

Nachhaltige *in vitro* Kultivierungsansätze
in der Zellkulturtechnik:
Xenofreie Kultivierungsoptimierung mit
Thrombozytenlysat

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Hanna Marline Kirsch, M. Sc.

2021

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferentin: Dr. Janina Bahnemann
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferentin: Prof. Dr. Cornelia Kasper
Institut für Zell- und Gewebekulturtechnologien
Universität für Bodenkultur Wien

Tag der Promotion: 09.04.2021

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich während der Zeit meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Bereitstellung dieses spannenden Promotionsthemas und die Unterstützung während meiner Zeit am TCI danken. Ich habe die Zeit sehr genossen und bin dankbar für die Möglichkeit der Promotion am TCI.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Janina Bahnemann für die Übernahme des Korreferats und den vielen netten und interessanten Gesprächen. Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. Cornelia Kasper meinen Dank für die Übernahme des Korreferats ausdrücken. Zusätzlich möchte ich mich gerne bei Herrn PD Dr. Ulrich Krings für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und die vielen freundlichen Begegnungen seit Beginn meines Studiums bedanken.

Frau Dr. Antonina Lavrentieva möchte ich ganz besonders danken, die mich nicht nur fachlich in den vergangenen Jahren betreut und begleitet hat. Vielen Dank für die unzähligen konstruktiven Diskussionen, die netten, produktiven und immer fröhlichen Unterhaltungen, die tatkräftige, allzeit geleistete Unterstützung und Freundschaft. Danke, dass Du immer für mich da warst und ich mich immer auf Dich verlassen konnte.

Ebenfalls möchte ich Frau Dr. Iliyana Pepelanova neben der fachlichen Unterstützung rund ums Thema Hydrogele und Rheologie auch für die vielen schönen Gespräche danken.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Jessica Rach, Frau Dr. Wiebke Handke und Herrn Prof. Dr. Axel Seltsam sowie dem ganzen Team der F&E Abteilung des DRKs NSTOB für die Möglichkeit und die Unterstützung bei dieser Arbeit. Ich bin sehr dankbar für die Einblicke und die Einladungen nach Springe sowie für die vielen konstruktiven Treffen.

Des Weiteren möchte ich meinen Studenten Laura Leykam, Oliver Jeske, Luise Birnstein, Sandra Mielke, Annabelle-Christin Herder und Annalea Brüggemann für die angeregte und motivierte Mitarbeit an und rund um mein Promotionsthema danken. Vielen Dank für die vielen interessanten Gespräche und eurer großen Begeisterung an der Arbeit in der Zellkultur.

Ein großer Dank gilt auch Martina Weiß, Ulrike Dreschel, Cornelia Alic, Christiane Hellwig, Dr. Ivo Havlik, Dr. Michael Dors, Thorleif Hentrop und Martin Pähler. Friedbert Gellermann und Thorsten Stempel danke ich besonders für die allzeit spontane Unterstützung in allen Belangen.

Darüber hinaus möchte ich dem gesamten TCI für die schöne Zeit und die familiäre Atmosphäre danken. Ihr habt meine Zeit am TCI zu einer ganz besonderen gemacht und ich bin froh, so viele nette Menschen kennengelernt zu haben. Dem alten Büro der guten Laune mit Ingo, Jonas, Elsa, Lukas und Basti möchte ich vor

allem danken, dass sie mich trotz meiner glänzenden anfänglichen Abwesenheit im Büro 265 (CTB, CTB, CTBBBBB), trotzdem so herzlich aufgenommen haben. Gemeinsam mit den Disko Ninjas Pia, Ina, Svenja und Kimia habt ihr mir eine wundervolle Zeit am TCI beschert und dafür gesorgt, dass ich die vielen schönen Stunden mit euch nie vergessen werde. Ich hoffe sehr, dass noch viele weitere folgen werden!

Außerdem möchte ich auch dem „jungen“ BDGL, Torsten, Marc und Tobi und dem „neuen“ TCI für die unvergessliche Zeit danken. Lisa Seiler und Alina Gonzalez danke ich unter anderem für die wundervolle Zeit in Minnesota! Mein ganz persönlicher Dank gilt neben Pia und Ina auch Ole, Thorben, Chrissi und Alina Eilers. Ich freue mich sehr darüber, dass ich euch nach unserer schönen Studienzeit auch noch als direkte Kollegen und LUH-Angestellte immer um mich haben konnte. Thorben, ich freue mich sehr darüber, dass wir auch diesen letzten Schritt zusammengehen! Chrissi und Alina, vielen Dank für eure große Hilfe und die vielen aufbauenden Worte zum Ende der Promotion. Ich freue mich auf viele weitere schöne Abende und Urlaube mit euch.

Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern, meinem Bruder, meinen Freunden und meinem Freund danken. Danke für eure vielen lieben Worte, eure große Unterstützung und dass ihr immer für mich da seid. Meinen Eltern und Stiefeltern möchte ich ganz besonders danken, ohne euch wäre ich niemals soweit gekommen! Ein großer Dank gilt meinem Freund Wieger. Danke, dass du mich immer bedingungslos unterstützt und an mich glaubst.

Kurzfassung

Zweidimensionale (2D) oder dreidimensionale (3D) *in vitro* Kultivierungen vieler Säugetierzellen erfordern eine Supplementierung mit Serum. In klinischen Studien für die regenerative Medizin werden vermehrt mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem/stromal cell*, MSC) eingesetzt. Vor einer erfolgreichen Anwendung ist in den meisten Fällen eine *ex vivo* Expansion oder *in vitro* Differenzierung der MSCs erforderlich. Optimierte Kultivierungsbedingungen spielen daher eine Schlüsselrolle für den Therapieerfolg. Die Entwicklung und erfolgreiche Etablierung effizienter xenofreier Kultivierungsbedingungen für MSCs können die Wahrscheinlichkeiten für Risiken und Komplikationen nach der Behandlung minimieren und gleichzeitig den Behandlungserfolg nachhaltig positiv beeinflussen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Proliferation und Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe (*human adipose tissue derived mesenchymal stem cells*, hAD-MSCs) in 2D- und 3D-Zellkultursystemen (Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Hydrogelen) unter Verwendung von drei verschiedenen Mediensupplementen (fetales Kälberserum, Humanserum und humanes Thrombozytenlysate (hPL)) analysiert und verglichen. In beiden Zellkultursystemen erwies sich das hPL als vielversprechendes Mediumsupplement. In den Hydrogelen zeigte es sowohl als Supplement im Wachstumsmedium als auch als Zusatz zur Formulierung des Hydrogels einen positiven Einfluss auf das Zellverhalten.

In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurden Hydrogele verschiedener Steifigkeit mit unterschiedlichen Konzentrationen von hPL formuliert und untersucht. Die Zugabe von hPL verbesserte konzentrationsabhängig die Zellausbreitung, Proliferation sowie die osteogene Differenzierung von hAD-MSCs. Darüber hinaus erhöhte die Zugabe von hPL die Viskosität und Steifigkeit der Hydrogele und hatte einen positiven Einfluss auf die Formstabilität.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden additiv gefertigte resorbierbare Polymerkonstrukte auf ihre Eignung als Zellgerüst für eine xenofreie Kultivierung untersucht. Das untersuchte Biopolymer erwies sich als biokompatibel auch nach erfolgter Degradation und kann als osteokonduktives Implantatgerüst für das *Tissue Engineering* eingesetzt werden. Unter xenofreien Bedingungen mit hPL kann eine beschleunigte osteogene Differenzierung bei unbeeinträchtigter Zellmorphologie erreicht werden.

Schlagwörter: humanes Thrombozytenlysate, xenofreie Kultivierungsbedingungen, mesenchymale Stammzellen, fetales Kälberserum, 2D Zellkultur, 3D-Zellkultur, Gelatine Methacryloyl (GelMA), Hydrogele, resorbierbares Biomaterial, 3D-Druck, Zellexpansion, Mediensupplemente

Abstract

Two-dimensional (2D) or three-dimensional (3D) *in vitro* cultivation of various mammalian cells requires supplementation with serum. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are widely used in clinical trials for regenerative medicine. In most cases, *ex vivo* expansion or *in vitro* differentiation of MSCs are required before application. Therefore, optimized cultivation conditions play a key role for the treatment outcome. The development and successful establishment of efficient xeno-free cultivation conditions for MSCs can minimize the chances of post-treatment risks and complications and can positively influence the long-term treatment outcome.

In the first part of this thesis, the proliferation and differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs) was comparative analyzed in 2D and 3D cell culture systems (gelatine-methacryloyl (GelMA) hydrogels) using three different media supplements (fetal calf serum, human serum and human platelet lysate (hPL)). hPL proved to be a promising media supplement in both studied cell culture systems. Additionally, it showed a positive effect on cell behavior in both, added to the growth medium and used for the formulation of the hydrogel.

In the second part of this work, hydrogels of different stiffness were formulated and investigated with different concentrations of hPL. The addition of hPL improved cell spreading, proliferation, as well as osteogenic differentiation of hAD-MSCs in a concentration-dependent manner. Furthermore, the addition of hPL increased the viscosity and stiffness of the hydrogels and had a positive effect on the shape fidelity.

In the third part of this work, 3D-printed resorbable polymer constructs were investigated for their suitability as cell scaffolds for xeno-free cultivation. The studied biopolymer proved to be biocompatible even after degradation and can be used as an osteoconductive implant scaffold for tissue engineering. An improved osteogenic differentiation can be achieved without affecting cell morphology, if cultivated under xeno-free conditions with hPL.

Keywords: Human platelet lysate, xeno-free cultivation conditions, mesenchymal stem cells, fetal calf serum, 2D cell culture, 3D cell culture, gelatin methacryloyl (GelMA), hydrogels, resorbable biomaterial, 3D printing, cell expansion, medium supplements

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Kurzfassung.....	IV
Abstract	V
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Zielsetzung	2
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Das Potential und die Einsatzmöglichkeiten von mesenchymalen Stammzellen.....	3
2.1.1 Einsatz von MSCs als Zelltherapeutika.....	5
2.1.2 Einsatz von MSCs im <i>Tissue Engineering</i>	6
2.2 Herausforderungen bei der Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen.....	9
2.3 2D- und 3D-Zellkultursysteme	12
2.3.1 Soft tissue.....	13
2.3.2 Hard tissue	15
2.4 Existierende Protokolle und deren Einfluss auf die <i>in vitro</i> Kultivierung von primären mesenchymalen Stammzellen.....	17
2.4.1 Serumfreie und chemisch definierte Medien.....	19
2.4.2 Konventionelle Mediensupplemente.....	20
2.5 Thrombozytenlysat als vielversprechendes Mediumsupplement.....	22
2.5.1 Gewinnung und Herstellung von Thrombozytenlysat.....	22
2.5.2 Bestandteile des Thrombozytenlysates.....	24
2.5.3 Nutzung des Thrombozytenlysates.....	25
3 Experimenteller Teil.....	28

3.1 Vergleichende Analyse der Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen in FKS, HS und hPL in 2D- und 3D-Zellkultursystemen.....	30
3.2 Mit Thrombozytenlysat hergestelltes Gelatin-Methacryloyl (GelMA) unterstützt die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und verbessert die mechanischen Eigenschaften des Hydrogels.....	48
3.3 Xenofreie <i>in vitro</i> Kultivierung und osteogene Differenzierung von hAD-MSCs auf resorbierbarem 3D gedruckten RESOMER®	66
4 Zusammenfassung und Ausblick.....	85
5 Literaturverzeichnis.....	89
Anhang.....	119
Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge.....	122
Lebenslauf.....	124

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Übersicht über konventionelle Quellen zur MSC-Isolation, charakteristische Eigenschaften und Potentiale von MSCs und deren mögliche Anwendungen im Bereich der Zelltherapie, des Tissue Engineering und der in vitro Medikamenten- und Wirkstofftestung.....	4
Abbildung 2-2: Schema der drei ausschlaggebenden Faktoren für erfolgreich biotechnologisch-hergestellte Gewebe im <i>Tissue Engineering</i>	7
Abbildung 2-3: Übersicht der geographischen Verteilung von klinischen Studien zu MSCs weltweit (Quelle: <i>clinicaltrials.gov</i> , abgerufen am 24.09.20, Eingriff/Behandlung: ‚ <i>mesenchymal stem cells</i> ‘).....	10
Abbildung 2-4: Anzahl klinischer Studien mit MSCs in Bezug auf die aktuellen klinischen Phasen (Quelle: <i>clinicaltrials.gov</i> , aufgerufen am 24.09.2020 mit Eingriff/Behandlung: ‚ <i>mesenchymal stem cells</i> ‘).....	10
Abbildung 2-5: Einflussfaktoren auf die Zelleigenschaften und den damit zusammenhängenden Erfolg von MSC-basierten Anwendungen.....	11
Abbildung 2-6: Vergleich zwischen 2D und 3D Zellkultur.....	13
Abbildung 2-7: Zusammensetzung herkömmlicher Kultivierungsmedien.....	18
Abbildung 3-1: <i>Graphical abstract</i> zu dem Manuskript „ <i>Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum and platelet lysate in 2D and 3D systems</i> “	30
Abbildung 3-2: <i>Graphical abstract</i> zu dem Manuskript " <i>Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Formulated with Human Platelet Lysate Supports Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation and Enhances the Hydrogel's Mechanical Properties</i> "	48
Abbildung 3-3: <i>Graphical abstract</i> zu dem Manuskript " <i>Xeno-Free In Vitro Cultivation and Osteogenic Differentiation of hAD-MSCs on Resorbable 3D Printed RESOMER®</i> "	66

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional (engl.: <i>Two-Dimensional</i>)
3D	Dreidimensional (engl.: <i>Three-dimensional</i>)
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
ATMP	Arzneimittel für neuartige Therapien (engl.: <i>advanced therapy medicinal products</i>)
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
BVD	Bovine virale Diarrhöe
CD	Cluster-Definition (engl.: <i>cluster of differentiation</i>)
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (engl.: <i>Creutzfeldt Jakob Disease</i>)
CT	Computer Tomographie
CTB	CellTiterBlue®
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DoF	Funktionalisierungsgrad (engl.: <i>Degree of Functionalization</i>)
EGF	Epidermale Wachstumsfaktor (engl.: <i>epidermal growth factor</i>)
Engl.	Englisch
Etc.	<i>Et cetera</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FDM	Schmelzschtichtung (engl.: <i>fused deposition modeling</i>)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl.: <i>fibroblast growth factor</i>)
FKS	Fetales Kälberserum
GelMA	Gelatine-Methacryloyl
GMP	Gute Herstellungspraxis (engl.: <i>good manufacturing practice</i>)

GvHD	Graft-versus-Host-Reaktion (engl.: <i>Graft versus Host Disease</i>)
hAD-MSC	Humane mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (engl.: <i>human adipose tissue derived mesenchymal stem cells</i>)
hBM-MSC	Humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (engl.: <i>human bone marrow derived mesenchymal stem cells</i>)
HLA	Humanes Leukozytenantigen
hPL	Humanes Thrombozytenlysate (engl.: <i>human platelet lysate</i>)
HS	Humanserum
hUC-MSC	Humane mesenchymale Stammzellen aus der Nabelschnur (engl.: <i>umbilical cord derived mesenchymal stem cells</i>)
IGF-1	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor 1 (engl.: <i>insulin-like growth factor 1</i>)
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
ISBT	Internationale Gesellschaft für Bluttransfusionen (engl.: <i>international society of blood transfusion</i>)
ISCT	Internationale Gesellschaft für Zelltherapien (engl.: <i>International Society for Cell Therapy</i>)
LBL	Lymphoblastisches Lymphom
Mind.	Mindestens
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzellen (engl.: <i>Mesenchymal Stem/Stromal Cells</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Saline (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Thrombozytenkonzentrat (engl.: <i>platelet concentrate</i>)
PDGF	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten (engl.: <i>platelet-derived growth factor</i>)
PGA	Polyglykolide (engl.: <i>polyglycolic acid</i>)
PLA	Polylactide (engl.: <i>polylactic acid</i>)

PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
PRP	Thrombozytenreiches Plasma (engl.: <i>platelet-rich plasma</i>)
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
S/D	Solvent/Detergent
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β (engl.: <i>transforming growth factor β</i>)
UV	Ultraviolett
VEGF	Vaskuläre endothele Wachstumsfaktor (engl.: <i>vascular endothelial growth factor</i>)
vWF	Von Willebrand Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: <i>world health organization</i>)
z.B.	Zum Beispiel
α -MEM	Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

In Transfusionszentren und medizinischen Einrichtungen werden jeden Tag weltweit etliche Thrombozytenkonzentrate (*platelet concentrate*, PC) vernichtet, da sie nicht mehr zur sicheren Transfusion für den Menschen geeignet sind¹⁻³. Gleichzeitig sterben bis zu 5 500 Kälber jeden einzelnen Tag auf grausame Weise zur Gewinnung des fetalen Kälberserums (FKS) für die Zellkulturlabore dieser Welt⁴⁻⁶. Entgegen den Empfehlungen und zunehmenden ethischen, sicherheitsbezogenen sowie wissenschaftlichen Bedenken bedeutender und anerkannter Organisationen und Richtlinien wie der *World Health Organisation* (WHO) und der guten Herstellungspraxis (*good manufacturing practice*, GMP) bleibt das FKS nach wie vor Teil der Standardausrüstung eines jeden Zellkulturlabors und aus den Standardprotokollen zur Zellkultivierung nicht weg zu denken⁶⁻⁹. Obwohl die Nachteile, die gegen eine Nutzung des FKS sprechen, wie eine hohe Chargenvariabilität, ethische Bedenken und das Risiko von Virus-, Mykoplasmen- oder Prioneninfektionen sowie Immunreaktionen der Empfänger auf xenogene Faktoren überwiegen, gibt es immer noch keine weit verbreiteten Alternativen für das FKS^{3,6-15}.

Vor allem im Bereich der Stammzellkultivierung empfehlen die WHO und GMP-Richtlinien immer dringender die Nutzung von tierischen Supplementen zu untersagen⁶⁻⁹. In den letzten Jahren hat sich insbesondere die Stammzellforschung in kürzester Zeit zu einem der wichtigsten Forschungsbereiche der regenerativen Medizin entwickelt. Das große Potential der vielfältigen Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen (*mesenchymal stem/stromal cells*, MSCs) führt vor allem bereits bei Zelltherapien und dem *Tissue Engineering* zu vielversprechenden Ergebnissen¹⁶⁻²⁶. Insbesondere die standardmäßige Verwendung eines xenogenen Mediumsupplements wie das FKS beeinträchtigt hierbei entscheidend den Erfolg klinischer Studien und Anwendungen am Menschen.

Die mögliche Verwendung von aus PCs hergestelltem humanem Thrombozytenlysat (*human platelet lysate*, hPL) als alternatives Mediumsupplement zu FKS scheint in den letzten Jahren zunehmend das Potential zu entwickeln, die Verschwendung dieser humanen Medizinprodukte zu minimieren und gleichzeitig eine Möglichkeit für xenofreie Kultivierungsbedingungen zu schaffen. Vielversprechende Ergebnisse weisen darauf hin, dass abgelaufenes hPL, ebenso wie frisches hPL, MSCs optimal versorgen kann^{1,3,27}.

Mit der stetigen Entwicklung moderner, nachhaltiger und resorbierbarer Biomaterialien und der Etablierung individuell modifizierbarer dreidimensionaler (3D)-Kultivierungssysteme für die regenerative Medizin vergrößert sich der Einsatzbereich von xenofreien MSC-Produkten zunehmend²⁸⁻³⁴. Die Verwendung von hPL zur Kultivierung von MSCs in Kombination mit fortschrittlichen

3D-Kultivierungssystemen bietet die Möglichkeit den Bereich der regenerativen Medizin zu revolutionieren.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die vergleichende Analyse von hPL als xenofreie Alternative zu konventionellen Mediensupplementen (FKS und Humanserum (HS)) hinsichtlich der Proliferations- und Differenzierungsunterstützung von humanen MSCs aus Fettgewebe (*human adipose tissue derived mesenchymal stem cells*, hAD-MSCs) in zweidimensionalen (2D)- und 3D-Zellkultursystemen. Es soll die xenofreie Kultivierung von MSCs optimiert werden und Möglichkeiten nachhaltiger Kultivierungsansätze untersucht werden.

Zunächst soll dazu der Einfluss von FKS, HS und hPL auf die Proliferation (Langzeitproliferation) und Differenzierung (osteogen und chondrogen) von hAD-MSCs (von vier Spendern) in 2D-Zellkultursystemen analysiert werden. Anschließend sollen Hydrogele (Gelatin-Methacryloyl (GelMA)) als repräsentatives 3D-Zellkultursystem herangezogen werden. In diesem System sollen die Mediensupplemente im Wachstumsmedium variiert werden. Gleichzeitig werden auch im 3D-Konstrukt die drei verschiedenen Mediensupplemente direkt während der Hydrogel-Formulierung eingesetzt. Zur Charakterisierung der eingesetzten Mediensupplemente soll ihr Einfluss auf die Zelleigenschaften wie die Zelladhäsion, Ausbreitung und Viabilität untersucht werden.

Um den Einfluss der vielversprechenden xenofreien Alternative (hPL) auf 3D-kultivierte Zellen näher zu betrachten, soll das hPL zusätzlich in verschiedenen Konzentrationen zur Formulierung der Hydrogele eingesetzt werden. Auf diesem Weg soll die optimale Supplementkonzentration zur Unterstützung der Zelleigenschaften (Adhäsion, Morphologie, Ausbreitung, Proliferation, osteogene Differenzierung) im Hydrogel ermittelt werden. Zur allgemeinen Optimierung des Systems und zur Kontrolle des Einflusses von hPL auf die Hydrogeleigenschaften wurden Hydrogele mit drei verschiedenen Funktionalisierungsgraden (*degree of functionalization*, DoF) (50 %, 70 % und 95 % DoF) und daraus resultierenden Steifigkeiten analysiert.

Ferner sollen 3D-gedruckte Konstrukte aus einem resorbierbaren Polymer als weiteres Kultivierungssystem herangezogen werden. Zum einen sollen die gedruckten Konstrukte auf ihre Eignung als Implantatmaterial getestet werden (Degradation, Biokompatibilität, Zytotoxizität und Zellviabilität/Morphologie). Zum anderen soll aber auch der Einfluss von verschiedenen Mediensupplementen auf die auf den Konstrukten kultivierten hAD-MSCs untersucht werden (Morphologie, Adhäsion, Migration und osteogene Differenzierung).

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Das Potential und die Einsatzmöglichkeiten von mesenchymalen Stammzellen

Zwischen 50 und 70 Billionen Zellen im menschlichen Körper sterben im Durchschnitt pro Tag durch einen programmierten Zelltod³⁵. Hervorgerufen durch Krankheiten oder Verletzungen des menschlichen Organismus kann gleichzeitig eine Nekrose in den betroffenen Bereichen des Körpers ausgelöst werden. Für die Heilung dieser Bereiche bedarf es daher einer Regeneration^{36,37}. Um den Bedarf an Nachschub für solch eine immense Zellzahl zu regulieren, gibt es im menschlichen Körper Mechanismen, die dafür sorgen, dass die abgestorbenen Zelltypen in den Geweben nachgebildet werden. Zusätzlich zu der normalen Zellteilung der bereits spezialisierten Zellen befinden sich in den meisten Teilen des Körpers sogenannte Stammzellen/Stromazellen, die die Gewebemöostase unterstützen und sich symmetrisch erneuern oder asymmetrisch in spezialisierte Zellen differenzieren können.

Das Regenerationsvermögen des Gewebes variiert gewebespezifisch, jedoch wird die Regeneration in nahezu allen Gewebetypen von Stammzellen unterstützt. Insbesondere die mesenchymalen Stammzellen (*mesenchymal stem/stromal cells*, MSC), die in vielen verschiedenen menschlichen Geweben vorliegen, haben mit ihrem großen Potential aufgrund vielfältiger Eigenschaften die wissenschaftliche Aufmerksamkeit auf sich gelenkt^{19,36,38-40}. Vor über einem halben Jahrhundert isolierten Friedenstein *et al.* als erste Forschungsgruppe MSCs wodurch die Geschichte der MSC-*in-vitro*-Kultivierung ihren Anfang nahm⁴¹⁻⁴³. Seither wurden MSCs aus verschiedensten adulten und geburtsassoziierten Quellen isoliert und untersucht. Beispielsweise können MSCs aus Knochenmark, Muskel-, Knorpel-, Haut-, Zahn- und Fettgewebe sowie aus der Plazenta, dem Amnion, dem Nabelschnurblut und dem Wharton-Jelly der Nabelschnur gewonnen werden^{19,44-53}. Um die isolierten heterogenen Zellpopulationen bestmöglich als MSCs charakterisieren und standardisieren zu können, beschloss die *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) 2006 Minimalkriterien zur Definition von MSCs²⁰. Diese umfassen die Plastikadhärenz der Zellen, die Expression spezifischer Oberflächenmarker (CD73+, CD90+, CD105+, CD14-, CD34-, CD45-, HLA-DR-) und das *in vitro* Differenzierungspotential in mindestens drei mesodermale Richtungen, wie die Chondrogenese, die Adipogenese und die Osteogenese^{20,54}.

Die aus verschiedenen Geweben isolierten MSCs verfügen über Eigenschaften wie ein hohes *ex vivo* Proliferationsvermögen, die Unterstützung somatischer Zellen, die Differenzierung in verschiedene mesodermale Richtungen, ein migratorisches und immunmodulatorisches Potential, *Homing* (Ansiedlung von Stammzellen in spezifischem Gewebe) und die Sekretion löslicher Faktoren (z.B. antimikrobielle Peptide, entzündungshemmende Zytokine, extrazelluläre Vesikel und angiogene Wachstumsfaktoren) (Abbildung 2-1)¹⁶⁻²⁶. Verschiedene immunmodulatorische Effekte konnten *in vitro* bereits erforscht werden. Di Nicola *et al.* und Selmani *et al.* zeigten beispielsweise, dass MSCs die Proliferation und

Aktivierung von T-Zellen sowie von natürlichen Killerzellen unterdrücken können^{55,56}. Des Weiteren wiesen Corcione *et al.* eine von MSCs regulierte Wirkungsweise von B-Zellen nach und Jiang *et al.* zeigten, dass MSCs die Differenzierung und Funktion dendritischer Zellen hemmen können^{57,58}. Darüber hinaus zeigten Le Blanc *et al.*, dass humane MSCs keine alloreaktiven proliferativen Lymphozytenantworten auslösen, sondern Immunantworten modulieren. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass MSCs kaum immunogen und zwischen HLA-inkompatiblen Individuen transplantierbar sind⁵⁹. Die immunmodulatorischen Eigenschaften gemeinsam mit der geringen eigenen Immunogenität der MSCs deuten darauf hin, dass allogene MSCs zur Behandlung von Graft-versus-Host-Erkrankungen (GvHD) und Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden können⁶⁰⁻⁶³. Ein Beispiel für die sekretorischen/stromalen Eigenschaften von MSCs ist die in den letzten Jahren *in vivo* beobachtete sogenannte *parakrine rescue function*. Verschiedene Studien demonstrierten beispielsweise eine über einen direkten Zellkontakt oder MSC-Wachstumsfaktoren vermittelte Unterstützung der Zellregeneration⁶⁴⁻⁶⁸.

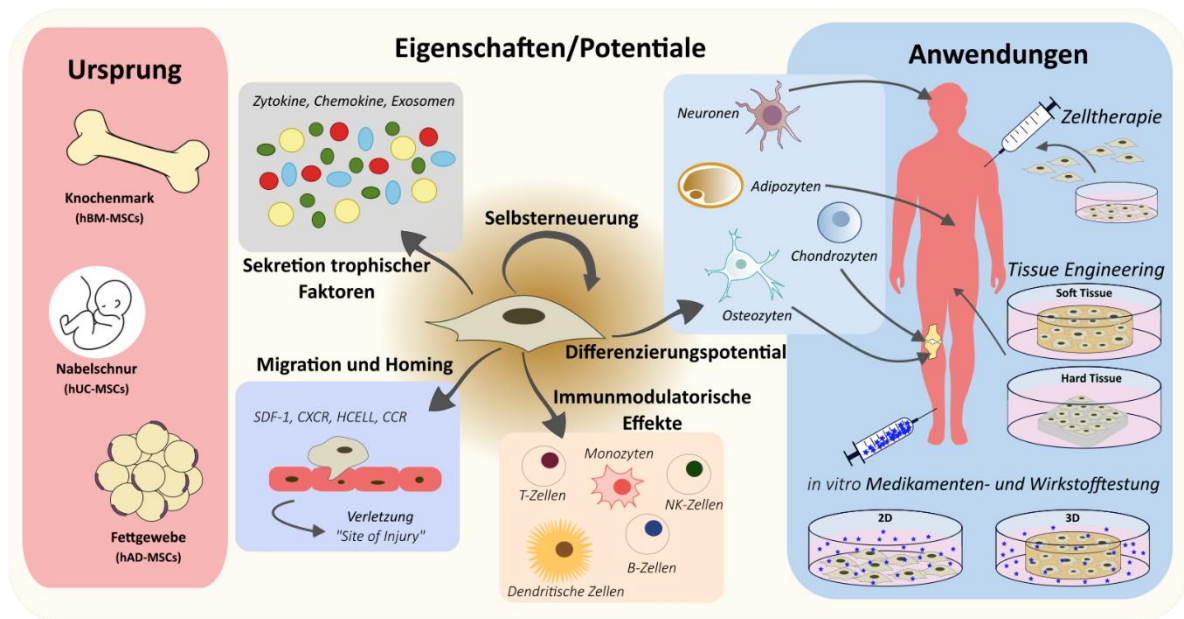


Abbildung 2-1: Übersicht über konventionelle Quellen zur MSC-Isolation, charakteristische Eigenschaften und Potentiale von MSCs und deren mögliche Anwendungen im Bereich der Zelltherapie, des *Tissue Engineering* und der *in vitro* Medikamenten- und Wirkstofftestung.

Die zahlreichen positiven Eigenschaften der MSCs verdeutlichen ihr großes Potential, eine gute Grundlage für die langfristige Anwendung in der regenerativen Medizin bieten zu können. In zellbasierten Therapien und im *Tissue Engineering* werden MSCs daher bereits vielfältig eingesetzt. Isoliert werden MSCs optimalerweise von Spendern oder Patienten in einem gering invasiven Verfahren. Da für eine Anwendung als Zelltherapeutika sehr große Zellzahlen benötigt werden, eignen sich insbesondere humane mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (*human adipose tissue derived mesenchymal stem*

cells, hAD-MSCs) als MSC-Quelle, die in großer Zahl mittels einer Liposuktion oder Abdominoplastik isoliert werden können^{5,22,24,26,69-75}. Um jedoch klinisch relevante Zellzahlen zu erhalten, müssen die isolierten MSCs zusätzlich *ex vivo* expandiert werden⁷⁶⁻⁷⁸. Auf die Vorteile und die genaue Verwendung von MSCs in Zelltherapeutika wird im nachfolgenden Abschnitt 2.1.1 näher eingegangen. Das hohe reproduzierbare Differenzierungsverhalten der isolierten und expandierten MSCs und die Möglichkeit von sicheren autologen oder allogenen Transplantationen sind grundlegende Aspekte für einen erfolgreichen Einsatz von MSCs im *Tissue Engineering* (siehe Abschnitt 2.1.2)^{22,79,80}.

Darüber hinaus können MSCs zur *in vitro* Simulation von Krankheitsmodellen genutzt werden und somit zur Entwicklung und Testung neuer Medikamente und Therapien beitragen. Bislang scheitern in klinischen Studien beinahe 90% aller getesteten Medikamente. Aufgrund einiger grundlegender biologischer Unterschiede zwischen dem humanen und dem tierischen Organismus kann ein Medikament im Tierversuch erfolgreich erscheinen und trotz allem in der klinischen Studie scheitern. Eine *in vitro* Testung der Medikamente vor dem Beginn einer klinischen Studie an humanen Zellen in 2D- oder physiologisch-relevanten 3D-Modellen kann über den direkten Ausschluss scheiternder Medikamente zur Steigerung des Erfolgs in klinischen Studien beitragen und somit nachhaltig die Therapiekosten senken. Mit der Anwendung physiologisch-relevanter *in vitro* Modelle kann die Prognostizierbarkeit der therapeutischen Wirksamkeit von Medikamenten möglicherweise gesteigert und gleichzeitig die Zeit, die Kosten und der Aufwand bis zur Marktetablierung („*Valley of Death*“) gesenkt werden.

In den nachfolgenden Abschnitten wird näher auf das Potential von MSCs für die Anwendung in Zelltherapien und im *Tissue Engineering* eingegangen.

2.1.1 Einsatz von MSCs als Zelltherapeutika

Zelltherapien, auch als zellbasierte Verfahren bekannt, haben das Ziel geschädigte oder abgestorbene Zellen, Gewebe oder ganze Organe zu reparieren, zu regenerieren, zu ersetzen oder auch nur ihre biologischen Funktionen zu optimieren. Zu solchen Verfahren kann die Transplantation ausdifferenzierter humaner autologer oder allogener Zellen, die Injektion (genetisch) modifizierter humaner Zellen sowie xenogener Zellen gehören⁸¹⁻⁸³. Ein weiterer erfolgreicher Bereich der Zelltherapie umfasst die Transplantation autologer und allogener Stammzellen (z.B. bei Leukämie wie dem lymphoblastischen Lymphom (LBL)), die bereits für verschiedene Anwendungsgebiete zugelassen sind^{54,84-86}. Die Verwendung lebender funktionell aktiver Zellen ist nicht mit einer konventionellen Medikamentengabe zu vergleichen. Die zahlreichen allgemein positiven Eigenschaften von MSCs können auch Risiken darstellen, wenn sie zuvor nicht sachgemäß auf die geplante Anwendung im menschlichen Körper getestet wurden. Beispielsweise könnten die MSCs im Körper migrieren und durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren die Tumorigenese begünstigen oder sich unkontrolliert differenzieren^{54,87,88}.

Unabhängig von den Anwendungsbereichen besteht ein grundlegend gleicher Ablauf einer Stammzelltherapie. Zu Beginn wird therapiespezifisch Gewebe entnommen, aus welchem die Stammzellen dann isoliert, charakterisiert (siehe Minimalkriterien in Punkt 2.1) und kultiviert werden^{19,20,89}. Für Zelltherapien werden meist pro Patient mehrere Millionen Zellen benötigt, wovon aus dem Spendergewebe jedoch nur ein Bruchteil entnommen werden kann^{86,90,91}. Demnach besteht die größte Herausforderung in der Expansion großer Zellmengen für autologe oder allogene Zelltherapien. Nach einer erfolgreichen *ex vivo* Zellexpansion und dem Nachweis des gewünschten therapeutischen Potentials können die MSCs anschließend für die Therapie autolog oder allogene verwendet werden^{19,76-78}. Da es während der Zellexpansion zu einem Funktionsverlust der MSCs kommen kann, sind optimierte und standardisierte Expansionsprotokolle sowie eine anschließende Überprüfung der Qualität und Identität der Zellen essenziell. Nur auf diesem Weg kann ein reproduzierbarer Therapieerfolg garantiert werden und in den Studien zwischen den Ergebnissen der MSCs und der Placebos unterschieden werden¹⁹.

MSC-Therapien sind bislang nur für wenige Anwendungsbereiche, wie Krebserkrankungen (z.B. Leukämie), Herzversagen, Makuladegenerationen oder Rückenmarksverletzungen zugelassen. Jedoch besteht ein bedeutendes Potential für weitere zelltherapeutische Anwendungen^{84,85}. Für den Einsatz von MSCs als Zelltherapeutika sind auf *clinicaltrials.gov* die meisten der klinischen Studien für Krankheiten des Nervensystems, Knochen-, Muskel- und Knorpelerkrankungen, Herz- und Bluterkrankungen sowie Erkrankungen des Verdauungssystems registriert^{85,89,92}. Die Anzahl klinischer Studien, die MSCs für Zelltherapien einsetzen, beläuft sich auf 991 registrierte Studien (*clinicaltrials.gov*, abgerufen am 24.09.20, Eingriff/Behandlung: *mesenchymal stem cells*, Filter: *cell therapy*). Dass sich innerhalb dieser Studien bereits mehr als die Hälfte in Phase 2 oder höher (587 Studien) befinden, zeigt das große Potential der MSC-basierten Therapien. Im Hinblick auf die noch laufenden sowie die bereits abgeschlossenen klinischen Studien zeigt sich, dass die Sicherheit einer Behandlung (z.B. Kontaminationen und Tumorigenität) auf der Basis von MSCs gewährleistet werden kann^{89,90,93-96}. Jedoch sind die erzielten Ergebnisse aus vielen Studien häufig kontrovers und können abhängig von der MSC-Quelle und des -Spenders sowie von den Isolations-, Expansions- und allgemeinen Kultivierungsprotokollen variieren^{19,97,98}. Daher ist trotz der Sicherheit bezüglich Kontaminationen und Tumorigenität fraglich, ob die Effektivität einer Behandlung mit MSCs für eine großflächig therapeutische Anwendung ausreichend ist^{19,84,99}.

2.1.2 Einsatz von MSCs im *Tissue Engineering*

Das interdisziplinäre Gebiet des *Tissue Engineerings* umfasst die Anzucht von Gewebe und Zellverbänden sowie den Ersatz beschädigten oder zerstörten Gewebes oder Organen. Es vereint unterschiedliche wissenschaftliche Aspekte aus dem Ingenieurwesen, den Materialwissenschaften, der Biologie, der Physik

und der Medizin, um optimierte Gewebe für die klinische Anwendung zu entwickeln^{30,34,100-105}. Drei Faktoren sind für eine erfolgreiche klinische Anwendung des gezüchteten Gewebes ausschlaggebend: (1) die Zellen, (2) die Zellumgebung beziehungsweise das Biomaterial sowie (3) die Zell- oder Gewebekulturbedingungen (Abbildung 2-2)^{103,104,106}.

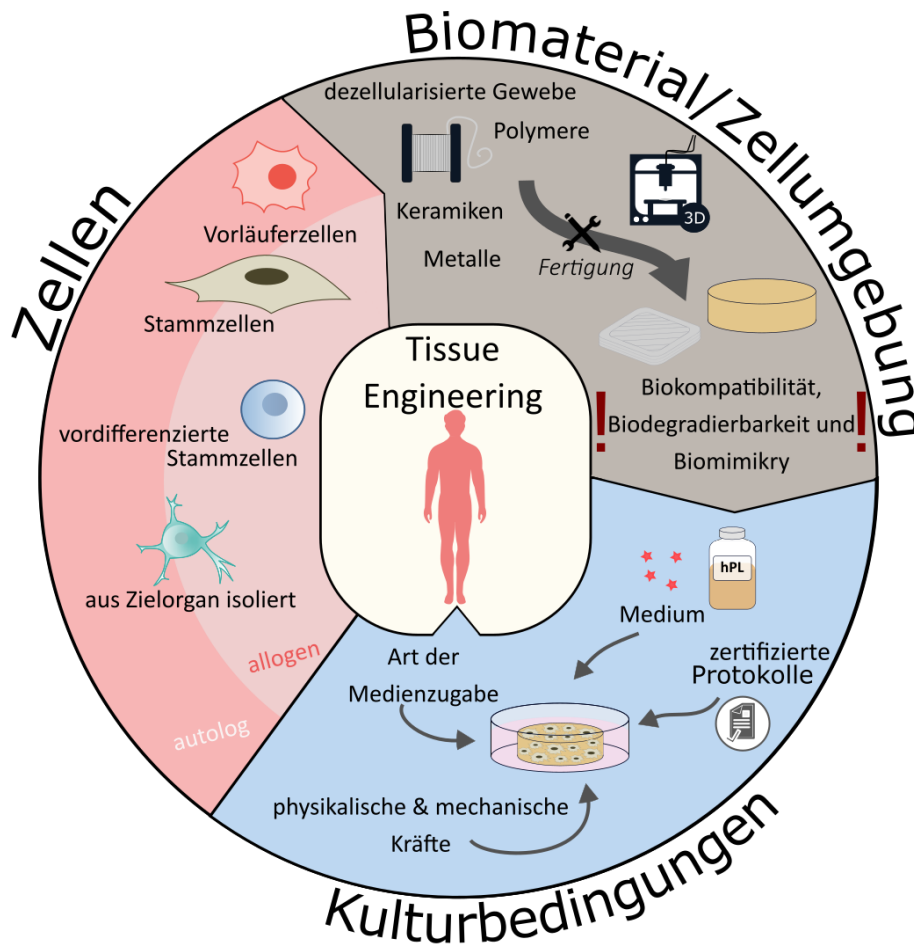


Abbildung 2-2: Schema der drei ausschlaggebenden Faktoren für erfolgreich biotechnologisch-hergestellte Gewebe im *Tissue Engineering*.

Einen primären Einfluss auf einen klinischen Erfolg hat die Auswahl der verwendeten Zellen. Bestmöglich sollten patienteneigene Zellen (autolog) verwendet werden, um eine Immunreaktion oder eine Abstoßung des Implantats zu vermeiden. Die zu verwendenden Zellen können entweder direkt vom Zielorgan isoliert werden, aus körpereigenen Vorläuferzellen sowie aus Stammzellen des Patienten entwickelt werden oder es werden im Labor kultivierte Zellen genutzt. Lange Zeit wurden vor allem bereits ausdifferenzierte Zellen aus dem spezifischen Gewebe isoliert und für das *Tissue Engineering* verwendet. In den letzten Jahren konnte jedoch vor allem MSC-basiertes *Tissue Engineering* zunehmend etabliert werden¹⁰⁷⁻¹¹⁴. Dank der charakteristischen stetigen Selbsterneuerung und des großen Potentials in verschiedene Richtungen zu differenzieren, stellen MSCs eine sehr vielversprechende Zellquelle für das *Tissue Engineering* dar. Vergleichbar zu der Zellgewinnung für Zelltherapeutika können MSCs nach der

Isolation in einer ersten Phase *ex vivo* bis zur erforderlichen Zellzahl expandiert oder direkt auf Gewebekonstrukten *in vitro* angezüchtet werden. Nach einer vollständigen Bewachung des Konstruktes besteht die Möglichkeit die MSCs zur Differenzierung in den phänotypischen und funktionellen *in vivo* Zielzelltyp anzuregen und diese anschließend beispielsweise zur Medikamententestung oder zur Einbringung in den Menschen zu verwenden.

Die Verwendung von Biomaterialien und damit die Interaktion der Zellen mit ihrer Umgebung stellen einen weiteren essentiellen Faktor für eine erfolgreiche klinische Anwendung dar¹¹⁵⁻¹¹⁹. Die Mikroumgebung *in vivo* übt komplexe dynamische und spezifische Stimuli auf die Zellen aus und hat somit einen direkten Einfluss auf das Zellverhalten, wie die Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und den Aufbau der extrazellulären Matrix (EZM)^{116,117,120-125}. Um ein möglichst natives Gewebe zu schaffen, sollten die natürlichen Bedingungen der Zellen so präzise wie möglich imitiert und die *in vivo* EZM nachgeahmt werden^{113,124,126}. Für *in vitro* Anwendungen werden Gerüststrukturen, sogenannte Scaffolds, erforscht und gewebespezifisch optimiert, um eine individuelle Unterstützung und Versorgung der Zellen zu gewährleisten^{118,119,127,128}. Die Entwicklung der Biomaterialien erfolgte von dezellularisierten Gewebestrukturen über Metalle, Keramiken und bioaktiven Gläsern zu natürlichen und synthetischen Polymeren, Nanokomposit-Biomaterialien sowie Oberflächenmodifikationen^{115,129-148}. Insbesondere die Entwicklung natürlicher und synthetischer Polymere mit spezifischen Materialeigenschaften hat das Gebiet der Biomaterialforschung grundlegend verändert⁷¹. Für die klinische Verwendung der Polymere muss das Implantat in der Lage sein, die Gewebe und Organe des Empfängers zu ersetzen und in ihrer Funktion zu unterstützen. Zusätzlich sollte die Biokompatibilität des Materials sichergestellt sein, sodass vom Körper keine chronischen Reaktionen ausgelöst oder die Adhärenz, Proliferation, Viabilität oder Differenzierung der Zellen negativ beeinflusst werden^{29,34,149}. Ein weiterer relevanter Faktor, der vor allem in der Pädiatrie eine große Rolle spielt, ist die Biodegradierbarkeit eines solchen Materials über natürliche Abbaumechanismen des Körpers¹⁴⁹⁻¹⁵³. Ein optimales Biomaterial ist biokompatibel, biodegradierbar und ahmt die dreidimensionale Gewebestruktur einschließlich ihrer spezifischen Eigenschaften wie die Steifigkeit nach. So wird eine EZM-ähnliche Mikroumgebung geschaffen, die die Adhäsion, Proliferation und den Differenzierungsprozess von MSCs stimuliert und unterstützt (Biomimikry)^{29,115-117,122-124,154,155}.

Zuletzt haben auch die Zell- bzw. Gewebekulturbedingungen einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung des biotechnologisch-hergestellten Gewebeproduktes. Zum einen spielen hierbei das Nährmedium und die Differenzierungsfaktoren sowie die Art der Medienzugabe (z.B. die Verwendung von Dampfreaktoren für die Corneakultivierung) eine Rolle, zum anderen können physikalische und mechanische Kräfte die Entwicklung der Zellen beeinflussen (z.B. mechanische Stimulation zur Produktion von Muskel-, Sehnen- oder Knorpelgewebe). Neben der Medienzugabe ist vor allem die Verwendung etablierter Protokolle essenziell, um eine schnelle und effiziente Produktion des benötigten Gewebes zu erreichen. In der Zellexpansionsphase gilt es eine möglichst hohe Zellmenge zu erhalten,

während eine verfrühte oder unkontrollierte Differenzierung sowie das Einsetzen der Seneszenz verhindert werden soll. Bei dem Differenzierungsschritt kann es aufgrund der Stammzellheterogenität zu einer unvollständigen Differenzierung und variablen Effizienz kommen. Detaillierte und ausgereifte Protokolle für die optimale Medienkomposition sowie die spezifischen Kultivierungsbedingungen haben daher eine große Bedeutung für eine effiziente biotechnologische Herstellung von Zell- und Gewebekulturen^{127,156,157}.

Die Anforderungen und Einsatzmöglichkeiten von biotechnologisch-hergestellten Gewebeprodukten sind sehr umfangreich und vielfältig. Neben einer direkten Anwendung als Gewebeersatz können anhand solcher Gewebekonstrukte auch Krankheitsmodelle zur Reduktion von Tierversuchen untersucht werden. Zusätzlich können solche Konstrukte in der Grundlagenforschung oder der Medikamententestung betrieben sowie die Auswirkung von Schadstoffen mithilfe künstlich hergestellter Gewebe (z.B. Lungengewebe) analysiert werden. Die Etablierung des 3D-Drucks im *Tissue Engineering* kann zu zusätzlichen Erleichterungen für Patienten und für den klinischen Alltag führen^{100,158,159}. Ein weiterer vielversprechender Einsatz ist die Deckung des Bedarfs an Spenderorganen. Langfristig könnten *in vitro* funktionstüchtige Organe gezüchtet und somit die Nachfrage an Spenderorganen reduziert werden. MSCs wurden mit der *Tissue Engineering* Technologie bereits für die Behandlung verschiedener Arten von Gewebedefekten oder als Gewebeersatz wie für die Cornea, Trachea, Myokard, Parodontalband, Urethra, kleinen Arterien, Nasalknorpel sowie für Haut- und Knochengewebe eingesetzt¹⁶⁰⁻¹⁷⁰. Um Zell- und Gewebeprodukte perfektioniert und risikoarm in der Therapie von Krankheiten und Verletzungen einsetzen zu können, bedarf es, trotz der bereits vielversprechenden Ergebnisse, noch intensiverer Forschung und der Bewältigung von Herausforderungen bei der MSC-Kultivierung, die im nachfolgenden Kapitel näher ausgeführt werden^{88,100,158,171-173}.

2.2 Herausforderungen bei der Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen

Aufgrund der vielfältigen positiven Eigenschaften von MSCs waren zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit weltweit über 1 000 klinische Studien registriert (1 064 Studien registriert auf *clinicaltrials.gov*, abgerufen am 24.09.20, Eingriff/Behandlung: ‚*mesenchymal stem cells*). In China wurden nahezu ebenso viele Studien durchgeführt wie in Europa und den USA zusammen. In Europa liegt der Schwerpunkt der Studien in Spanien (Abbildung 2-3).

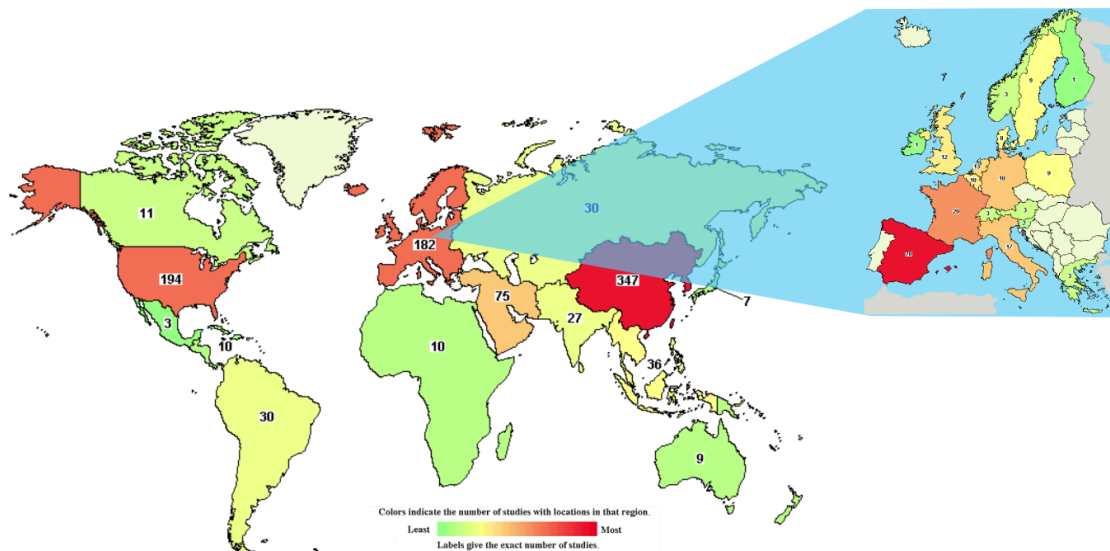


Abbildung 2–3: Übersicht der geographischen Verteilung von klinischen Studien zu MSCs weltweit (Quelle: *clinicaltrials.gov*, abgerufen am 24.09.20, Eingriff/Behandlung: ‚*mesenchymal stem cells*‘).

MSCs als Behandlungsformen werden in klinischen Studien vermehrt bei Krankheiten wie Multiple Sklerose, Rheumatische Arthritis, Osteoarthritis, dekompensierte Zirrhose, Bronchopulmonale Dysplasie, GvHD, Anämie, Schlaganfällen, Autismus, Schizophrenie, Rückenmarksverletzungen, Asthma, Autoimmunerkrankungen, Hauterkrankungen, Knochenfrakturen und Altersschwächen eingesetzt (*clinicaltrials.gov*). Davon befinden sich ungefähr die Hälfte aller klinischen Studien bereits in Phase 2 oder höher (Abbildung 2–4). Als Zelltherapie zur Behandlung von Schädigungen infolge der neuartigen SARS-CoV-2-Infektionen befinden sich bereits 33 klinische Studien in Phase 2 und 3 (*clinicaltrials.gov*, abgerufen am 24.09.20, Erkrankung: ‚*Covid 19*‘, Eingriff/Behandlung: ‚*mesenchymal stem cells*‘, Filter: ‚*cell therapy*‘, Phase 2 bis Phase 4).

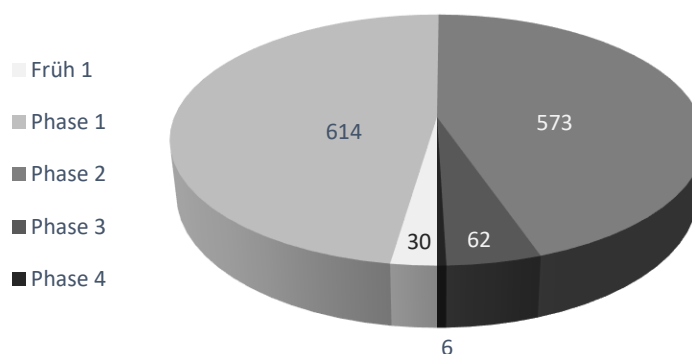


Abbildung 2–4: Anzahl klinischer Studien mit MSCs in Bezug auf die aktuellen klinischen Phasen (Quelle: *clinicaltrials.gov*, aufgerufen am 24.09.2020 mit Eingriff/Behandlung: ‚*mesenchymal stem cells*‘).

Eine über 20-jährige Erfahrung und große Fortschritte in präklinischen sowie klinischen Studien weisen auf ein großes Potential von MSC-basierten Therapien hin⁶. Allerdings führen Publikationen und klinische Studien mit heterogenen und widersprüchlichen Ergebnissen fortwährend zu einem Diskurs über die Anwendungsmöglichkeiten in der regenerativen Medizin^{19,174}. Die Ursache liegt hauptsächlich darin begründet, dass bei den Vorbehandlungsprozessen und Protokollen viele verschiedene Faktoren einen Einfluss auf die MSC-Eigenschaften haben können (Abbildung 2-5) und bislang noch keine optimale Behandlungsstrategie für MSCs etabliert werden konnte^{19,175}. Beispielsweise haben vor allem der Zellursprung wie das Spenderalter, der Gesundheitszustand des Spenders und die Gewebequelle der MSCs sowie die *ex vivo* Kultivierungsbedingungen einen grundlegenden Einfluss auf die finalen Eigenschaften der Zellen und können für den Therapieerfolg ausschlaggebend sein^{19,89,176}.

