

**Aus der Abteilung für Hand-, Plastische und
Ästhetische Chirurgie
Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Riccardo E. Giunta

**Isolation und Charakterisierung von multipotenten Vorläuferzellen
aus dem Fettgewebe, sowie Proliferationsanalyse in Fibrin-Kleber**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anita Beer
geboren in Alexejewka (Kasachstan)

2020

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Elias Volkmer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralf Sodian

Prof. Dr. Thomas Mussack

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Maximilian Saller

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2020

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Anita Beer, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Isolation und Charakterisierung von multipotenten Vorläuferzellen aus dem Fettgewebe, sowie Proliferationsanalyse in Fibrin-Kleber“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 27. Juli 2020

Anita Beer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
Publikationsliste	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Mesenchymale Stammzellen und deren Verwendung in der Klinik	1
1.2 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe	3
1.3 Fibrin-Kleber als Zellträger und dessen Verwendung in der Klinik.....	6
2. Zielsetzung und Eigenanteil	8
3. Zusammenfassung.....	9
3.1. Deutsche Zusammenfassung	9
3.2 Englische Zusammenfassung	11
4. Veröffentlichung 1.....	14
5. Veröffentlichung 2.....	32
6. Literaturverzeichnis.....	41
7. Danksagung	50

Abkürzungsverzeichnis

ASPCs	Adipose-derived stem/progenitor cells
FGF	Fibroblast growth factor
BMSCs	Bone marrow-derived stem cells
CFU	Colony-forming-unit
GMP	Good Manufacturing Process
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor
HGF	Hepatocyte growth factor
HPLC	High performance liquid chromatography
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Messenger ribonucleic acid
OCT-4	Octamer-binding transcription factor 4
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PLA	Processed lipoaspirate
SDF1	Stromal cell-derived factor
SOX2	Sex determining region Y-box 2
SVF	Stromal vascular fraction
TGF- β	Transforming growth factor beta
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WST	Water-soluble-tetrazolium

Publikationsliste

1. Erstautorenschaft: Originalarbeit

Fibrin glue displays promising in vitro characteristics as a potential carrier of adipose progenitor cells for tissue regeneration.

In Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 13 (3): 359-368, 2019.

PMID: 30515986 DOI: 10.1002/term.2778

Christian Krug*, Anita Beer*, Bastian Hartmann, Carina Prein, Hauke Clause-Schaumann, Thomas Holzbach, Attila Aszodi, Riccardo Enzo Giunta, Maximilian Michael Saller*, Elias Volkmer*

* geteilte Erst-/Letztautorenschaft

2. Co-Autorenschaft: Originalarbeit

Isolation und Charakterisierung von multipotenten Vorläuferzellen aus murinem Fettgewebe mithilfe eines klinisch zugelassenen Aufbereitungssystems.

In Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie, 48 (2): 87–94, 2016.

PMID: 27096206 DOI: 10.1055/s-0042-104655

Christian Krug, Anita Beer, Maximilian Michael Saller, Thomas Holzbach, Attila Aszodi, Riccardo Enzo Giunta, Elias Volkmer

1. Einleitung

1.1 Mesenchymale Stammzellen und deren Verwendung in der Klinik

Seit der Entdeckung von multipotenten Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Bone marrow-derived stem cells; BMSCs) stehen diese im Fokus vieler Forschungsarbeiten [1]. Aufgrund ihres großen Potentials sich in verschiedenste Zelllinien auszudifferenzieren, sind sie aus dem Bereich der Stammzellforschung und der regenerativen Medizin nicht mehr wegzudenken. Da aber die Entnahme von Knochenmark ein invasives Verfahren darstellt, das unter anderem mit starken perioperativen Schmerzen verbunden sein kann, bleibt die klinische Anwendung umstritten [2]. Adulte mesenchymale Stammzellen können fast in jedem Gewebe mesenchymalen Ursprungs gefunden werden, wo sie nicht nur eine zentrale Rolle in der Regeneration und Reparatur von beschädigtem Gewebe im menschlichen Körper spielen, sondern auch zum Ersatz alter, nicht mehr funktionsfähiger Zellen dienen [3]. Dominici et al. definierten 2006 die Kriterien für multipotente mesenchymale Stromazellen als Plastikadhärenz, Expression von spezifischen Oberflächenmarkern und multipotente Differenzierungsfähigkeit in mesenchymale Zelllinien [4]. 2013 definierte die 'International Federation of Adipose Therapeutics and Science (IFATS)' und die 'International Society for Cellular Therapy (ISCT)' Stammzellen anhand zweier wesentlicher Eigenschaften: die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die Differenzierung in verschiedene Zelllinien [5]. Vorläuferzellen aus dem Fettgewebe (Adipose-derived stem/progenitor cells; ASPCs), die Zuk et al. 2001 erstmalig beschrieben haben, weisen die erforderlichen Stammzeleigenschaften auf [6], [7]. Außerdem hat das Fettgewebe als eine gut durchblutete Bindegewebsart viele entscheidende Vorteile gegenüber anderen Bindegeweben. Es ist in ausreichendem Maße vorhanden und kann, da es leicht zugänglich ist, durch minimalinvasive Eingriffe gewonnen werden, wie zum Beispiel durch eine Liposuktion. Dabei wird das Fettgewebe nicht wie bisher nur als ein zu entsorgendes Abfallprodukt angesehen, sondern als eine reich vorhandene Ressource an mesenchymalen Stammzellen [8]. Des Weiteren besitzen die isolierten Stammzellen ein hohes Differenzierungspotential und können durch eine autologe oder allogene Transplantation auf einfache Weise wieder in den Patienten überführt werden [9]. Hervorzuheben ist außerdem, dass der Stammzellertrag aus Fettgewebe ca. 500-fach höher ist als aus Knochenmark (ca. 0.001 bis 0.01% plastikadhärente Zellen) [10], [11]. Prozentual gesehen befinden sich im Fettgewebe ca. 2% mesenchymale Stammzellen, wohingegen es im Knochenmark nur eine Frequenz von 1:25.000 bis 1:100.000 ist [12]. Während frisch isolierte Zellen aus dem

Knochenmark eine CFU-Effizienz (Colony-Forming-Unit) von nur 1:50.000-1:100.000 haben, findet man im Fettgewebe eine Effizienz von 1:100 [13]. Somit genügen multipotente Stammzellen aus dem Fettgewebe durchaus den Anforderungen von Gimble et al. [8], da sie in ausreichendem Maße vorhanden sind, eine multipotente Differenzierungsfähigkeit aufweisen, durch minimal invasive Methoden gewonnen und autolog oder allogent transplantiert werden können. Sie haben somit ein beträchtliches Potential auf dem Gebiet der zellbasierten Gewebeerneuerung [14], [15].

Es gibt zahlreiche Labor- und Tierversuche, die ASCs für Geweberegeneration unter anderem bei Knochendefekten, Knorpelschäden, ischämischer Herzkrankheit, Hautdefekten und Rückenmarksverletzungen verwenden [16], [17], [18], [19], [20]. Mit gutem Erfolg werden sie auch bei peripheren Nervenläsionen eingesetzt [21], [22], [23]. Zudem finden die Stammzellen in vielen Studien bereits Anwendung am Patienten. Die Forschungsarbeiten umfassen Behandlungstherapien auf den Gebieten autoimmunologischer, muskuloskelettaler, kardiovaskulärer, urologischer oder gastroenterologischer Erkrankungen [24], [25]. So sind bereits im Labor expandierte aus humanem Fettgewebe gewonnene ASCs das Thema vieler Pilotstudien, beispielsweise für die Behandlung von Komplikationen des Morbus Crohn [26] oder für eine bessere funktionelle Genesung nach einem schweren Schlaganfall [27]. In der Neurologie scheinen die ASCs zukunftsweisend zu sein und werden bereits bei Rückenmarksverletzungen, Parkinson, Amyotropher Lateralsklerose oder multipler Sklerose in Studien erprobt [28], [29].

Auf dem Gebiet der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie werden die Stammzellen in der Verbrennungsforschung, bei chronischen Wunden [30], Brustrekonstruktionen [31] und Weichteilrekonstruktionen jeglicher Art verwendet [32].

Bei chronischen, diabetischen oder ischämischen Ulcera verbessert die Anwendung der stromalen vaskulären Fraktion (stromal vascular fraction; SVF), welche durch enzymatischen Verdau von Fettgewebe gewonnen wird, die Heilung und somit die Lebensqualität der Patienten [33], [34]. Eine intravenöse Injektion der SVF wird bei Patienten mit fortgeschrittener obstruktiver Lungenerkrankung erprobt [35]. In der Kardiologie dient die SVF bei intrakardialer Injektion bei Patienten mit chronischen Kardiomyopathien der Regeneration des Myokards [36]. Auch bei orthopädischen Erkrankungen, wie zum Beispiel bei intraartikulären Verletzungen, Sehnenrissen oder Osteoarthritis, kommt die SVF mit vielversprechenden Ergebnissen zum Einsatz [37], [9].

Ihr großes Potential Gewebe zu ersetzen, haben mesenchymale Stammzellen unter anderem ihrer Fähigkeit sich in verschiedene Zelllinien differenzieren zu können zu verdanken. Es wurden bereits Differenzierungen in adipogene, osteogene, chondrogene, myogene, hepatogene und sogar neurogene Zelllinien durchgeführt [38]. Darüber hinaus besitzen die Stammzellen die Fähigkeit zahlreiche Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel “granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)”, “transforming growth factor beta (TGF- β)”, “vascular endothelial growth factor (VEGF)”, “hepatocyte growth factor (HGF)” oder “fibroblast growth factor (FGF2)”, zu sezernieren [24], [39], [40]. Diese sind unter anderem für Wundheilung sowie für Neovaskularisation von entscheidender Bedeutung [41], [42]. Außerdem besitzen ASCs immunregulatorische Funktionen, da sie zahlreiche anti-inflammatorische Faktoren sezernieren und gleichzeitig einen Abfall pro-inflammatorischer Zytokine bewirken [43], [44], [45].

Da die Sauerstoffkonzentration im menschlichen Fettgewebe und somit in der Stammzellnische physiologisch 3,8% bis 9,6% beträgt [46], wirkt sich das Kultivieren von ASCs unter niedriger Sauerstoffkonzentration positiv auf die Expansion, Differenzierung, CFU-Effizienz und die metabolische Aktivität aus [47]. Dies konnten wir in unserer ersten Publikation nachweisen [48]. Außerdem begünstigt Hypoxie die Wachstumsfaktor-Sekretion und damit das regenerative Potenzial der Zellen [49], [50]. Dazu untersuchten Studien die Fähigkeit von ASCs Zytokine, die in der Angiogenese involviert sind, zu sezernieren und unter hypoxischem Stress zu proliferieren [51]. Sowohl VEGF als auch HIF-1 α (hypoxia inducible factor 1 α) wurden unter Hypoxie hochreguliert und das Wachstum der Zellen *in vitro* und *in vivo* beschleunigt. Außerdem erhöhte Hypoxie die Bereitschaft der Zellen zu dem Chemokin SDF1 (stromal cell-derived factor), welches in ischämischem Gewebe exprimiert wird, zu wandern [52].

1.2 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe

Als einer der Ersten isolierte Rodbell 1964 Zellen aus epididymalem Fettgewebe von Ratten. Die Methode beinhaltete das Zerkleinern und Waschen des Fettgewebes, die Verdauung mit Hilfe des Enzyms Kollagenase bei 37°C und die anschließende Zentrifugation zur Trennung einzelner Bestandteile des Gewebes. An der Oberfläche sammelten sich die reifen Adipozyten und am Boden die stromale vaskuläre Fraktion (stromal vascular fraction; SVF) an, die unter anderem Blutzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Perizyten enthält [53]. Diese war

zunächst von geringerer Bedeutung, bis die Arbeitsgruppe Zuk et al. 2001 eine besondere Zellpopulation in der SVF vorfand, die sie 'Processed lipoaspirate' (PLA) Zellen nannte. Da die SVF eine heterogene Zellmasse darstellt, wurde durch das Kultivieren der SVF und das Adhärenz bestimmter Zellgruppen eine Selektion vorgenommen und tote oder unerwünschte Zellen, wie z.B. Erythrozyten eliminiert (Abbildung 1). Durch verschiedene Methoden wie Histologie, Immunhistochemie und dem Nachweis von speziellen Transkriptionsfaktoren (z.B. Oct4, Nanog, SOX2) in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die für die Selbsterneuerung von Stammzellen essentiell sind, bewiesen viele Arbeitsgruppen, dass die PLA-Zellen multipotente Stammzellen darstellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren [7], [54] [55].

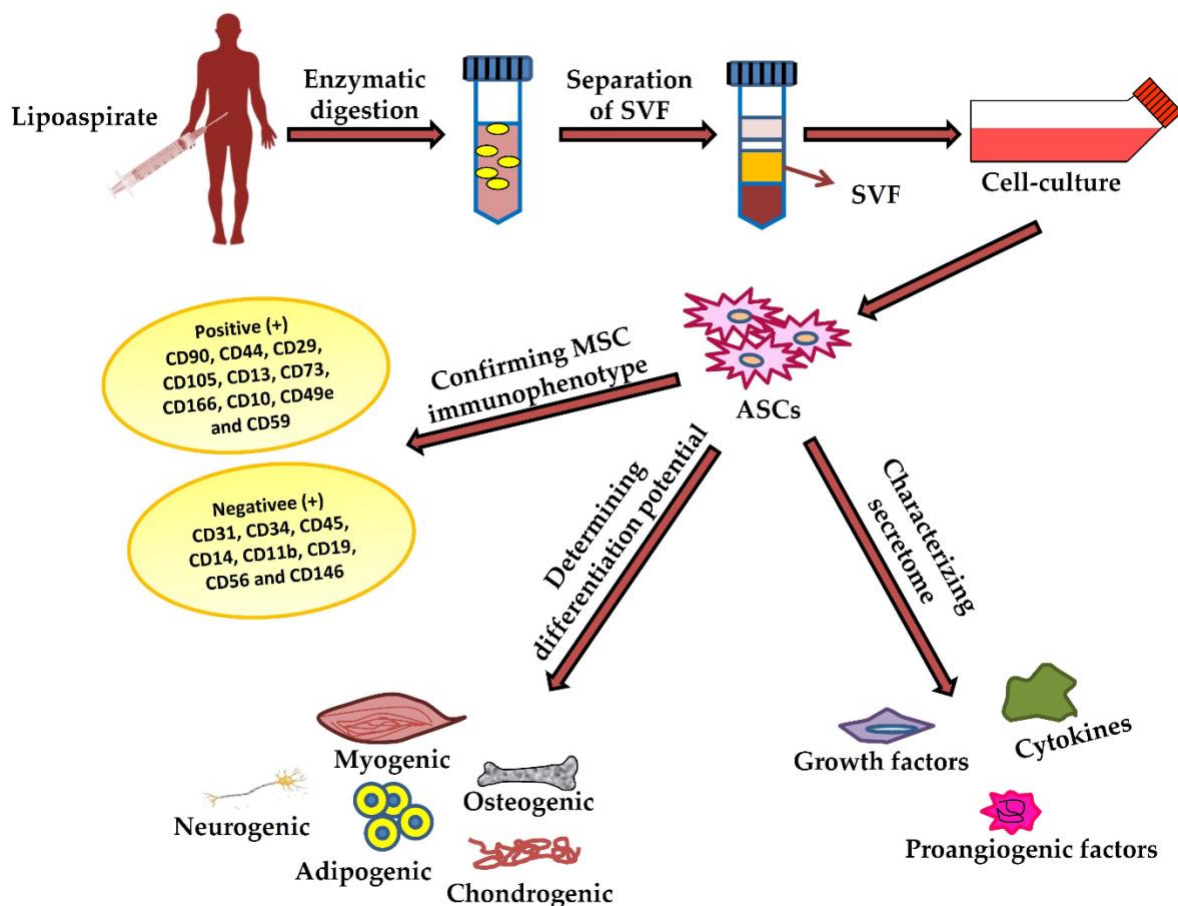


Abbildung 1: Graphische Zusammenfassung [56]. Abkürzungen: SVF-stromal vascular fraction, ASC- adipose stem cell, MSC- mesenchymal stem cell, CD- Cluster of Differentiation.

Der Isolierungsvorgang wurde weiterhin durch mehrere Arbeitsgruppen modifiziert. Dabei verwendeten sie kleinere Mengen an humanem Fettgewebe, die bei Liposuktionen anfielen. Die Liposuktion ist einer der häufigsten kosmetischen Eingriffe weltweit und ist unter

Lokalanästhesie durchführbar [57]. Dies ist für die Patientinnen und Patienten mit wesentlich weniger Schmerzen verbunden als bei einer Knochenmarksentnahme, die für einige Patienten eine schmerzvolle Prozedur darstellt [2]. Außerdem ist das Fettgewebe nach einer Liposuktion bereits durch die Infiltration der Tumeszenzlösung aufgelockert, sodass die feinere Struktur des Gewebes einen schnelleren enzymatischen Verdau ermöglicht [58].

Die gängigste Methode für die Isolation der SVF ist nach wie vor der enzymatische Verdau von Fettgewebe. Hierfür gibt es eine Standardprozedur, die nach derselben Reihenfolge, die Rodbell beschrieben hat, abläuft. Dennoch finden sich in den unterschiedlichen Isolierungsvorgängen Unterschiede in der Anzahl an Waschvorgängen, Enzymkonzentrationen, Zentrifugierungseinstellungen und der anschließenden Erythrozytenlyse oder Filtration. Es werden darüber hinaus Methoden beschrieben, die ohne Enzyme und nur mit mechanischen Kräften wie Scherkraft, Zentrifugalkraft oder Druck arbeiten [59]. Hierzu zeigen Markarian et al. 2014 einen Vergleich zwischen verschiedenen Isolierungsmöglichkeiten. Sie konnten beweisen, dass die älteste Methode, die mit der Verdauung des Fettgewebes durch Kollagenase arbeitet, den bei weitem größten Zellertrag liefert [60]. Hierbei spielt das Alter der Patienten für den Zellertrag und das Überleben der Zellen keine Rolle. Zellen, die durch alleinige Zentrifugation gewonnen wurden, zeigten nach 14 Tagen in Kultur keine Proliferation und wurden aus der Studie ausgeschlossen. Die einzig ebenbürtige Methode stellte die Verdauung mit Trypsin dar. In Bezug auf Proliferation und Differenzierungsfähigkeit der isolierten Zellen ließen sich kaum Unterschiede zwischen den Enzymen erkennen, jedoch führte die Verdauung mit Kollagenase zu einem 5-fach höheren Zellertrag.

Um die Arbeit im nächsten Schritt zu erleichtern, Zeit zu sparen und die Gefahr von Kontamination zu verringern, wurden zahlreiche Zellaufbereitungssysteme entwickelt, die eine gewisse Standardisierung gewährleisten sollen. Das Besondere dabei ist, dass die Entnahme, die Isolierung und schließlich die Injektion während eines einzelnen Eingriffs theoretisch möglich sind.

