

AUS DER KLINIK FÜR MUND-, KIEFER- UND PLASTISCHER GESICHTSCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. DR. DENT. BERNHARD FRERICH

**MRT-Darstellung der Distribution nanopartikulär markierter
adipogener Stammzellen nach in vivo Applikation zellbesiedelter
Kollagenträger in SCID Mäuse**

INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON
CAROLINE HASLER

EINGEREICHT 2020

VERTEIDIGT 2021

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. DR. BERNHARD FRERICH, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: PROF. DR. ROBERT MLYNSKI, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. THORALF NIENDORF, CHARITÉ BERLIN



INHALTSVERZEICHNIS

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	1
2.1	Weichgewebsdefekte	1
2.2	Verfahren des Weichgewebsersatzes	2
2.2.1	Autologe Fetttransplantation	2
2.2.2	Mikrochirurgischer Gewebetransfer	3
2.2.3	Alloplastische und allogene Materialien	4
2.3	Tissue Engineering	4
2.3.1	Tissue Engineering im Mausmodell	5
2.4	Biomaterialien zur Formstabilität	6
2.5	Darstellung mittels MRT	7
2.5.1	MRT zur Eisendarstellung	8
2.6	Einsatz von Nanopartikeln als Kontrastmittel in der Bildgebung	9
2.7	Fragestellung und Überlegungen zum Versuchsmodell	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Charakterisierung der Stammzellen	11
3.2	Isolation, Amplifikation und Vorbereitung adipogener Stammzellen	12
3.3	Nanopartikel	13
3.3.1	Partikelmarkierung der ASC	13
3.3.2	Live-Dead-Assay zur Bestimmung der Zellvitalität nach Partikel- markierung	14
3.3.3	Ferrozin-Assay	15
3.3.4	BerlinerBlau/ Kernechtrot-Färbung	16
3.4	Kollagen-Carrier	16
3.4.1	Besiedlung der Kollagen-Carrier mit ASC	17
3.4.2	Visualisierung und Zellzahlbestimmung der ASC auf den Kollagen- Carriern mittels Hoechst-H 33342-Färbung und Hoechst-Assay	17
3.5	<i>In vivo</i> Untersuchungen	19
3.5.1	SCID-Mäuse	19
3.5.2	Untersuchung der SCID-Mäuse im MRT	19

3.5.3	Distribution implantierter adipogener Stammzellen	20
3.5.4	Auswertung der MRT-Daten	22
3.5.5	Statistische Auswertung	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Partikelmarkierung	23
4.1.1	Live-Dead-Assay: Nachweis der Zellvitalität nach Partikelmarkierung	23
4.1.2	Ferrozine-Assay	24
4.1.3	BerlinerBlau/ Kernechtrot- Färbung	25
4.2	Zellbesiedlung der Kollagen-Carrier	25
4.2.1	Qualitativer und quantitativer Nachweis der Kollagenbesiedlung mit ASC	25
4.2.2	Live-Dead-Assay vor Implantation der ASC besiedelten Kollagenträger	26
4.3	<i>In vivo</i> Ergebnisse der Distribution und Migration adipogener Stammzellen	27
4.3.1	Verlauf der Tierexperimente	27
4.3.2	Darstellung der Nanopartikel-markierten Zellen im MRT	29
4.3.3	Messung der Signalintensität in den Zielorganen	33
5	Diskussion	45
5.1	Narkose der Mäuse	45
5.2	Zell-Tracking im MRT	46
5.2.1	Leber	47
5.2.2	Niere	48
5.2.3	Gehirn	48
5.2.4	Skelettmuskulatur	49
5.2.5	Harnblase	49
5.2.6	Knochen	49
5.2.7	Injektionsareal	50
5.3	Distribution	51
5.4	Adipose tissue engineering	52
5.4.1	SCID-Mäuse vom Typ beige als Tiermodell	52
5.4.2	Kollagen-Carrier	52
5.5	Toxizität eisenoxidhaltiger Nanopartikel	53
5.6	Kanzerogenes Potential	54
6	Zusammenfassung	56
7	Anhang	58
7.1	Puffer und Lösungen	58
7.2	Reagenzien	59

8 Literatur	65
9 Danksagung	75
10 Lebenslauf	76
11 Eidesstattliche Erklärung	77

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3D	3-dimensional
Abb.	Abbildung(en)
ASA	American Society of Anesthesiologists
ASC	Adipose tissue derived stem cells
bFGF	basic fibroblast growth factor
BNF	bionisiertes Nanoferrit
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
Ca	Calcium
CAL	cell assisted lipotransfer
CT	Computertomographie
d	Tag(e)
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
DNA	desoxyribonucleic acid
Fe	Eisen
Fig.	Figur
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GRE	Gradientenechosequenz
h	Stunde(n)
HCC	hepatocellular carcinoma
HCHO	Formaldehyd

HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HES	Hydroxyethylstärke
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
IMDM	Iscoe's Modified Dubacco's medium
i.v.	intravenös
IVC	individually ventilated cages
K	Kontrolle
Koll	Kollagen-Carrier
M	Mittelwert
Mz	Magnetisierung
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
mMol	Millimol
Mon	Monat(e)
MR	Magnetresonanz
MRT	Magnetresonanztomograph(ie)
Ms	Millisekunde(n)
MSC	mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
NP	Nanopartikel
NKS	neonatales Kälberserum
Nr.	Nummer
OD	optical density
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglycol

PET	Positronen-Emissions-Tomograph(ie)
PDL	Poly-D-Lysin
ROI	region of interest
rpm	rotations per minute
s	Sekunden
SCID	severe combined immunodeficient
s.c.	subkutan
SPF	specific pathogen free
SPIO	superparamagnetic iron oxide
SVF	stromal vascular fraction
T	Tesla
Tab.	Tabelle
TE	Echozeit
TSE	Turbo-Spinecho
t	Zeit
USPIO	ultrasmall superparamagnetic iron oxide
VEGF	vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel

2. EINLEITUNG

Fettgewebe kann sich nicht selbst erneuern, wenn es geschädigt wurde [Kokai et al., 2019]. Für die Rekonstruktion von geschädigtem bzw. fehlendem Gewebe gibt es in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie eine Vielzahl an Behandlungen. Nach statistischen Erhebungen der American Society of Plastic Surgeons wurden im Jahr 2018 5,8 Mio. rekonstruktive Eingriffe durchgeführt, davon über 75 % nach Tumorresektionen. Insgesamt kann von 2008 - 2018 in den USA ein Anstieg an rekonstruktiven Eingriffen um rund 18 % verzeichnet werden [American Society of Plastic Surgeons, 2019] [American Society of Plastic Surgeons, 2008]. Dies zeigt den ständig wachsenden Bedarf an Transplantaten, die neben der Oberflächenrekonstruktion auch die biologische Funktion des zu ersetzenden Gewebes übernehmen können.

Trotz intensiver Forschungsarbeit ist die rekonstruktive Medizin noch immer auf der Suche nach einem geeigneten Weichgewebeersatz. Bis heute hat sich noch kein ideales und nachhaltiges Verfahren für die lokale Weichgewebsaugmentation herauskristallisiert. Das „Adipose tissue engineering“ stellt einen neuen Lösungsansatz dar. Derzeit bleiben auf diesem Forschungsgebiet weiterhin Fragen offen, wie ein langfristiger Volumenersatz *in vivo* ortsständig generiert werden kann.

Bei der Anwendung des tissue engineering zum Gewebe-Volumenersatz müssen natürlich auch Risiken bedacht und intensiv untersucht werden. Dabei zählt die Abwanderung von applizierten Stammzellen in ortsferne Gewebe und Organe zu den bekannten Risiken, die es zu untersuchen gilt. Unter anderem bergen die applizierten Stammzellen aufgrund ihres multipotenten Differenzierungsverhaltens das Risiko für die Bildung von Tumoren. In der vorliegenden Arbeit wurde das Distributionsverhalten der adipogenen Stammzellen in einem Mausmodell untersucht. Dabei wurde der Fokus auf die Abwanderung der ASC in lebenswichtige Organe wie Gehirn, Leber, Niere gelegt. Die dabei gewonnenen Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet und mit der aktuellen Literatur verglichen.

2.1 Weichgewebsdefekte

Subkutanes Fettgewebe prägt die Kontur des gesamten Körpers und ist damit maßgeblich an der äußeren Erscheinung des Menschen beteiligt. Weichgewebsdefekte führen zu Einschränkungen der Funktion und Ästhetik bis hin zur Entstellung. Die betroffenen Patienten

leiden häufig unter Stigmatisierung, Beeinträchtigung sozialer Kontakte, gesellschaftlicher Isolation und professioneller und finanzieller Benachteiligung. Diese Faktoren münden nicht selten in eine psychische Erkrankung [de Ávila et al., 2013] [Frejman et al., 2013]. Die Rekonstruktion und Substitution von Weichteilgewebe kann bei betroffenen Patienten den Leidensdruck verringern [Choi et al., 2010].

Es kann zwischen angeborenen und erworbenen Weichgewebsdefekten unterschieden werden. Erworbene Weichgewebsdefekte können traumatisch, postoperativ z. B. nach Mastektomie oder anderen Tumoroperationen, autoimmun, medikamentös und infektiös bedingt sein. Als Therapie stehen verschiedene Formen des Weichgewebsersatzes zur Verfügung. Häufig verwendete Methoden sind die autologe Fettgewebstransplantation oder die Verwendung alloplastischer und allogener Materialien [Haneke, 2014].

Auch im Bereich der ästhetischen Chirurgie besteht ein Bedarf an Weichgewebsersatzmaterialien, um altersbedingte Veränderungen zu korrigieren. Derzeit gängige Filler-Materialien wie Kollagen und Hyaluronsäure sind allerdings nicht dauerhaft, sodass die Applikation in regelmäßigen Abständen wiederholt werden muss. Des Weiteren bergen die Applikation von Hyaluronsäure und Kollagen durchaus Risiken, die im Folgenden beschrieben werden.

2.2 Verfahren des Weichgewebsersatzes

2.2.1 Autologe Fetttransplantation

Die autologe Fetttransplantation ist eine weitverbreitete Methode um kleine Weichgewebsdefekte zu decken. Beim sogenannten Lipofilling wird körpereigenes Fettgewebe aspiriert und nach Aufbereitung in Form von Zentrifugation und Sedimentation in das Defektareal injiziert [Coleman, 1995] [Gabriel et al., 2015]. Diese Methode ist aufgrund ihrer geringen Komplikations- bzw. Nebenwirkungsrate, guten Biokompatibilität, sowie schnellen und einfachen Verfügbarkeit, geringen Donormorbidität und geringen Kosten der heutige Standard of Care für Weichgewebsrekonstruktionen [Paolini et al., 2014] [Kasem et al., 2015] [Prantl et al., 2016] [Bellini et al., 2017]. Jedoch stellt sich die kurz anhaltende, schwer vorhersagbare Volumenstabilität dieses Verfahrens als nachteilig dar [Kaufman et al., 2007].

Das Hauptproblem besteht in der insuffizienten Vaskularisation, die zur Nekrose, Resorption und damit verbundenem Volumenverlust führt. Außerdem wird bei der Aspirationslipektomie ein Teil der Adipozyten zerstört und später im Gewebe resorbiert, wodurch es ebenfalls zu Volumenverlust und Bildung von Ölzysten und Bindegewebe kommen kann [Delay et al., 2009].

Der Volumenverlust variiert zwischen 25–80 %, wobei das Volumen circa drei bis vier Monate nach dem Eingriff konstant bleibt [Kølle et al., 2013] [Wang et al., 2015]. Da autologe Fetttransplantationen oft mit einem unvorhersehbaren Volumenverlust einhergehen, wurden Methoden zur Verbesserung der Volumenstabilität entwickelt. Der sogenannte

zellassistierte Lipotransfer (CAL) beschreibt die Anreicherung von Fetttransplantaten mit adipogenen Stammzellen (ASC), mit dem Ziel einer verbesserten Volumenstabilität des Fettimplantats. Yoshimura et al. (2010), Koh et al. (2012) und Kølbe et al. (2013) beschrieben in ihren klinischen Studien signifikant verbesserte Transplantat-Retentionen bei ASC angereicherten Fetttransplantaten. Auch die systematische Literaturrecherche von Rasmussen et al. (2017) zeigte verbesserte Langzeitergebnisse der Fetttransplantate bei Verwendung der CAL.

Malik et al. (2019) untersuchte autologe Fetttransplantate als Therapiemöglichkeit von schmerzhaften Amputationsstümpfen. Für diese Studie wurden Patienten ausgewählt, die aufgrund von starken Schmerzen im Bereich des Stumpfes keine Prothese tragen konnten. Der Fallgruppe wurde mit SVF angereichertes autologes Fett in den Narbenbereich des Stumpfes transplantiert. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich die autologe Fetttransplantation. Patienten beider Gruppen zeigten eine verminderte Schmerzsymptomatik im Bereich des Amputationsstumpfes. Bei den Patienten der Fallgruppe konnte nach 6 Monaten eine verbesserte Volumenstabilität des Fettimplantats nachgewiesen werden.

2.2.2 Mikrochirurgischer Gewebetransfer

Im Rahmen von großen Weichteildefekten, zum Beispiel nach Tumoroperationen im Kopf-Halsbereich, ist die lokal-regionale und freie Lappenplastik die Therapie der Wahl. Diese können entweder gestielt mit den zugehörigen blutversorgenden Gefäßen und Nerven oder frei durch Blutversorgung aus Blutgefäßen der neuen Umgebung transplantiert werden. Die Vaskularisation großvolumiger Transplantate wird durch den Anschluss von Transplantatgefäßen an die Empfängergefäße ermöglicht. Allerdings können die Lappenplastiken mit langen Operations- und Hospitalisationszeiten, starker Narbenbildung und Morbidität im Bereich der Entnahmestelle, sowie einem erhöhten Infektionsrisiko einhergehen [Chang et al., 2016] [Sun et al., 2017].

In der Literatur wird deshalb weiterhin über die optimale Behandlungsstrategie bei Kopf-Hals-Rekonstruktionen diskutiert. Sun et al. (2017) beschreibt in seiner Studie ein signifikant häufigeres Auftreten von Hämatomen, Wundheilungsstörungen und Dehiszenzen bis hin zu kompletten Lappenverlusten und notfallmäßigen Reoperationen bei freien Plastiken im Vergleich zu gestielten Plastiken. Im Gegensatz dazu kommt [Gabrysz-Forget et al., 2019] zu dem Ergebnis, dass freie Lappenplastiken im Gegensatz zur Pectorallappenplastiken (PMMF) mit einer geringeren Empfängermorbidität, weniger Infektionen, Dehiszenzen und Hämatomen bei Patienten assoziiert sind. Jedoch weisen freie Lappenplastiken oft längere Operationszeiten, höhere Kosten und häufigere postoperative Revisionen auf.

O'Neill et al. (2010) und Hsing et al. (2011) präsentieren in ihren Studien eine Überlegenheit der freien Lappenplastik gegenüber der gestielten bezüglich der Verständlichkeit der Sprache der Patienten nach den Eingriffen. Nach O'Neill et al. (2010) ermöglichen die freien Plastiken durch ihre verstärkte Mobilität und Nachgiebigkeit eine verbesserte

Artikulation. Hingegen beschreibt Zhang et al. (2014) eine schlechtere Artikulation der Patienten mit einer freien Lappenplastik.

Zusammenfassend sollte die Wahl der Rekonstruktionsmethode immer individuell unter Betrachtung der Patientenvoraussetzungen getroffen werden. Grundsätzlich scheinen freie Lappenplastiken eine geeignete Rekonstruktionsmethode für jüngere, relativ gesunde Patienten mit niedriger ASA-Klasse zu sein. Nichtsdestotrotz können gestielte Lappenplastiken in speziellen Indikationen bevorzugt werden.

2.2.3 Alloplastische und allogene Materialien

Alternative Ansätze zur Augmentation stellen die alloplastischen und allogenen Materialien dar, wie z.B. Teflon, Silikon, humanes oder bovines Kollagen und Hyaluronsäurepräparate. Abhängig von der Persistenz des Volumens kann man zwischen nicht-permanenten und permanenten Fillern unterscheiden.

Nicht-permanente, biologisch abbaubare Filler wie Kollagen oder Hyaluronsäure werden häufig zum Ausgleich kleinerer Gewebedefizite wie beispielsweise zur Faltenbehandlung, genutzt. Durch die Resorption der Materialien besteht kein langfristiger Gewebeersatz, sodass die Behandlungen wiederholt werden müssen, um einen langfristigen Effekt zu erzielen [Funt et al., 2013]. Hyaluronsäurederivate sind die am häufigsten benutzten nicht-permanenten Filler in Amerika und Europa, deren Effekt im Schnitt 6-18 Monate anhält [American Society of Plastic Surgeons, 2019].

Nicht-biologisch abbaubare, permanente Filler wie Polymethylmethacrylat (PMMA) und Silikon lösen Fremdkörperreaktionen aus, die wiederum die Kollagensynthese von Fibroblasten anregt. Das Kollagen lagert sich anschließend um die nicht resorbierbaren Mikrosphären der Filler ab und führt somit zu einem Volumenzuwachs [Hilinski et al., 2009]. Beim Vergleich der beiden Filler PMMA und Hyaluronsäure wiesen Hyaluronsäure-filler mit identischem Injektionsvolumen ein erhöhtes Risiko für Embolien auf [Nie et al., 2019].

Nebenwirkungen können bei allen dermalen Fillern auftreten. Abhängig von der Art des Fillers variieren die möglichen Komplikationen, sowie das zeitliche Auftreten dieser [Zielke et al., 2008]. Allerdings kann der permanente Charakter der nicht-resorbierbaren Filler zu länger anhaltenden und schwieriger zu behandelnden Komplikationen führen. Zu den möglichen Komplikationen zählen unter anderem Erytheme, Ödeme, Schmerzen, Infektionen, Granulombildung, bis hin zu lokalen Gewebesnekrosen und allergischen Reaktionen [Funt et al., 2013].

2.3 Tissue Engineering

Unter dem Tissue Engineering versteht man ein interdisziplinäres Gebiet aus Medizin, Natur-, Ingenieur- und Informationswissenschaften mit dem Ziel, Gewebesubstitute für

ein verletztes oder fehlendes Gewebe zur Wiederherstellung, Erhaltung und Verbesserung von Gewebefunktionen zu entwickeln [Borges et al., 2003] [Muschler et al., 2004].

Zur Herstellung dieser Gewebe werden, wie in der vorliegenden Arbeit ersichtlich, folgende Schritte eingeleitet: Zunächst erfolgt die Gewinnung der Zellen aus dem frisch exzidierten Gewebe. Anschließend werden die Zellen kultiviert, sodass sie bis zum Erreichen von Zellkonfluenz proliferieren. Danach erfolgt die Besiedlung der Träger *in vitro*, um diese abschließend *in vivo* zu implantieren.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der intraoperativen Gewinnung von Stammzellen, welche anschließend zeitnah im OP in die Defektstelle reappliziert werden.

2.3.1 Tissue Engineering im Mausmodell

Um eine erfolgreiche Implantation humaner Stammzellen im Mausmodell zu gewährleisten, ist eine Verträglichkeit mit dem Empfängerorganismus entscheidend. Im Versuchsaufbau wurden SCID-Mäuse verwendet, bei denen aufgrund ihres dreifachen Immundefekts eine Immunreaktion infolge der Implantation humaner Zellen unterdrückt wird. Somit wird eine xenogene Implantation ermöglicht [Sundberg et al., 1994]. Im Rahmen der Studie von Frerich et al. (2012) wurde bereits die Implantation adipogener Vorläuferzellen auf Kollagencarriern bei SCID-Mäusen umfangreich untersucht. Hier zeigte sich eine Differenzierung der adipogenen Vorläuferzellen in Fettgewebe innerhalb weniger Tage, allerdings wird schließlich ein Volumenverlust des Implantats über einen Zeitraum von vier Monaten beobachtet. Fettgewebe ist ein dreidimensionales Gewebe, das bis zu einer maximalen Strecke von 100 μm durch Diffusion suffizient mit Sauerstoff versorgt werden kann [Hosogai et al., 2007]. Bei größeren dreidimensionalen Fettgewebiskonstrukten reicht die Diffusion zur Erhaltung der Zellen nicht mehr aus. Die Gefäße aus dem umliegenden Gewebe sprießen erst nach circa acht Tagen ein und gelangen anfänglich nur in den Randbereich des Konstrukts. Die Zellen im Zentrum des Konstrukts werden unzureichend versorgt und sterben ab [Suga et al., 2010] [Eto et al., 2012]. Somit besteht die Problematik, die implantierten Fettzellen vor dem Absterben zu schützen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde im hiesigen Versuchsmodell auf Kollagencarrier mit einer Partikelgröße unter 1 mm zurückgegriffen, um eine ausreichende Diffusion zu gewährleisten. Des Weiteren ermöglicht die geringe Größe der Kollagenpartikel eine subkutane Implantation, die mit einer geringen Invasivität und damit reduzierten Empfängermorbidität einhergeht.

Im Rahmen des Tissue Engineering wären folgende Eigenschaften von Zellen von Vorteil: Die Zellen sollten minimalinvasiv gewonnen werden können, in großen Mengen verfügbar sein, reproduzierbar kultiviert werden können, ihr Proliferations- und Differenzierungsverhalten sollte vorhersehbar und steuerbar sein und sie sollten in autologes und autogenes Gewebe transplantiert werden können. Dabei scheinen hMSC ideale Eigenschaften aufzuweisen. Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in unterschiedlichste Gewebetypen [Zuk, 2013]. Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

gehören zu den adulten Stammzellen und weisen ein multipotentes Differenzierungsverhalten auf. Sie können sich in verschiedene Zelltypen, beispielsweise Adipozyten, Monozyten, Fibrozyten, Chondrozyten und Osteozyten differenzieren [Baksh et al., 2004] [Tang et al., 2012] [Fernández Vallone et al., 2013]. Ihre Funktion besteht unter anderem in der Regeneration und Reparatur im Rahmen von Wundheilungsprozessen nach Gewebeschädigung [Coradeghini et al., 2010] [Caruana et al., 2015] [Simonacci et al., 2017].

Dabei können humane mesenchymale Stammzellen unter anderem aus Knochenmark (bone marrow derived stem cells, BMSC) und Fettgewebe (adipose derived stem cells, ASC) gewonnen werden. Aufgrund des geringen Komplikationsrisikos und der hohen Dichte an MSCs wird häufig die Gewinnung aus dem Fettgewebe bevorzugt. ASC können leicht und in großen Mengen aus dem subkutanen Gewebe per Liposuktion gewonnen und anschließend isoliert und kultiviert werden [Zuk et al., 2001].

Aufgrund ihrer Eigenschaften kann man sie idealerweise beim Fettgewebs-Engineering verwenden. Die adipogenen Vorläuferzellen (ASC) sind im Vergleich zu den reifen Adipozyten resistenter gegenüber Ischämie, Mangel an Nährstoffen und mechanischem Stress, letztere sind deshalb schlechter transplantierbar. Somit können die sogenannten adipogenic derived stem cells den Zeitraum der anfänglich fehlenden Vaskularisation des Konstrukts überdauern [von Heimburg et al., 2001a] [von Heimburg et al., 2001b] [Suga et al., 2010]. In Betracht der einfachen Gewinnung, guten Verfügbarkeit und des hohen Differenzierungs- und Proliferationspotentials wurden die ASC für den Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit verwendet.

2.4 Biomaterialien zur Formstabilität

Ein Ziel des Fettgewebs-Engineering stellt die Volumen- und Formstabilität des Transplantats dar. Da die alleinige Transplantation der ASC dies nicht gewährleisten kann, wird über den Einsatz von Scaffolds versucht, die Stabilität anfänglich zu ermöglichen. Der Scaffold sollte bioverträglich und resorbierbar sein und als Träger für die Besiedlung mit Zellen dienen. Idealerweise würde der Scaffold resorbiert werden, wenn die implantierten Zellen selber ein stabiles Konstrukt gebildet hätten.

Auf der Suche nach einem geeigneten Scaffold stehen biologische und synthetische Materialien zur Verfügung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Kollagenpartikel unter 1 mm Durchmesser benutzt. Vorteile dieses Materials bestehen in der guten Bioverträglichkeit, der einfachen Besiedlung, sowie der Möglichkeit der geringinvasiven subkutanen Injektion. Hingegen wird sich vermutlich die geringe Formstabilität und schnelle Resorption des Materials nachteilig auswirken.

2.5 Darstellung mittels MRT

Die Kernmagnetresonanz beruht auf den Eigenschaften von Atomkernen mit ungerader Protonenzahl z.B. Wasserstoff (H^+). Diese besitzen im Grundzustand einen Drehimpuls (Kernspin), welcher einen magnetischen Dipolmoment bedingt.

Der menschliche Körper besteht zu ca. 60 % aus Wasser und damit zu einem großen Teil aus dem Proton Wasserstoff. Somit eignen sich wasserhaltige Gewebe im Gegensatz zu knöchernen Gewebe besonders gut zur MRT Darstellung [Hünerbein, 2017]. Ohne ein äußeres Magnetfeld liegen im Körper die Dipole ungeordnet vor und kompensieren sich gegenseitig. Bei Anlage eines äußeren Magnetfeldes richten sich die magnetischen Dipole entlang der Feldlinien, parallel oder antiparallel, aus. Ein größerer Teil an Protonen nimmt die energetisch günstigere Parallellposition ein. Dadurch entsteht eine Nettomagnetisierung (longitudinale M_z) [Hünerbein, 2017]. Die Protonen bewegen sich kreiselähnlich um die Längsachse des Magnetfeldes, was man als Präzession bezeichnet. Die Präzessionsfrequenz ist abhängig von der Stärke des äußeren Magnetfeldes und der stoffspezifischen Konstante [Kremers, 2017]. Durch einen definierten Hochfrequenzimpuls (HF) wird Energie auf die Protonen übertragen. Der Summenvektor der Spins wird um einen bestimmten Winkel ausgelenkt und rotiert nicht mehr in Z-Richtung, sondern in der xy-Ebene. Dadurch sinkt die longitudinale Magnetisierung (Nettomagnetisierung) und es entsteht die sogenannte Transversalmagnetisierung (M_{xy}). Gleichzeitig wird die Präzessionsbewegung der Spins synchronisiert [Kremers, 2017]. Nach der Anregung kehren die Protonen wieder in ihren Grundzustand zurück. Diesen Vorgang nennt man Relaxation. Man unterscheidet zwischen longitudinaler und transversaler Relaxation. Die longitudinale Relaxation beschreibt die Rückkehr der Protonen in Längsmagnetisierung (Z-Richtung) unter Energieabgabe an die Umgebung [Reith, 2011]. Die Zeitkonstante der Längsmagnetisierung heißt T_1 und ist die Zeit in ms, nach der sich 63 % der Längsmagnetisierung wieder erholt hat [Kremers, 2017]. Die transversale Relaxation beschreibt den Verlust der transversalen Magnetisierung durch die Dephasierung der Spins ohne Energieabgabe an die Umgebung. Die Transversalrelaxation beinhaltet zwei Komponenten: T_2 beschreibt den Energieaustausch unter den Spins, während T_2^* den zusätzlichen Phasenerfall durch konstante Inhomogenitäten charakterisiert.

