

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)

**Die Generierung und Analyse der angiogenen
Aktivität von Sphäroiden aus
mikrovaskulären Gefäßfragmenten (MVF)**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2023**

vorgelegt von: Danièle Müller

geb. am 08.06.1995 in Saarbrücken

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund, meiner Schwester, meinen Freunden
und meinen Eltern.

Tag der Promotion: 16. Juli 2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Werner Laschke
Prof. Dr. Henning Madry

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	2
3	Einleitung	3
4	Ziel	10
5	Methoden	11
5.1	Reagenzien	11
5.2	Antikörper	12
5.3	Versuchstiere	12
5.4	Exzision epididymaler Fettpolster	13
5.5	Gefäßfragment- und Zellisolierung	14
5.5.1	Isolierung von mikrovaskulären Gefäßfragmenten (MVF)	14
5.5.2	Isolierung von Zellen der stromalen Gefäßfraktion (SVF)	15
5.5.3	Fluoreszenzmikroskopische Viabilitätsprüfung (Propidiumiodid)	17
5.6	Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauer-Zählkammer	17
5.7	Liquid-Overlay Technik	19
5.8	Rasterelektronenmikroskopie	20
5.9	Lichtmikroskopische Viabilitätsprüfung (Neutralrot & Trypanblau)	21
5.10	Durchflusszytometrie	21
5.10.1	Viabilitätsprüfung (Annexin V & Propidiumiodid)	21
5.10.2	Bestimmung von Vorläuferzellen innerhalb der Sphäroide	22
5.11	Präadipozytendifferenzierung	22
5.12	Oil Red O-Färbung	23
5.13	Sphäroid-Sprossungsanalyse (Sprouting Assay)	23
5.14	Rückenhautkammermodell	24
5.14.1	Implantation der Rückenhautkammer	24
5.14.2	Transplantation der Sphäroide auf den quergestreiften Rückenhautmuskel	27
5.14.3	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	27

5.14.4	Experimentelles Protokoll	30
5.15	Immunhistochemie.....	31
5.16	Statistische Analyse	32
6	Ergebnisse.....	33
6.1	Zellviabilität der SVF- und MVF-Suspension sowie der MVF-Einzelzellen	33
6.2	Generierung von SVF- und MVF-Sphäroiden	34
6.3	Morphologie der SVF- und MVF-Sphäroide.....	36
6.4	Viabilität der SVF- und MVF-Sphäroide.....	37
6.5	Zusammensetzung der SVF- und MVF-Sphäroide	40
6.6	Analyse der angiogenen Aktivität der SVF- und MVF-Sphäroide <i>in vitro</i>	41
6.7	<i>In vivo</i> -Vaskularisierungspotential von SVF- und MVF-Sphäroiden	44
6.8	Immunhistochemische Analyse der transplantierten Sphäroide	47
7	Diskussion	49
8	Schlussfolgerungen	56
9	Literaturverzeichnis	57
10	Publikationen.....	66
11	Kongressbeiträge	67
12	Danksagung.....	68
13	Lebenslauf	69

1 Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren hat sich die Prävascularisierung von Gewebekonstrukten zu einem Themenschwerpunkt im Bereich *Tissue Engineering* entwickelt. Hierbei werden gegenwärtig verschiedene Ansätze wie die Stimulierung der Angiogenese mittels Wachstumsfaktoren oder die direkte Bildung von Blutgefäßen unter Verwendung von Endothelzellen verfolgt. Viele dieser Strategien fördern den Prozess der Vaskularisierung. Allerdings ist die Entstehung neuer Blutgefäße immer noch nicht schnell genug, um eine ausreichende Versorgung der Gewebekonstrukte mit Sauerstoff und Nährstoffen in der frühen Post-Transplantationsphase zu gewährleisten.

Ein vielversprechender Ansatz, der die Vaskularisierung beschleunigen könnte, wäre nicht die Induktion angiogener Prozesse, sondern die direkte Inkorporation kleiner Blutgefäße in das Gewebekonstrukt. Diese müssten dann nur noch untereinander und an dem Gefäßsystem des Empfängers Anschluss finden. In der Tat haben mehrere Studien der letzten Jahre gezeigt, dass sogenannte mikrovaskuläre Gefäßfragmente (*microvascular fragments*, MVF), welche enzymatisch aus dem Fettgewebe isoliert werden können, nicht nur ein hohes angiogenes Potential besitzen, sondern auch effektiv die Vaskularisierung von verschiedenen Gewebekonstrukten fördern. Da die MVF nach Isolierung in Lösung vorliegen und ohne Trägermatrix nicht adäquat transplantiert werden können, werden in der vorliegenden Arbeit erstmals Sphäroide aus MVF generiert, welche dann als transferierbare und hoch angiogene Vaskularisierungseinheiten im Bereich des *Tissue Engineering* eingesetzt werden könnten.

Hierfür wurden MVF aus dem Nebenhodenfettgewebe von männlichen C57BL/6N-Mäusen isoliert und daraus mithilfe der *Liquid-Overlay* Technik über einen Kultivierungszeitraum von fünf Tagen Sphäroide generiert. Als Kontrolle dienten Sphäroide aus Zellen der Stromalen Gefäßfraktion (*stromal vascular fraction*, SVF). Sowohl SVF- als auch MVF-Sphäroide zeigten eine sphäroide Morphologie und die Zellen auf der Oberfläche waren locker organisiert. Beide Versuchsgruppen wiesen eine vergleichbare Viabilität auf. Allerdings enthielten MVF-Sphäroide einen signifikant höheren Anteil CD31-positiver Endothelzellen sowie α -smooth-muscle-actin (α -SMA)-positiver, gefäßwandstabilisierender Muskelzellen, was zu einer höheren angiogenen Sprossungsaktivität führte. Weiterführend zeigten MVF-Sphäroide auch eine im Vergleich zu SVF-Sphäroiden verbesserte *in vivo*-Vaskularisierung nach Transplantation auf den quergestreiften Rückenhautmuskel der Maus. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass das Vaskularisierungspotential von MVF-Sphäroiden dem von SVF-Sphäroiden überlegen ist und dass sie somit potente Vaskularisierungseinheiten für *Tissue Engineering*-Anwendungen darstellen.

2 Summary

In recent years, the prevascularization of tissue constructs has become a major topic in the field of tissue engineering. Various approaches are currently being pursued, such as the stimulation of angiogenesis using growth factors or the direct formation of blood vessels using endothelial cells. Although many of these strategies promote the process of vascularization, the formation of new blood vessels is still not fast enough to ensure an adequate supply of oxygen and nutrients to the tissue constructs in the early post-transplantation period.

A promising approach that could accelerate vascularization may not be the induction of angiogenic processes, but the direct incorporation of small blood vessels into the tissue construct. Then, they only need to connect to each other and to the recipient's vasculature. Several studies in recent years have shown that so-called microvascular fragments (MVF) which can be isolated enzymatically from adipose tissue not only have a high angiogenic potential but also effectively promote vascularization of various tissue constructs. Since MVF are in solution after isolation and cannot be adequately transplanted without a carrier matrix, the present work aims, for the first time, to generate spheroids from MVF, which can then be used as transferable and highly angiogenic vascularization units in the field of tissue engineering.

*For this purpose, MVF were isolated from epididymal fat tissue of male C57BL/6N mice. Spheroids were generated using the liquid overlay technique over a cultivation period of five days. Spheroids from the stromal vascular fraction (SVF) served as controls. SVF- and MVF-spheroids showed spheroidal morphology and the cells on the surface were loosely organized. Both experimental groups exhibited comparable viability. MVF-spheroids contained a significantly higher proportion of CD31-positive endothelial cells and α -smooth-muscle-actin(α -SMA)-positive stabilizing muscle cells, resulting in higher angiogenic sprouting activity. Further, compared with SVF-spheroids, MVF-spheroids also showed an enhanced *in vivo*-vascularization after grafting onto mouse striated muscle of the dorsal skinfold. The results of the present work suggest that the vascularization potential of MVF-spheroids is superior to that of SVF-spheroids and that they may represent potent vascularization units for tissue engineering applications.*

3 Einleitung

Das Forschungsgebiet *Tissue Engineering* beschäftigt sich mit der Herstellung biologischer Gewebeersatzstoffe. Dabei werden dem Spenderorganismus üblicherweise Zellen entnommen und mit bioaktiven Faktoren und einer Trägersubstanz (*Scaffold*) bzw. einer formgebenden Matrix kombiniert. Nach entsprechender Kultivierungszeit bildet sich ein Gewebekonstrukt, welches in den Empfängerorganismus implantiert werden kann (Abb. 1). Dieses Ersatzgewebe hat die Aufgabe, die ursprüngliche Funktion des Gewebes an der Implantationsstelle wiederherzustellen (Doblado et al., 2021; Langer, Vacanti, 1993).

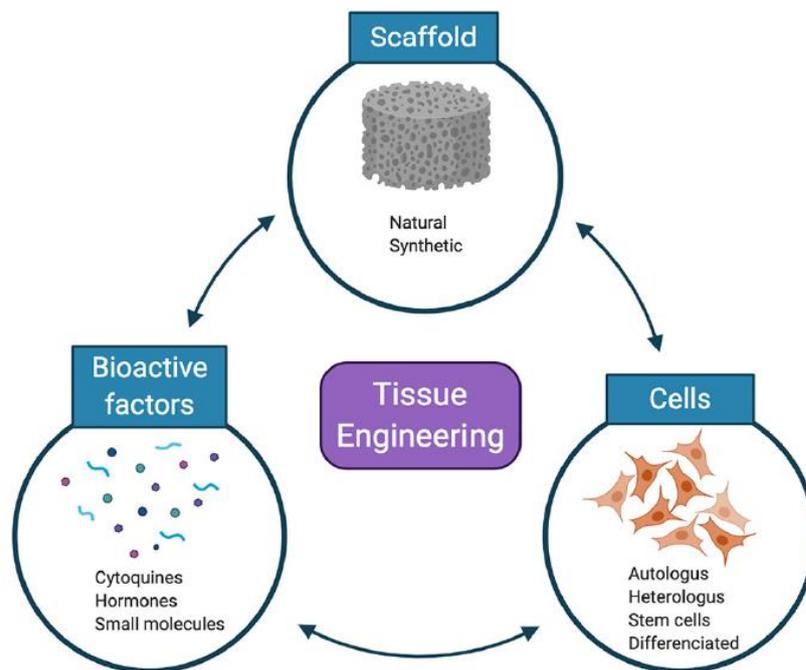


Abbildung 1: Strategien des Tissue Engineering. Zur Herstellung biologischer Gewebeersatzstoffe werden üblicherweise Spenderzellen und bioaktive Faktoren mit einer Trägersubstanz (*Scaffold*) kombiniert (Doblado et al., 2021).

In den letzten Jahren wurde über zahlreiche erfolgreiche Anwendungen im Forschungsgebiet des *Tissue Engineering* berichtet (Fulco et al., 2014; Raya-Rivera et al., 2011; Zhang et al., 2018). Im Bereich des Knorpel-*Tissue Engineering* bietet beispielsweise die Kombination von Vorläuferzellen mit thermosensitiven Hydrogelen, die als künstliche extrazelluläre Matrix dienen, eine vielversprechende Möglichkeit zur Knorpel-Regeneration (Zhang et al., 2018). Basierend auf dieser Strategie synthetisierten Zhang et al. (2018) ein aus dem Triblock-Copolymer PLGA-PEG-PLGA (*poly(lactide-co-glycolide)-block-poly(ethylene glycol)-block-poly(lactide-co-glycolide)*) bestehendes Thermogel, welches bei einer Umgebungstemperatur von ~ 4 °C flüssig ist und bei ~ 37 °C eine gelartige Struktur annimmt. Nach Einbringen von *bone marrow stromal cells* (BMSC) in das Thermogel transplantierten sie dieses in einen Knorpeldefekt an der Femurtrochlea eines Kaninchens. Zwölf Wochen nach der Operation

zeigten histologische Untersuchungen eine gesteigerte Proliferation von Neochondrozyten im Bereich der Defektstelle. Zudem war makroskopisch keine Grenze zwischen dem neu gebildeten Knorpel und der Femurtrochlea sichtbar (Zhang et al., 2018). Raya-Rivera et al. (2011) konnten zeigen, dass es möglich ist, komplexe Harnröhrendefekte mit künstlichen Harnröhren aus autologem Gewebe zu behandeln. Hierzu wurden Patienten mit komplexen Harnröhrendefekten Urothelzellen und glatte Muskelzellen durch eine Blasenbiopsie entnommen. Die Zellen wurden über mehrere Wochen expandiert und anschließend röhrenförmige *Scaffolds* mit den Urothelzellen auf der luminalen Oberfläche und glatten Muskelzellen auf der äußeren Oberfläche besiedelt. Diese wurden dann für sieben Tage kultiviert und anschließend den Patienten implantiert. Histologische Untersuchungen belegten, dass die künstlich hergestellten Harnröhren drei Monate nach Implantation eine geordnete Architektur aus unterscheidbaren Schichten von Epithel und glatter Muskulatur aufweisen (Raya-Rivera et al., 2011).

Trotz des scheinbaren Erfolgs des *Tissue Engineering* in einzelnen Bereichen stellt die Implantation großer und/oder besonders stoffwechselaktiver Gewebe immer noch ein großes Problem dar, denn die Diffusionsstrecke von Sauerstoff und Nährstoffen innerhalb von Geweben beträgt maximal $\sim 200 \mu\text{m}$ (Jain et al., 2005). Um dennoch eine ausreichende Versorgung der Zellen zu garantieren, müssen neue Blutgefäße aus bestehenden Blutgefäßen gebildet werden und aus dem Empfängergewebe in das Gewebekonstrukt einwachsen. Dieser Prozess wird als Angiogenese bezeichnet (Karamysheva, 2008). Unter physiologischen Bedingungen befindet sich das mikrovaskuläre Gefäßsystem in einer sogenannten Ruhephase, in der keine Blutgefäße gebildet werden. Entsteht jedoch ein angiogener Stimulus wie beispielsweise Hypoxie, so wird eine komplexe Kaskade bestehend aus proliferativen und migratorischen Prozessen in Gang gesetzt, die letztendlich zur Bildung neuer Blutgefäße führt (Karamysheva, 2008). Hierbei werden zunächst die endothelialen Zell-Zell-Kontakte gelockert und die Basalmembran durch Matrixmetalloproteasen abgebaut. Zugleich bildet sich im Bereich des entstehenden Gefäßes ein Gradient aus dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF) aus, wodurch die Entstehung und Fusion von Endothelzellsprossen induziert wird (Abb. 2). Abschließend werden Perizyten und glatte Muskelzellen rekrutiert, sodass ein stabiles, funktionsfähiges Blutgefäß entsteht (Carmeliet, Jain, 2011; Karamysheva, 2008; Moon, West, 2008).

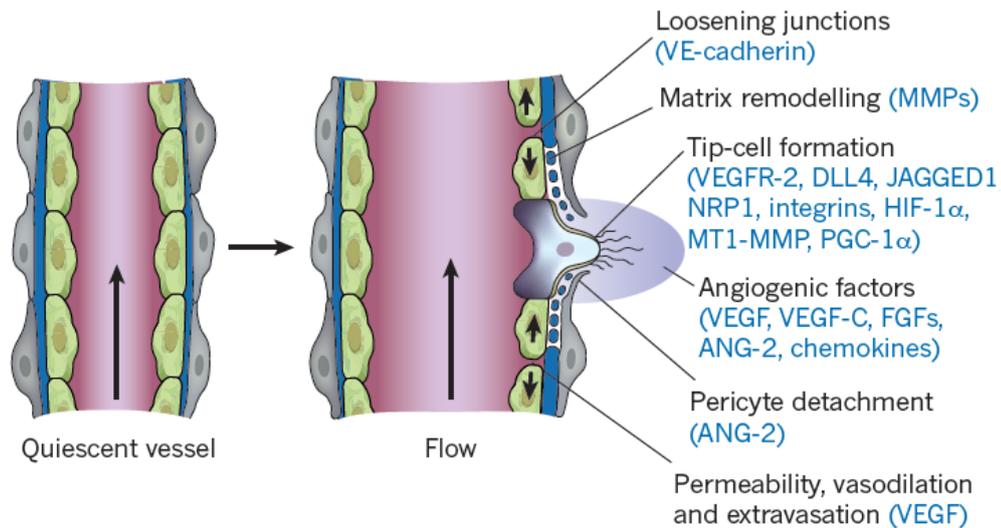


Abbildung 2: Zelluläre und molekulare Mechanismen der tip-cell-Bildung. Nach Stimulation eines ruhenden Blutgefäßes durch angiogene Faktoren wie VEGF weitet sich das Blutgefäß und es bildet sich eine sogenannte *tip-cell* aus. Zudem wird die Basalmembran durch Matrixmetalloproteasen abgebaut, Perizyten lösen sich ab und die endothelialen Zellverbindungen werden gelockert. Die dadurch erhöhte Gefäßpermeabilität ermöglicht die Extravasation von Plasmaproteinen, wodurch sich eine provisorische Matrixschicht ausbildet (Carmeliet, Jain, 2011).

Jedoch beträgt die Wachstumsgeschwindigkeit von neu entstehenden Blutgefäßen nur ~ 5 $\mu\text{m/h}$ und ist somit zu langsam, um besonders große Gewebekonstrukte allein durch das Einwachsen von Blutgefäßen aus dem umgebenden Empfängergewebe ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (Utzinger et al., 2015). Dementsprechend erleiden besonders die Zellen im Zentrum des Implantats, die mehr als einige hundert Mikrometer von den nächstgelegenen Kapillaren entfernt sind, einen Hypoxie-induzierten Zelltod (Moon, West, 2008; Patel, Mikos, 2004).

Um das Problem der zu langsam ablaufenden Revaskularisierung zu lösen, wurden in den letzten Jahren verschiedene Ideen umgesetzt. Beispielsweise wurde berichtet, dass die Angiogenese durch Zugabe von Wachstumsfaktoren wie VEGF, *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder *fibroblast growth factor* (FGF-1 und FGF-2) stimuliert werden kann (Norrby, 1997). Hierbei zeigte sich, dass die systemische Anwendung von Wachstumsfaktoren das Einwachsen von Blutgefäßen in implantierte Gewebekonstrukte zwar beschleunigt, jedoch birgt diese Applikationsform auch das Risiko der unkontrollierten Entstehung von Blutgefäßen an anderen Stellen im Organismus (Yancopoulos et al., 2000). Eine Alternative ist die Fixierung der Wachstumsfaktoren an oder in Biomaterialien, um eine lokale Freisetzung dieser zu garantieren. Dabei können die Wachstumsfaktoren direkt mit Polymerpartikeln zu einem Scaffold verarbeitet werden, oder sie werden zuerst in Mikrokugeln verkapselt und anschließend in das Biomaterial eingearbeitet (Perets et al., 2003; Shea et al., 1999). Obwohl sich die Verwendung von proangiogenen Faktoren und Wachstumsfaktoren ideal für therapeutische Ansätze in der regenerativen Medizin eignen würde, stellen sowohl die kurze

Halbwertszeit, als auch die Nebenwirkungen bei systemischer Verabreichung supraphysiologischer Dosen immer noch große Probleme dar, weshalb diese Strategie bisher im klinischen Alltag keine Anwendung findet (Mitchell et al., 2016; Ren et al., 2020).

Zahlreiche Studien der letzten Jahre belegten, dass besonders der Einsatz von vaskulären Zellen wie Endothelzellen die Revaskularisierung von Gewebekonstrukten deutlich beschleunigen kann (Fuchs et al., 2009; Sekine et al., 2008; Supp et al., 2002). Neben der entscheidenden Rolle beim Vaskularisierungsprozess sind Endothelzellen auch an der Entzündungsreaktion in der frühen Post-Transplantationsphase und am Reparaturprozess von Geweben beteiligt (Liu et al., 2017; Peters et al., 2003). Nachteilig ist jedoch, dass es zur Initiierung des Vaskularisierungsprozesses spezifische proangiogene Faktoren bedarf, die nicht von den Endothelzellen selbst erzeugt werden können, und dass Endothelzellen alleine nur instabile vaskuläre Strukturen bilden können (Koike et al., 2004; Liu et al., 2017; Unger et al., 2015). Daher hat sich in Studien die Ko-Kultivierung von Endothelzellen mit anderen Zelltypen als vielversprechender Lösungsansatz herausgestellt (Fuchs et al., 2009; Liu et al., 2017; Santos et al., 2009). Denn Ko-Kultur-Systeme fördern durch den zellulären *Crosstalk* die Produktion der wesentlichen proangiogenen Faktoren und andere Zellen tragen zur Stabilisierung des Blutgefäßsystems bei (Brennan et al., 2013; Unger et al., 2015). So demonstrierten Fuchs et al. (2009), dass Endothelzellen die Vaskularisierung eines komplexen Gewebekonstrukts, bestehend aus einem Polycaprolacton-Netz, zur Knochenregeneration unterstützen. Die Ko-Kultur von menschlichen Endothelzellen mit primären menschlichen Osteoblasten aus Spongiosa-Fragmenten führte *in vitro* ohne die Zugabe von angiogenen Wachstumsfaktoren zur Ausbildung von mikrogefäßähnlichen Strukturen. Weiterführend wurden die beiden Zelltypen in Matrigel eingebettet, über eine Woche kultiviert und nachfolgend in vorgeformte subkutane Taschen der subscapularen Region von Mäusen implantiert. Histologische Schnitte nach 14 Tagen zeigten, dass sich perfundierte Blutgefäße mit einem Durchmesser von bis zu 60 µm ausbildeten, die mit dem Mikrogefäßsystem des Wirtes anastomosierten (Fuchs et al., 2009). In einer ähnlichen Studie untersuchte die Arbeitsgruppe um Xu et al. (2017) die Prävaskularisierung und Mineralisierung von mit *human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells* (hiPSC-MSC) besiedelten Kalziumphosphat-Zementgerüsten in Abhängigkeit vom Vorhandensein von *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC). Sie konnten zeigen, dass HUVEC in Ko-Kultur mit hiPSC-MSC sowohl zur Bildung von kapillarartigen Strukturen führen, als auch die Mineralisation der Zementgerüste fördern. Weiterführend wurden die besäten Gerüste nach 21 Tagen in 5 mm große Schädeldefekte von Mäusen transplantiert. Nach 12 Wochen erreichte hier die Ko-Kultur-Gruppe den höchsten Prozentsatz an neuer Knochenfläche (Liu et al., 2017).

Auch Stammzellen tragen direkt und indirekt über verschiedene Mechanismen zum Vaskularisierungsprozess bei. Man unterscheidet generell zwischen pluripotenten und

multipotenten Stammzellen. Zu der ersten Gruppe gehören sowohl embryonale Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESC), als auch induzierte pluripotente Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) (Kolios, Moodley, 2013). Es wird berichtet, dass diese sowohl das Einwachsen von Blutgefäßen aus dem umgebenen Mikrogefäßsystem durch Freisetzung von proangiogenen Faktoren wie VEGF stimulieren können, als auch die Fähigkeit besitzen, selbst zu vaskulären Zellen zu differenzieren und somit die Bildung neuer Mikrogefäße zu initiieren (Laschke, Menger, 2012; Rehman et al., 2004; Singh et al., 2011). Jedoch bringt der Einsatz von pluripotenten Stammzellen nicht nur ethische Hürden mit sich, sondern birgt auch die Gefahr der Entstehung eines Tumors bzw. Teratoms (Blum et al., 2009). Dementsprechend sind auch diese Ansätze künftig nur schwer im klinischen Alltag umzusetzen.

Die Verwendung von multipotenten, mesenchymalen Stammzellen wie *adipose-derived stem cells* (ADSC) ist hingegen mit weniger ethischen Auflagen verbunden. Zudem ist die Gewinnung dieser Zellen weitaus einfacher. ADSC können beispielsweise aus der SVF, eine durch enzymatischen Verdau des Fettgewebes entstandene Zellquelle, isoliert werden. In der SVF befinden sich neben ADSC auch noch eine beträchtliche Anzahl an Endothelzellen, *endothelial progenitor cells* (EPC), Perizyten, glatten Muskelzellen, Makrophagen, Lymphozyten und Präadipozyten (Bora, Majumdar, 2017; Senesi et al., 2019). Allerdings benötigt die Entstehung von völlig ausgereiften und funktionsfähigen Blutgefäßen aus einzelnen Endothelzellen oder Stammzellen mehrere Wochen, weshalb der klinische Nutzen dieser Strategien nur bedingt erfolgversprechend ist (Rouwkema, Khademhosseini, 2016).

Ein vielversprechender Ansatz die Vaskularisierung zu beschleunigen ist die Verwendung von MVF. Sie bestehen aus Arteriolen, Venolen und Kapillaren, welche eine typische Gefäßmorphologie mit einem Gefäßlumen, perivaskulären Zellen und umgebenden extrazellulären Matrix(EZM)-Bestandteilen aufweisen (Hoying et al., 1996; Später et al., 2018) (Abb. 3). MVF können einfach mittels enzymatischem Verdau aus dem Fettgewebe isoliert werden und besitzen eine Länge zwischen 40 µm und 180 µm (Frueh et al., 2017b; Pilia et al., 2014). Neben vaskulären Zellen enthalten MVF zudem eine substantielle Anzahl an ADSC. Diese sind größtenteils im perivaskulären Bereich angesiedelt und dienen als Reservoir für Adipozyten (Berry et al., 2013; McDaniel et al., 2014). Interessanterweise wird berichtet, dass durch Kultivierung der ADSC mit Medien, die entsprechende linienspezifische Induktionsfaktoren enthalten, eine Differenzierung in Zellen endo-, meso- und ektodermalen Ursprungs wie beispielsweise Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Myozyten, neuronale Zellen und Endothelzellen möglich ist (Huang et al., 2013; Radtke et al., 2009; Tsuji et al., 2014). Dementsprechend können ADSC je nach Umgebungsbedingung in andere Zelltypen differenzieren und somit die Angiogenese während der Expansion des Fettgewebes unterstützen.

