

Aus der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie
des Deutschen Herzzentrums Berlin

DISSERTATION

MSC-Mikroverkapselung in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel zur Potenzierung
von additionalen Stammzell-Therapieverfahren beim akuten Myokardinfarkt

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Farina Aline Luca Löper

aus Berlin

Datum der Promotion: 23.06.2019

VORWORT

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden im September 2017 in der 67. Ausgabe des internationalen wissenschaftlichen Journals „Clinical hemorheology and microcirculation“ publiziert.

 INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
ABSTRAKT	8
ABSTRACT	9
1. EINLEITUNG	10
1.1 Akuter Myokardinfarkt	10
1.1.1 Epidemiologie	10
1.1.2 Pathophysiologie und Klinik	10
1.1.3 Konventionelle Therapie	11
1.2 Stammzelltherapie	11
1.2.1 Grundlagen und Verfahren	11
1.2.2 Mesenchymale Stammzellen	12
1.2.2.1 Herkunft und allgemeine Charakteristika	12
1.2.2.2 Immunmodulation	13
1.2.2.3 Proangiogenetisches und anti-apoptotisches Potenzial	15
1.2.2.4 Unterschiede zwischen verschiedenen MSC-Populationen	16
1.3 Biomaterialien	18
1.3.1 Optimierung der Stammzelltherapie durch den Einsatz von Biomaterial	18
1.3.2 Mikroverkapselung zur Stammzelltransplantation	18
1.3.3 Herstellung von Mikrokapseln aus GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel	19
1.3.4 Modifikation der Mikrokapselzusammensetzung durch Dextransulfat	20
1.3.5 Methoden der zellulären Verkapselung	21
2. ZIELSETZUNG	22
3. MATERIAL UND METHODIK	23
3.1 Verwendete Materialien	23
3.1.1 Gelatine - als Grundlage Hydrogel-basierter Mikrokapseln	23
3.1.1.1 Eigenschaften	23
3.1.1.2 Funktionalisierung der Gelatine	23
3.1.1.3 Herstellung der GMA-Gelatine-Lösungen	23
3.1.2 Dextransulfat - supplementiertes Biopolymer zur Generierung hybrider Mikrokapseln	24
3.2 Zellkultur	24
3.2.1 MSC	24

3.2.2 L929-Fibroblasten	24
3.2.3 HUVEC	25
3.2.4 Kryokonservierung und Auftauen	25
3.3 Zelluläre Verkapselung	25
3.3.1 Herstellung der Zell-beladenen Mikrokapseln	25
3.3.2 Bestimmung der mittleren Mikrokapselgröße	28
3.3.3 Ermittlung der Zellverkapselungseffizienz	28
3.3.4 Evaluation der Viabilität verkapselter Zellen	29
3.4 MSC-konditioniertes Medium	29
3.4.1 Herstellung des konditionierten Mediums	29
3.4.2 Evaluation der sezernierten Zytokine	30
3.4.3 Angiogenetische Wirkung des konditionierten Mediums	31
3.2 Statistische Auswertung	32
4. ERGEBNISSE	33
4.1 Zellverkapselung	33
4.1.1 L929-Fibroblasten	33
4.1.1.1 Zelluläre Viabilität - Tag 1 und 7	33
4.1.1.2 Mittlere Mikrokapselgröße	36
4.1.1.3 Zellverkapselungseffizienz	37
4.1.2 MSC	37
4.1.2.1 Zelluläre Viabilität und Zellmasse - Tag 1	37
4.1.2.1.1 BM-MS	39
4.1.2.1.2 CB-MS	40
4.1.2.1.3 AD-SC	41
4.1.2.2 Zelluläre Viabilität und Zellmasse - Tag 7	42
4.1.2.2.1 BM-MS	44
4.1.2.2.2 CB-MS	46
4.1.2.2.3 AD-SC	48
4.1.2.3 Morphologischer Vergleich verkapselter MSC zwischen Follow-up Tag 1. und 7.	49
4.1.2.4 MSC-Biomaterial-Interaktion in Abhängigkeit vom ursprünglichen Grundgewebe	49
4.2 Zytokin-Sekretionsprofil verkapselter MSC	50
4.3 Proangiogenetische parakrine Aktivität	55
5. DISKUSSION	58
5.1 Therapeutische MSC-Transplantation	58
5.2 L929-Verkapselung in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel	63
5.3 MSC-beladene Hydrogel-Kapseln	65
5.4 Verkapselte MSC-Sekretion	68
5.5 Angiogenese-Induktion nach MSC-Verkapselung	71

5.6 Abhängigkeit des Therapieeffekts vom MSC-Ursprungsgewebe	72
6. ZUSAMMENFASSUNG	74
7. LITERATURVERZEICHNIS	76
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	84
9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	85
10. ANTEILSERKLÄRUNG	86
11. LEBENSLAUF	87
9.1 Bildungswesen	87
9.2 Akademische Laufbahn	87
9.3 Publikationen	87
12. DANKSAGUNG	88

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMI	Akuter Myokardinfarkt
MSC	Mesenchymale Stammzellen
GMA	Glycidylmethacrylat
CD	Cluster of Differentiation
HLA	Humanes Leukozytenantigen
TNF	Tumornekrosefaktor
IFN	Interferon
IL	Interleukin
TLR	Toll-like Rezeptor
TGF	Transforming Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
bFGF	Basal Fibroblast Growth Factor
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
SDF	Stromal Cell-Derived Factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PIGF	Placental Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
Ang	Angiopoietin
IGF	Insulin Growth Factor
Bcl	B-Cell Lymphoma
Akt	Proteinkinase B
AD-SC	Adipose Tissue-Derived Stem Cells
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
CB-MSC	Cord Blood Mesenchymal Stem Cells
BM-MSC	Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
UV	Ultraviolett
DxS	Dextransulfat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
MEM	Minimum Essential Medium
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
EGM	Endothelial Cell Growth Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
AC	Einfach autoklaviert
2xAC	Zweifach autoklaviert
EBM	Endothelial Basal Medium
CM	konditioniertes Medium
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HRP	Horseradish Peroxidase
ATP	Adenosintriphosphat
EGF	Epidermal Growth Factor
uPAR	Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor
USPIO	Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide
MRT	Magnetresonanztomographie
CHI3L1	Chitinase 3 Like 1
Dkk-1	Dickkopf-related Protein 1

ABSTRAKT

Als neuartige therapeutische Option des AMI, sieht sich das adulte Stammzell-basierte Therapieverfahren mit einem geringen lokalen Verbleib und Überleben nach zellulärem Transfer konfrontiert. Das herabgesetzte Engraftment und die niedrige Viabilität der Stammzellen im infarzierten Myokardgewebe tragen zu einer erheblichen Reduktion des zu beobachtenden Behandlungserfolgs bei und hindern eine aussichtsreiche Etablierung in der klinischen Praxis. Mit dem Einsatz von Biomaterialien ist den Limitationen abzuhelfen, indem eine örtliche Immobilisation gegeben wird und gleichzeitig transplantierte Stammzellen eine Unterstützung erfahren. Einer minimal-invasiven Injektionsapplikation zugänglich, verspricht die Herstellung von biokompatiblen und biodegradierbaren Hydrogel-basierten Mikrokapseln eine Verfahrensoptimierung der Stammzelltherapie herbeizuführen. Folglich wurde ein Zellverkapselungsprozess unter dem Einsatz von GMA-funktionalisierter Gelatine entwickelt, die dank photochemischer Induktion eine kontrollierte Gelierung vollzieht und zur Herstellung Zell-beladener sphärischer Partikel im Mikrometerbereich befähigt. Nach der erfolgreichen Verkapselung von Fibroblasten in GMA-Gelatine mit optimierten mechano-elastischen Eigenschaften resultierender Hydrogel-Kapseln wurden hybride Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Supplementation produziert und auf eine Eignung zur MSC-Verkapselung getestet. Eine deutliche Zunahme des Anteils vitaler Stammzellen war unter Verwendung von GMA-Gelatine mit zugesetztem DxS ersichtlich, sodass von einer verbesserten Interaktion der Zellen mit der mikrokapsulären Matrix auszugehen ist. Im 7-tägigen Follow-up war eine höhere Zellviabilität sowie vermehrte mittlere zelluläre Masse der MSC-beladenen Mikrokapseln unter Applikation von Gelatine-Lösung mit DxS-Zugabe zu bestätigen. Das partielle Bestreben der verkapselten Stammzellen vom Inneren der Mikrokapseln an die Oberfläche der Hydrogel-Kapsel zu migrieren verweist ferner auf eine Optimierung der Zusammensetzung des implantierbaren Werkstoffs. Das analysierte Sekretom der verkapselten Stammzellen lässt auf einen Erhalt sekretorischer Aktivität schließen, gleichfalls konnte eine proangiogenetische Wirkung freigesetzter Signalmoleküle nachgewiesen werden. Schließlich präsentiert sich GMA-Gelatine-basiertes Hydrogel mit DxS-Zusatz als erfolgsversprechendes Biomaterial, das eine Anwendung in Mikroverkapselungsverfahren von Stammzellen findet und somit die zelluläre Transplantation infolge myokardialer Ischämie potenziert.

ABSTRACT

As a novel treatment option for acute myocardial infarction, stem cell-based therapy faces the challenge of low cell retention and survival upon transfer. Limited engraftment and viability of stem cells in the infarct zone markedly reduces the observable treatment success and hinders a promising establishment in clinical practice. To address the aforementioned restrictions, the application of tissue-engineered constructs grant local immobilization as well as support of transplanted stem cells. Accessible for minimally invasive injectable cell delivery, biomaterial-derived microcapsules help enforce a procedural optimization of therapeutic approaches based on cellular transplantation. Hence, we report a technique to prepare biocompatible and biodegradable hydrogel-capsules of GMA-functionalized gelatin, controlledly induced to gel by photochemical polymerization and qualified to generate cell-laden spherical particles in the micrometer range. Following a successful encapsulation of fibroblasts in GMA-gelatin-based hydrogel with optimized mechanical-elastic properties, DxS supplemented hybride microcapsules of 10 wt% AC GMA-gelatin were produced and tested for suitability to encapsulate MSC. The evaluation of vital cell count revealed that the supplementation of DxS increased cellular viability of stem cells ensuing encapsulation. Accordingly, an enhancement in cell interaction with the surrounding micromatrix is assumable. At 7-day follow-up a higher viability and greater mean cellular mass of MSC-laden microcapsules with DxS add-on was confirmed. Partly observable attempts of stem cells to migrate out of the microcapsules and attach to the spherical surface, further indicated an improved biomaterial composition. The analyzed secretoma of encapsulated MSC implied a preservation of the secretory activities, likewise a proangiogenic effect of expressed signaling molecules was determined. In conclusion, GMA-gelatin-based hydrogels with added DxS represents an auspicious engineered biomaterial applicable for cell microencapsulation and consequently promoting cellular transplantation upon myocardial ischemia.

1. EINLEITUNG

1.1. Akuter Myokardinfarkt:

1.1.1. Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen gelten weltweit als die häufigste Todesursache und sind vorrangig auf eine ischämische koronararterielle Herzerkrankung zurückzuführen, die sich unvermittelt als akuter Myokardinfarkt präsentiert.^{1,2} Allein in Europa versterben jährlich 3,9 Millionen Menschen an kardiovaskulär-bedingten Krankheiten, entsprechend einem Anteil von 45% aller Todesursachen. Obwohl europaweit ein leichter Rückgang der Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen zu verzeichnen ist, nimmt die absolute Anzahl registrierter Fälle von kardiovaskulär-bedingten Krankheiten stetig zu. Ein konstanter Anstieg der krankenhäuslichen Entlassungsrate aufgrund behandlungsbedürftiger kardiovaskulärer Erkrankung ist zu beobachten. Bei der altersstandardisierten Prävalenz des Krankheitsbilds wird eine Abnahme festgestellt. Jedes Jahr werden schätzungsweise Kosten in Höhe von insgesamt 210 Milliarden Euro zu Lasten der europäischen Wirtschaft verursacht. Dabei entfallen auf das Gesundheitswesen rund 53%, auf den Produktivitätsverlust 26% und auf die informelle Betreuung und Pflege kardiovaskulärer erkrankter Patienten näherungsweise 21% der Ausgaben. Für die Therapie hospitalisierter Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen werden 57 Milliarden Euro ausgegeben, indessen belaufen sich die finanziellen Auslagen für deren Medikamente auf 28 Milliarden Euro. Hinsichtlich des demografischen Wandels mit zunehmender Alterung der Bevölkerung ist zukünftig mit einem Inzidenz-Anstieg kardiovaskulär-bedingter Krankheiten zu rechnen, der mit wachsenden sozioökonomischen Herausforderungen einhergeht.³

1.1.2. Pathophysiologie und Klinik

Ein AMI resultiert aus einer ischämischen Gewebhypoxie, die eine Schädigung der Kardiomyozyten hervorruft und bei Prolongation eine kardiomyozytäre Nekrose bedingt. Infolge einer abrupten myokardialen Perfusionsstörung aufgrund einer akuten Okklusion koronararterieller Blutgefäße kommt es zur kompletten Infarzierung der nicht perfundierten Gewebzonen. Das peri-infarzielle minderperfundierte Myokard ist hingegen gekennzeichnet durch eine reversible Schädigung, die einhergeht mit einer funktionellen Beeinträchtigung der Kardiomyozyten.⁴ Neben einem spontanen AMI infolge einer okkludierenden atherosklerotischen Plaqueruptur mit intraluminaler Thrombosierung resultiert eine myokardiale Infizierung gleichfalls aus einer ischämischen Imbalance aufgrund koronararterieller endothelialer Dysfunktion, Vasospasmus, Embolisation oder arterieller Hypotonie.^{4,5} Klinisch imponiert der AMI typischerweise durch Angina pectoris, als anfallsartig auftretende retrosternale Schmerzen. Teils manifestieren sich auch unspezifische Symptome wie epigastrische Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Dyspoe. Außerdem wird ein charakteristischer Anstieg von Troponin T und I festgestellt, die spezifische Serummarkern für myokardiale Nekrose darstellen. Des Weiteren werden eine signifikante ST-Strecken-Hebung, ein vermeintlich neu aufgetretener Linksschenkelblock oder pathologische Q-Wellen im Elektrokardiogramm diagnostiziert.

Echokardiographisch können neue myokardiale Wandbewegungsanomalien oder ein regionaler Verlust von kontraktilen Myokard auftreten.⁵

1.1.3. Konventionelle Therapie

Nach eindeutiger Diagnosestellung ist eine sofortige Reperfusionstherapie indiziert, die mechanisch mittels primärer perkutaner Koronarintervention oder alternativ als pharmakologische Thrombolyse erfolgen kann. Bei der interventionellen Wiederherstellung der myokardialen Perfusion wird dabei durch Ballondilatation oder Thrombektomie das entsprechende Blutgefäß revaskularisiert und zusätzlich eine Stentangioplastie durchgeführt. Die Indikation für eine koronare Bypass-Operation ergibt sich bei ungeeigneten anatomischen Voraussetzungen für die Durchführung einer primären perkutanen Koronarintervention oder bei nicht erfolgreicher mechanischer Reperfusion.^{5,6} Die zeitnahe Revaskularisierung der okkludierten Koronararterie reduziert die Ischämiezeit des betroffenen Myokards, wobei vornehmlich eine andauernde Hypoxie-bedingte Schädigung des peri-infarziellen Gewebes abgewandt und damit das Ausmaß des myokardialen Infarkts limitiert wird. Dennoch stellt sich post-AMI oftmals eine negative myokardiale Remodellierung ein, begleitet von exzentrischer ventrikulärer Hypertrophie und Dilatation.⁷ Während diese reaktiven Veränderungen kurzfristig eine Stabilisation der Myokardfunktion gewährleisten, ist langfristig mit einer Funktionseinschränkung und Dekompensation der Herzleistung zu rechnen. Im Verlauf treten eine progrediente ventrikuläre Dysfunktion und progressive Herzinsuffizienz auf. Auch in der akuten Phase kommt die myokardiale Funktionsstörung als transiente oder permanente Komplikation vor. Die systolische linksventrikuläre Dysfunktion kennzeichnet die primäre Folge eines AMI und zählt zu den eminenten Mortalitätsprädiktoren.^{5,8}

1.2. Stammzelltherapie

1.2.1. Grundlagen und Verfahren

Angesichts der ungünstigen Prognose der Infarkt-assoziierten myokardialen Remodellierung bietet sich die adulte Stammzell-basierte Therapie als neuartige therapeutische Option an, die einer Progression zur myokardialen Dysfunktion vorbeugen oder diese verhindern kann.⁹ Da keine effektive endogene Regenerationsfähigkeit des Myokards vorliegt, verspricht die Stammzelltherapie einen vielversprechenden Therapieansatz, der auf die Induktion von Neovaskularisation, Aktivierung und Rekrutierung von lokalen als auch extrakardialen Stamm- und Progenitorzellen, Inhibition von kardiomyozytärer Apoptose sowie Modulation der inflammatorischen und immunologischen Reaktion abzielt.⁹ Die Mechanismen der Stammzell-vermittelten myokardialen Regeneration sind hauptsächlich auf die Sekretion parakrin wirkender Signalmoleküle und auf die Signaltransduktion über Mikrovesikel oder Endosomen zurückzuführen. Darüber hinaus ist eine Transdifferenzierung der applizierten Stamm- und Progenitorzellen in Endothelzellen oder Kardiomyozyten denkbar, sodass als zelluläre Kardiomyoplastie ein funktioneller Ersatz für das Infarkt-geschädigte Gewebe gegeben ist.^{9,10} Die Transplantation der Stammzellen in das Myokard kann dabei via intrakoronarer Infusion, mittels Block-Ballon Technik oder intramyokardialer Injektion, appliziert von

endomyokardial dank eines Nadel-bestückten Katheters, im Rahmen einer perkutanen Koronarintervention erfolgen. Alternativ kann eine intramyokardiale Injektion der Stammzellen von epimyokardial während einer kardiochirurgischen Intervention erfolgen. Während eine intrakoronare Infusion eine Revaskularisation des okkludierten Blutgefäßes voraussetzt, kann eine intramyokardiale Injektion auch in der Therapie von nicht reperfundiertem Myokard Anwendung finden. Außerdem wird durch die direkte Injektion in das Myokard die endotheliale Adhäsion und Transmigration durch die Blutgefäßwand zur Extravasation der infundierten Stammzellen umgangen. Dementsprechend wird ebenfalls die Applikation von Stammzellen mit erhöhtem Zelldurchmesser möglich, die mit intrakoronarer Infusionsmethode nicht denkbar ist. Jedoch weist die Myokardinjektion auch eine höhere Invasivität im Vergleich zur intrakoronarer Infusion auf. Neben einer schonenden und sicheren Durchführbarkeit muss das gewählte Verfahren das lokale Engraftment der Stammzellen begünstigen.^{9,11} Das ischämische Myokardgewebe stellt ein hostiles Milieu dar, das sich durch erhöhten oxidativen Stress, erniedrigten pH-Wert, eine lokale Inflammation und den Verlust von extrazellulärer Matrix auszeichnet. Entsprechend gestörte Zell-Matrix-Interaktionen beeinträchtigen den Verbleib und induzieren die Anoikis der transplantierten Stammzellen im betroffenen Myokard. Zudem ist eine Adhäsion der Stammzellen aufgrund der kontinuierlichen myokardialen Kontraktion erschwert.⁹

1.2.2. Mesenchymale Stammzellen

1.2.2.1. Herkunft und allgemeine Charakteristika

Derzeit wurden bereits unterschiedliche Populationen von Stamm- und Progenitorzellen für den therapeutischen Einsatz beim AMI untersucht. Unter den bislang explorierten Zellpopulationen mit potentieller Anwendung in einem Stammzell-basierten Behandlungsverfahren haben sich mesenchymale Stammzellen aufgrund immunmodulatorischer, proangiogenetischer und anti-apoptotischer Wirkungen hervorgehoben. Der Wirkmechanismus der Stammzellen ist vorwiegend auf die sezernierten Signalmoleküle zurückzuführen. Das MSC-Sekretom besteht aus multiplen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die in einer löslichen Form oder innerhalb von Exosomen sowie in extrazellulären Vesikeln freigesetzt werden und einen parakrinen therapeutischen Effekt vorweisen.^{12,13} MSC stellen eine prototypische adulte Stammzellpopulation dar, die mesodermalen Ursprungs ist und sich durch einen niedrigen Differenzierungsgrad, eine Multipotenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung auszeichnet. Durch die Differenzierung der Stammzellen in lokale gewebetypische Zellen wird eine endogene Regeneration ermöglicht und folglich die Erhaltung des Gewebes gewährleistet.¹⁴ Zunächst wurden MSC aus dem stromalen Binde- und Stützgewebe des Knochenmarks isoliert, wobei sie anfänglich als eine Koloniebildende Einheit aus einer Fibroblasten-ähnlichen Zellpopulation definiert wurden.^{14,15} Die Isolation der multipotenten Stammzellen gelingt auch aus anderen Grundgewebearten, wobei die Lokalisation mehrheitlich der perivaskulären Nische des Stromas entspricht. Als gemeinsame Charakteristika sind die Adhärenz auf Plastikoberflächen unter gängigen Zellkulturkonditionen, die Expression der oberflächlichen zellulären Antigene CD73, CD90 und CD105 bei Fehlen von CD34, CD45, HLA-DR, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 sowie die Fähigkeit der in-vitro-Differenzierung in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten aufzuführen.¹⁴ In Abhängigkeit vom Ursprungsgewebe wurde zusätzlich die Differenzierung

in weitere sowohl mesenchymale als auch nicht-mesenchymale Zelltypen unter in-vitro-Konditionen beobachtet, wobei sich MSC auch in Endothelzellen und Kardiomyozyten differenzieren ließen. In-vivo ist das Differenzieren in Osteoblasten und Chondrozyten nach ektopter Transplantation von MSC nachgewiesen worden.¹⁴

Besonders bei niedriger Zellkulturdichte weisen die Stammzellen eine hohe Proliferationsrate auf, sodass dank rascher Expansion zeitnah hohe Zellzahlen erreicht werden, die für die Transplantation notwendig sind.¹⁶ In Zellkultur bilden MSC Zellkolonien, die jeweils aus einer einzelnen Stammzelle hervorgehen und morphologisch heterogene Zelltypen präsentieren. Neben großen flachen und spindelförmigen Stammzellen mit mäßig granuliertem Zytoplasma sind Subpopulationen von kleineren runden granulierten sowie agranulierten Zellen zu identifizieren. Im Vergleich zeigen die kleinen MSC sowohl eine höhere Proliferationsrate als auch eine gesteigerte Fähigkeit zur multipotenten Differenzierung.¹⁷ Des Weiteren lassen sich Unterschiede in der Expression oberflächlicher Epitope zwischen den großen und kleinen Subpopulationen identifizieren. Jedoch besteht auch innerhalb der kleineren Subpopulationen keine homogene Antigen-Expression, sodass eine weitere Unterteilung vorgenommen werden kann. Aufgrund der progressiven Zunahme der Anzahl großer MSC bei gleichzeitiger Abnahme des Anteils kleiner Stammzellen an der gesamten Zellpopulation im Verlauf der Kultur ist ein Prekursorzell-Verhältnis anzunehmen. Aus den agranulären kleinen Stammzellen gehen demnach die granulären kleinen Zellsubpopulationen hervor, die wiederum zur Generation der reiferen großen MSC führen.^{17,18} Gleichfalls werden unter in-vitro Expansion phenotypische Veränderungen beobachtet, wobei die MSC mit der Zeit eine vermehrte Variabilität der Zellgröße und der Zellmorphologie sowie zunehmende Granulation des zellulären Zytoplasmas erfahren.¹⁹ Einhergehend treten Alterationen der Genexpression, eine Abnahme der Telomerlänge sowie die fortschreitenden Reduktion der Proliferationsrate und der Multipotenz auf. Die nach Isolation zunächst multipotenten MSC verlieren unter in vitro Konditionen erst die adipozytäre und dann die chondrozytäre Differenzierungskapazität, wobei die Differenzierung zu Osteoblasten am längsten erhalten bleibt.^{19,20} Der progressive Verlust der zellulären Morphologie und Funktionalität entspricht dem Eintritt zellulärer Seneszenz, der durch ex vivo Konditionen hervorgerufen wird.¹⁹ Demzufolge könnte die identifizierte Verschiedenartigkeit der MSC-Kolonien auch eine direkte Konsequenz der in-vitro Kultivierung widerspiegeln. Eine bereits in-vivo bestehende Heterogenität der MSC-Population ist dennoch nicht auszuschließen.²¹ Für die klinische Applikation sollte daher die Isolation der MSC mit der höchsten Proliferationsaktivität und dem größten Differenzierungspotenzial aus dieser morphologisch und funktionell heterogenen Zellpopulation angestrebt werden.

1.2.2.2. Immunmodulation

MSC üben eine immunmodulatorische Wirkungen auf das Immunsystem aus, wobei sowohl die unspezifische native als auch spezifische adaptive immunologische Reaktion beeinflusst wird. Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-1 β induzieren die MSC zur Immunmodulation. Außerdem führt die Ligandenbindung an die exprimierten TLR zur Aktivierung der MSC, wobei hauptsächlich eine immunsuppressive Wirkung hervorgerufen wird.²² Jedoch kann unter Ko-Stimulation mit IFN- γ auch ein TLR-vermittelter proinflammatorischer Phänotyp auftreten. Demzufolge kommt es abhängig

von den prädominierenden Zytokinen der lokalen Mikroumgebung zur Polarisierung zu immunstimulatorischen oder immunsuppressiven MSC.²³ Die MSC-Aktivierung führt zur Expression und Sekretion von immunmodulatorischen Molekülen wie Indoleamin-2,3-dioxygenase, die vornehmlich die Induktion des antiinflammatorischen Makrophagen-Phänotyps, tolerogene dendritischer Zellen und regulatorischer T-Lymphozyten vermittelt sowie die T-Helfer-Zellen-Balance zugunsten der Th2-Lymphozyten verschiebt.²⁴ Das sezernierte Prostaglandin E-2 wird für die direkte Suppression der T-Zell-Aktivierung und Proliferation verantwortlich gemacht. Darüber hinaus zeigen das sezernierte TGF- β 1 und HGF sowohl auf CD4⁺- als auch auf CD8⁺-T-Lymphozyten eine inhibitorische Wirkung. Die Modulation der T-Zell-abhängigen Immunreaktion erfolgt zusätzlich indirekt, wobei die Interaktion zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und T-Lymphozyten beeinflusst wird.²⁵ MSC inhibieren die Reifung von Monozyten zu dendritischer Zellen, sodass die Expression von MHC-Klasse-II-Komplexen sowie der ko-stimulatorischen Antigene CD40, CD80 und CD86 herabgesetzt und damit die T-Zell-Aktivierung durch die Antigen-präsentierenden Zellen unterbunden wird. Des Weiteren wird die Sekretion der dendritischen Zellen von proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IFN- γ und IL-12 gehemmt, wohingegen die antiinflammatorische IL-10 -Sekretion gesteigert wird. Demzufolge wird die Bildung antiinflammatorischer dendritischer Zellen begünstigt, die einen tolerogenen Phänotyp präsentieren und eine Immuntoleranz durch konstante Antigen-Präsentation herbeiführen.²⁶ Darüber hinaus induzieren MSC regulatorische T-Zellen, die wiederum die inflammatorische Aktivität der Th1-, Th2- und Th17-Lymphozyten einschränken.²² Auf neutrophile Granulozyten üben MSC eine anti-apoptotische Wirkung aus, die vornehmlich durch die konstitutive Sekretion von IL-6 bedingt wird. Gleichzeitig bewirken MSC eine Inhibition der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, sodass ein Neutrophilen-vermittelter oxidativer Burst unterbunden wird. Die Bildung radikaler Sauerstoffderivate ist Teil der unspezifischen immunologischen Reaktion, jedoch ruft eine exzessive und inadäquate Radikal-Produktion oxidativen Stress hervor und ist mit einer lokalen Gewebeläsion verbunden. Demzufolge erwirken MSC einen limitierenden Effekt auf die Inflammation.²⁷ Durch die Sekretion des Faktors H, der einen gesteigerten Abbau der C3/C5-Konvertase und als Ko-Faktor die Faktor I-abhängige Inaktivierung von C3b und C4b bewirkt, wird die Aktivierung des Komplementsystems und folglich eine unspezifische Immunreaktion verhindert.²⁸ Neben den sezernierten immunmodulatorischen Molekülen ist auch ein direkter Zell-Zell-Kontakt für die MSC-vermittelte Immunmodulation wesentlich. Die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 an der Zelloberfläche erhöht das immunsuppressive Potenzial der MSC, indem eine direkte Interaktion mit den T-Lymphozyten hergestellt und demnach die lokale Wirkung sezernierter Moleküle potenziert wird.²⁹ In-vitro entziehen sich MSC einer Zellyse durch aktivierte zytotoxische T-Zellen oder natürlichen Killerzellen trotz oberflächlicher Expression von MHC-Klasse-I-Komplexen. Eine konstitutive Expression von MHC-Klasse-II-Komplexen besteht hingegen nicht, desgleichen kann keine Expression der ko-stimulatorischen Antigene CD40, CD80 oder CD86 nachgewiesen werden.²² Unter Exposition von IFN- γ werden MSC zur Expression von MHC-Klasse-II-Komplexen induziert, oberflächliche ko-stimulatorische Antigene können hingegen nicht detektiert werden. Dementsprechend fehlt MSC die Fähigkeit der Antigen-Präsentation und konsekutiven Stimulation von T-Lymphozyten, sodass auch eine Alloantigen-vermittelte Aktivierung und Proliferation ausbleibt.³⁰ MSC präsentieren sich somit als immunprivilegierte Zellen, die neben der Sekretion immunmodulatorischer Zytokine einer Erkennung oder Abwehr durch das

Immunsystem entgehen. Angesichts der Immunevasion ist ein autologe als auch allogene Applikation der Stammzellen denkbar, da lediglich mit einer minimalen oder keiner immunologischen Abstoßung zu rechnen ist.

1.2.2.3. Proangiogenetisches und anti-apoptotisches Potenzial

MSC verbessern die Gewebepfusion dank der Expression von proangiogen wirkenden Faktoren, die lokal eine gesteigerte Proliferation und Migration von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen stimulieren sowie die Reifung neugebildeter Blutgefäße initiieren.³¹ Die Angiogenese stützt auf die Aussprossung präexistierender Kapillare und Bildung eines unreifen kapillaren Netzwerks, das einer Assoziation mit Perizyten bedarf, um das Überleben der Endothelzellen zu gewährleisten sowie den Blutfluss und die vaskuläre Permeabilität zu garantieren. Allerdings stellt die Zunahme der Kapillardichte nur eine unzureichende Perfusion des Gewebes sicher. Um eine suffiziente Gewebepfusion zu erreichen, wird ein begleitender Kaliber-Anstieg arterieller Blutgefäße benötigt. Die Remodellierung kleiner Arteriolen zu größeren blutzuführenden Gefäßen führt zur funktionalen Kollateralisierung mit Wiederherstellung einer ausreichenden Durchblutung des Gewebes. Durch die MSC-Sekretion des angiogenetischen Mitogens VEGF wird das proliferative Potenzial der Endothelzellen erhöht, während das freigesetzte bFGF zudem eine Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen induziert. Die sezernierten Chemokine MCP-1 und SDF-1 rekrutieren zirkulierende Monozyten, die in das perivaskuläre Gewebe einwandern und sich zu Makrophagen ausdifferenzieren. Durch die makrophagozytäre Freisetzung parakrin wirkender Zytokine wie VEGF, bFGF und TNF- α wird die Angiogenese unmittelbar gefördert.³² Die endotheliale und glattmuskuläre Proliferation und Migration sowie die Blutgefäßreifung werden eingeleitet und die anschließende Arteriogenese angeregt. Weiterhin sind die freigesetzten Signalmoleküle PDGF, TGF- β und PIGF an der Neovaskularisation beteiligt. Den MSC-sezernierten Interleukinen IL-1 und IL-6 werden genauso ein proangiogenetisches Potenzial zugeschrieben. Dabei regt IL-6 indirekt die Angiogenese durch gesteigerte endotheliale VEGF-Expression an, IL-1 wird hingegen eine Zunahme der VEGF- und FGF-2-Freisetzung nachgesagt, die ebenfalls eine proangiogene Wirkung hat.³³ Der Wachstumsfaktor VEGF deutet zugleich chemotaktische Eigenschaften an und stimuliert die Migration von VEGFR1- und VEGFR2-exprimierenden Progenitorzellen in das minderperfundierte Gewebe. Eingewanderte Progenitorzellen werden in die Arteriolenwand inkorporiert und tragen zur Remodellierung bei. Neben der Aktivierung, Rekrutierung und Integration von Progenitorzellen in den Prozess der Arteriogenese wird auch eine direkte Inkorporation transplanteder MSC in die Kollateralen beobachtet.³⁴

Ferner weisen MSC einen zytoprotektiven Effekt auf, der den Zellen gegenüber dem zellfeindlichen Milieu des infarzierten Gewebes, resultierend aus Hypoxie, erhöhtem oxidativen Stress, erniedrigtem pH-Wert sowie einer lokalen Inflammation, Schutz bietet. Die MSC-Sekretion des Wachstumsfaktors Ang-1 supprimiert die Apoptose von Endothelzellen, fördert die Stabilität und Reifung neugebildeter Kapillare und scheint darüber hinaus einen anti-apoptotischen Effekt auf Kardiomyozyten auszuüben.³⁵ Der pleiotrope Wachstumsfaktor IGF-1, der gleichermaßen zum Sekretionsprofil der MSC zählt, begünstigt allgemein die Gewebetrophik sowie das zelluläre Wachstum und Überleben. Als potentes Mitogen inhibiert IGF-1 die

Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen, vermittelt die Migration von Endothelzellen und aktiviert sowie rekrutiert sowohl lokale als auch extrakardiale Stamm- und Progenitorzellen.^{36,37} Ebenso werden das Wachstum, die Regeneration und die Neovaskularisation nach Ischämie-bedingter Gewebeläsion durch das freigesetzte HGF favorisiert. Additional zur T-Lymphozyten-Inhibition weist das multifunktionelle Zytokin eine wachstumsstimulierende Wirkung auf, protegiert die Angiogenese und birgt auch anti-fibrotische Eigenschaften.³⁸ Auch die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF stellen MSC-Signalmoleküle mit kardiomyozytärer Zytoprotektion dar.³⁹ In den zum Sekretom der Stammzellen zählenden Exosomen und Mikrosvesikeln wurde zahlreich mRNA gefunden, die eine Suppression der Apoptose und die Überlebensfähigkeit verschiedenartiger Zellen stärkt. Die nicht-kodierende regulatorische Mikro-RNA, miR221 und miR-19a zeigt einen kardioprotektiven Effekt durch die Bindung und Inaktivierung intrazellulär gelegener anti-apoptotischer Bcl-Proteine sowie die Aktivierung der Akt-Signaltransduktion.^{40,41}

1.2.2.4. Unterschiede zwischen verschiedenen MSC-Populationen

Aus vielzähligen Grundgewebearten lassen sich multipotente Stammzellen isolieren, wobei sowohl adulte als auch perinatale Gewebeformen herangezogen werden. Bei der MSC-Isolation aus adulten Gewebeformen findet neben dem Knochenmark vor allem Fettgewebe Verwendung. Als perinatales Gewebe dient hingegen Nabelschnurblut der Entnahme von mesenchymalen Stammzellen.⁴² Nach der Gewinnung einer Knochenmarkprobe mittels Aspirationsnadel und der anschließenden Abzentrifugierung nicht-nukleärer Zellen können die MSC von anderen mononukleären Zellen dank der Adhärenz auf der Plastikoberfläche der Zellkulturflasche und der spezifischen Reaktion auf Trypsinisierung getrennt werden. Die Isolation der Stammzellen aus dem Knochenmarkgewebe stellt ein invasives Verfahren dar, das mit Schmerzen bei der Probeentnahme und einem Infektionsrisiko assoziiert ist. Aus subkutanem Fettgewebe-isolierten MSC werden mittels Lipoaspiration oder Lipektomie, gefolgt von enzymatischer Spaltung dank Kollagenase-I und Zentrifugation, gewonnen.⁴³ Vergleichend zeigt sich die Isolationsmethode der AD-SC als nebenwirkungsärmer und bietet eine geringere Invasivität. Ferner muss die hohe Disponibilität des subkutanen Fettgewebes hervorgehoben werden. Um mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnurblut zu erhalten, wird plazentares Gewebe für die Vollblutentnahme benötigt. Das mit Citrat- oder EDTA-Zusatz antikoagulierte Blut wird in eine Zellkulturflasche überführt, um die enthaltenen MSC durch die Adhärenz auf der Plastikoberfläche und die folgende Trypsinisierung von anderen mononukleären Zellen zu trennen. Somit werden invasive Maßnahmen bei der CB-MSC-Gewinnung vermieden und zugleich ist die Verfügbarkeit der Stammzellen für eine umgehende therapeutische Applikation gegeben.⁴⁴ Zwischen den verschiedenen Isolationsverfahren lassen sich erhebliche Differenzen im jeweiligen MSC-Ertrag ausmachen. Bei der Aspiration oder Resektion von Fettgewebe ist ein beachtlicher Stammzellertrag vorzuweisen, wobei eine äquivalente Menge an isoliertem Ausgangsgewebe näherungsweise 500-fach mehr AD-SC im Vergleich zu BM-SC birgt. Der Ertrag mesenchymaler Stammzellen fällt bei der Isolation aus Nabelschnurblut vergleichsweise gering aus. Gleichwohl werden deutlich divergierende Ertragszahlen in Abhängigkeit von der angewandten CB-SC-Isolationsmethode gesehen.^{45,46}

