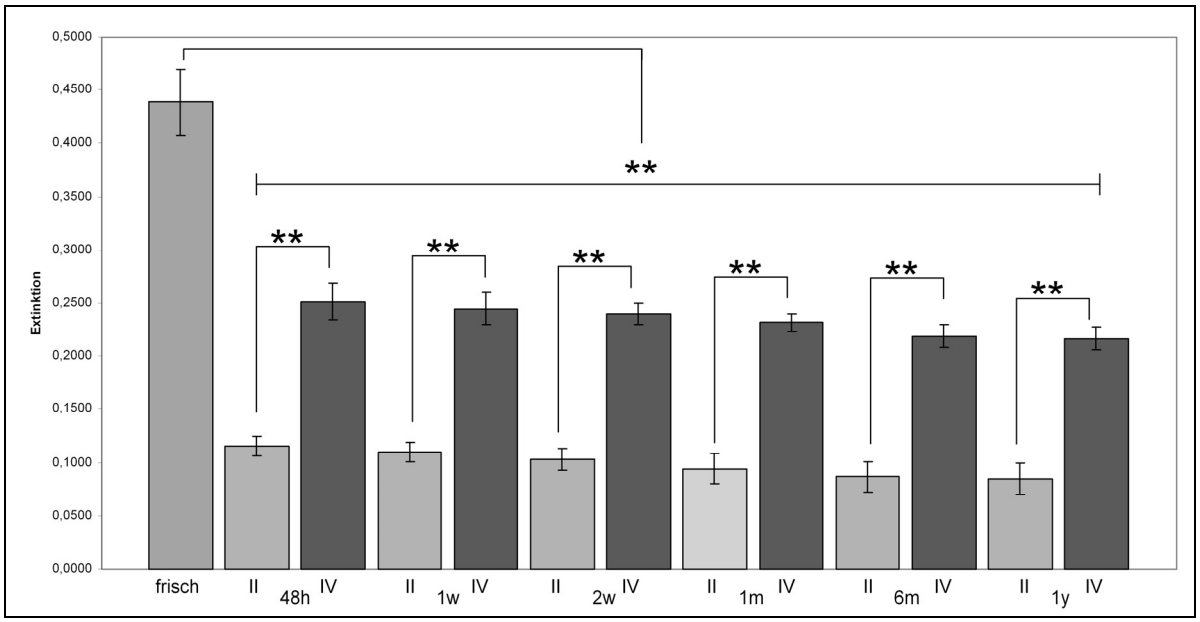

Abbildung 107: ***Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01***

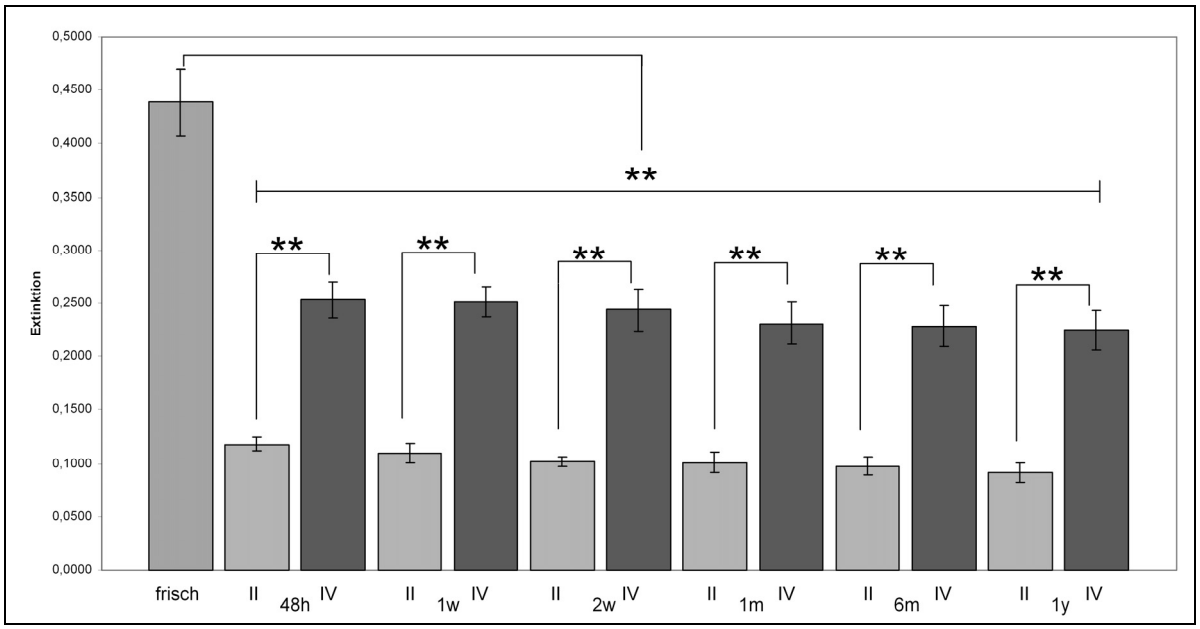

Abbildung 108: ***Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,001***

5.6.5.3 GPDH

Bei der Bestimmung der freien Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase zum direkten Vergleich der Kryoprotektive HES und der oben beschrieben Mischung zeigt sich ebenfalls der hochsignifikante Unterschied zwischen den konservierten Proben und der frischen Referenzprobe. Nach 48 Stunden ist in der HES-Gruppe 531,20% und in der Protektiv-Mischung 220,42% mehr freies GPDH nachweisbar. Am Ende der Versuchsreihe kann in den Proben der HES-Gruppe, bei einer Konservierungstemperatur von -20°C, 577,30% und in der Protektiv-Mischung 278,99% mehr freies GPDH bestimmt werden.

Das bedeutet beim direkten Vergleich der beiden Gruppen, dass in den Proben der Protektiv-Mischung, nach 48 Stunden Konservierung, 58,69% weniger freies GPDH nachgewiesen werden konnte, als in der entsprechenden Probe der HES-Gruppe. Nach einem Jahr konnte in den Proben der Protektiv-Mischung 51,03% weniger freies GPDH bestimmt werden.

Im äquivalenten Teilversuch, bei einer Konservierungstemperatur von -80°C, kann ebenfalls ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der frischen Probe und den konservierten Proben dargestellt werden. Die „Mehr-Freisetzung“ liegt in der HES-Gruppe nach 48 Stunden bei 754,9% und in der Protektiv-Mischung bei 307,89%, verglichen mit der frischen Probe. Nach einem Jahr hat sich die Menge der freien GPDH in der HES-Gruppe auf 908,70% und in der Protektiv-Mischung auf 414,72% erhöht.

Im direkten Vergleich zeigt sich damit in der Protektiv-Mischung eine um 51,20% geringere Freisetzung von GPDH, nach 48 Stunden, als in der HES-Gruppe. Nach einem Jahr konnte in der Protektiv-Mischung 54,36% weniger freie Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase nachgewiesen werden, als in der entsprechenden Probe der HES-Gruppe.

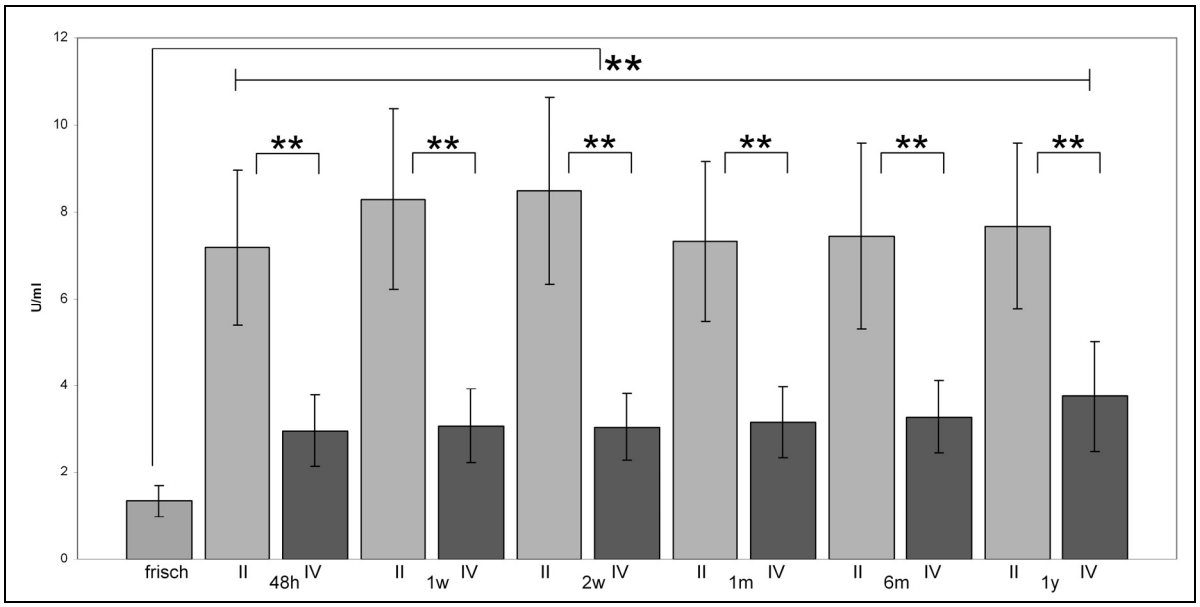

Abbildung 109: ***Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01***

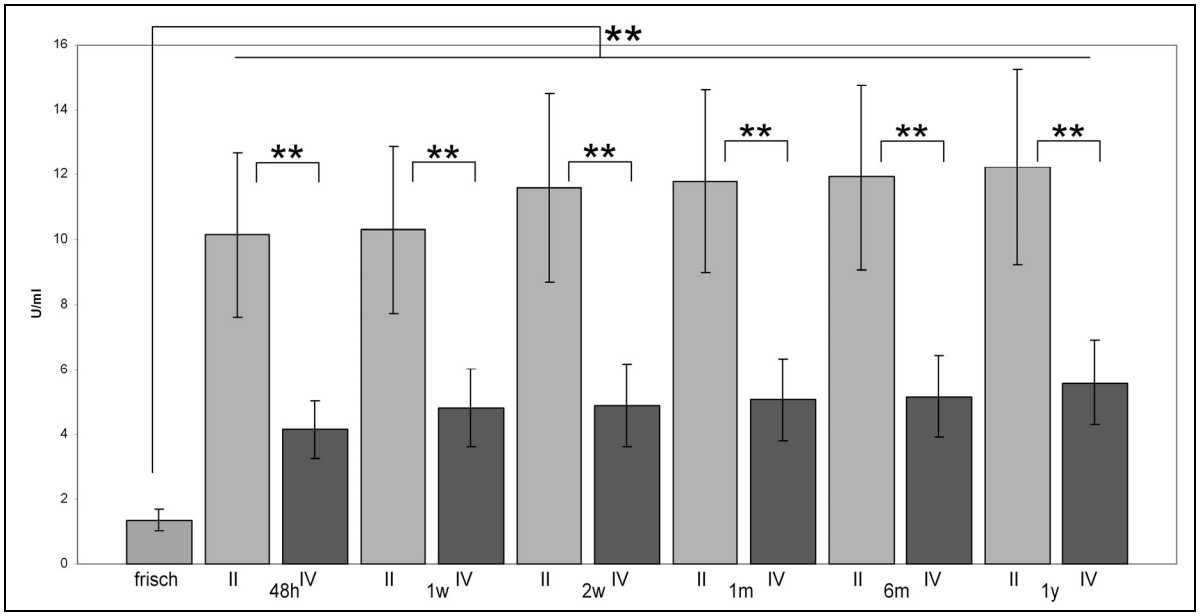

Abbildung 110: ***Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01***

5.6.6 Glycerin versus Glycerin, Dextran, Polyvinylpyrrolidon

5.6.6.1 MTT

In diesem Vergleich kann weiterhin der hochsignifikante Verlust der enzymatischen Aktivität, verglichen mit der frischen Probe, nach 48 Stunden Lagerung und einer Konservierungstemperatur von -20°C beobachtet werden. In der Glycerin-Gruppe konnte nach 48 Stunden eine Aktivität von 21,23% und in der Protektiv-Mischung von 37,32% gemessen werden. Nach einem Jahr konnte in der Glycerin-Gruppe ein Aktivitätsgrad von 16,22% und in der Protektiv-Mischung von 30,40%, bezogen auf die frische Probe, bestimmt werden. Der direkte Vergleich der beiden Protektivgruppen zeigt, nach 48 Stunden Konservierungsdauer, eine 43,70% höhere enzymatische Aktivität für die Zellen, die in der Protektiv-Mischung eingefroren wurden; gegensätzlich bedeutet dies, dass die Zellen, die mit Glycerin als Protektiv eingefroren wurden, im Vergleich zur Protektiv-Mischung, nur einen Aktivitätsgrad von 53,37% erreichen. Diese Differenz ist hochsignifikant.

Bei einer Veränderung der Konservierungstemperatur von -20°C auf -80°C kann weiterhin die hochsignifikante Veränderung der Aktivität innerhalb der ersten 48 Stunden, verglichen zur frischen Probe, beobachtet werden. In der Glycerin-Gruppe konnte eine Aktivität von 20,54% und in der Protektiv-Mischung von 35,66% bestimmt werden. Nach Ablauf eines Jahres konnte die Aktivität der Glycerin-Gruppe mit 16,14% und die Protektiv-Mischung mit 30,57% gemessen werden. Der direkte Vergleich zeigt einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den verwendeten Kryoprotektiven. Bei einer Lagerungsdauer von 48 Stunden bedeutet dies, eine um 42,42% höhere messbare Aktivität in den mit der Protektiv-Mischung konservierten Zellen. Nach einem Jahr ist diese Aktivitätsdifferenz auf 47,22% angestiegen. Die Zellen, die protektiv mit Glycerin eingefroren wurden, erreichen im Bezug auf die Protektiv-Mischung, ein Aktivitätsverhältnis von 52,78%.

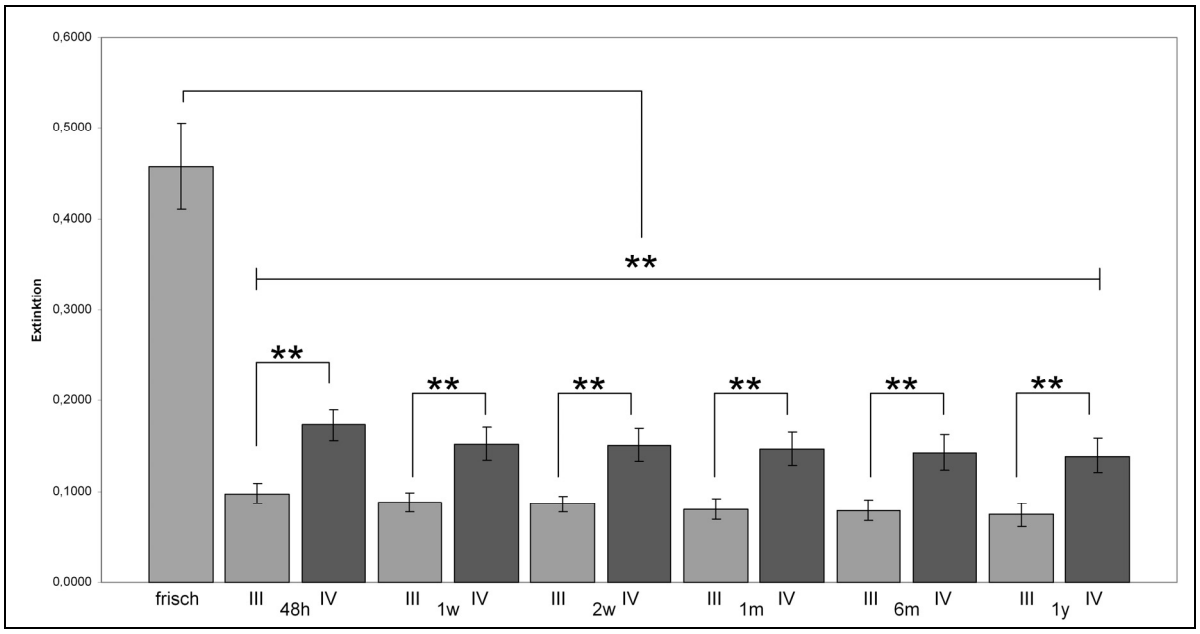

Abbildung 111: ***Vergleich von Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01***

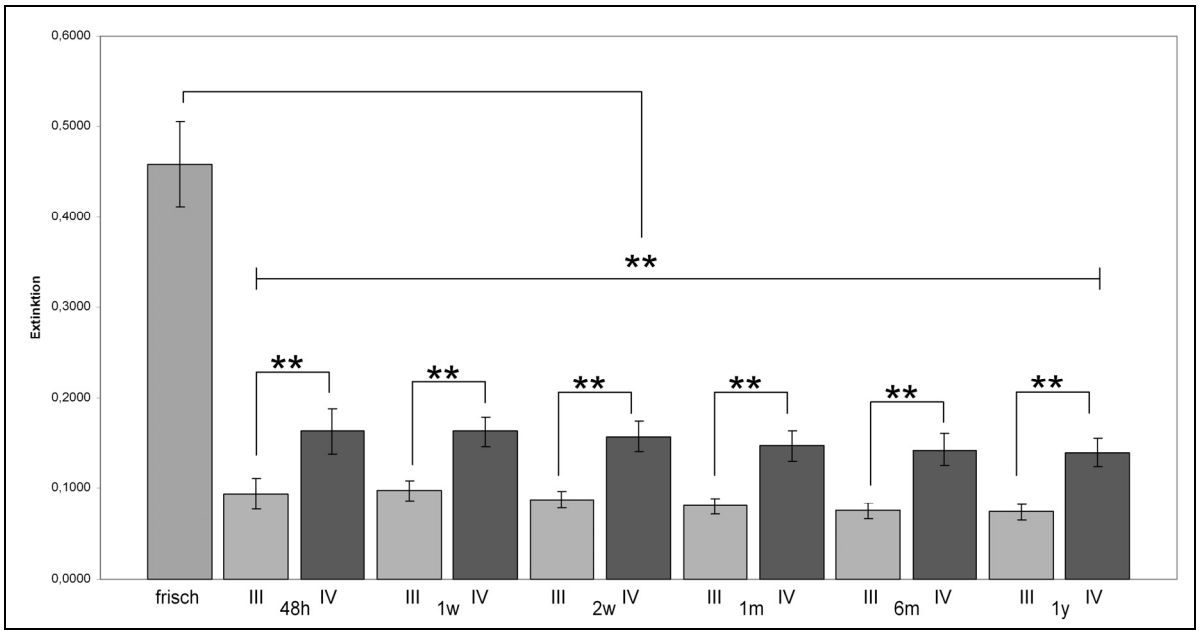

Abbildung 112: ***Vergleich von Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01***

5.6.6.2 XTT

Der Vergleich der beiden Protektive mittels des XTT-Tests zeigt, ebenso wie der MTT-Test zuvor, den hochsignifikanten Verlust der enzymatischen Aktivität innerhalb der ersten 48 Stunden nach Beginn der Kryokonservierung. Die Glycerin-Gruppe weist, bei einer Konservierungstemperatur von -20°C, einen Aktivitätsgrad von 36,98% und die Protektiv-Mischung von 57,31%, verglichen mit der frischen Probe, auf. In der direkten Gegenüberstellung der beiden Protektive zeigt sich nach 48 Stunden Lagerung eine um 35,52% höhere Aktivität in den Proben, die mit der Protektiv-Mischung bei -20°C kryokonserviert wurden. Am Ende der Versuchsreihe konnte in diesen Proben eine „Mehr-Aktivität“ von 42,94%, verglichen mit der Glycerin-Gruppe, nachgewiesen werden.

Bei identischem Test und veränderter Lagerungstemperatur, Konservierung mit -80°C, konnte ebenfalls der hochsignifikante Verlust nach 48 Stunden dargestellt werden. Die Glycerin-Gruppe hatte einen Aktivitätsgrad von 37,41% und die Protektiv-Mischung von 57,84%, bezogen auf die frische Probe. Nach Ablauf von 12 Monaten lag diese Aktivität für die Glycerin-Gruppe bei 29,43% und für die Protektiv-Mischung bei 51,28%.

Ein Vergleich der beiden Protektivgruppen untereinander, bei einer Konservierungstemperatur von -80°C, zeigt nach 48 Stunden Konservierung eine in der Protektiv-Mischung um 35,38% höhere, hochsignifikante, enzymatische Aktivität. Nach 12 Monaten liegt diese Aktivitätsdifferenz, bezogen auf die Glycerin-Gruppe, ebenfalls hochsignifikant, bei 42,61%.

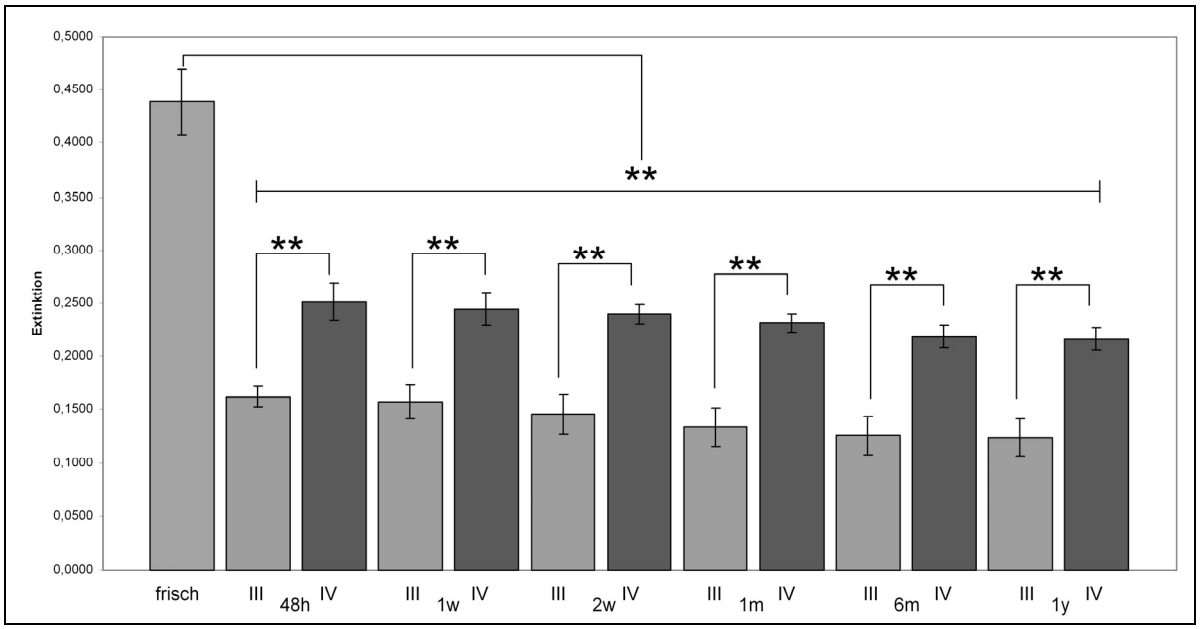

Abbildung 113: ***Vergleich von Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz ** p < 0,01***

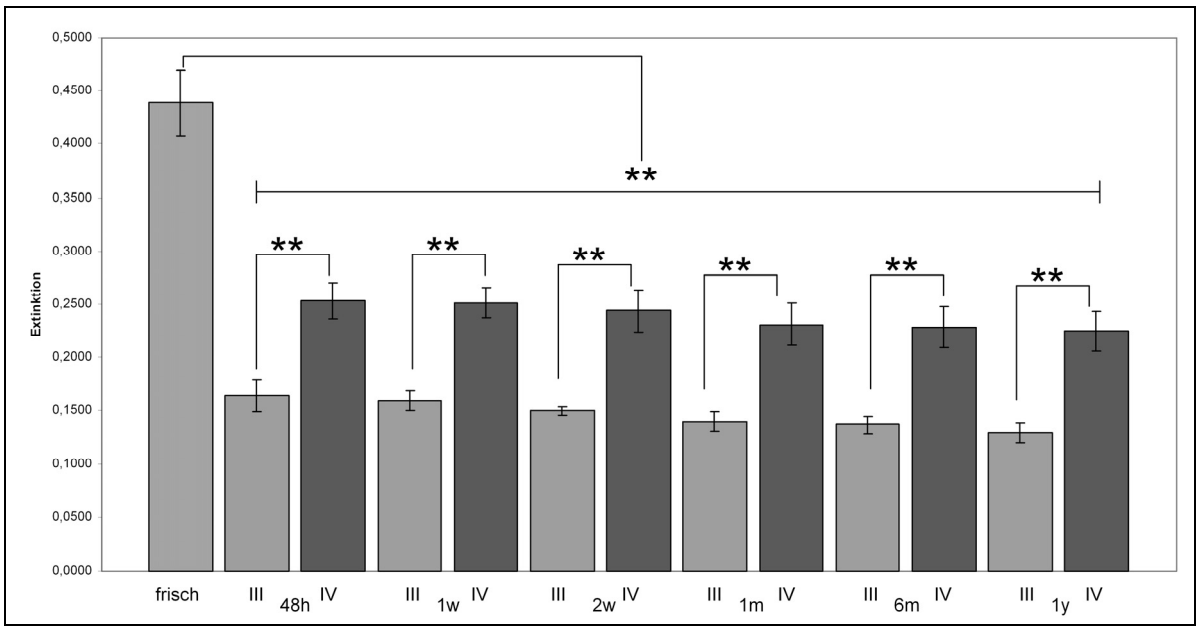

Abbildung 114: ***Vergleich von Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz ** p < 0,01***

5.6.6.3 GPDH

Der Vergleich der beiden Protektive durch die Bestimmung der Quantität der freien Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase zeigt erneut einen hochsignifikanten Verlust nach 48 Stunden und erstmals einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Protektiven Glycerin und der Protektiv-Mischung Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen. Nach 48 Stunden Lagerung bei -20°C findet sich in den Proben der Glycerin-Gruppe 353,16% und in den Proben der Protektiv-Mischung 220,42% mehr freies GPDH, als in den nicht kryokonservierten Proben. Nach einem Jahr konnte in der Glycerin-Gruppe 397,3% und in der Protektiv-Mischung 278,99% mehr freies GPDH nachgewiesen werden.