Eines dieser Zellaufbereitungssysteme ist das Transpose® RT System der Firma InGeneron (Houston, USA). In unserer Studie verwendeten wir das Modell ARC™-Tissue Processing Unit, bei welchem es sich um dasselbe Gerät handelt, jedoch unter diesem Namen in der Veterinärmedizin verwendet wird (Abbildung 2). Das Transpose® RT System sowie das ARC™-Tissue Processing Unit System sind automatisierte und vorprogrammierte

Aufbereitungssysteme zum Vermischen, Erwärmen (37°C), Zentrifugieren und Verdauen von Fettgewebe. Bis zu vier Proben können gleichzeitig verarbeitet werden. Die dazugehörige Matrasetm ist eine hochreine enzymatische Mischung, die nach den GMP-Richtlinien für Arzneimittel (Good Manufacturing Practice, „Gute Herstellungspraxis“) hergestellt und mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) getestet wird. Das Matrasetm-Reagenz ist frei von tierischen Produkten [61].

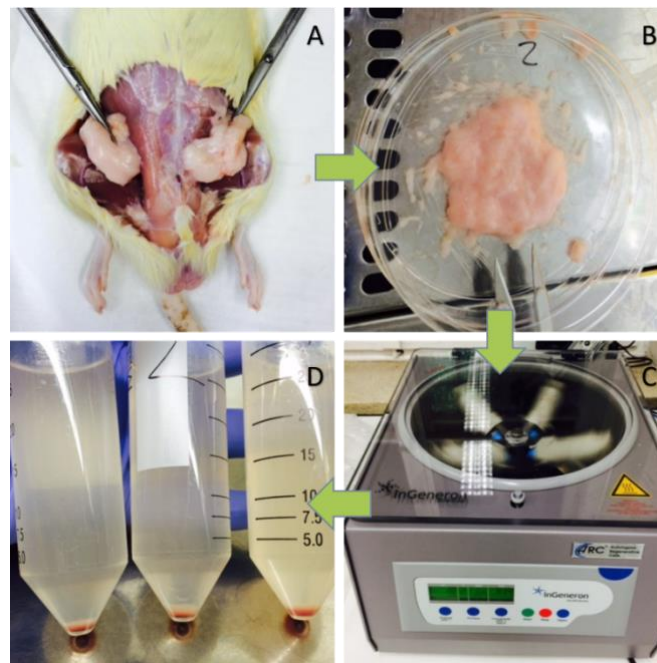


Abbildung 2: Ablauf der Zellgewinnung aus dem Fettgewebe der Ratte. A: Entnahme des Fettgewebes, B: Zerkleinerung des Fettgewebes, C: Zugabe des Enzyms und Aufbereitung in der Zentrifuge, D: Entnahme der SVF oder Kultivierung.

1.3 Fibrin-Kleber als Zellträger und dessen Verwendung in der Klinik

Therapiekonzepte in der regenerativen Medizin haben das Ziel, bestimmte Gewebe oder Organe zu reparieren, auszutauschen oder die Regeneration durch das Einbringen von Vorläuferzellen, die zur Bildung von neuem Gewebe fähig sind, zu beschleunigen. Da die direkte Injektion von Vorläuferzellen an die Stelle der Verletzung zu einer schlechten, dauerhaften Einwachsrate führt und eine beträchtliche Anzahl verloren geht, werden Gerüste aus verschiedenen Materialien als Zellträger verwendet. Der ideale Zellträger sollte biokompatibel sein, ähnliche mechanische Eigenschaften wie das natürliche Gewebe haben und bei Implantation keine Entzündungsreaktion hervorrufen. Außerdem sollte er eine Zellanhaftung, Zellproliferation und Zelldifferenzierung ermöglichen [62].

Man unterscheidet zwei verschiedene Arten von Biomaterialien, die als Zellträger verwendet werden. Zum einen natürliche Biomaterialien, die im Allgemeinen Proteine und Polysaccharide umfassen (Kollagen, Fibrin, Alginat, Hyaluronsäure, usw.), und zum anderen synthetische Biomaterialien, die aus metallischen, keramischen oder polymeren Materialien wie Polyglycolsäure und Polymilchsäure bestehen [63]. Natürliche Biomaterialien haben einige Vorteile gegenüber den synthetischen: Sie imitieren die Struktur und Zusammensetzung der nativen extrazellulären Matrix und binden Wachstumsfaktoren und andere Proteine, um während der Geweberegeneration die Migration und das Wachstum der umgebenden Zellen zu lenken bzw. zu unterstützen. Des Weiteren sind sie meist biokompatibel, biologisch abbaubar und nicht toxisch oder immunogen [64].

So bietet auch Fibrin, ein biologisch abbaubares Polymer, zahlreiche Vorteile gegenüber synthetischen Materialien in der Funktion als „Tissue Engineering“- Gerüst und Zellträger. Es wird physiologischerweise während des normalen Wundheilungsprozesses absorbiert und zeigt eine minimale Entzündungs- und Fremdkörperreaktion. Eine gleichmäßige Zellverteilung, gute klebende und mechanische Eigenschaften sowie biologische Abbaubarkeit sind nur einige der Qualitätsmerkmale des Fibrins [65]. Es kann zudem die Adhäsion, Migration, Proliferation und gewünschte Differenzierung von Vorläuferzellen begünstigen [66], [67].

Als Nachteile des Fibrins sind die geringe mechanische Festigkeit und der schnelle Abbau zu erwähnen. Deswegen haben Arbeitsgruppen versucht, durch Veränderungen der Fibrinpolymerisation auf molekularer Ebene, wie z.B. Änderungen in der pH-, Salz- und Thrombinkonzentration, eine höhere Festigkeit zu erreichen. Auch eine Anheftung von Polyethylenglykol (PEG) wird mehrfach in der Literatur verwendet [68], [69]. Da es jedoch bei Implantation zu einer starken inflammatorischen Immunantwort kommen kann [70], sollte das für die Patientensicherheit vermieden werden.

Fibrin-Kleber werden bei chirurgischen Eingriffen bereits seit 1909 eingesetzt [71], insbesondere bei solchen, welche ein hohes Risiko einer postoperativen Blutung aufweisen, zum Beispiel in der Visceralchirurgie bei Läsionen an parenchymatösen Organen oder Blutungen aus Ulcera im Magen oder Duodenum. Auch in der Neurochirurgie und in der Thoraxchirurgie wird Fibrin-Kleber verwendet [72]. In der Plastischen Chirurgie wird er unter anderem bei Verbrennungen benutzt, wie in der Studie von Kim J. im Jahr 2018, in welcher die

Verwendung von Fibrin-Kleber zu einem besseren Anwachsen von Spalthauttransplantaten führte [73].

In zahlreichen Tierstudien wird Fibrin-Kleber als Trägersubstanz von Zellen benutzt, um den Heilungsprozess zu fördern, so zum Beispiel für die Regeneration eines infarzierten, ischämischen Herzmuskelareals [74], bei Knorpeldefekten [75] oder bei chronischen Wunden als Folge eines Diabetes mellitus [76]. Sehr vielversprechend sind die Ergebnisse im Bereich der peripheren Nervenregeneration [21], [22].

2. Zielsetzung und Eigenanteil

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Evaluation des Aufbereitungssystems ARCTM-Tissue Processing Unit, um zu testen, inwiefern diese Zellisolierungsmethode Anwendung im klinischen Alltag finden kann. Da die SVF in zahlreichen Anwendungsgebieten in der Plastischen Chirurgie, sei es bei der Eigenfetttransplantation, bei chronischen Wunden oder bei Verbrennungen, durch die mehrfach bewiesene Wirksamkeit einen enormen Bedeutungszuwachs bekommen hat, wird die schnelle Gewinnung dieser Zellfraktion in Zukunft von Bedeutung sein. Die Arbeitsschritte der Zellisolierung wurden dem Protokoll des Herstellers entnommen. Durch Kultivierung der daraus gewonnenen SVF wurden die multipotenten Stammzellen (ASPCs) auf ihre Eigenschaften untersucht. Dabei war es auch von Bedeutung, wie viele plastikadhärente ASPCs tatsächlich aus der SVF gewonnen werden können.

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Biokompatibilität des Fibrin-Klebers ARTISS (Baxter, USA) und das Verhalten von ASPCs darin, um herauszufinden, ob die Kombination eines zellbesiedelten Gels eine mögliche Anwendung in einer klinischen Situation darstellt, wie z.B. bei der Unterstützung von peripheren Nervenläsionen. Da die alleinige Injektion von Zellen oft zu unsicher ist und es zu einer fraglichen Einwachsrate ins Gewebe und Zellverlust kommen kann, ist ein geeignetes Trägermaterial von großem Nutzen. Dieses sollte die Zellen nach der Transplantation an dem gewünschten Ort halten, damit sie ihre protektive Wirkung entfalten können. Die Ergebnisse der zweiten Publikation sollen zum Verständnis von zellbesiedelten Proteingelen und somit zur Entwicklung verbesserter Trägersubstanzen für das „Tissue – Engineering“ beitragen.

Beschreibung des Eigenanteils Publikation 1: Ausführliche Literaturrecherche, Mitgestaltung des Versuchsaufbaus, Fettentnahme an Ratten und Isolierung der SVF mit dem

Aufbereitungssystem, Durchführung aller Experimente zur Charakterisierung der Fettvorläuferzellen, Gestaltung der Abbildungen, Verfassen des Material-und Methoden-Teils, Korrekturlesen des Manuskripts.

Beschreibung des Eigenanteils Publikation 2: Ausführliche Literaturrecherche, Mitgestaltung des Versuchsaufbaus, Durchführung aller *in vitro* Experimente mit Fibrin-Kleber und Fettvorläuferzellen, gemeinsame Analyse und Interpretation der Versuchsergebnisse mit den Co-Autoren der Studie, Erstverfassung des Manuskripts, Durchführung aller Experimente im Rahmen der Revision, Erstverfassung der Revision.

3. Zusammenfassung

3.1. Deutsche Zusammenfassung

Durch enzymatische Verdauung von aspiriertem Fettgewebe kann die heterogene stromale vaskuläre Fraktion (stromal vascular fraction; SVF), die Fettvorläuferzellen (adipose-derived stem/progenitor cells; ASPCs) enthält, isoliert und in den Patienten zurückgeführt werden. Das Ziel beider Studien war es, eine Population von Zellen einschließlich multipotenter Vorläuferzellen aus Fettgewebe zu isolieren, um eine zellbesiedelte, biokompatible Matrix herzustellen, an der die Zellen adhären und ein stabiles Überleben aufweisen können. Diese biokompatible Matrix sollte für die Implantation in einen Patienten geeignet und deren Herstellung in der Nähe der Patientenversorgung durchführbar sein. Außerdem sollte die Herstellung der zellbesiedelten Matrix in einer möglichst geringen Zeit durchführbar sein, um ihr Zellüberleben und ihre sofortige Transplantation in demselben Verfahren zu gewährleisten.

Wir haben ein zertifiziertes Zellisolationssystem mit dem Namen ARCTM-Tissue Processing Unit evaluiert, um die Wirksamkeit und Zuverlässigkeit dieses halbautomatisierten Systems für die SVF-Isolierung aus Fettgewebe zu testen. In unserer Studie konnten wir mit dem halbautomatisierten Verfahren aus der frisch isolierten SVF ca. 60.000 plastikadhärente Zellen pro ml Fettgewebe gewinnen. Diese Zellen wurden sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen kultiviert und auf ihr Stammzellpotential getestet. Sie zeigten eine multipotentielle Differenzierung zur adipogenen und osteogenen Linie sowie eine hohe Koloniebildungseffizienz (CFU). Die Durchflusszytometrie bestätigte ein Oberflächenprofil der ASPCs, das für die mesenchymalen Stammzellen der Ratte angenommen wird und dem

Expressionsprofil von humanen ASCs ähnelt. Kultivierung unter Hypoxie wirkte sich positiv auf die Proliferation und den Zellmetabolismus aus.

Als biokompatible Matrix verwendeten wir den ARTISS Fibrin-Kleber der Firma Baxter. ASCs zeigten in unseren 2D-Untersuchungen Adhärenz auf dem Fibrin-Kleber, eine gleichmäßige Verteilung und eine ähnliche Morphologie auf dem Kleber wie auf Plastik. Die 3D-Experimente zeigten nach 7 Tagen in Kultur ebenso eine gleichmäßige Verteilung und eine spindelförmige Morphologie der Zellen. In einem Langzeitversuch zeigten die Zellen ein beständiges Überleben und einen stabilen Metabolismus über 2 Wochen hinweg. Auch in dem Versuch des TUNEL-Assay konnten keine apoptotischen Zellen innerhalb dieser 2 Wochen gefunden werden, was das Langzeitüberleben der Zellen bestätigte. In der Timelapse-Analyse konnten wir beobachten, dass die Zellen sich frei im Fibrin bewegen können und ihn auf zunächst unbekannte Weise verdauen bzw. abbauen. In einer quantitativen PCR-Analyse haben wir gezeigt, dass die Matrix-Metalloproteinasen 3,9 und 13 (MMPs) auf mRNA-Ebene von den Zellen hochreguliert werden, die eine Rolle im Abbau des Fibrins spielen könnten. Im Gesamtergebnis erwies sich der ARTISS Fibrin-Kleber als eine zellkompatible, leicht formbare und applizierbare Trägersubstanz für Zellen. Zudem ist der Fibrinkleber aufgrund des häufigen Einsatzes für das OP-Personal ein bekanntes Produkt.

Neben zahlreichen tierexperimentellen Studien, wird die SVF bereits in unterschiedlichen Fachbereichen am Menschen angewendet, wie zum Beispiel in der Diabetologie, Kardiologie, Pulmologie oder Orthopädie. Dabei wird die SVF direkt an die zu behandelnde Stelle, intravenös, intrakardial oder intraartikulär injiziert. In vielen Pilotstudien werden bereits auch im Labor expandierte aus humanem Fettgewebe gewonnene ASCs angewendet, so beispielsweise für die Behandlung von Komplikationen des Morbus Crohn.

Auch wenn die Anwendung der SVF zu vielversprechenden Ergebnissen führt, gibt es letztlich noch keine vollständige Charakterisierung der heterogenen Zellmasse. Wenn die SVF injiziert wird, erfolgt eine Transplantation der gesamten Mikroumgebung der Stammzellen und nicht nur die der Stammzellen selbst. Bevor das Verfahren also in die klinische Praxis eingeführt werden kann, muss der Wirkmechanismus verstanden werden. Es gilt, die Fragen zu beantworten, wie sich die transplantierten Stammzellen *in vivo* vor allem auf lange Sicht hin verhalten, ob sie ihren undifferenzierten Zustand beibehalten oder sich in andere Zelltypen differenzieren. Ebenso sollte untersucht werden, welche sezernierten Faktoren die beste therapeutische Wirkung haben. Eine weitere wichtige Frage bezüglich der klinischen

Anwendung von Stammzellen ist ihre Sicherheit im Rahmen der Tumorgenese. Bisher wurden keine bösartigen Transformationen oder negative Auswirkungen von injizierten Fettvorläuferzellen in humanen Studien berichtet.

In Deutschland zählen zelltherapeutische Präparate bzw. klinische Prüfpräparate zu den Arzneimitteln. Dementsprechend wird deren Verwendung im Arzneimittelgesetz (AMG) geregelt. Diese Richtlinien geben vor, welche Anforderungen für Produkte von Herstellern in der pharmazeutischen Industrie zu erfüllen sind, damit für die Patientinnen und Patienten die größtmögliche Sicherheit gewährleistet ist. Da die SVF aus lebensfähigen Zellen besteht, die die Eigenschaft besitzen menschliches Gewebe wiederherzustellen, handelt es sich laut Gesetzgeber um ein biotechnologisch bearbeitetes Gewebeprodukt. Somit fällt es unter die rechtlich verbindliche EU-Verordnung für neuartige Therapien („Advanced Therapy Medicinal Products“; ATMP) und benötigt zur Anwendung am Menschen eine Erlaubnis nach §§20b bzw. 20c des AMG.

Während die Anforderungen der gesetzlichen Regularien und Zulassungsanforderungen somit für die klinische Verwendung von ASCs derzeit schwer erfüllbar sind, ist die Isolierung der SVF aus Lipoaspiraten hingegen umsetzbar. Dabei erfolgt keine *ex vivo* Kultivierung im Labor. In unserer Studie bestätigen wir, dass die Isolierung der SVF mit der ARC™ Tissue Processing Unit in weniger als 60 Minuten möglich ist. Die isolierte SVF enthielt die gewünschten ASCs, was durch Durchflusszytometrie und das Differenzierungspotential nachgewiesen wurde. Die Isolationsschritte können von einer geschulten Person unter sterilen Bedingungen in einem geeigneten Reinraum durchgeführt werden.

Wir befürworten zusammenfassend die Verwendung von Fibrin-Kleber als Gerüst bei zellbasierten therapeutischen Anwendungen. Fibrin-Kleber ist klinisch zugelassen, biokompatibel und hält eine hohe Lebensfähigkeit von Zellen aufrecht. Nach Isolierung der SVF aus dem Lipoaspirat des Patienten stellt die Kombination eine vielversprechende Anwendung in unterschiedlichen Bereichen der regenerativen Medizin dar.

3.2 Englische Zusammenfassung

The heterogeneous stromal vascular fraction (SVF) which contains adipose-derived stem/progenitor cells (ASCs) can easily be isolated through enzymatic digestion of aspirated adipose tissue and reinjected into the patient.

In conclusion, the purpose of both studies was to isolate a population of cells that included multipotent progenitor cells in order to generate a cell-seeded biocompatible matrix, which the cells could adhere to and enable a stable survival. This biocompatible matrix should be suitable for implantation into human subjects and preparation should be possible close to the site of patient care, e.g. the operating room. Furthermore, the fabrication of the cell-seeded biocompatible matrix should take as little time as possible to guarantee cell survival. The graft should possibly be transplanted in the same operative intervention.

Therefore, we evaluated a certified cell isolation system called ARC™ Tissue Processing Unit with the aim of testing the efficiency and reliability of this semi-automated system for SVF isolation from adipose tissue.

The SVF cells, freshly isolated using a semi-automated procedure, contained 60.000 adhered cells per ml fat tissue. Those cells were cultured under normoxic and hypoxic culture conditions and tested on their stem cell potential. They showed multipotential differentiation towards the adipogenic and osteogenic lineage and a high colony-forming-unit (CFU) efficiency. A flow cytometric analysis confirmed a SVF cell composition profile, which is assumed for rat mesenchymal stem cells and is also similar to the human expression profile. Cultivation under hypoxia had a positive effect on proliferation and cell metabolism.