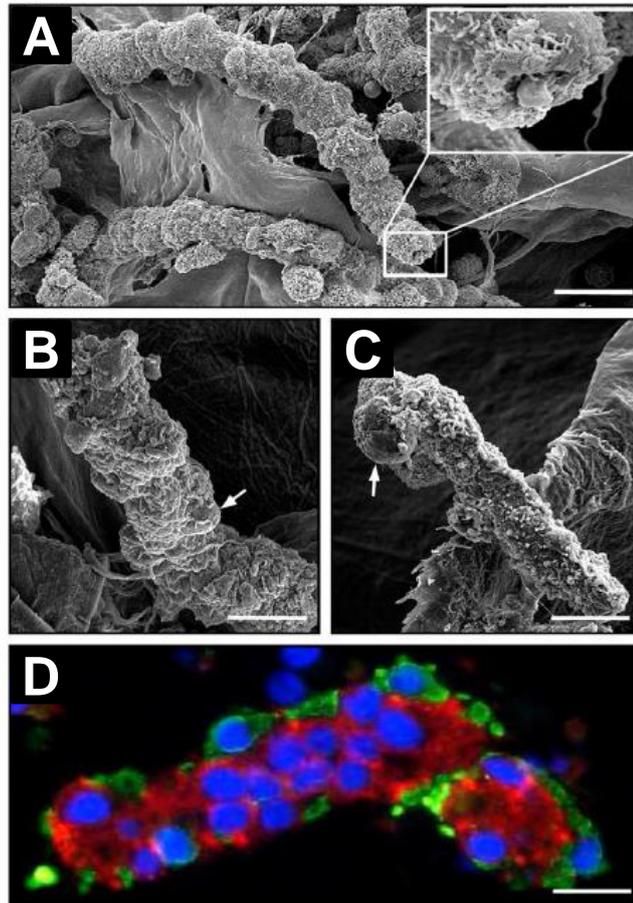


Abbildung 3: Mikroskopische Aufnahmen von isolierten MVF. (A-C) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von (A und B) frisch isolierten MVF und (C) eines kryokonservierten MVF nach Aussaat auf Kollagen-Glykosaminoglykan-Matrizen (Integra®). Die MVF zeigen typische Merkmale von Blutgefäßsegmenten mit einem zentralen Lumen (Einschub in A) und gefäßwandstabilisierenden Perizyten (Pfeile in B und C). Maßstäbe a=16 µm, b und c=9 µm. (D) Immunhistochemische Analyse eines frisch isolierten MVF. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (blau visualisiert), CD31-positive Zellen sind rot und α-SMA-positive glatte Muskelzellen sind grün visualisiert. Maßstab=11 µm. (modifiziert nach Laschke et al., 2018)

Mehrere Studien unserer als auch anderer Arbeitsgruppen berichteten bereits, dass MVF nicht nur untereinander voll funktionsfähige mikrovaskuläre Netzwerke ausbilden, sondern auch mit dem Mikrogefäßsystem des Empfängers (Laschke et al., 2012; Nakano et al., 1998; Pilia et al., 2014; Shepherd et al., 2007). Bei der Verwendung von MVF im Bereich des *Tissue Engineering* muss jedoch beachtet werden, dass sich diese nach Isolierung aus dem Fettgewebe in Suspension befinden. Bei unmittelbarer Transplantation in den Empfängerorganismus würden sich diese somit ungeordnet und mit großem Abstand zueinander am Transplantationsort verteilen und demnach nur unzureichend die Angiogenese fördern. Um dies zu verhindern wurden daher verschiedene Ansätze verfolgt, welche die Lokalisation an der gewünschten Transplantationsstelle gewährleisten. Die Arbeitsgruppe um Williams et al. (2007) generierte prävascularisierte Kollagen-*Patches* zur Behandlung der Myokardischämie in einem Mausmodell. Hierzu wurden MVF in ein Kollagengel eingebettet

und anschließend auf die Oberfläche des Epikards nach Ligatur der linken Koronarie transplantiert. Bereits sieben Tage nach Implantation konnte eine Inoskulation der vorgeformten mikrovaskulären Netzwerke mit der Koronar-Mikrozirkulation des Empfängers nachgewiesen werden. Die schnelle Vaskularisierung führte zu einer kleineren Infarktgröße und einer verbesserten linksventrikulären Funktion im Vergleich zu den Kontrolltieren mit avaskulären *Patches* (Shepherd et al., 2007). Frueh et al. (2018) verwendeten MVF zur Prävaskularisierung von Hautersatzmaterialien, um somit das Überleben von Hauttransplantaten zu verbessern. Hierzu wurden Integra®-Matrizen, bestehend aus einer Kollagen-Glykosaminoglykan-Matrix und einer Silikon-Pseudoepidermis, mit MVF besiedelt und in einen Wunddefekt implantiert. Hierbei zeigte sich ein dichteres Blut- und Lymphgefäßnetzwerk innerhalb der prävaskularisierten Matrizen im Vergleich zu nicht-besiedelten Integra®-Matrizen (Frueh et al., 2018).

Um nun MVF ohne Trägersubstanz und trotzdem in räumlicher Nähe zueinander implantieren zu können, wäre eine Generierung von Sphäroiden aus MVF denkbar. Sphäroide sind rundliche, dreidimensionale Aggregate, die aufgrund ihrer Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte sowie der heterogenen räumlichen Verteilung von Sauerstoff, Stoffwechselprodukten und Nährstoffen natürliches Gewebe weitaus besser nachahmen als 2D-Kulturen (Laschke, Menger, 2017; Petrenko et al., 2017). Die Generierung von Sphäroiden aus Endothelzellen wurde erstmals von Korff und Augustin im Jahre 1998 beschrieben. In einer darauffolgenden Studie konnten sie zeigen, dass erst die Zugabe von vaskulären Zellen wie α -SMA-positiven Muskelzellen und folglich die parakrine Interaktion zwischen den beiden Zelltypen einen reifen, ruhenden Endothelzellphänotyp induziert, der auch eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose aufweist (Korff et al., 2001).

Wie erwartet konnten auch *in vivo*-Studien ein hohes angiogenes Potential von Endothelzell-Sphäroiden nachweisen, welches durch die Inkorporation von anderen Zelltypen wie beispielsweise Perizyten gesteigert werden kann (Alajati et al., 2008; Chang et al., 2013).

Basierend auf den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die zeigt, dass MVF ein hohes Vaskularisierungspotential haben, sowie der Tatsache, dass Endothelzellsphäroide aufgrund ihrer räumlichen Zell-Zell-Kontakte eine höhere angiogene Aktivität besitzen als Endothelzellen in 2D-Kultur, soll in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob aus MVF Sphäroide generiert werden können und ob diese dann auch eine hohe angiogene Aktivität besitzen.

4 Ziel

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Sphäroide aus MVF und zugehörigen Einzelzellen generiert und deren Morphologie, Zellviabilität und Zusammensetzung analysiert. Als Kontrolle dienten Sphäroide aus Zellen der SVF. Weiterführend wurde das Vaskularisierungspotential von SVF- und MVF-Sphäroiden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht und miteinander verglichen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die angiogene Aktivität der MVF-Sphäroide die der SVF-Sphäroide übertrifft.

Diesbezüglich wurden folgende Arbeitshypothesen formuliert und überprüft:

- Aus der SVF- und MVF-Suspension können 3D-Sphäroide generiert werden.
- MVF-Sphäroide enthalten im Vergleich zu den SVF-Sphäroiden einen höheren Anteil vitaler Zellen.
- Innerhalb der SVF- und MVF-Sphäroide ist eine nennenswerte Anzahl Vorläuferzellen enthalten.
- Die angiogene Aktivität der MVF-Sphäroide ist *in vitro* höher als die der SVF-Sphäroide.
- Das *in vivo*-Vaskularisierungspotential der MVF-Sphäroide übertrifft das der SVF-Sphäroide.

5 Methoden

5.1 Reagenzien

Tabelle 1: Name und Herkunft der verwendeten biologischen Reagenzien		
Agarose	Promega (Dübendorf, Schweiz)	
Accutase®	BioLegend (Koblenz, Deutschland)	
Trypsin 4% (0,5 U/ml)	SERVA Elektrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)	
Kollagenase NB4G (0,5 U/ml)		
<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i> (DMEM)	PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)	
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)		
Penicillin/Streptomycin		
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)	
Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-markiertes Dextran (150 kDa)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	
Propidiumiodid		
Hoechst 33342		
<i>Oil Red O</i>		
Trypanblau		
Neutralrot		
Insulin (10 mg/dl, 1,7 mM)		
<i>HepatoQuick</i> ®		Roche (Basel, Schweiz)
Ketamin (Ursotamin®)		Serumwerke Bernburg (Bernburg, Deutschland)
Xylazin (Rompun®)		Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)
Deionisiertes Wasser	Universität des Saarlandes (Homburg/Saar, Deutschland)	
Ethanol	Chemsolute (Roskilde, Dänemark)	
Natriumcacodylat-Puffer	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	
Hexamethyldisilazan (HDMS)		
Isopropanol		
CaCl ₂		
Glutaraldehyd	Merck (Darmstadt, Deutschland)	
Formalin (4%, 10%)		
Mayers Hämalaunlösung		
H ₂ O ₂	Otto Fischar GmbH (Saarbrücken, Deutschland)	
Propidiumiodid	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	
Annexin V		
Natriumhydroxid	Zentrales Chemikalienlager, Universität des Saarlandes (Homburg/Saar, Deutschland)	
Endothelzellmedium	PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)	
Methylcellulose	Thermo Fisher (Herxheim, Deutschland)	
Medium 199 (10x)		
NaCl 0,9%	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)	
<i>Platelet-poor plasma</i> (PPP)	eigene Herstellung	
Kollagenextrakt		
Kohle	Balzers Union (Balzers, Liechtenstein)	
Gold	BalTec AG (Pfäffikon, Schweiz)	

5.3 Antikörper

Tabelle 2: Name und Herkunft der verwendeten Antikörper	
Primärantikörper:	
Ratte anti-CD31 (DIA310), 1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Kaninchen anti-Ki67 (12202), 1:100	Cell Signaling (Danvers, USA)
Kaninchen anti-casp-3 (9661), 1:200	
Kaninchen anti- α -SMA (1A4), 1:200	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaninchen anti-MPO (ab9535), 1:200	Abcam (Cambridge, UK)
PE Ratte anti-Maus CD73 (550741), 1:50	BD (Heidelberg, Deutschland)
PE Ratte anti-Maus CD117 (567471), 1:50	
PE Hamster anti-Maus CD29 (562801), 1:50	
Sekundärantikörper:	
Anti-Maus IgG (H+L)-Cy3, 1:1000	Jackson Immuno Research Labs (West Grove, USA)
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-Cy3, 1:1000	
Anti-Ratte IgG (H+L)-Cy3, 1:1000	

5.4 Versuchstiere

Für die Entnahme des epididymalen Fettgewebes wurden männliche C57BL/6N-Mäuse (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) im Alter von 11 ± 3 Monate und einem Gewicht von 36 ± 4 g verwendet. Die Implantation der Rückenhautkammer erfolgte an männlichen und weiblichen C57BL/6N-Mäusen im Alter von 4 ± 2 Monaten und einem Gewicht von 23 ± 2 g. Die Versuchstiere wurden unter klimatisierten Bedingungen mit einem Tag-/Nachtrhythmus (jeweils 12 h) gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser und Standard-Pelletfutter (Altromin, Lage, Deutschland).

Die genannten Experimente wurden gemäß der deutschen Tierschutzgesetzgebung und nach dem Leitfaden des *National Institutes of Health* (NIH) für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren (*Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, Washington DC, USA*) durchgeführt. Für die tierexperimentellen Versuche lag ein genehmigter Tierversuchsantrag vor (Versuchs-Nr.18/2017). Alle tierexperimentellen Versuche wurden im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Gebäude 65) am Campus Homburg/Saar der Universität des Saarlandes durchgeführt.

5.5 Exzision epididymaler Fettpolster

Sowohl die Zellen der SVF als auch die MVF wurden aus epididymalen Fettpolstern von männlichen C57BL/6N-Mäusen gewonnen. Die ersten Arbeitsschritte wurden am OP-Platz des Kleintier-OPs im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie durchgeführt. Vor Beginn des Eingriffs wurde die Maus mit Ketamin (75 mg/kgKG) und Xylazin (25 mg/kgKG) narkotisiert. Im Anschluss wurde der Bauch mithilfe eines elektrischen Tierhaarschneiders (Aesculap „Exacta“ Akku Schermaschine, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) rasiert, desinfiziert und anschließend durch einen Mittellinienschnitt mit einer stumpfen Schere (Längslaparotomie) die Abdominalhöhle des Tieres eröffnet. Danach wurden zwei senkrecht zum Mittellinienschnitt verlaufende Hautschnitte gesetzt und die vier Hautlappen seitlich mit einer Kanüle (B. Braun Melsungen AG, Deutschland) fixiert (Abb. 4A). Nun konnten die epididymalen Fettpolster identifiziert und mithilfe einer stumpfen Pinzette bilateral freigelegt werden. Durch leichtes Anheben wurden die Fettpolster oberhalb des Hodens mit einer Schere vorsichtig abgetrennt. Die gewonnenen Fettpolster ($1 \pm 0,45$ ml pro Maus) wurden in DMEM mit 10% (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin überführt und bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre aus 95% Luft und 5% (v/v) CO₂ aufbewahrt (Abb. 4B). Die Prozedur zur Gewinnung der epididymalen Fettpolster dauerte 20-25 Minuten. Die darauffolgenden Arbeitsschritte wurden im Zelllabor des Instituts unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

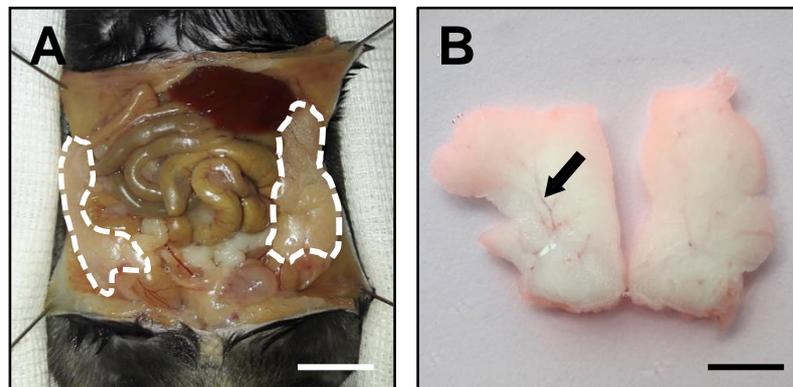


Abbildung 4: Exzision epididymaler Fettpolster. (A) Bauchsitus nach Längslaparotomie, epididymale Fettpolster von C57BL/6N-Mäusen sind durch gestrichelte, weiße Linien abgegrenzt. Maßstab=10 mm. (B) Nebenhodenfettpolster nach Exzision in einer mit DMEM gefüllten Petrischale, Pfeil markiert ein Blutgefäß. Maßstab=5 mm.

5.6 Gefäßfragment- und Zellisolierung

5.5.1 Isolierung von mikrovaskulären Gefäßfragmenten (MVF)

Zunächst wurden die entnommenen Fettpolster dreimal in mit PBS gefüllten Petrischalen (Greiner Bio-One, Deutschland) gewaschen, um Haarreste und Verunreinigungen vom Nebenhodenfettgewebe zu entfernen. Die Fettpolster wurden in ein 14 ml Rundbodenröhrchen (Greiner Bio-One, Deutschland) überführt und mit einer Schere mechanisch zerkleinert bis eine homogene Gewebesuspension entstanden ist. Im nächsten Schritt wurde das zerkleinerte Gewebe in ein Becherglas überführt, mit dem doppelten Volumen an Kollagenaselösung NB4G (0,5 U/ml in PBS) versetzt und für zehn Minuten unter Rühren bei 37 °C und 5% CO₂ enzymatisch verdaut. Der Verdau wurde lichtmikroskopisch überprüft, um einen Überverdau (Verdau zu Einzelzellen) zu vermeiden. Wie in Abbildung 5A erkennbar, besteht die MVF-Suspension zunächst aus zahlreichen Fetttröpfchen, Zelldebris, MVF und vereinzelt Zellen. Die enzymatische Reaktion wurde im nächsten Schritt durch Zugabe von doppeltem Volumen an PBS mit 20% FCS gestoppt. Die Suspension wurde danach in ein frisches 14 ml Rundbodenröhrchen überführt und für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert, um MVF durch Schwerkraft vom übrigen Fett abzutrennen. Mithilfe einer Pipette wurde der Fettüberstand entfernt und verworfen. Durch Filtration der MVF-Suspension durch einen Filter der Porengröße 500 µm wurden danach Verunreinigungen entfernt. Das Filtrat wurde in einem neuen 14 ml Rundbodenröhrchen aufgefangen und fünf Minuten bei 300 xg zentrifugiert (Zentrifuge CR 412, *Thermo Fisher Scientific*, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in dem restlichen Volumen resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß (Sarstedt, Deutschland) überführt. Die MVF-Suspension wurde erneut für fünf Minuten bei 300 xg zentrifugiert und anschließend bei 37 °C und 5% CO₂ bis zur Generierung der MVF-Sphäroide aufbewahrt. Wie in Abbildung 5B erkennbar, besteht die MVF-Suspension am Ende des Isolierungsvorgangs lediglich aus MVF sowie einigen Einzelzellen (~55000 MVF und ~825000 Einzelzellen pro ml Fettgewebe). Die Isolierung der MVF-Suspension aus dem Nebenhodenfettgewebe dauerte ~60 Minuten.

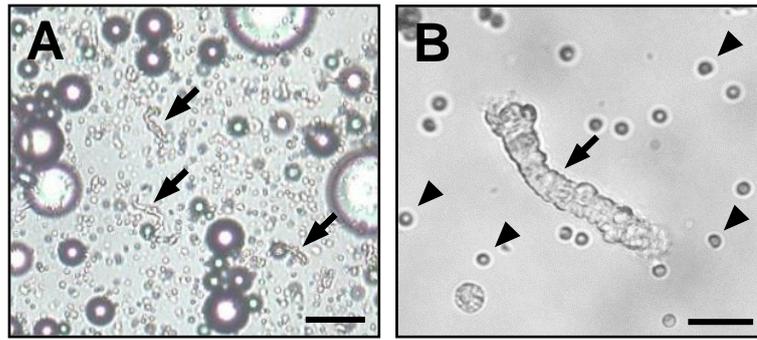


Abbildung 5: MVF-Suspension vor und nach Filtration. (A) MVF-Suspension nach zehnmütigem enzymatischen Verdau der epididymalen Fettpolster. Lichtmikroskopisch sind zunächst Fetttropfchen, Zelldebris, MVF (Pfeile) sowie einzelne Zellen erkennbar, 10x-Vergrößerung. Maßstab=125 µm. (B) MVF-Suspension nach Filtration durch einen 500 µm-Filter und zweimaliger Zentrifugation. In der Suspension sind nun MVF (Pfeil) und Einzelzellen (Pfeilspitzen) zu erkennen, 40x-Vergrößerung. Maßstab=25 µm.

5.5.2 Isolierung von Zellen der stromalen Gefäßfraktion (SVF)

Die ersten Schritte zur Isolierung der SVF-Suspension aus dem Nebenhodenfettgewebe erfolgten analog zum Protokoll der Isolierung der MVF-Suspension. Die MVF-Suspension wurde zunächst wie zuvor beschrieben mittels eines 500 µm-Filters aufgereinigt, um größere Gewebereste oder Zelldebris zu entfernen. Nun wurde die MVF-Suspension zusätzlich mithilfe eines 20 µm-Filters gereinigt, welcher durch die geringe Porengröße die MVF zurückhielt (Abb. 6). Die restlichen Zellen wurden dabei in einem Falcon aufgefangen und aufbewahrt. Anschließend wurde der Filter invertiert, auf ein 50 ml Falcon aufgesetzt und die MVF mithilfe von PBS aus dem Filter gewaschen. Danach wurde die MVF-enhaltende Suspension mit 4% Trypsin versetzt und zwölf Minuten im Wärmeschrank (CO₂-Inkubator, Binder GmbH, Deutschland) inkubiert, um die MVF weiter zu MVF-Einzelzellen zu verdauen. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von PBS mit 20% FCS gestoppt und die Suspension zweimalig für fünf Minuten bei 300 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet im restlichen Volumen resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Auch diese Zell-Suspension wurde zweimalig für fünf Minuten bei 300 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 1 ml DMEM resuspendiert. Abschließend wurden die MVF-Einzelzellen und die Zellsuspension zur SVF-Suspension zusammengeführt. Der Vorgang zur Isolierung der SVF-Suspension aus den epididymalen Fettpolstern dauerte ~90 Minuten.

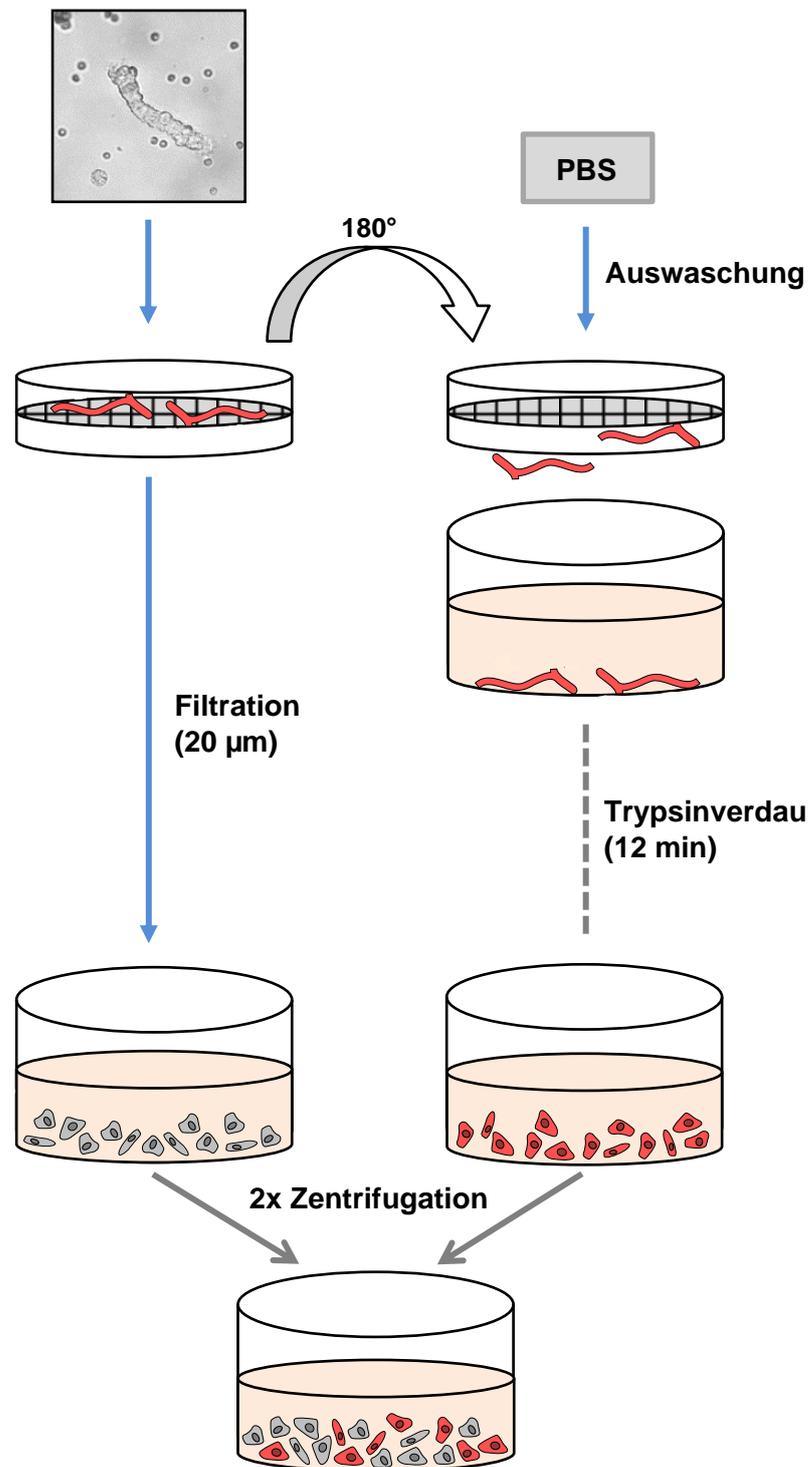


Abbildung 6: Schematische Darstellung der SVF-Isolierung. Filtration der MVF-Suspension durch einen 20 µm-Filter, der die Gefäßfragmente zurückhält. Die restlichen Zellen werden in einem Falcon aufgefangen. Danach Invertieren des Filters und Auswaschen der Gefäßfragmente mittels PBS. In einem weiteren Schritt werden MVF enzymatisch mittels 4% Trypsin zu MVF-Einzelzellen verdaut. Nach zweimaliger Zentrifugation werden die MVF-Einzelzellen und die restlichen Zellen schließlich zur SVF-Suspension zusammengeführt.

5.5.3 Fluoreszenzmikroskopische Viabilitätsprüfung (Propidiumiodid)

Um den Anteil der vitalen Zellen innerhalb der Zellsuspensionen unmittelbar nach Isolierung zu analysieren, wurden die Zellen mit Propidiumiodid angefärbt. Propidiumiodid kann die perforierte Zellmembran von toten Zellen (Apoptose und Nekrose) passieren und folglich in die DNA interkalieren. Die Komplexe aus DNA und Propidiumiodid können dann fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Die SVF-, MVF-Suspension sowie die MVF-Einzelzellsuspension (erhalten durch einen vollständigen Verdau von MVF) von drei Mäusen wurden direkt nach Isolierung aus dem Nebenhodenfettgewebe (Tag -5) für zehn Minuten mit 2 µg/ml Propidiumiodid und 2 µg/ml Hoechst 33342 versetzt. Die Zellen wurden auf einen Objektträger übertragen, mit einem Deckglas verschlossen und mittels Fluoreszenzmikroskopie (20x-Objektiv, Fluoreszenzmikroskop Olympus BX 60, Olympus Deutschland GmbH, Deutschland) visualisiert. Es wurden fünf *high power fields* (HPF) pro Objektträger analysiert und die Anzahl der vitalen, Propidiumiodid-negativen Zellen in % aller Hoechst 33342-positiven Zellen pro HPF angegeben.