Im direkten Vergleich fand sich in der Protektiv-Mischung 37,58% weniger freies GPDH, verglichen mit der Glycerin-Gruppe. Nach einem Jahr lag diese signifikante Differenz bei 29,78% mehr freiem GPDH in der Glycerin-Gruppe.

Bei einer Konservierungstemperatur von -80°C und einem Konservierungszeitraum von 48 Stunden lag die Menge der bestimmbaren freien GPDH in der Protektiv-Mischung 8,85% unterhalb jener, die in der Glycerin-Gruppe nachgewiesen werden konnte; nach 12 Monaten konnte eine Differenz von 19,80% gemessen werden.

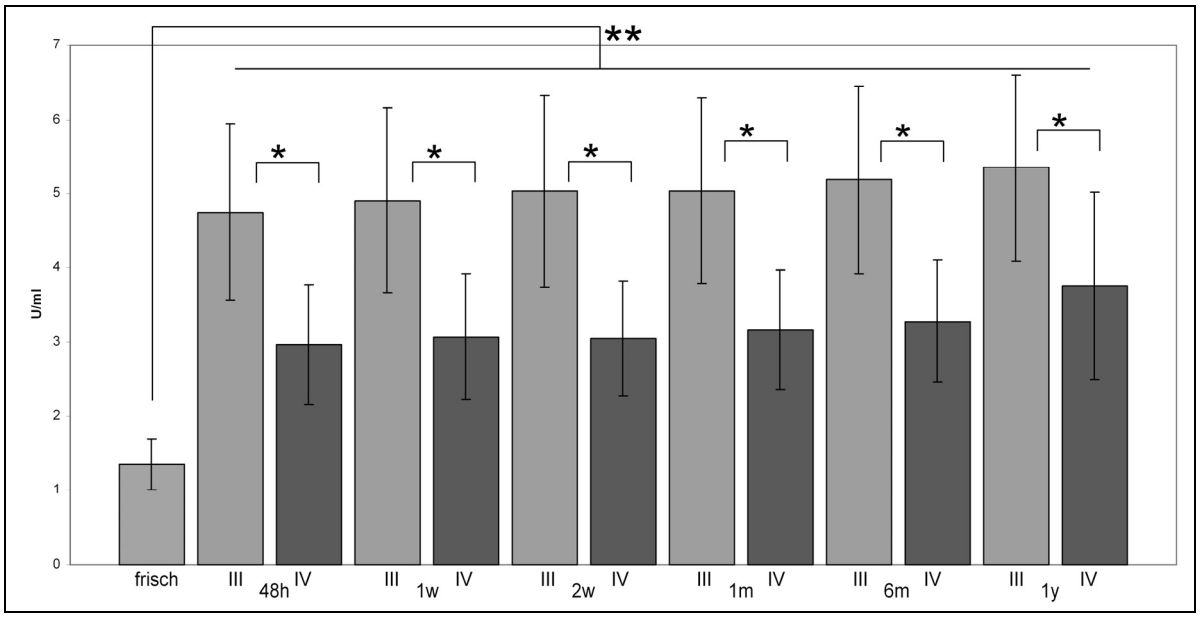

Abbildung 115: ***Vergleich von Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C; Signifikanz: ** < 0,01, * < 0,05***

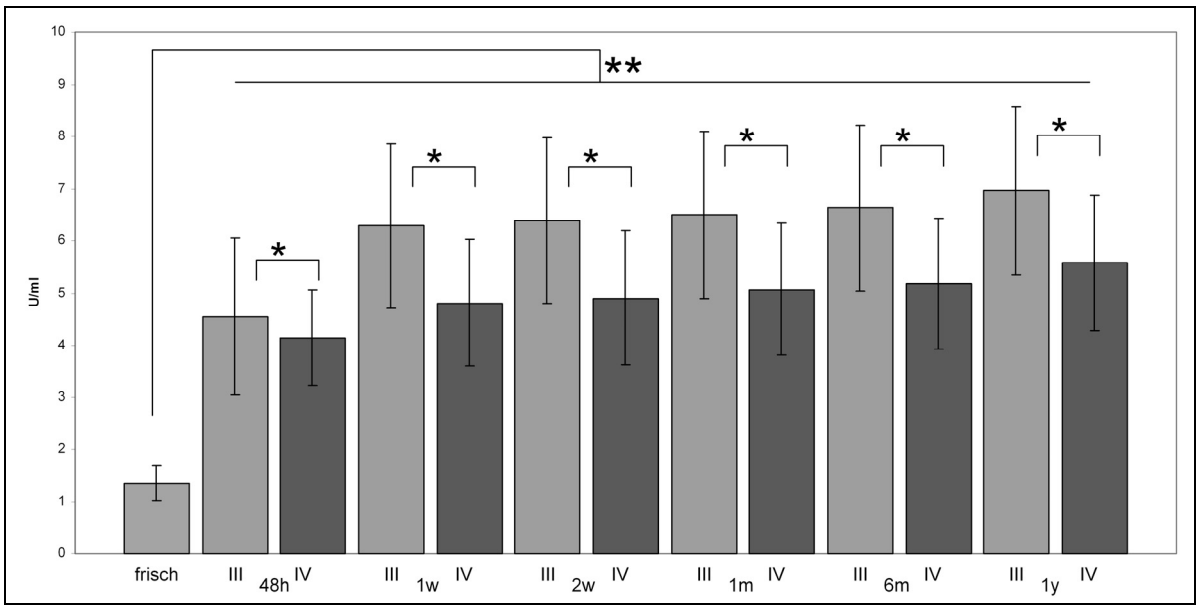

Abbildung 116: ***Vergleich von Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C; Signifikanz: **p < 0,01, * p < 0,05***

5.7 Vergleich I-IV

5.7.1 MTT

In einem direkten Vergleich aller Kryoprotektive lässt sich bereits nach 48 Stunden Konservierung eine Fraktionsbildung erkennen. Eine erste Fraktion wird aus der Kontroll-Gruppe mit den Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C und der HES-Gruppe mit den Konservierungstemperaturen -20°C und -80°C gebildet. Diese Fraktion weist den deutlichsten enzymatischen Aktivitätsverlust nach einem Jahr auf.
Die zweite Fraktion bildet die Glycerin-Gruppe mit den beiden Temperaturstufen -20°C und -80°C.
Den geringsten Aktivitätsverlust weist die dritte Fraktion auf, welche von den beiden Konservierungsstufen der Glycerin, Dextran und PVP Gruppe gebildet wird.
Weiterhin bleibt der deutliche Aktivitätsverlust nach 48 Stunden zu erkennen.

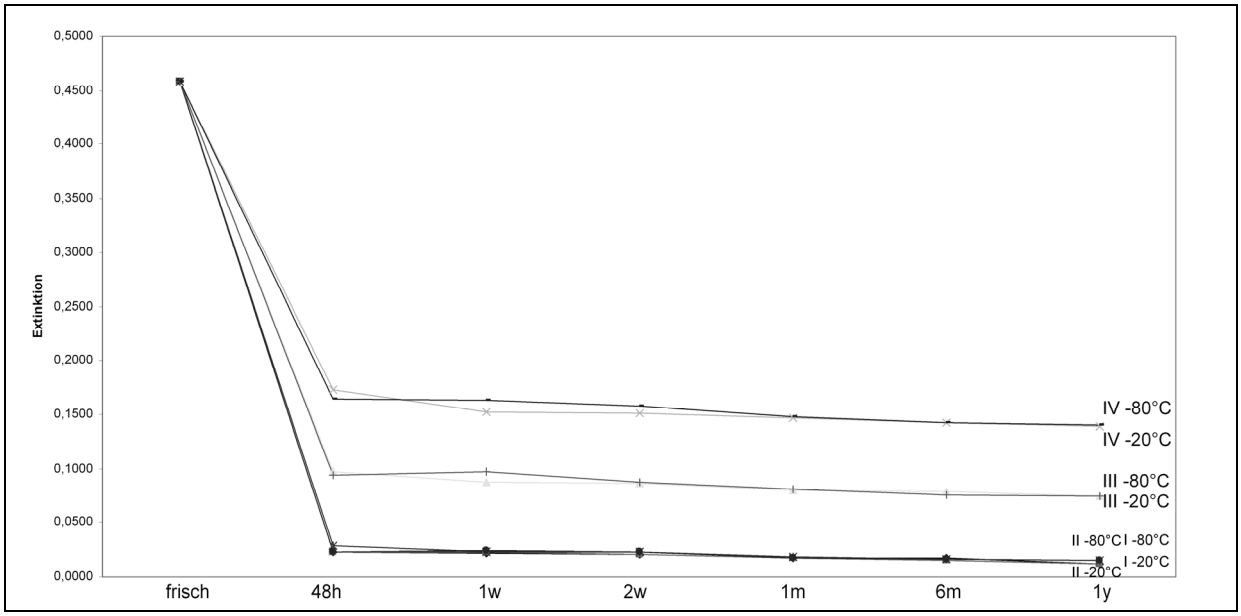

Abbildung 117: *Vergleich von Kontrolle (I), Hydroxyethylstärke (II), Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit Hilfe der MTT-Messung bei Konservierungstemperaturen von -20°C und -80°C*

5.7.2 XTT

Im analogen Vergleich aller Protektive, mittels des XTT-Tests, lässt sich erneut eine Fraktionsbildung innerhalb der Kryoprotektive bzw. Temperaturstufen erkennen.

Eine erste Fraktion wird wieder von der Kontroll-Gruppe und der HES-Gruppe gebildet. Jedoch lässt sich bei den Ergebnissen der XTT-Daten ein deutlicherer Unterschied zwischen den Konservierungstemperaturen darstellen. Sowohl in der Kontroll-Gruppe als auch in der HES-Gruppe ist die Aktivität in den bei -80°C gelagerten Proben höher, als in den vergleichbaren Proben, die bei -20°C gelagert wurden.

Die zweite Fraktion wird von der Glycerin-Gruppe gebildet. Analog zu den Beobachtungen in der ersten Fraktion, kann auch hier eine Differenz zwischen den Lagerungstemperaturen dargestellt werden. Eine Zellkonservierung bei -20°C weist nach einem Jahr Lagerung eine geringere Aktivität auf als die Lagerung identischer Zellen bei -80°C.

In der dritten Fraktion kann Vergleichbares beobachtet werden. In den Proben der Lagerungstemperatur -80°C ist ein geringerer Aktivitätsverlust nachweisbar als in den Proben, die bei -20°C konserviert wurden.

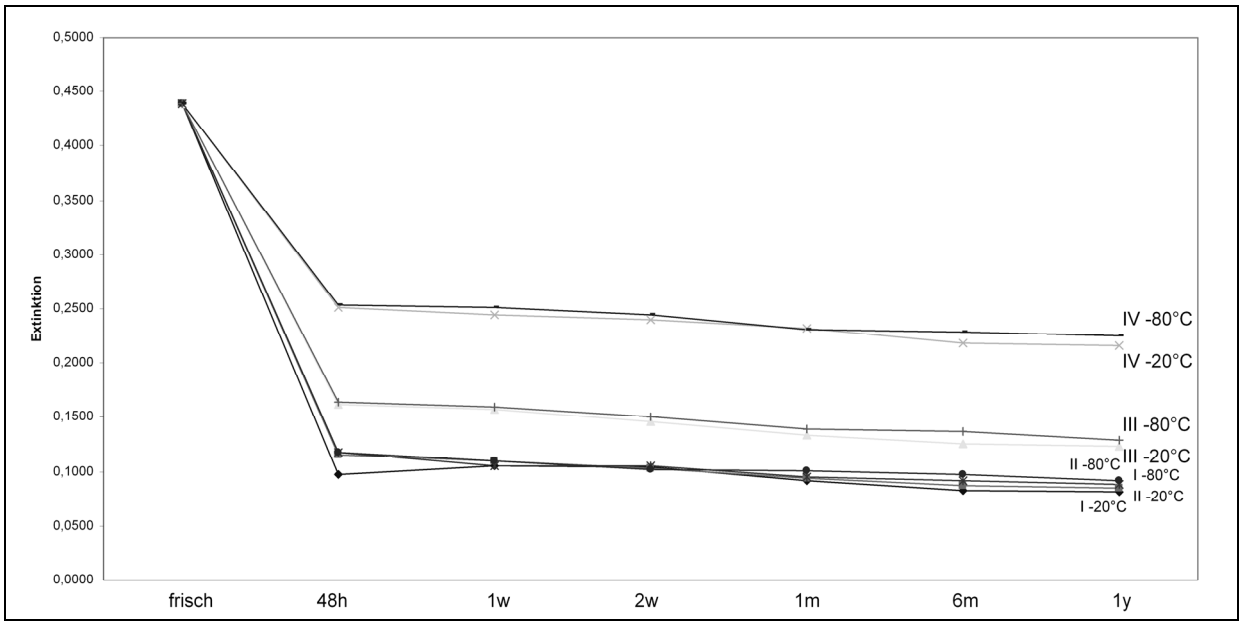

Abbildung 118: *Vergleich von Kontrolle (I), Hydroxyethylstärke (II), Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit Hilfe der XTT-Messung bei Konservierungstemperaturen von -20°C und -80°C*

5.7.3 GPDH

In der zusammenfassenden Betrachtung der vier Bedingungen, unter denen die Fettzellen kryokonserviert wurden und anschließend mittels der GPDH-Bestimmung verglichen werden konnten, zeigt sich verglichen mit den MTT- und XTT-Analysen keine identische Fraktionsbildung. Dennoch ist teilweise eine Blockbildung möglich:
Der erste Block bildet sich aus jenen Proben der Kontroll-Gruppe und der HES-Gruppe, die gemeinsam bei -80°C gelagert wurden. Besonders zu beachten ist der Verlauf der beiden Bedingungen in den ersten zwei Wochen des Versuchsablaufs. Hier zeigt die HES-Gruppe bei den Messpunkten 48 Stunden und 1 Woche eine kurze Plateauphase, verglichen mit der Kontroll-Gruppe, die nach 48 Stunden einen geringeren Wert aufweist und sich erst im Verlauf der folgenden zwei Messpunkte der HES-Gruppe angleicht.
Der zweite Block vereint in einer großen Breite, die Protektive und Bedingungen, die weder in den ersten Block noch in den dritten Block einzugliedern sind. Er umfasst die Proben der Kontroll- und HES-Gruppe, welche bei -20°C konserviert wurden, ebenso die Proben der Glycerin-Gruppe mit beiden Lagerungsbedingungen und die Proben der Protektiv-Mischung, welche bei -80°C aufbewahrt wurden.
Die Proben der Protektiv-Mischung, die bei -20°C gelagert wurden, bilden den dritten Block.

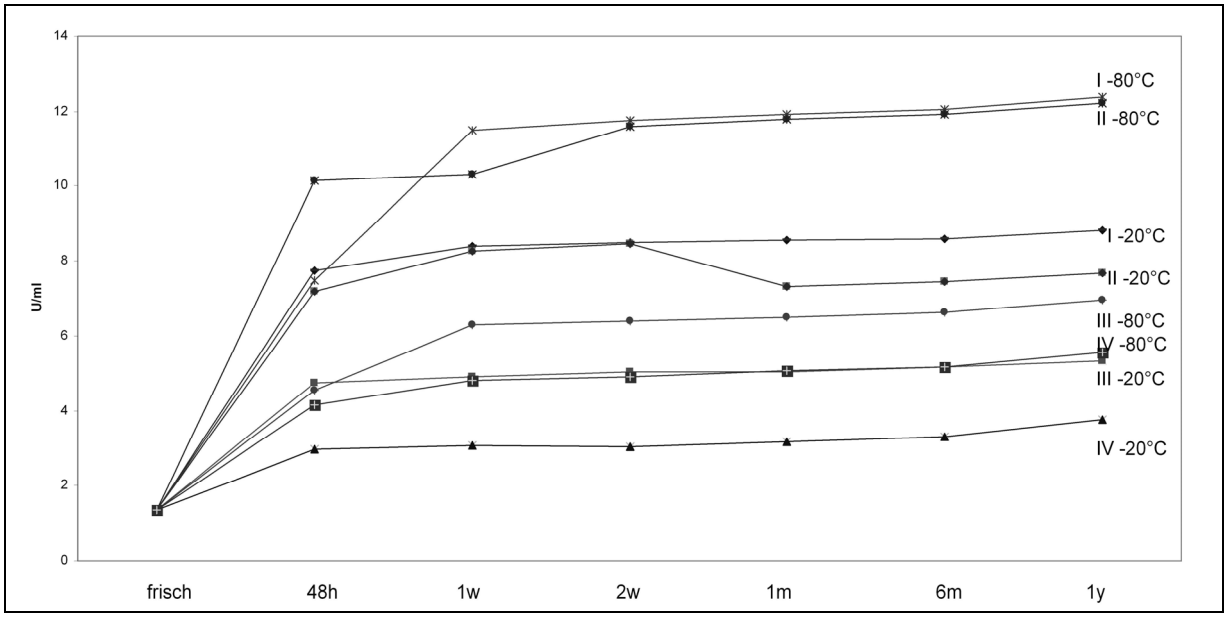

Abbildung 119: *Vergleich von Kontrolle (I), Hydroxyethylstärke (II), Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit Hilfe der GPDH-Bestimmung bei Konservierungstemperaturen von -20°C und -80°C*

6 Diskussion

Inhalt dieser Arbeit sind zwei grundlegende Fragen bezüglich der Kryokonservierung humaner Adipozyten. Erstens: Inwiefern ist eine Kryokonservierung ohne Schädigung der Zellen überhaupt möglich und zweitens: wenn, wie vermutet, eine solche Schädigung durch die Konservierung eintritt, welche Kryoprotektive könnten einen Schädigungsmechanismus teilweise oder ganz verhindern?
Beginnend mit der Annahme, das humane Adipozyten eine Konservierung bei -20°C oder -80°C nicht oder nur erheblich eingeschränkt überleben, wurden Zellfärbungen mit Trypanblau und Flouresceindiacetat/Ethidumbromid für die Verwendung mit humanen Adipozyten angepasst und durchgeführt.
Einen detaillierten Einblick in die Zellen und die, durch die Kryokonservierung, entstanden Schädigungen an den Membranen und Zellorganellen, liefern die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.
Zur genaueren quantitativen Analyse der enzymatischen Aktivität in der Zelle, wurden der MTT- und XTT-Test, zur Messung an Adipozyten, modifiziert.
Die Etablierung des Verfahrens zur Bestimmung der freien Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase ermöglicht eine quantitative Aussage über die Zerstörung der adipozytären Zellmembran nach der Kryokonservierung.

6.1 Färbungen

Beide Färbungen, sowohl die Trypanblau-Methode, als auch die Fluoreszenz-Methode mit FAD/EB, haben den Nachteil einer eingeschränkten Aussagekraft. In beiden Fällen ist jeweils nur eine Aussage über den Zustand bzw. die Integrität der Zellmembran möglich.
Desweiteren ist bei der Verwendung der Trypanblau-Methode nicht immer eindeutig zwischen Farbaufnahme und Nichtaufnahme des Farbstoffs zu unterscheiden. (Siehe Kapitel Material & Methoden 4.3.1 Färbungen)
Bei der Verwendung von FAD/EB muss weiterhin angemerkt werden, dass beide Farbstoffe zelltoxisch sind, im besonderen Ethidiumbromid. Von einer Ausschließlichkeit im Bezug auf den Zelluntergang im Verlauf des Kryoprozesses kann also nicht ausgegangen werden.

6.2 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen ermöglichen einen detailreichen Einblick in die intakten Zellen und im Vergleich mit den kryokonservierten Zellen, vor allem eine Einsicht in die Zerstörung, die im Verlauf des Konservierungsprozesses in den Adipozyten abläuft. Wie den Bilder zu entnehmen ist, kommt es vor allem zur sichtbaren Schädigung der Zellmembran, des Zellkerns und der Mitochondrien.
Ohne eine genauere laborchemische Analyse lässt sich bereits nur mit Hilfe dieser Bilder konstatieren dass eine Kryokonservierung humaner Adipozyten ohne die Verwendung eines Kryoprotektives so gut wie ausgeschlossen scheint.

6.3 MTT

Der MTT-Test hat sich als ein äußerst hilfreiches Instrument zur Bestimmung der Zellvitalität, im Bezug auf die Untersuchung von Adipozyten, dargestellt. Durch die Modifikation des bekannten Protokolls, an die Gegebenheiten der humanen Fettzelle und des sich ergebenden Versuchsaufbaus, konnte ein Testverfahren etabliert werden, dass eine quantitative Betrachtung der mitochondrialen enzymatischen Aktivität humaner Adipozyten ermöglicht. Durch diese replizierbare Methode ist es möglich, die zu untersuchenden Proben über den Versuchszeitraum von einem Jahr, vergleichbar zu analysieren. Im Gegensatz zu den Zellfärbemethoden Trypanblau und FAD/EB, die durch die Auszählung am Mikroskop einer deutlich höheren Fehlerquote unterliegen, ist der MTT-Test, bei dem das MTT-Tetrazoliumsalz (3-[4,5-Dimetylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) durch Spaltung des Tetrazoliumringes in MTT-Formazan umgewandelt wird [215,248,285], durch die Messung am Photometer, bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm, signifikant fehlerunanfälliger. Eine selbstverständlich vorhandene Fehlerquote konnte durch die Verwendung einer parallelen Dreifachmessung der jeweiligen Proben, weiter gesenkt werden.
Zur Modifikation des Tests wurde vor Beginn der Hauptversuche eine Toxizitätsstudie durchgeführt[f]. Die humanen Adipozyten wurden, bei modifizierter Reagenzmenge, über einen zeitlichen Verlauf von 8 Stunden stündlich analysiert, um den geeigneten Zeitpunkt für die künftigen Messungen zu bestimmen.