As a biocompatible matrix, we used the ARTISS fibrin glue from Baxter (USA). In our 2D studies, the cells showed adherence, uniform distribution, and similar morphological behavior on the fibrin glue as on plastic. The 3D experiments also showed a uniform distribution and a spindle-like morphology of the cells after 7 days in culture. In a long-term experiment, the cells showed a constant survival and stable metabolism for 2 weeks. Also, in the TUNEL assay, no apoptotic cells could be detected within these 2 weeks, which confirms the long-term survival of the cells. In a time lapse analysis, we observed that the cells can move easily in the fibrin matrix and degrade it. In a quantitative PCR analysis, we were able to show that the matrix-metalloproteinases 3, 9 and 13 (MMPs) were highly upregulated at the mRNA level by the cells, which might play a role in degradation of the fibrin.

Overall, the ARTISS fibrin glue proved to be a cell-compatible, easy-to-apply carrier substance for cells. As the ARTISS fibrin glue is widely used throughout all surgical specialties, the handling and the thawing of the two-compound fibrin glue is established.

In addition to numerous animal studies, there is a great number of clinical trials in humans using mesenchymal stem cells, e.g. in diabetology, cardiology, pulmonology or orthopedics.

The SVF is applied directly into the operative site or injected intrapulmonary, intracardial or intraarticular. In pilot studies, culture-expanded human ASCs are already used with magnificent outcomes, for example in patients with complications of Crohn's disease.

Nevertheless, there is no full characterization of the heterogeneous SVF. When the SVF is injected, the whole microenvironment of the stem cells is transplanted as well. There is a great need to understand how things work before introducing it into common clinical practices. There are questions arising, whether the grafted stem cells differentiate into other cell types or maintain their undifferentiated state. Further it needs to be answered, which factors are secreted by the stem cells and how they mediate a therapeutic effect, especially on a long-term basis. Another important question regarding clinical use of stem cells is their safety in the context of tumorigenesis. No malignant transformation or adverse events of injected SVF or ASCs has been observed in human trials so far.

In Germany, cell-based therapies are categorized as pharmaceutical drugs and are regulated by the pharmaceutical law (Arzneimittelgesetz, AMG). The SVF consists of living cells and is able to repair human tissue. Because of this, the cells are subcategorized as a biotechnologically produced product. Therefore the use of SVF in the European Union is regulated in the Law "Advanced Therapy Medicinal Products" (ATMP), and permission is required (§§20b and 20c) for application in human probands.

While the requirements and formalities for using ASCs in humans are hardly realizable, the isolation of SVF from lipoaspirates is. There is no need of *ex vivo* cultivation.

In our study, we confirm that the isolation of the SVF from fat tissue is possible in fewer than 60 minutes with the ARC™ Tissue Processing Unit. The isolated SVF contains the desired ASCs, which was proven by flow cytometry and the differentiation potential.

In summary, we support the use of fibrin glue as a scaffold in cell-based therapeutic applications in the clinical field because it is clinically approved, biocompatible, and maintains high cell viability. We recommend the use of fibrin gel scaffolds that can be prepared with the isolated SVF from the patient's lipoaspirate in one surgical intervention.

4. Veröffentlichung 1

Isolation und Charakterisierung von multipotenten Vorläuferzellen aus murinem Fettgewebe mithilfe eines klinisch zugelassenen Aufbereitungssystems

Isolation and characterization of multipotent precursor cells from murine adipose tissue using a clinically approved cell separation system

Christian Krug¹, Anita Beer^{1,2}, Maximilian Michael Saller², Thomas Holzbach¹, Attila Aszodi², Riccardo Enzo Giunta¹, Elias Volkmer¹

¹Klinik für Handchirurgie, Plastische Chirurgie und Ästhetische Chirurgie, Ludwig-Maximilians-Universität, München

²Labor für Experimentale Chirurgie und Regenerative Medizin (ExperiMed), Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Korrespondierender Autor: Priv.-Doz. Dr. med. Elias Volkmer
Klinik für Handchirurgie, Plastische Chirurgie und Ästhetische Chirurgie
Ludwig-Maximilians-Universität
Pettenkoferstr. 8a
80336 München
Email: Elias.Volkmer@med.uni-muenchen.de
Tel.: +49(0)89 4400-52697

Schlüsselwörter: Fettgewebs-Vorläuferzellen, ASPC, Mesenchymale Stammzellen, MSC, Regenerative Medizin

Key Words: adipose-derived progenitor cell, ASPC, mesenchymal stem cell, MSC, regenerative medicine

Introduction

Recent studies underscored the clinical potential of adipose-derived multipotent stem-/precursor cells (ASPCs). One of the main hurdles en route to clinical application was to isolate cells without having to perform expansion cultures outside the OR. A new generation of clinically approved, commercially available cell separation systems claims to provide ASPCs ready for application without further expansion cultures. However, it is unclear if the new systems yield sufficient cells of adequate quality for the use in autologous murine models. The aim of this study was to isolate and characterize adipose-derived precursor cells taken from the inguinal fat pad of Wistar rats using InGeneron's clinically approved ARCTM-cell separation system.

Materials and Methods

We isolated cells from the inguinal fat pad of three male Wistar rats according to the manufacturer's protocol. In order to reduce the influence of the atmospheric oxygen on the multipotent precursor cells, one half of the cell suspension was cultivated under hypoxia (2% O₂) simulating physiological conditions for ASPCs. As a control, the other half of the cells were cultivated under normoxia (21% O₂). Cell surface markers CD90, CD29, CD45 and CD11b/c were analyzed by FACS, and osteogenic and adipogenic differentiation of the ASPCs was performed. Finally, cellular growth characteristics were assessed by evaluation of the cumulative population doublings and CFU assay and metabolic activity was evaluated by WST-1 assay.

Results

Processing time was 90 ($\pm$ 12) min. 1g of adipose tissue yielded approximately 60000 plastic adhering cells. Both groups showed a high expression of mesenchymal stem cell markers CD 90 and CD 29 while they were negative for the leucocyte markers CD 45 and CD 11b/c. A strong osteogenic differentiation and a sufficient adipogenic differentiation potential was proven for all ASPCs. Under hypoxia, ASPCs showed increased proliferation characteristics and CFU efficiency as well as a significantly increased metabolic activity.

Conclusion

This study showed that sufficient multipotent ASPCs of appropriate quality can be isolated from the inguinal fat pad of Wistar rats using the ARC™-cell separation system. As shown in previous studies, cultivation of cells under hypoxic conditions increased their stemness. Our findings will enable future studies that focus on autologous transplantation of ASPCs in a rat model, which most closely resembles a possible clinical application.

Abstract

Einleitung

Das Potenzial von multipotenten Stamm-/Vorläuferzellen aus Fettgewebe (ASPCs) für die regenerative Medizin ist gut belegt. Problematisch für den klinischen Einsatz von ASPCs ist jedoch die Zellisolation, welche oft Expansionsschritte außerhalb des OPs beinhaltet. Eine neue Generation von klinisch zugelassenen, kommerziell erhältlichen Aufbereitungssystemen kommt ohne Expansionsschritte aus, wobei nicht geklärt ist, ob insbesondere für das autologe Kleintiermodell ausreichend Zellmaterial von suffizienter Qualität gewonnen werden kann. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, mit dem klinisch zugelassenen ARCTM-Aufbereitungssystem von InGeneron, adipogene Vorläuferzellen aus dem Leistenfettpolster der Ratte zu isolieren und zu charakterisieren.

Material und Methoden

Die Zellisolation erfolgte nach Herstellerangabe aus dem inguinalen Fettpolster von drei männlichen Wistar-Ratten. Der Einfluss der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration auf die Zellen wurde minimiert, indem die Zellsuspension direkt nach Isolation zur Hälfte unter Hypoxie (2 % O₂) kultiviert wurde. Die andere Hälfte wurde als Kontrolle unter klassischer Normoxie (21 % O₂) mitgeführt. Neben der Ermittlung des molekularen Oberflächenprofils (CD90, CD29, CD45 und CD11b/c) mittels FACS wurden die osteogene und adipogene Differenzierbarkeit der ASPCs geprüft. Weiterhin wurde das kumulative Wachstum, das klonogene Potenzial (CFU assay) sowie die metabolische Aktivität (WST-1 assay) der ASPCs bestimmt.

Ergebnisse

Die Dauer der Aufbereitung betrug 90 ($\pm$ 12) min. Pro 1 g Fett konnten ca. 60000 adhärenente Zellen isoliert werden. In beiden Gruppen zeigte sich eine hohe Expression der mesenchymalen Marker CD90 und CD 29 und ein Fehlen der Leukozytenmarker CD 45 und CD 11b/c. Für alle ASPCs konnte ein starkes osteogenes und ausreichendes adipogenes Differenzierungspotenzial nachgewiesen werden. Hypoxisch kultivierte ASPCs zeigten eine gesteigerte Proliferation, eine erhöhte CFU-Effizienz sowie eine signifikant gesteigerte metabolischen Aktivität.

Schlussfolgerung

Die Gewinnung von multipotenten ASPCs aus dem Leistenfettpolster von Wistar-Ratten mithilfe des ARC™ Aufbereitungssystems von InGeneron ist in ausreichender Quantität und Qualität möglich. Die hypoxische Kultivierung erhöht das Stammzellcharakter der Zellen. Unsere Studie hat somit nachfolgenden Studien den Weg geebnet, die eine Klinik-analoge, autologe Transplantation von ASPCs im Rattenmodell anstreben.

Einleitung

Mehr als vier Jahrzehnte lang wurde das Potenzial aus Knochenmark gewonnener Stamm- und Stromazellen (sog. bone-marrow-derived stem cells – BMSCs) intensiv erforscht [1]. Trotz vielversprechender *in-vitro*- und tierexperimenteller Ergebnisse bleibt deren Einsatz jedoch aufgrund des schmerzhaften, komplikationsträchtigen Gewinnungsprozesses in der Klinik umstritten [2]. Um für die Anwendung im klinischen Alltag geeignet zu sein, sollten die Zellen einfach zu gewinnen, in ausreichendem Maße vorhanden, einfach zu handhaben sein und sich komplikationslos in das Empfängergewebe integrieren können. Verschiedenste alternative Quellen für Vorläuferzellen wurden in den letzten zwei Dekaden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in fast jedem menschlichen Gewebetyp Vorläuferzellen (sog. human mesenchymal stem cells – hMSCs) nachweisbar sind, die die Fähigkeit besitzen, *in vitro* in verschiedene Gewebearten wie beispielsweise Knochen, Knorpel oder Fett differenzierbar zu sein [3, 4]. Während früher die Bezeichnung *Fettstammzelle* (sog. adipose-derived stem cells) für alle Zellen, die die Voraussetzungen des Konsensus-Publikation von Domenici et al. erfüllten, gewählt wurde, ist man heute mit dem Begriff *Stammzelle* zurückhaltender und nennt derartige Zellen Stamm-/Progenitor-Zellen bzw. *adipose-derived stem/progenitor cells* (ASPCs) [5].

Als leicht zugängliche, reichhaltige und ethisch unbedenkliche Quelle von ASPCs rückte das Fettgewebe immer weiter in den Fokus aktueller Forschung. Aus der stromal-vaskulären Zellfraktion (SVF) gelang Zuk et al. 2001 die Isolierung und der Nachweis des Differenzierungspotenzials der ASPCs [6]. Weitere Studien bestätigten, dass die ASPCs die Kriterien für multipotente mesenchymale Stamm-/Progenitor-Zellen erfüllen [5-9]. Gleiches ließ sich für das Fettgewebe von Ratten nachweisen [10]. ASPCs sind in ihrer Funktion immunologisch privilegiert und besitzen einen immunsuppressiven Effekt [9,11]. Im Vergleich zu BMSCs scheinen sie in Langzeitkulturen genetisch stabiler [12] sowie in der klinischen Anwendung gleich effektiv zu sein [13].

Eine große Reihe tierexperimenteller und klinischer Studien unterstreicht das Potenzial der ASPCs für die regenerative Medizin. So wiesen Zhu et al. eine erhöhte Einwachsrate bei der Fettgewebstransplantation durch Zusatz von angereicherten ASPCs im Rahmen des in der Klinik bereits etablierten Lipofillings nach [14]. Desweiteren werden ASPCs zur Förderung der Regeneration von Lebergewebe, von Myokard nach Myokardinfarkt sowie zur Behandlung von Knochen- und Knorpeldefekten eingesetzt [9, 15, 16]. Ein ebenfalls vielversprechender Ansatz ist die Verbesserung peripherer Nervenregeneration durch die Einbettung der Nervenläsion in mit ASPCs besiedelten Fibrinhülsen [17, 18].

Ein Grund für den zögerlichen klinischen Einsatz von ASPCs war der Prozess der Zellgewinnung: Bei den ursprünglich etablierten Isolierungsprotokollen wurde das Gewebe außerhalb des OPs aufbereitet. Es wurde zerkleinert, die Zellen mittels Enzymen wie Kollagenase herausgelöst und die Zellmischung abschließend zentrifugiert, um die SVF zu erhalten. Im Anschluss wurden die Zellen expandiert und schließlich mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) in die verschiedenen Zell-Populationen aufgetrennt [19-22]. Obgleich dies eine akkurate Form der Gewinnung von großen

Mengen von multipotenten Vorläuferzellen darstellt, ist dieses Verfahren für den klinischen Einsatz nicht zulässig, da die autologe Gewebeprobe unter normalen Bedingungen nicht den OP verlassen darf. Über eine alternative Vorgehensweise berichten Wu et al. [23]: Eine humane Fettzellsuspension wird mittels einer Polyurethanmembran gefiltert. Im Filtrat konnte eine bis zu 4,5-fach höhere Konzentration von Zellen nachgewiesen werden als in der Ausgangslösung. Rapoiso et al. und Romanov et al. beschreiben die mechanische Extraktion der ASCs durch Vibration [24] beziehungsweise durch alleinige Zentrifugierung [25] der Fettzellsuspension. Eine weitere Alternative zum „klassischen Weg“ der Isolierung bieten neue, kommerziell erhältliche Aufbereitungssysteme, die für den Gebrauch im OP zugelassen sind. Vier derartige Systeme zur Gewinnung der SVF (ChaStation, Lipokit with MaxStem, Multi Station, Celution 800/CRS) wurden 2013 evaluiert [26]. Hier wurde allerdings der Fokus auf die Praktikabilität und die Wirtschaftlichkeit gelegt, eine ausreichende Charakterisierung der Zellen fand nicht statt.

Um das große Potenzial der therapeutisch einsetzbaren Vorläuferzellen besser ausschöpfen zu können, müssen die zur Verfügung stehenden, klinisch zugelassenen Systeme zur Gewinnung solcher Zellen kritisch überprüft werden. Insbesondere sind neben ausführlichen *in-vitro*-Untersuchungen vor allem auch tierexperimentelle Studien angezeigt, da nur hier der Effekt auf den Gesamtorganismus sowie auf die komplexen Heilungsvorgänge von Säugetieren analysiert werden können. Somit müssen die Zellisolierungssysteme vor allem auch an klassischen Labortieren wie Ratte und Maus getestet werden, um sicherzugehen, dass ausreichend und suffizient charakterisierte Zellen für tierexperimentelle Studien zur Verfügung stehen.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, mithilfe des klinisch zugelassenen, tragbaren ARC™-Aufbereitungssystems von InGeneron adipogene Vorläuferzellen aus dem Leistenfettpolster der Ratte zu isolieren und biologisch zu charakterisieren. Neben der Überprüfung des Stammzellcharakters wurde dabei ein besonderes Augenmerk auf die Frage gelegt, ob aus dem Leistenfettpolster eines Tiers genug Zellen gewonnen werden können, um damit später autologe ASC-Transplantationen im Tiermodell durchführen zu können, da dieses Setting der späteren klinischen Anwendung am nächsten kommt.

Material & Methoden

Zellisolation

Für die Versuche wurde drei männlichen Wistar-Ratten direkt nach Euthanasie das inguinale Fettpolster entnommen. Anschließend wurde das Gewebe mit PBS (phosphate-buffered saline, Millipore) gewaschen und mit dem Skalpell zerkleinert. Es folgte nach Herstellerprotokoll die Zugabe des Enzymmixes (Matrase, InGeneron, USA). Die genaue Enzym-Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht preisgegeben. Nun schloss sich das Zentrifugieren der Fettzellen im InGeneron-Aufbereitungssystem (ARC™-System – Abb. 1) an. Dieses System ist unter dem Namen Transpose RT™ bereits für die Behandlung von Menschen zugelassen, da die Zellen innerhalb des Operationssaals gewonnen und direkt wieder reimplantiert werden können. Das gewonnene Zellpellet wurde in Standardnährmedium, bestehend aus 89 % DMEM high glucose, 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Life Technology, USA), gelöst und in T-225 Zellkulturflaschen (Thermo Scientific, USA) kultiviert. Um den Einfluss der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration auf die multipotenten Vorläuferzellen auszuschließen, wurde die Zellsuspension direkt nach Isolation zu einer Hälfte unter Hypoxie (2 % O₂) kultiviert, was am ehesten den physiologischen Bedingungen bezüglich der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration von ASCs entspricht [27, 3]. Die andere Hälfte wurde als Kontrolle unter klassischer Normoxie (21 % O₂), ebenfalls bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % mittels 0,5 % Trypsin (Merck, Deutschland) passagiert.



Abbildung 1: ARC™-System von InGeneron, USA (Maße L x B x H = 47 x 38 x 28 cm).

Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Zur Bestimmung des molekularen Oberflächenprofils wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS trypsiniert und anschließend einzeln mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD90, CD29, CD45 und CD11b/c (BioLegend, USA) in einer 1:200 Verdünnung für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Färbungen mit korrespondierenden Isotyp-Antikörpern dienten als Kontrolle. Nach

zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, B&D Bioscience, USA) gemessen und die erfassten Daten anschließend mit FlowJo (Tree Star Inc., USA) verarbeitet.

Osteogene Differenzierung

Zur osteogenen Differenzierung wurden 3.000 Zellen/cm² in 6-Well-Platten (Thermo Scientific, USA) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 100 % in Standardnährmedium kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen für die Dauer von 21 Tagen in einem Induktionsmedium, bestehend aus Standardmedium und 100 nM Dexamethason, 10 mM β -Glycerolphosphat und 50 μ M L-Ascorbinsäurephosphat (jeweils Sigma-Aldrich, USA), differenziert. Zellen der Kontrollgruppe wurden durchgehend mit Standardmedium kultiviert.

Alizarin Rot Färbung

Im Anschluss an die osteogene Differenzierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und darauffolgend mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, Merck, Deutschland) für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen zweimal mit destilliertem Wasser (dH₂O) gewaschen, mit 40 mM Alizarin-Rot-Lösung (in dH₂O, pH4.1) für 20 Minuten bei RT gefärbt, dreimal mit dH₂O gewaschen und abschließend mikroskopiert. Die Quantifizierung der osteogenen Differenzierung wurde mittels Osteogenesis Quantitation Kit (Merck, Deutschland) nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

Adipogene Differenzierung

Zur adipogenen Differenzierung wurden die Zellen in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² in 6-Well-Platten ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Die zweiwöchige Differenzierungsphase bestand aus einer 5-tägigen Induktionsphase (Standardmedium mit 1 μ M Dexamethason, 0,2 mM Indomethacin, 0,01 mg/ml Insulin und 1 mM 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin – alles von Sigma-Aldrich) gefolgt von einer 2-tägigen Erhaltungsphase (Standardmedium mit 4 mM L-Glutamin und 0,01 mg/ml Insulin). Zellen der Kontrollgruppe wurden durchgehend mit Standardmedium kultiviert.