Benachbarte Spins verursachen lokale, schnell wechselnde Magnetfeldinhomogenitäten (Spin-Spin-Wechselwirkung). Diese führen zur Dephasierung der einzelnen Spins. Die Zeit in ms, in der 63 % der Protonen dephasiert sind, wird als Zeitkonstante T_2 bezeichnet [Reith, 2011] [Kremers, 2017].

Das MRT-Gerät selbst und der Körper der untersuchten Person bedingen eine immer gleich starke Inhomogenität des äußeren Magnetfeldes. Diese konstanten Inhomogenitäten bewirken eine beschleunigte transversale Relaxation und somit einen rascheren Signalabfall als T_2 [Reith, 2011]. Die Zeitkonstante dieses Prozesses ist T_2^* . Da das Signal in T_2^* grundsätzlich schneller abfällt als in T_2 , werden kürzere Echozeiten und auch

kürzere Repetitionszeiten benötigt, was zu einer kürzeren Messzeit führt. Der Großteil an Inhomogenitäten, die den T2*-Effekt oder auch Suszeptibilitätseffekt ausmachen, tritt an Grenzflächen auf oder entsteht durch lokale magnetische Felder, z.B. durch den Einsatz von eisenoxidhaltigen Partikeln [Reith, 2011].

Unterschiedliche Gewebearten können somit abhängig von ihrer Protonendichte anhand ihrer unterschiedlichen T1- und T2-Eigenschaften von einander abgegrenzt werden. Wasserhaltige Gewebe wie z.B. Liquor erscheinen aufgrund ihrer langen T1 und T2 Zeiten in T1-gewichteten Sequenzen dunkel und in T2 gewichteten Sequenzen hell. Im Vergleich dazu besitzt Fettgewebe eine kurze T1- und T2-Zeit und stellt sich in T1- als auch T2-gewichteten Sequenzen hell dar. Abhängig von den gewichteten Parametern einer Messung, z.B. Time-to-echo oder Time-to-repetition, entstehen jeweils anders kontrastierte Bilder.

2.5.1 MRT zur Eisendarstellung

Wie bereits erwähnt verursachen Eisenmoleküle Magnetfeldinhomogenitäten, die zu einer Dephasierung der in der Nähe befindlichen Protonenspins führen. Dies bedingt eine beschleunigte transversale Relaxation, was zu einem Signalabfall in T2 führt. In der T2-Sequenz stellen sich eisenhaltige Gewebe schwarz dar [Schönnagel et al., 2013]. Man kann Eisen im Gewebe mittels MR-Technik durch die Spin-Echo- (SE), sowie die Gradienten-Echo-Methode (GRE) darstellen [Wood et al., 2008].

Bei der Spin-Echo-Methode werden nach einem 90°-Impuls die wieder dephasierten Protonen nach einer festgelegten Zeit mit einem 180°-Impuls rephasiert. Es wird somit ein zweites Signal, das sogenannte Spin-Echo erzeugt. Die Zeit zwischen der Applikation des 90°-Impulses und der maximalen Amplitude des Echo-Signals wird als „Time-to-echo“ (TE) bezeichnet. Die TE kann unterschiedlich lang gewählt werden. Mit längerer Echozeit sinkt die Signalintensität (schlechteres Signal zu Rausch Verhältnis) und steigt der Kontrast zwischen den Geweben. Die Gradienten-Sequenz (GRE) benutzt ein zusätzlich starkes Magnetfeld (Gradient), um die Protonen zu resynchronisieren. In der Spin-Echo-Sequenz wird die Relaxationszeit als T2 und in der GRE-Sequenz als T2* bezeichnet. Anstatt der Relaxationszeit wird oftmals der Begriff der Relaxationsrate R2 und R2* benutzt. Hierbei handelt es sich um reziproke Werte der jeweiligen Zeitkonstanten.

$$R2 = 1000/T2$$

$$R2^* = 1000/T2^*$$

Der Faktor 1000 wird eingefügt, da T2 und T2* in ms und R2 und R2* in reziproken Sekunden angegeben werden. Die Relaxationszeit R2* verhält sich proportional zur Eisenkonzentration [Stark et al., 1985].

In dieser Arbeit wurden die MRT-Messungen der Region of Interest (ROI) zur Eisenvisualisierung in der T2 sowie der R2* Sequenz durchgeführt.

2.6 Einsatz von Nanopartikeln als Kontrastmittel in der Bildgebung

Nanopartikel werden in der medizinischen Diagnostik und experimentellen Forschung verwendet, um einzelne Zellverbände, bestimmte Gewebe oder Strukturen sichtbar zu machen. Das *Tracking*, also die Nachverfolgung von Stammzellen mittels MRT im lebenden Organismus, konnte mit der Verwendung superparamagnetischer Eisenoxidpartikel (SPIO) erfolgreich gezeigt werden [Kedziorek et al., 2010] [Li et al., 2013] [Azevedo-Pereira et al., 2019] [Siegmund et al., 2017] [Kasten et al., 2015]. Partikel unter 30 nm verhalten sich superparamagnetisch, da die verwendeten Kristalle kleiner als die magnetischen Domänen sind. Superparamagnetismus bezeichnet die Eigenschaft, dass nach Abschalten des magnetischen Feldes keine Remanenzmagnetisierung bleibt [Bean et al., 1956]. Bei den verwendeten Nanopartikeln handelt es sich um ultra-small SPIO (USPIO) mit einem Durchmesser von unter 30 nm.

Aufgrund der superparamagnetischen Eigenschaften sowie der geringen Zytotoxizität eignen sich SPIO zum *cell tracking* [Kolecka et al., 2017] [Mishra et al., 2018]. Dabei ermöglicht die Internalisierung der Nanopartikel ein *Real time tracking* der Zellen innerhalb von Geweben über einen längeren Zeitraum. Basierend auf dem Suszeptibilitätseffekt bewirken eisenhaltige Kontrastmittel einen Signalabfall in der T2 gewichteten Sequenz, der sich als hypointenses Areal darstellt [Lawaczek et al., 2004] [Schönnagel et al., 2013].

In T2 gewichteten Sequenzen zeigen SPIOs sowohl in vitro als auch in vivo eine hohe Auflösung, sodass bereits kleine Zellverbände im MRT dargestellt werden können. Auch über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten weisen SPIOs eine gleichbleibende Intensität im MRT auf [Himmelreich et al., 2009] [Struys et al., 2013] [Kasten et al., 2015] [Siegmund et al., 2017]. Diese Langzeitstabilität und Sensitivität eignet sich besonders für die Durchführung von longitudinalen Studienmodellen wie den hier verwendeten Versuchsaufbau.

In vorausgegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass BNF-Starch Partikel im Vergleich zu Nanomag-D-SPIO Partikeln zwar einen größeren Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der ASC ausüben, aber bessere MRT-Detektionseigenschaften aufweisen [Kasten et al., 2014]. Aufgrund dessen wurde sich in der hier vorliegende Fragestellung entschieden, die Markierung der Zellen mit BNF-Starch-Partikeln vorzunehmen, um auch eine geringe Anzahl von Stammzellen visualisieren zu können.

2.7 Fragestellung und Überlegungen zum Versuchsmodell

Die Suche nach einem stabilen und nachhaltigen Fettgewebersatz stellt noch immer eine Herausforderung in der medizinischen Forschung dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kollagen-Carrier mit humanen mesenchymalen Stammzellen besiedelt und SCID-Mäusen subkutan injiziert, um einen Fettgewebsaufbau zu ermöglichen.

Vor dem Hintergrund einer potentiellen klinischen Anwendung soll die Frage geklärt werden, ob die eingebrachten Stammzellen ortsständig verbleiben und an der Geweberegeneration teilnehmen oder in angrenzende Gewebe und andere Organe abwandern. Die Detektion der Nanopartikel-markierten Stammzellen erfolgte mittels MRT. Die Distribution injizierter mesenchymaler Stammzellen war bereits Gegenstand mehrerer Studien [Gao et al., 2001] [Kurtz, 2008] [Jing et al., 2008] [Hu et al., 2012]. Allerdings beziehen sich diese Studien vorwiegend auf die intravenöse, intramedulläre, intraspinale, intraartikuläre, intraperitoneale und intraarterielle Implantation von Stammzellen. Des Weiteren wird zumeist der Frage nach lokalen Reaktionen im Implantatgebiet sowie in einzelnen Organen nachgegangen.

Im Rahmen dieses Versuchsvorhabens wurde die Distribution der subkutan lokal injizierten Stammzellen im Gesamtorganismus betrachtet. Dafür wurden den Tieren der Versuchsgruppe +NP mit Nanopartikeln (NP) markierte ASC subkutan injiziert. Die Versuchstiere der Versuchsgruppe +NP/Koll erhielten auf Kollagen-Carriern (Koll) befindliche, nanopartikulär (NP) markierte ASC. Als Kontrolle dienten die Versuchstiere der Kontrollgruppe K, denen unmarkierte ASC auf Kollagenträgern subkutan appliziert wurden. Die Überlegungen zum Versuchsaufbau basieren auf vorausgegangenen Studien zur Fettgewebsregeneration mit humanen adipogenen Stammzellen im SCID-Modell [Weinzierl et al., 2006] [Frerich et al., 2012] [Kasten et al., 2015]. Unter Beachtung der zuvor dargelegten Überlegungen wurde die Bearbeitung folgender Fragen Ziel dieser Arbeit:

- Erfolgt eine Abwanderung der markierten Stammzellen nach einer s.c. Applikation?
Wenn ja: Welche Organe sind betroffen?
- Kann die Distribution der Zellen mittels MRT eindeutig detektiert werden?
- Wie lange können die subkutan injizierten Stammzellen am Ort der Injektion detektiert werden?
- Bildet sich ein form- und volumenstabiles Fettgewebe am Ort der Injektion?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Charakterisierung der Stammzellen

Die internationale Gesellschaft für Stammzelltherapie erstellte 2006 die Definition der mesenchymalen Stammzelle anhand von drei Kriterien: Dazu zählen die Plastikadhärenz, eine spezifische Oberflächen-Antigen-Expression und ihr multipotentes Differenzierungspotential [Horwitz et al., 2005]. Laut erstem Kriterium müssen die MSC plastikadhärent sein, wenn sie unter standardisierten Kulturbedingungen gehalten werden. Zweitens muss der Nachweis mittels Durchflusszytometrie erbracht werden, dass ≥ 95 % der MSC Population die Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90 exprimieren. Weiterhin muss das Fehlen der Expression der Antigene CD45, CD34, CD11 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA Typ II bei ≥ 98 % der Zellen nachgewiesen werden. Drittens müssen die Zellen die Eigenschaften aufweisen, sich *in vitro* unter Standardbedingungen in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten differenzieren zu können [Dominici et al., 2006] [Zimmerlin et al., 2010].

In der vorliegenden Arbeit stützt sich die Charakterisierung der adipogenen Stammzellen unter anderem auf Untersuchungsergebnisse vorheriger Forschungsarbeiten von Zimmerlin et al. (2010) und Weinzierl et al. (2006).

Mittels Phasenkontrastmikroskopie konnten die ASC während des Versuchs beobachtet werden. Abbildung 3.1 zeigt adipogene Stammzellen vier Tage nach der Aussaat. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes zeigte sich ein plastikadhärentes Verhalten der adipogenen Stammzellen.

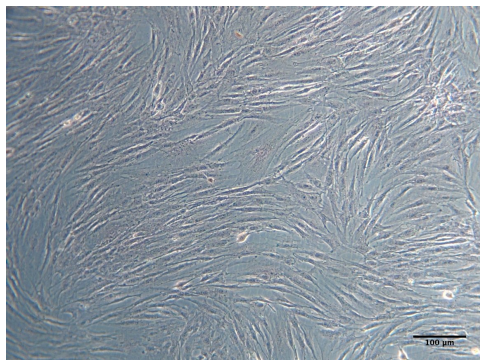


Abbildung 3.1 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme adipogener Stammzellen, welche aus humanem Fettgewebe isoliert wurden. (Messbalken=100 µm, Vergrößerung 1:10)

3.2 Isolation, Amplifikation und Vorbereitung adipogener Stammzellen

Für den Versuch wurden adipogene Stammzellen aus humanem, subkutanem Fettgewebe gewonnen. Vor dem operativen Eingriff wurden die Patienten ausführlich über die Verwendung des adipogenen Gewebes aufgeklärt und eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Verwendung wurde vom Ethikkomitee der Universitätsmedizin Rostock unter der Nummer A 2014-0092 genehmigt.

Die Gewinnung des Fettgewebes erfolgte mittels Liposuktion während planmäßiger, operativer Routineeingriffe in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Rostock. Bei den Proben handelte es sich um Fettgewebe, das beispielsweise im Bereich der Bauchdecke und Glutealregion im Rahmen von Liposuktionen entfernt wurde oder als Überschussmaterial beim Lipofilling übrig blieb. Dabei bestand bei den Patienten durch die Probenentnahme zu keiner Zeit ein Gewebedefizit im Bereich der Entnahmestelle. Die Fettgewebprobe umfasste ein Volumen von circa 5 ml. Der Transport der Fettgewebprobe ins Labor erfolgte mittels eines sterilen Transportmediums, welches sich aus IMDM (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) und GlutaMAX F12 (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) im Verhältnis 1:1 sowie Penicillin/Streptomycin (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) zusammensetzte. Die Isolierung der ASC aus dem Fettgewebe sowie sämtliche im Folgenden beschriebenen Arbeiten im Labor wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank (Herasafe, Heraeus Holding GmbH, Hanau) mit autoklavierten Materialien bzw. Geräten und sterilfiltrierten Lösungen durchgeführt. Materialien und Geräte, die mit humanem Zellmaterial in Kontakt kamen, wurden mit 70 % Alkohol desinfiziert oder durch Autoklavieren sterilisiert.

Jeweils 30 ml Fettgewebe wurde mit 5 ml PBS (Biochrom GmbH, Berlin) und 5 ml Kollagenase NB4 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in einem 50 ml Falcon-Tube (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) vermischt. In den folgenden 30 Minuten erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Anschließend wurde das Substrat sieben Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Standardmedium, bestehend aus 44,5 % IMDM (Fisher Scientific GmbH, Schwerte), 44,5 % F12 Nut Mix (Fisher Scientific GmbH, Schwerte), 10 % NKS (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Fisher Scientific GmbH, Schwerte), resuspendiert.

Die Zellsuspension konnte anschließend für weiterführende Untersuchungen auf T25-Kulturflaschen (25 cm², Cellstar, Greiner Bio One, Frickenhausen) ausgesät und im Brutschrank (Binder, Tuttlingen) bei 37 °C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert werden. Um die Zellen zur Proliferation anzuregen, wurde an jedem zweiten Tag der Wachstumsfaktor bFGF (Merck KGaA, Darmstadt) abhängig von der Größe der besiedelten Kulturflaschen ins Medium gegeben. Alle zwei bis

drei Tage erfolgte der Mediumwechsel. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt, die adhären Zellen mit PBS gespült und zur weiteren Kultivierung erneut Kulturmedium hinzugefügt. Die Passagierung der Zellen erfolgte bei einem Konfluenzgrad der Zellen von 80-90 %. Für das notwendige Splitten wurden die Zellen vorerst mit 10 % PBS gespült und anschließend mittels Trypsin/EDTA-Lösung (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) von der Kulturflasche abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde nach Ablösen aller Zellen durch die Zugabe von Kulturmedium gestoppt, die Zellsuspension anschließend in 50 ml Falcon-Tubes überführt und fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und nun auf nächstgrößere Kulturflaschen (75 cm², Cellstar, Greiner Bio One, Frickenhausen) ausgesät. Zeigten sich die Zellen dieser nach einigen Tagen wieder konfluent, erfolgte die erneute Passagierung der Zellen auf 175 cm² große Kulturflaschen (175 cm², Cellstar, Greiner Bio One, Frickenhausen). Diese Zellen konnten nun für die Markierung mit BNF-Starch Partikeln verwendet werden.

3.3 Nanopartikel

Bei den verwendeten bionisierten Nanoferrit (BNF)-Starch-Partikeln handelt es sich um 20-25 nm große eisenoxidhaltige Nanopartikel mit einem multikristallinen Kern aus Eisenoxiddkristallen. Die von der Micromod GmbH (Warnemünde) für die Versuche zur Verfügung gestellten BNF-Starch Partikel wurden mittels eines Core/Shell-Verfahrens hergestellt, bei dem das Eisen zuerst in alkalischem Milieu ausgefällt, unter hohem Druck homogenisiert und anschließend mit Stärke umhüllt wird [Grüttner et al., 2007]. Daraus resultieren multikristalline Partikel mit einem Kern aus multiplen Magnetit-Kristallen und einer Stärke-Hülle. Das Magnetit bedingt den superparamagnetischen Effekt, welcher für die spezifische Darstellung im MRT benötigt wird.

Basierend auf Erkenntnissen vorangegangener Studien von Kasten et al. (2014) zeigten BNF-Starch Partikel keine zytotoxischen Effekte, sodass davon auszugehen ist, dass keine Gewebeschädigungen oder thermischen Effekte zu erwarten sind. Jedoch zeigten ASC unter dem Einfluss von BNF-Starch Partikeln eine konzentrationsabhängige Verringerung der adipogenen Differenzierung [Kasten et al., 2014]. Da im hiesigen Versuch die MRT-Detektionseigenschaften für die Frage nach der Distribution der ASC eine übergeordnete Rolle spielten, wurden BNF-Starch Partikel ausgewählt, um auch eine geringe Anzahl von abgewanderten Stammzellen visualisieren zu können.

3.3.1 Partikelmarkierung der ASC

Die Partikelmarkierung der Zellen erfolgte einen Tag nach der Zellaussaat auf die T175-Zellkulturflaschen. Um eine Aufnahme der BNF-Starch Nanopartikel (Mikromod GmbH,

Warnemünde) in die Zellen zu ermöglichen, erfolgte vorher eine Beschichtung mit Poly-D-Lysin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München). Dabei handelt es sich um ein synthetisches Polymer der Aminosäure D-Lysin, das durch eine Änderung der Oberflächenspannung eine verbesserte Zelladhäsion und Proteinabsorption ermöglicht. Somit ist eine verbesserte Adhäsion und Inkorporation der Nanopartikel möglich. Anschließend wurde die Partikelsuspension zu den Zellen gegeben. Am darauf folgenden Tag wurden die Kollagencarrier (Medical Biomaterial Products GmbH, Neustadt-Glewe) mit den markierten Zellen besiedelt. Mittels Durchlichtmikroskopie (Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss GmbH, Jena) konnte die erfolgreiche Markierung der Zellen mit BNF-Starch-Nanopartikeln überprüft werden.

3.3.2 Live-Dead-Assay zur Bestimmung der Zellvitalität nach Partikelmarkierung

Der Live-Dead-Assay erfolgte zur Bestimmung der Vitalität humaner adipogener Stammzellen nach der Nanopartikelmarkierung in Abhängigkeit von unterschiedlichen BNF-Starch-Konzentrationen. Der Beobachtungszeitraum zur Bestimmung der Vitalität der Zellen betrug eine Woche. In vorangegangenen Studien konnten bereits fehlende zytotoxische Effekte bis zu einer BNF-Starch-Konzentration von 50 $\mu\text{g Fe/ml}$ nachgewiesen werden [Kasten et al., 2014]. Da im vorliegenden Versuchsaufbau eine höhere Konzentration von 100 $\mu\text{g Fe/ml}$ verwendet wurden, erfolgte im Voraus der Live-Dead-Assay der markierten ASC, um zytotoxische Effekte höherer Konzentrationen auszuschließen. Dafür wurden 26.000 Zellen/ cm^2 auf einer 24-Well-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Partikelmarkierung mit BNF-Starch-Partikeln der Konzentrationen 0, 50, 75 und 100 $\mu\text{g Fe/ml}$. An Tag drei und sieben wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Calcein-AM, Ethidium Homodimer-1 (EthD1) und Hoechst angefärbt und unter dem Mikroskop mit Hilfe von Filtern unterschiedlicher Wellenlänge visualisiert. Vitale Zellen wurden mittels Calcein-AM grün und die Kerne der apoptotischen Zellen mittels Ethidium Homodimer-1 rot angefärbt. Mit Hoechst 33342 (blau) erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne. Mit Filtern der Wellenlänge 495-515 nm konnten die mit Calcein-AM angefärbten vitalen Zellen dargestellt werden. Filter der Wellenlänge 495-635 nm ermöglichten die Darstellung der mit Ethidium-Homodimer angefärbten Zellkerne apoptotischer Zellen und Filter der Wellenlänge 460-490 nm konnten Zellkerne aller mit Hoechst gefärbten Zellen visualisieren. Die Ergebnisse des Live-Dead-Assays wurden mittels Aufnahmen des Invert-Phasenkonstrastmikroskops (Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss GmbH, Jena) dokumentiert. Calcein-AM ist eine nichtfluoreszierende Esterverbindung, die passiv durch die Zellmembran in die Zelle diffundieren kann. Im Zytoplasma lebender Zellen wird Calcein-AM durch Esterasen zu Calcein gespalten. Dieses ist in der Lage, Calciumionen zu komplexieren, woraus ein grün fluoreszierender Chelatkomplex entsteht (ex/em 495 nm/515 nm). In toten Zellen bleibt durch die fehlenden aktiven Esterasen eine Fluoreszenz aus. Der fluoreszierende Chelatkomplex kann anschließend die Zellmembran nicht mehr eigenständig

überwinden und verbleibt in der Zelle [Coder, 2001].

EthD-1 kann im Gegensatz zu Calcein-AM nur durch beschädigte Membranen apoptotischer Zellen eindringen und anschließend an die DNA binden. Dies führt zu einer 40fachen Amplifikation der Fluoreszenz (ex/em 495 nm/635 nm) und somit zur spezifischen Färbung der Nuclei apoptotischer Zellen [Coder, 2001].

Hoechst ist ein zellgängiger Farbstoff, welcher an die DNA bindet und bei einer Wellenlänge von 460 bis 490 nm blau fluoresziert. Somit können die Zellkerne spezifisch angefärbt werden [Latt et al., 1976].

3.3.3 Ferrozin-Assay

Der Ferrozin-Assay erfolgte zur Quantifizierung der Eisenaufnahme in die adipogenen Stammzellen. Zu Beginn wurden 26.000 Zellen/cm² ausgesät und am folgenden Tag mit den Nanopartikelkonzentrationen 0, 50, 75 und 100 µg Fe/ml markiert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und mit 1 ml NaOH (1,0 mol/l, Morphisto GmbH, Frankfurt am Main) in ein 15 ml Tube gefüllt. Am Tag des Ferrozin-Assays erstellte der Untersucher eine Eichgerade mit den Eisenkonzentrationen 0/ 0,3/ 0,6/ 0,9/ 1,2/ 1,5/ 2,25/ 3/ 3,75/ 4,5 µg Fe. Diese diente später als Referenz, um die Eisenkonzentration der Zellen zu bestimmen.

Die Zellpellets der Proben wurden mit 50 mM NaOH der Firma Morphisto GmbH versetzt (Frankfurt am Main). Durch die Zugabe von 600 µl iron releasing reagent konnte das Eisen aus dem Komplex mit Proteinen gelöst werden. Iron releasing reagent wurde aus 4,5 prozentigem KMnO₄ (VWR International GmbH, Darmstadt) und 0,5 mol/l HCl (Morphisto GmbH, Frankfurt am Main) im Verhältnis 1:4 direkt vor der Verwendung frisch angesetzt. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit bei 60 °C auf dem Schüttelinkubator (Labnet International, Edison, USA) erfolgte die Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur und anschließende Hinzugabe von 100 µl iron detection reagent. Das iron detection reagent wurde kurz zuvor aus 6,5 mMol Ferrozin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 6,5 mMol Neocuproin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 2,5 Mol Ammoniumacetat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und 1 Mol Ascorbinsäure in H₂O der Firma VWR International GmbH (Darmstadt) angesetzt. Ferrozin bildet als Eisenchelator für zweiwertiges Eisen einen violettfarbigen Eisen(II)-Ferrozin-Komplex. Diese Farbreaktion konnte anhand der optischen Dichte (OD) mittels Tecan-Reader Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 540 nm photometrisch erfasst und quantifiziert werden. Im Anschluss wurden die gemessenen Eisenkonzentrationen der Proben durch die Anzahl der Zellen geteilt, um die Eisenaufnahme pro Zelle zu berechnen [Riemer et al., 2004] [Harris, 2014].

3.3.4 BerlinerBlau/ Kernechtrot-Färbung

Für den Nachweis der Partikelinternalisierung in die adipogenen Stammzellen wurden die BerlinerBlauFärbung und Kernechtrot-Gegenfärbung durchgeführt. Berliner Blau ist ein synthetischer Farbstoff, der zu einer Reduktion von dreiwertigem zu zweiwertigem Eisen führt. Dadurch werden blaue Präzipitate gebildet, die die Nanopartikel-Markierung indirekt nachweisen. Vor der Färbung wurden je 20.000 Zellen/cm² und 30.000 Zellen/cm² in einer 12-Well-Platte ausgesät und am folgenden Tag mit BNF-Starch Partikeln markiert. Die Markierung der Zellen erfolgte mit 50, 75 und 100 µg Fe/ml. Nach dreimaligem Spülen der Zellen mit PBS (VWR International GmbH, Darmstadt) wurden die Zellen mit 4 % PFA (VWR International GmbH, Darmstadt) fixiert. Anschließend erfolgte die BerlinerBlauFärbung durch Zugabe von Blutlaugensalzlösung, bestehend aus 2 % Kaliumhexacyanoferrat(II) und 1 % Salzsäure der Firma Morphisto (Morphisto GmbH, Frankfurt am Main) im Verhältnis 1:1. Nach einer 20 minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen erneut zwei Mal mit PBS gespült und darauffolgend mit einer 1 % Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung (Merck Chemicals GmbH, Darmstadt) gegengefärbt. Abschließend konnten die Zellen mikroskopiert und zur Dokumentation abfotografiert werden.

3.4 Kollagen-Carrier

Das Kollagen wurde von der Firma Medical Biomaterial Products GmbH (Neustadt-Glewe) in Form von Partikeln für die Versuche zur Verfügung gestellt. Nach Herstellerangaben erfolgte die Gewinnung aus der Haut von Schweinen. Dabei wurde das Kollagengerüst durch verschiedene chemische Behandlungsschritte von Fett und zellulären Bestandteilen getrennt. Anschließend wurden die gewonnenen Häute zerkleinert und zu einer 1 % Kollagensuspension gemahlen. Es folgte ein Gefriertrocknungsprozess und eine Gamma-Sterilisierung. Die Kollagenvliese wurden daraufhin mittels einer Fritsch Pulverisette 19 zerkleinert und anschließend ausgesiebt, um eine Partikelgröße unter 0,1 mm zu garantieren. Am Ende des Herstellungsprozesses hat das porcine Kollagen einen Kollagengehalt von 94 %.