[f] Vgl. Abb. 13: MTT-Toxizitätstest, Material und Methoden

6.4 XTT

Die Verwendung des XTT-Test ist im Kontext dieser Arbeit ein logischer Schritt, welcher sich, ebenso wie der MTT-Test, auf die Analyse der enzymatischen Aktivität beschränkt, dies aber im Besonderen auf die Enzyme der zu untersuchenden Adipozyten. Gemeinsam bilden diese beiden Tests eine gesicherte Grundlage für die Analyse der enzymatischen Aktivität der Zellen.

Das beim XTT-Test verwendete XTT (Bis-(2methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Natriumsalz) ist ein dem MTT ähnliches gelbes Tetrazoliumsalz, das bei Metabolisierung durch die intramitochondrialen Dehydrogenasen einen wasserlöslichen orangen Formazan-Farbstoff bildet [29].

Desweiteren hat XTT gegenüber dem zytotoxischen MTT den Vorteil, dass es wasserlöslich ist und das es selbst nicht zytotoxisch für die Zellen ist [179,255,285].

Auch für den XTT-Test wurde ein Toxizitätstest durchgeführt, der die Modifikationen testen und die Parameter für den zeitlichen Ablauf der Hauptversuche definieren sollte[g].

Ebenfalls wurde durch die Verwendung einer parallelen Dreifachmessung versucht, die Fehlerquote der photometrischen Messung zu senken.

Zusammenfassend lässt sich urteilen, dass die parallele Verwendung der beiden Testverfahren, die in ihrer Grundidee, der enzymatischen Aktivitätsmessung ähnlich sind, gerade aus diesem Anlass eine ideale gegenseitige Ergänzung, vor allem im Bezug auf die Fragen dieser Arbeit, darstellen. Durch diese Möglichkeit der differenzierten Betrachtungsweise, ob zytosolische Enzyme oder mitochondriale Enzyme, ist auch eine differenzierte Aussage über die Kryokonservierung der Adipozyten im Bezug auf die abgelaufenen Schädigungen möglich.

[g] Vgl. Abb. 14: XTT-Toxizitätstest, Material und Methoden

6.5 GPDH

Die Bestimmung der freien Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase verfolgt ein ähnliches Ziel, wie die Färbung der Zellen; eine quantitative Aussage über die Zerstörung der Zellen im Verlauf der Kryokonservierung und dem sich anschließenden Auftauprozess. Da sich die Färbungen mit Trypanblau und FAD/EB zu diesem Zweck nur sehr eingeschränkt eignen [h], konnte durch die indirekte photometrische Bestimmung der freien GPDH-Menge eine Methode in den Versuchaufbau integriert werden, die qualitativ gute und replizierbare Rückschlüsse auf die Quantität der Zelldestruktion erlaubt. Die im Ergebnisteil der Arbeit dargestellten Werte sind die auf Basis einer Standardkurve errechneten Milliunits GPDH, die nach dem Auftauprozess im Überstand bestimmt werden konnten.

Die GPDH-Daten korrelieren mit den durchgeführten Zellfärbungen bzw. Zellzählungen, jedoch kann infolgedessen nicht der Rückschluss gezogen werden, dass das Zellfärbeverfahren qualitative Ergebnisse über die Vitalität humaner Adipozyten, nach einer Kryokonservierung, liefert.

Die Bestimmung der Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase, ist nicht nur ein guter Parameter des Differenzierungsgrades humaner Adipozyten [5,110-112,146,227,300], sondern eignet sich auch sehr gut zur quantitativen Analyse von Zellmembranschädigungen. Hierbei überwiegen vor allem die Vorteile dieses Testverfahrens, das trotz eines höheren Kostenniveaus und eines größeren Zeitaufwandes, im Bezug auf eine einzelne Messung, qualitativ bessere Aussagen über die Zellmembranzerstörung liefern kann, da es durch die Verwendung der photometrischen Messung objektiviert wird und weit weniger durch subjektive Einwirkungen des Untersuchenden beeinflusst werden kann. Desweiteren ermöglicht die GPDH-Bestimmung eine erweiterte quantitative Aussage über die Zellzerstörung. Diese Aussage beschränkt sich nicht nur auf die alleinige Information der Zellmembranverletzung, sondern enthält, im Vergleich zur Zellfärbung, auch eine Information über das Ausmaß der Zellmembranzerstörung, die durch die Kryokonservierung verursacht wurde. Dies bedeutet eine differenzierte Aussagemöglichkeit über den Typus der entstandenen Schäden; handelt sich um verhältnismäßig kleine Membranschäden, die in der Zellfärbung, bedingt durch die Methode, nicht weiter unterschieden werden können und somit zu einer Anfärbung führen, oder handelt es sich um eine großflächige Zellmembranauflösung, die mittels

[h] Vgl. Kapitel 6.1 Färbungen

des GPDH-Tests abgestufter betrachtet werden kann. Somit konnte, durch Etablierung des GPDH-Tests als indirekten Indikator für adipozytäre Zellmembranzerstörung, im Rahmen dieser Arbeit, ein Testverfahren etabliert werden, dass die Möglichkeit eröffnet, über die unterschiedlichen Schädigungsmechanismen, im Zusammenhang mit den verwendeten Konservierungstemperaturen und Kryoprotektiven, deutlich differenziertere Aussagen zu treffen, als dies bisher mit dem Zellfärbeverfahren möglich war.

Die parallele Verwendung dieser drei Testverfahren ermöglicht daher eine differenzierte Aussage über den Unterschied zwischen Zellvitalitätsminderung, respektive der zellulären Enzymaktivität und einer Zellzerstörung.

6.6 Lagerung ohne Kryokonservierung

Zur Vorbereitung bzw. um ein umfassenderes Bild von der Lagerungsfähigkeit humaner Adipozyten zu erhalten wurden Fettgewebsproben auch bei nicht kryobiologischen Bedingungen gelagert. Gewählt wurden die Temperaturstufen 04°C, 20°C und 37°C. Die Untersuchung erfolgte mittels des MTT- und XTT-Tests, alle 24 Stunden über einen Zeitraum von 7 Tagen.
Der zu beobachtende stetige Abfall der enzymatischen Aktivität, sowohl im MTT[i]- als auch XTT-Test[j], liegt in der nicht vorhandenen Versorgung der Zellen begründet. Im Gegensatz dazu sind die Differenzen zwischen den verschiedenen Lagerungstemperaturen, in einer, durch die Konservierungsbedingung verursachten, unterschiedlichen Stoffwechselaktivität zu suchen. Das bei 37°C im Zellkulturschrank aufbewahrte Fettgewebe verliert schon innerhalb der ersten 24 Stunden signifikant an Aktivität bzw. an Zellvitalität, verglichen mit den Proben, die bei 04°C oder 20°C gelagert wurden. Gleiches gilt für die Differenz zwischen den zuletzt genannten Bedingungen. Die geringere Zellvitalität der Probe, die durch einen temperaturbedingten höheren Stoffwechsel der Zellen mit einer höheren Rate an Zelluntergängen verbunden ist, drückt sich in einer verringerten enzymatischen Aktivität aus.

[i] Vgl. Abb. 36: MTT - Aktivitätsbestimmungen im Verlauf von 7 Tagen nach Lagerung des Fettgewebes bei 04°C, 20°C und 37°C
[j] Vgl. Abb. 37: XTT - Aktivitätsbestimmungen im Verlauf von 7 Tagen nach Lagerung des Fettgewebes bei 04°C, 20°C und 37°C

Interessant ist der anfängliche Verlauf der 20°C Proben, der innerhalb der ersten drei Tage sehr ähnlich dem Verlauf der 04°C Proben ist. Die verwendete Temperaturdifferenz von 16°C wird also erst nach 72 Stunden Lagerung bedeutsam; im Gegensatz zu der oben beschriebenen Temperaturdifferenz von 17°C (Differenz 20°C und 37°C). Zusammenfassend wird ein bekanntes Phänomen beschrieben; Gewebe bzw. Zellen, die bei Körper- oder Raumtemperatur gelagert werden, büßen schneller Vitalität ein, als Zellen die kühl (04°C) gelagert werden. Diese Erkenntnis wird nicht nur in der Medizin, besonders in der Transplantations- und Replantationsmedizin bzw. Onkologie mit der Hyperthermie-Therapie, sondern auch im alltäglichen Leben, in der Verwendung des Kühlschranks, praktisch angewandt.
Die Analyse der XTT-Test Ergebnisse zeigt im Gesamten ein vergleichbares Bild, mit stetigem Zellvitalitätsverlust im Verlauf des Beobachtungszeitraumes.
Jedoch werden erneut die unterschiedlichen Ansatzpunkte der beiden Tests deutlich. Der XTT-Test bezieht sich auf die im Zytosol befindlichen Enzyme, wohingegen das MTT-Formazansalz durch die Enzyme der Mitochondrien umgesetzt wird.
Der, im Vergleich zum MTT-Test, differente Verlauf kann durch die unterschiedliche Reihenfolge der Enzymschädigung begründet werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass die im Zytosol befindlichen Enzyme den Zustand der Mangelversorgung mit Nährstoffen länger tolerieren und in diesem Zusammenhang auch die Lagerung bei Körper- (37°C) und Raumtemperatur (20°C), einhergehend mit einer höheren Stoffwechselaktivität, für eine kurze Zeit besser tolerieren, als die mitochondrialen Enzyme.

6.7 Kryokonservierung ohne Kryoprotektiv

Eine der Hauptfragen dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen einer Kryokonservierung auf humane Adipozyten, vor allem Bezug nehmend auf die praktische Anwendung der Kryokonservierung von Fettgewebe und die anschließende Verwendung dieser Zellen.

Die einfachste und im ästhetisch-chirurgischen Einsatz einzige Variante in diesem Zusammenhang ist die Konservierung der Zellen ohne die Zugabe einer kryoprotektiven Substanz.

Bei der Analyse der Daten aus MTT[k]-, XTT[l]- und GPDH-Test[m] lassen sich folgende Fakten verdeutlichen:

In allen Testverfahren ist ein hochsignifikanter Zelluntergang innerhalb der ersten 48 Stunden nach Beginn der Kryokonservierung, sowohl bei einer Lagerungstemperatur von -20°C als auch bei -80°C, zu beobachten. Diese Ergebnisse bestätigen, die in der Einleitung beschriebenen Kenntnisse über die Zeitpunkte der Hauptschädigung von Zellen während der Kryokonservierung. Die für das Überleben der Zellen entscheidenden Ereignisse sind das Einfrieren [196], vor allem der Temperaturbereich zwischen -05°C und -15°C, und das Auftauen, bei dem die Zellen den gleichen Bereich ein weiteres Mal passieren [94]. Gleichfalls von Relevanz für die Erklärung des Zelluntergangs ist die von Mazur [197] beschriebene „Zwei-Faktoren-Theorie“[n] , welche zum einen die Veränderung der intrazellulären Salzkonzentration und zum anderen die intrazelluläre Eiskristallbildung als Ursache für eine Schädigung der Zelle beschreibt.

In der detaillierten Betrachtung der MTT-Ergebnisse lässt sich kein Unterschied zwischen der Lagerung bei -20°C und -80°C finden. In den Daten der XTT-Tests zeigt sich am Messpunkt 48 Stunden eine erste diskrete Differenz zwischen den Temperaturstufen, zu Gunsten der tieferen Lagerungstemperatur. Im Verlauf der weiteren Messungen egalisiert sich diese Beobachtung jedoch. Dies kann als ein erster Hinweis darauf gewertet werden, dass die Lagerung bei -80°C, im Vergleich

[k] Vgl. Abb. 41: Aktivitätsverlauf mit MTT über ein Jahr, ohne Kryoprotektiv, Vergleich der Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C

[l] Vgl. Abb. 44: Aktivitätsverlauf mit XTT über ein Jahr, ohne Kryoprotektiv, Vergleich der Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C

[m] Vgl. Abb. 47: Vergleich des Aktivitätsverlauf des freien GPDH über ein Jahr, ohne Kryoprotektiv, Vergleich der Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C

[n] Vgl. Abb. 7: „Zwei-Faktoren-Hypothese“ nach Mazur (1972)

zur Konservierung bei -20°C, einen geringen Vorteil gegenüber der Langzeitaufbewahrung dieser Zellen haben könnte.
Dieser Annahme hingegen widersprechen die Daten aus der GPDH-Analyse. Mit Beginn der Messpunkte nach 48 Stunden weicht der Verlauf der Kurven signifikant auseinander. Die bei -80°C konservierten Proben weisen eine signifikant höhere Zellmembranzerstörung auf als jene Proben, die bei -20°C konserviert wurden. Von Bedeutung könnte in diesem Zusammenhang die gewählte Kühlrate von 01°C/min sein. Erneut bezugnehmend auf die Theorie von Mazur, ist die verwendete Kühlrate ebenfalls von gewichtiger Bedeutung. Bei einer zu geringen Kühlrate bewirkt der einwirkende osmotische Gradient ein starkes Schrumpfen der Zelle und die im Zellinneren erreichte hohe Salzkonzentration führt zu irreversiblen Schädigungen der Zelle. Bei zu hohen Kühlraten verbleibt ein relativ hoher Wasseranteil in der Zelle, da der Zelle nicht genügend Zeit bleibt, den osmotischen Gradienten durch Wasserabgabe auszugleichen. Durch diesen hohen Wasseranteil besteht eine hochgradige Wahrscheinlichkeit für intrazelluläre Eisbildung, die ebenfalls zellschädigende Wirkung hat[o]. Beide Ereignisse führen zu Defekten in der Zellmembran, welche wiederum den Austritt von im Zytosol befindlichem Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase bedingen bzw. erklären können.

Abschließend müssen zwei Punkte angemerkt werden:
1. Eine präzisere Aussage zur Variation der Kühlrate kann im Rahmen dieser Arbeit, nicht getätigt werden und zur genaueren Analyse dieser Frage bedarf es weiterer kryobiologischer Untersuchungen.
2. Eine Kryokonservierung humaner Adipozyten mit dem beabsichtigten Ziel, nach einer Lagerung intakte und vitale Zellen zu erhalten, ohne die Verwendung eines Kryoprotektives, ist aus heutiger Sicht nicht möglich.

[o] Vgl. Abb. 8: Einfluss der Zeit, die einem Gewebe zum Ausgleich des osmotischen Gradienten zur Verfügung steht, auf die Zellüberlebensrate

6.8 Kryokonservierung mit Kryoprotektiv

Der Behauptung aus dem vorangegangenen Teilkapitel folgend, wurde versucht, durch die Zugabe kryoprotektiver Substanzen, die Überlebensrate und Vitalität der Zellen zu steigern.

6.8.1 Kontrolle versus Hydroxyethylstärke

Die erste gegen die Kontrolle (I) getestete Substanz ist die Hydroxyethylstärke (II), ein makromolekulares, extrazellulär wirksames, nicht toxisches Kryoprotektiv [151].
Der Vergleich der beiden Bedingungen mittels des MTT-Test bei -20°C[p] und -80°C[q] zeigt bezüglich einer verbesserten Überlebensrate keine Signifikanz. In den zugehörigen XTT-Tests[r,s] lässt sich zwar ein geringgradiger Vorteil zu Gunsten des Kryoprotektives ausmachen, jedoch ist dieser nicht signifikant. Nur in den Daten der GPDH-Messungen[t,u] zeigt sich eine signifikante Differenz zwischen der Kontrolle und der verwendeten Hydroxyethylstärke. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in einem Vitalitätsvorteil nach einem Jahr Kryokonservierung wider, der beim MTT-Test lediglich 3,28% und im XTT-Test 3,73% für die Hydroxyethylstärke beträgt. Der Integritätsvorteil, der durch die GPDH-Bestimmung ermittelt wurde, beträgt 13,23%.
Erklären lassen sich diese Ergebnisse bei einer erneuten Betrachtung der Wirkungsweise der Hydroxyethylstärke; es handelt sich um ein extrazelluläres Kryoprotektiv, das die physio-chemischen Eigenschaften der Lösung verändert. Vor allem die Viskosität, die Devitrifikation, der glasförmige Übergang [87], die mikroskopische Morphologie, die Kapazität Wasser zu binden, der Schutz vor Eiskristall-Bildung, die Löslichkeit, der osmotische Druck und die Interaktion mit biologischen Membranen [281,282].
Bezogen auf die Resultate der oben genannten Tests kann davon ausgegangen werden, dass die Hydroxyethylstärke die Adipozyten, im Vergleich zur Kontrolle, in

[p] Vgl. Abb. 81: Vergleich von Kontrolle (I) und Hydroxyethylstärke (II) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C
[q] Vgl. Abb. 82: Vergleich von Kontrolle (I) und Hydroxyethylstärke (II) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C
[r] Vgl. Abb. 83: Vergleich von Kontrolle (I) und Hydroxyethylstärke (II) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C
[s] Vgl. Abb. 84: Vergleich von Kontrolle (I) und Hydroxyethylstärke (II) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C
[t] Vgl. Abb. 85: Vergleich von Kontrolle (I) und Hydroxyethylstärke (II) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C
[u] Vgl. Abb. 86: Vergleich von Kontrolle (I) und Hydroxyethylstärke (II) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C;

einem gewissen Maß vor einer Zellmembranzerstörung schützt, auf die in der Zelle ablaufenden Schädigungsmechanismen an den Zellkernen, Mitochondrien und Enzymen jedoch keinen Einfluss hat.

Ein direkter Vergleich der beiden Konservierungstemperaturen zeigt im XTT-Test[v] einen signifikanten Unterschied zu Gunsten einer Lagerung bei -80°C und in der GPDH-Messung[w] einen hochsignifikanten Unterschied zu Ungunsten derselben Temperatur. Der MTT-Test[x] zeigt diesbezüglich keine signifikante Aussage. Die kältere Konservierungstemperatur bedeutet also auf der einen Seite eine höhere Zellvitalität nach dem Auftauen, vermutlich bedingt durch ein noch stärkeres Herabsetzen des zellulären Stoffwechsels im Vergleich zur Lagerung bei -20°C, auf der anderen Seite eine hochgradigere Zerstörung der zellulären Doppellipidmembran.

6.8.2 Kontrolle versus Glycerin

Der Vergleich der Kontrolle (I) mit Glycerin (III), bedeutet den Wechsel in eine andere Kryoprotektivklasse. Glycerin gehört zu den niedermolekularen und damit intrazellulär wirkenden Protektiven.

Die Aufgliederung der Messergebnisse zeigt, in allen Testverfahren, einen hochsignifikanten Unterschied zwischen beiden Beobachtungseinheiten.

Der MTT-Test[y,z] belegt über den gesamten Verlauf des Versuchszeitraums eine hochsignifikante Differenz bezüglich der gemessenen mitochondrialen Aktivität. Erneut ist zwischen den beiden Konservierungstemperaturen keine Signifikanz erkennbar[aa].

Im XTT-Test stellt sich ebenfalls, die soeben beschriebene hochsignifikante Differenz dar. Das bedeutet nach einem Jahr Kryokonservierung mit Glycerin einen Vitalitätsvorteil im MTT-Test von 83,60% und im XTT-Test von 34,47%; die Messung

[v] Vgl. Abb. 118: Vergleich von Kontrolle (I), Hydroxyethylstärke (II), Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit Hilfe der XTT-Messung bei Konservierungstemperaturen von -20°C und -80°C

[w] Vgl. Abb. 119: Vergleich von Kontrolle (I), Hydroxyethylstärke (II), Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit Hilfe der GPDH-Bestimmung bei Konservierungstemperaturen von -20°C und -80°C

[x] Vgl. Abb. 117: Vergleich von Kontrolle (I), Hydroxyethylstärke (II), Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit Hilfe der MTT-Messung bei Konservierungstemperaturen von -20°C und -80°C

[y] Vgl. Abb. 87: Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin (III) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C

[z] Vgl. Abb. 88: Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin (III) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C

[aa] Vgl. Abb. 117: Vergleich von Kontrolle (I), Hydroxyethylstärke (II), Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit Hilfe der MTT-Messung bei Konservierungstemperaturen von -20°C und -80°C

der freien GPDH ergibt einen Vorteil von 39,41%, gegenüber der Kontrolle. Im Vergleich zum MTT-Test findet sich jedoch abermals im XTT-Test ein geringerer Differenzwert zwischen den beiden untersuchten Probengruppen. Hier muss davon ausgegangen werden, dass dies erneut in einer differenten Wirkung der Kryokonservierung auf die mitochondrialen Enzyme bzw. Mitochondrien (MTT-Test) selbst und die zytosolischen Enzyme (XTT-Test) begründet liegt. Weitere Gründe hierfür können sein:

1. Die Struktur der im Zytosol befindlichen Enzyme ist, verglichen mit den mitochondrialen Enzymen, stabiler.
2. Die zytosolischen Enzyme sind durch den hohen Lipidanteil der Adipozyten besser vor Schäden durch die Kryokonservierung geschützt.
3. Die Mitochondrien werden durch die Kryokonservierung zerstört und die dort ansässigen Enzyme ebenfalls bzw. sie verlieren ihre Funktionsfähigkeit.

Der Vergleich der Temperaturstufen zeigt im XTT-Test erneut eine signifikante Differenz. Dies weist daraufhin, dass die mitochondrialen Enzyme im Verlauf einer Kryokonservierung, eine Lagerung bei -80°C[bb], im Bezug auf die postkryotische Vitalität, besser tolerieren, als die bei -20°C[cc] konservierten Proben. Die Erklärung hierfür dürfte wieder in der deutlich stärkeren Absenkung des Zellstoffwechsels während der Kryokonservierung bei -80°C zu finden sein. Denn den Schädigungsmechanismen durch den Einfrierprozess, die Passsage der kritischen Punkte zwischen -05°C und -15°C, sind beide Gruppen, sowohl die Glycerin-Gruppe bei -20°C als auch die Glycerin-Gruppe bei -80°C ausgesetzt. Die signifikante Differenz gründet sich also hauptsächlich auf die endgültige Lagerungstemperatur.
Die Grundlage für diese Ergebnisse, des Vergleichs mit Glycerin, ist in der Wirkung desselben zu suchen. Die Literatur beschreibt als Effekt eine Gefrierpunktserniedrigung [175,176], durch die zellschädigende Salzkonzentrationen erst bei niedrigeren Temperaturen erreicht werden, und die Zelle weniger schrumpft [195]. Zudem wird die Salzkonzentration in der noch nicht erstarrten Restlösung

[bb] Vgl. Abb. 89: Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin (III) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C
[cc] Vgl. Abb. 90: Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin (III) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C

herabgesetzt [311]. Die Verlangsamung der Eiskristallisationskinetik setzt die Wahrscheinlichkeit für intrazelluläre Eisbildung herab.
Ein weiterer Effekt der niedermolekularen Kryoprotektive soll die Stabilisierung der Zellmembran sein [120]. Dies jedoch kann durch die Resultate der GPDH-Messung in Frage gestellt werden. Denn entgegen der Ergebnisse aus den XTT-Tests, weisen die Daten der GPDH-Bestimmung darauf hin, dass durch eine Konservierung bei -80°C[dd] mehr Zellen ihre Integrität verlieren.