Basierend auf dem ursprünglichen Grundgewebe treten Unterschiede im proliferativen Potenzial der kultivierten MSC-Populationen auf. In Zellkultur weisen AD-SC eine eindeutig höhere Proliferationsrate als

BM-MSC auf, die längere Generationszeiten zur Verdopplung der Zellzahl besitzen. Das größte Proliferationspotenzial in-vitro ist jedoch bei CB-MSC vorzufinden.⁴⁵

Bei der Bestimmung maximaler Replikationskapazität bis zum Seneszenz-Eintritt werden ähnliche Zeitspannen für die unterschiedlichen MSC beschrieben.⁴⁷ Teils ist die replikative Kapazität der CB-MSC überlegen, sodass sich eine höhere Passagierbarkeit mit 14-16 Passagen gegenüber 11-12 Passagen der anderen MSC-Populationen ergibt.⁴⁶

Abhängig vom Donor ist ebenfalls eine Heterogenität der Rate zellulärer Proliferation auszumachen. Die MSC jüngerer Patienten zeigen eine signifikant höhere Proliferationsaktivität im Vergleich zu Stammzellen älterer Patienten, sodass eine Altersabhängigkeit der mitotischen Zellteilung angenommen wird.⁴⁸ Besonders bei BM-MSC-Isolation im fortgeschrittenen Alter offenbart sich ein Rückgang des proliferativen Potenzials und eine Verkürzung der Zeitspanne bis zum Eintritt zellulärer Seneszenz sowie eine Reduktion des Differenzierungspotenzials. In Bezug auf die Kapazität zur osteoblastären, adipozytäre und chondrozytäre Differenzierung werden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen MSC-Populationen notiert. Allgemein sind perinatale Stammzellen für eine hohe Plastizität und entwicklungsbiologische Flexibilität bekannt. Allerdings wird eine eindeutig herabgesetzte Induktion der Differenzierung zu Oil-Red-O-positiven Adipozyten bei den CB-MSC vorgefunden.^{45,49} Die Fähigkeit zur Multipotenz bleibt bei AD-SC in-vitro länger erhalten als bei BM-MSC, die bereits früher das Potenzial zur Differenzierung in die drei unterschiedliche mesodermale Zelllinien verlieren.⁴⁵

Größtenteils ist die Expression oberflächlicher Antigene identisch, jedoch werden zum Teil auch Divergenzen zwischen den MSC verschiedener Grundgewebearten registriert. Die typischen zellulären Antigene CD73, CD90 und CD105 sind bei allen MSC-Populationen detektierbar. Während BM-MSC und AD-SC deutlich CD105 an der Zelloberfläche exprimieren, ist der Nachweis bei CB-MSC gering. Im Gegensatz zu den BM-MSC und AD-SC ist auch das CD90-Antigen bei CB-MSC nur in geringem Ausmaß festzustellen. Zusätzlich tun sich Differenzen in der immunmodulatorischen Effizienz der Stammzellen auf, wobei widersprüchliche Ergebnisse beim Vergleich zwischen den MSC-Populationen auftreten.⁵⁰ Die Überlegenheit der AD-SC bei der Inhibition der Th1-Differenzierung und Verschiebung der T-Helfer-Zellen-Balance zugunsten der Th2-Lymphozyten gegenüber der BM-MSC wird gefunden. Wohingegen auch eine ähnliche inhibitorische Wirkung auf die Differenzierung der CD4+-T-Lymphozyten auszumachen ist.⁵¹ Sowohl bei den CB-MSC als auch bei den BM-MSC wird eine vergleichbare Suppression der CD8+-T-Lymphozyten beschrieben. Außerdem ist eine ähnliche Induktion regulatorische T-Zellen bei beiden MSC-Populationen nachweisbar.⁵² Die Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch aktivierte Makrophagen wird in Ko-Kultur mit CB-MSC stärker supprimiert als in simultaner Kultivierung mit BM-MSC oder AD-SC. Folglich ist eine effizientere CB-MSC-vermittelte Unterdrückung der unspezifischen nativen immunologischen Reaktion zu erkennen.⁴⁶

1.3. Biomaterialien

1.3.1. Optimierung der Stammzelltherapie durch den Einsatz von Biomaterial

Durch eine Applikation von Biomaterialien, die das native myokardiale Binde- und Stützgewebe imitieren und einen strukturellen extrazellulären Matrix-Ersatz bilden, kann eine Unterstützung der Stammzellen erzielt werden. Das verwendete Material erhöht durch die Zelladhäsion die Überlebensfähigkeit der applizierten Stammzellen und kann zur Regulation von zellulären Prozessen wie Migration, Proliferation und Differenzierung beitragen. Über die Potenzierung der Stammzelltransplantation hinaus können ebenfalls lokale Stamm- und Progenitorzellen strukturell-mechanisch und funktionell unterstützt werden, sodass sich die Infiltration und Integration in das ischämische Myokardgewebe verbessert. Als biokompatible Werkstoffe werden sowohl natürlich vorkommende Polymere als auch synthetisch hergestellte Makromoleküle verwendet.⁵³ In Abhängigkeit vom angewendeten Isolationsverfahren weisen natürliche Biomaterialien eine hohe Variabilität und Heterogenität der Produktqualität und der Reproduzierbarkeit auf sowie eine variable Immunogenität aufgrund der Kontamination mit Endotoxinen. Synthetische Polymere präsentieren hingegen konstantere Produkteigenschaften angesichts automatisierter Produktionsverfahren. Des Weiteren ist die mechanische und chemische Stabilität synthetisch generierter Polymere größer und gleichzeitig besteht eine erleichterte Modifizierbarkeit, sodass sich der eingesetzte biokompatible Werkstoff effizienter adaptieren lässt. Jedoch bedarf die Modifikation der synthetischen Biomaterialien meist unphysiologischen Bedingungen, sodass die Verarbeitung inkompatibel mit der zellulären Viabilität ist und folglich der Einsatz limitiert wird. Sowohl natürliche als auch synthetische Biomaterialien können biologisch abbaubar sein und nach der Transplantation eine Remodellierung erfahren.⁵⁴ Die resultierenden Abbauprodukte müssen sich genauso wie das eingesetzte Implantatmaterial durch Biosicherheit und Biokompatibilität auszeichnen sowie eine biologische Degradierbarkeit nachweisen. Außerdem ist eine Integration der Abbauprodukte in die myokardiale Regeneration denkbar, wobei die bei der Remodellierung anfallenden Materialien als Substrat für die Genese und als funktioneller Ersatz für das Infarkt-geschädigte Myokard dienen.⁵⁵

1.3.2. Mikroverkapselung zur Stammzelltransplantation

Aus Biomaterial lassen sich Mikropartikel herstellen, die als Mikrokapseln mit einer semipermeablen Membran die transplantierten Zellen einschließen. Dank eines idealen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses erlauben sphärische Mikrokapseln eine effiziente einwärts gerichtete Diffusion von Sauerstoff und nutritiven Substanzen zur Aufrechterhaltung des zellulären Metabolismus der verkapselten Zellen. Gleichzeitig ist die auswärts gerichtete Diffusion von sezernierten modulatorischen Signalmolekülen möglich, die dann zur myokardiale Regeneration beitragen. Zudem gewährt die Zellverkapselung einen Schutz gegenüber der lokalen Inflammation und schafft eine Immunisolation der transplantierten Zellen.⁵⁶ Da die Stammzellen älterer multimorbider Patienten teils eine geringere Funktionalität mit reduzierter Proliferationsrate und eine frühzeitigere Apoptose zeigen, muss auf die Transplantation von Zellen allogenen oder xenogenen Ursprungs zurückgegriffen werden. Demzufolge ist das Isolieren der applizierten Stammzellen essentiell, um die Einnahme von Immunsuppressiva zu umgehen. Bei der Applikation von autogenen sowie

immunmodulatorischen allogenen Stammzellen kann auf eine absolute Isolation gegenüber dem Immunsystem verzichtet und eine höhere Membranpermeabilität zugelassen werden. Das zur Verkapselung verwendete Biomaterial sollte aber Immuntoleranz aufweisen sowie über mechanische Stabilität verfügen und osmotisch bedingtem Stress standhalten.⁵⁵

1.3.3. Herstellung von Mikrokapseln aus GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel

Zur Transplantation designierte Zellen können in Mikrokapseln aus Hydrogel eingebettet werden, das ein Netzwerk aus Wasser-bindenden natürlichen oder synthetischen Polymeren darstellt und die Struktur der nativen Extrazellulärmatrix nachbildet.⁵⁷ Die zur Herstellung von Hydrogel befähigte Gelatine stellt ein heterogenes Gemisch aus natürlich vorkommenden wasserlöslichen Proteinen dar, das durch die Denaturierung und eine partielle Hydrolyse aus Kollagen extrahiert wird. Bei Abkühlung geliert Gelatine in wässriger Lösung, wobei eine reversible Transition der Random-Coil- zu einer Triple-Helix-Sekundärstruktur stattfindet. Da Gelatine eine geringe Wärmeleitfähigkeit aufweist, resultiert beim Abkühlen eine ungleiche und instabile interne Temperaturverteilung, die strukturelle Inhomogenitäten während des physikalischen Gelierungsprozesses ergibt.^{58,59} Das photochemisch-induzierte Gelieren stellt hingegen ein Verfahren dar, das mit höherer Reliabilität durchzuführen ist und eine größere Reproduzierbarkeit gewährleistet. Außerdem ist das photopolymerisierte Gelatine-Hydrogel nicht thermoreversibel, sondern erweist sich bei physiologischen Temperaturen als stabil.⁶⁰

Die Funktionalisierung der Gelatine mit Glycidylmethylacrylat erlaubt eine UV-A-Strahlung-abhängige Polymerisation der Proteine, die zu einer Gelierung des Polymer-Derivats führt. Die Amino- oder Hydroxylgruppen werden als funktionelle Seitengruppen der Gelatine-Proteine mit GMA modifiziert und anschließend unter Exposition von UV-A-Strahlung der Wellenlänge 350-370 nm kovalent vernetzt.

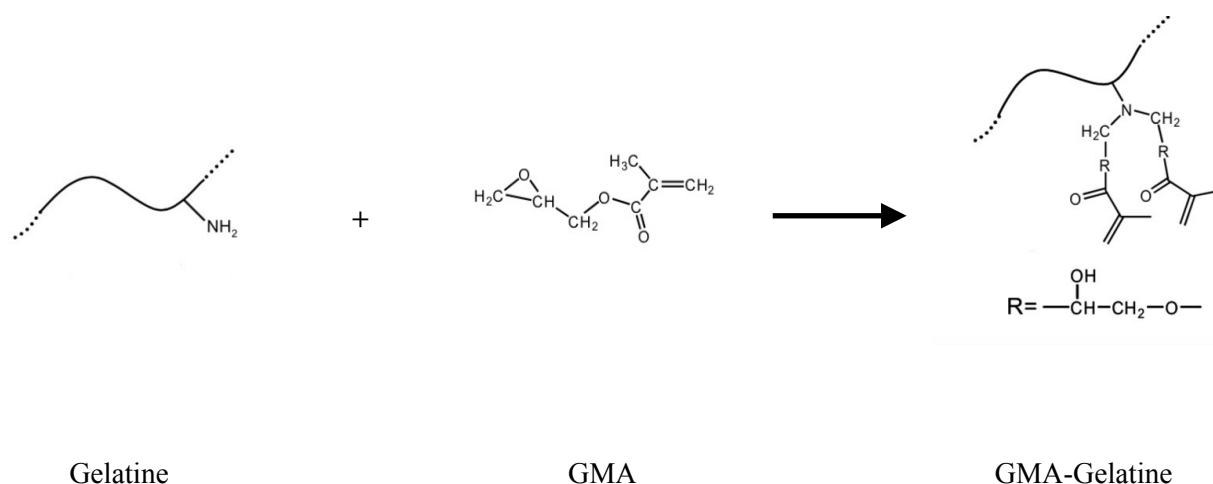


Abb. 1: Darstellung der Gelatine-Funktionalisierung durch Zusatz von GMA. Die Aminogruppen der Lysinreste werden mit dem Acryl-Monomer modifiziert, sodass eine photochemisch-induzierte Polymerisation der Proteine möglich ist.

Die Verwendung des Photoinitiators Irgacure® 2959 beschleunigt dabei die Induktion der photochemischen radikalischen Vernetzung.⁶¹

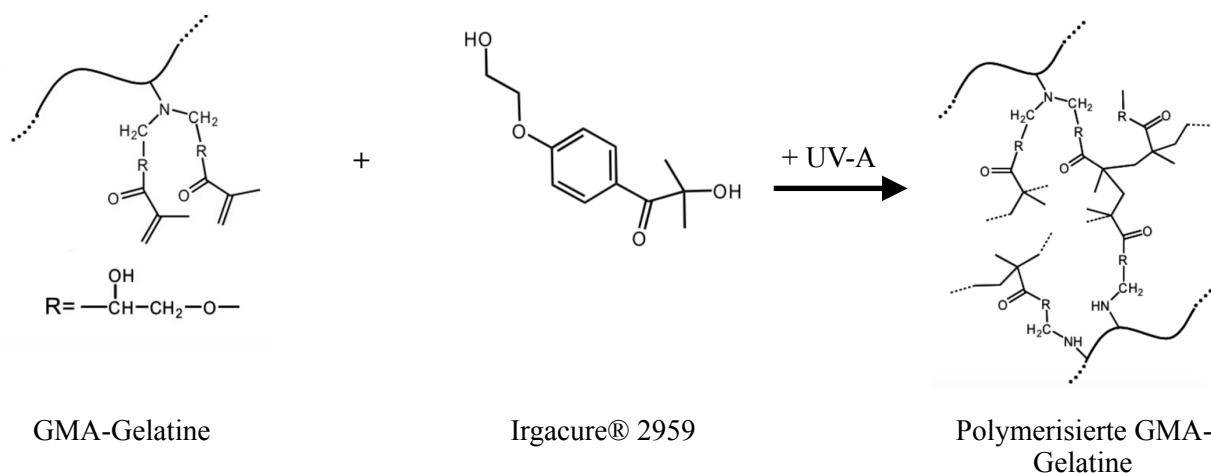


Abb. 2: Darstellung der Polymerisation von GMA-modifizierter Gelatine unter Zusatz des Photoinitiators und anschließender Exposition gegenüber von UV-A-Licht.

Als natürliches Polymer-Derivat weist Gelatine eine intrinsische Zelladhäsionsfähigkeit auf, die bei anderen Biomaterialien überwiegend mittels assoziierter Proteinen generiert wird. Integrine, die als Adhäsionsrezeptoren in der zellulären Plasmamembran vorliegen, vermitteln durch Bindungsdomänen für spezifische Aminosäure-Sequenzen Zell-Matrix-Interaktionen. Dabei wird vornehmlich eine Sequenz aus den Aminosäuren Arginin-Glycin-Aspartat gebunden, die ebenfalls in Gelatine vorzufinden ist. Darüber hinaus präsentiert Gelatine eine geringe Immunogenität und erweist sich als biologisch degradierbar dank Matrix-Metalloproteasen-sensitiver Sequenzen, die einen enzymatischen Abbau durch Endopetidase ermöglichen.⁶² Nach der GMA-Funktionalisierung bleiben der Gelatine die RGD- und die MMP-sensitiven Sequenzen erhalten, sodass weiterhin die zelluläre Adhäsion und die biologische Degradation sichergestellt sind. In Abhängigkeit vom Grad der GMA-Modifikation der Gelatine, von der Konzentration der Gelatine und des Photoinitiators sowie von der Expositionszeit gegenüber der UV-A-Strahlung ändern sich die chemischen und mechanisch-physikalischen Eigenschaften des resultierenden Hydrogels.⁶³ Eine geringere Steifheit des Gelatine-basierten Hydrogels ist entscheidend für die Proliferation der verkapselten Stammzellen sowie eine mögliche Migration aus der Mikrokapsel in das umliegende myokardiale Gewebe. Bei zu geringer Steifheit und Instabilität der Hydrogel-Kapseln kann eine Assoziation mit weiteren biokompatiblen Werkstoffen erwogen werden, die als eine äußere semipermeable Membran die Mikrokapseln stabilisieren und ferner immunisulatorisch wirken.

1.3.4. Modifikation der Mikrokapselzusammensetzung durch Dextransulfat

Der Zusatz von synthetischem Dextransulfat führt qualitative Veränderungen des Gelatine-basierten Hydrogels herbei und dient dem Ersatz von Glykosaminoglykanen, die als Polymere aus repetitiven Disacchariden in der nativen extrazellulären Matrix vorzufinden sind und die Seitenketten von

Proteoglykanen bilden. Die ionisierten Sulfatreste des Polysaccharids führen zur Anlagerung von positiv geladenen Natrium- und Kalzium-Ionen, sodass sich ein osmotisch bedingter Wassereinstrom ergibt und die Hydrogelbildung gefördert wird.⁶⁴ Außerdem erweist sich DxS von Bedeutung für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion sowie stellt einen Korezeptor für modulatorische Signalmoleküle dar. Folglich kann das eingesetzte Biomaterial auch als Vehikel für Wachstumsfaktoren eintreten und gebundene Zytokine integrieren, die vor allem eine proangiogenetische Wirkung entfalten. Über die Heparin-bindende Domäne des VEGF wird eine Assoziation mit DxS hergestellt und eine kontrollierte Freisetzung des Mitogens induzieren, sodass eine langfristige Stimulation der Angiogenese besteht.⁶⁵ Die Degradierbarkeit des DxS basiert auf enzymatischem Abbau via Dextranasen, die eine Depolymerisation katalysieren.⁶⁶

1.3.5. Methoden der zellulären Verkapselung

Bei der Zellverkapselung kommen unterschiedliche Verfahrensmethoden zur Anwendung, die den Erhalt der zelluläre Integrität und Funktionalität gewährleisten. Die produzierten Mikrokapseln sollten eine einheitliche sphärische Kapselform und regelmäßige Oberfläche aufweisen sowie eine Kapselgröße von ungefähr 100 µm besitzen. Für die Herstellung von Hydrogel-Mikrokapseln finden hauptsächlich Emulsions-, Extrusions- und Ko-Extrusionsverfahren Verwendung.⁵⁴ Für die Herstellung von Gelatine-basierten Hydrogel-Kapseln eignet sich das Extrusionsverfahren oder die Wasser-in-Öl-Emulsion-Technik, bei der eine wässrige Gelatine-Lösung in einer Ölphase dispergiert und anschließend unter UV-A-Strahlung photochemisch zur Gelierung induziert wird. Dabei sind die zu transplantierenden Zellen in der wässrigen Lösung aus Gelatine suspendiert und erfahren durch das Gelieren eine Verkapselung. Zum anderen können Zellen auch in flüssige oder semi-flüssige Mikrokapseln eingeschlossen werden, die ebenfalls dank assoziierten Biomaterialien eine äußere Stabilisation erfahren. Aus einer flüssigen Phase gebildete Mikrokapseln versprechen eine effizientere einwärts- und auswärtsgerichtete Diffusion und erlauben den transplantierten Zellen eine größere Mobilität. Jedoch ist durch fehlende Zell-Matrix-Interaktion die langfristige zelluläre Viabilität beeinträchtigt. Um das Oberflächen-Volumen-Verhältnis zu reduzieren und die Diffusion der Metabolite und sezernierten modulatorischen Signalmolekülen damit zu optimieren, werden auch Verfahren zur direkten Verkapselung von einzelnen Zellen oder Zellaggregaten entwickelt. Mittels Schicht-für-Schicht-Technik können applizierte Zellen direkt mit einer Membran aus natürlichen oder synthetischen Polymeren umhüllt werden, sodass auch eine höhere Zellkonzentration bei der Transplantation erreicht wird und sich das Gesamtvolumen des Implantats verringert. Dennoch erschwert die mangelnde Extrazellulärmatrix-Interaktion die Viabilität der applizierten Zellen sowie geht bei der einzelligen Verkapselung die Zell-Zell-Interaktion verloren, die gleichermaßen bedeutend für die zelluläre Funktionalität ist. Die Entwicklung von hohlen Mikrokapseln, in die zu transplantierende Zellen dank Mikroinjektion integriert werden, verspricht die Trennung der Mikrokapselproduktion von der zellulären Verkapselung. Folglich reduziert sich der Stress, dem die Zellen beim Verkapselungsprozess ausgesetzt sind, und die Erhaltung der zellulären Funktionalität wird gewährt. Des Weiteren erlaubt die separate Herstellung der Mikrokapseln unphysiologische Bedingungen bei der Produktion anzuwenden und erweitert damit das Spektrum der einsetzbaren biokompatiblen Werkstoffe.^{54,55}

2. ZIELSETZUNG

Das Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung eines Biomaterials, das zur optimalen Verkapselung von therapeutisch applizierten Stammzellen befähigt und dabei das Überleben, die Migration sowie die Zytokinsekretion aus der Mikrokapsel unterstützt. Um das Potenzial der Stammzell-basierten Therapie beim AMI zu steigern, wird die additive Verwendung von implantierbaren Werkstoffen zur Verfahrensoptimierung angestrebt. Der Einsatz von Biopolymer-basierten Mikrokapseln sichert Schutz gegenüber dem hostilen Milieu des infarzierten Myokards, garantiert den lokalen Verbleib nach Transfer und ermöglicht den verkapselten Stammzellen das Nachkommen einer parakrinen Aktivität angesichts permeabler Kapselmatrix. Eine Optimierung des Überlebens und der Funktionalität transplanteder Stammzellen wird erlangt. Des Weiteren gewährt ein langsam erfolgender biologischer Abbauprozesse der Mikrokapsel die anschließende Integration der Stammzellen in das Myokard. Die Entwicklung hybrider Hydrogel-Kapseln basierend auf GMA-Gelatine supplementiert mit DxS lässt eine optimale Imitation der nativen extrazelluläre Matrix erwarten und verspricht eine erfolgreiche Verkapselungsform darzustellen. Durch die Nachbildung der nativen Extrazellulärmatrix, in Bezug auf mechano-elastische Eigenschaften und Zell-Matrix-Interaktion, ist eine Verkapselung mit hoher Zytoverträglichkeit anzunehmen und eine Potenzierung der zellulären Funktionsfähigkeit und der therapeutisch wirksamen Sekretion von Signalmolekülen mit konsekutiver Verbesserung der myokardialen Funktion nach Stammzelltransplantation zu erhoffen.

Unter den zahlreich erforschten Zelltypen für eine Applikation post-AMI stechen MSC mit einem vorteilhaften Charakteristika-Profil hervor und weisen eine Eignung zur Testung des entwickelten Biomaterials auf. Die Interaktion zwischen den Stammzellen und dem verkapselnden GMA-Gelatine-Hydrogel ist zu evaluieren, ferner soll der Erhalt des zellulären Funktionsvermögens nach Mikroverkapselung belegt werden. Darüber hinaus wird ein direkter Vergleich zwischen unterschiedlichen MSC-Populationen angestellt und eine potentielle Anwendung in einem Stammzell-basierten Behandlungsverfahren beurteilbar. Anhand des Spektrums sezernierter Zytokine sowie des in-vitro ausgeübten Einflusses auf die Angiogenese ist der additional Einsatz zur konventionellen Therapie und die erwünschte Verbesserung der Prognose des AMI dank Transplantation von MSC nachzuvollziehen.

3. METHODEN

3.1. Verwendete Materialien

3.1.1. Gelatine - als Grundlage Hydrogel-basierter Mikrokapseln

3.1.1.1. Eigenschaften

Zur Verwendung kam eine Typ-A-Gelatine, die aus Säure-gehärteter Schweinehaut durch Auskochen in Wasser extrahiert und von Fluka (Deutschland) bezogen wurde. Die Gelatine wies eine mittlere Gelierkraft von 200 g Bloom auf sowie eine Löslichkeit von 67 mg / 1 ml Wasser.

Beim Erhitzen erfährt in Wasser gelöste Gelatine eine Degradation durch partielle Hydrolyse, sodass die Länge der Polypeptidketten reduziert wird. Eine thermische hyperbare Sterilisation mittels Dampf-Autoklaven geht mit einer Verkürzung der Polypeptidkettenlänge einher, wobei die mittlere Kettenlänge progressiv mit zunehmender Dauer der Autoklavierung sinkt. Das Hydrogel autoklavierter Gelatine weist eine höhere volumetrische Quellbarkeit sowie einen verringerten Elastizitätsmodul auf, welches die niedrigere Steifheit und gesteigerte elastische Verformbarkeit des Biomaterials widerspiegelt. Demnach verspricht der Autoklavierungsprozess der Gelatine eine höhere Viabilität verkapselter Zellen dank günstiger mechano-elastischer Eigenschaften des resultierenden Hydrogels.

3.1.1.2. Funktionalisierung der Gelatine

Für die UV-Licht-abhängige Polymerisation der Gelatine-Proteine war die Modifikation funktioneller Seitengruppen mit GMA essentiell und bildete dabei die Grundlage der photochemisch-induzierten Gelierung sowie Herstellung eines nicht thermoreversiblen stabilen Hydrogels. Die verwendete Gelatine wurde nach Lösung in PBS bei 50 °C mit GMA (Sigma-Aldrich, Deutschland) versetzt, sodass nach 3 Stunden unter konstantem Rühren eine Funktionalisierung erfolgte. Die entstandene GMA-Gelatine wurde dank Präzipitation in Ethanol isoliert und der Substitutionsgrad der ϵ -Aminogruppen der Lysinreste mittels Spektralphotometer determiniert.⁶⁷ GMA-Gelatine mit einer Funktionalisierung von 85.6% der funktionellen Seitenketten wurde für die Durchführung der Experimente verwendet.

3.1.1.3. Herstellung der GMA-Gelatine-Lösungen

Um die optimale Gelatine-Lösung als Basis für eine zelluläre Verkapselung in Hydrogel zu finden, war die Produktion gelöster Gelatine in verschiedener Konzentration und mit unterschiedlichem Elastizitätsmodul zur direkten Gegenüberstellung notwendig. Die GMA-Gelatine wurde vollständig in PBS bei einer Temperatur von 38-40 °C sowie unter kontinuierlichem Rühren über Nacht gelöst, sodass sich 5 wt%- und 10 wt%-GMA-Gelatine-Lösungen ergaben. Anschließend wurde ein Teil der gewonnenen 10 wt%-GMA-Gelatine-Lösung einfach oder zweifach autoklaviert (121°C, 210 kPa, 15 Minuten). Die resultierenden

.....

GMA-Gelatine-Lösungen wurden bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt, bevor eine experimentelle Verwendung eintrat.

3.1.2. Dextransulfat - supplementiertes Biopolymer zur Generierung hybrider Mikrokapseln

Zum Einsatz kam synthetisch hergestelltes DxS mit einer Molekülmasse von 500 kDa, das bei pK Chemicals (Dänemark) erstanden wurde. Die Löslichkeit in Wasser belief sich auf 10 mg / 1 ml.

3.2. Zellkultur

Die Zellkulturarbeit wurde unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Bank durchgeführt, wobei genutzte Flächen und eingebrachte Materialien vor Verwendung mittels Vernebler mit 70%-Ethanol benetzt wurden.

3.2.1. MSC

Humane BM-MSC wurden bei Lonza (Deutschland) erworben und in Gelatine-benetzten T150 und T75 Zellkulturflaschen in 12-20 ml DMEM (Lonza, Deutschland) supplementiert mit 10% FBS und 1% Penicillin-Streptomycin im luftbefeuchteten Inkubator bei 37°C 5% CO₂ kultiviert. Bei 80% Konfluenz der Zellkulturflasche wurden die Stammzellen subkultiviert. Nach Verwerfen des Zellkulturmediums erfolgte eine zweifache Spülung mit jeweils 8-10 ml PBS und die Induktion der Ablösung adhärenter Zellen von dem Zellkulturflaschenboden dank Trypsinierung mit 2-4 ml Trypsin. Während der zweiminütigen Inkubation im luftbefeuchteten Inkubator bei 37°C 5% CO₂ löste sich der dichte Zellrasen auf und eine lichtmikroskopisch bestätigte zelluläre Abrundung wurde notiert. Die katalytische Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 4-8 ml Kulturmedium inhibiert. Für die Experimente wurden Zellen der Passage p⁶ verwendet. Unter den selben Bedingungen wurden humane CB-MSC, erworben bei AG Bieback des Instituts für Transfusionsmedizin und Immunologie der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg (Deutschland), sowie AD-SC, bei Lonza (Deutschland) erstanden, kultiviert und für die Experimente verwendet.

3.2.2. L929-Fibroblasten

Murine Fibroblasten der Zelllinie L929, isoliert aus subkutanem Bindegewebe, wurden bei ATCC (LGC Standards GmbH, Deutschland) erworben und in T75 Zellkulturflaschen in 12 ml MEM (Biochrom AG, Deutschland) ergänzt durch 10% equines Serum im luftbefeuchteten Inkubator bei 37°C 5% CO₂ kultiviert. Bei 80% Konfluenz der Zellkulturflasche wurden die Zellen ebenfalls subkultiviert. Im Anschluss an ein zweifaches Waschen mit 8 ml PBS ereignete sich die Ablösung der Zellen dank Trypsinierung mit 2 ml Trypsin. Auf die unter dem Lichtmikroskop beobachtete Abrundung der Zellen folgte eine Inhibition der katalytischen Reaktion durch Zugabe von 4 ml Zellkulturmedium. Für die Experimente wurden Zellen der Passage p⁴⁻⁵ verwendet.

3.2.3. HUVEC

Humane aus der Nabelschnurvene-isolierte Endothelzellen wurden von Monza (Deutschland) bezogen und in T75 Zellkulturflaschen in 12 ml EGM-2 (Lonza, Deutschland) im luftbefeuchteten Inkubator bei 37°C 5% CO₂ kultiviert. Gleichfalls wurden die Zellen bei 80% Konfluenz der Zellkulturflasche subkultiviert. Dafür wurden die HUVEC nach einer zweifachen Spülung mit 8 ml PBS mit 2 ml Trypsin trypsinisiert. Nach lichtmikroskopisch verifizierter zellulärer Abrundung wurden 4 ml Zellkulturmedium hinzugefügt. Für die Experimente fanden Zellen der Passage p⁴⁻⁵ Verwendung.

3.2.4. Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Neben den bei laufenden Versuchen im Inkubator aufbewahrten Zellen wurde die restliche Zellpopulation der MSC sowie der L929 kryokonserviert bei - 196 °C in Flüssigstickstofftanks gehalten. Zur Kryokonservierung wurden die kultivierten Zellen zweifach mit 8-10 ml PBS gespült und hiernach durch Trypsinablösung und Zugabe des entsprechenden Zellkulturmediums in eine Zellsuspension überführt. Nach dem Zentrifugieren der Zellsuspension erfolgte das Anfärben der Zellen mit Trypan Blau 0,4% (Invitrogen) und die automatisierte Bestimmung der Zellkonzentration dank Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen). Die Zellen wurden nun in Zellkulturmedium versetzt mit 40% FBS sowie mit 10% DMSO (Biochrom AG, Deutschland) resuspendiert und in Kryoröhrchen zu jeweils 10⁶ Zellen / 1 ml Zellsuspension abgefüllt. Über Nacht wurden diese in einer Isopropanolbox bei - 70 °C eingefroren, um danach zur langfristigen Konservierung in die Flüssigstickstofftanks überführt zu werden. Das Auftauen der kryokonservierten Zellen vollzog sich bei 37 °C im Wasserbad. Nahezu vollständig aufgetaute Zellen wurden in ein 8 ml Zellkulturmedium befülltes Falcon Tube ® pipettiert und darauf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet erneut in 12 ml Zellkulturmedium suspendiert und dann in Gelatine-benetzte T75 Zellkulturflaschen überführt. Am folgenden Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt, um verbleibende Reste des zytotoxischen DMSO zu entfernen.

3.3. Zelluläre Verkapselung

3.3.1. Herstellung der Zell-beladenen Mikrokapseln

Für die zelluläre Verkapselung wurde Hydrogel aus GMA-funktionalisierter Gelatine gewählt, die in verschiedener Konzentration und Zusammensetzung sowie mit unterschiedlichem Elastizitätsmodul vorlag. Um das optimale Biomaterial zur Herstellung MSC-beladener Mikrokapseln zu identifizieren, wurde die Zellverkapselung zunächst an den L929-Fibroblasten, als etablierte Zelllinie zur Überprüfung auf Biokompatibilität, erprobt. Hierbei wurde Gelatine mit 5 wt%- und 10 wt%-Masseanteil sowie AC als auch 2xAC 10 wt%-Gelatine getestet. Zugleich wurde die UV-Licht-Expositionszeit variiert, um eine geeignete Stabilität und Steifheit der Mikrokapseln zu finden, ohne gleichzeitig die zelluläre Viabilität zu beeinträchtigen. Nachdem die ideale GMA-Gelatine-Lösung zur zellulären Verkapselung der L929 gefunden wurde, ereignete sich die Übertragung des Zellverkapselungsverfahrens auf die MSC. Bei der Produktion

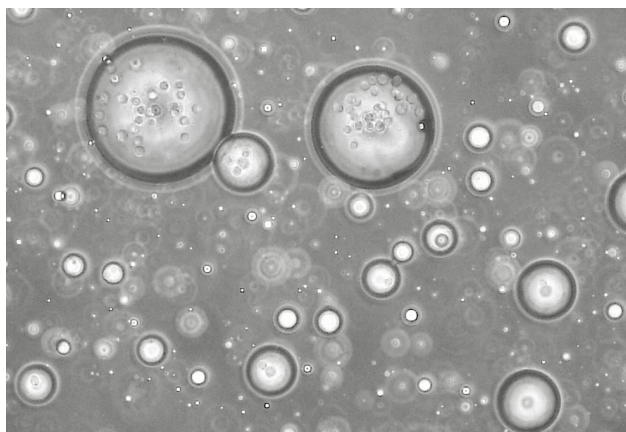
MSC-beladener Mikrokapseln fand die optimale GMA-Gelatine-Lösung Verwendung, die darüber hinaus mit DxS versetzt wurde. Folglich konnte ein direkter Vergleich zwischen GMA-Gelatine-Lösungen mit und ohne DxS-Zusatz aufgestellt und die erhoffte Steigerung der Anzahl vitaler Zellen in den Mikrokapseln dank verbesserter Zell-Matrix-Interaktion nachvollzogen werden. Die UV-Licht-Expositionszeit erfuhr ebenso eine Variation. Neben einer ausreichenden mikrokapsulären Stabilität und Steifheit, wurde eine möglichst geringe Expositionszeit gegenüber dem UV-Licht angestrebt, um die Viabilität der verkapselten Zellen durch reduzierte Strahlenbelastung und herabgesetzte Steifheit des Hydrogels zu verbessern.

Die produzierten GMA-Gelatine-Lösungen wurde mit 2 M Kalziumchlorid 2% w/V und dem Photoinitiator Irgacure® 2959 (Sigma-Aldrich, Deutschland) versetzt und in einem Thermoblock (Eppendorf® ThermoStat Plus) bei 34°C aufbewahrt. Für die zelluläre Verkapselung der MSC wurden Aliquots der GMA-Gelatine-Suspension mit einem DxS-Zusatz versehen. Zu 30 µl der GMA-Gelatine-Lösung wurden jeweils 0,3 µl DxS zugefügt, um eine 1% Konzentration des DxS an der GMA-Gelatine-Suspension zu erlangen.

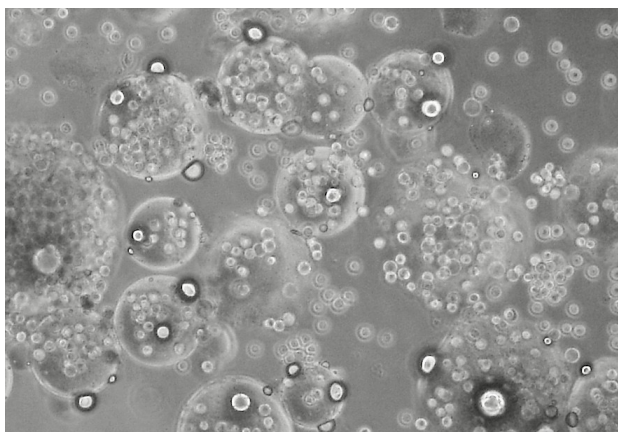
Die kultivierten Zellen L929 sowie MSC wurden nach zweifachem Waschen mit je 8-10 ml PBS trypsinisiert und für 2 Minuten im luftbefeuchteten Inkubator bei 37°C 5% CO₂ inkubiert, um die Lösung von der Zellkulturflasche zu erzielen. Nach Zugabe von Kulturmedium zur Inhibition der Trypsin-Reaktion und dem folgendem Zentrifugieren der Zellsuspension wurden die Zellen mit Trypan Blau 0,4% angefärbt und die Zellkonzentration dank Countess™ Automated Cell Counter automatisiert bestimmt. Um eine Konzentration von $3,0 \times 10^5$ Zellen/ 30 µl Gelatine-Suspension zu erreichen, wurde das entsprechende Volumen der Zellsuspension in 1,5 ml Eppendorf Tube ® pipettiert und dann zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss in 30 µl der flüssigen GMA-Gelatine suspendiert.

Nach Überführen der Zell-Gelatine-Suspension in ein 1,5 ml Eppendorf Tube ® mit 300 µl sterilisiertem Sojabohnen-Öl 0,5% w/V Span80 (Sigma-Aldrich, Deutschland) wurde mittels Pipettieren eine Emulsion hergestellt, sodass es zur Verkapselung der Zellen in Mikrokapseln aus GMA-Gelatine kam. Die Emulsion wurde anschließend in eine Petrischale ($\varnothing = 3$ cm) mit 500 µl sterilisiertem Sojabohnen-Öl pipettiert und ein Magnetrührstäbchen hinzugegeben. Unter ständigem Rühren bei 300 rpm wurde die Emulsion UV-A-Licht ausgesetzt, um das Gelieren der GMA-Gelatine zu induzieren. Der Abstand zwischen der UV-Licht-Lampe, ausgestattet mit einem Filter für Strahlung der Wellenlänge 350-370 nm, und der Petrischale betrug 7 cm.

a.



b.



c.