Oil-Red-O Färbung

Nach 14 Tagen wurden die Zellen der adipogenen Differenzierung einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten bei RT fixiert. Gebildete Lipidvakuolen wurden mit 0,2 % Oil-Red-O Isopropanollösung (Sigma-Aldrich, USA) für 20 Minuten bei RT gefärbt, dreimal mit dH₂O gewaschen und mikroskopiert. Die objektive, computergestützte Quantifizierung der Vakuolen wurde mit dem Open-Source-Programm ImageJ [28] durchgeführt. Hierfür wurde der grüne Farbkanal (Komplementärfarbe zum Oil-Red-O) aus den farbigen Mikroskopaufnahmen extrahiert und die Fläche

der Vakuolen über einen zuvor manuell eingestellten Schwellenwert berechnet. Pro Spender und Differenzierung wurden 30 Bilder verwendet und der Mittelwert gebildet.

Kumulative Populationsverdopplung

Um das kumulative Wachstumsverhalten (cumPD) der gewonnenen Zellen zu bestimmen, wurden 2.000 Zellen/cm² in T-25 Kulturfラスchen ausgesät und alle 3 Tage gezählt. Diese Prozedur wurde bis zur Seneszenz aller Spender wiederholt. Zur Berechnung der Populationsverdopplungszeit wurde in jeder Passage die folgende Formel benutzt: $(\log(N_1/N_2))/\log_2$, wobei N_1 der Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt der Zellzählung, und N_2 der Anzahl der Zellen beim Aussäen entsprach. Die cumPD ergibt sich aus der Summe der einzelnen Populationsverdopplungen.

Colony forming units (CFU) Assay

Zur Bestimmung des klonogenen Potenzials wurde ein CFU assay nach einem Protokoll von Alberton et. al. [29] durchgeführt. Hierfür wurden 10 Zellen/cm² in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 10 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden die Kolonien gewaschen und mit 0,5 % Kristallviolett in Methanol fixiert und gefärbt. Nach dreimaligem Waschen wurden die Kolonien über 64 Zellen gezählt und die Effizienz des Assays nach folgender Formel bestimmt: CFU-Effizienz [%] = (Anzahl der Kolonien/Anzahl der ausgesäten Zellen) x 100.

Metabolische Aktivität

Um einen möglichen Unterschied der metabolischen Aktivität zwischen normoxisch und hypoxisch kultivierten Zellen ermitteln zu können, wurde ein WST-1 (water soluble tetrazolium) Assay nach einem Protokoll von Saller et al. [30] durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 2.500 Zellen/cm² in 24-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden in Standardmedium kultiviert. Das WST-Reagenz wurde anschließend in einem Verhältnis von 1:10 in normalem Nährmedium verdünnt und die Zellen für 4 Stunden inkubiert. Abschließend wurde die Absorption bei 450 nm mit einem ELISA-Reader (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA) gemessen. Normoxische Messwerte dienten als Referenzpunkt zur Berechnung der relativen metabolischen Aktivität.

Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde nach Bestimmung der Gauß-Verteilung entweder mit einem t-Test oder mit einem Mann-Whitney-U-Test berechnet (GraphPad Prism, USA). Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ angenommen.

Ergebnisse

Jedem Tier wurde ca. 2g Fettgewebe entnommen. Die Dauer des Aufbereitungsprozesses im ARC™-System betrug 90 ± 12 Minuten. Pro 1g Fett konnten ca. 60000 adhärenente Zellen gewonnen werden.

Primäre ASPCs exprimieren mesenchymale Stammzellmarker

Während für humane MSCs ein Minimalkonsens der Oberflächenproteine erarbeitet wurde [5], besteht für murine MSCs noch kein derartiges Einvernehmen. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich das Oberflächenprofil von MSCs in verschiedenen Rattenstämmen zum Teil stark unterscheidet [31]. Aus diesen Gründen entschieden wir uns für je zwei positive bzw. negative mesenchymale Stammzellmarkerproteine und analysierten die primären Zellen mittels FACS.

Der immunozytochemische Nachweis von Transmembranproteinen mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern zeigte, dass $99,86 \pm 0,05$ % (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) der normoxisch und $99,98 \pm 0,01$ % der hypoxischen kultivierten Zellen eine starke Expression des Glykoproteins Thy-1 (CD90) aufwiesen und $99,86 \pm 0,07$ % (Normoxie) bzw. $99,99 \pm 0,01$ % (Hypoxie) positiv für die Integrinunterheit β_1 (CD29) nach ca. 14 Tagen in Kultur waren (Abb. 2A/B). Im Gegensatz zum Nachweis mesenchymaler Oberflächenproteine konnten wir nur eine leichte Expression der Leukozyten-spezifischen Tyrosinphosphatase (CD45; Normoxie: $7,45 \pm 5,88$ %, Hypoxie: $4,30 \pm 4,34$ %) bzw. der Integrinuntereinheiten α_m/α_x (CD11b/c; Normoxie: $1,50 \pm 0,40$ %, Hypoxie: $2,26 \pm 1,59$ %) (Abb. 2C, D) feststellen. Bei keinem Spender zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Oberflächenprofils zwischen normoxischer und hypoxischer Kultivierung der ASPCs (Abb. 2A-D).

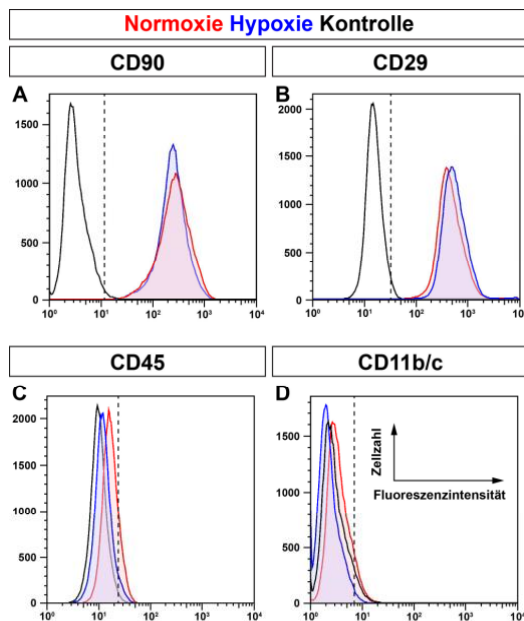


Abbildung 2: Exemplarische FACS-Analyse der isolierten ASPCs eines Spenders. Die mesenchymalen Marker CD90 (A) und CD29 (B) zeigten eine hohe Expression in normoxisch (rot) bzw. hypoxisch (blau) kultivierten Zellen, während die beiden Leukozytenmarker CD45 und CD11b/c negativ waren. Als Kontrolle wurden Isotyp-Antikörper (schwarz) verwendet. Versuche wurden mit drei biologischen Replikaten in Triplikaten durchgeführt.

ASPCs zeigen ein starkes osteogenes und adipogenes Differenzierungspotenzial

Um die Differenzierbarkeit der primär gewonnenen ASPCs in mesenchymale Zelllinien nachweisen zu können, wurden die Zellen osteogen und adipogen differenziert. Während normoxisch und hypoxisch kultivierte ASPCs nach 21 Tagen osteogener Stimulation eine starke Mineralablagerung aufwiesen (Abb. 3A/C), zeigten Zellen in Kontrollmedium keine Differenzierung (Abb. 3A/C, Bildeinsatz). Bei der Quantifizierung der Mineralisierung der extrazellulären Matrix zeigt sich sowohl bei den hypoxisch als auch den normoxisch kultivierten ASPCs eine signifikant höhere Menge als bei der Kontrollgruppe (Abb. 3E). Wir konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied der osteogenen Differenzierbarkeit in unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen feststellen (Abb. 3E).

Im Gegensatz zum starken osteogenen Differenzierungspotenzial der ASPCs konnten wir nach 14-tägiger adipogener Stimulation nur eine leichte Ausbildung von Lipidvakuolen in Primärzellen nachweisen (Abb. 3B/D). Durch eine computergestützte Quantifizierung der neugebildeten Vakuolen konnten wir eine signifikante, 2,3-fache Verminderung in hypoxisch differenzierten ASPCs nachweisen

(Abb. 3F). Undifferenzierte Zellen in Kontrollmedium zeigten keine Ausbildung von Lipidvakuolen (Abb. 3B/D, Bildeinsatz und F).

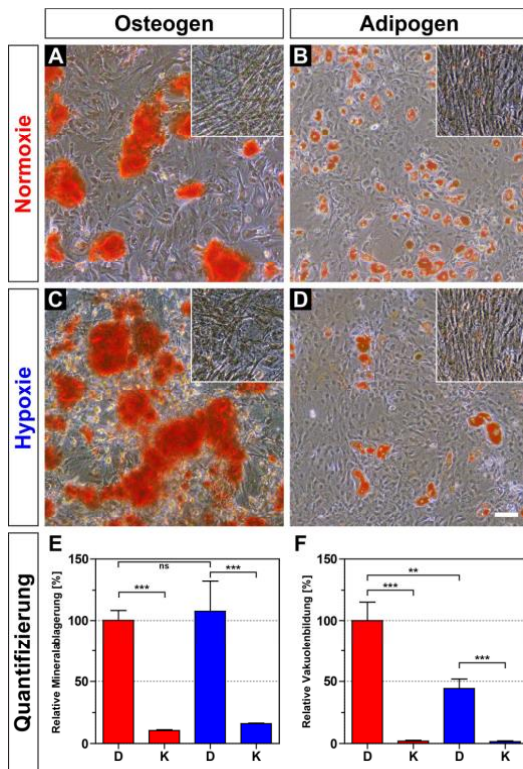


Abbildung 3: Repräsentative Alizarin-Rot-Färbungen von normoxisch (A) und hypoxisch (C) osteogen differenzierten ASPCs zeigten eine starke Mineralablagerung nach 21 Tagen, während Zellen in normalen Kulturmedium keine Differenzierung vorwiesen (A/C, Bildeinsätze). Die Quantifizierung des Alizarin Rots (E) bestätigte eine signifikante Erhöhung der Mineralablagerung in differenzierten ASPCs. Exemplarische Oil-Red-O-Färbungen von normoxisch (B) bzw. hypoxisch (D) adipogen differenzierter ASPCs zeigten unter beiden Sauerstoffkonzentrationen eine Ausbildung von Lipidvakuolen nach 14 Tagen. Im Gegensatz zur fast gleich starken osteogenen Differenzierung zeigte die Quantifizierung der Lipidvakuolen in hypoxischen Zellen eine signifikante Reduktion. Versuche wurden mit drei biologischen Replikaten in Triplikaten durchgeführt. Maßstabsbalken: 200 µm. Signifikanzniveau: ** ≤ 0.01, *** ≤ 0.001. n.s.: nicht signifikant. D = differenziert, K = Kontrolle, rote Balken = normoxische Kultur, blaue Balken = hypoxische Kultur.

Hypoxie wirkt sich positiv auf die Proliferation und den Zellmetabolismus aus

Um die möglichen regenerativen Eigenschaften der primären ASPCs detaillierter beschreiben zu können, untersuchten wir ihr kumulatives Wachstumsverhalten (cumPD). Hierbei zeigte sich, dass normoxisch ($30,9 \pm 11,2$ Stunden) sowie hypoxisch ($35,7 \pm 11,4$ Stunden) kultivierte Zellen initial eine etwa gleiche Teilungsrate hatten. Allerdings erreichten ASPCs unter normoxischen Kulturbedingungen

schon ab dem 18. Tag in Kultur ein Seneszenz-Plateau, wohingegen dies bei den hypoxisch konditionierten Zellen erst nach 35-40 Tagen der Fall war (Abb. 4A). Des Weiteren zeigten hypoxisch kultivierte ASCs ein signifikantes, 2,1-fach höheres klonogenes Potenzial (CFU) als Zellen in Normoxie (Abb. 4B). Die gesteigerte Proliferation und die erhöhte CFU Effizienz in Hypoxie spiegelte sich auch in einer signifikant gesteigerten metabolischen Aktivität wider (Abb. 4C).

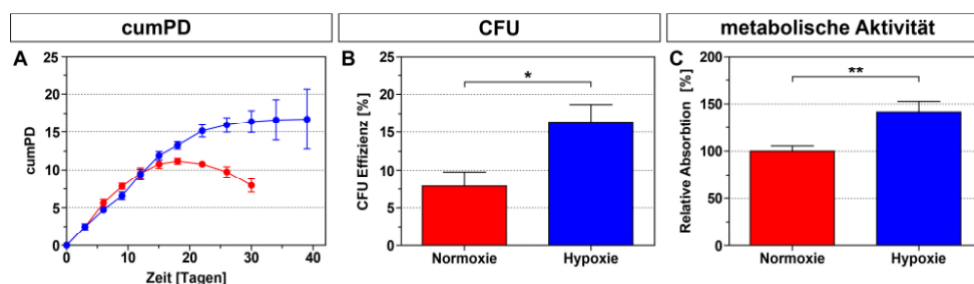


Abbildung 4: Das kumulative Wachstumsverhalten zeigte bereits nach 18 Kulturtagen den Beginn der Seneszenz der normoxisch kultivierten ASCs (A, rot), während Zellen unter hypoxischen Kulturbedingungen erst nach 40 Tagen eine reduzierte Teilungsrate aufwiesen (A, blau). Auch das klonogene Potenzial (B) sowie die metabolische Aktivität waren in hypoxisch kultivierten Zellen signifikant höher als in normoxisch kultivierten. Alle Versuche wurden mit drei biologischen Replikaten in Triplikaten durchgeführt. Signifikanzniveau: * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 . Rote Graphen = normoxische Kultur, blaue Graphen = hypoxische Kultur.

Diskussion

Durch die Etablierung klinisch zugelassener Aufbereitungssysteme für multipotente Vorläuferzellen aus dem Fettgewebe, die ohne Expansionsschritt im Labor auskommen, ist der breite klinische Einsatz dieser Zellen möglich gemacht worden. Um die stetig steigende Zahl der Indikationen zu testen, sind tierexperimentelle Studien unerlässlich. Ziel der vorliegenden Studie war es, zu überprüfen, ob mit dem ARC™-Aufbereitungssystem von InGeneron ausreichend qualitativ hochwertige Vorläuferzellen aus dem Leistenfettpolster von Wistar-Ratten gewonnen werden können. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass später auch Tiermodelle mit autologer Zelltransplantation ohne Euthanasie des Tiers zur Gewinnung des Fettgewebes möglich sind. Andererseits wird das identische System zur Gewinnung der Zellen verwendet und somit der Transfer der im Tierexperiment gewonnenen Erkenntnisse in die Klinik vereinfacht.

Neben Parametern wie Wirtschaftlichkeit und Praktikabilität muss vor allem die Qualität der gewonnenen Zellen hinsichtlich ihrer Proliferationskapazität, ihrer metabolischen Aktivität und ihrer Stammzeileigenschaften überprüft werden. Die Dauer des Aufbereitungsprozesses im ARC™-System von 90 ± 12 Minuten ist mit den aktuell auf dem Markt erhältlichen Alternativen vergleichbar (88-115 Minuten) [26]. Bei Lipoaspiraten verringert sich der zeitliche Aufwand auf ca. 60 Minuten. Des Weiteren liegen die Kosten pro Anwendung mit ca. 500 € unter dem Durchschnitt (350-1500 €). Voraussetzung für die Isolation von Zellen ist allerdings der einmalige Erwerb der InGeneron Tischzentrifuge (Preis: 6.500 €). Sie misst 47 x 38 x 28 cm (Länge x Breite x Höhe) und ist damit im Vergleich zu den meisten anderen Systemen, die bis zur Größe einer ganzen Zell-Kultur-*hood* reichen verhältnismäßig klein. Das Gerät kann somit im Gegensatz zu anderen Systemen problemlos im OP eingesetzt werden. Aus 1 g Fettgewebe konnten ca. 60000 adhärenente Zellen für weiterführende Versuche isoliert werden, so dass eine autologe Behandlung im Rattenmodell unter Verwendung des Leistenfettpolsters ohne Probleme möglich ist. Mit diesem Wert liegt das vorgestellte Isolationsystem zwischen den in der Studie von Aronowitz et al. vorgestellten Geräten, die zwischen 35000 und 240000 Zellen pro Gramm Fettgewebe erreichten. Kritisch anzumerken ist, dass die genaue Enzym-Zusammensetzung vom Hersteller nicht preisgegeben wird, was die wissenschaftliche Einordnung der Qualität des Isolationsprotokolls erschwert.

Wir untersuchten die isolierten Zellen sowohl unter in Zellkulturlaboren üblichen normoxischen (21 % O₂) Bedingungen als auch im hypoxischen (2 % O₂) Milieu. Aktuellen Forschungsergebnissen zu Folge entspricht diese Form der Kultivierung bezüglich der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration viel eher den natürlichen Lebensbedingungen der Zellen und fördert deren Stammzellcharakter [30, 32, 33]. Bezüglich der FACS-Analyse muss erwähnt werden, dass im Gegensatz zu menschlichen Vorläuferzellen noch kein Konsens darüber besteht, wie genau das Oberflächenprofil von murinen multipotenten Zellen beschaffen sein muss. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich das Oberflächenprofil von MSCs in verschiedenen Rattenstämmen zum Teil stark unterscheidet [31]. Aus diesen Gründen entschieden wir uns für je zwei etablierte positive bzw. negative Markerproteine von mesenchymalen Stammzellen. Als Negativ-Marker dienten die der hämatopoietischen Stammzellen

(CD45 und CD11b/c). Als Positivmarker wählten wir das Glykoprotein Thy-1 (CD90) und die Integrinunterheit $\beta 1$ (CD29) [30].