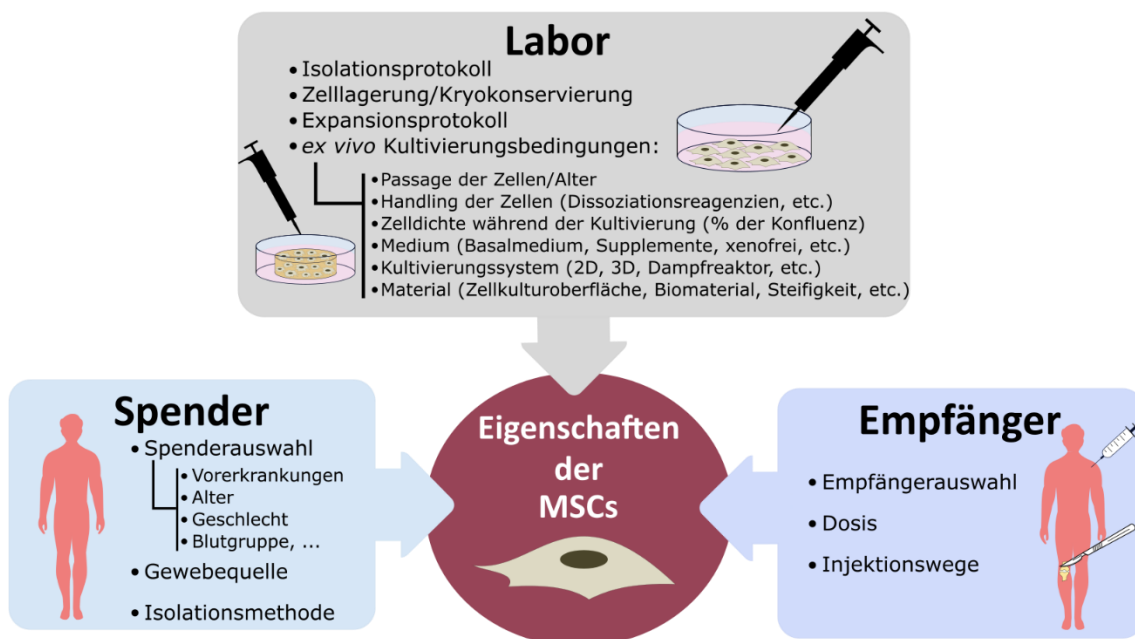


Abbildung 2–5: Einflussfaktoren auf die Zelleigenschaften und den damit zusammenhängenden Erfolg von MSC-basierten Anwendungen.

Da klinisch relevante Zellzahlen für MSC-basierte Therapien in der Regel lediglich über eine *in vitro* Expansion isolierter Zellen erreicht werden, spielen neben Schlüsselfaktoren wie die Zellquelle, die Spender und Empfänger, Injektionswege, Dosis und die Isolationsmethode auch Expansionsprotokolle eine essenzielle Rolle für die finale Zellqualität und das Behandlungsergebnis. Aus diesem Grund ist die Optimierung und Standardisierung der Isolations- und Expansionsverfahren von MSCs für zukünftige klinische Anwendungen von entscheidender Bedeutung. Nur bei anwendungsspezifischen und standardisierten Kultivierungsprotokollen kann eine reproduzierbare Qualität der Zellen erreicht und das klinische Potential (immunmodulatorische und stromale Funktionen, *in vitro* Proliferations- und Differenzierungspotential, Minimierung des Infektions- und Abstoßungsrisikos) der MSCs für den Einsatz in zellbasierten Therapien und im *Tissue Engineering* vollkommen ausgeschöpft werden^{10,19,54,177}. Zu den

entscheidenden Kultivierungsfaktoren, wie dem Isolations-, Expansionsprotokoll oder der Zelllagerung gehören auch Kultivierungsbedingungen wie beispielsweise die Zellpassage, das Kultivierungsmedium, das (Bio)Material oder das Kultivierungssystem. Insbesondere die Dimension des Kultivierungssystems hat einen entscheidenden Einfluss auf die Zellqualität. Im folgenden Kapitel wird daher näher auf 2D- und 3D-Zellkultursysteme eingegangen.

2.3 2D- und 3D-Zellkultursysteme

Standardmäßig werden adhärente Zellen wie MSCs im Labor auf speziellen Oberflächen von Kulturflaschen oder Mikrowellplatten kultiviert. In einer solchen 2D-Kultur bilden die Zellen einen Monolayer, sodass das Zellwachstum auf zwei Raumrichtungen begrenzt und durch die Größe der Kultivierungsoberfläche eingeschränkt ist^{34,178}. Aufgrund der Limitierung der Wachstumsfläche müssen die Zellen regelmäßig passagiert werden, um eine Konfluenz und eine resultierende Ablösung des Zellrasens zu vermeiden. Zur Spaltung der Zell-Plastik- (meist modifizierte Polystyrol-Oberflächen) und Zell-Zell-Verbindungen finden standardmäßig Enzyme wie Trypsin oder Enzymcocktails für sensiblere Zellen (z.B. Accutase) Anwendung. Die notwendige enzymatische Spaltung der Zellverbindungen 2D-kultivierter Zellen kann unterschiedliche Einflüsse auf die Zelleigenschaften sowie die Seneszenz der Zellen haben^{179,180}. Obwohl 2D-Kultivierungssysteme sehr große Unterschiede zu den *in vivo* Zellbedingungen aufweisen, können 2D-kultivierte Zellen jedoch in einigen Versuchsaufbauten Vorteile bieten. So kann beispielsweise eine schnelle Zellexpansion in 2D für *High-Throughput-Screenings*, autologe Chondrozyten Transplantationen (ACT) sowie für individualisierte Implantate vorteilhaft sein (vereinfachter Zugang und erleichterte Verwendung von MSCs für *Tissue-Engineering-Strategien*)¹⁸¹. Um die therapeutische Effizienz von 2D-kultivierten MSCs zu steigern, besteht trotz jahrelanger experimenteller und klinischer Erfahrung in der 2D-Zellkulturtechnik noch stets Bedarf an optimierten und standardisierten Protokollen.

Im Vergleich zu den traditionellen 2D-Zellkulturen spiegeln 3D-Zellkultursysteme die *in vivo* Umgebung der Zellen besser wider (Abbildung 2-6). Insbesondere physiologische Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte und -Interaktionen sowie das Diffusionsverhalten können nur in 3D-Zellkultursystemen simuliert und analysiert werden^{34,182}. Freigesetzte Signalmoleküle von 2D-kultivierten Zellen werden direkt im größeren Volumen des Zellkulturmediums verdünnt, anstatt konzentrations- und ortsabhängig auf andere Zellen wirken zu können. Des Weiteren können in 2D-Kultursystemen keine physiologischen Gradienten von Signalmolekülen, Metaboliten und Sauerstoff erzeugt werden. Mechanische Kräfte wie Kompression, Dehnung oder Scherspannung, die in lebenden Organismen auf die Zellen wirken und diese beeinflussen, können in 2D-Zellkultursystemen nicht imitiert werden. Bezüglich der angiogenen und immunmodulatorischen Faktoren weisen 3D-kultivierte MSCs im Vergleich zu 2D-kultivierten Zellen eine höhere Qualität auf¹⁸³⁻¹⁹⁰. Darüber hinaus dokumentierten mehrere Arbeitsgruppen, dass die Dimension

des Kultursystems einen direkten Einfluss auf das zelluläre Verhalten und die Funktionalität hat^{182,191–193}. Aus diesen Gründen nimmt die Bedeutung von 3D-Kultivierungssystemen in der Grundlagenforschung, bei der Isolation und Zellexpansion, beim Wirkstoffscreening, bei Toxizitätsstudien sowie beim *Tissue Engineering* stetig zu^{194–202}.

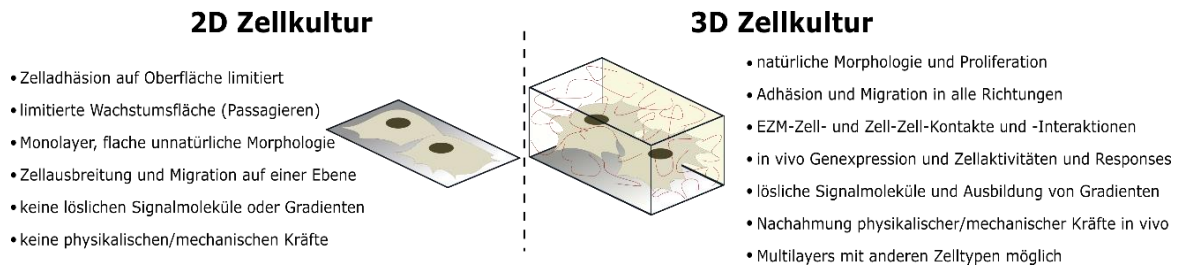


Abbildung 2–6: Vergleich zwischen 2D und 3D Zellkultur.

Für eine optimale Wirkungsweise der 3D-kultivierten Zellen und eine möglichst große Annäherung an die Wachstumsbedingungen *in vivo* wird ein anwendungsspezifisches 3D-Zellkultursystem benötigt. Zu den 3D-Zellkulturmodellen gehören gerüstfreie Zellaggregate (Sphäroide), natürliche oder synthetische Gerüste (Scaffolds), sowie die Einkapsulierung in Hydrogelen^{203,204}. Außer bei der Verwendung von Sphäroiden sind Faktoren wie das ausgewählte Biomaterial und dessen Porosität und Steifigkeit für die Anwendung bedeutend. Gerüststrukturen aus Biomaterialien stellen eine physiologischere Mikroumgebung für die Zellen dar und können sowohl physikalische als auch biochemische Signale, wie beispielsweise Zelladhäsionsstellen, aufweisen^{191,195}. Beim Design neuer Gerüste müssen oberflächliche, mechanische, physikalische, morphologische und chemische Eigenschaften genau berücksichtigt werden, da diese einen direkten Einfluss auf die Zelleigenschaften haben können^{191,195}. Beispielsweise reguliert die Steifigkeit eines Scaffolds das Expressionsmuster von Zelloberflächenmarkern und kann die Differenzierungspräferenz von MSCs *in vitro* bestimmen^{120–123,205–209}. Demnach besitzt eine sehr steife Matrix das Potential die osteogene Differenzierung von hAD-MSCs, unabhängig vom Vorhandensein spezifischer Wachstumsfaktoren, zu induzieren^{122,123}. Demgegenüber begünstigt eine weiche Matrix beispielsweise die Induktion der Adipogenese^{210–215}. In der Medizin unterscheidet man zwischen zwei Hauptgewebetypen, dem *Soft Tissue* und dem *Hard Tissue*. Im Folgenden wird auf diese Gewebetypen näher eingegangen.

2.3.1 Soft tissue

Im *Soft Tissue Engineering* werden aus natürlichen und synthetischen Biomaterialien Gerüststrukturen für den Einsatz im Weichgewebe entwickelt. Zu den Weichgeweben zählen mit Ausnahme von Knochen und Zähnen nahezu alle Gewebe im Körper, wie beispielsweise das Hautgewebe, Organe, Nerven, Sehnen oder Bänder.

Für die Herstellung von *soft tissues* in der regenerativen Medizin stellen sich einige Herausforderungen an das 3D-Kultivierungssystem. Zum einen sollte, neben der Simulation einer möglichst nativen EZM, die Stabilität der 3D-Gerüststruktur während des Kultivierungsprozesses erhalten bleiben und eine mechanische Unterstützung der Zellen gewährleisten sein²¹⁶. Zum anderen ist es gleichzeitig erforderlich, dass die Gerüststruktur den weichen Charakter des Gewebes simuliert. Aus diesem Grund haben sich in den letzten zwei Jahrzehnten vor allem Hydrogele als gängigstes *Tissue Engineering*-Scaffold für *soft tissues* herausgestellt. Sie bieten eine variable multifunktionale Plattform für die *in vitro* 3D-Zellkulturforschung, das *Tissue Engineering* und das Bioprinting^{195,204,217,218}.

Neben der Aufrechterhaltung ihrer spezifischen 3D-Struktur können Hydrogele die native EZM simulieren und schaffen zusätzlich aufgrund ihres hohen Wassergehaltes eine ideale Umgebung für das Überleben von Zellen²¹⁹⁻²²². Hydrogele können aus einer Vielzahl synthetischer und natürlicher Moleküle hergestellt werden und ihre Eigenschaften sind den Anforderungen des Zellmodells (Steifigkeit, Viskosität, Porenarchitektur, Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD)-Motive etc.) entsprechend regulierbar^{195,222-229}. Zu den verbreitetsten natürlichen Materialien, die für Hydrogele verwendet werden, gehören Kollagen, Gelatine, Hyaluronsäure, Elastin, Fibrin, Alginat, Chitosan und azelluläre Matrix²²⁹⁻²³³. Die Verwendung azellulärer Matrix hat jedoch einige Nachteile wie beispielsweise mögliche Abstoßungsreaktionen im Falle einer allogenen Transplantation^{234,235}. Hingegen zeichnen sich die natürlichen Materialien durch Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit, einer geringen Zytotoxizität, die Möglichkeit das Hydrogel zu einem injizierbaren Gel zu modifizieren und die Ähnlichkeit zu der physiologischen Umgebung aus. Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Materialien für Hydrogele sind allerdings aufgrund möglicher Chargenschwankungen und dem Fehlen guter mechanischer Eigenschaften limitiert. Aus diesem Grund werden natürliche Hydrogele vermehrt chemisch modifiziert oder mit synthetischen Hydrogelen kombiniert, um modifizierbare semi-synthetische Hydrogele oder variable Kompositpolymere herzustellen^{221,229,232,236-238}.

Gelatine gehört zu den natürlichen und kostengünstigen proteinbasierten Polymeren, die neben einer hohen Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit gelformende Eigenschaften und das Vorhandensein von bioaktiven Motiven, den sogenannten RGD-Motiven, aufweisen^{221,222,239-243}. Die RGD-Motive unterstützen die fokale Adhäsion der Zellen. Aufgrund dieser charakteristischen Eigenschaften eignen sich gelatinbasierte Hydrogele optimal für die Anwendung in der regenerativen Medizin^{222,239,244}.

Über eine Derivatisierung mit Methacrylsäureanhydrid kann aus Gelatine das semi-synthetische Hydrogel Gelatine-Methacryloyl (GelMA) hergestellt werden^{195,240,245,246}. Hierbei werden die Lysin- und Hydroxyl-Reste mit Methacrylamid- und Methacrylat-Seitengruppen modifiziert. Nach Zugabe eines Photo-Initiators, der freie Radikale bereitstellt, ist eine Polymerisation mittels Photo-Crosslinking möglich. Dabei werden unter UV-Licht kovalente Bindungen aufgebrochen und neu geknüpft, sodass eine

Quervernetzung erfolgt. Variiert man das Verhältnis zwischen Gelatine und Methacrylsäureanhydrid bei der Herstellung, entstehen verschiedene Sorten von GelMA, die sich hinsichtlich ihrer Anzahl an Quervernetzungen unterscheiden. Dieser Grad der Funktionalisierung (*degree of functionalization*, DoF) ist charakteristisch für viele Eigenschaften der GelMAs¹⁹⁵. Beispielsweise kann über den DoF die Porengröße, die Viskosität, die Steifigkeit des Hydrogels und das damit verbundene Zellwachstum und die Zellausbreitung beeinflusst werden. Zusätzlich kann über die UV-Intensität und die Hydrogelkonzentration das Endprodukt weiter modifiziert werden^{195,247}. In GelMA konnten zudem Matrix-Metalloproteinase Zielsequenzen nachgewiesen werden, welche die Zellremodellierung erleichtern²²¹. Aufgrund der schwachen mechanischen Eigenschaften und der schnellen Degeneration sind die Anwendungsgebiete von GelMA Hydrogelen jedoch bislang limitiert^{228,248}. *Suo et al.* konnten stabilere Hydrogele mit einem geringeren Quellverhalten und einer langsameren Degradation erreichen, indem sie eine Mischung aus Gelatine und Glucosamin mit Acrylat-Gruppen derivatisierten und unter UV-Licht kovalent verknüpften. Daraus resultierende Vorteile sind eine stärkere Zelladhäsion und ein verbessertes Zellwachstum auf der Hydrogeloberfläche²⁴⁹.

Semi-synthetische Hydrogele wie GelMA können über die Zugabe spezieller Additive weiter modifiziert werden²⁵⁰⁻²⁵². Additive mit scherverdünnenden Eigenschaften, wie beispielsweise Alginat, Alginat-Modifikationen (z.B. Alginat-2-Hydroxyethylmethacrylat), Gellan Gum oder Nanopartikelzusätze (z.B. Silikat-Nanopartikel), erfüllen den Zweck die Viskosität der Hydrogele zu steigern, um beispielsweise die 3D-Bioprintbarkeit zu vereinfachen^{195,251,252}. Das 3D-Bioprinting stellt eine fortschrittliche 3D-Zellkulturtechnik dar, bei der eine größere räumliche Kontrolle der Zellverteilung und Zellorganisation erreicht werden kann. Dank der zahlreichen Modifikationsmöglichkeiten und der 3D-Bioprintbarkeit von Hydrogelen bieten sich vielfältige Anwendungsbereiche. Neben der Verwendung zur *in vivo* Geweberegeneration und als wundheilende Bio-Klebstoffe, können Hydrogele auch für die künstliche Gewebeproduktion sowie *in vitro* zur Untersuchung von biologischen Prozessen wie beispielsweise zur Toxizitäts- und Medikamententestung genutzt werden^{195,219,229}. Die Einführung reproduzierbarer Methoden zur Kultivierung von MSCs in *soft tissues* könnte das therapeutische Potential und die Effektivität noch weiter steigern⁹¹.

2.3.2 Hard tissue

Knochenfrakturen, Osteoporose, Osteoarthritis und Knochentumore stellen häufige, lange bekannte und bedeutende klinische Probleme dar²⁵³. Ebenso gibt es im Bereich der Schädel-, Kiefer- und Gesichtschirurgie viele Krankheitsformen, die zum Teil bereits im Säuglingsalter ein schnellstmögliches Handeln erfordern²⁵⁴⁻²⁵⁹. Aus diesem Grund wird im Bereich des *Hard Tissue Engineerings* insbesondere die Erforschung und Entwicklung optimaler Implantatmaterialien vorangetrieben. Zu Beginn wurden vor allem Keramiken und Bio-Glas als Biomaterialien eingesetzt. Allerdings liegt die Beständigkeit vieler

herkömmlicher Implantatmaterialien zwischen 10 und 15 Jahren und bei ihrer Verwendung treten häufig Implantatlockerungen, Entzündungen, Infektionen, Osteolyse und Abrieb auf^{260–267}. Dementsprechend liegt der Fokus mittlerweile primär auf biokompatiblen und biodegradierbaren temporären Implantatmaterialien, die nach der Operation von dem umgebenden Gewebe ersetzt werden können und somit die Regenerationszeit der Patienten verkürzen und weitere Operationen und damit einhergehende Risiken postoperativer Infektionen erübrigen^{239,268–275}. Insbesondere bei Säuglingen würde das fortschreitende Wachstum eine zweite Operation zur Entfernung eines permanenten Implantats erfordern. Diese Operation kann durch die Verwendung biokompatibler resorbierbarer Implantate vermieden werden^{32,258}. Die optimale *in vivo* Degradationsrate entspricht dabei der Geweberegenerationsrate, sodass resorbierbare Implantate nur so lange im Körper des Patienten verbleiben, bis sich das körpereigene Gewebe selbst regeneriert hat^{276,277}.

Zu den bekanntesten Biopolymeren für temporäre Implantatmaterialien gehören Polycaprolactone, Polylactide (*polylactic acid*, PLA) und Polyglykolide (*polyglycolic acid*, PGA)²⁷⁸. Diese Polymere werden im Körper von organischen Säuren und Esterasen abgebaut, anschließend als Monomere weiter metabolisiert und ausgeschieden²⁷⁵. Da jedes Material verschiedene Eigenschaften und somit unterschiedliche Vor- und Nachteile besitzt, werden zunehmend diverse Materialien kombiniert³⁴. Eines der am häufigsten verwendeten biokompatiblen Copolymere im Bereich des *Tissue Engineering* ist Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA)^{279–285}. Das PLGA verfügt über gute mechanische Eigenschaften wie eine hohe Festigkeit, hervorragende Prozessierbarkeit und eine spezifisch regulierbare Degradationsdauer. Die Degradationszeit kann über das Verhältnis von Milchsäure (LA) und Glykolsäure (GA) (LA:GA) individuell für die jeweilige Verwendung angepasst werden^{279,282,286,287}.

Die Etablierung des 3D-Drucks im Gebiet der regenerativen Medizin bietet die Möglichkeit der schnellen Herstellung eines individuellen, an den Körper und die Bedürfnisse des Patienten angepassten Implantates, das zusätzlich die Lebensqualität und Lebenserwartung des Empfängers steigern kann^{30,34,288–292}. In der bioregenerativen Medizin hat sich vor allem das *fused deposition modeling* (FDM) als 3D-Drucktechnik für synthetische Polymere durchgesetzt²⁹². Mittels dieses weit verbreiteten und kostengünstigen Schicht-für-Schicht-Verfahrens (additive Fertigung) kann eine Vielzahl an Materialien präzise gedruckt werden^{31,286,292–294}. Je nach Anwendung kann ein bestimmtes Polymer verwendet oder ein Copolymer wie PLGA modifiziert werden, um Hydrophobie, Degradationszeit, Stabilität und mechanische Eigenschaften präzise einzustellen^{30–32,294}. Einer der größten Vorteile ist die reproduzierbare Herstellung, die die preiswerte Produktion von Ersatzprodukten für Spenderorgane ermöglicht²⁹². Wie bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte, können 3D-gedruckte Scaffolds die gewünschten Zellphänotypen und die Morphologie erhalten, während sie die Bildung von funktionellem Gewebe stimulieren und die spezifische Differenzierung fördern können^{33,286,295–300}. Insbesondere aber die Möglichkeit der Kombination von alloplastischen resorbierbaren Materialien wie PLGA mit dem

Verfahren des 3D-Drucks erlaubt die Herstellung hochpersonalisierter, an die spezifischen Anforderungen des Patienten angepasster Implantate³². Solche individuellen Implantate können über die Umwandlung der Ergebnisse medizinischer Bildgebungsverfahren wie Röntgen, Computer- (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) in 3D-Objekte realisiert werden^{149,301–303}. Ein detaillierteres Design kann zu einer verbesserten Regenerationsdynamik und einem besseren Behandlungsergebnis führen²⁹⁴. Der Behandlungserfolg kann zudem weiter gesteigert werden, wenn die 3D-gedruckten Konstrukte vor der Implantation mit patienteneigenen Zellen wie beispielsweise MSCs besiedelt werden, um den Heilungsprozess zusätzlich zu unterstützen²⁹. Für die erfolgreiche Etablierung solcher autologen Implantate für das *Hard Tissue Engineering* sind jedoch xenofreie optimierte Kultivierungsprotokolle essenziell.

2.4 Existierende Protokolle und deren Einfluss auf die *in vitro* Kultivierung von primären mesenchymalen Stammzellen

Zahlreiche Publikationen betonen die Bedeutung der *ex vivo* Manipulation von MSCs für den klinischen Erfolg^{76–78,304–307}. Um eine klinisch relevante Zellzahl und die Funktionalität der Zellen nach der Implantation zu erhalten, ist eine *ex vivo* Expansion und Präkonditionierung entscheidend^{19,304,307,308}. Da der Wirkmechanismus bei der Behandlung verschiedener Erkrankungen nicht im Detail erforscht ist, müssen alle ursprünglichen MSC-Funktionen aufrechterhalten bleiben. Dazu gehören die Erhaltung aller Rezeptoren (Aufnahme externer Stimuli) und Adhäsionsmoleküle (für Migration, *Homing* und der Interaktion mit anderen Zellen) sowie die Produktion von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und extrazellulären Vesikeln (für die stromale Funktion)^{1,19,27}. Für eine erfolgreiche klinische Anwendung und eine reproduzierbare Produktion von Zellen unter GMP-konformen Bedingungen müssen die Expansionsverfahren für MSCs effektiv, sicher und genau definiert sein sowie kontrollierte Bedingungen entwickelt und etabliert werden^{304,307,308}. Bis zum heutigen Zeitpunkt fehlt es jedoch an allgemeinen standardisierten *in vitro* Expansionsprotokollen. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da die Kulturbedingungen einen Einfluss auf das Transkriptom, das Proteom und die zelluläre Organisation der MSCs haben können und damit wiederum das *Engraftment* und die MSC-Eigenschaften sowie das MSC-Verhalten nach erfolgter Transplantation beeinflussen³⁰⁹.

Die Wahl eines geeigneten Wachstumsmediums für die *in vitro* Kultivierung ist der wichtigste und entscheidende Schritt für ein optimales Zellwachstum³¹⁰. Ein herkömmliches Zellkulturmedium setzt sich aus einem Basalmedium, welches aus einer Ergänzung von Aminosäuren, Vitaminen, anorganischen Salzen und Energiequellen (Glukose und Glutamin) besteht und einem Serum als Quelle von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Bindungsfaktoren zusammen (Abbildung 2–7)^{307,310–315}. Zusätzlich zu den Nährstoffen trägt das Medium auch zur Aufrechterhaltung des pH-Werts und der Osmolalität bei³¹⁰. Die Anforderungen an das Medium können abhängig vom Zelltyp variieren und resultieren in einer

großen Anzahl an verwendeten Medienzusammensetzungen^{310,316}. Da jede der Komponenten im Basalmedium eine bestimmte Funktion erfüllt, kann bereits die Wahl des Basalmediums ausschlaggebend für den Kultivierungserfolg von MSCs sein. Auch wenn Langzeitkultivierungen negative Auswirkungen auf die Migration, Differenzierung, genetische Stabilität und Proliferation von MSCs haben können^{317,318}, kann eine schnelle Expansion nicht unbedingt die Qualität der zellbasierten Produkte garantieren. Die Verwendung von *high glucose* Medium kann zwar aufgrund der leichten Verfügbarkeit von Glukose zu einem schnellen Zellwachstum führen, Zhang *et al.* und Parsch *et al.* zeigten allerdings, dass eine hohe Glukosekonzentration (größer als 1 g/L) zelluläre Seneszenz sowie eine Telomerverkürzung und genomische Instabilität zur Folge haben kann^{319–321}. Für humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (*human bone marrow derived mesenchymal stem cells*, hBM-MSCs) konnten Sotiropoulou *et al.* zeigen, dass das *low-glucose* Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (α -MEM) (1 g/L Glukose) ein vorteilhafteres Basalmedium darstellt als beispielsweise Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1–4,5 g/L Glukose)³²² und Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) (4,5 g/L)³²³.



Abbildung 2–7: Zusammensetzung herkömmlicher Kultivierungsmedien.

Für ein optimales Zellwachstum werden dem Basalmedium Mediensupplemente hinzugegeben. Das Serum gilt hierbei als eines der wichtigsten Komponenten des Zellkulturmediums und dient als Quelle für viele für die Zellfunktionen entscheidende Faktoren^{307,310}. Beispielsweise versorgt das Serum die Zellen mit Grundnährstoffen und mit an der Wachstumsförderung und spezialisierten Zellfunktionen beteiligten Molekülen (Wachstumsfaktoren und Hormone) sowie mit Bindungsproteinen (z.B. Albumin, Transferrin) und Zelladhäsionsproteinen (z.B. Fibronectin). Auch Faktoren zur Unterstützung der Zellausbreitung sowie Proteaseinhibitoren, Mineralien (z.B. Na⁺, K⁺, Zn²⁺, Fe²⁺) und Spurenelemente werden von dem Serum bereitgestellt³²⁴. Das gängigste und am weitesten verbreitete Zellkulturmediumsupplement ist das fetale Kälberserum (FKS). Bis heute wird es in den meisten Zellisoliations- oder Expansionsprotokollen für klinische Studien zur Supplementierung verwendet^{6–8,10–15,325–327}. Obwohl verschiedene Nachteile im Zusammenhang mit der Verwendung von FKS bestehen, auf die in Abschnitt 2.4.2 näher eingegangen wird, gibt es bislang keine allgemein akzeptierten Alternativen für FKS^{3,7,8,10–14,77,328}. Eine geeignete

Alternative zu FKS sollte idealerweise eine wohldefinierte Zusammensetzung, einen möglichst reduzierten Grad an Verunreinigungen, niedrige Produktionskosten, lange Haltbarkeit und eine einfache Verfügbarkeit gewährleisten^{307,310}. In der Literatur wird bei Alternativen insbesondere zwischen chemisch definierten Medien und humanen Blutderivaten (z.B. HS, hPL) als Mediensupplemente unterschieden²⁷. In den folgenden Abschnitten werden chemisch definierte Medien und die konventionellen Mediensupplemente näher betrachtet.

2.4.1 Serumfreie und chemisch definierte Medien

Die Entwicklung serumfreier chemisch definierter Medien kann die Reproduzierbarkeit, das Upscaling und die Kosten von Zellkultivierungen verbessern.^{329,330} Sie enthalten weder Proteine, Hydrolysate oder andere Komponenten unbekannter Zusammensetzung. Die in der Vergangenheit größtenteils noch aus humanem oder tierischem Serum isolierten und aufgereinigten Hormone oder Wachstumsfaktoren können inzwischen größtenteils rekombinant hergestellt werden und ermöglichen damit die Produktion von vollständig xenofreiem chemisch definierten Medium^{316,330}.

Insbesondere für die stetig wichtiger werdende Qualitätssicherung sollen im Rahmen der guten Zellkulturpraxis (*good cell culture practice*, GCCP) allgemein geltende Standards für *in vitro* Methoden entwickelt werden. Zu diesen Standards zählt unter anderem auch die Einführung der Verwendung von chemisch definierten Medien und der damit einhergehenden Abwendung von tierischen, undefinierten Supplementen mit variabler Zusammensetzung^{305,316,331-334}.

Da MSCs abhängig von ihrer Isolationsquelle und des Spenders stark variieren können, bestehen verschiedene spezifische Anforderungen an die Medienzusätze eines für die Zellen optimalen chemisch definierten Mediums. Aus diesem Grund stellt die Entwicklung eines universellen chemisch definierten Mediums bislang noch eine große Herausforderung dar^{307,316}. Für einige Zelltypen sind spezifisch definierte Medienzusätze (serum- und/oder xenofrei) bereits kommerziell erhältlich. Allerdings bestehen für eine universelle Anwendung in der MSC-Expansion im klinischen Maßstab noch viele limitierende Nachteile. Verschiedene Studien wiesen abhängig von den chemisch definierten Medien Variationen bezüglich der Zellverdoppelungszeiten, den Zellmorphologien und -größen sowie Veränderungen der Zellvakuolen auf^{307,330,335,336}. Ähnlich zu serumhaltigen Medien kann auch die Qualität beziehungsweise Aktivität der in den chemisch definierten Medien enthaltenen biologischen Substanzen eine Variabilität zwischen verschiedenen Chargen hervorrufen, welches wiederum die Reproduzierbarkeit der Experimente beeinträchtigen kann^{307,337}. Zusätzlich erfordern viele der derzeit verfügbaren chemisch definierten Medien eine Präinkubation in serumhaltigen Medien oder eine Vorbeschichtung der Kultursubstrate mit EZM-Proteinen, um die Zelladhäsion zu unterstützen^{307,310,316,338-340}. Die Proteine zur Beschichtung sind wiederum oftmals tierischen Ursprungs, sodass in diesem Fall mit den chemisch definierten Medien keine komplett xenofreie Kultivierung ermöglicht werden kann^{14,316}.

Bislang führen kommerziell erhältliche chemisch definierte Medien verglichen mit Serum oder xenogen supplementierten Medien oft zu einem nicht optimalen Wachstum und können daher nicht für primäre adhärenzte Zellen universell verwendet werden³³⁷. Aus diesen Gründen bedarf es bis zur Optimierung von chemisch definierten Medien für MSCs einer Kultivierung mit Supplementen. Jedoch stellen sich auch bei der Wahl der Mediensupplemente gewisse Herausforderungen, auf die in den nächsten Abschnitten (Kapitel 2.4.2 und 2.5) näher eingegangen wird.

2.4.2 Konventionelle Mediensupplemente

Mit der ersten Isolation und Kultivierung von MSCs begannen vor über 50 Jahren auch die ersten Versuche der Verwendung von humanen und xenogenen Seren zur Nährstoffversorgung von Zellen^{9,42}. Das aus Kälberherzen gewonnene FKS hat sich seither als Standardsupplement in der Zellkultur etabliert und wird nach wie vor in den meisten Isolations- und Kultivierungsprotokollen für klinische Studien/Zellen verwendet^{6-8,10-15,325-327}. Es ist ein sehr komplexes Supplement, das eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Adhäsionsproteinen, Bindungs- und Transportproteinen, Vitamine, Aminosäuren, Kohlenhydrate und Hormone zur Verfügung stellt, die für das Zellwachstum benötigt werden^{7,305,307,341}. Außerdem lässt sich FKS kostengünstig herstellen, wird uneingeschränkt produziert und kann daher leicht erworben werden⁶.

Pro Jahr werden zwischen 500 000 und 800 000 Liter FKS für Zellkulturlabore produziert. Um solche Mengen an FKS zu erhalten, müssen bis zu zwei Millionen Kälber sterben^{4,5}. Das Serum wird den Föten schwangerer Schlachtkühe direkt per Herzpunktion und ohne jegliche Form der Anästhesie entnommen^{6,305,307,316,342}. Während dieser Methode werden die Föten einer Anoxie, einem starken Sauerstoffmangel ausgesetzt. Auf diese unethische Serumgewinnung wird zurückgegriffen, da im fetalen Stadium das Blut und somit das daraus gewonnene Serum mehr Wachstumsfaktoren und weniger Antikörper als im fortgeschritteneren Alter enthält⁷. Unabhängig des geringen Antikörpertiters können bovine, xenogene Verbindungen wie Proteine oder Polysaccharide während der Kultur von den Zellen internalisiert werden. Nach einer erfolgten Trans- oder Implantation können daher selbst bei der Verwendung autologer Zellen immunologische Reaktionen hervorgerufen werden^{343,344}. Des Weiteren werden Kühe nicht unter kontrollierten Laborbedingungen gehalten und sind somit Umwelteinflüssen und Pathogenen ausgesetzt, welche über die Plazentaschranke direkt auf den Fötus übertragen werden können³⁰⁵. Auf diesem Wege kann die Verwendung von FKS bei der Kultivierung humaner Zellen zu einer Übertragung von Kontaminationen (z.B. Pilze, Mykoplasmen oder Endotoxine) oder übertragbaren Infektionskrankheiten durch Viren (z.B. der bovine Adenovirus, Parovirus, Reovirus, Parainfluenza-3-Virus, bovine virale Diarrhöe (BVD), Tollwut oder Blauzungenvirus), Bakterien oder Prione (z.B. bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE), Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)) auf den Patienten führen^{3,7,77,305,328,341,345-352}.

Neben den ethischen und immunologischen Bedenken stellt auch die Variabilität der FKS-Chargen einen Nachteil für die klinische Verwendung dar. Trotz der jahrelangen Nutzung und Erforschung von FKS, konnten weder alle Bestandteile identifiziert und definiert noch der molekulare Wirkmechanismus hinter dem positiven Effekt von FKS auf das Zellwachstum geklärt werden⁴. Darüber hinaus besteht keine einheitliche Qualität zwischen den Chargen und die Konzentrationen an Wachstumsfaktoren und anderen Biomolekülen kann von Charge zu Charge stark variieren^{307,353-355}. Dies wiederum kann einen Einfluss auf das Differenzierungspotential der Zellen *in vivo* haben und zu phänotypischen Unterschieden in den Zellkulturen und damit zu Abweichungen in den Ergebnissen führen^{305,307,356-359}. Zusätzlich können individuelle Produktionsabläufe der Hersteller für weitere Qualitätsunterschiede einzelner Chargen sorgen. Dies führt dazu, dass nur ungefähr ein Drittel der jährlichen Produktion von FKS als GMP-konform deklariert und verwendet werden kann^{6,7,10}.

Aufgrund der zuvor genannten Punkte wird die Verwendung von FKS für die MSC-Kultivierung sehr kontrovers diskutiert und es wird davon abgeraten, diese für klinische Anwendungen zu nutzen. Organisationen und regulatorische Richtlinien (WHO, GMP) empfehlen vielmehr die Verwendung einer xenofreien Alternative zur Entwicklung sicherer und standardisierter Protokolle zur MSC-Kultivierung und der Anwendung für zellbasierte Therapien sowie im *Tissue Engineering*^{7,305,307,316,341}.

Eine mögliche Alternative stellen Derivate aus humanem Blut, wie beispielsweise autologes oder allogenes HS oder hPL dar³⁰⁷. Aufgrund seines humanen Ursprungs und einer fördernden Wirkung auf die Zellexpansion wird HS bereits als mögliche Alternative zu FKS kommerziell vertrieben und eingesetzt³⁶⁰. In verschiedenen Studien zeigte HS bereits einen nachhaltigen Effekt auf die Differenzierungsfähigkeit und den Immunphänotyp von Zellen^{6,360-362}.

Gewonnen wird das HS von gesunden Spendern mittels einer Venenpunktion. Aufgrund des humanen Ursprungs kann das Risiko für Immunabstoßungsreaktionen sowie für die Übertragung von Infektionskrankheiten gesenkt werden^{307,363}. In verschiedenen vergleichenden Studien zur Verwendung von FKS und HS als Mediensupplemente zeigte HS einen zu FKS vergleichbaren und teilweise sogar verstärkten positiven Einfluss auf das Zellverhalten^{306,361,363-365}. Tateishi *et al.* demonstrierten sogar eine deutlich schnellere Proliferation und eine ausgeprägte Differenzierungsfähigkeit von humanen in HS-kultivierten MSCs bei gleichbleibender Genexpression und Proteinbiosynthese³⁶³.

Stute *et al.* zeigten, dass autologes HS für die MSC Isolation und Expansion die gleiche Effizienz aufweist wie FKS in vergleichbarer Konzentration und die osteogene Differenzierung der MSCs darüber hinaus sogar noch verstärken kann³⁶⁶. Um MSCs für die klinische Anwendung zu vermehren, wird allerdings eine große Menge des Serums benötigt, die nur schwer autolog gewonnen werden kann. Andererseits kann auch der Einsatz von allogenen HS aufgrund von Spendervariabilitäten nachteilig sein. Um dem vorzubeugen, bietet es sich an das gewonnene HS möglichst vieler diverser Spender zu poolen.

Witzeneder *et al.* untersuchten humane Alternativen zum FKS und entwickelten Protokolle für die HS Produktion. Unter anderem zeigten sie, dass ein Pooling von sechs verschiedenen Spendern bereits ausreichen kann, um die Variabilität zwischen den humanen Blutproben zu reduzieren³⁶⁷.

Trotz der vielen Vorteile und den größtenteils positiven Ergebnissen aus zahlreichen Studien ergeben sich weitere Nachteile für die Etablierung von HS als Mediumsupplement für klinische Studien^{361,363-365}. Da HS aus dem Blut gesunder Spender gewonnen wird, stellt dies einen limitierenden Faktor der Verfügbarkeit dar. Darüber hinaus ist die Herstellung von HS mit einem teuren und aufwändigen Verfahren verbunden, sodass die Produktion von HS inzwischen bereits rückläufig ist^{6,360-362}. Hinzu kommt, dass die Zusammensetzung des HS mit dem Alter und dem Geschlecht der Spender variiert und bisher keine Standardisierung zur Herstellung erfolgte. Aus diesen Gründen stellt HS bislang noch keine effiziente Alternative zu FKS für klinische Anwendungen dar^{6,7,305,307,365}.

Bis jedoch universelle chemisch definierte Medien entwickelt und kommerziell erhältlich sind, ist es notwendig existierende Alternativen zu FKS zu evaluieren. Von den verfügbaren humanen Blutderivaten hat sich bislang das hPL als vielversprechende Alternative zu FKS und HS etabliert und ist in den letzten zwei bis drei Jahren auch vermehrt kommerziell erhältlich. Im folgenden Kapitel 2.5 wird näher auf das hPL als vielversprechendes Mediumsupplement für die Zellkultur eingegangen.

2.5 Thrombozytenlysat als vielversprechendes Mediumsupplement

Das hPL ist ein effizientes alternatives Mediumsupplement, das verglichen zu dem bislang vorwiegend verwendeten kommerziellen FKS in vielen Studien in den Bereichen der Zellkultur bessere Ergebnisse liefert^{7,10,328,368,369}. Es ist ein zellfreies, protein- und wachstumsfaktorreiches biologisches Material, das viele Vorteile aufweist. Neben einer einfachen Herstellung aus humanem Thrombozytenkonzentrat (*platelet concentrate*, PC) in Übereinstimmung mit GMP-Richtlinien vereint die Verwendung von hPL moderne gesellschaftliche Prinzipien der Ethik, Nachhaltigkeit, Wiederverwertung und Ressourcenschonung^{3,7,10,27,370-372}. Zusätzlich kann der Einsatz von hPL für biologische Produkte und Arzneimittel für neuartige Therapien (*advanced therapy medicinal products*, ATMP) zu einer Reduktion der immunologischen und infektiologischen Risiken führen^{1,7,10,27,373}. In den nächsten Abschnitten werden die Gewinnung und Herstellung von hPL, die Bestandteile sowie die Verwendung näher erläutert.

2.5.1 Gewinnung und Herstellung von Thrombozytenlysat

Weltweit werden im Rahmen von Blutspendekampagnen Vollblutspenden oder reine Thrombozyten über Apheresespenden für Transfusionszwecke gesammelt. Über die Buffy Coat- oder *platelet-rich-plasma* (PRP)-Methoden können aus den Vollblutspenden anschließend ebenfalls GMP-konform PCs gewonnen werden^{10,371,372}. Für die Transfusionsmedizin besteht die Notwendigkeit einen ausreichend großen Bestand an Thrombozyten sicherzustellen, welche allerdings nur eine eingeschränkte Haltbarkeit von drei

bis sieben Tagen aufweisen. Aus diesem Grund werden in einigen Ländern zwischen 10 % und 20 % der produzierten PCs nicht transfundiert, sondern müssen verworfen werden¹⁻³. Allerdings können die abgelaufenen PCs bei -80 °C gelagert werden und eignen sich als Rohmaterial für die Herstellung von hPL, ohne die nachfolgende Zellkultivierung zu beeinträchtigen^{3,27}. Das Komitee der internationalen Gesellschaft für Bluttransfusionen (*international society of blood transfusion*, ISBT) geht von einer sicheren Verwendung (begrenztes Risiko eines Bakterienwachstums) von sieben Tage alten eingefrorenen PCs zur hPL Herstellung aus^{1,372}.

Aus den PCs kann über verschiedene Verfahren, wie beispielsweise Sonikation, Solvent/Detergent (S/D)-Behandlung und der Thrombozytenaktivierung mit Calcium oder Thrombin, hPL hergestellt werden^{6,10,372}. Die am weitesten verbreitete Methode ist allerdings das Lysieren der Thrombozyten über repetitive Gefrier- und Auftauzyklen^{10,374}. Die optimale Anzahl dieser Zyklen sowie das Temperaturoptimum der jeweiligen Schritte dieser sehr einfachen, schnellen und kostengünstigen Methode zur Herstellung von hPL sind noch nicht abschließend geklärt. Allerdings empfehlen verschiedene Studien zwischen drei und fünf Zyklen sowie Temperaturen von -70°C/+37°C, um den maximalen Gehalt an Wachstumsfaktoren zu erreichen^{1,369,375,376}. Die wiederholten Gefrier- und Auftauschritte beschädigen die Thrombozytmembranen und führen so zur Freisetzung von Proteinen und Wachstumsfaktoren aus den Zellen. Aggregate, Debris und Thrombozytenfragmente werden anschließend über Zentrifugations- und Filtrationsschritte entfernt^{10,371,372}.

Da Thrombozyten eine der heterogensten Komponenten des menschlichen Blutes darstellen (stark spenderabhängig: Alter, Geschlecht, Blutgruppe und Thrombozytenanzahl), werden normalerweise große Pools von hPL erzeugt, um großen Chargenschwankungen vorzubeugen^{10,370,374,377}. Aufgrund des inhärenten Risikos der Pathogenübertragung empfehlen verschiedene Richtlinien (z.B. europäische Pharmakopöe 13, Kapitel 5-2-12) die Spenderzahlen beim Pooling von hPL für die klinische Verwendung zu limitieren oder Methoden der Pathogeninaktivierung anzuschließen^{27,372,378}. Schallmoser *et al.* zeigten bereits 2013, dass ein Pooling von 15 Spenden die Variabilität vermindern und zur Standardisierung beitragen kann³⁷⁴. Zusätzlich ist der Schritt der Pathogeninaktivierung insbesondere für eine klinische Verwendung des Produkts im Rahmen der Qualitätskontrolle essenziell^{1,372}. Routinemäßig sollte bei der Herstellung von Thrombozytenlysat ein Sterilitätsnachweis über die Testung von Bakterien-, Mykoplasmen-, Pilz- und Endotoxinkonzentrationen durchgeführt werden (Intercept™ Blood System)^{1,27,307,370,372,379-381}.

Die physiologische Fibrinogenkonzentration in den aus den PCs hergestellten hPL-Chargen beträgt durchschnittlich 1 bis 3 mg/mL¹⁰. Diese hohe Konzentration hat eine Gelbildung des hPLs zur Folge. Da der Einfluss von Fibrinogen auf die Biologie der kultivierten Zellen noch nicht abschließend geklärt ist, wird es bislang meist nicht entfernt. Stattdessen wird in gängigen Herstellungsverfahren Heparin als

Antikoagulationsmittel hinzugegeben^{10,369,372,382,383}. Allerdings ist der Einsatz von Heparin aufgrund seines tierischen Ursprungs (extrahiert aus der Mukosa des Schweinedünndarms) und der Beeinträchtigung der Zellproliferation bei einer hohen Konzentration im Medium kritisch^{369,382,384-388}. Daher werden mittlerweile alternative Fibrinogendepletionsmethoden gesucht, um eine Gelierung von hPL zu verhindern und die Verwendung von Heparin zu vermeiden^{383,388}. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten hPL (DRK, NSTOB) erfolgte die Fibrinogenabreicherung über die Calciumpräzipitationsmethode mit einer anschließenden Filtration des hPLs³⁷².

In der Industrie sollte anschließend eine Standardisierung der hPL-Qualität über validierte Messungen relevanter Parameter (z.B. pH-Wert, Osmolalität, Wachstumsfaktoren, Proteine, Lipide, Zytokingehalt und proteomische Analysen) sichergestellt werden. Anschließend können Funktions- und Wirksamkeitsprüfungen der unterschiedlichen Chargen in Bezug auf die Zellproliferation, Morphologie, Differenzierung und die immunmodulatorische Kapazität der MSCs eine vergleichbare Qualität der hPL-Chargen gewährleisten^{1,27,370,372}.

2.5.2 Bestandteile des Thrombozytenlysates

Im menschlichen Körper befinden sich in einem Mikroliter Blut zwischen 150 000 und 400 000 Thrombozyten. Dies sind kleine kernlose Blutplättchen, die im Körper bei der Wundheilung eine wichtige Rolle spielen¹⁰. In den Thrombozyten befindet sich eine sogenannte Speichergranula, die sich aus Lysosomen (λ -Granula), einer δ -Granula (elektronendichte Granula) und der α -Granula zusammensetzt. In der Speichergranula der Thrombozyten sind viele bioaktive Substanzen enthalten, die mittels Exozytose freigesetzt werden können und in sehr unterschiedlichen Konzentrationen in den Thrombozyten vorliegen^{10,389,390}. Die Lysosomen der Thrombozyten enthalten hydrolytische Enzyme wie beispielsweise Kollagenase und β -Galaktosidase. Hingegen speichert die δ -Granula Moleküle wie Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Calcium und Serotonin^{10,391-393}. In der α -Granula befinden sich neben essentiellen Gerinnungsfaktoren ebenfalls Adhäsionsmoleküle, immunologische Moleküle, Chemokine sowie Wachstums- und Angiogenesefaktoren^{10,341,389,394,395}. Nach der Lyse der Thrombozyten liegen die bioaktiven Substanzen frei in der Lösung vor und können somit die mit hPL kultivierten Zellen beeinflussen. Die Proteinkonzentration im Thrombozytenlysat liegt vorwiegend zwischen 55 mg/mL und 65 mg/mL, von dem der Hauptbestandteil Albumin und Immunglobuline (ca. 80 % der Proteingesamtkonzentration) bildet. Wenn Fibrinogen nicht entfernt wird, liegt das Glykoprotein ebenfalls in einer hohen Konzentration im hPL vor.

Unter den regulatorischen Proteinen und Faktoren befinden sich viele Zytokine, wie der epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF), der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) und der sogenannte *vascular endothelial growth factor* (VEGF)³⁹⁶. Diese wiesen in *in vitro* Studien eine abhängige Unterstützung der Proliferation der MSCs auf und förderten

den Erhalt der Differenzierungsfähigkeit⁶. Zudem trägt der *transforming growth factor β* (TGF-β) nachweislich zur Induktion der chondrogenen Differenzierung von MSCs bei und fördert die Expression von Zelladhäsionsmolekülen²²¹. Reible *et al.* zeigten, dass der *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) bereits in geringen Konzentrationen zu einer verstärkten osteogenen Differenzierung von MSCs führen kann und somit indirekt einen positiven Einfluss auf die Knochenbildung hat^{396,397}. Mizuno *et al.* untersuchten den Einfluss des in hPL enthaltenen *platelet-derived growth factors* (PDGFs) auf die Proliferation von MSCs und wiesen eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferationsaktivität nach^{396,398}. Des Weiteren zeigten verschiedene Studien eine verstärkte Zelladhäsion bei der Zellkultivierung mit hPL, die auf verschiedene Adhäsionsfaktoren wie den von Willebrand Faktor (vWF), Fibronektin, Vitronektin und Thrombospondin zurückgeführt werden konnten³⁹⁹⁻⁴⁰².

Neben diesen Wachstumsfaktoren und den gut erforschten gerinnungsfördernden und -hemmenden Faktoren können regenerative Funktionen ebenfalls von aus Thrombozyten gewonnenen mikrobiziden Faktoren ausgehen (z.B. Komplement C3- und C4-Vorstufen, Komplementfaktor D, Matrix-Metalloproteinasen). Auch andere in den Speichergranula vorkommende Proteasen (z.B. Thymosin B2, Cathepsin D und E, C1-Inhibitor), Signalmoleküle (z.B. Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat, TGF-β, Histamin, Serotonin, Epinephrin) und eine Reihe von Chemokinen (z.B. CCL-2, -3, -5, CXCL-1, -4, -5, -8, -12, NAP-2/CXCL7) können ebenso eine wichtige Rolle bei Entzündungen, der Immunität und der Angiogenese spielen^{27,403}.

Neben der spenderabhängigen Variabilität der Thrombozyten selbst, können auch der Plasmagehalt, der allgemeine Gehalt an Wachstumsfaktoren, mRNAs und Metaboliten, die eingesetzte Thrombozytenlysatzzahl und das -volumen variieren^{1,10,27,370,372,377}. Aber auch der Herstellungsprozess inklusive einer Behandlung mit Antikoagulanzen (siehe 2.5.1), die Lagerungsbedingungen, der Gehalt an extrazellulären Vesikeln und eine mögliche Behandlung zur Reduktion oder Inaktivierung von Pathogenen haben einen Einfluss auf die Zusammensetzung und Bioaktivität des hPL^{7,27,341,353,370,404}.

2.5.3 Nutzung des Thrombozytenlysates

Im menschlichen Organismus tragen Thrombozyten insbesondere bei der Hämostase zur Aufrechterhaltung von Gerinnungskaskaden und dem damit verbundenen Wundheilungsprozess bei. Sie spielen dabei eine zentrale Rolle bei dem Verschluss von inneren sowie äußeren Gefäßverletzungen, der Wundheilung und dem Entgegenwirken von Infektionen^{10,27,328,403,405,406}. Ihre Funktion besteht darin, an der Verletzungsstelle zu aggregieren und den Gerinnungsmechanismus zu unterstützen. Über den Kontakt der Thrombozytenoberfläche mit verschiedenen Glykoproteinen werden die Thrombozyten aktiviert und Wachstumsfaktoren und weitere Mediatoren freigesetzt, um den Heilungsprozess der Wunde zu initiieren⁵. Dies wird über eine Stimulation des Vaskularisierungsprozesses und der Förderung des Bindegewebewachstums erreicht^{5,10,407}.

Zusätzlich zu ihrer essenziellen Wundheilungsfunktion weisen Thrombozyten noch viele alternative Eigenschaften auf^{27,403}. Neben ihrer zentralen Rolle in der Hämostase sind Thrombozyten auch entscheidend an Entzündungen, der Immunität und der Angiogenese beteiligt^{27,396}. Zusätzlich beschrieben Leiter und Walker 2019 in einem Perspektivartikel den Einfluss von Thrombozyten als potente Mediatoren der Gehirnfunktion, dass sie pro-neurogene Faktoren tragen und die Nervenzellen regulieren können sowie einen Beitrag zur Plastizität des Gehirns leisten⁴⁰³. Bereits 1989 isolierten und charakterisierten Wicki *et al.* stabile mRNAs aus humanen Thrombozyten⁴⁰⁸. Dadurch zeigte sich, dass Thrombozyten ihr Proteom schnell modifizieren und somit flexibel auf Umweltveränderungen reagieren. Verschiedene Publikationen deuten auf eine Variation in der molekularen Zusammensetzung der Thrombozytengranula in Abhängigkeit verschiedener Umwelteinflüsse und Stimuli hin^{389,409,410}. In diesem hohen Grad an Diversität zwischen den einzelnen Individuen liegt die Ursache der Problematik der im vorherigen Abschnitt beschriebenen großen hPL-Chargenschwankungen.