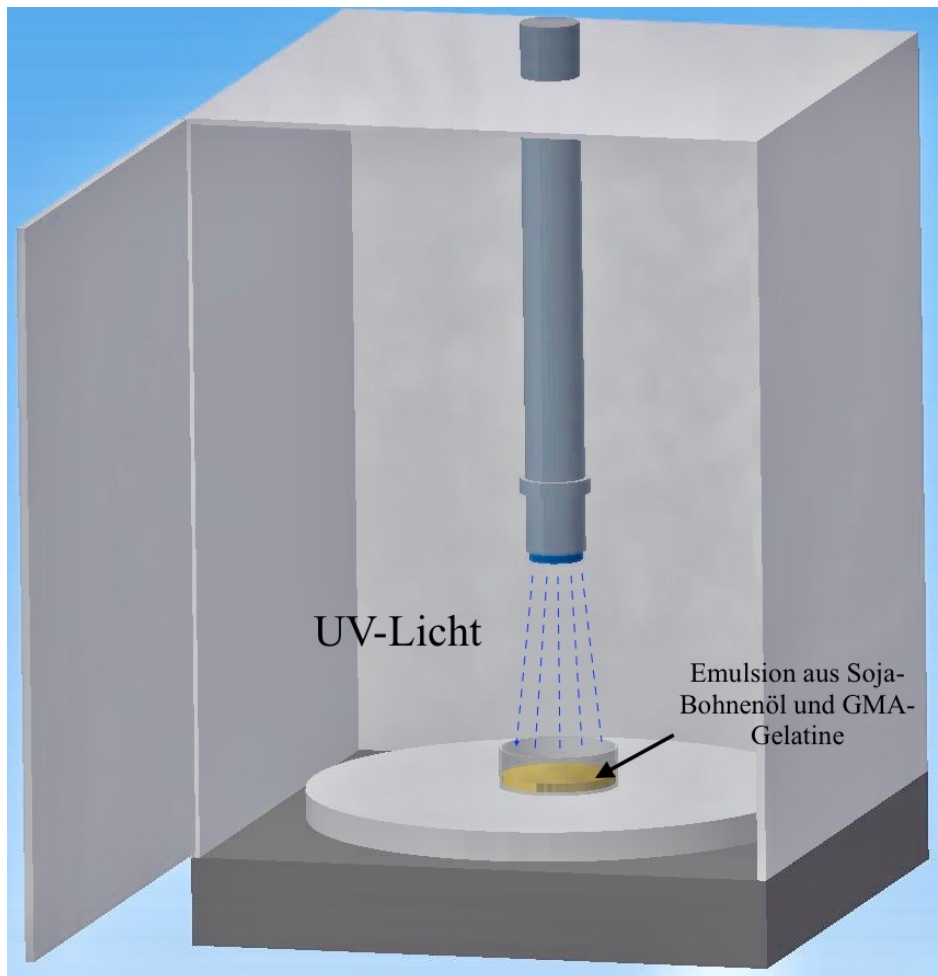


Abb. 3: Herstellung von Zell-beladenen Mikrokapselfn auf Basis von Hydrogel aus photopolymerisierter GMA-Gelatine im Emulsionsverfahren.w-up.

- a. Lichtmikroskopische Aufnahme von verkapselten L929 in Emulsion mit Sojabohnen-Öl vor der Zentrifugation.
- b. Lichtmikroskopische Aufnahme von verkapselten L929 in Emulsion mit Sojabohnen-Öl nach der Zentrifugation. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . Eine Vergrößerung von 200 x wurde verwendet.
- c. Dreidimensionale Darstellung des Zellverkapselungsprozesses.

Eine UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden, 1 Minute, 2 Minuten oder 3 Minuten wurde gewählt. Nach der Exposition gegenüber der UV-A-Strahlung wurde die Emulsion auf 1 ml Zellkulturmedium in einem 1,5 ml Eppendorf Tube ® geschichtet und dann zentrifugiert. Die basal im Zellkulturmedium gelegenen Mikrokapselfn wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube ® mit Zellkulturmedium überführt und erneut zentrifugiert, um eine Trennung von der Ölphase zu erreichen. Die nun vorliegenden Mikrokapselfn wurden dann in 2 ml Zellkulturmedium in einer Greiner 36-Well-Platte kultiviert.

3.3.2. Bestimmung der mittleren Mikrokapselgröße

Zur Evaluation der durchschnittlichen Mikrokapselgröße wurden mit Zellen-beladene Mikrokapseln aus 10 wt%-GMA-Gelatine herangezogen. Aus 5 unterschiedlichen Proben wurden Mikrokapseln entnommen und gleichmäßig in eine Greiner 6-Well-Platte pipettiert. Im Anschluss wurden 6 Fotos an verschiedenen Lokalisationen der Platte mit der integrierten Mikroskop-Kamera bei 5-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Kapsel-Durchmesser der abgebildeten Mikrokapseln wurde mittels ImageJ Software (National Institutes of Health, NIH) vermessen.

3.3.3. Ermittlung der Zellverkapselungseffizienz

Als gewählte Methode der Zellverkapselung wurde das Emulsionsverfahren in Hinblick auf die prozessbezogene Effizienz beurteilt. Während der Verkapselung sind die Zellen erheblichem Stress ausgesetzt, der mit der zellulären Integrität und Funktionalität interferiert. Demzufolge muss mit einem Verlust vitaler Zellen gerechnet werden, der auf das prozessuale Vorgehen zurückzuführen ist. Eine Auflösung der zellulären Verkapselung und nachfolgende Ermittlung der Zellzahl lebender Zellen gewährt die Effizienz der Mikroverkapselung zu verifizieren.

Eine komplette proteolytische Spaltung des GMA-Gelatine-basierten Hydrogels wurde durch Zugabe einer Zink-Endopeptidase erreicht, die eine schonende Isolation der Zellen aus der Verkapselung erlaubte. Die Zell-beladenen Mikrokapseln wurden in 600 µl DPBS-gelöster Kollagenase (17 Einheiten/ml Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* C1639, Sigma Aldrich, Deutschland) suspendiert und für 20 Minuten bei einer Temperatur von 39° C unter kontinuierlicher Rotation inkubiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das basale Zellpellet in 100 µl Zellkulturmedium resuspendiert. Darauf wurden die Zellen mit Trypan Blau 0,4% angefärbt und die Zellzahl dank Countess™ Automated Cell Counter automatisiert bestimmt. Die resultierende Zellzahl wurde mit der initial verwendeten zellulären Konzentration korreliert.

Um den protektiven Effekt der Mikrokapseln auf die verkapselten Zellen zu untersuchen, wurde das Zellverkapselungsverfahren mit Verzicht auf eine UV-Licht-Exposition wiederholt. Durch das Ausbleiben des photochemisch-induzierten Gelieren der GMA-Gelatine wurde die Herstellung Hydrogel-basierter Mikrokapseln unterbunden. Die Zellen wurden ebenso in 30 µl GMA-Gelatine-Lösung suspendiert und im Anschluss in das Sojabohnen-Öl überführt. Unter ständigem Rühren bei 300 rpm wurde eine Emulsion gebildet, die dann auf 1 ml Zellkulturmedium in einem 1,5 ml Eppendorf Tube ® geschichtet und zentrifugiert wurde. Nach dem Zentrifugieren wurde das basale Zellpellet in ein neues mit Zellkulturmedium befülltes 1,5 ml Eppendorf Tube ® überführt und erneut zentrifugiert, um eine Trennung von der Ölphase zu erreichen. Darauf erfolgte die Resuspension in 100 µl Zellkulturmedium und die Anfärbung der Zellen mit Trypan Blau 0,4%, um eine automatisierte Bestimmung der Zellzahl dank Countess™ Automated Cell Counter durchzuführen. Eine Korrelation der resultierenden Zellzahl mit der initial verwendeten zellulären Konzentration wurde vorgenommen.

3.3.4. Evaluation der Viabilität verkapselter Zellen

Die Viabilität der in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel eingeschlossenen Zellen wurde mittels des LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit untersucht. Das Assay differenziert lebende und tote Zellen durch den Einsatz von zwei spezifischen Fluoreszenz-Farbstoffen: Calcein-AM und Propidium-Iodid. Der eingesetzte zellendurchlässige Calcein-AM-Farbstoff wird durch Acetoxymethylester-Hydrolyse in grün fluoreszierendes Calcein umgewandelt und weist auf intrazelluläre Esterase-Aktivität hin, während rot fluoreszierendes Propidium-Iodid doppelsträngige DNA bindet, indem es sich zwischen Basenpaaren einfügt, und somit den Integritätsverlust der zellulären Plasmamembran markiert. Eine intakte Zellmembran ist Propidium-Iodid-undurchlässig. Dementsprechend werden lebende Zellen grün angefärbt, wohingegen sich tote Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop rot darstellen.

Nach dem Zentrifugieren der Proben wurde das Zellkulturmediums entfernt und die basal gelegenen Mikrokapseln in einem 1,5 ml Eppendorf Tube ® in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden 2 µl Calcein-AM (Sigma-Aldrich, Deutschland) in die Suspension pipettiert und für 15 Minuten inkubiert. Dann wurden 3,5 µl Propidium-Iodid (LifeTechnologies) hinzugefügt und nach einer weiteren Inkubationszeit von 5 Minuten erfolgte die Analyse unter dem Mikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, Deutschland). Die Dichte der lebenden Calcein-AM markierten Zellen sowie der toten Propidium-Iodid gekennzeichneten Zellen wurde mit Zuhilfenahme von ImageJ Software quantifiziert. Überdies wurde die Masse der verkapselten vitalen Zellen beurteilt und das mittlere Flächenmaß der zellulären Oberfläche dank ImageJ Software (National Institutes of Health, NIH) bestimmt. Die Viabilität, die Masse und das mittlere Flächenmaß der zellulären Oberfläche verkapselter Zellen wurde an Tag 1- sowie Tag 7-Follow-up ermittelt.

3.4. MSC-konditioniertes Medium

3.4.1. Herstellung des konditionierten Mediums

Um eine Analyse des MSC-Sekretoms anstellen zu können, wurde das Zellkulturmedium nach einem Tag der Konditionierung durch die Stammzellen gesammelt. Die kultivierten MSC wurden in Gelatine-basiertem Hydrogel eingeschlossen, wobei GMA-funktionalisierte Gelatine mit Zusatz von DxS und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden verwendet wurde. Die verkapselten Stammzellen wurden in Gelatine-benetzten Greiner 6-Well-Platten in EBM-2 (Lonza, Deutschland) oder in DMEM im luftbefeuchteten Inkubator bei 37°C 5% CO₂ kultiviert. Nach Tag 1 wurde das MSC-CM abpipettiert und zentrifugiert, um verkapselte Stammzellen, Zelldetritus und Gelatine-Zerfallsprodukte zu entfernen. Aliquotiert in 1 ml Eppendorf Tube ® wurde das hergestellte CM bei - 80 °C gelagert. Zur Kontrolle wurden Proben mit nicht verkapselten MSC produziert, die ebenso in Gelatine-benetzten 6-Well-Platten in EBM-2 oder in DMEM im luftbefeuchteten Inkubator bei 37°C 5% CO₂ kultiviert wurden. Gleichermaßen wurde das CM nach 1 Tag abpipettiert, zentrifugiert und zur Lagerung bei - 80 °C in 1 ml Eppendorf Tube ® überführt. Weiterhin wurden zellfreie Proben generiert, die aus EBM-2 oder DMEM ebenfalls inkubiert auf Gelatine-benetzten 6-Well-Platten bestanden. Auch dieses Medium wurde nach eintägiger Inkubation abpipettiert, zentrifugiert und bei - 80 °C in 1 ml Eppendorf Tube ® gelagert.

3.4.2. Evaluation der sezernierten humanen Zytokine

Die parallele Bestimmung des relativen Anteils ausgewählter humaner Zytokine im MSC-CM fand mithilfe von dem Proteome Profile™ Human XL Cytokine Array Kit statt. Das Assay beruht auf Nitrocellulose-Membranen bestückt mit Duplikaten von Capture-Antikörpern und entsprechenden Kontrollen. Die fixierten antigenspezifischen Antikörper sind gegen 105 unterschiedliche humane Zytokine gerichtet, die als lösliche Antigene fungieren. Unter anderem das immunmodulatorische Zytokine IL-6, die proangiogenetischen Signalmoleküle VEGF, bFGF, SDF-1 sowie Ang-1 mit anti-apoptotischer Wirkung.

Für das Verfahren des Sandwich-ELISA wird das zu untersuchende Medium über Nacht mit den Membranen inkubiert, sodass eine Bindung zwischen den Capture-Antikörpern und den zu detektierenden Antigenen stattfindet. Nachfolgend werden die benetzten Membranen gewaschen, um unspezifisch gebundene Antigene zu entfernen und eine falsch positive Reaktion zu verhindern. Ein zweiter biotinylierter Detection-Antikörper wird hinzugefügt und bindet ebenfalls antigenspezifisch. Die Zugabe von Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase induziert eine Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung, die eine hohe Affinität aufweist und eine Kopplung des Detection-Antikörpers mit HRP hervorruft. Durch die Applikation einer Chemilumineszenz-Reagenz wird die Kopplung von einer chemischen Reaktion mit Lichtemission begleitet. Die HRP-katalysierte Chemilumineszenzreaktion der Reagenz produziert ein Lichtsignal, dessen Stärke mit der Menge der gebundenen Antigene korrespondiert. Demnach entspricht ein starkes Lichtsignal einem hohen Anteil sezernierter humaner Zytokine im untersuchten Medium.

Die Nitrocellulose-Membranen wurden jeweils in ein Well einer 4-Well-Multischale positioniert und mit 2 ml Pufferlösung versehen. Während der einstündigen Inkubation der Membranen auf einem Wippschüttler wurden 1 ml des zuvor hergestellten DMEM-basierten CM zentrifugiert und mit Pufferlösung versetzt, sodass jede Probe ein Gesamtvolumen von 1,5 ml aufwies. Im Anschluss wurde die Pufferlösung von den Membranen abpipettiert und die Lösung aus MSC-CM und Puffer gleichmäßig auf den Membranen verteilt. Über Nacht inkubierten die benetzten Nitrocellulose-Membranen auf einem Wippschüttler bei 2-8 °C. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die Membranen in separaten Plastikbehälter mit je 20 ml Pufferlösung gelagert und zum Waschen für 10 Minuten auf einen Wippschüttler gelegt. Der Waschvorgang der Nitrocellulose-Membranen wurde insgesamt dreimal wiederholt. In der Zwischenzeit wurde die 4-Well-Multischale mit destilliertem Wasser gereinigt und dann in jedes Well 1,5 ml Detection-Antikörper-Lösung pipettiert. Die gewaschenen Membranen wurden aus der Pufferlösung entfernt und erneut in die Wells der 4-Well-Multischale überführt. Es folgte eine einstündige Inkubation der Membranen in der Detection-Antikörper-Lösung auf dem Wippschüttler bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der dreifache Waschvorgang der Nitrocellulose-Membranen in Pufferlösung wiederholt und unterdessen 2 ml Streptavidin-HRP in jedes Well der mit destilliertem Wasser gereinigten 4-Well-Multischale pipettiert. Die Membranen wurden zurück in die 4-Wells-Multischale gegeben und für 30 Minuten in der Streptavidin-HRP-Lösung auf dem Wippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Ein weiterer dreifacher Waschvorgang wurde vollzogen und im Folgenden wurden die Membranoberflächen gleichmäßig mit jeweils 1 ml der Chemilumineszenz-Reagenz benetzt und für 1 Minute inkubiert. Schließlich wurden die Nitrocellulose-Membranen auf eine Röntgenfilmkassette platziert und eine Expositionszeit von 10 Minuten gewählt. Die Schwärzung des röntgenologischen Filmmaterials wurde mit einem Transmission-Mode Scanner erfasst und die Signalstärke

der zugrundeliegenden Lichtemission analysiert, wobei ein Vergleich der Zytokin-Zusammensetzung der unterschiedlichen Proben angestellt sowie der relative Anteil der humanen Zytokine im MSC-CM untersucht wurde.

3.4.3. Angiogenetische Wirkung des konditionierten Mediums

Das MSC-CM wurde dank des Spheroid Sprouting Assay auf einen angiogenetischen Effekt hin untersucht. Das Assay gründet auf der Herstellung dreidimensionaler Endothelzell-basierter Sphäroide, um in-vitro die Angiogenese, in Form von zellulärer Aussprossung, Proliferation sowie Migration, nachzustellen. Zur Produktion der Sphäroide werden die Endothelzellen in Rundboden-Platten überführt, die eine zelluläre Adhäsion am Plattenboden verhindern und zur Kultivierung der Zellen in einer zentral gelegenen sphäroiden Zellkultur verhelfen. Nach Einbetten der Endothelzell-basierten Sphäroide in Kollagen-Gel kann das angiogenetische Verhalten der Zellen beobachtet werden. Die Endothelzellen tendieren zur Ausbildung von Sprouts innerhalb der Gel-Matrix, die als Kapillar-ähnliche Strukturen Ausdruck ihres Potenzials zur Gefäßneubildung sind. Unter Zusatz des MSC-CM zu den in Kollagen-Gel eingebetteten Sphäroiden ist dessen angiogenetische Wirkung anhand der Anzahl und Länge gebildeter Sprouts zu beurteilen. Folglich weisen eine hohe Anzahl an zellulären Aussprossungen und eine große Länge der einzelnen Sprouts auf einen positiven Einfluss auf die Angiogenese hin.

Zur Sphäroid-Herstellung wurden die kultivierten HUVEC zweimal mit jeweils 8 ml PBS gewaschen und dann trypsinisiert, sodass nach 2 Minuten Inkubation im luftbefeuchteten Inkubator bei 37 °C 5% CO₂ eine Lösung der Zellen vor der Zellkulturflaschen unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden konnte. Die Trypsin-Reaktion wurde mit 4 ml Zellkulturmedium inhibiert und die resultierende Zellsuspension zentrifugiert. Das basale Zellpellet wurde dann in 1 ml EGM-2 supplementiert mit 0,25 % Methylcellulose (Sigma-Aldrich, Deutschland) resuspendiert. Nach automatisierter Bestimmung der Zellkonzentration dank Countess™ Automated Cell Counter wurde die Zellsuspension mit dem entsprechenden Volumen von EGM-2 mit 0,25 % Methylcellulose verdünnt, um eine Konzentration von 500 Zellen/ 100 µl Zellsuspension zu erlangen. In die Wells einer nicht-adhärennten Rundboden-96-Well-Platte (Corning Costar ®) wurden dann jeweils 100 µl der HUVEC-Zellsuspension pipettiert, sodass sich innerhalb von 24 Stunden Sphäroide formen konnten. Jeweils 24 Sphäroide wurde nun in ein 1,5 ml Eppendorf Tube ® überführt, zentrifugiert und in 750 µl des EBM-2-basierten CM supplementiert mit 0,5 % Methylcellulose suspendiert. Auf Eis gekühlte Kollagen-I-Lösung (Sigma-Aldrich, Deutschland) neutralisiert mit 10 % 10 x PBS und 10 % 0,1 M Natriumhydroxid wurde im Verhältnis von 1:1 zu der Sphäroid-Suspension gegeben und im Anschluss in ein Well einer 12-Well-Platte pipettiert. Nach 2-stündiger Inkubation im luftbefeuchteten Inkubator bei 37°C 5% CO₂ wurden jeweils 0,7 ml des CM oberflächlich auf die Sphäroid-enthaltene gelierte Kollagen-I-Lösung gegeben. Das Sprouting der Sphäroide wurde nach 2 Tagen unter dem Lichtmikroskop (Axio Scope.A1, Zeiss, Deutschland) analysiert. Dabei wurde die Anzahl der zellulären Aussprossungen gezählt und die Länge der einzelnen Sprouts unter Einsatz von ImageJ Software vermessen.

3.5. Statistische Auswertung

Eine einfaktorielle ANOVA wurde unter der Annahme einer Normalverteilung der voneinander unabhängigen Messwerte sowie einer vorliegenden Varianzhomogenität durchgeführt, wobei IBM® SPSS Statistics Version 21.0.0.0 Verwendung fand. Ein P Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert.

4. ERGEBNISSE

4.1. Zellverkapselung

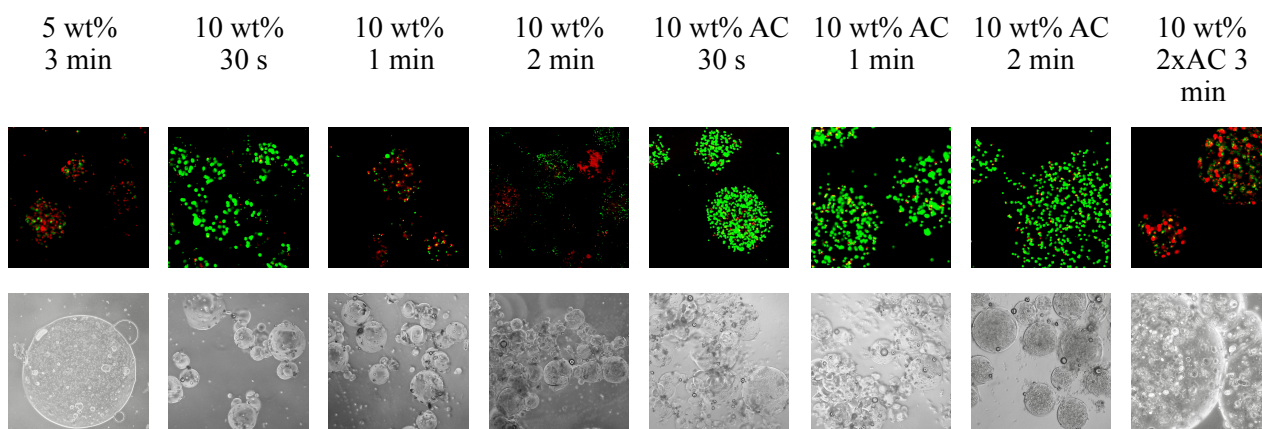
4.1.1. L929-Fibroblasten

4.1.1.1. Zelluläre Viabilität - Tag 1 und 7

Die zelluläre Verkapselung der L929 wurde entsprechend der zuvor vorgestellten Methode durchgeführt, wobei stabile Mikrokapseln unter Verwendung von 10 wt%-GMA-Gelatine und 10 wt% AC GMA-Gelatine entstanden. Eine UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden bis 2 Minuten ermöglichte die Produktion von kovalent vernetzten GMA-Gelatine-basierten Mikrokapseln. Nach Isolation und Resuspension der Zell-beladenen Mikrokapseln in das Zellkulturmedium waren zudem einzelne ungebundene Zellen zwischen den Mikrokapseln vorzufinden. Hingegen, waren keine stabilen Mikrokapseln unter Einsatz von 5 wt%-GMA-Gelatine sowie 10 wt% 2xAC GMA-Gelatine bei identischen UV-Licht-Expositionenzeiten herzustellen. Erst die Verlängerung der Expositionszeit auf 3 Minuten resultierte in Mikrokapsel mit ausreichender Stabilität. An Tag 1. des Follow-ups präsentierten die Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden die höchste zelluläre Viabilität ($97 \pm 1,5\%$). Dahingegen wiesen die Zell-beladenen Mikrokapseln aus 10 wt%-GMA-Gelatine und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden nur eine Viabilität von $83 \pm 9\%$ auf. Verlängerte Expositionszeiten gegenüber dem UV-Licht von 1 Minute bzw. 2 Minuten hatten eine deutliche Verringerung der zellulären Viabilität der 10 wt%-GMA-Gelatine-Mikrokapseln zum Resultat. Demnach waren keine lebenden Zellen in den Mikrokapseln aus 10 wt%-GMA-Gelatine, die eine UV-Licht-Exposition von 2 Minuten erfuhren, nachzuweisen. Gleichfalls zeichneten sich die stabilen Mikrokapseln aus 5 wt%-GMA-Gelatine und 10 wt% 2xAC GMA-Gelatine, die einer UV-Licht-Exposition von 3 Minuten bedurften, durch eine reduzierte zelluläre Viabilität aus ($42 \pm 7\%$ bzw. $70 \pm 6\%$). Eine geringere Abnahme der zellulären Viabilität ergab sich bei den 10 wt% AC GMA-Gelatine-basierten Mikrokapseln. Die Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine boten eine lediglich 10% geringere zelluläre Viabilität nach einer 2 Minuten UV-Expositionszeit dar. Zwischen den 10 wt% AC GMA-Gelatine-basierten Hydrogel-Kapseln konnte kein signifikanter Unterschied der Zellviabilität in Abhängigkeit von der gewählten UV-Licht-Expositionszeit dokumentiert werden. Hingegen zeigten Mikrokapseln aus 10 wt%-GMA-Gelatine verschiedenartiger Expositionszeiten gegenüber dem UV-Licht Divergenzen in der zellulären Viabilität mit statistischer Signifikanz.

Nach 7 Tagen Follow-up wurde die zelluläre Viabilität der verkapselten Zellen erneut evaluiert (Abb. 5). Hierfür erfolgte die Bestimmung der Zellzahl lebender Zellen für die Mikrokapseln aus 10 wt%-GMA-Gelatine und 10 wt% AC GMA-Gelatine. Die zelluläre Viabilität wurde mit vergleichbaren Ergebnissen zu Tag 1. Follow-up quantifiziert. Dementsprechend hatten die Mikrokapseln aus 10 wt%-GMA-Gelatine eine eminente Reduktion der Viabilität verkapselter Zellen bei gesteigerter UV-Licht-Expositionszeit vorzuweisen, indessen präsentierten 10 wt% AC GMA-Gelatine-Mikrokapseln eine geringere Abnahme. Der signifikante Unterschied zwischen der Zellviabilität verkapselter L929 in Mikrokapseln aus 10 wt%-GMA-Gelatine mit verschiedenartiger UV-Licht-Expositionsdauer bleibt erhalten, genauso wie das Fehlen einer

a.



b.

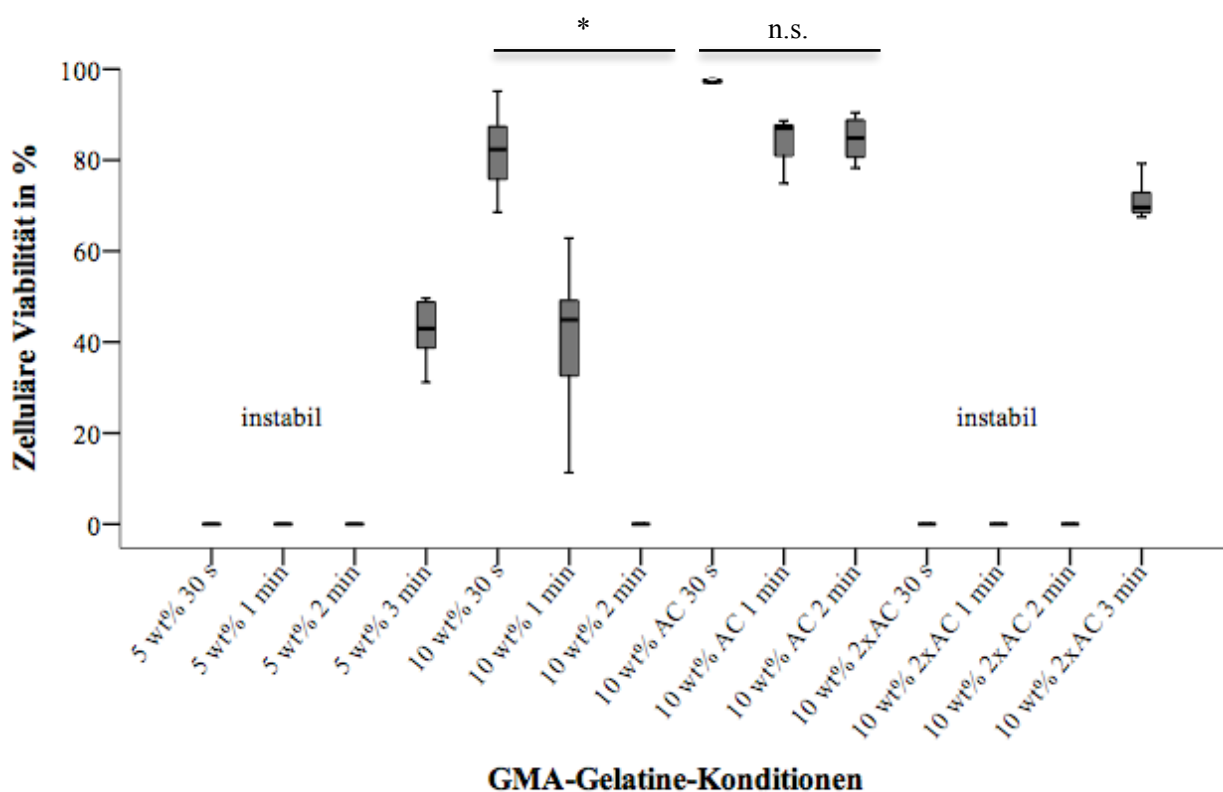
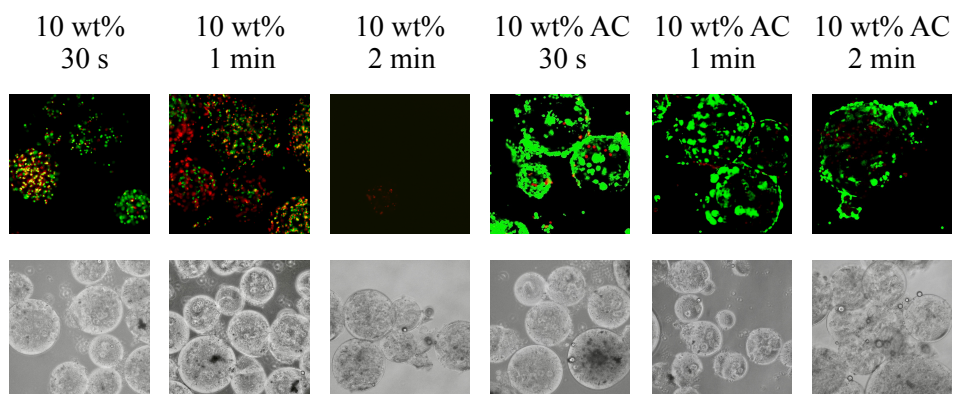


Abb. 4: Zelluläre Verkapselung von L929-Fibroblasten in Hydrogel-Kapseln auf Basis unterschiedlicher GMA-Gelatine-Lösungen nach 1 Tag Follow-up.

* Statistisch signifikanter Unterschied mit einem P Wert von $< 0,05$. n.s. Nicht signifikanter Unterschied.

- Fluoreszenzmikroskop-Bilder und entsprechende lichtmikroskopische Aufnahmen der verkapselten L929 nach Anfärbung mit dem LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit. Lebende Zellen zeigen sich grün fluoreszierend (Calcein-AM), wohingegen sich tote Zellen rot darstellen (Propidium-Iodid). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μm . Eine Vergrößerung von 200 x wurde verwendet.
- Box-Plot-Darstellung der zellulären Viabilität in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel verkapselter L929.

a.



b.

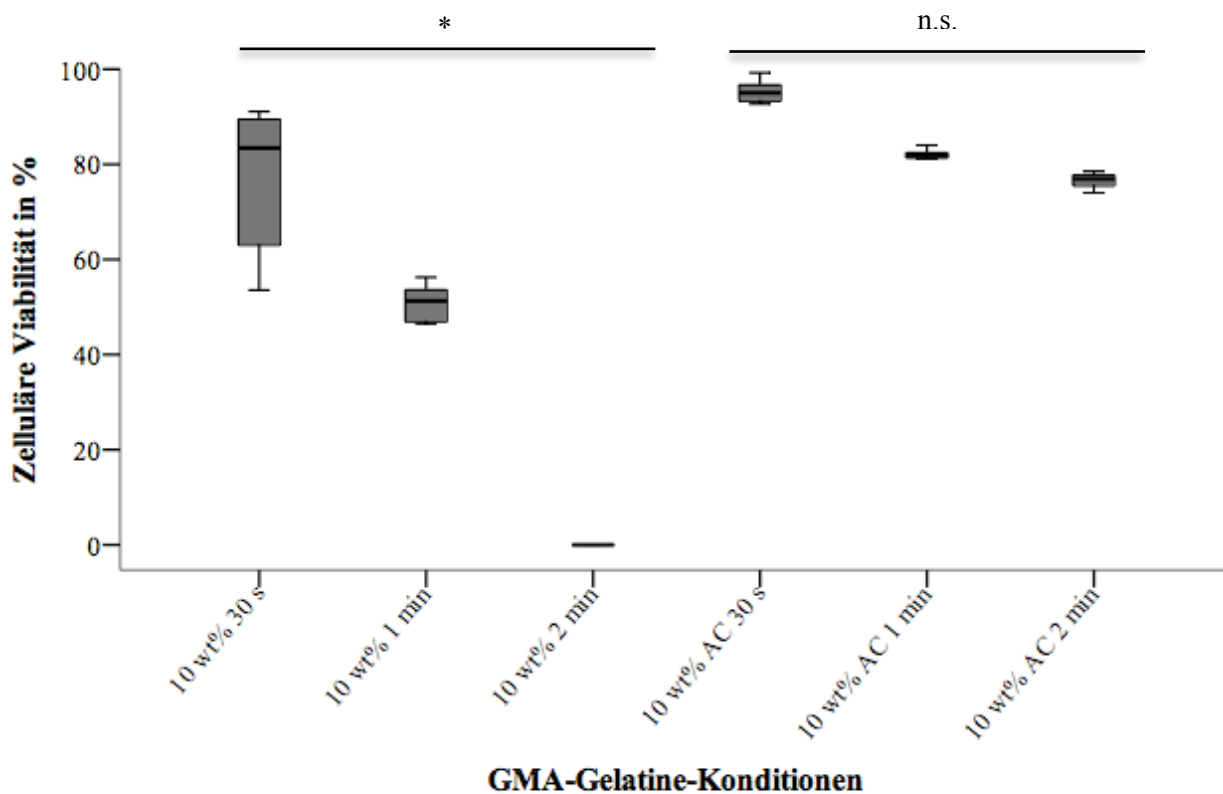


Abb. 5: Zelluläre Verkapselung von L929-Fibroblasten in Hydrogel-Kapseln auf Basis unterschiedlicher GMA-Gelatine-Lösungen nach 7 Tagen Follow-up.

* Statistisch signifikanter Unterschied mit einem P Wert von $< 0,05$. n.s. Nicht signifikanter Unterschied.

- Fluoreszenzmikroskop-Bilder und entsprechende lichtmikroskopische Aufnahmen der verkapselten L929 nach Anfärbung mit dem LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit. Lebende Zellen zeigen sich grün fluoreszierend (Calcein-AM), wohingegen sich tote Zellen rot darstellen (Propidium-Iodid). Der Maßstabsbalken entspricht $500 \mu\text{m}$. Eine Vergrößerung von $200 \times$ wurde verwendet.
- Box-Plot-Darstellung der zellulären Viabilität in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel eingeschlossener L929.

Differenz mit statistischer Signifikanz zwischen zellulärer Viabilität der Fibroblasten eingeschlossen in 10 wt% AC GMA-Gelatine-Mikrokapsel eine Bestätigung erfuhr.

An Tag 7. des Follow-ups wurde bei allen Mikrokapseln, hergestellt aus 10 wt% AC GMA-Gelatine, eine zelluläre Migration vom Kapselinneren an die sphärische Kapseloberfläche beobachtet. Unter dem Lichtmikroskop waren L929 als Monolayer mit einer typischen fibroblastoiden Zellmorphologie zu identifizieren, die aus dem Inneren der Hydrogel-Kapseln auf die Oberfläche migriert waren und eine Ummantelung der Mikrokapseln herstellten (Abb. 5 a).

In Anbetracht der erzielten Ergebnissen bei der zellulären Verkapselung der L929-Fibroblasten wurde die 10 wt% AC GMA-Gelatine-Lösung als ideale für die Herstellung Zell-beladener Mikokapseln angesehen. Demgemäß kam die 10 wt% AC GMA-Gelatine bei der MSC-Verkapselung durch Hydrogel-basierte Mikrokapseln zum Einsatz.

4.1.1.2. Mittlere Mikrokapselgröße

Die Vermessung der hergestellten Mikrokapseln wurde anhand von Abbildungen, die mit der integrierten Mikroskop-Kamera bei 5-facher Vergrößerung aufgenommen wurden, durchgeführt.

Die durchschnittliche Kapselgröße belief sich auf $102 \pm 73 \mu\text{m}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) (Abb. 6), sodass die Produktion von Zell-beladenen sphärischen Hydrogel-Kapseln mit einer Größe im Mikrometer-Bereich verifiziert wurde. Obwohl eine mittlere Mikrokapselgröße von ungefähr $100 \mu\text{m}$ erreicht wurde, war eine breite Streuung bei der Größenverteilung der Mikrokapseln festzuhalten.