5.7 Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauer-Zählkammer

Mithilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl der SVF-Einzelzellen bzw. MVF pro µl SVF- bzw. MVF-Suspension bestimmt. Hierfür wurden 10 µl der jeweiligen Suspension in jede Kammer der Neubauer-Zählkammer überführt. Wie in Abbildung 7 schematisch dargestellt, wurde in jedem Großquadrat die Anzahl der SVF-Einzelzellen bzw. MVF ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Im Anschluss konnte die Menge der SVF- bzw. MVF-Suspension bestimmt werden, die in jede Vertiefung einer 96-Lochplatte (Greiner Bio-One, Deutschland) überführt werden musste, um Sphäroide mit entsprechender Zellzahl zu generieren.

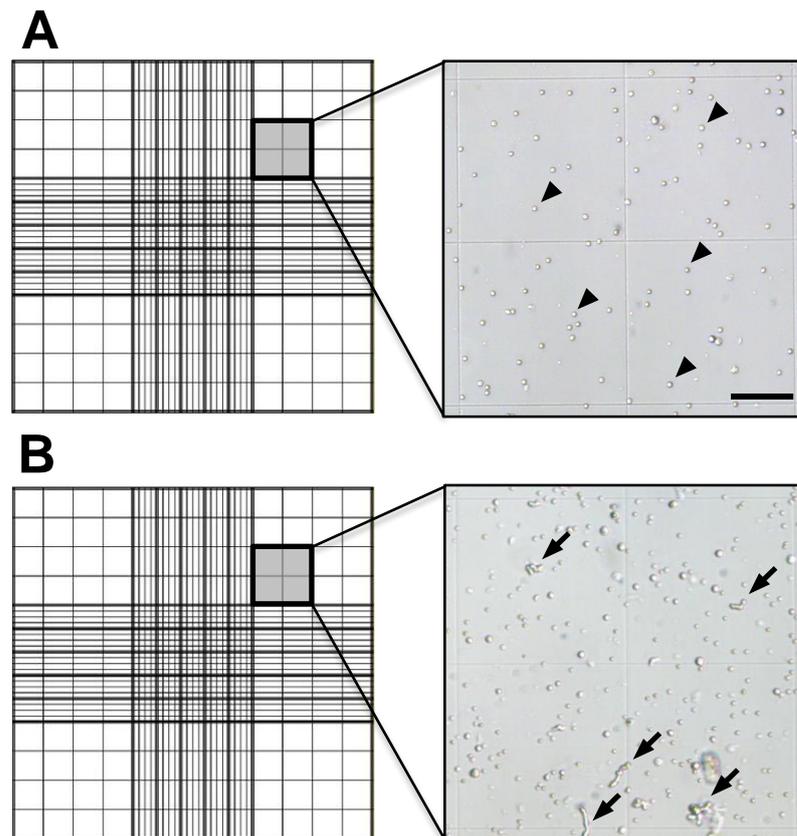


Abbildung 7: Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauer-Zählkammer. (A und B) Linker Bereich: Schematische Abbildungen der Neubauer-Zählkammer. In grau hervorgehoben sind jeweils vier Kleinquadrate eines Großquadrates. Rechter Bereich: Mikroskopische Aufnahmen von jeweils vier Kleinquadraten in 10x-Vergrößerung. (A) Pfeilspitzen markieren Zellen der SVF-Suspension. (B) Pfeile markieren mikrovaskuläre Gefäßfragmente der MVF-Suspension. Maßstab=100 µm. (modifiziert nach <http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>)

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Generierung der MVF-Sphäroide eine Anzahl von ~1000 MVF (bestehend aus je ~15 Zellen) und ~15000 Einzelzellen festgelegt. Für die Generierung von SVF-Sphäroiden mit vergleichbarer Größe wurden ~30000 Einzelzellen benötigt (Abb. 8).

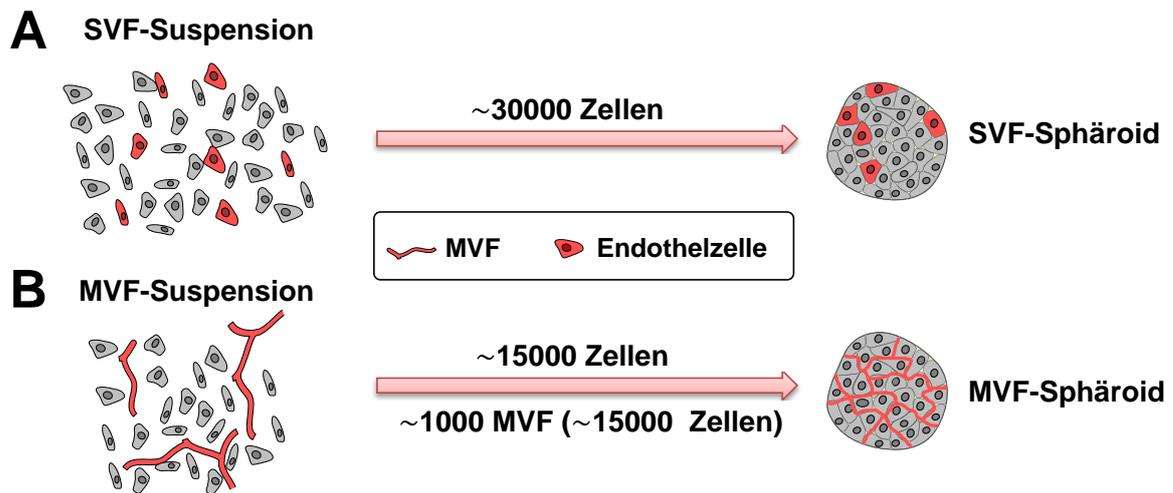


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Sphäroidzusammensetzung. (A) Für die Generierung von MVF-Sphäroiden wurden eine Anzahl von ~1000 MVF (bestehend aus je ~15 Zellen) und ~15000 Einzelzellen festgelegt. (B) Für die Generierung von SVF-Sphäroiden mit vergleichbarer Größe wurden ~30000 Einzelzellen benötigt.

5.8 *Liquid-Overlay* Technik

Zu Beginn wurden die Vertiefungen einer 96-Lochplatte mit je 40 μ l einer 1%igen Agaroselösung befüllt. Nach dem Aushärten der Agarose wurde jede Vertiefung mit 100 μ l DMEM befüllt und die Lochplatte anschließend für mindestens eine Stunde bei 37°C im Wärmeschrank aufbewahrt, bevor die Zellen ausgesät wurden. Im darauffolgenden Schritt wurde in jede Vertiefung der Platte die entsprechende Menge der SVF- bzw. MVF-Suspension gegeben. Nach Aussaat konnte nach zwei bis drei Tagen eine deutliche Zusammenlagerung der Zellen in der Mitte jeder Vertiefung beobachtet werden und nach vier bis fünf Tagen bildete sich im Zentrum ein Sphäroid aus (Abb. 9). Während der Sphäroidgenerierung wurde das Kulturmedium an jedem vierten Tag gewechselt. Hierbei wurden 50 μ l des Mediums entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach fünf Tagen wurden die Sphäroide geerntet und ihre Durchmesser lichtmikroskopisch mit der *FIJI-Software* (NIH, Bethesda, MD, USA) gemessen.

Zusätzlich wurden MVF-Sphäroide nach gleichem Protokoll über einen Zeitraum von bis zu 20 Tagen mittels *Liquid-Overlay* Technik kultiviert und an den Tagen 10, 15 und 20 lichtmikroskopisch dokumentiert.

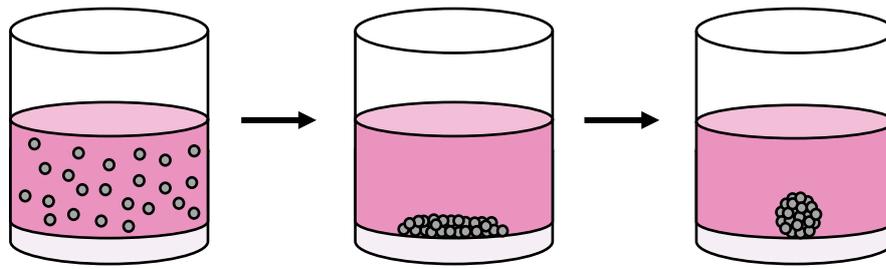


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Sphäroidgenerierung mittels *Liquid-Overlay* Technik über einen Zeitraum von fünf Tagen. Zu Beginn wurden Zellen der SVF-Suspension bzw. MVF-Suspension in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte überführt. Nach zwei bis drei Tagen konnte eine deutliche Zusammenlagerung der Zellen in der Mitte der Vertiefung beobachtet werden. Nach vier bis fünf Tagen bildete sich im Zentrum jeder Vertiefung ein Sphäroid aus.

5.9 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde durchgeführt, um detaillierte Aufnahmen der Morphologie der generierten Sphäroide zu erhalten. Hierfür wurden die Sphäroide auf einen Zellfilter (Porengröße 40 μm) überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Sphäroide zehn Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und auf einem Taumelschüttler unter leichter Bewegung in 2% (v/v) Glutaraldehyd-Puffer und in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,4) fixiert. Die Dehydrierung der Sphäroide erfolgte durch jeweils zehnminütige Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70% (vergällt), 80% (vergällt), 90% (vergällt), 96% (reinst), 100% (reinst)). Im Anschluss wurden die Sphäroide in einem 1:1-Gemisch aus 100% Ethanol (reinst) und Hexamethyldisilazan (HMDS) für 15 Minuten inkubiert, es folgte eine zweimalige Inkubation für je 15 Minuten in reinem HMDS. Zum Abschluss der Entwässerung wurden die Sphäroide mit HMDS überschichtet und bis zur vollständigen Verdunstung über Nacht unter einem Abzug gelagert. Anschließend wurden die Sphäroide auf leitfähige Kohlenstoffplättchen überführt und zunächst mit Kohle sowie zusätzlich dreimalig für jeweils 60 Sekunden mit Goldstaub beschichtet. Es folgte die elektronenmikroskopische Analyse der Proben in einem FEI XL 30 ESEM FEG SEM-Gerät (FEI, Hillsboro, OR) im *secondary electron*(SE)-Modus. Die Präparation sowie die Mikroskopie der Sphäroide für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. rer. nat. Wolfgang Metzger aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikum des Saarlandes (Homburg/Saar) durchgeführt.

5.10 Lichtmikroskopische Viabilitätsprüfung (Neutralrot & Trypanblau)

Zum Nachweis der Viabilität der Sphäroide wurden diese mit den Farbstoffen Neutralrot und Trypanblau versetzt. Neutralrot ist ein kationischer Farbstoff, der durch Endozytose und Diffusion in die Lysosomen vitaler Zellen aufgenommen wird. Trypanblau hingegen dient dem Nachweis toter Zellen, da der Farbstoff lediglich die Zellmembran von abgestorbenen oder perforierten Zellen passieren kann. Für die Analyse der Zellviabilität wurden zunächst die Sphäroide zur Kontrolle im Hellfeld mikroskopiert, dokumentiert und anschließend für zwei Minuten mit Neutralrot bzw. Trypanblau (jeweils im Verhältnis 1:10 verdünnt) bei RT inkubiert. Als Positivkontrolle dienten MVF- und SVF-Sphäroide, welche für zehn Stunden in einer 0,2%igen H₂O₂-Lösung inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Sphäroide dreimal mit PBS gewaschen und die Färbungen im Hellfeld mit einem BZ-8000 Mikroskop (*Keyence*) visualisiert.

5.11 Durchflusszytometrie

5.10.1 Viabilitätsprüfung (Annexin V & Propidiumiodid)

Da es sich bei der Neutralrot- und Trypanblaufärbung um eine nicht sehr sensitive Methode handelt, wurde der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen innerhalb der Sphäroide zudem durchflusszytometrisch mithilfe der Annexin V- und Propidiumiodidfärbung untersucht. Phosphatidylserin (PS) befindet sich bei vitalen Zellen auf der Innenseite der Zellmembran. Während der Apoptose wird PS auf die Außenseite der Zellmembran transloziert. Durch Bindung von Annexin V an PS können somit apoptotische Zellen detektiert werden. Während der späten Apoptose und auch Nekrose wird die Zellmembran permeabel, Propidiumiodid dringt in die Zelle ein und interkaliert in die DNA. Dadurch gelingt der Nachweis nekroapoptotischer und nekrotischer Zellen. Vitale Zellen hingegen sind weder Annexin V- noch Propidiumiodid-positiv.

Nach enzymatischer Auftrennung der Sphäroide in Einzelzellen mittels Accutase® (1:20) wurden die Zellen in PBS gewaschen, anschließend in einem Inkubationspuffer resuspendiert und für 15 Minuten mit Propidiumiodid (10 µg/ml) und Annexin V (100 µg/ml) gemäß Herstellerprotokoll (Roche) gefärbt. Danach wurden die gefärbten Zellen mittels Durchflusszytometrie im *FACScan*-Gerät (*BD Biosciences*, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Dabei wurde die Anzahl vitaler (ungefärbter), apoptotischer (Annexin V-positiv), nekrotischer (Propidiumiodid-positiv) sowie nekroapoptotischer (Annexin V- und Propidiumiodid-positiv) Zellen in % zur Gesamtzellzahl gemessen.

5.10.2 Bestimmung von Vorläuferzellen innerhalb der Sphäroide

Zu Beginn wurden die Sphäroide in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mithilfe von 0,5 ml Accutase® (1:20) bei 37 °C in Einzelzellen dispergiert. Um die Reaktion abzustoppen wurde 1 ml PBS und 20% FCS zugegeben und die Zellen danach zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt und das Volumen der Suspension auf 50 µl aufgefüllt. Die Zellen wurden mit Phycoerythrin(PE)-markierten Primärantikörpern gegen CD73, CD117 und CD29 sowie den PE-markierten Kontrollantikörpern lichtgeschützt für 30 Minuten bei RT inkubiert. Um Signale durch ungebundene Antikörper zu verhindern, wurden diese in einem Waschvorgang mit PBS für fünf Minuten bei 2000 xg bei RT entfernt. Schließlich erfolgte die Messung der Zellen im *FACScan*-Gerät (*BD Biosciences*, Heidelberg, Deutschland) und die Auswertung mithilfe der *Software Cellquest*®. Die Anzahl der CD73-, CD117- und CD29-positiven Zellen wurden in % zur Gesamtzellzahl angegeben.

5.12 Präadipozytendifferenzierung

Es ist bekannt, dass durch die Kultivierung von ADSC mit entsprechenden linienspezifischen Induktionsfaktoren eine Differenzierung in verschiedene Zelltypen wie beispielsweise Adipozyten möglich ist (Huang et al., 2013; Radtke et al., 2009; Tsuji et al., 2014). Während der Differenzierung von ADSC zu reifen Adipozyten können typische zellmorphologische Veränderungen beobachtet werden. Am Anfang steht dabei der Präadipozyt mit einer spindelförmigen Zellform. Während des Reifungsprozesses bilden sich innerhalb des Zytoplasmas viele kleine Lipidtröpfchen aus, welche sich im Verlauf vergrößern und zu einer großen Lipidvakuole verschmelzen. Der reife Adipozyt ist gekennzeichnet durch eine große Fettvakuole, welche das Zytoplasma und den Zellkern an den Rand drängt (Niemelä et al., 2008) (Abb. 10).

Zum Nachweis der innerhalb der Sphäroide enthaltenen ADSC wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Insulin die Differenzierung von ADSC zu Präadipozyten induziert. Dabei wurden die Sphäroide zunächst mithilfe der *Liquid-Overlay* Technik über einen Zeitraum von fünf Tagen generiert und anschließend jeweils fünf bis zehn Sphäroide in eine Vertiefung einer 24-Lochplatte überführt. In jeder Vertiefung befand sich eine 2 µMol Insulin-Lösung (DMEM supplementiert mit Insulin; Insulinstocklösung: 10 mg/dl=1,7 mM). Als Kontrolle dienen Sphäroide, die ausschließlich in DMEM kultiviert wurden. Die Sphäroide wurden nach Zugabe von Insulin über einen Zeitraum von fünf Tagen kultiviert und an jedem zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Bildung von Präadipozyten wurde an Tag 2 und 5 lichtmikroskopisch dokumentiert. Dabei wurden sowohl Übersichtsaufnahmen in 4x-Vergrößerung als auch

Aufnahmen in 20x-Vergrößerung aufgenommen. Abschließend wurde an jedem Versuchstag in 20x-Vergrößerung die Anzahl der Präadipozyten (Zellen bei denen zytoplasmatisch Fetttropfchen sichtbar waren) ausgezählt und diese in % zu allen Sphäroidzellen pro HPF angegeben.

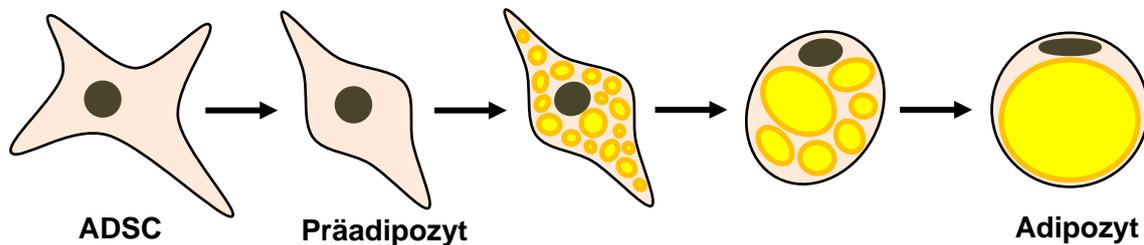


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Reifungsprozesses vom Präadipozyt zum reifen Adipozyten. Der Präadipozyt zeigt zu Beginn eine spindelförmige Zellform. Während des Reifungsprozesses bilden sich innerhalb des Zytoplasmas viele kleine Lipidtröpfchen aus, welche sich vergrößern und zu einer Lipidvakuole verschmelzen. Der reife Adipozyt ist gekennzeichnet durch eine große Lipidvakuole, welche den Zellkern und das Zytoplasma an den Rand drängt.

5.13 Oil Red O-Färbung

Oil Red O ist ein fettlöslicher Farbstoff, der Triglyzeride innerhalb von Zellen rot anfärbt und dazu genutzt wird, Präadipozyten und Adipozyten nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils fünf bis zehn SVF- und MVF-Sphäroide nach fünftägiger Generierung mittels *Liquid-Overlay* Technik in Vertiefungen einer 24-Lochplatte überführt und für fünf weitere Tage in einer 2 μ Mol Insulin-Lösung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Färbung der Lipidtröpfchen innerhalb der Präadipozyten wurden die Zellen anschließend für fünf Minuten bei RT in 1 ml 60%igem Isopropanol inkubiert. Im Anschluss wurde das Isopropanol entfernt und 1 ml der *Oil Red O*-Lösung zu den Zellen gegeben. Nach einer Stunde erneuter Inkubation bei RT wurden die Zellen mit deionisiertem Wasser gewaschen bis alle Farbrückstände beseitigt waren. Die gefärbten Lipidtropfen wurden lichtmikroskopisch in 40x-Vergrößerung mit einem BX60-Mikroskop (Olympus) visualisiert.

5.14 Sphäroid-Sprossungsanalyse (*Sprouting Assay*)

Zur Analyse des Sprossungsverhaltens und der angiogenen Aktivität der Sphäroide *in vitro* wurde eine Sprossungsanalyse nach Heiss et. al. (2015) durchgeführt. Hierzu wurden in jede Vertiefung einer 24-Lochplatte jeweils 200 μ l einer Kollagenlösung (160 μ l Kollagenextrakt aus Rattenschwänzen, 20 μ l Medium 199 (10x) und 20 μ l 0.2 M Natriumhydroxid; Ansatz auf Eis) und 200 μ l Endothelzellmedium (ohne Zusätze, 20% FCS und 0,5% (w/v) Methylcellulose) gegeben. Im Anschluss erfolgte eine Polymerisierung der Kollagenlösung für 45 Minuten bei

37 °C. Dann wurden wiederum 200 µl der Kollagenlösung (wie zuvor beschrieben) hergestellt, ~30 Sphäroide in diese Lösung gegeben, auf die bereits polymerisierte Kollagenmatrix überführt und für 45 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank ebenfalls ausgehärtet. Schließlich wurde 400 µl Endothelzellmedium pro Vertiefung zugegeben und die Sphäroide wurden für insgesamt zwei Tage bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Das Sprossungsverhalten wurde an den Tagen 0, 1 und 2 lichtmikroskopisch (BZ-8000; Keyence) analysiert. Die kumulative Länge der Sprossen (µm) pro Sphäroid wurde an jedem Versuchstag mithilfe der *ImageJ-Software* (NIH, Bethesda, MD, USA) bestimmt.

5.15 Rückenhautkammermodell

5.14.1 Implantation der Rückenhautkammer

Das Modell der Rückenhautkammer eignet sich durch Anwendung der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse von Angiogenese, Vaskularisierung und Biokompatibilität verschiedener Gewebe und Biomaterialien *in vivo* (Laschke, Menger, 2016). Wie in Abbildung 11 dargestellt, setzt sich die Rückenhautkammer aus zwei symmetrischen Titanrahmen zusammen.

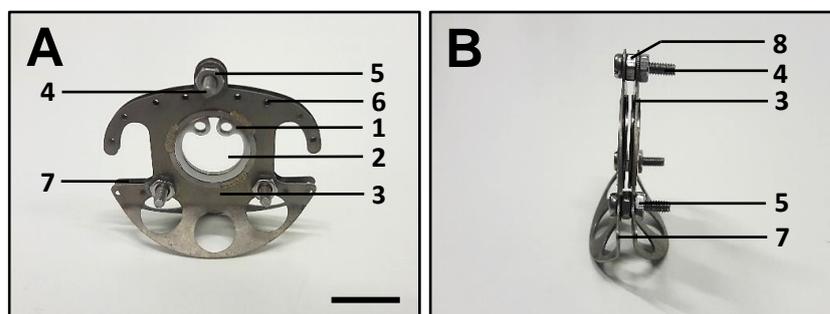


Abbildung 11: Aufbau der Rückenhautkammer. (A) Vorderansicht und (B) Seitensicht der aus zwei Titanrahmen bestehenden Rückenhautkammer, Gewicht 3,2 g. (1) Sprengring, (2) Beobachtungsfenster, (3) Vorderseite des Titanrahmens, (4) Verbindungsschraube, (5) Schraubenmutter, (6) Löcher für die Haltefäden, (7) Hinterseite des Titanrahmens, (8) Edelstahlmutter. Maßstab=1 cm.

Vor dem operativen Eingriff wurden insgesamt 16 Versuchstiere durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (75 mg/kgKG) und Xylazin (25 mg/kgKG) narkotisiert. Das Auftragen von Bepanthen®-Augensalbe verhinderte das Austrocknen der Augen. Mithilfe eines Tierhaarschneiders erfolgte die elektrische Rasur der Rücken- und Flankenbehaarung. Das Auftragen einer Enthaarungscreme (Pila med Creme, Asid Bonz, Böblingen, Deutschland) und das anschließende Entfernen der Creme (nach zweiminütiger Einwirkzeit) mit einem Plastischaber diente dazu, auch kleinste Haarreste aus dem Operationsfeld zu entfernen. Danach wurde der Rücken der Maus unter warmem Wasser gereinigt. Zu Beginn des

chirurgischen Eingriffs wurde die Maus auf den Bauch gelagert und die Rückenhaut mit zwei Haltefäden entlang der Mittellinie an einem Metallgestell aufgespannt, sodass sich die Blutgefäße des linken und rechten Rückens kongruent überlagerten (Abb. 12A). Mit Durchleuchtung wurde die Rückseite der Rückenhautkammer am Oberrand der Hautfalte festgenäht (Abb. 12B). Basal wurden mithilfe des Skalpell zwei etwa 3 mm große Hautschnitte für die Verbindungsschrauben zur Kammervorderseite gesetzt. Unter Durchleuchtung wurde dann der freizulegende Bereich mit einem Stift auf der Rückenhaut nachgezeichnet, um dort später das Beobachtungsfenster frei präparieren zu können (Abb. 12B). An den Verbindungsschrauben wurden anschließend Klemmen befestigt, um eine stabile Befestigung der Rückenhaut an der Kammerrückseite zu gewährleisten (Abb. 12C). Die Tiere wurden dann in Seitenlage positioniert. Mithilfe eines Stereo-Operationsmikroskops konnten in dem markierten Bereich die Kutis und Subkutis mit quergestreiftem Rückenhautmuskel (der zugewandten Seite) sowie der Musculus retractor beider Seiten entfernt werden (Abb. 12D). Das verbliebene Gewebe, bestehend aus Subkutis mit quergestreiftem Rückenhautmuskel sowie Kutis, wurde mehrfach mit warmer NaCl 0,9%-Lösung gespült, um ein Austrocknen der Wundfläche zu verhindern. Anschließend wurde die Vorderseite des Kammergerüsts unter Zuhilfenahme von Edelstahlmuttern als Abstandshalter mit einem Rahmen-Rahmen-Abstand von 400-500 µm auf die Verbindungsschrauben aufgesetzt und an die Kammerrückseite angedrückt. Dies verhinderte eine Kompression der zu- und abführenden Gefäße. Das Deckglas wurde unter Vermeidung von Lufteinschlüssen aufgelegt und das Fenster anschließend mit einem Sprengring am Titanrahmen fixiert (Abb. 12E). Nach dem chirurgischen Eingriff sollten sich die Tiere mindestens 48 Stunden erholen, um einen Einfluss der Anästhesie oder des chirurgischen Traumas durch das Präparationsverfahren auf die Mikrozirkulation der Kammer auszuschließen (Abb. 12F).