Die Vielfalt an Wachstumsfaktoren und regulativen Proteinen sowie die vielversprechenden Mechanismen der Geweberegeneration im menschlichen Körper führten zu einem immer größer werdenden Interesse an Thrombozytenprodukten. Aufgrund seiner regenerativen und wiederherstellenden Eigenschaften hat die Verwendung von Thrombozytenderivaten wie beispielsweise PRP und hPL im medizinischen Bereich in den letzten Jahren exponentiell zugenommen^{411–422}. PRP wurde ursprünglich vorwiegend zur Behandlung dermatologischer und oromaxillofazialer Erkrankungen eingesetzt. Inzwischen hat es sich allerdings auch in anderen klinischen Fachbereichen wie der orthopädischen und plastischen Chirurgie verbreitet⁴¹⁷. In diesen Bereichen finden Therapien hauptsächlich mit patienteneigenem PRP für Gesichtsverjüngungen (Vampir-Lifting), androgenetische Alopezie, Akne- oder Operationsnarben, Fetttransplantationen sowie in der Orthopädie bei Arthrose und Überlastungsschäden Anwendung^{411,412,417,423}.

Zelltherapeutische Expansionsansätze weisen auf eindeutige Vorteile der Verwendung von hPL hin und klinische Studien zur geweberegenerativen Wirkung von thrombozytenbasierten Produkten wie hPL zeigen vielversprechende Ergebnisse^{27,424–428}. So konnte beispielsweise die klinische Verwendung von Thrombozyten (aus Vollblut und Thrombozytpherese) in der Prophylaxe und Behandlung von Thrombozytopenie bedingten Blutungen etabliert werden und Erkrankungen wie Tendinopathien, Osteoarthritis und Herzinsuffizienz in klinischen Studien erfolgreich behandelt werden^{404,429–431}. Von der frühen Entstehung und Entwicklung von Thrombozytengelen (seit 1909) wie beispielsweise Thrombozyten-Fibrinogen-Thrombin-Gemische, Thrombozyten-Fibrinkleber oder Gelatine-Thrombozytengel-Schaum für lokale Anwendungen (z.B. für Knochentransplantate in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie) hat sich der Fokus der Forschung zu komplexen Anwendungen im *Tissue Engineering* verschoben^{432–436}. Mithilfe der Kombination des protein- und wachstumsfaktorreichem hPLs mit zellfördernden Materialien sollen in Zukunft anspruchsvolle transplantierbare 3D-Gewebekonstrukte

entwickelt werden^{10,413,437-440}. Viele *in vitro* Studien zu 2D-Zellkultursystemen zeigen bereits deutliche Ergebnisse zur erfolgreichen Anwendung von hPL. Dazu gehören erfolgreiche Kultivierungen von Fibroblasten, Endothelzellen und Krebszelllinien⁴⁴¹⁻⁴⁴⁴, die Verwendung von hPL zur Isolation, Expansion und erfolgreichen Differenzierung (adipogen, chondrogen, osteogen) von MSCs oder der *ex vivo* Anzucht MSC-basierter medizinischer Produkte^{7,10,368,370,445}.

Trotz Variationen in der Herstellung und Nachbearbeitung (Zusatz oder Entfernung weiterer Stoffe, Pathogeninaktivierung etc.) scheint hPL daher bis zur Entwicklung effizienter und universeller chemisch definierter Medien ein optimales alternatives xenofreies Mediumsupplement für die Anwendung in zellbasierten Verfahren und im *Tissue Engineering* darzustellen^{1,27,370}. In Anbetracht der Rolle, die dem hPL in der biotechnologischen und zelltherapeutischen Industrie damit zufällt, sind standardisierte xenofreie Kultivierungsprotokolle sowie Prozesse zur Sicherung der Qualität und Sicherheit im Umgang mit hPL umso notwendiger¹.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Publikationen verdeutlichen das Potential von hPL-Anwendungen für die 2D- und 3D-Zellkultur und sollen einen Beitrag zur Entwicklung standardisierter Protokolle und Kultivierungsbedingungen leisten.

3 Experimenteller Teil

Dieses Kapitel setzt sich aus drei verschiedenen Publikationen zusammen, die sich mit dem Einsatz von hPL als alternatives Mediensupplement zur xenofreien Kultivierung von MSCs in 2D- und 3D-Zellkultursystemen beschäftigen. Alle vorgestellten Publikationen wurden einzeln in *peer-reviewed* Fachzeitschriften veröffentlicht.

Die Schwerpunkte liegen auf der vergleichenden Analyse von hPL mit traditionellen kommerziellen Mediensupplementen (FKS, HS) hinsichtlich der Proliferations- und Differenzierungsunterstützung von hAD-MSCs kultiviert in standardmäßigen Zellkulturplatten (2D), auf additiv gefertigten Polymerkonstrukten (*hard tissue* Konstrukten, 2D/3D) sowie enkapsuliert in GelMA Hydrogelen (*soft tissue* Konstrukten, 3D). MSCs spielen eine große Rolle in klinischen Studien für die bioregenerative Medizin. Für den Erfolg klinischer Studien ist die Etablierung optimierter und standardisierter Protokolle zur *ex vivo* Zellexpansion sowie für die Proliferation und Differenzierung von MSCs essenziell. Hierbei ist die Etablierung eines effektiven xenofreien Mediensupplements zur Stammzellkultivierung in 2D- und 3D-Zellkultursystemen von entscheidender Bedeutung.

Die erste Publikation mit dem Titel „*Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum and platelet lysate in 2D and 3D systems*“ befasst sich daher mit der vergleichenden Analyse der *ex vivo* Expansion und osteogener sowie chondrogener Differenzierung von hAD-MSCs unter Verwendung verschiedener Mediensupplemente in 2D-Zellkultursystemen. Um ebenfalls die Spenderdiversität mit einzubeziehen, wurde für die 2D-Analysen der Einfluss auf die Zellen von vier verschiedenen Spendern unterschiedlichen Alters und Geschlechts untersucht. Neben der Untersuchung des Einflusses des vom DRK hergestellten hPLs auf die Eigenschaften der 2D-kultivierten hAD-MSCs wurde die Auswirkung auf das Zellverhalten in 3D untersucht. Dazu wurde das GelMA Hydrogel mit den drei verschiedenen Mediensupplementen (FKS, HS und hPL) formuliert und deren Einfluss auf das Zellwachstum und die Adhäsion der hAD-MSCs in 3D untersucht. Gleichzeitig wurde auch der Einfluss der drei Supplemente bei direkter Zugabe zu den Wachstumsmedien der 3D-kultivierten Zellen unter den Aspekten der Zellausbreitung, der Zellmorphologie sowie der Zellviabilität untersucht.

In beiden Zellkultursystemen (2D und 3D) hat sich das hPL als sehr vielversprechend herausgestellt und der Zusatz von 50 % hPL bei der Formulierung des GelMA Hydrogels konnte die Zellausbreitung und Proliferation verbessern. Aus diesem Grund beschäftigt sich die Publikation mit dem Titel „*Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Formulated with Human Platelet Lysate Supports Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation and Enhances the Hydrogel's Mechanical Properties*“ mit der Untersuchung der zellwachstums- und materialspezifischen Eigenschaften von GelMA Hydrogelen unterschiedlicher DoFs unter Einfluss verschiedener hPL-Konzentrationen im Hydrogel. Das lyophilisierte

GelMA mit drei verschiedenen DoFs (50 %, 70 % und 95 %) wurde vor der Encapsulierung der Zellen in 0 % (100 % PBS), 2,5 %, 50 % oder 100 % hPL gelöst. Anschließend wurde der Einfluss des hPLs auf die Zellausbreitung, die Proliferation und die osteogene Differenzierung von hAD-MSCs sowie auf die Materialeigenschaften der Hydrogele untersucht.

Neben der Anwendung von hPL als Mediumsupplement in 2D-Zellkultursystemen und in Hydrogelen als 3D-Kultivierungssystem, wurde in der dritten Veröffentlichung ein resorbierbares 3D-druckbares Biopolymer auf seine Eignung als Zellgerüst für eine xenofreie Kultivierung untersucht. In der Publikation mit dem Titel „*Xeno-Free In Vitro Cultivation and Osteogenic Differentiation of hAD-MSCs on Resorbable 3D Printed RESOMER®*“ wurden zuerst die *in vitro* Biokompatibilität und *in vitro* Degradation der 3D-gedruckten Konstrukte aus dem resorbierbaren Material untersucht und anschließend der Einfluss verschiedener Mediensupplemente auf die Zellmorphologie und osteogene Differenzierung von auf den Konstrukten wachsenden hAD-MSCs analysiert.

3.1 Vergleichende Analyse der Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen in FKS, HS und hPL in 2D- und 3D-Zellkultursystemen

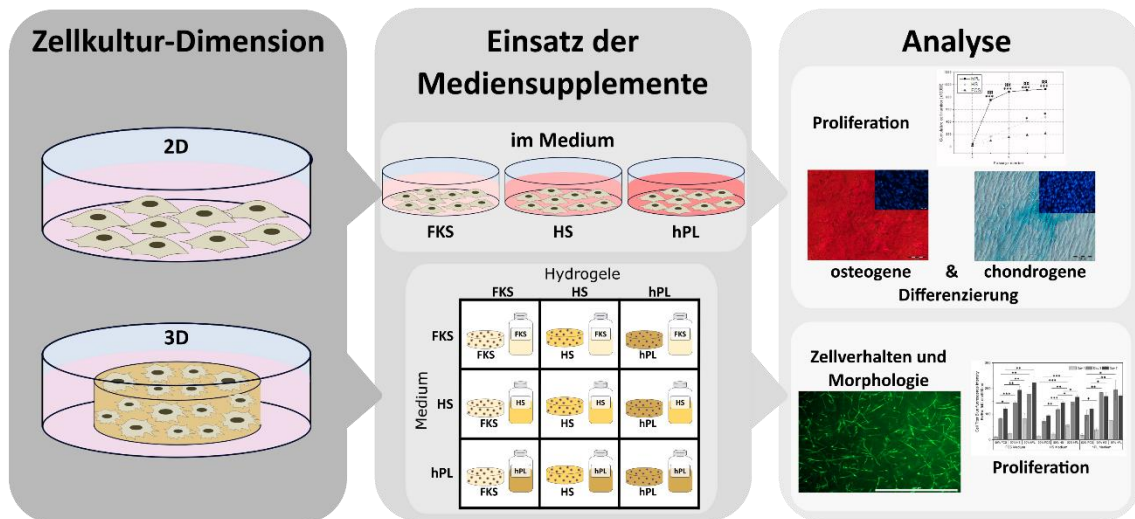


Abbildung 3-1: Graphical abstract zu dem Manuskript „Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum and platelet lysate in 2D and 3D systems“

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der vergleichenden Analyse von hPL und den konventionellen Mediensupplementen HS und FKS zur Kultivierung von hAD-MSCs in 2D- und 3D-Zellkultursystemen. Im ersten Teil wurden die Mediensupplemente als Kultivierungs- und Differenzierungsmedien für hAD-MSCs vier verschiedener Spender in 2D-Zellkultursystemen eingesetzt. Um klinisch relevante Zellzahlen für Zelltherapien oder Anwendungen im *Tissue Engineering* zu erreichen ist eine *ex vivo* Zellexpansion von entscheidender Bedeutung. Daher wurde der Einfluss der drei verschiedenen Mediensupplemente auf die Proliferation von hAD-MSCs in einer Langzeitkultivierung untersucht. Unabhängig von Alter oder Geschlecht der Spender, führte die Supplementierung mit hPL bei den Zellen aller vier Spender zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation. Zusätzlich wurde die osteogene und chondrogene Differenzierung der hAD-MSCs qualitativ und quantitativ bestimmt, um sicherzustellen, dass die humanen alternativen Mediensupplemente das Differenzierungspotential der Zellen unterstützen. In dieser Arbeit konnte bei Zugabe von hPL qualitativ sowie quantitativ eine Steigerung des osteogenen Differenzierungsgrades nachgewiesen werden. Allein bei einer Supplementierung mit 2,5% hPL (entgegen 10% FKS oder HS) konnte eine osteogene Differenzierung bereits nach einer Woche nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden mithilfe einer bildbasierten Echtzeitanalyse charakteristische osteogene Zellveränderungen im frühen Stadium detektiert. Qualitativ und quantitativ wurde ebenfalls der chondrogene Differenzierungsgrad der Zellen mit verschiedenen Mediensupplementen in 2D-kultivierten hAD-MSCs untersucht. Zur chondrogenen Differenzierung werden oftmals Zellpellets oder 3D-Konstrukte verwendet, um eine erfolgreiche Differenzierung zu erreichen. In der in diesem Kapitel vorgestellten Publikation konnte gezeigt werden, dass allein hPL als Mediensupplement die

chondrogene Differenzierung von hAD-MSCs auch in 2D-Kulturen unterstützt und diese sogar bereits nach zwei Wochen qualitativ und quantitativ nachweisbar ist.

Nachdem das hPL gegenüber FKS und HS im 2D-Kultivierungssystem als Mediumsupplement deutliche positive Effekte auf die Zellexpansion und den osteogenen und chondrogenen Differenzierungsgrad der hAD-MSCs gezeigt hat, wurde hPL ebenfalls in 3D-Kultivierungen eingesetzt. Als repräsentatives 3D-Kultivierungssystem dienten GelMA Hydrogele mit einem DoF von 50 %. Die drei verschiedenen Mediumsupplemente wurden auf zwei unterschiedliche Arten eingesetzt und verglichen. Zum einen wurde das GelMA direkt bei der Herstellung der Hydrogellösung anstelle von in 100 % PBS zur Hälfte in dem jeweiligen Mediumsupplement gelöst (50 % Mediumsupplement und 50 % PBS). Zum anderen wurden die unterschiedlich supplementierten Hydrogele in Wachstumsmedium kultiviert, welchem wiederum eines der drei verschiedenen Mediumsupplemente zugegeben wurde. Anschließend wurden das Zellwachstum und das Zellverhalten über die Messung der metabolischen Aktivität der Zellen, sowie ihrer Morphologie evaluiert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Supplementierung des Hydrogels (50 % Mediumsupplement) und des Mediums zu besseren Wachstumsbedingungen der Zellen führt als bei herkömmlicher Formulierung (100 % PBS). Allerdings spielt vor allem die Wahl des Mediumsupplements eine ausschlaggebende Rolle für die Zelladhäsion, -ausbreitung und das Zellwachstum im Hydrogel. Das direkt im Hydrogel eingesetzte hPL verbesserte deutlich die Zelladhäsion und Ausbreitung (entgegen FKS und HS). Dieser Punkt ist insbesondere für MSCs als adhäsionsabhängige Zellen sehr bedeutend, da über die Adhäsion und Ausbreitung der Zellen die Proliferation, Migration und Differenzierung reguliert werden^{211,446,447}. Die insgesamt beste Kombination, die die höchsten Zellviabilitäten aufwies, stellten Kultivierungen in 50 % hPL gelösten GelMA Hydrogelen dar, wenn diese zusätzlich in FKS- oder hPL-haltigem Medium kultiviert wurden. Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass hPL als Mediumsupplement in 2D- und 3D-Zellkultursystemen, gegenüber der Verwendung des xenogenen FKS und der humanen Alternative des HS, deutliche Vorteile aufweist.

In dem folgenden Artikel „*Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum and platelet lysate in 2D and 3D systems*“ werden die Ergebnisse detailliert beschrieben und diskutiert.



Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cell Cultivation in Fetal Calf Serum, Human Serum, and Platelet Lysate in 2D and 3D Systems

Marline Kirsch¹, Jessica Rach², Wiebke Handke³, Axel Seltsam³, Iliyana Pepelanova¹, Sarah Strauß⁴, Peter Vogt⁴, Thomas Scheper¹ and Antonina Lavrentieva^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Cornelia Kasper,
University of Natural Resources and
Life Sciences Vienna, Austria

Reviewed by:

Karen Bieback,
Heidelberg University, Germany
Elisabeth Ferreira,
University of Arkansas for Medical
Sciences, United States

*Correspondence:

Antonina Lavrentieva
lavrentieva@iftc.uni-hannover.de

Specialty section:

This article was submitted to
Preclinical Cell and Gene Therapy,
a section of the journal
Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology

Received: 24 August 2020

Accepted: 08 December 2020

Published: 15 January 2021

Citation:

Kirsch M, Rach J, Handke W,
Seltsam A, Pepelanova I, Strauß S,
Vogt P, Scheper T and Lavrentieva A
(2021) Comparative Analysis of
Mesenchymal Stem Cell Cultivation in
Fetal Calf Serum, Human Serum, and
Platelet Lysate in 2D and 3D Systems.
Front. Bioeng. Biotechnol. 8:598389.
doi: 10.3389/fbioe.2020.598389

¹Institute of Technical Chemistry, Leibniz University Hannover, Hanover, Germany, ²German Red Cross Blood Service NSTOB, Institute Springe, Springe, Germany, ³Bavarian Red Cross Blood Service, Institute Nuremberg, Nuremberg, Germany, ⁴Department of Plastic, Aesthetic, Hand and Reconstructive Surgery, Hannover Medical School, Hanover, Germany

In vitro two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cultivation of mammalian cells requires supplementation with serum. Mesenchymal stem cells (MSCs) are widely used in clinical trials for bioregenerative medicine and in most cases, *in vitro* expansion and differentiation of these cells are required before application. Optimized expansion and differentiation protocols play a key role in the treatment outcome. 3D cell cultivation systems are more comparable to *in vivo* conditions and can provide both, more physiological MSC expansion and a better understanding of intercellular and cell-matrix interactions. Xeno-free cultivation conditions minimize risks of immune response after implantation. Human platelet lysate (hPL) appears to be a valuable alternative to widely used fetal calf serum (FCS) since no ethical issues are associated with its harvest, it contains a high concentration of growth factors and cytokines and it can be produced from expired platelet concentrate. In this study, we analyzed and compared proliferation, as well as osteogenic and chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived MSCs (hAD-MSC) using three different supplements: FCS, human serum (HS), and hPL in 2D. Furthermore, online monitoring of osteogenic differentiation under the influence of different supplements was performed in 2D. hPL-cultivated MSCs exhibited a higher proliferation and differentiation rate compared to HS- or FCS-cultivated cells. We demonstrated a fast and successful chondrogenic differentiation in the 2D system with the addition of hPL. Additionally, FCS, HS, and hPL were used to formulate Gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogels in order to evaluate the influence of the different supplements on the cell spreading and proliferation of cells growing in 3D culture. In addition, the hydrogel constructs were cultivated in media supplemented with three different supplements. In comparison to FCS and HS, the addition of hPL to GelMA

hydrogels during the encapsulation of hAD-MSCs resulted in enhanced cell spreading and proliferation. This effect was promoted even further by cultivating the hydrogel constructs in hPL-supplemented media.

Keywords: platelet lysate, mesenchymal stem cells, differentiation, medium supplements, fetal calf serum, human serum, gelatin methacryloyl (GelMA), hydrogel

INTRODUCTION

More than half a century has passed since the first isolation and *in vitro* cultivation of mesenchymal stem cells (MSC) described by Friedenstein et al. (1966) and Friedenstein et al. (1970). From that point on, numerous studies about the handling of these cells have been performed. However, the development of an optimal protocol for cultivating MSCs is still in progress (Spees et al., 2016; Lavrentieva et al., 2020). The most common and most widely used cell culture medium supplement is fetal calf serum (FCS). It has been used for the cultivation of several cell types for more than 50 years (Gstraunthaler et al., 2013). To date, most cell isolation or expansion protocols for clinical studies use FCS for supplementation (Schrödel, 2007; Lindroos et al., 2009; Bieback, 2013; Hemeda et al., 2014; Burnouf et al., 2016; Monsanto et al., 2017; Motedayyen et al., 2017; Araújo et al., 2018; Lee et al., 2019; Cherian et al., 2020; Ghamari et al., 2020; Wagner et al., 2020). Even though there are various disadvantages related to FCS such as lot-to-lot variability, ethical concerns about collecting the serum from the heart of unborn calves and the risk of viral, mycoplasma or prion infections or immune responses of the recipients toward foreign factors, there are no widely accepted alternatives for FCS (Lindroos et al., 2009; Bieback, 2013; Jonsdottir-Buch et al., 2013; Hemeda et al., 2014; Burnouf et al., 2016; Monsanto et al., 2017; Motedayyen et al., 2017; Lee et al., 2019; Cherian et al., 2020; Wagner et al., 2020).

A sustained effect on the differentiation capacity and the immunophenotype of cells has been observed in different studies by using xeno-free autologous human serum (HS) as a medium supplement. Due to its promoting effect on cell expansion and its human origin, HS appears to be a potential alternative to FCS (Mannello and Tonti, 2007). However, because of high costs of its manufacture, the production of HS is actually decreasing (Müller et al., 2006; Mannello and Tonti, 2007; Aldahmash et al., 2011; Hemeda et al., 2014). Hence, the goal for the future is a completely chemically defined MSC medium. But to date, there is still no reliable, efficient, comprehensive and fully defined medium available for a broad MSCs cultivation. Moreover, most of the available defined media require additional coatings of the cell culture surface with proteins (Pijuan-Galitó et al., 2016; Salzig et al., 2016; Wu et al., 2016; Cherian et al., 2020). These, in turn are often derived from animal origin, so that in this case no truly xeno-free cultivation with these media is possible.

MSCs have a clinical potential for use in cell therapies and tissue engineering (TE) due to their immunomodulatory potential, stromal functions and their great proliferation as well as differentiation capacities *in vitro* (Dominici et al., 2006). MSCs can be differentiated in different cell types and the potential of controlled chondrogenic and osteogenic differentiation of these

cells makes them promising candidates for cartilage and bone TE, as well as for *in vitro* 2D and 3D models for drug screening and disease modeling (Raic et al., 2019). Because of rising ethical, safety and scientific concerns, the World Health Organization and Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines recommend the prohibition of the use of animal-derived supplements or supplements containing animal-sourced ingredients for stem cell cultivations or advanced therapy medicinal products (Schrödel, 2007; Lindroos et al., 2009; Bieback, 2013; Gstraunthaler et al., 2013; Hemeda et al., 2014). Hence, until a chemically defined medium is available for MSCs cultivation, it is essential to evaluate existing alternatives to FCS such as human platelet lysate (hPL).

The first attempts to use platelet-rich plasma and platelet lysates as cell culture medium supplement were already made 30 years ago (Gimbrone et al., 1969; Mavrina et al., 1986; Burnouf et al., 2016). Since that time it has been shown that hPL supports *in vitro* growth and osteogenic differentiation of MSCs (Doucet et al., 2005; Lange et al., 2007; Schallmoser et al., 2007; Bieback et al., 2009; Jonsdottir-Buch et al., 2013; Schallmoser and Strunk, 2013; Shih and Burnouf, 2015; Siciliano et al., 2015; Astori et al., 2016; Burnouf et al., 2016; Fernandez-Rebollo et al., 2017), as well as the proliferation of progenitor cells and endothelial colony forming progenitor cells (Schallmoser and Strunk, 2013). hPL appears to be a valuable alternative to FCS and shows several advantages, such as its easy production from human platelet concentrate in conformity with GMP guidelines (Burnouf et al., 2016). Moreover, the use of hPL combines modern social principles of ethics, sustainability, recycling and resources conservation. More than twenty percent of the platelets donated in global blood donation programs expire before they can be used for infusions. Since no difference was determined between using expired or fresh hPL as medium supplements, there is a possibility to recycle expired platelets obtained from blood banks (Jonsdottir-Buch et al., 2013). Furthermore, hPL contains many bioactive factors such as growth factors and cytokines, which act synergistically to support the cell growth, behavior and differentiation of MSCs. Moreover, hPL has demonstrated the ability to enhance the proliferation and differentiation of MSCs in 2D and 3D cultivations in various studies (**Supplementary Table 1**) (Bieback, 2013; Jonsdottir-Buch et al., 2013; Altaie et al., 2016; Burnouf et al., 2016; Kirsch et al., 2019, 2020). However, commercially available hPLs usually contain heparin in order to prevent hPL gelation. Heparin is a product, extracted from porcine small intestine mucosa. Thus, cell cultures grown in the presence of such hPL are no longer xeno-free (Mojica-Henshaw et al., 2013). Furthermore, Hemeda et al. showed that the heparin concentration is critical for 2D MSC cultures in hPL-supplemented medium. This group

demonstrated a concentration-dependent influence of heparin on cell proliferation, the colony-forming unit frequency as well as the *in vitro* differentiation of MSCs (Hemeda et al., 2013). In our study, fibrinogen-depleted hPL was used without addition of heparin to the cell culture medium, in order to maintain true xeno-free cultivation conditions. Providing genuine xeno-free conditions and considering these promising aspects, the challenge is to evaluate and optimize protocols for the production and application of hPL.

Many cell cultivation protocols are still predominantly designed for 2D cultivation. However, compared to 2D-cultured MSCs, 3D cell cultivation seems to be more advantageous, because 3D growing cells reflect the *in vivo* environment of MSCs to a higher extent. Thus, physiological cell-cell and cell-matrix contacts can be simulated and studied only in 3D cell cultures. Moreover, considering angiogenic and immunomodulatory factors, 3D-grown cells have a higher quality (Mark et al., 1977; Cukierman et al., 2001, 2002; Abbott, 2003; Bissell et al., 2003; Schmeichel and Bissell, 2003; Lee et al., 2009; Li and Cui, 2014). Various studies have already investigated the possibility of direct 3D isolation of MSCs from bone and adipogenic tissue to prevent 2D cultivation of the cells (Papadimitropoulos et al., 2014; Egger et al., 2019). Similar to 2D cell cultivation, xeno-free alternatives to FCS are needed for 3D cell cultivation and the influence of medium supplements must be systematically evaluated.

In addition to cellular aggregates and cells growing on scaffolds, hydrogels represent a very promising 3D cultivation system. Hydrogels provide a tunable versatile platform for *in vitro* 3D cultivation, TE and bioprinting (Ruedinger et al., 2015; Pepelanova et al., 2018). Regular semi-synthetic hydrogels are usually stored as lyophilized proteins and are reconstituted with PBS prior cell encapsulation. Thus, they do not normally contain any additional supplements. Regarding 3D hydrogels, the addition of supplements to both, hydrogels and the medium can influence cell behavior. Only a limited number of studies have investigated the influence of direct hPL addition to hydrogels on encapsulated MSCs (Moreira Teixeira et al., 2012; Santos et al., 2018; Jooybar et al., 2019). Most of these studies cultivated the hPL-containing hydrogels in media supplemented with FCS, thus effectively not under true xeno-free conditions (Moreira Teixeira et al., 2012; Santos et al., 2018). So far, no study has shown the influence of different medium supplements on the cell behavior of encapsulated MSCs in comparison. To the best of our knowledge, no study investigating the effect of supplementation of hydrogels and medium on the encapsulated cells has been conducted to date.

In the present study, the influence of hPL (2.5% hPL) on the proliferation, as well as the osteogenic and chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs) obtained from four different donors was systematically investigated in a 2D cultivation system.

The influence of hPL was compared to FCS (10%) and HS (10%). Online monitoring of osteogenic differentiation in 2D under the influence of different supplements was performed and evaluated.

Recently, we published a study about the influence of formulating GelMA hydrogels with different hPL concentrations (Kirsch et al., 2019). The addition of hPL directly to the hydrogel supported not only the cells but also had a positive impact on the mechanical properties of the GelMA hydrogels. It was demonstrated that the addition of hPL to the hydrogels improves cell growth and cell adhesion. However, this beneficial effect could have been caused by the direct formulation of the hydrogel with a supplement carrying multiple bioactive factors, and must not be directly related to the superior properties of a xeno-free protocol with hPL. In order to investigate this aspect more closely, we expanded the study by formulating GelMA hydrogel with three different media supplements (FCS, HS, and hPL) and studied their influence on cell growth and adhesion. Consequently, the influence of the three supplements as direct additions to the growth media of 3D cultivated cells was also investigated under the aspects of cell spreading, cell morphology, as well as cell viability.

MATERIALS AND METHODS

MSC Cultivation

Human AD-MSCs were isolated from adipose tissue of four donors after abdominoplasty surgery. The use of human tissue from patients (after their informed consent) has been approved by the Institutional Review Board (Hannover Medical School, Ref. Nr.: 3475-2017). As described earlier, we performed surface marker analysis and functional characterization of the isolated cell populations to characterize them as MSCs (Pepelanova et al., 2018). hAD-MSCs were expanded in alpha-MEM medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 10% human serum (CC-pro, Oberdorla, Germany) as well as 0.5% gentamicin (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), harvested by accurate treatment (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany), and cryopreserved at passage one or two until the start of the experiment. Experiments were performed with cells of passages two to nine. Following concentrations of cell culture supplements were used for all performed experiments: 10% FCS, 10% HS and 2.5% hPL. hPL concentration of 2.5% was chosen based on preliminary experiments. The tested concentrations in preliminary experiments were 0, 1, 2.5, 5, and 10% of hPL in medium. The highest differentiation capacity and a more even distribution of Alizarin Red staining were observed at a concentration of 2.5% (**Supplementary Figure 1a**). Furthermore, in order to test if lower concentrated FCS or HS could also result in higher osteogenic differentiation, 2.5% of all supplements were used in preliminary experiments. The cell viability and osteogenic differentiation was significantly lower for hAD-MSCs cultivated with 2.5% FCS and 2.5% HS compared to 2.5% hPL (**Supplementary Figure 1b**). Due to those results the standard concentration of 10% FCS and HS was used to supplement the medium in all experiments.

Platelet Lysate Preparation

Human platelet lysates were prepared and provided by the German Red Cross Blood Service NSTOB (Springe, Germany) by freeze-thaw treatments of pooled platelets from surplus buffy

coats. To prevent gelation of hPL and avoid the use of heparin, fibrinogen depletion was performed by the calcium precipitation method, followed by filtration of the platelet lysate.

Cell Proliferation Analysis

For cell proliferation studies, the hAD-MSCs were harvested at 80% of confluency by accutase treatment, counted using a hemocytometer and seeded at a density of 3,000 cells/cm² in 25 cm² cell culture flasks containing 4 ml medium. Alpha-MEM medium was supplemented with 10% HS, 10% FCS or 2.5% hPL. hAD-MSCs from four different donors were sub-cultivated two times per week with a seeding density of 3,000 cells/cm² over five passages; cell number and viability were evaluated by trypan blue exclusion and cumulative cell numbers were calculated.

Osteogenic and Chondrogenic Differentiation

For differentiation experiments, cells were seeded in 24-well plates (growth area 2 cm², Sarstedt, Germany) at a density of 10,000 to 15,000 cells/cm² in 500 µl alpha-MEM containing 10% HS, 10% FCS or 2.5% hPL and 50 µg/ml gentamicin per well. After seeding, cells were cultivated for 24–48 h (until full confluence was achieved) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 21% O₂ at 37°C. Afterwards, the cell culture medium was changed to either the osteogenic or chondrogenic differentiation medium. Osteogenic differentiation medium contained 5 mM β-glycerophosphate, 0.1 µM dexamethasone, 0.2 mM L-ascorbate-2-phosphate, 0.5% gentamicin, as well as 2.5% hPL, 10% HS or 10% FCS. Serum-free chondrogenic differentiation medium was purchased from Gibco (StemPro Chondrogenic differentiation kit, Gibco, Germany) and also supplemented with 2.5% hPL, 10% HS or 10% FCS. The medium was exchanged every 3–4 days. Cells were cultured for the next 7, 14, or 21 days and then washed in PBS and fixed for 15 min at 4°C with 4% paraformaldehyde for staining. Before fixation, indirect cell viability was estimated by CellTiter-Blue® (CTB) assay according to the manufacturer's instructions (Promega, Mannheim, Germany). Briefly, CTB stock solution was diluted in alpha-MEM basal medium (1:10 v/v) and added to the cells. The fluorescence was measured after 2 h of incubation at an extinction wavelength of 544 nm and an emission wavelength of 590 nm with a microplate reader (Fluoroskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Alizarin Red and Alcian Blue Staining

In order to determine the degree of osteogenic differentiation, Alizarin Red staining was used. The fixed cell layers were incubated in Alizarin Red solution, containing 1% Alizarin Red S (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in deionized H₂O, for 15 min at room temperature. After washing with deionized H₂O the red chelates were detected with a microscope. The accumulation of proteoglycans in the extracellular matrix during the chondrogenic differentiation was visualized by using Alcian Blue staining. Fixed cell layers were washed twice with PBS, incubated for 3 min in 3% acetic acid at room temperature, followed by 30 min incubation in Alcian Blue solution (1% Alcian Blue 8GX, Sigma Aldrich, in 3% acetic acid) at room temperature.

After incubation, cell layers were washed several times with 3% acetic acid and the presence of bound Alcian Blue stain was detected using a microscope.

Alizarin Red Extraction

To quantify the degree of osteogenic differentiation, Alizarin Red was extracted with 10% hexadecylpyridinium chloride monohydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, WI, USA) in 1 × PBS for 20 min at 37°C. The concentration of extracted Alizarin Red was measured at 550 nm (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) and calculated using a calibration curve with a regression of 0.997. If required, samples were diluted to bring Alizarin Red concentrations within the linear range of the photometer.

Online Monitoring and Evaluation of Osteogenic Differentiation by Image Analysis

During the differentiation, time-lapse microscopic pictures were taken using an IncuCyte® Live-Cell Imaging System (Sartorius, Göttingen, Germany) placed in the incubator. The osteogenic differentiation of the cells was determined and quantified by training a metric phase object confluence mask for the typical changes in the morphology of the cells toward osteocytes (Figure 5B). To add an enhanced coloring mask to the images, the software (IncuCyte® Analysis Software) provides a processing definition step to train the algorithm to highlight the correct markers on a limited representative set of images at different time points and stages of the osteogenic differentiation. This processing step can be visually inspected and adjusted to be valid for all the pictures in the limited training set. After the visual inspection, when the mask highlights the correct parts where the cells are slowly changing their morphology toward osteocytes and increasing the mineralization of the extracellular matrix, the software can automatically analyze the images of the total experiment. When the processing definition is valid for the training image set, this can be used for online monitoring of the experiment.

Alkaline Phosphatase (ALP) Assays

Next to the Alizarin Red staining and quantification, the ALP activity was also measured in the cells as well as in the supernatants (Anh et al., 1998). The fixated cells were incubated with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium (NBT) (SIGMAFAST BCIP®/NBT, B5655, Merck, Darmstadt, Germany) for 30 min at room temperature, washed with PBS and microscopically analyzed with an Olympus IX50 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). For the quantification of the ALP activity in the supernatant 1 day before measurement, the medium was exchanged to proliferation or differentiation medium without supplements, in order to ensure a sensitive measurement of the activity in the medium. As a standard 4-nitrophenol solution (10 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, WI, USA) was used and diluted in ALP buffer (one Trizma® Buffer tablet of SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl phosphate dissolved in 20 ml ddH₂O, Merck, Darmstadt, Germany) for a standard series. The five-fold concentrated substrate solution was prepared by dissolving one pNPP tablet and one Trizma® Buffer tablet of

the kit in 4 ml ddH₂O. Each week, the supernatant was removed 5 min centrifuged at 4°C/14.000 rpm and 250 µl were stored at -20°C until further use. At the end of the experiment, all supernatants were thawed, vortexed and 40 µl/well of each sample, control (medium) and the standard series was added in a 96-wellplate. After adding 10 µl of the substrate solution, the plate was shaken for 5 min at 37°C/450 rpm and incubated for 7 h at 37°C. After 7 h, the plate was measured at 405 nm (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) and the ALP activity was calculated by using a calibration curve of the standard series with a regression of 0.999.

Quantitative Glycosaminoglycan (GAG) Assay

After 7, 14, and 21 days of culture in chondrogenic differentiation medium, the cells were harvested and digested in 500 µl/well papain solution [500 µl 0.1 M NaH₂PO₄/0.005 mM EDTA (pH 6), 5 µl β-mercaptoethanol, and 2.5 µl papain (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, WI, USA) at 60°C and 800 rpm overnight. The papain digest solution was then used to quantify the deoxyribonucleic acid (DNA) and GAGs. A DNA standard series was prepared with DNA from calf thymus (Sigma-Aldrich, St. Louis, WI, USA). In a 96 well plate, 100 µl preparation buffer and then 100 µl of the respective sample or standard series were added. After 100 µl of bisbenzimidazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, WI, USA) was added to each well, the plate was measured at 360/460 nm with a spectrophotometer (F-7000 FL Spectrophotometer, Hitachi, Tokio, Japan). Chondroitin sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, WI, USA) was used as a standard and 100 µl of the samples was added to 100 µl/well ddH₂O in a 96 well plate. After adding 150 µl 1,9-dimethyl-methylene blue (DMMB, Sigma-Aldrich, St. Louis, WI, USA) the plate was measured at 530 nm (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) and the DNA and GAG concentration was calculated with calibration curves.

GelMA Synthesis and Hydrogel Preparation

As already described in a previous study, GelMA was synthesized according to a previously described protocol (Pepelanova et al., 2018). The degree of functionalization (DoF) of GelMA used in the experiments was of 50%. GelMA solutions were prepared at a concentration of 5% (w/v). The GelMA was dissolved in 50% of PBS and either 50% (v/v) FCS, HS, or hPL (hPL pH value 7.3, manufactured by German Red Cross, Blood Service NSTOB, Springe, Germany) was added (Figure 1). After dissolving all GelMA solutions in a water bath at 37°C, they were sterile filtered with 0.45 µm polyethersulfone (PES) filters and 0.1% (w/v) photoinitiator 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure 2959) was added prior to the encapsulation of cells.

Encapsulation and Cultivation of hAD-MSCs in Hydrogels

The cells were resuspended in the GelMA solutions at a concentration of 1.0×10^6 cells/mL and filled in 50-µL disks (6-mm diameter) in silicon molds. With an UV intensity of

1.2 J/cm² (polymerization time of ~5 min) the hAD-MSCs were encapsulated in the hydrogels with the help of a cross linker (BLX-365 Bio-Link, 365 nm, Vilber Lourmat, Germany). The cells encapsulated in GelMA hydrogels formulated with PBS, FCS, HS, and hPL were further cultivated in medium supplemented with 10% FCS, 10% HS, or 2.5% hPL (Figure 1).

The preparation of the well-plates and the handling of the hydrogels is described earlier (Kirsch et al., 2019). As described in more detail in our previous study, the indirect cell viability was determined by the CellTiter-Blue[®] (CTB) (Promega, Mannheim, Germany) assay according to the manufacturer's specifications (Kirsch et al., 2019). For morphological analysis, encapsulated cells were cultivated for one, three or seven days, incubated in basal alpha-MEM with the addition of 4 µM calcein-acetoxymethyl (AM) (Merck, Darmstadt, Germany) for 40 min at 37°C. The hAD-MSCs were analyzed with a Cytation 5-Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

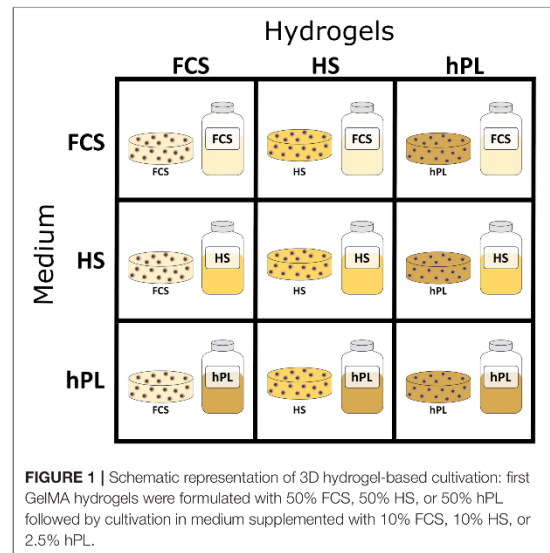
Statistical Analysis

The data are presented as mean value ± standard deviation of the multiple measurements/counts of each sample. A one-way ANOVA (OriginLab) was performed to determine the statistical significance of the measured values, defined as *p*-value of **p* < 0.05, ***p* < 0.01, or ****p* < 0.001.

RESULTS

hAD-MSCs Proliferation in 2D

To evaluate the influence of hPL on hAD-MSCs proliferation, cells isolated from four different donors were cultivated over five passages in alpha-MEM supplemented with 2.5% hPL



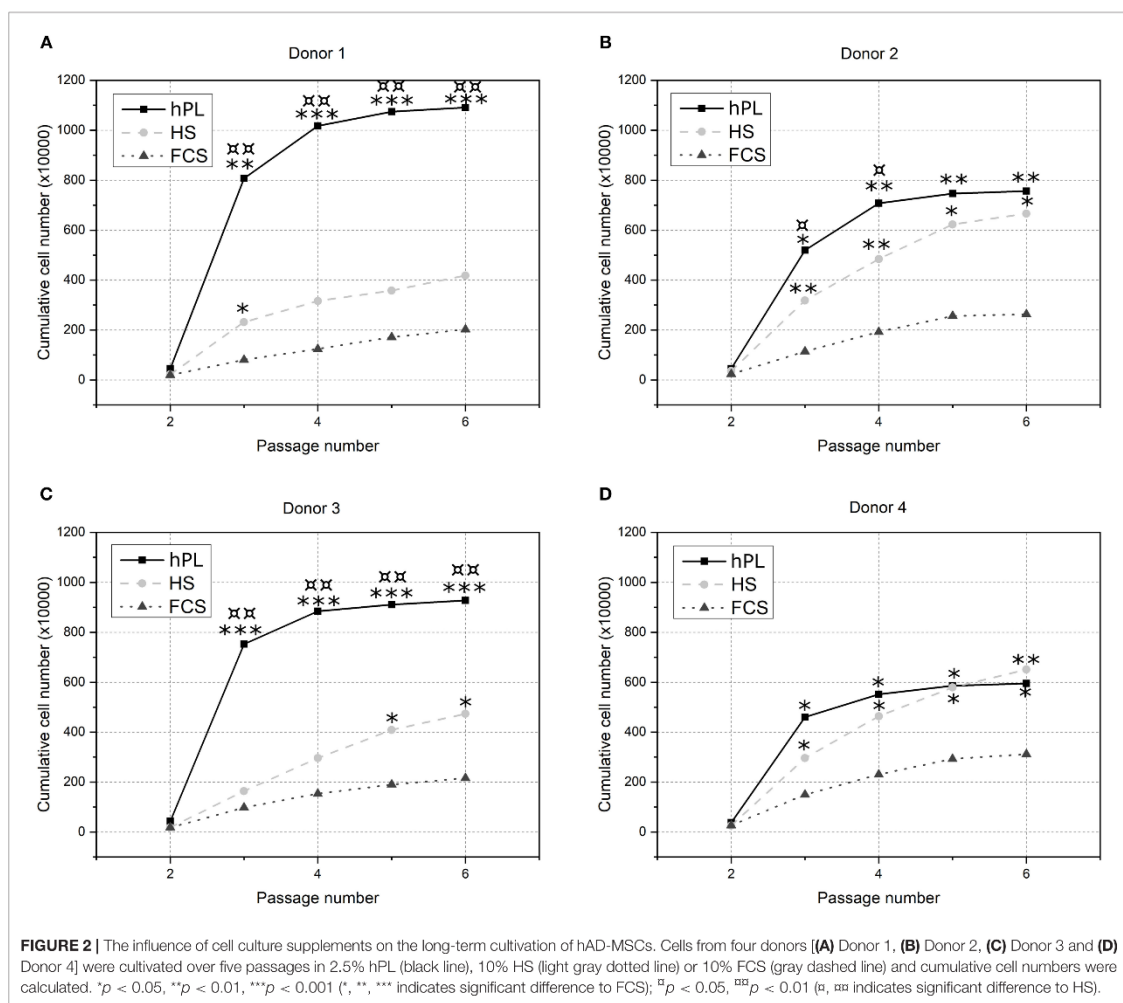
and compared to the cell growth in conventional cell culture conditions: medium with 10% FCS and 10% HS. Differences in the cell growth of the various donors are caused by biological variations. **Figures 2A–D**, that three of the four donor cells cultivated in medium supplemented with hPL show the highest total cell number compared to FCS and HS as supplements. Especially during the first passages, the increase of cell number was highest for cells cultivated in hPL-containing medium. Cells cultivated in medium supplemented with FCS exhibited the lowest cell number and cell division for all donors.

To ensure that hAD-MSCs had not changed their typical immunophenotype during the cultivation with different supplements, a flow cytometry analysis for characteristic MSC-markers was performed and revealed no changes in specific marker expression (**Supplementary Table 2**).

The obtained results demonstrate that medium supplemented with hPL provide a significant higher cell proliferation of hAD-MSCs for three of four donors compared to HS and in all four donors compared to FCS as a supplement. The cumulative cell number after cultivation with hPL was twice to more than five times higher than the cell number after cultivation with FCS. In a short period of time the cell number can be increased significantly, which underlines the potential of hPL-containing medium for rapid MSCs expansion.

Osteogenic Differentiation

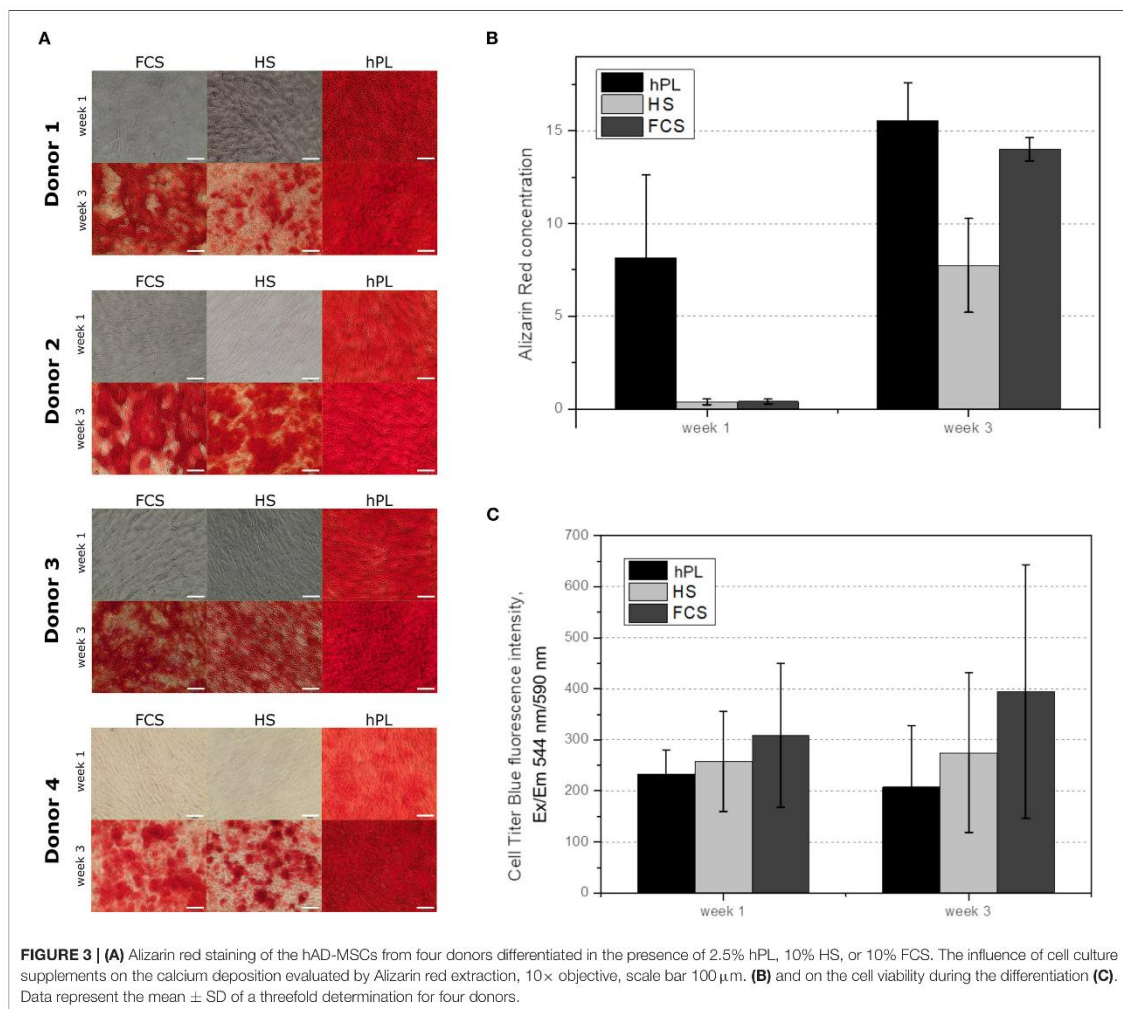
The cells were cultivated in differentiation medium supplemented with FCS, HS, or hPL over three weeks. Despite the higher amount of supplements (10% of volume), cells cultivated in medium with conventional supplements (FCS

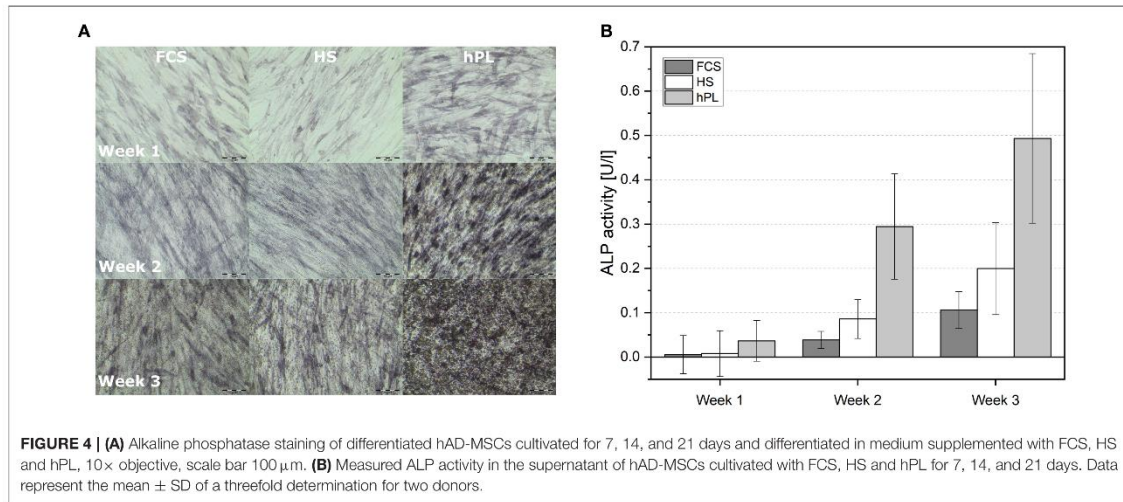


and HS) only showed an irregular Alizarin red staining after three weeks. As illustrated in **Figure 3**, only MSCs differentiated in medium supplemented with hPL showed an accumulation of calcium already after 1 week of cultivation visualized by Alizarin red staining. The staining was even more intense and homogeneously distributed after 3 weeks of cultivation. hAD-MSCs from all donors exhibited an osteogenic differentiation in all used supplements after 3 weeks of stimulation. These results were also confirmed by the quantification of Alizarin red staining during the whole period of differentiation (**Figure 3B**). Only hPL as a supplement was able to induce osteogenic differentiation during the first week of cultivation. As illustrated in **Figure 3C**, the indirectly measured viability of cells remained high and did not change significantly over 3 weeks with all three medium supplements. In addition to the staining and quantification of

Alizarin red, the ALP activity was measured in the supernatant and in the cells (**Figure 4**). Only cells differentiated with hPL containing medium showed ALP -positive cells already after 1 week (**Figure 4A**). In comparison, fewer ALP-positive cells were observed in FCS and HS differentiated cells. The quantitative determination of ALP activity in the supernatant showed the lowest activity each week in cells differentiated in FCS (**Figure 4B**). In HS differentiated cells, low ALP activity could be measured after seven days of differentiation. The highest ALP activity was detectable in the supernatant of cells differentiated in hPL-supplemented medium.

Online monitoring and the evaluation of osteogenic differentiation dynamics with the help of a trained metric phase object confluence mask also revealed the superiority of hPL in terms of the onset of calcium deposition (**Figure 5**). However,





in comparison to the Alizarin red staining in the unstained live MSCs culture, the software first recognized the deposition after day seven.