Die gewonnenen Zellen proliferierten über mehrere Passagierungsschritte gut, bis schließlich das Seneszenz-Plateau erreicht wurde. Im hypoxischen Milieu kam es, wie in diversen Studien zuvor belegt, später zum Erreichen der Seneszenz, was darauf hinweist, dass die Hypoxie die Proliferationskapazität der Zellen verbessert [30]. Alle Zellen zeigten eine gute CFU-Aktivität, was eine herausragende Eigenschaft von Stammzellen ist. Auch hier war der Effekt - wie auch in anderen Studien gezeigt - unter Hypoxie größer, was bedeutet, dass die klonogene Potenz, also die Fähigkeit aus einer einzigen Zelle eine Zellkolonie zu bilden, unter niedrigen Sauerstoffbedingungen erhöht ist [30]. Weiterhin ließen sich die Zellen beider Gruppen adipogen sowie osteogen differenzieren, was den eigentlichen Hinweis für eine Multipotenz darstellt. Somit konnten wir zeigen, dass die aus dem Leistenfettpolster der Wistar-Ratte gewonnenen Zellen alle überprüften Kriterien der Multipotenz erfüllten, was beispielsweise in der Vergleichsstudie von vier kommerziell erhältlichen Aufbereitungssystemen von Aronowitz et al. [26] oder in der Untersuchung von Raposio et al. [24] unterlassen und völlig zu Recht von Bertheuil und Chaput [34] kritisiert wurde. Üblicherweise wird beim Versuch des Stammzellnachweises zusätzlich zur adipogenen und osteogenen Differenzierung auch eine chondrogene Differenzierung durchgeführt. Da hierfür sehr viele Zellen und damit sehr viele Passagierungsschritte nach Entnahme nötig sind, haben wir in unserer Studie darauf verzichtet, was eine Schwäche der vorgestellten Arbeit darstellt. Wir halten diesen Differenzierungsschritt allerdings im letztlich nie endgültig möglichen Nachweis des *echten* Stammzellcharakters für entbehrlich, insbesondere als beispielsweise der sehr aussagekräftige *clonogenic assay* deutlich positiv ausgefallen ist.

Unsere Studie hat somit nachfolgenden Tiermodellen den Weg geebnet, insofern wir zeigen konnten, dass mithilfe des ARC™-Aufbereitungssystems von InGeneron aus dem Leistenfettpolster von Wistar-Ratten in ausreichender Quantität und Qualität ASPCs gewonnen werden können. Dies ermöglicht die autologe Transplantation von ASPCs im Rattenmodell, was – zusammen mit dem Einsatz der klinisch zugelassenen Zentrifuge – der aktuellen klinischen Anwendung am nächsten kommt.

Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Gewinnung von multipotenten ASPCs aus dem Leistenfettpolster von Wistar-Ratten mithilfe des ARC™-Aufbereitungssystems von InGeneron in ausreichender Quantität und Qualität möglich ist. Unter Berücksichtigung der Kosten des Geräts ist somit der Weg geebnet, um etwaige neue klinische Einsatzmöglichkeiten der ASPCs im Tiermodell zu untersuchen.

Interessenkonflikt

Bei keinem der Autoren liegt ein Interessenskonflikt vor.

Literaturverzeichnis

- [1]
Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6:230–247.
- [2]
Harasymiak-Krzyżanowska I, Niedojadło A, Karwat J et al. Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications. *Cell Mol Biol Lett*. 2013; 18(4):479-93.
- [3]
Docheva D, Vaerst B, Deiler S et al. Alterations of cell phenotype in Dupuytren's disease--an in vitro analysis. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 2012; 44(2):59-66.
- [4]
Elahi KC, Klein G, Avci-Adali M et al. Human Mesenchymal Stromal Cells from Different Sources Diverge in Their Expression of Cell Surface Proteins and Display Distinct Differentiation Patterns. *Stem Cells Int*. 2016; 2016:5646384.
- [5]
Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315-7.
- [6]
Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001; 7:211–228.
- [7]
Witkowska-Zimny, M. and Walenko, K. Stem cells from adipose tissue. *Cell. Mol. Biol. Lett*. 2011; 16:236-257.
- [8]
Schaffler, A. and Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; 25:818-827.
- [9]
Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev*. 2011; 7(2):269-91.
- [10]
Kaiping Yang. *Adipose Tissue Protocols* Editors- Kaiping Yang ISBN- 978-1-58829-916-1 (Print) 978-1-59745-245-8
- [11]
Gonzalez-Rey, E., Gonzalez, M. A., Varela, N., et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2010; 69:241–248.
- [12]
Meza-Zepeda, L. A., Noer, A., Dahl, J. A., et al. Highresolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2008; 12:553–563.
- [13]
Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A et al. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*. 2012; 20;21(14):2724-52.
- [14]

Zhu M, Zhou Z, Chen Y, et al. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg.* 2010; 64:222–228.

[15]

Mazo, M., Gavira, J.J., Pelacho, B. et al. Adipose-derived stem cells for myocardial infarction. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2011; 4:145-153.

[16]

Yang, X., Gong, P., Lin, Y. et al. Cyclic tensile stretch modulates osteogenic differentiation of adipose-derived Arch Med Sci. 2010; 6(2):152-9

[17]

Christian Krug, Thomas Holzbach, Riccardo E. Giunta. Periphere Nervenverletzungen. *Handchir Scan* 2015; 04(01): 57-69

[18]

Kingham PJ, Reid AJ, Wiberg M. Adipose-derived stem cells for nerve repair: hype or reality? *Cells Tissues Organs.* 2014; 200(1):23-30.

[19]

Nicoletti GF, De Francesco F, D'Andrea F et al. Methods and procedures in adipose stem cells: state of the art and perspective for translation medicine. *J Cell Physiol.* 2015; 230(3):489-95.

[20]

Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008; 45(2):115-20.

[21]

Gentile P, Orlandi A, Scioli MG et al. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1(3):230-6.

[22]

Meyer J, Salamon A, Herzmann N et al. Isolation and differentiation potential of human mesenchymal stem cells from adipose tissue harvested by water jet-assisted liposuction. *Aesthet Surg J.* 2015; 35(8):1030-9.

[23]

Wu, C.-H., Lee, F.-K., Kumar, S.S. et al. The isolation and differentiation of human adipose-derived stem cells using membrane filtration. *Biomaterials* 2012; 33:8228-8239.

[24]

Caruana G, Bonomini S, Libondi G. A novel and effective strategy for the isolation of adipose-derived stem cells: minimally manipulated adipose-derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy. *Plast Reconstr Surg.* 2014; 133(6):1406-9.

[25]

Romanov, Y.A., Darevskaya, A.N., Merzlikina et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization and differentiation potentialities. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005; 3:138-143.

[26]

Aronowitz JA, Ellenhorn JD. Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plast Reconstr Surg.* 2013; 132(6):932e-9e.

[27]

Volkmer E, Otto S, Polzer H et al. Overcoming hypoxia in 3D culture systems for tissue engineering of bone in vitro using an automated, oxygen-triggered feedback loop. *J Mater Sci Mater Med.* 2012 Nov;23(11):2793-801.

[28]

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9(7):671-5.

[29]

Alberton P, Popov C, Prägert M et al. Conversion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into tendon progenitor cells by ectopic expression of scleraxis. *Stem Cells Dev*. 2012; 10;21(6):846-58.

[30]

Saller MM, Prall WC, Docheva D et al. Increased stemness and migration of human mesenchymal stem cells in hypoxia is associated with altered integrin expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 29:423(2):379-85.

[31]

Barzilay R, Sadan O, Melamed E, Offen D. Comparative characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from four different rat strains. *Cytotherapy*. 2009; 11(4):435-42.

[32]

Volkmer E, Drosse I, Otto S et al. Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone *Tissue Eng Part A* 2008;14:1331-40.

[33]

Choi JR, Pingguan-Murphy B, Wan Abas WA et al. Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 30:448(2):218-24.

[34]

Bertheuil N, Chaput B. A novel and effective strategy for the isolation of adipose-derived stem cells: minimally manipulated adipose-derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy. *Plast Reconstr Surg*. 2015; 135(2):454e-5e.

Received: 19 June 2017 | Revised: 8 August 2018 | Accepted: 19 November 2018
DOI: 10.1002/term.2778

RESEARCH ARTICLE

WILEY

Fibrin glue displays promising in vitro characteristics as a potential carrier of adipose progenitor cells for tissue regeneration

Christian Krug^{4*} | Anita Beer^{1,2*} | Bastian Hartmann^{2,3} | Carina Prein^{2,3} | Hauke Clause-Schaumann³ | Thomas Holzbach⁴ | Attila Aszodi² | Riccardo Enzo Giunta¹ | Maximilian Michael Saller^{2*}  | Elias Volkmer^{2*}

¹Department of Hand, Plastic and Aesthetic Surgery, Munich University Hospital, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

²Experimental Surgery and Regenerative Medicine (ExperiMed), Department of General, Trauma and Reconstructive Surgery, Munich University Hospital, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

³Center for Applied Tissue Engineering and Regenerative Medicine (CANTER), Munich University of Applied Sciences, Munich, Germany

⁴Clinic for Hand and Plastic Surgery, Spital Thurgau, Frauenfeld, Switzerland

Correspondence

Elias Volkmer, Department of Hand Surgery, Helios Klinikum München West, Steinerweg 5, 8124 Munich, Germany.
Email: elias_volkmer@hotmail.com

Abstract

Adipose-derived multipotent stem/progenitor cells (ASPCs) were shown to be ideal candidates for cell-based regenerative therapies. Yet, despite their huge potential, successful clinical applications are still rare. It was suggested that the efficacy of ASPCs at the recipient site depends on the vehicle of cell delivery. In this study, for preparation of a murine critical-size nerve defect model, we assessed the commercially available fibrin gel (ARTISS) as a potential cell carrier.

In a thorough in vitro analysis, we investigated cell–fibrin interactions and analyzed the distribution and the long-term behavior of ASPCs cultivated in fibrin gel under normoxic and hypoxic conditions.

ASPCs attached to the surface of a thin fibrin layer (two-dimensional condition) and spread with the abundant formation of actin stress fibers. Cells cultured within a fibrin matrix (three-dimensional condition) displayed a uniform distribution and formed interconnected networks while exhibiting strong cell–matrix interactions. Using time-lapse analysis, cells were found to migrate out of the gel and subsequently proliferated robustly both under hypoxic and normoxic conditions. During 14 days of culture in fibrin gel, ASPCs showed high viability, metabolic, and remodeling activities. At the end of the culture period, the fibrin matrix was degraded entirely accompanied by an upregulation of matrix metalloproteinases.

In conclusion, fibrin gel stands out as a valuable biomaterial for delivering vital and active cells to damaged tissues. As a direct proof, ASPCs carried in a fibrin matrix will be evaluated in a murine critically sized peripheral nerve repair model.

KEYWORDS

adipose-derived progenitor cell, ASPC, fibrin glue, mesenchymal stem cell, MSC, regenerative medicine

1 | INTRODUCTION

Cell-based therapies aim at repairing, replacing, or regenerating tissues or organs. Over the past four decades, adult stem/progenitor cells and

their potential for tissue regeneration were studied intensively. Many steps along the way to successful application, including isolation from a plethora of donor sites, detailed characterization, proliferation, and multilineage differentiation in vitro, are today standardized procedures (Gimble, Bunnell, Chiu, & Guilak, 2011; Gir, Oni, Brown, Mojallal, &

*These authors have equal contribution.

Rohrich, 2012). Adipose-derived stem/progenitor cells (ASPCs) display all the required stem cell characteristics (Bourin et al., 2014; Dominici et al., 2006). Furthermore, ASPCs were found to have immune-regulatory functions (Gonzalez-Rey et al., 2010), they are genetically stable in long-term culture (Meza-Zepeda et al., 2008), and as effective as bone marrow-derived stem cells in clinical applications (Noël et al., 2008). There are a plethora of *in vitro* studies and animal trials, which use ASPCs for tissue regeneration, for example, in bone defects, tendon repair, ischemic heart disease, and spinal cord injuries (Mazo, Gavira, Pelacho, & Prosper, 2011; Ryu et al., 2009). Reid et al. (2011) showed that ASPCs have a beneficial influence on nerve repair *in vivo*, resulting in neuronal protection and supported nerve regeneration. The improvement of regeneration of peripheral nerve injuries with ASPCs seeded fibrin conduits is another promising approach (Di Summa et al., 2011). In contrast to bone marrow-derived stem cells, ASPCs are abundant in most humans and are easily accessible with only minimal donor site morbidity. Today, several systems exist to isolate ASPCs in the operating theater within a reasonable time. One of them is the ARC™ Tissue Processing Unit, which takes less than 60 min to provide cells ready for application. In this tempered centrifuge, fat tissue is enzymatically digested to yield the so-called stromal vascular fraction (SVF) that contains the desired ASPCs (Krug et al., 2016). It has been shown that oxygen concentration is typically less than 3% in adipose tissue; thus, culturing stem cells under more physiological conditions of low-oxygen tension benefits the expansion, differentiation, colony-forming-unit efficiency, metabolic activity (Krug et al., 2016; Saller et al., 2012), growth factor secretion, and regenerative potential (Chung, Won, & Sung, 2009; Lee et al., 2009). Although ASPCs bear considerable promise for regenerative medicine applications (Lindroos, Suuronen, & Miettinen, 2011; Witkowska-Zimny & Walenko, 2011), reports of truly successful clinical applications of stem/progenitor cells for tissue regeneration are currently extremely scarce. One of the key questions remaining is to determine the best method of *in vivo* application, which permits cell survival and fully exploits the beneficial potentials of ASPCs. Direct injection of cells into the site of injury often results in poor engraftment. Therefore, a wide range of carriers made of different biomaterials were tested to keep the cells in place. The ideal scaffold must fulfill a long list of requirements including biocompatibility and biodegradability, promotion of cell adhesion and proliferation, and adequate nutrition of the cells since it was previously shown that hypoxia may be a serious problem in scaffold-based approaches (Volkmer et al., 2012). It is therefore of utmost importance that the carrier or scaffold must not interfere with nutrition of the cells during preparation/expansion and after application. A wide variety of natural or synthetic biomaterials have been tested as cell carriers for tissue engineering approaches. Natural biomaterials generally include proteins and polysaccharides (collagen, fibrin, alginate, and hyaluronic acid), whereas the synthetic ones are composed of metallic, ceramic, or polymeric materials, such as polyglycolic acid and polylactic acid (Malafaya, Silva, & Reis, 2007). Natural biomaterials have some advantages over the synthetic ones: They mimic the structure and composition of natural matrices, are usually nontoxic and, if purified, they do not induce significant immune response. Fibrin scaffolds are clinically approved natural biomaterials, which are used in the surgical practice (Stoppel, Ghezzi,

McNamara, Black, & Kaplan, 2015) to seal small wounds or micro-anastomoses of vessels, to treat lacerations of parenchymatous organs (Mankad & Codispoti, 2001), and to secure nerve coaptations (Sameem, Wood, & Bain, 2011). Although there is not a large number of compelling evidence in literature, fibrin glues are considered to improve nerve regeneration and, hence, they are used to entirely wrap nerve transplants. Biologically, fibrin glue has numerous advantages when considered as potential scaffold and cell carrier (De la Puente & Ludeña, 2014). Its main component, fibrin, is a naturally occurring, biodegradable polymer, which is one of the key molecules in blood clot formation. Its precursor, fibrinogen, is produced in the liver and abundantly secreted into the blood plasma, where it is a ubiquitous molecule. Upon activation by the blood clotting factor thrombin, fibrinogen is polymerized into a soft fibrin mesh, which is further stabilized by factor XIIIa resulting in the formation of the stable blood clot. In this process, white blood cells and platelets are incorporated into the clot. During the normal wound healing process, fibrin is ultimately degraded by proteases. Fibrin glue therefore evokes only minimal inflammatory response and no foreign body reaction. *In vitro*, recombinant fibrin has been tested as a potential cell matrix (Ahmed, Dare, & Hincke, 2008). It exhibits high cell seeding efficiency with uniform cell distribution, and its adhesive and mechanical assets mimic those of natural tissues. Moreover, it promotes the attachment, migration, proliferation, and desired differentiation of tissue progenitors cells (Li, Meng, Liu, & Lee, 2015). Fibrin glue can be fabricated from pooled or autologous human plasma. Taken together, it is tempting to speculate that a combination of fibrin glue and progenitor cells, such as ASPCs, may foster nerve regeneration after peripheral nerve coaptation or even after nerve transplantation. Using the above-mentioned centrifuge for isolation of cells, cells mixed with the fibrin glue would yield any given shape of ASPC-containing fibrin clot. In a situation of a nerve lesion, a fibrin conduit could be generated to be wrapped around a nerve coaptation suture to support nerve regeneration. The beauty of this concept lies in its feasibility. The whole process of preparation may be performed within the operating theater. Both, the ARC™ Tissue Processing Unit and the ARTISS fibrin glue are clinically approved, thus representing a possible clinical setting clearly within our reach. Before that, however, *in vitro* studies have to confirm that ASPCs isolated with the named centrifuge system can safely be cultured in fibrin glue for a prolonged period of time without losing their regenerative potential. With the future goal in mind to further assess the use of ASPCs dissolved in fibrin glue as a substrate to improve nerve regeneration *in vivo*, the aim of our present study was to investigate the biocompatibility of commercially available fibrin glue with a special focus on the behavior and viability of ASPCs seeded into this fibrin matrix.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Isolation of ASPCs

Inguinal fat tissue was harvested from three euthanized male Wistar rats (Charles River, USA), washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) and minced with a scalpel. According to the

manufacturer's protocol, an enzyme blend (Matrase, InGeneron, USA) and Lactated Ringer's solution (Fresenius Kabi, Germany) were added to the fat tissue and the SVF was isolated with a semi-automated centrifuge system (ARC™ Processing Unit, InGeneron, USA). The same system is also known under the name Transpose RT™ and approved for clinical application, so that sterile isolation and injection of SVF from fat tissue in the operating room is part of clinical trials. After centrifugation, the cell pellet was cultured in standard medium, consisting of DMEM high glucose supplemented with 10% fetal bovine serum, 100-U/ml penicillin and 100-µg/ml streptomycin (all from Thermo Scientific, USA). In order to reduce the influence of atmospheric oxygen on the multipotent precursor cells, 50% of the cell suspension was cultivated under hypoxia (2% O₂, O₂/CO₂ Incubator MCO-5M, SANYO, Japan) simulating physiological conditions for ASCs and 50% were cultivated under normoxia (21% O₂). Cells were trypsinized with 0.5% trypsin (Merck, Germany), once they reached confluency of 80% and were used between Passages 1 and 5. Stem cell characteristics of the isolated cells and the influence of oxygen tension on cell growth, metabolism, and colony-forming-unit efficiency were published previously (Krug et al., 2016).

2.2 | 2D analysis by cytoskeleton staining and atomic force microscopy

For all experiments, the two-component fibrin glue ARTISS (Baxter, Deerfield, USA) was used, which was reconstituted according to manufacturer's instructions. It is derived from pooled human plasma and has a fibrinogen concentration of 91 mg/ml and a thrombin concentration of 4 units/ml. In order to test adhesion of the cells on the fibrin glue, a thin layer of fibrin gel was sprayed on a plastic slide using the company's EASYSpray system (Baxter); then approximately 10,000 cells were seeded on the top and cell were could adhere for 2 hr. Before staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15 min at room temperature (RT) and washed three times with PBS. For visualization of the actin cytoskeleton, slides were incubated for 1 hr at RT with fluorescence-conjugated phalloidin (Thermo Scientific, USA) diluted 1:100 in a blocking solution (3% bovine serum albumin [BSA], 0.5% Triton X-100 in PBS, all from Sigma-Aldrich, USA). Afterwards, the slides were rinsed again in PBS, and cell nuclei were stained with 4,6-diamidin-2-phenylindol (DAPI) and mounted with Mowiol. Images were obtained with a Zeiss AxioObserver. Imaging by atomic force microscopy (AFM) were carried out using a NanoWizard I AFM instrument (JPK Instruments, Germany) in combination with an inverse optical microscope (Axiovert 200, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Germany). The optical microscope with a 400× magnification was used to ensure the right positioning of the cantilever tip on the area of interest. The AFM had a maximum lateral scan range of 100 × 100 µm² and a vertical range of 15 µm. The same sample as described above was used.