Vor Versuchsbeginn wurden die Kollagenträger in Formaldehyd-Dampf sterilisiert, um eine bessere Quervernetzung des Kollagens und damit eine verminderte Resorbierbarkeit dieser zu erreichen. Dies erfolgte mittels einer Dampf-Formaldehyd-Sterilisation bei einer Temperatur von 60-75 °C über einen Zeitraum von 90 Minuten in der Zentralsterilisation der Universitätsmedizin Rostock. Anschließend wurden die Partikel trocken gelagert und man ließ sie über einen Zeitraum von mindestens einer Woche auslüften. Zusätzlich wurden die Kollagen-Carrier alle 24 Stunden für mindestens 14 Tage mit 10 % NKS/PBS-Lösung gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine quantitative Bestimmung des Formaldehyd-Gehaltes, um eventuelle Rückstände zu detektieren.

Bei einem HCHO-Gehalt von 0 mg/l konnte eine Schädigung der Zellen ausgeschlossen und die Kollagen-Carrier für die weiteren Versuche verwendet werden.

3.4.1 Besiedlung der Kollagen-Carrier mit ASC

Vor der Besiedlung der Kollagen-Carrier mit den ASC erfolgte die Auszählung der Zellen, um eine Aussage über die Anzahl der Zellen auf den besiedelten Kollagenträgern treffen zu können. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, zentrifugiert und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Jeweils 10 μ l dieser Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1000 mm, Marienfeld, Lauda-Königshof) pipettiert und anschließend unter dem Invert-Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 40, Carl Zeiss GmbH, Oberkochen) ausgezählt. Für jede Bestimmung wurden die Zellen aus 4 Quadranten à 16 Kleinquadranten summiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in Duplikaten, aus denen der Mittelwert (MW) bestimmt wurde. Aus der Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis wurde die Zellzahl pro ml wie folgt ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{MW aus 4 Quadranten}}{4} \cdot 10^4$$

Dies ermöglichte den Rückschluss auf die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension. Diese wurde nun mit circa 26.000 Zellen/ cm^2 auf T175-Kulturflaschen (175 cm^2 , Cellstar, Greiner Bio One, Frickenhausen) ausgesät. Im nächsten Arbeitsschritt konnte die Markierung der ASC mit Nanopartikeln und anschließende Besiedlung der Kollagen-Carrier erfolgen.

Die Besiedlung der Kollagen-Carrier wurde mit Zellen der zweiten und dritten Passage vorgenommen. Es wurden $20 \cdot 10^6$ Zellen auf 12,5 ml Kollagen-Carrier in 10 % NKS-PBS ausgesät. Die Suspension aus Zellen und Kollagencarriern wurde anschließend mit 80 ml Medium und 20 μ l bFGF in Roller-Flaschen überführt und für insgesamt sieben Tage inkubiert. Die Flaschen befanden sich dabei auf einem Roller (Labnet International, Edison, USA), sodass die Suspension in ständiger Bewegung war und eine Verklumpung des Inhaltes verhindert werden konnte. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

3.4.2 Visualisierung und Zellzahlbestimmung der ASC auf den Kollagen-Carriern mittels Hoechst-H 33342-Färbung und Hoechst-Assay

Die Hoechst-Färbung erfolgte im Anschluss an die ASC-Besiedlung der Kollagen-Carrier, um den qualitativen Nachweis der erfolgreichen Besiedlung der Kollagen-Carrier mit adipogenen Stammzellen zu erbringen. Für die Hoechst-Färbung wurden 6 ml der ASC besiedelten Kollagen-Carrier aus dem Medium entnommen und jeweils 3 ml in ein Well einer 6-Well-Platte gegeben. Das Medium wurde abgesaugt und das Kollagen anschließend mit einer 1:250 Hoechst-Lösung 33342 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) versetzt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation der Platte für 30 Minuten. Nach erneutem Absaugen des Mediums konnte die Besiedlung des Kollagens mit Zellen durch das Mikroskopieren

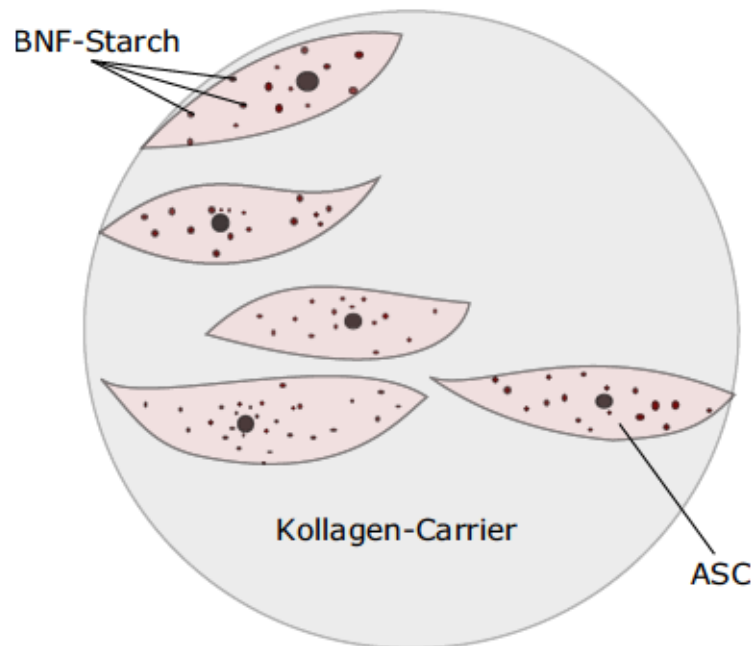


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der Besiedlung der Kollagen-Carrier mit BNF-Starch markierten adipogenen Stammzellen (ASC).

mit einem DAPI-Filter (Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss GmbH, Jena) nachgewiesen und dokumentiert werden.

Für die quantitative Bestimmung der Zellzahlen auf den Kollagen-Carriern wurde ein Hoechst-Assay nach Labarca und Paigen [Labarca et al., 1980] durchgeführt. Dieser Versuch erfolgte kurz vor der *in vivo* Injektion der ASC besiedelten Kollagen-Carrier, um die Zellzahlen auf den Kollagen-Carriern zu quantifizieren. Damit konnten Rückschlüsse auf die injizierte Zellzahl und damit einhergehende, gemessene Signalunterschiede zwischen den Versuchstieren gezogen werden.

Zu Beginn wurde eine Standardreihe mit $0/0,1/0,25/0,5/1,0/1,5 \cdot 10^6$ Zellen angelegt. Der Untersucher entnahm mehrere Proben à 1,5 ml der Zell-Kollagensuspension mit 0 und 100 $\mu\text{g Fe/ml}$ für das Hoechst-Assay. Dabei wurde versucht, ein gleichmäßiges Verhältnis von Medium und Zell-Kollagensuspension in jede Spritze zu aspirieren. Die Kollagen-Zellsuspension wurde vom Medium durch den Cell-Strainer 40 μm Nylon (Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte) getrennt und jeweils 100 μl der Kollagen-Zellsuspension mit 350 μl RA1-Puffer (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) versetzt, in ein Eppendorfgefäß mit Beads gefüllt und 20 Sekunden mit einem Vortex Mixer (neoLab Migge GmbH, Heidelberg) bei 500 rpm homogenisiert. 300 μl der Suspension wurden nun auf einen Nucleo-Spin-Filter gegeben und bei 11.000 rpm eine Minute zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 8504R, Eppendorf Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf). Nach erneutem Resuspendieren erfolgte die Überführung von jeweils 50 μl des Durchflusslysats in ein neues Eppendorfgefäß und die Hinzugabe von 350 μl Hoechst-Puffer. Der Hoechst-Puffer setzte sich zusammen aus 2 Mol Natriumchlorid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und 0,05 Mol Dinatriumhydrogenphosphat (VWR International GmbH, Darmstadt). Im Anschluss wurden jeweils $3 \cdot 100 \mu\text{l}$ jeder

Probe in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Auswertung erfolgte mittels Tecan-Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$. Anhand der gemessenen optischen Dichte (OD) konnte auf die DNA-Menge und somit auf die Zellzahl geschlossen werden.

3.5 *In vivo* Untersuchungen

3.5.1 SCID-Mäuse

Für den Versuchsaufbau wurden fünf bis acht Wochen alte, weibliche SCID-beige Mäuse (Stamm CB17.Cg-Prkdc^{scid} Lyst^{bg}/Crl) verwendet, welche zwei autosomal-rezessive Mutationen tragen: scid (Prkdc^{skid}, protein kinase, DNA-activated catalytic polypeptide, severe combined immunodeficiency) und beige (Lyst^{bg}, lysosomal trafficking regulator gene). Tiere mit einer homozygoten Ausprägung bezüglich der scid-Mutation besitzen unterentwickelte lymphatische Organe und weisen eine Lymphopenie, Hypoglobulinämie und eine geschädigte B- und T-Zellfunktion auf. Diese genetisch bedingte Immundefizienz ermöglicht die xenogene Implantation humaner Zellen, ohne dass eine Immunantwort ausgelöst wird [Sundberg et al., 1994]. Die Tiere wurden von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) geliefert und anschließend in der Zentralen Versuchstierhaltung der Universität Rostock in IVC (individually ventilated cages)-Systemen der SPF (specific pathogen free)-nahen Zone gehalten und durch Mitarbeiter der Zentralen Versuchstierhaltung versorgt.

Das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei in Mecklenburg-Vorpommern genehmigte den Tierversuch (7221.3-1-010/15).

3.5.2 Untersuchung der SCID-Mäuse im MRT

Der Transport der Tiere nach Greifswald wurde in möglichst ruhiger Umgebung durchgeführt. Die Versuche wurden frühestens eine Woche nach Lieferung der Tiere durchgeführt, um eine Akklimatisierung der Tiere zu gewährleisten. Für die Zeit des Transportes und zwischen den MRT-Untersuchungen befanden sich die Versuchstiere innerhalb ihrer Gruppen in abgedunkelten Käfigen. Die Käfige enthielten sterile Filter, welche die umgebende Raumluft filterten. In der Zeit zwischen den MRT-Untersuchungen wurden die Tiere in S2 Laboren des Friedrich Loeffler Institutes der Universität Greifswald untergebracht. Für den Vorgang der subkutanen Injektion und anschließenden MRT-Untersuchung erfolgte die Sedierung der Mäuse mit dem Inhalationsanästhetikum 4 % Isofluran mit 5,0 l/min. Während der Narkose befanden sich die Tiere in einer nach außen abgedichteten Plexiglaskammer, in die ein Gasgemisch aus Sauerstoff und Isofluran strömte und die Maus narkotisierte. Nachdem sich der Herzschlag der Maus verlangsamt und eine motorische Reaktion auf mechanische Reize fehlte, erfolgte die Applikation. Anschließend wurde die Maus mittels

eines Mausebette im MRT positioniert. Die Zufuhr des Sauerstoff-Isofluran-Gemisches erfolgte nun über eine kranial am Mausebett angebrachte Maske. Die Atemfrequenz wurde über den gesamten Messzeitraum mittels einer Thoraxsonde überwacht. Abhängig von der Atemfrequenz wurde die Narkosetiefe bestimmt und konnte entsprechend reguliert werden. Das Friedrich-Loeffler-Institut der Universität Greifswald stellte das Narkosezubehör und die Kunststoffkammer zur Verfügung, die zur Beatmung und Überwachung der Tiere unter tiermedizinischer Betreuung durch Dr. Susan Mouchantat notwendig war. Die MRT-Untersuchungen erfolgten am 7,1 Tesla Kleintier MRT (ClinScan, Bruker Corp., Billerica, MA, USA) des Instituts für Diagnostische Radiologie und Neuroradiologie der Universitätsmedizin Greifswald (Direktor Prof. Dr. N. Hosten). Die Bilder wurden in der T2-gewichteten TSE- und R2* fat-corrected single peak Sequenz mit einer Schichtdicke von 1,5 mm aufgenommen.

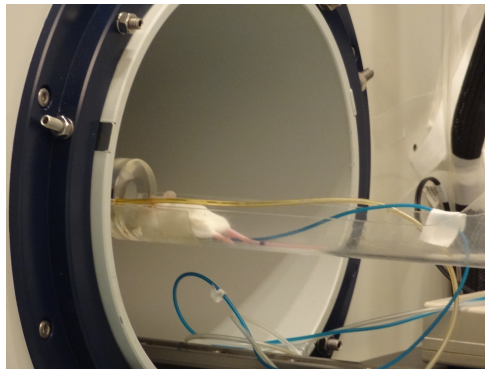


Abbildung 3.3 Narkotisierte SCID-Maus während einer MRT-Untersuchung im 1,5 Tesla Kleintier-MRT.

3.5.3 Distribution implantierter adipogener Stammzellen

Nach der Durchführung aller vorbereitenden Maßnahmen konnte mit dem Hauptversuch, der Messung der Distribution der implantierten adipogenen Stammzellen, begonnen werden. Dafür wurden drei Untersuchungsgruppen mit jeweils drei Tieren gebildet. In der Versuchsgruppe +NP, bestehend aus den Versuchstieren eins, zwei und drei, erfolgte die subkutane Applikation von Nanopartikel-markierten ASC. Den Tieren der Versuchsgruppe +NP/Koll wurden auf Kollagen (Koll) befindliche Nanopartikel-markierte Zellen subkutan injiziert. In der Kontrollgruppe K applizierte der Untersucher unmarkierte, auf Kollagenträgern befindliche ASC.

Die Injektion wurde mittels einer 18G-Braunüle (B.Braun Melsungen Ag, Melsungen) subkutan in den Bereich der linken Rückenhaut vorgenommen. Vor der Injektion erfolgte die Durchführung eines Nativscans aller Tiere. Im Anschluss an die Applikation folgten die MRT-Scans der Tiere im Abstand von fünf Minuten, einer Woche, einem Monat, zwei Monaten bis hin zu drei Monaten.

Des Weiteren wurden die Tiere über den Versuchszeitraum tiermedizinisch überwacht, um mögliche pathologische Reaktionen auf den Eingriff zu registrieren. Wöchentlich erfolgte die Messung des Gewichts, die Analyse des Verhaltens und des Bewegungsmusters der Tiere, sowie die Palpation und Inspektion der Injektionsstelle durch die Veterinärmedizinerin Frau Dr. Susan Mouchantat.

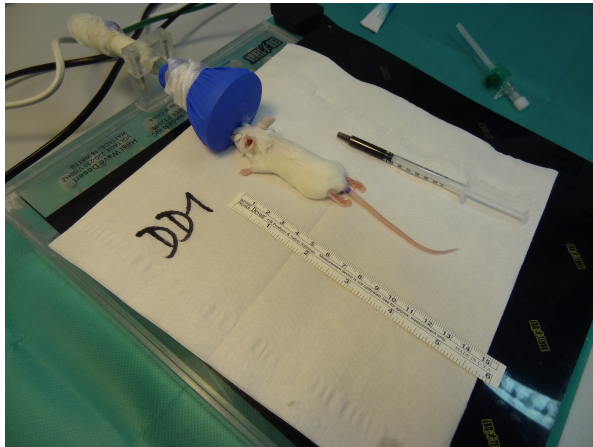


Abbildung 3.4 Narkotisierung der Maus mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran in Vorbereitung auf die Injektion.



Abbildung 3.5 Subkutane Injektion der Kollagen-Zell-Suspension in die linke Flanke der Maus durch den Experimentator.

Tabelle 3.1 Versuchsgruppe +NP: subkutane Applikation von Nanopartikel (NP) markierten ASC

Maus	Labellingkonzentration	Injektionsvolumen	Gewicht	Zellzahl
+NP(1)	100 μg Fe/ml	400 μl	16,5 g	$1 \cdot 10^6$
+NP(2)	100 μg Fe/ml	400 μl	17,4 g	$1 \cdot 10^6$
+NP(3)	100 μg Fe/ml	400 μl	17,5 g	$1 \cdot 10^6$

Tabelle 3.2 Versuchsgruppe +NP/Koll: subkutane Applikation von Nanopartikel (NP) markierten ASC auf Kollagenträgern (Koll)

Maus	Labellingkonzentration	Injektionsvolumen	Gewicht	Zellzahl
+NP/Koll(1)	100 μg Fe/ml	1,5 ml	14,5 g	$21,84 \cdot 10^6$
+NP/Koll(2)	100 μg Fe/ml	1,5 ml	20,0 g	$21,84 \cdot 10^6$
+NP/Koll(3)	100 μg Fe/ml	1,5 ml	17,5 g	$21,84 \cdot 10^6$

Tabelle 3.3 Kontrollgruppe K: subkutane Applikation von unmarkierten Zellen auf Kollagenträgern

Maus	Labellingkonzentration	Injektionsvolumen	Gewicht	Zellzahl
K1	0 μg Fe/ml	1,5 ml	16,4 g	$6,13 \cdot 10^6$
K2	0 μg Fe/ml	1,5 ml	16,6 g	$6,13 \cdot 10^6$
K3	0 μg Fe/ml	1,5 ml	17,4 g	$6,13 \cdot 10^6$

3.5.4 Auswertung der MRT-Daten

Die MRT-Datensätze wurden mit der Software HOROS für das Betriebssystem Mac OS X ausgewertet. Die Eisendetektion in den jeweiligen Organen erfolgte durch die Messung der Signalintensität in der R2* fat-corrected single peak und T2-TSE-cor gewichteten Sequenz in der koronaren Ebene. Die Messungen wurden von drei unterschiedlichen Untersuchern unabhängig voneinander durchgeführt. Bei der Markierung der ROI wurde versucht, den gesamten Umfang des Organs bzw. Injektionsareals in mehreren Ebenen zu erfassen, um die durchschnittliche Signalintensität des gesamten Organs zu messen. Anschließend erfolgte die Messung der Signalintensität innerhalb des markierten Areal (ROI).

3.5.5 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens dreimal repliziert und die Datensätze als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem "student's t-test" ($***P < 0,001$; $**P < 0,01$; $*P < 0,05$) ermittelt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Partikelmarkierung

4.1.1 Live-Dead-Assay: Nachweis der Zellvitalität nach Partikelmarkierung

Die Ergebnisse des Live-Dead-Assays als Nachweis der Zellvitalität werden exemplarisch in der Abbildung 4.1 und 4.2 gezeigt.

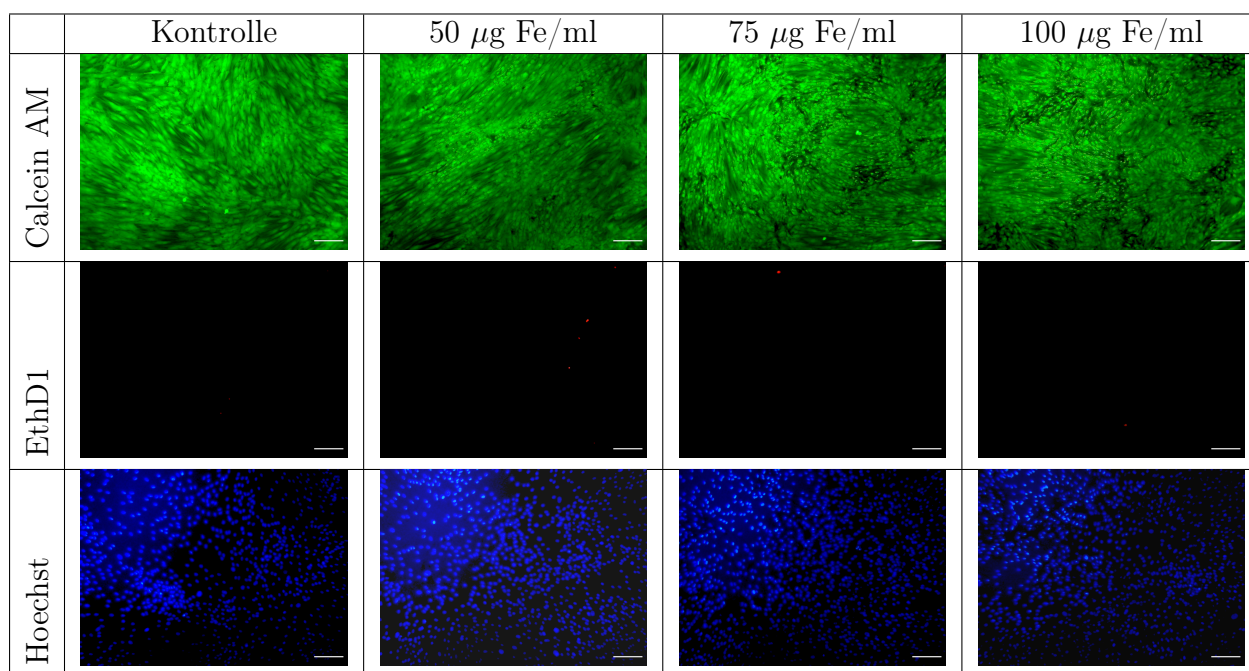


Abbildung 4.1 Live-Dead-Assay drei Tage nach der Nanopartikel-Markierung der ASC mit unterschiedlichen BNF-Starch-Konzentrationen (0/50/75/100 $\mu\text{g Fe/ml}$). Vitale Zellen wurden mit Calcein AM grün (ex/em 495/515) und die Kerne apoptotischer Zellen mit Ethidium Homodimer rot (ex/em 460/490 nm) angefärbt. Die blaue Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (ex/em 460/490 nm) (Vergrößerung 1:10, Messbalken=100 μm).

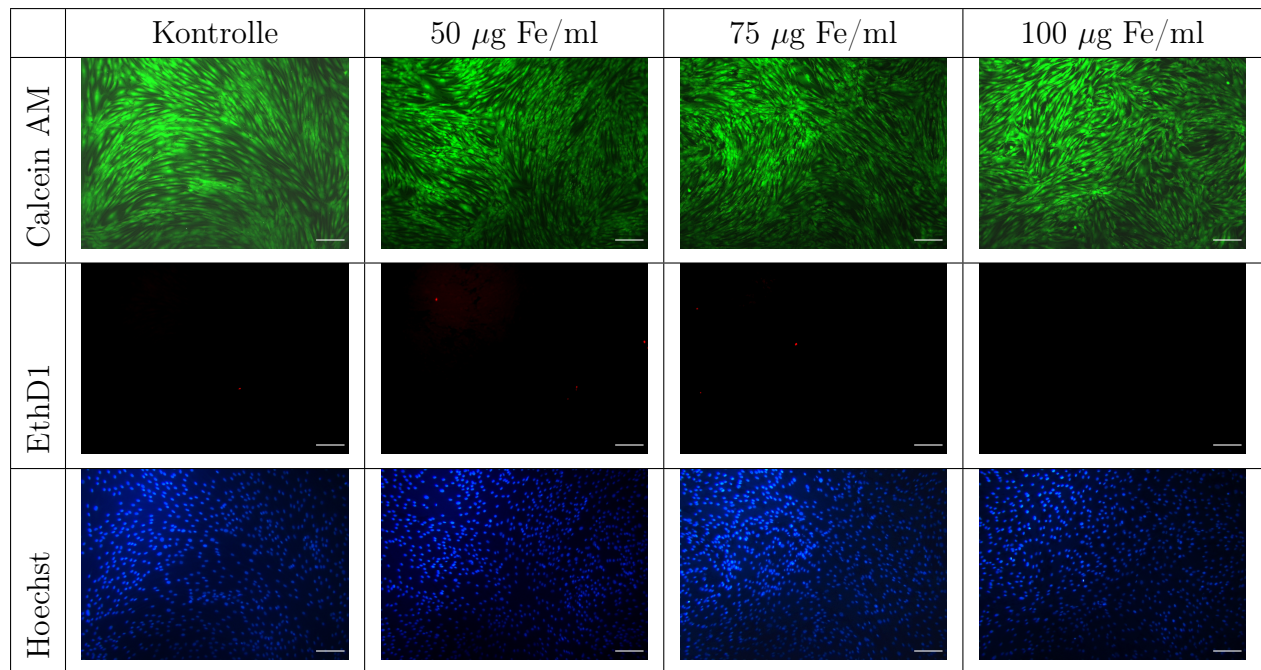


Abbildung 4.2 Live-Dead-Assay sieben Tage nach der Nanopartikel-Markierung der ASC mit unterschiedlichen BNF-Starch-Konzentrationen (0/50/75/100 $\mu\text{g Fe/ml}$). Vitale Zellen wurden mit Calcein AM grün (ex/em 495/515) und die Kerne apoptotischer Zellen mit Ethidium Homodimer rot (ex/em 460/490 nm) angefärbt. Die blaue Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (ex/em 460/490 nm) (Vergrößerung 1:10, Messbalken=100 μm).

Im Untersuchungszeitraum waren nur vereinzelt apoptotische Zellen nachweisbar. Es ließ sich keine Korrelation zwischen einer zunehmenden Partikelkonzentration und der Menge an apoptotischen Zellen erkennen. Am Tag sieben war, im Vergleich zu Tag drei, kein Anstieg der Anzahl toter Zellen zu verzeichnen. Den Ergebnissen nach konnte bis zu einer BNF-Starch Konzentration von 100 $\mu\text{g Fe/ml}$ keine erhöhte Apoptose der Zellen nachgewiesen werden.

4.1.2 Ferrozin-Assay

Die Ergebnisse des Ferrozin-Assays zeigten, dass der Eisengehalt der Zellen mit höherer Konzentration der BNF-Starch Nanopartikel ansteigt. Allerdings lässt sich anhand der Tabelle 4.1 deutlich eine Sättigung der Zellen mit steigender Nanopartikelmarkierung nachweisen.

	0 $\mu\text{g Fe/ml}$	50 $\mu\text{g Fe/ml}$	75 $\mu\text{g Fe/ml}$	100 $\mu\text{g Fe/ml}$
MW \pm SD	4,39 \pm 3,69	60,02 \pm 11,71	77,08 \pm 8,41	86,41 \pm 15,82
Min	0,83	37,58	59,80	56,58
Max	14,32	73,59	89,61	113,38

Tabelle 4.1 Bestimmung der Nanopartikel-Aufnahme gelabelter ASC mittels Ferrozin-Assay. Angabe des Maximums, Minimums und Mittelwerts \pm Standardabweichung in pg Fe/Zelle.

4.1.3 BerlinerBlau/ Kernechtrot- Färbung

Mittels BerlinerBlauFärbung konnte mit ansteigender Konzentration der eisenhaltigen Nanopartikelmarkierung der ASC eine zunehmende Blaufärbung der markierten Zellen dargestellt werden. Abbildung 4.3 zeigt beispielhaft die verstärkte Blaufärbung der gelabelten ASC mit ansteigender BNF-Starch-Nanopartikelkonzentration. Die Anordnung der blauen Farbpigmente um den mit Kernechtrot angefärbten Zellkern lässt darauf schließen, dass die Eisenpartikel internalisiert wurden.

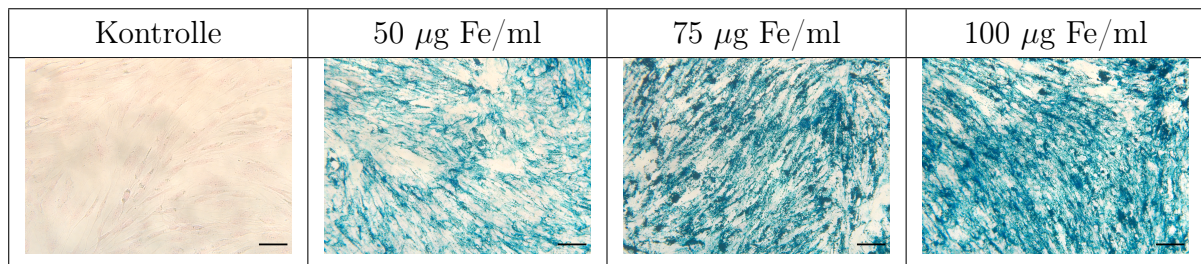


Abbildung 4.3 Nachweis der Nanopartikelmarkierung mittels BerlinerBlauFärbung. Nach der Inkubation der ASC mit BNF-Starch Partikeln verschiedener Konzentration (0/50/75/100 $\mu\text{g Fe/ml}$) erfolgte die Visualisierung des Eisenoxids der internalisierten Nanopartikel mittels BerlinerBlauFärbung (Vergrößerung 1:20, Messbalken=200 μm).