Chondrogenic Differentiation

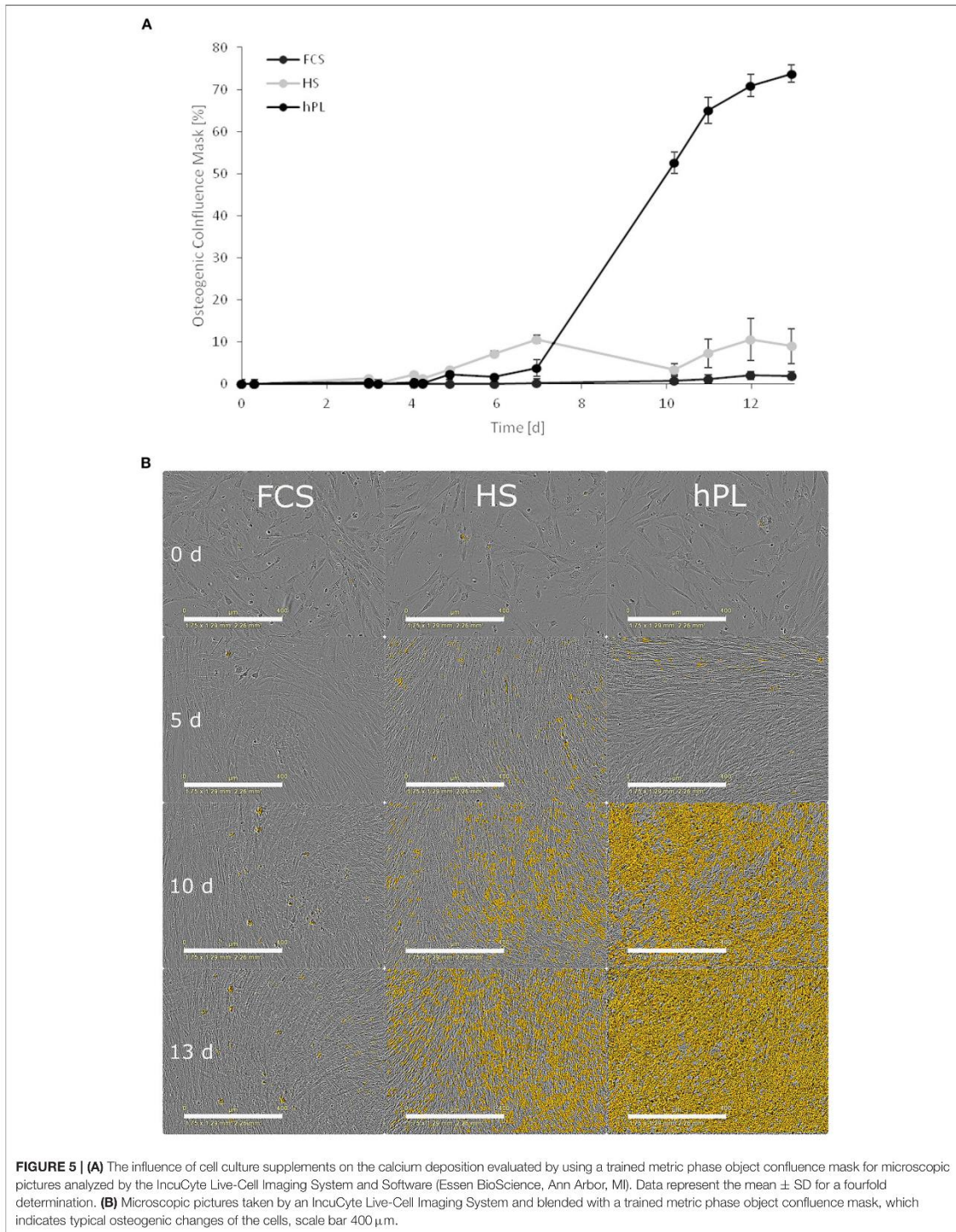
Traditionally MSCs are only able to differentiate into chondrocytes when cultivated in pellet 3D cultures. In this study, hPL supported chondrogenic differentiation of hAD-MSCs also in 2D cultivations system (Figure 6). If media were supplemented with FCS or HS, hAD-MSCs of all tested donors did not show accumulation of proteoglycans after the chondrogenic stimulation (Figure 6A). Under FCS and HS cultivation conditions, cells started to detach from the cell culture surface and to agglomerate already after 2 weeks of differentiation. In the presence of hPL, cells from all tested donors started to accumulate proteoglycans already after 2 weeks of stimulation, as demonstrated by the positive Alcian Blue staining. After 2 weeks of stimulation, an increased GAG production was measured in the presence of hPL (Figure 6B). hAD-MSCs cultivated with hPL-supplemented differentiation medium showed the highest GAG/DNA ratios during the entire period of differentiation. These data demonstrate that the sole presence of hPL in chondrogenic medium can induce chondrogenic differentiation and accumulation of glycosaminoglycans by hAD-MSCs.

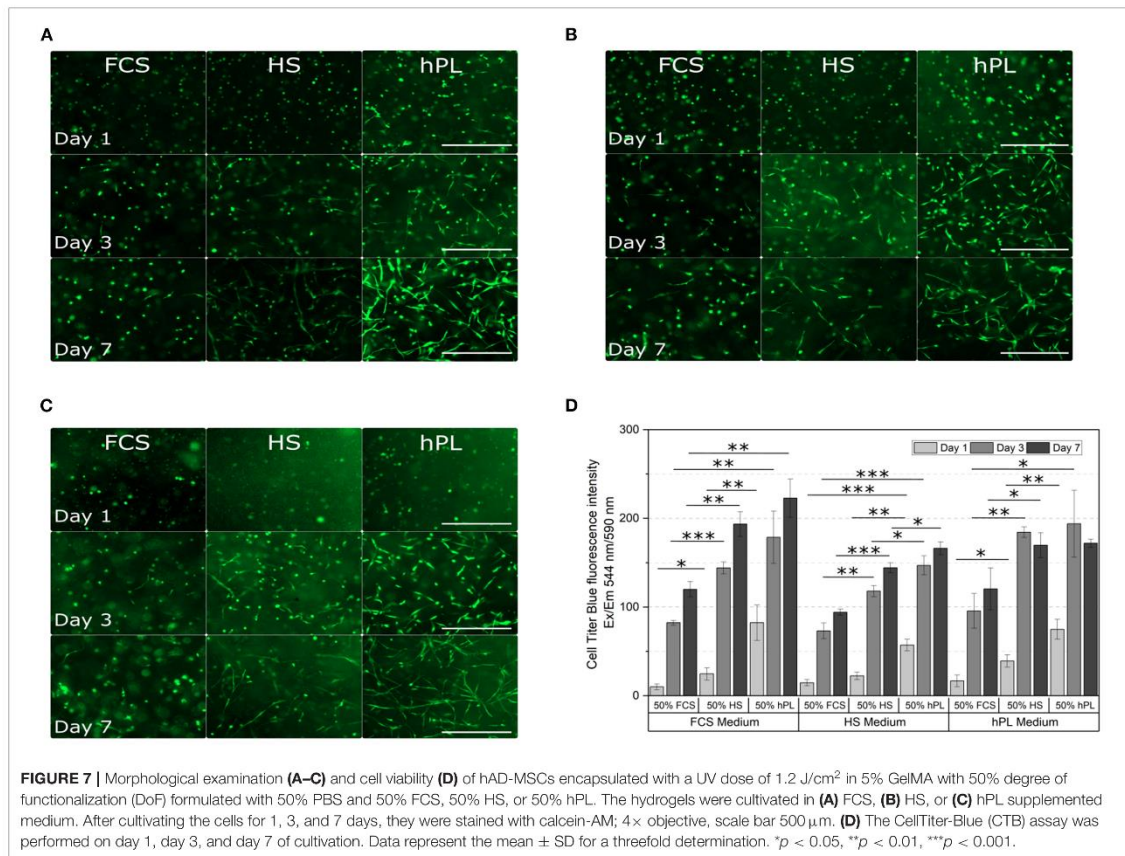
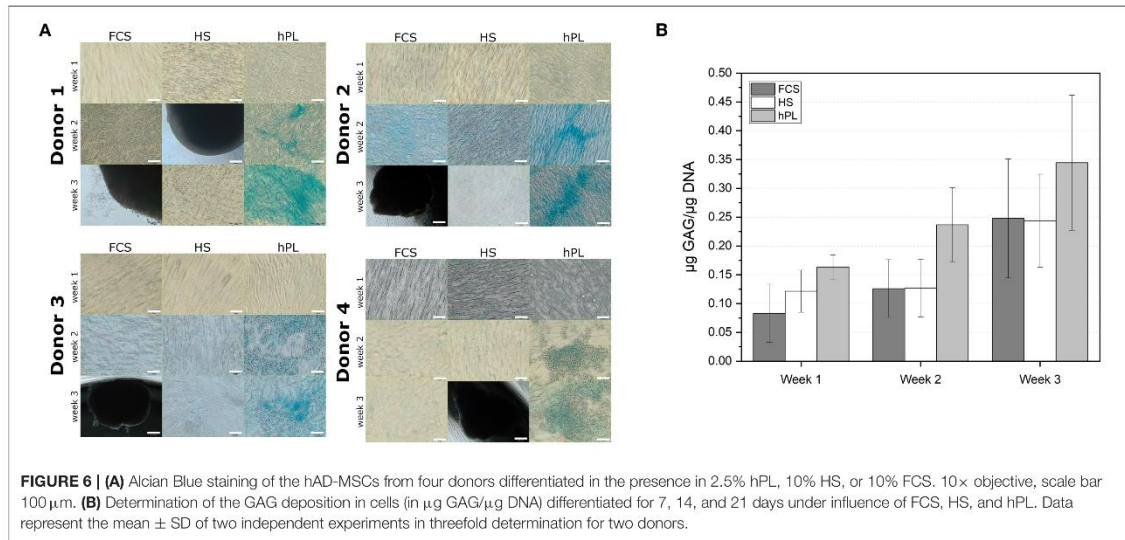
Comparative Analysis of the Influence of Different Medium Supplements in 3D Cultivation

To compare the influence of different supplements on hAD-MSCs cultivated in hydrogels, both addition of supplements directly into hydrogels and addition of supplements to the media were investigated (Figure 1). To evaluate the cell growth and behavior, the morphology as well as the metabolic activity of the cells was measured (CTB).

In almost all GelMA hydrogels, increased cell spreading was visible from day three to day seven (Figure 7). The lowest amount of spreading after seven days was observed when hAD-MSCs were encapsulated in GelMA prepared in PBS with the addition of 50% FCS. When additionally cultivated with FCS-supplemented medium, spreading cells were rarely seen 7 days (Figure 7A) and only a few elongated cells were visible after 7 days in the HS or hPL-supplemented medium (Figures 7B,C). In contrast, the addition of HS to the hydrogel had a positive influence on the cell spreading in FCS, HS and hPL-supplemented medium (Figures 7A–C). Encapsulating the cells in GelMA with the addition of 50% hPL led to a more distinct cell spreading in all tested culture media. A few elongated cells could be observed already on day one with most cells showing extensive spreading after 7 days. In hPL-supplemented medium, cells were elongated and formed a three dimensional homogenous cell network.

The metabolic activity in all hydrogels increased over the cultivation time (Figure 7D). Cells encapsulated in GelMA hydrogels formulated with 50% FCS showed the lowest viability in all media, cells encapsulated in GelMA hydrogels formulated with 50% hPL demonstrated the highest viability. Formulating the hydrogels with 50% hPL instead of FCS led to an almost doubled cell viability when cultivated in FCS-supplemented medium. Regarding the media supplementation, supplementation with HS led to the lowest cell viability compared to the supplementation of FCS and hPL. However, in comparison to FCS-supplemented medium, hAD-MSCs cultivated in hPL-supplemented medium did not show a cell viability increase from day three to day seven. Overall, the cultivation of cells in GelMA hydrogels formulated with 50% FCS, in combination with HS-supplemented medium, represents the worst combination. The best combination, with the highest cell viability, was shown by GelMA hydrogels dissolved in 50% hPL, when cultivated in FCS- or hPL-containing medium.





DISCUSSION

Cultivation of human cells, including MSCs, in FCS-supplemented media raises concerns since cells cultivated with animal supplements can cause xenogenic immune reactions and transmit prions or other zoonotic infections after transplantation (Bottio et al., 2003; Capelli et al., 2007; Astori et al., 2016). Moreover, the large-scale manufacturing of these cells requires large amounts of clinical grade FCS, which is in limited supply. The use of serum-free media would be the best choice, however, at the moment only few chemically defined, serum-free media are available on the market (e.g., MSCGM-CDTM media from Lonza). The term “serum-free,” however, does not always mean that the media does not contain supplements of animal or human origin. Moreover, not every chemically defined medium supports cell growth of all kind of MSCs (MSCs of different origin). For example, it has been demonstrated that Mesencult-XF supports growth of hAD-MSCs, but not of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (Al-Saqi et al., 2014). Until efficient “real” serum-free media are developed, it is essential to establish xeno-free systems for *in vitro* expansion of primary human cells, including MSCs. At the moment, more than 1,100 clinical trials are listed where MSCs from different sources are involved (clinicaltrials.gov). Treatment with MSCs often requires an *in vitro* cell expansion step to reach clinically relevant cell numbers. For each treatment, the individual cell dosage is estimated to be 10⁵-10⁹ cells (Simaria et al., 2014). In addition, the expanded MSCs should retain their biological activity (e.g., immunomodulating properties, differentiation capacity and stromal/rescue function). Thus, it is indispensable to have an efficient xeno-free *in vitro* media to expand these cells for clinical trials and later for therapies.

An additional factor which affects the cell quality is the applied cultivation system. As shown in various studies, the chosen cultivation system influences cell behavior and cell functionality, such as the expression of specific factors (Mark et al., 1977; Cukierman et al., 2001, 2002; Abbott, 2003; Bissell et al., 2003; Schmeichel and Bissell, 2003; Lee et al., 2009; Li and Cui, 2014; Papadimitropoulos et al., 2014; Sart et al., 2014; Egger et al., 2019). Therefore, the application of xeno-free *in vitro* media should be combined with cell cultivation in a 3D cultivation system, in order to obtain the best possible replication of the physiological cell state.

In the present work, the influence of hPL on proliferation and differentiation of hAD-MSCs in 2D cultivation systems was investigated and the obtained results were systematically compared with cells cultivated with HS and FCS. In this study, we revealed that the 2D supplementation of cell culture medium with 2.5% hPL accelerated cell proliferation during the first 2–3 passages. Cells isolated from all four tested donors expanded in 2D faster in the presence of 2.5% hPL than in the presence of 10% HS or 10% FCS. Although differences in proliferation capacities could be observed in each donor, the application of hPL will allow each donor to reach the fastest cell expansion. These results were demonstrated earlier for MSCs isolated from human bone-marrow, umbilical cord blood and adipose tissue (Blande

et al., 2009; Shih et al., 2011; Bieback, 2013; Astori et al., 2016). It is important to note that not only supplements (serum) play an essential role in the expansion efficiency, but also the basal media composition. In addition, the right combination of basal media, supplements and seeding strategy is critical to obtain optimal conditions for *in vitro* cell growth (Kasper et al., 2018). In our work, α MEM was used, which is more physiological than the widely used high glucose DMEM or RPMI media.

Human platelets *in vivo* play a major role in homeostasis and represent a rich source of survival and growth factors, which are usually released during wound healing at the site of injury (Shih and Burnouf, 2015). Therefore, hPL could provide an efficient replacement for FCS and HS (Hemeda et al., 2014). Siciliano et al. performed the isolation and successful 2D expansion of human mediastinal hAD-MSCs in virally inactivated GMP-grade hPL (Siciliano et al., 2015). They demonstrated that mediastinal hAD-MSCs cultivated in 10–20% hPL had higher growth rates than the ones cultivated in FCS. In comparison to the above-mentioned study, we could reach the same effect by cultivating the cells with only 2.5% hPL in 2D.

In this work, we also demonstrated that hPL accelerates osteogenic and chondrogenic differentiation in 2D cultures of hAD-MSCs. Cells cultured with hPL remained viable during the entire period of differentiation. The CTB assay is regarded as an indirect measure of viability and proliferation. Since proliferation rate is significantly reduced after induction of differentiation, the low CTB values within hPL supplemented cultures indicate absence of further proliferation and initiation of osteogenic differentiation.

Furthermore, cells from all four donors accumulated calcium in the extracellular matrix already after 1 week of osteogenic stimulation. Concentrations of the extracted Alizarin red were 20 times higher than those measured after cell differentiation in HS and FCS. ALP activity could be detected after the first week, when cultured with hPL-supplemented differentiation medium. In this study, we could monitor the changes in extracellular matrix morphology during osteogenic differentiation online. By training an algorithm with the software of InCuCyte[®] Live-Cell Imaging and Analysis, the increase of mineralization over time was detected by adding a coloring mask to the images. Using the trained mask, the software first recognized calcium deposition after seven days and evenly distributed early mineralization could be detected after only 10 days. This finding of 2D differentiated cells is in line with the results of previous studies that used hPL for 3D cell culture (Kirsch et al., 2019, 2020; Re et al., 2019). Santo et al. demonstrated that scaffolds loaded with hPL supported accelerated differentiation of hAD-MSCs (Santo et al., 2012). Another group used platelet-functionalized polycaprolactone scaffolds to enhance osteogenic differentiation of MG-63 cells (Rampichová et al., 2017). Altaie et al. reported that osteoconductive scaffolds colonized with hPL-expanded MSCs show a good capability to cure bone deficiencies *in vivo* in pre-clinical studies (Altaie et al., 2016). Since CTB was used, it is not possible to differentiate between the proliferation and metabolic activity directly. In further experiments, the cell proliferation and direct cell viability during differentiation could be measured, in order to distinguish

directly between cell number and the metabolic activity of cells differentiating under the influence of the three different medium supplements.

In the case of chondrogenic differentiation in the 2D cultivation system, only cells cultivated in hPL-containing medium were positively stained with Alcian blue. The production of GAG could be already measured in the second week, if cultivated in the presence of hPL. In addition, hPL cultivated cells demonstrated the highest GAG/DNA ratios during the entire period of differentiation. Moreover, the Alcian blue staining was already positive after 2 weeks of stimulation. It is well-known that for most of the protocols for chondrogenic differentiation, cell pellets or 3D constructs need to be created in order to achieve a successful differentiation. In this work, the addition of hPL was sufficient for chondrogenesis in a 2D system. Merceron et al. were unable to detect any GAG production by hAD-MSCs cultured in 2D (Merceron et al., 2011). Only chondrogenic differentiated cells in 3D pellet cultures showed GAG synthesis and accumulation. In our study, we could show a clear Alcian blue staining, as well as a GAG production of cells differentiated with hPL in 2D. Earlier, Feng et al. demonstrated that 10% hPL could improve chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived MSCs in 3D pellets (Feng et al., 2011). It is known that platelets contain numerous growth factors involved in chondrogenesis such as transforming growth factor- β 1, vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), and insulin-like growth factor 2 (IGF-2) (Kabiri et al., 2014). Several groups also demonstrated a positive influence of platelet-rich plasma on chondrogenesis of various MSCs in terms of increased collagen II production as well as upregulation of SOX9 and Aggrecan (Mishra et al., 2009; Xie et al., 2012; Kabiri et al., 2014). Since chondrogenic differentiation of MSCs represents a promising strategy for cartilage regeneration or replacement, application of hPL can provide good conditions for effective *in vitro* induction of chondrogenesis (Boeuf and Richter, 2010). 2D culture applications of osteogenic and chondrogenic differentiated MSCs may be of special interest for high-throughput screening. For instance, they could be used for drug screening in bone and cartilage disease models. Furthermore different studies have shown that osteogenic or chondrogenic pre-differentiated MSCs in 2D can produce cartilage and bone tissue *in vivo* in the same degree as MSCs pre-differentiated in 3D (Merceron et al., 2011).

In addition to the need for xeno-free 2D cell culture protocols, the demand for xeno-free cultivation protocols for 3D cell cultures is also increasing. In the case of hydrogel-based 3D cultivation systems, supplements can be added not only to the medium, but also directly during hydrogel formulation. Although 3D cell cultures with hPL as medium supplement have been studied, there are still certain areas that require further investigation. There are only a limited number of studies which investigated and compared the effect of different supplements on MSCs in general 3D cell culture systems and there are no studies about supplement addition directly to hydrogels (Santos et al., 2018; Kirsch et al., 2019; Re et al., 2019). In a recent study, we have demonstrated that the supplementation of GelMA

hydrogels with different hPL concentrations had a positive effect on cell spreading, proliferation and differentiation, as well as on the material properties such as viscosity, storage modulus and swelling ratio (Kirsch et al., 2019).

With this work we have shown that not only the addition of the supplement to hydrogels, but also the supplement origin plays an important role in cell spreading and growth. Due to the direct addition of supplements to the hydrogels, proteins do not have to diffuse into the hydrogels from the media, and growth factors, adhesion factors and other bioactive proteins are directly accessible to encapsulated cells. In this work we could show that especially the addition of hPL to the hydrogel led to better cultivation conditions for the cells.

In situ formulation of hydrogels with hPL increased the cell spreading of hAD-MSCs compared to FCS- and HS-formulated hydrogels. Supporting our previous findings, hPL in hydrogels led to cell attachment and spreading after only 1 day of cultivation in 3D (Kirsch et al., 2019). In contrast, FCS and HS did not show a general positive influence on cell spreading and cell viability in hydrogels. Several studies have previously shown a hPL-dependent or hPL-supported increase of the proliferation rate and cell number of cells growing on the surface or encapsulated in hPL-containing gels (hPL gels/matrix) and hydrogels (Walenda et al., 2012; Babo et al., 2016; Fortunato et al., 2016; Egger et al., 2019; Re et al., 2019). In addition, the hPL enhanced cell spreading of cells encapsulated in hydrogels was previously observed (Fortunato et al., 2016; Santos et al., 2018; Jooybar et al., 2019). MSCs belong to the anchorage-dependent cells. Therefore, increased cell adhesion and enhanced cell spreading have a major impact on migration, proliferation and differentiation of MSCs (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Trappmann et al., 2012; Wang et al., 2016; Yang et al., 2019). One reason for the positive effect of hPL on the cell attachment and spreading in the hydrogel could be the α -granules of platelets (Kirsch et al., 2019). The α -granules contain many different adhesion proteins, such as vitronectin, fibronectin, thrombospondin and von Willebrand factor, which are released during the platelet lysis (Sander et al., 1983; Wencel-Drake et al., 1985; Kore-Grodzicki et al., 1988; Heijnen and van der Sluijs, 2015; Burnouf et al., 2016). Another possible reason could be the different stiffness of the matrix material, which was shown to increase with higher hPL concentrations in the hydrogel (Kirsch et al., 2019). Indeed, several studies described the effect of the material stiffness from different matrices on the cell behavior of MSCs, embryonic stem cells and fibroblasts (Engler et al., 2004; Solon et al., 2007; Chowdhury et al., 2010; Park et al., 2011; Sun et al., 2018). For instance, Sun et al. demonstrated that a higher stiffness of fibronectin-coated polyacrylamide hydrogels led to greater spreading and adherence of BM-MSCs, as well as to an increased proliferation rate (Sun et al., 2018). However, the exact reason for the positive influence of hPL on cell adhesion and cell spreading in GelMA hydrogels needs to be investigated in more detail in further studies.

The most promising combinations for enhanced cell spreading and increased cell proliferation were observed by hAD-MSCs encapsulated in hydrogels formulated with 50% hPL

cultivated in medium supplemented with 10% FCS or 2.5% hPL. For clinical studies and applications, however, the use of xeno-free cultivation methods is crucial. Therefore, the more suitable xeno-free 3D cultivation protocol would be the cultivation of MSCs in hydrogels formulated with 50% hPL in medium supplemented with 2.5% hPL. Since allogenic and autologous hPL can be added as a supplement to the hydrogel, but also to the medium, individualized xeno-free off-the-shelf TE constructs can be realized on the long-term using this optimized protocol. In this study, the focus of the 3D experiments was to study and compare cell behavior (morphology, cell spreading and metabolic activity) under all possible combinations of supplements added to the medium or during hydrogel formulation. In further experiments the influence of all possible supplement combinations on the differentiation of the encapsulated cells should be investigated.

The advantages of hPL compared to FCS and HS demonstrated in this work regarding the support of osteogenic and chondrogenic differentiation of MSCs in 2D *in vitro* cultivations must be investigated in further studies for 3D cultivation systems. For example, immunohistological staining of differentiation specific markers can be performed inside the hydrogel, as well as after the preparation of cryosections. Cryosections can be histochemically stained for osteogenic (e.g., calcium or alkaline phosphatase activity) and chondrogenic (e.g., collagen, proteoglycan, or glycosaminoglycan) specific markers. Moreover, the hydrogels can also be enzymatically digested in order to liberate encapsulated cells and allow the performance of cell analysis protocols like gene microarray analysis or flow cytometry.

CONCLUSION

Our work demonstrated that medium supplementation with 2.5% hPL is favorable for cultivation of hAD-MSCs in 2D systems and accelerates proliferation as well as osteogenic and chondrogenic differentiation of these cells. To our knowledge, the progress of osteogenic differentiation under the influence of three different supplements was monitored and evaluated in 2D for the first time. Both, osteogenic and chondrogenic differentiation was already detectable after 1 week of stimulation. In 3D systems, we could show that hAD-MSCs in hPL-supplemented hydrogels cultivated with hPL-supplemented medium adhere and spread faster and in higher numbers when compared to FCS and HS as supplement in hydrogels or medium. This indicates that hPL can be a possible xeno-free alternative to the widely used FCS not only in 2D, but also in hydrogel-based 3D cultivation protocols. Until efficient chemically defined serum-free media are established and approved for the large-scale MSCs production and differentiation, hPL can serve as a suitable supplement for xeno-free cell cultivation in 2D and 3D. Produced under optimal conditions of standardization and safety, hPL can become a key supplement for *ex vivo* production of MSCs and *ex vivo* tissue formation for applications in the field of regenerative medicine.

As yet, the precise hPL composition and the reason for fast MSCs differentiation in hPL are unclear.

Further studies including hPL fractionation, protein separation and MS-analysis must be performed in order to elucidate the positive effects of individual components of hPL and for the creation of defined supplements. Taken together, the application of hPL in 2D and 3D *in vitro* cultivation of MSCs appears to be a promising approach for bioregenerative medicine.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

Human AD-MSCs were isolated from adipose tissue of four donors after abdominoplasty surgery. The use of human tissue from patients (after their informed consent) has been approved by the Institutional Review Board (Hannover Medical School, Ref. Nr.: 3475-2017).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MK performed and planned the experiments and wrote the manuscript. AL and TS planned the experiments and proofread the manuscript. AS, JR, and WH prepared the hPL, participated in the experimental design and in proofreading. IP provided the GelMA and proofread the manuscript. SS and PV provided adipose tissue and cell isolation protocols and proofread the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This research was financially supported by the German Research Foundation (DFG Project 398007461 488 3D Dual-Gradient Systems for Functional Cell Screening). The publication of this article was funded by the Open Access fund of Leibniz Universität Hannover.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge Ethan Overfelt and Theresa Schulz for the language correction. Furthermore, we want to acknowledge Sandra Miehke for her help in performing the GelMA experiments and Annabelle-Christin Herder as well as Annalea Brüggemann for their motivation and support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.598389/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abbott, A. (2003). Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 424, 870–872. doi: 10.1038/424870a
- Aldahmash, A., Haack-Sørensen, M., Al-Nbaheem, M., Harkness, L., Abdallah, B. M., and Kassem, M. (2011). Human serum is as efficient as fetal bovine serum in supporting proliferation and differentiation of human multipotent stromal (mesenchymal) stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cell Rev.* 7, 860–868. doi: 10.1007/s12015-011-9274-2
- Al-Saqi, S. H., Saliem, M., Asikainen, S., Quezada, H. C., Ekblad, A., Hovatta, O., et al. (2014). Defined serum-free media for *in vitro* expansion of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 16, 915–926. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.02.006
- Altaie, A., Owston, H., and Jones, E. (2016). Use of platelet lysate for bone regeneration - are we ready for clinical translation? *World J. Stem Cells* 8, 47–55. doi: 10.4252/wjsc.v8.i2.47
- Anh, D. J., Dimai, H. P., Hall, S. L., and Farley, J. R. (1998). Skeletal alkaline phosphatase activity is primarily released from human osteoblasts in an insoluble form, and the net release is inhibited by calcium and skeletal growth factors. *Calcif. Tissue Int.* 62, 332–340. doi: 10.1007/s002239900441
- Araújo, A. B., Furlan, J. M., Salton, G. D., Schmalfluss, T., Röhlig, L. M., Silla, L. M. R., et al. (2018). Isolation of human mesenchymal stem cells from amnion, chorion, placental decidua and umbilical cord: comparison of four enzymatic protocols. *Biotechnol. Lett.* 40, 989–998. doi: 10.1007/s10529-018-2546-z
- Astori, G., Amati, E., Bambi, F., Bernardi, M., Chierigato, K., Schäfer, R., et al. (2016). Platelet lysate as a substitute for animal serum for the *ex-vivo* expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res. Ther.* 7:93. doi: 10.1186/s13287-016-0352-x
- Babo, P. S., Pires, R. L., Santos, L., Franco, A., Rodrigues, F., Leonor, I., et al. (2016). Platelet lysate-loaded photocrosslinkable hyaluronic acid hydrogels for periodontal endogenous regenerative technology. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3, 1359–1369. doi: 10.1021/acsbiomaterials.6b00508
- Bieback, K. (2013). Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfus. Med. Hemother.* 40, 326–335. doi: 10.1159/000354061
- Bieback, K., Hecker, A., Kocaömer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D., et al. (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 27, 2331–2341. doi: 10.1002/stem.139
- Bissell, M. J., Rizki, A., and Mian, I. S. (2003). Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 753–762. doi: 10.1016/j.ceb.2003.10.016
- Blande, I. S., Bassaneze, V., Lavini-Ramos, C., Fae, K. C., Kalil, J., Miyakawa, A. A., et al. (2009). Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion* 49, 2680–2685. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02346.x
- Boeuf, S., and Richter, W. (2010). Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors. *Stem Cell Res. Ther.* 1:31. doi: 10.1186/scrt31
- Bottio, T., Pittarello, G., Bonato, R., Fagiolo, U., and Gerosa, G. (2003). Life-threatening anaphylactic shock caused by porcine heparin intravenous infusion during mitral valve repair. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 126, 1194–1195. doi: 10.1016/S0022-5223(03)00813-4
- Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M. B. C., and Schallmoser, K. (2016). Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 76, 371–387. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.065
- Capelli, C., Domenghini, M., Borleri, G., Bellavita, P., Poma, R., Carobbio, A., et al. (2007). Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplant* 40, 785–791. doi: 10.1038/sj.bmt.1705798
- Cherian, D. S., Bhuvan, T., Meagher, L., and Heng, T. S. P. (2020). Biological considerations in scaling up therapeutic cell manufacturing. *Front. Pharmacol.* 11:654. doi: 10.3389/fphar.2020.00654
- Chowdhury, F., Na, S., Li, D., Poh, Y.-C., Tanaka, T. S., Wang, F., et al. (2010). Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nat. Mater.* 9, 82–88. doi: 10.1038/nmat2563
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., and Yamada, K. M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294, 1708–1712. doi: 10.1126/science.1064829
- Cukierman, E., Pankov, R., and Yamada, K. M. (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 633–640. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00364-2
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy* 8, 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905
- Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J.-R., Begot, L., Holy, X., et al. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* 205, 228–236. doi: 10.1002/jcp.20391
- Egger, D., Oliveira, A. C., Mallinger, B., Hemed, H., Charwat, V., and Kasper, C. (2019). From 3D to 3D: isolation of mesenchymal stem/stromal cells into a three-dimensional human platelet lysate matrix. *Stem Cell Res. Ther.* 10:248. doi: 10.1186/s13287-019-1346-2
- Engler, A. J., Griffin, M. A., Sen, S., Bönnemann, C. G., Sweeney, H. L., and Discher, D. E. (2004). Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.* 166, 877–887. doi: 10.1083/jcb.200405004
- Feng, X., Tian, S., Sun, K., Zhang, J., Zhang, C., Liu, S., et al. (2011). Effect of platelet lysate on chondrogenic differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 25, 1250–1255.
- Fernandez-Rebollo, E., Mentrup, B., Ebert, R., Franzen, J., Abagnale, G., Sieben, T., et al. (2017). Human platelet lysate versus fetal calf serum: these supplements do not select for different mesenchymal stromal cells. *Sci. Rep.* 7:5132. doi: 10.1038/s41598-017-05207-1
- Fortunato, T. M., Beltrami, C., Emanuelli, C., de Bank, P. A., and Pula, G. (2016). Platelet lysate gel and endothelial progenitors stimulate microvascular network formation *in vitro*: tissue engineering implications. *Sci. Rep.* 6:25326. doi: 10.1038/srep25326
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., and Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3, 393–403.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., and Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 16, 381–390.
- Ghamari, S.-H., Abbasi-Kangevari, M., Tayebi, T., Bahrami, S., and Niknejad, H. (2020). The bottlenecks in translating placenta-derived amniotic epithelial and mesenchymal stromal cells into the clinic: current discrepancies in marker reports. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:180. doi: 10.3389/fbioe.2020.00180
- Gimbrone, M. A., Aster, R. H., Cotran, R. S., Corkery, J., Jandl, J. H., and Folkman, J. (1969). Preservation of vascular integrity in organs perfused *in vitro* with a platelet-rich medium. *Nature* 222, 33–36.
- Gstraunthaler, G., Lindl, T., and van der Valk, J. (2013). A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology* 65, 791–793. doi: 10.1007/s10616-013-9633-8
- Heijnen, H., and van der Sluijs, P. (2015). Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J. Thromb. Haemost.* 13, 2141–2151. doi: 10.1111/jth.13147
- Hemed, H., Giebel, B., and Wagner, W. (2014). Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 16, 170–180. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.11.004
- Hemed, H., Kalz, J., Walenda, G., Lohmann, M., and Wagner, W. (2013). Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy* 15, 1174–1181. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.006

- Jonsdottir-Buch, S. M., Lieder, R., and Sigurjonsson, O. E. (2013). Platelet lysates produced from expired platelet concentrates [-108mm]Q22 support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* 8:e68984. doi: 10.1371/journal.pone.0068984
- Jooybar, E., Abdekhodaie, M. J., Alvi, M., Mousavi, A., Karperien, M., and Dijkstra, P. J. (2019). An injectable platelet lysate-hyaluronic acid hydrogel supports cellular activities and induces chondrogenesis of encapsulated mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* 83, 233–244. doi: 10.1016/j.actbio.2018.10.031
- Kabiri, A., Esfandiari, E., Esmaeili, A., Hashemibeni, B., Pourazar, A., and Mardani, M. (2014). Platelet-rich plasma application in chondrogenesis. *Adv. Biomed. Res.* 3:138. doi: 10.4103/2277-9175.135156
- Kasper, C., Charwat, V., and Lavrentieva, A. (2018). *Cell Culture Technology*. Cham, Switzerland: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-74854-2
- Kirsch, M., Birnstein, L., Pepelanova, I., Handke, W., Rach, J., Seltam, A., et al. (2019). Gelatin-methacryloyl (GelMA) formulated with human platelet lysate supports mesenchymal stem cell proliferation and differentiation and enhances the hydrogel's mechanical properties. *Bioengineering* 6:76. doi: 10.3390/bioengineering6030076
- Kirsch, M., Herder, A.-C., Boudot, C., Karau, A., Rach, J., Handke, W., et al. (2020). Xeno-free *in vitro* cultivation and osteogenic differentiation of hAD-MSCs on resorbable 3D printed RESOMER®. *Materials* 13:3399. doi: 10.3390/ma13153399
- Kore-Grodzicki, B., Tauber-Finkelstein, M., Chain, D., and Shaltiel, S. (1988). Vitronectin is phosphorylated by a cAMP-dependent protein kinase released by activation of human platelets with thrombin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 1131–1138. doi: 10.1016/S0006-291X(88)80991-4
- Lange, C., Cakiroglu, F., Spiess, A.-N., Cappallo-Obermann, H., Dierlamm, J., and Zander, A. R. (2007). Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* 213, 18–26. doi: 10.1002/jcp.21081
- Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359–369. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81280-5
- Lavrentieva, A., Hoffmann, A., and Lee-Thedieck, C. (2020). Limited potential or unfavorable manipulations? *Strategies toward efficient mesenchymal stem/stromal cell applications*. *Front. Cell Dev. Biol.* 8:316. doi: 10.3389/fcell.2020.00316
- Lee, J., Lilly, G. D., Doty, R. C., Podsiadlo, P., and Kotov, N. A. (2009). *In vitro* toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small* 5, 1213–1221. doi: 10.1002/smll.200801788
- Lee, M.-S., Wang, J., Yuan, H., Jiao, H., Tsai, T.-L., Squire, M. W., et al. (2019). Endothelin-1 differentially directs lineage specification of adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *FASEB J.* 33, 996–1007. doi: 10.1096/fj.201800614R
- Li, Z., and Cui, Z. (2014). Three-dimensional perfused cell culture. *Biotechnol. Adv.* 32, 243–254. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.10.006
- Lindroos, B., Boucher, S., Chase, L., Kuokkanen, H., Huhtala, H., Haataja, R., et al. (2009). Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells *in vitro*. *Cytotherapy* 11, 958–972. doi: 10.3109/14653240903233081
- Mannello, F., and Tonti, G. A. (2007). Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? *All that glitters is not gold!* *Stem Cells* 25, 1603–1609. doi: 10.1634/stemcells.2007-0127
- Mark, K., von der, Gauss, V., Mark, H., von der, Müller, P. (1977). Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267, 531–532. doi: 10.1038/267531a0
- Mavrina, L., Elstner, E., and Bundschuh, G. (1986). Über die wirkung von thrombozytenlysat auf das proliferationsverhalten menschlicher knochenmarkzellen. *Biomed. Biochim. Acta* 45, 1007–1014.
- Merceron, C., Portron, S., Masson, M., Lesoeur, J., Fellah, B. H., Gauthier, O., et al. (2011). The effect of two- and three-dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel. *Cell Transplant* 20, 1575–1588. doi: 10.3727/096368910X557191
- Mishra, A., Tummala, P., King, A., Lee, B., Kraus, M., Tse, V., et al. (2009). Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng C Methods* 15, 431–435. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0534
- Mojica-Henshaw, M. P., Jacobson, P., Morris, J., Kelley, L., Pierce, J., Boyer, M., et al. (2013). Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy* 15, 1458–1468. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.06.014
- Monsanto, M. M., White, K. S., Kim, T., Wang, B. J., Fisher, K., Ilves, K., et al. (2017). Concurrent isolation of 3 distinct cardiac stem cell populations from a single human heart biopsy. *Circ. Res.* 121, 113–124. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310494
- Moreira Teixeira, L. S., Leijten, J. C. H., Wennink, J. W. H., Chatterjea, A. G., Feijen, J., van Blitterswijk, C. A., et al. (2012). The effect of platelet lysate supplementation of a dextran-based hydrogel on cartilage formation. *Biomaterials* 33, 3651–3661. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.051
- Motedayyen, H., Esmail, N., Tajik, N., Khadem, F., Ghotloo, S., Khani, B., et al. (2017). Method and key points for isolation of human amniotic epithelial cells with high yield, viability and purity. *BMC Res. Notes* 10:552. doi: 10.1186/s13104-017-2880-6
- Müller, I., Kordowich, S., Holzwarth, C., Spano, C., Isensee, G., Staiber, A., et al. (2006). Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 8, 437–444. doi: 10.1080/14653240600920782
- Papadimitropoulos, A., Piccinini, E., Brachat, S., Braccini, A., Wendt, D., Barbero, A., et al. (2014). Expansion of human mesenchymal stromal cells from fresh bone marrow in a 3D scaffold-based system under direct perfusion. *PLoS ONE* 9:e102359. doi: 10.1371/journal.pone.0102359
- Park, J. S., Chu, J. S., Tsou, A. D., Diop, R., Tang, Z., Wang, A., et al. (2011). The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β . *Biomaterials* 32, 3921–3930. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.019
- Pepelanova, I., Kruppa, K., Scheper, T., and Lavrentieva, A. (2018). Gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogels with defined degree of functionalization as a versatile toolkit for 3D cell culture and extrusion bioprinting. *Bioengineering* 5:55. doi: 10.3390/bioengineering5030055
- Pijuan-Galitó, S., Tamm, C., Schuster, J., Sobol, M., Forsberg, L., Merry, C. L. R., et al. (2016). Human serum-derived protein removes the need for coating in defined human pluripotent stem cell culture. *Nat. Commun.* 7:12170. doi: 10.1038/ncomms12170
- Raic, A., Naolou, T., Mohra, A., Chatterjee, C., and Lee-Thedieck, C. (2019). 3D models of the bone marrow in health and disease: yesterday, today and tomorrow. *MRS Commun.* 9, 37–52. doi: 10.1557/mrc.2018.203
- Rampichová, M., Buzgo, M., Míčková, A., Vocetková, K., Sovková, V., Lukášová, V., et al. (2017). Platelet-functionalized three-dimensional poly- ϵ -caprolactone fibrous scaffold prepared using centrifugal spinning for delivery of growth factors. *Int. J. Nanomed.* 12, 347–361. doi: 10.2147/IJN.S120206
- Re, F., Sartore, L., Moulisova, V., Cantini, M., Almici, C., Bianchetti, A., et al. (2019). 3D gelatin-chitosan hybrid hydrogels combined with human platelet lysate highly support human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *J. Tissue Eng.* 10:2041731419845852. doi: 10.1177/2041731419845852
- Ruedinger, F., Lavrentieva, A., Blume, C., Pepelanova, I., and Scheper, T. (2015). Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 623–636. doi: 10.1007/s00253-014-6253-y
- Salzig, D., Leber, J., Merkwitz, K., Lange, M. C., Köster, N., and Czermak, P. (2016). Attachment, growth, and detachment of human mesenchymal stem cells in a chemically defined medium. *Stem Cells Int.* 2016:5246584. doi: 10.1155/2016/5246584

- Sander, H. J., Slot, J. W., Bouma, B. N., Bolhuis, P. A., Pepper, D. S., and Sixma, J. J. (1983). Immunocytochemical localization of fibrinogen, platelet factor 4, and beta thromboglobulin in thin frozen sections of human blood platelets. *J. Clin. Invest.* 72, 1277–1287. doi: 10.1172/JCI111084
- Santo, V. E., Duarte, A. R. C., Popa, E. G., Gomes, M. E., Mano, J. F., and Reis, R. L. (2012). Enhancement of osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells by the controlled release of platelet lysates from hybrid scaffolds produced by supercritical fluid foaming. *J. Control. Release* 162, 19–27. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.06.001
- Santos, S. C., Custódio, C. A., and Mano, J. F. (2018). Photopolymerizable platelet lysate hydrogels for customizable 3D cell culture platforms. *Adv. Health. Mater.* 7:e1800849. doi: 10.1002/adhm.201800849
- Sart, S., Tsai, A.-C., Li, Y., and Ma, T. (2014). Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications. *Tissue Eng. B Rev.* 20, 365–380. doi: 10.1089/ten.TEB.2013.0537
- Schallmoser, K., Bartmann, C., Rohde, E., Reinisch, A., Kashofer, K., Stadelmeyer, E., et al. (2007). Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion* 47, 1436–1446. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01220.x
- Schallmoser, K., and Strunk, D. (2013). Generation of a pool of human platelet lysate and efficient use in cell culture. *Methods Mol. Biol.* 946, 349–362. doi: 10.1007/978-1-62703-128-8_22
- Schmeichel, K. L., and Bissell, M. J. (2003). Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J. Cell Sci.* 116, 2377–2388. doi: 10.1242/jcs.00503
- Schrödel, A. (2007). Die rolle des fetalen kälberserums in zellkulturmedien. *Biol. Unserer Zeit* 37:289. doi: 10.1002/biuz.200790079
- Shih, D. T.-B., and Burnouf, T. (2015). Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for *ex vivo* stem cell expansion. *N. Biotechnol.* 32, 199–211. doi: 10.1016/j.nbt.2014.06.001
- Shih, D. T.-B., Chen, J.-C., Chen, W.-Y., Kuo, Y.-P., Su, C.-Y., and Burnouf, T. (2011). Expansion of adipose tissue mesenchymal stromal progenitors in serum-free medium supplemented with virally inactivated allogeneic human platelet lysate. *Transfusion* 51, 770–778. doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02915.x
- Siciliano, C., Ibrahim, M., Scafetta, G., Napoletano, C., Mangino, G., Pierelli, L., et al. (2015). Optimization of the isolation and expansion method of human mediastinal-adipose tissue derived mesenchymal stem cells with virally inactivated GMP-grade platelet lysate. *Cytotechnology* 67, 165–174. doi: 10.1007/s10616-013-9667-y
- Simaria, A. S., Hassan, S., Varadaraju, H., Rowley, J., Warren, K., Vanek, P., et al. (2014). Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: single-use cell expansion technologies. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 69–83. doi: 10.1002/bit.25008
- Solon, J., Levental, I., Sengupta, K., Georges, P. C., and Janmey, P. A. (2007). Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys. J.* 93, 4453–4461. doi: 10.1529/biophysj.106.101386
- Spees, J. L., Lee, R. H., and Gregory, C. A. (2016). Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res. Ther.* 7:125. doi: 10.1186/s13287-016-0363-7
- Sun, M., Chi, G., Li, P., Lv, S., Xu, J., Xu, Z., et al. (2018). Effects of matrix stiffness on the morphology, adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int. J. Med. Sci.* 15, 257–268. doi: 10.7150/ijms.21620
- Trappmann, B., Gautrot, J. E., Connelly, J. T., Strange, D. G. T., Li, Y., Oyen, M. L., et al. (2012). Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nat. Mater.* 11, 642–649. doi: 10.1038/nmat3339
- Wagner, M., Yoshihara, M., Douagi, I., Damdimopoulos, A., Panula, S., Petropoulos, S., et al. (2020). Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells. *Nat. Commun.* 11:1147. doi: 10.1038/s41467-020-14936-3
- Walenda, G., Hemeda, H., Schneider, R. K., Merkel, R., Hoffmann, B., and Wagner, W. (2012). Human platelet lysate gel provides a novel three dimensional-matrix for enhanced culture expansion of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng. C Methods* 18, 924–934. doi: 10.1089/ten.tec.2011.0541
- Wang, X., Hu, X., Dulińska-Molak, I., Kawazoe, N., Yang, Y., and Chen, G. (2016). Discriminating the independent influence of cell adhesion and spreading area on stem cell fate determination using micropatterned surfaces. *Sci. Rep.* 6:28708. doi: 10.1038/srep28708
- Wencel-Drake, J. D., Painter, R. G., Zimmerman, T. S., and Ginsberg, M. H. (1985). Ultrastructural localization of human platelet thrombospondin, fibrinogen, fibronectin, and von willebrand factor in frozen thin section. *Blood* 65, 929–938.
- Wu, X., Kang, H., Liu, X., Gao, J., Zhao, K., and Ma, Z. (2016). Serum and xeno-free, chemically defined, no-plate-coating-based culture system for mesenchymal stromal cells from the umbilical cord. *Cell Prolif.* 49, 579–588. doi: 10.1111/cpr.12279
- Xie, X., Wang, Y., Zhao, C., Guo, S., Liu, S., Jia, W., et al. (2012). Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterials* 33, 7008–7018. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.058
- Yang, Y., Wang, X., Wang, Y., Hu, X., Kawazoe, N., Yang, Y., et al. (2019). Influence of cell spreading area on the osteogenic commitment and phenotype maintenance of mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* 9:6891. doi: 10.1038/s41598-019-43362-9

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Kirsch, Rach, Handke, Seltsam, Pepelanova, Strauß, Vogt, Scheper and Lavrentieva. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3.2 Mit Thrombozytenlysat hergestelltes Gelatin-Methacryloyl (GelMA) unterstützt die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und verbessert die mechanischen Eigenschaften des Hydrogels

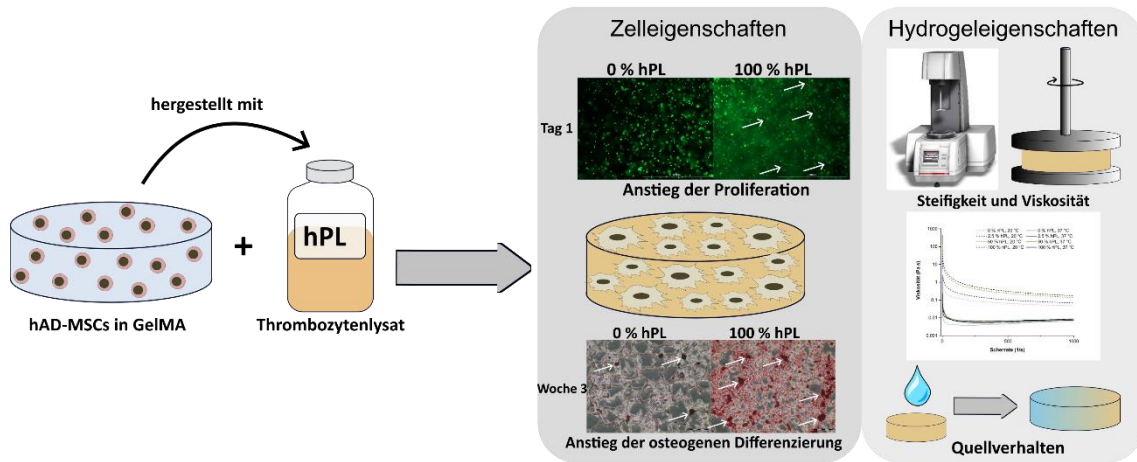


Abbildung 3-2: Graphical abstract zu dem Manuskript "Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Formulated with Human Platelet Lysate Supports Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation and Enhances the Hydrogel's Mechanical Properties"

Der vorherige Abschnitt konnte den positiven Einfluss, den das xenofreie hPL im Vergleich zu FKS und HS auf die Proliferation und die Differenzierung in 2D- und auf das Zellwachstum und Zellverhalten in 3D-Kultivierungen ausübt, veranschaulichen. Neben der Medienkomposition hat ebenso das verwendete Kultivierungssystem einen ausschlaggebenden Einfluss auf das Zellverhalten, die Zellfunktionalität, sowie die Expression spezifischer Faktoren. Zusätzlich bieten Kultivierungen unter physiologischen Bedingungen in 3D-Kulturen bessere Rückschlüsse auf das *in vivo* Zellverhalten^{34,182}.

In der in diesem Kapitel beschriebenen Publikation wurden daher die zellwachstumspezifischen und materialspezifischen Eigenschaften von GelMA Hydrogelen unterschiedlicher DoFs unter Einfluss verschiedener hPL-Konzentrationen im Hydrogel untersucht. Aufgrund ihres variablen DoFs sind Hydrogele als 3D-Zellkultursystem ein universelles Werkzeug für Anwendungen wie beispielsweise im *Tissue Engineering*. Zusätzlich bieten ihre individuell modifizierbaren Eigenschaften die Möglichkeit einer erfolgreichen Anwendung im Bioprinting von Biomaterialien und Zellen für die künstliche Gewebe- oder Organherstellung und -regeneration⁴⁴⁸. Die Materialsteifigkeit hat neben einem Einfluss auf die Bioprintbarkeit und Handhabung des Hydrogels, auch eine Auswirkung auf das Zellwachstum und Zellverhalten. So führen eine höhere Steifigkeit beispielsweise zu einer verbesserten osteogenen Differenzierung von enkapsulierten Zellen^{122,123}. Aus diesem Grund wurden in der hier beschriebenen Arbeit drei verschiedene DoFs von GelMA (50 %, 70 %, 95 % DoF) verwendet und ihre Wirkung auf das Zellverhalten untersucht. Zusätzlich wurden drei unterschiedliche hPL-Konzentrationen (2,5 %, 50 %, 100 % hPL) bei der GelMA-Formulierung eingesetzt und diese mit konventioneller PBS-Substitution

(0 % hPL) verglichen. Da sich im Abschnitt 3.1 hPL bereits als favorisiertes Supplement zur Unterstützung der Zelladhäsion und des Zellwachstums hervorgetan hat, wurde in diesem Abschnitt der Fokus auf einen konzentrationsabhängigen Einfluss des hPLs auf verschiedene Eigenschaften der Zellen und des Hydrogels untersucht.

Die *in situ* Formulierung von Hydrogelen mit hPL führte zu einer verbesserten Zelladhäsion und Zellausbreitung nach nur einem Tag der 3D-Kultivierung und erreichte damit vergleichbare Werte zu einer Geschwindigkeit der Zelladhäsion auf speziell behandelten 2D-Zellkulturoberflächen. Zusätzlich konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Zellviabilität und des osteogenen Differenzierungsgrades (insbesondere bei höherer Steifigkeit von 70 % DoF) nachgewiesen werden. Um sicherzustellen, dass die Substitution mit hPL keinen negativen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele und somit auf die 3D-Bioprintbarkeit nimmt, wurden rheologische Untersuchungen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Supplementierung mit hPL die Viskosität der GelMA-Lösungen und das Speichermodul der GelMA Hydrogele steigern konnte und zu einem geringeren Quellverhalten der Hydrogele führte. Diese Ergebnisse weisen auf eine gute Bioprintbarkeit hin, da hPL direkt als zellviabilitäts- und viskositätssteigerndes Additiv verwendet werden kann. Zudem führt ein geringes Quellverhalten zu einer Aufrechterhaltung der Formstabilität eines gedruckten Hydrogels.

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass die Supplementierung von GelMA verschiedener DoFs mit hPL einen positiven Einfluss auf die Zelladhäsion, die -ausbreitung, die Proliferation und osteogene Differenzierung hat. Außerdem führte hPL zu einer positiven Beeinflussung der Viskosität der GelMA-Lösung, des Speichermoduls und Quellverhaltens der Hydrogele. Diese Erkenntnisse ebnen den Weg für die Etablierung von Formulierungsprotokollen für Hydrogele mit der direkten Zugabe von hPL, um die Hydrogeleigenschaften und das Zellwachstum nachhaltig zu verbessern. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse eine erfolgreiche Anwendung von hPL als xenofreies Mediumsupplement für Hydrogele als 3D-Zellkultursystem.