2.3 | IT-AFM measurements

To determine the Young's modulus, fibrin clots with a cell density of 600,000 cells in 50-µl fibrin gel were prepared. On Days 1 and 7 after

cultivation, the clots were rinsed with PBS and embedded in Tissue-Tek O.C.T compound (Sakura, the Netherlands). Afterwards, they were sectioned to 25 µm thickness on a cryostat (CryoStar™ NX50, Thermo Fischer). For the IT-AFM measurements, silicon nitride cantilevers (MLCT Cantilever E, Bruker, Mannheim, Germany) with a nominal spring constants of 0.03 N/m and pyramidal tips with a nominal radius of 20 nm were used. The tip velocity during the indentation experiments was always constant at 10 µm/s. For the used cantilever, the actual spring constant was determined individually in PBS buffer by using the thermal noise method. The spring constant determination was repeated three times, and the arithmetic average was used for data analysis. IT-AFM measurements were performed in phosphate buffered saline at pH7.4. First, an area of 30 × 30 µm² with 30 × 30 force-indentation curves was recorded. Then, avoiding cells and air bubbles, a smaller area of 10 × 10 µm² and 15 × 15 force-indentation curves was measured, to ensure a correct position on the fibrin gel. On every fibrin clot and fibrin-cell clot, two force maps were acquired. The Young's modulus was extracted from the extend part of the force-indentation curves using a modified Hertz model for a pyramidal indenter using the JPK Data Processing software (Version 6.1.42, JPK Instruments AG, Berlin, Germany). The results for the Young's modulus of all force-indentation curves of one sample were summarized, and the mean and the standard deviation were calculated.

2.4 | Cell density measurement

In order to determine cell density, fibrin clots on Days 1 and 7 after cultivation were rinsed with PBS and embedded in Tissue-Tek O.C.T compound. They were sectioned to 25 µm thickness on a cryostat. After rinsing, DAPI staining for 2 min was performed and sections were imaged with a Zeiss AxioObserver. Cell counting was performed with ImageJ.

2.5 | 3D analysis with confocal microscopy

Identical cell-fibrin clots were prepared in 96-well plates. Clots with a density of 300,000 cells per 50 µl fibrin glue were fabricated by resuspending cells in 12.5 µl thrombin and carefully adding an equal volume of the fibrinogen component. After polymerization, the cell-gel mix was placed into a 12-well plate and incubated at 37°C for 7 days in a humidified incubator. After fixation with 4% PFA for 15 min at RT and three times rinsing with PBS, staining was performed with fluorescence-conjugated phalloidin diluted 1:100 in blocking solution for 1 hr at RT (3% BSA, 0.5% Triton X-100 in PBS). After a final rinsing step and DAPI staining for 2 min, the cell-fibrin clots were imaged under a confocal microscope (LSM 800, Zeiss, Germany).

2.6 | Shrinking assay and time-lapse analysis

Fibrin clots with a cell density of 600,000 cells per 50 µl fibrin glue were prepared. After polymerization, the clots were transferred into a six-well plate and incubated in standard medium under normoxic and hypoxic culture conditions. The fibrin clots were imaged daily under a stereo microscope (Zeiss, Germany), and the area of the clots

was analyzed using ImageJ. Fibrin clots without cells served as controls. In addition, we performed time lapse of cell–fibrin clots in a controlled environment at 37°C and 5% CO₂, and images were taken every 30 min for 6 days using a Zeiss Axiovert microscope (Zeiss, Germany).

2.7 | Live and dead cell assay

In order to perform a live–dead assay with fluorescein diacetate (Sigma-Aldrich, USA) and propidium iodide (PI, 1 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA) at four selected time points (Days 1, 3, 7, and 14), cell–fibrin clots at a cell density of 300,000 cells per 25 µl fibrin glue were prepared and moved to 12-well plates with standard medium. First, the samples were put in a 24 µM fluorescein diacetate solution for 30 s and afterwards 5 s in PI solution, washed two times in PBS, and imaged with an AxioObserver Z1 microscope (Zeiss, Germany).

2.8 | Analysis of metabolic activity

A 22 mm-long fibrin conduit with a 2 mm wall thickness and a 2 mm lumen was molded and cut into uniform slices. Each section contained 400,000 cells. The slices were incubated in standard medium under normoxic and hypoxic condition in six-well plates. At four selected stages, slices were moved into a 12-well plate and incubated for 4 hr with 1 ml of water soluble tetrazolium (WST, Roche, Germany) supplemented media, respectively. WST reagent was freshly mixed before with medium at a ratio of 1:10. Subsequently, 100 µl of the reacted suspension from each well were transferred in triplicates into a 96-well plate, and absorbance was measured at 450 nm using an ELISA plate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA). Normoxic conditions were used as reference point to yield the relative metabolic activity.

2.9 | Apoptosis and proliferation assay

Identical slices as described above were used. After 2 hr of incubation in the WST supplemented media, 2 µl of 10-mM BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine, Roche, Germany) diluted in Dimethylsulfoxide was added. After 4 hr, the absorbance of the reacted suspension was measured, and the slices were washed three times with PBS and fixated with 4% PFA for 20 min. The samples were cryoprotected at 4°C in 30% sucrose in PBS overnight, mounted in Tissue-Tek O.C.T compound (Sakura, the Netherlands), and sectioned at 10 µm thickness on a cryostat. For the detection of proliferating cells, we used a rat monoclonal antibody against BrdU (ab 6326, abcam, United Kingdom) diluted 1:250 in blocking buffer, containing PBS, 1% BSA, and 0.1% Triton X-100 over night at 4°C. On the next day after washing in PBS, an anti-rat IgG Alexa Fluor 488 secondary antibody (Thermo Fisher, USA) in a 1:250 dilution was added for 1 hr at RT. After washing, the sections were mounted with Mowiol and imaged with an epifluorescence AxioObserver Z1 microscope (Zeiss, Germany). In order to detect apoptosis, a TUNEL assay using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Switzerland) was performed by following the company's protocol. As a control, the sections were treated with

DNase (Roche, Switzerland). Finally, the sections were counterstained with DAPI and washed three times in PBS before mounting with Mowiol.

2.10 | Semiquantitative polymerase chain reaction analysis

For polymerase chain reaction (PCR) analysis, clots at a density of 600,000 cells per 50 µl fibrin glue were prepared, and after 3 days of incubation, RNA was isolated. Cell–fibrin clots were removed from the culture well, rinsed with PBS, and minced. Three hundred microliter of TRIzol reagent (Thermo Scientific, USA) was added and incubated for 3 min at RT. After adding 72 µl of chloroform, the aqueous phase was separated by centrifugation. RNA was purified using the RNeasy MinElute spin columns (Qiagen, the Netherlands). The concentration of the purified RNA was determined using a NanoDrop spectrometer (Nanodrop Technologies, USA). Complementary DNA was synthesized by the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit using 1 µg RNA input (Roche, Switzerland). PCR reactions were carried out with rat-specific primer pairs for *Gapdh* and *Plg* (*Gapdh* primer sequence forward GACATGCCGCTGGAGAAAC; reverse AGCCCAGGATGCCCTTTAGT; *Plg* primer sequence forward AAATTACCGAGGGACCG; reverse TTTTCTGGCGTCCTGTTGTG) with following amplification parameters: preheating at 95°C for 5 min, 35 cycles of denaturation (95°C for 30 s), annealing (64°C for 30 s), elongation (72°C for 60 s), and a final extension step at 72°C for 5 min. Amplified products were electrophoresed and visualized on 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

2.11 | Quantitative PCR analysis

Identical cDNA as described above was analyzed in the LightCycler 96 (Roche, Switzerland) using FastStart Essential DNA Green Master kit (Roche, Switzerland). The reaction volume contained 10 µl of hot start reaction mix with SYBR Green I dye, 8 µl PCR-water, 1 µl Primer-Mix, and 1 µl cDNA in a 1:5 dilution (2.2 ng in total). Following primers were used: *Gapdh* (Rn.PT.58.35727291), *Mmp3* (Rn.PT.58.44652574), *Mmp9* (Rn.PT.587383134), and *Mmp13* (Rn.PT.58.9488961, all from Integrated DNA Technology, USA). A three-step amplification (95°C for 10 s, 60°C for 10 s, and 72°C for 15 s) was performed, and samples were normalized against a house keeping gene (*Gapdh*).

2.12 | Statistical analysis

All in vitro experiments were carried out three times in triplicates with pooled cells from three individual animals. Statistical significance was calculated after determination of the Gaussian distribution using either an unpaired *t* test, Mann–Whitney *U* test (GraphPad Prism, USA) or a one-way analysis of variance test, depending on the experimental setup. Statistical significance was assumed at a *p* value of ≤0.05. All values represent the mean and the standard deviation.

3 | RESULTS

3.1 | ASCs form actin-rich cytoskeleton upon fibrin adherence and a highly interconnected 3D network

We first assessed the adhesion of ASCs to fibrin gel in a 2D environment. Cells were seeded and allowed to adhere to a thin fibrin layer, and subsequently, the actin cytoskeleton was visualized by phalloidin staining. Similar to that usually observed in cells cultured on plastic, actin stress fibers were formed in ASCs indicating that the cells were able to attach and spread to the fibrin glue. The cells were flattened and closely adapted to the surface of the fibrin layer suggesting cell-fibrin interactions (Figure 1a). Similarly, the smooth surface of a well-adapted cell on the rough fibrin surface was visualized by AFM in the vertical deflection image (dotted line; Figure 1b,b'). The overlap with the actin staining reveals the exact cell boundaries (Figure 1b''). In order to investigate the 2D characteristics of ASCs, the cells were embedded into the fibrin gel, stained with phalloidin and visualized by confocal laser-scanning microscopy after 7 days in culture. Phalloidin

staining revealed an even distribution of ASCs with elongated morphology, which formed a highly interconnected network within the fibrin matrix (Figure 2a,a').

3.2 | ASCs rapidly remodel and degrade fibrin matrix

To monitor the behavior of the ASC-fibrin gel constructs during cultivation, we performed time-lapse microscopy. Interestingly, the cells started to migrate out of the fibrin glue droplet within less than 24 hrs, and proliferated robustly (data not shown) on the culture dish surface (Figure 3a). At the same time, a gradual shrinking of the cell-containing fibrin clots was evident (Figure 3a,b). Halving of the droplet's size was observed after 4 days, and nearly complete disappearance of fibrin gel was seen after 15 days (Figure 3b). We observed no significant difference in fibrin gel degradation between cultures under normoxic and hypoxic conditions (Figure 3b'). No remodeling of the fibrin occurred in control droplets without cells indicating that the ASCs actively induced fibrin degradation (Figure 3b, left panel, and Figure 3b').

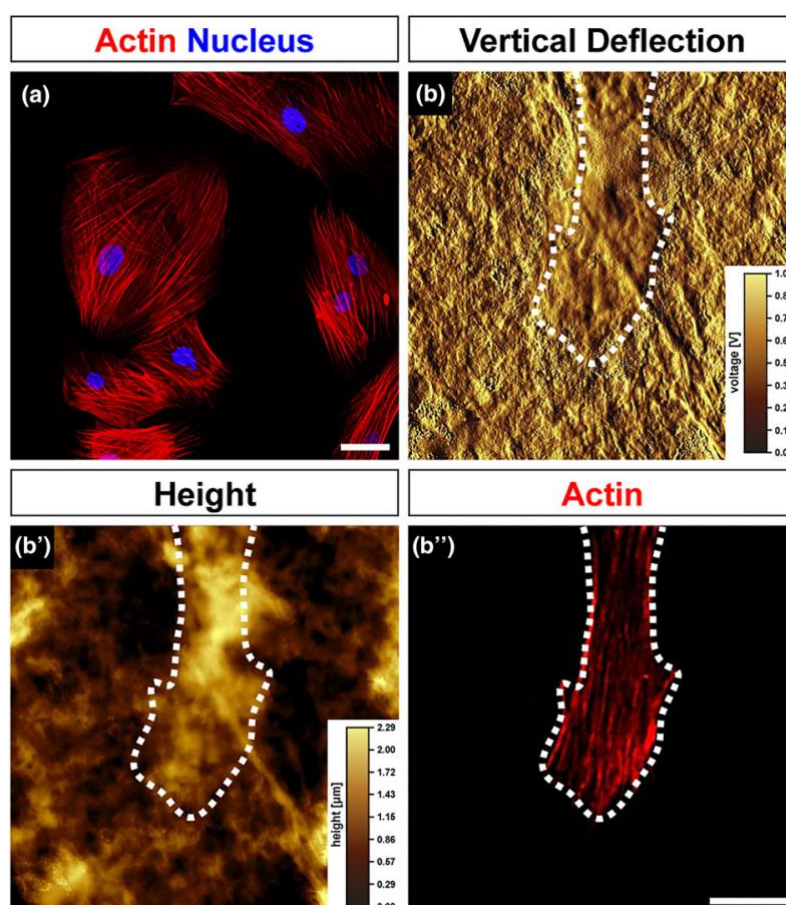


FIGURE 1 Adipose-derived multipotent stem/progenitor cells adhere and spread on the surface of a fibrin layer [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

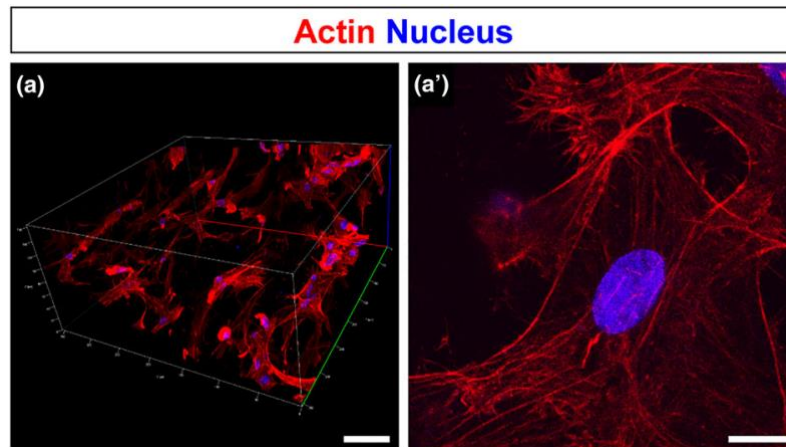


FIGURE 2 Confocal laser scanning microscopy reveals a network of adipose-derived multipotent stem/progenitor cells in the fibrin gel [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

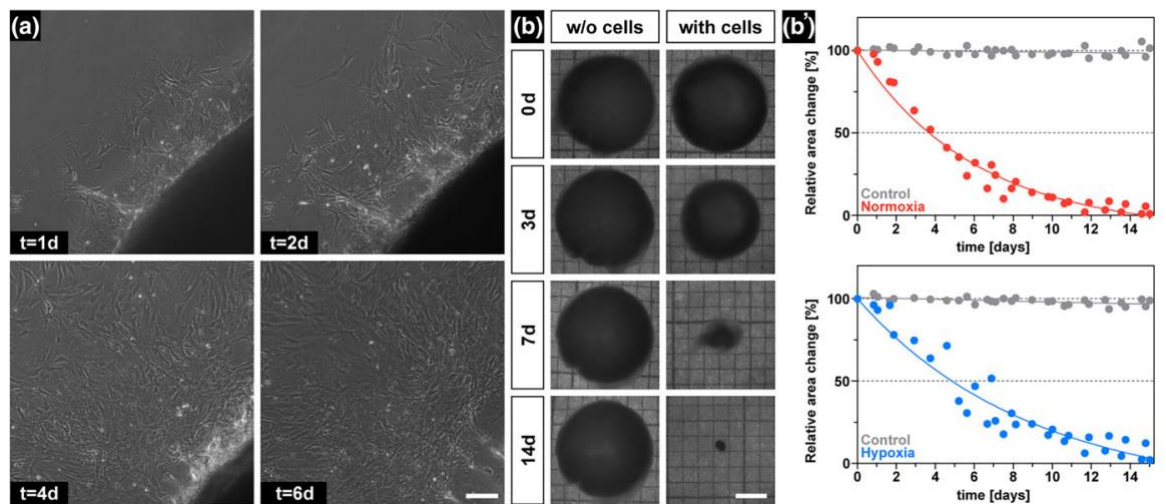


FIGURE 3 Time-lapse analysis [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

3.3 | Mechanical properties of fibrin remain constant over time

On Day 1 after cultivation, the Young's modulus of the fibrin gel was similar under normoxia and hypoxia (182 ± 52 kPa vs. 245 ± 102 kPa). On Day 7, the Young's modulus of the fibrin gel under hypoxia increased (323 ± 50 kPa). On the cell seeded fibrin clots, the Young's Moduli remain constant over time suggesting that the cells do not influence the mechanical properties of the fibrin gel (Normoxia Day 1: 146 ± 61 , Day 7: 275 ± 113 ; Hypoxia Day 1: 206 ± 70 , Day 7: 337 ± 81 ; Table 1).

3.4 | Cell density of ASCs increases over time under normoxia

In the beginning, cell density was similar under normoxia and hypoxia. After one week cell density approximately doubled under normoxia, whereas it decreased under hypoxia (Table 1).