6.8.3 Kontrolle versus Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidon

Die dritte, gegen die Kontrolle (I), getestete Variante (IV) bestand aus drei kryoprotektiven Komponenten. Glycerin, als intrazellulär wirkendes Kryoprotektiv, sowie Dextran und Polyvinylpyrrolidon als extrazelluläres Protektiv.
Der MTT-Test[ee] zeigt erneut einen hochsignifikanten Unterschied an, der sich allerdings nur auf die Proben-Gruppen und nicht auf eine Signifikanz zwischen den Temperaturstufen[ff] bezieht.
Im XTT-Test[gg] findet sich ebenfalls eine hochsignifikante Differenz zwischen den beiden getesteten Substanzen. Im Vergleich zum MTT-Test zeigt der XTT-Test allerdings eine Signifikanz zu Gunsten der Lagerung bei -80°C[hh].
Identische Ergebnisse finden sich bei der GPDH-Messung im Bezug auf die Auswirkungen der Kryoprotektivmischung. Dagegen zeigt sich im Vergleich der Konservierungstemperaturen ein abweichendes Resultat. Erneut zeigt sich in der Bestimmung der freien GPDH eine Tendenz, die die Ergebnisse aus den vorangegangenen Versuchen bestätigt; bei einer Lagerungstemperatur von -80°C[ii] werden mehr Zellmembranen zerstört, als in der zu vergleichenden Probe, die bei -20°C[jj] gelagert wurde. Dies spricht für weitere destruktive Vorgänge im Verlauf der

[dd] Vgl. Abb. 92: Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin (III) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C
[ee] Vgl. Abb. 93: Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C
[ff] Vgl. Abb. 94: Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C
[gg] Vgl. Abb. 95: Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C
[hh] Vgl. Abb. 96: Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C
[ii] Vgl. Abb. 97: Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C
[jj] Vgl. Abb. 98: Vergleich von Kontrolle (I) und Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C

Temperaturerniedrigung von -20°C auf -80°C beziehungsweise wird erneut deutlich, dass die Enzyme der Adipozyten durch die tiefere Lagerungstemperatur weniger Schaden nehmen und im Gegenteil die Lagerungsperiode vitaler überstehen. Die Zellmembran hingegen wird durch den Vorgang der Kryokonservierung irreversibel geschädigt.

Nach einem Jahr hat die Protektiv-Mischung einen Vitalitätsvorteil von 91,25% im MTT-Test, von 62,60% im XTT-Test und in der Bestimmung der Zellmembranintegrität einen Vorteil von 57,52%, im Vergleich zur Kontrolle.

Die Erklärung für die gute Wirksamkeit des verwendeten Kryoprotektives dürfte in seiner Zusammensetzung aus drei einzelnen Komponenten zu finden sein.

Die Polyvinylpyrrolidone sind eine der gebräuchlichsten Polymergruppen der Medizin, da sie die Eigenschaften Wasserlöslichkeit und geringe Toxizität vereinen [122,173]; derzeit sind sie, für die Verwendung in vivo, jedoch ungeeignet, da sie nur schwer aus den Zellsuspensionen zu entfernen sind [129,185].

Die nicht-permeierenden, extrazellulären Kryoprotektive können die Zellmembraneigenschaften ändern [194]. Diese sollen durch die Zugabe der Additive permeabler für gelöste Stoffe werden, so dass die osmotischen Zellreaktionen reduziert werden [203,204]. Zudem bewirken die Additive, ähnlich wie die niedermolekularen Additive, eine Herabsetzung der extrazellulären Salzkonzentration. Die Erhöhung der Lösungsviskosität vermindert das Diffusionsvermögen, was ebenfalls die Schrumpfung der Zellen während der Eisbildung herabsetzt. Zudem haben die Makromoleküle absorptive Eigenschaften [150,151], die so einen Teil des Wassers am Kristallisieren hindern [81,83]. Ein weiterer Mechanismus beruht auf einer potentiellen Membran- und Proteinstabilisierung [119,290].

Glycerin, wie schon zuvor beschrieben, hat den Effekt einer Gefrierpunktserniedrigung [175,176]. Die daraus resultierende Verlangsamung der Eiskristallisationskinetik setzt die Wahrscheinlichkeit für eine intrazelluläre Eisbildung herab[311].

Die gemeinsame Verwendung eines intrazellulär (Glycerin[128]) und zweier extrazellulär (Dextran [105] und PVP [185]) wirkenden Protektive bedeutet offensichtlich auch die Kumulation deren kryoprotektiven Eigenschaften.

6.8.4 Hydroxyethylstärke versus Glycerin

Der Vergleich dieser beiden Proben-Gruppen ist in dieser Arbeit der erste direkte Vergleich eines extrazellulären Protektives mit einem intrazellulär wirkenden Kryoprotektiv.

Die Resultate der MTT-Tests[kk] zeigen einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Der XTT-Test[ll] bestätigt diese Messergebnisse.

Die Bestimmung der freien Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase[mm] zeigt ebenfalls eine hochsignifikante Differenz zwischen der HES-Gruppe und der Glycerin-Gruppe.

Im Rahmen einer Verwendung von HES und Glycerin als Kryoprotektiv bei der Konservierung von humanen Adipozyten liegt der Vorteil deutlich auf der Seite des intrazellulär wirkenden Glycerins; begründet werden die protektiven Eigenschaften des permeierenden Glycerins vor allem mit einer Gefrierpunktserniedrigung [175,176] sowie der Tatsache, dass eine zellschädigende Salzkonzentrationen erst bei niedrigeren Temperaturen erreicht wird und die Zelle dadurch einem geringeren Schrumpfungsprozess unterworfen ist [195]. Die beschriebenen Eigenschaften der Hydroxyethylstärke sind vor allem die Veränderung der Viskosität, die Devitrifikation, der glasförmige Übergang [87], die Kapazität Wasser zu binden, der Schutz vor Eiskristall-Bildung und die Interaktion mit biologischen Membranen [281,282].

Bei der Kryokonservierung der humanen Fettzelle scheint die Eigenschaft der Gefrierpunktserniedrigung den Wirkungen der Hydroxyethylstärke hochsignifikant überlegen.

Nach einem Jahr Kryokonservierung weisen die Proben der Glycerin-Gruppe im MTT-Test einen Vitalitätsvorteil von 84,14% und im XTT-Test von 31,39% auf; in der GPDH-Bestimmung ist 30,26% weniger freies GPDH nachweisbar. Inwiefern diese Dominanz nur in der Wirkungsweise der intra- bzw. extrazellulären Kryoprotektive begründet liegt, oder ob die Hydroxyethylstärke zur Verwendung bei der Konservierung humaner Adipozyten grundsätzlich ungeeignet ist, lässt sich anhand der durchgeführten Analysen nicht beurteilen.

[kk] Vgl. Abb. 99: Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Glycerin (III) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C

[ll] Vgl. Abb. 101: Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Glycerin (III) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C

[mm] Vgl. Abb. 103: Vergleich von Hydroxyethylstärke (II) und Glycerin (III) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C

6.8.5 Hydroxyethylstärke versus Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidon

Den vorangegangenen Beobachtungen folgend, kann kein anderes Ergebnis erwartet werden, als eine hochsignifikante Differenz der beiden Proben-Gruppen.
Die Vitalität der mitochondrialen Enzyme, gemessen mit dem MTT-Test zeigt einen hochsignifikanten Unterschied zwischen dem einzelnen extrazellulären Kryoprotektiv und der Mischung aus intra- und extrazellulären Protektiven. Gleiches gilt für den XTT-Test. Die Vitalität der im Zytosol befindlichen Enzyme ist in der Protektiv-Mischung hochsignifikant höher, als in der HES-Gruppe.
Die Analyse der freien GPDH-Menge ergibt ein analoges Resultat. Die Kryoprotektivmischung schützt die Membran der humanen Adipozyten deutlich besser gegen die Schädigungen durch die Konservierung als die zu vergleichende HES.
Dies bedeutet im MTT-Test einen Vitalitätsvorteil von 91,54%, im XTT-Test von 60,85% und in der Messung der freien GPDH einen Zellintegritätsvorteil von 51,03% für die Zellen, die mit der Protektiv-Mischung kryokonserviert wurden, verglichen mit der HES-Gruppe.
Der zuvor beschriebene Effekt der Wirkungs-Kumulation[nn] der in der Mischung verwendeten Kryoprotektive darf hier erneut als ein Grund für das Ergebnis angeführt werden.
Desweiteren darf an dieser Stelle auf die Beobachtungen des direkten Vergleichs der Protektive Hydroxyethylstärke und Glycerin hingewiesen werden[oo], in denen bei allen Tests eine hochsignifikante Differenz zu Gunsten des Glycerins darstellbar ist.

[nn] siehe Kapitel 6.8.3: Kontrolle versus Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidone
[oo] siehe Kapitel: 6.8.4 Hydroxyethylstärke versus Glycerin

6.8.6 Glycerin versus Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidon

Im letzten logischen Schritt fehlt noch der Vergleich zwischen Glycerin und der Glycerin enthaltenden Protektiv-Mischung.

Der MTT-Test bestätigt die Annahme des vorausgegangenen Vergleichs, nach dem eine Protektiv-Mischung aus intra- und extrazellulären Protektiven einer Einzellösung überlegen ist. Sowohl im Vergleich der Proben-Gruppen bei einer Lagerungstemperatur von -20°C [pp] als auch bei -80°C [qq] findet sich ein hochsignifikanter Unterschied. Analog hierzu sind die Ergebnisse des XTT-Tests[rr]; in beiden Testbedingungen [ss] findet sich im jeweiligen Gruppenvergleich eine hochsignifikante Diskrepanz in der Zellvitalität.

Der Abgleich der Daten aus der GPDH-Messung[tt] ist gleichfalls in Bezug auf die Differenz zwischen Glycerin und der Protektiv-Mischung hochsignifikant.

Durch diesen direkten Vergleich der Einzellösung mit Glycerin und einer Protektiv-Mischung mit Glycerin wird die Hypothese der Kumulativwirkung deutlich gestärkt, denn die Mischung ist hochsignifikant effektiver als die Verwendung einer Einzellösung.

Im MTT-Test liegt der Vitalitätsvorteil für die Protektiv-Mischung nach einem Jahr bei 46,63%, im XTT-Test bei 42,41% und in der Bestimmung der freien Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase zeigt sich ein Vorteil in der Zellintegrität von 29,78%.

[pp] Vgl. Abb. 111: Vergleich von Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C

[qq] Vgl. Abb. 112: Vergleich von Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der MTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C

[rr] Vgl. Abb. 113: Vergleich von Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C

[ss] Vgl. Abb. 114: Vergleich von Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der XTT-Messung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -80°C

[tt] Vgl. Abb. 115: Vergleich von Glycerin (III) und Dextran, Glycerin und Polyvinylpyrrolidonen (IV) mit der GPDH-Bestimmung über ein Jahr; Konservierungstemperatur -20°C

6.9 Abschließende Beurteilung

Wie aus der vorangegangenen Analyse ersichtlich wurde, kann eine Kryokonservierung humaner Adipozyten, ohne die Verwendung eines geeigneten Kryoprotektives, weder empfohlen, noch in irgendeiner Weise als medizinisch sinnvoll und verwertbar eingestuft werden. Im Gegenteil, es scheint gerade zu fahrlässig, kryokonservierte Fettzellen, die nach den Ergebnissen dieser Arbeit weder vital noch in ihrer Integrität intakt sind, für eine Transplantation zu verwenden. Der in der Literatur beschriebene Augmentationseffekt durch eine Injektion kryokonservierten Fettes [134,274] ist primär nicht durch die Transplantation lebensfähiger Adipozyten zu erklären, sondern viel eher durch das Einbringen des durch die Kryokonservierung entstandenen Zelldetritus und der freien Lipide in den Körper des Patienten. Das in der Literatur beschriebene dauerhaftere Augmentationsergebnis [266,291] dieser Methode gründet sich ebenfalls auf diese Fakten. Die Zellreste und Lipide werden durch den Organismus nur teilweise abtransportiert, der Rest unterliegt einer Abkapselung, die für den Augmentationseffekt verantwortlich ist.

Dies widerspricht jedoch erheblich jenen für die autologe Fetttransplantation angeführten Vorteilen sowie jeglicher Form des verantwortungsvollen Handelns in der Medizin.

Die verwendeten MTT- und XTT-Tests sowie die Bestimmung der freien Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase haben sich gänzlich als verwendbar und sinnvoll erwiesen. Besonders zu betonen ist zum einen die doppelte Vitalitätsprüfung, durch die eine differenzierte Analyse der mitochondrialen und zytosolischen Enzyme, im Bezug auf die Auswirkungen der Kryokonservierung, möglich war.

Ebenfalls hervorzuheben ist die GPDH-Bestimmung, durch die eine erweiterte quantitative Aussage über die Zellmembranzerstörung möglich wurde. Die Aussage dieses Testverfahrens beschränkt sich nicht nur auf die alleinige Information der Zellmembranverletzung, sondern enthält, im Vergleich zur Zellfärbung, auch eine Information über das Ausmaß der Zellmembranzerstörung, die durch die Kryokonservierung verursacht wurde; dies gestattet eine abgestuftere Aussage über den Typus der entstandenen Schäden. Damit konnte, durch Etablierung des GPDH-Tests als indirekten Indikator für adipozytäre Zellmembranzerstörung im Rahmen dieser Arbeit ein Testverfahren etabliert werden, das die Möglichkeit eröffnet, über

die unterschiedlichen Schädigungsmechanismen, im Zusammenhang mit den verwendeten Konservierungstemperaturen und Kryoprotektiven, deutlich differenziertere Aussagen zu treffen, als dies bisher mit dem Zellfärbeverfahren möglich war.
Lediglich die Färbung der Zellen mit Trypanblau und FAD/EB hat sich als eingeschränkt durchführbar und verwendbar dargestellt.

Der zweite Teil dieser Arbeit bestand in der Suche nach einem geeigneten Kryoprotektiv, mit dessen Hilfe eine erfolgreichere Kryokonservierung möglich wäre, beziehungsweise zumindest die Überlebensrate der Zellen gesteigert werden könnte. Die Wahl fiel auf ein extrazellulär (HES) und ein intrazellulär (Glycerin) wirkendes Protektiv sowie eine Kryoprotektivmischung aus einem niedermolekularen (Glycerin) und zwei makromolekularen (Dextran, PVP) Additiven.
Die oben aufgeführten detaillierten Analysen berücksichtigend, kann festgehalten werden, dass die verwendete Protektiv-Mischung eindeutig die qualitativ besten Resultate aller getesteten Protektive liefert. Den geringsten Vorteil im Vergleich zur Kontrolle, als auch im Vergleich zu den anderen Protektiven, erbringt die Verwendung von Hydroxyethylstärke, die als Einzelprotektiv in der Anwendung mit humanen Adipozyten keinen Sinn zu ergeben scheint.
Glycerin als Protektiv hingegen erbringt in der Einzelverwendung einen hochsignifikanten Vorteil gegenüber einer Nicht-Verwendung von Kryoprotektiven.
Wie schon in der vorangegangenen Diskussion festgehalten, führt die Verwendung der Protektiv-Mischung zu den besten Ergebnissen. Verglichen mit der Kontrolle sind die Zellen der Protektiv-Mischung um 91,25% bzw. 89,30% (MTT, -20°C und -80°C) und 62,60% bzw. 60,94% (XTT, -20°C und -80°C) vitaler. Bezogen auf die Zellintegrität liegt der Vorteil bei 57,52% (-20°C) und 54,80% (-80°C). Im direkten Vergleich mit den frischen Proben, konnten folgende Vergleichsvitalitäten ermittelt werden: im MTT-Test von 30,40% (-20°C) und 30,57% (-80°C), im XTT-Test von 49,41 (-20°C) und 51,28% (-80°C) und in der GPDH-Bestimmung konnte eine Verringerung auf 278,99% (-20°C) bzw. 414,72% (-80°C), nachgewiesen werden.
Zusammengefasst bedeutet dies, bei Verwendung der Protektiv-Mischung, eine Verringerung der Zellintegritätsverluste, durch die Kryokonservierung, um ca. 50% und eine Vitalitätserhaltung der kryokonservierten Zellen, die im MTT-Test ca. 30% und im XTT-Test ca. 60% beträgt.

In näherer Zukunft wäre zu untersuchen, welche Kryoprotektive ein besseres Ergebnis liefern und inwiefern die Veränderung und genauere Steuerung der Kühlrate einen Einfluss auf das Überleben humaner Adipozyten hat. Hierbei ist besonders zwischen Zellvitalitätsverlust und Zellzerstörung (Zellintegritätsverlust) zu unterscheiden. Wie die Ergebnisse zeigen, muss zwischen der Verringerung der enzymatischen Aktivität der Adipozyten und dem Verlust der gesamten Zellintegrität unterschieden werde. Besonders deutlich wird dies bei Vergleich der beiden Temperaturstufen. Die Lagerung bei -80°C führt zwar zu einem leicht höheren Zellintegritätsverlust (GPDH-Messung) als die Konservierung bei -20°C, jedoch sind die Resultate im Bezug auf die enzymatische Aktivität (MTT- und XTT-Tests) gegenteilig. Die Aktivität der mitochondrialen und zytosolischen Enzyme kann durch eine Lagerung bei -80°C besser konserviert werden, als in den vergleichenden Proben bei -20°C.

Zu berücksichtigen ist weiterhin, dass eine praktische Anwendung in der Medizin derzeit ausgeschlossen ist, da durch die Verwendung eines Kryoprotektivs mit humanen Zellen ein Medizinprodukt entsteht, das zulassungspflichtig ist.

7 Zusammenfassung

Die autologe Transplantation kryokonservierter humaner Adipozyten ist in der Plastischen Chirurgie seit Jahren übliche Praxis. Inwiefern diese Zellen jedoch zum Zeitpunkt der Transplantation über eine Vitalität und vollständige Integrität ihrer Membran verfügen, darüber gibt es bisher keine Aussagen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe eines enzymbasierten Testsystems, eine quantitative Aussage über die Zellvitalität und die Zellintegrität adulter humaner Adipozyten machen zu können. Hierfür wurden die bestehenden MTT-, XTT- und GPDH-Tests zur Verwendung mit humanen Adipozyten modifiziert.

Zum Schutz der Zellen während einer Kryokonservierung sind in der Naturwissenschaft Kryoprotektive eine gebräuchliche Substanzgruppe. Für die vorliegende Arbeit wurde Hydroxyethylstärke, Glycerin und eine Mischung aus Glycerin, Dextran und Polyvinylpyrrolidon verwendet.

Die Zellaktivität und die Zellintegrität wurden jeweils vor der Kryokonservierung, die parallel bei einer Temperatur von -20°C und -80°C erfolgte, und nach 2, 7 und 14 Tagen sowie nach 1, 6 und 12 Monaten gemessen.

Als Zwischenergebnis konnte festgestellt werden, dass eine Kryokonservierung humaner Fettzellen ohne Kryoprotektiv, nach 48 Stunden, zu einem Vitalitätsverlust von 94,9% (MTT-Test, -20°C) und nach einem Jahr, zu einem Vitalitätsverlust von ca. 97,4% (MTT-Test -20°C) führt. Vergleichbare Ergebnisse finden sich auch in den XTT- und GPDH-Tests sowie bei einer Lagerungstemperatur von -80°C.

Die Verwendung der gewählten Kryoprotektive konnte diesen Vitalitätsverlust und die durch den GPDH-Test messbare Zellmembranschädigung verringern. Das beste Ergebnis wurde hierbei mit der Protektiv-Mischung erzielt. Es konnte eine Steigerung der Zellvitalität, nach Kryokonservierung und einem Lagerungszeitraum von einem Jahr, von ca. 30% im MTT-Test, von ca. 60% im XTT-Test und eine Verringerung der Zellintegritätsverluste im GPDH-Test von ca. 50%, nachgewiesen werden.

Zusammengefasst:

1. Ein Einsatz kryokonservierter humaner Adipozyten ohne die Verwendung eines Kryoprotektivs sollte nicht Gegenstand einer praktischen Anwendung in der Medizin sein.

2. Durch die Zugabe einer kryoprotektiven Substanz kann die Vitalität und Integrität humaner Adipozyten, im Vergleich zu einer Nichtverwendung, hochsignifikant verbessert werden.

3. Als Kryoprotektiv hat sich die Verwendung einer Mischung aus einem intrazellulären (Glycerin) und zwei extrazellulären (Dextran und Polyvinylpyrrolidonen) Protektiven, als geeignet dargestellt.

8 Literaturverzeichnis

1. **Acker, J. P., and McGann, L. E.:** Intracellular ice, membrane damage, and cell viability. *Cryobiology,* 37: 408, 1998.

2. **Adams, M. et al.:** Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest,* 100(12): 3149-53, 1997.

3. **Alexander, R. W.:** Guidlines for Autologous Fat Transfer. In *Autologous Fat Transplantation*, pp. 23-30. Edited by Shiffman, M. A., 23-30, New York, Basel, Marcel Dekker, Inc., 2001.

4. **Alkek, D. S.:** Lipofilling Acne Scars. In *Autologous Fat Transplantation*, pp. 243-259. Edited by Shiffman, M. A., 243-259, New York, Basel, Marcel Dekker, Inc., 2001.

5. **Aprath-Husmann, I.; Rohrig, K.; Gottschling-Zeller, H.; Skurk, T.; Scriba, D.; Birgel, M.; and Hauner, H.:** Effects of leptin on the differentiation and metabolism of human adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord,* 25(10): 1465-70, 2001.

6. **Ashley, F. L.; Thompson, D. P.; and Henderson, T.:** Augmentation of surface contour by subcutaneous injections of silicone fluid. A current report. *Plast Reconstr Surg,* 51(1): 8-13, 1973.

7. **Ashwood-Smith, M. J., and Warby, C.:** Studies on the molecular weight and cryoprotective properties of polyvinylpyrrolidone and dextran with bacteria and erythrocytes. *Cryobiology,* 8(5): 453-64, 1971.

8. **Aufses, A. H.:** Obliteration of chronic empyema cavity with aid of free fat transplant. *J Mt Sinai Hosp,* 10: 283, 1943.

9. **Badum, H.:** Ueber Dauerheilung durch Fettautoplastik bei Arachnitis adhaesiva spinalis und Psammon der Dura spinalis. *Zentralbl Neurochir,* 4: 102, 1939.

10. **Bambang, L. S.; Mazzucotelli, J. P.; Moczar, M.; Beaujean, F.; and Loisance, D.:** Effects of cryopreservation on the proliferation and anticoagulant activity of human saphenous vein endothelial cells. *J Thorac Cardiovasc Surg,* 110(4 Pt 1): 998-1004, 1995.

11. **Barraquez, J.:** Enucleation con ingerto de tejido adiposo en capsula de Tenon. *Arch Soc Oftal,* 1: 1901, 1914.

12. **Bartels, M.:** Verpflanzung von Fett in die Tenon´sche Kapsel zur Erzielung eines guten Stumpfes nach Enucleatio bulbi. pp. 333. Edited, 333, Heidelberg, Versamml Dtsch Ophth Gesellsch, 1908.

13. **Beaujean, F.; Bourhis, J. H.; Bayle, C.; Jouault, H.; Divine, M.; Rieux, C.; Janvier, M.; Le Forestier, C.; and Pico, J. L.:** Successful cryopreservation of

purified autologous CD34+ cells: influence of freezing parameters on cell recovery and engraftment. *Bone Marrow Transplant,* 22(11): 1091-6, 1998.