In dem folgenden Artikel *„Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Formulated with Human Platelet Lysate Supports Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation and Enhances the Hydrogel's Mechanical Properties“* werden die Ergebnisse detailliert beschrieben und diskutiert.

Article

Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Formulated with Human Platelet Lysate Supports Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation and Enhances the Hydrogel's Mechanical Properties

Marline Kirsch ¹, Luise Birnstein ¹, Iliyana Pepelanova ¹, Wiebke Handke ², Jessica Rach ², Axel Seltsam ², Thomas Scheper ¹ and Antonina Lavrentieva ^{1,*}

¹ Institute of Technical Chemistry, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 30167 Hannover, Germany

² German Red Cross Blood Service NSTOB, 31832 Springe, Germany

* Correspondence: lavrentieva@iftc.uni-hannover.de; Tel.: +49-511-762-2955

Received: 26 July 2019; Accepted: 24 August 2019; Published: 28 August 2019



Abstract: Three-dimensional (3D) cell culture is a major focus of current research, since cultivation under physiological conditions provides more reliable information about in vivo cell behavior. 3D cell cultures are used in basic research to better understand intercellular and cell-matrix interactions. Moreover, 3D cell culture plays an increasingly important role in the in vitro testing of bioactive substances and tissue engineering. Gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogels of different degrees of functionalization (DoFs) are a versatile tool for 3D cell culture and related applications such as bioprinting. Human platelet lysate (hPL) has already demonstrated positive effects on 2D cell cultures of different cell types and has proven a valuable alternative to fetal calf serum (FCS). Traditionally, all hydrogels are formulated using buffers. In this study, we supplemented GelMA hydrogels of different DoF with hPL during adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (AD-MSCs) encapsulation. We studied the effect of hPL supplementation on the spreading, proliferation, and osteogenic differentiation of AD-MSCs. In addition, the influence of hPL on hydrogel properties was also investigated. We demonstrate that the addition of hPL enhanced AD-MSC spreading, proliferation, and osteogenic differentiation in a concentration-dependent manner. Moreover, the addition of hPL also increased GelMA viscosity and stiffness.

Keywords: gelatin-methacryloyl (GelMA); hydrogels; 3D cell culture; human platelet lysate; adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs)

1. Introduction

Three-dimensional (3D) cell culture systems provide a more physiological environment for cells in comparison to traditional 2D cell cultures in terms of cell-cell and cell-matrix interactions and diffusion behavior. Indeed, in 2D cell cultures, signaling molecules released by cells are immediately diluted in the greater volume of the cell culture medium instead of acting in a concentration- and site-dependent manner on other cells. Moreover, no physiological gradients of signaling molecules, metabolites, and oxygen can be created in 2D culture systems. For these reasons, 3D cultures are now increasingly used in basic research, drug screening, toxicity studies, and tissue engineering (TE) [1–4]. There are several 3D cell culture models that are used for these applications: scaffold-free cellular aggregates, cells growing on natural or synthetic scaffolds, and cells encapsulated in hydrogels [5,6]. The latter have become highly popular, since hydrogels can be made of a great variety of synthetic and natural molecules, and their properties can be adjusted according to cell model requirements [7–9]. Among others, gelatin-methacryloyl (GelMA) provides a broad spectrum of tunable parameters,

which lead to the creation of hydrogel networks with different stiffness and pore architectures [10–13]. Thus, these hydrogels can serve as a versatile platform for 3D cell culture research and TE. Mesenchymal stem cells (MSCs) are widely used in biomedical applications. These include the use of MSCs in cell therapies for different indications and as part of TE constructs. Although cell therapies using MSCs are currently involved in over 900 clinical trials, the field of tissue engineering is still under development [14]. One of the challenges in this case is the development of suitable scaffolds. In the case of soft tissues, decellularized human tissues could be used as a TE scaffold. This strategy, however, has several limitations, such as possible rejection in case of allogenic transplantation [15,16]. Thus, engineered polymers like hydrogels represent a valuable alternative to decellularized tissues.

On the one hand, the cultivation of cells in 3D systems recapitulates the *in vivo* microenvironment and diffusion rates in a better manner. On the other hand, slower diffusion rates can slow down cell adhesion and nutrient supply. Indeed, in comparison to 2D cell cultures, cell adhesion in hydrogels is much slower [17]. One reason for this observation could be that cell-containing constructs are traditionally formulated from hydrogels reconstituted in buffers (e.g., in phosphate buffer saline (PBS)). Even if the hydrogels in question possess enough arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motifs for focal adhesion, typical adhesion proteins like fibronectin are still missing inside the bulk hydrogel and need to diffuse from the media into the hydrogel to exert their effects.

Existing studies have shown that human platelet lysate (hPL) provides cells cultivated *in vitro* with numerous growth factors and small molecules required for growth and proliferation [18–28]. hPL increases cell proliferation and differentiation in 2D and can be used as a xeno-free supplement for various types of primary cells, including MSCs [18,19,22–30]. hPL can be easily produced from human platelet concentrate in conformity with good manufacturing practice (GMP) guidelines [28]. Thus, hPL appears to be a valuable alternative to FCS. Moreover, the application of hPL complies with modern social principles of ethics, sustainability, recycling, and conservation of resources. Platelets are donated worldwide within the scope of blood donation campaigns, though more than twenty percent of donated platelets expire before they can be used for infusions, due to their short shelf life. Since no differences were detected between the use of hPL prepared from expired or fresh platelet concentrates as a medium supplement, it is possible and desirable to recycle expired platelets obtained from blood banks [31].

In the present study, we hypothesized that the formulation of GelMA hydrogels with hPL will be beneficial for MSCs in terms of cell spreading, proliferation, and osteogenic differentiation. The effect of hPL addition on the mechanical properties of GelMA has also not been studied yet. In this work, we investigated (1) the influence of hPL on MSCs cultivated in hydrogels and (2) the influence of hPL on hydrogel viscosity and stiffness.

2. Materials and Methods

2.1. GelMA Synthesis and Hydrogel Preparation

GelMA of different degrees of functionalization (DoF) (50%, 70%, and 95%) was synthesized and analyzed as described earlier [10]. GelMA solutions were prepared at a concentration of 5% (w/v) by weighing an appropriate amount of GelMA and dissolving it in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), in PBS with the addition of 2.5%, 50% hPL (% v/v), or by 100% hPL (hPL pH value 7.3, manufactured by German Red Cross, Blood Service NSTOB, Springe, Germany). The GelMA solutions were incubated in a water bath until complete dissolution of the solid GelMA at 37 °C. All GelMA solutions contained 2-hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure 2959) at a final concentration of 0.1% (w/v). Warm GelMA solutions were sterile filtered prior to cell experiments using 0.45- μ m polyethersulfone (PES) filters under aseptic conditions.

2.2. Rheological Characterization

GelMA viscosity was determined at 20 °C and 37 °C by rotational viscosimetry using an MCR 302 modular rheometer (Anton Paar, Graz, Austria) equipped with a plate-plate geometry (20-mm

plate diameter) and a gap size of 1 mm. The shear rate was varied from 0.1–1000 s⁻¹, which is a typical shear rate region associated with pneumatic extrusion bioprinting.

The storage modulus of GelMA hydrogels with and without the addition of hPL was investigated in situ at 25 °C using an MCR 302 modular rheometer (Anton Paar, Graz, Austria) equipped with a plate-plate geometry (20-mm diameter, 1-mm gap size). The sample volume of 360 µL of GelMA with 0.1% (w/v) photoinitiator (PI) was filled in between the gap and was polymerized by performing in situ UV cross-linking by irradiation with a UV lamp (Delolux 80, Delo, Windach, Germany) from below, with a UV intensity of 20 mW/cm² and UV irradiation time of 5 min. The storage modulus was recorded with a time sweep oscillatory test under a constant strain amplitude of 1% and at a constant frequency of 1 Hz, which is within the linear viscoelastic (LVE) region. The parent gelatin material was dissolved, and a sample volume of 400 µL was filled in silicon molds (20-mm diameter) and solidified for an hour at room temperature. The solid construct was placed in the rheometer, and the storage modulus was recorded with a time sweep oscillatory test.

2.3. Hydrogel Swelling

Polymerized GelMA hydrogels were incubated in water until equilibrium and weighed. The hydrogels were then frozen over night at –80 °C and lyophilized. The weight of the hydrogels after freeze-drying was also determined. The swelling ratio can be calculated from the weight after swelling (W_S) and the weight of the dry hydrogel after lyophilization (W_D) according to the following formula [32]:

$$\text{Swelling ratio} = \frac{(W_S - W_D)}{W_D}$$

2.4. Cell Culture

Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) were isolated from adipose tissue after abdominoplasty. All patients provided their informed consent, as approved by the Institutional Review Board (Hannover Medical School) with the reference number 3475-2017. The isolated cell populations were characterized as mesenchymal stem cells by surface marker analysis, differentiation capacity, and functional properties [10]. Cells were expanded in alpha-MEM medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Germany) containing 1 g/L glucose, 2 mM L-glutamine, 10% human serum (HS) (CC-pro, Oberdorla, Germany), and 50 µg/mL gentamicin (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), harvested by accutase treatment (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and cryopreserved at Passage 1 until the start of the experiments. The experiments were performed with cells of Passages 2–8 only.

2.5. Encapsulation and Cultivation of AD-MSCs in Hydrogels

AD-MSCs were encapsulated in GelMA hydrogels at a concentration of 1.0×10^6 cells/mL in 50-µL disks (6-mm diameter) in silicon molds with the help of a cross linker (BLX-365 Bio-Link, 365 nm, Vilber Lourmat, Germany) with a UV intensity of 1.2 J/cm² and a polymerization time of approximately 5 min. Polymerized hydrogel constructs with cells were incubated in 24-well plates in 400 µL of alpha-MEM medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Germany) containing 1 g/L glucose, 2 mM L-glutamine, 10% HS (CC-pro, Oberdorla, Germany), and 50 µg/mL gentamicin (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). To avoid cell adhesion on the well bottoms, 1% agarose coating of wells was performed before cultivation. Hydrogel constructs with cells were cultivated in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 21% O₂ at 37 °C. Indirect cell viability was estimated by the CellTiter-Blue® (CTB) assay according to the manufacturer's instructions (Promega, Mannheim, Germany). Briefly, CTB stock solution was added to the medium of the cells to receive a concentration of 10% CTB solution (1:10 v/v). After 5 h of incubation, fluorescence was measured at an extinction wavelength of 544 nm and an emission wavelength of 590 nm using a microplate reader (Fluoroskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Encapsulated AD-MSCs cultivated for one, three, or seven days were incubated in 4 µM calcein-acetoxymethyl (AM)

(Merck, Darmstadt, Germany) solution in basal alpha-MEM for 40 min at 37 °C and analyzed with a Cytation 5-Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

2.6. Osteogenic Differentiation, Cryosections, and Alizarin Red Staining

AD-MSCs encapsulated in hydrogels with and without hPL were differentiated into osteoblasts. The osteogenic differentiation medium contained 5 mM β -glycerophosphate, 0.1 μ M dexamethasone, 0.2 mM L-ascorbate-2-phosphate, 0.5% gentamicin, as well as 10% HS. The medium was exchanged every 3–4 days. Cells in hydrogels were cultured for 7, 14, or 21 days and then washed in PBS and fixed for 15 min at 4 °C with 4% paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany). Fixed hydrogels were embedded and frozen at -20 °C in Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, The Netherlands) for cryostat sectioning. Twelve-micrometer cryosections were made with the help of a Microm HM 560 cryostat (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) at -20 °C and mounted on Super Frost glass slides (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). For the evaluation of osteogenic differentiation, cryosections were incubated in Alizarin Red solution, containing 1% Alizarin Red S (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in deionized H₂O, for 15 min at room temperature. After washing with deionized H₂O, the red chelates were detected and analyzed with a fluorescent microscope (Olympus, IX50, Olympus Corporation, Tokyo, Japan), equipped with a camera (Olympus SC30, IX-TVAD, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) and the CellSens Software (CellSens Standard 1.7.1, Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

3. Results

3.1. AD-MSCs' Viability in GelMA-Hydrogels

To evaluate the influence of hPL on 3D-cultivated AD-MSCs, cells were encapsulated in three different GelMA-hydrogels of 50%, 70%, and 95% DoF. Polymerization was performed at an intensity of 1.2 J/cm², which has been shown to promote MSC spreading [10]. Each GelMA solution was prepared in PBS with the addition of 0%, 2.5%, or 50% hPL (% v/v) or by adding hPL only (100% hPL), prior to the addition of the photoinitiator and the polymerization of the hydrogels. The specific hPL concentrations used in this study were selected because: (1) 2.5% hPL is the recommended concentration for 2D cell cultivation [33,34]; (2) 100% represents a complete substitution of PBS with hPL; (3) 50% hPL serves as an intermediate point between 2.5% and 100% hPL; and (4) 0% hPL functions as a control. Calcein-AM staining was performed to evaluate the influence of hPL addition on cell viability and spreading. Cell proliferation in hydrogels was evaluated using a CTB assay.

As shown in Figure 1, the calcein-AM staining indicated the presence of viable cells in all tested GelMA hydrogels. In comparison to cultivation in hPL-free materials, AD-MSCs demonstrated increased cell spreading and growth when cultivated in GelMA hydrogels containing hPL. Single cell spreading was detectable already one day after encapsulation of AD-MSCs in the lowest functionalized GelMA (50% DoF) formulated in hPL (100%) (Figure 1A). Cell spreading of AD-MSCs in GelMA hydrogels typically occurred after three days of cultivation [10]. In a similar manner, the AD-MSCs cultivated in hPL-free GelMA (hydrogels with 50% and 70% functionalization) showed only a few spreading cells after three days of cultivation (Figure 1A,B). A positive effect of adding hPL to GelMA could be seen by comparing the cell morphology in 0, 2.5, 50, and 100% hPL containing GelMA hydrogels on Day 7. The higher the hPL concentration, the more cells could spread and establish cell-cell contacts. AD-MSCs cultured in 100% hPL containing GelMA-hydrogels showed extensive cell-cell contacts and a pronounced three-dimensional network of cells. In contrast, AD-MSCs cultivated in GelMA hydrogels with a high DoF of 95% displayed a round morphology (Figure 1C). These cells exhibited no spreading or cell-cell contacts over the entire cultivation period. The only exceptions to this observation were cells cultivated in GelMA containing 50% hPL. Under these conditions, a few cells spread within the first 24 h and showed extensive cell spreading and three-dimensional cell growth after seven days of cultivation. Moreover, it was also noticeable that cell aggregates formed in

hydrogels with 0% and 2.5% hPL after three and seven days, respectively. This is even more evident by comparing the images of the entire hydrogel (Figure A1). Since cells did not sufficiently spread and create cell-cell contacts in 95% DoF GelMA hydrogels, we excluded this material from further investigations of osteogenic differentiation.

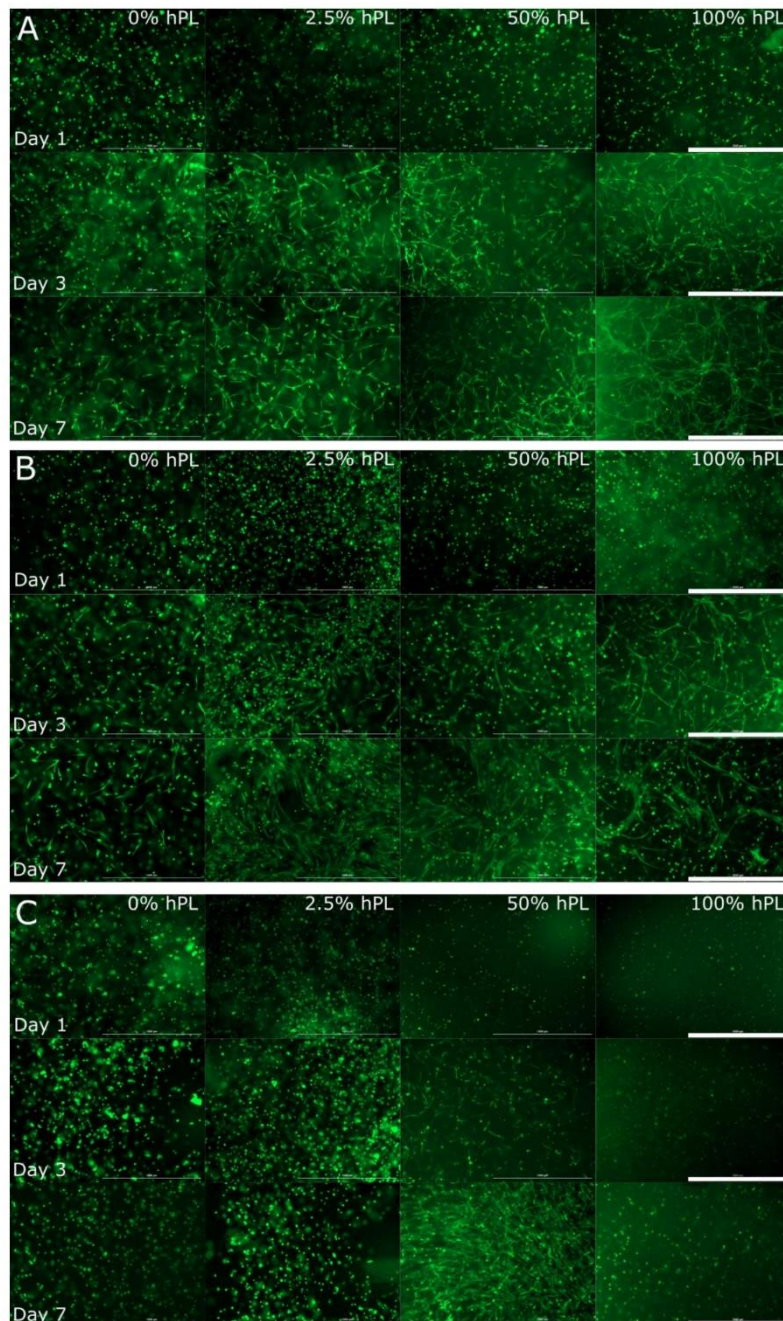


Figure 1. Morphological examination of AD-MSCs encapsulated with a UV dose of 1.2 J/cm^2 in 5% GelMA with (A) 50% degree of functionalization (DoF), (B) 70% DoF, and (C) 95% DoF, formulated with 0, 2.5, 50, and 100% human platelet lysate (hPL). After cultivation of 1, 3, and 7 days, the cells were stained with calcein-AM; 4 \times objective, scale bar 1000 μm .

In addition to the calcein-AM staining, a CTB assay was performed to estimate the viability of the cells after one, three, and seven days of cultivation in GelMA hydrogels with 50%, 70%, and 95% of functionalization. As can be seen in Figure 2, a higher hPL concentration in the GelMA led to higher cell viability, at least on Day 7 of cultivation. Contrary to GelMA with DoF of 50% and 70%, cell viability in 95% DoF GelMA-hydrogels was increased until the third day by the addition of 50% and 100% hPL. These results suggest that platelet lysate contributes to the preservation and enhancement of cell viability.

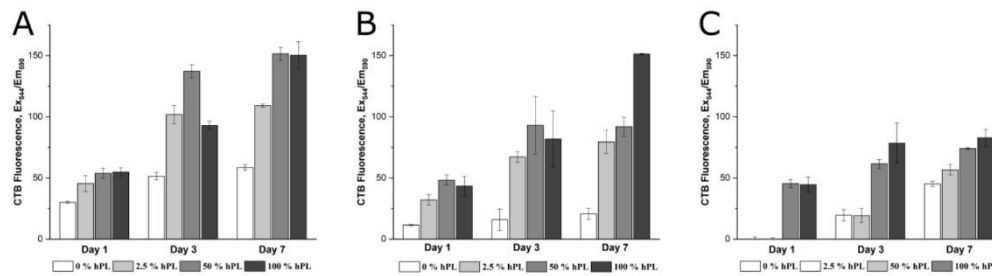


Figure 2. Cell viability of AD-MSCs encapsulated with a UV dose of 1.2 J/cm² in 5% (w/v) GelMA with (A) 50% DoF, (B) 70% DoF, and (C) 95% DoF, dissolved in 0, 2.5, 50, and 100% hPL. The CellTiter-Blue® (CTB) assay was performed on Day 1, Day 3, and Day 7 of cultivation. Data represent the mean ± SD for a threefold determination.

As shown before by Pepelanova et al., AD-MSCs cultivated in GelMA with a DoF of 70% or above were not able to spread and to establish cell-cell contacts [10]. The addition of hPL to GelMA, however, increased cell viability, supported cell spreading, and led to the formation of three-dimensional networks. The increased proliferation and viability can be attributed to growth factors contained in platelet lysate, such as epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and vascular endothelial growth factor (VEGF) [27]. Improved cell spreading after hPL addition can be explained by the influence of proteins like vitronectin and fibronectin, which mediate cell adhesion to the matrix [35].

3.2. AD-MSC Differentiation in GelMA-Hydrogels

In order to investigate the influence of hPL on the differentiation grade of AD-MSCs in different GelMA hydrogels (50% and 70% DoF), cells were cultivated for 7, 14, and 21 days after induction of osteogenic differentiation. As illustrated in Figure 3, osteogenic differentiation of AD-MSCs was detected by Alizarin Red staining.

In contrast to 2D culture (Figure A2, the AD-MSCs' cultivation in 3D constructs led to an accumulation of calcium already after one week of cultivation. Osteogenic differentiation in 50% functionalized GelMA was more pronounced with 0% and 2.5% hPL after one week. However, the addition of 50% and 100% hPL to GelMA showed a more homogeneous and intensive Alizarin Red staining in Week 3 (Figure 3A). Furthermore, GelMA with a DoF of 70% showed an increase of differentiation in Weeks 2 and 3 in GelMA hydrogels containing 50% and 100% hPL (Figure 3B). Thus, higher hPL concentrations in hydrogels increased osteogenic differentiation of AD-MSCs. In less functionalized hydrogels, bone nodules were detected earlier in GelMA hydrogels formulated with lower hPL concentrations, while higher functionalized GelMA showed increased formation of bone nodules with higher hPL concentrations. Bone nodules are formed in vivo by progenitor cells, which differentiate into osteoblasts and are thus characteristic for osteogenic differentiation [36]. A positive effect of 3D cell cultivation on the osteogenic differentiation of MSCs was also demonstrated by Re et al. in gelatin-chitosan hydrogels [9]. Our results also support the observation that 3D cultivation enhances the osteogenic differentiation of AD-MSCs and illustrates the differentiation-supporting effect of hPL.

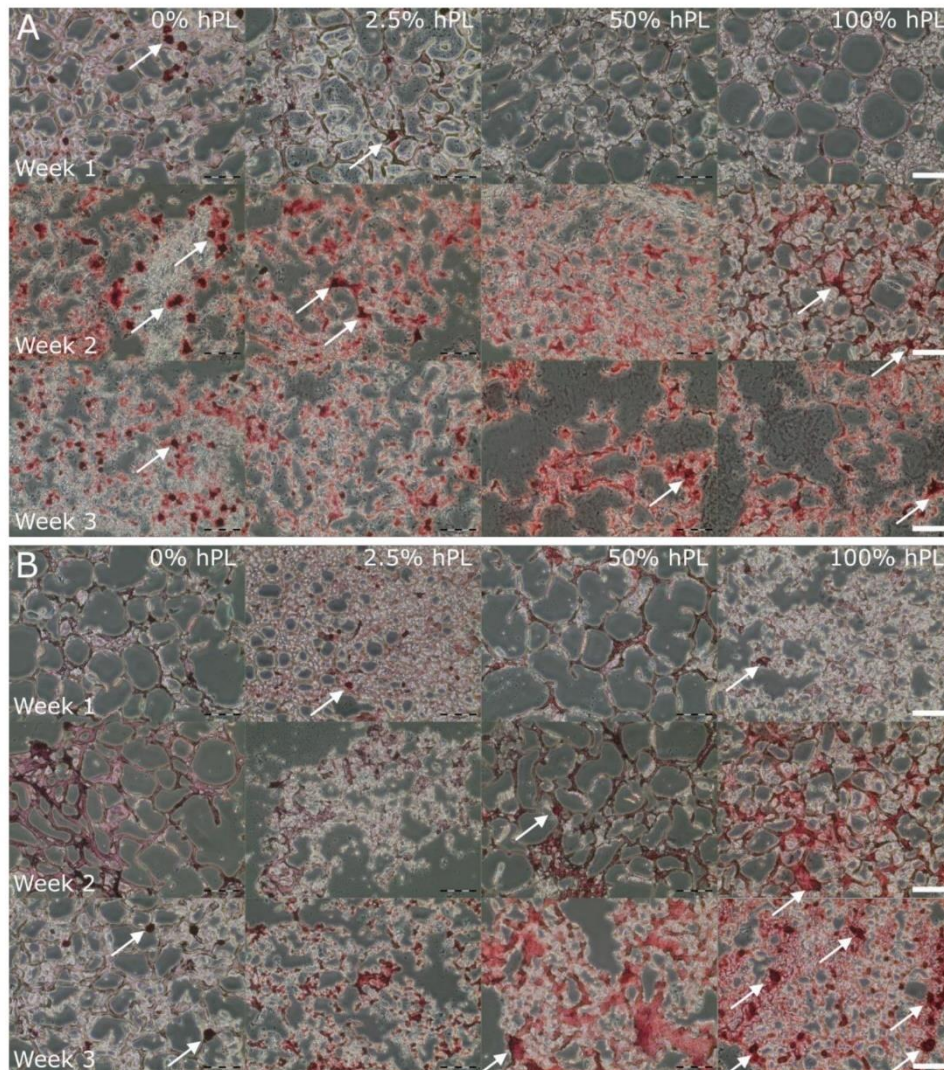


Figure 3. Osteogenic differentiation of AD-MSCs encapsulated in 5% (w/v) GelMA with (A) 50% DoF and (B) 70% DoF, formulated with 0, 2.5, 50, and 100% hPL. The GelMA-hydrogels were cryosectioned (12 μ m) and stained with Alizarin Red 7, 14, and 21 days after induction of the osteogenic differentiation; 10 \times objective, scale bar 100 μ m.

3.3. Influence of hPL on GelMA Properties

The mechanical properties of hydrogels play an important role in cell fate and in the intended application of these hydrogels as, e.g., bioinks for bioprinting [37]. As shown in this study, the addition of hPL had a positive effect on spreading, proliferation, and osteogenic differentiation of AD-MSCs. As a next step, the influence of hPL on the mechanical properties of GelMA was investigated by measuring the viscosity and storage modulus in rheological experiments.

The viscosity of the hydrogel solution is crucial for the application in extrusion-based bioprinting. On the one hand, the solution in the cartridge syringe requires a high viscosity so that cells do not precipitate before printing. High viscosity is also desired after printing in order to maintain the printed shape before polymerization. On the other hand, a low viscosity is desirable at high pressure during extrusion (shear thinning behavior) [38]. The viscosity of GelMA solutions (DoF 50%) with different concentrations of hPL was determined by varying the shear rate from 0.1–1000 s^{-1} ,

as these shear forces typically occur during bioprinting. The viscosity was measured at 20 and 37 °C, which corresponds to room temperature (e.g., during bioprinting) and the physiological cultivation temperature. As illustrated in Figure 4, all samples showed decreasing viscosity with increasing shear rate. Thus, GelMA showed a shear thinning flow behavior independent of hPL concentration. Furthermore, as expected, the GelMA viscosity at 20 °C was higher than at 37 °C. More interestingly, the addition of hPL increased GelMA viscosity in a concentration-dependent manner. This effect was comparable to the addition of rheological additives such as hyaluronic acid, which increase the viscosity of hydrogels [8]. These results demonstrate that the viscosity of GelMA hydrogels used as bioinks can be adjusted by varying the concentration of hPL and the temperature used for bioprinting.

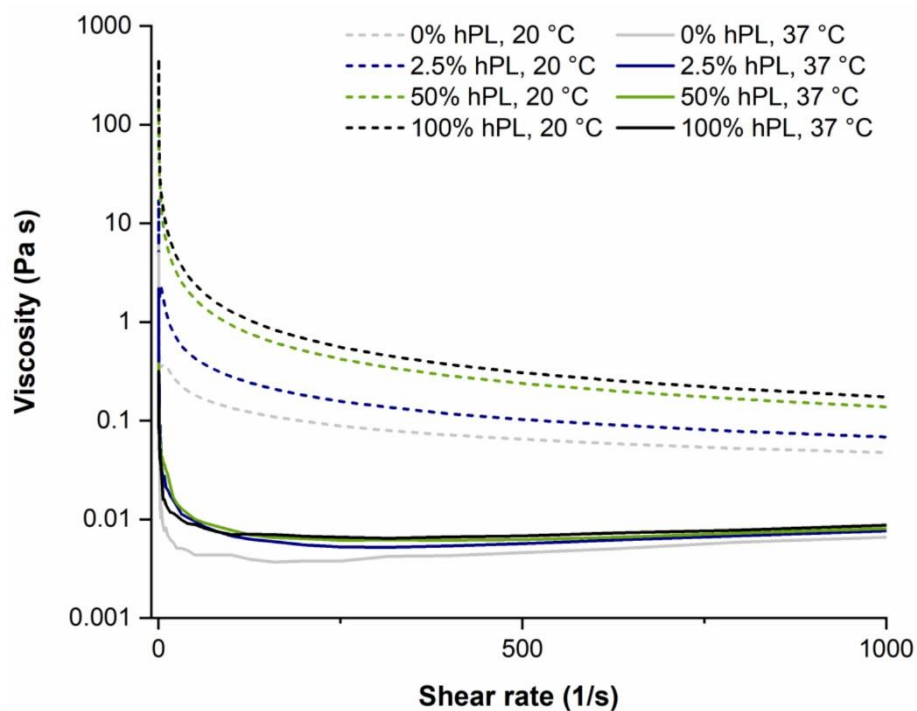


Figure 4. The viscosity of GelMA (5% w/v, DoF of 50%) containing 0%, 2.5%, 50%, and 100% hPL at 20 °C and 37 °C.

The mechanical properties of hydrogels formulated with different hPL levels were investigated using rheology. As can be seen in Figure 5A–C, the storage modulus of GelMA increased with higher hPL concentrations. This effect was also observed for the parent molecule, parent gelatin material without methacrylic modification, formulated with different hPL concentrations and measured at 25 °C, where gelatin formed a physical gel (Figure 5C). At this temperature, gelatin formed a stronger gel than the modified GelMA, whose vinyl side chains led to steric hindrance [39]. Thus, hPL addition enhanced the storage modulus of a hydrogel regardless of the type of cross-linking involved (covalent photo-cross-linking or physical interactions). Apparently, the presence of additional polypeptides and macromolecules in hPL contributes to the overall viscoelastic strength of the polymer network. Similar effects were observed for rheological additives based on polysaccharides or proteins in bioinks, as well as on the presence of protein additives like whey protein on gelatin gels [40,41]. Moreover, during the time-sweep studies of GelMA polymerization, we could also observe that higher levels of hPL led to quicker onset of polymerization.

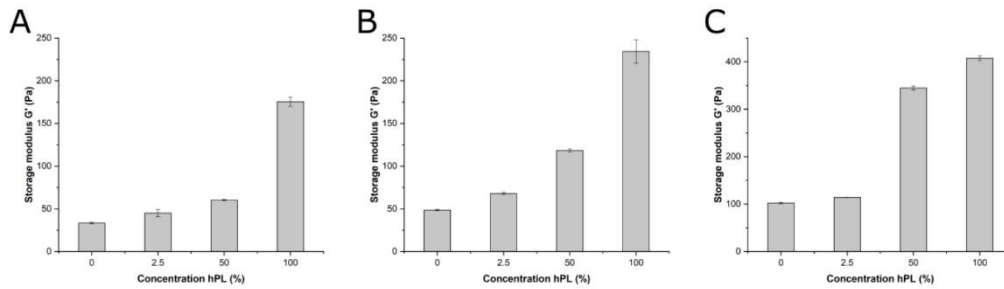


Figure 5. (A) Material stiffness of GelMA hydrogels (5% w/v) with a DoF of 50% (A) and a DoF of 70% (B) at 25 °C determined by a time-sweep oscillatory test. (C) Material stiffness of unmodified gelatin at 25 °C, determined by a time-sweep oscillatory test. Data represent the mean \pm SD for a threefold determination.

Hydrogels can maintain more than 90% water in their 3D network. The extent of water uptake influences the mechanical properties of a hydrogel such as overall elasticity, compressibility, and, thus, ultimately, cell behavior [12,42,43]. For this reason, it was important to investigate the influence of hPL on the swelling ratio of GelMA hydrogels. As can be seen in Figure 6, the swelling ratio decreased with increasing hPL concentration in all tested hydrogels. Incorporating hPL in the GelMA hydrogel decreased overall water uptake by the network. A lower swelling ratio typically indicates a more compact network structure with smaller pores, for example resulting due to the formation of additional cross-links. While hPL did not directly introduce more covalent cross-links into the GelMA hydrogel, the presence of hPL macromolecules reduced available interstitial volume. Another beneficial effect of a lower swelling ratio is improved maintenance of shape fidelity after bioprinting.

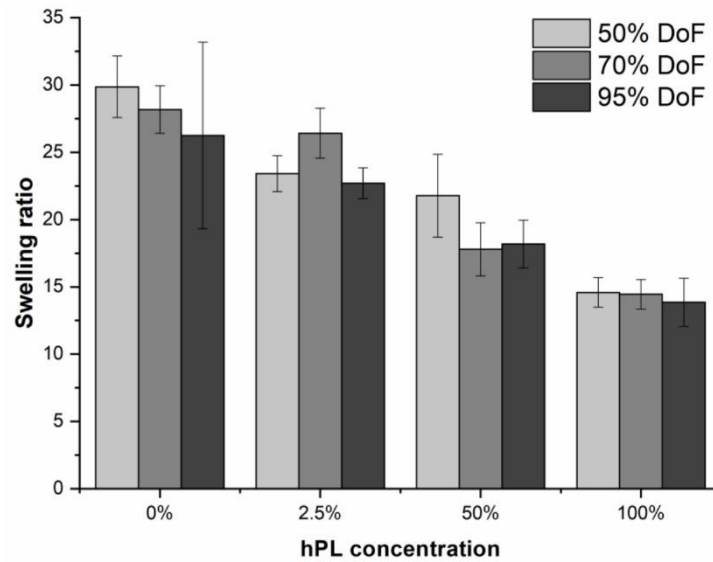


Figure 6. Swelling ratio of GelMA hydrogels with 50%, 70%, and 95% functionalization and the addition of 0%, 2.5%, 50%, and 100% hPL. Data represent the mean \pm SD for a sixfold determination.

Taken together, these results show that the addition of hPL to GelMA not only contributed to the biological effects on the cells, but also influenced the resulting material properties of the hydrogel.

4. Discussion

In this study, the influence of hPL on the cell behavior of 3D cell cultures of AD-MSCs in GelMA hydrogels was investigated. In addition, the material properties of the resulting GelMA hydrogels were studied, as well. Since hPL had already shown a positive effect on the growth of different types of primary and stem cells in 2D [18,21–23,25,26,29,31,44,45], we hypothesized that the addition of hPL during hydrogel formulation would be beneficial for cells growing in 3D cultures. Moreover, the influence of hPL on GelMA material properties in terms of viscosity (before polymerization), storage modulus (after polymerization) and swelling ratio (after polymerization) was also previously unknown. Cultivation of MSCs in 3D seems to be advantageous, since the quality of cells (in terms of production of angiogenic and immunomodulatory factors) from 3D cultures is higher compared to 2D-expanded cells [46–51]. Moreover, physiological cell-cell and cell-matrix interactions can only be recreated in 3D cell cultures [49,52,53]. Earlier, we demonstrated that GelMA hydrogels of different DoFs can be tuned to change their mechanical properties (e.g., UV intensity and hydrogel concentration), which in turn influences MSC growth and behavior [10].

Traditionally, PBS or other buffer solutions are used to formulate or reconstitute hydrogels [8,32,54–58]. In our work, we substituted PBS partially or fully with hPL. The addition of hPL led to a concentration-dependent increase in cell viability and osteogenic differentiation. When cells were encapsulated in hydrogels formulated with PBS only, important nutrients and adhesion factors, which are missing in the bulk hydrogel, must diffuse from the cultivation media or be gradually produced by the cells themselves. Kaemmerer et al. measured the diffusion rate of a 70-kDa molecule in GelMA of DoF 70% [39]. The authors could show that the diffusion of the test molecule inside the hydrogel construct was $23.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and that it was slower than diffusion in water alone. hPL contains molecules of a great variety of sizes (e.g., fibronectin = 440 kDa), so the exact diffusion rate of all proteins cannot be determined. In addition, the phase boundary between gel and liquid medium represents an additional diffusion barrier. As a natural derivative from collagen I, GelMA provides sufficient arginine-glycine-aspartic acid (RGD) sequences for cell adhesion [59–63]. The presence of natural RGD sequences in GelMA leads to cell adhesion and spreading of encapsulated cells typically after three days of cultivation, as shown by our group [10] and other researchers [12]. In contrast, adhesion to the plastic cell culture plate occurred after 24 h in 2D. In situ formulation of hydrogels with hPL leads to cell attachment and spreading only after one day of cultivation in 3D. One possible explanation for this observation is the presence of vitronectin and fibronectin in hPL. Indeed, the α -granules of platelets contain different types of adhesion proteins, including von Willebrand factor (vWF), fibronectin, vitronectin, and thrombospondin [35,64–66]. The exact reasons for the positive hPL effects on cell adhesion and spreading in hydrogels must be investigated in greater detail in future studies. Fast and effective cell adhesion and spreading are extremely important for anchorage-dependent cells like MSCs [67], since adhesion and spreading regulate their proliferation, migration, and differentiation [67–69].

Thus, the supplementation of hydrogels with hPL directly during encapsulation and polymerization can positively influence the cells via both (I) the provision of growth and differentiation factors and (II) the enhancement of cell spreading and adhesion in the hydrogel. This is essential for fast *ex vivo* tissue formation. Moreover, both autologous and allogenic hPL can be used for hydrogel supplementation, which creates the possibility of individualized off-the-shelf TE constructs. The positive effect of hPL addition to the cell culture medium during cultivation of 3D cell cultures was also recently supported by the studies of Re et al. [9]. This group also found that the addition of 5% hPL to the medium increased the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow (BM)- and AD-MSCs encapsulated in gelatin-chitosan hybrid hydrogels [9]. Only three different hPL concentrations (2.5%, 50%, and 100%) were investigated to study the general outcome of PBS substitution during GelMA formulation. Further experiments, using hPL concentrations at levels between tested ones, could lead to even better protocols. Moreover, the influence of hPL addition on other cell types must be studied as well. In future experiments, the combination of the use of

hPL for hydrogel formulation and for cell culture medium supplementation during expansion (2D) and subsequent cultivation in 3D must be also studied, since such a combined protocol could further enhance cell growth and differentiation. In our work, we demonstrated for the first time that the addition of hPL directly to the hydrogels during formulation and polymerization displayed positive effects on AD-MSCs.

Cell behavior and especially cell fate are directly related to the stiffness of matrix materials [70–75]. Thus, soft tissue supports the differentiation of stem cells into neural lineages, while stiffer materials support the differentiation into muscle cells. Finally, hard and rigid materials lead to osteogenic differentiation [70–75]. In this study, three GelMA materials with different degrees of functionalization and thus, stiffness, were used to study the effect on cell growth. A material of 50% DoF was compared to a material of higher mechanical strength (70% DoF). Indeed, we could show that a higher degree of osteogenic differentiation was achieved at the higher DoF and thus at higher mechanical strengths. Moreover, the addition of hPL was shown to contribute to an increase in the overall mechanical strength of the material, which also promoted osteogenic differentiation.

3D bioprinting represents an advanced 3D cell culture technique, where higher spatial control of cell distribution/organization can be achieved. Earlier, we reported that GelMA hydrogels can be used for bioprinting, but that such bioinks would require viscosity enhancers for printing at the low GelMA concentrations supporting AD-MSCs cell spreading [10]. The results of the current work demonstrate that supplementation with hPL alone increases hydrogel viscosity at room temperature, which in turn makes hPL an interesting addition to the bioink toolkit. However, even higher viscosities are usually required for high fidelity extrusion bioprinting [76]. In our lab, we typically use viscosities between 20 and 200 mPa·s for the bioprinting of cell-promoting bioinks. This viscosity range, however, will necessitate the addition of rheological additives or even lower printing temperatures during bioprinting of hPL-formulated GelMA. As an additional effect, hPL decreases the swelling ratio of the hydrogel, which is beneficial for maintaining shape fidelity after printing. Of course, the true printability of GelMA hydrogels formulated with hPL has to be evaluated in future studies.

Taken together, our results demonstrated that the supplementation of GelMA hydrogels with different degrees of functionalization with hPL had a positive effect on cell spreading, proliferation, and differentiation. Moreover, the viscosity of GelMA solutions and the storage modulus of cross-linked hydrogels were increased by the addition of hPL. These results can be used to improve the protocols/methods for hydrogel-based tissue engineering and for extrusion-based bioprinting.

Author Contributions: Conceptualization, M.K. and A.L.; methodology, I.P., A.L., J.R., W.H., and M.K.; validation, L.B. and M.K.; resources, A.S. and T.S.; writing, original draft preparation, M.K. and A.L.; writing, review and editing, I.P., J.R., W.H., A.S., T.S., and A.L.; supervision, T.S. and A.L.

Funding: This research was funded by the German Research Foundation (DFG Project 398007461 488 “3D Dual-Gradient Systems for Functional Cell Screening”).

Acknowledgments: Our gratitude also goes to Peter Vogt and Sarah Strauß, Hannover Medical School, for providing the adipose tissues and corresponding regulatory framework.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

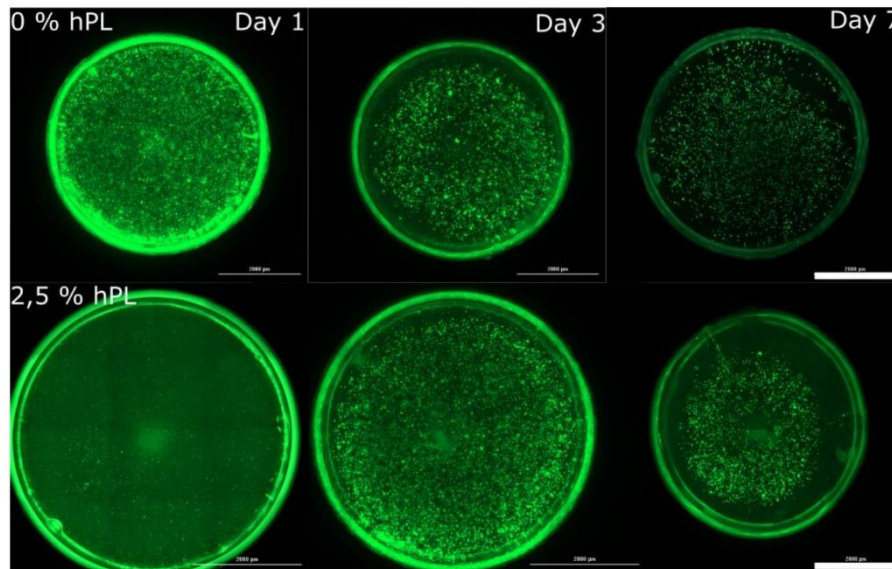


Figure A1. Cell aggregation of AD-MSCs in GelMA hydrogels (95% DoF) containing 0% and 2.5% hPL. Fluorescence pictures taken after one, three, and seven days of cultivation (4× objective and combined pictures). Scale bar 2000 µm per picture.

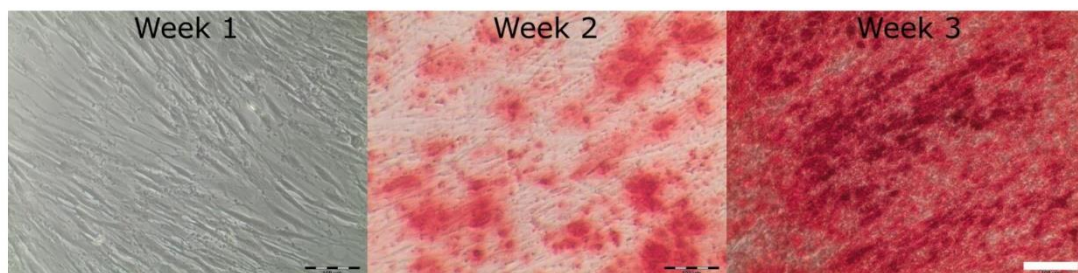


Figure A2. Osteogenic differentiation of 2D-cultivated AD-MSCs. The cells were stained with Alizarin Red 7, 14, and 21 days after induction of the osteogenic differentiation; 10× objective, scale bar 100 µm.

References

1. Booi, T.H.; Price, L.S.; Danen, E.H.J. 3D cell-based assays for drug screens: Challenges in imaging, image analysis, and high-content analysis. *SLAS Discov. Adv. Life Sci. RD* **2019**, *24*, 615–627. [[CrossRef](#)]
2. Di Modugno, F.; Colosi, C.; Trono, P.; Antonacci, G.; Ruocco, G.; Nisticò, P. 3D models in the new era of immune oncology: Focus on T cells, CAF and ECM. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 117. [[CrossRef](#)]
3. Sambale, F.; Lavrentieva, A.; Stahl, F.; Blume, C.; Stiesch, M.; Kasper, C.; Bahnemann, D.; Scheper, T. Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. *J. Biotechnol.* **2015**, *205*, 120–129. [[CrossRef](#)]
4. Van Griensven, M.; Diederichs, S.; Roeker, S.; Boehm, S.; Peterbauer, A.; Wolbank, S.; Riechers, D.; Stahl, F.; Kasper, C. Mechanical strain using 2D and 3D bioreactors induces osteogenesis: Implications for bone tissue engineering. In *Bioreactor Systems for Tissue Engineering*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; Volume 112, pp. 95–123.
5. Ravi, M.; Paramesh, V.; Kaviya, S.R.; Anuradha, E.; Solomon, F.D.P. 3D cell culture systems: Advantages and applications. *J. Cell. Physiol.* **2015**, *230*, 16–26. [[CrossRef](#)]
6. Ruedinger, F.; Lavrentieva, A.; Blume, C.; Pepelanova, I.; Scheper, T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: A starting guide for laboratory practice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 623–636. [[CrossRef](#)]

7. Lev, R.; Seliktar, D. Hydrogel biomaterials and their therapeutic potential for muscle injuries and muscular dystrophies. *J. R. Soc. Interface* **2018**, *15*, 20170380. [CrossRef]
8. Schuurman, W.; Levett, P.A.; Pot, M.W.; Van Weeren, P.R.; Dhert, W.J.A.; Hutmacher, D.W.; Melchels, F.P.W.; Klein, T.J.; Malda, J. Gelatin-Methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage Constructs. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 551–561. [CrossRef]
9. Re, F.; Sartore, L.; Moulisova, V.; Cantini, M.; Almici, C.; Bianchetti, A.; Chinello, C.; Dey, K.; Agnelli, S.; Manferdini, C.; et al. 3D gelatin-chitosan hybrid hydrogels combined with human platelet lysate highly support human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *J. Tissue Eng.* **2019**, *10*. [CrossRef]
10. Pepelanova, I.; Kruppa, K.; Scheper, T.; Lavrentieva, A. Gelatin-Methacryloyl (GelMA) hydrogels with defined degree of functionalization as a versatile toolkit for 3D cell culture and extrusion bioprinting. *Bioengineering* **2018**, *5*, 55. [CrossRef]
11. Loessner, D.; Meinert, C.; Kaemmerer, E.; Martine, L.C.; Yue, K.; A Levett, P.; Klein, T.J.; Melchels, F.P.W.; Khademhosseini, A.; Hutmacher, D.W. Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 727–746. [CrossRef]
12. Nichol, J.W.; Koshy, S.T.; Bae, H.; Hwang, C.M.; Yamanlar, S.; Khademhosseini, A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* **2010**, *31*, 5536–5544. [CrossRef]
13. Bulcke, A.I.V.D.; Bogdanov, B.; De Rooze, N.; Schacht, E.H.; Cornelissen, M.; Berghmans, H. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 31–38. [CrossRef]
14. Home—ClinicalTrials.gov. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home> (accessed on 15 July 2019).
15. Tonsho, M.; Michel, S.; Ahmed, Z.; Alessandrini, A.; Madsen, J.C. Heart transplantation: Challenges facing the field. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*, a015636. [CrossRef]
16. Orgill, D.P.; Carlos, B. *Biomaterials for Treating Skin Loss*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2009.
17. Duval, K.; Grover, H.; Han, L.-H.; Mou, Y.; Pegoraro, A.F.; Fredberg, J.; Chen, Z. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology* **2017**, *32*, 266–277. [CrossRef]
18. Bieback, K.; Hecker, A.; Kocaömer, A.; Lannert, H.; Schallmoser, K.; Strunk, D.; Klüter, H. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* **2009**, *27*, 2331–2341. [CrossRef]
19. Müller, I.; Kordowich, S.; Holzwarth, C.; Spano, C.; Isensee, G.; Staiber, A.; Viebahn, S.; Gieseke, F.; Langer, H.; Gawaz, M.; et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 437–444. [CrossRef]
20. Fekete, N.; Rojewski, M.T.; Fürst, D.; Kreja, L.; Ignatius, A.; Dausend, J.; Schrezenmeier, H. GMP-Compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e43255. [CrossRef]
21. Fekete, N.; Gadelorge, M.; Fürst, D.; Maurer, C.; Dausend, J.; Fleury-Cappellesso, S.; Mailänder, V.; Lotfi, R.; Ignatius, A.; Sensebé, L.; et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: Production process, content and identification of active components. *Cytotherapy* **2012**, *14*, 540–554.
22. Doucet, C.; Ernou, I.; Zhang, Y.; Begot, L.; Holy, X.; Llense, J.-R.; Lataillade, J.-J.; Llense, J.; Lataillade, J. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *205*, 228–236. [CrossRef]
23. Shih, D.T.-B.; Chen, J.-C.; Chen, W.-Y.; Kuo, Y.-P.; Su, C.-Y.; Burnouf, T. Expansion of adipose tissue mesenchymal stromal progenitors in serum-free medium supplemented with virally inactivated allogeneic human platelet lysate. *Transfusion* **2011**, *51*, 770–778. [CrossRef]
24. Astori, G.; Amati, E.; Bambi, F.; Bernardi, M.; Chierigato, K.; Schäfer, R.; Sella, S.; Rodeghiero, F. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: Present and future. *Stem Cell Res. Ther.* **2016**, *7*, 93. [CrossRef] [PubMed]
25. Lange, C.; Cakiroglu, F.; Spiess, A.-N.; Dierlamm, J.; Zander, A.R.; Cappallo-Obermann, H.; Cappallo-Obermann, H. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213*, 18–26. [CrossRef] [PubMed]

26. Schallmoser, K.; Bartmann, C.; Rohde, E.; Reinisch, A.; Kashofer, K.; Stadelmeyer, E.; Drexler, C.; Lanzer, G.; Linkesch, W.; Strunk, D. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion* **2007**, *47*, 1436–1446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hemeda, H.; Giebel, B.; Wagner, W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **2014**, *16*, 170–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Burnouf, T.; Strunk, D.; Koh, M.B.; Schallmoser, K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* **2016**, *76*, 371–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Fernandez-Rebollo, E.; Mentrup, B.; Ebert, R.; Franzen, J.; Abagnale, G.; Sieben, T.; Ostrowska, A.; Hoffmann, P.; Roux, P.-F.; Rath, B.; et al. Human platelet lysate versus fetal calf serum: These supplements do not select for different mesenchymal stromal cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Siciliano, C.; Ibrahim, M.; Scafetta, G.; Napoletano, C.; Mangino, G.; Pierelli, L.; Frati, G.; De Falco, E. Optimization of the isolation and expansion method of human mediastinal-adipose tissue derived mesenchymal stem cells with virally inactivated GMP-grade platelet lysate. *Cytotechnology* **2015**, *67*, 165–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Jonsdottir-Buch, S.M.; Lieder, R.; Sigurjonsson, O.E. Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e68984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Suo, H.; Xu, K.; Zheng, X. Using glucosamine to improve the properties of photocrosslinked gelatin scaffolds. *J. Biomater. Appl.* **2015**, *29*, 977–987. [[CrossRef](#)]
33. Tancharoen, W.; Aungsuchawan, S.; Pothacharoen, P.; Bumroongkit, K.; Puaninta, C.; Pangjaidee, N.; Narakornsak, S.; Markmee, R.; Laowanitwattana, T.; Thaojamnong, C. Human platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum for culture and endothelial differentiation of human amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 5123–5132. [[CrossRef](#)]
34. Bernardo, M.; Avanzini, M.; Perotti, C.; Cometa, A.; Moretta, A.; Lenta, E.; Del Fante, C.; Novara, F.; De Silvestri, A.; Amendola, G.; et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: Further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *211*, 121–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kore-Grodzicki, B.; Tauber-Finkelstein, M.; Chain, D.; Shaltiel, S. Vitronectin is phosphorylated by a cAMP-dependent protein kinase released by activation of human platelets with thrombin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *157*, 1131–1138. [[CrossRef](#)]
36. Arnett, T.R.; Henderson, B. *Methods in Bone Biology*; Springer US: Boston, MA, USA, 1997; ISBN 978-0-412-75770-9.
37. Anseth, K.S.; Bowman, C.N.; Brannon-Peppas, L. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* **1996**, *17*, 1647–1657. [[CrossRef](#)]
38. Murphy, S.V.; Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 773–785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kaemmerer, E.; Melchels, F.P.; Holzapfel, B.M.; Meckel, T.; Huttmacher, D.W.; Loessner, D. Gelatine methacrylamide-based hydrogels: An alternative three-dimensional cancer cell culture system. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 2551–2562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Melchels, F.P.W.; Dhert, W.J.A.; Huttmacher, D.W.; Malda, J. Development and characterisation of a new bioink for additive tissue manufacturing. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 2282. [[CrossRef](#)]
41. Pang, Z.; Deeth, H.; Sopade, P.; Sharma, R.; Bansal, N. Rheology, texture and microstructure of gelatin gels with and without milk proteins. *Food Hydrocoll.* **2014**, *35*, 484–493. [[CrossRef](#)]
42. Kaji, H.; Camci-Unal, G.; Langer, R.; Khademhosseini, A. Engineering systems for the generation of patterned co-cultures for controlling cell-cell interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1810*, 239–250. [[CrossRef](#)]
43. Shi, J.; Xing, M.M.Q.; Zhong, W. Development of hydrogels and biomimetic regulators as tissue engineering scaffolds. *Membranes* **2012**, *2*, 70–90. [[CrossRef](#)]
44. Schallmoser, K.; Strunk, D. Generation of a pool of human platelet lysate and efficient use in cell culture. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *946*, 349–362. [[CrossRef](#)]
45. Shih, D.T.-B.; Burnouf, T. Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *New Biotechnol.* **2015**, *32*, 199–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bissell, M.J.; Rizki, A.; Mian, I.S. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 753–762. [[CrossRef](#)]