3.5 | ASCs embedded in fibrin show high viability and metabolic activity

In order to test cell survival, we performed a live–dead assay of cells cultured in fibrin gel at Days 1, 3, 7, and 14 (Figure 4a). While on Day 1, some dead cells were detected, the later stages showed almost only viable cells with only a few dead cells. Additionally, we prepared uniform fibrin slices and performed WST assay at four different stages (Figure 4b). The cells displayed a stable metabolic activity over

TABLE 1 Young's modulus and cell density

	Control (kPa)	Sample with cells (kPa)	Cell density (cells/mm ²)
Day 1 Normoxia	182 ± 52	146 ± 61	563 ± 65
Day 1 Hypoxia	245 ± 102	206 ± 70	513 ± 155
Day 7 Normoxia	135 ± 36	275 ± 113	$1,205 \pm 102$
Day 7 Hypoxia	323 ± 50	337 ± 81	344 ± 73

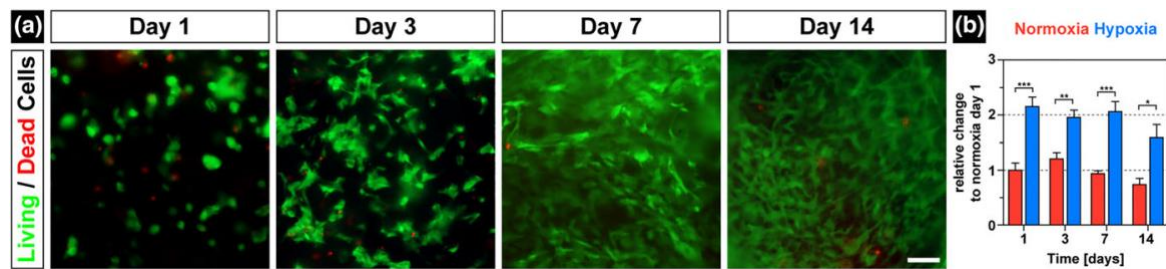


FIGURE 4 Adipose-derived multipotent stem/progenitor cells are viable and metabolically active in the fibrin gel [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

2 weeks. Interestingly, under hypoxia, cells showed a markedly increased metabolic activity compared with normoxic cultured cells (Figure 4b, blue bars). To further validate the high viability and metabolic activity of ASCs over the prolonged culture period, we performed BrdU incorporation and a TUNEL assays. We could not detect proliferative or apoptotic cells on the sections of the cell–fibrin constructs (data not shown).

3.6 | ASCs upregulate matrix metalloproteinases upon contact with fibrin matrix

In physiological fibrinolysis, plasminogen and matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role. In order to investigate the reason for the fibrin shrinkage identified in our experiments, we examined which of these proteases were expressed by ASCs using quantitative and semiquantitative PCR. In contrast to the control cells, which were cultured on plastic, the cells cultured in fibrin glue had a 14 ± 2 -fold higher expression of *Mmp3*, a 11 ± 2 -fold higher expression of *Mmp9*, and a 7 ± 2 -fold higher expression of *Mmp13* (Figure 5a, red bars). Under hypoxia, the expression of *Mmp3* was 6 ± 0.5 -fold, of *Mmp9* 14 ± 4 -fold, and of *Mmp13* 8 ± 2 -fold higher compared with the control group (Figure 5a, blue bars). Semiquantitative PCR showed no expression of plasminogen, neither in the negative plastic-control group nor in the fibrin gels seeded with the ASCs. Liver samples, however, showed a high expression of plasminogen.

4 | DISCUSSION

In our study, we investigated fibrin glue as a potential cell carrier for cell-based therapies. Fibrin promotes hemostasis and tissue bonding

and has therefore routinely been used by clinicians of multiple specialties. As an example, many peripheral nerve surgeons apply fibrin glue to sites of nerve coaptation and nerve transplantation (Sameem et al., 2011). All commercial fibrin sealants are liable to strict regulations from the U.S. Food and Drug Administration and have an impeccable safety record for over 20 years. There have so far been no proven incidences of hepatitis virus or HIV transmission (Albala, 2003). In contrast to many other cell carriers or scaffolds, fibrin gel is entirely biocompatible and its degradation process is noninflammatory. In sharp contrast, even collagen, which is widely used as a scaffold material, displays antigenicity and immunogenicity (Lynn, Yannas, & Bonfield, 2004). In addition, fibrin gel has a high-affinity interaction with several growth factors (e.g., basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor), enzymes and proenzymes (plasminogen activator and plasminogen; De la Puente & Ludeña, 2014; Sahni & Francis, 2000), which regulate cellular response at the site of injury. Due to their availability, accessibility, and their multilineage potential, ASCs are of great interest for cell-based therapies in tissue repair and regeneration (Lindroos et al., 2011; Witkowska-Zimny & Walenko, 2011). The isolation from excised or lipoaspirated adipose tissue can be performed within 60 min under sterile conditions in the operating room using a commercially available semi-automated cell isolation systems. In a previous study, we proved the viability and multilineage differentiation potency of cells harvested and isolated in such a manner (Krug et al., 2016). Although a considerable amount of studies are being conducted in order to create scaffolds of newly developed and innovative materials, the utilization of materials that have safely been applied in patient care for years are equally important and promising. Potentially, a combination of clinically approved fibrin glue and progenitor cells such as ASCs may

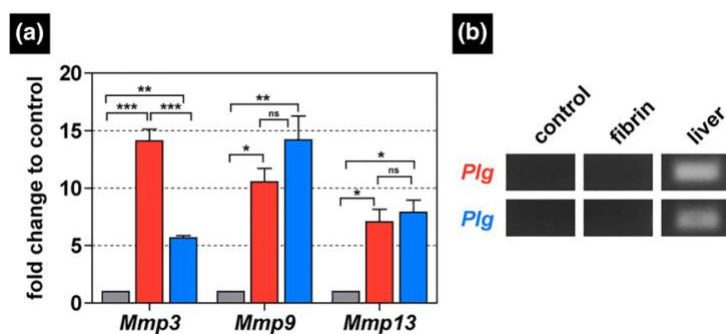


FIGURE 5 Quantitative and semi-quantitative and polymerase chain reaction analysis [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

produce a ready-to-use source for regenerative cells on a biocompatible cell-carrier. Before testing that, however, in vitro studies have to confirm that ASCs can safely be cultured in fibrin glue for a prolonged period of time without losing their regenerative potential. The gel consists of long, thick fibers forming a loose mesh, which enables diffusion of nutrients and metabolic waste products (Macasev et al., 2011). Fibrin droplets were seeded with ASCs and studied for their support of ASC attachment, migration, viability, metabolic activity, and proliferation. In the 2D analysis, we observed a morphological behavior similar to cells cultured on plastic. This suggests a strong cell-surface interaction of ASCs attaching to the fibrin matrix, which is consistent with the findings of Macasev et al. (2011). In a 3D fibrin matrix, the cells distributed uniformly, developed an elongated morphology, and formed interconnected networks after 7 days of culture. Taking into account the results of our time-lapse analysis, we believe that the cells can migrate and spread along the fibrin matrix. They build ample cell-matrix and cell-cell interactions (Hakkinen, Harunaga, Doyle, & Yamada, 2011). In order to cause a therapeutic effect at the damaged tissue location, implanted cells need to maintain functionality, while surviving for a sufficient time. In our study, ASCs survived over 2 weeks in the fibrin gel, while maintaining a stable metabolism along with a healthy intercellular network. In a hypoxic setting, ASC's metabolic activity was twice as high as under normoxia. A comparable situation arises after the implantation of tissue-engineered scaffolds. Until neovascularization has taken place, the transplanted cells are in a constant state of hypoxia. Reportedly, hypoxia also increases the proliferation of ASCs and enhances the wound-healing function of ADSCs by upregulating growth factors (Chung et al., 2009). However, we could not observe evidence of proliferation within fibrin glue in the BrdU assay. The high fibrinogen concentration of our fibrin sealants might be a potential reason for this finding (Brown & Barker, 2014). Gels formed from low concentrations of fibrinogen are, however, extremely soft and therefore impractical for the use in a clinical setting. Interestingly, the fibrin matrix was degraded within roughly 15 days. To achieve uncompromised cell-to-cell communication, the degradation of extracellular proteins like fibins is of key importance and proteases play a pivotal role in this process. MMPs are one of the proteases secreted by the ASCs and thus might be involved in the remodeling and degradation of fibrin conduits (Even-Ram & Yamada, 2005; Sternlicht & Werb, 2001). They have several additional functions, enabling them to regulate cell behavior in numerous ways. These mechanisms work via the alteration of cell-matrix and cell-cell interactions (Sternlicht & Werb, 2001). Our findings showed that the MMPs are relevant to the degradation of the fibrin clots presumably enabling ASCs to migrate within the clot. Cells evading the fibrin clot in our time-lapse experiments proliferated vigorously, suggesting that in a clinical application, cells seeded in fibrin would be freed within a relatively short period of time to act at the site of interest. Although this period seems to be rather short, it remains to be assessed whether or not this may be beneficial to regenerative processes in vivo or not. A number of studies have already evaluated the advantages of using ASCs in combination with fibrin glue in a variety of cell-based regeneration in multiple tissue types in animal models, for example, for the creation of skin tissue (Ozpur et al., 2016), rat acute myocardial infarction (Chen et al., 2015), cartilage regeneration (Wei et al., 2009), and

support of peripheral nerve healing (Carriel et al., 2013; Di Summa et al., 2010; Reichenberger et al., 2015). All studies imply some positive effect that in our eyes need further evaluation given our findings in this study. Similarly, there are ongoing clinical studies that use the SVF or ASCs isolated from lipoaspirate (Pikuła, Marek-Trzonkowska, Wardowska, Renkielska, & Trzonkowski, 2013). No adverse effects have been reported so far (Lindroos et al., 2011). Besides, ASCs find application in the field of plastic surgery, such as for soft tissue augmentation (Yoshimura et al., 2008) or the repair of chronic wounds (Rigotti et al., 2007). One of the most important questions regarding clinical use of stem cells is their safety in the context of tumorigenesis. To date, no malignant transformation of injected ASCs has been reported in human trials (Pikuła et al., 2013). In conclusion, we would like to encourage the use of fibrin glue as scaffold in cell based therapeutic applications as it is clinically approved, biocompatible, and preserves high cell viability. We suggest the use of fibrin gel scaffolds seeded with isolated SVF of lipoaspirate from the patient in a clinical setting. A possible application may be the treatment of critically sized peripheral nerve defects.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared that there is no conflict of interest.

ORCID

Maximilian Michael Saller  <https://orcid.org/0000-0001-8774-7892>

REFERENCES

- Ahmed, T. A. E., Dare, E. V., & Hincke, M. (2008). Fibrin: A versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 14, 199–215. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2007.0435>
- Albala, D. M. (2003). Fibrin sealants in clinical practice. *Cardiovascular Surgery*, 11(Suppl 1), 5–11. [https://doi.org/10.1016/S0967-2109\(03\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0967-2109(03)00065-6)
- Bourin, P., Bunnell, B., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., ... Gimble, J. M. (2014). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International S. *Cytotherapy*, 15, 641–648.
- Brown, A., & Barker, T. (2014). Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomaterialia*, 10(4), 1502–1514. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.008>
- Carriel, V., Garrido-Gómez, J., Hernández-Cortés, P., Garzón, I., García-García, S., Sáez-Moreno, J. A., ... Alaminos, M. (2013). Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Journal of Neural Engineering*, 10, 26022, 026022. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/10/2/026022>
- Chen, Y. L., Sun, C. K., Tsai, T. H., Chang, L. T., Leu, S., Zhen, Y. Y., ... Yip, H. K. (2015). Adipose-derived mesenchymal stem cells embedded in platelet-rich fibrin scaffolds promote angiogenesis, preserve heart function, and reduce left ventricular remodeling in rat acute myocardial infarction. *American Journal of Translational Research*, 7, 781–803.
- Chung, H.-M., Won, C.-H., & Sung, J.-H. (2009). Responses of adipose-derived stem cells during hypoxia: Enhanced skin-regenerative potential. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9, 1499–1508. <https://doi.org/10.1517/14712590903307362>
- De la Puente, P., & Ludeña, D. (2014). Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Experimental Cell Research*, 322, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.12.017>

- Di Summa, P. G., Kalbermatten, D. F., Pralong, E., Raffoul, W., Kingham, P. J., & Terenghi, G. (2011). Long-term in vivo regeneration of peripheral nerves through bioengineered nerve grafts. *Neuroscience*, 181, 278–291. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.02.052>
- Di Summa, P. G., Kingham, P. J., Raffoul, W., Wiberg, M., Terenghi, G., & Kalbermatten, D. F. (2010). Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 63, 1544–1552. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2009.09.012>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., ... Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Even-Ram, S., & Yamada, K. (2005). Cell migration in 3D matrix. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(5), 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.cceb.2005.08.015>
- Gimble, J. M., Bunnell, B. A., Chiu, E. S., & Guilak, F. (2011). Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: Let's not get lost in translation. *Stem Cells*, 29, 749–754. <https://doi.org/10.1002/stem.629>
- Gir, P., Oni, G., Brown, S., Mojallal, A., & Rohrich, R. J. (2012). Human adipose stem cells: Current clinical applications. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 129, 1277–1290. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31824ecae6>
- Gonzalez-Rey, E., Gonzalez, M., Varela, N., O'Valle, F., Hernandez-Cortes, P., Rico, L., ... Delgado, M. (2010). Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69, 241–248. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.101881>
- Hakkinen, K. M., Harunaga, J. S., Doyle, A. D., & Yamada, K. M. (2011). Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. *Tissue Engineering. Part A*, 17, 713–724. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0273>
- Krug, C., Beer, A., Saller, M., Aszodi, A., Holzbach, T., Giunta, R. E., & Volkmer, E. (2016). Isolation and characterization of multipotent precursor cells from murine adipose tissue using a clinically approved cell separation system. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie*, 48, 87–94.
- Lee, E. Y., Xia, Y., Kim, W.-S., Kim, M. H., Kim, T. H., Kim, K. J., ... Sung, J. H. (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 and Regeneration*, 17, 540–547. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00499.x>
- Li, Y., Meng, H., Liu, Y., & Lee, B. P. (2015). Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering. *Scientific World Journal*, 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/685690>
- Lindroos, B., Suuronen, R., & Miettinen, S. (2011). The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7, 269–291. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9193-7>
- Lynn, A. K., Yannas, I. V., & Bonfield, W. (2004). Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*, 71, 343–354.
- Macasev, D., Diorio, J. P., Gugerell, A., Goppelt, A., Gulle, H., & Bittner, M. (2011). Cell compatibility of fibrin sealants: In vitro study with cells involved in soft tissue repair. *Journal of Biomaterials Applications*, 26, 129–149. <https://doi.org/10.1177/0885328210369574>
- Malafaya, P. B., Silva, G. A., & Reis, R. L. (2007). Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 207–233. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.012>
- Mankad, P. S., & Codispoli, M. (2001). The role of fibrin sealants in hemostasis. *American Journal of Surgery*, 182, 21S–28S. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(01\)00773-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(01)00773-5)
- Mazo, M., Gavira, J. J., Pelacho, B., & Prosper, F. (2011). Adipose-derived stem cells for myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 4, 145–153. <https://doi.org/10.1007/s12265-010-9246-y>
- Meza-Zepeda, L. A., Noer, A., Dahl, J. A., Micci, F., Myklebost, O., & Collas, P. (2008). High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12, 553–563. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00146.x>
- Noël, D., Caton, D., Roche, S., Bony, C., Lehmann, S., Casteilla, L., ... Cousin, B. (2008). Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Experimental Cell Research*, 314, 1575–1584. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.12.022>
- Ozpur, M. A., Guneren, E., Canter, H. I., Karaaltin, M. V., Ovali, E., Yogun, F. N., ... Kaplan, S. (2016). Generation of skin tissue using adipose tissue-derived stem cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 137, 134–143. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000001927>
- Pikuła, M., Marek-Trzonkowska, N., Wardowska, A., Renkielska, A., & Trzonkowski, P. (2013). Adipose tissue-derived stem cells in clinical applications. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13, 1357–1370. <https://doi.org/10.1517/14712598.2013.823153>
- Reichenberger, M. A., Mueller, W., Hartmann, J., Diehm, Y., Lass, U., Koellensperger, E., ... Fischer, S. (2015). ADSCs in a fibrin matrix enhance nerve regeneration after epineural suturing in a rat model. *Microsurgery*, 36(6), 491–500. <https://doi.org/10.1002/micr.30018>
- Reid, A. J., Sun, M., Wiberg, M., Downes, S., Terenghi, G., & Kingham, P. J. (2011). Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis. *Neuroscience*, 199, 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.09.064>
- Rigotti, G., Marchi, A., Galiè, M., Baroni, G., Benati, D., Krampera, M., ... Sbarbati, A. (2007). Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: A healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 119, 1409–1422. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000256047.47909.71>
- Ryu, H. H., Lim, J. H., Byeon, Y. E., Park, J. R., Seo, M. S., Lee, Y. W., ... Kweon, O. K. (2009). Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *Journal of Veterinary Science*, 10, 273–284. <https://doi.org/10.4142/jvs.2009.10.4.273>
- Sahni, A., & Francis, C. W. (2000). Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood*, 96, 3772–3778.
- Saller, M. M., Prall, W. C., Docheva, D., Schönlitzer, V., Popov, T., Anz, D., ... Polzer, H. (2012). Increased stemness and migration of human mesenchymal stem cells in hypoxia is associated with altered integrin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.134>
- Sameem, M., Wood, T. J., & Bain, J. R. (2011). A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 127, 2381–2390. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3182131cf5>
- Sternlicht, M., & Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 463–516. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.463>
- Stoppel, W. L., Ghezzi, C. E., McNamara, S. L., Black, L. D. 3rd, & Kaplan, D. L. (2015). Clinical applications of naturally derived biopolymer-based scaffolds for regenerative medicine. *Annals of Biomedical Engineering*, 43, 657–680. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1206-2>
- Volkmer, E., Otto, S., Polzer, H., Saller, M., Trappendrehre, D., Zagar, D., ... Schieker, M. (2012). Overcoming hypoxia in 3D culture systems for tissue engineering of bone in vitro using an automated, oxygen-triggered feedback loop. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 23, 2793–2801. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4725-0>
- Wei, Y., Hu, N., Wang, H., Wu, Y., Deng, L., & Qi, J. (2009). Cartilage regeneration of adipose-derived stem cells in a hybrid scaffold from fibrin-

6. Literaturverzeichnis

- [1] A. J. Friedenstein, K. V Petrakova, A. I. Kurolesova, and G. P. Frolova, "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.," *Transplantation*, vol. 6, no. 2, pp. 230–247, Mar. 1968.
- [2] P. Vanhelleputte, K. Nijs, M. Delforge, G. Evers, and S. Vanderschueren, "Pain during bone marrow aspiration: Prevalence and prevention.," *J. Pain Symptom Manage.*, vol. 26, no. 3, pp. 860–866, 2003.
- [3] K. C. Elahi, G. Klein, M. Avci-Adali, K. D. Sievert, S. Macneil, and W. K. Aicher, "Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns.," *Stem Cells Int.*, vol. 2016, no. Figure 1, 2016.
- [4] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, a Keating, D. Prockop, and E. Horwitz, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.," *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–7, 2006.
- [5] M. A. Ozpur, E. Guneren, H. I. Canter, M. V. Karaaltin, E. Ovali, F. N. Yogun, E. G. Baygol, and S. Kaplan, "Generation of Skin Tissue Using Adipose Tissue-Derived Stem Cells.," *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 137, no. 1, pp. 134–143, 2016.
- [6] P. Zuk, M. Zhu, and H. Mizuno, "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.," *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 2, pp. 211–228, 2001.
- [7] P. A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim, and M. H. Hedrick, "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. 12, pp. 4279–95, Dec. 2002.
- [8] J. M. Gimble, "Adipose tissue-derived therapeutics.," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 3, no. 5, pp. 705–713, 2003.