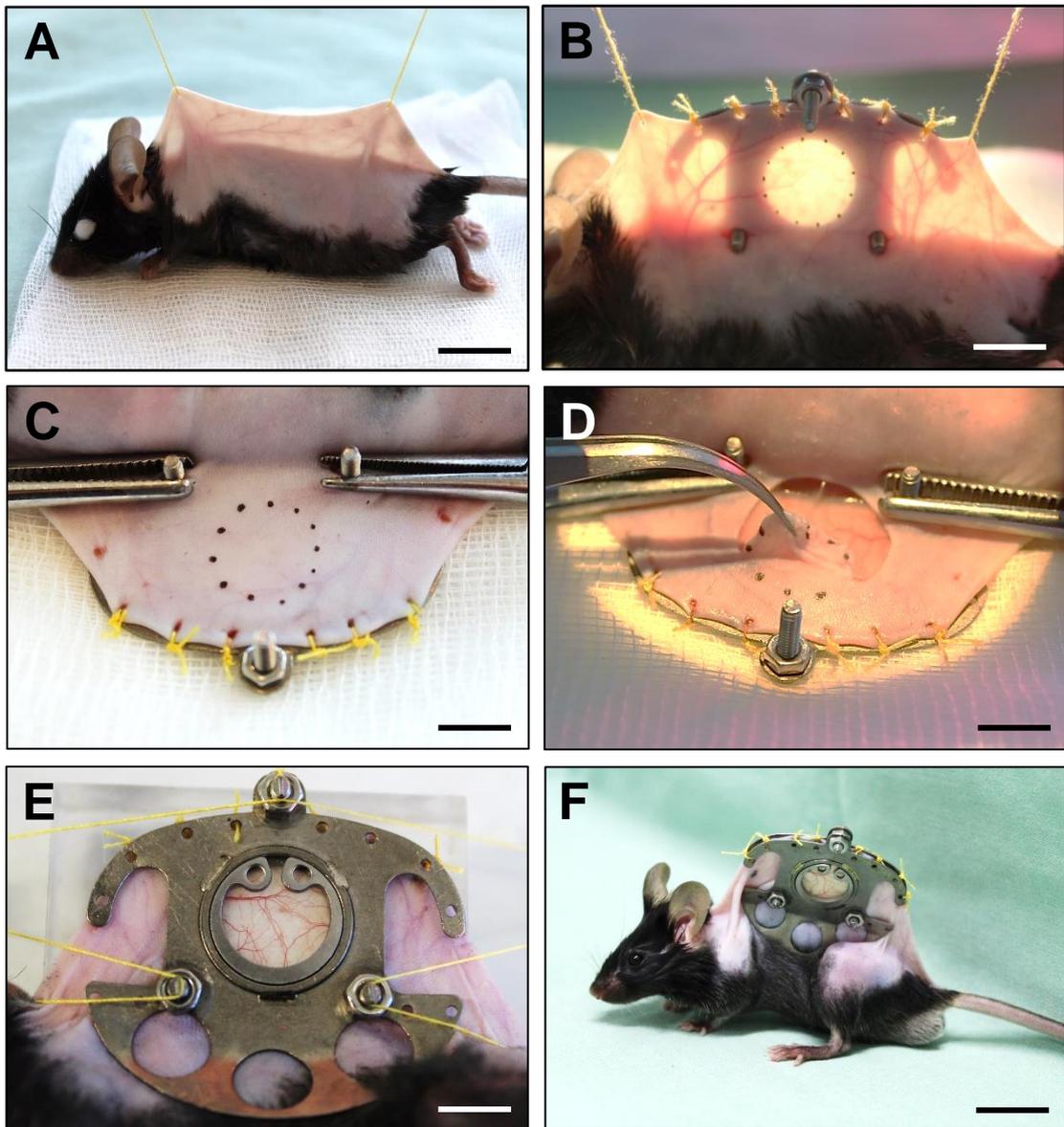


Abbildung 12: Implantation der Rückenhautkammer. (A) Unter Durchleuchtung wurde die Rückenhaut der Maus mit zwei Haltefäden angehoben und die Blutgefäße kongruent zur Deckung gebracht. Maßstab=1,5 cm. (B und C) Der hintere Kammerrahmen wurde an die Rückenhaut angenäht, anschließend wurden mit einem Skalpell Schnitte für die beiden Verbindungsschrauben gesetzt. Die beiden Verbindungsschrauben wurden durch die Rückenhaut vorgeschoben, anschließend wurde unter Durchleuchtung das Beobachtungsfenster nachgezeichnet. Maßstab=0,75 cm. (D) Schrittweise Entfernung von Kutis, Subkutis sowie des quergestreiften Rückenhautmuskels (der zugewandten Seite) und den beiden Schichten des Musculus retractor mithilfe einer Mikroschere. Maßstab=0,5 cm. (E) Nach Anbringen des vorderen Kammerrahmens wurde das Beobachtungsfenster mithilfe eines Deckglases und Sprenglings abgedichtet. Im Beobachtungsfenster sind die Blutgefäße des freipräparierten Rückenhautmuskels zu erkennen. Maßstab=0,75 cm. (F) Maus mit implantierter Rückenhautkammer. Maßstab=1,5 cm.

5.14.2 Transplantation der Sphäroide auf den quergestreiften Rückenhaulmuskel

Vor Transplantation der Sphäroide auf den quergestreiften Rückenhaulmuskel wurden die Empfängertiere durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (75 mg/kgKG) und Xylazin (25 mg/kgKG) narkotisiert. Anschließend wurden diese in Seitenlage auf einer Plexiglasplatte platziert (Abb. 13A). Der Sprengring und das Deckglas wurden entfernt und das Beobachtungsfenster mehrmals mit 0,9%iger NaCl-Lösung gespült. Die restliche 0,9%ige NaCl-Lösung wurde mit einem Wattetupfer von der freiliegenden Wundfläche entfernt. Mit einer 200 µl-Pipette wurden sieben bis acht Sphäroide, die zur besseren Sichtbarkeit zuvor mit Neutralrot angefärbt worden sind, auf die Wundfläche transferiert. Die Sphäroide wurden dann mit einer Pinzette, in ausreichendem Abstand zueinander, im oberen Bereich der Wundfläche positioniert (Abb. 13B). Um dem Verrutschen der Sphäroide beim Schließen der Kammer vorzubeugen, wurde nochmals Flüssigkeit mit einem Wattetupfer entfernt. Schließlich wurden Deckglas und Sprengring wieder vorsichtig auf den Kammerrahmen aufgesetzt.

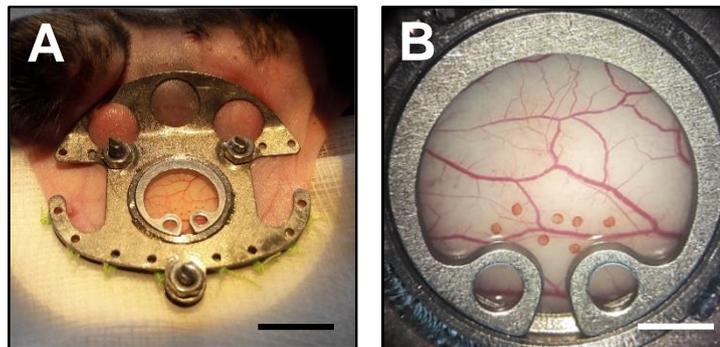


Abbildung 13: Transplantation der Sphäroide auf den quergestreiften Rückenhaulmuskel. (A) Das narkotisierte Empfängertier wurde in Seitenlage auf einer Plexiglasplatte platziert und die Rückenhaulkammer horizontal auf einer Komresse positioniert. Danach wurde der Sprengring entfernt und die Sphäroide in ausreichendem Abstand zueinander auf dem Rückenhaulmuskel platziert. Maßstab=1 cm. (B) Innerhalb des Beobachtungsfensters sind die Blutgefäße des freipräparierten Rückenhaulmuskels und sieben transplantierte Sphäroide zu erkennen. Maßstab=2,5 mm.

5.14.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse der Angiogenese der Sphäroide und der mikrozirkulatorischen Parameter erfolgte mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Die intravitale mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem dafür vorgesehenen Arbeitsplatz im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) durchgeführt (Abb. 14). Vorbereitend wurden die Versuchstiere durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (75 mg/kgKG) und Xylazin (25 mg/kgKG) narkotisiert. Es folgte die Injektion von 0,05 ml 5% FITC-Dextran (150 kDa) in den retrobulbären Venenplexus und das anschließende Auftragen von Bepanthen®-Augensalbe (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), um dem Austrocknen der

Augen vorzubeugen. Aufgrund seiner Größe von 150 kDa verbleibt das FITC-Dextran innerhalb des Gefäßsystems und kontrastiert somit das Blutplasma. Anschließend wurde die Maus auf einer Plexiglasbühne liegend unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiotech Mikroskop, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) positioniert. Dieses Mikroskop war mit einer 100 W Quecksilberdampfampe mit einem blauen (Anregungswellenlänge: 450-490 nm; Emissionswellenlänge: >515 nm) und einem grünen (Anregungswellenlänge: 530-560 nm; Emissionswellenlänge: >585 nm) Filterblock ausgestattet. Über eine *Charge-Coupled-Device*-Videokamera (FK6990; Pieper, Schwerte, Deutschland) wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen für spätere Analysen auf einem DVD-Rekorder (DVD-HR775; Samsung, Eschborn, Deutschland) aufgezeichnet und mithilfe des Bildverarbeitungssystem *CapImage* (Version 6.03; Dr. Zeintl, Ingenieurbüro Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Für die intravitalfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde an jedem Versuchstag (Tag 0, 3, 6 und 10) jeweils eine Übersichtsaufnahme in 4x-Vergrößerung aufgenommen. Anschließend wurde jedes einzelne Sphäroid in 10x- und 20x-Vergrößerung mikroskopiert, um die mikrozirkulatorischen Parameter zu bestimmen. An allen Messtagen wurde nach dem gleichen Protokoll vorgegangen, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

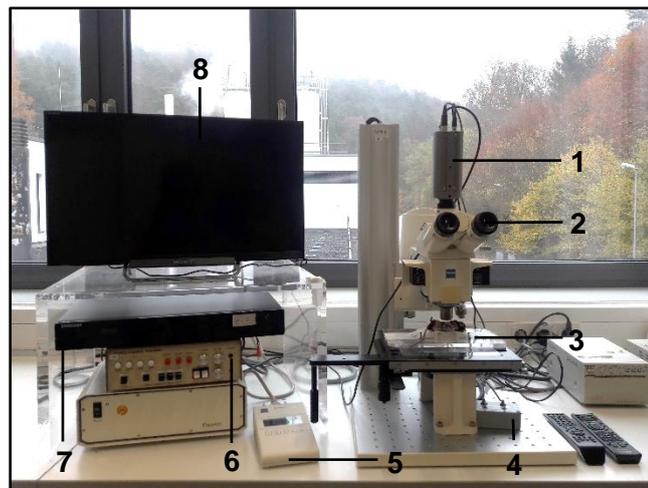


Abbildung 14: Geräte zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Aufbau des Arbeitsplatzes im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland). (1) Kamera, (2) Fluoreszenzmikroskop, (3) Plexiglasbühne mit Maus, (4) Kamerasteuerung, (5) Lampensteuerung, (6) Videotimer, (7) DVD-Rekorder, (8) Bildschirm.

Am ersten Versuchstag (Tag 0) wurde die initiale Größe (mm^2) jedes Sphäroids durch kreisförmiges Umfahren bestimmt (Abb. 15A). Um die Größe der vaskularisierten Fläche zu ermitteln, wurde die Fläche des neu gebildeten Blutgefäßnetzwerks an den jeweiligen Versuchstagen kreisförmig eingegrenzt und in Relation zur Größe des jeweiligen Sphäroids an Tag 0 gesetzt (%) (Abb. 15B). Zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte wurde in 20x-Vergrößerung die Fläche des neu gebildeten Gefäßnetzwerkes eingegrenzt und darin die

perfundierten Blutgefäße markiert (Abb. 15C). Somit ergab sich die funktionelle Kapillardichte aus der Gesamtlänge der perfundierten Blutgefäße pro Fläche des neu gebildeten Gefäßnetzwerks (cm/cm^2). Außerdem wurde die Anwachsrate (%) bestimmt. Hierbei handelt es sich um den Anteil der Sphäroide an allen transplantierten Sphäroiden, aus denen sich bis zu Tag 10 der Versuchsreihe ein perfundiertes Gefäßnetzwerk ausgebildet hat. Der Durchmesser der gebildeten Blutgefäße (μm) wurde durch Markierung der Gefäßränder orthogonal zum Gefäßverlauf in 20x-Vergrößerung bestimmt (Abb. 15D). Pro Sphäroid wurden die Durchmesser von sechs Blutgefäßen gemessen und diese anschließend gemittelt.

Die Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten innerhalb der gebildeten Blutgefäße wurde in der vorliegenden Arbeit mithilfe der von Klyscz et al. (1997) entwickelten *Line-Shift*-Diagramm-Methode computergesteuert berechnet. Dazu wurde das jeweilige Sphäroid in 20x-Vergrößerung fokussiert und innerhalb von sechs perfundierten Blutgefäßen eine Messlinie im Zentralstrom parallel zur Gefäßwand eingezeichnet (Abb. 15E). Während einer Messequenz von zehn Sekunden wurde die Fortbewegung der Erythrozyten in Form von Grauwertdaten entlang der Messlinie abgelesen. Die unterschiedlichen Grauwerte wurden in Abhängigkeit zur abgelaufenen Zeit in ein *Line-Shift*-Diagramm übertragen. Durch Nachzeichnen der schräg verlaufenden Grauwertlinien innerhalb des *Line-Shift*-Diagramms wurde deren Steigung ermittelt und daraus die Flussgeschwindigkeit errechnet (Abb. 15F). Für jedes Sphäroid wurde der Mittelwert gebildet. Der Blutvolumenfluss innerhalb der neu entstandenen Blutgefäße errechnete sich durch Multiplikation des Gefäßdurchmessers mit der Flussgeschwindigkeit. Hierbei muss beachtet werden, dass durch die *Line-Shift*-Diagramm-Methode ausschließlich die Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten im Zentralstrom der Blutgefäße berechnet wird. Diese nimmt jedoch innerhalb von röhrenförmigen Gebilden vom Zentrum zur Peripherie hin ab. Um daraus resultierend eine Überschätzung des mikrovaskulären Blutflusses zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit zur Korrektur der *Baker-Wayland*-Proportionalitätsfaktor mit dem Wert 1,6 miteinbezogen (Baker, Wayland, 1974). Der Blutvolumenfluss Q innerhalb des Gefäßnetzwerkes errechnete sich somit mithilfe der Formel:

$$Q = \pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2 \cdot \frac{v}{K} \quad [\text{pl/s}],$$

wobei d den Gefäßdurchmesser, v die Flussgeschwindigkeit und K den *Baker-Wayland*-Proportionalitätsfaktor darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei dem jeweiligen Versuchstier die mikrozirkulatorischen Parameter für jedes Sphäroid bestimmt und ein Mittelwert für alle Sphäroide errechnet. Die Werte aller Versuchstiere wurden anschließend erneut gemittelt.

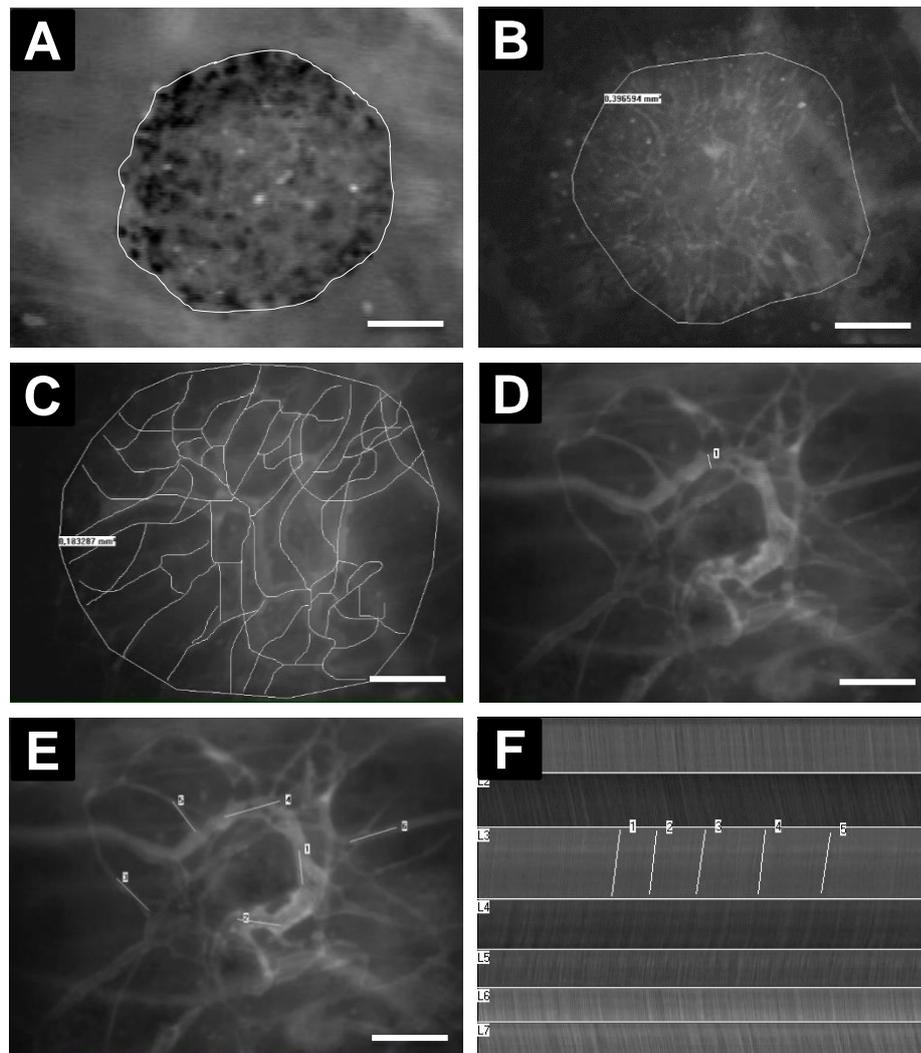


Abbildung 15: Mikrozirkulatorische Parameter. (A) Intravitalmikroskopische Aufnahme eines SVF-Sphäroids an Tag 0 nach Transplantation auf den quergestreiften Rückenhautmuskel. Bestimmung der initialen Größe (mm^2) durch Einkreisen des Sphäroids, 10x-Vergrößerung. Maßstab=100 μm . (B) Messung der Größe der vaskularisierten Fläche durch kreisförmiges Umfahren der neu gebildeten Blutgefäße, 10x-Vergrößerung. Maßstab=100 μm . (C) Messung der funktionellen Kapillardichte (cm/cm^2) durch Nachzeichnen der perfundierten Blutgefäße innerhalb des neu gebildeten Blutgefäßnetzwerkes, 20x-Vergrößerung. Maßstab=50 μm . (D) Messung des Gefäßdurchmessers (μm) durch Markierung der Gefäßränder orthogonal zum Gefäßverlauf, 20x-Vergrößerung. Maßstab=50 μm . (E) Messung der Flussgeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{s}$) durch Einzeichnen einer parallel zur Gefäßwand verlaufenden Messlinie im Zentralstrom von sechs perfundierten Blutgefäßen, 20x-Vergrößerung. Maßstab=50 μm . (F) Errechnung der Flussgeschwindigkeit über die Steigung der eingezeichneten Grauwertlinien.

5.14.4 Experimentelles Protokoll

Am ersten Versuchstag (Tag -5) wurde die SVF- bzw. MVF-Suspension aus dem Nebenhodenfettgewebe gewonnen und mittels *Liquid-Overlay* Technik wurden Sphäroide generiert. An Tag -2 wurden den Empfängertieren die Rückenhautkammern implantiert. Nach zwei weiteren Tagen erfolgte die Transplantation der Sphäroide auf den quergestreiften Rückenhautmuskel. Dies wurde als Tag 0 des experimentellen Protokolls definiert (Abb. 16).

An diesem Tag wurde die genaue Lokalisation der Sphäroide innerhalb des Kammerfensters sowie deren Größe mithilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Ebenso wurden an den Tagen 3, 6 und 10 nach Implantation der Sphäroide in die Kammer intravitalemfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen durchgeführt, um die Gefäßmorphologie und die mikrozirkulatorischen Parameter der neu gebildeten Gefäße zu bestimmen. Zehn Tage nach Implantation der Sphäroide (Tag 10) wurde die Maus euthanasiert, die Kammer explantiert und das Rückenhautgewebe mit den Sphäroiden für histologische Untersuchungen in Formalin fixiert.

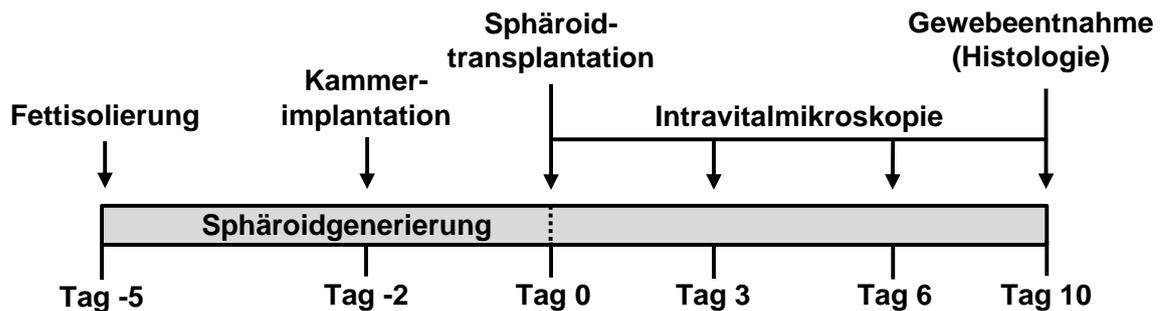


Abbildung 16: Experimentelles Protokoll. Fünf Tage vor Sphäroidtransplantation erfolgte die Isolierung der SVF- und MVF-Suspension aus dem Nebenhodenfettgewebe (Tag -5) und nachfolgend die Generierung der Sphäroide mittels *Liquid-Overlay* Technik (Tag -5 bis Tag 0). Nach 3 Tagen erfolgte die Implantation der Rückenhautkammer (Tag -2) und nach weiteren 2 Tagen die Transplantation der SVF- und MVF-Sphäroide auf den quergestreiften Rückenhautmuskel (Tag 0). An den Tagen 0, 3, 6 und 10 wurden intravitalemfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Nach der letzten Mikroskopie wurde die Rückenhautkammer explantiert und das Kammergewebe für histologische Untersuchungen in Formalin fixiert (Tag 10).

5.16 Immunhistochemie

Die zelluläre Zusammensetzung der SVF- und MVF-Sphäroide wurde immunhistochemisch analysiert. Zur Vorbereitung wurde ein Fibrin-Clot, bestehend aus 100 μ l *HepatoQuick*®, 50 μ l thrombozytenarmem Plasma (*platelet-poor plasma*, PPP) und 10 μ l CaCl_2 (10% in deionisiertem Wasser), hergestellt und für 15 Minuten im Wärmeschrank zur Polymerisation inkubiert. Danach wurden 15-20 Sphäroide in 15 μ l *HepatoQuick*® aufgenommen und mittig auf den ausgehärteten Fibrin-Clot platziert. Danach wurde 5 μ l PPP und 1 μ l CaCl_2 (10% in deionisiertem Wasser) hinzugegeben und zur Polymerisation für 15 Minuten im Wärmeschrank inkubiert. Danach wurde der zweite, die Sphäroide beinhaltende Fibrin-Clot, von einem dritten Fibrin-Clot (100 μ l *HepatoQuick*®, 50 μ l PPP und 10 μ l CaCl_2) umschlossen. Dieser zusammengesetzte Fibrin-Clot wurde über Nacht in 4%igem Formalin (Merck, Deutschland) inkubiert, am nächsten Tag in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (70%, 80%, 90%, 96%, 100% Ethanol) und in Paraffin eingeblockt. Abschließend wurden 3 μ m dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden mit den entsprechenden Primär-

Antikörpern (gegen CD31, α -SMA, Caspase-3 und Ki67) über Nacht inkubiert und anschließend mit den korrespondierenden Sekundärantikörpern (im Verhältnis 1:1000 verdünnt) 45 Minuten bei RT inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Die Anzahl der positiv gefärbten Zellen (Mittelwert aus drei Schnitten) wurde in % aller Sphäroidzellen pro HPF angegeben.

Für die Anfertigung von histologischen Schnitten am Ende der *in vivo*-Experimente wurden Rückenhautkammerpräparate von fünf Mäusen mit mindestens drei transplantierten Sphäroiden für 24 Stunden in 4% Formalin fixiert. Die formalinfixierten Präparate wurden dann in Paraffin eingebettet und 3 μ m dicke Gewebeschnitte angefertigt. Für die immunhistochemischen Analysen wurden die Schnitte mit den Primärantikörpern gegen CD31 und α -SMA angefärbt und durch entsprechende fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Anschließend wurden die Schnitte fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Außerdem wurden die Gewebeschnitte mit einem Myeloperoxidase (MPO)-Antikörper und anschließend mit einem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert, mit Mayers Hämalaun-Lösung gegengefärbt und danach lichtmikroskopisch analysiert. Die Anzahl CD31-, α -SMA- und MPO-positiver Zellen wurde an drei Gewebeschnitten pro Sphäroid mit der Software *ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, USA) gezählt und in % aller Sphäroidzellen pro HPF angegeben.

5.17 Statistische Analyse

Die *in vitro*-Experimente wurden in dieser Studie mindestens dreimalig reproduziert und für die *in vivo*-Studien wurden acht Tiere pro Versuchsgruppe verwendet. Nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung und gleiche Varianz wurden Unterschiede zwischen SVF- und MVF-Sphäroiden mit dem ungepaarten *Student's Test* (*Prism 8 Software, GraphPad, USA*) bewertet. Im Falle von nichtparametrischen Daten wurden Unterschiede zwischen den Daten mit dem *Mann-Whitney-Rangsummentest* beurteilt. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ akzeptiert.