14. **Bennett, A. B.:** Cure of mastoid fistula with fat graft: Report of a case. *M Ann District of Columbia,* 2: 117, 1933.

15. **Berdeguer, P.:** Five Years of Experience Using Fat for Leg Contouring. *The American Journal of Cosmetic Surgery,* 12(3): 221-229, 1995.

16. **Berini Gimenez, E.:** Fatty tissue graft in total petromastoid removal findings, results and statistics. *Acta Otorinolar Iber Amer (Barcelona),* 8: 620, 1957.

17. **Berridge, M. V.; Herst, P. M.; and Tan, A. S.:** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev,* 11: 127-52, 2005.

18. **Bertossi, D.; Zancanaro, C.; Trevisiol, L.; Albanese, M.; Ferrari, F.; and Nocini, P. F.:** Lipofilling of the lips: ultrastructural evaluation by transmission electron microscopy of injected adipose tissue. *Arch Facial Plast Surg,* 5(5): 392-8, 2003.

19. **Bier, A.:** In *Transplantation of Tissues*, pp. 194. Edited by Peer, L. A., 194, Baltimore, William&Wilkins, 1955-1959.

20. **Bircoll, M.:** Autologous fat transplantation. *Plast Reconstr Surg,* 79(3): 492-3, 1987.

21. **Bircoll, M.:** Cosmetic breast augmentation utilizing autologous fat and liposuction techniques. *Plast Reconstr Surg,* 79(2): 267-71, 1987.

22. **Bircoll, M., and Novack, B. H.:** Autologous fat transplantation employing liposuction techniques. *Ann Plast Surg,* 18(4): 327-9, 1987.

23. **Bolinder, J.; Engfeldt, P.; Ostman, J.; and Arner, P.:** Site differences in insulin receptor binding and insulin action in subcutaneous fat of obese females. *J Clin Endocrinol Metab,* 57(3): 455-61, 1983.

24. **Bolinder, J.; Kager, L.; Ostman, J.; and Arner, P.:** Differences at the receptor and postreceptor levels between human omental and subcutaneous adipose tissue in the action of insulin on lipolysis. *Diabetes,* 32(2): 117-23, 1983.

25. **Bolinder, J.; Ostman, J.; and Arner, P.:** Influence of aging on insulin receptor binding and metabolic effects of insulin on human adipose tissue. *Diabetes,* 32(10): 959-64, 1983.

26. **Borel Rinkes, I. H.; Toner, M.; Sheeha, S. J.; Tompkins, R. G.; and Yarmush, M. L.:** Long-term functional recovery of hepatocytes after cryopreservation in a three-dimensional culture configuration. *Cell Transplant,* 1(4): 281-92, 1992.

27. **Boschert, M. T.; Beckert, B. W.; Puckett, C. L.; and Concannon, M. J.:** Analysis of lipocyte viability after liposuction. *Plast Reconstr Surg,* 109(2): 761-5; discussion 766-7., 2002.

28. **Bourne, W. M.; Shearer, D. R.; and Nelson, L. R.:** Human corneal endothelial tolerance to glycerol, dimethylsulfoxide, 1,2-propanediol, and 2,3-butanediol. *Cryobiology,* 31(1): 1-9, 1994.

29. **Braeckman, B. P.; Houthoofd, K.; De Vreese, A.; and Vanfleteren, J. R.:** Assaying metabolic activity in ageing Caenorhabditis elegans. *Mech Ageing Dev,* 123(2-3): 105-19, 2002.

30. **Brandow, K., and Newman, J.:** Facial multilayered micro lipo-augmentation. *Int J Aesthetic Restor Surg,* 4(2): 95-110, 1996.

31. **Braun, H.:** Über den Verschluss eines perforirten Magengeschwurs durch Netz. *Centralbl Chir Leipz,* 24: 739, 1897.

32. **Bright, R. M.; Thacker, H. L.; and Brunner, R. D.:** Fate of autogenous fat implants in the frontal sinuses of cats. *Am J Vet Res,* 44(1): 22, 1983.

33. **Bugbee, W. M., and Kernkamp, M. F.:** An improved method for the longterm preservation of Naegleria gruberi. *Cryo Letters,* 14: 2349-354, 1993.

34. **Caforio, L.:** I trapianti liberi di adipe quali mezzi di obliterazione della cavita osteomielitiche. *Policlinico,* 24: 490, 1917.

35. **Campfield, L. A.; Smith, F. J.; and Burn, P.:** The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res,* 28(12): 619-32, 1996.

36. **Cantas, M.:** Sur un cas de plombage organique par greffe epiploique d`un evidement osseux pour osteomyelite. *Bull et Mem Soc Chir de Par,* 37: 1052, 1911.

37. **Caplan, A. I.:** The mesengenic process. *Clin Plast Surg,* 21(3): 429-35, 1994.

38. **Carraway, J. H., and Mellow, C. G.:** Syringe aspiration and fat concentration: a simple technique for autologous fat injection. *Ann Plast Surg,* 24(3): 293-6; discussion; 297., 1990.

39. **Chajchir, A., and Benzaquen, I.:** Fat-grafting injection for soft-tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg,* 84(6): 921-34; discussion 935, 1989.

40. **Chajchir, A.; Benzaquen, I.; and Moretti, E.:** Comparative experimental study of autologous adipose tissue processed by different techniques. *Aesthetic Plast Surg,* 17(2): 113-5., 1993.

41. **Chapman, A. B.; Knight, D. M.; Dieckmann, B. S.; and Ringold, G. M.:** Analysis of gene expression during differentiation of adipogenic cells in culture and hormonal control of the developmental program. *J Biol Chem,* 259(24): 15548-55, 1984.

42. **Chaput, H.:** Enorme herme ombilicale, anneau trop large pour etre suture, obturation de l`anneau par un enorme greffon adipeux, place dans le peritoine , derriere la paroi abdominale. *Bull et Mem Soc Chir de Par,* 38: 231, 1913.

43. **Chaput, H.:** Greffe adipeuse, resultat eloigne d`unvaste evidement du tibia traite avec succes pa la greffe adipeuse en 1904; radiographie. *Bull et Mem Soc Chir de Par,* 38: 203, 1913.

44. **Chehab, F. F.; Mounzih, K.; Lu, R.; and Lim, M. E.:** Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science,* 275(5296): 88-90, 1997.

45. **Cianflone, K., and Maslowska, M.:** Differentiation-induced production of ASP in human adipocytes. *Eur J Clin Invest,* 25(11): 817-25, 1995.

46. **Clark, W. A.; Horneland, W.; and Klein, A. G.:** Attempts to freeze some bacteriophages to ultralow temperatures. *Appl Microbiol,* 10: 463-5, 1962.

47. **Coleman, S. R.:** Facial Recontouring with Lipostructure. *Clinics in Plastic Surgery,* 24(2), 1997.

48. **Coleman, S. R.:** Hand rejuvenation with structural fat grafting. *Plast Reconstr Surg,* 110(7): 1731-44; discussion 1745-7., 2002.

49. **Coleman, S. R.:** Indications and Complications of Autologous Fat Transplantation. *American Society of Aesthetic Plastic Surgery*, 1988.

50. **Coleman, S. R.:** Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg,* 19(5): 421-5., 1995.

51. **Coleman, S. R.:** Structural Fat Grafts: The ideal Filler. *Clinics in Plastic Surgery,* 28(1), 2001.

52. **Conley, J. J., and Clairemont, A. A.:** Dermal-fat-fascia grafts. *Otolaryngology,* 86(4): 641-9, 1978.

53. **Coticchio, G.; Bonu, M. A.; Borini, A.; and Flamigni, C.:** Oocyte cryopreservation: a biological perspective. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,* 115 Suppl 1: S2-7, 2004.

54. **Czerny, A.:** Plastischer Ersatz der Brustdrüse durch ein Lipoma. *Chir Kongr Verhandl,* 2: 216, 1895.

55. **Daily, W. A., and Higgens, C. E.:** Proceedings: Preservation and storage of microorganisms in the gas phase of liquid nitrogen. *Cryobiology,* 10(5): 364-7, 1973.

56. **Darimont, C.; Vassaux, G.; Ailhaud, G.; and Negrel, R.:** Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology,* 135(5): 2030-6, 1994.

57. **Davis, E. E.; Hodges, F. A.; and Goos, R. D.:** Effect of suspending media on the survival of Puccinia graminis ureodiospores during freezing. *Phytopathology,* 56: 1432-1433, 1966.

58. **de Pedroza, L. V.:** Fat transplantation to the buttocks and legs for aesthetic enhancement or correction of deformities: long-term results of large volumes of fat transplant. *Dermatol Surg,* 26(12): 1145-9., 2000.

59. **Del Canzio Suarez, C.:** Radical de oido con injerto de grasa libre. *Rev Clin Espan,* 34: 403, 1949.

60. **DeLustro, F.; Dasch, J.; and Keefe, J.:** Immune response to allogeneic and xenogeneic implants of collagen and collagen derivatives. *Clin Orthop,* 260: 263-79, 1990.

61. **Deslex, S.; Negrel, R.; and Ailhaud, G.:** Development of a chemically defined serum-free medium for differentiation of rat adipose precursor cells. *Exp Cell Res,* 168(1): 15-30, 1987.

62. **Diller, K. R.:** Coefficients for solution of the analytical freezing equation in the range of states for rapid solidification of biological systems. *Proc Inst Mech Eng [H],* 204(3): 199-202, 1990.

63. **Diller, K. R.:** A simple procedure for determining spatial and transient variations of cooling rate within a specimen during cryopreservation. Part 2: Graphical solutions. *Proc Inst Mech Eng [H],* 204(3): 188-97, 1990.

64. **Dopfner, K.:** Die Methodik der Naht an peripheren Nerven. *Muenchen Med Wochenschr,* 62: 526, 1915.

65. **Drenckhahn, D., and Kugler, P.:** Fettgewebe. In *Anatomie*, pp. 125-8. Edited by Benninghoff, and Drenckhan, 125-8, München, Urban&Fischer, 2003.

66. **Dupertuis, S. M.:** Free ear lobe grafts of skin an fat; their value in reconstructions about nostrils. *Plast Reconstr Surg,* 1: 135, 1946.

67. **Eden, R., and Rehn, E.:** Die autoplastische Fettransplantation zur Neurolysis und Tendolysis. *Arch f Klin Chir,* 104: 65, 1914.

68. **Egyedi, P.:** Utilization of the buccal fat pad for closure of oro-antral and/or oro-nasal commmunications. *J Maxillofac Surg,* 5(4): 241, 1977.

69. **Eitner, E.:** Fettplastik bei Gesichtsatrophie. *Med Klin,* 27: 624, 1931.

70. **Ellenbogen, R.:** Autologous fat injection. *Plast Reconstr Surg,* 88(3): 543-4, 1991.

71. **Ellenbogen, R.:** Free autogenous pearl fat grafts in the face-A preliminary report of a rediscovered technique. *Ann Plast Surg,* 16: 179, 1986.

72. **Eppley, B. L.:** A Potential Biomaterial Composite for Dermal and Subcutaneous Augmentation. *Ann Plast Surg,* 32(5): 463-468, 1994.

73. **Eppley, B. L.; Sidner, R. A.; Platis, J. M.; and Sadove, A. M.:** Bioactivation of free-fat transfers: a potential new approach to improving graft survival. *Plast Reconstr Surg,* 90(6): 1022-30., 1992.

74. **Eremia, S., and Newman, N.:** 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., 2000.

75. **Erol, O. O.:** Facial autologous soft-tissue contouring by adjunction of tissue cocktail injection (micrograft and minigraft mixture of dermis, fascia, and fat). *Plast Reconstr Surg,* 106(6): 1375-87; discussion 1388-9, 2000.

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

77. **Ersek, R. A., and Beisang, A. A., 3rd:** Bioplastique: a new textured copolymer microparticle promises permanence in soft-tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg,* 87(4): 693-702, 1991.

78. **Estor, E., and Etienne, E.:** La greffe graisseuse dans l`obliteration des cavites osteomyeliques. *Rev d`Orthop,* 4(193), 1913.

79. **Fabbrocini, A.; Del Sorbo, C.; Fasano, G.; and Sansone, G.:** Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of Mediterranean buffalo (B.bubalis) spermatozoa. *Theriogenology,* 54(2): 193-207, 2000.

80. **Fagien, S.:** Autologous collagen injections to treat deep glabellar furrows. *Plast Reconstr Surg,* 93(3): 642, 1994.

81. **Fahy, G. M.:** The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology,* 23(1): 1-13, 1986.

82. **Fahy, G. M.; Lilley, T. H.; Linsdell, H.; Douglas, M. S.; and Meryman, H. T.:** Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology,* 27(3): 247-68, 1990.

83. **Fahy, G. M.; MacFarlane, D. R.; Angell, C. A.; and Meryman, H. T.:** Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology,* 21(4): 407-26, 1984.

84. **Farrant, J.:** Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinylpyrrolidone and glycerol ding freezing? *Nature,* 222(199): 1175-6, 1969.

85. **Ferran, J.:** Osteite traitee par la greffe graisseuse. *Soc Chir Marseille Arch Prov de Chir,* 23: 304, 1914.

86. **Figi, F. A.:** Epithelioma of larynx, pharyngotomy, and diathermy; depression of frontal region, fat transplant; loss of nasal ala and upper lip, reconstruction; stenosis of larynx, laryngofissure and skin graft. *S Clin North Am,* 11: 829, 1931.

87. **Franks, F.; Asquith, M. H.; Hammond, C. C.; Skaer, H. B.; and Echlin, P.:** Polymer cryoprotectants in the preservation of biological ultrastructure. I. Low temperature states of aqueous solutions of hydrophilic polymers. *J Microsc,* 110(3): 223-8, 1977.

88. **Freund, H.:** Neue Prinzipien der Prolaps-behandlung, zugleich Mitteilung eines Falles von Faszien- und Fetttransplantation. *Arch Gynecol,* 107: 165, 1917.

89. **Fried, S. K., and Kral, J. G.:** Sex differences in regional distribution of fat cell size and lipoprotein lipase activity in morbidly obese patients. *Int J Obes,* 11(2): 129-40, 1987.

90. **Fuller, B.; Busza, A. L.; Lockett, C. J.; and Proctor, E.:** Cold reflush of stored livers with anoxic solution--A31P NMR study of metabolic changes in rat liver. *Transplant Proc,* 23(5): 2411-2, 1991.

91. **Fulton, J. E.; Suarez, M.; Silverton, K.; and Barnes, T.:** Small volume fat transfer. *Dermatol Surg,* 24(8): 857-65., 1998.

92. **Gaillard, D.; Wabitsch, M.; Pipy, B.; and Negrel, R.:** Control of terminal differentiation of adipose precursor cells by glucocorticoids. *J Lipid Res,* 32(4): 569-79, 1991.

93. **Galpern, Y. A.:** Free fat implantation after radical operation for abscesses of the frontal sinus. *Vrach Gaz, S. Petarb,* 20: 592, 1913.

94. **Gao, D., and Critser, J. K.:** Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Ilar J,* 41(4): 187-96, 2000.

95. **Garelli, F.:** Gli innesti digrasso in otorinolaringologia. *Ann Laring Otol,* 46: 82, 1947.

96. **Gaskins, H. R.; Kim, J. W.; Wright, J. T.; Rund, L. A.; and Hausman, G. J.:** Regulation of insulin-like growth factor-I ribonucleic acid expression, polypeptide secretion, and binding protein activity by growth hormone in porcine preadipocyte cultures. *Endocrinology,* 126(1): 622-30, 1990.

97. **Glogau, R. G.; Matarasso, S. L.; and Markey, A. C.:** Microlipoinjection: autologous fat grafting. In *Principles and Techniques of Cutaneous Surgery*, pp. 437-44. Edited by Lask, G., and Moy, R., 437-44, New York, McGraw-Hill, 1996.

98. **Goldenberg, B.:** Pequenos injertos de dermis-grasa cirugia plastica. *Rev Asoc Med Argent,* 63: 130,649, 1949.

99. **Grandin, P., and Deroubaix, P.:** Traitment d`un volimineux kyste paradentaire du maxillaire inferieur par greffe de graisse. *Rev fr d`Odonto-Stomat,* 1: 1087, 1954.

100. **Gregoire, F.; De Broux, N.; Hauser, N.; Heremans, H.; Van Damme, J.; and Remacle, C.:** Interferon-gamma and interleukin-1 beta inhibit

adipoconversion in cultured rodent preadipocytes. *J Cell Physiol,* 151(2): 300-9, 1992.

101. **Gregoire, F.; Genart, C.; Hauser, N.; and Remacle, C.:** Glucocorticoids induce a drastic inhibition of proliferation and stimulate differentiation of adult rat fat cell precursors. *Exp Cell Res,* 196(2): 270-8, 1991.

102. **Gregoire, F. M.; Smas, C. M.; and Sul, H. S.:** Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev,* 78(3): 783-809, 1998.

103. **Gross, H.:** Fettplastik der Lunge. *Dtsch Ztschr f Chir,* 141: 204, 1917.

104. **Guller, S.; Corin, R. E.; Yuan-Wu, K.; and Sonenberg, M.:** Up-regulation of vinculin expression in 3T3 preadipose cells by growth hormone. *Endocrinology,* 129(1): 527-33, 1991.

105. **Halberstadt, M.; Athmann, S.; and Hagenah, M.:** Corneal cryopreservation with dextran. *Cryobiology,* 43(1): 71-80, 2001.

106. **Hang-Fu, L.; Marmolya, G.; and Feiglin, D. H.:** Liposuction fat-fillant implant for breast augmentation and reconstruction. *Aesthetic Plast Surg,* 19(5): 427-37., 1995.

107. **Harter, J. H.:** Plastic surgery: Depressed forehead following Killian operation; repaired by fat grafts. *Northwest Med,* 26: 313, 1927.

108. **Hauner, H.:** Complete adipose differentiation of 3T3 L1 cells in a chemically defined medium: comparison to serum-containing culture conditions. *Endocrinology,* 127(2): 865-72, 1990.

109. **Hauner, H.; Ditschuneit, H. H.; Pal, S. B.; Moncayo, R.; and Pfeiffer, E. F.:** Fat distribution, endocrine and metabolic profile in obese women with and without hirsutism. *Metabolism,* 37(3): 281-6, 1988.

110. **Hauner, H., and Entenmann, G.:** Regional variation of adipose differentiation in cultured stromal-vascular cells from the abdominal and femoral adipose tissue of obese women. *Int J Obes,* 15(2): 121-6, 1991.

111. **Hauner, H.; Entenmann, G.; Wabitsch, M.; Gaillard, D.; Ailhaud, G.; Negrel, R.; and Pfeiffer, E. F.:** Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest,* 84(5): 1663-70, 1989.

112. **Hauner, H.; Rohrig, K.; and Petruschke, T.:** Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) on human adipocyte development and function. *Eur J Clin Invest,* 25(2): 90-6, 1995.

113. **Hauner, H.; Wabitsch, M.; and Pfeiffer, E. F.:** Differentiation of adipocyte precursor cells from obese and nonobese adult women and from different adipose tissue sites. *Horm Metab Res Suppl,* 19: 35-9, 1988.

114. **Hayashi, I.; Nixon, T.; Morikawa, M.; and Green, H.:** Adipogenic and anti-adipogenic factors in the pituitary and other organs. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 78(6): 3969-72, 1981.

115. **Hayward, E.:** Freie Fetttransplantation beim Menschen. *Verhandl Dtsch Gesellsch Chir,* 42(132), 1913.

116. **Heinemann, O.:** Ueber Fettplombierung eiternder Knochenhoehlen. *Berl Klin Wehnschr,* 57: 113, 1920.

117. **Henle:** Ueber Kriegsverletzungen der peripherischen Nerven. *Arch Klin Chir,* 79: 1070, 1906.

118. **Hernandez-Perez, E., and Venadero-Albarran, F.:** Fat Transplants in Male and Female Genitals. In *Autologous Fat Transplantation*, pp. 219-232. Edited by Shiffman, M. A., 219-232, New York, Basel, Marcel Dekker, Inc., 2001.

119. **Heschel, I.:** Kältekonservierung biologischer Zellen. *KI Luft- und Klimatechnik,* 6: 294-296, 1994.

120. **Heschel, I.:** Verfahrensgestaltung bei der Tiefkühlkonservierung biologischer Systeme unter den Aspekten Homogenität und Dynamik. Edited by Rau, G., Aachen, Shaker Verlag GmbH, 2002.

121. **Hesse, E.:** Freie Fetttransplantation in der Markshoehle bei Osteomyelitis. *Zentralbl Chir,* 39: 1226, 1912.

122. **Higa, O.; Rogero, S.; Machado, L.; Mathor, M.; and AB., L.:** Biocompatibility study for PVP wound dressing obtaind in different conditions. *Radiat Phys Chem,* 55: 705-7, 1999.

123. **Hilse, A.:** Die freie Fetttransplantation bei Blutungen der parenchymatoesen Bauchorgane. *Zentralbl f Chir,* 40: 1849, 1913.

124. **Hirokawa, J.; Sakaue, S.; Tagami, S.; Kawakami, Y.; Sakai, M.; Nishi, S.; and Nishihira, J.:** Identification of macrophage migration inhibitory factor in adipose tissue and its induction by tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun,* 235(1): 94-8, 1997.

125. **Hoenger, A.; Doerhoefer, M.; Woehlke, G.; Tittmann, P.; Gross, H.; Song, Y. H.; and Mandelkow, E.:** Surface topography of microtubule walls decorated with monomeric and dimeric kinesin constructs. *Biol Chem,* 381(9-10): 1001-11, 2000.

126. **Hollander, D. H., and Nell, E. E.:** Improved preservation of Treponema pallidum and other bacteria by freezing with glycerol. *Appl Microbiol,* 2(3): 164-70, 1954.

127. **Howard, D. H.:** The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth. *J Bacteriol,* 71(5): 625, 1956.

128. **Huang, Q.; Pegg, D. E.; and Kearney, J. N.:** Banking of non-viable skin allografts using high concentrations of glycerol or propylene glycol. *Cell Tissue Bank,* 5(1): 3-21, 2004.

129. **Hubalek, Z.:** Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology,* 46(3): 205-29, 2003.

130. **Hubel, A.; Toner, M.; Cravalho, E. G.; Yarmush, M. L.; and Tompkins, R. G.:** Intracellular ice formation during the freezing of hepatocytes cultured in a double collagen gel. *Biotechnol Prog,* 7(6): 554-9, 1991.

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

132. **Illouz, Y. G.:** Present results of fat injection. *Aesthetic Plast Surg,* 12(3): 175-81., 1988.

133. **Iseke, G.:** Zur Plombierung von Knochenhoehlen mit freitransplantierten Fett. *Dtsch Ztschr f Chir,* 173: 386, 1922.

134. **Jackson, R. F.:** Frozen Fat - Does it Work? *The American Journal of Cosmetic Surgery,* 14(3): 339-343, 1997.

135. **Jeyendran, R. S.; Van der Ven, H. H.; Perez-Pelaez, M.; and Zaneveld, L. J.:** Nonbeneficial effects of glycerol on the oocyte penetrating capacity of cryopreserved and incubated human spermatozoa. *Cryobiology,* 22(5): 434-7, 1985.

136. **Juvara, E.:** Contribution a l`etude des autogreffes de graisse. *Bull et Mem Soc Chir de Par,* 47: 196, 1921.

137. **Kaneda, Y. et al.:** The use of PVP as a polymeric carrier to improve the plasma half-life of drugs. *Biomaterials,* 25(16): 3259-66, 2004.

138. **Karlsson, J. O., and Toner, M.:** Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials,* 17(3): 243-56., 1996.