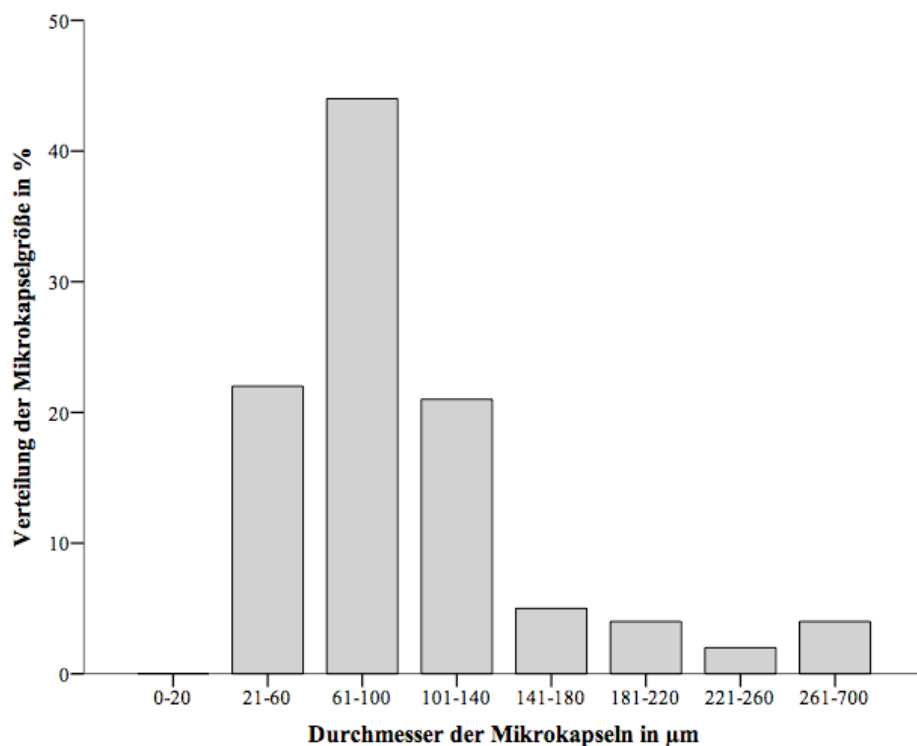


Abb. 6: Balkendiagramm-Darstellung der Größenverteilung der aus 10 wt%-GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel hergestellten Mikrokapseln.

Mit einem Mikrokapseldurchmesser von 20 μm bis zu 700 μm wurden sowohl sehr kleine als auch sehr große Kapseln generiert. Eine einheitliche Mikrokapselgröße konnte nicht gewährleistet werden.

4.1.1.3. Zellverkapselungseffizienz

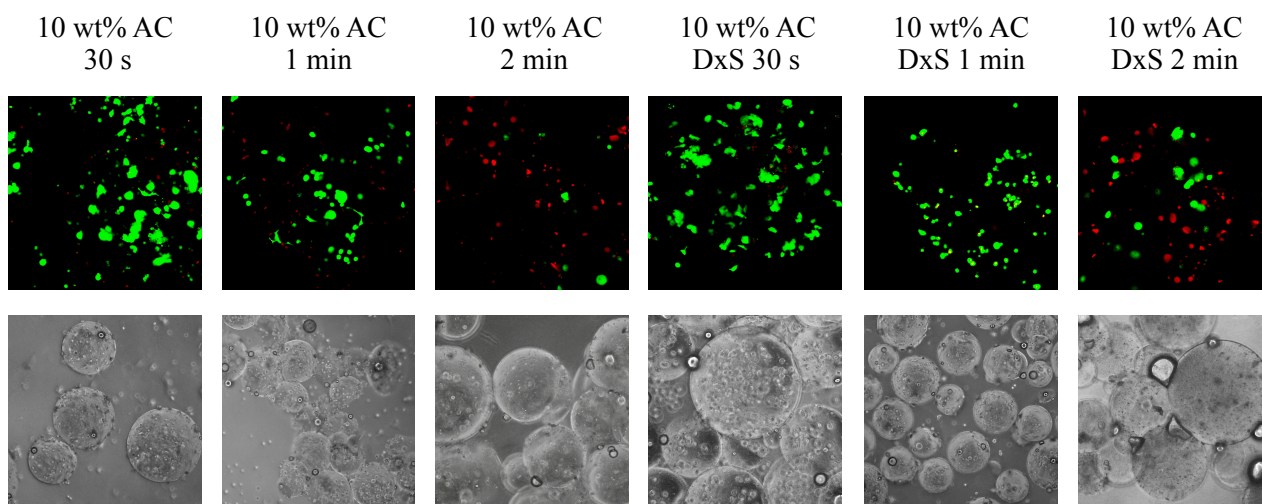
Nachdem die Zellen erneut aus der Mikroverkapselung gelöst wurden, erfolgte die Zellzahlbestimmung der vitalen Zellen, um die Effizienz der zellulären Mikroverkapselung zu erhalten. Im Durchschnitt bot sich ein prozessbedingter Verlust von 60% der lebenden Zellen, die anfänglich in der Zell-Gelatine-Suspension vorzufinden waren. Damit muss von einem relevanten Stress, den die Zellen durch das eingesetzte Emulsionsverfahren erfahren, ausgegangen werden. Die zelluläre Integrität und Funktionalität scheint erheblich unter dem prozessualen Vorgehen der Zellverkapselung zu leiden.

Zum Vergleich wurde das zelluläre Verkapselungsverfahren ohne Exposition der Zell-Gelatine-Suspension gegenüber dem UV-Licht wiederholt. Infolgedessen blieb die Gelierung der GMA-Gelatine durch photochemische Induktion aus. Das Zentrifugieren der Zell-Gelatine-Suspension in Emulsion mit der Ölphase evozierte einen ausgeprägten Verlust an vitalen Zellen, wie bereits nach zellulären Verkapselung vorgefunden. Die Bildung von GMA-Gelatine-basierten Mikrokapseln stellt sich ohne protektiven Effekt auf die Zellen während des Verkapselungsprozesses dar.

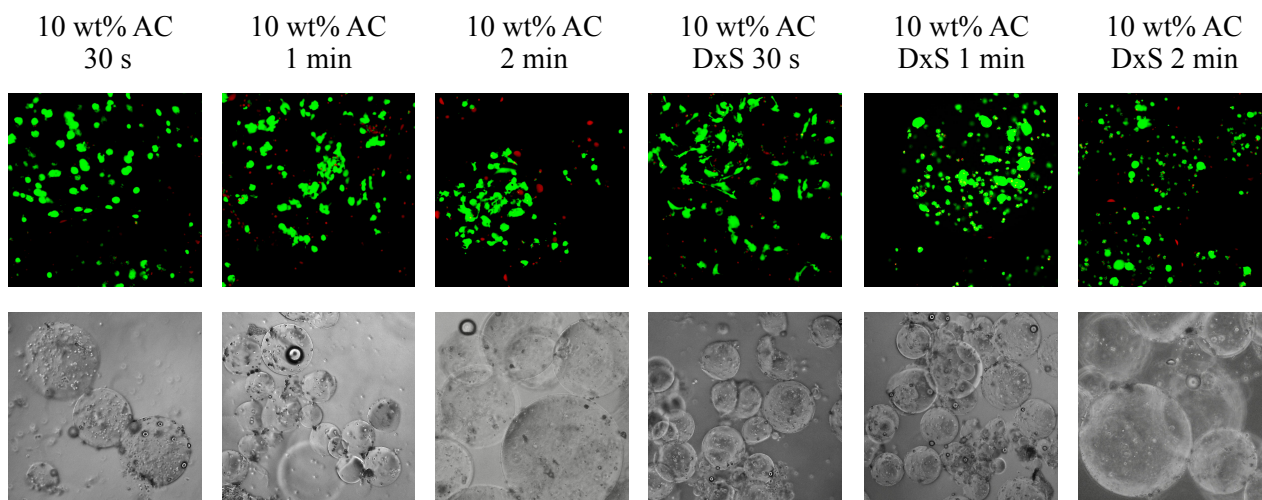
4.1.2. MSC

4.1.2.1. Zelluläre Viabilität und Zellmasse - Tag 1

a. BM-MS



b. CB-MSK



c. AD-SC

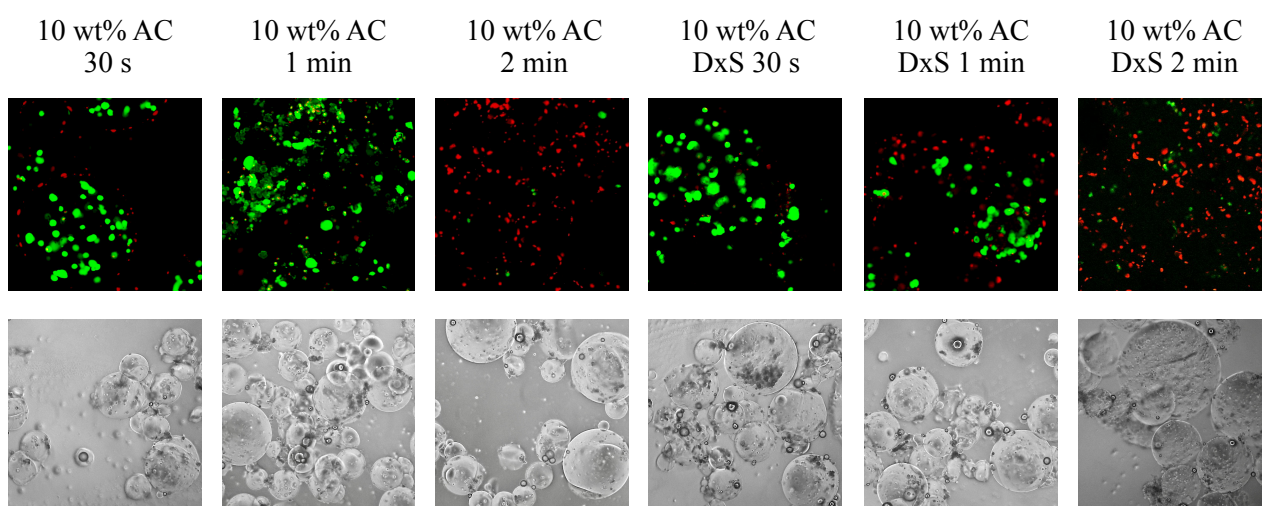


Abb. 7: Fluoreszenzmikroskop-Bilder und entsprechende lichtmikroskopische Aufnahmen der verkapselten MSC nach 1 Tag Follow-up. Es erfolgte eine Anfärbung mit dem LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit. Lebende Zellen zeigen sich grün fluoreszierend (Calcein-AM), wohingegen sich tote Zellen rot darstellen (Propidium-Iodid). Der Maßstabsbalken entspricht 500 µm. Eine Vergrößerung von 200 x wurde verwendet.

- Verkapselung von BM-MSK in 10 wt%-GMA-Gelatine mit und ohne DxS-Zusatz.
- Verkapselung von CB-MSK in 10 wt%-GMA-Gelatine mit und ohne DxS-Zusatz.
- Verkapselung von AD-SC in 10 wt%-GMA-Gelatine mit und ohne DxS-Zusatz.

Die zelluläre Verkapselung der MSC wurde entsprechend der zuvor vorgestellten Methode und basierend auf den Ergebnissen der L929-Zellverkapselung realisiert, sodass 10 wt% AC GMA-Gelatine und 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS genutzt wurden. Stabile Mikrokapseln waren sowohl mit der 10 wt% AC GMA-Gelatine als auch mit der 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz herzustellen. UV-Licht-Expositionszeiten von 30 Sekunden bis 2 Minuten stellten die Produktion von kovalent vernetzten GMA-Gelatine-basierten Hydrogel-Kapseln sicher.

4.1.2.1.1. BM-MSc

An Tag 1. des Follow-ups zeigten BM-MSc verkapselt in Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz und einer UV-Licht-Exposition von 30 Sekunden ausgesetzt die höchste zelluläre Viabilität ($90 \pm 5,6\%$). Im Vergleich zu den Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine präsentierten BM-MSc-beladene Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit supplementiertem DxS einen deutlich höheren Anteil lebender Zellen an der gesamten Zellpopulation bei gleicher UV-Licht-Expositionszeiten von 30 Sekunden ($90 \pm 5,6\%$ vs. $82 \pm 10,4\%$). Bei einer Expositionzeit von 2 Minuten gegenüber dem UV-Licht offenbarte sich eine minimale zelluläre Viabilität für die BM-MSc-beladenen Mikrokapseln. Besonders evident war der Abfall der Zellviabilität bei der DxS-freien GMA-Gelatine-Lösung. Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine ohne DxS-Zugabe und einer 2-minütigen UV-Licht-Exposition zeigten eine signifikant geringere zelluläre Viabilität ($9 \pm 6,8\%$). Die 10 wt% AC GMA-Gelatine ohne DxS-Zusatz fiel darüber hinaus durch einen nahezu unveränderten Anteil vitaler Zellen nach Verkapselung unter UV-Licht-Exposition von 30 Sekunden und 1 Minute auf. Eine zu erwartende Abnahme der Zellviabilität durch zeitliche Verlängerung der UV-Licht-Exposition blieb aus. Verlängerte Expositionszeiten gegenüber dem UV-Licht von 1 Minute bzw. 2 Minuten hatten eine Verringerung zellulärer Viabilität der Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz zur Folge. Die Reduktion des Anteils lebender MSC

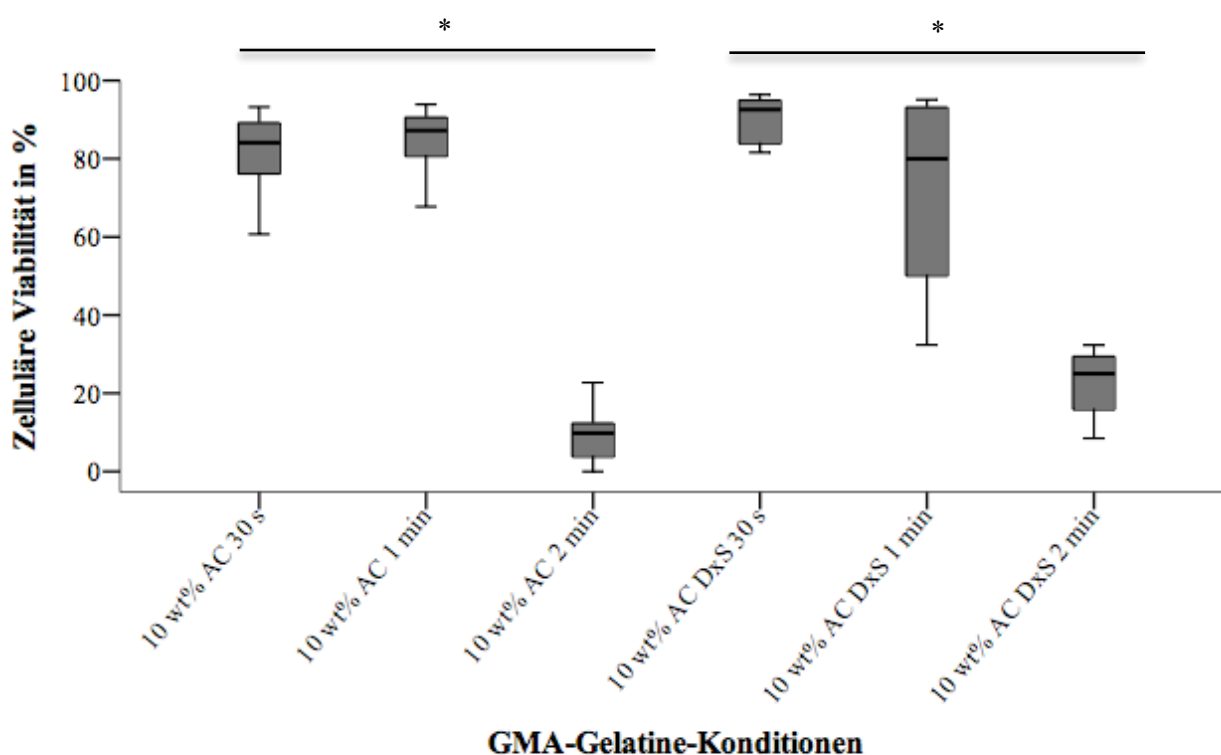


Abb. 8: Box-Plot-Darstellung der zellulären Viabilität in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel mit und ohne DxS-Zusatz verkapselter BM-MSc bei unterschiedlicher UV-Expositionsdauer nach 1 Tag.

* Statistisch signifikanter Unterschied mit einem P Wert von $< 0,05$.

eingeschlossen in 10 wt% AC GMA-Gelatine-Hydrogel-Kapseln mit DxS-Supplementation und 2-Minuten-UV-Licht-Exposition erzielte statistische Signifikanz.

Die höchste mittlere Zellmasse infolge einer zellulären Proliferation wurde für BM-MSC verkapselt in Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit zugesetztem DxS und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden festgehalten. Das Verhältnis der LIVE/DEAD®-angefärbten Flächen war eindeutig zugunsten vitaler Zellen verschoben ($86 \pm 10,9\%$). Einen Unterschied von mehr als 10% in Bezug auf das Flächenverhältnis vitaler zu toter BM-MSC war bei der Verkapselung in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel ohne DxS-Supplementation zu identifizieren. Trotz identischer Expositionszeit von 30 Sekunden gegenüber dem UV-Licht wurde lediglich ein Wert von $74 \pm 4,7\%$ erreicht. Ebenfalls eine hohe durchschnittliche Zellmasse verzeichnete die 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz und einer UV-Licht-Expositionszeit von 1 Minute mit einem Verhältnis LIVE/DEAD®-angefärbter Flächen von $79 \pm 9,3\%$. Die GMA-Gelatine-Lösungen mit einer UV-Licht-Expositionszeit von 2 Minuten boten, genauso wie bei den Ergebnissen zur zellulären Viabilität nach Verkapselung, einen beträchtlichen Abfall der durchschnittlichen Zellmasse vitaler Zellen.

4.1.2.1.2. CB-MSC

Für CM-MSC lag die maximale zelluläre Viabilität ebenso bei einer Verkapselung in Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden vor ($88 \pm 9,4\%$). Bei gleicher Expositionszeit von 30 Sekunden gegenüber dem UV-Licht manifestierten die Hydrogel-Kapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit zugesetztem DxS eine höhere Zellviabilität im Vergleich zu den Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine ohne DxS-Zugabe ($88 \pm 9,4\%$ vs. $76 \pm 7\%$). Die zelluläre Viabilität nahm bei den Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit steigender UV-Licht-Expositionszeit zunehmend ab (Abb. 9). Gleichfalls war eine Reduktion der Zellviabilität bei GMA-Gelatine-Lösungen mit DxS-Zusatz und UV-Licht-Expositionszeitverlängerung zu erkennen, jedoch präsentierte sich der Unterschied im Anteil vitaler Zellen zwischen den Mikrokapseln nach 30 s- und 1 Minute-UV-Licht-Exposition als gering ($88 \pm 9,4\%$ vs. $86 \pm 11,5\%$). Die niedrigste Zellviabilität wurde bei 2 Minuten UV-Licht-Expositionszeit vorgefunden sowohl bei den Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine ($56 \pm 20,2\%$) als auch bei den Hydrogel-Kapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine unter supplementiertem DxS ($56 \pm 9\%$). Die Abnahme der zellulären Viabilität verkapselter CB-MSC infolge einer 2-minütigen Exposition gegenüber dem UV-Licht erreichte Signifikanzniveau.

Verkapselte vitale CB-MSC legten die höchste mittlere Zellmasse bei Verkapselung in Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz und einer UV-Licht-Expositionszeit von 1 Minute vor. Ein Verhältnis von $80 \pm 3\%$ der LIVE/DEAD®-angefärbten Flächen wurde vermerkt. Insgesamt war dennoch kein großer Unterschied zwischen den verschiedenartig generierten GMA-basierten Mikrokapseln bezüglich der durchschnittlichen Zellmasse der CB-MSC ersichtlich. Das berechnete Verhältnis LIVE/DEAD®-angefärbter Flächen zeigte sich als vergleichbar zwischen den unterschiedlich hergestellten GMA-basierten Mikrokapseln. Im Mittel wurde ein Wert von 76% verifiziert.

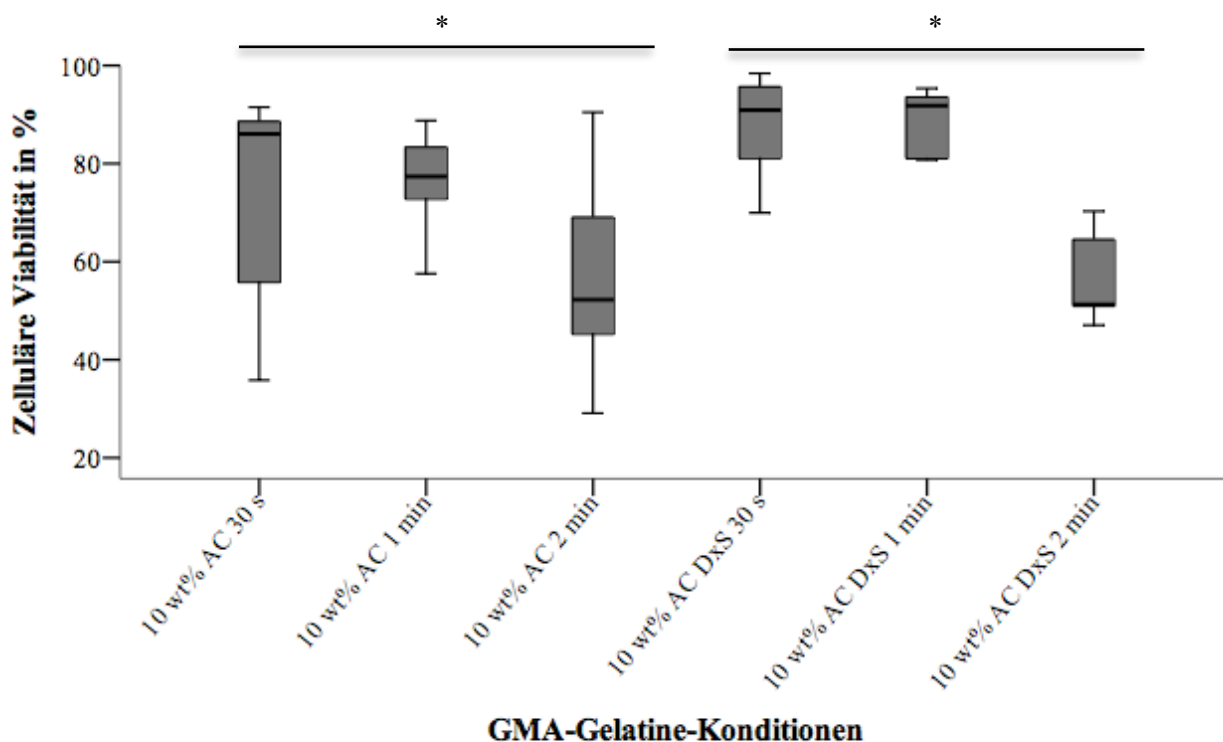


Abb. 9: Box-Plot-Darstellung der zellulären Viabilität in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel mit und ohne Dxs-Zusatz verkapselter CB-MS-C bei unterschiedlicher UV-Expositionsdauer nach 1 Tag.

* Statistisch signifikanter Unterschied mit einem P Wert von $< 0,05$.

4.1.2.1.3. AD-SC

Follow-up-Tag 1 dokumentierte die höchste zelluläre Viabilität der AD-SC-beladenen Mikrokapseln bei einer Hydrogel-Zusammensetzung aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit Dxs-Zugabe und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden ($89 \pm 7\%$). Dahingegen wiesen die AD-SC eingebettet in Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine ohne zugesetztes Dxs und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden nur eine Viabilität von $71 \pm 14,1\%$ auf. Eine Zunahme der Expositionszeit gegenüber dem UV-Licht bewirkte eine sichtliche Reduktion der Zellviabilität der Hydrogel-Kapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit Dxs-Zusatz, sodass der Anteil lebender AD-SCs an der gesamten Zellpopulation bei 1 Minute- und 2 Minuten-Exposition minimal war ($38 \pm 13,2\%$ bzw. $13 \pm 9,2\%$). Ebenso wiesen GMA-Gelatine-Lösungen ohne Supplementation von Dxs eine geringfügige zelluläre Viabilität bei 2 Minuten-Exposition auf ($17 \pm 12,6\%$). Die Zellviabilität verkapselter AD-SC war jeweils nach 2-minütiger UV-Licht-Expositionsdauer signifikant niedriger. Bei den Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine war nach einer UV-Licht-Exposition von 1 Minute eine höhere Viabilität verkapselter AD-SC vorzufinden im Vergleich zu den 10 wt% AC GMA-Gelatine-Mikrokapseln nach 30 Sekunden UV-Licht-Exposition ($84 \pm 6,5\%$ vs. $71 \pm 14,1\%$).

In Bezug auf die mittlere Zellmasse boten AD-SC nach Verkapselung in GMA-Gelatine-Lösung mit Dxs-Zusatz und UV-Licht-Exposition von 30 Sekunden ein Verhältnis LIVE/DEAD®-angefärbter Flächen von 81

$\pm 13,7\%$. Daneben fiel das Flächenverhältnis lebender zu toter Zellen bei der Verwendung von 10 wt% AC GMA-Gelatine und einer 1 Minute-UV-Licht-Exposition ebenfalls deutlich zugunsten vitaler Zellen aus ($77 \pm 6,3\%$). Hierbei wurde auch ein höherer Wert vergleichend mit der GMA-Gelatine identischer Zusammensetzung und einer geringeren UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden notiert. $73 \pm 7,2\%$ waren bei der Verkapselung von AD-SC in GMA-Gelatine-Lösung ohne DxS-Supplementation und einer 30-sekündigen UV-Licht-Exposition zu registrieren. Die GMA-Gelatine-Konditionen, die einer UV-Licht-Exposition von 2 Minuten ausgesetzt waren, verzeichneten einen offensichtlichen Abfall der mittleren Zellmasse.

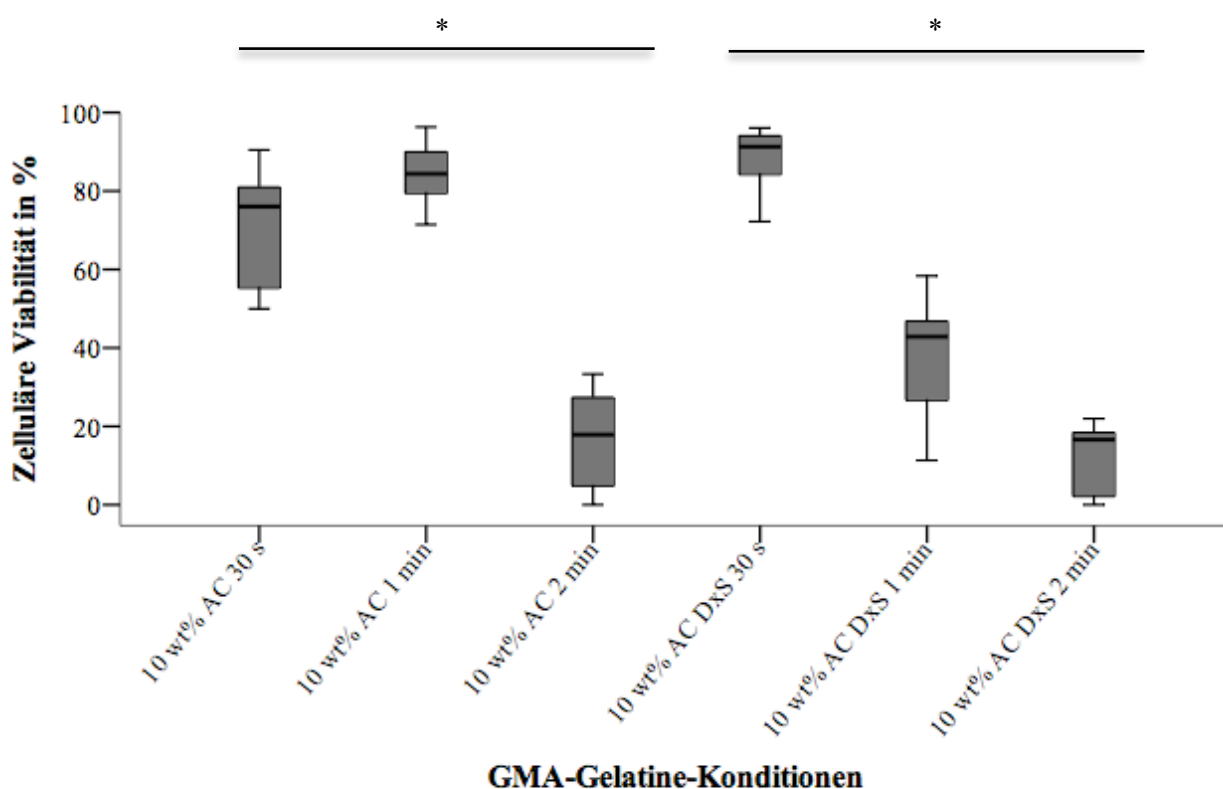


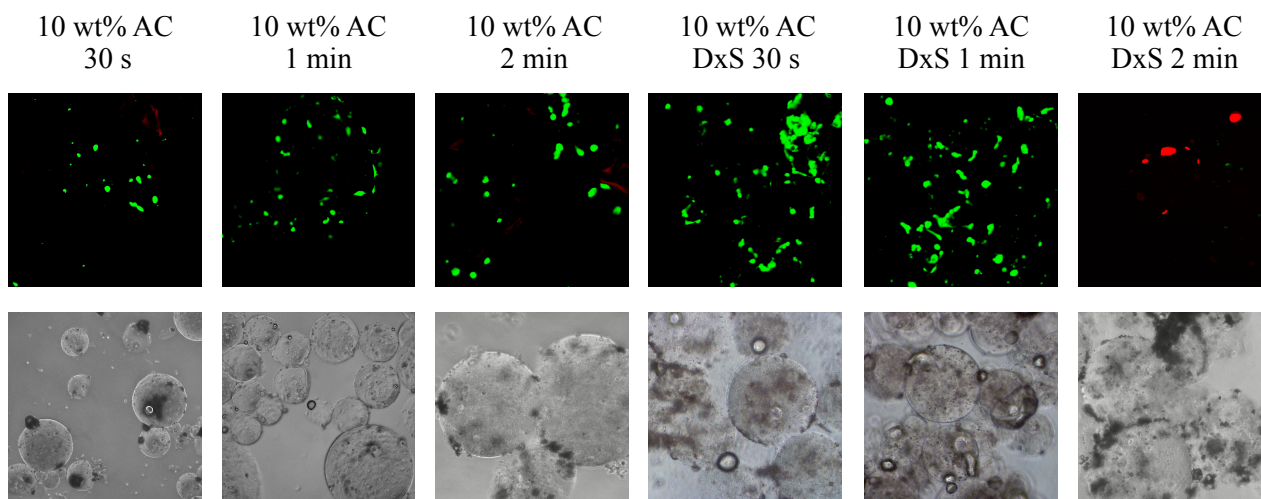
Abb. 10: Box-Plot-Darstellung der zellulären Viabilität in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel mit und ohne DxS-Zusatz verkapselter AD-SC bei unterschiedlicher UV-Expositionsdauer nach 1 Tag.

* Statistisch signifikanter Unterschied mit einem P Wert von $< 0,05$.

4.1.2.2. Zelluläre Viabilität und Zellmasse - Tag 7

Nach einem Beobachtungszeitraum von einer Woche waren weiterhin stabile Mikrokapseln unter den herangezogenen GMA-Gelatine-Konditionen identifizierbar. Ein beginnender Zerfall des Hydrogels wurden nicht vernommen. Gleichfalls waren keine singulären Stammzellen frei zwischen den Mikrokapseln oder adhärent am Boden der verwendeten Greiner 36-Well-Platte vorzufinden. Das Zellkulturmedium erfuhr keinen Wechsel während der 7-tägigen Inkubation der produzierten MSC-beladenen Hydrogel-Kapseln.

a.



b.

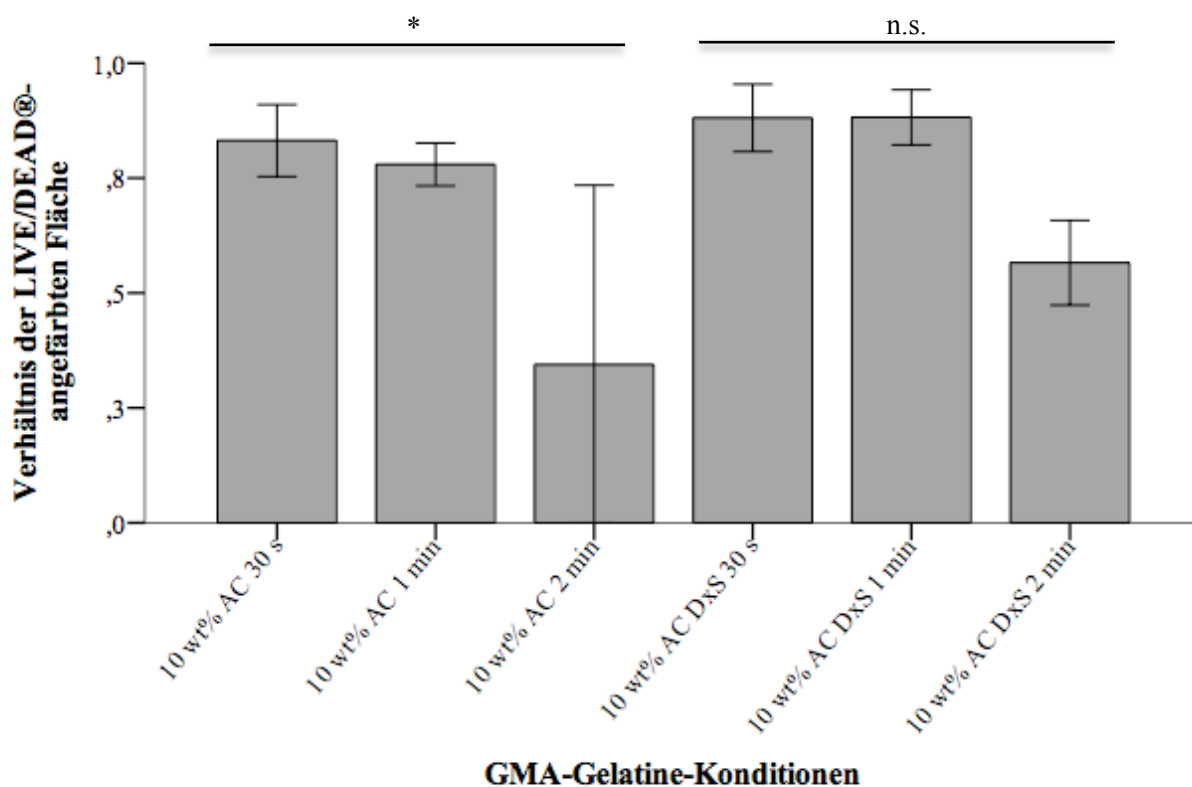


Abb. 11: Zelluläre Verkapselung von BM-MSK in Hydrogel-Kapseln auf Basis von GMA-Gelatine-Lösung mit und ohne DxS nach 7 Tagen Follow-up.

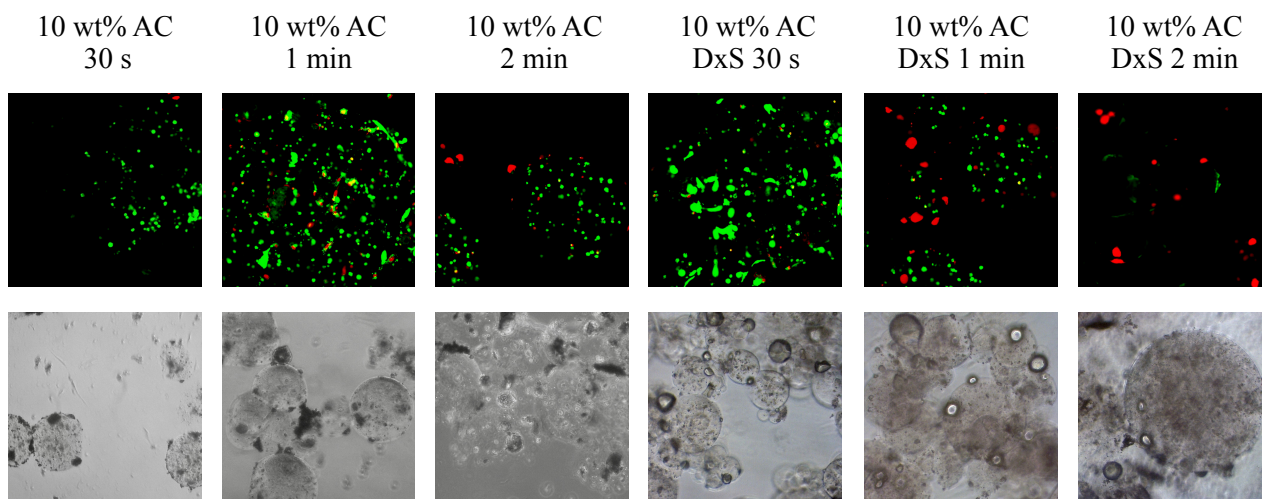
* Statistisch signifikanter Unterschied mit einem P Wert von $< 0,05$. n.s. Nicht signifikanter Unterschied.

- Fluoreszenzmikroskop-Bilder und entsprechende lichtmikroskopische Aufnahmen der verkapselten L929 nach Anfärbung mit dem LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit. Lebende Zellen zeigen sich grün fluoreszierend (Calcein-AM), wohingegen sich tote Zellen rot darstellen (Propidium-Iodid). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μm . Eine Vergrößerung von 200 x wurde verwendet.
- Balkendiagramm-Darstellung des Verhältnis der LIVE/DEAD®-angefärbten Fläche, die mit der Zellmasse lebender und toter Zellen korreliert. Fehlerbalken: 95% Konfidenzintervall.