6 Ergebnisse

6.1 Zellviabilität der SVF- und MVF-Suspension sowie der MVF-Einzelzellen

Für die Isolierung der MVF-Suspension wurden die epididymalen Fettpolster von C57BL/6N-Spendermäusen zunächst mechanisch und anschließend enzymatisch aufbereitet. Die SVF-Suspension wurde durch einen zusätzlichen enzymatischen Verdauungsschritt gewonnen. Direkt nach Isolierung wurden die Suspensionen mit Propidiumiodid versetzt und der Anteil an vitalen, Propidiumiodid-negativen Zellen (%) innerhalb der SVF- und MVF-Suspension sowie innerhalb der MVF-Einzelzellen bestimmt (Abb. 17A-C). Dadurch war es möglich, den durch das Isolierungsverfahren induzierten Zelltod zu beurteilen. Interessanterweise zeigte sich eine signifikant größere Anzahl Propidiumiodid-negativer Zellen innerhalb der MVF-Suspension im Vergleich zur SVF-Suspension und zur MVF-Einzelzellfraktion (Abb. 17D).

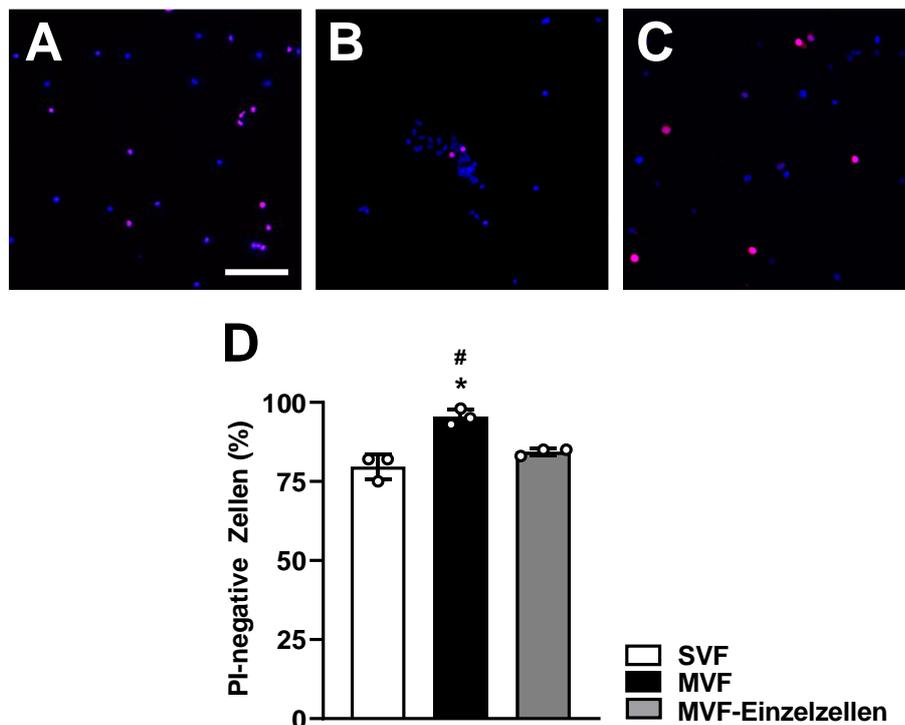


Abbildung 17: Zellviabilität der SVF- und MVF-Suspension sowie der MVF-Einzelzellen nach Isolierung aus dem Nebenhodenfettgewebe. (A-C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Propidiumiodid (rot)- und Hoechst 33342 (blau)-gefärbten Zellen innerhalb der (A) SVF-Suspension, (B) MVF-Suspension und (C) MVF-Einzelzellen, jeweils unmittelbar nach der Isolierung aus dem Nebenhodenfettgewebe. Maßstab=100 μ m. (D) Quantitative Analyse der vitalen, Propidiumiodid-negativen Zellen (in % aller Hoechst 33342-positiven Zellen pro HPF) innerhalb der SVF-Suspension (weiße Säule), der MVF-Suspension (schwarze Säule) und der MVF-Einzelzellen (graue Säule) nach Isolierung aus dem Nebenhodenfettgewebe (Tag -5). Mittelwert \pm SD (n=4). *p<0,05 vs. SVF, #p<0,05 vs. MVF-Einzelzellen.

6.2 Generierung von SVF- und MVF-Sphäroiden

Zunächst wurden 200, 500, 1000 und 2000 MVF mit den zugehörigen Einzelzellen in eine 96-Lochplatte überführt und die Sphäroidgenerierung lichtmikroskopisch dokumentiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Anzahl von 200 und 500 MVF zur Ausbildung eines Sphäroids nicht ausreichte und die Zellen sich nicht zu einer dreidimensionalen Struktur formierten (Abb. 18A). Die Kultivierung von 1000 MVF (bestehend aus ~15 Zellen) und ~15000 zugehörigen Einzelzellen pro Vertiefung führte zur Bildung jeweils eines einzigen Sphäroids mit einem Durchmesser von ~270 μm . Bei einer Zellzahl von 2000 MVF bildeten sich jeweils mehrere Sphäroide aus, weshalb sich diese Anzahl als ungeeignet herausstellte (Abb. 18A). Als Kontrolle dienten Sphäroide generiert aus SVF-Einzelzellen. Um SVF-Sphäroide mit vergleichbarer Größe zu erhalten wurden ~30000 SVF-Einzelzellen benötigt, was zu einem Durchmesser von ~230 μm führte (Abb. 18B). Für die nachfolgenden Experimente wurden ausschließlich MVF-Sphäroide aus ~1000 MVF (bestehend aus je ~15 Zellen) und ~15000 zugehörigen Einzelzellen, sowie SVF-Sphäroide aus ~30000 SVF-Einzelzellen verwendet.

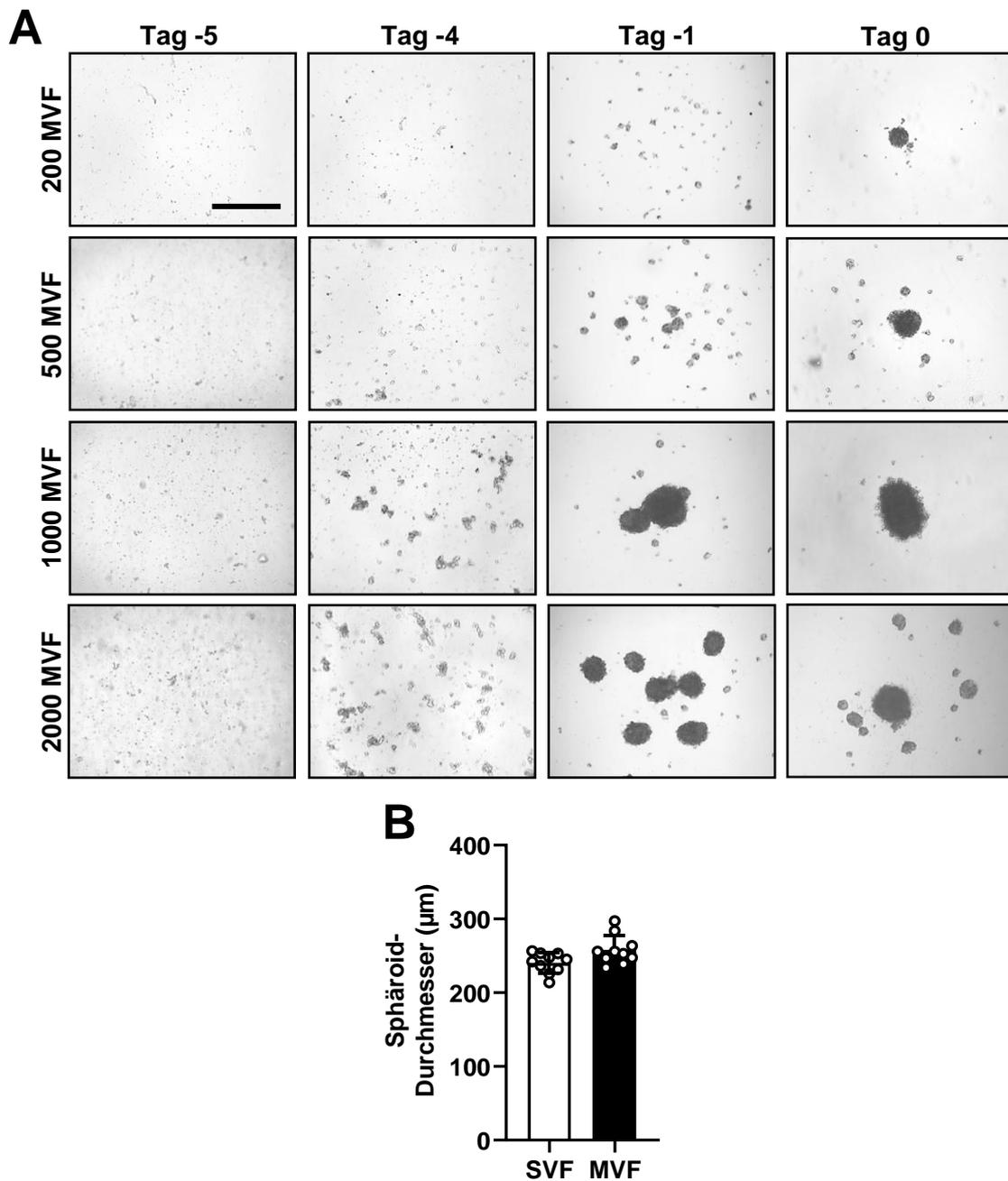


Abbildung 18: Generierung der Sphäroide. (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen der MVF-Sphäroidbildung. Zweihundert, 500, 1000 und 2000 MVF und die zugehörigen Einzelzellen wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels Liquid-Overlay Technik kultiviert. Maßstab=200 µm. (B) Quantitative Analyse der Durchmesser (µm) von SVF-Sphäroiden (bestehend aus ~30000 SVF-Einzelzellen) und MVF-Sphäroiden (bestehend aus 1000 MVF und ~15000 zugehörigen Einzelzellen) an Tag 0. Mittelwert ± SD (n=10).

Zusätzlich wurden MVF-Sphäroide über einen Zeitraum von bis zu 20 Tagen mittels *Liquid-Overlay* Technik kultiviert und an den Tagen 10, 15 und 20 lichtmikroskopisch dokumentiert (Abb. 19). Dabei sollte untersucht werden, ob eine längere Kultivierung die Morphologie der Sphäroide beeinflusst. Allerdings verloren die Sphäroide über einen Kultivierungszeitraum von mehr als fünf Tagen ihre kompakte Struktur. Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, dissoziierten die Zellen der MVF-Sphäroide über einen Zeitraum von bis zu 20 Tagen zunehmend.

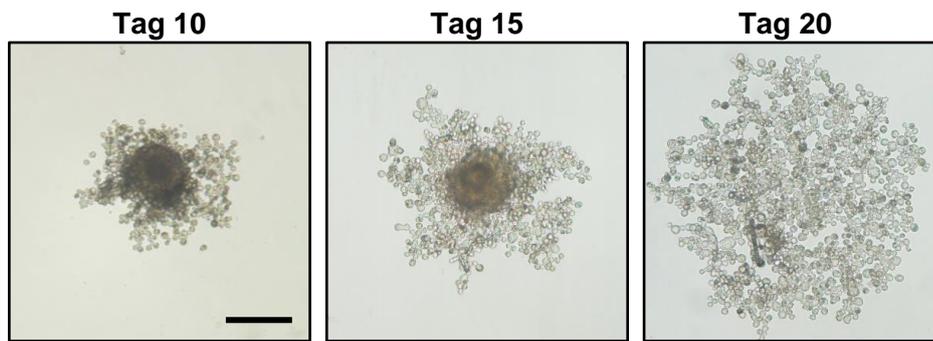


Abbildung 19: Langzeitkultivierung der MVF-Sphäroide. Lichtmikroskopische Aufnahmen von MVF-Sphäroiden an den Tagen 10, 15 und 20 in 10x-Vergrößerung. Bis zu einem Kultivierungszeitraum von 20 Tagen dissoziierten die Sphäroidzellen zunehmend. Maßstab=250 µm.

6.3 Morphologie der SVF- und MVF-Sphäroide

Durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach einem Kultivierungszeitraum von fünf Tagen wurde die Morphologie der Sphäroide charakterisiert. SVF- und MVF-Sphäroide zeigten eine sehr ähnliche Morphologie mit einem rauen, heterogenen Oberflächenmuster (Abb. 20A und B). Die Oberfläche der Sphäroidzellen war durch Ausstülpungen und Einsenkungen stark vergrößert und die Zellen standen durch lange Ausläufer in Kontakt mit benachbarten Zellen (Abb. 20C und D).

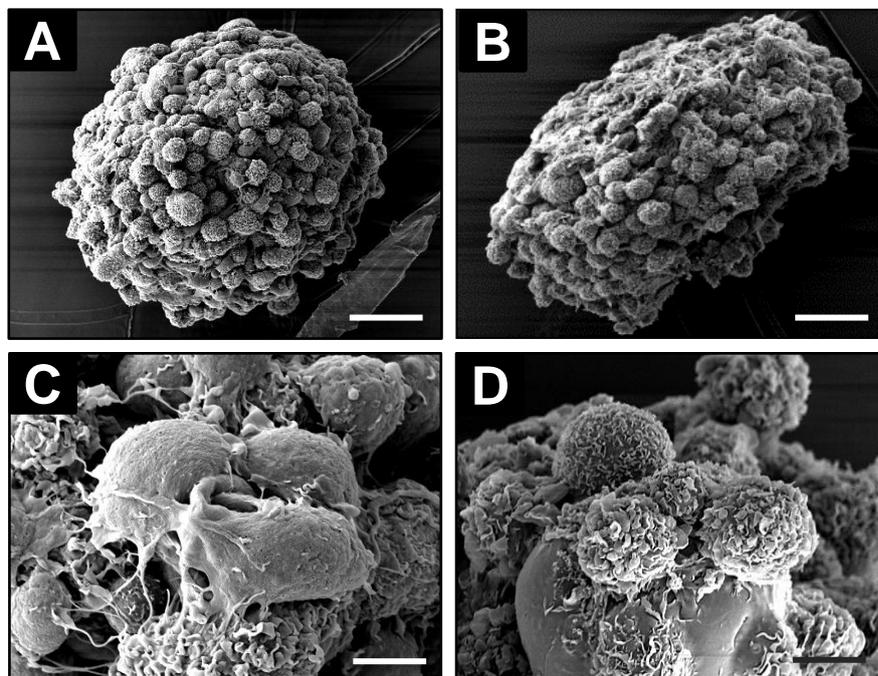


Abbildung 20: Morphologie der SVF- und MVF-Sphäroide. SVF- und MVF-Sphäroide wurden fixiert, präpariert und anschließend rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. (A) SVF-Sphäroid in 400x-Vergrößerung. Maßstab=35 µm. (B) MVF-Sphäroid in 400x-Vergrößerung. Maßstab=35 µm. (C) SVF-Sphäroid in 3200x-Vergrößerung. Maßstab=5 µm. (D) MVF-Sphäroid in 1600x-Vergrößerung. Maßstab=7,5 µm.

6.4 Viabilität der SVF- und MVF-Sphäroide

In einem ersten Experiment wurde die Viabilität der SVF- und MVF-Sphäroide mithilfe der Neutralrot- und Trypanblaufärbung bestimmt. Nach entsprechender Inkubationszeit färbten sich sowohl die SVF- als auch die MVF-Sphäroide rot. Eine Blaufärbung konnte in beiden Gruppen nicht beobachtet werden (Abb. 21). Dementsprechend beeinflusste die Sphäroidgenerierung die Viabilität der Zellen nicht. Im Gegensatz dazu färbten sich H_2O_2 -behandelte SVF- und MVF-Sphäroide (Positivkontrolle) blau, was auf den H_2O_2 -induzierten Zelltod zurückzuführen ist.

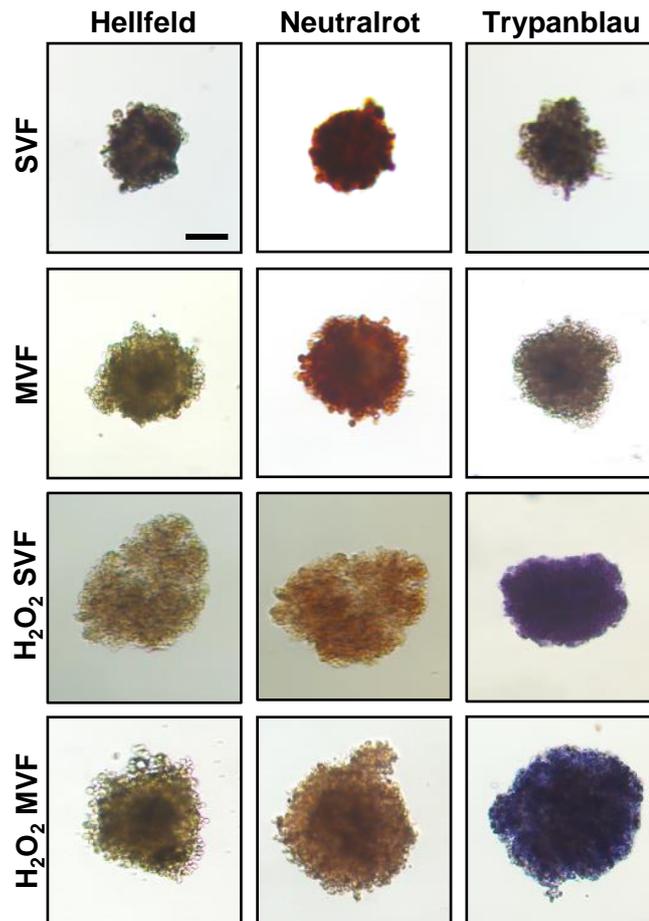


Abbildung 21: Analyse der Viabilität der SVF- und MVF-Sphäroide. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Neutralrot- und Trypanblau-gefärbten SVF- und MVF-Sphäroiden an Tag 0. Als Positivkontrolle dienten MVF- und SVF-Sphäroide, die für zehn Stunden mit 0,2% H_2O_2 inkubiert wurden, 10x-Vergrößerung. Maßstab=150 μm .

Der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen wurde weiterführend durchflusszytometrisch mittels Annexin V und Propidiumiodid analysiert. Wie erwartet konnte auch hier gezeigt werden, dass sowohl innerhalb der Gruppe der SVF- als auch der MVF-Sphäroide der überwiegende Anteil der Sphäroidzellen vital waren (Abb. 22A-C, blauer Bereich). Bezüglich der relativen Anteile vitaler, nekrotischer, apoptotischer oder nekro-apoptotischer Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der SVF- und MVF-Sphäroidgruppe (Abb. 22C).

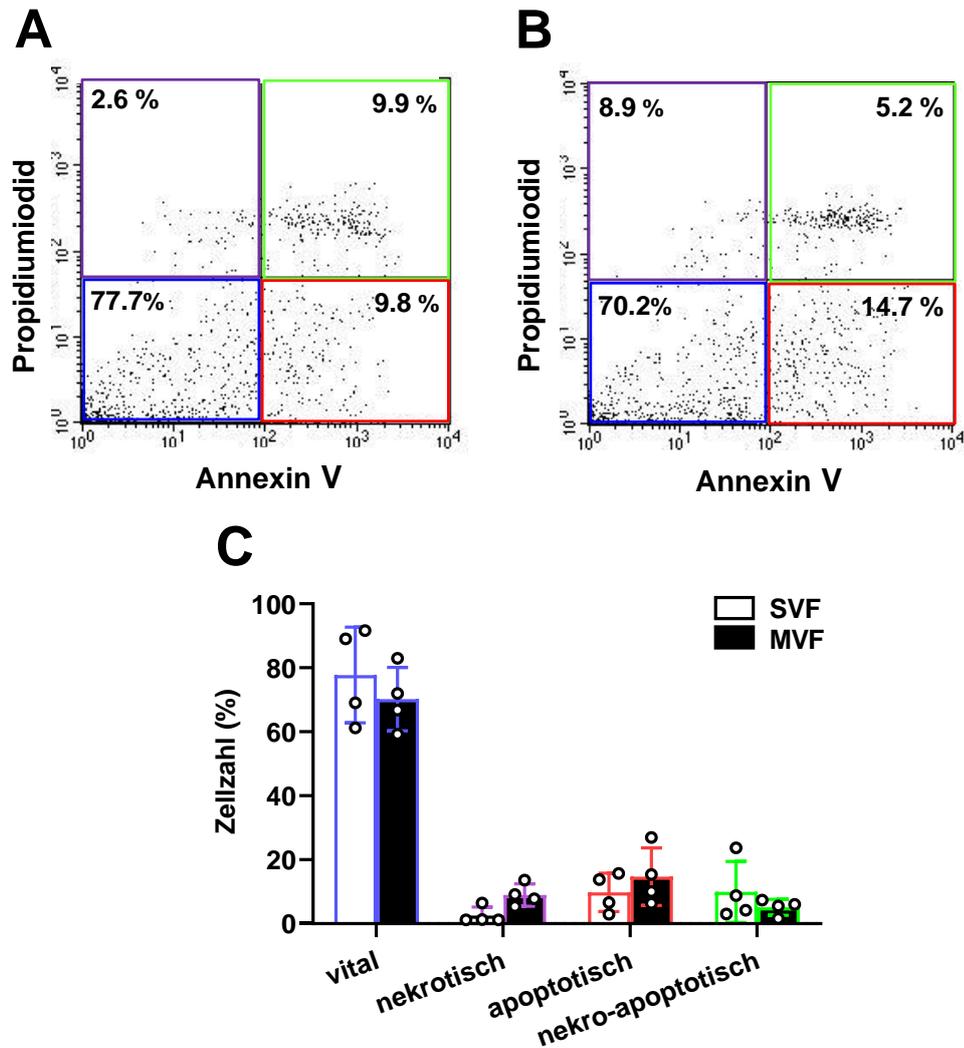


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse der Zellviabilität der SVF- und MVF-Sphäroide mittels Annexin V und Propidiumiodid. (A und B) Repräsentative Streudiagramme von Annexin V- und Propidiumiodid-gefärbten Zellen aus (A) SVF- und (B) MVF-Sphäroiden. Vitale Zellen sind blau, nekrotische Zellen violett, apoptotische Zellen rot und nekro-apoptotische Zellen grün umrahmt. (C) Quantitative Analyse der Annexin V- und Propidiumiodid-gefärbten Zellen in SVF- (weiße Säulen) und MVF-Sphäroiden (schwarze Säulen). Unterteilung in vitale (blau), nekrotische (violett), apoptotische (rot) und nekro-apoptotische Zellen (grün). Die Daten sind angegeben in % der Gesamtzellzahl. Mittelwerte \pm SD (n=4).

In einem weiteren Experiment wurden immunhistochemische Färbungen von SVF- und MVF-Sphäroiden angefertigt, um den Anteil an Caspase-3-positiven Zellen zu bestimmen (Abb. 23A). Auch hier zeigte die quantitative Auswertung keinerlei Unterschiede. In beiden Versuchsgruppen lag der Anteil der apoptotischen Zellen bei weniger als ein Prozent (Abb. 23B).

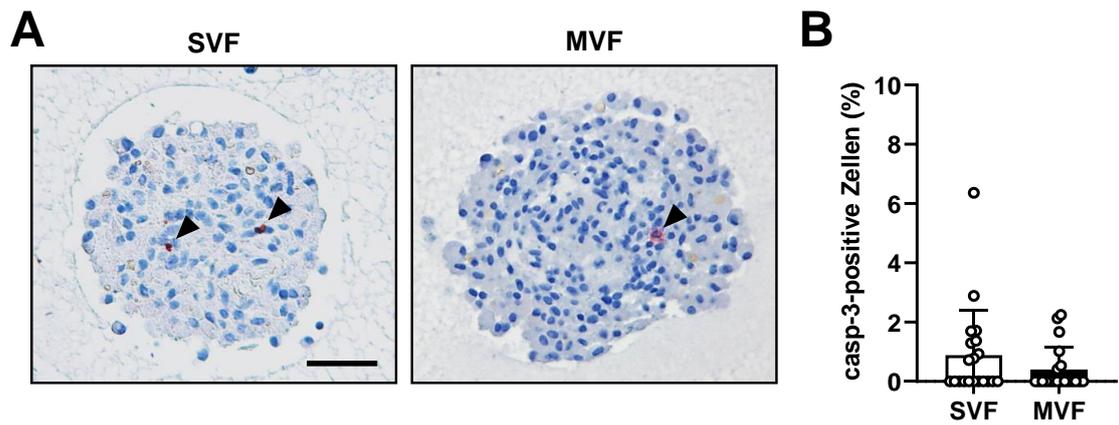


Abbildung 23: Bestimmung der apoptotischen Zellen innerhalb der SVF- und MVF-Sphäroide mittels Caspase-3-Färbung. (A) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Caspase-3-positiven Zellen eines SVF- und MVF-Sphäroids in 10x-Vergrößerung. Caspase-3-positive Zellen (rotbraun) durch Pfeilspitzen hervorgehoben. Maßstab=50 µm. (B) Quantitative Analyse der Caspase-3-positiven Zellen in SVF-Sphäroiden (weiße Säule) und MVF-Sphäroiden (schwarze Säule). Die Daten sind angegeben in % zu allen Sphäroidzellen pro HPF. Mittelwert \pm SD (n=20).

Weiter wurde der Anteil an Ki67-positiven Zellen immunhistochemisch bestimmt (Abb. 24A). Der Anteil der proliferierenden Zellen betrug in der SVF-Sphäroidgruppe durchschnittlich $6,7 \pm 0,9\%$ und in der MVF-Sphäroidgruppe durchschnittlich $6,7 \pm 0,6\%$ (Abb. 24B). Es zeigt sich somit kein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen.