139. **Kearney, J. N.:** Cryopreservation of cultured skin cells. *Burns,* 17(5): 380-3, 1991.

140. **Keay, S., and Grossberg, S. E.:** Interferon inhibits the conversion of 3T3-L1 mouse fibroblasts into adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 77(7): 4099-103, 1980.

141. **Keith, S. C.:** Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water. *Science,* 37: 877-879, 1913.

142. **Key, B. W.:** Fat implantations. *Arch Ophth,* 48: 292, 1919.

143. **Klapp, R.:** Beitrag zur Fetttransplantation. *Dtsch Med Wochenschr,* 38: 1569, 1912.

144. **Klein, A. W.:** Indications and implantation techniques for the various formulations of injectable collagen. *Dermatol Surg Oncol,* 14: 27-30, 1988.

145. **Klopfer, E.:** Ueber freie Fetttransplantation in Knochenhoehlen. *Beitr z Klin Chir,* 84: 499, 1913.

146. **Koekemoer, T. C.; Litthauer, D.; and Oelofsen, W.:** Isolation and characterization of adipose tissue glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Int J Biochem Cell Biol,* 27(6): 625-32., 1995.

147. **Kolb, K.:** Ueber lipomatose Entartung eines zum Schutze einer Nervennaht transplantierten Fettlappens. *Zentralbl Chir,* 43: 423, 1916.

148. **Kononas, T. C.; Bucky, L. P.; Hurley, C.; and May, J. W., Jr.:** 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(5): 763-8., 1993.

149. **Konstantinow, A.; Muhlbauer, W.; Hartinger, A.; and von Donnersmarck, G. G.:** Skin banking: a simple method for cryopreservation of split-thickness skin and cultured human epidermal keratinocytes. *Ann Plast Surg,* 26(1): 89-97, 1991.

150. **Korber, C.:** Phenomena at the advancing ice-liquid interface: solutes, particles and biological cells. *Q Rev Biophys,* 21(2): 229-98, 1988.

151. **Korber, C., and Scheiwe, M. W.:** The cryoprotective properties of hydroxyethyl starch investigated by means of differential thermal analysis. *Cryobiology,* 17(1): 54-65, 1980.

152. **Krauss, M. C.:** Recent advances in soft tissue augmentation. *Semin Cutan Med Surg,* 18(2): 119-28, 1999.

153. **Kundu, C. N.; Chakrabarty, J.; Dutta, P.; Bhattacharyya, D.; Ghosh, A.; and Majumder, G. C.:** Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction,* 123(6): 907-13, 2002.

154. **Lachenbruch, C. A., and Diller, K. R.:** A network thermodynamic model of kidney perfusion with a cryoprotective agent. *J Biomech Eng,* 121(6): 574-83, 1999.

155. **Laico, J. E.:** Fat grafting in facial deformity. *Philippine J Surg,* 6: 226, 1951.

156. **Lambert, L.:** Un cas de greffe graisseuse extra-pleurale. *Bull et Mem Soc Chir de Par,* 39: 1196, 1913.

157. **Langenskiold, A., and Valle, M.:** Epidurally placed free fat grafts visualized by CT scanning 15-18 years after discectomy. *Spine,* 10(1): 97, 1985.

158. **Larese, F.; Fiorito, A.; and De Zotti, R.:** The possible haematological effects of glycol monomethyl ether in a frame factory. *Br J Ind Med,* 49(2): 131-3, 1992.

159. **Lassus, C.:** Expanded PTFE in the treatment of facial wrinkles. *Aesthetic Plast Surg,* 15(2): 167-74, 1991.

160. **Laubier, H.:** Ueber Enukleation mit Fettimplantation. *Ztschr Augenh,* 23: 426, 1910.

161. **Lawrowa, M. P.:** Einpflanzung von lebendem Gewebe in Knochenhoehlen. Vorlaeufige Mitteilung. *Zentralbl Chir,* 2: 1197, 1913.

162. **Leaf, N., and Zarem, H. A.:** Correction of contour defects of the face with dermal and dermal-fat grafts. *Arch Surg,* 105(5): 715, 1972.

163. **Lemperle, G.:** Faltenbehandlung und Lippenvergrößerung. In *Ästhetische Chirurgie*, pp. VI - 3 (1-14). Edited by Lemperle, G., VI - 3 (1-14), Landsberg/Lech, ecomed, 1998.

164. **Lemperle, G.; Hazan-Gauthier, N.; and Lemperle, M.:** PMMA microspheres (Artecoll) for skin and soft-tissue augmentation. Part II: Clinical investigations. *Plast Reconstr Surg,* 96(3): 627-34, 1995.

165. **Lenormant, C.:** Un nouveau mode de traitment des suppurations dermiques du poumon: Le pneumothorax extrapleurale. *Presse Med,* 21: 786, 1913.

166. **Levin, R. L., and Miller, T. W.:** An optimum method for the introduction or removal of permeable cryoprotectants: isolated cells. *Cryobiology,* 18(1): 32-48, 1981.

167. **Lexer, E.:** Cited in Peer, L. A. In *Transplantation of Tissue*. Edited, Baltimore, Williams&Wilkins, 1959.

168. **Lexer, E.:** Die gesamte Wiederherstellungs-Chirurgie. Edited, Leipzig, J. B. Barth, 1931.

169. **Lexer, E.:** Freie Fetttransplantation. *Deutsch Med Wochenschr,* 36: 640, 1910.

170. **Litthauer, D., and Serrero, G.:** The primary culture of mouse adipocyte precursor cells in defined medium. *Comp Biochem Physiol A,* 101(1): 59-64, 1992.

171. **Llaneza Rodriguez, E.:** Injertos de grasa en la radical de oido. *Rev Espan Oto-neuro-oftal y Neurocir,* 11: 191, 1952.

172. **Löffler, G., and Petrides, P. E.:** Biochemie und Pathobiochemie. Edited, Berlin, Springer-Verlag, 1998.

173. **Lopes, C., and Felisberti, M.:** Mechanical behavior and biocompatibility of poly(1-vinyl-2-pyrrolidone)-gelatin IPN hydrogels. *Biomaterials,* 24: 123-7, 2003.

174. **Lopez, F., and Velez, D.:** Valor comparativo de las diversas operaciones propuestas para reemplazar a la enucleation y especialmente de las implantaciones de grasa. *Ann de oftal Mexico,* 5: 335, 1903.

175. **Lovelock, J. E.:** The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta,* 11(1): 28-36, 1953.

176. **Lovelock, J. E.:** The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem J,* 56(2): 265-70, 1954.

177. **Lovelock, J. E., and Bishop, M. W.:** Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature,* 183(4672): 1394-5, 1959.

178. **Lovelock, J. E., and Bishop, M. W. H.:** Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulphoxide. *Nature,* 183: 1394-1395, 1959.

179. **Lu, J. H.; Chiu, Y. T.; Sung, H. W.; Hwang, B.; Chong, C. K.; Chen, S. P.; Mao, S. J.; Yang, P. Z.; and Chang, Y.:** XTT-colorimetric assay as a marker of viability in cryoprocessed cardiac valve. *J Mol Cell Cardiol,* 29(4): 1189-94, 1997.

180. **Luetteke, N. C.; Lee, D. C.; Palmiter, R. D.; Brinster, R. L.; and Sandgren, E. P.:** Regulation of fat and muscle development by transforming growth factor alpha in transgenic mice and in cultured cells. *Cell Growth Differ,* 4(3): 203-13, 1993.

181. **Lutz, K.:** Ueber Fetttransplantation. Edited, Berlin, 1913.

182. **Luyet, B., and Rapatz, G.:** A review of basic researches on the cryopreservation of red blood cells. *Cryobiology,* 6(5): 425-82, 1970.

183. **Maas, W. J.; de Graaf, I. A.; Schoen, E. D.; Koster, H. J.; van de Sandt, J. J.; and Groten, J. P.:** Assessment of some critical factors in the freezing technique for the cryopreservation of precision-cut rat liver slices. *Cryobiology,* 40(3): 250-63., 2000.

184. **Maas, W. J.; Leeman, W. R.; Groten, J. P.; and van de Sandt, J. J.:** Cryopreservation of precision-cut rat liver slices using a computer- controlled freezer. *Toxicol In Vitro,* 14(6): 523-30., 2000.

185. **Madden, P. W.; Taylor, M. J.; Hunt, C. J.; and Pegg, D. E.:** The effect of polyvinylpyrrolidone and the cooling rate during corneal cryopreservation. *Cryobiology,* 30(2): 135-57, 1993.

186. **Mahadevan, M.:** Cryobiological and Biochemical Studies of Human Semen. Edited, Melbourne, Victoria, Australia, Monash University, 1980.

187. **Makkas, M.:** Experimentelle und klinische Beitraege zur freien Fetttransplantation. Plombierung von Knochenhoehlen mit Fett. *Beitr z Klin Chir (Tuebingen),* 77: 523, 1912.

188. **Mann, F. C.:** The Transplantation of the Fat in the Peritoneal Cavity. *Surgical Clinics of North America,* 1: 1465-1471, 1921.

189. **Mantovani, R.; Rora, A.; Falomo, M. E.; Bailoni, L.; and Vincenti, L.:** Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of

equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reprod Nutr Dev,* 42(3): 217-26, 2002.

190. **Markey, A. C., and Glogau, R. G.:** Autologous fat grafting: comparison of techniques. *Dermatol Surg,* 26(12): 1135-9., 2000.

191. **Marx, G.:** Fetttransplantation nach Stirnhoehlenoperation. *Ztschr Ohrenh,* 61: 7, 1910.

192. **Maslowska, M.; Sniderman, A. D.; Germinario, R.; and Cianflone, K.:** ASP stimulates glucose transport in cultured human adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord,* 21(4): 261-6, 1997.

193. **Mathieu, M.:** Greffe graisseuse. *Lyon Med,* 125: 335, 1916.

194. **Mazur, P.:** Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science,* 168(934): 939-49, 1970.

195. **Mazur, P.:** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol,* 247(3 Pt 1): C125-42, 1984.

196. **Mazur, P.:** Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol,* 47: 347-69, 1963.

197. **Mazur, P.; Leibo, S. P.; and Chu, E. H.:** A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res,* 71(2): 345-55, 1972.

198. **Mazur, P., and Schneider, U.:** Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophys,* 8(4): 259-85, 1986.

199. **McCaa, C.; Diller, K. R.; Aggarwal, S. J.; and Takahashi, T.:** Cryomicroscopic determination of the membrane osmotic properties of human monocytes at subfreezing temperatures. *Cryobiology,* 28(4): 391-9, 1991.

200. **McCarthy, J. G.:** Introduction to Plastic Surgery. In *Plastic Surgery*, pp. 1-68. Edited by McCarty, J. G., 1-68, Philadelphia, WB Saunders, 1990.

201. **McKinney, P., and Pandya, S.:** Use of pubic fat as a graft for eyelid defects. *Aesthetic Plast Surg,* 18(4): 383-5, 1994.

202. **Medicine, P. C. o. t. A. S. f. R.:** Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil Steril,* 82(4): 993-8, 2004.

203. **Meryman, H. T.:** Cryoprotective agents. *Cryobiology,* 8(2): 173-83, 1971.

204. **Meryman, H. T.:** Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology,* 8(5): 489-500, 1971.

205. **Meryman, H. T., and Hornblower, M.:** A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration. *Transfusion,* 12(3): 145-56, 1972.

206. **Meyle, J. S., and Kempf, J. E.:** Preservation of T2 Bacteriophage with Liquid Nitrogen. *Appl Microbiol,* 12: 400-2, 1964.

207. **Mikus, J. L.; Koufman, J. A.; and Kilpatrick, S. E.:** Fate of liposuctioned and purified autologous fat injections in the canine vocal fold. *Laryngoscope,* 105(1): 17-22, 1995.

208. **Mishler, J. M. t.:** [Pharmacokinetics of middle-molecular hydroxyethyl starch (HAS 200/0,5]. *Infusionsther Klin Ernahr,* 7(2): 96-102, 1980.

209. **Mishler, J. M. t.:** The plasma kinetics of hydroxyethyl starch 350/0.60: a potential new adjunct for centrifugal leucapheresis. *Am J Hematol,* 7(4): 341-7, 1979.

210. **Morestin, H.:** In *Considérations générales sur les greffes graisseuses et serograisseuses épiloiques et leurs pricipales applications.* Edited by Richard, M. A., Paris, Paris thése, 1919.

211. **Morestin, H.:** Cited by Broeckaert, T.J. and Steinhaus, J., Contribution a l`etude des greffes adipeuses. *Bull Acad Roy Med Belgique,* 28: 440, 1914.

212. **Morestin, H.:** Epithelioma du front propage au crane; extirpation, resection d`une partie du frontal; autoplastie; transplantation graisseuse; blepharoplastie partiellepar greffe cutanee libre. *Bull Acad Roy Med Belgique*: 1646-1658.

213. **Morestin, H.:** Quelque cas de greffes graisseuses appliquees a la chirurgie reparatrice. *Bull et Mem Soc Chir de Par,* 41: 1631, 1915.

214. **Morris, G. J.:** The cryopreservation of Chlorella. 2. Effect of growth temperature on freezing tolerance. *Arch Microbiol,* 107(3): 309-12, 1976.

215. **Mosmann, T.:** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods,* 65(1-2): 55-63., 1983.

216. **Moszkowicz, L.:** Fettplastik bei Hemiatrophia Faciei. *Med Klin,* 26: 1478, 1930.

217. **Moustaid, N.; Lasnier, F.; Hainque, B.; Quignard-Boulange, A.; and Pairault, J.:** Analysis of gene expression during adipogenesis in 3T3-F442A preadipocytes: insulin and dexamethasone control. *J Cell Biochem,* 42(4): 243-54, 1990.

218. **Münker, R.:** Autologe Fettgewebstransplantation. In *Ästhetische und Plastische Chirurgie an Nase, Gesicht und Ohrmuschel*, pp. 281-3. Edited by Kastenbauer, E. R., and Tardy, M. E., 281-3, Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, 1999.

219. **Naumov, P. V.; Gladkii, A. P.; and Eliseeva, T. I.:** An experimental and clinical study of free grafts in skin fat transplantation. *Stomatologiia (Mosk),* 52(4): 32, 1973.

220. **Navratilova, Z.; Slonkova, V.; Semradova, V.; and Adler, J.:** Cryopreserved and lyophilized cultured epidermal allografts in the treatment of leg ulcers: a pilot study. *J Eur Acad Dermatol Venereol,* 18(2): 173-9, 2004.

221. **Navre, M., and Ringold, G. M.:** A growth factor-repressible gene associated with protein kinase C-mediated inhibition of adipocyte differentiation. *J Cell Biol,* 107(1): 279-86, 1988.

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

223. **Neuhof, H.:** Free transplantation of fat for closure of bronchopulmonary cavities (lattice lung). *J Thorac Surg,* 7: 23, 1937.

224. **Newman, J.:** Preliminary report on "fat-recycling" - liposuction fat transfer for facial defects. *Am J Cosm Surg,* 3: 67-69, 1986.

225. **Nguyen, A.; Pasyk, K. A.; Bouvier, T. N.; Hassett, C. A.; and Argenta, L. C.:** Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg,* 85(3): 378-86; discussion 387-9., 1990.

226. **Niechajev, I., and Sevcuk, O.:** Long-term results of fat transplantation: clinical and histologic studies. *Plast Reconstr Surg,* 94(3): 496-506., 1994.

227. **Nougues, J.; Reyne, Y.; Barenton, B.; Chery, T.; Garandel, V.; and Soriano, J.:** Differentiation of adipocyte precursors in a serum-free medium is influenced by glucocorticoids and endogenously produced insulin-like growth factor-I. *Int J Obes Relat Metab Disord,* 17(3): 159-67, 1993.

228. **Novaes, F.; dos Reis, N.; and Baroudi, R.:** Counting method of live fat cells used in lipoinjection procedures. *Aesthetic Plast Surg,* 22(1): 12-5., 1998.

229. **Novakofski, J.:** Adipogenesis: usefulness of in vitro and in vivo experimental models. *J Anim Sci,* 82(3): 905-15, 2004.

230. **Obwegeser, H. L., and Sailer, H. F.:** Experience with free adipose-tissue transplantation for contour correction in the facial area. *Fortschr Kiefer Gesichtschir,* 24: 51, 1979.

231. **Ohsumi, J.; Miyadai, K.; Kawashima, I.; Ishikawa-Ohsumi, H.; Sakakibara, S.; Mita-Honjo, K.; and Takiguchi, Y.:** Adipogenesis inhibitory factor. A novel inhibitory regulator of adipose conversion in bone marrow. *FEBS Lett,* 288(1-2): 13-6, 1991.

232. **Okano, T.; Murase, T.; Asano, M.; and Tsubota, T.:** Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *J Vet Med Sci,* 66(11): 1359-64, 2004.

233. **Parent, R.:** Contribution a l`etude du traitment des grands evidements osseus consecutifs a l`osteomyelite par la greffe adipeuse de M. Chaput. *Bull et Mem Soc Chir de Par,* 93: 58, 1910.

234. **Pasch, J.:** Verfahren zur Kryokonservierung epidermaler Zellen auf Kollagen-Microcarriern. Edited, 2000.

235. **Pasch, J.; Schiefer, A.; Heschel, I.; and Rau, G.:** Cryopreservation of keratinocytes in a monolayer. *Cryobiology,* 39(2): 158-68., 1999.

236. **Passani, S. L.; Angelini, G. D.; Breckenridge, I. M.; and Newby, A. C.:** Endothelial function can be preserved during cryo-storage of human saphenous vein. *Eur J Cardiothorac Surg,* 2(4): 233-6, 1988.

237. **Patton, J. S.; Shepard, H. M.; Wilking, H.; Lewis, G.; Aggarwal, B. B.; Eessalu, T. E.; Gavin, L. A.; and Grunfeld, C.:** Interferons and tumor necrosis factors have similar catabolic effects on 3T3 L1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 83(21): 8313-7, 1986.

238. **Peer, L.:** Loss of Weight an Volume in Human Fat grafts. *Plast Reconstr Surg,* 5: 217-230, 1950.

239. **Peer, L. A.:** The Neglected "Free Fat Graft", Its Behavior and Clinical Use. *Am J Surg,* 92: 40-7, 1956.

240. **Peer, L. A.:** Presentation of cases requiring plastic repair. *J Am Soc New Jersey,* 34: 15, 1937.

241. **Peiser, A.:** Freie Fetttransplantation bei der Behandlung der Dupuytrenchen Finger-kontractur. *Zentralbl f Chir,* 44: 6, 1917.

242. **Peolenov, A., and Ladygin, M. J.:** Die blutstillende Wirkung des Fettgewebes bei Wunden der parenchymatösen Organe der Bauchhoehle. *Zentralbl Chir,* 2: 1383, 1913.

243. **Petruschke, T.; Rohrig, K.; and Hauner, H.:** Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits the differentiation of human adipocyte precursor cells in primary culture. *Int J Obes Relat Metab Disord,* 18(8): 532-6, 1994.

244. **Poissonnet, C. M.; LaVelle, M.; and Burdi, A. R.:** Growth and development of adipose tissue. *J Pediatr,* 113(1 Pt 1): 1-9, 1988.

245. **Poland, A.:** Deficiency of the pectoral muscles. *Guys Hosp. Rep.,* 6: 191, 1841.

246. **Polge, C.; Smith, A. U.; and Parkes, A. S.:** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature,* 164: 666, 1949.

247. **Raccach, M.; Rottem, S.; and Razin, S.:** Survival of frozen mycoplasmas. *Appl Microbiol,* 30(2): 167-71, 1975.

248. **Radosevich, J. A.; Haines, G. K.; Elseth, K. M.; Shambaugh, G. E., 3rd; and Maker, V. K.:** A new method for the detection of viable cells in tissue sections using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): an application in the assessment of tissue damage by surgical instruments. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol,* 63(6): 345-50, 1993.

249. **Ramsay, T. G.; White, M. E.; and Wolverton, C. K.:** Insulin-like growth factor 1 induction of differentiation of porcine preadipocytes. *J Anim Sci,* 67(9): 2452-9, 1989.

250. **Rehn, E.:** Die Fetttransplantation. *Arch klin Chir,* 98(1): 1-37, 1910.

251. **Rehn, E.:** Die Verwendung der autoplastischen Fetttransplantation bei Dura- und Hirndefekten. *Arch f Klin Chir (Berlin),* 101: 962, 1913.

252. **Reyne, Y.; Nougues, J.; and Dulor, J. P.:** Differentiation of rabbit adipocyte precursor cells in a serum-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol,* 25(8): 747-52, 1989.

253. **Rindler, V.; Heschel, I.; and Rau, G.:** Freeze-drying of red blood cells: how useful are freeze/thaw experiments for optimization of the cooling rate? *Cryobiology,* 39(3): 228-35, 1999.

254. **Rindler, V.; Luneberger, S.; Schwindke, P.; Heschel, I.; and Rau, G.:** Freeze-drying of red blood cells at ultra-Low temperatures. *Cryobiology,* 38(1): 2-15, 1999.

255. **Roehm, N. W.; Rodgers, G. H.; Hatfield, S. M.; and Glasebrook, A. L.:** An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods,* 142(2): 257-65, 1991.

256. **Rohrich, R. J.; Rios, J. L.; and Fagien, S.:** Role of new fillers in facial rejuvenation: a cautious outlook. *Plast Reconstr Surg,* 112(7): 1899-902, 2003.

257. **Röpke, W.:** In *Transplantation of Tissue*, pp. 197. Edited by Peer, L. A., 197, Baltimore, Williams&Wilkins, 1959.

258. **Rosser, C. M.:** Transplantation of extra-abdominal fat for the relief of post-operativ adhesions. *Texas State J Med,* 16: 298, 1921.

259. **Rubin, C. S.; Hirsch, A.; Fung, C.; and Rosen, O. M.:** Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem,* 253(20): 7570-8, 1978.

260. **Ruddle, A. C.; George, S. J.; Armitage, W. J.; Alexander, E. L.; and Mitchell, D. C.:** A simplified technique for the cryopreservation of vein allografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg,* 19(3): 233-7, 2000.

261. **Sattler, G., and Sommer, B.:** Liporecycling: a technique for facial rejuvenation and body contouring. *Dermatol Surg,* 26(12): 1140-4., 2000.

262. **Saylan, Z.:** Autologous Frozen Fat for Transplant. In *Autologous Fat Transplantation*, pp. 261-265. Edited by Shiffman, M. A., 261-265, Dekker, Inc., 2001.

263. **Schaefer, U. W.:** Bone Marrow Stem Cells. In *Low temperature preservation in medicine and biology*, pp. 139-154. Edited by Ashwood-Smith, M. J., and Farrant, J., 139-154, Turnbridge Wells, Pitman Medical, 1980.

264. **Schiebler, T. H.:** Histologie. In *Histologica Basica*. Edited by Junqueira, L. C., and Carneiro, J., Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1996.

265. **Schlapfer, K.:** Beitrag zur operativen Behandlung der Vorderarmsynostosen (Brueckencallus). *Dtsch Ztschr f Chir,* 137: 225, 1916.

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

267. **Schmidt, W.; Poll-Jordan, G.; and Loffler, G.:** Adipose conversion of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, corticosterone, and cyclic AMP. *J Biol Chem,* 265(26): 15489-95, 1990.

268. **Schneider, U., and Mazur, P.:** Relative influence of unfrozen fraction and salt concentration on the survival of slowly frozen eight-cell mouse embryos. *Cryobiology,* 24(1): 17-41, 1987.