47. Cukierman, E.; Blanco, P.; Palucka, A.K.; Gill, M.; Pascual, V.; Banchereau, J. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* **2001**, *294*, 1708–1712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Cukierman, E.; Pankov, R.; Yamada, K.M. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr. Opin. Cell Boil.* **2002**, *14*, 633–640. [[CrossRef](#)]
49. Lee, J.; Lilly, G.D.; Doty, R.C.; Podsiadlo, P.; Kotov, N.A. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small* **2009**, *5*, 1213–1221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Li, Z.; Cui, Z. Three-dimensional perfused cell culture. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 243–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Schmeichel, K.L.; Bissell, M.J. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2377–2388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Abbott, A. Cell culture: Biology's new dimension. *Nature* **2003**, *424*, 870–872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Von Der Mark, K.; Gauss, V.; Von Der Mark, H.; Muller, P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* **1977**, *267*, 531–532. [[CrossRef](#)]
54. Almany, L.; Seliktar, D. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2467–2477. [[CrossRef](#)]
55. Mironi-Harpaz, I.; Wang, D.Y.; Venkatraman, S.; Seliktar, D.; Venkatraman, S. Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: Crosslinking efficiency versus cytotoxicity. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 1838–1848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Tse, J.R.; Engler, A.J. Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Curr. Protoc. Cell Boil.* **2010**, *47*, 10–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Zhao, L.; Mok, S.; Moraes, C. Micropocket hydrogel devices for all-in-one formation, assembly, and analysis of aggregate-based tissues. *Biofabrication* **2019**, *11*, 045013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Camci-Unal, G.; Cuttita, D.; Annabi, N.; Demarchi, D.; Khademhosseini, A. Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1085–1092. [[CrossRef](#)]
59. Alsberg, E.; Anderson, K.W.; Albeiruti, A.; Rowley, J.A.; Mooney, D.J. Engineering growing tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12025–12030. [[CrossRef](#)]
60. Yang, F.; Williams, C.G.; Wang, D.-A.; Lee, H.; Manson, P.N.; Elisseeff, J. The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5991–5998. [[CrossRef](#)]
61. Hern, D.L.; Hubbell, J.A. Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39*, 266–276. [[CrossRef](#)]
62. Maheshwari, G.; Brown, G.; A Lauffenburger, D.; Wells, A.; Griffith, L.G. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1677–1686.
63. Feng, Y.; Mrksich, M. The synergy peptide PHSRN and the adhesion peptide RGD mediate cell adhesion through a common mechanism. *Biochemistry* **2004**, *43*, 15811–15821. [[CrossRef](#)]
64. Sander, H.J.; Slot, J.W.; Bouma, B.N.; A Bolhuis, P.; Pepper, D.S.; Sixma, J.J. Immunocytochemical localization of fibrinogen, platelet factor 4, and beta thromboglobulin in thin frozen sections of human blood platelets. *J. Clin. Investig.* **1983**, *72*, 1277–1287. [[CrossRef](#)]
65. Heijnen, H.; van der Sluijs, P. Platelet secretory behaviour: As diverse as the granules ... or not? *J. Thromb. Haemost.* **2015**, *13*, 2141–2151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Wencel-Drake, J.D.; Painter, R.G.; Zimmerman, T.S.; Ginsberg, M.H. Ultrastructural localization of human platelet thrombospondin, fibrinogen, fibronectin, and von Willebrand factor in frozen thin section. *Blood* **1985**, *65*, 929–938. [[PubMed](#)]
67. Wang, X.; Hu, X.; Dulińska-Molak, I.; Kawazoe, N.; Yang, Y.; Chen, G. Discriminating the independent influence of cell adhesion and spreading area on stem cell fate determination using micropatterned surfaces. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Trappmann, B.; Gautrot, J.E.; Connelly, J.T.; Strange, D.G.T.; Li, Y.; Oyen, M.L.; Stuart, M.A.C.; Boehm, H.; Li, B.; Vogel, V.; et al. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nat. Mater.* **2012**, *11*, 642–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. A Lauffenburger, D.; Horwitz, A.F. Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* **1996**, *84*, 359–369. [[CrossRef](#)]

70. Engler, A.J.; Sen, S.; Sweeney, H.L.; Discher, D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **2006**, *126*, 677–689. [[CrossRef](#)]
71. Chowdhury, F.; Na, S.; Li, D.; Poh, Y.-C.; Tanaka, T.S.; Wang, F.; Wang, N. Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 82–88. [[CrossRef](#)]
72. Engler, A.J.; Griffin, M.A.; Sen, S.; Bönnemann, C.G.; Sweeney, H.L.; Discher, D.E. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: Pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.* **2004**, *166*, 877–887. [[CrossRef](#)]
73. Park, J.S.; Chu, J.S.; Tsou, A.D.; Diop, R.; Tang, Z.; Wang, A.; Li, S. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β . *Biomaterials* **2011**, *32*, 3921–3930. [[CrossRef](#)]
74. Solon, J.; Levental, I.; Sengupta, K.; Georges, P.C.; Janmey, P.A. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 4453–4461. [[CrossRef](#)]
75. Sun, M.; Chi, G.; Li, P.; Lv, S.; Xu, J.; Xu, Z.; Xia, Y.; Tan, Y.; Xu, J.; Li, L.; et al. Effects of matrix stiffness on the morphology, adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int. J. Med Sci.* **2018**, *15*, 257–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Malda, J.; Visser, J.; Melchels, F.P.; Jungst, T.; Hennink, W.E.; Dhert, W.J.A.; Groll, J.; Hutmacher, D.W. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5011–5028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.3 Xenofreie *in vitro* Kultivierung und osteogene Differenzierung von hAD-MSCs auf resorbierbarem 3D gedruckten RESOMER®

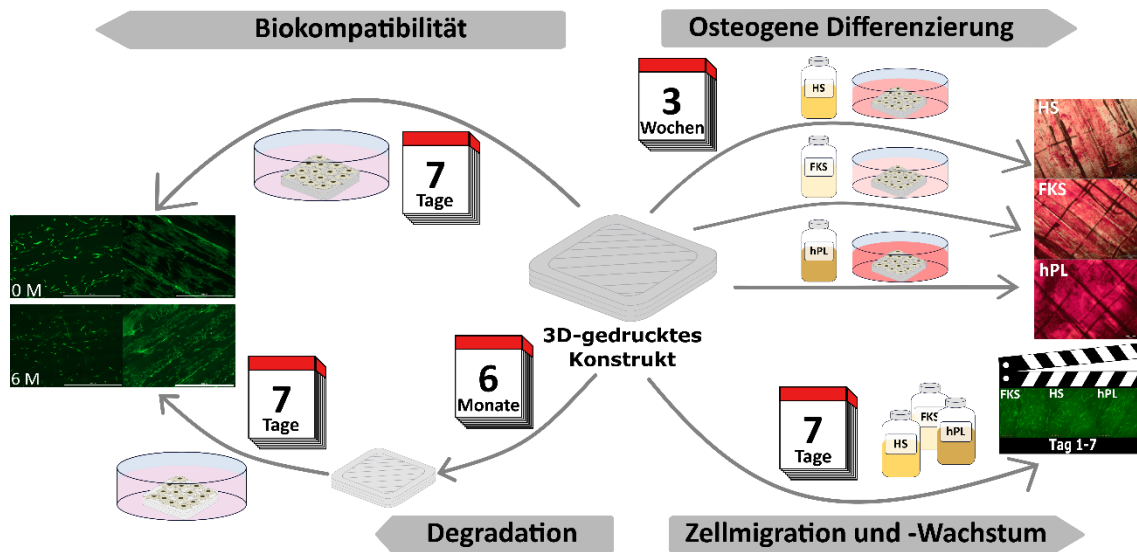


Abbildung 3–3: Graphical abstract zu dem Manuskript "Xeno-Free In Vitro Cultivation and Osteogenic Differentiation of hAD-MSCs on Resorbable 3D Printed RESOMER®"

Neben Hydrogelen als bioprintbare 3D-Zellkultursysteme zur vorwiegenden Herstellung von *Soft Tissues*, gibt es zusätzlich auch gewebespezifische und medizinische Anforderungen, die ein starres Gewebegerüst (*Hard Tissue*) erfordern. Um bei der Anwendung in der regenerativen Medizin einen größtmöglichen Implantationserfolg gewährleisten zu können, stellen sich neben dem Bedarf an effizienten und xenofreien Kultivierungsbedingungen auch Herausforderungen an das Gerüstmaterial. Damit die Spender- und Patientenzellen ohne Komplikationen auf dem Material adhären und proliferieren können, ist eine Biokompatibilität des Materials Voraussetzung. Mit der Anwendung bioresorbierbarer Materialien kann zudem ein erneuter Eingriff am Patienten vermieden werden. Die Entwicklung von alloplastischen resorbierbaren Materialien spielt daher mittlerweile eine große Rolle im Bereich der Implantationstechnologie. Die Implementierung neuer 3D-druckbarer Materialien für Implantate bietet die Realisierung personalisierte medizinische Produkte zu designen, die auf die individuellen Anforderungen zugeschnitten werden können⁴⁴⁹. Hierbei spielen die Biokompatibilität und eine kontrollierte Biodegradierbarkeit 3D-gedruckter Konstrukte eine Schlüsselrolle für ihre Anwendung in der Medizin.

Im folgenden Kapitel wurden daher die *in vitro* Biokompatibilität und *in vitro* Biodegradierbarkeit des Materials RESOMER® Filament LG D1.75 (Evonik Industries AG) untersucht. Um das RESOMER® Filament LG D1.75 (PLGA mit einem LA:GA Verhältnis von 85/15) als abbaubares Implantatmaterial in der regenerativen Medizin verwenden zu können, sind gewisse Voraussetzungen nötig. So dürfen bei der Zersetzung des Materials im Körper des Empfängers keine toxischen Substanzen freigesetzt werden und die Gesundheit des Empfängers darf nicht gefährdet sein. Das Material erwies sich als biokompatibel und

zeigte keinen zytotoxischen Effekt auf die hAD-MSCs. Auf den Konstruktoberflächen wachsende Zellen wiesen sogar eine verstärkte Proliferation und eine höhere metabolische Aktivität auf, als die auf der Zellkulturoberfläche wachsenden Zellen. Die *in vitro* Degradation von RESOMER® Filament LG D1.75 wurde über sechs Monate mikroskopisch, gravimetrisch und über die Oberflächenrauheit analysiert. Anschließend folgte eine Besiedlung der degradierten Konstrukte, um zu kontrollieren, ob eine fortschreitende Degradation und daraus resultierende glattere Oberfläche einen Einfluss auf die Zelladhäsion, Proliferation und Morphologie der hAD-MSCs hat. Die Biokompatibilität des Materials konnte auch nach einer sechsmonatigen *in vitro* Degradation sichergestellt werden, sodass eine erfolgreiche Implantation 3D-gedruckter RESOMER® Filament LG D1.75 Konstrukte gewährleistet sein kann.

Auch für vordifferenzierte Gewebekonstrukte spielt es eine entscheidende Rolle, dass sich die Bindungsstellen des Konstruktmaterials für die Zellen während der Degradation nicht nachteilig verändern. Nach einer Besiedlung mit MSCs können die Zellen direkt auf den Konstrukten *in vitro* angezüchtet werden. Sobald die Zellen konfluent sind, kann die spezifische Differenzierung induziert werden. Langfristig könnten auf diese Weise individualisierte 3D-gedruckte Gewebekonstrukte zur künstlichen Gewebeherstellung oder -regeneration realisiert werden. Zur Implementierung eines solchen Systems muss ausgeschlossen werden, dass die Osteogenese der menschlichen Zellen auf den Konstrukten durch die Materialeigenschaften und dessen Komponenten gehemmt werden könnte. Neben geeigneten Materialien besteht ebenfalls ein zunehmendes Interesse an xenofreien Alternativen zu FKS als Mediumsupplement. Bislang werden die meisten Studien zu PLGA als resorbierbares Implantatmaterial mit FKS als Mediumsupplement durchgeführt^{450,451}. Aus diesen Gründen wurde in der folgenden Arbeit die osteogene Differenzierung von hAD-MSCs auf den 3D-gedruckten Konstrukten unter Einfluss verschiedener Mediensupplemente (FKS, HS und hPL) untersucht. Es zeigte sich ein osteokonduktiver Effekt der 3D-gedruckten LG D1.75 Konstrukte. Zusätzlich konnte die Supplementierung von hPL zu einer weiteren Verstärkung der osteogenen Differenzierung der Zellen führen, welche bereits nach einer Woche detektierbar war.


Die Möglichkeit, hPL als xenofreies Mediumsupplement für die Zellkultivierung auf biokompatiblen, degradierbaren, 3D-gedruckten Konstrukten zu verwenden, stellt eine vielversprechende, nachhaltige Kombination mit einem großen Potenzial für zukünftige Anwendungen in der regenerativen Medizin dar.

In dem folgenden Artikel „*Xeno-Free In Vitro Cultivation and Osteogenic Differentiation of hAD-MSCs on Resorbable 3D Printed RESOMER®*“ werden die Ergebnisse detailliert beschrieben und diskutiert.



Article

Xeno-Free In Vitro Cultivation and Osteogenic Differentiation of hAD-MSCs on Resorbable 3D Printed RESOMER®

Marline Kirsch ¹ , Annabelle-Christin Herder ¹, Cécile Boudot ², Andreas Karau ², Jessica Rach ³, Wiebke Handke ⁴, Axel Seltsam ⁴, Thomas Scheper ¹ and Antonina Lavrentieva ^{1,*}

¹ Institute of Technical Chemistry, Leibniz University Hannover, Callinstrasse 5, 30167 Hannover, Germany; kirsch@iftc.uni-hannover.de (M.K.); annabelle.herder@gmail.com (A.-C.H.); scheper@iftc.uni-hannover.de (T.S.)

² Evonik Nutrition & Care GmbH, Business Line Health Care, Kirschenallee, 64293 Darmstadt, Germany; cecile.boudot@evonik.com (C.B.); andreas.karau@evonik.com (A.K.)

³ German Red Cross Blood Service NSTOB, Institute Springe, Eldagsener Straße 38, 31830 Springe, Germany; Jessica.Rach@bsd-nstob.de

⁴ Bavarian Red Cross Blood Service, Institute Nuremberg, Heimerichstrasse 57, 90419 Nuremberg, Germany; w.handke@blutspendedienst.com (W.H.); a.seltsam@blutspendedienst.com (A.S.)

* Correspondence: lavrentieva@iftc.uni-hannover.de; Tel.: +49-511-762-2955

Received: 30 June 2020; Accepted: 28 July 2020; Published: 31 July 2020



Abstract: The development of alloplastic resorbable materials can revolutionize the field of implantation technology in regenerative medicine. Additional opportunities to colonize the three-dimensionally (3D) printed constructs with the patient's own cells prior to implantation can improve the regeneration process but requires optimization of cultivation protocols. Human platelet lysate (hPL) has already proven to be a suitable replacement for fetal calf serum (FCS) in 2D and 3D cell cultures. In this study, we investigated the in vitro biocompatibility of the printed RESOMER® Filament LG D1.75 materials as well as the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) cultivated on 3D printed constructs under the influence of different medium supplements (FCS, human serum (HS) and hPL). Additionally, the in vitro degradation of the material was studied over six months. We demonstrated that LG D1.75 is biocompatible and has no in vitro cytotoxic effects on hMSCs. Furthermore, hMSCs grown on the constructs could be differentiated into osteoblasts, especially supported by supplementation with hPL. Over six months under physiological in vitro conditions, a distinct degradation was observed, which, however, had no influence on the biocompatibility of the material. Thus, the overall suitability of the material LG D1.75 to produce 3D printed, resorbable bone implants and the promising use of hPL in the xeno-free cultivation of human MSCs on such implants for autologous transplantation have been demonstrated.

Keywords: resorbable polymers; 3D printing; in vitro biocompatibility; RESOMER®; in vitro degradation; osteogenic differentiation; human platelet lysate; human serum; fetal calve serum; adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs)

1. Introduction

Additive manufacturing, or three-dimensional (3D) printing has become an important and promising part of regenerative medicine and tissue engineering in recent years. To date, over 2500 publications on the topic of 3D printing in tissue engineering are published in PubMed, with over 90 percent in the past five years. 3D printing had its early start at the beginning of the 1980s and since that time gained popularity in increasing number of application fields [1–3]. Besides the application in

food industry, military, engineering, and automobile industry, the use of 3D printing in regenerative medicine and tissue engineering increasingly gains the attention of researchers [1–5].

One of the widely used 3D printing techniques in bioregenerative medicine is the fused deposition modeling (FDM) of synthetic polymers [2]. In this process, material is applied via an extruder and printing head onto a platform. By this common and inexpensive layer by layer process, a wide range of materials can be precisely printed [2,6–9]. Depending on the application, a specific polymer can be used to precisely adjust hydrophobicity, degradation time, stability, and mechanical properties [8–11]. One of the greatest advantages is reproducible production, which successfully offers inexpensive replacement products for donor organs [2]. 3D printed scaffolds can maintain the desired cell phenotypes and morphology, stimulate the formation of functional tissue, and promote differentiation [7,12,13]. In several studies the positive impact of the application of 3D scaffolds on tissue regeneration has already been proven [12].

In addition to already extensively studied permanent implant materials, such as ceramics, composites and metal alloys, biodegradable polymers can also be applied [14,15]. The use of alloplastic biodegradable materials provides many advantages for regenerative medicine. The fact that 3D printed constructs degrade in the body after fulfilling their purpose prevents a second surgical intervention and thus improves the patient's quality of life. The risk of post-surgical infections is also subsequently reduced [15,16]. The optimal *in vivo* degradation rate would correspond to the tissue regeneration rate, so that the degradable implant remains in the patient's body only until the body's own tissues have regenerated themselves [17,18]. By creation of personalized tissue constructs, tissue engineering with 3D printed resorbable polymers has the potential to increase quality and length of life [10]. Particularly in oral and maxillofacial surgery, a wide variety of studies have already demonstrated the advantages of using resorbable biomaterials [19–24]. For instance, 3D printing can optimize surgery as well as rehabilitation time and facilitate pre- and intraoperative decisions which improves the efficacy and the accuracy of surgeries [20]. Especially in infants, progressive growth would require a second surgery to remove the permanent implant [11]. This surgery can be avoided by using resorbable implants.

To ensure successful implantation of 3D printed biodegradable constructs in the human body, the used material must be biocompatible through the entire process of biodegradation in the body so that no toxic degradation compounds are released into the body [25]. Therefore, the printing process must not trigger the formation and release of toxic substances and not alter the original material properties such as resorbability and mechanical stability [15]. In combination with the process of 3D printing, the developed resorbable materials can be used to manufacture highly personalized implants adapted to the demands of each patient [11]. This can be achieved by converting the results of medical imaging techniques such as X-rays, computer, or magnetic resonance tomography into 3D objects [26–29]. A more detailed design can lead to an improved regeneration dynamics and treatment outcome. For example, Hsu et al. demonstrated that a larger inner space of FDM-generated scaffolds could stimulate osteoblast cell growth, a highly porous and interconnecting structure could promote cell ingrowth and a concentric structure may be conducive for osteoblast growth [8].

Considering the broad field of applications of biodegradable implant materials, the question of the application-specific suitable material becomes crucial. One of the most widely used biocompatible materials in the field of tissue engineering is poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) [30–36]. This biocompatible copolymer is characterized by good mechanical properties such as firmness, excellent processability, and the degradation time can be individually adapted to the respective use via the lactic acid (LA), glycolic acid (GA) ratio. Guo et al. investigated the effects of ester and acid end caps as well as the effect of different LA:GA ratios in PLGA [7].

They demonstrated that a high LA:GA ratio and an ester cap can provide a higher structural stability of the polymer during the printing process and the scaffold structure and mechanical strength can be maintained over a relatively long period of time [7,37].

As promising implant polymer, PLGA degrades primarily by chemical hydrolysis of the hydrolytically unstable ester bonds. The generated products such as lactic acid and glycolic acid can be broken down and excreted via the common metabolic pathways [33,38]. In addition to the implantation of printed alloplastic resorbable constructs into the human body, it is also possible to colonize the 3D printed constructs with the patient's own cells such as mesenchymal stem cells (MSCs) prior to implantation to additionally support the healing process [39]. Increasingly, xeno-free cultivation conditions of MSCs are being intensively studied in order to avoid the use of animal-derived supplements, such as fetal calf serum (FCS). Several advantages of human platelet lysate (hPL) as a valuable alternative for FCS have already been demonstrated, such as its human origin, its easy accessibility, good manufacturing practice (GMP) conform production capability and a wide range of bioactive factors. Furthermore, hPL has already shown positive results in 2D and 3D cell cultivation because of excellent expansion and differentiation support of MSCs [40–42]. Furthermore, Jonsdottir-Buch et al. showed no difference between using expired or fresh platelet concentrates for the preparation of hPL as medium supplement. Therefore, the combination of two promising and sustainable approaches, such as cultivation in hPL and creation of degradable 3D printed constructs could be a highly favorable strategy for regenerative medicine.

In the present work, we investigated the suitability of 3D printed constructs made from the resorbable PLGA filament LG D1.75 (Evonik Industries AG, Essen, Germany) with a LA:GA ratio of 85:15 for use as biomaterial for implant manufacturing with regard to its general in vitro cytotoxicity and biocompatibility to human MSCs. Furthermore, the in vitro degradation behavior of the constructs was investigated and its influence on the biocompatibility of the material was examined. Additionally, a comparative study of proliferation and differentiation of MSCs on the printed constructs under the influence of three supplements (FCS, HS, hPL) was performed.

2. Materials and Methods

2.1. Printing and Sterilisation of the Resorbable Constructs

The used RESOMER[®] Filament LG D1.75 (85:15) is an amorphous copolymer consisting of L-lactide and glycolide filament provided by Evonik Industries AG (Essen, Germany). By using FDM printing with a nozzle temperature of 230–250 °C (3NTR, Oleggio, Italy) 1 cm² constructs of the RESOMER[®] with a filament diameter of 1.75 mm were printed as a 45° crosshatch with three layers (1 mm). The chamber temperature was always lower than 35 °C. The average filament size of the 3D printed constructs was determined microscopically and measured 424.6 ± 36.95 µm. Pictures of four different constructs were taken and the width of three filaments on each picture were measured (twelve-fold determination) (Figure S1, Supplementary Materials). After the printing process the constructs were sterilized for 30 min in 70% ethanol at 37 °C followed by washing with sterile phosphate buffer saline (PBS) [15]. Until further use the constructs were stored in the freezer at –20 °C to prevent spontaneous degradation.

2.2. Cell Cultivation

Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs) were isolated from adipose tissue after abdominoplastic surgery. All patients gave their informed consent, which was approved by the Institutional Review Board (Hannover Medical School) with the reference number 3475-2017. In order to identify the isolated cells as mesenchymal stem cells, the cells were examined for several characteristics as already described in a previous study [43]. The as hAD-MSCs-characterized cells were expanded in alpha-MEM medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% human serum (HS, CC-pro, Oberdorla, Germany), and 0.5% gentamicin (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The cells were passaged by using accutase (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and cryopreserved in alpha-MEM medium with 20% HS, 0.5% gentamycin, and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) until the start of the experiment. After revitalization the cells were cultivated at 37 °C in a

humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. The experiments were performed with cells of passages 2–10 only.

2.3. *In Vitro* Biocompatibility of LG D1.75

2.3.1. *In Vitro* Toxicity of Extracts

According to ISO 10993-12:2012 [44], each construct was placed in proliferation medium (alpha-MEM medium containing 10% HS and 50 µg/mL gentamicin) with extraction ratio of 3 cm²/mL (surface of printed construct area/media volume) [15]. Together with a control (medium without construct) it was incubated at 37 °C for 72 ± 1 h. hAD-MSCs were plated in 96-well plates with cell densities of 8000 cells/well. After 24 h, cells were treated with extract dilutions for 24 h at 37 °C. Afterwards, the cell viability was determined by CellTiter-Blue[®] Assay (CTB, Promega, Mannheim, Germany) (incubation time of 90 min). Cells treated with medium incubated without printed constructs were used as control and considered as 100% of cell viability.

2.3.2. Direct Cell Growth on Constructs

The sterilized and washed constructs were placed in the middle of a 24-well plate and 8000 cells per well were seeded. As control the same cell number per square centimeter was seeded in wells without constructs. After one day, the constructs were moved in a new well plate, where the cells grew only on the surface of the construct. After one, three, and seven days of cultivation the viability of the cells was evaluated by CTB assay (Promega, Mannheim, Germany) and calcein-acetoxymethyl (AM, Merck, Darmstadt, Germany) and ethidium-homodimer (Sigma Aldrich, München, Germany) staining. CTB assay was performed according to the information provided by the manufacturer. Briefly, a 10% CTB solution was prepared with α-MEM (1:10 v/v) and 500 µL were added to each well after carefully aspirating the old medium. Additionally, wells without cells were filled with the 10% CTB solution and used as a blank. The fluorescence was measured with a microplate reader (Fluoroskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) at an extinction wavelength of 544 nm and an emission wavelength of 590 nm after 4 h of incubation at 37 °C. To each well 500 µL of a staining solution with 4 µM calcein-AM, 4 µM ethidium-homodimer in α-MEM were added and incubated for 45 min at 37 °C and evaluated with a Cytation 5-Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

2.4. *In Vitro* Degradation Study

The *in vitro* degradation of the 3D printed RESOMER[®] Filament LG D1.75 constructs was performed in sterile Kirkland's Biocorrosion Medium (KBM: 5.4 g/L NaCl, 2.2 g/L NaHCO₃, 0.9 g/L D-Glucose, 0.38 g/L KCl, 0.28 g/L CaCl₂, 0.122 g/L Na₂HPO₄ (Anhydrous), 0.06 g/L MgSO₄). Therefore, the constructs were incubated for over six months in 3 mL KBM/construct at 37 °C and the medium was exchanged every other week. The degree of degradation was evaluated microscopically as well as gravimetrically and surface changes were analyzed by 3D microscopy (Keyence VHX-6000, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Germany). Prior to the start of the experiment, all constructs were weighed and compared with the measurements after 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 months. Constructs were washed with distilled water to remove residual salts, vacuum dried in a desiccator for 24 h at room temperature (RT), weighed and examined for surface degradation on a 3D microscope. Using a 200× magnification, gloss-reduced images of the top of the structure were taken and the entire image area was used for the software analysis with the VHX-5000 Communication Software of the Keyence 3D microscope. A Gaussian filter and end effect correction were used to measure the maximum height (Sz). The degraded constructs were stored at –20 °C until they were sterilized for biocompatibility testing on the degraded surfaces.

2.5. *In Vitro* Biocompatibility of the Partially Degraded Constructs

The biocompatibility test was performed as described previously (Section 2.3). Instead of the new 3D printed constructs, the degraded constructs after 0, 3, 4, 5, and 6 months of *in vitro* degradation were used to evaluate if the cells can still grow on a degraded surface.

2.6. Osteogenic Differentiation on Printed LG D1.75

The hAD-MSCs were seeded on the 3D printed constructs and cell culture surfaces as control, grown until confluence and differentiated with FCS, HS, or hPL as supplement into osteoblasts. The differentiation medium was composed of 5 mM β -glycerophosphate, 0.2 mM L-ascorbate-2-phosphate, 0.1 μ M dexamethasone, 0.5% gentamicin, as well as either 10% FKS, 10% HS, or 2.5% hPL. As a proliferation control, cells were cultured on the construct in proliferation medium. The cells were cultured for 7, 14, or 21 days and the medium was exchanged every 3–4 days. Afterwards they were washed with warm PBS and fixed for 15 min at 4 °C with 4% paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany). To evaluate the osteogenic differentiation, the cell culture surface and constructs were stained for 15 min with an alizarin red solution (1% alizarin red S (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in dH₂O) at RT. The wells were washed with dH₂O and the red chelates were visualized and examined with a fluorescence microscope (Olympus, IX50, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) with a camera (Olympus SC30, IX-TVAD, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) and the CellSens Software (CellSens Standard 1.7.1, Olympus Corporation, Tokyo, Japan). To quantify the degree of differentiation, the bonded alizarin red chelate complexes were extracted by incubation for 20 min in 10% hexadecylpyridiniumchloride monohydrat (Sigma Aldrich, St. Louis, WI, USA) in PBS at 37 °C and transferred 100 μ L/well in a 96 well plate. The absorption was determined with an Epoch Microplate Photospectrometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at 550 nm. Dilution series was prepared to relate the absorbance to the alizarin red concentration. The concentration was determined by means of a calibration curve. In addition to the alizarin red staining and quantification, the alkaline phosphatase activity of the cells was monitored with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium (NBT) (SIGMAFAST BCIP[®]/NBT, B5655, Merck, Darmstadt, Germany). The cells were washed with PBS and fixed with 4% PFA seven days after induction of the osteogenic differentiation. Afterwards the constructs were covered with the BCIP/NBT solution, incubated for 30 min at RT, washed with PBS, and were microscopically analyzed (Olympus, IX50, Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

2.7. Statistical Analysis

Data are represented as mean \pm standard deviation for triplicate or multiplicate measurements/counts for each sample. Statistical significance was defined as *p* value of 0.05 or less. Statistics were performed using one-way ANOVA (OriginLab, Northampton, MA, USA).

3. Results

3.1. *In Vitro* Biocompatibility of Printed LG D1.75

For the application of LG D1.75 in tissue engineering and bioregenerative medicine to produce 3D printed, resorbable implants, it is important that the copolymer is biocompatible. Apart from the absence of general *in vitro* cytotoxicity, cells should be able to adhere to the surface of the construct and cell proliferation and viability on the construct must not be affected. In addition, the cells should not undergo any morphological or phenotypic changes [29,39].

As first step, 3D printed constructs were tested on possible toxic leachables. After an exposition time of 24 h, the cell viability of the hAD-MSCs cultivated in a dilution series of extracts remained unchanged if compared to the control (cells cultivated in medium without extract) (Figure 1A). Furthermore, the cells were able to adhere to the construct surface and proliferate (Figure 1B,C). Cells demonstrated significantly higher viability on the printed construct, one and seven days after

seeding in comparison to the cell culture treated surface in the well plates (Figure 1B). The cells showed an elongated morphology on day 1, although some cells did not fully spread yet (Figure 1C). After one week all cells showed a complete spreading and complex cell network.

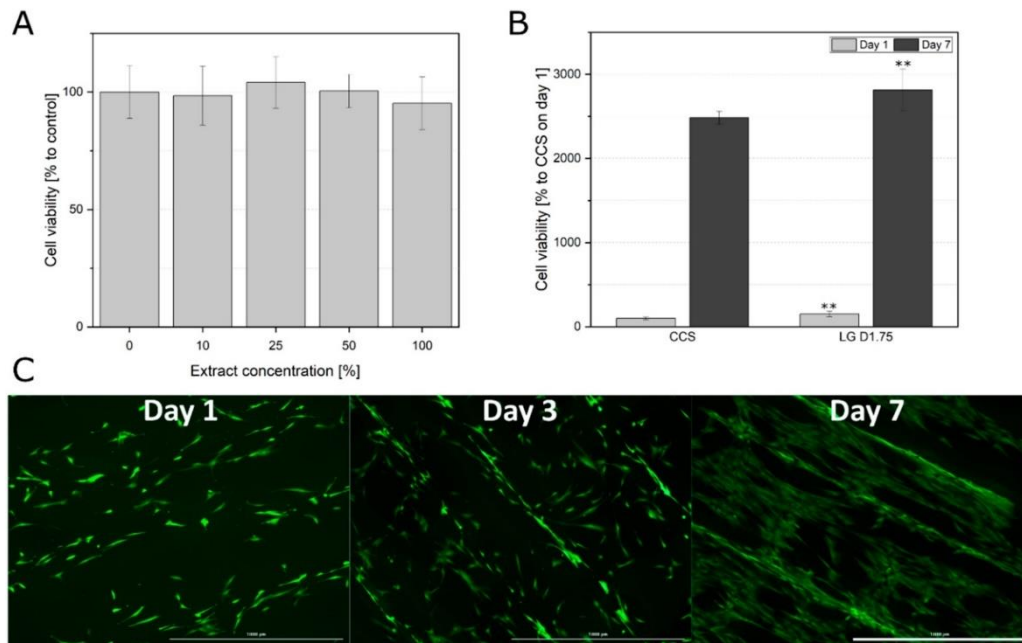


Figure 1. (A) Cell viability of hAD-MSCs after 24 h incubation with extraction medium (0, 10, 25, 50, and 100% extraction medium). Data represent the mean \pm SD for an eight to ten-fold determination. (B) Comparison of cell viabilities of hAD-MSCs grown on the construct surface (LG D1.75) and cell culture surface (CCS) after one and seven days of proliferation. Cell viability determined with the help of CTB assay, CTB fluorescence signal of the cells grown on the CCS on day one served as 100% control. Data represent the mean \pm SD for a three to six-fold determination. $** p < 0.01$. (C) Morphological examination of hAD-MSCs growing on the construct surface. After cultivation of 1, 3, and 7 days, the cells were stained with calcein-AM; 4 \times objective, scale bar 1000 μ m.

3.2. In Vitro Degradation

As the next step, in vitro degradation rate of 3D printed constructs was evaluated. The in vitro degradation could be detected microscopically over the studied period (Figure 2A). Already after half a month, a slight milky discoloration of the surface could be observed, which was even more evident after the third month. Furthermore, the change in surface roughness during degradation was examined using a 3D microscope by determining the maximum height (S_z). S_z is defined as the sum of the largest peak height value and the largest pit depth value within the defined area. A distinct difference can be observed between the 3D-profile of a construct before the degradation and after six months of degradation (Figure 2B). Under the studied in vitro conditions, the surface roughness decreased significantly over the six months (maximum height before degradation $783.8 \pm 150.0 \mu$ m and after 6 months of degradation $235.5 \pm 20.5 \mu$ m) (Figure 2C). This could be examined and confirmed more closely with high magnification (500 \times and 3000 \times) micrographs of the construct surface (Figure S2). However, gravimetrically no clear trend could be detected (Figure 2D).

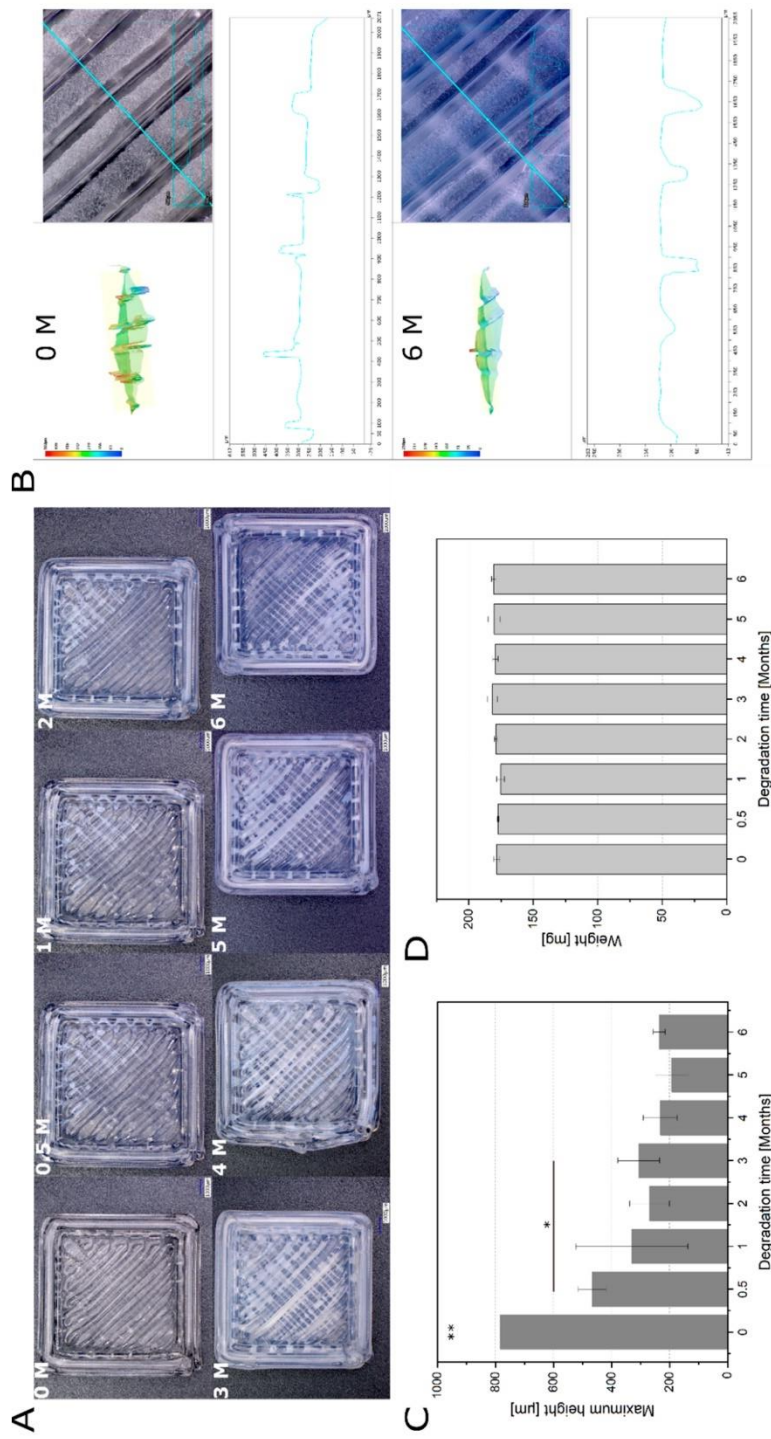


Figure 2. Degradation of printed RESOMER® Filament LG D1.75 over six months. (A) Surface of 3D printed constructs before and after different time points of degradation under physiological conditions. Scale bar: 1000 µm. (B) Representative 3D profiles of the printed constructs which were used to determine the surface roughness as a threefold determination. One construct without degradation (0 M) and one after six months of degradation (6 M) is shown. (C) Maximum height (Sz) as an indicator for the surface roughness of the construct surface during the degradation (200x magnification). Data represent the mean ± SD for a threefold determination. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (D) Weight change of printed RESOMER® Filament LG D1.75 during the degradation. Data represent the mean ± SD for a three-fold determination.

3.3. In Vitro Biocompatibility of the Partially Degraded Constructs

Because the surface properties changed already within the first months of degradation, the in vitro biocompatibility of the degraded constructs after three months was additionally tested. The influence of surface alterations on cell adherence and proliferation was also investigated. Microscopic observations revealed increasing cell spreading from day one to day seven (Figure 3A and Figure S3). Also, cell viability increased over 7 days of cultivation on all studied constructs (Figure 3B). No tendency of changes in morphology, adherence and viability with increasing degradation time could be observed.

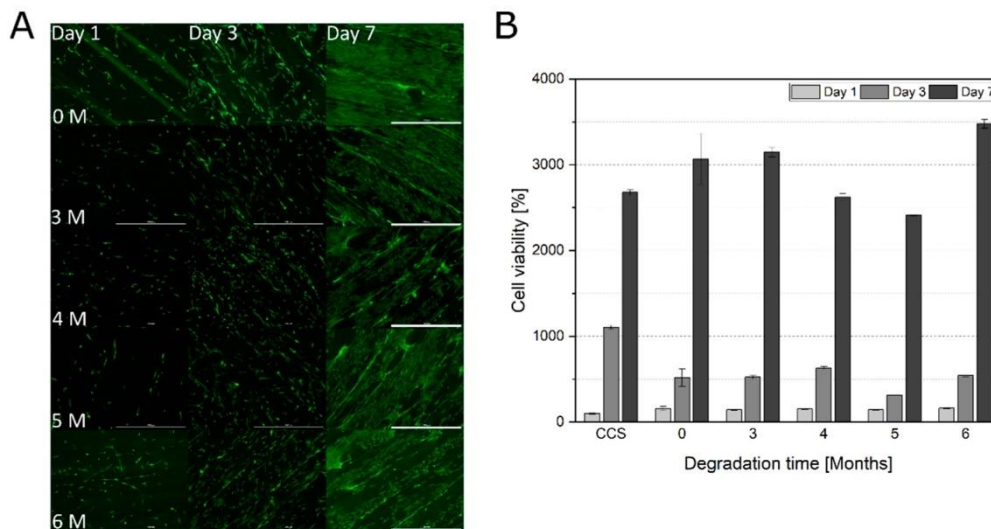


Figure 3. (A) Morphological examination of hAD-MSCs growing on degraded RESOMER[®] PLGA scaffolds (0, 3, 4, 5, and 6 months). After cultivation of 1, 3, and 7 days, the cells were stained with calcein-AM; 4 × objective, scale bar 1000 μm. (B) Comparison of cell viabilities of hAD-MSCs grown on degraded RESOMER[®] PLGA (0, 3, 4, 5, and 6 months) after one, three, and seven days of proliferation. Cell viability determined with the help of CTB assay, CTB fluorescence signal of the cells grown on the CCS on day one served as 100% control. Data represent the mean ± SD for a three-fold determination.

3.4. Influence of Supplements (FCS, HS and hPL) on Cell Morphology and Osteogenic Differentiation on Printed LG D1.75

3.4.1. Cell Morphology

For the application of 3D printed constructs as cell seeded implants in the human body, xeno-free cultivation media is advisable for in vitro cultivation prior implantation. Therefore, the influence of different medium supplements (FCS, HS, hPL) on morphology and cell behavior on 3D printed PLGA constructs was investigated. To observe the cell behavior on the constructs, live time-laps images of the hAD-MSCs growing on the constructs were taken. Independent of the medium supplements, the cells showed a healthy cell spreading and movement on the constructs along the printing direction (Figure 4). Cell morphology and size were nearly the same in all tested supplements.

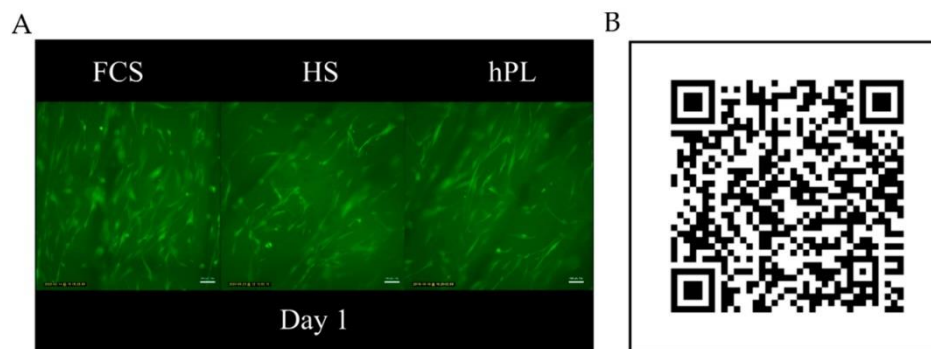


Figure 4. Time-lapse microscope video of hAD-MSCs cultivated on RESOMER[®] PLGA in medium supplemented with FCS, HS and hPL. (A) Single image of the time-lapse video of hAD-MSCs cultivated in medium supplemented with FCS, HS, and hPL on day 1 of cultivation. (B) QR code linking to a high speed time-lapse video of hAD-MSCs migrating on RESOMER[®] PLGA (11270 × speed).

3.4.2. Osteogenic Differentiation

To investigate whether the LG D1.75 is a suitable material for 3D printed, resorbable bone implants, osteogenic differentiation of hAD-MSCs on the constructs was also investigated. For successful applications, printed materials should not affect cell differentiation. Moreover, as mentioned earlier, the cultivation media plays a crucial role for construct colonization prior to implantation. Thus, the degree of osteogenic differentiation of hAD-MSCs on LG D1.75 was tested comparatively under the influence of FCS, HS, or hPL.

In order to compare the cell behavior on the constructs with the traditional cell culture surface, the osteogenic differentiation of hAD-MSCs was first studied in conventional cell culture plates (Figure S4). Here, hPL supported the osteogenic differentiation of hAD-MSCs significantly better than FCS and HS. This effect could be also observed by cells grown on RESOMER[®] PLGA (Figure 5A). Only the cells cultured in hPL-supplemented medium showed signs of osteogenesis after one week (Figure S5). After two weeks a clear red coloration of the deposited calcium was detectable, which was even stronger after three weeks indicating an advanced state of mineralization and osteogenic differentiation [42]. For cells cultured in medium supplemented with FCS and HS, first signs of initial osteogenic differentiation could only be detected after two or three weeks, respectively (Figure 5B). The proliferation control showed no spontaneous osteogenic differentiation of hAD-MSCs on LG D1.75 without induction of differentiation (Figure 5B).

For the quantitative determination of the differentiation an alizarin red quantification was performed for the cells growing on LG D1.75 (Figure 5C). The alizarin red quantification showed that hPL could positively influence and significantly support the differentiation of hAD-MSCs on LG D1.75 3D printed constructs. In contrast to hPL ($4.7 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ in week 1 and $295.5 \pm 23.0 \mu\text{g/mL}$ after three weeks), cells differentiated in HS-supplemented medium showed the lowest alizarin red concentrations ($8.07 \pm 2.77 \mu\text{g/mL}$ in week 1 and $54.81 \mu\text{g/mL} \pm 7.15$ after three weeks). In addition to the staining and quantification of alizarin red, cells growing on the constructs were also examined for alkaline phosphatase as an early osteogenic marker. After one week of osteogenic differentiation, hAD-MSCs cultivated in the presence of hPL showed a high number of ALP-positive cells (Figure 5D and Figure S6). In contrast, fewer ALP-positive cells were detected in HS differentiated cells. FCS as supplement led only to single ALP-positive cells.

In order to compare the differentiation levels of cells grown on RESOMER[®] PLGA and on the cell culture surface, the quantification of the alizarin red concentration after week 3 was also performed (Figure 6). hPL was more supportive of osteogenic differentiation of hAD-MSCs on the 3D printed constructs after three weeks than on the cell culture surface. The degree of osteogenic differentiation of the hAD-MSCs cultivated with hPL was almost doubled ($295.5 \pm 23.0 \mu\text{g/mL}$) compared to the

2D growing hAD-MSCs on the cell culture surface ($160.1 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$). In contrast, the cells on the constructs using HS medium could hardly differentiate compared to the cell culture surface.

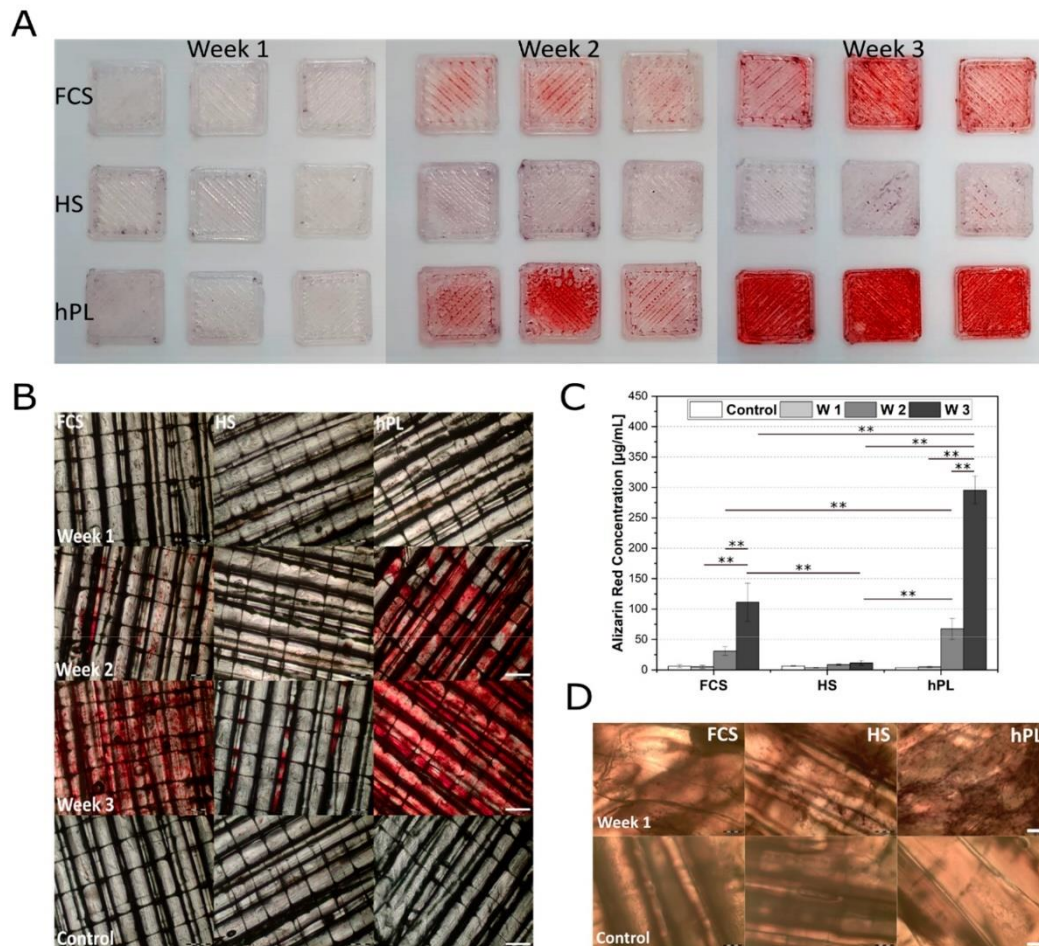


Figure 5. (A) Overview over alizarin red stained hAD-MSCs grown on LG D1.75 constructs after 7, 14, and 21 days after induction of the osteogenic differentiation under influence of FCS, HS, and hPL. (B) Osteogenic differentiation of hAD-MSCs cultivated on printed RESOMER® Filament LG D1.75 and stained with alizarin red 7, 14, and 21 days after induction of the osteogenic differentiation under the influence of FCS, HS, and hPL. Proliferation control after week 3; 2x objective, scale bar 500 μm . (C) Quantification of osteogenic differentiation hAD-MSCs grown on printed RESOMER® Filament LG D1.75 cultivated in medium supplemented with FCS, HS, or hPL. The quantification was performed after day 7, 14, and 21 of differentiation. RESOMER® PLGA in proliferation medium was used as a control. Data represent the mean \pm SD for a three-fold (control) and nine-fold (differentiation) determination. ** $p < 0.01$. (D) Alkaline phosphatase staining of differentiated hAD-MSCs cultivated and for seven days differentiated on printed RESOMER® Filament LG D1.75. Proliferation control after seven days, 4x objective, scale bar 200 μm .

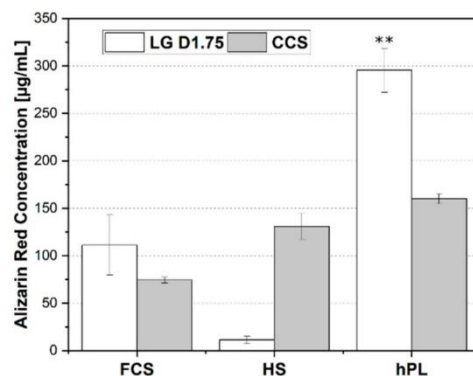


Figure 6. Comparison of alizarin red stained hAD-MSCs grown and differentiated on the printed RESOMER® Filament LG D1.75 construct and on cell culture surface (CCS) for three weeks after induction of osteogenic differentiation under the influence of FCS, HS, and hPL. Data represent the mean \pm SD for a three-fold (cell culture surface) and nine-fold (construct surface) determination. ** $p < 0.01$.

4. Discussion

Development of new 3D printable materials for implants provides the possibility to design personalized medical products tailored for each patient according to individual requirements, even for complex medical treatments. 3D printing technology allows the flexibility of single piece manufacturing of the personalized implants of a precise and complex geometry [15,26–28]. Besides higher flexibility, application of 3D printing can reduce the production costs. Resorbable polymers represent a novel promising material for implantable medical products, especially preferable in cases where the implant replacement or removal is required. After implantation, these materials also will be reabsorbed in the patient's body in a controlled manner, by adjusting the degradation rates to the regeneration speed [17,33]. Recently, bioresorbable polymer RESOMER® Filament LG D1.75 was fabricated as filament for 3D printing (Evonik Industries AG). This polymer consists of PLGA (85:15) and has a degradation time of one to two years. These filaments can be used in FDM printers, where the filament is heated up to 250 degrees in a printing head and uploaded 3D implant models are printed.