- [9] H. Bansal, K. Comella, J. Leon, P. Verma, D. Agrawal, P. Koka, and T. Ichim, "Intra-articular injection in the knee of adipose derived stromal cells (stromal vascular fraction) and platelet rich plasma for osteoarthritis.," *J. Transl. Med.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [10] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak, "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells.," *Science*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–147, 1999.
- [11] M. J. Oedayrajsingh-Varma, S. M. van Ham, M. Knippenberg, M. N. Helder, J. Klein-Nulend, T. E. Schouten, M. J. P. F. Ritt, and F. J. van Milligen, "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure.," *Cytotherapy*, vol. 8, no. 2, pp. 166–177, 2006.
- [12] M. Pikuła, N. Marek-Trzonkowska, A. Wardowska, A. Renkielska, and P. Trzonkowski, "Adipose tissue-derived stem cells in clinical applications.," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 13, no. 10, pp. 1357–1370, 2013.
- [13] J. K. Fraser, I. Wulur, Z. Alfonso, and M. H. Hedrick, "Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology.," *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 4, pp. 150–154, 2006.
- [14] M. Witkowska-Zimny and K. Walenko, "Stem cells from adipose tissue.," *Cell. Mol. Biol. Lett.*, vol. 16, no. 2, pp. 236–257, 2011.
- [15] B. Lindroos, R. Suuronen, and S. Miettinen, "The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine.," *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 7, no. 2, pp. 269–291, 2011.
- [16] Y. Kuroda, T. Matsumoto, S. Hayashi, S. Hashimoto, K. Takayama, S. Kirizuki, M. Tsubosaka, T. Kamenaga, Y. Takashima, T. Matsushita, T. Niikura, and R. Kuroda, "Intra-articular autologous uncultured adipose-derived stromal cell transplantation inhibited the progression of cartilage degeneration.," *J. Orthop. Res.*, pp. 1–11, 2018.
- [17] M. Mazo, J. J. Gavira, B. Pelacho, and F. Prosper, "Adipose-derived stem cells for myocardial infarction.," *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 145–153, Apr. 2011.
- [18] M. Mazo, S. Hernández, J. J. Gavira, G. Abizanda, M. Araña, T. López-Martínez, C.

- Moreno, J. Merino, A. Martino-Rodríguez, A. Uixeira, J. A. G. De Jalón, J. Pastrana, D. Martínez-Caro, and F. Prósper, "Treatment of Reperfused Ischemia with Adipose-Derived Stem Cells in a Preclinical Swine Model of Myocardial Infarction.," *Cell Transplant.*, vol. 21, no. 12, pp. 2723–2733, 2012.
- [19] M. A. Ozpur, E. Guneren, H. I. Canter, M. V. Karaaltin, E. Ovali, F. N. Yogun, E. G. Baygol, and S. Kaplan, "Generation of skin tissue using adipose tissue-derived stem cells.," *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 137, no. 1, pp. 134–143, 2016.
- [20] Y. Wei, N. Hu, H. Wang, Y. Wu, L. Deng, and J. Qi, "Cartilage regeneration of adipose-derived stem cells in a hybrid scaffold from fibrin-modified PLGA.," *Cell Transplant.*, vol. 18, no. 2, pp. 159–170, 2009.
- [21] M. M. Saller, R. E. Huettl, J. M. Mayer, A. Feuchtinger, C. Krug, T. Holzbach, and E. Volkmer, "Validation of a novel animal model for sciatic nerve repair with an adipose-derived stem cell loaded fibrin conduit.," *Neural Regen. Res.*, vol. 13, no. 5, pp. 854–861, 2018.
- [22] M. A. Reichenberger, W. Mueller, J. Hartmann, Y. Diehm, U. Lass, E. Koellensperger, U. Leimer, G. Germann, and S. Fischer, "ADSCs in a fibrin matrix enhance nerve regeneration after epineural suturing in a rat model.," *Microsurgery*, vol. 36, no. 6, pp. 491–500, Sep. 2016.
- [23] P. G. di Summa, D. F. Kalbermatten, E. Pralong, W. Raffoul, P. J. Kingham, and G. Terenghi, "Long-term in vivo regeneration of peripheral nerves through bioengineered nerve grafts.," *Neuroscience*, vol. 181, pp. 278–291, 2011.
- [24] L. E. Kokai, K. Marra, and J. P. Rubin, "Adipose stem cells: Biology and clinical applications for tissue repair and regeneration.," *Transl. Res.*, vol. 163, no. 4, pp. 399–408, 2014.
- [25] A. Bajek, N. Gurtowska, J. Olkowska, L. Kazmierski, M. Maj, and T. Drewa, "Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies.," *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).*, pp. 85–92, 2016.
- [26] J. Panés, D. García-Olmo, G. Van Assche, J. F. Colombel, W. Reinisch, D. C. Baumgart, A.

- Dignass, M. Nachury, M. Ferrante, L. Kazemi-Shirazi, J. C. Grimaud, F. de la Portilla, E. Goldin, M. P. Richard, A. Leselbaum, and S. Danese, "Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial.," *Lancet*, vol. 388, no. 10051, pp. 1281–1290, 2016.
- [27] E. Díez-Tejedor, M. Gutiérrez-Fernández, P. Martínez-Sánchez, B. Rodríguez-Frutos, G. Ruiz-Ares, M. L. Lara, and B. F. Gimeno, "Reparative therapy for acute ischemic stroke with allogeneic mesenchymal stem cells from adipose tissue: A safety assessment: A phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, pilot clinical trial.," *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, vol. 23, no. 10, pp. 2694–2700, 2014.
- [28] M. Kuzma-Kozakiewicz, A. Marchel, A. Kaminska, M. Gawel, J. Sznajder, A. Figiel-Dabrowska, A. Nowak, E. Maj, N. E. Krzesniak, B. H. Noszczyk, K. Domanska-Janik, and A. Sarnowska, "Intraspinal Transplantation of the Adipose Tissue-Derived Regenerative Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis in Accordance with the Current Experts' Recommendations: Choosing Optimal Monitoring Tools.," *Stem Cells Int.*, vol. 2018, pp. 1–16, 2018.
- [29] J. W. Hur, T.-H. Cho, D.-H. Park, J.-B. Lee, J.-Y. Park, and Y.-G. Chung, "Intrathecal transplantation of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells for treating spinal cord injury: A human trial.," *J. Spinal Cord Med.*, vol. 39, no. 6, pp. 655–664, 2016.
- [30] G. Rigotti, A. Marchi, M. Galiie, G. Baroni, D. Benati, M. Krampera, A. Pasini, and A. Sbarbati, "Clinical Treatment of Radiotherapy Tissue Damage by Lipoaspirate Transplant: A Healing Process Mediated by Adipose-Derived Adult Stem Cells.," *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 119, no. 5, pp. 1409–1422, Apr. 2007.
- [31] K. Yoshimura, K. Sato, N. Aoi, M. Kurita, T. Hirohi, and K. Harii, "Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: Supportive use of adipose-derived stem/stromal cells.," *Aesthetic Plast. Surg.*, vol. 32, no. 1, pp. 48–55, 2008.
- [32] S. F. T. Kølle, A. Fischer-Nielsen, A. B. Mathiasen, J. J. Elberg, R. S. Oliveri, P. V. Glovinski, J. Kastrup, M. Kirchhoff, B. S. Rasmussen, M. L. M. Talman, C. Thomsen, E. Dickmeiss, and K. T. Drzewiecki, "Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded

- adipose tissue-derived stem cells for graft survival: A randomised placebo-controlled trial.," *Lancet*, vol. 382, no. 9898, pp. 1113–1120, 2013.
- [33] S. K. Han, H. R. Kim, and W. K. Kim, "The treatment of diabetic foot ulcers with uncultured, processed lipoaspirate cells: A pilot study.," *Wound Repair Regen.*, vol. 18, no. 4, pp. 342–348, 2010.
 - [34] J. S. Holm, N. M. Toyserkani, and J. A. Sorensen, "Adipose-derived stem cells for treatment of chronic ulcers: Current status.," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2018.
 - [35] K. Comella, J. A. P. Blas, T. Ichim, J. Lopez, J. Limon, and R. C. Moreno, "Autologous Stromal Vascular Fraction in the Intravenous Treatment of End-Stage Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Phase I Trial of Safety and Tolerability.," *J. Clin. Med. Res.*, vol. 9, no. 8, pp. 701–708, 2017.
 - [36] K. Comella, J. Parcero, H. Bansal, J. Perez, J. Lopez, A. Agrawal, and T. Ichim, "Effects of the intramyocardial implantation of stromal vascular fraction in patients with chronic ischemic cardiomyopathy.," *J. Transl. Med.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–7, 2016.
 - [37] K. Siennicka, A. Zolocinska, K. Stepień, N. Lubina-Dabrowska, M. Maciagowska, E. Zolocinska, A. Słysz, R. Piusinska-Macoch, S. Mazur, U. Zdanowicz, R. Smigielski, A. Stepień, and Z. Pojda, "Adipose-Derived Cells (Stromal Vascular Fraction) Transplanted for Orthopedical or Neurological Purposes: Are They Safe Enough?," *Stem Cells Int.*, vol. 2016, 2016.
 - [38] P. A. Zuk, "The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, no. 11, pp. 1783–7, 2010.
 - [39] N. Kalinina, D. Kharlampieva, M. Loguinova, I. Butenko, O. Pobeguts, A. Efimenko, L. Ageeva, G. Sharonov, D. Ischenko, D. Alekseev, O. Grigorieva, V. Sysoeva, K. Rubina, V. Lazarev, and V. Govorun, "Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes.," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, 2015.
 - [40] S. K. Kapur and A. J. Katz, "Review of the adipose derived stem cell secretome.,"

Biochimie, vol. 95, no. 12, pp. 2222–2228, 2013.

- [41] G. S. Schultz and A. Wysocki, “Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing,” *Wound Repair Regen.*, vol. 17, no. 2, pp. 153–162, 2009.
- [42] Y. Dor, I. Avraham, R. Abramovitch, M. Grunewald, E. Keshet, A. Itin, E. Bachar-Lustig, L. Landsman, S. Yung, and S. Chimenti, “VEGF-Induced Adult Neovascularization: Recruitment, Retention, and Role of Accessory Cells,” *Cell*, vol. 124, no. 1, pp. 175–189, 2006.
- [43] E. Gonzalez-Rey, M. a Gonzalez, N. Varela, F. O’Valle, P. Hernandez-Cortes, L. Rico, D. Büscher, and M. Delgado, “Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 69, no. 1, pp. 241–248, 2010.
- [44] B. Puissant, C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, L. Penicaud, L. Casteilla, and A. Blancher, “Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells,” *Br. J. Haematol.*, vol. 129, no. 1, pp. 118–129, 2005.
- [45] A. A. Leto Barone, S. Khalifian, W. P. A. Lee, and G. Brandacher, “Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells: Fact or fiction?,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, 2013.
- [46] S. R. Smith, J. C. Rood, L. E. Roan, M. Pasarica, D. C. Albarado, L. M. Redman, O. R. Sereda, D. H. Burk, and D. T. Hymel, “Reduced Adipose Tissue Oxygenation in Human Obesity: Evidence for Rarefaction, Macrophage Chemotaxis, and Inflammation Without an Angiogenic Response,” *Diabetes*, vol. 58, no. 3, pp. 718–725, 2008.
- [47] W. Mutschler, H. Polzer, S. Otto, B. C. Kallukalam, M. Schieker, M. Stengele, J. Maertz, E. Volkmer, W. Bocker, I. Drosse, and D. Docheva, “Hypoxic Preconditioning of Human Mesenchymal Stem Cells Overcomes Hypoxia-Induced Inhibition of Osteogenic Differentiation,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, no. 1, pp. 153–164, 2009.
- [48] C. Krug, A. Beer, M. Saller, A. Aszodi, T. Holzbach, R. Giunta, and E. Volkmer, “Isolation und Charakterisierung von multipotenten Vorläuferzellen aus murinem Fettgewebe

- mithilfe eines klinisch zugelassenen Aufbereitungssystems.," *Handchirurgie · Mikrochirurgie · Plast. Chir.*, vol. 48, no. 02, pp. 87–94, 2016.
- [49] J. R. Choi, B. Pingguan-Murphy, W. A. B. Wan Abas, M. A. Noor Azmi, S. Z. Omar, K. H. Chua, and W. K. Z. Wan Safwani, "Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 448, no. 2, pp. 218–224, 2014.
- [50] E. Y. Lee, Y. Xia, W.-S. Kim, M. H. Kim, T. H. Kim, K. J. Kim, B.-S. Park, and J.-H. Sung, "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.*, vol. 17, no. 4, pp. 540–547, 2009.
- [51] N. Kakudo, N. Morimoto, T. Ogawa, S. Taketani, and K. Kusumoto, "Hypoxia enhances proliferation of human adipose-derived stem cells via HIF-1 α activation.," *PLoS One*, vol. 10, no. 10, pp. 1–14, 2015.
- [52] H. Thangarajah, I. N. Vial, E. I. E. Chang, S. El-Ftesi, M. Januszyk, E. I. E. Chang, J. Paterno, E. Neofytou, M. T. Longaker, and G. C. Gurtner, "IFATS collection: Adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia.," *Stem Cells*, vol. 27, no. 1, pp. 266–74, 2009.
- [53] M. Rodbell, "Metabolism of Isolated Fat Cells, I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis.," *J. Biol. Chem.*, vol. 239, no. 1, pp. 375–380, 1964.
- [54] P. Zuk, M. Zhu, and H. Mizuno, "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.," *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 2, pp. 211–228, 2001.
- [55] I. Muiznieks, U. Riekstina, G. Jankovskis, J. Ancans, R. Muceniece, M. Hoogduijn, I. Cakstina, and V. Parfejevs, "Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis.," *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 5, no. 4, pp. 378–386, 2009.
- [56] N. K. Dubey, V. K. Mishra, R. Dubey, Y. H. Deng, F. C. Tsai, and W. P. Deng, "Revisiting the advances in isolation, characterization and secretome of adipose-derived stromal/stem cells.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 8, pp. 1–23, 2018.

- [57] C. T. Chia, R. M. Neinstein, and S. J. Theodorou, "Evidence-Based Medicine: Liposuction.," *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 139, no. 1, p. 267e–274e, Jan. 2017.
- [58] B. Bunnell, M. Flaate, G. C. B. Patel, and C. Ripoll, "Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 45, no. 2, pp. 115–120, 2008.
- [59] E. Oberbauer, C. Steffenhagen, C. Wurzer, C. Gabriel, H. Redl, and S. Wolbank, "Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art.," *Cell Regen.*, vol. 4, p. 7, 2015.
- [60] C. F. Markarian, G. Z. Frey, M. D. Silveira, E. M. Chem, A. R. Milani, P. B. Ely, A. P. Horn, N. B. Nardi, and M. Camassola, "Isolation of adipose-derived stem cells: A comparison among different methods.," *Biotechnol. Lett.*, vol. 36, no. 4, pp. 693–702, 2014.
- [61] InGeneron GmbH: "Medical Products - InGeneron.," 2018. URL: <http://ingeneron.com/products/medical-products/> [Abruf am 14.12.2018].
- [62] F. Rosso, G. Marino, A. Giordano, M. Barbarisi, D. Parmeggiani, and A. Barbarisi, "Smart materials as scaffolds for tissue engineering.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 203, no. 3, pp. 465–470, 2005.
- [63] P. De la Puente and D. Ludeña, "Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering.," *Exp. Cell Res.*, vol. 322, no. 1, pp. 1–11, 2014.
- [64] T. L. B. Ha, T. M. Quan, D. N. Vu, and D. M. Si, "Naturally Derived Biomaterials: Preparation and Application.," *Regen. Med. Tissue Eng.*, pp. 247–274, 2013.
- [65] P. B. Malafaya, G. A. Silva, and R. L. Reis, "Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 4–5, pp. 207–233, May 2007.
- [66] T. A. E. Ahmed, E. V. Dare, and M. Hincke, "Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications.," *Tissue Eng. Part B. Rev.*, vol. 14, no. 2, pp. 199–215, Jun. 2008.
- [67] Y. Li, H. Meng, Y. Liu, and B. P. Lee, "Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering.," *Sci. World J.*, vol. 2015, 2015.

- [68] A. C. Brown and T. H. Barker, "Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level.," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 4, pp. 1502–1514, 2014.
- [69] E. Chung, J. A. Rytlewski, A. G. Merchant, K. S. Dhada, E. W. Lewis, and L. J. Suggs, "Fibrin-based 3D matrices induce angiogenic behavior of adipose-derived stem cells.," *Acta Biomater.*, vol. 17, pp. 78–88, Apr. 2015.
- [70] C. D. Anderson JM, Rodriguez A, "Foreign body reaction to biomaterials.," *Semin Immunol*, vol. 20, no. 2, pp. 86–100, 2008.
- [71] M. R. Jackson, "Fibrin sealants in surgical practice: An overview.," *Am. J. Surg.*, vol. 182, no. 2 SUPPL. 1, 2001.
- [72] D. M. Albala, "Fibrin sealants in clinical practice.," *Cardiovasc. Surg.*, vol. 11 Suppl 1, pp. 5–11, Aug. 2003.
- [73] Y. Kim, D. Kym, Y. S. Cho, J. Yoon, and H. Yim, "Use of Fibrin Sealant for Split-Thickness Skin Grafts in Patients with Hand Burns : A Prospective Cohort Study.," vol. 0, no. December, pp. 1–5, 2018.
- [74] K. L. Christman, H. H. Fok, R. E. Sievers, Q. Fang, and R. J. Lee, "Fibrin Glue Alone and Skeletal Myoblasts in a Fibrin Scaffold Preserve Cardiac Function after Myocardial Infarction.," *Tissue Eng.*, vol. 10, no. 3–4, pp. 403–409, 2004.
- [75] O. Cakmak, S. T. Babakurban, H. G. Akkuzu, S. Bilgi, E. Ovali, M. Kongur, H. Altintas, B. Yilmaz, B. Bilezikçi, Z. Y. Celik, M. C. Yakicier, and F. I. Sahin, "Injectable tissue-engineered cartilage using commercially available fibrin glue.," *Laryngoscope*, vol. 123, no. 12, pp. 2986–2992, 2013.
- [76] E. A. Wahl, F. A. Fierro, T. R. Peavy, U. Hopfner, J. F. Dye, H. G. Machens, J. T. Egaña, and T. L. Schenck, "In Vitro Evaluation of Scaffolds for the Delivery of Mesenchymal Stem Cells to Wounds.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.

7. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei PD Dr. med. Elias Volkmer, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Vielen Dank für die Unterstützung und die enge Betreuung von Anfang bis Ende dieser Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Maximilian Saller danke ich besonders für die Themastellung, seine ständige Hilfsbereitschaft und die ausgezeichnete Betreuung, mit Hilfe derer ich die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens erlernen konnte.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe des ExperiMed für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinen Eltern und Schwestern möchte ich mich ganz besonders bedanken für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.