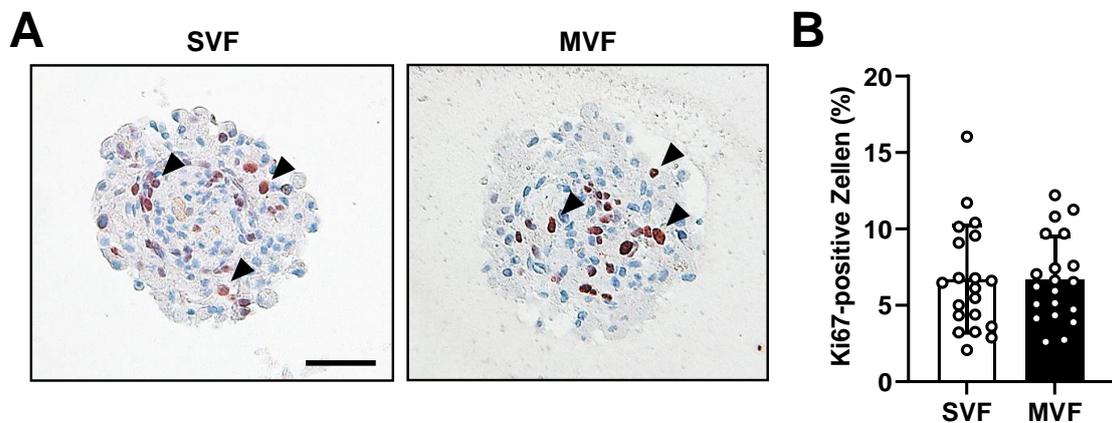


Abbildung 24: Bestimmung der proliferierenden Zellen innerhalb der SVF- und MVF-Sphäroide mittels Ki67-Färbung. (A) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Ki67-positiven Zellen eines SVF- und MVF-Sphäroids in 10x-Vergrößerung. Ki67-positive Zellen (rotbraun) durch Pfeilspitzen hervorgehoben. Maßstab=50 µm. (B) Quantitative Analyse der Ki67-positiven Zellen in SVF-Sphäroiden (weiße Säule) und MVF-Sphäroiden (schwarze Säule). Die Daten sind angegeben in % zu allen Sphäroidzellen pro HPF. Mittelwert \pm SD (n=20).

6.5 Zusammensetzung der SVF- und MVF-Sphäroide

Mesenchymale Stammzellen wie ADSC sind innerhalb des Fettgewebes im perivaskulären Bereich angesiedelt. Daher enthalten sowohl die SVF- als auch die MVF-Suspension eine substantielle Anzahl an ADSC (Berry et al., 2013; Bora, Majumdar, 2017; McDaniel et al., 2014). Mit den nachfolgenden Experimenten sollte deren Existenz auch in den jeweiligen Sphäroiden nachgewiesen werden. Die durchflusszytometrischen Analysen mit spezifischen Markerproteinen für ADSC zeigten, dass innerhalb der SVF- und MVF-Sphäroide eine vergleichbare Anzahl CD73-, CD117- und CD29-positiver Zellen enthalten sind (Abb. 25). Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen vor.

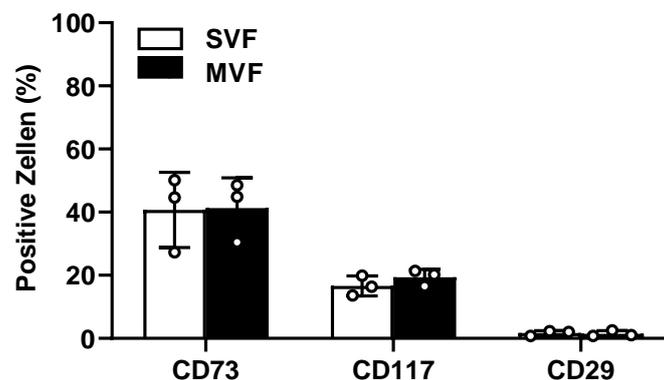


Abbildung 25: Vorläuferzellen in SVF- und MVF-Sphäroiden. Quantitative Analyse von CD73-, CD117- und CD29-positiven Zellen innerhalb von SVF- (weiße Säulen) und MVF-Sphäroiden (schwarze Säulen) mittels Durchflusszytometrie. Die Daten sind angegeben in % der Gesamtzellzahl. Mittelwert \pm SD (n=3).

Als nächstes wurde das Differenzierungspotential von ADSC zu Präadipozyten untersucht. Zu diesem Zweck wurden SVF- und MVF-Sphäroide über einen Zeitraum von fünf Tagen in Anwesenheit von rekombinantem Insulin kultiviert. Interessanterweise konnten in beiden Versuchsgruppen am fünften Versuchstag eine große Anzahl an *Oil Red O*-positiven Zellen nachgewiesen werden (Abb. 26A). Nachfolgend wurde der Anteil an Präadipozyten an den Tagen 2 und 5 bestimmt. In beiden Versuchsgruppen nahm die Anzahl der Präadipozyten zu. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der SVF- und MVF-Sphäroidgruppe (Abb. 26B). Dies deutet darauf hin, dass ADSC, wenn überhaupt, in gleichen Maßen das angiogene Potential der MVF-Sphäroide begünstigen.

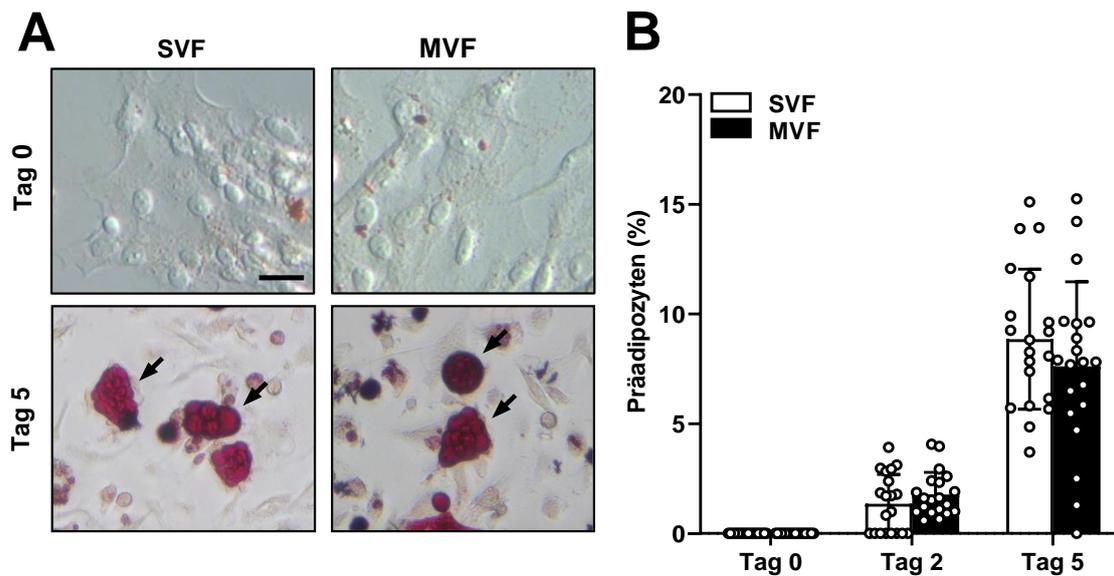


Abbildung 26: Differenzierung von ADSC zu Präadipozyten in SVF- und MVF-Sphäroiden. (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen von in Kollagengel eingebetteten SVF- und MVF-Sphäroiden, welche über einen Zeitraum von fünf Tagen in Anwesenheit von Insulin kultiviert wurden. An Tag 0 waren in beiden Versuchsgruppen noch keine Fetttröpfchen sichtbar. An Tag 5 waren sowohl in der SVF- als auch in der MVF-Sphäroidgruppe *Oil Red O*-gefärbte Präadipozyten (mit Pfeilen markiert) zu erkennen, 20x-Vergrößerung. Maßstab=30 µm. (B) Quantitative Analyse von *Oil Red O*-gefärbten Präadipozyten, an den Tagen 0, 2 und 5 in SVF- (weiße Säulen) und MVF-Sphäroiden (schwarze Säulen). Die Daten sind angegeben in % zu allen Sphäroidzellen pro HPF. Mittelwert \pm SD (n=20).

6.6 Analyse der angiogenen Aktivität der SVF- und MVF-Sphäroide *in vitro*

Zu Beginn wurde durch eine fluoreszenzmikroskopische α -SMA- und CD31-Doppelfärbung der Anteil der endothelialen und perivaskulären Zellen innerhalb der Sphäroide immunhistochemisch analysiert (Abb. 27A und B). Die quantitative Auswertung zeigte einen signifikant höheren Anteil an CD31-positiven und α -SMA-positiven Zellen innerhalb der MVF-Sphäroidgruppe im Vergleich zur SVF-Sphäroidgruppe (Abb. 27C und D).

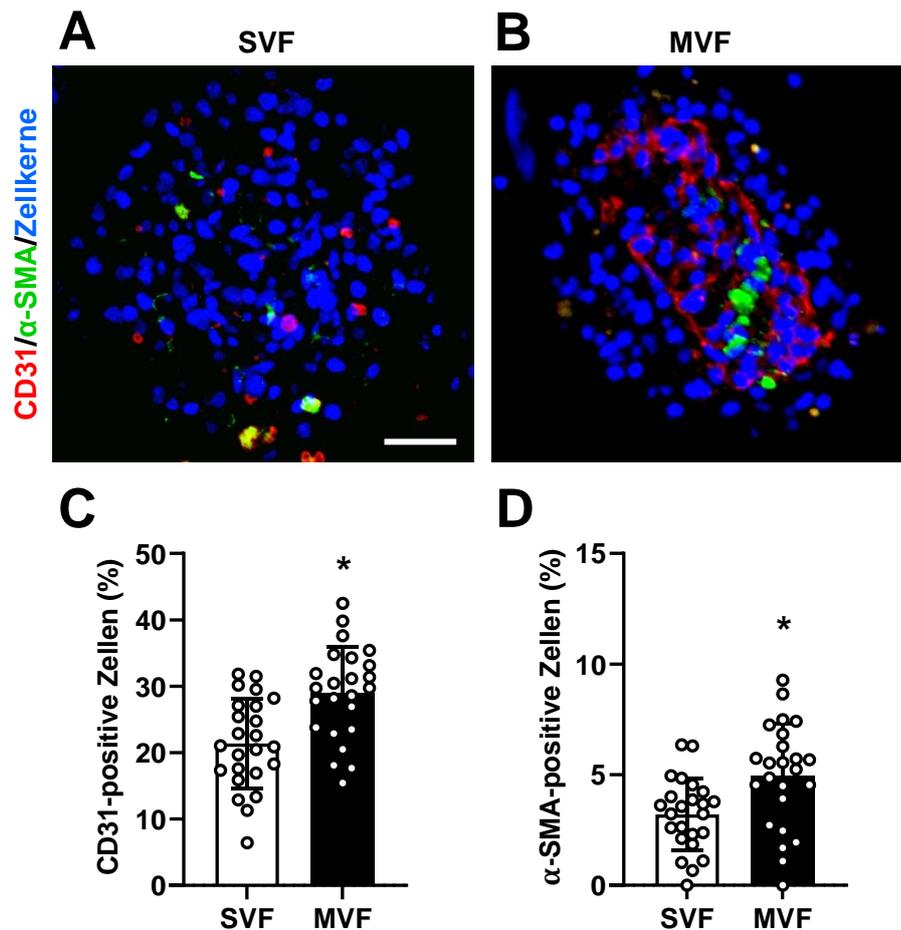


Abbildung 27: CD31- und α-SMA-positive Zellen innerhalb der SVF- und MVF-Sphäroide. (A und B) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung eines (A) SVF- und eines (B) MVF-Sphäroids in 20x-Vergrößerung. CD31-positive Endothelzellen sind rot, α-SMA-positive perivaskuläre Zellen grün und Hoechst 33342-positive Zellkerne blau angefärbt. Maßstab=50 µm. (C und D) Quantitative Analyse der (C) CD31- und (D) α-SMA-positiven Zellen innerhalb der SVF- (weiße Säule) MVF-Sphäroide (schwarze Säule). Die Daten sind angegeben in % aller Hoechst 33342-positiven Sphäroidzellen pro HPF. Mittelwert ± SD (n=25). $p^* < 0,05$ vs. SVF.

Als nächstes wurde die angiogene Aktivität der Sphäroide *in vitro* mittels *Sprouting Assay* untersucht. Hierbei wurden die Sphäroide in eine Kollagenmatrix eingebettet und das Aussprossen einzelner Zellen in die umgebene Matrix analysiert. Wie in Abbildung 28A deutlich zu erkennen ist, sprosseten in beiden Versuchsgruppen schon nach einem Tag einzelne Zellen aus dem Sphäroid aus. Am zweiten Versuchstag nahm die Länge der Zellausläufer weiter zu (Abb. 28A). Zusätzliche immunhistochemische Färbungen der Zellsprossen zeigten, dass diese hauptsächlich aus CD31-positiven Endothelzellen bestanden und von α-SMA-positiven perivaskulären Zellen umgeben waren (Abb. 28B).

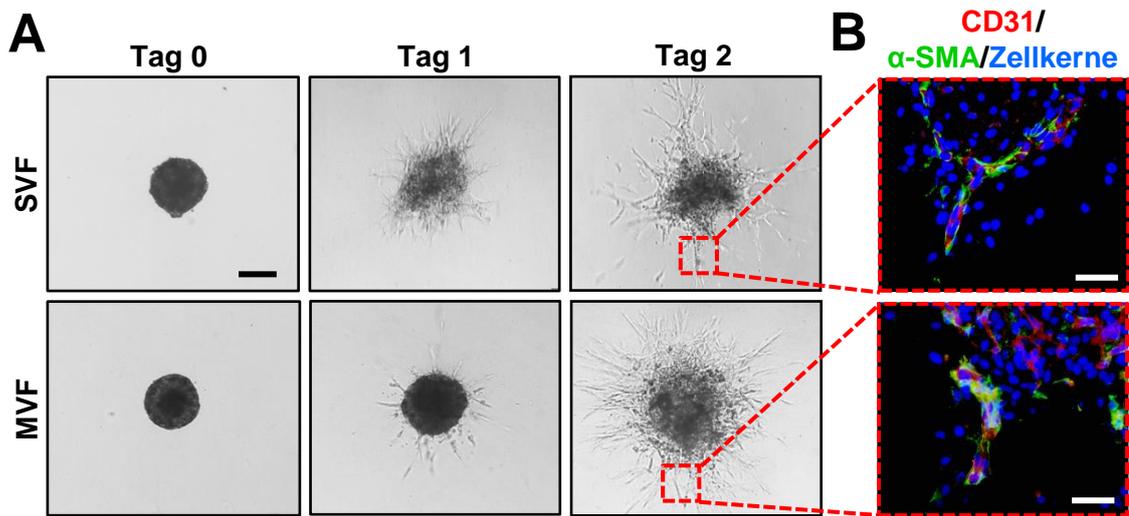


Abbildung 28: Sprouting Assay der SVF- und MVF-Sphäroide. (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen von sprossenden SVF- (obere Reihe) und MVF-Sphäroiden (untere Reihe) über einen Zeitraum von zwei Tagen in 10x-Vergrößerung. Maßstab=300 µm. (B) Rote Einschübe: Immunfluoreszenzfärbungen von CD31-positiven Endothelzellen (grün) und α-SMA-positiven perivaskulären Zellen (rot) innerhalb der Zellsprossen von SVF- (obere Reihe) und MVF-Sphäroiden (untere Reihe). Die Zellkerne sind mit Hoechst 33342 (blau) angefärbt. Maßstab=25 µm.

Des Weiteren wurde die kumulative Sprossenlänge der Sphäroide an den Tagen 1 und 2 bestimmt. Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, war die kumulative Sprossenlänge über den ganzen Versuchszeitraum in der MVF-Sphäroidgruppe signifikant größer als in der SVF-Sphäroidgruppe. Am zweiten Versuchstag war diese in der MVF-Sphäroidgruppe mit ~6400 µm sogar mehr als doppelt so groß wie in der SVF-Sphäroidgruppe mit ~3000 µm (Abb. 29).

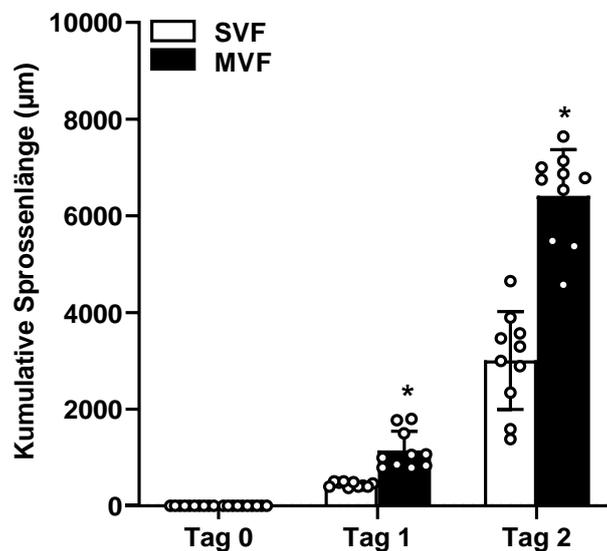


Abbildung 29: Kumulative Sprossenlänge der SVF- und MVF-Sphäroide. Quantitative Analyse der kumulativen Sprossenlänge (µm) von SVF- (weiße Säulen) und MVF-Sphäroiden (schwarze Säulen) an den Tagen 0, 1 und 2. Mittelwert ± SD (n=10). *p<0.05 vs. SVF-Sphäroidgruppe.

6.7 *In vivo*-Vaskularisierungspotential von SVF- und MVF-Sphäroiden

Abschließend wurde die angiogene Aktivität von SVF- und MVF-Sphäroiden *in vivo* untersucht. Hierzu wurden Rückenhautkammern auf C57BL/6N-Empfängermäuse implantiert und sieben bis acht Neutralrot-gefärbte SVF- bzw. MVF-Sphäroide auf den quergestreiften Rückenhautmuskel transplantiert (Abb. 30A). Mithilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie wurden mikrozirkulatorische Veränderungen an den Tagen 3, 6 und 10 dokumentiert. Bereits an Tag 3 nach Implantation der Sphäroide in die Rückenhautkammer zeigten sich kleinste Einblutungen als erste Zeichen der Angiogenese im unmittelbaren Umfeld der Sphäroide, die schon makroskopisch zu erkennen waren (Abb. 30B). Diese Einblutungen wurden bis zum sechsten Tag wieder resorbiert (Abb. 30C).

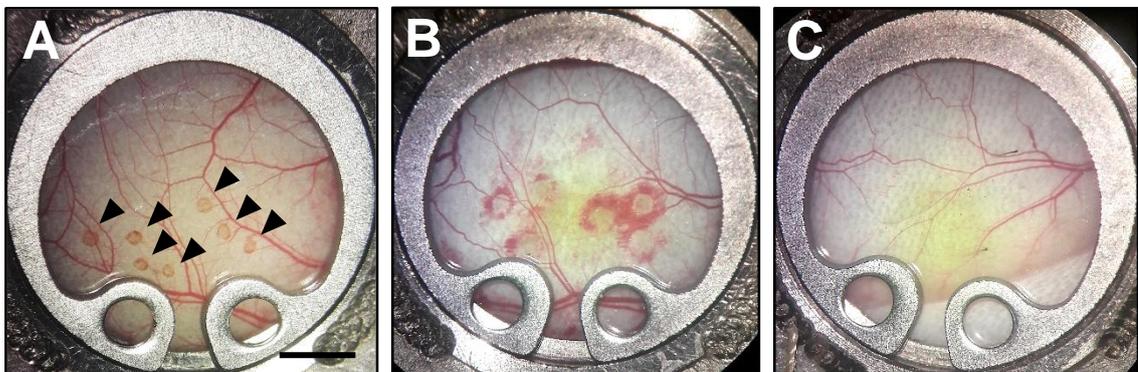


Abbildung 30: Makroskopische Veränderungen nach Transplantation der MVF-Sphäroide auf den quergestreiften Rückenhautmuskel. (A-C) Aufsicht auf das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer an den Tagen 0, 3 und 6 nach Implantation der MVF-Sphäroide. (A) An Tag 0 waren die Neutralrot-gefärbten Sphäroide deutlich abgrenzbar (Pfeilspitzen). (B) An Tag 3 waren makroskopisch kleinste Einblutungen an den Transplantationsstellen der Sphäroide zu erkennen. (C) An Tag 6 waren die Einblutungen wieder vollständig resorbiert. Maßstab=250 µm.

Die relative vaskularisierte Fläche bezeichnet die Fläche des neu gebildeten Blutgefäßnetzwerkes nach Implantation der Sphäroide in Bezug zur initialen Größe der Sphäroide (%). Wie aus Abbildung 31A hervorgeht, vergrößerte sich die relative vaskularisierte Fläche in beiden Versuchsgruppen von Beginn an stetig. In der MVF-Sphäroidgruppe war diese jedoch an allen Tagen im Vergleich zur SVF-Sphäroidgruppe signifikant größer (Abb. 31A und B). Der Maximalwert wurde mit ~240% in der SVF-Sphäroidgruppe und ~350% in der MVF-Sphäroidgruppe an Tag 10 erreicht.

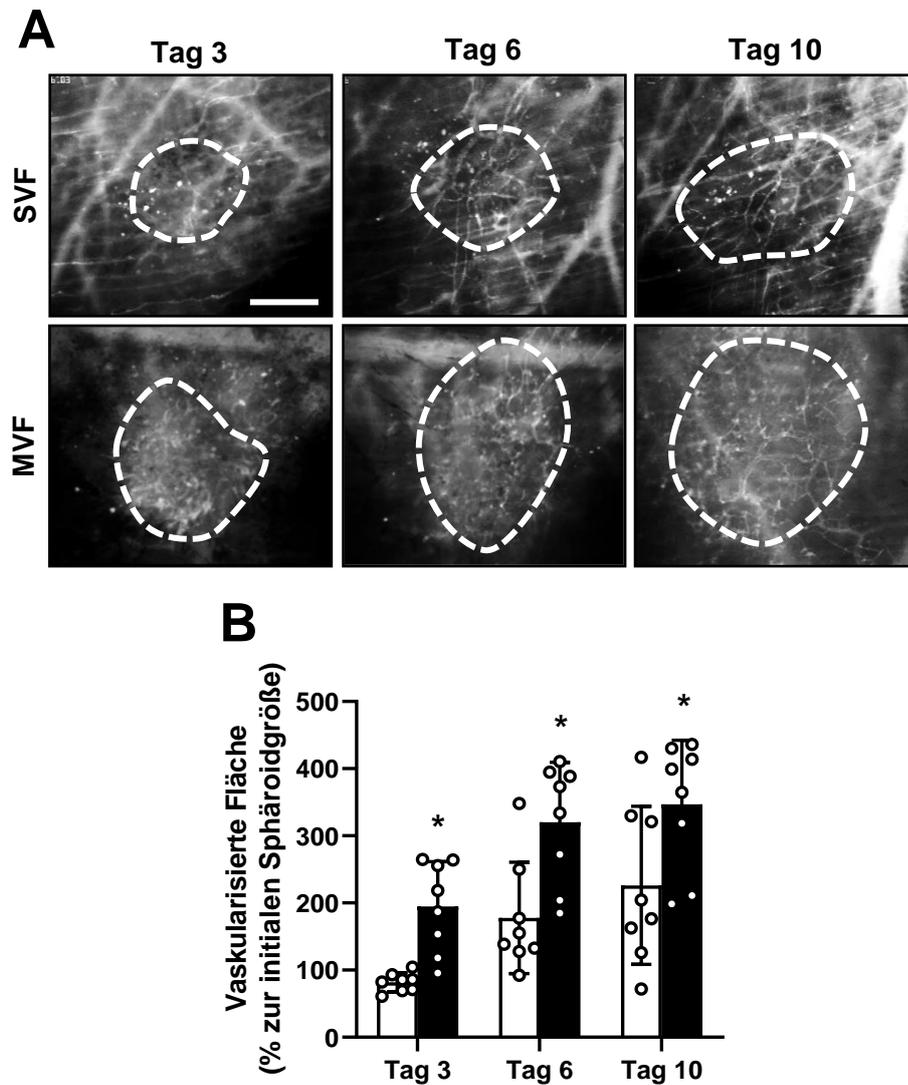


Abbildung 31: Vaskularisierte Fläche der transplantierten SVF- und MVF-Sphäroide. (A) Repräsentative, intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von SVF- (obere Reihe) und MVF-Sphäroiden (untere Reihe) an den Tagen 3, 6, und 10 nach Transplantation in 10x-Vergrößerung. Das Gefäßsystem wurde mithilfe von intravenös appliziertem FITC-Dextran kontrastiert. Die vaskularisierte Fläche wird durch gestrichelte weiße Linien hervorgehoben. Maßstab=250 μm . (B) Quantitative Analyse der vaskularisierten Fläche der transplantierten SVF- (weiße Säulen) und MVF-Sphäroide (schwarze Säulen) an den Tagen 3, 6 und 10 nach Transplantation auf den quergestreiften Rückenhautmuskel. Die Daten sind angegeben in % zur initialen Sphäroidgröße an Tag 0. Mittelwerte \pm SD (n=8). * $p < 0.05$ vs. SVF-Sphäroidgruppe.

Die funktionelle Kapillardichte wurde aus der Länge der neu gebildeten perfundierten Blutgefäße im Verhältnis zur vaskularisierten Fläche des jeweiligen Sphäroids errechnet. Diese stieg in beiden Sphäroidgruppen von Tag 0 bis Tag 6 auf einen Maximalwert von ~ 240 cm/cm^2 in der SVF-Sphäroidgruppe und ~ 280 cm/cm^2 in der MVF-Sphäroidgruppe an (Abb. 32). Von Tag 6 bis Tag 10 blieben die Werte unverändert (Abb. 32). Ein signifikanter Unterschied konnte allerdings nur an Tag 3 der Versuchsreihe detektiert werden.

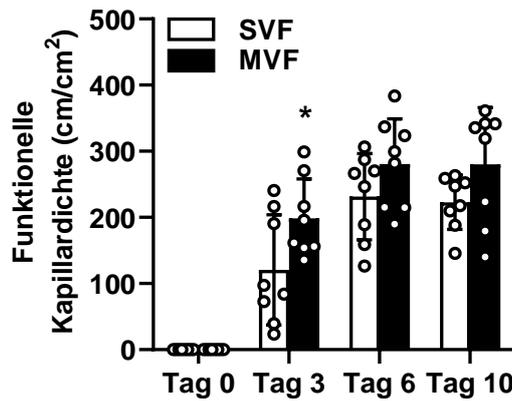


Abbildung 32: Funktionelle Kapillardichte der transplantierten SVF- und MVF-Sphäroide. Quantitative Analyse der funktionellen Kapillardichte (cm/cm^2) von transplantierten SVF- (weiße Säulen) und MVF-Sphäroiden (schwarze Säulen) an den Tagen 0, 3, 6 und 10 nach Transplantation auf den quergestreiften Rückenhautmuskel. Mittelwerte \pm SD ($n=8$). * $p<0.05$ vs. SVF-Sphäroidgruppe.