4.2 Zellbesiedlung der Kollagen-Carrier

4.2.1 Qualitativer und quantitativer Nachweis der Kollagenbesiedlung mit ASC

Die Ergebnisse der Hoechst-Färbung zeigten eine erfolgreiche Besiedlung der Kollagen-Carrier mit ASC. Im zeitlichen Verlauf konnte eine Vermehrung der Zellen auf den Kollagen-Carriern festgestellt werden. Während des Untersuchungszeitraumes lagerten sich die Kollagen-Carrier zusammen und bildeten stabilere Konstrukte. In Abbildung 4.4 werden beispielhaft die ASC besiedelten Kollagen-Carrier an Tag 4, 7, 11, 18 und 47 dargestellt.

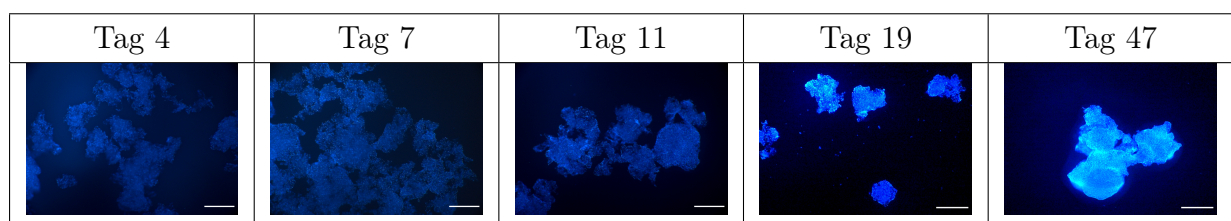


Abbildung 4.4 Hoechst-Färbung zum qualitativen Nachweis der Besiedlung der Kollagenträger mit ASC 4, 7, 11, 18, 47 Tage nach der initialen Besiedlung. Gleichmäßige Besiedlung der Kollagenträger und Proliferation der ASC mit der Zeit sichtbar (Vergrößerung 1:4, Messbalken=50 μm).

Das im Vorfeld der *in vivo* Injektion durchgeführte Hoechst-Assay zeigte eine höhere Zellzahl in den Injektionslösungen, deren Zellen mit Nanopartikeln gelabelt wurden. Im Vergleich der totalen Zellzahlen von unmarkierten und BNF-Starch markierten Zellen konnten am Tag der Applikation (zehn Tage nach Partikelmarkierung) dreifach höhere Zellzahlen in 1,5 ml Injektionslösung bei markierten Zellen mit 100 $\mu\text{g Fe/ml}$ BNF-Starch-Partikelkonzentration nachgewiesen werden. Wie schon in einer vorangegangenen Studie von Kasten et al. (2014) gezeigt, konnte eine erhöhte Zellproliferation durch die Markierung der Zellen mit BNF-Starch-Partikeln verzeichnet werden. Dabei ist die Proliferationsrate der Zellen abhängig von dem Partikeltyp und der Labelingkonzentration [Kasten et al., 2014].

	0 $\mu\text{g Fe/ml}$	100 $\mu\text{g Fe/ml}$
MW \pm SD	6,13*10 ⁶ Zellen \pm 0,8	21,84*10 ⁶ Zellen \pm 3,44
Min	4,65*10 ⁶ Zellen	17,44*10 ⁶ Zellen
Max	7,27*10 ⁶ Zellen	26,74*10 ⁶ Zellen

Tabelle 4.2 Zellzahlbestimmung in 1,5 ml Injektionsvolumen mittels HOECHST-Assay zum Zeitpunkt der *in vivo* Injektion der Zellen. Es zeigen sich höhere Zellzahlen der markierten ASC.

4.2.2 Live-Dead-Assay vor Implantation der ASC besiedelten Kollagenträger

Nach der Besiedlung der Kollagenpartikel mit ASC wurde der Live-Dead-Assay erneut durchgeführt, um die Implantation vitaler ASC bei den *in vivo* Versuchen nachzuweisen. Die Färbung mit Calcein-AM und EthD1 zeigte, dass die Zellen nach drei sowie sieben Tagen vital waren und nur vereinzelt tote Zellen nachgewiesen werden konnten. Es konnte kein Anstieg toter Zellen vom dritten bis siebten Tag festgestellt werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die ASC zum Zeitpunkt der Implantation noch vital waren.

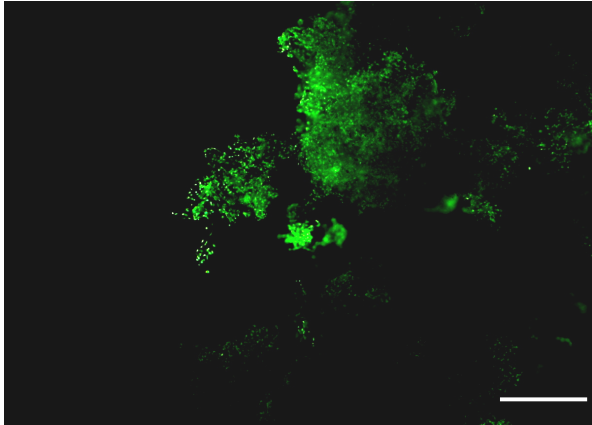


Abbildung 4.5 Färbung der vitalen Zellen mit Calcein AM (grün) sieben Tage nach der Kollagenbesiedlung. Die vitalen Zellen bedecken rasenartig die Kollagen-Carrier (Messbalken=50 μm , Vergrößerung 1:4).



Abbildung 4.6 Ethidiumhomodimer-Färbung (rot) der auf den Kollagenträgern befindlichen avitalen Zellen an Tag sieben nach Besiedlung des Kollagens. Es sind vereinzelt tote Zellen (rote Punkte) sichtbar (Messbalken=50 μm , Vergrößerung 1:4).

4.3 *In vivo* Ergebnisse der Distribution und Migration adipogener Stammzellen

4.3.1 Verlauf der Tierexperimente

Der Transport der Mäuse nach Greifswald für die MRT-Untersuchungen gestaltete sich problemlos. Die Mäuse zeigten während des Transports keinerlei aufgeregtes Verhalten sowie keine Adaptationsschwierigkeiten in Greifswald. Die Tierhaltung in Gruppen verlief erwartungsgemäß ohne Komplikationen.

Die Injektion der Stammzellen sowie der dreimonatige Untersuchungszeitraum verlief weitestgehend komplikationslos. Bei den Mäusen +NP(1) und +NP(2) schwankte die Atemfrequenz stark bei konstanter Isofluranversorgung. Die Mäuse +NP(1-3) zeigten kurzzeitige Apnoeintervalle während der Narkose mit 4 % Isofluran. Daraufhin wurden die betroffenen Mäuse kurzzeitig beatmet bis sich wieder eine Spontanatmung einstellte. Im Anschluss an die Beatmung wiesen die betroffenen Mäuse weiterhin eine stark schwankende Atemfrequenz auf. Bei den anderen Versuchstieren verliefen die Narkose, anschließende Injektion und MRT-Untersuchung komplikationslos. Nach dem Aufwachen aus der Narkose erschienen einige Mäuse im Rahmen der Exzitationsphase kurzzeitig aufgereggt und zeigten ein taumeliges Bewegungsmuster. Nach einer Adaptionszeit von circa fünf bis zehn Minuten legte sich dies wieder, die Mäuse waren agil und munter und bewegten sich uneingeschränkt. Während des dreimonatigen Untersuchungszeitraumes wurde die Injektionsstelle palpatatorisch als auch inspektorisch untersucht. Keines der Tiere zeigte Wundinfektionen oder andere pathologische Reaktionen auf die durchgeführte Injektion. Am Tag der Injektion zeigte sich bei allen Tieren eine bohngroße Schwellung an der linken Flanke. Innerhalb

der ersten Woche war bei allen Versuchstieren noch inspektorisch eine erbsen- bis boh-nengroße Schwellung erkennbar. Palpatorisch zeigte sich derbes Gewebe, über dem die Haut gut verschiebbar war. Ab der zweiten Woche war bei den Versuchstieren +NP(1-3) keine Schwellung mehr sichtbar und palpabel. Im Gegensatz dazu stellte sich der Injektionsbereich der Tiere +NP/Koll(1-3) und der Tiere K(1-3) der Kontrollgruppe bis zum Erreichen der dritten Woche unverändert dar. Nach Ablauf des ersten Monats war auch bei den Tieren der Versuchsgruppe +NP/Koll und der Kontrollgruppe K keine Schwellung mehr palpabel.

Alle Mäuse wiesen eine Gewichtszunahme über den dreimonatigen Untersuchungszeit-raum auf. Die Gewichtszunahme schwankte, abhängig vom Versuchstier zwischen 3,7 - 9,1 g / Maus in drei Monaten. In der Versuchsgruppe +NP/Koll konnte ein größerer Gewichtszuwachs der Mäuse als in der Versuchsgruppe +NP und Kontrollgruppe K über den dreimonatigen Versuchszeitraum festgestellt werden. Der Gewichtszuwachs der Mäuse der Versuchsgruppe +NP und der Kontrollgruppe zeigten fast identische Werte.

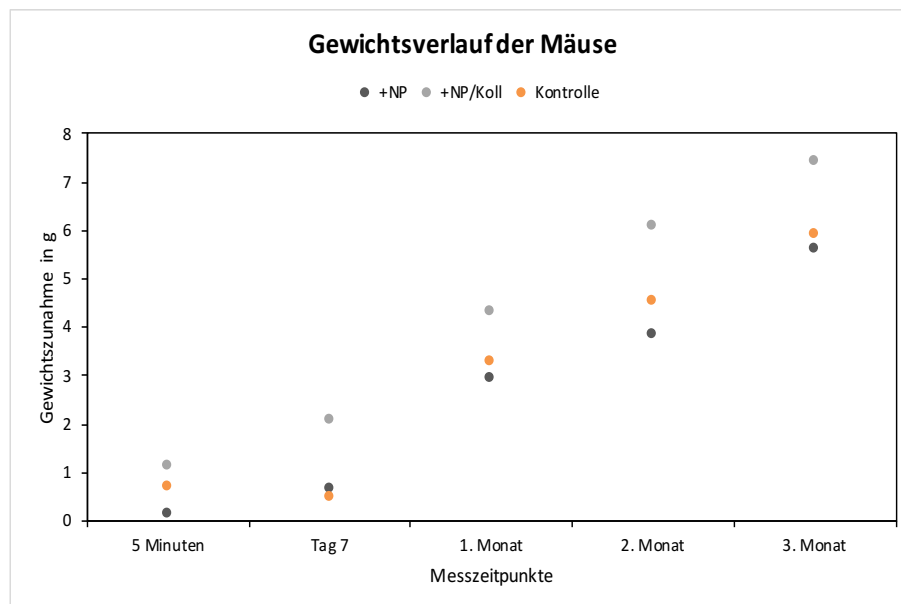


Abbildung 4.7 Graphischen Darstellung der Gewichtszunahme der Mäuse +NP(1-3), +NP/Koll(1-3) und K(1-3) in Gramm (g) zu den Messzeitpunkten 5 Minuten, 1. Woche, 1. Monat, 2. Monat, 3. Monat.

Nach den MRT-Untersuchungen im dritten Monat erfolgte die Tötung der Mäuse und anschließende Organentnahme für weitere Untersuchungen. Im Verlauf der Obduktion wurde die Untersuchung des Injektionsareals vorgenommen. Dabei konnte bei allen Mäusen der Versuchsgruppen Nanopartikelablagerungen im Bereich des Injektionsareals nachgewiesen werden. In der Abbildung 4.8 werden beispielhaft die Nanopartikelablagerungen im Flankenbereich einer Maus gezeigt.

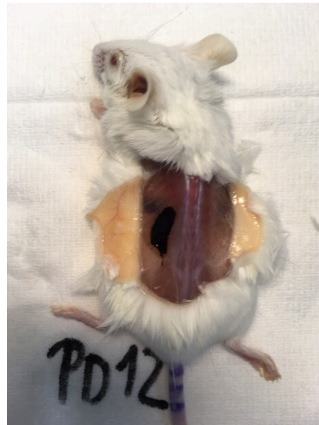


Abbildung 4.8 Post mortem fanden sich subkutan braun-schwarze Nanopartikelablagerungen im Bereich der linken Flanke einer Maus der Versuchsgruppe +NP/Koll.

4.3.2 Darstellung der Nanopartikel-markierten Zellen im MRT

Durch das angewandte MRT-Verfahren konnten die Nanopartikel-markierten Zellen erfolgreich visualisiert werden.

Bei der Darstellung der Injektionsareale ließen sich eindeutige Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe K ohne nanopartikuläre Markierung und den Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll feststellen. In der Kontrollgruppe wurde den Mäusen unmarkierte ASC auf Kollagenträgern subkutan injiziert, während Mäusen der Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll Nanopartikel-markierte Zellen subkutan implantiert wurden. Der Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen bestand in dem Vorhandensein des Trägermaterials Kollagen (Koll) in der Versuchsgruppe +NP/Koll. Abbildung 4.9 zeigt das Injektionsareal von Vertretern aller drei Gruppen fünf Minuten nach der Injektion.

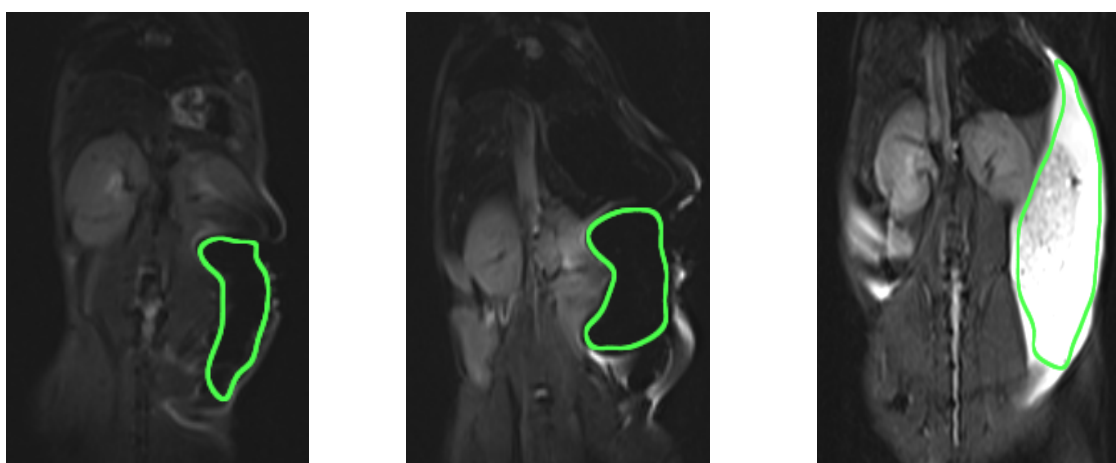


Abbildung 4.9 Ausschnitte aus den T2-gewichteten MRT-Sequenzen der Injektionsareale fünf Minuten postoperativ in der koronaren Ebene. Links: Versuchsgruppe +NP, mittig: Versuchsgruppe +NP/Koll, rechts: Kontrollgruppe K

Die eisenoxidbeladenen Zellen der Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll stellten sich in

der T2-Sequenz hypointens (schwarz) dar. Die Eisenmoleküle der Nanopartikel-Markierung bedingen Magnetfeldinhomogenitäten, die benachbarte Protonen dephasieren. Dadurch kommt es zu einer schnelleren transversalen Relaxation, was sich in einem Signalabfall in T2 äußert. Hingegen waren die unmarkierten Zellen der Kontrollgruppe in T2 als hyperintenses Areal im Injektionsbereich sichtbar. Bei R2* handelt es sich um den Kehrwert von T2* und daher stellten sich die mit BNF-Starch markierten Zellen hyperintens und die unmarkierten Zellen hypointens dar.

In der folgenden Abbildung 4.10 werden MRT-Ausschnitte von Vertretern aller drei Gruppen zu allen Messzeitpunkten beispielhaft dargestellt.


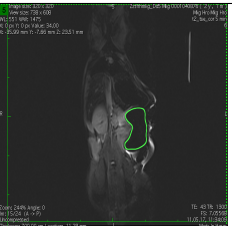
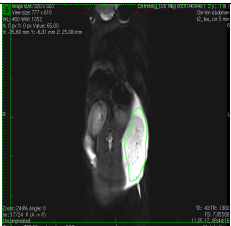

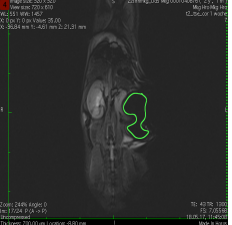

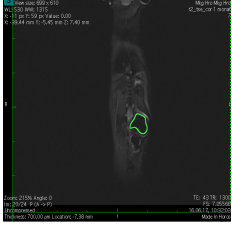

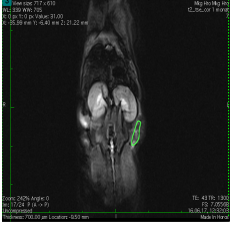

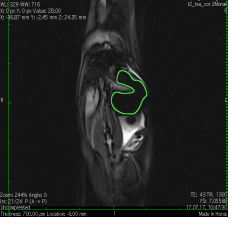


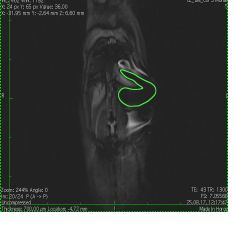

	Versuchsgruppe +NP	Versuchsgruppe +NP/Koll	Kontrollgruppe
5 Minuten			
7 Tage			
1. Monat			
2. Monat			
3. Monat			

Abbildung 4.10 MRT-Scans der drei Versuchsgruppen an den Beobachtungszeitpunkten 5 Minuten, 7 Tage, 1. Monat, 2. Monat, 3. Monat. Aus jeder Versuchsgruppe wurde ein repräsentatives Tier für die Abbildung ausgewählt: +NP(2), +NP/Koll(2), K(1). Die grüne Umrandung kennzeichnet das jeweilige Injektionsareal. Die Darstellung erfolgte in der T2-tse gewichteten Sequenz in koronarer Ebene.

Die Injektionsareale der Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll ließen sich bis in den dritten Monat visualisieren. Hingegen konnte in der Kontrollgruppe K bereits ab dem ersten Monat kein eindeutiges Signal mehr im Injektionsareal detektiert werden. Zwischen den Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll war zum Zeitpunkt fünf Minuten nach der Injektion kein Unterschied erkennbar. Erst im Langzeitvergleich zeigte sich in den MRT-Aufnahmen als auch in den klinischen Untersuchungen ein Unterschied in der Größenpersistenz der Implantate. In den MRT-Aufnahmen der Mäuse der Versuchsgruppe +NP konnte bereits ab der ersten Woche eine starke Schrumpfung des Implantats festgestellt werden.

Schließlich zeigte sich in der Versuchsgruppe +NP im dritten Monat nur noch ein geringes Implantatvolumen. Im Gegensatz dazu war in der Versuchsgruppe +NP/Koll nur ein geringfügig verkleinertes Implantatvolumen im dritten Monat erkennbar.

Hinsichtlich der Signalintensität der Injektionsareale in T2 und R2* ließen sich nur geringfügig Unterschiede zwischen den Gruppen +NP und +NP/Koll erkennen. In beiden Gruppen verhielt sich die Signalintensität in der T2 gewichteten Sequenz über den Beobachtungszeitraum von drei Monaten konstant um 50.000. In der R2*-Sequenz waren mehr Schwankungen sichtbar. Vom Messzeitpunkt fünf Minuten bis sieben Tage ließ sich in beiden Versuchsgruppen ein Anstieg der Signalintensität um durchschnittlich 40-64 % verzeichnen. Nach der ersten Woche sank die Signalintensität wieder und pendelte sich zwischen 160.000 und 180.000 ein.

In der Kontrollgruppe sah man einen Abfall der T2- und einen Anstieg der R2*-Messwerte über den dreimonatigen Versuchszeitraum. Ab dem ersten Monat konnte weder in den T2- noch in den R2*-gewichteten Sequenzen das Injektionsareal der Kontrollgruppe detektiert werden.

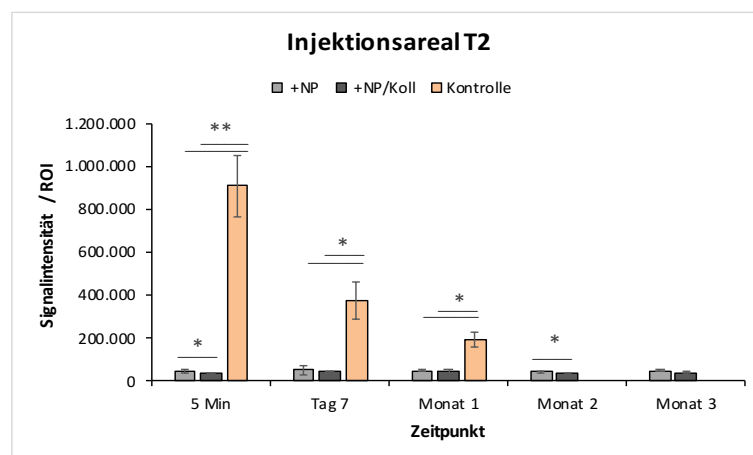


Abbildung 4.11 Graphische Darstellung der T2 gewichteten MRT-Messungen der Injektionsareale aller drei Versuchsgruppen über den Beobachtungszeitraum von drei Monaten.

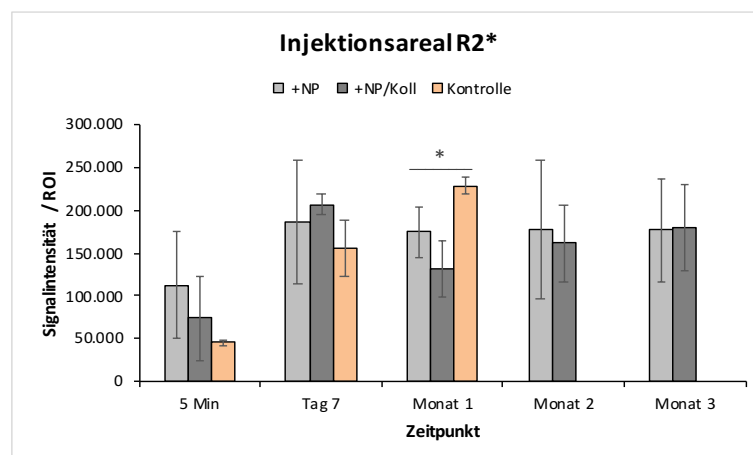


Abbildung 4.12 Graphische Darstellung der R2* gewichteten MRT-Messungen der Injektionsareale aller drei Versuchsgruppen über den Beobachtungszeitraum von drei Monaten.

4.3.3 Messung der Signalintensität in den Zielorganen

Entsprechend der Fragestellung nach der Distribution der ASC erfolgte die Messung der Signalintensität in der T2- und R2*-Sequenz in den selektierten Organen. Ausgewählt wurden Ausscheidungsorgane wie die Blase und Niere, um mögliche Ablagerungen bei der Sekretion zu detektieren. Außerdem erfolgte die Auswahl gut durchbluteter und kapillarreicher Organe wie Niere, Muskel, Leber, Gehirn, um auch hier mögliche Ablagerungen festzustellen, die möglicherweise zur Bildung von Neoplasien in den jeweiligen Organen führen könnten.

In den folgenden Abbildungen wurden alle drei Versuchsgruppen nebeneinander dargestellt, um die Unterschiede zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen, als auch unter den Versuchsgruppen aufzuzeigen.

Es wurden jeweils zwei Diagramme pro Organ erstellt. Beide Diagramme bilden Mittelwerte ab. Eines stellt die Signalintensität eines Organs aller drei Versuchsgruppen in der T2 gewichteten MRT Sequenz dar. Das Andere stellt die Signalintensität des jeweiligen Organs in der R2* gewichteten Sequenz dar. Die Signalintensität wird über den jeweiligen Messzeitpunkten aufgetragen.

Leber

Aufgrund des natürlichen Eisengehalts der Leber war ein Vergleich der Messergebnisse der Versuchsgruppen mit denen der Kontrollgruppe nicht ausreichend. Für die Detektion eisenhaltiger Nanopartikel-Ablagerungen in der Leber war ein direkter Vergleich mit den Nativaufnahmen notwendig, um einen vermehrten Eisengehalt der Leber nachzuweisen. Beispielfhaft wird in der Abbildung 4.13 die Leber als ROI aller drei Versuchsgruppen dargestellt. Makroskopisch können keine relevanten Unterschiede bezüglich der Signalintensität festgestellt werden. Allerdings konnten mittels der Messung des Mean-Wertes (Mittelwert der Signalintensität in einer ROI) in verschiedenen Ebenen der Leber signifikante Unterschiede zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen, als auch Veränderungen der Leber eines Versuchstieres innerhalb von drei Monaten verzeichnet werden.

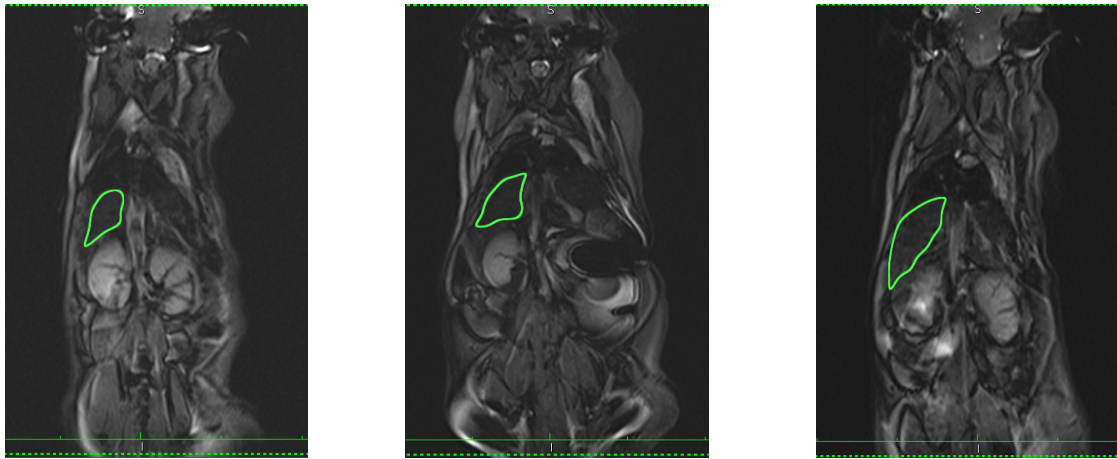


Abbildung 4.13 MRT-Scans aller drei Versuchsgruppen zum Zeitpunkt dritter Monat mit Markierung der Leber als ROI. Darstellung in T2-gewichteter Sequenz, in koronarer Ebene. Links: Versuchsgruppe +NP (Maus +NP(2)), mittig: Versuchsgruppe +NP/Koll (Maus +NP/Koll(2)), rechts: Kontrollgruppe K (Maus K(3))

Aus den Abbildungen 4.14 und 4.15 werden die Unterschiede der Signalintensität der Leber zwischen den Versuchsgruppen +NP, +NP/Koll und der Kontrollgruppe K ersichtlich. In den Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll zeigte sich in der T2-Sequenz ein stetiger Signalabfall um 33 % des Ausgangswertes über den Beobachtungszeitraum von drei Monaten. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich während des Versuchsablaufs zunehmend eisenhaltige Nanopartikel in der Leber ablagerten.