Biocompatibility and controlled biodegradability of 3D printed materials is a key issue for their application in medicine. Since FDM printing requires material melting, it is important to exclude the spontaneous generation of possible toxic products [45]. Moreover, the possible introduction of foreign particles between the layers during the 3D printing process is intensively discussed. This can be a critical point, especially with bioresorbable materials since such particles can be released in the body during degradation. For this reason, it must be shown that the printing process itself does not introduce toxic substances.

First, possible toxic leachables from processed material were studied using solid phase extraction method (SPE, according to the ISO 10993-12:2012 [44]). After 24 h of exposition the cells remained vital, regardless of extract concentration. The obtained extracts did not show a toxic effect on human MSCs. Furthermore, the cell adhesion and proliferation on the constructs were investigated to exclude any morphological or phenotypic changes [29,39]. Cultivating the cells directly on the construct surface did not adversely affect the cell behavior. No morphological changes were detectable. The cells showed a high cell viability and remained adhered on the constructs over the entire cultivation period.

Because of the hydrophobic properties of the surface of PLGA scaffolds, many biocompatible materials have been earlier incorporated into PLGA to mimic the extracellular matrix and to enhance the cell adhesion and growth on PLGA [33,46,47]. Fu et al. showed an enhanced effect on proliferation and adhesion of cells on PLGA/hydroxyapatite nanofiber scaffolds [46]. Ren et al. demonstrated successful adhesion and cell proliferation by cultivating MSCs directly on porous PLGA (85/15) scaffolds [47].

In this study, even a faster proliferation and a higher metabolic activity of the cells growing on the LG D1.75 constructs were observed compared to MSCs growing on cell culture surface. The reason of such good cell adhesion on the 3D printed constructs must be further investigated. A possible explanation is the formation of rough, cell-supporting surface structure during extrusion of the melted material.

A requirement for the use of RESOMER[®] Filament LG D1.75 as a degradable implant material in regenerative medicine is the decomposition after a certain time in the recipient's body without releasing toxic substances and without endangering the patient's health [16]. The rate of degradation and the associated effects on cell growth have a major impact when used as a bone support material. If the construct would dissolve too early after transplantation, the regeneration and promotion of the patient's own cells cannot be facilitated [15,33,48]. Nevertheless, it should be resorbed after a certain time since a removal after a completed healing process would require another surgical intervention. Furthermore, if the degradation is too slow, the growth and thus the recovery of the recipient can be negatively affected [49].

In this study, the *in vitro* degradation of the RESOMER[®] Filament LG D1.75 (with an indicative *in vivo* degradation time of one to two years) was observed mainly microscopically and by measuring the surface roughness. No clear development could be detected gravimetrically over six months. However, the method used to determine the degradation time plays an important role in the resulted degradation time. The *in vitro* degradation of a bulk construct in a physiological buffer is not directly comparable to the degradation time of small granulate or tensile bars in the same buffer and also the porosity as well as the pore size has a significant impact [33,50,51]. However, Ren et al. were able to determine an immediate linear weight loss for PLGA with the same LA:GA ratio used in this study (85/15). In contrast to this study, the medium was not changed, so that the pH shift caused by degradation enhanced the autocatalysis of PLGA [33,47]. In our study, the *in vitro* degradation was performed in a buffered system with regular buffer change to prevent a pH shift. In addition to employing a different pH range, Ren et al. used 90% porous PLGA cut in 7 mm × 4 mm pieces instead of bulk constructs, which results in an increased degradation of PLGA [47]. Wu et al. examined the weight loss of a porous PLGA (85/15) scaffold with 87 ± 3% porosity and showed 16 weeks of constant weight followed by a dramatic weight loss afterwards [48]. These results support the importance of a controlled pH-value for *in vitro* degradation experiments and the awareness of the previously demonstrated effect of the material fragment size on the degradation rate [33]. Factors like shape, structure, pH, and temperature can be easily adjusted for an *in vitro* degradation test for physiological conditions. But even if the *in vitro* degradation buffer has a physiological pH value and is stored at 37 °C, in this study no enzymes were added which would make a significant difference to the conditions *in vivo*, especially for enzyme-degradable polymers. Since PLGA is prevalingly degraded by chemical hydrolysis, the difference between *in vitro* and *in vivo* degradation times should not be significant, but can still not be neglected [33,38]. For instance, Wang et al. could demonstrate a faster degradation of PLGA (75/25) *in vivo* [52] and Cai et al. showed that trypsin can accelerate the degradation rate of PLGA *in vitro* [53].

As mentioned earlier, different tissues require a varying degradation time of the implant to support the specific tissue regeneration [33,48]. For a successful implantation, besides the suitable degradation time, the surface including the binding sites for cells should not change adversely during the degradation process to avoid negative effects on the *de novo* cell adhesion [54]. Several studies investigated the *in vivo* biocompatibility and degradation of resorbable scaffolds [55–57]. A limited number of publications studied the *in vitro* or *in vivo* biocompatibility of *in vitro* degraded resorbable polymer constructs [58]. In our *in vitro* study under physiological conditions, the progressing degradation and the resulting smoother surface did not affect the adhesion and proliferation of hAD-MSCs. The cells were able to grow on the degraded constructs as well as on the non-degraded constructs and showed even a slightly higher cell viability after seven days of cultivation compared to cells cultured on the cell culture surface. Since no morphological changes of the cells on the degraded constructs were detected either, the RESOMER[®] Filament LG D1.75 can be considered biocompatible

also after degradation [29,39]. Therefore, it can be assumed that even after implantation into the human body and the subsequent degradation of LG D1.75, cell growths on constructs is possible and no detachment from the surface will appear over time. Nevertheless, *in vivo* experiments would be necessary to investigate inflammatory reactions of the body. Moreover, mechanical properties of degraded 3D printed construct must be studied in the future.

RESOMER[®] Filament LG D1.75 could be a valuable material for 3D printed, resorbable bone implants in regenerative medicine and tissue engineering. On the one hand, it can replace missing bone areas as an accurately fitting implant by supporting the patient's own bone cells during regeneration [54,59]. On the other hand, constructs printed with LG D1.75 could be colonized with the patient's own cells before autologous transplantation, so that recovery and new bone formation can be additionally supported [49]. For such applications of LG D1.75 it was important to test whether the osteogenesis of human cells on the constructs can be inhibited by the material properties and components. In addition to the material, there is increasing interest in the search for xeno-free alternatives for FCS as media supplementation in regenerative medicine. hPL could provide such an alternative since the use of hPL was already shown to improve proliferation and differentiation in 2D and 3D cultivations of MSCs [40–42,60,61]. hPL contains many bioactive factors, which act synergistically to promote the attachment, proliferation, and differentiation of MSCs [40–42,60,61]. Most of the recent studies of PLGA as resorbable implant material were still performed with FCS as a medium supplement for cell culture [46,47]. For clinical applications, however, it is crucial to be able to replace FCS with an xeno-free alternative to avoid xenogenic immune reactions and the transmission of prions or other zoonotic infections after transplantation [62–64].

In this study, we investigated the influence of FCS, HS, and hPL on the cell morphology and osteogenic differentiation on printed LG D1.75. As described already in a previous study, the hAD-MSCs in all three tested supplements were migrating on the construct surface along the printing direction [15]. The hAD-MSCs colonized on printed RESOMER[®] Filament LG D1.75 showed osteogenic differentiation after three weeks in medium supplemented with FCS, HS, and hPL. As described earlier in several studies, in comparison to HS and FCS, hPL showed an accelerated and improved osteogenic differentiation of hAD-MSCs [40–42]. Altaie et al. described an osteoconductive influence of hPL after coating scaffolds with hPL [61]. Additionally, to the osteoconductive effect of hPL, several studies described also an osteoconductive influence of primarily porous PLGA scaffolds [46,65–68]. In this study, the differentiation behavior of the cells on LG D1.75 was more strongly supported by hPL than on the cell culture surface. Thus, the bulk construct of LG D1.75 can be described as osteoconductive in its function as a scaffold, but not as osteoinductive because of the lack of stimulation for osteogenesis [46,54,59,65–68]. Although histological staining with BCIP/NBT and alizarin red revealed higher osteogenic differentiation degree in terms of ALP-positive cells and calcium accumulation by cells in the presence of hPL, a deeper differentiation analysis must be performed in future experiments. Gene expression of osteogenic markers and immunofluorescent detection of specific proteins will give a closer insight into the cellular behavior in the presence of different supplements. However, the obtained results display the advantage of the combination of hPL supplemented cells cultivated on 3D printed PLGA constructs for bone tissue engineering.

5. Conclusions

We demonstrated a possible application of RESOMER[®] Filament LG D1.75 as a material for fabrication of 3D printed, resorbable bone implants. Our *in vitro* experiments indicate that no cytotoxic effects can be expected after implantation. No toxic leachables and no inhibition of cell growth directly on the constructs were detected. The combination of xeno-free cultivation conditions with hPL and RESOMER[®] Filament LG D1.75 as 3D printed scaffold supported the osteogenic differentiation of hAD-MSCs. RESOMER[®] Filament LG D1.75 is suitable as a material for resorbable, 3D printed bone implants because of its remaining biocompatibility after degradation.

Taken together, the suitability of the material RESOMER® Filament LG D1.75 to produce 3D printed, resorbable implants was demonstrated. Furthermore, the favorable utilization of hPL for xeno-free cultivation of human MSCs on such implants for possible autologous implantation was shown. The possibility to use hPL as xeno-free medium supplement for cell cultivation on biocompatible resorbable 3D printed scaffolds represents a promising sustainable combination with a great potential for future applications in regenerative medicine.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1996-1944/13/15/3399/s1>, Figure S1: Representative picture of the determination of the average filament size of 3D printed constructs. Scale bar 100 µm. Figure S2: Micrographs of constructs after 0, 3, 4, 5, and 6 months of degradation. A: 500× magnification of the construct surface in 2D and 3D taken with 3D microscope. Scale bar 100 µm. B: 3000× magnification of the construct surface. Scale bar 25 µm. Figure S3: Morphological examination of hAD-MSCs growing on degraded printed RESOMER® Filament LG D1.75 (0, 3, 4, 5, and 6 months). After cultivation of 1, 3, and 7 days, the cells were stained with calcein-AM; 4× objective, scale bar 100 µm. Figure S4: Osteogenic differentiation of hAD-MSCs cultivated on the cell culture surface and stained with alizarin red 7, 14, and 21 days after induction of the osteogenic differentiation under the influence of FCS, HS, and hPL. Proliferation control after week 3; 4× objective, scale bar 200 µm. Figure S5: Osteogenic differentiation of hAD-MSCs cultivated on printed RESOMER® Filament LG D1.75 and stained with alizarin red seven days after induction of the osteogenic differentiation under influence of FCS, HS and hPL; 4× objective, scale bar 200 µm. Figure S6: Alkaline phosphatase staining of differentiated hAD-MSCs cultivated and for seven days differentiated on printed RESOMER® Filament LG D1.75. Scale bar 2500 µm.

Author Contributions: Conceptualization, M.K. and A.L.; data curation, M.K. and A.-C.H.; investigation, M.K. and A.-C.H.; methodology, M.K., C.B., J.R., W.H., and A.L.; data analysis and interpretation, M.K., A.-C.H., A.L., A.K., A.S.; resources, A.K., A.S., and T.S.; supervision, T.S. and A.L.; validation, M.K. and A.L.; visualization, M.K. and A.-C.H.; writing—original draft, M.K. and A.L.; writing—review and editing, A.-C.H., C.B., A.K., J.R., W.H., A.S., T.S., and A.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge Annalea Brüggemann for data preparation support and Thorsten Stempel for material processing support. The publication of this article was funded by the Open Access fund of Leibniz Universität Hannover.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hull, C.W. Apparatus for Production of Three-Dimensional Objects by Stereolithography. U.S. Patent No. 638905, 8 August 1984.
- Keyhan, S.O.; Fallahi, H.; Jahangirnia, A.; Amirzade-Iranaq, M.T.; Amirzade-Iranaq, M.H. Application of 3-D Printing for Tissue Regeneration in Oral and Maxillofacial Surgery: What is Upcoming. In *Biomaterials in Regenerative Medicine*; Dobrzański, L.A., Ed.; InTech: London, UK, 2018; ISBN 978-953-51-3776-4.
- Dawood, A.; Marti Marti, B.; Sauret-Jackson, V.; Darwood, A. 3D printing in dentistry. *Br. Dent. J.* **2015**, *219*, 521–529. [[CrossRef](#)]
- Cunningham, L.L.; Madsen, M.J.; Peterson, G. Stereolithographic modeling technology applied to tumor resection. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2005**, *63*, 873–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chae, M.P.; Rozen, W.M.; McMenamin, P.G.; Findlay, M.W.; Szychal, R.T.; Hunter-Smith, D.J. Emerging Applications of Bedside 3D Printing in Plastic Surgery. *Front. Surg.* **2015**, *2*, 25. [[CrossRef](#)]
- Hoy, M.B. 3D printing: Making things at the library. *Med. Ref. Serv. Q.* **2013**, *32*, 94–99. [[CrossRef](#)]
- Guo, T.; Holzberg, T.R.; Lim, C.G.; Gao, F.; Gargava, A.; Trachtenberg, J.E.; Mikos, A.G.; Fisher, J.P. 3D printing PLGA: A quantitative examination of the effects of polymer composition and printing parameters on print resolution. *Biofabrication* **2017**, *9*, 24101. [[CrossRef](#)]
- Hsu, S.-h.; Yen, H.-J.; Tseng, C.-S.; Cheng, C.-S.; Tsai, C.-L. Evaluation of the growth of chondrocytes and osteoblasts seeded into precision scaffolds fabricated by fused deposition manufacturing. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2007**, *80*, 519–527. [[CrossRef](#)]
- Mertz, L. Dream it, design it, print it in 3-D: What can 3-D printing do for you? *IEEE Pulse* **2013**, *4*, 15–21. [[CrossRef](#)]
- Langer, R.; Vacanti, J.P. Tissue engineering. *Science* **1993**, *260*, 920–926. [[CrossRef](#)]
- Ventola, C.L. Medical Applications for 3D Printing: Current and Projected Uses. *P T* **2014**, *39*, 704–711.

12. Hollister, S.J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 518–524. [[CrossRef](#)]
13. Lee, K.Y.; Mooney, D.J. Hydrogels for tissue engineering. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1869–1879. [[CrossRef](#)]
14. Barrows, T. Degradable implant materials: A review of synthetic absorbable polymers and their applications. *Clin. Mater.* **1986**, *1*, 233–257. [[CrossRef](#)]
15. Raddatz, L.; Kirsch, M.; Geier, D.; Schaeske, J.; Acreman, K.; Gentsch, R.; Jones, S.; Karau, A.; Washington, T.; Stiesch, M.; et al. Comparison of different three dimensional-printed resorbable materials: In vitro biocompatibility, In vitro degradation rate, and cell differentiation support. *J. Biomater. Appl.* **2018**, *33*, 281–294. [[CrossRef](#)]
16. Pina, S.; Ferreira, J. Bioresorbable Plates and Screws for Clinical Applications: A Review. *J. Healthc. Eng.* **2012**, *3*, 243–260. [[CrossRef](#)]
17. Babensee, J.E.; Anderson, J.M.; McIntire, L.V.; Mikos, A.G. Host response to tissue engineered devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *33*, 111–139. [[CrossRef](#)]
18. Gutwald, R.; Pistner, H.; Reuther, J.; Mhling, J. Biodegradation and tissue-reaction in a long-term implantation study of poly(L-lactide). *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **1994**, *5*, 485–490. [[CrossRef](#)]
19. Mehra, P.; Miner, J.; D’Innocenzo, R.; Nadershah, M. Use of 3-d stereolithographic models in oral and maxillofacial surgery. *J. Maxillofac. Oral Surg.* **2011**, *10*, 6–13. [[CrossRef](#)]
20. Mendez, B.M.; Chiodo, M.V.; Patel, P.A. Customized "In-Office" Three-Dimensional Printing for Virtual Surgical Planning in Craniofacial Surgery. *J. Craniofac. Surg.* **2015**, *26*, 1584–1586. [[CrossRef](#)]
21. Mazzoni, S.; Marchetti, C.; Sgarzani, R.; Cipriani, R.; Scotti, R.; Ciocca, L. Prosthetically guided maxillofacial surgery: Evaluation of the accuracy of a surgical guide and custom-made bone plate in oncology patients after mandibular reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.* **2013**, *131*, 1376–1385. [[CrossRef](#)]
22. Lopez, C.D.; Witek, L.; Torroni, A.; Flores, R.L.; Demissie, D.B.; Young, S.; Cronstein, B.N.; Coelho, P.G. The role of 3D printing in treating craniomaxillofacial congenital anomalies. *Birth Defects Res.* **2018**, *110*, 1055–1064. [[CrossRef](#)]
23. Han, H.H.; Shim, J.-H.; Lee, H.; Kim, B.Y.; Lee, J.-S.; Jung, J.W.; Yun, W.-S.; Baek, C.H.; Rhie, J.-W.; Cho, D.-W. Reconstruction of Complex Maxillary Defects Using Patient-specific 3D-printed Biodegradable Scaffolds. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open* **2018**, *6*, e1975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Windhagen, H.; Radtke, K.; Weizbauer, A.; Diekmann, J.; Noll, Y.; Kreimeyer, U.; Schavan, R.; Stukenborg-Colsman, C.; Waizy, H. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: Short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *Biomed. Eng. Online* **2013**, *12*, 62. [[CrossRef](#)]
25. Jammalamadaka, U.; Tappa, K. Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering. *J. Funct. Biomater.* **2018**, *9*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ursan, I.D.; Chiu, L.; Pierce, A. Three-dimensional drug printing: A structured review. *J. Am. Pharm. Assoc.* **2013**, *53*, 136–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Banks, J. Adding value in additive manufacturing: Researchers in the United Kingdom and Europe look to 3D printing for customization. *IEEE Pulse* **2013**, *4*, 22–26. [[CrossRef](#)]
28. Cui, X.; Boland, T.; D’Lima, D.D.; Lotz, M.K. Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2012**, *6*, 149–155. [[CrossRef](#)]
29. Gross, B.C.; Erkal, J.L.; Lockwood, S.Y.; Chen, C.; Spence, D.M. Evaluation of 3D Printing and Its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3240–3253. [[CrossRef](#)]
30. Gentile, P.; Chiono, V.; Carmagnola, I.; Hatton, P.V. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 3640–3659. [[CrossRef](#)]
31. Ishaug, S.L.; Crane, G.M.; Miller, M.J.; Yasko, A.W.; Yaszemski, M.J.; Mikos, A.G. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *36*, 17–28. [[CrossRef](#)]
32. Ma, P.X.; Choi, J.W. Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng.* **2001**, *7*, 23–33. [[CrossRef](#)]
33. Pan, Z.; Ding, J. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface Focus* **2012**, *2*, 366–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Seunarine, K.; Gadegaard, N.; Tormen, M.; Meredith, D.O.; Riehle, M.O.; Wilkinson, C.D.W. 3D polymer scaffolds for tissue engineering. *Nanomedicine* **2006**, *1*, 281–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Shen, H.; Hu, X.; Bei, J.; Wang, S. The immobilization of basic fibroblast growth factor on plasma-treated poly(lactide-co-glycolide). *Biomaterials* **2008**, *29*, 2388–2399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Yu, L.; Ding, J. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1473–1481. [[CrossRef](#)]
37. Cohen, N.P.; Foster, R.J.; Mow, V.C. Composition and dynamics of articular cartilage: Structure, function, and maintaining healthy state. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* **1998**, *28*, 203–215. [[CrossRef](#)]
38. Göpferich, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* **1996**, *17*, 103–114. [[CrossRef](#)]
39. Nolan, K.; Millet, Y.; Ricordi, C.; Stabler, C.L. Article Commentary: Tissue Engineering and Biomaterials in Regenerative Medicine. *Cell Transpl.* **2008**, *17*, 241–243. [[CrossRef](#)]
40. Kirsch, M.; Birnstein, L.; Pepelanova, I.; Handke, W.; Rach, J.; Seltsam, A.; Scheper, T.; Lavrentieva, A. Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Formulated with Human Platelet Lysate Supports Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation and Enhances the Hydrogel's Mechanical Properties. *Bioengineering* **2019**, *6*, 76. [[CrossRef](#)]
41. Bieback, K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfus. Med. Hemother.* **2013**, *40*, 326–335. [[CrossRef](#)]
42. Burnouf, T.; Strunk, D.; Koh, M.B.C.; Schallmoser, K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* **2016**, *76*, 371–387. [[CrossRef](#)]
43. Pepelanova, I.; Kruppa, K.; Scheper, T.; Lavrentieva, A. Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Hydrogels with Defined Degree of Functionalization as a Versatile Toolkit for 3D Cell Culture and Extrusion Bioprinting. *Bioengineering* **2018**, *5*, 55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. ISO 10993-12:2012. *Biological Evaluation of Medical Devices—Part 12: Sample Preparation and Reference Materials*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2012.
45. Oskui, S.M.; Diamante, G.; Liao, C.; Shi, W.; Gan, J.; Schlenk, D.; Grover, W.H. Assessing and Reducing the Toxicity of 3D-Printed Parts. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2015**, *3*, 1–6. [[CrossRef](#)]
46. Fu, C.; Bai, H.; Zhu, J.; Niu, Z.; Wang, Y.; Li, J.; Yang, X.; Bai, Y. Enhanced cell proliferation and osteogenic differentiation in electrospun PLGA/hydroxyapatite nanofibre scaffolds incorporated with graphene oxide. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0188352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ren, T.; Ren, J.; Jia, X.; Pan, K. The bone formation in vitro and mandibular defect repair using PLGA porous scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2005**, *74*, 562–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Wu, L.; Ding, J. In vitro degradation of three-dimensional porous poly (D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5821–5830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Yuan, H.; Fernandes, H.; Habibovic, P.; De Boer, J.; Barradas, A.M.C.; De Ruiter, A.; Walsh, W.R.; van Blitterswijk, C.A.; De Bruijn, J.D. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 13614–13619. [[CrossRef](#)]
50. Félix Lanao, R.P.; Jonker, A.M.; Wolke, J.G.C.; Jansen, J.A.; van Hest, J.C.M.; Leeuwenburgh, S.C.G. Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2013**, *19*, 380–390. [[CrossRef](#)]
51. Athanasiou, K.A.; Schmitz, J.P.; Agrawal, C.M. The Effects of Porosity on in Vitro Degradation of Polylactic Acid–Polyglycolic Acid Implants Used in Repair of Articular Cartilage. *Tissue Eng.* **1998**, *4*, 53–63. [[CrossRef](#)]
52. Wang, W.; Li, B.; Li, Y.; Jiang, Y.; Ouyang, H.; Gao, C. In vivo restoration of full-thickness cartilage defects by poly(lactide-co-glycolide) sponges filled with fibrin gel, bone marrow mesenchymal stem cells and DNA complexes. *Biomaterials* **2010**, *31*, 5953–5965. [[CrossRef](#)]
53. Cai, Q. Enzymatic degradation behavior and mechanism of Poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin. *Biomaterials* **2003**, *24*, 629–638. [[CrossRef](#)]
54. Intini, G.; Andreana, S.; Buhite, R.J.; Bobek, L.A. A Comparative Analysis of Bone Formation Induced by Human Demineralized Freeze-Dried Bone and Enamel Matrix Derivative in Rat Calvaria Critical-Size Bone Defects. *J. Periodontol.* **2008**, *79*, 1217–1224. [[CrossRef](#)]
55. Pappalardo, D.; Mathisen, T.; Finne-Wistrand, A. Biocompatibility of Resorbable Polymers: A Historical Perspective and Framework for the Future. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 1465–1477. [[CrossRef](#)]
56. Ramot, Y.; Haim-Zada, M.; Domb, A.J.; Nyska, A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 153–162. [[CrossRef](#)]

57. De Tayrac, R.; Chentouf, S.; Garreau, H.; Braud, C.; Guiraud, I.; Boudeville, P.; Vert, M. In vitro degradation and in vivo biocompatibility of poly(lactic acid) mesh for soft tissue reinforcement in vaginal surgery. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2008**, *85*, 529–536. [[CrossRef](#)]
58. Bergsma, J.E.; Rozema, F.R.; Bos, R.R.; Boering, G.; De Bruijn, W.C.; Pennings, A.J. In vivo degradation and biocompatibility study of in vitro pre-degraded as-polymerized polyactide particles. *Biomaterials* **1995**, *16*, 267–274. [[CrossRef](#)]
59. Wei, L.; Miron, R.J.; Shi, B.; Zhang, Y. Osteoinductive and Osteopromotive Variability among Different Demineralized Bone Allografts. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **2015**, *17*, 533–542. [[CrossRef](#)]
60. Jonsdottir-Buch, S.M.; Lieder, R.; Sigurjonsson, O.E.; Kerkis, I. Platelet Lysates Produced from Expired Platelet Concentrates Support Growth and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e68984. [[CrossRef](#)]
61. Altaie, A.; Owston, H.; Jones, E. Use of platelet lysate for bone regeneration - are we ready for clinical translation? *World J. Stem Cells* **2016**, *8*, 47–55. [[CrossRef](#)]
62. Astori, G.; Amati, E.; Bambi, F.; Bernardi, M.; Chierigato, K.; Schäfer, R.; Sella, S.; Rodeghiero, F. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: Present and future. *Stem Cell Res. Ther.* **2016**, *7*, 93. [[CrossRef](#)]
63. Capelli, C.; Domenghini, M.; Borleri, G.; Bellavita, P.; Poma, R.; Carobbio, A.; Micò, C.; Rambaldi, A.; Golay, J.; Introna, M. Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplant.* **2007**, *40*, 785–791. [[CrossRef](#)]
64. Bottio, T.; Pittarello, G.; Bonato, R.; Fagiolo, U.; Gerosa, G. Life-threatening anaphylactic shock caused by porcine heparin intravenous infusion during mitral valve repair. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2003**, *126*, 1194–1195. [[CrossRef](#)]
65. Dean, D.; Topham, N.S.; Rinnac, C.; Mikos, A.G.; Goldberg, D.P.; Jepsen, K.; Redtfeldt, R.; Liu, Q.; Pennington, D.; Ratcheson, R. Osseointegration of preformed polymethylmethacrylate craniofacial prostheses coated with bone marrow-impregnated poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foam. *Plast. Reconstr. Surg.* **1999**, *104*, 705–712. [[CrossRef](#)]
66. Dean, D.; Topham, N.S.; Meneghetti, S.C.; Wolfe, M.S.; Jepsen, K.; He, S.; Chen, J.E.-K.; Fisher, J.P.; Cooke, M.; Rinnac, C.; et al. Poly(propylene fumarate) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) as scaffold materials for solid and foam-coated composite tissue-engineered constructs for cranial reconstruction. *Tissue Eng.* **2003**, *9*, 495–504. [[CrossRef](#)]
67. Ge, Z.; Tian, X.; Heng, B.C.; Fan, V.; Yeo, J.F.; Cao, T. Histological evaluation of osteogenesis of 3D-printed poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) scaffolds in a rabbit model. *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, 21001. [[CrossRef](#)]
68. Langenbach, F.; Handschel, J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* **2013**, *4*, 117. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4 Zusammenfassung und Ausblick

Zur *in vitro* Zellversorgung und Aufrechterhaltung der Zelleigenschaften stellen sich abhängig vom Zelltyp oder der geplanten Anwendung spezifische Anforderungen an das Zellkulturmedium. Insbesondere im Bereich der regenerativen Medizin, in dem die Zellen und zellbesiedelten Implantate selbst das Endprodukt sind, stellen sich besondere Herausforderungen an die Kultivierungsbedingungen. Für einen optimalen Therapieerfolg ist es von Vorteil, die Zellen von Beginn an unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen zu kultivieren. So müssen die MSCs zum einen unter optimierten xenofreien Verhältnissen kultiviert werden, sodass ihr klinisches Potential und ihre Zelleigenschaften erhalten bleiben und unterstützt werden. Zum anderen wirkt sich die Art des Kultivierungssystems (2D oder 3D) entscheidend auf das Zellverhalten und die Zellfunktionalität aus. Die Wahrscheinlichkeit für Risiken oder Komplikationen (z.B. Immunreaktionen oder Erkrankungen) nach erfolgter Injektion der Zellen oder Implantation der Gewebekonstrukten sollte möglichst minimiert werden. Für die Anwendung in klinischen Studien und langfristig in der regenerativen Medizin sind die Entwicklung und erfolgreiche Etablierung effektiver xenofreier Kultivierungsbedingungen für MSCs in 2D- und 3D-Zellkultursystemen von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden verschiedene alternative xenofreie Kultivierungsbedingungen betrachtet und auf MSCs in verschiedenen Zellkultursystemen angewendet. Das Ziel war es, die xenofreie Kultivierung von MSCs zu optimieren und Möglichkeiten nachhaltiger Kultivierungsansätze zu schaffen.

Im ersten Abschnitt des praktischen Teils dieser Arbeit (Kapitel 3.1) konnte gezeigt werden, dass eine Mediumsupplementierung mit 2,5 % hPL spenderunabhängig zu einer schnelleren Expansion sowie zu einer effizienteren osteogenen und chondrogenen Differenzierung von hAD-MSCs führt als eine Supplementierung mit 10 % HS oder 10 % FKS. Da eine *ex vivo* Expansion für eine klinische Anwendung von MSCs essenziell ist, eignet sich hPL daher als vielversprechendes Mediumsupplement, um eine hohe Zellausbeute für klinische Studien und Therapien zu erreichen. Unter Standardbedingungen *in vitro* differenzieren MSCs normalerweise innerhalb von 21 Tagen nach erfolgter Induktion zu Osteozyten. Bei einer Zugabe von hPL konnten bereits nach einer Woche morphologische Veränderungen (Calciumablagerungen) detektiert werden. Für die chondrogene Differenzierung von MSCs werden traditionell vorwiegend 3D-Kultivierungsprotokolle verwendet. Darüber hinaus besitzen hAD-MSCs eine nur sehr geringe chondrogene Differenzierungsfähigkeit. In dieser Arbeit konnte jedoch mittels einer hPL-Supplementierung eine verstärkte chondrogene Differenzierung (innerhalb von zwei Wochen) von hAD-MSCs in einer 2D-Zellkultur erreicht werden. Die bereits innerhalb von zwei Wochen nachweisbare chondrogene Differenzierung der 2D-kultivierten MSCs zeigt den entscheidenden Einfluss von hPL auf das Differenzierungspotential der Zellen. Solch eine Eigenschaft von hPL kann beispielsweise für einen Behandlungserfolg von autologen Chondrozytentransplantationen von bedeutendem Vorteil sein.

Neben dem Potential von hPL die Proliferation sowie die Differenzierung von 2D-kultivierten MSCs deutlich zu steigern, konnte in 3D-Zellkultursystemen zusätzlich noch eine verstärkte Zelladhäsion und -ausbreitung der mit hPL-kultivierten hAD-MSCs beobachtet werden. In den Hydrogelen, die als repräsentative 3D-Zellkultursysteme verwendet wurden, zeigte neben der Mediensupplementierung insbesondere die Zugabe eines Mediumsupplements bei der Formulierung der Hydrogele einen großen Einfluss. Es konnte gezeigt werden, dass allein eine Zugabe von Supplementen zu den Hydrogelen keine Voraussetzung für ein verstärktes Zellwachstum und eine Ausbreitung ist (Kapitel 3.1). Vor allem die Zugabe von hPL zum Hydrogel (50 %hPL/50 % PBS) führte zu verbesserten Kultivierungsbedingungen für die Zellen. Es wurde gezeigt, dass die Kombination einer Zugabe des hPLs in das Hydrogel und in das Kultivierungsmedium die besten xenofreien Bedingungen für die hAD-MSCs darstellt.

Im zweiten Abschnitt des praktischen Teils dieser Arbeit (Kapitel 3.2) konnte zudem gezeigt werden, dass der positive Einfluss des hPLs auf die Kultivierungsbedingungen konzentrationsabhängig erfolgt. Neben einer konzentrationsabhängigen Verbesserung der Proliferation und Differenzierung konnten auch die Hydrogeleigenschaften durch die Zugabe von hPL positiv beeinflusst werden. In Hydrogelen verschiedener Steifigkeit führte die Formulierung mit hPL zu einer Verbesserung der Bioprintbarkeit (Erhöhung der Viskosität) und zu einer erhöhten Formstabilität (geringerer Quellungsgrad). Das 3D-Bioprinting stellt eine fortschrittliche 3D-Zellkulturtechnik dar, bei der eine höhere räumliche Kontrolle der Zellverteilung und -organisation erreicht werden kann. Da für das *High-Fidelity-Extrusion*-Bioprinting in der Regel höhere Viskositäten erforderlich sind, kann sich das hPL als ein Additiv für Biotinten (*Bioinks*) eignen, welches gleichzeitig die Zellviabilität, das -verhalten und die -funktionen verbessert. In weiterführenden Studien sollte die Druckbarkeit von mit hPL formulierten Hydrogelen evaluiert werden.

Im Falle von Knochenfrakturen oder Tumorresektionen in *Hard Tissues* sollen langfristig bildgebende Verfahren in Kombination mit dem 3D-Druck zu individuellen Gerüststrukturen führen, die *in vitro* besiedelt und anschließend im menschlichen Körper implantiert werden können. Additiv gefertigte resorbierbare Polymerkonstrukte stellen hierbei eine vielversprechende universelle Grundlage für vielfältige Anwendungen in der regenerativen Medizin dar. Vor der Einbringung in den Organismus müssen Anforderungen wie die Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit abschließend geklärt und das Material auf seine Eignung geprüft werden. Im dritten Abschnitt des praktischen Teils dieser Arbeit (Kapitel 3.3) konnte gezeigt werden, dass sich das Material RESOMER® Filament LG D1.75 (Evonik Industries AG) als 3D-druckbares Implantatmaterial eignet. Insbesondere aufgrund einer osteokonduktiven Wirkung des Materials erweist es sich als optimales resorbierbares Polymer für eine Anwendung im Knochen *Tissue Engineering*. Eine Supplementierung mit hPL kann die osteogene Differenzierung zusätzlich beschleunigen und führt innerhalb kürzester Zeit zu einer homogenen Differenzierung der auf den Konstrukten wachsenden hAD-MSCs. Die Möglichkeit hPL als xenofreies

Mediumsupplement für die Zellkultivierung auf biokompatiblen resorbierbaren 3D-gedruckten Konstrukten zu verwenden, stellt eine vielversprechende nachhaltige Kombination mit einem großen Potenzial für zukünftige Anwendungen in der regenerativen Medizin dar. So könnte beispielsweise eine schnelle Produktion personalisierter Implantate gewährleistet werden. Die Zeit zwischen der Diagnose (Verletzung/Krankheit) und der Behandlung könnte somit maßgeblich verkürzt werden. Nach erfolgter Diagnose kann mithilfe von bildgebenden Verfahren (Röntgenaufnahmen, MRT, CT) das benötigte Konstrukt additiv gefertigt, *in vitro* mit patienteneigenen Zellen besiedelt und unter Zugabe von hPL in kürzester Zeit *in vitro* differenziert werden. Direkt nach Einsetzung des Knochenimplantates kann die körpereigene Regeneration und Vaskularisierung durch das bewachsene resorbierbare Gewebekonstrukt angeregt und der Heilungsprozess zusätzlich unterstützt werden²⁹.

Bis zur erfolgreichen Etablierung und Zulassung effizienter chemisch definierter serumfreier Medien für die MSC-Produktion und Differenzierung im großen Maßstab kann hPL als geeignetes Supplement für die xenofreie 2D- und 3D-Zellkultivierung dienen. Wenn hPL unter optimalen Bedingungen der Standardisierung und Sicherheit produziert wird, kann es sich zukünftig zu einem wichtigen Mediumsupplement für die *ex vivo* Produktion von MSCs und die *ex vivo* Gewebebildung für Anwendungen im Bereich der regenerativen Medizin entwickeln. Die genaue hPL-Zusammensetzung und die Ursache für die schnelle MSC-Differenzierung in hPL konnten bislang noch nicht genau erforscht werden. Weitere Studien (hPL-Fraktionierungen, Proteinauftrennungen (siehe Anhang A1) und MS-Analysen) könnten dazu beitragen, die positiven Effekte einzelner Komponenten des hPLs zu identifizieren und diese zur Herstellung chemisch definierter Medien zu verwenden. Zusätzlich könnte die Analyse der Zusammensetzung des hPLs zu einem verbesserten Verständnis der biologischen Prozesse in den Stammzellen führen. Da viele verschiedene Faktoren die Zusammensetzung und Bioaktivität des hPLs beeinflussen, sollten nach einer Kultivierung mit hPL spezifische Zelleigenschaften der MSCs wie die Immunmodulation, die Produktion und der Gehalt von extrazellulären Vesikeln sowie von Wachstumsfaktoren überprüft werden^{7,27,341,353,370}. Mit einer zukünftig steigenden Tendenz in der Produktion und Verwendung von hPL werden ebenfalls größere Spenderpools und somit eine Pathogeninaktivierung erforderlich²⁷. Aus diesem Grund sollte der Einfluss einer Pathogeninaktivierung auf das hPL und seine Eigenschaften weitergehend untersucht werden^{379,380,452}. Des Weiteren ist es für einen universellen Einsatz von hPL als Mediumsupplement notwendig, die Kultivierung weiterer Zellen (z.B. T-Zellen, Progenitorzellen) unter Einfluss von hPL zu untersuchen³⁷⁴.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen das große Potential der Verwendung des xenofreien hPLs als Mediumsupplement. Zusätzlich entspricht der Einsatz von hPL den modernen gesellschaftlichen Grundsätzen von Ethik, Nachhaltigkeit, Recycling und Ressourcenschonung, sodass es eine geeignete Alternative zu dem xenogenen FKS darstellt. Die Etablierung von hPL könnte vollständig xenofreie Kultivierungsbedingungen (von der Zellisolation bis hin zur *ex vivo* Expansion oder Differenzierung)

ermöglichen, die die Risiken einer Anwendung von MSCs für die regenerative Medizin erheblich senken würden^{202,453}. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass hPL in Kombination mit vielversprechenden additiv herstellbaren Zellkultursystemen für das *Soft* und *Hard Tissue Engineering* optimale Ansätze für klinische Anwendungen liefern kann.

5 Literaturverzeichnis

- 1 Schallmoser K, Henschler R, Gabriel C, Koh MBC, Burnouf T. Production and Quality Requirements of Human Platelet Lysate: A Position Statement from the Working Party on Cellular Therapies of the International Society of Blood Transfusion. *Trends in biotechnology* 2020; 38: 13–23.
- 2 Whitaker B, Rajbhandary S, Kleinman S, Harris A, Kamani N. Trends in United States blood collection and transfusion: results from the 2013 AABB Blood Collection, Utilization, and Patient Blood Management Survey. *Transfusion* 2016; 56: 2173–2183.
- 3 Jonsdottir-Buch SM, Lieder R, Sigurjonsson OE. Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PloS one* 2013; 8: e68984.
- 4 Rauch C, Feifel E, Amann E-M, Spötl HP, Schennach H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX* 2011; 28: 305–316.
- 5 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 1999; 284: 143–147.
- 6 Hemedá H, Giebel B, Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2014; 16: 170–180.
- 7 Bieback K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie* 2013; 40: 326–335.
- 8 Lindroos B, Boucher S, Chase L, Kuokkanen H, Huhtala H, Haataja R, Vemuri M, Suuronen R, Miettinen S. Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro. *Cytotherapy* 2009; 11: 958–972.
- 9 Gstraunthaler G, Lindl T, van der Valk J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology* 2013; 65: 791–793.
- 10 Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 2016; 76: 371–387.
- 11 Monsanto MM, White KS, Kim T, Wang BJ, Fisher K, Ilves K, Khalafalla FG, Casillas A, Broughton K, Mohsin S, Dembitsky WP, Sussman MA. Concurrent Isolation of 3 Distinct Cardiac Stem Cell Populations From a Single Human Heart Biopsy. *Circulation research* 2017; 121: 113–124.
- 12 Motedayyen H, Esmail N, Tajik N, Khadem F, Ghotloo S, Khani B, Rezaei A. Method and key points for isolation of human amniotic epithelial cells with high yield, viability and purity. *BMC research notes* 2017; 10: 552.
- 13 Lee M-S, Wang J, Yuan H, Jiao H, Tsai T-L, Squire MW, Li W-J. Endothelin-1 differentially directs lineage specification of adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2019; 33: 996–1007.

- 14 Cherian DS, Bhuvan T, Meagher L, Heng TSP. Biological Considerations in Scaling Up Therapeutic Cell Manufacturing. *Frontiers in pharmacology* 2020; 11: 654.
- 15 Wagner M, Yoshihara M, Douagi I, Damdimopoulos A, Panula S, Petropoulos S, Lu H, Pettersson K, Palm K, Katayama S, Hovatta O, Kere J, Lanner F, Damdimopoulou P. Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells. *Nature communications* 2020; 11: 1147.
- 16 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 (Dayton, Ohio)* 2006; 24: 1294–1301.
- 17 Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology* 2003; 57: 11–20.
- 18 Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarte DA de, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell* 2002; 13: 4279–4295.
- 19 Lavrentieva A, Hoffmann A, Lee-Thedieck C. Limited Potential or Unfavorable Manipulations? Strategies Toward Efficient Mesenchymal Stem/Stromal Cell Applications. *Frontiers in cell and developmental biology* 2020; 8: 316.
- 20 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315–317.
- 21 Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual review of biomedical engineering* 2010; 12: 87–117.
- 22 Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review. Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2012; 30: 804–810.
- 23 Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature medicine* 2000; 6: 1282–1286.
- 24 Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research* 2008; 103: 1204–1219.
- 25 Gao F, Chiu SM, Motan DAL, Zhang Z, Chen L, Ji H-L, Tse H-F, Fu Q-L, Lian Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation. Current status and future prospects. *Cell death & disease* 2016; 7: e2062.
- 26 Caplan AI, Correa D. The MSC. An injury drugstore. *Cell stem cell* 2011; 9: 11–15.
- 27 Henschler R, Gabriel C, Schallmoser K, Burnouf T, Koh MBC. Human platelet lysate current standards and future developments. *Transfusion* 2019; 59: 1407–1413.
- 28 Tasnim N, La Vega L de, Anil Kumar S, Abelseth L, Alonzo M, Amereh M, Joddar B, Willerth SM. 3D Bioprinting Stem Cell Derived Tissues. *Cellular and molecular bioengineering* 2018; 11: 219–240.
- 29 Nolan K, Millet Y, Ricordi C, Stabler CL. Tissue engineering and biomaterials in regenerative medicine. *Cell transplantation* 2008; 17: 241–243.
- 30 Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)* 1993; 260: 920–926.
- 31 Mertz L. Dream it, design it, print it in 3-D: what can 3-D printing do for you? *IEEE pulse* 2013; 4: 15–21.

- 32 Ventola CL. Medical Applications for 3D Printing: Current and Projected Uses. *Pharmacy and Therapeutics* 2014; 39: 704–711.
- 33 Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews* 2001; 101: 1869–1879.
- 34 Kasper C, Charwat V, Lavrentieva A. *Cell Culture Technology*. Springer International Publishing, Cham 2018.
- 35 Chen GG, Lai PBS. Apoptosis in carcinogenesis and chemotherapy. *Apoptosis in cancer*. Springer, Dordrecht, London 2009.
- 36 Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L, Shi Y. Mesenchymal stem cells. A new trend for cell therapy. *Acta pharmacologica Sinica* 2013; 34: 747–754.
- 37 Wong DJ, Chang HY. *StemBook. Skin tissue engineering*, Cambridge (MA) 2008.
- 38 Ballini A, Cantore S, Scacco S, Coletti D, Tatullo M. Mesenchymal Stem Cells as Promoters, Enhancers, and Playmakers of the Translational Regenerative Medicine 2018. *Stem cells international* 2018; 2018: 6927401.
- 39 Kabat M, Bobkov I, Kumar S, Grumet M. Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004–2018. Is efficacy optimal in a narrow dose range? *Stem cells translational medicine* 2020; 9: 17–27.
- 40 Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 1991; 9: 641–650.
- 41 Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 1970; 3: 393–403.
- 42 Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology* 1966; 16: 381–390.
- 43 Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6: 230–247.
- 44 Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis and rheumatism* 2004; 50: 1522–1532.
- 45 Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio M, Luconi M. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2009; 23: 3494–3505.
- 46 Berger MJ, Adams SD, Tigges BM, Sprague SL, Wang X-J, Collins DP, McKenna DH. Differentiation of umbilical cord blood-derived multilineage progenitor cells into respiratory epithelial cells. *Cytherapy* 2006; 8: 480–487.
- 47 Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2004; 321: 102–108.
- 48 Huang AH-C, Chen Y-K, Chan AW-S, Shieh T-Y, Lin L-M. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. *Journal of endodontics* 2009; 35: 673–681.

- 49 Jazedje T, Secco M, Vieira NM, Zucconi E, Gollop TR, Vainzof M, Zatz M. Stem cells from umbilical cord blood do have myogenic potential, with and without differentiation induction in vitro. *Journal of translational medicine* 2009; 7: 6.
- 50 Moretti P, Hatlapatka T, Marten D, Lavrentieva A, Majore I, Hass R, Kasper C. Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues. Primitive cells with potential for clinical and tissue engineering applications. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2010; 123: 29–54.
- 51 Tang X-P, Zhang M, Yang X, Chen L-M, Zeng Y. Differentiation of human umbilical cord blood stem cells into hepatocytes in vivo and in vitro. *World journal of gastroenterology* 2006; 12: 4014–4019.
- 52 Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis research & therapy* 2003; 5: 32–45.
- 53 Witkowska-Zimny M, Wrobel E. Perinatal sources of mesenchymal stem cells. Wharton's jelly, amnion and chorion. *Cellular & molecular biology letters* 2011; 16: 493–514.
- 54 Weyand B, Benda C. Mesenchymal stem cells. Basics and clinical application. Springer, Berlin, New York 2013.
- 55 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: 3838–3843.
- 56 Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2008; 26: 212–222.
- 57 Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107: 367–372.
- 58 Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-X, Wu Y, Yu X-D, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105: 4120–4126.
- 59 Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* 2003; 31: 890–896.
- 60 Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet* 2004; 363: 1439–1441.
- 61 Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, Marschall H-U, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006; 81: 1390–1397.
- 62 Uccelli A, Zappia E, Benvenuto F, Frassoni F, Mancardi G. Stem cells in inflammatory demyelinating disorders: a dual role for immunosuppression and neuroprotection. *Expert opinion on biological therapy* 2006; 6: 17–22.
- 63 Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005; 106: 1755–1761.

- 64 Jones J, Jaramillo-Merchán J, Bueno C, Pastor D, Viso-León M, Martínez S. Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia. *Neurobiology of disease* 2010; 40: 415–423.
- 65 Lund RD, Wang S, Lu B, Girman S, Holmes T, Sauvé Y, Messina DJ, Harris IR, Kihm AJ, Harmon AM, Chin F-Y, Gosiewska A, Mistry SK. Cells Isolated from Umbilical Cord Tissue Rescue Photoreceptors and Visual Functions in a Rodent Model of Retinal Disease. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2007; 25: 1089.
- 66 Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N, Alison M, Remuzzi G. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 2004; 15: 1794–1804.
- 67 Tate CC, Fonck C, McGrogan M, Case CC. Human mesenchymal stromal cells and their derivative, SB623 cells, rescue neural cells via trophic support following in vitro ischemia. *Cell transplantation* 2010; 19: 973–984.
- 68 Wilkins A, Kemp K, Ginty M, Hares K, Mallam E, Scolding N. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem cell research* 2009; 3: 63–70.
- 69 Nordberg RC, Lobo EG. Our Fat Future: Translating Adipose Stem Cell Therapy. *Stem cells translational medicine* 2015; 4: 974–979.
- 70 Kolaparthi LK, Sanivarapu S, Moogla S, Kutcham RS. Adipose Tissue – Adequate, Accessible Regenerative Material. *International journal of stem cells* 2015; 8: 121–127.
- 71 Argentati C, Morena F, Bazzucchi M, Armentano I, Emiliani C, Martino S. Adipose Stem Cell Translational Applications. From Bench-to-Bedside. *International journal of molecular sciences* 2018; 19.
- 72 Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YDC, Hicok K, Du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 2004; 6: 7–14.
- 73 Stockmann P, Park J, Wilmowsky C von, Nkenke E, Felszeghy E, Dehner J-F, Schmitt C, Tudor C, Schlegel KA. Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells – a comparison of different tissue sources. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery: official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2012; 40: 310–320.
- 74 Tevlin R, Walmsley GG, Marecic O, Hu MS, Wan DC, Longaker MT. Stem and progenitor cells: advancing bone tissue engineering. *Drug delivery and translational research* 2016; 6: 159–173.
- 75 Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell biochemistry and function* 2008; 26: 664–675.
- 76 Guadix JA, López-Beas J, Clares B, Soriano-Ruiz JL, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Principal Criteria for Evaluating the Quality, Safety and Efficacy of hMSC-Based Products in Clinical Practice: Current Approaches and Challenges. *Pharmaceutics* 2019; 11.
- 77 Mastroliola I, Foppiani EM, Murgia A, Candini O, Samarelli AV, Grisendi G, Veronesi E, Horwitz EM, Dominici M. Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. *Stem cells translational medicine* 2019; 8: 1135–1148.
- 78 Yuan X, Logan TM, Ma T. Metabolism in Human Mesenchymal Stromal Cells: A Missing Link Between hMSC Biomanufacturing and Therapy? *Frontiers in immunology* 2019; 10: 977.

- 79 Bunnell BA, Flaas M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods (San Diego, Calif.)* 2008; 45: 115–120.
- 80 Bateman ME, Strong AL, Gimble JM, Bunnell BA. Concise Review: Using Fat to Fight Disease: A Systematic Review of Nonhomologous Adipose-Derived Stromal/Stem Cell Therapies. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2018; 36: 1311–1328.
- 81 Mount NM, Ward SJ, Kefalas P, Hyllner J. Cell-based therapy technology classifications and translational challenges. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 2015; 370: 20150017.
- 82 Zhong R, Platt JL. Current status of animal-to-human transplantation. *Expert opinion on biological therapy* 2005; 5: 1415–1420.
- 83 Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97: 3422–3427.
- 84 Schnitzler AC, Verma A, Kehoe DE, Jing D, Murrell JR, Der KA, Aysola M, Rapiejko PJ, Punreddy S, Rook MS. Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use. *Current technologies and challenges. Biochemical Engineering Journal* 2016; 108: 3–13.
- 85 Ratcliffe E, Glen KE, Naing MW, Williams DJ. Current status and perspectives on stem cell-based therapies undergoing clinical trials for regenerative medicine. *Case studies. British medical bulletin* 2013; 108: 73–94.
- 86 van den Bos C, Keefe R, Schirmaier C, McCaman M. Therapeutic human cells. *Manufacture for cell therapy/regenerative medicine. Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2014; 138: 61–97.
- 87 Djouad F, Ponce P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102: 3837–3844.
- 88 Freese KE, Kokai L, Edwards RP, Philips BJ, Sheikh MA, Kelley J, Comerci J, Marra KG, Rubin JP, Linkov F. Adipose-derived stem cells and their role in human cancer development, growth, progression, and metastasis: a systematic review. *Cancer research* 2015; 75: 1161–1168.
- 89 Fan X-L, Zhang Y, Li X, Fu Q-L. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 2020; 77: 2771–2794.
- 90 Averyanov A, Koroleva I, Konoplyannikov M, Revkova V, Lesnyak V, Kalsin V, Danilevskaya O, Nikitin A, Sotnikova A, Kotova S, Baklaushev V. First-in-human high-cumulative-dose stem cell therapy in idiopathic pulmonary fibrosis with rapid lung function decline. *Stem cells translational medicine* 2020; 9: 6–16.
- 91 Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective. *Cell biology to clinical progress. NPJ Regenerative medicine* 2019; 4: 22.
- 92 Golpanian S, Wolf A, Hatzistergos KE, Hare JM. Rebuilding the Damaged Heart. *Mesenchymal Stem Cells, Cell-Based Therapy, and Engineered Heart Tissue. Physiological reviews* 2016; 96: 1127–1168.
- 93 Bhasin A, Srivastava MVP, Mohanty S, Bhatia R, Kumaran SS, Bose S. Stem cell therapy. A clinical trial of stroke. *Clinical neurology and neurosurgery* 2013; 115: 1003–1008.
- 94 Glassberg MK, Minkiewicz J, Toonkel RL, Simonet ES, Rubio GA, DiFede D, Shafazand S, Khan A, Pujol MV, LaRussa VF, Lancaster LH, Rosen GD, Fishman J, Mageto YN, Mendizabal A, Hare JM. Allogeneic Human

- Mesenchymal Stem Cells in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis via Intravenous Delivery (AETHER). A Phase I Safety Clinical Trial. *Chest* 2017; 151: 971–981.
- 95 Aly RM. Current state of stem cell-based therapies. An overview. *Stem cell investigation* 2020; 7: 8.
- 96 Borakati A, Mafi R, Mafi P, Khan WS. A Systematic Review And Meta-Analysis of Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cartilage Repair. *Current stem cell research & therapy* 2018; 13: 215–225.
- 97 Lukomska B, Stanaszek L, Zuba-Surma E, Legosz P, Sarzynska S, Drela K. Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem cells international* 2019; 2019: 9628536.
- 98 Soundararajan M, Kannan S. Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin? *Journal of cellular physiology* 2018; 233: 9099–9109.
- 99 Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells. An Update. *Cell transplantation* 2016; 25: 829–848.
- 100 Khademhosseini A, Vacanti JP, Langer R. Progress in tissue engineering. *Scientific American* 2009; 300: 64–71.
- 101 Ovsianikov A, Khademhosseini A, Mironov V. The Synergy of Scaffold-Based and Scaffold-Free Tissue Engineering Strategies. *Trends in biotechnology* 2018; 36: 348–357.
- 102 Saltzman WM. *Tissue engineering. Engineering principles for the design of replacement organs and tissues.* Oxford University Press, New York, Toronto 2006], ©2004.
- 103 Caddeo S, Boffito M, Sartori S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2017; 5: 40.
- 104 Bartold PM, Xiao Y, Lyngstaadas SP, Paine ML, Snead ML. Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontology* 2000 2006; 41: 123–135.
- 105 Zhao C, Tan A, Pastorin G, Ho HK. Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Biotechnology advances* 2013; 31: 654–668.
- 106 Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society, Interface* 2006; 3: 589–601.
- 107 Cowan CM, Shi Y-Y, Aalami OO, Chou Y-F, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature biotechnology* 2004; 22: 560–567.
- 108 McIntosh KR, Frazier T, Rowan BG, Gimble JM. Evolution and future prospects of adipose-derived immunomodulatory cell therapeutics. *Expert review of clinical immunology* 2013; 9: 175–184.
- 109 Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *The New England journal of medicine* 2001; 344: 385–386.
- 110 Shih H-N, Shih L-Y, Sung T-H, Chang Y-C. Restoration of bone defect and enhancement of bone ingrowth using partially demineralized bone matrix and marrow stromal cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 2005; 23: 1293–1299.
- 111 Vaccaro AR, Stubbs HA, Block JE. Demineralized bone matrix composite grafting for posterolateral spinal fusion. *Orthopedics* 2007; 30: 567–570.