Die Anwachsrate bezeichnet den Anteil der transplantierten Sphäroide, der bis zu Tag 10 der Versuchsreihe perfundierte Blutgefäße ausbildete. Interessanterweise zeigte die Analyse, dass $\sim 100\%$ der MVF-Sphäroide an Tag 10 perfundiert waren, wohingegen es in der Gruppe der SVF-Sphäroide nur $\sim 90\%$ waren. (Abb. 33). Somit zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Anwachsrate in beiden Versuchsgruppen.

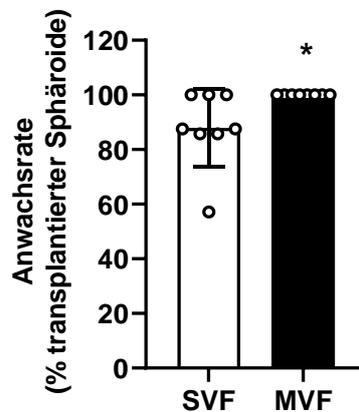


Abbildung 33: Anwachsrate der transplantierten SVF- und MVF-Sphäroide. Quantitative Bestimmung der Anwachsrate an Tag 10 nach Transplantation von SVF- (weiße Säule) und MVF-Sphäroiden (schwarze Säule) auf den quergestreiften Rückenhautmuskel. Mittelwerte \pm SD ($n=8$). Die Daten sind angegeben in % zu den transplantierten Sphäroiden an Tag 0. * $p<0.05$ vs. SVF.

Der Durchmesser der gebildeten Blutgefäße hatte an Tag 3 nach Transplantation in beiden Sphäroidgruppen das Maximum erreicht und nahm danach in beiden Versuchsgruppen kontinuierlich ab (Abb. 34A). Die Flussgeschwindigkeit sowie der Volumenfluss nahmen von Tag 3 bis Tag 6 zu und erreichten an Tag 6 in beiden Versuchsgruppen das Maximum (Abb. 34B und C). Durchmesser, Flussgeschwindigkeit und Volumenfluss der gebildeten Blutgefäße unterschieden sich zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht.

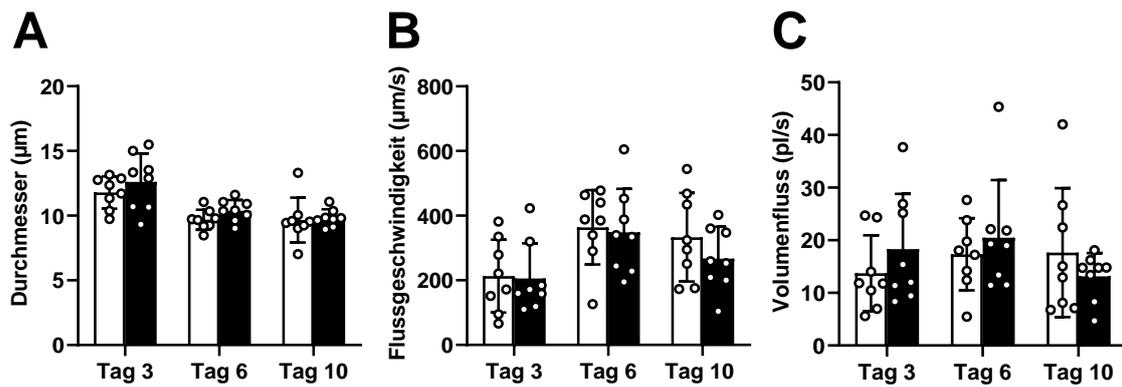


Abbildung 34: Durchmesser, Flussgeschwindigkeit und Volumenfluss der neu gebildeten Blutgefäße in SVF- und MVF-Sphäroiden an den Tagen 3, 6 und 10. (A) Quantitative Analyse der Gefäßdurchmesser (μm) der neu gebildeten Blutgefäße in den SVF- (weiße Säulen) und MVF-Sphäroiden (schwarze Säulen) an den Tagen 3, 6 und 10 nach Transplantation auf den quergestreiften Rückenhautmuskel. Mittelwert \pm SD ($n=15$). (B) Quantitative Analyse der Flussgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) innerhalb der neu gebildeten Blutgefäße in den SVF- (weiße Säulen) und MVF-Sphäroiden (schwarze Säulen) an den Tagen 3, 6 und 10 nach Transplantation auf den quergestreiften Rückenhautmuskel. Mittelwert \pm SD ($n=15$). (C) Quantitative Analyse des Volumenflusses (pl/s) innerhalb der neu gebildeten Blutgefäße in den SVF- (weiße Säulen) und MVF-Sphäroiden (schwarze Säulen) an den Tagen 3, 6 und 10 nach Transplantation auf den quergestreiften Rückenhautmuskel. Mittelwert \pm SD ($n=15$).

6.8 Immunhistochemische Analyse der transplantierten Sphäroide

Am Ende der *in vivo*-Experimente (Tag 10) wurde das Kammergewebe entnommen und die transplantierten Sphäroide immunhistochemisch analysiert (Abb. 35A und B). Wie erwartet zeigte die quantitative Analyse eine signifikant höhere Anzahl an CD31- und α -SMA-positiven Zellen innerhalb der transplantierten MVF-Sphäroide im Vergleich zu den transplantierten SVF-Sphäroiden (Abb. 35C und D). Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der *in vitro*-Analysen, in denen auch ein größerer Anteil CD31- und α -SMA-positiver Zellen innerhalb der MVF-Sphäroide im Vergleich zu den SVF-Sphäroiden nachgewiesen werden konnte. Außerdem wurde die Anzahl an MPO-positiven Neutrophilen innerhalb der Transplantate bestimmt. Allerdings zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen (Abb. 35E).

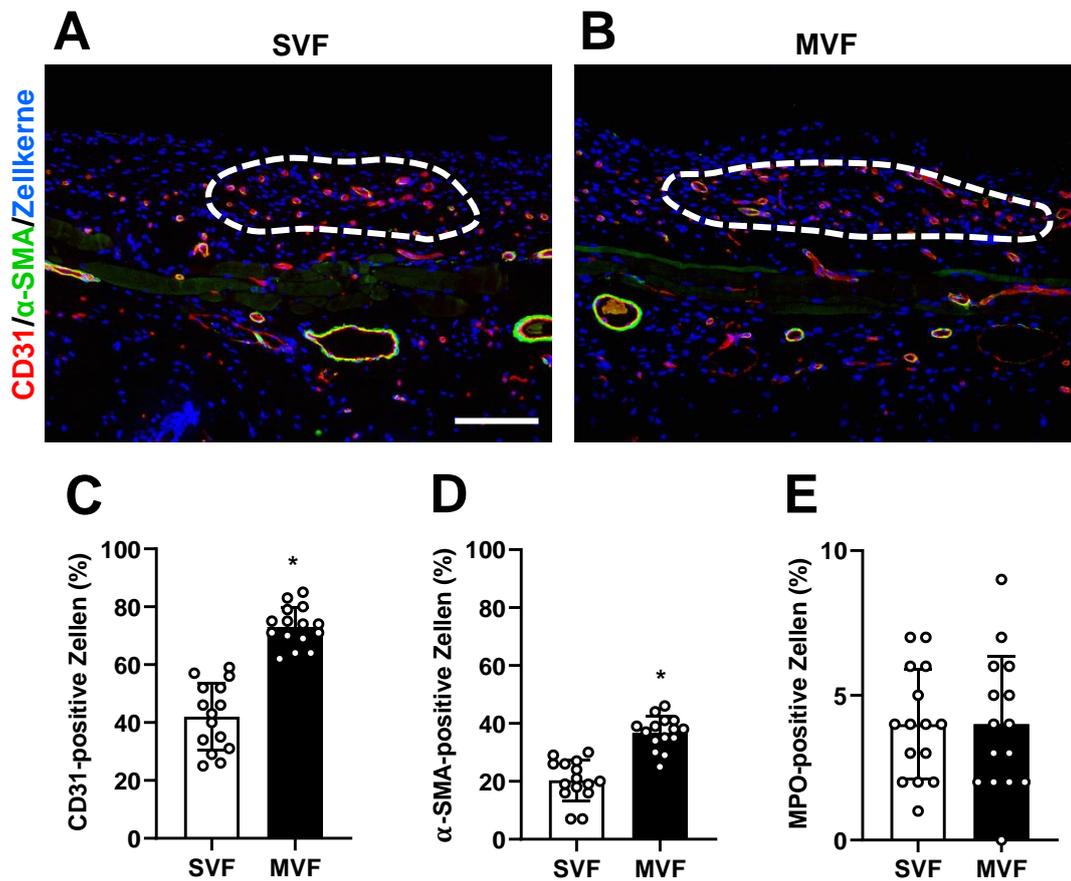


Abbildung 35: Immunhistochemische Analyse des Kammergewebes an Tag 10 nach Transplantation der SVF- und MVF-Sphäroide. (A und B) Immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen von CD31-positiven (grün) und α-SMA-positiven Zellen (rot) innerhalb der transplantierten (A) SVF- und (B) MVF-Sphäroide an Tag 10 nach Transplantation auf den quergestreiften Rückenhautmuskel (Grenzen der Transplantate durch gestrichelte weiße Linien markiert). Die Zellkerne sind mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Maßstab=50 µm. (C-E) Quantitative Analyse der (C) CD31- (D) α-SMA- (E) MPO-positiven Zellen innerhalb der transplantierten SVF- und MVF-Sphäroide an Tag 10 nach Transplantation auf den quergestreiften Rückenhautmuskel der Maus. Mittelwert ± SD (n=15). Die Daten sind angegeben in % aller Hoechst 33342-positiven Sphäroidzellen pro HPF. *p < 0,05 vs. SVF.

7 Diskussion

Eine der zentralen Herausforderungen im *Tissue Engineering* ist die Etablierung klinisch anwendbarer Strategien, welche eine adäquate Vaskularisierung und damit das langfristige Überleben implantierter Gewebekonstrukte gewährleisten (Bramfeldt et al., 2010; Laschke, Menger, 2012). In den letzten Jahren hat sich die Prävaskularisierung von Gewebekonstrukten als ein vielversprechendes Konzept erwiesen. Hierbei zeigte sich, dass besonders MVF diesen Prozess deutlich beschleunigen. Allerdings befinden sich isolierte MVF in Suspension und können ohne Trägermaterial nicht zufriedenstellend transplantiert werden.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals Sphäroide aus MVF generiert und deren Vaskularisierungspotential *in vitro* und *in vivo* analysiert. Als Kontrolle dienten Sphäroide aus Zellen der SVF. Nach fünftägiger Kultivierung mittels *Liquid-Overlay* Technik zeigten sowohl SVF- als auch MVF-Sphäroide eine kugelförmige Morphologie mit rauem, heterogenem Oberflächenmuster. Die Generierung und anschließende Kultivierung führte zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der Zellviabilität in beiden Versuchsgruppen. Nachfolgende immunhistochemische Analysen offenbarten, dass die MVF-Sphäroide über ein dichtes mikrovaskuläres Netzwerk verfügen, wohingegen in den SVF-Sphäroiden lediglich vereinzelte Endothelzellen zu finden sind. Dementsprechend zeigten *in vitro*-Untersuchungen zur angiogenen Aktivität, dass die MVF-Sphäroide den SVF-Sphäroiden deutlich überlegen sind. Abschließend wurden die SVF- und MVF-Sphäroide auf den quergestreiften Rückenhautmuskel der Maus transplantiert und deren Revaskularisierung repetitiv analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die MVF-Sphäroide nicht nur schneller an das Blutgefäßsystem des Empfängers Anschluss finden, sondern auch ein dichteres mikrovaskuläres Netzwerk ausbilden. Die in der vorliegenden Arbeit generierten MVF-Sphäroide stellen somit vielversprechende Vaskularisierungseinheiten für das *Tissue Engineering* dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde zu Beginn die Viabilität der SVF- und MVF-Suspension sowie der MVF-Einzelzellen unmittelbar nach der Isolierung aus dem Nebenhodenfettgewebe analysiert. Dabei wies die MVF-Suspension im Gegensatz zur SVF-Suspension und den MVF-Einzelzellen eine signifikant höhere Anzahl vitaler Zellen auf. Später et al. (2018) konnten ebenfalls eine höhere Anzahl vitaler Zellen innerhalb der MVF nachweisen, während SVF-Einzelzellen eine reduzierte Lebensfähigkeit zeigten. Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass die Zell-Zell-Kontakte innerhalb der MVF die Viabilität positiv beeinflussen. Denn es ist bekannt, dass transmembranöse Adhäsionsproteine neben ihrer strukturellen Funktion auch eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Signalübertragung spielen und dass Gene, welche am Zellwachstum, der Apoptose und dem Matrix- und Zytoskeletumbau beteiligt sind, durch Zell-Zell-Kontakte reguliert werden (Liebner et al., 2006). So wurde beispielsweise berichtet, dass die Interaktion von Perizyten und Endothelzellen über N-Cadherin nicht nur die

Zellproliferation und -migration fördert, sondern auch die Expression von für das Zellüberleben essentieller Gene induziert (Liebner et al., 2006; Luo, Radice, 2005; Tillet et al., 2005). Zudem zeigten Zellinteraktionsstudien an humanen Keratinozyten, dass das Junctionsprotein Plakoglobin ein grundlegender Regulator für die Lebensfähigkeit von Zellen darstellt (Wei et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant höhere Anzahl an Endothelzellen und Perizyten in MVF-Sphäroiden im Vergleich zu den SVF-Sphäroiden detektiert werden. Dementsprechend kann spekuliert werden, dass sich die Interaktion der Zellen innerhalb der MVF positiv auf deren Überleben im Sphäroid ausübt.

In der Literatur wurde bisher kontrovers diskutiert, inwiefern die Kultivierung von Zellen in einem 3D-Sphäroid gegenüber einer 2D-Kultivierung vorteilhaft ist (Antoni et al., 2015; Laschke, Menger, 2017). Die Gruppe von Noel et al. (2015) beschrieb in diesem Zusammenhang, dass Zellen in einer 3D-Kultur im Allgemeinen durch ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte eine verbesserte zelluläre Lebensfähigkeit und eine höhere proliferative Aktivität aufweisen. Zudem führt die zelluläre Interaktion aufgrund entsprechender Anordnung von Oberflächenrezeptoren zueinander, sowie durch chemische, physikalische und mechanische Wechselwirkungen mit umgebenden Strukturen zu einem optimalen zellulären Milieu (Alemany-Ribes, Semino, 2014). Im Gegensatz zu 2D-Kulturen, in denen eine weitestgehend gleichmäßige Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff stattfindet, liegt innerhalb der Sphäroide eine verminderte Glukose- und Sauerstoffverfügbarkeit von der Sphäroidperipherie bis hin zum Kern vor, was wiederum die Viabilität und mitotische Aktivität der Zellen beeinflusst (Rolver et al., 2019; Sutherland et al., 1971; Tevis et al., 2017). Sutherland et al. untersuchten diesbezüglich im Jahre 1971 die Aggregation und den Aufbau von Sphäroiden aus Lungenzellen des chinesischen Hamsters als Modell für noduläre Karzinome. Sie fanden heraus, dass Sphäroide ab einem Durchmesser von 250 μm einen 3-zonigen Aufbau entwickeln. Dabei ist die äußere Zone $\sim 75 \mu\text{m}$ dick und besteht aus hochproliferierenden Zellen. In der darunterliegenden Zwischenzone ist die Teilung der Zellen deutlich vermindert und im Sphäroidkern ist keine Teilung mehr zu beobachten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es insbesondere ab einem Sphäroiddurchmesser von 400-600 μm im Zentrum des Sphäroids aufgrund eines Sauerstoff- und Nährstoffmangels vermehrt zu Zellnekrosen kommt (Groebe, Mueller-Klieser, 1996). In diesem Zusammenhang scheint eine milde Hypoxie im Sphäroidkern durch eine ineffiziente Sauerstoffdiffusion in gewisser Weise vorteilhaft zu sein. Denn dies führt zu einer gesteigerten Expression von Hypoxie-induzierten Überlebensfaktoren wie dem *stromal cell-derived factor-1 α* (CXCL12) und dem *hypoxia-inducible factor*(HIF)-1 α und in der Folge zur verstärkten Sekretion von proangiogenen und antiapoptotischen Faktoren im Vergleich zu Monolayer-Kulturen (Bhang et al., 2011). Wie Bhang et al. (2012) in ihrer Arbeit zeigten, reagieren MSC-Sphäroide mit einer Größe zwischen 200-400 μm nach 24-stündiger hypoxischer Vorkonditionierung mit einer gesteigerten

Produktion proangiogener Faktoren wie VEGF, FGF-2 und HGF und einer gesteigerten *B-cell lymphoma-2*(Bcl-2)-Expression nach Transplantation in ischämische Hinterläufe der Maus. Die Größen der SVF- und MVF-Sphäroide in der vorliegenden Arbeit lagen innerhalb des von Bhang et al. (2012) beschriebenen Größenbereichs von 200-400 µm und die hier durchgeführten Viabilitätsuntersuchungen zeigten auch, dass der überwiegende Anteil der Zellen innerhalb der SVF- und der MVF-Sphäroide vital war. Dementsprechend kann eine Hypoxie-induzierte Schädigung der Zellen im Sphäroidzentrum weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Sphäroidmorphologie und -größe hängen entscheidend vom verwendeten Zelltyp ab (Schmidt et al., 2015; Shoal et al., 2017). So konnten beispielsweise Shoal et al. (2017) in einer Studie nachweisen, dass Sphäroide bestehend aus Endothelzellen eine aufgelockerte, rundliche Struktur mit einer rauen Oberfläche annehmen, wohingegen Sphäroide von Tumorzelllinien eine glatte Oberfläche und eine kompakte Struktur besitzen. Zudem konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass Tumorsphäroide mit steigender Anzahl inkorporierter Endothelzellen eine deutlich rauere Oberfläche aufweisen. Diese lockere Anordnung innerhalb und auf der Oberfläche der Sphäroide scheint maßgeblich zur migratorischen Fähigkeit der Endothelzellen beizutragen (Shoal et al., 2017). Diese Beobachtungen gehen einher mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen. Die fünftägige Kultivierung mittels der *Liquid-Overlay* Technik führte zur Formierung von rundlichen SVF- und MVF-Sphäroiden mit einem rauen und heterogenen Oberflächenmuster.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass MVF-Sphäroide, wenn diese über einen Zeitraum von mehr als fünf Tagen kultiviert wurden, allmählich ihre kompakte, rundliche Form verloren und die Zellen dissoziierten. Schmidt et al. (2015) beschrieben in diesem Zusammenhang, dass Zelllinien, die zu lockeren Sphäroiden aggregieren, grundsätzlich eine geringe E-Cadherin-Expression aufweisen, die bei steigender Kultivierungsdauer weiter abnimmt und damit einhergehend auch zur Reduktion der bestehenden Zell-Zell-Kontakte führt. Dies könnte erklären, warum die Sphäroide in der vorliegenden Arbeit bei der Langzeitkultivierung in ihre einzelnen Zellen dissoziiert sind. Um dies zu prüfen, müssten allerdings detaillierte immunhistochemische und/oder durchflusszytometrische Untersuchungen folgen, welche die Expression von Zelladhäsionsproteinen innerhalb der Sphäroide über einen entsprechenden Kultivierungszeitraum analysieren.

ADSC sind multipotente Stammzellen, die innerhalb des Fettgewebes zwischen den Adipozyten und an den Blutgefäßen lokalisiert sind (Berry et al., 2013; McDaniel et al., 2014). Daher kann davon ausgegangen werden, dass nicht nur in den SVF-Sphäroiden, sondern auch in den MVF-Sphäroiden ein substanzieller Anteil an ADSC vorhanden ist. Die Identifizierung von Stammzellen, einschließlich ADSC, erfolgt hauptsächlich durchflusszytometrisch über die Bestimmung verschiedener Vorläuferzellmarker (Griffin et al.,

2017; Später et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit konnte ein Anteil von ~41% CD73-positiver, ~18% CD117-positiver und ~2% CD29-positiver Zellen in beiden Gruppen identifiziert werden. Allerdings muss beachtet werden, dass die hier abgebildeten durchflusszytometrischen Analysen jeweils in Einzelfärbung durchgeführt wurden. Somit kann nicht der exakte Anteil an ADSC analysiert werden, da hierfür mindestens die drei zuvor erwähnten Vorläuferzellmarker gleichzeitig auf einer Zelle bestimmt werden müssten. Dementsprechend kann nur das Vorhandensein von ADSC mit der in dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Methode verifiziert werden. Des Weiteren wurden die in den Sphäroiden vorhandenen ADSC mittels Insulin zu Präadipozyten differenziert. Der Anteil der lichtmikroskopisch nachweisbaren Präadipozyten war in beiden Versuchsgruppen vergleichbar. So konnte auch mit dieser Methode das Vorhandensein von ADSC, welche den SVF- und MVF-Sphäroiden ein hohes regeneratives Potential verleihen und ihre angiogenen Prozesse nach der Transplantation unterstützen könnten, innerhalb der Sphäroide nachgewiesen werden. Da jedoch kein Unterschied zwischen den Gruppen vorlag, kann davon ausgegangen werden, dass die ADSC innerhalb der MVF-Sphäroide nicht für deren verbesserte angiogene Aktivität verantwortlich sind.

Zur Analyse der angiogenen Aktivität der SVF- und MVF-Sphäroide *in vitro* wurde in der vorliegenden Arbeit der *Sprouting Assay* verwendet. SVF- und MVF-Sphäroide wurden dabei in eine Kollagenmatrix eingebettet und morphologische Veränderungen der Zellen über einen Zeitraum von zwei Tagen dokumentiert. Es zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine hohe angiogene Aktivität der Sphäroidzellen, denn bereits 24 Stunden nach Versuchsbeginn sprosseten einzelne Zellen aus den Sphäroiden aus. Interessanterweise war die kumulative Sprosslänge in der MVF-Sphäroidgruppe im Vergleich zur SVF-Sphäroidgruppe deutlich größer. Dieses Ergebnis könnte zum einen durch die höhere Anzahl von Endothelzellen und mikrovaskulären Strukturen innerhalb der MVF-Sphäroide erklärt werden, zum anderen aber auch durch die mit den MVF assoziierten extrazellulären Matrix(EZM)-Bestandteilen. Die EZM ist ein dreidimensionales Netzwerk bestehend aus unterschiedlichen Makromolekülen wie Kollagen, Elastin, Fibronectin, Laminin, Proteoglykanen und verschiedenen anderen Glykoproteinen (Mongiat et al., 2016; Theocharis et al., 2015). Neben der Aufgabe als mechanisches Stützgerüst für Zellen innerhalb von Geweben oder Organen reguliert die EZM über den Kontakt mit Zelloberflächenrezeptoren auch verschiedene zelluläre Funktionen wie das Zellüberleben und -wachstum sowie die Zelldifferenzierung und -migration (Theocharis et al., 2015). Interessant ist auch, dass verschiedene EZM-Bestandteile die Angiogenese positiv beeinflussen (Mongiat et al., 2016). So konnte gezeigt werden, dass beispielsweise Kollagen Typ I sowohl die Gefäßlumenbildung unterstützt, als auch mit verschiedenen Integrinen interagiert (Mongiat et al., 2016; Perruzzi et al., 2003; Stratman et al., 2009). Letztere aktivieren den *mitogen-activated protein*(MAP)-Kinase-Weg, wodurch die Proliferation und Viabilität der

Endothelzellen erhöht werden (Perruzzi et al., 2003). Es kann daher angenommen werden, dass bei MVF-Sphäroiden das Aussprossen auch durch die EZM begünstigt wird, da die MVF zu einem Großteil noch von EZM-Bestandteilen wie Kollagen-Typ I, III und IV umgeben sind (Hoying et al., 1996).

Abschließend wurde überprüft, ob die MVF-Sphäroide auch *in vivo* eine höhere angiogene Aktivität im Vergleich zu den SVF-Sphäroiden aufweisen. Hierfür wurden diese auf den quergestreiften Rückenhautmuskel der Maus transplantiert und die Revaskularisierung an den Tagen 3, 6 und 10 intravitalmikroskopisch analysiert. Bemerkenswerterweise waren bereits nach drei Versuchstagen in beiden Versuchsgruppen in unmittelbarer Nähe zu den Sphäroiden lichtmikroskopisch kleinste Einblutungen erkennbar. Diese sind ein charakteristisches Zeichen für die beginnende Angiogenese innerhalb der Implantate (Laschke et al., 2012). Auf molekularer Ebene kommt es hierbei zur Bindung von VEGF an die dazugehörigen VEGF-Rezeptoren (VEGFR1, VEGFR2), welche zur Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren gehören. Diese Interaktion aktiviert nachfolgend eine Vielzahl von Signalwegen, die zur Steigerung der Gefäßpermeabilität sowie zum Abbau der EZM und Basalmembran führen. Schlussendlich lösen sich Endothelzellen aus ihrem Verband und organisieren sich mit Perizyten zu neuen Gefäßsprossen (Blanco, Gerhardt, 2013; Carmeliet, Jain, 2011). Dementsprechend könnten die hier beobachteten Einblutungen auf die VEGF-induzierte Gefäßpermeabilität zurückzuführen sein (Connolly, 2011).