4.1.2.2.1. BM-MSC

An Tag 7. des Follow-ups zeigten BM-MSC eingeschlossen in Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz und einer UV-Licht-Exposition von 1 Minute ausgesetzt die höchste zelluläre Viabilität ($92 \pm 9,6\%$). Eine vergleichbar hohe Zellviabilität mit $91 \pm 2,8\%$ wurde für die GMA-Gelatine-Lösung mit Zugabe von DxS und einer 30 Sekunden UV-Licht-Expositionzeit ermittelt. Hingegen, war der Anteil vitaler Zellen an der gesamten BM-MSC-Population nach Verkapselung in GMA-Gelatine-Lösung ohne supplementiertes DxS und mit einer 30 s-UV-Licht-Exposition unverkennbar niedriger ($86 \pm 11,7\%$). Minimale Werte für die zelluläre Viabilität ergaben sich unter einer 3-minütigen UV-Licht-Exposition. Mit $27 \pm 22,4\%$ und $8 \pm 3\%$ war die Zellviabilität sowohl bei 10 wt% AC GMA-Gelatine ohne als auch mit zugesetztem DxS anschaulich reduziert. Im Vergleich zu Tag 1. des Follow-ups war eine konstant hohe zelluläre Viabilität für die Mikrokapseln der 10 wt% AC GMA-Gelatine-Kondition mit DxS-Zusatz und einer 30 s-UV-Licht-Exposition festzuhalten. Der Anteil lebender BM-MSC an der gesamten Population in GMA-Gelatine-Lösung mit Supplementation von DxS und UV-Licht-Expositionszeit von 1 Minute verkapselter Zellen schien sogar zu steigen. Für die entsprechende Zellviabilität wurde ein Anstieg von $70 \pm 24\%$ auf $92 \pm 9,6\%$ registriert. Eine markante Abnahme der Zellviabilität zeichneten die BM-MSC eingebettet in Hydrogel-Kapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz und einer UV-Licht-Exposition von 2 Minuten auf. Die zelluläre Viabilität belief sich an Tag 7. des Follow-up nur noch auf $8 \pm 3,1\%$. Bei der durchschnittlichen Größe der Zellmasse verzeichneten die Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz und einer UV-Licht-Exposition von 1 Minute den höchsten Wert. Ein Verhältnis von $88 \pm 10,4\%$ der LIVE/DEAD®-angefärbten Flächen wurde festgehalten (Abb. 11 b). Entsprechend konnte eine beachtliche Zunahme von 9% im Vergleich zu Tag 1. des Beobachtungszeitraums konstatiert werden. Stammzell-beladene Mikrokapseln aus GMA-Gelatine-Lösung mit DxS-Zugabe und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden differenzierten sich in der mittleren Zellmasse von den Mikrokapseln ohne zugesetztes DxS aber mit identischer UV-Licht-Expositionszeit. Für die BM-MSC eingeschlossen in Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz wurde im Vergleich eine höhere durchschnittliche Zellmasse dokumentiert ($86 \pm 15,6\%$ vs. $83 \pm 14,1\%$). Jedoch blieb das Flächenverhältnis lebender zu toter Zellen unverändert vergleichend zu Follow-up-Tag 1. Herabgesetzte mittlere Zellmasse ließen sich bei den in GMA-Gelatine-Lösung mit oder ohne DxS-Supplementation eingebetteten MSC nachweisen, die einer höheren UV-Licht-Expositionszeit von 2 Minuten ausgesetzt wurden. Hierbei erwies sich der Unterschied bei den DxS-freien Hydrogel-Kapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine als signifikant. Die Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine ohne DxS-Zusatz zeigten einen bedeutenden Abfall des Verhältnis LIVE/DEAD®-angefärbter Flächen von $64 \pm 24,7\%$ auf $34 \pm 31,4\%$ nach 1 Woche Inkubation.

a.



b.

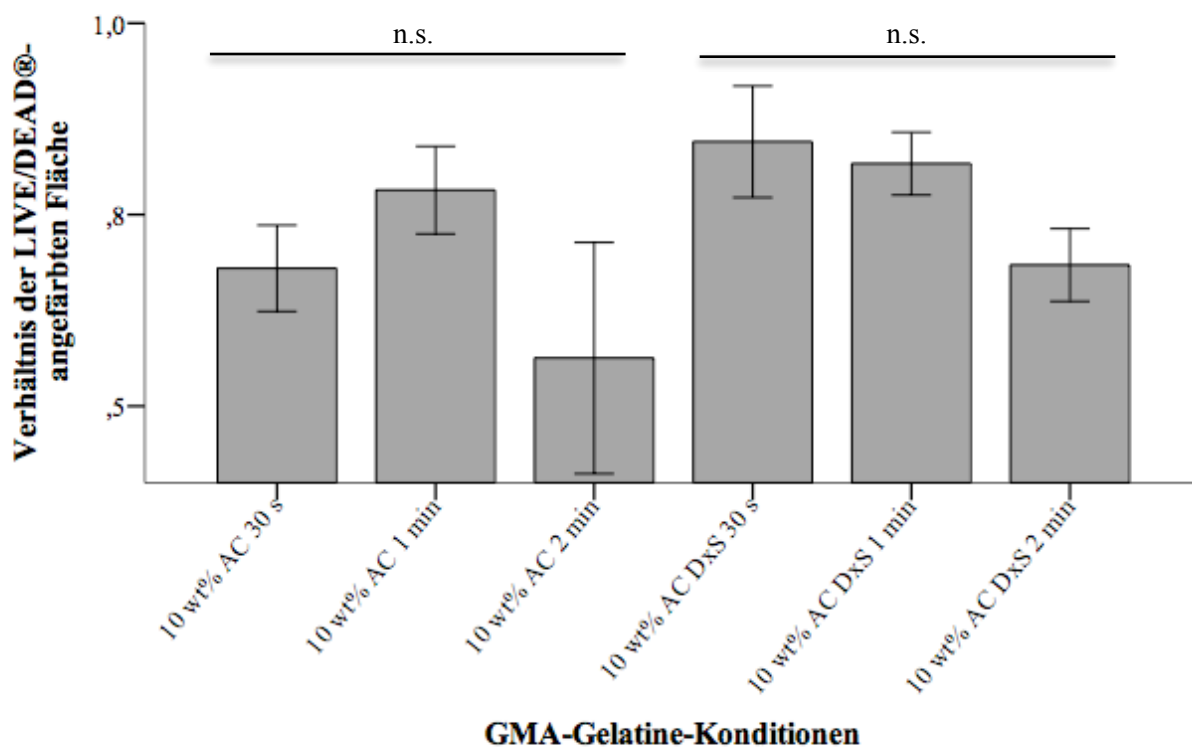


Abb. 12: Zelluläre Verkapselung von CB-MSC in Hydrogel-Kapseln auf Basis von GMA-Gelatine-Lösung mit und ohne DxS nach 7 Tagen Follow-up.

n.s. *Nicht signifikanter Unterschied.*

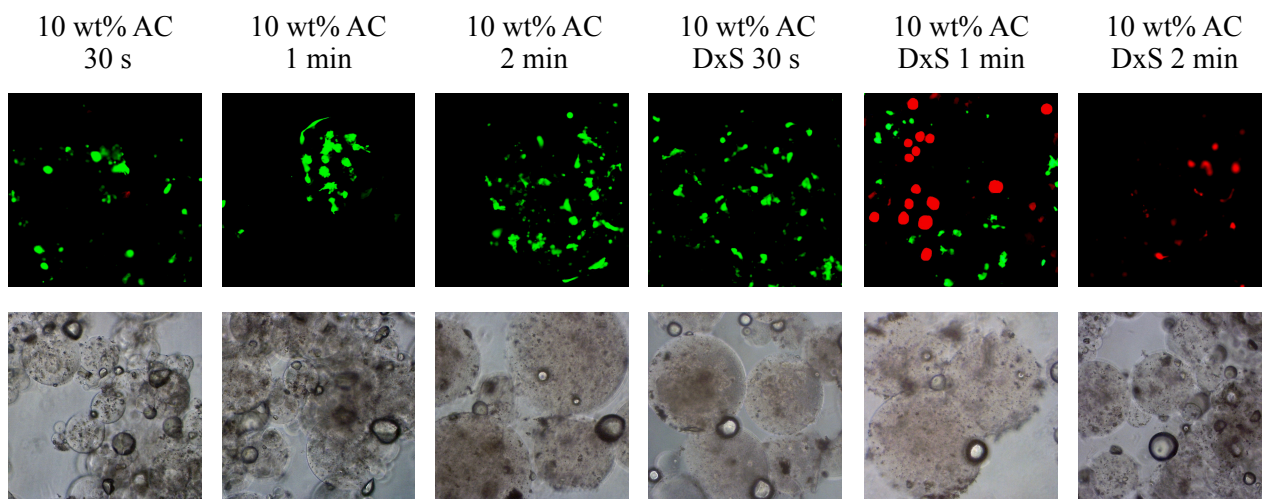
- Fluoreszenzmikroskop-Bilder und entsprechende lichtmikroskopische Aufnahmen der verkapselten L929 nach Anfärbung mit dem LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit. Lebende Zellen zeigen sich grün fluoreszierend (Calcein-AM), wohingegen sich tote Zellen rot darstellen (Propidium-Iodid). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μm . Eine Vergrößerung von 200 x wurde verwendet.
- Balkendiagramm-Darstellung des Verhältnis der LIVE/DEAD®-angefärbten Fläche, die mit der Zellmasse lebender und toter Zellen korreliert. Fehlerbalken: 95% Konfidenzintervall.

4.1.2.2.2. CB-MSc

Am 7. Follow-up-Tag boten die verkapselten CB-MSc die maximale Zellviabilität in den Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zugabe und einer UV-Licht-Exposition von 30 Sekunden ($96 \pm 2,3\%$). Die ermittelte zelluläre Viabilität der CB-MSc-beladenen Mikrokapseln aus GMA-Gelatine-Lösung ohne DxS aber mit gleicher UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden war im Vergleich niedriger ($92 \pm 4,2\%$). Eine Abnahme der Zellviabilität verkapselter CB-MSc war bei steigender UV-Licht-Expositionszeit zu beobachten. Gleichermaßen hatte die Verlängerung der Exposition gegenüber dem UV-Licht eine eindringliche Reduktion der Zellviabilität in GMA-Gelatine-Lösung mit oder ohne supplementiertes DxS eingebetteter MSc zur Folge. Dementsprechend wurde ein geringer Anteil vitaler Zellen an der gesamten Zellpopulation bei GMA-Gelatine-basierten Mikrokapseln sowohl mit als auch ohne DxS-Zusatz nachgewiesen ($46 \pm 6,7\%$ bzw. $33 \pm 17,4\%$). Im Vergleich zu Tag 1 war am 7. Follow-up-Tag eine höhere Zellviabilität für die Mikrokapseln aus GMA-Gelatine-Lösung mit oder ohne Zugabe von DxS und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden zu verzeichnen. Entsprechend stieg die zelluläre Viabilität von $88 \pm 9,4\%$ auf $96 \pm 2,3\%$ beziehungsweise von $76 \pm 20,2\%$ auf $92 \pm 4,2\%$. Dementgegen fiel die Zellviabilität der CB-MSc-beladenen Mikrokapseln hergestellt aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit und ohne DxS-Supplementation sowie einer UV-Licht-Exposition von 2 Minuten. Vergleichend mit Tag 1. des Follow-ups erzielten die Mikrokapseln an Tag 7. eine sichtlich reduzierte zelluläre Viabilität.

Das Verhältnis der LIVE/DEAD®-angefärbten Flächen war ebenso bei CB-MSc-beladenen Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit zugesetztem DxS und einer UV-Licht-Exposition von 30 Sekunden am höchsten ($85 \pm 9,5\%$). Bei den Mikrokapseln aus GMA-Gelatine-Lösung mit Zusatz von DxS und einer UV-Licht-Expositionszeit von 1 Minute wurde ein ähnlich hohes Verhältnis LIVE/DEAD®-angefärbten Flächen identifiziert ($82 \pm 8\%$). An Tag 1. des Follow-ups war die mittlere Zellmasse der in 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz eingeschlossener Zellen mit Expositionszeiten von 30 Sekunden und 1 Minute gegenüber dem UV-Licht geringer als an Tag 7. des Beobachtungszeitraums. Somit lag eine Zunahme des Verhältnis LIVE/DEAD®-angefärbter Flächen von $76 \pm 12,6\%$ auf $85 \pm 9,5\%$ beziehungsweise von $80 \pm 3\%$ auf $82 \pm 8\%$ vor. Analog zum Abfall der Zellviabilität kam es an Follow-up-Tag 7. zur Verringerung der mittleren Zellmasse der CB-MSc verkapselt in Mikrokapseln aus GMA-Gelatine-Lösung mit oder ohne DxS-Zugabe und 2-minütiger UV-Licht-Exposition. Ein Rückgang des Verhältnis LIVE/DEAD®-angefärbter Flächen zum Nachteil vitaler Zellen von $76 \pm 4,9\%$ auf $68 \pm 6,6\%$ beziehungsweise von $74 \pm 5,6\%$ auf $68 \pm 6,1\%$ wurde bemerkt. Signifikante Unterschiede wurde jedoch nicht erzielt.

a.



b.

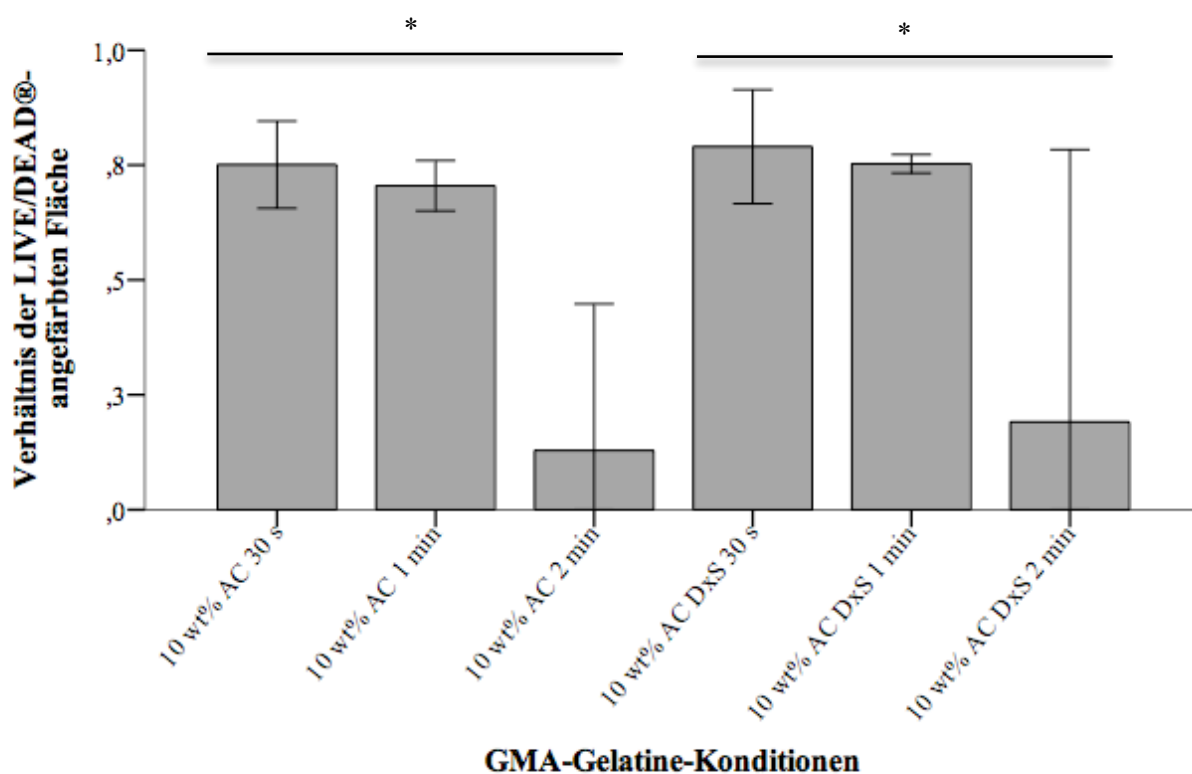


Abb. 13: Zelluläre Verkapselung von AD-SC in Hydrogel-Kapseln auf Basis von GMA-Gelatine-Lösung mit und ohne DxS nach 7 Tagen Follow-up.

* Statistisch signifikanter Unterschied mit einem P Wert von $< 0,05$.

- Fluoreszenzmikroskop-Bilder und entsprechende lichtmikroskopische Aufnahmen der verkapselten L929 nach Anfärbung mit dem LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit. Lebende Zellen zeigen sich grün fluoreszierend (Calcein-AM), wohingegen sich tote Zellen rot darstellen (Propidium-Iodid). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μm . Eine Vergrößerung von 200 x wurde verwendet.
- Balkendiagramm-Darstellung des Verhältnis der LIVE/DEAD®-angefärbten Fläche, die mit der Zellmasse lebender und toter Zellen korreliert. Fehlerbalken: 95% Konfidenzintervall.

4.1.2.2.3. AD-SC

Follow-up-Tag 7 notierte die höchste Zellviabilität der AD-SC-beladenen Mikro kapseln bei 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden ($89 \pm 7,5\%$). Die Mikro kapseln aus GMA-Gelatine-Lösung ohne Supplementation von DxS mit gleichlanger UV-Licht-Exposition wiesen eine auffallend niedrigere zelluläre Viabilität von nur $83 \pm 9,5\%$ auf. Sowohl bei den GMA-Gelatine-basierten Mikro kapseln mit DxS als auch bei den Mikro kapseln ohne DxS-Zugabe bildete sich eine Reduktion der zellulären Viabilität in Abhängigkeit von der Expositionszeit gegenüber dem UV-Licht ab. Mit zunehmender Länge der UV-Licht-Expositionszeit wurde die Zellviabilität der verkapselten AD-SC herabgesetzt. Beachtlich war der Abfall der Zellviabilität bei Verkapselung der Zellen in GMA-Gelatine-Lösung und einer UV-Licht-Expositionszeit von 2 Minuten ($13 \pm 10,3\%$ bzw. $13 \pm 6,8\%$). Bei einer Gegenüberstellung mit den Ergebnissen von Tag 1. des Follow-ups wurde eine Konstanz der Anzahl vitaler Zellen an der Gesamtpopulation in GMA-Gelatine-Lösung verkapselter MSC mit zugesetztem DxS und einer 30 s-UV-Licht-Expositionszeit erkennbar ($89 \pm 7\%$ vs. $89 \pm 7,9\%$). Die zuvor vorgefundenen hohe Zellviabilität der Mikro kapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine und einer UV-Licht-Expositionszeit von 1 Minute konnte am 7. Tag des Follow-ups bestätigt werden. Lediglich eine leichte Abnahme von $84 \pm 6,5\%$ auf $81 \pm 13,1\%$ war anzumerken. Die Zellviabilität der AD-SC eingeschlossen in 10 wt% AC GMA-Gelatine mit und ohne DxS-Zusatz sowie einer UV-Licht-Expositionszeit von 2 Minuten erwies sich an beiden Beobachtungszeitpunkten als vergleichbar niedrig.

In Hinblick auf die durchschnittliche Zellmasse verkapselter Zellen wurde ein Verhältnis der LIVE/DEAD®-angefärbten Flächen von $79 \pm 16,1\%$ für die Mikro kapseln aus GMA-Gelatine-Lösung mit Zugabe von DxS und einer Expositionszeit von 30 Sekunden gegenüber dem UV-Licht festgehalten. Mit nur $75 \pm 12,3\%$ fiel das LIVE/DEAD®-angefärbte Flächenverhältnis bei Verkapselung in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel ohne supplementiertes DxS und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden geringer aus.

Übereinstimmend mit der Abnahme der Zellviabilität bei zunehmender UV-Licht-Expositionszeit wurde eine sichtliche Reduktion der mittleren Zellmasse bei Verlängerung der Expositionszeit gegenüber dem UV-Licht identifiziert. Die Bestimmung des Flächenverhältnis lebenden zu toter Zellen nach Verkapselung in 10 wt% AC GMA-Gelatine und einer 2-minütigen UV-Licht-Exposition lies unabhängig vom zugesetzten DxS niedrigste Werte vorfinden ($19 \pm 37,2\%$ bzw. $13 \pm 30,4\%$). Die Abnahme der AD-SC-Viabilität nach Einschluss in 10 wt% AC GMA-Gelatine-Hydrogel-Kapseln und einer UV-Licht-Expositionszeit von 2 Minuten war signifikant. Im Vergleich zu Tag 1. des Follow-ups stellte sich ein geringfügiger Rückgang der durchschnittlichen Zellmasse bei den GMA-Gelatine-basierten Mikro kapseln mit DxS-Zusatz und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden heraus ($81 \pm 13,7\%$ vs. $79 \pm 16,1\%$). Hingegen, ergab sich eine leichte Erhöhung des mittleren Zellmasse bei AD-SC-beladenen Mikro kapseln aus GMA-Gelatine-Lösung ohne DxS-Supplementation und ebenfalls einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden ($73 \pm 7,2\%$ vs. $75 \pm 12,3\%$). Zuvor mit einem höherer Wert für das Flächenverhältnis LIVE/DEAD®-angefärbter AD-SC nach Einbettung in Hydrogel-Kapseln assoziiert, wurde an Follow-up-Tag 7. ein Rückgang von $77 \pm 6,3\%$ auf $70 \pm 7,7\%$ bei zellulärer Verkapselung in 10 wt% AC GMA-Gelatine ohne zugesetztes DxS und einer UV-Licht-Expositionszeit von 1 Minute gemessen. Ein markanter Verlust mittlerer Zellmasse war vergleichend zu Tag 1. des Follow-ups bei den GMA-Gelatine-basierten Mikro kapseln und einer UV-Licht-

Expositionsdauer von 2 Minuten zu vernehmen. Von $55 \pm 27,4\%$ auf $19 \pm 37,2\%$ bzw. von $52 \pm 23,1\%$ auf $13 \pm 30,4\%$ reduzierte sich das entsprechende Verhältnis LIVE/DEAD®-angefärbter Flächen. Ein signifikanter Unterschied zu den Zell-beladenen Mikrokapseln aus Hydrogel auf GMA-Gelatine-Basis und einer geringeren UV-Licht-Expositionsdauer wurde festgehalten.

4.1.2.3. Morphologischer Vergleich verkapselter MSC zwischen Follow-up Tag 1. und 7.

An Tag 1. des Follow-ups war eine kugelförmige Morphologie der verkapselten MSC zu erkennen, charakteristisch für nicht-adhärenente Zellen mit fehlender Interaktion zur umliegenden Extrazellulärmatrix. Eine sichtbare Tendenz monomorpher runder Stammzellen zur Ausbildung von zellulären Fortsätzen und zur Annahme einer Spindelform bestand bei Verkapselung in 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zugabe. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung wurde bei den MSC-beladenen Mikrokapseln hergestellt aus GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz im Vergleich zu den Hydrogel-Kapseln aus Gelatine-Lösung ohne supplementiertes DxS vermehrt eine spindelförmige Morphologie der Zellen vermerkt. Größtenteils präsentierten die vitalen Stammzellen eine homogene Verteilung innerhalb der Mikrokapseln. Auch an Follow-up Tag 7. wurde die typische Spindelform mit einer Elongation des Zytoplasmas bei MSC-Verkapselung in 10 wt% AC GMA-Gelatine mit zugesetztem DxS notiert. Des Weiteren konnte ein oberflächliche Konzentration der Stammzellen identifiziert werden, sodass von einem Bestreben der MSC vom Kapselinneren an die Oberfläche zu migrieren auszugehen war (Abb. 11 a, 12 a, 13 a).

4.1.2.4. MSC-Biomaterial-Interaktion in Abhängigkeit vom ursprünglichen Grundgewebe

Zwischen den unterschiedlichen MSC-Populationen ließen sich nur geringfügige Differenzen in der Auswirkung einer Verkapselung in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel auf die zelluläre Viabilität nachvollziehen. Ungeachtet des Ursprungsgewebe wurde die höchste Zellviabilität bei Verwendung von 10 wt% AC GMA-Gelatine mit zugesetzten DxS und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden beobachtet. Der erzielte Anteil vitaler MSC an der gesamten Zellpopulation war am Follow-up Tag 1. vergleichbar zwischen den verkapselten BM-MSC, CB-MSC sowie AD-SC ($90 \pm 5,6\%$ vs. $88 \pm 9,4\%$ vs. $89 \pm 7\%$). Im Intervall von 7 Tagen hatte die Überlegenheit der GMA-Gelatine-Kondition bei eingebetteten CB-MSC und AD-SC Bestand. Hierbei boten CB-MSC mit 8% den höchsten Abfall der Viabilität nach Verkapselung in Hydrogel auf GMA-Gelatine-Basis. Hingegen verzeichneten verkapselte BM-MSC nach 7-tätigem Follow-up die höchste Zellviabilität in Hydrogel-Kapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit supplementiertem DxS und 1-minütiger Expositionszeit gegenüber dem UV-Licht. Mit nur 0,16 Prozentpunkten war die Abgrenzung zur zelluläre Viabilität BM-MSC-beladener Mikrokapseln aus DxS-zugesetzter GMA-Gelatine-Lösung und einer UV-Licht-Exposition von 30 Sekunden relativ gering. Längere UV-Licht-Expositionszeiten wurden von verkapselten CB-MSC besser toleriert im Vergleich zu den beiden anderen MSC-Populationen. Nach einem Beobachtungszeitraum von 1. Tag präsentierte sich der Abfall zellulärer Viabilität assoziiert mit einer UV-Licht-Expositinsdauer von 2 Minuten weniger gravierend bei einer Verkapselung von CB-MSC. Ebenso war am 7. Tag des Follow-ups die Zellviabilität verkapselter CB-

MSC trotz langer UV-Licht-Exposition höher als bei entsprechenden BM-MSC- und AD-SC-beladenen Mikrokapseln.

Während BM-MSC und AD-SC nach einer Verkapselung in 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zugabe und 30 Sekunden UV-Licht-Expositionszeit maximale Werte für die mittlere Zellmasse erlangten, wurde der höchste Wert für das Flächenverhältnis LIVE/DEAD®-angefärbter CB-MSC bei Hydrogel-Kapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz und 1 Minute Exposition gegenüber dem UV-Licht notiert. Bei verkapselten AD-SC bestätigt sich die Überlegenheit der GMA-Gelatine-Kondition bezüglich durchschnittlicher Zellmasse auch im 7-Tage-Follow-up. Konträr war die höchste mittlere BM-MSC-Masse im 7-tägigen Intervall bei einer Verkapselung in 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz und einer UV-Licht-Exposition von 1 Minute zu vernehmen. Am Tag 7. des Beobachtungszeitraums ließen verkapselte CB-MSC die höchste durchschnittliche Zellmasse bei Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz und 1 Minute Exposition gegenüber dem UV-Licht erkennen, gemäß einer beträchtlichen Zunahme von 8% des Verhältnis LIVE/DEAD®-angefärbter Flächen zu Follow-up-Tag 1.

4.2. Zytokin-Sekretionsprofil verkapselter MSC

Das MSC-Sekretom setzt sich aus unzähligen Signalmolekülen mit immunmodulatorischer, proangiogenetischer und anti-apoptotischer sowie kardioprotektiver Wirkung zusammen. Um die Auswirkung der zellulären Mikroverkapselung auf das Sekretionsprofil von humanen Zytokinen zu evaluieren, wurde das MSC-CM herangezogen. Die Freisetzung einer Vielzahl von Zytokinen wurde belegt und Differenzen in der Zusammensetzung des Spektrums sezernierter Faktoren waren zu identifizieren (Abb. 14). Die Chemokine MCP-1 und SDF-1 wurden in allen Proben des untersuchten CM nachgewiesen. Ebenso konnte die kontinuierliche Sekretion des proangiogenetischen Faktors Angiogenin und des anti-apoptotisch wirksamen Rezeptors uPAR in allen CM-Proben dargelegt werden. Hinzukommend war eine Expression des Matrix-Metalloproteasen-Induktors CD147 sowie des chemotaktischen Zytokins IL-8 und des immunmodulatorischen Interleukins IL-6 in den analysierten Proben des MSC-CM erkennbar. Außerdem wurde die Freisetzung des Fibrinolyse-Inhibitor Serpin E1 in den gesamten CM-Proben dokumentiert. Das proangiogenetische Glykoprotein Endoglin, die Zytokine IL-11 und IL-17A waren ebenfalls im CM vorzufinden. Ein Erhalt konstitutiv erfolgender MSC-Sekretion der Signalmoleküle Pentraxin 3 und FGF-19 wurde bestätigt. Das Angiogenese- sowie Gewebsremodellierung-involvierte Protein und der Wachstumsfaktor waren sowohl im CM nicht verkapselter MSC als auch im Medium nach Konditionierung durch Stammzell-beladene Mikrokapseln zu detektieren. Im Vergleich zum CM in Hydrogel-Kapseln eingeschlossener MSC, war das konditionierte DMEM ohne vorhergehende Stammzellverkapselung frei von bFGF sowie den Wachstumsfaktoren GM-CSF und G-CSF. Jedoch wurde ein korrespondierendes Fehlen der bFGF-Expression auch im CM verkapselter BM-MSC gesehen. Die Kolonie-stimulierenden Faktoren waren lediglich im AD-SC-CM zu eruieren und zeigten eine mangelnde Nachweisbarkeit im BM-MSC- und CB-MSC-Sekretom. VCAM-1 war indessen nur im BM-MSC- und CB-MSC-CM sowie im Medium nach Konditionierung durch nicht verkapselte Stammzellen festzustellen. Eine qualitative Analyse des AD-SC-CM erbrachte keinen Beleg für das Adhäsionsmolekül. Die Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF war im BM-MSC, AD-SC-CM und dem CM nicht verkapselter MSC ersichtlich. Das CB-MSC-CM wies hingegen

keine VEGF-Freisetzung auf. Desgleichen war keine Expression des Enzyms CHI3L1 und des Wnt-Signalweg-Inhibitors Dkk-1 im CM der verkapselten CB-MSK auszumachen. Das Interleukin IL-1 sowie die Zytokine IGF-1 und HGF wurden weder im CM verkapselter Stammzellen noch im DMEM nach Konditionierung durch nicht verkapselte MSC bestimmt.

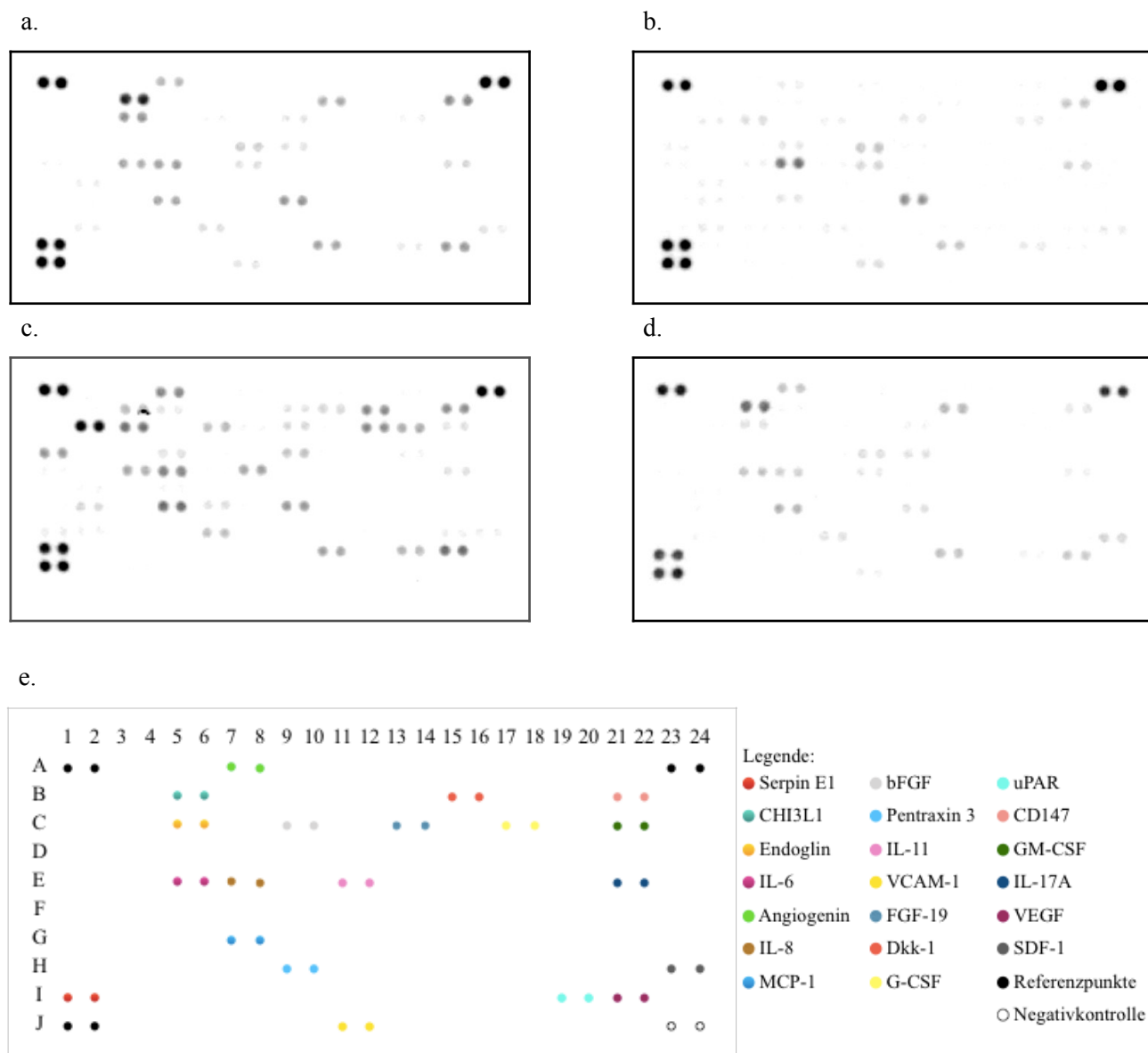


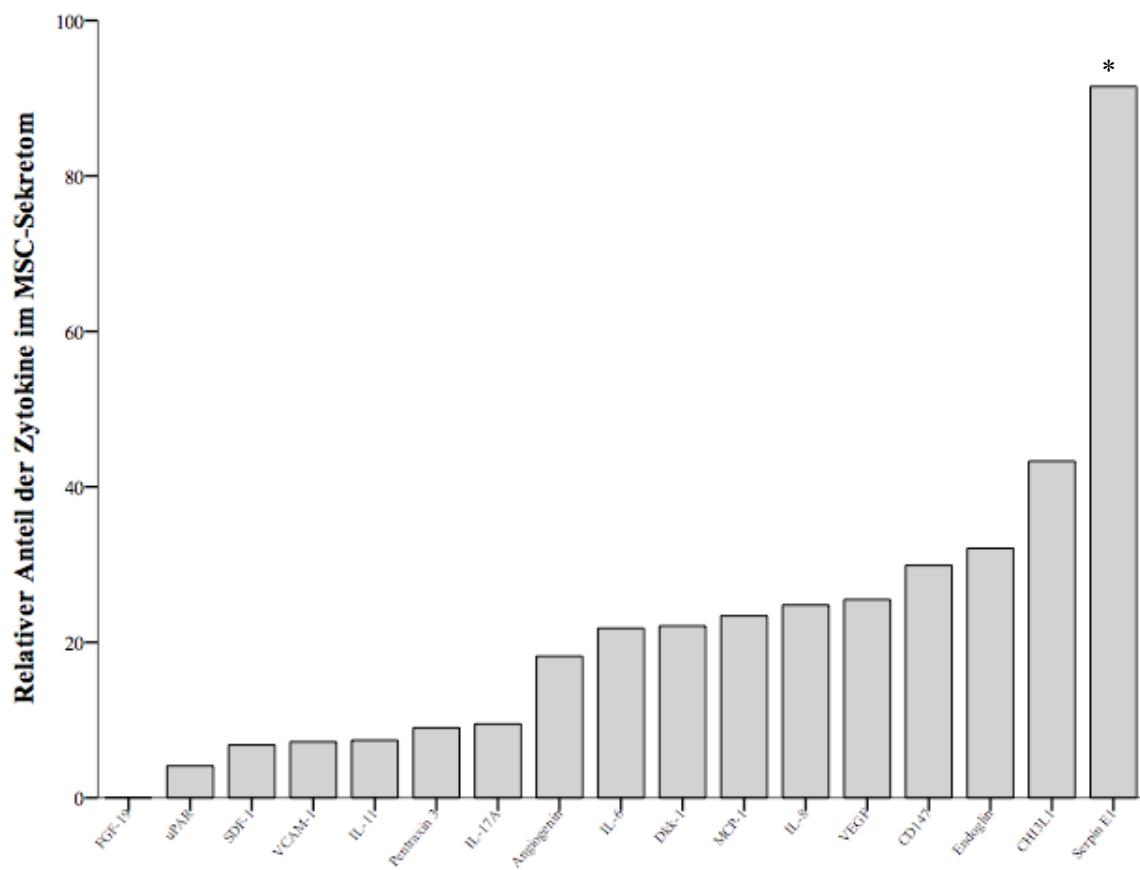
Abb. 14: Qualitative Analyse sezernerter humaner Zytokine im MSC-CM mithilfe des Proteome Profile™ Human XL Cytokine Array Kits. Nach 10-minütiger Exposition gegenüber der Röntgenfilmkassette wurden die geschwärzten Filmmaterialien erhalten und Signalmolekül-entsprechende Koordinaten tabellarisch aufgearbeitet.

- CM verkapselter BM-MSK in 10 wt%-GMA-Gelatin mit DxS-Zusatz.
- CM verkapselter CB-MSK in 10 wt%-GMA-Gelatin mit DxS-Zusatz.
- CM verkapselter AD-SC in 10 wt%-GMA-Gelatin mit DxS-Zusatz.
- CM nicht verkapselter MSC.
- Koordinaten der humanen Zytokine.