269. **Schuller-Petrovic, S.:** Improving the aesthetic aspect of soft tissue defects on the face using autologous fat transplantation. *Facial Plast Surg,* 13(2): 119-24., 1997.

270. **Serrero, G., and Mills, D.:** Decrease in transforming growth factor beta 1 binding during differentiation of rat adipocyte precursors in primary culture. *Cell Growth Differ,* 2(3): 173-8, 1991.

271. **Serrero, G., and Mills, D.:** Differentiation of newborn rat adipocyte precursors in defined serum-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol,* 23(1): 63-6, 1987.

272. **Shafik, A.:** Perianal injection of autologous fat for treatment of sphincteric incontinence. *Dis Colon Rectum,* 38(6): 583-7., 1995.

273. **Shiffman, M. A.:** Principles of Autologous Fat Transplantation. In *Autologous Fat Transplantation*, pp. 5-22. Edited by Shiffman, M. A., 5-22, New York, Basel, Marcel Dekker, Inc., 2001.

274. **Shoshani, O.; Ullmann, Y.; Shupak, A.; Ramon, Y.; Gilhar, A.; Kehat, I.; and Peled, I. J.:** The role of frozen storage in preserving adipose tissue obtained by suction-assisted lipectomy for repeated fat injection procedures. *Dermatol Surg,* 27(7): 645-7., 2001.

275. **Silex, P.:** Ueber Lidbildung mit stiellosen Hautlappen. *Klin Monatsbl Augenh,* 34: 46, 1896.

276. **Smith, P. J.; Wise, L. S.; Berkowitz, R.; Wan, C.; and Rubin, C. S.:** Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem,* 263(19): 9402-8, 1988.

277. **Sommerfeld, V., and Niemann, H.:** Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology,* 38(2): 95-105, 1999.

278. **Sparks, R. L.; Allen, B. J.; and Strauss, E. E.:** TGF-beta blocks early but not late differentiation-specific gene expression and morphologic differentiation of 3T3 T proadipocytes. *J Cell Physiol,* 150(3): 568-77, 1992.

279. **Spieles, G.; Kresin, M.; Loges, K.; Sputtek, A.; Heschel, I.; and Rau, G.:** The effect of storage temperature on the stability of frozen erythrocytes. *Cryobiology,* 32(4): 366-78, 1995.

280. **Spina, V.; Ferreira, M. C.; and Psillakis, J. M.:** Skin and fat grafts to correct facial deformities. *Rev Paul Med,* 80(1): 19, 1972.

281. **Sputtek, A.:** Hydroxyethylstärke: Synthese, Eigenschaften und Anwendung als Schutzadditiv in der Kryobiologie. Edited, 1990.

282. **Sputtek, A.; Singbartel, G.; Langer, R.; Schleinzer, W.; and Henrich, H. A.:** Cryopreservation of red blood cells with the non-penetrating cryoprotectant hydroxyethyl starch. *Cryo Letters,* 16: 283-288, 1995.

283. **Stachecki, J. J., and Cohen, J.:** An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online,* 9(2): 152-63, 2004.

284. **Steele, P. R.; Davies, J. D.; and Greaves, R. I.:** Some factors affecting the viability of freeze-thawed T4 bacteriophage. *J Hyg (Lond),* 67(1): 107-14, 1969.

285. **Stevens, M. G., and Olsen, S. C.:** Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *J Immunol Methods,* 157(1-2): 225-31, 1993.

286. **Stieda, A.:** Klinisches und Histologisches zur freien Knochentransplantation. *Verhandl Dtsch Gesellsch Chir,* 40: 88, 1911.

287. **Straatsma, C. R., and Peer, L. A.:** Repair of postauricular fistula by means of free fat grafts. *Arch Otolaryngol,* 15: 620, 1932.

288. **Stromeyer, K.:** Verschluss einer Lungenabszesshoehle und dreier Bronchialfisteln mit Fett. *Dtsch Ztschr f Chir,* 150: 420, 1919.

289. **Suryawan, A.; Swanson, L. V.; and Hu, C. Y.:** Insulin and hydrocortisone, but not triiodothyronine, are required for the differentiation of pig preadipocytes in primary culture. *J Anim Sci,* 75(1): 105-11, 1997.

290. **Takahashi, T.; Inada, S.; Pommier, C. G.; O'Shea, J. J.; and Brown, E. J.:** Osmotic stress and the freeze-thaw cycle cause shedding of Fc and C3b receptors by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol,* 134(6): 4062-8, 1985.

291. **Takasu, K., and Takasu, S.:** Long-Term Frozen Fat Transplant. In *Autologous Fat Transplantation*, pp. 267-277. Edited by Shiffman, M. A., 267-277, Dekker, Inc., 2001.

292. **Tomlinson, M. J., and Schenk, N. L.:** Autogenous fat implantation as a treatment for chronic frontal sinusitis in a cat. *J Am Vet Med Assoc,* 167(10): 927, 1975.

293. **Tsuru, S.:** Proceedings: Preservation of marine and fresh water algae by means of freezing and freeze-drying. *Cryobiology,* 10(5): 445-52, 1973.

294. **Tucker, M.; Morton, P.; and Liebermann, J.:** Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,* 113 Suppl 1: S24-7, 2004.

295. **Tuffier, T.:** Abcès gangreneux du poumon ouvert dans les broches; hémoptysies répétées opération par décollement pleuro-pariétal; guérison. *Bull et Mem Soc Chir de Par,* 37: 134, 1985.

296. **Uchida, J.:** Free fat grafting for the upper eye lid. *Jap J Plast Reconstr Surg,* 8(4): 279, 1965.

297. **Vague, J.; Boyer, J.; Jubelin, J.; Nickolino, C.; and Pinto, C.:** Adipomuscular ration in human subjects. In *Physiopathology of Adipose tissue*, pp. 360. Edited by Vague, J., and Richard, D., 360, Amsterdam, Excerpta Medica, 1969.

298. **Valdez, D. M., Jr.; Miyamoto, A.; Hara, T.; Seki, S.; Kasai, M.; and Edashige, K.:** Water- and cryoprotectant-permeability of mature and immature oocytes in the medaka (Oryzias latipes). *Cryobiology,* 50(1): 93-102, 2005.

299. **van der Meulen:** Considérations générales sur les greffes graisseuses et serorgraisseuses épiloiques et luers pricipales applications. Paris thése. pp. 11. Edited, 11, 1919.

300. **Vassaux, G.; Negrel, R.; Ailhaud, G.; and Gaillard, D.:** Proliferation and differentiation of rat adipose precursor cells in chemically defined medium: differential action of anti-adipogenic agents. *J Cell Physiol,* 161(2): 249-56, 1994.

301. **Verderame, P.:** Ueber Fetttransplantation bei adhaerenten Knochennarben am Orbitalrand. *Klin Monatsbl Augenh,* 7: 433, 1909.

302. **von Heimburg, D.:** Gewebetechnologische Herstellung von Fettgewebe auf der Basis kultivierter humaner primärer Präadipozyten und dreidimensionaler Träger zur rekonstruktion von Weichgewebsdefekten. Edited, Aachen, 2001.

303. **von Heimburg, D.; Lemperle, G.; Dippe, B.; and Kruger, S.:** Free transplantation of fat autografts expanded by tissue expanders in rats. *Br J Plast Surg,* 47(7): 470-6, 1994.

304. **von Heimburg, D., and Pallua, N.:** Two-year histological outcome of facial lipofilling. *Ann Plast Surg,* 46(6): 644-6., 2001.

305. **Wabitsch, M.; Heinze, E.; Hauner, H.; Shymko, R. M.; Teller, W. M.; De Meyts, P.; and Ilondo, M. M.:** Biological effects of human growth hormone in rat adipocyte precursor cells and newly differentiated adipocytes in primary culture. *Metabolism,* 45(1): 34-42, 1996.

306. **Wahrenberg, H.; Lonnqvist, F.; and Arner, P.:** Mechanisms underlying regional differences in lipolysis in human adipose tissue. *J Clin Invest,* 84(2): 458-67, 1989.

307. **Walter, C.:** The free dermis fat transplantation as adjunct in the surgery of the parotid gland. *Laryngol Rhinol Otol,* 54(5): 435, 1975.

308. **Walter, C.:** Should free dermis-fat transplantation still be considered for use in the face? *HNO,* 22(4): 110, 1974.

309. **Wetmore, S. J.:** Injection of fat for soft tissue augmentation. *Laryngoscope,* 99(1): 50-7, 1989.

310. **Wiederer, O., and Loffler, G.:** Hormonal regulation of the differentiation of rat adipocyte precursor cells in primary culture. *J Lipid Res,* 28(6): 649-58, 1987.

311. **Woods, E. J.; Zieger, M. A.; Gao, D. Y.; and Critser, J. K.:** Equations for obtaining melting points for the ternary system ethylene glycol/sodium chloride/water and their application to cryopreservation. *Cryobiology,* 38(4): 403-7, 1999.

312. **Wrede, L.:** Freie Fettplastiken, Ersatz des os lunatum. *Muenchen Med Wochenschr,* 62: 1727, 1915.

313. **Zeno, L.:** Injerto de grasa en la correccion de las depresiones cicatriciales. *Ann de Cir,* 7: 52, 1941.

314. **Zertusche, A.:** Exenteración del globo ocular con implantacion de grasa. *An Soc Mex de Oftal y Otorino-laring,* 16: 202, 1941.

315. **Zieger, M. A.; Tredget, E. E.; and McGann, L. E.:** Mechanisms of cryoinjury and cryoprotection in split-thickness skin. *Cryobiology,* 33(3): 376-89, 1996.

316. **Zieger, M. A.; Tredget, E. E.; Sykes, B. D.; and McGann, L. E.:** Injury and protection in split-thickness skin after very rapid cooling and warming. *Cryobiology,* 35(1): 53-69, 1997.

9 Anhang

9.1 Protokolle

Protokoll „Lipo-Filling“
1. Liposuction nach „Coleman“ 2. Zentrifugation der Liposuctionsspritzen für 5 min 3. bei 490 U/min (50 x g) – Minifuge T; Heraeus 4. Ablassen des Unterstandes (Blut, Zelldetritus) 5. Aufnehmen des Überstandes (Lipide) 6. Transplantation **6. Herstellung einer Einzelzellsuspension** 7. Entnahme eines „Fettläppchens“ (50 mg) 8. Überführung in ein Eppendorf-Cup 9. Zugabe der Collagenase-Lösung 500µl (1,5 % BSA, 0,2 % Collagenase CLS) 10. Inkubation für 45 min bei 37°C 11. Zugabe von 1,5 ml Adipozyten-Anwachs Mediums 12. Zentrifugation im Eppendorf Cup bei 500 U/min (28 x g) für 2 min 13. Absaugen des Unterstands

Farbstoffaufnahme-Test FAD/EB

- modifiziert -

1. Protokoll „Lipo-Filling“
2. Eppendorf-Cups zentrifugieren 500U/min; 2 min (28 x g)
3. Adipozyten-Anwachsmedium 500 µl – 10 min
4. Fluoresceindiacetat (5mg/ml) 2,5 µl
5. Ethidiumbromid (0,5mg/ml) 2,5 µl
6. Inkubation für 3 min bei 37°C
7. Überführung von 10µl in eine Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal
8. Betrachtung und Auszählung der Zellen unter dem UV-Mikroskop

MTT-Test Adipozyten

- modifiziert -

1. Protokoll Lipofilling (bis Unterpunkt 6.)
2. PBS-Lösung zugeben – 200 µl
3. MTT-Lösung zugeben – 80 µl
4. Inkubation für 5h bei 37°C (Wasserbad)
5. Eppendorf-Cups zentrifugieren – 500 U/min; 2min (28 x g)
6. Unterstand absaugen
7. Zugabe von SDS (3%ig) – 60 µl
8. Zugabe von Isopropanol/HCL – 300 µl
9. Inkubation für 15min bei 37°C
10. intermittierend vortexen
11. Überführung des Eppendorf-Cup Inhalts auf die Well-Platte (3x100 µl)
12. Photometrie bei 570 nm Referenzwellenlänge 650 nm

XTT-Test Adipozyten

- modifiziert -

1. Protokoll Lipofilling (bis Unterpunkt 6.)
2. PBS-Lösung zugeben – 200 µl
3. XTT-Lösung zugeben – 80 µl
4. Inkubation für 5h bei 37°C (Wasserbad)
5. Eppendorf-Cups zentrifugieren – 500 U/min; 2min (28 x g)
6. Unterstand absaugen → Überführung in Eppendorf-Cup
7. Überführung des Eppendorf-Cup Inhalts auf die Well-Platte (3x100 µl)
8. Photometrie bei 470 nm Referenzwellenlänge 650 nm

GPDH – Test Adipozyten

- modifiziert -

1. Gewinnung des freien GPDH
   a. Frische Zellen: in 1000 µl PBS aufnehmen und Unterstand absaugen
   oder
   b. Gefrorene Zellen: Unterstand (CPA) absaugen
2. Unterstand (aus 1. a oder b) bei 13.500 U/min 5 min. zentrifugieren
3. Küvetten-Ansatz:
   a. Tram-Puffer – 100 µl
   b. Assay-Puffer – 100 µl
   c. 2-Mercaptoethanol – 20 µl
   d. NADH-Lösung – 50 µl
   e. H_2O – 630 µl
4. 100 µl des Überstandes (aus 2. - Enzym) zum Küvettenansatz hinzugeben
5. 200 µl des Küvetten-Ansatzes in eine 96 Well-Platte überführen
6. Start-Zugabe von 20 µl DHAP
7. photometrische Messung bei 340nm

Protokoll Einfrieren mit CPA

1. Liposuction nach „Coleman“
2. Zentrifugation der Liposuctionsspritzen für 5 min bei 490 U/min (28 x g)
3. Ablassen des Unterstandes (Blut, Zelldetritus)
4. Aufnehmen des Überstandes (Lipide)
5. jeweils 0,5 g Fett pro Cryovial
6. Zugabe der Kryoprotektive, jeweils 2 ml
7. Verschließen der Cryoviales + Beschriftung
8. Überführen der Proben in die Strata-Kühler
9. Einbringen der Kühler in die Gefrierschränke
10. nach Angleichung der Proben- und Lagerungstemperatur (Kühlrate 1°C/min) Überführung der Proben in Lagerungskisten der Gefrierschränke

Protokoll Auftauen

1) Entnahme der Cryoviales aus dem Gefrierschrank
2) Überführung der Proben in ein Wasserbad 37°C (kein Schüttelbad)
3) Entnahme der Proben nach drei Minuten
4) weitere Verwendung:
   a. Unterstand (Medium) → GPDH-Bestimmung
   b. Überstand (Fett) → Färbungen, MTT bzw. XTT-Tests

9.2 Tabellen

9.2.1 MTT

LF-Nr.	20	21	22	23	24		
Sex	w	w	w	w	w		
Locus	Hüfte/OS	Abdomen	Abdomen	Abdomen	Abdomen	Mittelwert	Stabw.
Alter (Jahre)	43	49	36	32	41	**40,2**	**5,8447**
MTT frisch	0,4080	0,4710	0,5290	0,4810	0,4040	**0,4586**	**0,0472**
MTT gefroren -20° C 48h I	0,0320	0,0380	0,0120	0,0050	0,0300	**0,0234**	**0,013**
MTT gefroren -20° C 48h II	0,0280	0,0310	0,0190	0,0100	0,0270	**0,0230**	**0,0076**
MTT gefroren -20° C 48h III	0,0850	0,1020	0,1260	0,0980	0,0760	**0,0974**	**0,0170**
MTT gefroren -20° C 48h IV	0,1480	0,1830	0,2120	0,1790	0,1430	**0,1730**	**0,0252**
MTT gefroren -20° C 1w I	0,0300	0,0290	0,0180	0,0080	0,0220	**0,0214**	**0,0080**
MTT gefroren -20° C 1w II	0,0280	0,0320	0,0180	0,0100	0,0260	**0,0228**	**0,0079**
MTT gefroren -20° C 1w III	0,0810	0,0860	0,1050	0,0950	0,0710	**0,0876**	**0,0117**
MTT gefroren -20° C 1w IV	0,1350	0,1540	0,1790	0,1580	0,1370	**0,1526**	**0,0160**
MTT gefroren -20° C 2w I	0,0180	0,0210	0,0220	0,0230	0,0190	**0,0206**	**0,0019**
MTT gefroren -20° C 2w II	0,0190	0,0210	0,0250	0,0220	0,0180	**0,0210**	**0,0024**
MTT gefroren -20° C 2w III	0,0780	0,0890	0,1020	0,0880	0,0740	**0,0862**	**0,0098**
MTT gefroren -20° C 2w IV	0,1360	0,1570	0,1710	0,1630	0,1290	**0,1512**	**0,0161**
MTT gefroren -20° C 1m I	0,0160	0,0180	0,0190	0,0190	0,0170	**0,0178**	**0,0012**
MTT gefroren -20° C 1m II	0,0150	0,0180	0,0190	0,0180	0,0160	**0,0172**	**0,0015**
MTT gefroren -20° C 1m III	0,0720	0,0820	0,0950	0,0820	0,0700	**0,0802**	**0,0089**
MTT gefroren -20° C 1m IV	0,1290	0,1520	0,1700	0,1560	0,1270	**0,1468**	**0,0165**
MTT gefroren -20° C 6m I	0,0140	0,0180	0,0180	0,0190	0,0160	**0,0170**	**0,0018**
MTT gefroren -20° C 6m II	0,0140	0,0120	0,0190	0,0170	0,0150	**0,0154**	**0,0024**
MTT gefroren -20° C 6m III	0,0700	0,0810	0,0930	0,0790	0,0710	**0,0788**	**0,0083**
MTT gefroren -20° C 6m IV	0,1210	0,1520	0,1670	0,1490	0,1230	**0,1424**	**0,0177**
MTT gefroren -20° C 1y I	0,0100	0,0120	0,0160	0,0140	0,0090	**0,0122**	**0,0026**
MTT gefroren -20° C 1y II	0,0130	0,0100	0,0120	0,0130	0,0110	**0,0118**	**0,0012**
MTT gefroren -20° C 1y III	0,0660	0,0780	0,0900	0,0710	0,0670	**0,0744**	**0,0089**
MTT gefroren -20° C 1y IV	0,1210	0,1460	0,1610	0,1480	0,1210	**0,1394**	**0,0159**
MTT gefroren -80° C 48h I	0,0330	0,0460	0,0180	0,0170	0,0260	**0,0280**	**0,0107**
MTT gefroren -80° C 48h II	0,0210	0,0200	0,0280	0,0240	0,0200	**0,0226**	**0,0031**
MTT gefroren -80° C 48h III	0,0870	0,0870	0,1150	0,0970	0,0850	**0,0942**	**0,0112**
MTT gefroren -80° C 48h IV	0,1480	0,1660	0,1940	0,1610	0,1490	**0,1636**	**0,0167**
MTT gefroren -80° C 1w I	0,0200	0,0230	0,0250	0,0240	0,0210	**0,0226**	**0,0019**
MTT gefroren -80° C 1w II	0,0210	0,0250	0,0280	0,0260	0,0210	**0,0242**	**0,0028**
MTT gefroren -80° C 1w III	0,0890	0,0950	0,1150	0,1010	0,0870	**0,0974**	**0,0101**
MTT gefroren -80° C 1w IV	0,1420	0,1710	0,1890	0,1670	0,1460	**0,1630**	**0,0172**
MTT gefroren -80° C 2w I	0,0210	0,0240	0,0260	0,0230	0,0200	**0,0228**	**0,0021**
MTT gefroren -80° C 2w II	0,0200	0,0230	0,0270	0,0230	0,0200	**0,0226**	**0,0026**
MTT gefroren -80° C 2w III	0,0790	0,0890	0,1020	0,0900	0,0780	**0,0876**	**0,0087**
MTT gefroren -80° C 2w IV	0,1370	0,1590	0,1850	0,1670	0,1390	**0,1574**	**0,0180**
MTT gefroren -80° C 1m I	0,0170	0,0190	0,0220	0,0200	0,0130	**0,0182**	**0,0031**
MTT gefroren -80° C 1m II	0,0160	0,0180	0,0220	0,0200	0,0140	**0,0180**	**0,0028**
MTT gefroren -80° C 1m III	0,0730	0,0810	0,0980	0,0850	0,0660	**0,0806**	**0,0109**
MTT gefroren -80° C 1m IV	0,1320	0,1480	0,1760	0,1550	0,1250	**0,1472**	**0,0180**
MTT gefroren -80° C 6m I	0,0150	0,0180	0,0180	0,0190	0,0130	**0,0166**	**0,0022**
MTT gefroren -80° C 6m II	0,0130	0,0170	0,0190	0,0200	0,0130	**0,0164**	**0,0029**
MTT gefroren -80° C 6m III	0,0700	0,0770	0,0920	0,0810	0,0580	**0,0756**	**0,0113**
MTT gefroren -80° C 6m IV	0,1280	0,1430	0,1750	0,1490	0,1180	**0,1426**	**0,0195**

MTT gefroren -80° C 1y I	0,0140	0,0180	0,0170	0,0140	0,0120	**0,0150**	**0,0022**
MTT gefroren -80° C 1y II	0,0130	0,0150	0,0180	0,0210	0,0100	**0,0154**	**0,0038**
MTT gefroren -80° C 1y III	0,0690	0,0770	0,0900	0,0810	0,0530	**0,0740**	**0,0125**
MTT gefroren -80° C 1y IV	0,1250	0,1410	0,1750	0,1410	0,1190	**0,1402**	**0,0195**

Abbildung 120: ***MTT-Messung;*** *wenn nicht abweichend angegeben, handelt es sich um die gemessene Extinktion*