Im Gegensatz dazu blieb die Signalintensität der Leber in der Kontrollgruppe K weitestgehend konstant. An den Messzeitpunkten sieben Tage, erster, zweiter und dritter Monat waren die Unterschiede zwischen den Messwerten der Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$).

Zwischen der Versuchsgruppe +NP/Koll und der Kontrollgruppe konnten zu den Zeitpunkten sieben Tage, zweiter Monat schwach ($p < 0,05$) und im dritten Monat hoch signifikante ($p < 0,01$) Unterschiede festgestellt werden. Dies verstärkt die Annahme der zunehmenden Nanopartikelablagerung in der Leber innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Bei dem Vergleich der Versuchsgruppe +NP und der Kontrollgruppe traten im ersten und dritten Monat schwach signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede auf.

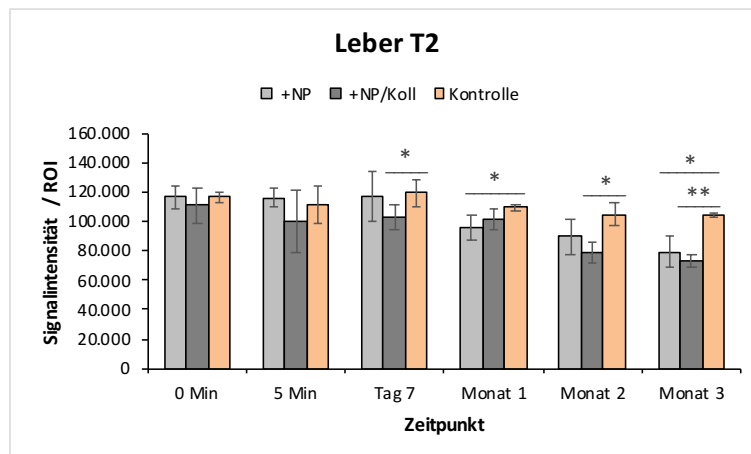


Abbildung 4.14 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Leber in der T2-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet. (n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)

In den R2*-gewichteten Aufnahmen der Leber (Abb. 4.15) zeichnete sich, wie zu erwarten, ein inverses Bild ab. In den Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll stieg die Signalintensität der Leber über 50 % bis zum dritten Monat an. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Kontrollgruppe ein maximaler Anstieg um 26 % im gleichen Zeitraum.

Zusammenfassend lässt sich in der R2*-gewichteten Darstellung der Leber der Versuchstiere +NP(1-3) und +NP/Koll(1-3) ein verändertes Signalverhalten als bei den Mäusen der Kontrollgruppe K(1-3) feststellen. Jedoch stellten sich die gemessenen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen +NP, +NP/Koll und der Kontrollgruppe K als nicht signifikant heraus.

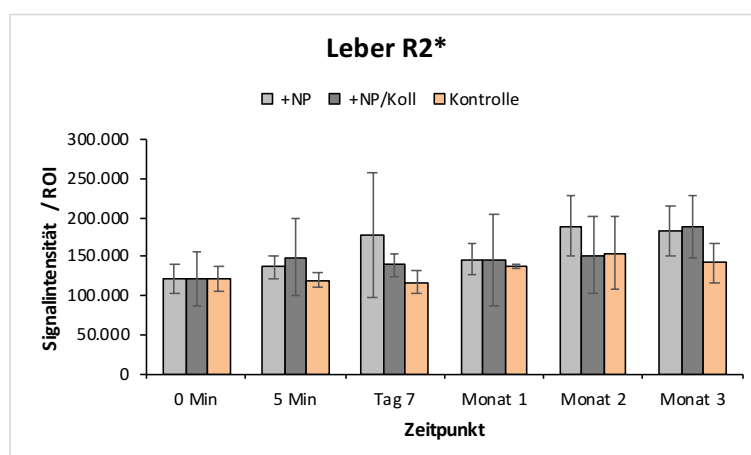


Abbildung 4.15 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Leber in der R2*-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet. (n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)

Zwischen den Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Beide Gruppen zeigten in den T2-gewichteten Sequenzen eine

stetig sinkende Signalintensität der Leber um 32 % vom Zeitpunkt der Nativaufnahme bis zum dritten Monat. Einzig ließen sich bei Betrachtung der absoluten Messwerte in T2 geringfügig höhere Werte bei der Versuchsgruppe +NP zu den Zeitpunkten Nativ, fünf Minuten, sieben Tage, zweiter Monat, dritter Monat feststellen.

In den R2*-gewichteten Bildern der Leber waren die Messwerte der Versuchsgruppe stärkeren Schwankungen ausgesetzt. Allerdings zeigte sich auch hier ein synchroner Anstieg der Signalintensität beider Versuchsgruppen auf 133-136 % des Ausgangswertes im dritten Monat.

Gehirn

Bei den Messungen der Signalintensität des Gehirns wurde sich darauf beschränkt nur das Großhirn in die Betrachtung miteinzubeziehen, um Messfehlern vorzubeugen. In der T2-Sequenz sank die Signalintensität der Versuchsgruppen um bis zu 32 % innerhalb des dreimonatigen Untersuchungszeitraumes. Die Signalintensität/ ROI der Kontrollgruppe hingegen sank maximal um 16 % und schwankte dabei um 260.000. Es zeigte sich allerdings nur ein schwach signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchstieren der Versuchsgruppen +NP, +NP/Koll und den Tieren der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt Nativ und fünf Minuten. Zwischen den Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll konnten nach fünf Minuten und sieben Tagen schwach signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) verzeichnet werden.

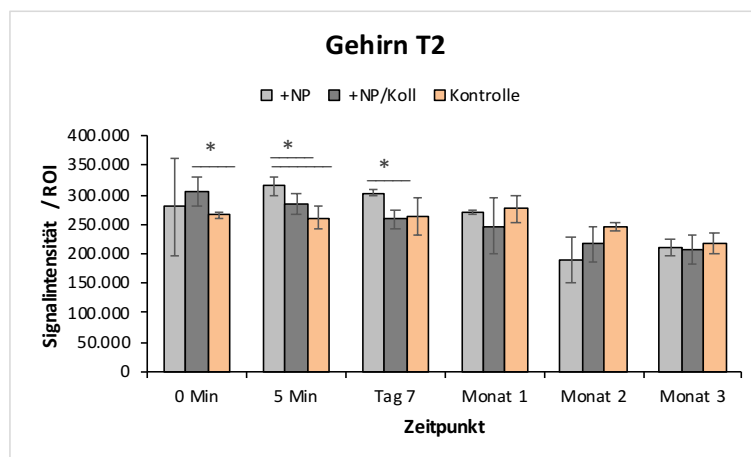


Abbildung 4.16 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität des Gehirns in der T2-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet. (n=3; "student's t-test"; * $P < 0,05$ = schwach signifikant; ** $P < 0,01$ = hoch signifikant; *** $P < 0,001$ = höchst signifikant)

In den R2*-gewichteten Bildern des Gehirns stieg die Signalintensität in den Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll um bis zu 100 % innerhalb von zwei Monaten an. Die gemessene Signalintensität der Kontrolle in der R2*-Sequenz blieb weitestgehend konstant. Hier zeigten sich nur leichte Schwankungen um 20 %. Allerdings stellten sich keine der Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Versuchsgruppen als signifikant heraus.

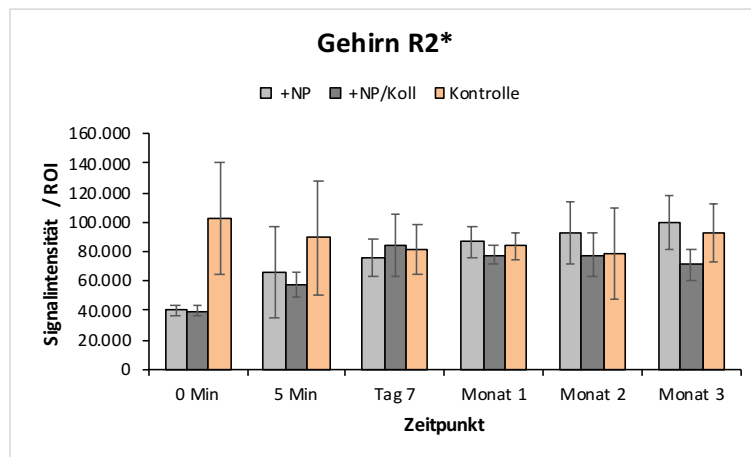


Abbildung 4.17 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität des Gehirns in der R2*-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet. (n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)

Bei der Betrachtung des Gehirns beider Versuchsgruppen in der T2-Sequenz zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie auch in der Leber. Die Signalintensität des Großhirns der Versuchstiere +NP(1-3) und +NP/Koll(1-3) sank im Verlauf der Zeit um 25-32 % des Ausgangswertes ab. Dabei waren die absoluten Messwerte der Signalintensität des Gehirns in der Versuchsgruppe +NP größtenteils geringfügig höher als die der Versuchsgruppe +NP/Koll.

In den R2*-gewichteten Bildern des Gehirns zeigten sich größere Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bezüglich des relativen Anstiegs der Signalintensität innerhalb von drei Monaten. In der Versuchsgruppe +NP stieg die Signalintensität um 60 %, während die Signalintensität der Versuchsgruppe +NP/Koll nur um 44 % anstieg.

Niere

Bei den Messungen der Niere wurde sich darauf beschränkt, die Signalintensität im parenchymatösen Teil der Niere unter Ausschluss des Nierenbeckens zu messen. Da die Signalintensität des Nierenbeckens vor allem durch den darin befindlichen Urin beeinflusst wird, wurde dieser Teil bei Erstellung der ROI ausgespart.

Die Auswertung der MRT-Messungen der Niere ergab ein ähnliches Bild wie die von Leber und Gehirn. In der T2-Sequenz ließ sich in den Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll eine sinkende Signalintensität der Nieren um bis zu 24 % feststellen. Die Signalintensität der Kontrollgruppe K stellte sich konstant, mit leichten Schwankungen bis maximal 7 %, dar. An den Messzeitpunkten sieben Tage sowie erster, zweiter und dritter Monat konnten signifikante Unterschiede ($p<0,05$) zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Versuchsgruppe +NP und der Kontrollgruppe K zeigten sich im ersten Monat schwach ($p<0,05$) und im zweiten und dritten Monat hoch signifikante ($p<0,01$) Unterschiede. Auch zwischen der Versuchsgruppe +NP/Koll und der

Kontrollgruppe K konnten zu den Zeitpunkten sieben Tage und erster Monat schwach signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) und im dritten Monat hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) festgestellt werden.

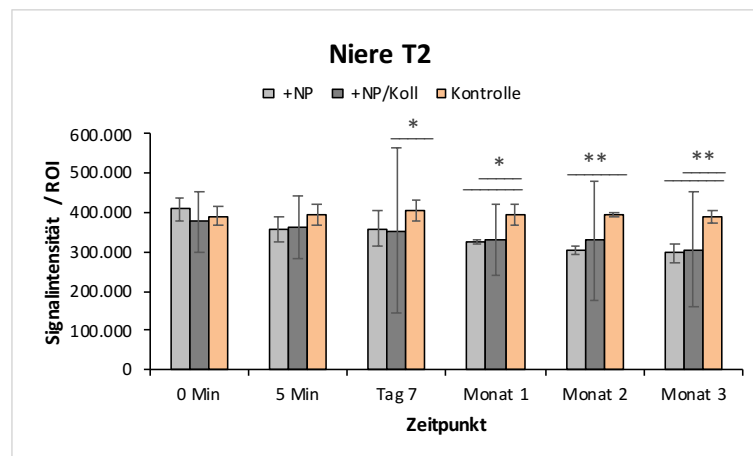


Abbildung 4.18 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Niere in der T2-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet. ($n=3$; "student's t-test"; * $P < 0,05$ = schwach signifikant; ** $P < 0,01$ = hoch signifikant; *** $P < 0,001$ = höchst signifikant)

In der R2*-gewichteten Sequenz trat bei der Betrachtung der Niere in den Versuchsgruppen sowie in der Kontrollgruppe eine stark schwankende Signalintensität auf. In den Versuchsgruppen konnte ein Anstieg der Signalintensität um bis zu 70 % verzeichnet werden. Hingegen zeigte sich in der Kontrollgruppe ein maximaler Anstieg um 37 %. Im zweiten Monat konnte ein schwach signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Versuchsgruppe +NP und Kontrollgruppe festgestellt werden. Der gemessene Unterschied zwischen der Versuchsgruppe +NP/Koll und Kontrollgruppe im dritten Monat stellte sich als hoch signifikant ($p < 0,01$) heraus.

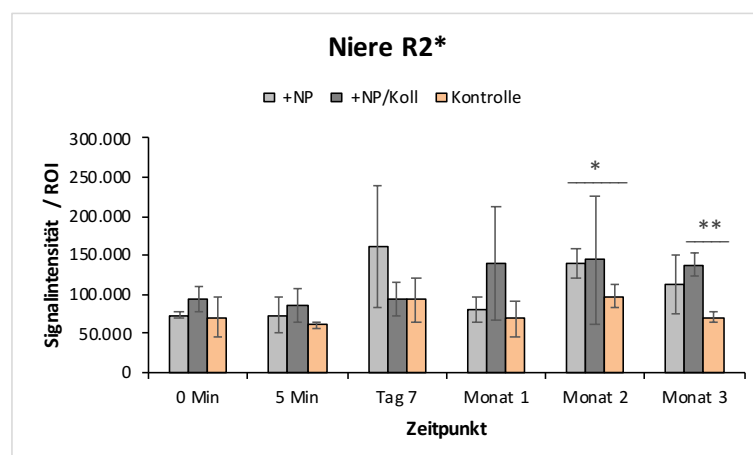


Abbildung 4.19 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Niere in der R2*-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet. ($n=3$; "student's t-test"; * $P < 0,05$ = schwach signifikant; ** $P < 0,01$ = hoch signifikant; *** $P < 0,001$ = höchst signifikant)

Bei dem Vergleich der T2-Signalintensität der Niere der Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll zeigte sich ein Abfall in beiden Gruppen innerhalb von drei Monaten. Bei den Versuchstieren +NP(1-3) konnte ein Abfall um 27 % des Ausgangswertes dargestellt werden. Im Gegensatz dazu sank die Signalintensität der Nieren der Versuchstiere +NP/Koll(1-3) nur um 19 %.

In der R2*-gewichteten Sequenz ließen sich in beiden Versuchsgruppen Anstiege der Signalintensität um 32-34 % von den Nativaufnahmen bis zu den Messungen im dritten Monat feststellen, jedoch zeigte sich keine eindeutige Dynamik der Werte. Die Messungen der Signalintensität der Niere in der R2*-gewichteten Sequenz schwankten sowohl zwischen den einzelnen Versuchstieren einer Gruppe, als auch bei den wiederholten Bestimmungen der Signalintensität eines Tieres.

Harnblase

Die Harnblase wurde in ihrem gesamten Umfang mit ihrem Inhalt vermessen. Abhängig vom Urinvolumen variierte die Größe und Signalintensität der Blase. Sowohl in den Versuchsgruppen als auch in der Kontrollgruppe konnte innerhalb des Beobachtungszeitraumes von drei Monaten ein Abfall der Werte in der T2-gewichteten Sequenz nachgewiesen werden. In den Versuchsgruppen zeigte sich ein maximaler Abfall um 31 %, in der Kontrollgruppe um maximal 26 %. Die gemessene Signalintensität der Harnblase der Versuchs- als auch Kontrollgruppe in der T2-Sequenz schwankte stark. Die gemessenen Unterschiede der Signalintensität der Harnblase zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe erwiesen sich als nicht signifikant.

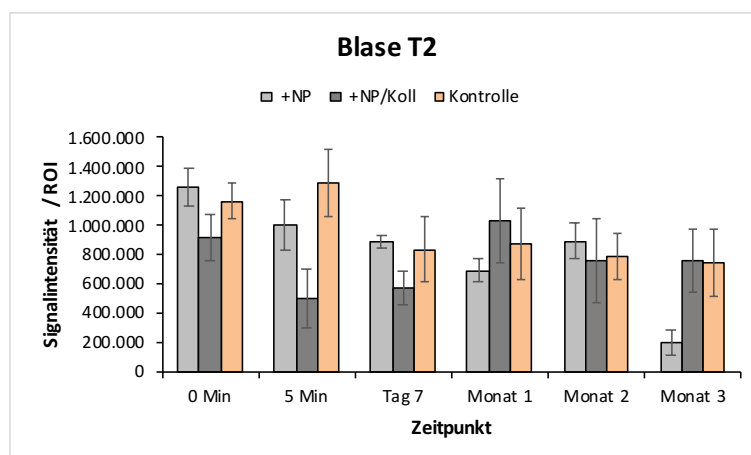


Abbildung 4.20 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Harnblase in der T2-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet. (n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)

In der R2*-gewichteten Sequenz wurden stark schwankende Werte in der Versuchs- und Kontrollgruppe festgestellt. Auch hier ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen. Die hohe Standardabweichung der Messwerte innerhalb der

Gruppen lässt zudem an der Aussagekraft dieser zweifeln.

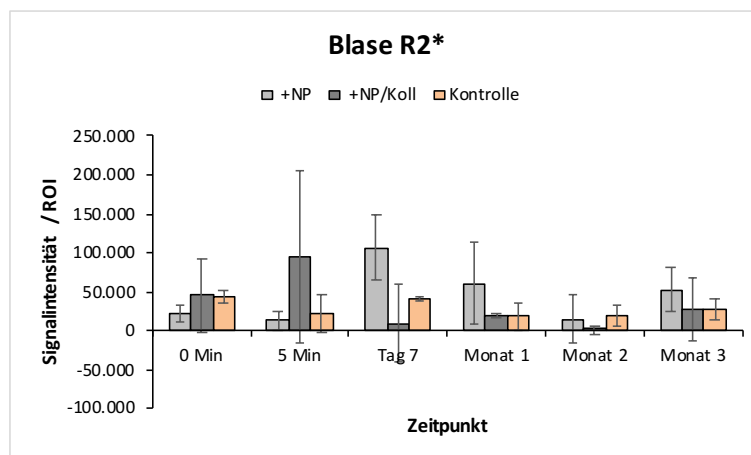


Abbildung 4.21 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Harnblase in der R2*-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet. (n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)

Der Vergleich beider Versuchsgruppen in den T2-gewichteten Aufnahmen der Harnblase ergab klare Unterschiede. In der Versuchsgruppe +NP sanken die Messwerte der Harnblase innerhalb von drei Monaten um 84 %. Die Messwerte der Versuchsgruppe +NP/Koll verringerten sich von der Nativaufnahme bis zum dritten Monat lediglich um 17 %. Weiterhin konnte in keiner der Gruppen eine klare Dynamik der Werte dargestellt werden, da die gemessenen Schwankungen zu stark waren.

Die Messungen der Signalintensität in den R2*-gewichteten Sequenzen ergaben ein ähnliches Bild. Auch hier waren die Schwankungen der Messwerte so stark ausgeprägt, dass ein Vergleich der beiden Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe nicht sinnvoll erschien. In der Versuchsgruppe +NP stiegen die Werte in drei Monaten bis auf 160 % des Ausgangswertes an. Hingegen zeigten sich in der Versuchsgruppe +NP/Koll fallende Werte um 63 %.

Knochen

Um die Messungen der Signalintensität des Knochens vergleichen zu können, wurde sich darauf geeinigt im Bereich des distalen Femurs zu messen. Der Femur war bei jedem Versuchstier gut auffindbar und aufgrund seiner Größe für die Messungen geeignet.

In den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe zeigte sich in der T2-gewichteten Sequenz nach fünf Minuten ein Abfall der Signalintensität/ ROI. Bei den Versuchsgruppen handelte es sich um einen maximalen Abfall von 42 %, bei der Kontrollgruppe um maximal 41 %. In der T2-Sequenz verhielt sich die Signalintensität des Femurs der Versuchs- und Kontrollgruppen in ihrer Verlaufsdyamik ähnlich. Zwischen der Versuchsgruppe +NP/Koll und der Kontrollgruppe K konnte zu den Zeitpunkten Nativ, siebter Tag und im ersten Monat ein schwach signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) gemessen werden. Der Vergleich der Versuchsgruppe +NP mit der Kontrollgruppe ergab lediglich im zweiten Monat einen

schwach signifikanten Unterschied ($p < 0,05$). Zwischen den Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll zeigte sich im ersten Monat ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,01$).

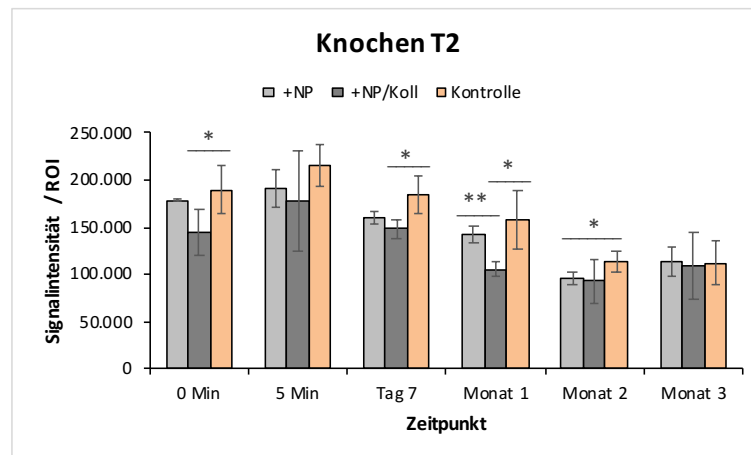


Abbildung 4.22 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität des Femurs in der T2-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet. ($n=3$; "student's t-test"; * $P < 0,05$ = schwach signifikant; ** $P < 0,01$ = hoch signifikant; *** $P < 0,001$ = höchst signifikant)

In der R2*-gewichteten Sequenz ließ sich keine eindeutige Tendenz der Werte der Versuchs- oder Kontrollgruppe erkennen. Sowohl die Versuchs- als auch die Kontrollgruppen wiesen schwankende Signalintensitäten des Femurs zwischen 80-100 % des Ausgangswertes auf. Zu den Zeitpunkten Nativ, sieben Tage und dritter Monat konnten schwach ($p < 0,05$) bis hoch ($p < 0,01$) signifikante Unterschiede zwischen der Signalintensität des Knochens der Versuchs- und Kontrollgruppe verzeichnet werden.

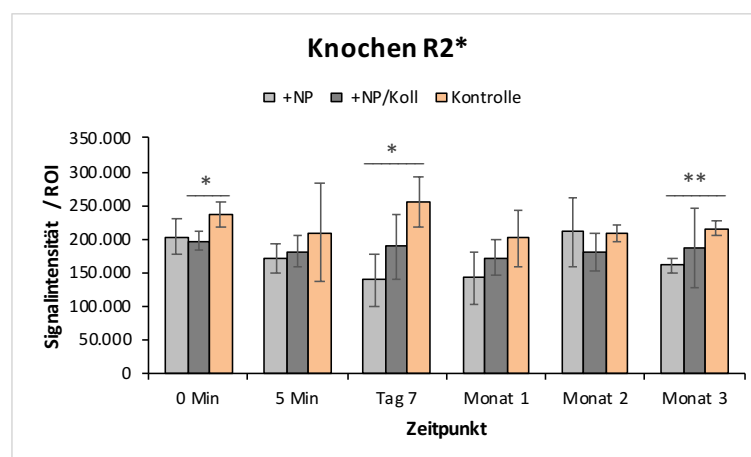


Abbildung 4.23 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität des Femurs in der R2*-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet. ($n=3$; "student's t-test"; * $P < 0,05$ = schwach signifikant; ** $P < 0,01$ = hoch signifikant; *** $P < 0,001$ = höchst signifikant)

In den T2-gewichteten Aufnahmen des Femurs konnte eine ähnliche Dynamik der Signalintensität in beiden Versuchsgruppen mit der Zeit festgestellt werden. Die Messwerte beider

Versuchsgruppen sanken um 25-37 % innerhalb von drei Monaten. Allerdings ließen sich in allen Gruppen starke Schwankungen innerhalb der Messungen des Knochens einer Maus in der R2*-gewichteten Sequenz zu einem festgelegten Zeitpunkt feststellen.

Die Messwerte der Versuchsgruppen in den R2*-gewichteten Sequenz wiesen keine einheitliche Dynamik während des Beobachtungszeitraums auf. In der Versuchsgruppe +NP/Koll blieb die Signalintensität des Knochens weitestgehend konstant und stieg lediglich um 2 % innerhalb von drei Monaten an. Hingegen erhöhte sich die Signalintensität der Versuchsgruppe +NP innerhalb von drei Monaten um 21 %.

Muskel

Für die Messung der Signalintensität des Muskels wurde die Schultermuskulatur ausgewählt. Dabei stellte die Faszie der einzelnen Muskeln die äußere Grenze bei der Einzeichnung der ROI dar.

Die Messungen des Muskels zeigten in der T2-gewichteten Sequenz ein ähnliches Bild wie die der Leber, des Gehirns und der Nieren. Mit Zunahme der Beobachtungszeit konnte in den Versuchsgruppen im Gegensatz zu der Kontrollgruppe ein Abfall der Signalintensität nachgewiesen werden. In den Versuchsgruppen sanken die Messwerte kontinuierlich bis auf 71-73 % des Nativ-Messwertes ab. Im Gegensatz dazu blieb die Signalintensität der Kontrollgruppe weitestgehend konstant und verzeichnete einen maximalen Abfall der Signalintensität um 8 % innerhalb von drei Monaten.

Die Unterschiede zwischen der Signalintensität der Muskulatur in der T2 gewichteten Sequenz zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen stellten sich zu den Zeitpunkten Tag sieben sowie erster, zweiter und dritter Monat als schwach ($p < 0,05$) bis höchst signifikant ($p < 0,001$) heraus. Zwischen der Versuchsgruppe +NP und der Kontrollgruppe K konnten im ersten, zweiten und dritten Monat schwach signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Messwerte aufgezeigt werden. Der Vergleich der Versuchsgruppe +NP/Koll und der Kontrollgruppe ergab zu den Zeitpunkten Tag sieben, erster Monat, zweiter Monat schwach signifikante Unterschiede. Allerdings konnte im dritten Monat ein höchst signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen der Versuchsgruppe +NP/Koll und Kontrollgruppe verzeichnet werden.