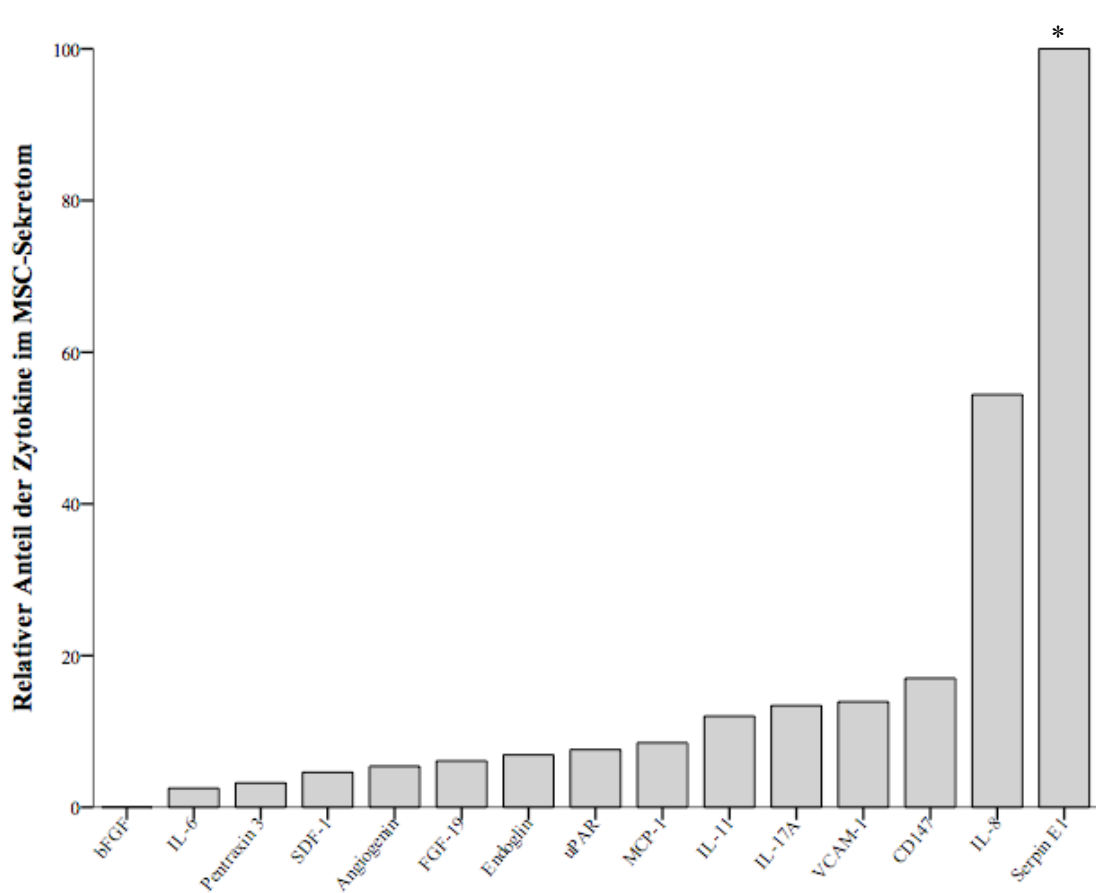
Zur Kontrolle hergestellte Proben, bestehend aus zellfreiem Medium gleichermaßen inkubiert auf Gelatine-benetzen 6-Well-Platten für einen Zeitraum von 24 Stunden, erwiesen sich signalmoleküllos. Eine Nachweis der untersuchten 105 humanen Zytokine konnte nicht erbracht werden.

Die quantitative Analyse des Zytokin-Sekretionsprofils erfolgte gemäß dem Schwärzungsgrad der Filmmaterialien als Graustufen-Quotient und gewährte die Bestimmung des relativen Anteils der untersuchten Signalmoleküle am gesamten MSC-Sekretom (Abb. 15). Eine ausgeprägte Sekretion von Serpin E1 war zu bekunden, wobei in allen CM-Proben die Konzentration des Fibrinolyse-Inhibitors signifikant am Größten schien. Im direkten Vergleich zwischen den analysierten Medien wurde der höchste Serpin E1-Anteil im CM verkapselter CB-MS-CM vorgefunden ($99 \pm 0,1\%$). Im BM-MS-CM war vornehmlich das Glykoprotein CHI3L1 und das proangiogenetische Zytokine Endoglin nachzuweisen ($43 \pm 3,1\%$ bzw. $32 \pm 2,7\%$). Ebenfalls einen hohen Anteil am Sekretom verkapselter BM-MS-CM nahmen CD147 sowie der Wachstumsfaktor VEGF. Die Expression von FGF-19 fiel mit $1 \pm 3,5\%$ hingegen am geringsten aus. Nach einer eintägigen Inkubation der verkapselten CB-MS-CM in DMEM war das Interleukin IL-8 in einer hohen Konzentration zu detektieren ($54 \pm 4,1\%$). Das Zytokin mit chemotaktischer Wirkung erzielte einen maximalen relativen Anteil am MSC-Sekretom im CM der CB-MS-CM eingeschlossenen in GMA-Gelatine-basierten Hydrogel-Kapseln. Die Freisetzung der anderen identifizierten Signalmoleküle war vergleichsweise niedrig. Eine minimale Sekretion von $2 \pm 0,1\%$ wurde für den Wachstumsfaktor bFGF belegt. Verkapselte AD-SC präsentierten ein CM mit einer hohen Konzentration an MCP-1 sowie den proangiogenetischen Faktoren Endoglin und Angiogenin ($42 \pm 0,5\%$ bzw. $39 \pm 2,1\%$ und $32 \pm 4,9\%$). Dabei wurden die anteiligen Maximalwerte der entsprechenden Zytokine am MSC-Sekretom erreicht. Die niedrigste Konzentration war mit $2 \pm 1,6\%$ für FGF-19 zu registrieren. Nicht verkapselte MSC legten ein Zytokin-Sekretionsprofil dar, das neben der beträchtlichen Serpin E1-Expression eine deutliche Freisetzung von CHI3L1 dokumentierte ($55 \pm 6,2\%$). Darüber hinaus war ein hoher relativer Anteil von Dkk-1 sowie Angiogenin zu ersehen ($25 \pm 4\%$ bzw. $23 \pm 7,7\%$). Wohingegen die Konzentration von Endoglin mit lediglich $2 \pm 0,1\%$ am geringsten ausfiel.

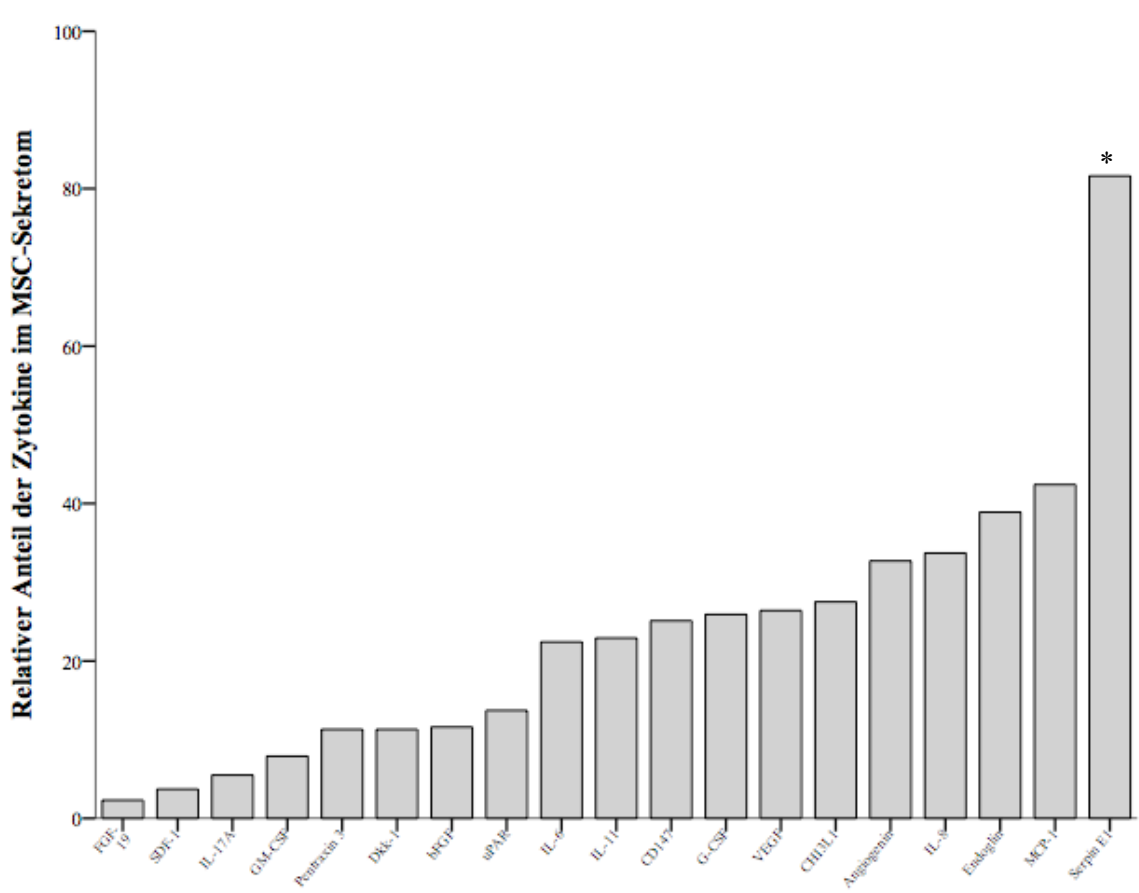
a.



b.



c.



d.

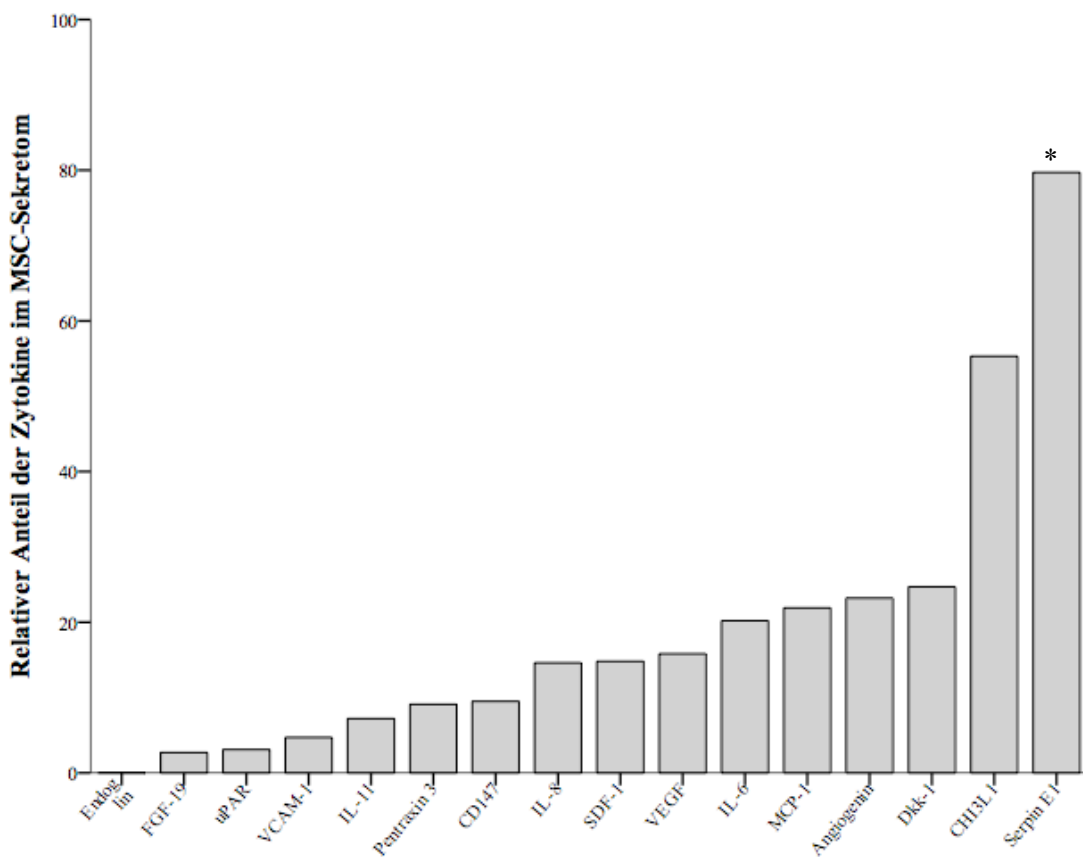


Abb. 15: Quantitative Analyse sezernierter humaner Zytokine im MSC-CM mithilfe des Proteome Profile™ Human XL Cytokine Array Kits. Die Stärke der zugrundeliegenden Lichtemission wurde nach Exposition der Filmmaterialien gegenüber der Röntgenfilmkassette mittels Transmission-Mode Scanner erfasst und grafisch in Form von Balkendiagrammen festgehalten. Auf der X-Achse sind die entsprechenden Signalmoleküle aufgetragen, während die Y-Achse den relativen Anteil der Zytokine im MSC-Sekretom gemäß dem Schwärzungsgrad der Filmmaterialien als Graustufen-Quotient wiedergibt.

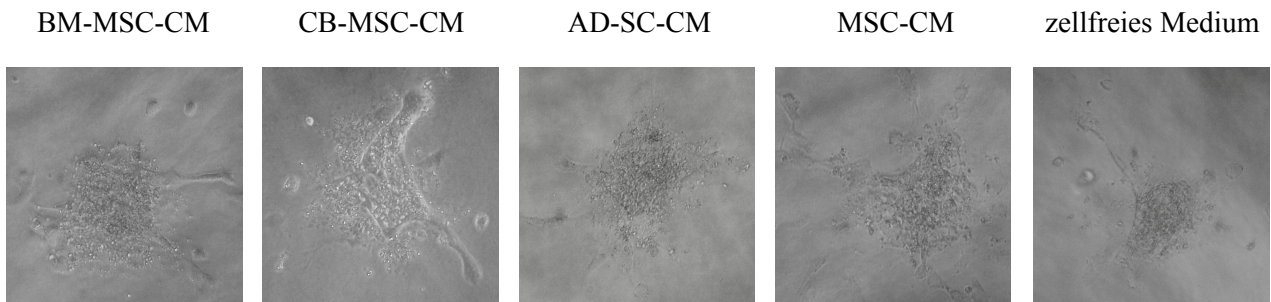
* Statistisch signifikanter Unterschied mit einem P Wert von $< 0,05$.

- a. CM verkapselter BM-MSC in 10 wt%-GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz.
- b. CM verkapselter CB-MSC in 10 wt%-GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz.
- c. CM verkapselter AD-SC in 10 wt%-GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz.
- d. CM nicht verkapselter MSC

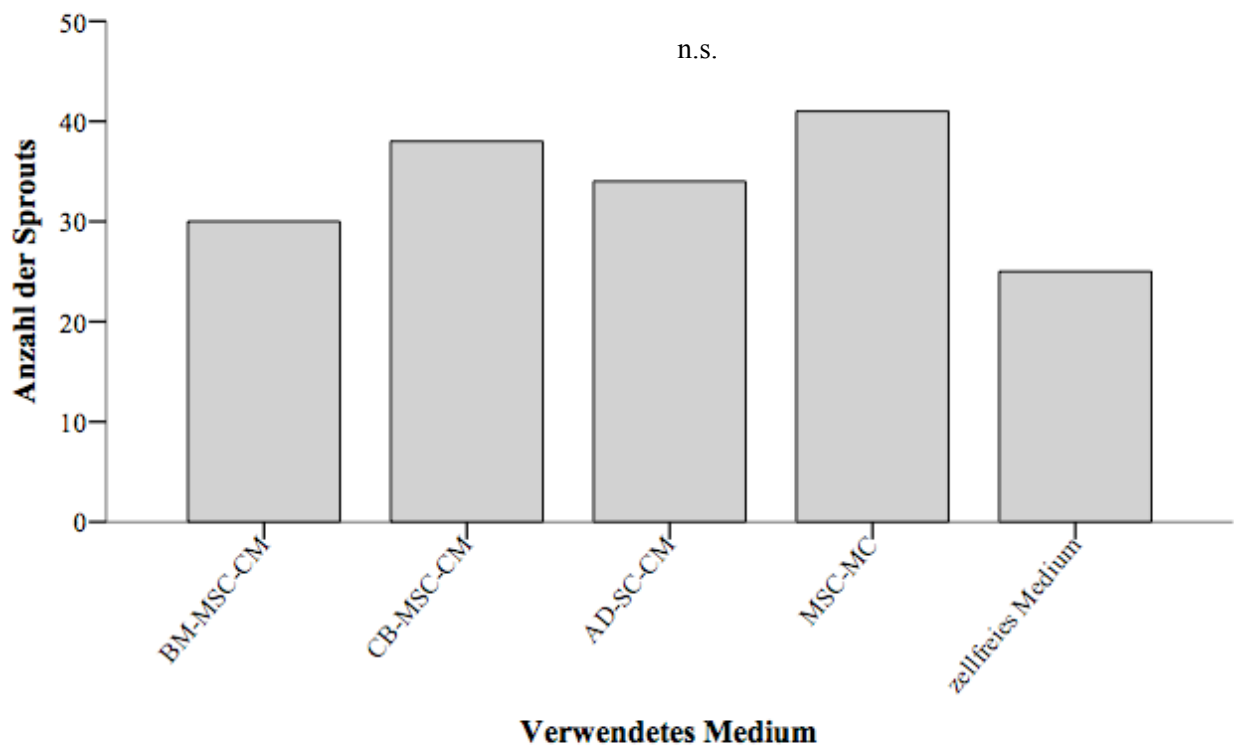
4.3. Proangiogenetische parakrine Aktivität

Die angiogenetische Wirkung des MSC-CM wurde anhand der Ausbildung zellulärer Aussprossungen durch HUVEC innerhalb einer Gel-Matrix beurteilt (Abb. 14). In sphäroider Zellkultur gehaltenen Endothelzellen ließen nach 2-tägiger Inkubationszeit ein Sprouting erkennen, das kapillaren Strukturen ähnelnd das Bestreben zur Gefäßneubildung widerspiegelte. Ausgebildete Sprouts erreichten eine maximale Anzahl bei einem Zusatz der in gelierter Kollegen-I-Lösung eingebetteten Sphäroide von CM nicht verkapselter MSC (41). Ebenfalls eine hohe Anzahl an Sprouts wurde nach Zugabe von CB-MSC-CM identifiziert (38). Mit lediglich 25 Aussprossungen verzeichnete zellfreies Medium die geringste Anzahl von den HUVEC-Sphäroiden ausgehender Sprouts. Ein vergleichbares Sprouting wurde unter Einfluss von BM-MSC-CM und AD-SC-CM beobachtet (30 und 34). Die höchste durchschnittliche kumulative Länge von endothelialen Aussprossungen pro Sphäroid bot eine Inkubation in CB-MSC-CM ($128 \pm 87,8 \mu\text{m}$). Insgesamt war dennoch kein großer Unterschied zwischen dem Zusatz verschiedenartig generierter Medien bezüglich der mittleren Sprout-Länge festzustellen. $107 \pm 78,3 \mu\text{m}$ war die niedrigste durchschnittliche kumulative Länge der HUVEC-Sprouts, vorzuweisen unter BM-MSC-CM-Zugabe. Die Evaluation der gesamten Länge von Endothelzell-Aussprossungen präsentierte einen Maximalwert für das Inkubieren der Sphäroide in nicht verkapselter MSC-CM ($5177,4 \mu\text{m}$). Angesichts der hohen Sprout-Anzahl sowie mittleren kumulativen Länge einzelner Aussprossungen pro Sphäroid, wurde eine eminente Gesamtlänge für das Sprouting erreicht. Genauso war die Zugabe von CB-MSC-CM mit einer beachtlichen Sprout-Gesamtlänge von $4796,4 \mu\text{m}$ assoziiert. Analog zu der geringsten Anzahl ausgebildeter Aussprossungen dokumentierte das zugesetzte zellfreie Medium die niedrigste Gesamtlänge der Sprouts ($3043,2 \mu\text{m}$). Singuläre endotheliale Aussprossungen erlangten eine absolute kumulative Ausdehnung von $441,6 \mu\text{m}$ unter BM-MSC-CM-Inkubation. Hingegen wurde bei Zusatz von zellfreiem Medium nur eine maximale kumulative Länge von $291,2 \mu\text{m}$ registriert. Folglich ist von einer erhaltenen proangiogenetischen Wirkung des verkapselten MSC-Sekretoms auszugehen. Wenngleich die Stammzellen eine Verkapselung in 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Supplementation und 30 Sekunden Exposition gegenüber dem UV-Licht erfuhren, blieb die parakrine Aktivität der MSC konserviert und ein positiver Einfluss auf die Angiogenese ist zu vermuten. Die unterschiedlichen MSC-Populationen divergierten kaum in der manifestierten proangiogenetischen Potenz.

a.



b.



c.

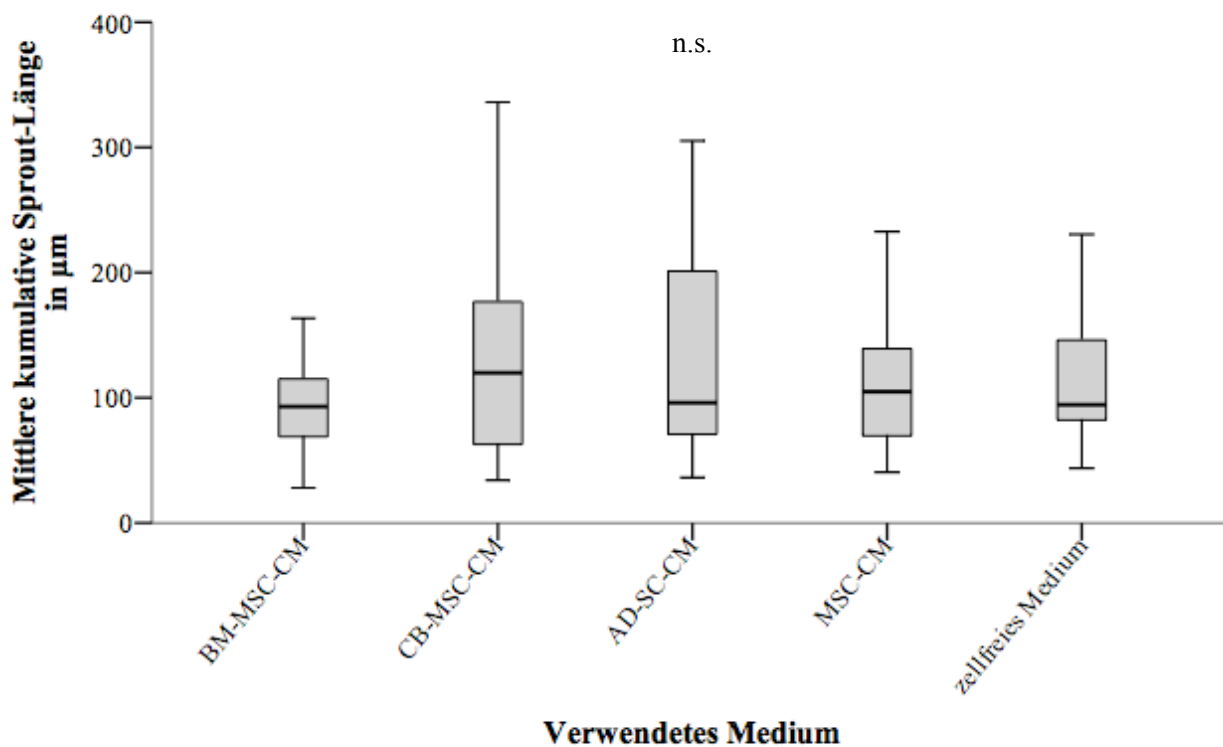


Abb. 16: Sprouting der Endothelzell-Sphäroide nach Einbettung in gelierte Kollegen-I-Lösung unter Zusatz von verschiedenartig generierten Medien und einem 2-tägigen Inkubationszeitraum.

n.s. *Nicht signifikanter Unterschied.*

- Lichtmikroskopische Aufnahmen von HUVEC in sphäroider Zellkultur. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. Eine Vergrößerung von 1000 x wurde verwendet.
- Balkendiagramm-Darstellung der Anzahl ausgebildeter HUVEC-Sprouts.
- Box-Plot-Darstellung der durchschnittlichen Länge zellulärer Aussprossungen.

Im Vergleich zum zellfreien Medium war eine Überlegenheit des CM verkapselter MSC zu erkennen, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied verifiziert werden. Die bedeutsamste Stimulation der HUVEC zur Ausbildung zellulärer Aussprossungen ging von CM nicht verkapselter MSC aus, ebenfalls ohne statistische Signifikanz zu erlangen.

5. DISKUSSION

5.1. Therapeutische MSC-Transplantation

Aktuell beschränken sich die ergriffenen konventionellen Therapiemaßnahmen nach dem akuten Ereignis der myokardialen Ischämie auf die zeitnahe Reperfusion und, im Folgenden, zumeist auf die medikamentöse hämodynamische Modulation, um das geschädigte Myokard zu entlasten, der erneute Okklusion koronararterieller Blutgefäße vorzubeugen sowie das Fortschreiten einer Herzinsuffizienz zu verlangsamen. Eine Verzögerung der Dekompensation und des Eintritts einer terminalen myokardialen Dysfunktion ist dank eingesetzter therapeutischer Verfahren erreichbar, die pathologische Remodellierung post-AMI zu adressieren wird aber versäumt. Während in den letzten Jahren die Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen leicht rückläufig ist, steigt parallel die Inzidenz der Herzinsuffizienz an, die mit einem erhöhten Sterblichkeitsrisiko und einer reduzierten mittleren Überlebensdauer von 4 Jahren assoziiert ist.⁶⁸ Angesichts der ungünstigen Entwicklung des klinischen Verlaufs post-AMI und einer kaum erzielten Verbesserung der langfristigen Prognose sind neuartige therapeutische Optionen gefragt, die additional und supportiv zur konventionellen Therapie Verwendung finden.

Der Einsatz Stammzell-basierte Therapieverfahren, mit dem Ziel der ineffizienten endogene Regenerationsfähigkeit des Myokards nach AMI entgegenzuwirken, ist Grundlage intensiver Forschung seit nunmehr 20 Jahren mit vielversprechenden Ergebnissen in präklinischen Studien und heterogenen Resultaten in der Klinik.^{10,69} In-vitro wurde eine 5-Azacytidin-induzierte Transdifferenzierung von MSC in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen gefunden, die bei Ratten nach autologer Transplantation in ischämisch geschädigtes Myokardgewebe eine merkliche Verbesserung der myokardialen Funktion hervorrufen.⁷⁰ Bei der transendokardialen Injektion von allogenen BM-MSC nach experimentell induziertem AMI konnte eine gesteigerte Herzleistung und eine reduzierte negative myokardiale Remodellierung identifiziert werden. Das porcine Myokardgewebe lies ein lokales Engraftment der applizierten Stammzellen und die Stimulation der kardialen Stamm- und Progenitorzellen nachweisen.⁷¹ Demgegenüber war der Nachweis eines kardiomyozytären Phänotyps durch Differenzierung von Knochenmark-isolierten Stammzellen nach direkter Injektion in peri-infarzielles murines Myokardgewebe nicht möglich. Eine Transdifferenzierung oder zelluläre Fusion mit Kardiomyozyten wurde für die injizierten Stammzellen ausgeschlossen und folglich die kardiomyoplastische Wirkung mit funktionellem Ersatz für das Infarkt-geschädigte Gewebe in Frage gestellt.⁷² Auch eine Modifikation der myokardialen Geweberegeneration konnte nicht gefunden werden, jedoch fand eine potenzielle Steigerung der Myokardfunktion durch die Stammzellapplikation keine Berücksichtigung.

Obwohl ein lokales Engraftment transplanteder MSC nicht auszuschließen ist, muss die beobachtete Verbesserung der myokardialen Funktion auf die parakrine Wirkung sezernierter Signalmoleküle zurückgeführt werden. Die Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren zeigt einen protektiven Effekt auf die funktionell beeinträchtigten Kardiomyozyten des minderperfundierten Myokards. Insbesondere unter ischämischen Bedingungen sezernieren MSC vermehrt zytoprotektive Moleküle, die eine Hypoxie-induzierte Apoptose oder Nekrose der Kardiomyozyten abwenden.^{73,74} In-vivo wurde eine Abnahme der verbleibenden Infarkt Narbe und eine Wiederherstellung der Myokardfunktion nach Applikation

von BM-MSCs in Ischämie-geschädigtes myokardiales Gewebe gesehen. Nach experimenteller AMI-Induktion und anschließender intrakoronarer Stammzellinjektion bei Schweinen war das nekrotische Areal sichtlich reduziert und die linksventrikuläre Funktionsleistung gesteigert.⁷⁵ Weiterhin wird ein positiver Einfluss auf die Neovaskularisation und die post-AMI auftretende Inflammation sowie die konsekutive myokardiale Fibrosierung und die negative Remodellierung beobachtet. In zahlreichen präklinischen Studien wurde eine Reduktion der Fibrose unterschiedlicher Grundgewebearten durch MSC-basierte Therapieverfahren dargelegt, wobei auch am Myokardgewebe eine eindeutige Minderung an kollagenen Fasern nachweisbar ist.⁷⁶ Die MSC-Transplantation inhibiert sowohl die Expression von Kollagen-I als auch von Kollagen-III und verhindert die Proliferation myokardialer Fibroblasten, sodass eine pathologische Remodellierung vermindert wird.^{77,78} Regulatorische Proteine mit Einflussnahme auf die extrazelluläre Matrix, wie Matrix-Metalloproteasen, Serinproteasen oder Serinproteasen-Inhibitoren, werden in großer Vielzahl von MSC exprimiert und scheinen an der anti-fibrotischen Wirkung der Stammzellen beteiligt zu sein.⁷⁹ Unter Hypoxie vollziehen Kardiomyozyten einen Wechsel von der typischen oxidativen Phosphorylierung zur anaeroben, glykolytischen ATP-Synthese und metabolisieren vorzugsweise Glukose anstatt Fettsäuren. Als Folge der unter Sauerstoffausschluss erfolgenden Energiegewinnung steigt die myokardiale Laktatproduktion, während der Kreatinphosphat-ATP-Quotient sinkt. Autolog applizierte BM-MSCs modulieren den myokardialen Metabolismus im porcinen AMI-Modell. Die Applikation der Stammzellen resultierte in einer Verbesserung der bioenergetischen Abnormitäten des Myokards mit Anstieg der Kreatinphosphatreserven und gleichzeitig einer Zunahme myokardialer Kontraktilität.⁸⁰ Des Weiteren wurde bei Ratten nach Ligation einer Koronararterie zur AMI-Induktion und peri-infarzieller Injektion von BM-MSCs eine Normalisierung des intrazellulären pH-Werts sowie eine Erniedrigung der Glukose-Aufnahmerate vorgefunden. Demzufolge ist das Ausbleiben einer verstärkten Metabolisierung mittels anaerober Glykolyse und konsekutivem Auftreten einer Laktatazidose anzunehmen. Die systolische sowie diastolische Myokardfunktion und die Kontraktilität der Kardiomyozyten profitierten ebenso von dem eingesetzten BM-MSCs-basierten Therapieverfahren.⁸¹ Für die Optimierung der kontraktilen Fähigkeiten des Myokards werden positiv-inotrop wirkende Faktoren des MSC-Sekretoms verantwortlich gemacht, deren Freisetzung unter hypoxischen Bedingungen sichtlich erhöht wird.⁸² Wegen der unzureichenden Fähigkeit zur endogenen Regeneration ist die Aktivierung und Rekrutierung sowie induzierte kardiomyozytäre Differenzierung von residenten Stamm- und Progenitorzellen essentiell, um den Verlust von funktionellem Myokardgewebe zu kompensieren. Die c-Kit⁺ kardialen Progenitorzellen erfahren durch MSC-CMs eine Stimulation zur Proliferation und differenzieren erwartungsgemäß zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen mit Expression von Troponin T und mikrofilamentärem α -Aktinin.⁸³ MSC-freigesetzte Signalmoleküle üben oftmals einen pleiotropen Effekt aus, wobei eine dynamische Änderung der Wirkungsweisen im zeitlichen Verlauf der post-AMI auftretenden Heilungs- und Regenerationsprozesse vermutet wird. Darüber hinaus bilden die sezernierten Zytokine, ausgehend vom Ort der MSC-Sekretion, einen Konzentrationsgradienten entlang dessen in Abhängigkeit von der lokal vorherrschenden Konzentration eine Variation der Wirkung auftreten kann.⁸⁴ Insofern determinieren der Zeitpunkt und die Lokalisation der Stammzell-Applikation die parakrine Wirkung des MSC-Sekretoms und bestimmen die erzielten Resultate der verwendeten Therapiemaßnahmen. Auch die applizierte Stammzell-

Dosis beeinflusst die Effizienz des therapeutischen Verfahrens, indem die Menge sezernierter Faktoren und damit die hergestellten Konzentrationsgradienten modifiziert werden.

Trotz der verheißungsvollen Ergebnisse präklinischer Studien gestaltet sich eine Übertragung in die Klinik schwierig, sodass zurzeit keine konventionelle Anwendung Stammzell-basierter Therapiemaßnahmen beim AMI verfügbar ist.⁸⁵ Die verfügbaren klinischer Studien zur MSC-Transplantation nach Ischämie-induzierter myokardialer Gewebeläsion liefern widersprüchliche Resultate und versagen ein effizientes, sicheres und kostengünstiges Verfahren zur therapeutischen Stammzell-Applikation zu präsentieren. In einer systematisch durchgeführten Cochrane-Metaanalyse unter Einschluss 41 klinischer randomisierter Studien und insgesamt 2700 Patienten wurde die Applikation autologer Knochenmark-isolierter Stamm- und Progenitorzellen nach AMI evaluiert. Die Mortalität, die Rehospitalisierung aufgrund eines erneuten AMI oder einer Herzinsuffizienz sowie das Auftreten periprozeduraler Komplikationen wurden in den ersten 12 Monaten sowie langfristig im Follow-up über mehrere Jahre erfasst. Zwischen den zusätzlich zur Standardtherapie mit autologen Stamm- und Progenitorzellen des Knochenmarks behandelten Patienten und der konventionell therapierten Kontrollgruppe wurden keine Unterschiede gefunden. Hinsichtlich der betrachteten Endpunkte konnte kein Vorteil durch die Stammzell-basierte Intervention beim AMI identifiziert werden, da weder eine Reduktion der Mortalität noch der Morbidität erreicht wurde. Trotz nicht nachweisbarer Effizienz der Stammzelltherapie, wurden Verfahrens-bedingte Komplikationen ausgeschlossen und damit die Sicherheit der Applikation von Stamm- und Progenitorzellen belegt.⁸⁶ Anzumerken ist die geringe Fallzahl der analysierten Studien, die Abwesenheit eines standardisierten Protokolls zur Stammzellisolation und eines einheitlichen Zellkulturprotokolls sowie die Heterogenität in der applizierten Stammzelldosis, sodass ein Vergleich der Forschungsergebnisse erschwert und die Aussagekraft der Metaanalyse eingeschränkt ist. Die randomisierte, Placebo-kontrollierte, klinische APOLLO Studie mit doppelter Verblindung untersuchte die Sicherheit und Durchführbarkeit der intrakoronaren Infusion von AD-SC bei AMI-Patienten. Bei der akut durchgeführten Lipoaspiration zur Isolation autologer Stammzellen aus dem subkutanen Fettgewebe wurden keine Komplikationen gefunden. Genauso verlief die AD-SC-Infusion in das revaskularisiert Blutgefäß nach perkutaner Koronarintervention komplikationslos ohne eine Alteration des koronararteriellen Blutflusses oder eine mikrovaskuläre Obstruktion hervorzurufen. Eine Verbesserung der myokardiale Funktion war im 6-monatigen Follow-up bei der Patientengruppe mit Stammzelltherapie im Vergleich zu den Kontrollen mit Placebo-Injektion sichtbar. Ferner wurden eine verbesserte Myokardperfusion und wesentliche Reduktion der Infarkt Narbe festgehalten.⁸⁷ In Anbetracht der niedrigen Fallzahl von insgesamt 13 Patienten sind die präsentierten Ergebnisse limitiert und bedürfen einer Bestätigung durch größer angelegte Multi-Center-Studien. Für die folglich durchgeführte randomisierte, Placebo-kontrollierte, klinischen ADVANCE Studie mit Einschluss von 375 Patienten stehen gegenwärtig keine Resultate zur Verfügung.

Entgegen dem aussichtsreichen therapeutischen Potential perinataler Stammzellen, liegen keine registrierten klinischen Studien zu CB-MS-C-basierten Behandlungsverfahren beim AMI vor. Jedoch lassen sich laufende Studien zur Therapie mit Nabelschnur-assoziierten MSC sowie ein abgeschlossener Versuch des intrakoronaren Wharton's Jelly MSC-Transfers nach akutem Auftreten einer myokardialen Ischämie bei einer Kohorte von 116 Patienten auffinden. Die Applikation von allogenen aus Nabelschnurgewebe-entnommenen Stammzellen wurde als sicher und effizient befunden. Im 18-monatigen Beobachtungszeitraum war eine erhöhte kardiomyozytäre Viabilität mittels Positronen-Emissions-

Tomographie und eine gesteigerte Perfusion innerhalb der infarzierten Myokardzone mithilfe von Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie bei der Patientengruppe mit Stammzelltherapie im Vergleich zu den Placebo-behandelten Studienteilnehmern zu ermitteln.⁸⁸ Weitere Ergebnisse zur Transplantation perinataler Stammzellen sind allerdings ausstehend, ebenfalls gelten Vergleich anstellende Studien zwischen unterschiedlichen MSC-Populationen bisher als resultatlos.