9.2.2 XTT

LF-Nr.	20	21	22	23	24		
Sex	w	w	w	w	w		
Alter (Jahre)	43	49	36	32	41		
Locus	Hüfte/OS	Abdomen	Abdomen	Abdomen	Abdomen	Mittelwert	Stabw.
XTT frisch	0,4510	0,4600	0,4670	0,3810	0,4330	**0,4384**	**0,031**
XTT gefroren -20° C 48h I	0,1140	0,1250	0,0510	0,0860	0,1080	**0,0968**	**0,026**
XTT gefroren -20° C 48h II	0,1190	0,1210	0,1250	0,1000	0,1120	**0,1154**	**0,009**
XTT gefroren -20° C 48h III	0,1720	0,1630	0,1690	0,1450	0,1620	**0,1622**	**0,009**
XTT gefroren -20° C 48h IV	0,2680	0,2580	0,2690	0,2260	0,2370	**0,2516**	**0,017**
XTT gefroren -20° C 1w I	0,1120	0,1140	0,1110	0,0920	0,0970	**0,1052**	**0,009**
XTT gefroren -20° C 1w II	0,1150	0,1160	0,1150	0,0910	0,1120	**0,1098**	**0,009**
XTT gefroren -20° C 1w III	0,1650	0,1720	0,1620	0,1270	0,1590	**0,1570**	**0,016**
XTT gefroren -20° C 1w IV	0,2630	0,2590	0,2450	0,2230	0,2320	**0,2444**	**0,015**
XTT gefroren -20° C 2w I	0,1010	0,1130	0,1050	0,0970	0,1030	**0,1038**	**0,005**
XTT gefroren -20° C 2w II	0,1060	0,1050	0,1190	0,0910	0,0940	**0,1030**	**0,010**
XTT gefroren -20° C 2w III	0,1550	0,1540	0,1470	0,1390	0,1320	**0,1454**	**0,009**
XTT gefroren -20° C 2w IV	0,2540	0,2450	0,2400	0,2220	0,2370	**0,2396**	**0,011**
XTT gefroren -20° C 1m I	0,0970	0,0890	0,1110	0,0810	0,0775	**0,0911**	**0,012**
XTT gefroren -20° C 1m II	0,1040	0,0910	0,1160	0,0740	0,0870	**0,0944**	**0,014**
XTT gefroren -20° C 1m III	0,1410	0,1560	0,1130	0,1110	0,1460	**0,1334**	**0,018**
XTT gefroren -20° C 1m IV	0,2420	0,2380	0,2320	0,2160	0,2290	**0,2314**	**0,009**
XTT gefroren -20° C 6m I	0,0850	0,0820	0,1010	0,0750	0,0710	**0,0828**	**0,010**
XTT gefroren -20° C 6m II	0,0930	0,0840	0,1100	0,0680	0,0790	**0,0868**	**0,014**
XTT gefroren -20° C 6m III	0,1350	0,1480	0,1070	0,1010	0,1370	**0,1256**	**0,018**
XTT gefroren -20° C 6m IV	0,2310	0,2290	0,2130	0,2010	0,2200	**0,2188**	**0,011**
XTT gefroren -20° C 1y I	0,0830	0,0790	0,0980	0,0740	0,0710	**0,0810**	**0,009**
XTT gefroren -20° C 1y II	0,0910	0,0800	0,1100	0,0650	0,0780	**0,0848**	**0,015**
XTT gefroren -20° C 1y III	0,1350	0,1440	0,1060	0,1000	0,1330	**0,1236**	**0,017**
XTT gefroren -20° C 1y IV	0,2300	0,2230	0,2120	0,1980	0,2200	**0,2166**	**0,011**
XTT gefroren -80° C 48h I	0,1250	0,1350	0,0980	0,1090	0,1220	**0,1178**	**0,013**
XTT gefroren -80° C 48h II	0,1190	0,1280	0,1190	0,1080	0,1170	**0,1182**	**0,006**
XTT gefroren -80° C 48h III	0,1740	0,1590	0,1860	0,1430	0,1580	**0,1640**	**0,015**
XTT gefroren -80° C 48h IV	0,2690	0,2650	0,2630	0,2230	0,2490	**0,2538**	**0,017**
XTT gefroren -80° C 1w I	0,1120	0,1050	0,1160	0,0910	0,1040	**0,1056**	**0,009**
XTT gefroren -80° C 1w II	0,1150	0,1220	0,1110	0,0970	0,1030	**0,1096**	**0,009**
XTT gefroren -80° C 1w III	0,1600	0,1610	0,1630	0,1430	0,1710	**0,1596**	**0,009**
XTT gefroren -80° C 1w IV	0,2630	0,2590	0,2640	0,2270	0,2450	**0,2516**	**0,014**
XTT gefroren -80° C 2w I	0,1090	0,1080	0,1050	0,0960	0,1080	**0,1052**	**0,005**
XTT gefroren -80° C 2w II	0,1070	0,1030	0,1060	0,0950	0,1000	**0,1022**	**0,004**
XTT gefroren -80° C 2w III	0,1550	0,1490	0,1470	0,1450	0,1540	**0,1500**	**0,004**
XTT gefroren -80° C 2w IV	0,2540	0,2430	0,2700	0,2110	0,2410	**0,2438**	**0,019**
XTT gefroren -80° C 1m I	0,0960	0,0930	0,1050	0,0950	0,0860	**0,0950**	**0,006**
XTT gefroren -80° C 1m II	0,1040	0,1090	0,1030	0,0820	0,1070	**0,1010**	**0,010**
XTT gefroren -80° C 1m III	0,1410	0,1530	0,1390	0,1240	0,1410	**0,1396**	**0,009**
XTT gefroren -80° C 1m IV	0,2410	0,2380	0,2560	0,1970	0,2240	**0,2312**	**0,020**
XTT gefroren -80° C 6m I	0,0890	0,0910	0,0990	0,0940	0,0830	**0,0912**	**0,005**
XTT gefroren -80° C 6m II	0,1010	0,1040	0,0980	0,0810	0,1040	**0,0976**	**0,009**
XTT gefroren -80° C 6m III	0,1400	0,1490	0,1370	0,1220	0,1350	**0,1366**	**0,009**
XTT gefroren -80° C 6m IV	0,2400	0,2330	0,2510	0,1950	0,2230	**0,2284**	**0,019**
XTT gefroren -80° C 1y I	0,0850	0,0850	0,0980	0,0920	0,0790	**0,0878**	**0,007**

XTT gefroren -80° C 1y II	0,0980	0,0960	0,0910	0,0740	0,0970	**0,0912**	**0,009**
XTT gefroren -80° C 1y III	0,1340	0,1380	0,1310	0,1130	0,1290	**0,1290**	**0,009**
XTT gefroren -80° C 1y IV	0,2380	0,2320	0,2440	0,1910	0,2190	**0,2248**	**0,019**

Abbildung 121: ***XTT-Daten;*** *wenn nicht abweichend angegeben, handelt es sich um die gemessene Extinktion*

9.2.3 GPDH

LF-Nr.	20	21	22	23	24		
Sex	w	w	w	w	w		
Alter (Jahre)	43	49	36	32	41		
Locus	Hüfte/OS	Abdomen	Abdomen	Abdomen	Abdomen	Mittelwert	Stabw.
GPDH frisch	0,8484	1,1918	1,6362	1,2524	1,7978	**1,3453**	**0,3434**
GPDH gefroren -20° C 48h I	4,5854	5,2924	9,8373	8,1001	10,8473	**7,7325**	**2,4644**
GPDH gefroren -20° C 48h II	4,5248	6,4034	8,6454	6,7063	9,6151	**7,179**	**1,7776**
GPDH gefroren -20° C 48h III	2,9896	4,2218	5,7772	4,4036	6,3629	**4,751**	**1,1918**
GPDH gefroren -20° C 48h IV	1,7979	2,5856	3,8784	2,7068	3,8582	**2,9654**	**0,808**
GPDH gefroren -20° C 1w I	5,6156	7,4536	10,0797	7,6961	11,0897	**8,387**	**1,9594**
GPDH gefroren -20° C 1w II	5,2318	7,3325	10,0595	7,6961	11,0897	**8,282**	**2,0806**
GPDH gefroren -20° C 1w III	3,0704	4,3429	5,9589	4,5449	6,6053	**4,9045**	**1,2524**
GPDH gefroren -20° C 1w IV	1,8584	2,6058	3,9995	2,8078	4,0602	**3,0664**	**0,8484**
GPDH gefroren -20° C 2w I	5,7569	7,4941	10,2211	7,8173	11,2715	**8,5122**	**1,9796**
GPDH gefroren -20° C 2w II	5,3328	7,4941	10,3019	7,8577	11,3321	**8,4638**	**2,1412**
GPDH gefroren -20° C 2w III	3,1512	4,4439	6,1609	4,6662	6,7669	**5,0378**	**1,2928**
GPDH gefroren -20° C 2w IV	1,9189	2,7269	3,6158	2,8482	4,1208	**3,0462**	**0,7676**
GPDH gefroren -20° C 1m I	5,4944	7,6557	10,3827	7,9183	11,4129	**8,5728**	**2,1008**
GPDH gefroren -20° C 1m II	4,5652	6,4437	8,9081	6,8477	9,7565	**7,3043**	**1,8382**
GPDH gefroren -20° C 1m III	3,1916	4,5046	6,0802	4,6662	6,7669	**5,0419**	**1,2524**
GPDH gefroren -20° C 1m IV	1,9594	2,8078	3,8582	2,9694	4,2218	**3,1631**	**0,808**
GPDH gefroren -20° C 6m I	5,4338	7,5951	10,5241	8,0193	11,3523	**8,585**	**2,121**
GPDH gefroren -20° C 6m II	4,6258	6,6053	9,0293	6,9891	9,9383	**7,4376**	**1,8786**
GPDH gefroren -20° C 6m III	3,2724	4,6258	6,3428	4,8479	6,8476	**5,1873**	**1,2726**
GPDH gefroren -20° C 6m IV	2,0603	2,8886	4,1006	3,0502	4,3026	**3,2805**	**0,8282**
GPDH gefroren -20° C 1y I	5,6156	7,7971	10,8473	8,3828	11,5341	**8,8354**	**2,1412**
GPDH gefroren -20° C 1y II	4,8682	6,7466	9,2515	7,2113	10,2413	**7,6638**	**1,8988**
GPDH gefroren -20° C 1y III	3,4744	4,7469	6,4541	5,0298	6,9891	**5,3449**	**1,2524**
GPDH gefroren -20° C 1y IV	2,1614	3,0502	5,8579	3,2724	4,4238	**3,7532**	**1,2726**
GPDH gefroren -80° C 48h I	7,2517	8,9283	7,8375	7,2719	6,1408	**7,4861**	**0,909**
GPDH gefroren -80° C 48h II	6,4034	8,9889	12,3017	9,4535	13,5945	**10,1484**	**2,5452**
GPDH gefroren -80° C 48h III	3,8582	5,4334	7,4133	5,7368	8,2103	**4,543**	**1,515**
GPDH gefroren -80° C 48h IV	2,8886	4,1208	5,6964	4,3026	3,6966	**4,141**	**0,909**
GPDH gefroren -80° C 1w I	7,2719	10,2211	14,0187	10,6453	15,3115	**11,4938**	**2,8684**
GPDH gefroren -80° C 1w II	6,4841	9,1101	12,5845	9,6151	13,6955	**10,2979**	**2,5856**
GPDH gefroren -80° C 1w III	3,9794	5,4944	7,6557	5,8782	8,3829	**6,2781**	**1,5756**
GPDH gefroren -80° C 1w IV	3,0502	4,2824	5,8579	4,4036	6,4437	**4,8076**	**1,212**
GPDH gefroren -80° C 2w I	7,4133	10,3827	14,2611	11,0089	15,7357	**11,7604**	**2,9492**
GPDH gefroren -80° C 2w II	7,3123	10,2413	14,0995	10,8271	15,4933	**11,5948**	**2,9088**
GPDH gefroren -80° C 2w III	4,0198	5,6156	7,7163	6,0196	8,5687	**6,3872**	**1,5958**
GPDH gefroren -80° C 2w IV	3,0502	4,3026	6,0398	4,5248	6,6053	**4,9046**	**1,2726**
GPDH gefroren -80° C 1m I	7,5143	10,6049	14,4025	11,0695	15,9781	**11,9139**	**2,9896**
GPDH gefroren -80° C 1m II	7,7769	10,3622	14,3419	10,9483	15,5741	**11,8008**	**2,8078**
GPDH gefroren -80° C 1m III	4,1208	5,8984	7,4537	6,1004	8,9081	**6,4963**	**1,5958**
GPDH gefroren -80° C 1m IV	3,2118	4,5046	6,1206	4,7469	6,7669	**5,0702**	**1,2524**
GPDH gefroren -80° C 6m I	7,6557	10,7261	14,5237	11,1705	16,1801	**12,0513**	**3,0098**
GPDH gefroren -80° C 6m II	7,9385	10,4837	14,5035	10,9483	15,7155	**11,918**	**2,828**
GPDH gefroren -80° C 6m III	4,3026	6,0398	7,5345	6,2014	9,0495	**6,6256**	**1,5958**
GPDH gefroren -80° C 6m IV	3,2926	4,6056	6,2822	4,8682	6,8275	**5,1752**	**1,2524**
GPDH gefroren -80° C 1y I	7,9385	11,0695	14,6651	11,5745	16,6043	**12,3704**	**3,0098**

GPDH gefroren -80° C 1y II	8,3425	10,7867	14,6445	11,3725	15,9781	**12,225**	**2,7472**
GPDH gefroren -80° C 1y III	4,6056	6,3226	8,1203	6,4236	9,3121	**6,9568**	**1,616**
GPDH gefroren -80° C 1y IV	3,7168	4,7672	6,6457	5,4136	7,3527	**5,5792**	**1,2928**

Abbildung 122: ***GPDH-Daten;*** *wenn nicht abweichend angegeben, handelt es sich um die GPDH-Menge in U/ml.*

9.3 Materialien

9.3.1 Chemikalien

- MTT-Kit: Cell Proliferation Kit I (MTT), Cat. No. 1465 007, Roche Diagnostic
- XTT-Kit: Cell Proliferation Kit II (XTT), Cat. No. 1465015, Roche Diagnostic
- FDA: Fluorescein Diacetate, F-7378, $C_{24}H_{16}O_7$, Sigma
- EB: Ethidium Bromide, E-1510, Sigma
- Trypanblau, Art. 11732, $C_{34}H_{24}Na_4O_{14}S_4$, Merck
- DMEM/HAM´s F-12, Cat. No. E15-813, PAA-Laboratories
- PBS: PBS Dulbecco 9,55 g/l, Cat. No. L 182-50, Biochrom AG
- Dextran: D-4876, Sigma
- PVP: Polyvinyl-Pyrrolidone, P5288, Sigma
- HES: Hydroxyethylstarch, H-6382, Sigma
- Glucose: Art. 8342, $C_6H_{12}O_6$, Merck
- DMSO: Dimethyl-Sulfoxide, D-2650, Sigma
- Bovine Serum Albumin Fraction V, Cat. No. K41-001-100, PAA Laboratories
- Collagenase: Collagenase Typ CLS 323 U/mg, Cat. No. CI-22, Biochrom AG
- GPDH: a-Glycerophosphatdehydrogenase, G-6751,
- NADH: b-Nicotinamide Adenine Dinucleotide, N-8129, $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2Na_2$
- TRAM-Puffer (Mischung)
- Assay-Puffer (Mischung)
- Mercaptoethanol: 2-Mercapto-Ethanol, M-3148, C_2H_6OS, Sigma
- DHAP: Dihydroxyacetonphosphate, D-7137, $C_3H_7O_6P$, Sigma
- Ethanol: 70%, Apotheke Universitätsklinikum, RWTH Aachen
- Coomassie-Brilliantblau: Art. 15444, $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$, Merck
- Phosphorsäure: ortho-Phosphorsäure 85%, UN 1805, Merck
- Glycerin, Art. 4093, $C_3H_8O_3$, Merck
- Händedesinfektion: Sterillium, Bode Chemie Hamburg

9.3.2 Geräte

- Zentrifuge: Heraeus Minifuge T
- Tischzentrifuge: Heraeus Biofuge A
- Kühlschrank: Kirsch, Bosch Kältemaschine, Bosch
- Gefrierschrank -18°C: Bosch

- Gefrierschrank -80°C: Jewett
- ELISA-Reader: MRX II Dynex Technologies
- Mikroskop: Telaval 31, Zeiss
- Mikroskop + UV-Licht
- Digitalkamera: D100, Nikon
- Wasserbad: GFL 1083
- Schüttel-Wasserbad: GFL 1092
- Magnetrührer: MR 3002, Heidolph
- Brutschrank: CO_2-Auto-Zero, Heraeus; Hera Cell 240, Heraeus
- Spülmaschine: Desinfektor Automatic G 7735, Miele
- Trockenschrank: B5090 E, Heraeus
- Vortex: Reax 2000, Heidolph
- Waage: Basic, Sartorius
- ph-Meter: Mikroprozessor-pH-Meter, Knick
- Sterilisator: 2540, Systec; Autoklav 23, Melag

9.3.3 Laborbedarf

- Pipetten: Reference, eppendorf
- Pipettenspitzen: epT.I.P.S. Reloads 01,-20 µl, order no. 0030 073.380, eppendorf
- Pipettenspitzen: epT.I.P.S. Reloads 20-300 µl, order no. 0030 073.444, eppendorf
- Pipettenspitzen: epT.I.P.S. Reloads 50-1000 µl, order no. 0030 073.460, eppendorf
- Reagiergefäße (Micro tubes), 1,5 ml, 39x10,8 mm, Ref. 72.690, Sarstedt
- Cryovial, steril, 2 ml, T-311-3, Simport Plastics
- Spritzen, 1 ml, Ref. 74220-01, Terumo
- Kanülen: stumpf, 0,40x25, B.Braun Melsungen
- Neuro-Tupfer, Webloy, 100x50 mm, Ref. 90012, Kendall
- Strata-Kühler: Cryo 1°C Freezing Container, Cat. No. 5100-0001, Nalgene
- Pipettierhilfe: Multipette plus, eppendorf
- Pipetten Combitips plus, 0,5 ml, Order No.: 0030069.226, eppendorf
- Pipetten Combitips plus, 2,5 ml, Order No.: 0030069.242, eppendorf
- Pipetten Combitips plus, 5,0 ml, Order No.: 0030069.250, eppendorf

- Pipetten Combitips plus, 10 ml, Order No.: 0030069.269, eppendorf
- Pipetierhilfe: pipetus-akku, Hirschmann Laborgeräte
- Pipetten: Serological Pipette 5 ml x 1/10, Cat. No. 94005, TPP
- Pipetten: Serological Pipette 5 ml x 1/10, Cat. No. 94005, TPP
- Petrischalen: Tissue Culture Dish, 100x20 mm, Cat. No. 83.1802, Sarstedt
- Zentrifugenröhrchen: Cellstar 50 ml, Cat. No. 227261, Greiner-bio-one
- Untersuchungshandschuhe, puderfrei, Latex: Safeskin Satin Plus, Kimberly-Clark
- Parafilm: Parafilm „M“, Pechiney Plastic Packing

9.4 Förderungen

Diese Arbeit wurde durch das START-Nachwuchsförderungsprogramm der Medizinischen Fakultät der RWTH-Aachen gefördert. (START AZ 45/03)

9.5 Publikationen

Paper

Wolter TP, von Heimburg D, Stoffels I, Groeger A, Pallua N
Cryopreservation of mature human adipocytes: in vitro measurement of viability. Ann Plast Surg. 2005 Oct;55(4):408-13

zitierfähige Abstracts

I. Stoffels, T.P. Wolter, D. v. Heimburg, N. Pallua
New Perspectives on Cryoconservation of Human Adipose Tissue for Autologous Transplantation, European Students´ Conference Abstract Book 2003, 14: 141

Wolter TP, von Heimburg D, Stoffels I, Pallua N
Optimizing Cryopreservation of Mature Human Adipocytes: In Vitro Measurement of Viability, Australian and New Zealand Journal of Surgery 2003;73 suppl: 284

Wolter, TP, von Heimburg, D, Stoffels, I, Pallua, N
Untersuchungen zur Kryokonservierung humanen Fettgewebes zur mehrzeitigen autologen Transplantation, Plastische Chirurgie 2003 (Sept.) Suppl 1: 46

Poster

Wolter T , Stoffels I , von Heimburg D, Hollweg G, Pallua N
In Vitro Measurement of Viabilty of Mature Human Adipose Cells after Cryopreservation.
XVIth Aachen Colloquium on Biomaterials - Aachen, Germany, 2003

Wolter T , von Heimburg D, Stoffels I , Pallua N
Optimizing cryopreservation of mature human adipocytes: in vitro measurement of viability.
IPRAS, Sydney, Australia 2003

Vorträge

Wolter T , von Heimburg D, Stoffels I , Pallua N
Validation of current methods of cryoconservation of human adipose tissue. 6. Annual Meeting European Conference of Scientists and Plastic Surgeons (ECSAPS), Wien, 27.-28. September 2002

Stoffels I, Wolter T , von Heimburg D, Pallua N
Cryopreservation of human Adipose - Tissue for repeated autologous transplantation. 14th European Students´ Conference 2003, Berlin, Germany

Wolter T , Stoffels I , von Heimburg D, Pallua N
Untersuchungen zur Kryokonservierung humanen Fettgewebes zur mehrzeitigen autologen Transplantation. 8. Jahrestagung der Vereinigung Deutscher Ästhetisch-Plastischer Chirurgen, Freiburg, 4.-5.10.2003

Wolter T , Stoffels I , Pallua N
Untersuchungen zur Kryokonservierung humaner Adipozyten zur mehrzeitigen autologen Transplantation.
121. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 27.-30. April 2004, ICC Berlin

Wolter TP, Stoffels I , von Heimburg D, Gempt J , Petersen A, Glasmacher B, Rau G, Pallua N
Establishing specific protocols for cryopreservation in autologous fat cell transfer.
7th ISAPS Conference, Houston, USA 2004

9.6 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr.med. Dr.med.univ. Prof.h.c. (RC) N. Pallua. Zum einen für die Überlassung des Themas und der damit verbundenen Möglichkeit in seiner Klinik promovieren zu dürfen und im Besonderen für die großzügige Hilfe bei der Probengewinnung, sowie für die jederzeit gewährte Unterstützung.

Mein ganz persönlicher Dank gilt Herrn Dr.med. T. P. Wolter. Er hat diese Arbeit von Beginn an betreut und war mir immer ein verständnisvoller, hilfsbereiter und freundschaftlicher Ratgeber.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr.med. D. von Heimburg, Praxisklinik Kaiserplatz Frankfurt, bedanken, der zu Beginn der Arbeit durch seinen Ideenreichtum zum Entstehen dieser Dissertation beigetragen hat.

Ebenfalls sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. J. Weis, Direktor des Instituts für Neuropathologie, bedanken, der freundlicherweise das Korreferat übernommen hat.

Für die Begleitung im Zell-Kultur-Labor der Klinik für Plastische Chirurgie möchte ich mich bei Frau T. Wollersheim bedanken, durch deren gute Tipps, im Verlauf der Laborarbeit, mir manche Rückschläge erspart geblieben sind.

Herrn Dipl.-Stat. S. Stanzel, Institut für Medizinische Statistik, Direktor Univ.-Prof. Dr.rer.nat. R.-D. Hilgers, danke ich herzlich für die statistische Betreuung der Arbeit.

Herrn Dr.med. B. Hollweg, Abteilung Elektronenmikroskopie des Instituts für Pathologie, Direktorin Frau Univ.-Prof. Dr.med. R. Knüchel-Clarke, danke ich herzlich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder.

Der größte Dank jedoch gilt meinen Eltern, die mich unermüdlich und liebevoll unterstützt haben und meinen akademischen Werdegang dadurch erst ermöglichten.

9.7 Curriculum vitae

Persönliche Informationen

- Geburtsdatum: 23. Dezember 1978
- Geburtsort: Geldern
- Familienstand: ledig
- Nationalität: deutsch
- Konfession: römisch-katholisch

Schulausbildung

08/1985 – 06/1989	Graf-Spee-Schule Essen-Bredeney
08/1989 – 06/1998	Grashof Gymnasium Essen-Bredeney
06/1998	Abitur Grashof Gymnasium

Ersatzdienst

07/1998 – 10/1999	Zivildienst im Rettungsdienst der Stadt Essen

Examina

04/2002	1. Ärztliche Prüfung
12/2006	2. Ärztliche Prüfung

Approbation

21.12.2006	Approbation als Arzt

Famulaturen

07/2001	Plastische Chirurgie, Bergmannsheil Bochum
08/2002	Plastische Chirurgie, Universitätsklinikum Aachen
03/2003	Radiologie, Universitätsklinikum Essen
09/2003	Plastische Chirurgie, Klinikum rechts der Isar
09/2004	Innere Medizin, Universitätsklinikum Aachen

Praktisches Jahr

1. PJ-Tertial	Plastische Chirurgie, Universitätsklinikum Aachen
2. PJ-Tertial	Chirurgie, G.F. Jooste Hospital Cape Town, Südafrika
3. PJ-Tertial	Innere Medizin, Kantonsspital Sursee, Schweiz

Ärztliche und Wissenschaftliche Tätigkeit

seit 04/2005	Forschungstätigkeit in der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie, Universitätsklinikum Aachen, Univ.-Prof. Dr. Dr. Prof. h.c. (RC) N. Pallua
seit 12/2006	Assistenzarzt in der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie, Universitätsklinikum Aachen