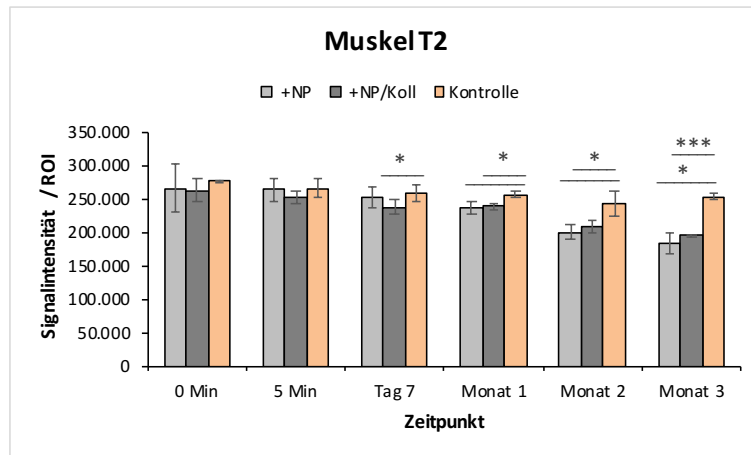


Abbildung 4.24 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Muskulatur in der T2-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet. (n=3; “student’s t-test“; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)

Die Auswertung der R2*-gewichteten MRT-Bilder verdeutlicht in Bezug auf den Muskel signifikante Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten sieben Tage, erster Monat, zweiter Monat und dritter Monat. Zwischen der Versuchsgruppe +NP und der Kontrollgruppe zeigten sich zu den Zeitpunkten Tag sieben, erster Monat und dritter Monat schwach signifikante Unterschiede. Nach zwei Monaten konnte ein höchst signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) gefunden werden. Der Vergleich der Versuchsgruppe +NP/Koll und der Kontrollgruppe ergab ebenfalls schwach signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu den Zeitpunkten erster und dritter Monat. Im zweiten Monat konnte ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen den beiden Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll nachgewiesen werden. In den Versuchsgruppen konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Signalintensität im Beobachtungszeitraum um 75-87 % verzeichnet werden. Die Messwerte der Kontrollgruppe blieben weitestgehend konstant und pendelten sich bei 110 % des Ausgangswertes ein.

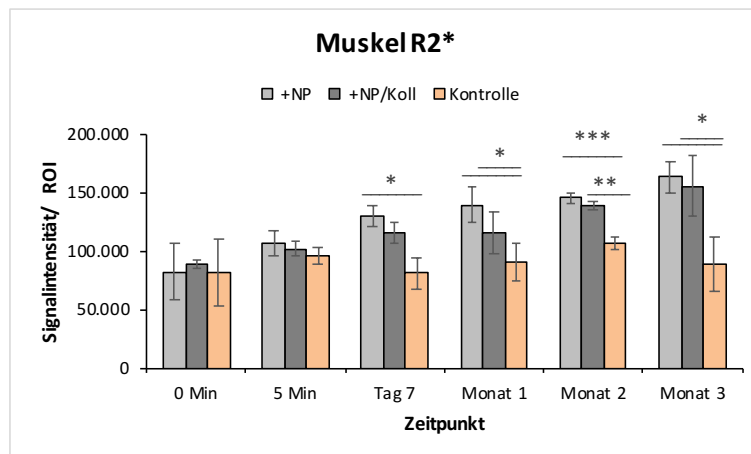


Abbildung 4.25 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Muskulatur in der R2*-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet. (n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)

Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen bezüglich der Signalintensität der Schultermuskulatur in der T2-Sequenz konnten fast identische Werte nachgewiesen werden. In beiden Versuchsgruppen sank die Signalintensität maximal um 26-31 % ab.

Auch der Vergleich der Messwerte der Muskulatur in den R2*-gewichteten Bildern zeigte kaum Unterschiede. Innerhalb von drei Monaten stieg die Signalintensität der Versuchsgruppe +NP und +NP/Koll fast synchron um 43-50 % an. Die Messwerte der Muskulatur der Versuchsgruppe +NP waren dabei größtenteils geringfügig höher als die der Versuchsgruppe +NP/Koll.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden etablierte Verfahren von der Gewinnung der adipogenen Stammzellen über die Kultivierung, Besiedlung von Kollagen-Carriern bis hin zur Implantation in SCID-Mäuse genutzt. Diese bewährten Materialien und Methoden wurden miteinander kombiniert, um die Wirkung der BNF-Starch markierten adipogenen Stammzellen auf einen lebenden Organismus zu untersuchen. Im Fokus stand die Beobachtung der implantierten ASC über einen Zeitraum von drei Monaten.

Der Versuchsaufbau ermöglichte die Visualisierung der Nanopartikel-markierten ASC. Dabei konnten die Implantate der Versuchsgruppen über einen Zeitraum von drei Monaten im lebenden Organismus dargestellt werden. Bei der Versuchsgruppe +NP/Koll gelang es ein stabiles Konstrukt aus Nanopartikel-markierten ASC und Kollagen-Carriern für drei Monate sichtbar zu machen. Allerdings war die Darstellung einzelner Zellen und Zellverbände *in vivo* trotz der hohen Auflösung des 7,1 T-Kleintier-MRTs nicht möglich. Anhand der gemessenen Signalintensitäten der Organe der Versuchstiere konnte kein eindeutiger Hinweis auf die Abwanderung der ASC in umliegende Gewebe und fernere Organe gefunden werden.

Die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse, sowie die Methodik des Versuchsaufbaus werden im Folgenden kritisch diskutiert. Dabei wird die gegenwärtige wissenschaftliche Datenlage berücksichtigt.

5.1 Narkose der Mäuse

Im gesamten Versuchsablauf stellte sich die Narkosephase der Mäuse als die kritischste bezüglich des Überlebens der Mäuse dar. Einen Risikofaktor bildet die Narkose mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran. Wie andere Inhalationsnarkotika wirkt auch Isofluran dosisabhängig atemdepressiv und bronchodilatatorisch [Ensinger, 2005]. Die Schleimhäute der Atemwege werden gereizt und die Bronchialsekretion wird verstärkt. Des Weiteren kann es in der Aufwachphase zu Erbrechen, Husten, Laryngo- und Bronchospasmus kommen [Larsen, 2006]. Aufgrund der genannten Nebenwirkungen auf den respiratorischen Trakt können sich kurze Apnoephasen bis hin zum Tod ereignen. Allerdings ist zu betonen, dass bei gewichtsadaptierter Anwendung der Inhalationsnarkosen sowie einer durchgängigen Überwachung der Respirations- und Kreislaufparameter die Risiken minimiert werden

können.

5.2 Zell-Tracking im MRT

Die *in vivo* Darstellung der Nanopartikel-markierten Zellen im MRT erfolgte in Anlehnung an vorausgegangene *in vivo* und *in vitro* Studien [Kasten et al., 2014] [Kasten et al., 2015] [Siegmund et al., 2017]. Mit der vorliegenden Arbeit konnten die Nanopartikel-markierten Zellen mittels MRT erfolgreich über einen Zeitraum von drei Monaten in einem lebenden Organismus visualisiert werden. Allerdings ist die Darstellung der markierten Zellen im lebenden Organismus stark abhängig von den Umgebungsbedingungen. Insbesondere der Wasser- bzw. Protonengehalt sowie der natürliche Eisengehalt von Geweben beeinflussen die Darstellung der Nanopartikel und damit der markierten Zellen im MRT [Trekker et al., 2014]. Somit unterscheiden sich die Untersuchungen des *in vivo* Trackings wesentlich vom *in vitro* Versuchsmodell. Bei der Durchführung der Messungen gestaltete sich die Anlage der ROI als fehlerbehaftet. Dabei schwankte die Signalintensität der ausgewählten ROI in Abhängigkeit der ausgewählten MRT-Schicht. Trotz Bemühungen der Untersucher ähnliche Bereiche und eine einheitliche Größe der ROI zu wählen, zeigten sich bei den Signalintensitäts-Messungen unterschiedlicher Tiere, aber auch innerhalb verschiedener MRT-Schichten eines Organes des gleichen Tieres, starke Unterschiede. Die Messungen der Leber, Skelettmuskulatur und Niere waren aufgrund der Homogenität des Gewebes dieser Organe leichter durchführbar. Daraus resultierten Messergebnisse mit einer geringeren Standardabweichung zwischen den Tieren einer Gruppe.

Die BNF-Starch Markierung der Zellen ermöglichte eine klare Demarkierung des Injektionsareals gegenüber dem umliegenden Gewebe. Jedoch stellte sich die Visualisierung einzelner Zellen und Zellverbände als erschwert heraus. Im Gegensatz zu den *in vitro* Studien von Kasten et al. (2015) konnten sich die markierten Zellen in eisenhaltigen Organen nicht eindeutig demarkieren. Kasten et al. (2014) wies eine lineare Korrelation der $R2^*$ -Zeiten mit der Eisenkonzentration der gelabelten Zellen ($\mu\text{gFe/ml}$) nach. Aufgrund des natürlichen Eisengehalts in unterschiedlichen körpereigenen Zellen und Geweben z.B. Erythrozyten, Hepatozyten, Myozyten, konnte eine verkürzte $T2$ - bzw. verlängerte $R2^*$ -Relaxationszeit nicht eindeutig auf die Abwanderung von Nanopartikeln oder markierten ASC in den jeweiligen Organen zurückgeführt werden.

In den $T2$ - und $R2^*$ -gewichteten Sequenzen konnten eindeutige Unterschiede zwischen den nicht- und den Nanopartikel-markierten Zellbereichen im Bereich des Injektionsareals dargestellt werden. Jedoch konnte die Abwanderung einzelner Zellen und Zellverbände mit der hier verwendeten Methodik nicht visualisiert werden. Bei den Messungen der Niere, Leber und Muskeln in der $T2$ -Sequenz zeigte sich eine abnehmende Signalintensität/ROI mit der Zeit. Es wird vermutet, dass mit voranschreitender Beobachtungszeit transplantierte, BNF-Starch markierte ASC abgebaut werden und das freigesetzte BNF-Starch in der Leber, Niere und Muskel akkumuliert. Jedoch konnte kein eindeutiger Rückschluss auf

die Ablagerung von BNF-Starch oder BNF-Starch markierten ASC gezogen werden. Grundlegend für die langfristige Beobachtung der Nanopartikel-markierten Zellen mittels MRT ist der Verbleib der Partikel in den intakten und lebenden Zellen. Im Falle eines Absterbens der Zelle würden die Partikel freigesetzt werden und sich in umliegendem Gewebe ablagern beziehungsweise über den Blutkreislauf oder die Lymphe in andere Körperregionen abtransportiert und metabolisiert werden. Abhängig von der Hülle werden SPIOs von unterschiedlichen Zelltypen absorbiert und verstoffwechselt. Wenn SPIOs abgebaut werden, wird das freigesetzte Eisen in den zellulären Eisenpool eingespeist. Dort wird es abhängig vom Gesamteisenstatus des Körpers entweder als Ferritin gespeichert oder über Ferroportin ins Blut transportiert. Besteht ein Eisenmangel wird vermehrt Eisen ins Knochenmark transportiert und in neugebildete Erythrozyten inkorporiert [Weissleder et al., 1989]. Auf Grundlage der aktuellen Literatur und der Ergebnisse dieser Arbeit ist eine Abwanderung der ASC aus dem Implantationsgebiet in ortsferne Organe unwahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung für die abnehmende Signalintensität in der Leber, der Niere und den Muskeln in der T2-Sequenz innerhalb der Beobachtungszeit ist die Apoptose einiger insuffizient über Perfusion und Diffusion versorgten ASC. Die freigesetzten BNF-Starch Partikel könnten durch Makrophagen aufgenommen, verstoffwechselt und anschließend als Ferritin im Bereich der Leber und Muskeln gespeichert worden sein. Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Einbau des aus den SPIOs stammenden Eisens als Hämoglobin in die Erythrozyten. Weissleder et al. konnte zeigen, dass das Eisen aus dem dextranumhüllten SPIO AMI-25, biodegradierbar und bioverfügbar ist und in den Erythrozyten in Form von Hämoglobin eingebaut wurde [Weissleder et al., 1989].

5.2.1 Leber

Die Messungen der Leber in der T2-Sequenz ergaben eine kontinuierlich abfallende Signalintensität in den Versuchsgruppen innerhalb des dreimonatigen Untersuchungszeitraumes. Jeweils invers verhielt es sich in der R2*-Sequenz. Die Signalintensität der Leber in der Kontrollgruppe blieb bis auf kleinere Schwankungen konstant. Zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe zeigte sich zu den Zeitpunkten erste Woche, erster Monat, zweiter Monat, und dritter Monat niedrig bis hoch signifikante Unterschiede bezüglich der Signalintensität der Leber. Hingegen konnten zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die gemessenen Unterschiede zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppen durch die Nanopartikel der markierten ASC verursacht wurden. Ob es sich dabei um abgewanderte, mit Nanopartikeln markierte ASC oder nur Nanopartikel handelt, welche durch Sekretion aus apoptotischen ASC freigesetzt wurden, kann in diesem Versuchsaufbau nicht geklärt werden.

Wie schon erwähnt, stellen eisenhaltige Nanopartikel die Zellen nur indirekt dar, was als verstärkte Hypointensität des jeweiligen Areals in den T2-gewichteten Sequenzen des MRT

sichtbar wird. Eine sichere Unterscheidung zwischen markierten vitalen Zellen und toten Zellen ist dabei nicht möglich. Folglich lässt sich mit der verwendeten Methodik keine Aussage darüber treffen, ob die ASC in entfernte Gewebe abwanderten oder aufgrund diverser Prozesse (Diffusions-, Perfusionsstörungen) im Implantationsgebiet untergingen und die internalisierten Nanopartikel freisetzten, die wiederum in entfernte Organe abtransportiert wurden.

Die nur teilweise signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen liegen neben den individuellen Messfehlern und Artefakten auch an der geringen Gruppengröße. Es empfiehlt sich, in weiterführenden Studien einen Versuchsaufbau mit mehr Versuchstieren pro Gruppe anzuvisieren.

5.2.2 Niere

Die Messungen der Signalintensität der Niere zeigten sowohl in der T2- als auch R2*-gewichteten Sequenz niedrig bis hoch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe. Im Verlauf des Versuchs wurde ein zunehmender Unterschied der Signalintensität der Nieren zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen deutlich. Wie zuvor ausgeführt wird vermutet, dass es sich um eine zunehmende Ablagerung von Nanopartikeln im Nierenparenchym handelt. Um die Vermutung zu erhärten, könnten in weiterführenden Studien lichtmikroskopische Untersuchungen der jeweiligen Organe vorgenommen werden, mit dem Ziel, die eisenhaltigen Nanopartikelablagerungen eindeutig visualisieren zu können.

5.2.3 Gehirn

Aufgrund der bestehenden Blut-Hirn-Schranke und einer damit einhergehenden selektiven Durchlässigkeit für lebenswichtige Nährstoffe wie Glucose und Aminosäuren, wurde eine Abwanderung der adipogenen Stammzellen beziehungsweise der Nanopartikel in das Gehirn als unwahrscheinlich erachtet. Die durchgeführten MRT-Messungen des Gehirns in der T2-Sequenz bestätigten diese Annahme. Es zeigten sich lediglich signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 0 Minuten und nach 5 Minuten. Eine Abwanderung der Zellen beziehungsweise eine Ablagerung der Nanopartikel im Gehirn wird zu diesen Zeitpunkten als unwahrscheinlich bewertet. Zu späteren Messzeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen verzeichnet werden. Allerdings gestaltete sich die Anlage der ROI als schwierig durchführbar. Abhängig vom Anteil des angeschnittenen Ventrikelsystems sowie der weißen und grauen Substanz variierte die Signalintensität des Gehirns. Somit kam es neben interindividuellen auch zu intraindividuellen Schwankungen der Messergebnisse. Vermutlich könnten durch eine zunehmende Gruppengröße diese Schwankungen verringert werden.

5.2.4 Skelettmuskulatur

Die Messungen der Signalintensität im Bereich der Skelettmuskulatur ergaben in beiden Versuchsgruppen einen fast linearen Abfall in der T2-gewichteten Sequenz. Die Signalintensität der Muskulatur der Kontrollgruppe verhielt sich dagegen weitestgehend konstant. Die schwach bis höchst signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und den Versuchsgruppen zu den Zeitpunkten sieben Tage, erster Monat, zweiter Monat, dritter Monat lassen die Vermutung zu, dass es sich bei den Signalveränderungen der Muskulatur in den Versuchsgruppen um abgelagertes Eisen aus den BNF-Starch Partikeln von apoptotischen, markierten ASC handelt. Eine Abwanderung der markierten ASC in die Skelettmuskulatur kann mit dem hiesigen Versuchsaufbau nicht eindeutig nachgewiesen werden, da einzelne Zellverbände im Bereich der Muskulatur nicht visualisiert werden konnten.

5.2.5 Harnblase

Die Messungen der Signalintensität im Bereich der Harnblase wiesen stark inter- als auch intraindividuelle Schwankungen auf. Dabei variierte die gemessene Signalintensität abhängig von der in der Blase befindlichen Urinmenge. Abhängig von der Urinmenge variierte auch die Größe der Harnblase, sodass einzelne Messungen aufgrund einer entleerten Blase nicht durchgeführt werden konnten. Bezüglich der Ablagerungen von adipogenen Stammzellen in der Blase konnte somit mit diesem Versuch keine eindeutige Aussage gemacht werden. Auch die Sekretion von Nanopartikeln mit dem Urin konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

5.2.6 Knochen

Die Messungen der Knochen erwiesen sich als äußerst schwierig durchführbar. Dabei gestaltete sich vor allem die Auswahl der ROI als problematisch. Oft waren nur kleine Anteile des Femurs in einer Ebene angeschnitten und diese beinhalteten sowohl Spongiosa, als auch Compacta, Corticalis und in Gelenknähe hyalinen Knorpel. Die Signalintensität des vermessenen Areals variierte abhängig von der Zusammensetzung dieser einzelnen Komponenten in der ROI. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen, einigten sich die drei Untersucher auf den distalen Femur. Jedoch wiesen die Signalintensitätsmessungen des Knochens starke Schwankungen sowohl zwischen den einzelnen Untersuchern als auch innerhalb eines Untersuchers auf. Somit konnten keine eindeutigen Rückschlüsse von der Signalintensität des Knochens im MRT auf eingewanderten ASC oder Nanopartikel gezogen werden.

5.2.7 Injektionsareal

Im Bereich des Injektionsareals zeigten sich zwischen den einzelnen Versuchstieren der Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll hinsichtlich der Intensität des Kontrastes keine wesentlichen Unterschiede. Auch bei der Betrachtung der Signalstärke des Injektionsareals innerhalb einzelner Versuchstiere zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten blieben die Werte weitgehend konstant. Beim Vergleich der Versuchs- und Kontrollgruppen zeigten sich hingegen eindeutige Unterschiede. Das Injektionsareal der Versuchsgruppen demarkierte sich hypointens in der T2-gewichteten Sequenz. Im Gegensatz dazu stellte sich das Implantatgebiet der Kontrollgruppe stark hyperintens dar. Das hyperintense Injektionsareal der Kontrollgruppe ist vermutlich durch den Wasseranteil der injizierten Lösung begründet, die neben auf Kollagenträgern befindlichen unmarkierten ASC auch STEM-Medium beinhaltete. Das STEM-Medium gewährleistete das Überleben der Zellen *in vitro*. Des Weiteren musste mit der zugesetzten Flüssigkeit sichergestellt werden, dass die Zell-Kollagen-Suspension mittels einer 18G-Braunüle injiziert werden konnte, um eine geringinvasive Implantation zu ermöglichen. Zwar befanden sich auch die Nanopartikel-markierten ASC in einer solchen Suspension. Jedoch wird durch den Suszeptibilitätseffekt der eisenhaltigen Nanopartikel das Signal der umliegenden Strukturen, zum Beispiel Kollagen und STEM-Medium, in der T2-Sequenz ausgelöscht.

In der Kontrollgruppe konnte das Injektionsareal nur bis einschließlich zum ersten Monat dargestellt werden. Hingegen war die Darstellung des Injektionsareals der Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll bis zum dritten Monat möglich. Hinsichtlich der Größenstabilität des Injektionsareals wiesen alle Gruppen ein unterschiedliches Verhalten auf. In der Versuchsgruppe +NP zeigte sich mit der Zeit eine starke Reduktion der Implantatgröße. In der Versuchsgruppe +NP/Koll blieb die Implantatgröße weitestgehend konstant. Im Gegensatz dazu konnte bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe schon ab dem ersten Monat kein Implantat mehr nachgewiesen werden.

Eine mögliche Erklärung für die kurze Darstellung des Implantatgebiets der Kontrollgruppe bildet die fehlende Markierung der Zellen, die nach Bildung reifer Adipozyten im Implantatgebiet eine ähnliche Signalintensität wie das natürlich angelegte subkutane Fettgewebe besitzen und somit mittels MRT-Technik nicht eindeutig differenziert dargestellt werden können. Vor allem zwischen den Zeitpunkten fünf Minuten und eine Woche zeigte sich eine massive Schrumpfung der Implantate in der Kontrollgruppe. Vermutlich wurde innerhalb der ersten Woche ein Großteil des wasserhaltigen STEM-Mediums aus dem Implantationsgebiet resorbiert, was zum einen zu einer verminderten Demarkierung des Injektionsareals und zum anderen zur Verringerung der initial gemessenen Implantatgröße führte. Die Implantatregionen der Versuchsgruppen erscheinen aufgrund des Suszeptibilitätseffekt vergrößert. Dieser bedingt durch den Abfall des T2-Signals an Grenzflächen von den Nanopartikel-markierten Zellen zum umliegenden Gewebe, dass unter Umständen die Implantate der mit den Nanopartikel-markierten Zellen größer erscheinen. Eine weitere

Erklärungsmöglichkeit wird durch das durchgeführte Hoechst-Assay aufgezeigt, welches eine verstärkte Proliferation der mit BNF-Starch markierten Zellen nachwies. Somit konnte in den Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll, in welchen Nanopartikel-markierte Zellen implantiert wurden, eine höhere Zellzahl und Größenpersistenz des Implantats als in der Kontrollgruppe erwartet werden.

Zusammenfassend konnte in der Versuchsgruppe +NP/Koll, in welcher den Mäusen auf Kollagencarriern befindlichen markierten ASC injiziert wurden, ein über drei Monate stabiles Implantat beobachtet werden. Es wird vermutet, dass die in diesem Versuch als Trägermedium verwendeten Kollagencarrier eine entscheidende Rolle bezüglich der Langzeitstabilität des Implantats spielen. Eine Untersuchung über den Zeitraum von drei Monaten hinaus würde sich als sinnvoll erweisen, um auch die Langzeitpersistenz des Implantats zu untersuchen.

5.3 Distribution

Wie bereits erwähnt, wurden mit der hier verwendeten Methodik Zellen lediglich indirekt dargestellt, was einen direkten Schluss auf die Distribution der ASC nicht zuließ. Um die Frage nach der Distribution vitaler Zellen sicher zu beantworten, bedarf es einer direkten Markierung der Zielzellen sowie funktioneller bildgebender Verfahren wie der Szintigraphie, Positronen-Emissions-Tomographie, Biolumineszenz. Zum Beispiel können hMSC durch Veränderung des Genmaterials der Zellen direkt dargestellt werden. Die in die DNA der Zielzellen eingefügten Gene kodieren Proteine, welche eine Fluoreszenz erzeugen, die mit einem Luminometer gemessen werden können [Ponomarev et al., 2004] [Cao et al., 2006] [Wu et al., 2006] [Love et al., 2007]. Nachteilig sind allerdings die fragliche Beeinflussung der Zielzellen durch die Veränderung des genetischen Materials sowie die kürzeren Darstellungszeiten und der hohe Arbeitsaufwand zu bewerten. Alternativ können Stammzellen auch über zelleigene Proteine dargestellt werden. Die Forschungsgruppe um Naumova et al. [Naumova et al., 2014] konnte transplantierte Stammzellen über eine gezielte Überexpression des Eisenspeicherproteins Ferritin im MRT visualisieren. Dies ermöglichte auch die Differenzierung von vitalen und avitalen implantierten Stammzellen. Jedoch ist die Darstellung im MRT aufgrund der vergleichsweise geringen Eisenkonzentration erschwert. Darüber hinaus existieren Methoden, welche durch photolumineszente Nanopartikel Stammzellen erfolgreich sichtbar machen können [Li et al., 2018]. Jedoch besteht auch hier die Problematik der kurzen Darstellungszeit bis maximal sieben Tage. Jede dieser Methoden der direkten und indirekten Markierung von Zellen hat verschiedene Vor- und Nachteile, die je nach Versuchsaufbau gezielt eingesetzt werden können, um die Zielzellen bestmöglich zu visualisieren.

5.4 Adipose tissue engineering

5.4.1 SCID-Mäuse vom Typ *beige* als Tiermodell

Die SCID-Mäuse vom Typ *beige* erwiesen sich, wie bereits in vorherigen Studien [Frerich et al., 2012] [Kasten et al., 2015] [Siegmond et al., 2017], als geeignetes Tiermodell für den vorliegenden Versuchsaufbau. Der Zeitrahmen des Versuchs von drei Monaten konnte mit der Lebenserwartung der Tiere von circa sechs Monaten gut vereinbart werden. Während des dreimonatigen Beobachtungszeitraums zeigte keines der Tiere eine Abstoßungsreaktion infolge der Implantation humaner Zellen. Die Tiere verhielten sich in der Gruppenhaltung sozial. In Stresssituationen erwies sich der Großteil der Tiere als stressresistent und robust.

5.4.2 Kollagen-Carrier

Im vorliegenden Versuch wurden als Carrier Kollagenpartikel mit einer Größe von unter 0,1 mm Durchmesser benutzt, um eine minimalinvasive Applikation und damit eine geringe Empfängersterblichkeit zu gewährleisten. Die subkutane Applikation mittels einer Braunüle konnte problemlos durchgeführt werden. Keine der Mäuse zeigte nach der Applikation eine eingeschränkte Mobilität oder verändertes Verhaltensmuster, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Mäuse nach dem Eingriff über keine starken, immobilisierenden Schmerzen verfügten. Infektionen im Bereich des Applikationsgebietes traten bei keinem der Versuchstiere auf. Im Gegensatz zu größeren und stabileren Kollagenkonstrukten war eine gleichmäßigere Besiedlung mit ASC möglich. Im MRT als auch in *in vitro* Versuchen (Hoechst-Färbung) konnte eine homogene Besiedlung der Kollagen-Carrier mit adipogenen Stammzellen nachgewiesen werden.