Die hohen Erwartungen an die Stammzell-basierten Therapiemaßnahmen hinken den bislang in der Klinik erzielten Ergebnissen hinterher, wobei die Verweildauer der applizierten Stammzellen im myokardialen Zielgewebe ein zentrales Problem gestaltet. Um das zelluläre Engraftment nachzuvollziehen, wurden in einer prospektiven klinischen Studie 2-Fluordesoxyglucose-markierte BM-MSC bei Patienten mit diagnostiziertem AMI nach perkutaner Koronarintervention und Stentimplantation in die entsprechende Koronararterie infundiert. Im Anschluss an den autologen Stammzell-Transfer erfolgte die Anfertigung Positronen-Emissions-tomographischer Aufnahmen, sodass die Lokalisation der applizierten BM-MSC zu detektieren war. Der nuklearmedizinische Nachweis mittels Radionuklid offenbarte eine primäre Anreicherung in der Leber und der Milz, während nur ein minimaler BM-MSC-Anteil im infarzierten Myokardgewebe vorzufinden war.⁸⁹ Die geringe lokale Adhäsion und Überlebensrate der transplantierten MSC lässt keinen klinisch bedeutsamen Nutzen der Stammzelltherapie erhoffen und stellt eine entscheidende Herausforderung für den therapeutischen Erfolg der Stammzell-Applikation dar. Das zellfeindliche Milieu des ischämischen Myokardgewebes provoziert einen erheblichen Zellverlust und zudem limitiert eine vorherrschende Hypoxie die Replikationskapazität der MSC. Schließlich ist der Verbleib transplantierte MSC durch die kontinuierlichen myokardialen Kontraktion behindert und für eine beachtliche Minderung des therapeutische Potenzials verantwortlich.⁹⁰

Verschiedenartige Strategien wurden exploriert, um der Problematik des reduzierte MSC-Engraftments zu begegnen und eine Verfahrensoptimierung der Stammzell-basierten Therapie zu erreichen. Neben der Ermittlung des effizientesten Transplantationsmodus, wurden eine in-vitro Präkonditionierung und genetische Manipulation der Stammzellen angeführt.⁹¹ Eine kurzzeitige Kultivierung der MSC unter hypoxischen Bedingungen ruft eine sichtliche Reduktion des Zellverlusts nach intramyokardialer Injektion in das peri-infarzielle Gewebe hervor. Unter Sauerstoffrestriktion oder Normoxie kultivierte BM-MSC wurden im murinen AMI-Modell nach koronararterieller Okklusion in das Myokardgewebe injiziert und bezüglich des zellulären Verlusts verglichen. Im Follow-up war eine höhere Anzahl vitaler Hypoxie-präkonditionierter BM-MSC im myokardialen Gewebe anzutreffen und eine gesteigerte Sekretion zytoprotektiver und anti-apoptotischer Zytokine wurde identifiziert.⁹² Auch eine Modifikation des Stammzell-Genoms verbessert das Überleben der therapeutisch verwendeten MSC im ischämischen Myokardgewebe. Mit einer lentiviralen RNA genetisch transduzierte AD-SC wurden nach AMI-Induktion bei Mäusen in die minderperfundierte Infarkt-angrenzende Gewebezone appliziert. Durch die RNA-Interferenz wurde die zelluläre Expression der Prolylhydroxylase stillgelegt und folglich die Hydrolyse sowie die Ubiquitin-abhängige Degradation des Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktors 1 α inhibiert. Damit zeigten die AD-SC unter hypoxischen Bedingungen eine verstärkte Transkriptionsfaktor-Expression mit zytoprotektiver Wirkung, die sich im verminderten Stammzellverlust nach Transplantation in das infarzierte Myokardgewebe widerspiegelt. Die Prolylhydroxylase-Stillegung erwirkt ferner eine Steigerung des anti-apoptotischen Effekts auf Kardiomyozyten.⁹³ Demnach vermag ein Priming der Stammzellen die Transplantationseffizienz nicht nur

durch eine erhöhte Überlebensrate der MSC im hostilen Milieu des ischämischen Myokardgewebes, sondern auch dank einer Stimulation der parakrinen Aktivität zu verbessern.⁹⁴ Darüber hinaus kann dem immensen Zellverlust mit der Wahl des idealen Therapiezeitpunkts nach AMI-Diagnosestellung Einhalt geboten werden. Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der zellulären Applikation erfolgte eine intramyokardiale BM-MSC-Injektion bei Ratten mit variablem zeitlichen Abstand nach koronararterieller Ligation. Im Intervall von einer Stunde, einer Woche oder zwei Wochen zur Induktion der Myokardischämie wurden die Stammzellen transplantiert und hinsichtlich dem Überleben, der flächenhaften Ausdehnung der Infarktzone und der myokardialen Funktion gegenübergestellt. Die MSC-Transplantation im einwöchentlichen Abstand zum AMI bot den größten Stammzell-basierten Therapieerfolg mit einem höheren Anteil vitaler BM-MSC und funktionsfähiger Kardiomyozyten. Die akut auftretende Inflammation scheint reduziert und erlaubt die Stammzell-Infiltration sowie Integration in das Myokard.⁹⁵ Bestätigung fanden diese Resultate in mehreren randomisierten klinischen Studien, bei denen ein Therapiezeitpunkt 4 bis 7 Tage post-AMI mit einer gesteigerten Myokardfunktion assoziiert war. Ein frühzeitiger Beginn der Stammzell-basierten Therapiemaßnahmen erbrachte einen geringeren Behandlungserfolg.⁹⁶

Eine weitere Strategie zur Verfahrensoptimierung stellt der Einsatz von Biomaterialien dar, mit dem ein verbessertes MSC-Engraftment und ein Schutz gegenüber dem zellfeindlichen Milieu des infarzierten Myokardgewebes verfolgt wird.⁹⁷ Die zerstörte Architektur und der Verlust von extrazellulärer Matrix erschweren den lokalen Verbleib der transplantierten Stammzellen und interferieren mit dem zellulären Überleben durch einen Mangel an Zell-Matrix-Interaktionen. Der biomechanischen Unterstützung angewandter MSC dienend, finden implantierbare Werkstoffe als Stammzell-beladene Patches sowie als injizierbare Hydrogele Verwendung. Zur Abdeckung des myokardialen Gewebedefekts können biokompatible Transplantate chirurgisch appliziert werden, die eine langsame Degradation erfahren und eine graduelle Freisetzung von Stammzellen einrichten. Die zellularisierten Scaffolds gewährleisten die lokale Adhäsion der MSC und steigern die zelluläre Viabilität nach Stammzell-Transfer, dennoch bildet ein invasiver Eingriff den vorausgesetzten Applikationsmodus. Einer intramyokardialen Injektion zugängliche Hydrogele werden sonach bevorzugt, da auf Verfahren mit minimaler Invasivität zurückgreifbar ist und eine additional Verwendung zur gängigen perkutanen Koronarintervention ermöglicht wird.⁶⁸ In-vivo bot sich eine Überlegenheit der Transplantation in Methylcellulose-basiertem Hydrogel suspendierter BM-MSC gegenüber der Stammzell-Applikation ohne unterstützendes Biomaterial. Nachdem ein AMI bei Mäusen induziert wurde, erfolgte die Injektion autologer BM-MSC in das peri-infarzielle Myokardgewebe als alleiniger Stammzell-Transfer oder in Kombination mit dem supportiven Hydrogel. Der Zusatz des verwendeten Biomaterials förderte die MSC-Implantation und das zelluläre Engraftment, sodass eine Verbesserung der myokardialen Funktion und eine Minderung der negativen Remodellierung resultierten.⁹⁸ Trotzdem war die erzielte Optimierung der Verweildauer transplantierte Stammzellen im Myokardgewebe nicht zufriedenstellend und im langfristigen Follow-up kein eindeutiger Vorteil des zusätzlichen Methylcellulose-Einsatzes ableitbar. Um eine längere Persistenz im Zielgewebe zu erwirken, wird eine implantierbare Werkstoffform gesucht, die für eine minimal-invasive Applikation disponibel ist und zugleich eine genügende Immobilisation der Stammzellen bei hoher Zytoverträglichkeit gewährt. Als dreidimensionales hydrophiles Netzwerk geltend, lässt Hydrogel die Herstellung weiterer Biopolymer-Strukturen mit einer stabileren Form und einer höheren Resistenz gegenüber externen physikalischen

Einflussfaktoren zu. Die Entwicklung Zell-beladener polymerer Mikrosphären oder Mikrokapseln vereinigt die geforderten Eigenschaften von idealen Dimensionen für eine intramyokardiale Injektion und mechanischer Stabilität zur Steigerung des lokalen Verbleibs applizierter MSC. Letztlich ist das Design eines Hydrogels gefragt, das zur zellulären Mikroverkapselung qualifiziert und eine maximale biomechanische Unterstützung leistet.

5.2. L929-Verkapselung in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel

Die präsentierte Produktion von GMA-Gelatine-basierten Mikrokapseln stellt eine leicht durchführbare, reproduzierbare und zytoverträgliche sowie kostengünstige Methode dar und gestattet die Herstellung von Zell-beladenen sphärischen Hydrogel-Kapseln mit einer Größe im Mikrometer-Bereich. Als verwendetes Biomaterial ermöglicht die GMA-Gelatine eine zuverlässige zelluläre Verkapselung dank dem photochemisch-induzierten Gelieren zu stabilem und nicht thermoreversiblen Hydrogel. Sowohl L929-Fibroblasten als auch MSC ließen sich erfolgreich mit dem beschriebenen Emulsionsverfahren verkapseln. Gleichwohl traten auch beträchtliche Limitationen des vorgestellten Zellverkapselungsprozesses auf, die eine standardisierte klinische Anwendung unterbinden. Eine inkomplette Verkapselung mit zellulärem Verlust in nicht gelierter GMA-Gelatine-Suspension und konsekutiver Erniedrigung der Verkapselungseffizienz wurde gefunden. Zwischen den Mikrokapseln waren vereinzelt ungebundene Zellen vorzufinden, die frei im Zellkulturmedium identifiziert wurden und sich einer Verkapselung im Hydrogel entziehen konnten (Abb. 3 b). Das Ausbleiben der UV-Licht-abhängigen Polymerisation der Gelatine-Proteine wurde vor allem bei Mikrokapseln mit einer Lokalisation am äußersten Rand der Petrischale und mit einem erhöhten Durchmesser ermittelt. Trotz ständigen Rührens durch den eingesetzten Magnetrührer konnte eine ungleichmäßige Verteilung der emulgierten GMA-Gelatine-Suspension innerhalb der Petrischale nicht ausgeschlossen werden. Infolgedessen ist von einer geringeren UV-Licht-Exposition und einer reduzierten photochemischen Induktion zur Gelierung der GMA-Gelatine-Suspension lokalisiert am äußersten Rand der Petrischale auszugehen. Durch die Heterogenität der UV-Licht-Exposition an den diversen Lokalisationen der Petrischale resultieren Hydrogel-Kapseln unterschiedlicher Steifheit und elastische Verformbarkeit. Eine Variation der mechano-elastischen Eigenschaften ist somit nicht nur zwischen den Proben verschiedener GMA-Gelatine-Lösungen, sondern auch zwischen den Mikrokapseln hergestellt unter Verwendung der selben gelösten GMA-Gelatine auszumachen. Mit steigender Mikrokapselgröße nimmt die Anzahl GMA-modifizierter funktioneller Seitengruppen der Gelatine-Proteine zu und die benötigte Expositionszeit gegenüber dem UV-Licht zur kovalenten Vernetzung erhöht sich. Um das Gelieren der GMA-Gelatine großer Mikrokapseln zu induzieren, waren die gewählten UV-Licht-Expositionszeiten unzureichend und die Verkapselung der suspendierten Zellen blieb aus.

Die breite Streuung der Mikrokapselgröße limitiert ebenso den entwickelten Prozess der Zellverkapselung. Obwohl eine durchschnittliche Kapselgröße von ungefähr 100 μm erreicht wurde, ist ein einheitlicher Durchmesser der Kapseln im idealen Mikrometer-Bereich nicht garantiert. Das Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Zell-beladenen Mikrokapseln bestimmt die einwärts gerichtete Diffusion von Sauerstoff und nutritiven Substanzen zur Aufrechterhaltung des zellulären Metabolismus, gleichzeitig wird die auswärts gerichtete Diffusion von sezernierten modulatorischen Signalmolekülen zur myokardiale Regeneration

beeinflusst. Mit zunehmender Mikrokapselgröße verlängert sich die Diffusionsstrecke und die Sauerstoff- sowie Nährstoff-Versorgung der verkapselten Zellen wird reduziert. Ferner verlangsamen sich die Diffusion freigesetzter Zytokine und die biologischen Abbauprozesse der Hydrogel-Kapseln mit Verzögerung einer möglichen Stammzell-Infiltration und Integration in das Myokard. Die manuell mittels Pipettieren herbeigeführte Emulsion aus sterilisiertem Sojabohnen-Öl und der GMA-Gelatine-Suspension generiert Mikrokapseln mit heterogenem Durchmesser und ist mit einer Inter-Experimentator-Variabilität belegt. Die Reproduzierbarkeit des Prozesses leidet gleichfalls unter den Variationen in der Emulsionsherstellung zwischen verschiedenen Experimentatoren.

Die relativ niedrige Verkapselungseffizienz schränkt zusätzlich das präsentierte Verfahren zur Zellverkapselung ein. Der deutliche Verlust an vitalen Zellen im Prozessverlauf ist hinsichtlich der limitierten Verfügbarkeit von Stammzellen nicht akzeptabel. Da die Applikation einer suffizienten MSC-Dosis mit therapeutischer Wirkung angestrebt wird, muss die gewählte Methode der zellulären Verkapselung eine hohe Effizienz bieten und mit einem möglichst niedrigen prozessualen Zellverlust assoziiert sein. Neben dem prozessbedingten Stress, einer Depletion von Sauerstoff und Nährstoffen sowie einer temporären Veränderung des mikrokapsulären Turgors bei Überführung in das Zellkulturmedium, ist an eine unvollständige Auflösung der zellulären Verkapselung mittels Kollagenase als Ursachen eines Zellverlusts zu denken. Ungeachtet einer begrenzten Eignung des Zellverkapselungsprozesses, konnte die Interaktion zwischen den Zellen und dem Biomaterial evaluiert werden. Das verwendete GMA-Gelatine-basierte Hydrogel befähigte zur Herstellung von Zell-beladenen Mikrokapseln, wobei mit der 10 wt%-GMA-Gelatine die höchste zelluläre Viabilität erzielt wurde. Eine Verringerung der GMA-Gelatine-Konzentration unter 10 wt% brachte eine Erniedrigung der Konzentration intramolekularer reaktiver Seitengruppen mit sich, sodass eine verlängerte UV-Licht-Expositionszeit notwendig war, um stabile Hydrogel-Mikrokapseln herzustellen. Die Verlängerung der Expositionszeit gegenüber dem UV-Licht provozierte wiederum eine Reduktion der zellulären Viabilität. Unter Verwendung der 5 wt%-GMA-Gelatine resultierten erst ab einer 3-minütigen Expositionsdauer Mikrokapsel mit genügender Stabilität, die Viabilität verkapselter L929 war jedoch desolat. Autoklavierte GMA-Gelatine zeichnete sich durch eine geringere mittlere Polypeptidkettenlänge aus, begleitet von einer Abnahme des Elastizitätsmoduls des entsprechenden Hydrogels. Demnach waren eine niedrigere Steifheit und gesteigerte elastische Verformbarkeit des Hydrogels zu erwarten, die sich in der Zunahme der benötigten UV-Licht-Expositionszeit zur Produktion stabiler Mikrokapseln bei der 10 wt% 2xAC GMA-Gelatine widerspiegeln. Im Vergleich zu den 10 wt%-GMA-Gelatine-Mikrokapseln zeigten die Hydrogel-Kapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine unabhängig von der UV-Licht-Exposition eine höhere Viabilität der verkapselten L929. Mit zunehmender UV-Licht-Expositionszeit steigen der Polymerisationsgrad der Gelatine-Proteine sowie die Steifheit des resultierenden Hydrogels. Eine hohe Dichte an kovalenten Bindungen beeinträchtigt eine effiziente einwärts gerichtete Diffusion von Sauerstoff und nutritiven Substanzen zum Nachteil des zellulären Metabolismus und dezimiert die Anzahl lebender Zellen in den Mikrokapseln. Darüber hinaus verhindert eine starke intramolekulare Vernetzung innerhalb des Hydrogels die zelluläre Mobilität mit negativer Auswirkung auf die Viabilität der Zellen. Die zelluläre Migration der L929 vom Kapselinneren an die sphärische Kapseloberfläche, die bei allen Mikrokapseln hergestellt aus 10 wt% AC GMA-Gelatine notiert wurde, weist eine uneingeschränkte Zellmobilität nach. Die Bildung eines L929-Monolayers auf der Oberfläche der Hydrogel-Kapseln suggeriert eine ideale Grundlage für die

zelluläre Adhäsion und könnte nach einer Transplantation das lokale Engraftment der Zellen unterstützen. Letztlich bot die 10 wt% AC GMA-Gelatine die günstigsten chemischen und mechanisch-physikalische Eigenschaften eines Biomaterial, das zur Produktion von Zell-beladenen Hydrogel-Mikrokapseln bestimmt ist. Die vorliegenden Ergebnisse sind kongruent mit den Resultaten der Verkapselung von 3T3 Fibroblasten in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel. Nach der Mikroverkapselung wurde eine hohe Zellviabilität vorgefunden, die auch im 15-tägigen Beobachtungszeitraum Bestand hatte. Desgleichen wurde eine Elongation und Migration der verkapselten Zellen beschrieben sowie die Etablierung von Zell-Zell-Interaktionen zwischen benachbarten Fibroblasten innerhalb der Hydrogel-Kapseln bemerkt. Auszumachen war ferner eine langsame Degradation der Mikrokapsel-Matrix durch die verkapselten Zellen, die zusätzlich eine Steigerung der zellulären Mobilität herbeiführte. Ein Abbau der Extrazellulärmatrix schafft zudem Raum für die zelluläre Proliferation. Die Viabilität und Funktionalität der Fibroblasten zeigte eine inverse Korrelation mit der verwendeten Gelatine-Konzentration und einer konsekutiven Erhöhung der Rigidität des Hydrogels, sodass die 5 wt% GMA-Gelatine-Lösung mit idealen Biomaterialeigenschaften für eine zelluläre Verkapselung assoziiert wurde. Die Herstellung der Zell-beladenen Mikrokapseln erfolgte im Unterschied zum dargestellten Emulsionsverfahren mittels Fotolithographie. Obwohl ein vergleichbar hoher Grad der Methylacrylierung von 81% und eine ähnliche Konzentration des Photoinitiators Irgacure® 2959 von 0,5 wt% eingesetzt wurden, war die UV-Licht-Expositionszeit auf 15 s festgelegt und der durchschnittliche Durchmesser generierter Hydrogel-Kapseln betrug 500 µm.⁶¹ Schließlich ist eine exzellente Eignung der GMA-Gelatine zur Zellverkapselung konstatierbar und besonders die Zell-bindende Eigenschaft des natürlichen Biopolymers zu betonen, die sowohl eine zelluläre Adhäsion als auch die Migration verkapselter Zellen fördert.

5.3. MSC-beladene Hydrogel-Kapseln

Zahlreiche natürliche sowie synthetische Makromoleküle wurden auf Verwendbarkeit als Biomaterial zur Produktion von Hydrogel-basierten Mikrokapseln untersucht. Zu den vorrangig explorierten Polymeren zählend, stellt Alginat ein hydrophiles lineares Polysaccharid dar, das von Braunalgen und diversen Bakterien gebildet wird sowie als biokompatibel einzustufen ist. Die Gelierung beruht auf einer Polymerisation durch Einlagerung von divalenten Kationen in homogen strukturierte Bereiche der monomeren Guluronsäure, sodass eine Ausbildung ionischer Bindungen induziert wird. Mangelnde Zell-Matrix-Interaktion und eine unkontrolliert ablaufende biologische Degradation geben beträchtliche Nachteile des Biomaterials wieder. Ein weiterer implantierbarer Werkstoff mit natürlichem Ursprung bietet das Polysaccharid Agarose dar, das aus Rotalgen isoliert wird und Temperatur-abhängig geliert. Trotz nachgewiesener Biokompatibilität erschwert das Fehlen zellulärer Bindungsdomänen den erfolgreichen Einsatz bei einer Hydrogel-basierten Zellverkapselung.^{99,100} Die Verwendung von Gelatine lässt hingegen eine erhöhte Zytoverträglichkeit erhoffen, angesichts der intrinsischen Zelladhäsionsfähigkeit des natürlichen Biopolymers. Im direkten Vergleich zwischen Alginat, Agarose und Gelatine, wurde bei der Hydrogel-Einbettung von AD-SC eine übereinstimmende zelluläre Viabilität ermittelt, die auch im Follow-up bestehen blieb. Ungleich der zellularisierten Alginat- und Agarose-Scaffolds, zeigten in Gelatine-basiertem Hydrogel eingebettete AD-SC eine morphologische Veränderung. Ausgehend von einer abgerundeten Zellform nahmen

die Stammzellen allmählich eine spindelförmige Morphologie an und erreichten nach Proliferation eine Konfluenz mit sichtbarer Zell-Zell-Interaktion. Darüber hinaus wurde in den Gelatine-Scaffolds eine höhere Rate der AD-SC-Biosynthese notiert. Die Wahl des Hydrogel-bildenden Biomaterials beeinflusst unverkennbar die Zellfunktionalität und trägt zur Potenzierung der MSC-basierten Therapieverfahren bei.¹⁰¹ Bei der beschriebenen MSC-Verkapselung in GMA-Gelatine-basierten Hydrogel-Kapseln war eine hohe zelluläre Viabilität reproduzierbar. Gleichfalls wurde im Beobachtungszeitraum von 7 Tagen ein konstant hoher Anteil vitaler Stammzellen nach Mikroverkapselung verzeichnet. Eine Abnahme der Zellviabilität ergab sich bei Verlängerung der UV-Licht-Expositionsdauer, resultierend aus einer Zunahme der Steifheit des Hydrogels mit steigendem Grad polymerisierter Gelatine-Proteine.

Die Entwicklung hybrider Hydrogel-Mikrokapseln, beruhend auf der Kombination unterschiedlicher Biopolymere, lässt einen Synergismus der Charakteristika einzelner Werkstoffe erwarten. Sonach verspricht die Modifikation der Mikrokapselzusammensetzung durch DxS-Zugabe eine Potenzierung vorteilhafter Materialeigenschaften und insgesamt eine Optimierung der Zytoverträglichkeit produzierter Hydrogel-Kapseln. Das zugesetzte DxS bewirkte eine merkliche Verbesserung der zellulären Viabilität der in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel verkapselten MSC. Unabhängig von der UV-Licht-Expositionsdauer war eine höhere Zellviabilität nach Verkapselung in 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz zu beobachten. Die Überlegenheit der Hydrogel-Kapseln aus GMA-Gelatine mit Zugabe von DxS wurde bei allen analysierten MSC-Populationen gleichermaßen vorgefunden und konnte im 7-tägigen Follow-up bestätigt werden. Vergleichend mit den Mikrokapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine ohne supplementiertes DxS, deuteten die Hydrogel-Kapseln mit zugesetztem DxS ebenso eine höhere Zellmasse verkapselter MSC an. Als osmotisch wirksam ausgezeichnet, fördert das anionische Polysaccharid die Hydrogelbildung, sodass mit einer Zunahme der elastischen Verformbarkeit und der Quellbarkeit resultierender Mikrokapseln zu rechnen ist. Zugleich verleiht DxS eine Stabilität und erhöht die Widerstandsfähigkeit der Matrix gegenüber komprimierender Krafteinwirkung. Außerdem ist das nicht-proteinerge Makromolekül bedeutend für die Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktion und dient als Reservoir für diverse Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine. Die Assoziation mit den Signalmolekülen beruht auf den negativen Ladungen des DxS und spezifischen Protein-Bindungsdomänen.¹⁰²

Die BM-MSC-Verkapselung in einem dualen Biopolymer-Netzwerk aus Agarose und DxS konnte eine Abhängigkeit der zellulären Viabilität von der zugesetzten DxS-Konzentration festgestellt werden. Hochkonzentriertes DxS resultierte in einer Instabilität der hergestellten Mikrokapseln, während das günstigste Verhältnis LIVE/DEAD®-angefärbter Flächen der verkapselten Stammzellen bei 100 µg/ ml DxS erlangt wurde. Der Zusatz von Kollagen I zu Alginat-basierten Hydrogel-Kapseln steigerte ebenfalls die Zellviabilität, dennoch fiel die registrierte Zunahme der MSC-Viabilität wesentlich höher unter DxS-Zugabe aus. Nach einer 3-tägigen Beobachtungszeit wurde eine Mikrokapselzusammensetzung aus Agarose, Kollagen I, Fibrin und 100 µg/ ml DxS mit der größten Anzahl vitaler Zellen assoziiert und eine Unterstützung des proliferativen Potenzials sowie der Überlebensfähigkeit verkapselter BM-MSC dekuviert. Bei einer weiteren Evaluation der Interaktion zwischen den Stammzellen und dem Biomaterial war die Migration der MSC aus den sphärischen Mikrokapseln ersichtlich sowie eine erhaltene Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF nachzuweisen. Unter Simulation einer Hypoxie wurden die verkapselten BM-MSC zu einer Forcierung der parakrinen Aktivität angeregt, sodass eine erhöhte VEGF-Freisetzung und ein

.....

konserviertes Reaktionsvermögen der Stammzellen auf externe Stimuli vernehmbar waren. Überdies manifestierte sich post-Verkapselung eine Wahrung des MSC-Differenzierungspotenzials, sowohl ein adipozytärer als auch ein osteoblastärer Phänotyp war induzierbar. Die in-vivo Eignung erprobend, wurden die generierten Hydrogel-Kapseln in das Ischämie-geschädigte Myokard sowie in die peri-infarzielle Gewebezone von Ratten injiziert und einer intramyokardialen Injektion von suspendierten Stammzellen gegenübergestellt. Die Verwendung von USPIO-markierten BM-MSC ermöglichte die Detektion der Stammzellen mithilfe von hochauflösenden T1-gewichteten magnetresonanztomographischen Aufnahmen des linken Ventrikels. Im Intervall von 2 Tagen sowie 1, 2, 4 und 6 Wochen nach Implantation wurde eine kardiale MRT-Untersuchung durchgeführt, wobei in Suspension applizierte MSC lediglich kurz nach der Transplantation aufzufinden waren. Verkapselte Stammzellen konnten dagegen bis zum 6-wöchigen Follow-up detektiert werden, mit einer sukzessiven Abschwächung der Signalintensität über den gesamten Beobachtungszeitraum. Somit war ein langfristiger lokaler Verbleib der MSC durch die Mikroverkapselung gegeben und die anschließende immunhistologische Analyse des murinen Myokards lies eine partielle Migration verkapselter Stammzellen aus den Hydrogel-Kapseln in das myokardiale Zielgewebe erkennen. Schließlich wurde die Verwendbarkeit der Agarose-DxS-Kollagen-I-Fibrin-Mikrokapseln bewiesen und eine Verfahrensoptimierung der therapeutischen MSC-Applikation durch den Einsatz von Biomaterialien realisiert. Ferner belegt der zielführende Einsatz von hybriden Mikrokapseln die Vorteile einer DxS-Supplementation und kommt einer Annäherung an die Komposition sowie Struktur natürlicher extrazellulärer Matrix nach.¹⁰³

Eine Imitation der nativen Extrazellulärmatrix gestaltet sich herausfordernd, da ein komplexes, kovalent sowie nicht-kovalent verbundenes System aus Matrix-Proteinen, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen nachzustellen ist. Das heterogene molekulare Netzwerk impliziert chemische und mechanisch-physikalische Signalcharakter, die Rezeptor-vermittelt einen Einfluss auf multiple Zellfunktionen und das zelluläre Verhalten ausüben. Eingebetteten Zellen wird eine physische Struktur zur Verfügung gestellt und eine räumliche Verteilung, Speicherung sowie kontrollierte Freisetzung der sezernierten Zytokine gewährt. Folglich wirkt die extrazelluläre Matrix modulierend auf zelluläre Interaktion und Kommunikation, wobei die Einrichtung eines Konzentrationsgradienten von Signalmolekülen essentiell für die Migration sowie das Homing der Zellen ist. Weiterhin besteht eine regulierende Wirkung auf die Verteilung von nutritiven Substanzen und Gasen.¹⁰⁴ Eine verlässliche Reproduktion der zellulären Mikroumgebung erlaubt den natürlichen MSC-Phänotyp und das zelluläre Überleben nach Transplantation zu erhalten sowie durch die additive Integration von Wachstumsfaktoren und Zytokinen die therapeutische Wirkung der applizierten Stammzellen zu potenzieren.^{103,105}

Die Kombination der verwendeten Gelatine-Proteinen mit dem Glykosaminoglykan-ähnlichen DxS verhilft ein biomimetisches Hydrogel herzustellen und die native Architektur der extrazellulären Matrix ideal zu imitieren. Erhöhte MSC-Viabilität und -Masse lassen auf eine erreichte qualitative Veränderungen der Mikrokapsel-Zusammensetzung durch den DxS-Zusatz schließen. Des Weiteren stützen die Ausbildung zellulärer Fortsätze, die Annahme einer Spindelform und die Tendenz zur Migration an die Mikrokapseloberfläche durch die verkapselten MSC eine postulierte Optimierung des implantierbaren Werkstoffs. Das Erreichen einer steigenden Verträglichkeit der Stammzellen gegenüber der Verkapselung substantiiert die Eignung hybrider Hydrogel-Kapseln und qualifiziert für eine konsequente in-vivo Testung.

In Anbetracht der kontinuierlichen myokardialen Kontraktion ist eine suffiziente mechanische Stabilität der Mikrokapseln und eine Resistenz gegenüber einer Dislokation vom Zielgewebe zu eruieren. Daneben bedarf der Erhalt zellulärer Viabilität und die Ermöglichung einer MSC-Evasion aus der Verkapselung sowie die Biodegradation des GMA-Gelatine-basierten Hydrogels einer Klärung.

Vor einer Translation in den lebenden Organismus wäre eine Optimierung des vorgestellten Zellverkapselungsprozesses hilfreich, um den erheblichen Einschränkungen des Verfahrens zu begegnen. Alternativen zu der eingesetzten Emulsions-Technik werden erforscht, die eine konstante Form und Größe der produzierten Mikrokapseln garantieren sowie eine Kontrolle über die Mikrostruktur der polymeren Mikrosphären gewährleisten. Mit einer gezielten Überwachung der mikrokapsulären Zusammensetzung und des Polymerisationsgrades werden verschiedene Biomaterialeigenschaften gegenüber einer präzisen Regulierung verfügbar. Die Viskoelastizität, Gelierfähigkeit, Quellbarkeit und Morphologie des implantierbaren Werkstoffs könnten exakt bestimmt und an die gestellten Anforderungen einer zellulären Mikroverkapselung adaptiert werden. Dank dem photochemisch-induzierten Gelieren der GMA-Gelatine erschließen sich diverse Verfahrensmethoden zur Herstellung von Zell-beladenen Mikrokapseln. Die mikrofluidische Verkapselungs-Technologie sticht aufgrund der Verwendung flüssigkeitsgefüllter Mikrokanäle heraus, durch die nichtmischbare Fluide geleitet und somit Sequenzen von Tropfen erzeugt werden. Über die regulierbare Strömung der kleinvolumigen Flüssigkeiten ist eine homogene Dispersion herzustellen und eine exakte Steuerung der Form und Größe resultierender Tropfen möglich. Aus der GMA-Gelatine-Lösung wären sphärische Partikel beim Fluss durch eine Ölphase formbar, die nach anschließender UV-Licht-Exposition Hydrogel-basierte Mikrokapseln ergeben würden. Die konstanten Produktionsbedingungen sorgen für eine hohe Reproduzierbarkeit und eine Kontinuität der mikrokapsulären Charakteristika. Demzufolge gestattet die Tropfen-basierte Mikrofluidik eine serielle Produktion von Mikrokapsel mit kontrollierbaren Eigenschaften, die flexibel an geforderte Voraussetzungen für eine erfolgreiche MSC-Verkapselung zu adaptieren sind.^{63,106}

5.4. Verkapselte MSC-Sekretion

Post-Stammzell-Verkapselung in 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden war eine konservierte MSC-Sekretion von Signalmolekülen vorzuweisen. Das durchgeführte Enzymimmunoassay belegte die Freisetzung einer Vielzahl von Zytokinen sowohl durch nicht verkapselte MSC als auch durch Stammzellen eingeschlossen in hybride Hydrogel-Kapseln. Proangiogenetische Faktoren wie Angiogenin, Endoglin sowie die Chemokine MCP-1 und SDF-1 waren dem Sekretionsprofil inbegriffen. Des Weiteren waren der anti-apoptotisch wirkende Rezeptor uPAR und der Zellproliferation-induzierende Wachstumsfaktor FGF im MSC-CM nachweislich. Immunmodulatorische Zytokine waren ebenfalls detektierbar, darunter die Interleukine IL-6, IL-8 und IL-11. Das Sekretom nicht verkapselter Stammzellen stimmte in der Variationsbreite sezernierter Zytokine mit dem Sekretionsspektrum des CM nach MSC-Mikroverkapselung größtenteils überein. Nur geringe Divergenzen im Profil freigesetzter Signalmoleküle waren zwischen den unterschiedlichen CM-Proben zu eruieren.

Das eingesetzte Enzym-gesteuerte Immunoassay gewährt die Evaluation einer großen Anzahl humaner Zytokine, ausgeschlossen sind Signalmoleküle wie Faktor H, IGF-1, TGF- β 1 und HGF, denen jedoch eine

Sekretion durch MSC nachgesagt wird. Weitere Testverfahren sind sonach obligat, um das gesamte MSC-Sekretom in den CM-Proben zu erfassen. Zum Sekretionsprofil der Stammzellen zählende Exosomen und Mikrovesikel werden gleichfalls nicht durch das Zytokine-Array abgebildet und entgehen einem Nachweis im hergestellten CM. Dennoch war die Freisetzung zahlreicher Signalmoleküle zu identifizieren und folglich von einer hohen Zytoverträglichkeit des verwendeten Biomaterials sowie einer Kontinuität zellulärer Funktionalität nach der Verkapselung in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel auszugehen. Auf eine Potenzierung der Funktionsfähigkeit konnte hingegen nicht geschlossen werden, da keine signifikanten Unterschiede weder in der qualitativen noch in der quantitativen Analyse des MSC-Sekretoms zwischen den nicht verkapselten und den verkapselten Stammzellen zu deduzieren waren.

Zur Mikroverkapselung herangezogenes Biomaterial übt eine wesentliche Modulation der Zellfunktionalität aus, wobei die gewählten Materialeigenschaften diverse Stammzell-Charakteristika zu beeinflussen vermögen. Die Steifheit des verwendeten Hydrogels determiniert die Differenzierung verkapselter Stammzellen. Mit steigender Rigidität des implantierbaren Werkstoffs nehmen verkapselte MSC vornehmlich einen osteoblastären Phänotyp an und weisen entsprechend eine spezifische sekretorische Aktivität auf. Auch die Degradation sowie die resultierenden Abbauprodukte der verwendeten Biopolymere modifizieren das zelluläre Verhalten und nehmen Einfluss auf die Stammzellendifferenzierung. Um eine Konservierung der Fähigkeit zur Multipotenz länger zu erhalten sowie ein breites Spektrum an freigesetzten Zytokinen zu gewähren, sollte demnach ein geringer biomaterieller Steifheitsgrad erstrebt werden.¹⁰⁷ Angesichts der hohen Übereinstimmung im MSC-Sekretom zwischen den verkapselten Stammzellen und den MSC kultiviert unter Monolayer-Bedingungen, sind vorteilhafte mechano-elastische Eigenschaften des produzierten Hydrogels aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit DxS-Zusatz zu erwarten. Das Biomaterial scheint kaum mit der zellulären Funktionsfähigkeit zu interferieren und sich nachteilig auf die parakrine Aktivität auszuwirken sowie keine Induktion der MSC-Differenzierung hervorzurufen. Im Gegenteil wiesen verkapselte AD-SC sogar die höchste Variation an sezernierten Zytokinen aller CM-Proben auf, jedoch ohne einen signifikanten zum CM nicht verkapselter Stammzellen aufzuzeigen.

Unter Monolayer-Zellkultur-Bedingungen bieten MSC ein Spektrum an sezernierten Zytokinen. In Abwesenheit einer artifiziellen Stimulation liegt ein konstitutiv exprimiertes MSC-Sekretom vor, das sich im CM der Stammzellen widerspiegelt. Zur Konditionierung von Zellkulturmedium kultivierten Chang et al. MSC der Passage p³ in T75 Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80%. Im Anschluss an das Waschen mit PBS und einer 1-tägigen Inkubation in Serum-freiem DMEM erfolgte die Analyse des basalen MSC-Sekretionsprofils unter in-vitro Bedingungen mittels Proteome Profile™ Human XL Cytokine Array Kit. Eine kontinuierliche Freisetzung von MCP-1, Endoglin, Angiogenin und uPAR konnte dokumentiert werden. Darüber hinaus war eine Expression des Wachstumsfaktors EGF ersichtlich. Ferner wurde eine ausgeprägte Serpin E1-Konzentration im CM vorgefunden.¹⁰⁸ Die präsentierten Ergebnisse kongruieren mit den erzielten Resultaten der Sekretionsprofilanalyse des hergestellten Mediums nach zellulärer Konditionierung. Das Spektrum sezernierter Zytokine ist mehrheitlich identisch mit dem vorgefundenen Sekretom nicht verkapselter MSC sowie der Stammzellen nach Mikroverkapselung. Allein die EGF-Freisetzung war in den untersuchten CM-Proben nicht nachzuvollziehen.