Durch intravitalmikroskopische Analysen wurde gezeigt, dass die relative vaskularisierte Fläche in beiden Versuchsgruppen von Tag 3 bis Tag 10 stetig zunahm. In der MVF-Gruppe erreichte diese jedoch an allen Versuchstagen signifikant größere Werte als in der SVF-Sphäroidgruppe. Dies könnte durch die Zusammensetzung der MVF-Sphäroide erklärt werden, denn diese beinhalten bereits voll funktionsfähige Gefäßsegmente mit einer Länge von bis zu 180 µm. Frueh et al. (2017a) berichteten, dass sich die Mikrogefäße nach der Transplantation rasch untereinander und mit der Wirtsmikrovaskulatur verbinden und somit das Transplantat in der frühen Post-Transplantationsphase mit Blut versorgen. Im Gegensatz dazu müssen sich einzelne Endothelzellen wie im Falle der SVF-Sphäroidgruppe erst durch den Prozess der Neoangiogenese zu einem Gefäßnetzwerk formieren (Koh et al., 2011). Daher ist anzunehmen, dass durch die verzögerte Vaskularisierung in dieser Gruppe einige Zellen Hypoxie-bedingt sterben und somit die transplantierten SVF-Sphäroide im Vergleich zu den MVF-Sphäroiden nicht nur eine geringere vaskularisierte Fläche besitzen, sondern auch eine geringere Anwachsrate aufweisen.

Die intravitalmikroskopischen Analysen zeigten außerdem, dass sich in beiden Versuchsgruppen bis zum zehnten Versuchstag aus mehreren großkalibrigen Gefäßkanälen mit unregelmäßiger Perfusion ein verzweigter, hierarchisch organisierter Gefäßbaum ausbildete. Dabei wurde mit Zunahme der Beobachtungszeit in beiden Versuchsgruppen eine

regelmäßigere Gefäßform und eine Abnahme des Gefäßdurchmessers festgestellt. Diese Beobachtungen sind typisch für die Reifung sich entwickelnder mikrovaskulärer Gefäßnetzwerke und entscheidend abhängig von einem adäquaten Blutfluss und dem Vorhandensein von Perizyten (Hellström et al., 2001; Karamysheva, 2008). Denn wie Karamysheva (2008) berichtete, beginnt der Reifungsprozess von Blutgefäßen mit Einsetzen der Blutperfusion. Durch die damit einhergehende verbesserte Sauerstoffverfügbarkeit wird das Expressionsniveau von VEGF und anderen proangiogenen Signalmolekülen gesenkt und der Angiogeneseprozess gestoppt (Karamysheva, 2008). Es folgt die Rekrutierung von Mesenchymzellen, die sich zu Perizyten differenzieren. Durch Bindung von PDGF an den PDGF-Rezeptor auf Perizyten kommt es zur longitudinalen Ausbreitung dieser kontraktiven Zellen entlang wachsender Blutgefäße. Dabei wird PDGF vermutlich von Endothelzellen als Reaktion auf VEGF sezerniert. Die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten führt zu einer Stabilisierung der Gefäßwand, was in der Folge zu einer zunehmend regelmäßigen Form der Blutgefäße und zu einer Verkleinerung des Gefäßdurchmessers führt (Hellström et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit bestätigen die immunhistochemischen Analysen des Kammergewebes am Ende der *in vivo*-Experimente in beiden Versuchsgruppen das Vorhandensein eines ausgereiften Blutgefäßnetzwerkes aus CD31- und α -SMA-positiven Zellen im Bereich der Transplantate.

Jedoch bleibt die Frage offen, ob die entstehenden Blutgefäße aus dem transplantierten Sphäroid hervorgehen oder ob es sich dabei um Blutgefäße handelt, welche aus dem umgebenden Empfängergewebe eingewachsen sind. Zur Klärung dieser Frage wären zukünftig weitere Untersuchungen notwendig wie beispielsweise die Generierung von SVF- und MVF-Sphäroiden unter Verwendung von *green fluorescent protein* (GFP)-positiven Spendermäusen. Die immunhistochemische Analyse dieser Sphäroide nach Transplantation mit Nachweis von GFP- und CD31-positiver Gefäße würde dann Aufschluss über den Ursprung der Blutgefäße geben.

In den vergangenen Jahren wurde in präklinischen Studien schon mehrfach über das hohe Vaskularisierungspotential sowohl von Zellen der SVF als auch von MVF berichtet (Nakano et al., 1998; Sato et al., 1987; Später et al., 2018; Pilia et al., 2014; Zakhari et al., 2018). In den Jahren 2007/2008 wurden sogar erste klinische Anwendungen der SVF zur Behandlung von Strahlenschäden nach Strahlentherapie und zur kosmetischen Brustvergrößerung veröffentlicht (Rigotti et al., 2007; Yoshimura et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Sbarbati et al. (2007) fand heraus, dass die autologe Lipoaspirat-Transplantation den Heilungsprozess von Strahlenschäden nach Strahlentherapie verbessert. Hierzu wurden Patienten mit schweren Gewebeschäden nach Radiotherapie SVF-reiche Lipoaspirate aus gesunden Körperstellen entnommen, aufgereinigt und wiederholt computergestützt im Bereich der Gewebeläsion injiziert. Nachuntersuchungen legten dar, dass die Ultrastruktur des

Zielgewebes eine fortschreitende Regeneration aufweist, einschließlich der Gefäßneubildungen. Yoshimura et al. (2008) entwickelten eine neuartige Strategie der autologen Fetttransplantation, die als *cell-assisted lipotransfer* (CAL) bezeichnet wird. Im Rahmen eines operativen Eingriffs wird dabei ein Liposuktionsaspirat gewonnen, anschließend SVF-Einzelzellen aus der Hälfte des aspirierten Fettvolumens isoliert und zu der anderen Hälfte des aspirierten Fettvolumens zugegeben. Die gewonnene ADSC-reiche Fettsuspension wird anschließend wieder subkutan in die Brust injiziert (etwa 270 ml). Nachuntersuchungen zeigten, dass der CAL wirksam für die Augmentation von Weichgewebe ist und im Hinblick auf das Transplantatüberleben und postoperativer Atrophie der konventionellen Lipoinjektion überlegen ist. Dies ist auf den höheren Gehalt an gewebespezifischen Vorläuferzellen zurückzuführen, welche die Fähigkeit besitzen, sich je nach Umgebungsbedingungen in verschiedene Zelllinien zu differenzieren.

Im Gegensatz zur SVF wurden MVF hingegen bisher nur in präklinischen Studien eingesetzt, beispielsweise zur Verbesserung der Vaskularisierung von Hautersatzmaterialien oder zur Prävaskularisierung von Pseudoinseln (Frueh et al., 2018; Nalbach et al., 2021). Auch die in der vorliegenden Arbeit generierten Sphäroide könnten künftig als neuartige Prävaskularisierungseinheiten in präklinischen Studien Anwendung finden, beispielsweise zur Identifizierung von pro-/antiangiogenen Substanzen.

Es wäre durchaus denkbar, MVF-Sphäroide auch für klinische *Tissue Engineering*-Anwendungen einzusetzen, beispielsweise als Wundersatzmaterial zur Verbesserung der Wundheilung. Dabei bietet insbesondere der hohe Gehalt an ADSC vielerlei Vorteile. Im Gegensatz zu ausdifferenzierten Zellen überleben ADSC auch unter ischämischen Bedingungen und sezernieren unter Hypoxie erhebliche Mengen an Wachstumsfaktoren wie beispielsweise FGF-2, VEGF, *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), HGF, *transforming growth factor-β1* (TGF-β1) und *nerve growth factor* (NGF) (Lee et al., 2009; Rehman et al., 2004; Salgado et al., 2010). Dies unterstützt die rasche Initiierung des Vaskularisierungsprozesses insbesondere in der frühen Phase nach Transplantation. Des Weiteren können sich die ADSC in verschiedene Zelllinien unterschiedlicher Gewebe wie Adipozyten, Myozyten, Neuronen, Endothelzellen, Chondrozyten oder Osteoblasten differenzieren (Huang et al., 2013). So könnten die MVF-Sphäroide, beispielsweise durch die Differenzierung der ADSC innerhalb der Sphäroide zu Osteoblasten, zur Frakturheilung im Bereich des Knochen-*Tissue Engineering* Anwendung finden.

8 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass SVF- und MVF-Sphäroide aus murinem Nebenhodenfettgewebe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine hohe angiogene Aktivität aufweisen. Dabei waren die MVF-Sphäroide insbesondere in der frühen Post-Transplantationsphase den SVF-Sphäroiden überlegen, da MVF als vorgeformte Gefäßfragmente die aufwendige Neoangiogenese umgehen und sich rasch untereinander und mit dem Mikrogefäßsystem des Wirts verbinden.

Interessanterweise zeigten Karschnia et al. (2018), dass die Vorkultivierung von MVF mit dem Zytokin Erythropoetin (EPO) sowohl die Lebensfähigkeit als auch die proliferative Aktivität von mikrovaskulären Gefäßfragmenten verbessert und letztendlich sogar zu einer verbesserten Bildung von funktionellen mikrovaskulären Netzwerken aus MVF *in vivo* führt. Laschke et al. (2019) führten ähnliche Untersuchungen durch und zeigten, dass die Stimulation von MVF mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 deren Vaskularisierungskapazität verbessert. Somit bietet die Exposition von MVF-Sphäroiden mit EPO und/oder IGF-1 vor der Transplantation die vielversprechende Möglichkeit, deren Vaskularisierungseigenschaften in künftigen *Tissue Engineering*-Anwendungen noch weiter zu optimieren.

9 Literaturverzeichnis

1. **Alajati A, Laib AM, Weber H, Boos AM, Bartol A, Ikenberg K, Korff T, Zentgraf H, Obodozie C, Graeser R, Christian S, Finkenzeller G, Stark GB, Héroult M, Augustin HG** (2008) Spheroid-based engineering of a human vasculature in mice. *Nat Methods* 5:439-445
2. **Alemaný-Ribes M, Semino CE** (2014) Bioengineering 3D environments for cancer models. *Adv Drug Deliv Rev* 79-80:40-49
3. **Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G** (2015) Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci* 16:5517-5527
4. **Baker M, Wayland H** (1974) On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7:131-143
5. **Berry DC, Stenesen D, Zeve D, Graff JM** (2013) The developmental origins of adipose tissue. *Development* 140:3939-3949
6. **Bhang SH, Cho SW, La WG, Lee TJ, Yang HS, Sun AY, Baek SH, Rhie JW, Kim BS** (2011) Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* 32:2734-2747
7. **Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Kim BS** (2012) Transplantation of cord blood mesenchymal stem cells as spheroids enhances vascularization. *Tissue Eng Part A* 18:2138-2147
8. **Blanco R, Gerhardt H** (2013) VEGF and notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a006569
9. **Blum B, Benvenisty N** (2009) The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell Cycle* 8:3822-3830
10. **Bora P, Majumdar S** (2017) Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res Ther* 8:145
11. **Bramfeldt H, Sabra G, Centis V, Vermette P** (2010) Scaffold vascularization: a challenge for three-dimensional tissue engineering. *Curr Med Chem* 17:3944-3967
12. **Brennan MA, Davaine JM, Layrolle P** (2013) Pre-vascularization of bone tissue-engineered constructs. *Stem Cell Res Ther* 4:96

13. **Carmeliet P, Jain RK** (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473:298-307
14. **Chang WG, Andrejcsk JW, Kluger MS, Saltzman WM, Pober JS** (2013) Pericytes modulate endothelial sprouting. *Cardiovas Res* 100:492-500
15. **Connolly DT** (1991) Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* 47:219-223
16. **Doblado LR, Martínez-Ramos C, Pradas MM** (2021) Biomaterials for neural tissue engineering. *Front Nanotechnol* 3:643507
17. **Frueh FS, Später T, Körbel C, Scheuer C, Simson AC, Lindenblatt N, Giovanoli P, Menger MD, Laschke MW** (2018) Prevascularization of dermal substitutes with adipose tissue-derived microvascular fragments enhances early skin grafting. *Sci Rep* 8:10977
18. **Frueh FS, Später T, Lindenblatt N, Calcagni M, Giovanoli P, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW** (2017a) Adipose tissue-derived microvascular fragments improve vascularization, lymphangiogenesis, and integration of dermal skin substitutes. *J Invest Dermatol* 137:217-227
19. **Frueh FS, Später T, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW** (2017b) Isolation of murine adipose tissue-derived microvascular fragments as vascularization units for tissue engineering. *J Vis Exp* 122:55721
20. **Fuchs S, Ghanaati S, Orth C, Barbeck M, Kolbe M, Hofmann A, Eblenkamp M, Gomes M, Reis RL, Kirkpatrick CJ** (2009) Contribution of outgrowth endothelial cells from human peripheral blood on in vivo vascularization of bone tissue engineered constructs based on starch polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials* 30:526-534
21. **Fulco I, Miot S, Haug MD, Barbero A, Wixmerten A, Feliciano S, Wolf F, Jundt G, Marsano A, Farhadi J, Heberer M, Jakob M, Schaefer DJ, Martin I** (2014) Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumour resection: an observational first-in-human trial. *Lancet* 384:337-346
22. **Griffin M, Ryan CM, Pathan O, Abraham D, Denton CP, Butler PEM** (2017) Characteristics of human adipose derived stem cells in scleroderma in comparison to sex and age matched normal controls: implications for regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther* 8:23

23. **Groebe K, Mueller-Klieser W** (1996) On the relation between size of necrosis and diameter of tumor spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 34:395-401
24. **Heiss M, Hellström M, Kalén M, May T, Weber H, Hecker M, Augustin HG, Korff T** (2015) Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. *FASEB J* 29:3076-3084
25. **Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C** (2001) Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 153:543–553
26. **Hoying JB, Boswell CA, Williams SK** (1996) Angiogenic potential of microvessel fragments established in three-dimensional collagen gels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32:409-419
27. **Huang SJ, Fu RH, Shyu WC, Liu SP, Jong GP, Chiu YW, Wu HS, Tsou YA, Cheng CW, Lin SZ** (2013) Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell Transplant* 22:701–709
28. **Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumara D** (2005) Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol* 23:821-823
29. **Karamysheva AF** (2008) Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry* 73:751-762
30. **Karschnia P, Scheuer C, Heß A, Später T, Menger MD, Laschke MW** (2018) Erythropoietin promotes network formation of transplanted adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 35:268-280
31. **Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H** (1997) Cap image - a newly-developed computer-aided videoframe analysis system for dynamic capillaroscopy. *Biomed Tech* 42:168-175
32. **Koh YJ, Koh BI, Kim H, Joo HJ, Jin HK, Jeon J, Choi C, Lee DH, Chung JH, Cho CH, Park WS, Ryu JK, Suh JK, Koh GY** (2011) Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1141–1150
33. **Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK** (2004) Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature* 428:138-139
34. **Kolios G, Moodley Y** (2013) Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration* 85:3-10

35. **Korff T, Augustin HG** (1998) Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 143:1341-1352
36. **Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG** (2001) Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J* 15:447-457
37. **Langer R, Vacanti JP** (1993) Tissue engineering. *Science* 260:920-926
38. **Laschke MW, Karschnia P, Scheuer C, Heß A, Metzger W, Menger MD** (2018) Effects of cryopreservation on adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng Regen Med* 12:1020-1030
39. **Laschke MW, Kleer S, Scheuer C, Schuler S, Garcia P, Eglin D, Alini M, Menger MD** (2012) Vascularization of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 24:266-277
40. **Laschke MW, Kontaxi E, Scheuer C, Heß A, Karschnia P, Menger MD** (2019) Insulin-like growth factor 1 stimulates the angiogenic activity of adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng* 10:2041731419879837
41. **Laschke MW, Menger MD** (2012) Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation. *Eur Surg Res* 48:85-92
42. **Laschke MW, Menger MD** (2016) The dorsal skinfold chamber: a versatile tool for preclinical research in tissue engineering and regenerative medicine. *Eur Cell Mater* 32:202-215
43. **Laschke MW, Menger MD** (2017) Life is 3D: boosting spheroid function for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 35:133-144
44. **Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, Park BS, Sung JH** (2009) Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen* 17:540-547
45. **Liebner S, Cavallaro U, Dejana E** (2006) The multiple languages of endothelial cell-to-cell communication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1431-1438

46. **Liu X, Chen W, Zhang C, Thein-Han W, Hu K, Reynolds MA, Bao C, Wang P, Zhao L, Xu HHK** (2017) Co-seeding human endothelial cells with human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffold enhances osteogenesis and vascularisation in rats. *Tissue Eng Part A* 23:546-555
47. **Luo Y, Radice GL** (2005) N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 169:29-34
48. **McDaniel JS, Pilia M, Ward CL, Pollot BE, Rathbone CR** (2014) Characterization and multilineage potential of cells derived from isolated microvascular fragments. *J Surg Res* 192:214-222
49. **Mitchell AC, Briquez PS, Hubbell JA, Cochran JR** (2016) Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomater* 30:1-12
50. **Mongiat M, Andreuzzi E, Tarticchio G, Paulitti A** (2016) Extracellular matrix, a hard player in angiogenesis. *Int J Mol Sci* 17:1822
51. **Moon JJ, West JL** (2008) Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angiogenesis in biomaterials. *Curr Top Med Chem* 8:300-310
52. **Nakano M, Nakajima Y, Kudo S, Tsuchida Y, Nakamura H, Fukuda O** (1998) Effect of autotransplantation of microvessel fragments on experimental random-pattern flaps in the rat. *Eur Surg Res* 30:149-160
53. **Nalbach L, Roma LP, Schmitt BM, Becker V, Körbel C, Wrublewsky S, Pack M, Später T, Metzger W, Menger MM, Frueh FS, Götz C, Lin H, Fox JEM, MacDonald PE, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E** (2021) Improvement of islet transplantation by the fusion of islet cells with functional blood vessels. *EMBO Mol Med* 13:e12616
54. **Niemelä S, Miettinen S, Sarkanen JR, Ashammakhi N** (2008) Adipose tissue and adipocyte differentiation: molecular and cellular aspects and tissue engineering applications. *Topics in Tissue Engineering* 4:1-26
55. **Norrby K** (1997) Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 105:417-437
56. **Patel ZS, Mikos AG** (2004) Angiogenesis with biomaterial-based drug- and cell-delivery systems. *J Biomater Sci Polym Ed* 15:701-726

- 57. Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S** (2003) Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res* 65:489-497
- 58. Perruzzi CA, de Fougerolles AR, Koteliansky VE, Whelan MC, Westlin WF, Senger DR** (2003) Functional overlap and cooperativity among α_v und β_1 integrin subfamilies during skin angiogenesis. *J Investig Dermatol* 120:1100-1109
- 59. Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ** (2003) Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res* 60:49-57
- 60. Petrenko Y, Syková E, Kubinová S** (2017) The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Res Ther* 8:94
- 61. Pilia M, McDaniel JS, Guda T, Chen XK, Rhoads RP, Allen RE, Corona BT, Rathbone CR** (2014) Transplantation and perfusion of microvascular fragments in a rodent model of volumetric muscle loss injury. *Eur Cell Mater* 28:11-24
- 62. Radtke C, Schmitz B, Spies M, Kocsis JD, Vogt PM** (2009) Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. *Int J Dev Neurosci* 27:817-823
- 63. Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A** (2011) Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet* 377:1175–1182
- 64. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL** (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109:1292-1298
- 65. Ren X, Zhao M, Lash B, Martino MM, Julier Z** (2020) Growth factor engineering strategies for regenerative medicine applications. *Front Bioeng Biotechnol* 7:469
- 66. Rigotti G, Marchi A, Galiè M, Baroni G, Benati D, Krampera M, Pasini A, Sbarbati A** (2007) Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 119:1409-1422
- 67. Rolver MG, Elingaard-Larsen LO, Pedersen SF** (2019) Assessing cell viability and death in 3D spheroid cultures of cancer cells. *J Vis Exp* 16:148

- 68. Rouwkema J, Khademhosseini A** (2016) Vascularization and angiogenesis in tissue engineering: beyond creating static networks. *Trends Biotechnol* 34:733-745
- 69. Salgado AJBOG, Reis RLG, Sousa NJC, Gimble JM** (2010) Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 5:103-110
- 70. Santos MI, Unger RE, Sousa RA, Reis RL, Kirkpatrick CJ** (2009) Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone-starch scaffold and the in vitro development of vascularization. *Biomaterials* 30:4407-4415
- 71. Sato N, Sawasaki Y, Senoo A, Fuse Y, Hirano Y, Goto T** (1987) Development of capillary networks from rat microvascular fragments in vitro: the role of myofibroblastic cells. *Microvasc Res* 33:194-210
- 72. Schmidt M, Scholz CJ, Polednik C, Roller J** (2015) Spheroid-based 3-dimensional culture models: Gene expression and functionality in head and neck cancer. *Oncol Rep* 35:2431-2440
- 73. Sekine H, Shimizu T, Hobo K, Sekiya S, Yang J, Yamato M, Kurosawa H, Kobayashi E, Okano T** (2008) Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation* 118:145-52
- 74. Senesi L, De Francesco F, Farinelli L, Manzotti S, Gagliardi G, Papalia GF, Riccio M, Gigante A** (2019) Mechanical and enzymatic procedures to isolate the stromal vascular fraction from adipose tissue: preliminary results. *Front Cell Dev Biol* 7:88
- 75. Shea LD, Smiley E, Bonadio J, Mooney DJ** (1999). DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat Biotechnol* 17:551-554
- 76. Shepherd BR, Hoying JB, Williams SK** (2007) Microvascular transplantation after acute myocardial infarction. *Tissue Eng* 13:2871-2879
- 77. Shoval H, Karsch-Bluman A, Brill-Karniely Y, Stern T, Zamir G, Hubert A, Benny O** (2017). Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids. *Sci Rep* 7:10428
- 78. Singh S, Wu BM, Dunn JCY** (2011) Accelerating vascularization in polycaprolactone scaffolds by endothelial progenitor cells. *Tissue Eng Part A* 17:1819-1830

79. **Später T, Frueh FS, Nickels RM, Menger MD, Laschke MW** (2018) Prevascularization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds: stromal vascular fraction versus adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Biol Eng* 12:24
80. **Stratman AN, Saunders WB, Sacharidu A, Koh W, Fisher KE, Zawieja DC, Davis MJ, Davis GE** (2009) Endothelial cell lumen and vascular guidance tunnel formation requires MT1-MMP-dependent proteolysis in 3-dimensional collagen matrices. *Blood* 114:237-247
81. **Supp DM, Wilson-Landy K, Boyce ST** (2002) Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice. *FASEB J* 16:797-804
82. **Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR** (1971) Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 46:113-120
83. **Tevis KM, Colson YL, Grinstaff MW** (2017) Embedded spheroids as models of the cancer microenvironment. *Adv Biosyst* 1:1700083
84. **Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK** (2015) Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 97:4–27
85. **Tillet E, Vittet D, Féraud O, Moore R, Kemler R, Huber P** (2005) N-Cadherin deficiency impairs pericyte recruitment, and not endothelial differentiation or sprouting, in embryonic stem cell-derived angiogenesis. *Exp Cell Res* 310:392-400
86. **Tsuji W, Rubin JP, Marra KG** (2014) Adipose-derived stem cells: implications in tissue regeneration. *World J Stem Cells* 6:312-321
87. **Unger RE, Dohle E, Kirkpatrick CJ** (2015). Improving vascularization of engineered bone through the generation of pro-angiogenic effects in co-culture systems. *Adv Drug Deliv Rev* 94:116-25
88. **Utzinger U, Baggett B, Weiss JA, Hoying JB, Edgar LT** (2015) Large-scale time series microscopy of neovessel growth during angiogenesis. *Angiogenesis* 18:219-232
89. **Wei Q, Hariharan V, Huang H** (2011) Cell-cell contact preserves cell viability via plakoglobin. *PLoS One* 6:e27064
90. **Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J** (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407:242-248

- 91. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K** (2008) Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* 44:1258-1265
- 92. Zakhari JS, Zabanick J, Gettler B, Williams SK** (2018) Vasculogenic and angiogenic potential of adipose stromal vascular fraction cell populations in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 54:32-40
- 93. Zhang Y, Zhang J, Chang F, Xu W, Ding J** (2018) Repair of full-thickness articular cartilage defect using stem cell-encapsulated thermogel. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 88:79–87

10 Publikationen

Nalbach L, Müller D, Wrublewsky S, Metzger W, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E
(2021) Microvascular fragment spheroids: Three-dimensional vascularization units for tissue engineering and regeneration. *J Tissue Eng* 12:20417314211035593

11 Kongressbeiträge

Müller D, Nalbach L, Ampofo E, Metzger W, Menger MD, Laschke MW: Adipose tissue-derived microvascular fragment spheroids are highly potent vascularization units for tissue engineering applications. 22. Chirurgische Forschungstage, Erlangen: 06.-08.09.2018.

Müller D, Nalbach L, Ampofo E, Metzger W, Menger MD, Laschke MW: Sphäroide aus mikrovaskulären Fragmenten sind hochpotente Vaskularisierungseinheiten für das Tissue Engineering. 136. Deutscher Chirurgen Kongress, München: 26.-29.03.2019.

12 Danksagung

Ich möchte hier die Gelegenheit nutzen und mich bei allen Menschen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt und mich in dieser Zeit begleitet haben.

Mein Dank geht an:

Herrn Prof. Dr. med. Michael Menger für die Möglichkeit zur Umsetzung der Promotionsarbeit am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (Homburg/Saar).

Herrn Prof. Dr. med. Matthias Laschke für die ausführliche Beratung während der gesamten Zeit sowie die hilfreichen Ratschläge in der Vorbereitung auf Kongressbeiträge.

Herrn PD Dr. rer. nat. Emmanuel Ampofo für die gute Betreuung während des gesamten Projektes, die hilfreiche Kritik sowie die wissenschaftlichen Diskussionen.

Frau M. Sc. Lisa Nalbach für die sehr gute Einarbeitung in die Methodik der Laborarbeit, die hilfreiche Unterstützung in allen experimentellen Angelegenheiten und die Antworten auf all meine Fragen.

Frau M. Sc. Selina Wrublewsky für die Unterstützung bei den tierexperimentellen Versuchen.

Herrn PD Dr. rer. nat. Wolfgang Metzger für die Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Sphäroide.

Frau Caroline Bickelmann für die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Analysen.

Frau Christina Marx für die mühevollen Vorbereitung der Lochplatten und Zellmedien.

Frau Ruth Nickels für die Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen.

Frau Julia Schakat und allen Tierpflegerinnen und Tierpflegern für die gute Pflege meiner Versuchstiere.

13 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.