In vorangegangenen Studien von Siegmund et al. (2017) und Frerich et al. (2012) konnte innerhalb des dreimonatigen Versuchsablaufs eine Schrumpfung der zellbesiedelten Scaffolds festgestellt werden. Diese wurden auf die fehlende Nährstoffversorgung der Zellen im Zentrum des Implantats innerhalb der ersten Tage durch eine fehlende Blutversorgung zurückgeführt. In der Zeit der fehlenden Vaskularisation werden die Zellen durch Diffusion versorgt. Die Perfusion des Implantats erfolgt durch Neovaskularisation, beginnend in der Peripherie bis zum Zentrum des Implantats. In Abhängigkeit von der Implantatgröße sterben die Zellen im Zentrum des Implantats aufgrund einer fehlenden Perfusion und mangelhaften Diffusion ab und es kommt zur Implantatschrumpfung [Muschler et al., 2004]. Hingegen sollten die Kollagen-Carrier aufgrund ihrer geringen Größe eine verbesserte Perfusion und Diffusion im Zentrum des Implantats ermöglichen. Jedoch zeigte sich in den Versuchs- und Kontrollgruppen sowohl makroskopisch als auch palpatorisch eine Schrumpfung der Implantate mit der Zeit. Nach Ablauf des ersten Monats konnten die Implantate nicht mehr eindeutig am Ort der Injektion makroskopisch vom umliegenden

subkutanen Fettgewebe unterschieden beziehungsweise palpatorisch abgegrenzt werden. Im MRT wurden eindeutige Unterschiede zwischen der Versuchsgruppe +NP und +NP/Koll sichtbar. In der Versuchsgruppe +NP ließ sich eine starke Reduktion der Implantatgröße innerhalb des dreimonatigen Beobachtungszeitraums darstellen. Hingegen verhielt sich die Implantatgröße in der Versuchsgruppe +NP/Koll weitestgehend stabil. Es wird vermutet, dass die Kollagen-Carrier das Fettgewebiskonstrukt stabilisieren und die ASC daran hindern ins umliegende Gewebe beziehungsweise in andere Organe zu emigrieren.

Ungeklärt bleibt die Frage, ob auch über den Versuchszeitraum von drei Monaten hinaus das Fettgewebiskonstrukt größenstabil und ortsbeständig bleibt.

5.5 Toxizität eisenoxidhaltiger Nanopartikel

In dieser Arbeit konnten mittels eines Live-Dead-Assays zytotoxische Effekte der BNF-Starch Partikel in den verwendeten Konzentrationen *in vitro* ausgeschlossen werden. Dabei zeigte sich in den Versuchsgruppen im Gegensatz zu der Kontrollgruppe keine erhöhte Apoptoserate der ASC. Allerdings konnten keine zytotoxischen Effekte wie z.B. thermische Schäden im Empfängerorganismus *in vivo* ausgeschlossen werden. Die klinischen Untersuchungen der Mäuse zeigten keinen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen. Weder die Tiere der Versuchsgruppen noch die der Kontrollgruppe zeigten während des dreimonatigen Untersuchungszeitraums pathologische Veränderungen im Bereich des Implantationsgebietes.

Die toxische Wirkung von eisenhaltigen Nanopartikeln wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Studien in denen die eisenoxidhaltigen Nanopartikel intravenös injiziert wurden, zeigten eine Anreicherung der Partikel in der Leber und der Milz [Kut et al., 2012]. In Abhängigkeit von der Konzentration traten Hyperthermie bedingte Gewebeschäden auf, die häufig tödlich endeten. Die Arbeitsgruppe um Kolečka et al. (2017) konnte keine nachteiligen Effekte auf die markierten ASC nachweisen, welche mit 319,2 $\mu\text{g Fe/ml}$ gelabelt wurden. Die Untersuchungen von Mishra et al. (2018) belegen lediglich marginale Veränderungen toxikologischer Parameter wie der Zelllänge, der Apoptoserate und des Aktinzytoskeletts, sowie keine signifikanten DNA-Schäden. Gupta et al. (2004) wies die Biokompatibilität von PEG-beschichtete Nanopartikel nach. In einer darauffolgenden Studie beschrieb Gupta et al. (2005) eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität der SPIOs. Eine andere Studie von Hussain et al. (2005) konnte auch bei höchsten Nanopartikelkonzentrationen keine zytotoxischen Effekte nachweisen.

Die unklare Datenlage verdeutlicht die Komplexität dieses Themengebietes. Die Nanopartikeltoxizität ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig: Konzentration, Größe, Form, Ladung, Oberflächenbeschichtung, Agglomerationszustand der Nanopartikel sowie auch vom markierten Zelltyp und dem Implantationsort [Mahmoudi et al., 2011].

Somit sollte vor jedem klinischen Einsatz von Nanopartikeln die Biokompatibilität und mögliche Nebenwirkungen spezifisch untersucht werden.

5.6 Kanzerogenes Potential

Derzeit wird ein mögliches kanzerogenes Potential der implantierten Stammzellen kontrovers diskutiert. In mehreren Studien werden Tumorrezidive und Tumorneubildungen nach dem Einsatz von autologen Fetttransplantationen und dem Einsatz von humanen mesenchymalen Stammzellen beschrieben. Dabei wird eine Verbindung von mesenchymalen Stammzellen und einem vermehrten Tumorwachstum von beispielsweise Mamma-, Prostata- und Lungenkarzinomen diskutiert [Chandler et al., 2012] [Zhao et al., 2012] [Lin et al., 2010]. *In vivo* als auch *in vitro* Studien zeigten ein verstärktes Wachstum und eine Metastasenbildung bei Mammakarzinom-Patienten, welche eine Brustrekonstruktion mit einer ASC-Coinjektion erhielten [Karnoub et al., 2007] [Lazennec et al., 2008] [Goldstein et al., 2010]. Perrot et al. (2010) beschrieb eine erhöhte Proliferation von Osteosarkomzellen durch autologe Fetttransplantationen bei immunsupprimierten Mäusen. Allerdings ist die Studienlage nicht eindeutig. Studien von Sun et al. (2009), Zhu et al. (2009) und Cousin et al. (2009) zeigten einen antitumorösen oder keinen Effekt von ASC auf das Tumorwachstum. Lee et al. (2019) konnte in seinem Versuchsaufbau keinen signifikanten Anstieg des Tumorwachstums von Mammakarzinomen in Verbindung mit SVF Injektionen nachweisen. Als positiv erwies sich die erhöhte Fettüberlebensrate der Versuchstiere, welche SVF Injektionen erhielten. Gebremeskel et al. (2019) beschrieb den proliferations- und invasivitätsfördernden Effekt von ASC auf Mammakarzinomzellen. Jedoch zeigten sich diese Eigenschaften nicht bei konventionellen Fetttransplantationen und Zell-assistiertem Lipotransfer.

Aufgrund der Unklarheiten hinsichtlich des kanzerogenen Potentials wird empfohlen, die Stammzelltherapie sowie Fetttransplantationen von Patienten mit einer Tumorgeschichte sorgfältig abzuwägen und im Falle einer aktiven Tumorerkrankung aufzuschieben [Chandler et al., 2012] [Zimmerlin et al., 2011].

Der Einsatz adipogener Stammzellen stellt sicherlich einen vielversprechenden Ansatz für die Augmentation dar, allerdings müssen vor dem klinischen Einsatz noch viele Fragen bezüglich der Patientensicherheit geklärt werden.

Derzeit rückt der Zell-assistierte Lipotransfer immer mehr in den Fokus der Forschung. Dabei handelt es sich um eine Technik, welche autologe Fetttransplantationen mit der Implantation von ASC kombiniert. In der Literatur wird aktuell eine Überlegenheit der CAL gegenüber der konventionellen autologen Fettgewebstransplantation noch kontrovers diskutiert. In mehreren Studien konnte eine verbesserte Retention des Fettgewebssimplantats nachgewiesen werden. 2017 untersuchte Hong et al. die Umgebungsveränderungen in Donor- und Empfängergewebe nach Zell-assistiertem Lipotransfer. Durch Immunofluoreszenzfärbung konnte die Distribution implantierter Adipozyten und ASC verfolgt werden. Die Untersuchungsergebnisse zeigten eine verstärkte Angiogenese im Empfängergewebe sowie eine verbesserte Retention des Implantats durch ASC- Supplementierung [Hong et al., 2017]. In den folgenden Jahren untersuchte Hong et al. (2019) den Einfluss von in-

travenös applizierten ASC auf Umgebungsveränderungen des Implantats. Die Distribution der ASC wurde anhand Immunofluoreszenz-Färbung dargestellt und die Transplantatvolumina durch MRT-Scans berechnet. Es resultierte eine signifikant höhere Adipogenese Gen-Expression, Retention des Implantatvolumens und Vaskularisationsdichte. Abhängig von der ASC-Konzentration zeigten sich quantitative Unterschiede der Angiogenese und Adipogenese während des adipogenen Remodellings. Harris et al. (2019) untersuchte anhand von Tierstudien den Einfluss endothelial differenzierter ASC auf das Überleben und die Neovaskularisation von Fetttransplantaten. Dabei wiesen die Transplantate der ASC assistierten Gruppen eine höhere Überlebensrate und morphologische Integrität auf. Darüber hinaus konnten weniger Entzündungsreaktionen und eine verstärkte Gefäßbildung im Implantatgebiet beobachtet werden. Jedoch existieren vereinzelt auch Studien, die kein verbessertes Outcome vom CAL im Gegensatz zur konventionellen Fetttransplantation beschreiben [Wang et al., 2015]. Die Meta-Analyse von Laloze et al. (2018) wertete die Literatur von 2008-2016 bezüglich der Effektivität der CAL aus. Dabei konnte eine signifikant höhere Fett-Überlebensrate mit der CAL-Methode bis zu einem Injektionsvolumen von 100 ml festgestellt. Allerdings wies die CAL-Methode eine höhere Komplikationsrate auf und reduzierte nicht die Anzahl an Folgeeingriffen nach der initialen Fettimplantation. Es bedarf weiterer Studien, um das Langzeit-Outcome des Zell-assistierten Lipotransfers bewerten und mit konventionellen Methoden vergleichen zu können.

Zusammenfassend stellt die Implantation beziehungsweise Supplementation von ASC eine innovative Therapiemöglichkeit dar, Weichgewebsdefekte langfristig zu decken. Jedoch muss aufgrund der ungeklärten Datenlage in jedem Patientenfall individuell über die bestmögliche Therapie entschieden werden. Auch bedarf es weiterer Forschungsarbeit, um die Langzeitpersistenz der Implantate, die Patientensicherheit und die Nebenwirkungsrate zu verbessern.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Derzeit existiert noch kein idealer Weichgewebersatz für die Rekonstruktion weichgewebiger Defekte. Somit stellt das tissue engineering von Fettgewebe einen Schwerpunkt der heutigen Forschung dar. Trotz des großen wissenschaftlichen Interesses an der Thematik wurden erst wenig Studien über die Distribution subkutan implantierter adipogener Stammzellen veröffentlicht, um mögliche Nebenwirkungen und Komplikationen dieser innovativen Therapiemöglichkeit zu untersuchen.

Aus dieser wissenschaftlichen Lücke heraus entstand das Ziel dieser Arbeit, das *in vivo* Verhalten implantierter ASC mittels MRT-Technik näher zu untersuchen. Im vorliegenden Versuchsaufbau wurden humane adipogene Stammzellen mit eisenhaltigen BNF-Starch-Nanopartikeln markiert und auf Kollagen-Carriern ausgesät. Anschließend erfolgte die subkutane Implantation dieser zellbesiedelten Weichgewebskonstrukte in die Flanke von SCID-Mäusen. Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen eingeteilt: In der Versuchsgruppe +NP wurde den Mäusen Nanopartikel-markierte ASC subkutan injiziert. Die Mäuse der Versuchsgruppe +NP/Koll erhielten mit Nanopartikeln-markierte auf Kollagen-Carriern befindliche ASC. Den Versuchstieren der Kontrollgruppe K wurden unmarkierte ASC auf Kollagen-Carriern appliziert. Die MRT-Untersuchungen erfolgten einmalig präinterventionell, sowie an fünf postinterventionellen Zeitpunkten (fünf Minuten, sieben Tage, erster Monat, zweiter Monat, dritter Monat). Durch die Nanopartikelmarkierung gelang die Darstellung der implantierten ASC mittels MRT. Die Visualisierung des Implantatgebietes sowie dessen Veränderung mit der Zeit konnte über einen Zeitraum von drei Monaten durchgeführt werden. Dabei zeigte sich in der Versuchsgruppe +NP eine Schrumpfung des Implantats. In der Versuchsgruppe +NP/Koll blieb das Implantat über drei Monate weitestgehend größenstabil. Die MRT-Aufnahmen des Implantatgebiets der Kontrollgruppe belegen eine massive Schrumpfung bis zum völligen Verschwinden des Implantats nach dem ersten Monat.

Die Visualisierung einzelner Zellen und Zellverbände war mit dieser Methode nicht realisierbar. Durch die Veränderungen der Signalintensität einzelner Organe innerhalb des dreimonatigen Beobachtungszeitraums wurde indirekt auf mögliche Nanopartikelablagerungen geschlossen. Dabei konnten signifikante Veränderungen der Signalintensität in der Leber, Niere, Knochen und Skelettmuskulatur der Versuchsgruppen detektiert werden. Mit fortschreitender Beobachtungszeit zeigten sich stärkere Signalveränderungen in den

genannten Zielorganen. Die Untersuchungen der Harnblase ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Versuchsgruppe. Von der gemessenen Signalintensität des Gehirns konnte nicht auf mögliche Ablagerungen von Nanopartikeln beziehungsweise markierten ASC geschlossen werden. Die Messungen der Signalintensität des Knochens wiesen starke Schwankungen innerhalb einer Gruppe, als auch innerhalb eines Tieres auf, sodass keine Rückschlüsse bezüglich der Ablagerung von markierten ASC beziehungsweise Nanopartikel gezogen werden konnten.

Anhand der gewonnenen Untersuchungsergebnisse wird die Vermutung aufgestellt, dass sich die Nanopartikel apoptotischer ASC in der Leber, Niere und Skelettmuskulatur ablagern. Es gilt nun, dieser Vermutung mit anderen gezielten Studien nachzugehen, um die ASC- und Nanopartikelablagerungen in anderen Organen direkt nachzuweisen.

7. ANHANG

7.1 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller	Artikelnummer
Hoechst- Puffer	2 M NaCl 0,05 M Na ₂ HPO ₄	ROTH VWR Prolabo	3957.1 1.06586.0500
Live-Dead-Kit	Calcein Blue-AM Ethidiumhomodimer Hoechst	Molecular Probes Molecular Probes Sigma-Aldrich	C1430 E1169 14533-100MG
STEM-Medium	44,5 % IMDM (1X)	Fisher Scientific GmbH	31980-022
	44,5 % F12 Nut Mix (1X)	Fisher Scientific GmbH	31765.027
	10 % NKS	Fisher Scientific GmbH	SH30118.03
	1 % Penicillin-Streptomycin	Fisher Scientific GmbH	15140-122
Iron releasing reagent (1:4)	4,5 % KMnO ₄ in H ₂ O	VWR Prolabo	26910.237
	0,5 mol/l HCL	Morphisto	13533.01000
Iron detection reagent	6,5 mM Ferrozin	Sigma-Aldrich	
	6,5 mM Neocuproin	Sigma-Aldrich	101555215
	2,5 M Ammonium-Acetat	Sigma-Aldrich	101387009
	1 M Ascorbinsäure in H ₂ O	VWR Prolabo	83568.180
Blutlaugensalzlösung (1:1)	1 % HCL	Morphisto	13533.01000
	2 % Kaliumhexacyanoferrat(II)	Morphisto	12674.F0500

Tabelle 7.1 Puffer und Lösungen

7.2 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
Agarose NEED	Carl Roth	2267.4
Aluminiumsulfat	AppliChem	A0747,0500
Ammonium-Acetat	Sigma-Aldrich	101387009
Aqua dest	Braun	2019.09
L-Ascorbinsäure	VWR Prolabo	83568.180
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M-3148
bFGF	Merck KGaA	GF003AF-100UG
BNF- Starch	Micromod	10-00-102
Calcein Blue-AM	Molecular Probes	C1430
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK	K21780380
Ethanol 70	Apomix	92A041016
Ethidiumhomodimer	Molecular Probes	E1169
Ferrozine	Sigma-Aldrich	160601-1G
F12 Nut Mix (1X)	Gibco	31765.027
Hoechst(bisBenzimide H33342 trihydrochloride)	Sigma-Aldrich	14533-100MG
IMDM (1X)	Gibco	31980-022
Kaliumhexacyanoferrat(II)	Morphisto	12674.F0500
Kaliumpermanganat	VWR Prolabo	26910.237
Kernechtrot	MERCK	1001210500
Kollagen	Medical Biomaterial Products GmbH	
Kollagenase NB4	Serva	17454.01
Natriumchlorid	ROTH	3957.1
Natriumhydrogenphosphat	VWR	1.06586.0500
Natronlauge 1,0 mol/l	Morphisto	13908.00500
Neocuproine	Sigma-Aldrich	101555215
NKS (Hyclone AYC60560)	Thermo Scientific	SH30118.03
PBS 9,55 g/l	VWR International GmbH	L-182-10
Penicillin-Streptomycin	Gibco	15140-122
Poly-D-Lysin Hydrobromide	Sigma-Aldrich	P7405
Salzsäure 5,0 mol/l	Morphisto	13533.01000
RA1-Puffer	Macherey-Nagel	LOT 70384
Trypsin/ EDTA	Gibco	15400-054

Tabelle 7.2 Reagenzien

TABELLENVERZEICHNIS

3.1	Versuchsgruppe +NP: subkutane Applikation von Nanopartikel (NP) markierten ASC	21
3.2	Versuchsgruppe +NP/Koll: subkutane Applikation von Nanopartikel (NP) markierten ASC auf Kollagenträgern (Koll)	21
3.3	Kontrollgruppe K: subkutane Applikation von unmarkierten Zellen auf Kollagenträgern	21
4.1	Bestimmung der Nanopartikel-Aufnahme gelabelter ASC mittels Ferrozin-Assay. Angabe des Maximums, Minimums und Mittelwerts \pm Standardabweichung in pg Fe/Zelle.	24
4.2	Zellzahlbestimmung in 1,5 ml Injektionsvolumen mittels HOECHST-Assay zum Zeitpunkt der <i>in vivo</i> Injektion der Zellen. Es zeigen sich höhere Zellzahlen der markierten ASC.	26
7.1	Puffer und Lösungen	58
7.2	Reagenzien	59

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

3.1	Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme adipogener Stammzellen, welche aus humanem Fettgewebe isoliert wurden. (Messbalken=100 μm , Vergrößerung 1:10)	11
3.2	Schematische Darstellung der Besiedlung der Kollagen-Carrier mit BNF-Starch markierten adipogenen Stammzellen (ASC).	18
3.3	Narkotisierte SCID-Maus während einer MRT-Untersuchung im 1,5 Tesla Kleintier-MRT.	20
3.4	Narkotisierung der Maus mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran in Vorbereitung auf die Injektion.	21
3.5	Subkutane Injektion der Kollagen-Zell-Suspension in die linke Flanke der Maus durch den Experimentator.	21
4.1	Live-Dead-Assay drei Tage nach der Nanopartikel-Markierung der ASC mit unterschiedlichen BNF-Starch-Konzentrationen (0/50/75/100 $\mu\text{g Fe/ml}$). Vitale Zellen wurden mit Calcein AM grün (ex/em 495/515) und die Kerne apoptotischer Zellen mit Ethidium Homodimer rot (ex/em 460/490 nm) angefärbt. Die blaue Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (ex/em 460/490 nm) (Vergrößerung 1:10, Messbalken=100 μm).	23
4.2	Live-Dead-Assay sieben Tage nach der Nanopartikel-Markierung der ASC mit unterschiedlichen BNF-Starch-Konzentrationen (0/50/75/100 $\mu\text{g Fe/ml}$). Vitale Zellen wurden mit Calcein AM grün (ex/em 495/515) und die Kerne apoptotischer Zellen mit Ethidium Homodimer rot (ex/em 460/490 nm) angefärbt. Die blaue Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (ex/em 460/490 nm) (Vergrößerung 1:10, Messbalken=100 μm).	24
4.3	Nachweis der Nanopartikelmarkierung mittels BerlinerBlauFärbung. Nach der Inkubation der ASC mit BNF-Starch Partikeln verschiedener Konzentration (0/50/75/100 $\mu\text{g Fe/ml}$) erfolgte die Visualisierung des Eisenoxids der internalisierten Nanopartikel mittels BerlinerBlauFärbung (Vergrößerung 1:20, Messbalken=200 μm).	25

4.4	Hoechst-Färbung zum qualitativen Nachweis der Besiedlung der Kollagen-träger mit ASC 4, 7, 11, 18, 47 Tage nach der initialen Besiedlung. Gleich-mäßige Besiedlung der Kollagenträger und Proliferation der ASC mit der Zeit sichtbar (Vergrößerung 1:4, Messbalken=50 μm).	25
4.5	Färbung der vitalen Zellen mit Calcein AM (grün) sieben Tage nach der Kollagenbesiedlung. Die vitalen Zellen bedecken rasenartig die Kollagen-Carrier (Messbalken=50 μm , Vergrößerung 1:4).	27
4.6	Ethidiumhomodimer-Färbung (rot) der auf den Kollagenträgern befind-lichen avitalen Zellen an Tag sieben nach Besiedlung des Kollagens. Es sind vereinzelt tote Zellen (rote Punkte) sichtbar (Messbalken=50 μm , Vergrößerung 1:4).	27
4.7	Graphischen Darstellung der Gewichtszunahme der Mäuse +NP(1-3), +NP/Koll(1-3) und K(1-3) in Gramm (g) zu den Messzeitpunkten 5 Minuten, 1. Woche, 1. Monat, 2. Monat, 3. Monat.	28
4.8	Post mortem fanden sich subkutan braun-schwarze Nanopartikelablagerun-gen im Bereich der linken Flanke einer Maus der Versuchsgruppe +NP/Koll.	29
4.9	Ausschnitte aus den T2-gewichteten MRT-Sequenzen der Injektionsareale fünf Minuten postoperativ in der koronaren Ebene. Links: Versuchsgruppe +NP, mittig: Versuchsgruppe +NP/Koll, rechts: Kontrollgruppe K	29
4.10	MRT-Scans der drei Versuchsgruppen an den Beobachtungszeitpunkten 5 Minuten, 7 Tage, 1. Monat, 2. Monat, 3. Monat. Aus jeder Versuchsgruppe wurde ein repräsentatives Tier für die Abbildung ausgewählt: +NP(2), +NP/Koll(2), K(1). Die grüne Umrandung kennzeichnet das jeweilige In-jektionsareal. Die Darstellung erfolgte in der T2-tse gewichteten Sequenz in koronarer Ebene.	31
4.11	Graphische Darstellung der T2 gewichteten MRT-Messungen der Injekti-onsareale aller drei Versuchsgruppen über den Beobachtungszeitraum von drei Monaten.	32
4.12	Graphische Darstellung der R2* gewichteten MRT-Messungen der Injekti-onsareale aller drei Versuchsgruppen über den Beobachtungszeitraum von drei Monaten.	32
4.13	MRT-Scans aller drei Versuchsgruppen zum Zeitpunkt dritter Monat mit Markierung der Leber als ROI. Darstellung in T2-gewichteter Sequenz, in koronarer Ebene. Links: Versuchsgruppe +NP (Maus +NP(2)), mittig: Versuchsgruppe +NP/Koll (Maus +NP/Koll(2)), rechts: Kontrollgruppe K (Maus K(3))	34

4.14	Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Leber in der T2-Sequenz. <i>Grau</i> werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. <i>Orange</i> wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet.(n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)	35
4.15	Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Leber in der R2*-Sequenz. <i>Grau</i> werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. <i>Orange</i> wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet.(n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)	35
4.16	Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität des Gehirns in der T2-Sequenz. <i>Grau</i> werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. <i>Orange</i> wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet.(n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)	36
4.17	Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität des Gehirns in der R2*-Sequenz. <i>Grau</i> werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. <i>Orange</i> wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet.(n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)	37
4.18	Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Niere in der T2-Sequenz. <i>Grau</i> werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. <i>Orange</i> wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet.(n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)	38
4.19	Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Niere in der R2*-Sequenz. <i>Grau</i> werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. <i>Orange</i> wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet.(n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)	38
4.20	Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Harnblase in der T2-Sequenz. <i>Grau</i> werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. <i>Orange</i> wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet.(n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)	39
4.21	Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Harnblase in der R2*-Sequenz. <i>Grau</i> werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. <i>Orange</i> wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet.(n=3; "student's t-test"; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant)	40

- 4.22 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität des Femurs in der T2-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet.(n=3; “student’s t-test“; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant) 41
- 4.23 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität des Femurs in der R2*-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet.(n=3; “student’s t-test“; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant) 41
- 4.24 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Muskulatur in der T2-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet.(n=3; “student’s t-test“; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant) 43
- 4.25 Darstellung der durchschnittlichen Signalintensität der Muskulatur in der R2*-Sequenz. *Grau* werden die Versuchsgruppen +NP und +NP/Koll dargestellt. *Orange* wird die Kontrollgruppe K gekennzeichnet.(n=3; “student’s t-test“; *P<0,05= schwach signifikant; **P<0,01= hoch signifikant; ***P<0,001= höchst signifikant) 44

8. LITERATUR

1. American Society of Plastic Surgeons (2008): 2008 Plastic Surgery Statistics. Online unter: <https://www.plasticsurgery.org/documents/News/Statistics/2008/plastic-surgery-statistics-full-report-2008.pdf>. Abgerufen am 18.07.2019.
2. American Society of Plastic Surgeons (2019): 2018 Plastic Surgery Statistics Report. Online unter: <https://www.plasticsurgery.org/documents/News/Statistics/2018/plastic-surgery-statistics-full-report-2018.pdf>. Abgerufen am 18.07.2019.
3. Azevedo-Pereira RL, Rangel B, Tovar-Moll F, Gasparetto EL, Attias M, Zaverucha-Valle C, Jasmin, Mendez-Otero R (2019): Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as a Tool to Track Mouse Neural Stem Cells in Vivo. *Molecular Biology Reports* 46(1): 191–198.
4. Baksh D, Song L, Tuan RS (2004): Adult Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Differentiation, and Application in Cell and Gene Therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8(3): 301–316.
5. Bean CP, Jacobs IS (1956): Magnetic Granulometry and Super-Paramagnetism. *Journal of Applied Physics* 27(12): 1448–1452.
6. Bellini E, Grieco MP, Raposio E (2017): The Science behind Autologous Fat Grafting. *Annals of Medicine and Surgery* 24: 65–73.
7. Borges J, Lang E, Stark G (2003): Tissue engineering und regenerative Medizin in der rekonstruktiven Chirurgie. In: *Tissue Engineering Neues zum Gewebeersatz im Muskel-Skelett-System*. Hrsg. von Bruns J. Heidelberg: Steinkopff Verlag, 3–10.
8. Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X, Drukker M, Dylla SJ, Connolly AJ, Chen X, Weissman IL, Gambhir SS, Wu JC (2006): In Vivo Visualization of Embryonic Stem Cell Survival, Proliferation, and Migration After Cardiac Delivery. *Circulation* 113(7): 1005–1014.
9. Caruana G, Bertozzi N, Boschi E, Pio Grieco M, Grignaffini E, Raposio E (2015): Role of Adipose-Derived Stem Cells in Chronic Cutaneous Wound Healing. *Annali Italiani Di Chirurgia* 86(1): 1–4.
10. Chandler EM, Seo BR, Califano JP, Eguiluz RCA, Lee JS, Yoon CJ, Tims DT, Wang JX, Cheng L, Mohanan S, Buckley MR, Cohen I, Nikitin AY, Williams RM, Gourdon D, Reinhart-King CA, Fischbach C (2012): Implanted Adipose Progenitor

- Cells as Physicochemical Regulators of Breast Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(25): 9786–9791.
11. Chang EI, Hanasono MM, Butler CE (2016): Management of Unfavorable Outcomes in Head and Neck Free Flap Reconstruction: Experience-Based Lessons from the MD Anderson Cancer Center. *Clinics in Plastic Surgery* 43(4): 653–667.
12. Choi WS, Lee S, McGrath C, Samman N (2010): Change in Quality of Life after Combined Orthodontic-Surgical Treatment of Dentofacial Deformities. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 109(1): 46–51.
13. Coder DM (2001): Assessment of Cell Viability. *Current Protocols in Cytometry* 15(1): 9.2.1–9.2.14.
14. Coleman SR (1995): Long-Term Survival of Fat Transplants: Controlled Demonstrations. *Aesthetic Plastic Surgery* 19(5): 421–425.
15. Coradeghini R, Guida C, Scanarotti C, Sanguineti R, Bassi AM, Parodi A, Santi PL, Raposio E (2010): A Comparative Study of Proliferation and Hepatic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Cells, Tissues, Organs* 191(6): 466–477.
16. Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, Bertuzzi M, Lulka H, Touil I, André M, Grolleau JL, Péron JM, Chavoïn JP, Bourin P, Pénicaud L, Casteilla L, Buscail L, Cordelier P (2009): Adult Stromal Cells Derived from Human Adipose Tissue Provoke Pancreatic Cancer Cell Death Both In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE* 4(7): 1–10.
17. de Ávila ÉD, de Molon RS, Loffredo LCM, Massucato EMS, Hochuli-Vieira E (2013): Health-Related Quality of Life and Depression in Patients with Dentofacial Deformity. *Oral and Maxillofacial Surgery* 17(3): 187–191.
18. Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R (2009): Fat Injection to the Breast: Technique, Results, and Indications Based on 880 Procedures Over 10 Years. *Aesthetic Surgery Journal* 29(5): 360–376.
19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006): Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *The International Society for Cellular Therapy Position Statement*. *Cytotherapy* 8(4): 315–317.
20. Ensinger H (2005): Narkose - Inhalationsanästhetika und Injektionsanästhetika. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Hrsg. von Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. 9.Auflage. München: Elsevier Urban&FischerVerlag, 263–282.
21. Eto H, Kato H, Suga H, Aoi N, Doi K, Kuno S, Yoshimura K (2012): The Fate of Adipocytes after Nonvascularized Fat Grafting: Evidence of Early Death and Replacement of Adipocytes. *Plastic and Reconstructive Surgery* 129(5): 1081–1092.
22. Fernández Vallone VB, Romaniuk MA, Choi H, Labovsky V, Otaegui J, Chasseing NA (2013): Mesenchymal Stem Cells and Their Use in Therapy: What Has Been Achieved? *Differentiation* 85(1): 1–10.