In Abhängigkeit von der Inkubationsdauer ließ sich eine Heterogenität der parakrinen Aktivität kultivierter Stammzellen konstatieren. Chang et al. erkannten bei der Analyse des MSC-CM Differenzen der

Signal-molekülsekretion im zeitlichen Verlauf, wobei 24 Stunden lang konditioniertes DMEM die höchsten Konzentrationen an Zytokinen bot.¹⁰⁸ Für die produzierten CM-Proben liegt lediglich eine Auswertung des Profils freigesetzter Faktoren vor, die auf einer Stammzellkultivierung über einen Zeitraum von einem Tag gründet. Ein etwaiger Vorteil der Mikroverkapselung gegenüber der in-vitro Kultivierung von MSC unter Monolayer-Bedingungen in Bezug auf Zellfunktion und sekretorischem Potential könnte erst nach einer Inkubationszeit von über 1 Tag demaskiert werden. Entsprechend ist eine mögliche Potenzierung oder ein Erhalt zellulärer Funktionsfähigkeit durch die Verkapselung der MSC in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel nach längerer Inkubation nicht auszuschließen und bedarf einer weiteren Untersuchung.

Die nachgewiesene Verbesserung der myokardialen Funktion nach MSC-Transfer wird hauptsächlich der parakrinen Wirkung sezernierter Zytokine zugeschrieben. Durch die alleinige Applikation von Stammzell-CM ist eine Stimulation der myokardialen Gewebeheilung und -regeneration zu erzielen. Ein azellulärer Ansatz der MSC-basierten Therapie gestaltet sich kostengünstig und bringt den Vorteil einer unmittelbaren Verfügbarkeit. Aufwendige Isolations- und Expansionsprozesse der Stammzellen werden umgangen, gleichfalls sind immunologische Abstoßungsreaktionen nicht zu erwarten. Jedoch weisen die freigesetzten Signalmoleküle eine kurze Halbwertszeit auf, sodass eine limitierte Bioaktivität vorliegt. Um das Containment negativer Remodellierung post-AMI zu gewähren, ist eine prolongierte Exposition gegenüber den favorablen Signalmolekülen notwendig. Darüber hinaus involviert die Applikation vitaler MSC eine Dynamik des Sekretoms, adaptiert an die unterschiedlichen regenerativen Phasen nach akuter Ischämie des Myokardgewebes. Die Sicherung der sekretorischen Aktivität und der Stimulationsfähigkeit verkapselter Stammzellen ist daher essentiell. Das zelluläre Reaktionsvermögen auf eine externe Stimulation sowie die Interaktion der MSC mit der Mikroumgebung ungeachtet einer Verkapselung in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel erscheint fundamental. Die Stammzell-vermittelte Immunmodulation kann durch zirkulierende oder im lokalen Milieu vorliegende Signalmoleküle induziert werden. Ebenso führt eine vorherrschende Hypoxie zur verstärkten Freisetzung anti-apoptotischer sowie zytoprotektiver Zytokine.⁷³ Das ischämische Myokardgewebe evoziert eine stimulatorische Wirkung auf die transplantierten MSC und moduliert die parakrine Stammzell-Aktivität. Wenngleich die MSC im Inneren einer Mikrokapsel lokalisiert sind, muss eine Kommunikation mit der Mikroumgebung gestattet und ein therapeutischer Effekt auf das Zielgewebe zu erwirken sein.

Barminko et al. konnten nach einer Verkapselung in Alginat-basiertem Hydrogel eine erhaltene MSC-Sekretion von Zytokinen dokumentieren. Das CM der verkapselten Stammzellen zeigte ein vergleichbares Sekretionsprofil mit dem Zellkulturmedium, das eine Konditionierung durch MSC-Monolayer-Kultur erfuhr. Konstitutiv freigesetzte Signalmoleküle waren auch im 3-wöchigen Follow-up nachweisbar und offenbarten keinen Unterschied zu der basalen MSC-Sekretion ohne Mikroverkapselung. Unter Stimulation der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ wurde eine gesteigerte MSC-Freisetzung notiert, wobei vor allem die VEGF-, IL-6- und MCP-1-Konzentrationen einen deutlichen Anstieg verzeichneten. Ein Erhalt der zellulären Reaktionsfähigkeit auf externe Reize nach einer Verkapselung in Hydrogel-Kapseln war vernehmbar. Überdies fiel die induzierte Zunahme der sekretorischen MSC-Aktivität post-Verkapselung signifikant höher aus, sodass von einer Potenzierung durch die Hydrogel-Kapseln auszugehen ist.¹⁰⁹

Die Evaluation einer konservierten Reaktivität auf äußere Stimuli der Stammzellen nach Mikroverkapselung in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel ist ausstehend und erfordert eine ausführliche Analyse, um die

Eignung des Biomaterials sowie eine potentielle Anwendung in einem Stammzell-basierten Behandlungsverfahren beurteilen zu können.

5.5. Angiogenese-Induktion nach MSC-Verkapselung

Der Erhalt einer proangiogenetischen Wirkung verkapselter MSC lies sich im durchgeführten Spheroid Sprouting Assay substantizieren. Nach Mikroverkapselung der Stammzellen wurde ein in-vitro ausgeübter Einfluss auf die Angiogenese vorgefunden, wobei eine Stimulation der HUVEC zur Ausbildung zellulärer Aussprossungen ausgehend vom MSC-CM zu erkennen war. Eine Überlegenheit des CM gegenüber dem zellfreien Medium war auf die eintägige Konditionierung zurückzuführen und brachte die sekretorische Stammzell-Aktivität zum Ausdruck. Jedoch erlangte die vorgefundene Superiorität des CM keine statistische Signifikanz im Vergleich zum Medium ohne zelluläre Konditionierung. Eine größere Probenanzahl müsste gegebenenfalls untersucht werden, um einen signifikanten Unterschied zu enthüllen. Die Analyse des MSC-Sekretoms offenbarte bereits die Freisetzung proangiogenetischer Zytokine, die zum konstitutiven Sekretionsprofil der Stammzellen zählen und nach einer Verkapselung der MSC in 10 wt% AC GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel mit DxS-Zugabe weiterhin exprimiert werden. Demnach ist auf eine Konservierung der zellulären Funktionalität post-Verkapselung zu schließen und eine therapeutisch wirksame Sekretion von Signalmolekülen mit konsekutiver Induktion der Neovaskularisation anzunehmen. Die hybriden Hydrogel-Kapseln boten eine geringe Interferenz der parakrinen Aktivität eingeschlossener MSC, sodass sich kein merklicher Unterschied zwischen dem proangiogenetischen Effekt des CM verkapselter sowie nicht verkapselter Stammzellen bestand. Sowohl in der Anzahl als auch in der Länge ausgebildeter HUVEC-Sprouts waren lediglich geringe Divergenzen zwischen den unterschiedlichen CM-Proben zu detektieren. Eine Potenzierung der sekretorischen Stammzellfunktion durch die Verwendung des Biomaterials war nicht abzuleiten.

Unter Monolayer-Zellkultur-Bedingungen zeigen MSC eine proangiogenetische Wirkung, die sich auf freigesetzte Zytokine zurückführen lässt. Um die Angiogenese-Induktion des basalen Sekretoms der Stammzellen zu untersuchen, stellten Timmers et al. MSC-CM her. Über einen Zeitraum von 3 Tagen erfolgte die Konditionierung von Serum-freiem DMEM unter in-vitro-Bedingungen. Anschließend wurde das abpipettierte Medium einer Ultrafiltration zur Konzentrierung unterzogen sowie eine Sterilisation mittels 220-nm-Filter durchgeführt. In sphäroider Zellkultur vorliegende HUVEC wurden in eine Kollagen-Methylcellulose-Matrix eingebettet und dem MSC-CM exponiert. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit wurden Aufnahmen der Sphäroide angefertigt und die Anzahl sowie Länge der entstandenen endothelialen Sprouts evaluiert. Das Angiogenese-Assay belegte eine gesteigerte Ausbildung von zellulären Aussprossungen der Endothelzellen durch eine Inkubation in dem MSC-CM. Die durchschnittliche Sproutlänge manifestierte hingegen keinen Unterschied im Vergleich zu einer Kultivierung der eingebetteten HUVEC-Sphäroide in unkonditioniertem Medium. Dennoch waren die gebildeten Sprouts durch eine höhere Gesamtlänge gekennzeichnet, infolge einer Exposition gegenüber dem Stammzell-CM.¹¹⁰ Die Applikation des MSC-CM inklusive der konstitutiv sezernierten Signalmoleküle demaskierte einen in-vitro bestehenden proangiogenetischen Effekt auf die Endothelzellen, der bei der Untersuchung des hergestellten Mediums nach Konditionierung durch verkapselte sowie nicht verkapselte Stammzellen Bestätigung fand. Die Anzahl

der HUVEC-Sprouts und die mittlere Gesamtlänge waren gleichermaßen erhöht unter Einfluss des MSC-CM vergleichend mit dem zellfreien unkonditionierten Medium.

Eke et al. untersuchten im Hühnerembryonen-Aortenbogen-Assay in GMA-Gelatine eingebettete MSC auf eine angiogenetische Wirkung hin. Bei der simultanen Kultivierung embryonaler Aortenbogenringe mit den zellularen Scaffolds konnte ein verstärktes Sprouting der Endothelzellen identifiziert werden.

Vergleichend mit der Ko-Kultur von Hydrogel ohne Stammzellen, wurde die Ausbildung merklich längerer Aussprossungen unter Einbettung von MSC beobachtet. Nur der Hydrogel-Zusatz von VEGF war mit einer noch größeren Länge tubulärer Strukturen und erhöhten Dichte neugebildeter Blutgefäße assoziiert.

Infolgedessen war von einer erhaltenen proangiogenetischen Wirkung der in GMA-Gelatine eingebetteten MSC auszugehen.¹¹² Die präsentierten Ergebnisse stehen im Einklang mit den erzielten Resultaten der Analyse des Potenzials zur Stimulation von einer Gefäßneubildung durch das hergestellte Medium nach zellulärer Konditionierung. Die Freisetzung proangiogenetisch wirkender Signalmoleküle scheint trotz Verkapselung in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel beständig zu sein und in-vitro eine Angiogenese-Induktion herbeizuführen. Eine Verstärkung der Neovaskularisation durch die zusätzliche Biomaterial-Applikation ist jedoch nicht nachweislich.

5.6. Abhängigkeit des Therapieeffekts vom MSC-Ursprungsgewebe

Für eine erfolgreiche Etablierung Stammzell-basierter Therapieverfahren ist die Wahl der MSC-Population mit dem günstigsten Charakteristika-Profil erforderlich. Die präzise Evaluation und Gegenüberstellung Therapie-relevanter Eigenschaften der sich unterscheidenden Stammzellen ist notwendig, um die Ausgangsgewebeart für die Isolation der MSC mit dem größten therapeutischen Nutzen zu identifizieren und eine Optimierung der Stammzell-basierten Behandlung zu erreichen. Dafür werden vergleichende sowohl präklinische als auch klinische Studien benötigt, die derzeit nur im geringen Umfang zur Verfügung stehen. .. In der vorliegenden Arbeit wurde ein systematischer Vergleich zwischen BM-MS, CB-MS und AD-SC in Bezug auf die Stammzell-Biomaterial-Interaktion und das Sekretom sowie die proangiogenetische Wirkung verkapselter MSC vorgenommen. Nur minimale Differenzen in der Auswirkung einer Verkapselung in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel auf die zelluläre Viabilität und Funktionalität ließen sich zwischen MSC unterschiedlicher Ursprungsgewebe nachvollziehen. Vergleichbare Werte für die Anzahl vitaler Zellen sowie die mittlere Zellmasse in Hydrogel-Kapseln aus 10 wt% AC GMA-Gelatine mit supplementiertem DxS und 30-sekündiger beziehungsweise 1-minütiger Expositionszeit gegenüber dem UV-Licht eingeschlossener Stammzellen waren zu detektieren. Des Weiteren wurde ungeachtet des ursprünglichen Grundgewebes ein ähnliches MSC-Sekretionsprofil von Zytokinen dokumentiert, sodass kaum Divergenzen in der parakrinen Aktivität zwischen den verkapselten Stammzellen anzunehmen waren. Auch der proangiogenetische Effekt der CM-Proben verschiedener MSC-Populationen nach Mikroverkapselung zeigte eine hohe Übereinstimmung. Die präsentierten Ergebnisse erlauben nicht die Überlegenheit einer Stammzelllinie zu belegen, jedoch ist die allgemeine Eignung und potentielle Anwendung des hergestellten Biomaterials in einem MSC-basierten Behandlungsverfahren festzuhalten. Das produzierte Hydrogel auf GMA-Gelatine-Basis offenbart einen vorteilhaften Materialcharakter, der für die Verkapselung diverser Stammzellen geeignet scheint.

Neben der Erforschung weiterer MSC-Populationen wäre die kombinierte Applikation unterschiedlicher Stammzelltypen mit synergistischer Wirkung und sich ergänzenden Funktionen und Eigenschaften denkbar. Eine gleichzeitige Mikroverkapselung verschiedenartiger Stammzellen oder eine Kombination aus MSC und anderen Zellarten eingeschlossen in Hydrogel-Kapseln könnte eine Optimierung herbeiführen und lässt eine Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit erhoffen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In Anbetracht inkonsistenter Ergebnisse klinischer Studien zur Stammzelltherapie beim AMI und einer bislang ausstehenden Etablierung in der klinischen Praxis, wird der Einsatz von Biomaterial zur Verfahrensoptimierung diskutiert. Das reduzierte zelluläre Engraftment und Überleben nach Transplantation der Stammzellen in das infarzierte Myokardgewebe limitierten vornehmlich den zu beobachtenden Behandlungserfolg und lassen die neuartige therapeutische Option den erwarteten Prognoseverbesserung nicht gerecht werden. Trotz eines unbestreitbaren therapeutischen Potentials erscheint die ausschließliche Applikation von Stammzellen post-AMI nicht zielführend und verlangt eine zusätzliche Anwendung von implantierbaren Werkstoffen. Mit dem entwickelten Biomaterial wird eine Imitation der natürlichen Extrazellulärmatrix angestrebt sowie der lokale Verbleib transplanteder Stammzellen im Zielgewebe erhofft. Das Einschließen der Stammzellen in Hydrogel-Kapseln im Mikrometer-Bereich verspricht den Einschränkungen des gegenwärtig verfolgten alleinigen Transfers von Stammzellen Abhilfe zu verschaffen und eine Integration in die Klinik zu ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wird ein zelluläres Verkapselungsverfahren in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel präsentiert, die Entwicklung hybrider Mikrokapseln mit DxS-Supplementation dargelegt und systematisch die Stammzell-Biomaterial-Interaktion evaluiert. Unter den untersuchten GMA-Gelatine-Konditionen hob sich 10 wt% AC GMA-Gelatine und eine 30-sekündige UV-Licht-Expositionszeit durch optimale Volumen- und Elastizitätseigenschaften resultierender Hydrogel-Kapseln hervor. Das Autoklavieren der 10 wt% GMA-Gelatine ergab ideale Biomaterial-Charakteristika, die mit einer hohen Zytoverträglichkeit produzierter Mikrokapseln assoziiert wurden. Zudem war eine Migration der Zellen vom Kapselinneren an die sphärische Kapseloberfläche zu identifizieren. Eine Zugabe von DxS steigerte ferner die zelluläre Verträglichkeit der hergestellten Hydrogel-Kapseln. Die explorierten Stammzellen erzielten eine maximale Zellviabilität bei Verkapselung in 10 wt% AC GMA-Gelatine mit zugesetztem DxS und einer UV-Licht-Expositionszeit von 30 Sekunden. Ebenfalls war im Follow-up die Annahme einer spindelförmigen Zellmorphologie sowie eine Konzentration der MSC an der Oberfläche der Mikrokapseln zu vernehmen. Die beobachtete Interaktion der verkapselten Zellen mit der umgebenden Matrix gewährleistet das zelluläre Überleben und fördert die Zellmobilität, sodass eine potentielle Infiltration und Integration in das umliegende Myokardgewebe nach Stammzell-Transfer ermöglicht wird. Trotz einer Verkapselung der MSC in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel blieb die parakrine Aktivität der Stammzellen erhalten und eine konservierte Freisetzung des basalen Sekretoms war zu vernehmen. Ein Unterschied im Sekretionsprofil exprimierter Zytokine zwischen nicht verkapselten und verkapselten MSC war demzufolge nicht zu belegen. Ferner war die Sekretion von proangiogenetisch wirksamen Signalmolekülen zu belegen und zeigte eine in-vitro Potenzierung des Sproutings von Endothelzellen. Im Gegensatz zum zellfreien Medium ergab sich eine deutliche Verbesserung der Angiogenese-Induktion durch den Zusatz von DMEM, konditioniert durch nicht verkapselte sowie in Hydrogel-Kapseln eingeschlossene Stammzellen. Ein signifikanter Unterschied war jedoch nicht nachweislich. Zwischen den unterschiedlichen MSC-Populationen wurden keine beachtlichen Differenzen in der Interaktion mit dem verwendeten Biopolymer sowie in der zellulären Funktionalität post-Verkapselung vorgefunden. Die bestimmte zelluläre Viabilität, mittlere Zellmasse sowie das untersuchte Zytokinspektrum

und der HUVEC-Sprouting-induzierende Effekt waren größtenteils identisch unabhängig vom ursprünglichen Grundgewebe der Stammzellen.

Zusammenfassend befähigt das hergestellte Biomaterial zur Produktion von MSC-beladenen Hydrogel-Kapseln mit hoher Zellviabilität und konservierter zellulärer Funktionsfähigkeit. Die Transplantation von verkapselten Stammzellen in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel mit DxS-Zusatz stellt einen multidimensionalen therapeutischen Ansatz in Aussicht, mit dem eine negative myokardiale Remodellierung post-AMI abzuwenden und die Progression einer Myokard-Dysfunktion entgegenzuwirken wäre. Um den erfolgreichen Einsatz der vorgestellten Mikrokapseln zu realisieren, ist jedoch ein alternativer Zellverkapselungsprozess gesucht, der eine effiziente und zuverlässige Verkapselung von MSC in Hydrogel-Kapseln mit standardisierten Dimensionen und Biomaterial-Zusammensetzung gewährt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J* 2016;37(42):3232-45.
- ² Hartley A, Marshall DC, Saliccioli JD, Sikkell MB, Maruthappu M, Shalhoub J. Trends in mortality from ischemic heart disease and cerebrovascular disease in Europe: 1980 to 2009. *Circulation* 2016;133(20):1916-26.
- ³ Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N (2017). *European Cardiovascular Disease Statistics 2017*. European Heart Network, Brussels.
- ⁴ Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Katus HA, Apple FS, Lindahl B, Morrow DA, Chaitman BA, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H, Underwood R, Bax JJ, Bonow RO, Pinto F, Gibbons RJ, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW, Uretsky BF, Steg PG, Wijns W, Bassand JP, Menasché P, Ravkilde J, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Simoons ML, Januzzi JL, Nieminen MS, Gheorghiade M, Filippatos G, Luepker RV, Fortmann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon JL, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012;33(20):2551-67.
- ⁵ Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2018;39(2):119-77.
- ⁶ Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, Bugiardini R, Crea F, Cuisset T, Di Mario C, Ferreira JR, Gersh BJ, Gitt AK, Hulot JS, Marx N, Opie LH, Pfisterer M, Prescott E, Ruschitzka F, Sabaté M, Senior R, Taggart DP, van der Wall EE, Vrints CJ; ESC Committee for Practice Guidelines, Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S; Document Reviewers, Knuuti J, Valgimigli M, Bueno H, Claeys MJ, Donner-Banzhoff N, Erol C, Frank H, Funck-Brentano C, Gaemperli O, Gonzalez-Juanatey JR, HAMILIOS M, Hasdai D, Husted S, James SK, Kervinen K, Kolh P, Kristensen SD, Lancellotti P, Maggioni AP, Piepoli MF, Pries AR, Romeo F, Rydén L, Simoons ML, Sirnes PA, Steg PG, Timmis A, Wijns W, Windecker S, Yildirir A, Zamorano JL. 2013 ESC Guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2013;34(38):2949-3003.
- ⁷ Wu X, He L, Chen F, He X, Cai Y, Zhang G, Yi Q, He M, Luo J. Impaired autophagy contributes to adverse cardiac remodeling in acute myocardial infarction. *PLoS One* 2014;9(11):e112891.
- ⁸ Sutton NR, Li S, Thomas L, Wang TY, de Lemos JA, Enriquez JR, Shah RU, Fonarow GC. The association of left ventricular ejection fraction with clinical outcomes after myocardial infarction: Findings from the

- Acute Coronary Treatment and Intervention Outcomes Network (ACTION) Registry-Get With the Guidelines (GWTG) Medicare-linked database. *AM Heart J* 2016;178:65-73.
- ⁹ Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges. *Eur Heart J* 2011;32(10):1197-206.
- ¹⁰ Ward MR, Abadeh A, Connelly KA. Concise Review: Rational Use of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Ischemic Heart Disease. *Stem Cells Trans Med* 2018;
- ¹¹ Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res* 2013;113(6):810-34.
- ¹² Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12(2):126-31.
- ¹³ Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res* 2011;109(8):923-40.
- ¹⁴ Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004;8:301-316.
- ¹⁵ Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
- ¹⁶ Smith JR, Pochampally R, Perry A, Hsu SC, Prockop DJ. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells* 2004;22(5):823-31
- ¹⁷ Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(7):3213-8.
- ¹⁸ Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(14):7841-5.
- ¹⁹ DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999;107(2):275-81.
- ²⁰ Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B, Dufour J, Bunnell BA. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008;68(11):4229-38.
- ²¹ Pevsner-Fischer M, Levin S, Zipori D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Rev* 2011;7(3):560-8.
- ²² English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2013;91(1):19-26.
- ²³ Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010;5(4):e10088.
- ²⁴ Opitz CA, Litzemberger UM, Lutz C, Lanz TV, Tritschler I, Köppel A, Tolosa E, Hoberg M, Anderl J, Aicher WK, Weller M, Wick W, Platten M. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem Cells* 2009;27(4):909-19.

- 25 Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99(10):3838-43.
- 26 Cutler AJ, Limbani V, Girdlestone J, Navarrete CV. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell proliferation. *J Immunol* 2010;185(11):6617-23.
- 27 Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 2008;26(1):151-62.
- 28 Tu Z, Li Q, Bu H, Lin F. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells Dev* 2010;19(11):1803-9.
- 29 Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C, Shi Y. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 2010;184(5):2321-8.
- 30 Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24(2):386-98.
- 31 Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004;109(12):1543-9.
- 32 Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998;101(1):40-50.
- 33 Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94(5):678-85.
- 34 Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Epstein SE. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res* 2004;95(4):354-63.
- 35 Brindle NP, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res* 2006;98(8):1014-23.
- 36 Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292(5):F1626-35.
- 37 Haider HKh, Jiang S, Idris NM, Ashraf M. IGF-1-overexpressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1alpha/CXCR4 signaling to promote myocardial repair. *Circ Res* 2008;103(11):1300-8.
- 38 Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Hiraoka K, Yamasaki K, Hashiya N, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Angiogenesis and antifibrotic action by hepatocyte growth factor in cardiomyopathy. *Hypertension* 2002;40(1):47-53.
- 39 Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004;109(10):1292-8.

- 40 Yu B, Gong M, Wang Y, Millard RW, Pasha Z, Yang Y, Ashraf M, Xu M. Cardiomyocyte protection by GATA-4 gene engineered mesenchymal stem cells is partially mediated by translocation of miR-221 in microvesicles. *PLoS One* 2013;8(8):e73304.
- 41 Yu B, Kim HW, Gong M, Wang J, Millard RW, Wang Y, Ashraf M, Xu M. Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection. *Int J Cardiol* 2015;182:349-60.
- 42 Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 2011;9:12.
- 43 Kuhbier JW, Weyand B, Radtke C, Vogt PM, Kasper C, Reimers K. Isolation, Characterization, Differentiation, and Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2010;123:55-105.
- 44 Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, Igura K, Satoh H, Yokomi I, Nishimura T, Yamaguchi S, Yoshimura K, Rubinstein P, Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2011;112(4):1206-18.
- 45 Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006;24(5):1294-301.
- 46 Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Kim SW, Yang YS, Oh W, Chang JW. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. *Int J Mol Sci* 2013;14(9):17986-8001.
- 47 Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med* 2016;37(1):115-25.
- 48 Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 1999;75(3):424-36.
- 49 Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansoerge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005;33(11):1402-16.
- 50 Mattar P, Bieback K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Front Immunol* 2015;6:560.
- 51 Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005;129(1):118-29.
- 52 Castro-Manrreza ME, Mayani H, Monroy-García A, Flores-Figueroa E, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet V, Santiago-Osorio E, Montesinos JJ. Human Mesenchymal Stromal Cells from Adult and Neonatal Sources: A Comparative In Vitro Analysis of Their Immunosuppressive Properties Against T Cells. *Stem Cells Dev* 2014;23(11):1217-32.

- 53 Olabisi RM. Cell microencapsulation with synthetic polymers. *J Biomed Mater Res A* 2015;103(2): 846-59.
- 54 Gasperini L, Mano JF, Reis RL. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J R Soc Interface* 2014;11(100):20140817.
- 55 Nicodemus GD, Bryant SJ. Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14(2):149-65.
- 56 Rabanel JM, Banquy X, Zouaoui H, Mokhtar M, Hildgen P. Progress technology in microencapsulation methods for cell therapy. *Biotechnol Prog* 2009;25(4):946-63.
- 57 Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *J Adv Res* 2015;6(2):105-21.
- 58 Chen X, Jia Y, Feng L, Li X, Sun S, An L. Numerical simulation of coil–helix transition processes of gelatin. *Polymer* 2009;50(9):2181-89.
- 59 Chen X, Jia Y, Sun S, Feng L, An L. Performance inhomogeneity of gelatin during gelation process. *Polymer* 2009;50(25):6186-91.
- 60 Van Den Bulcke AI, Bogdanov B, De Rooze N, Schacht EH, Cornelissen M, Berghmans H. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* 2000;1(1): 31-8.
- 61 Klotz BJ, Gawlitta D, Rosenberg AJWP, Malda J, Melchels FPW. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends Biotechnol* 2016;34(5):394-407.
- 62 Nichol JW, Koshy S, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* 2010;31(21):5536-44.
- 63 Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* 2015;73:254-71.
- 64 Mehvar R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *J Control Release* 2000;69(1):1-25.
- 65 Huang M, Vitharana SN, Peek LJ, Coop T, Berkland C. Polyelectrolyte complexes stabilize and controllably release vascular endothelial growth factor. *Biomacromolecules* 2007;8(5):1607-14.
- 66 Khalikova E, Susi P, Korpela T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;69(2):306-25.
- 67 Bubnis WA, Ofner CM 3rd. The determination of epsilon-amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal Biochem* 1992;207(1):129-33.
- 68 Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, Wang TJ, Parikh NI, D'Agostino RB, Levy D, Kannel WB, Vasan RS. Long-Term Trends in the Incidence of Heart Failure after Myocardial Infarction. *Circulation* 2008;118(20):2057-62.
- 69 Tompkins BA, Balkan W, Winkler J, Gyöngyösi M, Goliash G, Fernández-Avilés F, Hare JM. Preclinical Studies of Stem Cell Therapy for Heart Disease. *Circ Res* 2018;122(7):1006-1020.
- 70 Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999;100(19 Suppl):II247-56.

- 71 Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, Mazhari R, Boyle AJ, Zambrano JP, Rodriguez JE, Dulce R, Pattany PM, Valdes D, Revilla C, Heldman AW, McNiece I, Hare JM. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res* 2010;107(7):913–22.
- 72 Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JJ, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428(6983):664-8.
- 73 Gneocchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005;11(4):367-8.
- 74 Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell* 2012;10(3):244-58.
- 75 Lim SY, Kim YS, Ahn Y, Jeong MH, Hong MH, Joo SY, Nam KI, Cho JG, Kang PM, Park JC. The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt in a porcine myocardial infarction model. *Cardiovasc Res* 2006;70(3):530–42.
- 76 Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008;103(11):1204-19.
- 77 Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112(8):1128–35.
- 78 Xu X, Xu Z, Xu Y, Cui G. Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats. *Coron Artery Dis* 2005;16(4):245-55.
- 79 Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett* 2007;581(21):3961-6.
- 80 Feygin J, Mansoor A, Eckman P, Swingen C, Zhang J. Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293(3):H1772-80.
- 81 Gneocchi M, He H, Melo LG, Noiseux N, Morello F, de Boer RA, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ, Ingwall JS. Early beneficial effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing Akt on cardiac metabolism after myocardial infarction. *Stem Cells*. 2009;27(4):971-9.
- 82 Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(2):H886-93.
- 83 Engels MC, Rajarajan K, Feistritzer R, Sharma A, Nielsen UB, Schalij MJ, de Vries AA, Pijnappels DA, Wu SM. Insulin-like growth factor promotes cardiac lineage induction in vitro by selective expansion of early mesoderm. *Stem Cells* 2014;32(6):1493-502.
- 84 Hodgkinson CP, Bareja A, Gomez JA, Dzau VJ. Emerging Concepts in Paracrine Mechanisms in Regenerative Cardiovascular Medicine and Biology. *Circ Res* 2016;118(1):95-107.
- 85 Nguyen PK, Rhee JW, Wu JC. Adult Stem Cell Therapy and Heart Failure, 2000 to 2016: A Systematic Review. *JAMA Cardiol* 2016;1(7):831-841.

- 86 Fisher SA, Zhang H, Doree C, Mathur A, Martin-Rendon E. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;(9):CD006536.
- 88 Gao LR, Chen Y, Zhang NK, Yang XL, Liu HL, Wang ZG, Yan XY, Wang Y, Zhu ZM, Li TC, Wang LH, Chen HY, Chen YD, Huang CL, Qu P, Yao C, Wang B, Chen GH, Wang ZM, Xu ZY, Bai J, Lu D, Shen YH, Guo F, Liu MY, Yang Y, Ding YC, Yang Y, Tian HT, Ding QA, Li LN, Yang XC, Hu X. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Med* 2015;13:162.
- 87 Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, Springeling T, de Jong R, van Geuns RJ, Geleijnse ML, Fernandez-Aviles F, Zijlstra F, Serruys PW, Duckers HJ. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012;59(5):539-40.
- 89 Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH, Drexler H. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005;111(17):2198-202. Ji ST, Kim H, Yun J, Chung JS, Kwon SM. Promising Therapeutic Strategies for Mesenchymal Stem Cell-Based Cardiovascular Regeneration: From Cell Priming to Tissue Engineering. *Stem Cells Int* 2017;2017:3945403.
- 90 Li L, Chen X, Wang WE, Zeng C. How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart? *Stem Cells Int* 2016; 2016:9682757.
- 91 Lemcke H, Voronina N, Steinhoff G, David R. Recent Progress in Stem Cell Modification for Cardiac Regeneration. *Stem Cells Int* 2018;2018:1909346.
- 92 Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang JA, Wei L. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135(4):799-808.
- 93 Wang WE, Yang D, Li L, Wang W, Peng Y, Chen C, Chen P, Xia X, Wang H, Jiang J, Liao Q, Li Y, Xie G, Huang H, Guo Y, Ye L, Duan DD, Chen X, Houser SR, Zeng C. Prolyl hydroxylase domain protein 2 silencing enhances the survival and paracrine function of transplanted adipose-derived stem cells in infarcted myocardium. *Circ Res* 2013;113(3):288-300.
- 94 Mooney DJ, Vandenburgh H. Cell delivery mechanisms for tissue repair. *Cell Stem Cell* 2008;2(3):205-13.
- 95 Hu X, Wang J, Chen J, Luo R, He A, Xie X, Li J. Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;31(3):438-43.
- 96 Zhang S, Sun A, Xu D, Yao K, Huang Z, Jin H, Wang K, Zou Y, Ge J. Impact of timing on efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow stem cells transplantation in acute myocardial infarction: a pooled subgroup analysis of randomized controlled trials. *Clin Cardiol* 2009;32(8):458-66.
- 97 Ji ST, Kim H, Yun J, Chung JS, Kwon SM. Promising Therapeutic Strategies for Mesenchymal Stem Cell-Based Cardiovascular Regeneration: From Cell Priming to Tissue Engineering. *Stem Cells Int* 2017;2017:3945403.
- 98 Mathieu E, Lamirault G, Toquet C, Lhommet P, Rederstorff E, Sourice S, Biteau K, Hulin P, Forest V, Weiss P, Guicheux J, Lemarchand P. Intramyocardial delivery of mesenchymal stem cell-seeded hydrogel preserves cardiac function and attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction. *PLoS One* 2012;7(12):e51991.

- ⁹⁹ Orive G, Hernández RM, Rodríguez Gascón A, Calafiore R, Chang TM, de Vos P, Hortelano G, Hunkeler D, Lacík I, Pedraz JL. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends Biotechnol* 2004;22(2):87-92.
- ¹⁰⁰ Tan H, Marra KG. Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Materials (Basel)* 2010;3(3):1746-67.
- ¹⁰¹ Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004;25(16):3211-22.
- ¹⁰² Aamodt JM, Grainger DW. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials* 2016;86:68-82.
- ¹⁰³ Blocki A, Beyer S, Dewavrin JY, Goralczyk A, Wang Y, Peh P, Ng M, Moonshi SS, Vuddagiri S, Raghunath M, Martinez EC, Bhakoo KK. Microcapsules engineered to support mesenchymal stem cell (MSC) survival and proliferation enable long-term retention of MSCs in infarcted myocardium. *Biomaterials* 2015;53:12-24.
- ¹⁰⁴ Janson IA, Putnam AJ. Extracellular matrix elasticity and topography: material-based cues that affect cell function via conserved mechanisms. *J Biomed Mater Res A* 2015;103(3):1246-58.
- ¹⁰⁵ Diekjürgen D, Grainger DW. Polysaccharide matrices used in 3D in vitro cell culture systems. *Biomaterials* 2017;141:96-115.
- ¹⁰⁶ Sharma V, Hunckler M, Ramasubramanian MK, Opara EC, Katuri KC. Microfluidic Approach to Cell Microencapsulation. *Methods Mol Biol* 2017;1479:71-76.
- ¹⁰⁷ Tsou YH, Khoneisser J, Huang PC, Xu X. Hydrogel as a bioactive material to regulate stem cell fate. *Bioact Mater* 2016;1(1):39-55.
- ¹⁰⁸ Chang P, Zhang B, Shao L, Song W, Shi W, Wang L, Xu T, Li D, Gao X, Qu Y, Dong L, Wang J. Mesenchymal stem cells over-expressing cxcl12 enhance the radioresistance of the small intestine. *Cell Death Dis* 2018;9(2):154.
- ¹⁰⁹ Barminko J, Kim JH, Otsuka S, Gray A, Schloss R, Grumet M, Yarmush ML. Encapsulated mesenchymal stromal cells for in vivo transplantation. *Biotechnol Bioeng* 2011;108(11):2747-58.
- ¹¹⁰ Timmers L, Lim SK, Hofer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AA, Goumans MJ, Strijder C, Sze SK, Choo A, Piek JJ, Doevendans PA, Pasterkamp G, de Kleijn DP. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res* 2011;6(3):206-14.
- ¹¹¹ Eke G, Mangir N, Hasirci N, MacNeil S, Hasirci V. Development of a UV crosslinked biodegradable hydrogel containing adipose derived stem cells to promote vascularization for skin wounds and tissue engineering. *Biomaterials* 2017;129:188-98.

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 3c.: Dreidimensionale Darstellung des Zellverkapselungsprozesses mit Hilfe eines CAD-Modells durch Autodesk Inventor® Version 2013.

Abb. 1-16: Die Diagramme wurde mithilfe von IBM® SPSS Statistics Version 21.0.0.0 erstellt.

9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich, Farina Löper, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „MSC-Mikroverkapselung in GMA-Gelatine-basiertem Hydrogel zur Potenzierung von additionalen Stammzell-Therapieverfahren beim akuten Myokardinfarkt“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

10. ANTEILSERKLÄRUNG:

Farina Löper hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation: Blocki A, Löper F, Chirico N, Neffe AT, Jung F, Stamm C, Lendlein A. Engineering of cell-laden gelatin-based microgels for cell delivery and immobilization in regenerative therapies. Clin Hemorheol Microcirc 2017;67(3-4):251-59.

Die Idee und Konzeption der Arbeit wurde von Frau Blocki gestellt. Die Durchführung der Experimente und Datenerhebung erfolgte durch Frau Löper unter Mithilfe von Frau Blocki und Herrn Chirico. Die Auswertung und Interpretation der gesammelten Daten wurde durch Frau Löper und Frau Blocki durchgeführt. Aus der statistischen Datenauswertung von Frau Löper sind die Darstellungen 3 und 4 entstanden. Frau Löper wirkte beim Verfassen der Erstversion des Manuskripts unter Federführung von Frau Blocki mit. Alle Koautoren waren an der Korrektur des obigen Manuskripts beteiligt. Die Finalisierung erfolgte durch Frau Blocki.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

11. LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

12. DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Stamm, möchte ich für die Betreuung meiner Dissertation seitens des Deutschen Herzzentrums Berlin und des Berlin Center for Regenerative Therapy herzlichst danken. Zudem möchte ich an dieser Stelle meinen speziellen Dank für die fortwährende Unterstützung meiner akademischen Laufbahn aussprechen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Anna Blocki, die mich während meiner gesamten Arbeit hervorragend wissenschaftlich betreute und mir bei der experimentellen Durchführung meiner Promotion jederzeit helfend zur Seite stand. Für ihre kompetente Beratung und tatkräftige Unterstützung in technischen Angelegenheiten bin ich äußerst dankbar.

Größter Dank gilt Nino Chirico, der mir bei der Durchführung meiner Experimente seine uneingeschränkte Hilfe zusicherte und eine zuverlässige Mitarbeit an meinem Dissertationsprojekt leistete.

Ferner gebührt Kristin Klose und Matthias Becker großer Dank für die hilfreichen sowie wegweisenden Informationen zur Erstellung dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe unter Leitung des Prof. Dr. med. Stamm und allen weiteren beteiligten Mitarbeitern am Berlin Center for Regenerative Therapy der für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Schließlich bedanke ich mich bei Hannes Röh für die Anfertigung eines CAD-Modells des durchgeführten Zellverkapselungsprozesses.