23. Frejman MW, Vargas IA, Rösing CK, Closs LQ (2013): Dentofacial Deformities Are Associated With Lower Degrees of Self-Esteem and Higher Impact on Oral Health-Related Quality of Life: Results From an Observational Study Involving Adults. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 71(4): 763–767.
24. Frerich B, Winter K, Scheller K, Braumann UD (2012): Comparison of Different Fabrication Techniques for Human Adipose Tissue Engineering in Severe Combined Immunodeficient Mice. *Artificial Organs* 36(3): 227–237.
25. Funt D, Pavicic T (2013): Dermal Fillers in Aesthetics: An Overview of Adverse Events and Treatment Approaches. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 6: 295–316.
26. Gabriel A, Champaneria MC, Maxwell GP (2015): Fat Grafting and Breast Reconstruction: Tips for Ensuring Predictability. *Gland Surgery* 4(3): 232–243.
27. Gabrysz-Forget F, Tabet P, Rahal A, Bissada E, Christopoulos A, Ayad T (2019): Free versus Pedicled Flaps for Reconstruction of Head and Neck Cancer Defects: A Systematic Review. *Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery* 48(1): 13.
28. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI (2001): The Dynamic in Vivo Distribution of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells after Infusion. *Cells Tissues Organs* 169(1): 12–20.
29. Gebremeskel S, Gencarelli J, Gareau AJ, Levatte T, Dugandzic A, Johnston B, Bezuhly M (2019): Promotion of Primary Murine Breast Cancer Growth and Metastasis by Adipose-Derived Stem Cells Is Reduced in the Presence of Autologous Fat Graft. *Plastic and Reconstructive Surgery* 143(1): 137–147.
30. Goldstein RH, Reagan MR, Anderson K, Kaplan DL, Rosenblatt M (2010): Human Bone Marrow-Derived MSCs Can Home to Orthotopic Breast Cancer Tumors and Promote Bone Metastasis. *Cancer Research* 70(24): 10044–10050.
31. Grüttner C, Müller K, Teller J, Westphal F, Foreman A, Ivkov R (2007): Synthesis and Antibody Conjugation of Magnetic Nanoparticles with Improved Specific Power Absorption Rates for Alternating Magnetic Field Cancer Therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311(1): 181–186.
32. Gupta AK, Gupta M (2005): Cytotoxicity Suppression and Cellular Uptake Enhancement of Surface Modified Magnetic Nanoparticles. *Biomaterials* 26(13): 1565–1573.
33. Gupta AK, Wells S (2004): Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. *IEEE transactions on nanobioscience* 3(1): 66–73.
34. Haneke E (2014): Adverse Effects of Fillers and Their Histopathology. *Facial Plastic Surgery* 30(6): 599–614.
35. Harris DC (2014): Das Lambert-Beersche Gesetz in der chemischen Analyse. *Lehrbuch der quantitativen Analyse*. Übers. von Werner G, Werner T. 8. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag: 452–455.

36. Harris WM, Plastini M, Kappy N, Ortiz T, Chang S, Brown S, Carpenter JP, Zhang P (2019): Endothelial Differentiated Adipose-Derived Stem Cells Improvement of Survival and Neovascularization in Fat Transplantation. *Aesthetic Surgery Journal* 39(2): 220–232.
37. Hilinski JM, Cohen SR (2009): Soft Tissue Augmentation with ArteFill. *Facial Plastic Surgery* 25(2): 114–119.
38. Himmelreich U, Dresselaers T (2009): Cell Labeling and Tracking for Experimental Models Using Magnetic Resonance Imaging. *Methods* 48(2): 112–124.
39. Hong KY, Yim S, Kim HJ, Jin US, Lim S, Eo S, Chang H, Minn KW (2017): The Fate of the Adipose-Derived Stromal Cells during Angiogenesis and Adipogenesis after Cell-Assisted Lipotransfer. *Plastic and Reconstructive Surgery*: 365–375.
40. Hong K, Kim IK, Park S, Jin U, Chang H (2019): Systemic Administration of Adipose-Derived Stromal Cells Concurrent with Fat Grafting. *Plastic and Reconstructive Surgery* 143(5): 973e–982e.
41. Horwitz E, Le Blanc K, Dominici M, Baldelli I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Deans R, Krause D, Keating A (2005): Clarification of the Nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* 7(5): 393–395.
42. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I (2007): Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Adipocytokine Dysregulation. *Diabetes* 56: 901–11.
43. Hsing CY, Wong YK, Wang CP, Wang CC, Jiang RS, Chen FJ, Liu SA (2011): Comparison between Free Flap and Pectoralis Major Pedicled Flap for Reconstruction in Oral Cavity Cancer Patients – A Quality of Life Analysis. *Oral Oncology* 47(6): 522–527.
44. Hu SL, Lu PG, Zhang LJ, Li F, Chen Z, Wu N, Meng H, Lin JK, Feng H (2012): In Vivo Magnetic Resonance Imaging Tracking of SPIO-Labeled Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 113(3): 1005–1012.
45. Hünnerbein R (2017): Radiologische Verfahren. In: *Duale Reihe Radiologie*. Hrsg. von Reiser M, Kuhn FP, Debus J. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 73–106.
46. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ (2005): In Vitro Toxicity of Nanoparticles in BRL 3A Rat Liver Cells. *Toxicology in Vitro* 19(7): 975–983.
47. Jing Xh, Yang L, Duan Xj, Xie B, Chen W, Li Z, Tan Hb (2008): In Vivo MR Imaging Tracking of Magnetic Iron Oxide Nanoparticle Labeled, Engineered, Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Following Intra-Articular Injection. *Joint Bone Spine* 75(4): 432–438.
48. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA (2007): Mesenchymal Stem Cells within Tumour Stroma Promote Breast Cancer Metastasis. *Nature* 449: 557–563.

49. Kasem A, Wazir U, Headon H, Mokbel K (2015): Breast Lipofilling: A Review of Current Practice. *Archives of Plastic Surgery* 42(2): 126–130.
50. Kasten A, Grüttner C, Kühn JP, Bader R, Pasold J, Frerich B (2014): Comparative In Vitro Study on Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for MRI Tracking of Adipose Tissue-Derived Progenitor Cells. *PLoS ONE* 9(9): 1–13.
51. Kasten A, Siegmund BJ, Grüttner C, Kühn JP, Frerich B (2015): Tracking of Adipose Tissue-Derived Progenitor Cells Using Two Magnetic Nanoparticle Types. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 380: 34–38.
52. Kaufman M, Miller T, Huang C, Roostaien J, Wasson K, Ashley R, Bradley J (2007): Autologous Fat Transfer for Facial Recontouring: Is There Science behind the Art? *Plastic and Reconstructive Surgery* 119(7): 2287–2296.
53. Kedzior DA, Kraitchman DL (2010): Superparamagnetic Iron Oxide Labeling of Stem Cells for MRI Tracking and Delivery in Cardiovascular Disease. *Methods in molecular biology* 660: 171–183.
54. Koh KS, Oh TS, Kim H, Chung IW, Lee KW, Lee HB, Park EJ, Jung JS, Shin IS, Ra JC, Choi JW (2012): Clinical Application of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Progressive Hemifacial Atrophy (Parry-Romberg Disease) With Microfat Grafting Techniques Using 3-Dimensional Computed Tomography and 3-Dimensional Camera. *Annals of Plastic Surgery* 69(3): 331–337.
55. Kokai LE, Schilling BK, Chnari E, Huang YC, Imming EA, Karunamurthy A, Khouri RK, D’Amico RA, Coleman SR, Marra KG, Rubin JP (2019): Injectable Allograft Adipose Matrix Supports Adipogenic Tissue Remodeling in the Nude Mouse and Human. *Plastic and Reconstructive Surgery* 143(2): 299–309.
56. Koleccka MA, Arnhold S, Schmidt M, Reich C, Kramer M, Failing K, von Pückler K (2017): Behaviour of Adipose-Derived Canine Mesenchymal Stem Cells after Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Labelling for Magnetic Resonance Imaging. *BMC Veterinary Research* 13(1): 62.
57. Kølke SFT, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV, Kastrup J, Kirchhoff M, Rasmussen BS, Talman MLM, Thomsen C, Dickmeiss E, Drzewiecki KT (2013): Enrichment of Autologous Fat Grafts with Ex-Vivo Expanded Adipose Tissue-Derived Stem Cells for Graft Survival: A Randomised Placebo-Controlled Trial. *The Lancet* 382(9898): 1113–1120.
58. Kremers C (2017): Magnetresonanztomographie (MRT). In: *Basiswissen Radiologie*. Hrsg. von Kahl-Scholz M, Vockelmann C. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 55–70.
59. Kurtz A (2008): Mesenchymal Stem Cell Delivery Routes and Fate. *International Journal of Stem Cells* 1(1): 1–7.
60. Kut C, Zhang Y, Hedayati M, Zhou H, Cornejo C, Bordelon D, Mihalic J, Wabler M, Burghardt E, Gruettner C, Geyh A, Brayton C, Deweese TL, Ivkov R (2012): Preliminary Study of Injury from Heating Systemically Delivered, Nontargeted

- Dextran–Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Mice. *Nanomedicine* 7(11): 1697–1711.
61. Labarca C, Paigen K (1980): A Simple, Rapid, and Sensitive DNA Assay Procedure. *Analytical Biochemistry* 102(2): 344–352.
62. Laloze J, Varin A, Gilhodes J, Bertheuil N, Grolleau JL, Brie J, Usseglio J, Sensebe L, Filleron T, Chaput B (2018): Cell-Assisted Lipotransfer: Friend or Foe in Fat Grafting? Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 12(2): e1237–e1250.
63. Larsen R (2006): Pharmakologie gebräuchlicher Inhalationsanästhetika - 7.2 Isofluran. In: *Anästhesie*. 8. Auflage. München: Elsevier Urban&FischerVerlag, 33–36.
64. Latt SA, Stetten G (1976): Spectral Studies on 33258 Hoechst and Related Bisbenzimidazole Dyes Useful for Fluorescent Detection of Deoxyribonucleic Acid Synthesis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 24(1): 24–33.
65. Lawaczeck R, Menzel M, Pietsch H (2004): Superparamagnetic iron oxide particles: contrast media for magnetic resonance imaging. *Applied Organometallic Chemistry* 18(10): 506–513.
66. Lazennec G, Jorgensen C (2008): Concise Review: Adult Multipotent Stromal Cells and Cancer: Risk or Benefit? *STEM CELLS* 26(6): 1387–1394.
67. Lee JS, Eo P, Kim MC, Kim JB, Jin HK, Bae JS, Jeong Jh, Park HY, Yang JD (2019): Effects of Stromal Vascular Fraction on Breast Cancer Growth and Fat Engraftment in NOD/SCID Mice. *Aesthetic Plastic Surgery* 43(2): 498–513.
68. Li F, Du Y, Pi G, Lei B (2018): Long-Term Real-Time Tracking Live Stem Cells/Cancer Cells in Vitro/in Vivo through Highly Biocompatible Photoluminescent Poly(Citrate-Siloxane) Nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C* 93: 380–389.
69. Li L, Jiang W, Luo K, Song H, Lan F, Wu Y, Gu Z (2013): Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as MRI Contrast Agents for Non-Invasive Stem Cell Labeling and Tracking. *Theranostics* 3(8): 595–615.
70. Lin G, Yang R, Banie L, Wang G, Ning H, Li LC, Lue TF, Lin CS (2010): Effects of Transplantation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells on Prostate Tumor. *The Prostate* 70(10): 1066–1073.
71. Love Z, Wang F, Dennis J, Awadallah A, Salem N, Lin Y, Weisenberger A, Majewski S, Gerson S, Lee Z (2007): Imaging of Mesenchymal Stem Cell Transplant by Bioluminescence and PET. *Journal of Nuclear Medicine* 48(12): 2011–2020.
72. Mahmoudi M, Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Boutry S, Simchi A, Journeay WS, Subramani K, Laurent S (2011): Magnetic Resonance Imaging Tracking of Stem Cells in Vivo Using Iron Oxide Nanoparticles as a Tool for the Advancement of Clinical Regenerative Medicine. *Chemical Reviews* 111(2): 253–280.

73. Malik P, Gaba S, Ahuja C, Sharma RR, Sharma RK, Khandelwal N (2019): Role of Fat Graft Alone versus Enriched Fat Graft with Stromal Vascular Filtrate in Painful Amputation Stump. *Indian J Orthop.* 53(3): 452–458.
74. Mishra SK, Khushu S, Gangenahalli G (2018): Effects of Iron Oxide Contrast Agent in Combination with Various Transfection Agents during Mesenchymal Stem Cells Labelling: An in Vitro Toxicological Evaluation. *Toxicology in Vitro* 50: 179–189.
75. Muschler G, Nakamoto C, Griffith L (2004): Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering. *The Journal of Bone and Joint Surgery-american* Volume 86(7): 1541–1558.
76. Naumova AV, Balu N, Yarnykh VL, Reinecke H, Murry CE, Yuan C (2014): MRI Tracking of Graft Survival in the Infarcted Heart: Iron Oxide Particles vs. Ferritin Overexpression Approach. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 19(4): 358–367.
77. Nie F, Xie H, Wang G, An Y (2019): Risk Comparison of Filler Embolism Between Polymethyl Methacrylate (PMMA) and Hyaluronic Acid (HA). *Aesthetic Plastic Surgery* 43(3): 853–860.
78. O'Neill JP, Shine N, Eadie PA, Beausang E, Timon C (2010): Free Tissue Transfer versus Pedicled Flap Reconstruction of Head and Neck Malignancy Defects. *Irish Journal of Medical Science* 179(3): 337–343.
79. Paolini G, Amoroso M, Longo B, Sorotos M, Karypidis D, Santanelli di Pompeo F (2014): Simplified Lipostructure: A Technical Note. *Aesthetic Plastic Surgery* 38(1): 78–82.
80. Perrot P, Rousseau J, Bouffaut AL, Rédini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, Heymann MF, Heymann D, Duteille F, Trichet V, Gouin F (2010): Safety Concern between Autologous Fat Graft, Mesenchymal Stem Cell and Osteosarcoma Recurrence. *PLoS ONE* 5(6): e10999.
81. Ponomarev V, Doubrovin M, Serganova I, Vider J, Shavrin A, Beresten T, Ivanova A, Ageyeva L, Tourkova V, Balatoni J, Bornmann W, Blasberg R, Gelovani Tjuvajev J (2004): A Novel Triple-Modality Reporter Gene for Whole-Body Fluorescent, Bioluminescent, and Nuclear Noninvasive Imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 31(5): 740–751.
82. Prantl L, Rennekampff HO, Giunta RE, Harder Y, Heimbürg D von, Heine N, Herold C, Kneser U, Lampert F, Machens HG, Mirastschijski U, Müller D, Pallua N, Schantz T, Schönborn A, Ueberreiter K, Witzel C, Bull G, Rezek D, Sattler G, Vogt PM, Horch RE (2016): Aktuelle Erkenntnisse zur Eigenfett Transplantation anhand der neuen Leitlinie „Autologe Fetttransplantation“. *Handchirurgie · Mikrochirurgie · Plastische Chirurgie* 48(6): 330–336.
83. Rasmussen BS, Lykke Sørensen C, Vester-Glowinski PV, Herly M, Trojahn Kølbe SF, Fischer-Nielsen A, Drzewiecki KT (2017): Effect, Feasibility, and Clinical Relevance

- of Cell Enrichment in Large Volume Fat Grafting: A Systematic Review. *Aesthetic Surgery Journal* 37(3): 46–58.
84. Reith W (2011): Magnetresonanztomographie. In: Diagnostische und interventionelle Radiologie. Hrsg. von Vogl TJ, Reith W, Rummeny EJ. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 37–44.
85. Riemer J, Hoepken HH, Czerwinska H, Robinson SR, Dringen R (2004): Colorimetric Ferrozine-Based Assay for the Quantitation of Iron in Cultured Cells. *Analytical Biochemistry* 331(2): 370–375.
86. Schönnagel B, Fischer R, Nielsen P, Grosse R, Adam G, Yamamura J (2013): Eisenquantifizierung mittels MRT bei Eisenüberladung. *RöFo - Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren* 185(07): 621–627.
87. Siegmund BJ, Kasten A, Kühn JP, Winter K, Grüttner C, Frerich B (2017): MRI-Tracking of Transplanted Human ASC in a SCID Mouse Model. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 427: 151–155.
88. Simonacci F, Bertozzi N, Grieco MP, Grignaffini E, Raposio E (2017): Procedure, Applications, and Outcomes of Autologous Fat Grafting. *Annals of Medicine and Surgery*(20): 49–60.
89. Stark DD, Moseley ME, Bacon BR, Moss AA, Goldberg HI, Bass NM, James TL (1985): Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy of Hepatic Iron Overload. *Radiology* 154(1): 137–142.
90. Struys T, Ketkar-Atre A, Gervois P, Leten C, Hilkens P, Martens W, Bronckaers A, Dresselaers T, Politis C, Lambrichts I, Himmelreich U (2013): Magnetic Resonance Imaging of Human Dental Pulp Stem Cells in Vitro and in Vivo. *Cell Transplantation* 22(10): 1813–1829.
91. Suga H, Eto H, Aoi N, Kato H, Araki J, Doi K, Higashino T, Yoshimura K (2010): Adipose Tissue Remodeling under Ischemia: Death of Adipocytes and Activation of Stem/Progenitor Cells. *Plastic and Reconstructive Surgery* 126(6): 1911–1923.
92. Sun AH, Xu X, Sasaki CT, Ariyan S, Steinbacher DM (2017): A Thirty-Year Experience With Head and Neck Flap Reconstruction: *Journal of Craniofacial Surgery* 28(5): 1354–1361.
93. Sun B, Roh KH, Park JR, Lee SR, Park SB, Jung JW, Kang SK, Lee YS, Kang KS (2009): Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells in a Mouse Breast Cancer Metastasis Model. *Cytotherapy* 11(3): 289–298.
94. Sundberg JP, Shultz LD (1994): Combined Immunodeficiency (Scid) Mutation, Chromosome 16. In: *Handbook of Mouse Mutations with Skin and Hair Abnormalities: Animal Models and Biomedical Tools*. Hrsg. von Sundberg JP. Bar Harbour, Maine: CRC Press, 423–430.
95. Tang QQ, Lane MD (2012): Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annual Review of Biochemistry* 81(1): 715–736.

96. Trekker J, Leten C, Struys T, Lazenka VV, Argibay B, Micholt L, Lambrichts I, Van Roy W, Lagae L, Himmelreich U (2014): Sensitive in Vivo Cell Detection Using Size-Optimized Superparamagnetic Nanoparticles. *Biomaterials* 35(5): 1627–1635.
97. von Heimburg D, Zachariah S, Kühling H, Heschel I, Schoof H, Hafemann B, Pallua N (2001a): Human Preadipocytes Seeded on Freeze-Dried Collagen Scaffolds Investigated in Vitro and in Vivo. *Biomaterials* 22(5): 429–438.
98. von Heimburg D, Zachariah S, Low A, Pallua N (2001b): Influence of Different Biodegradable Carriers on the in Vivo Behavior of Human Adipose Precursor Cells. *Plastic and Reconstructive Surgery* 108(2): 411–420.
99. Wang L, Luo X, Lu Y, Fan ZH, Hu X (2015): Is the Resorption of Grafted Fat Reduced in Cell-Assisted Lipotransfer for Breast Augmentation? *Annals of Plastic Surgery* 75(2): 128–134.
100. Weinzierl K, Hemprich A, Frerich B (2006): Bone Engineering with Adipose Tissue Derived Stromal Cells. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 34(8): 466–471.
101. Weissleder R, Stark DD, Engelstad BL, Bacon BR, Compton C, White DL, Jacobs P, Lewis J (1989): Superparamagnetic Iron Oxide: Pharmacokinetics and Toxicity. *American Journal of Roentgenology* 152(1): 167–73.
102. Wood JC, Ghugre N (2008): Magnetic Resonance Imaging Assessment of Excess Iron in Thalassemia, Sick Cell Disease and Other Iron Overload Diseases. *Hemoglobin* 32(1-2): 85–96.
103. Wu JC, Spin JM, Cao F, Lin S, Xie X, Gheysens O, Chen IY, Sheikh AY, Robbins RC, Tsalenko A, Gambhir SS, Quertermous T (2006): Transcriptional Profiling of Reporter Genes Used for Molecular Imaging of Embryonic Stem Cell Transplantation. *Physiological Genomics* 25(1): 29–38.
104. Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, Kurita M, Oshima Y, Sato K, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Harii K (2010): Progenitor-Enriched Adipose Tissue Transplantation as Rescue for Breast Implant Complications. *The Breast Journal* 16(2): 169–175.
105. Zhang X, Li MJ, Fang QG, Sun CF (2014): A Comparison Between the Pectoralis Major Myocutaneous Flap and the Free Anterolateral Thigh Perforator Flap for Reconstruction in Head and Neck Cancer Patients: Assessment of the Quality of Life. *Journal of Craniofacial Surgery* 25(3): 868–871.
106. Zhao M, Sachs PC, Wang X, Dumur CI, Idowu MO, Robila V, Francis MP, Ware J, Beckman M, Rizki A, Holt SE, Elmore LW (2012): Mesenchymal Stem Cells in Mammary Adipose Tissue Stimulate Progression of Breast Cancer Resembling the Basal-Type. *Cancer Biology & Therapy* 13(9): 782–792.
107. Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, Li J, Yan X, Liu Y, Shao C, Zhao RC (2009): Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Cancer Cell Proliferation by Secreting DKK-1. *Leukemia* 23: 925.

108. Zielke H, Wölber L, Wiest L, Rzany B (2008): Risk Profiles of Different Injectable Fillers: Results from the Injectable Filler Safety Study (IFS Study). *Dermatologic Surgery* 34(3): 326–335.
109. Zimmerlin L, Donnenberg AD, Rubin JP, Basse P, Landreneau RJ, Donnenberg VS (2011): Regenerative Therapy and Cancer: In Vitro and In Vivo Studies of the Interaction Between Adipose-Derived Stem Cells and Breast Cancer Cells from Clinical Isolates. *Tissue Engineering. Part A* 17(1-2): 93–106.
110. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Péault B, Rubin JP, Donnenberg AD (2010): Stromal Vascular Progenitors in Adult Human Adipose Tissue. *Cytometry Part A* 77(1): 22–30.
111. Zuk P (2013): Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells* 1: 1–35.
112. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001): Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering* 7(2): 211–228.

9. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Arbeit an meiner Promotion unterstützt haben. An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Dr. Frerich, zum einen für das Überlassen dieses interessanten und herausfordernden Promotionsthemas und zum anderen für die Unterstützung und Beratung über den gesamten Arbeitszeitraum. Ganz besonders und herzlich danke ich Frau Dr. Nadja Engel-Lutz, Frau Dr. Annika Voges und Herrn Daniel Wolter aus dem Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Chirurgie für die konstruktive Zusammenarbeit und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung jedweder Probleme. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei Prof. Dr. Kühn, Frau Dr. Susan Mouchantat und Herrn Stefan Hadlich der Sektion Kleintier-MRT des Instituts für diagnostische Radiologie und Neuroradiologie der Universitätsmedizin Greifswald für ihre Hilfestellungen und kompetenten Beratungen bedanken. Das Verfassen dieser Arbeit wäre mir ohne die Hilfe der genannten Personen nicht möglich gewesen. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund Jakob und meiner Familie bedanken, die mich während des gesamten Arbeitsprozesses unterstützt und bestärkt haben und immer ein offenes Ohr für kleinere und größere Probleme hatten.

10. LEBENSLAUF

Name: Caroline Hasler

Geburtsdatum: 20.05.1992

Geburtsort: Stralsund

Schul Ausbildung:

2003-2011 Hansa-Gymnasium Stralsund

2011 Abitur

Universität:

10/2011-11/2018 Studium der Humanmedizin Universität Rostock

01-06/2015 Auslandsemester an der Université Diderot in Paris

11/2018 ärztliche Approbation

09/2019 Assistenzärztin der Orthopädie und Unfallchirurgie
am Klinikum Friedrichshafen

11/2020 Assistenzärztin der Dermatologie
am Helios-Klinikum in Erfurt

11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Gedanken wurden einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzten Werkes gekennzeichnet. Außerdem versichere ich, dass die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form noch nicht anderweitig als Promotionsleistung vorgelegt und bewertet wurde.

Unterschrift: *Caroline Harle*