- 112 Watt FM, Hogan BL. Out of Eden. Stem cells and their niches. *Science (New York, N.Y.)* 2000; 287: 1427–1430.
- 113 Shang F, Yu Y, Liu S, Ming L, Zhang Y, Zhou Z, Zhao J, Jin Y. Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration. *Bioactive materials* 2021; 6: 666–683.
- 114 Liao H-T, Chen C-T. Osteogenic potential. Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World journal of stem cells* 2014; 6: 288–295.
- 115 D'Angelo F, Armentano I, Cacciotti I, Tiribuzi R, Quattrocchi M, Del Gaudio C, Fortunati E, Saino E, Caraffa A, Cerulli GG, Visai L, Kenny JM, Sampaolesi M, Bianco A, Martino S, Orlicchio A. Tuning multi/pluri-potent stem cell fate by electrospun poly(L-lactic acid)-calcium-deficient hydroxyapatite nanocomposite mats. *Biomacromolecules* 2012; 13: 1350–1360.
- 116 Murphy WL, McDevitt TC, Engler AJ. Materials as stem cell regulators. *Nature materials* 2014; 13: 547–557.
- 117 Martino S, D'Angelo F, Armentano I, Kenny JM, Orlicchio A. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnology advances* 2012; 30: 338–351.
- 118 Bittner K, Vischer P, Bartholmes P, Bruckner P. Role of the subchondral vascular system in endochondral ossification. Endothelial cells specifically derepress late differentiation in resting chondrocytes in vitro. *Experimental cell research* 1998; 238: 491–497.
- 119 Yang J, Yamato M, Kohno C, Nishimoto A, Sekine H, Fukai F, Okano T. Cell sheet engineering. Recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials* 2005; 26: 6415–6422.
- 120 Tatullo M, Marrelli M, Falisi G, Rastelli C, Palmieri F, Gargari M, Zavan B, Paduano F, Benaglio V. Mechanical influence of tissue culture plates and extracellular matrix on mesenchymal stem cell behavior. A topical review. *International journal of immunopathology and pharmacology* 2016; 29: 3–8.
- 121 Yin JQ, Zhu J, Ankrum JA. Manufacturing of primed mesenchymal stromal cells for therapy. *Nature biomedical engineering* 2019; 3: 90–104.
- 122 Banks JM, Mozdzen LC, Harley BAC, Bailey RC. The combined effects of matrix stiffness and growth factor immobilization on the bioactivity and differentiation capabilities of adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 2014; 35: 8951–8959.
- 123 Wen JH, Vincent LG, Fuhrmann A, Choi YS, Hribar KC, Taylor-Weiner H, Chen S, Engler AJ. Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation. *Nature materials* 2014; 13: 979–987.
- 124 Burdick JA, Vunjak-Novakovic G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue engineering. Part A* 2009; 15: 205–219.
- 125 Neuss S, Apel C, Buttler P, Denecke B, Dhanasingh A, Ding X, Grafahrend D, Groger A, Hemmrich K, Herr A, Jahnen-Dechent W, Mastitskaya S, Perez-Bouza A, Rosewick S, Salber J, Wöltje M, Zenke M. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 302–313.
- 126 Renth AN, Detamore MS. Leveraging "raw materials" as building blocks and bioactive signals in regenerative medicine. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 2012; 18: 341–362.
- 127 Brown PT, Handorf AM, Jeon WB, Li W-J. Stem cell-based tissue engineering approaches for musculoskeletal regeneration. *Current pharmaceutical design* 2013; 19: 3429–3445.
- 128 Vacanti CA. The history of tissue engineering. *Journal of cellular and molecular medicine* 2006; 10: 569–576.

- 129 Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *The bone & joint journal* 2016; 98-B: 6–9.
- 130 laquinta MR, Mazzoni E, Bononi I, Rotondo JC, Mazziotta C, Montesi M, Sprio S, Tampieri A, Tognon M, Martini F. Adult Stem Cells for Bone Regeneration and Repair. *Frontiers in cell and developmental biology* 2019; 7: 268.
- 131 laquinta MR, Mazzoni E, Manfrini M, D'Agostino A, Trevisiol L, Nocini R, Trombelli L, Barbanti-Brodano G, Martini F, Tognon M. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *International journal of molecular sciences* 2019; 20.
- 132 Altman AM, Abdul Khalek FJ, Seidensticker M, Pinilla S, Yan Y, Coleman M, Song Y-H, Butler CE, Alt EU. Human tissue-resident stem cells combined with hyaluronic acid gel provide fibrovascular-integrated soft-tissue augmentation in a murine photoaged skin model. *Plastic and reconstructive surgery* 2010; 125: 63–73.
- 133 Argentati C, Morena F, Montanucci P, Rallini M, Basta G, Calabrese N, Calafiore R, Cordellini M, Emiliani C, Armentano I, Martino S. Surface Hydrophilicity of Poly(L-Lactide) Acid Polymer Film Changes the Human Adult Adipose Stem Cell Architecture. *Polymers* 2018; 10.
- 134 Armentano I, Ciapetti G, Pennacchi M, Dottori M, Devescovi V, Granchi D, Baldini N, Olalde B, Jurado MJ, Alava JIM, Kenny JM. Role of PLLA plasma surface modification in the interaction with human marrow stromal cells. *J. Appl. Polym. Sci.* 2009; 114: 3602–3611.
- 135 Ciapetti G, Granchi D, Devescovi V, Baglio SR, Leonardi E, Martini D, Jurado MJ, Olalde B, Armentano I, Kenny JM, Walboomers FX, Alava JI, Baldini N. Enhancing osteoconduction of PLLA-based nanocomposite scaffolds for bone regeneration using different biomimetic signals to MSCs. *International journal of molecular sciences* 2012; 13: 2439–2458.
- 136 Du Y, Ge J, Li Y, Ma PX, Lei B. Biomimetic elastomeric, conductive and biodegradable polycitrate-based nanocomposites for guiding myogenic differentiation and skeletal muscle regeneration. *Biomaterials* 2018; 157: 40–50.
- 137 Ho CMB, Mishra A, Lin PTP, Ng SH, Yeong WY, Kim Y-J, Yoon Y-J. 3D Printed Polycaprolactone Carbon Nanotube Composite Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering. *Macromolecular bioscience* 2017; 17.
- 138 Jaikumar D, Sajesh KM, Soumya S, Nimal TR, Chennazhi KP, Nair SV, Jayakumar R. Injectable alginate-O-carboxymethyl chitosan/nano fibrin composite hydrogels for adipose tissue engineering. *International journal of biological macromolecules* 2015; 74: 318–326.
- 139 Jung YK, Kim TY, Park SJ, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers. *Biotechnology and bioengineering* 2010; 105: 161–171.
- 140 Lizundia E, Sarasua JR, D'Angelo F, Orlacchio A, Martino S, Kenny JM, Armentano I. Biocompatible poly(L-lactide)/MWCNT nanocomposites. Morphological characterization, electrical properties, and stem cell interaction. *Macromolecular bioscience* 2012; 12: 870–881.
- 141 Poon CJ, Pereira E Cotta MV, Sinha S, Palmer JA, Woods AA, Morrison WA, Abberton KM. Preparation of an adipogenic hydrogel from subcutaneous adipose tissue. *Acta biomaterialia* 2013; 9: 5609–5620.
- 142 Rubin JP, Bennett JM, Doctor JS, Tebbets BM, Marra KG. Collagenous microbeads as a scaffold for tissue engineering with adipose-derived stem cells. *Plastic and reconstructive surgery* 2007; 120: 414–424.

- 143 Santoro M, Shah SR, Walker JL, Mikos AG. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews* 2016; 107: 206–212.
- 144 Silva JM, Rodrigues LC, Silva SS, Reis RL, Duarte ARC. Engineered tubular structures based on chitosan for tissue engineering applications. *Journal of biomaterials applications* 2018; 32: 841–852.
- 145 Song K, Li L, Yan X, Zhang W, Zhang Y, Wang Y, Liu T. Characterization of human adipose tissue-derived stem cells in vitro culture and in vivo differentiation in a temperature-sensitive chitosan/ β -glycerophosphate/collagen hybrid hydrogel. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 2017; 70: 231–240.
- 146 Tapp H, Hanley EN, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells. Characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 2009; 234: 1–9.
- 147 Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Reprint of. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta biomaterialia* 2015; 23 Suppl: S17–26.
- 148 Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science* 2010; 123: 4195–4200.
- 149 Gross BC, Erkal JL, Lockwood SY, Chen C, Spence DM. Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. *Analytical chemistry* 2014; 86: 3240–3253.
- 150 Perez JR, Kouroupis D, Li DJ, Best TM, Kaplan L, Correa D. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2018; 6: 105.
- 151 Liu G, Li Y, Sun J, Zhou H, Zhang W, Cui L, Cao Y. In vitro and in vivo evaluation of osteogenesis of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on partially demineralized bone matrix. *Tissue engineering. Part A* 2010; 16: 971–982.
- 152 Zhang E, Yin D, Xu L, Yang L, Yang K. Microstructure, mechanical and corrosion properties and biocompatibility of Mg–Zn–Mn alloys for biomedical application. *Materials Science and Engineering: C* 2009; 29: 987–993.
- 153 Abe A, Albertsson A-C, Cantow H-J, Dušek K, Edwards S, Höcker H, Joanny J-F, Kausch H-H, Lee K-S, McGrath JE, Monnerie L, Stupp SI, Suter UW, Wegner G, Young RJ. *Degradable Aliphatic Polyesters*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2002.
- 154 Zhang K, Wang S, Zhou C, Cheng L, Gao X, Xie X, Sun J, Wang H, Weir MD, Reynolds MA, Zhang N, Bai Y, Xu HHK. Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration. *Bone research* 2018; 6: 31.
- 155 Anderson DG, Levenberg S, Langer R. Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 2004; 22: 863–866.
- 156 Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Nishikawa K, Tanimura Y, Makinoshima H, Goda M, Akashi H, Inutsuka A, Niwa A, Shigemoto T, Nabeshima Y, Nakahata T, Nabeshima Y-I, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 8639–8643.
- 157 Motaln H, Schichor C, Lah TT. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer* 2010; 116: 2519–2530.

- 158 Ntege EH, Sunami H, Shimizu Y. Advances in regenerative therapy. A review of the literature and future directions. *Regenerative therapy* 2020; 14: 136–153.
- 159 Al-Himdani S, Jessop ZM, Al-Sabah A, Combellack E, Ibrahim A, Doak SH, Hart AM, Archer CW, Thornton CA, Whitaker IS. Tissue-Engineered Solutions in Plastic and Reconstructive Surgery: Principles and Practice. *Frontiers in surgery* 2017; 4: 4.
- 160 Hasegawa M, Yamato M, Kikuchi A, Okano T, Ishikawa I. Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. *Tissue engineering* 2005; 11: 469–478.
- 161 Liu Y, Ming L, Luo H, Liu W, Zhang Y, Liu H, Jin Y. Integration of a calcined bovine bone and BMSC-sheet 3D scaffold and the promotion of bone regeneration in large defects. *Biomaterials* 2013; 34: 9998–10006.
- 162 Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *The New England journal of medicine* 2004; 351: 1187–1196.
- 163 Shang F, Ming L, Zhou Z, Yu Y, Sun J, Ding Y, Jin Y. The effect of licochalcone A on cell-aggregates ECM secretion and osteogenic differentiation during bone formation in metaphyseal defects in ovariectomized rats. *Biomaterials* 2014; 35: 2789–2797.
- 164 Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* 2003; 24: 2309–2316.
- 165 Shiroyanagi Y, Yamato M, Yamazaki Y, Toma H, Okano T. Transplantable urothelial cell sheets harvested noninvasively from temperature-responsive culture surfaces by reducing temperature. *Tissue engineering* 2003; 9: 1005–1012.
- 166 Baiguera S, Birchall MA, Macchiarini P. Tissue-engineered tracheal transplantation. *Transplantation* 2010; 89: 485–491.
- 167 Fulco I, Miot S, Haug MD, Barbero A, Wixmerten A, Feliciano S, Wolf F, Jundt G, Marsano A, Farhadi J, Heberer M, Jakob M, Schaefer DJ, Martin I. Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumour resection: an observational first-in-human trial. *The Lancet* 2014; 384: 337–346.
- 168 Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *The Lancet* 2008; 372: 2023–2030.
- 169 Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *The Lancet* 2011; 377: 1175–1182.
- 170 Tsang VL, Bhatia SN. Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced drug delivery reviews* 2004; 56: 1635–1647.
- 171 Findlay MW, Dolderer JH, Trost N, Craft RO, Cao Y, Cooper-White J, Stevens G, Morrison WA. Tissue-engineered breast reconstruction: bridging the gap toward large-volume tissue engineering in humans. *Plastic and reconstructive surgery* 2011; 128: 1206–1215.
- 172 Khademhosseini A, Langer R. Microengineered hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28: 5087–5092.
- 173 Yuan Y, Ogawa R. Tissue-engineered breast reconstruction: bridging the gap toward large-volume tissue engineering in humans. *Plastic and reconstructive surgery* 2015; 135: 236e–7e.

- 174 Tobita M, Tajima S, Mizuno H. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: stem cell transplantation methods that enhance stemness. *Stem cell research & therapy* 2015; 6: 215.
- 175 Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem cell research & therapy* 2016; 7: 125.
- 176 Mazini L, Rochette L, Amine M, Malka G. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *International journal of molecular sciences* 2019; 20.
- 177 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315–317.
- 178 Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2011.
- 179 Li T, Li C, Zhang C-Y, Zhao J. Effect of accutase or trypsin dissociation on the apoptosis of human striatum-derived neural stem cells. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae* 2015; 37: 185–194.
- 180 Legzdina D, Romanauska A, Nikulshin S, Kozlovska T, Berzins U. Characterization of Senescence of Culture-expanded Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells. *International journal of stem cells* 2016; 9: 124–136.
- 181 Merceron C, Portron S, Masson M, Lesoeur J, Fella BH, Gauthier O, Geffroy O, Weiss P, Guicheux J, Vinatier C. The effect of two- and three-dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel. *Cell transplantation* 2011; 20: 1575–1588.
- 182 Liu Z, Tang M, Zhao J, Chai R, Kang J. Looking into the Future: Toward Advanced 3D Biomaterials for Stem-Cell-Based Regenerative Medicine. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 2018; 30: e1705388.
- 183 Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 2003; 424: 870–872.
- 184 Bissell MJ, Rizki A, Mian IS. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Current Opinion in Cell Biology* 2003; 15: 753–762.
- 185 Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science (New York, N.Y.)* 2001; 294: 1708–1712.
- 186 Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current Opinion in Cell Biology* 2002; 14: 633–640.
- 187 Lee J, Lilly GD, Doty RC, Podsiadlo P, Kotov NA. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 2009; 5: 1213–1221.
- 188 Li Z, Cui Z. Three-dimensional perfused cell culture. *Biotechnology advances* 2014; 32: 243–254.
- 189 Mark K von der, Gauss V, Mark H von der, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977; 267: 531–532.
- 190 Schmeichel KL, Bissell MJ. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *Journal of cell science* 2003; 116: 2377–2388.
- 191 Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of cell science* 2012; 125: 3015–3024.

- 192 Egger D, Schwedhelm I, Hansmann J, Kasper C. Hypoxic Three-Dimensional Scaffold-Free Aggregate Cultivation of Mesenchymal Stem Cells in a Stirred Tank Reactor. *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 2017; 4.
- 193 Sart S, Tsai A-C, Li Y, Ma T. Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 2014; 20: 365–380.
- 194 Zheng F, Fu F, Cheng Y, Wang C, Zhao Y, Gu Z. Organ-on-a-Chip Systems: Microengineering to Biomimic Living Systems. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 2016; 12: 2253–2282.
- 195 Pepelanova I, Kruppa K, Scheper T, Lavrentieva A. Gelatin–Methacryloyl (GelMA) Hydrogels with Defined Degree of Functionalization as a Versatile Toolkit for 3D Cell Culture and Extrusion Bioprinting. *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 2018; 5.
- 196 Booi TH, Price LS, Danen EHJ. 3D Cell-Based Assays for Drug Screens: Challenges in Imaging, Image Analysis, and High-Content Analysis. *SLAS discovery: advancing life sciences R & D* 2019; 24: 615–627.
- 197 Di Modugno F, Colosi C, Trono P, Antonacci G, Ruocco G, Nisticò P. 3D models in the new era of immune oncology: focus on T cells, CAF and ECM. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* 2019; 38: 117.
- 198 Sambale F, Lavrentieva A, Stahl F, Blume C, Stiesch M, Kasper C, Bahnemann D, Scheper T. Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. *Journal of Biotechnology* 2015; 205: 120–129.
- 199 Kasper C, Al-Rubeai M. *Bioreactor Systems for Tissue Engineering*. Springer, Berlin, Heidelberg 2009.
- 200 Ferlin KM, Prendergast ME, Miller ML, Kaplan DS, Fisher JP. Influence of 3D printed porous architecture on mesenchymal stem cell enrichment and differentiation. *Acta biomaterialia* 2016; 32: 161–169.
- 201 Singh A, Peppas NA. Hydrogels and scaffolds for immunomodulation. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 2014; 26: 6530–6541.
- 202 Egger D, Oliveira AC, Mallinger B, Hemeda H, Charwat V, Kasper C. From 2D to 3D: isolation of mesenchymal stem/stromal cells into a three-dimensional human platelet lysate matrix. *Stem cell research & therapy* 2019; 10: 248.
- 203 Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 3D cell culture systems: advantages and applications. *Journal of cellular physiology* 2015; 230: 16–26.
- 204 Ruedinger F, Lavrentieva A, Blume C, Pepelanova I, Scheper T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Applied microbiology and biotechnology* 2015; 99: 623–636.
- 205 Engler AJ, Griffin MA, Sen S, Bönnemann CG, Sweeney HL, Discher DE. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *The Journal of cell biology* 2004; 166: 877–887.
- 206 Chowdhury F, Na S, Li D, Poh Y-C, Tanaka TS, Wang F, Wang N. Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nature materials* 2010; 9: 82–88.
- 207 Park JS, Chu JS, Tsou AD, Diop R, Tang Z, Wang A, Li S. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β . *Biomaterials* 2011; 32: 3921–3930.
- 208 Solon J, Levental I, Sengupta K, Georges PC, Janmey PA. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophysical journal* 2007; 93: 4453–4461.

- 209 Sun M, Chi G, Li P, Lv S, Xu J, Xu Z, Xia Y, Tan Y, Xu J, Li L, Li Y. Effects of Matrix Stiffness on the Morphology, Adhesion, Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *International journal of medical sciences* 2018; 15: 257–268.
- 210 Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J, Pajeroski JD, Spinler KR, Shin J-W, Tewari M, Rehfeldt F, Speicher DW, Discher DE. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science (New York, N.Y.)* 2013; 341: 1240104.
- 211 Trappmann B, Gautrot JE, Connelly JT, Strange DGT, Li Y, Oyen ML, Cohen Stuart MA, Boehm H, Li B, Vogel V, Spatz JP, Watt FM, Huck WTS. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nature materials* 2012; 11: 642–649.
- 212 Alakpa EV, Jayawarna V, Lampel A, Burgess KV, West CC, Bakker SC, Roy S, Javid N, Fleming S, Lamprou DA, Yang J, Miller A, Urquhart AJ, Frederix PW, Hunt NT, Péault B, Ulijn RV, Dalby MJ. Tunable Supramolecular Hydrogels for Selection of Lineage-Guiding Metabolites in Stem Cell Cultures. *Chem* 2016; 1: 512.
- 213 Fu J, Wang Y-K, Yang MT, Desai RA, Yu X, Liu Z, Chen CS. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nature methods* 2010; 7: 733–736.
- 214 Yang C, Tibbitt MW, Basta L, Anseth KS. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nature materials* 2014; 13: 645–652.
- 215 Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126: 677–689.
- 216 Murphy KC, Fang SY, Leach JK. Human mesenchymal stem cell spheroids in fibrin hydrogels exhibit improved cell survival and potential for bone healing. *Cell and tissue research* 2014; 357: 91–99.
- 217 Ifkovits JL, Burdick JA. Review: photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue engineering* 2007; 13: 2369–2385.
- 218 Kopecek J. Hydrogel biomaterials: a smart future? *Biomaterials* 2007; 28: 5185–5192.
- 219 Mantha S, Pillai S, Khayambashi P, Upadhyay A, Zhang Y, Tao O, Pham HM, Tran SD. Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials (Basel, Switzerland)* 2019; 12.
- 220 Li Y, Rodrigues J, Tomás H. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. *Chemical Society reviews* 2012; 41: 2193–2221.
- 221 Yang J, Zhang YS, Yue K, Khademhosseini A. Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering. *Acta biomaterialia* 2017; 57: 1–25.
- 222 Xiao W, He J, Nichol JW, Wang L, Hutson CB, Wang B, Du Y, Fan H, Khademhosseini A. Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels. *Acta biomaterialia* 2011; 7: 2384–2393.
- 223 Lev R, Seliktar D. Hydrogel biomaterials and their therapeutic potential for muscle injuries and muscular dystrophies. *Journal of the Royal Society, Interface* 2018; 15.
- 224 Re F, Sartore L, Moulisova V, Cantini M, Almici C, Bianchetti A, Chinello C, Dey K, Agnelli S, Manferdini C, Bernardi S, Lopomo NF, Sardini E, Borsani E, Rodella LF, Savoldi F, Paganelli C, Guizzi P, Lisignoli G, Magni F, Salmeron-Sanchez M, Russo D. 3D gelatin-chitosan hybrid hydrogels combined with human platelet lysate highly support human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Journal of tissue engineering* 2019; 10: 2041731419845852.

- 225 Schuurman W, Levett PA, Pot MW, van Weeren PR, Dhert WJA, Hutmacher DW, Melchels FPW, Klein TJ, Malda J. Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromolecular bioscience* 2013; 13: 551–561.
- 226 Loessner D, Meinert C, Kaemmerer E, Martine LC, Yue K, Levett PA, Klein TJ, Melchels FPW, Khademhosseini A, Hutmacher DW. Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nature protocols* 2016; 11: 727–746.
- 227 van den Bulcke AI, Bogdanov B, Rooze N de, Schacht EH, Cornelissen M, Berghmans H. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* 2000; 1: 31–38.
- 228 Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* 2010; 31: 5536–5544.
- 229 Catoira MC, Fusaro L, Di Francesco D, Ramella M, Boccafocchi F. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of materials science. Materials in medicine* 2019; 30: 115.
- 230 Bressan E, Favero V, Gardin C, Ferroni L, Iacobellis L, Favero L, Vindigni V, Berengo M, Sivoletta S, Zavan B. Biopolymers for Hard and Soft Engineered Tissues: Application in Odontoiatric and Plastic Surgery Field. *Polymers* 2011; 3: 509–526.
- 231 James R, Mengsteab P, Laurencin CT. Regenerative Engineering: Studies of the Rotator Cuff and other Musculoskeletal Soft Tissues. *MRS Adv.* 2016; 1: 1255–1263.
- 232 Jose G, Shalumon KT, Chen J-P. Natural Polymers Based Hydrogels for Cell Culture Applications. *Current medicinal chemistry* 2020; 27: 2734–2776.
- 233 Singh MR, Patel S, Singh D. Nanobiomaterials in soft tissue engineering. *WA William Andrew an imprint of Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg* 2016; / edited by Alexandru Mihai Grumezescu; Volume 5.
- 234 Tonsho M, Michel S, Ahmed Z, Alessandrini A, Madsen JC. Heart transplantation: challenges facing the field. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2014; 4.
- 235 Orgill D. Biomaterials for treating skin loss. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge 2009.
- 236 Fazel-Rezai R. Biomedical engineering. Frontiers and challenges. InTech, Rijeka, Croatia 2011.
- 237 Jabbari E, Leijten J, Xu Q, Khademhosseini A. The matrix reloaded: the evolution of regenerative hydrogels. *Materials Today* 2016; 19: 190–196.
- 238 Suri S, Schmidt CE. Photopatterned collagen-hyaluronic acid interpenetrating polymer network hydrogels. *Acta biomaterialia* 2009; 5: 2385–2397.
- 239 Del Bakhshayesh AR, Asadi N, Alihemmati A, Tayefi Nasrabadi H, Montaseri A, Davaran S, Saghati S, Akbarzadeh A, Abedelahi A. An overview of advanced biocompatible and biomimetic materials for creation of replacement structures in the musculoskeletal systems. Focusing on cartilage tissue engineering. *Journal of biological engineering* 2019; 13: 85.
- 240 Chen MB, Srigunapalan S, Wheeler AR, Simmons CA. A 3D microfluidic platform incorporating methacrylated gelatin hydrogels to study physiological cardiovascular cell-cell interactions. *Lab on a chip* 2013; 13: 2591–2598.
- 241 Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Rowley JA, Mooney DJ. Engineering growing tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 12025–12030.

- 242 Feng Y, Mrksich M. The synergy peptide PHSRN and the adhesion peptide RGD mediate cell adhesion through a common mechanism. *Biochemistry* 2004; 43: 15811–15821.
- 243 Yang F, Williams CG, Wang D-A, Lee H, Manson PN, Elisseff J. The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005; 26: 5991–5998.
- 244 Asadi N, Alizadeh E, Del Rahmani Bakhshayesh A, Mostafavi E, Akbarzadeh A, Davaran S. Fabrication and in Vitro Evaluation of Nanocomposite Hydrogel Scaffolds Based on Gelatin/PCL-PEG-PCL for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Omega* 2019; 4: 449–457.
- 245 Yang Y, Tang H, Köwitsch A, Mäder K, Hause G, Ulrich J, Groth T. Novel mineralized heparin-gelatin nanoparticles for potential application in tissue engineering of bone. *Journal of materials science. Materials in medicine* 2014; 25: 669–680.
- 246 Hu X, Li D, Gao C. Chemically cross-linked chitosan hydrogel loaded with gelatin for chondrocyte encapsulation. *Biotechnology journal* 2011; 6: 1388–1396.
- 247 Kaemmerer E, Melchels FPW, Holzapfel BM, Meckel T, Hutmacher DW, Loessner D. Gelatine methacrylamide-based hydrogels: an alternative three-dimensional cancer cell culture system. *Acta biomaterialia* 2014; 10: 2551–2562.
- 248 Wang H, Zhou L, Liao J, Tan Y, Ouyang K, Ning C, Ni G, Tan G. Cell-laden photocrosslinked GelMA-DexMA copolymer hydrogels with tunable mechanical properties for tissue engineering. *Journal of materials science. Materials in medicine* 2014; 25: 2173–2183.
- 249 Suo H, Xu K, Zheng X. Using glucosamine to improve the properties of photocrosslinked gelatin scaffolds. *Journal of biomaterials applications* 2015; 29: 977–987.
- 250 Li X, Zhang J, Kawazoe N, Chen G. Fabrication of Highly Crosslinked Gelatin Hydrogel and Its Influence on Chondrocyte Proliferation and Phenotype. *Polymers* 2017; 9.
- 251 Jin Y, Liu C, Chai W, Compaan A, Huang Y. Self-Supporting Nanoclay as Internal Scaffold Material for Direct Printing of Soft Hydrogel Composite Structures in Air. *ACS applied materials & interfaces* 2017; 9: 17456–17465.
- 252 Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim D-H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology advances* 2016; 34: 422–434.
- 253 Thormann U, Ray S, Sommer U, Elkhassawna T, Rehling T, Hundgeburth M, Henß A, Rohnke M, Janek J, Lips KS, Heiss C, Schlewitz G, Szalay G, Schumacher M, Gelinsky M, Schnettler R, Alt V. Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Biomaterials* 2013; 34: 8589–8598.
- 254 Han HH, Shim J-H, Lee H, Kim BY, Lee J-S, Jung JW, Yun W-S, Baek CH, Rhie J-W, Cho D-W. Reconstruction of Complex Maxillary Defects Using Patient-specific 3D-printed Biodegradable Scaffolds. *Plastic and reconstructive surgery*. *Global open* 2018; 6: e1975.
- 255 Lopez CD, Witek L, Torroni A, Flores RL, Demissie DB, Young S, Cronstein BN, Coelho PG. The role of 3D printing in treating craniomaxillofacial congenital anomalies. *Birth defects research* 2018; 110: 1055–1064.

- 256 Mazzone S, Marchetti C, Sgarzani R, Cipriani R, Scotti R, Ciocca L. Prosthetically guided maxillofacial surgery: evaluation of the accuracy of a surgical guide and custom-made bone plate in oncology patients after mandibular reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery* 2013; 131: 1376–1385.
- 257 Mehra P, Miner J, D'Innocenzo R, Nadershah M. Use of 3-d stereolithographic models in oral and maxillofacial surgery. *Journal of maxillofacial and oral surgery* 2011; 10: 6–13.
- 258 Mendez BM, Chiodo MV, Patel PA. Customized "In-Office" Three-Dimensional Printing for Virtual Surgical Planning in Craniofacial Surgery. *The Journal of craniofacial surgery* 2015; 26: 1584–1586.
- 259 Windhagen H, Radtke K, Weizbauer A, Diekmann J, Noll Y, Kreimeyer U, Schavan R, Stukenborg-Colsman C, Waizy H. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *Biomedical engineering online* 2013; 12: 62.
- 260 Zhang L, Rodriguez J, Raez J, Myles AJ, Fenniri H, Webster TJ. Biologically inspired rosette nanotubes and nanocrystalline hydroxyapatite hydrogel nanocomposites as improved bone substitutes. *Nanotechnology* 2009; 20: 175101.
- 261 George A, Ravindran S. PROTEIN TEMPLATES IN HARD TISSUE ENGINEERING. *Nano today* 2010; 5: 254–266.
- 262 Jensen SS, Broggin N, Weibrich G, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone regeneration in standardized bone defects with autografts or bone substitutes in combination with platelet concentrate: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 2005; 20: 703–712.
- 263 Burdick JA, Philpott LM, Anseth KS. Synthesis and characterization of tetrafunctional lactic acid oligomers: A potential in situ forming degradable orthopaedic biomaterial. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 2001; 39: 683–692.
- 264 Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 1999; 14: 835–840.
- 265 Shi J, Sun J, Zhang W, Liang H, Shi Q, Li X, Chen Y, Zhuang Y, Dai J. Demineralized Bone Matrix Scaffolds Modified by CBD-SDF-1 α Promote Bone Regeneration via Recruiting Endogenous Stem Cells. *ACS applied materials & interfaces* 2016; 8: 27511–27522.
- 266 Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996; 32: 481–492.
- 267 Vehof JW, Spauwen PH, Jansen JA. Bone formation in calcium-phosphate-coated titanium mesh. *Biomaterials* 2000; 21: 2003–2009.
- 268 Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J American Ceramic Society* 1991; 74: 1487–1510.
- 269 Hench LL. Opening paper 2015- Some comments on Bioglass: Four Eras of Discovery and Development. *Biomedical glasses* 2015; 1.
- 270 D'Antò V, Raucci MG, Guarino V, Martina S, Valletta R, Ambrosio L. Behaviour of human mesenchymal stem cells on chemically synthesized HA-PCL scaffolds for hard tissue regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2016; 10: E147-54.

- 271 Kny E, Ghosal K, Thomas S. *Electrospinning. From Basic Research to Commercialization*. 1st ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2018.
- 272 Sharma C, Dinda AK, Potdar PD, Chou C-F, Mishra NC. Fabrication and characterization of novel nano-biocomposite scaffold of chitosan-gelatin-alginate-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 2016; 64: 416–427.
- 273 Mondal S, Pal U, Dey A. Natural origin hydroxyapatite scaffold as potential bone tissue engineering substitute. *Ceramics International* 2016; 42: 18338–18346.
- 274 He X, Jabbari E. Material properties and cytocompatibility of injectable MMP degradable poly(lactide ethylene oxide fumarate) hydrogel as a carrier for marrow stromal cells. *Biomacromolecules* 2007; 8: 780–792.
- 275 Pina S, Ferreira J. Bioresorbable Plates and Screws for Clinical Applications: A Review. *Journal of Healthcare Engineering* 2012; 3: 243–260.
- 276 Babensee JE, Anderson JM, McIntire LV, Mikos AG. Host response to tissue engineered devices. *Advanced drug delivery reviews* 1998; 33: 111–139.
- 277 Gutwald R, Pistner H, Reuther J, Mhling J. Biodegradation and tissue-reaction in a long-term implantation study of poly(L-lactide). *J Mater Sci: Mater Med* 1994; 5: 485–490.
- 278 Barrows T. Degradable implant materials: A review of synthetic absorbable polymers and their applications. *Clinical Materials* 1986; 1: 233–257.
- 279 Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International journal of molecular sciences* 2014; 15: 3640–3659.
- 280 Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 36: 17–28.
- 281 Ma PX, Choi JW. Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue engineering* 2001; 7: 23–33.
- 282 Pan Z, Ding J. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface focus* 2012; 2: 366–377.
- 283 Seunarine K, Gadegaard N, Tormen M, Meredith DO, Riehle MO, Wilkinson CDW. 3D polymer scaffolds for tissue engineering. *Nanomedicine (London, England)* 2006; 1: 281–296.
- 284 Shen H, Hu X, Bei J, Wang S. The immobilization of basic fibroblast growth factor on plasma-treated poly(lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 2008; 29: 2388–2399.
- 285 Yu L, Ding J. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society reviews* 2008; 37: 1473–1481.
- 286 Guo T, Holzberg TR, Lim CG, Gao F, Gargava A, Trachtenberg JE, Mikos AG, Fisher JP. 3D printing PLGA: a quantitative examination of the effects of polymer composition and printing parameters on print resolution. *Biofabrication* 2017; 9: 24101.
- 287 Cohen NP, Foster RJ, Mow VC. Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy* 1998; 28: 203–215.
- 288 Chae MP, Rozen WM, McMenamin PG, Findlay MW, Spychal RT, Hunter-Smith DJ. Emerging Applications of Bedside 3D Printing in Plastic Surgery. *Frontiers in surgery* 2015; 2: 25.

- 289 Dawood A, Marti Marti B, Sauret-Jackson V, Darwood A. 3D printing in dentistry. *British dental journal* 2015; 219: 521–529.
- 290 Cunningham LL, Madsen MJ, Peterson G. Stereolithographic modeling technology applied to tumor resection. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2005; 63: 873–878.
- 291 Dobrzański LA. *Biomaterials in Regenerative Medicine*. IntechOpen, 2018.
- 292 Keyhan SO, Fallahi H, Jahangirnia A, Amirzade-Iranaq MT, Amirzade-Iranaq MH. Application of 3-D Printing for Tissue Regeneration in Oral and Maxillofacial Surgery: What is Upcoming? In: Dobrzański LA (Hrsg.). *Biomaterials in regenerative medicine*. InTech, Rijeka, 2018.
- 293 Hoy MB. 3D printing: making things at the library. *Medical reference services quarterly* 2013; 32: 94–99.
- 294 Hsu S, Yen H-J, Tseng C-S, Cheng C-S, Tsai C-L. Evaluation of the growth of chondrocytes and osteoblasts seeded into precision scaffolds fabricated by fused deposition manufacturing. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 2007; 80: 519–527.
- 295 Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials* 2005; 4: 518–524.
- 296 Motamedian SR, Hosseinpour S, Ahsaie MG, Khojasteh A. Smart scaffolds in bone tissue engineering. A systematic review of literature. *World journal of stem cells* 2015; 7: 657–668.
- 297 Chen C-X, Peng H-H, Guan Y-X, Yao S-J. Morphological study on the pore growth profile of poly(ϵ -caprolactone) bi-modal porous foams using a modified supercritical CO₂ foaming process. *The Journal of Supercritical Fluids* 2019; 143: 72–81.
- 298 Salerno A, Oliviero M, Di Maio E, Iannace S, Netti PA. Design and preparation of μ -bimodal porous scaffold for tissue engineering. *J. Appl. Polym. Sci.* 2007; 106: 3335–3342.
- 299 Salerno A, Zeppetelli S, Di Maio E, Iannace S, Netti PA. Processing/structure/property relationship of multi-scaled PCL and PCL-HA composite scaffolds prepared via gas foaming and NaCl reverse templating. *Biotechnology and bioengineering* 2011; 108: 963–976.
- 300 Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 2010; 35: 1217–1256.
- 301 Urgan ID, Chiu L, Pierce A. Three-dimensional drug printing: a structured review. *Journal of the American Pharmacists Association: JAPhA* 2013; 53: 136–144.
- 302 Banks J. Adding value in additive manufacturing: researchers in the United Kingdom and Europe look to 3D printing for customization. *IEEE pulse* 2013; 4: 22–26.
- 303 Cui X, Boland T, D'Lima DD, Lotz MK. Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine. *Recent patents on drug delivery & formulation* 2012; 6: 149–155.
- 304 Lavrentieva A, Hatlapatka T, Winkler R, Hass R, Kasper C. Strategies in umbilical cord-derived mesenchymal stem cells expansion: influence of oxygen, culture medium and cell separation. *BMC Proceedings* 2011; 5 Suppl 8: P88.
- 305 Lee M-S, Youn C, Kim JH, Park BJ, Ahn J, Hong S, Kim Y-D, Shin YK, Park SG. Enhanced Cell Growth of Adipocyte-Derived Mesenchymal Stem Cells Using Chemically-Defined Serum-Free Media. *International journal of molecular sciences* 2017; 18.

- 306 Hatlapatka T, Moretti P, Lavrentieva A, Hass R, Marquardt N, Jacobs R, Kasper C. Optimization of culture conditions for the expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem or stromal cell-like cells using xeno-free culture conditions. *Tissue engineering. Part C, Methods* 2011; 17: 485–493.
- 307 Cimino M, Gonçalves RM, Barrias CC, Martins MCL. Xeno-Free Strategies for Safe Human Mesenchymal Stem/Stromal Cell Expansion: Supplements and Coatings. *Stem cells international* 2017; 2017: 6597815.
- 308 Bieback K, Hecker A, Schlechter T, Hofmann I, Brousos N, Redmer T, Besser D, Klüter H, Müller AM, Becker M. Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytotherapy* 2012; 14: 570–583.
- 309 Tonti GA, Mannello F. From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *The International journal of developmental biology* 2008; 52: 1023–1032.
- 310 Arora M. Cell Culture Media: A Review. *MATER METHODS* 2013; 3.
- 311 Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; 83: 2496–2500.
- 312 Howorth PJ. The physiological assessment of acid-base balance. *British journal of diseases of the chest* 1975; 69: 75–102.
- 313 Reznikov BF. Vyrashchivanie brutsell na tverdykh pitatel'nykh sredakh s indikatorom fenolovym krasnym. *Veterinariia* 1972; 7: 109–110.
- 314 Zigler JS, Lepe-Zuniga JL, Vistica B, Gery I. Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. *In vitro cellular & developmental biology: journal of the Tissue Culture Association* 1985; 21: 282–287.
- 315 Shipman C. Evaluation of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) as a tissue culture buffer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 1969; 130: 305–310.
- 316 van der Valk J, Brunner D, Smet K de, Fex Svenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, Norberg J, Price A, Scarino ML, Gstraunthaler G. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 2010; 24: 1053–1063.
- 317 Wagner W, Bork S, Horn P, Kronic D, Walenda T, Diehlmann A, Benes V, Blake J, Huber F-X, Eckstein V, Boukamp P, Ho AD. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PloS one* 2009; 4: e5846.
- 318 Hladik D, Höfig I, Oestreicher U, Beckers J, Matjanovski M, Bao X, Scherthan H, Atkinson MJ, Rosemann M. Long-term culture of mesenchymal stem cells impairs ATM-dependent recognition of DNA breaks and increases genetic instability. *Stem cell research & therapy* 2019; 10: 218.
- 319 Parsch D, Fellenberg J, Brümmendorf TH, Eschlbeck A-M, Richter W. Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2004; 82: 49–55.

- 320 Nuschke A, Rodrigues M, Wells AW, Sylakowski K, Wells A. Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells (MSCs) are glycolytic and thus glucose is a limiting factor of in vitro models of MSC starvation. *Stem cell research & therapy* 2016; 7: 179.
- 321 Zhang D, Lu H, Chen Z, Wang Y, Lin J, Xu S, Zhang C, Wang B, Yuan Z, Feng X, Jiang X, Pan J. High glucose induces the aging of mesenchymal stem cells via Akt/mTOR signaling. *Molecular medicine reports* 2017; 16: 1685–1690.
- 322 EAGLE H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science (New York, N.Y.)* 1955; 122: 501–514.
- 323 Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2006; 24: 462–471.
- 324 Weller TH, Wheeldon SK. The cultivation in vitro of cells derived from adult *Schistosoma mansoni*. I. Methodology; criteria for evaluation of cultures; and development of media. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1982; 31: 335–348.
- 325 Schrödel A. Die Rolle des fetalen Kälberserums in Zellkulturmedien. *Biol. Unserer Zeit* 2007; 37: 289.
- 326 Araújo AB, Furlan JM, Salton GD, Schmalfluss T, Röhsig LM, Silla LMR, Passos EP, Paz AH. Isolation of human mesenchymal stem cells from amnion, chorion, placental decidua and umbilical cord: comparison of four enzymatic protocols. *Biotechnology letters* 2018; 40: 989–998.
- 327 Ghamari S-H, Abbasi-Kangevari M, Tayebi T, Bahrami S, Niknejad H. The Bottlenecks in Translating Placenta-Derived Amniotic Epithelial and Mesenchymal Stromal Cells Into the Clinic: Current Discrepancies in Marker Reports. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2020; 8: 180.
- 328 Hemeda H, Giebel B, Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2014; 16: 170–180.
- 329 Hartung T. Food for thought... on cell culture. *ALTEX* 2007; 24: 143–152.
- 330 Chase LG, Lakshmiathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy* 2010; 1: 8.
- 331 Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten O-W, Price A, Schechtman L, Stacey G, Stokes W. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 2005; 33: 261–287.
- 332 Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G, Lewis D. Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 2002; 30: 407–414.
- 333 van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G, Hellebrekers L, Hyllner J, Jonker FH, Prieto P, Thalen M, Baumans V. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in Vitro* 2004; 18: 1–12.
- 334 Gupta K, Rispin A, Stitzel K, Coecke S, Harbell J. Ensuring quality of in vitro alternative test methods: issues and answers. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* 2005; 43: 219–224.
- 335 Dolley-Sonneville PJ, Romeo LE, Melkounian ZK. Synthetic surface for expansion of human mesenchymal stem cells in xeno-free, chemically defined culture conditions. *PLoS one* 2013; 8: e70263.

- 336 Mark P, Kleinsorge M, Gaebel R, Lux CA, Toelk A, Pittermann E, David R, Steinhoff G, Ma N. Human Mesenchymal Stem Cells Display Reduced Expression of CD105 after Culture in Serum-Free Medium. *Stem cells international* 2013; 2013: 698076.
- 337 Gottipamula S, Muttigi MS, Chaansa S, Ashwin KM, Priya N, Kolkundkar U, SundarRaj S, Majumdar AS, Seetharam RN. Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2016; 10: 108–119.
- 338 Jung S, Sen A, Rosenberg L, Behie LA. Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2010; 12: 637–657.
- 339 Barrias CC, Martins MCL, Almeida-Porada G, Barbosa MA, Granja PL. The correlation between the adsorption of adhesive proteins and cell behaviour on hydroxyl-methyl mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* 2009; 30: 307–316.
- 340 Dänmark S, Finne-Wistrand A, Albertsson A-C, Patarroyo M, Mustafa K. Integrin-mediated adhesion of human mesenchymal stem cells to extracellular matrix proteins adsorbed to polymer surfaces. *Biomedical materials (Bristol, England)* 2012; 7: 35011.
- 341 Astori G, Amati E, Bambi F, Bernardi M, Chierigato K, Schäfer R, Sella S, Rodeghiero F. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem cell research & therapy* 2016; 7: 93.
- 342 Jochems CEA, van der Valk JBF, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 2002; 30: 219–227.
- 343 Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, Hsu S-C, Smith J, Prockop DJ. Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 2004; 9: 747–756.
- 344 Lepperdinger G, Brunauer R, Jamnig A, Laschober G, Kassem M. Controversial issue: is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies? *Experimental gerontology* 2008; 43: 1018–1023.
- 345 Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature medicine* 2005; 11: 228–232.
- 346 Heiskanen A, Satomaa T, Tiitinen S, Laitinen A, Mannelin S, Impola U, Mikkola M, Olsson C, Miller-Podraza H, Blomqvist M, Olonen A, Salo H, Lehenkari P, Tuuri T, Otonkoski T, Natunen J, Saarinen J, Laine J. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2007; 25: 197–202.
- 347 Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. *Cell Journal (Yakhteh)* 2012; 13: 203–212.
- 348 Pinheiro de Oliveira TF, Fonseca AA, Camargos MF, Oliveira AM de, Pinto Cottorello AC, Souza ADR, Almeida IG de, Heinemann MB. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization* 2013; 41: 407–414.
- 349 ROTTEM S. Beware of mycoplasmas. *Trends in biotechnology* 1993; 11: 143–151.
- 350 Sousa PA de, Galea G, Turner M. The road to providing human embryo stem cells for therapeutic use: the UK experience. *Reproduction (Cambridge, England)* 2006; 132: 681–689.

- 351 Windsor HM, Windsor GD, Noordergraaf JH. The growth and long term survival of *Acholeplasma laidlawii* in media products used in biopharmaceutical manufacturing. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization* 2010; 38: 204–210.
- 352 Wessman SJ, Levings RL. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. *Developments in biological standardization* 1999; 99: 3–8.
- 353 Shih DT-B, Burnouf T. Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *New biotechnology* 2015; 32: 199–211.
- 354 Stein A. Decreasing variability in your cell culture. *BioTechniques* 2007; 43: 228–229.
- 355 Bjare U. Serum-free cell culture. *Pharmacology & therapeutics* 1992; 53: 355–374.
- 356 Kyllönen L, Haimi S, Mannerström B, Huhtala H, Rajala KM, Skottman H, Sándor GK, Miettinen S. Effects of different serum conditions on osteogenic differentiation of human adipose stem cells in vitro. *Stem cell research & therapy* 2013; 4: 17.
- 357 Zheng X, Baker H, Hancock WS, Fawaz F, McCaman M, Pungor E. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnology progress* 2006; 22: 1294–1300.
- 358 Knepper PA, Mayanil CS, Goossens W, McLone DC, Hayes E. The presence of transcription factors in fetal bovine sera. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 1998; 34: 170–173.
- 359 Wappler J, Rath B, Läufer T, Heidenreich A, Montzka K. Eliminating the need of serum testing using low serum culture conditions for human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell expansion. *Biomedical engineering online* 2013; 12: 15.
- 360 Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2007; 25: 1603–1609.
- 361 Aldahmash A, Haack-Sørensen M, Al-Nbaheen M, Harkness L, Abdallah BM, Kassem M. Human serum is as efficient as fetal bovine serum in supporting proliferation and differentiation of human multipotent stromal (mesenchymal) stem cells in vitro and in vivo. *Stem cell reviews and reports* 2011; 7: 860–868.
- 362 Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, Viebahn S, Gieseke F, Langer H, Gawaz MP, Horwitz EM, Conte P, Handgretinger R, Dominici M. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 2006; 8: 437–444.
- 363 Tateishi K, Ando W, Higuchi C, Hart DA, Hashimoto J, Nakata K, Yoshikawa H, Nakamura N. Comparison of human serum with fetal bovine serum for expansion and differentiation of human synovial MSC: potential feasibility for clinical applications. *Cell transplantation* 2008; 17: 549–557.
- 364 Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2007; 25: 1270–1278.
- 365 Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, Klüter H. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2009; 27: 2331–2341.

- 366 Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experimental Hematology* 2004; 32: 1212–1225.
- 367 Witzeneder K, Lindenmair A, Gabriel C, Höller K, Theiß D, Redl H, Hennerbichler S. Human-derived alternatives to fetal bovine serum in cell culture. *Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie* 2013; 40: 417–423.
- 368 Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense J-R, Begot L, Holy X, Lataillade J-J. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *Journal of cellular physiology* 2005; 205: 228–236.
- 369 Mojica-Henshaw MP, Jacobson P, Morris J, Kelley L, Pierce J, Boyer M, Reems J-A. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy* 2013; 15: 1458–1468.
- 370 Bieback K, Fernandez-Muñoz B, Pati S, Schäfer R. Gaps in the knowledge of human platelet lysate as a cell culture supplement for cell therapy: a joint publication from the AABB and the International Society for Cell & Gene Therapy. *Transfusion* 2019; 59: 3448–3460.
- 371 Strunk D, Lozano M, Marks DC, Loh YS, Gstraunthaler G, Schennach H, Rohde E, Laner-Plamberger S, Öller M, Nystedt J, Lotfi R, Rojewski M, Schrezenmeier H, Bieback K, Schäfer R, Bakchoul T, Waidmann M, Jonsdottir-Buch SM, Montazeri H, Sigurjonsson OE, Iudicone P, Fioravanti D, Pierelli L, Introna M, Capelli C, Falanga A, Takanashi M, López-Villar O, Burnouf T, Reems JA, Pierce J, Preslar AM, Schallmoser K. International Forum on GMP-grade human platelet lysate for cell propagation. *Vox sanguinis* 2018; 113: e1-e25.
- 372 Strunk D, Lozano M, Marks DC, Loh YS, Gstraunthaler G, Schennach H, Rohde E, Laner-Plamberger S, Öller M, Nystedt J, Lotfi R, Rojewski M, Schrezenmeier H, Bieback K, Schäfer R, Bakchoul T, Waidmann M, Jonsdottir-Buch SM, Montazeri H, Sigurjonsson OE, Iudicone P, Fioravanti D, Pierelli L, Introna M, Capelli C, Falanga A, Takanashi M, López-Villar O, Burnouf T, Reems JA, Pierce J, Preslar AM, Schallmoser K. International Forum on GMP-grade human platelet lysate for cell propagation: summary. *Vox sanguinis* 2018; 113: 80–87.
- 373 Altaie A, Owston H, Jones E. Use of platelet lysate for bone regeneration – are we ready for clinical translation? *World journal of stem cells* 2016; 8: 47–55.
- 374 Schallmoser K, Strunk D. Generation of a pool of human platelet lysate and efficient use in cell culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2013; 946: 349–362.
- 375 Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, Mailänder V, Lotfi R, Ignatius A, Sensebé L, Bourin P, Schrezenmeier H, Rojewski MT. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy* 2012; 14: 540–554.
- 376 Laitinen A, Oja S, Kilpinen L, Kaartinen T, Möller J, Laitinen S, Korhonen M, Nystedt J. A robust and reproducible animal serum-free culture method for clinical-grade bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotechnology* 2016; 68: 891–906.

- 377 Lohmann M, Walenda G, Hemedá H, Joussem S, Drescher W, Jockenhoevel S, Hutschenreuter G, Zenke M, Wagner W. Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS one* 2012; 7: e37839.
- 378 Burnouf T, Barro L, Nebie O, Wu Y-W, Goubran H, Knutson F, Seghatchian J. Viral safety of human platelet lysate for cell therapy and regenerative medicine: Moving forward, yes, but without forgetting the past. *Transfusion and apheresis science: official journal of the World Apheresis Association: official journal of the European Society for Haemapheresis* 2019; 58: 102674.
- 379 Jonsdóttir-Buch SM, Sigurgrímsdóttir H, Lieder R, Sigurjónsson OE. Expired and Pathogen-Inactivated Platelet Concentrates Support Differentiation and Immunomodulation of Mesenchymal Stromal Cells in Culture. *Cell transplantation* 2015; 24: 1545–1554.
- 380 Viau S, Chabrand L, Eap S, Lorant J, Rouger K, Goudaliez F, Sumian C, Delorme B. Pathogen reduction through additive-free short-wave UV light irradiation retains the optimal efficacy of human platelet lysate for the expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. *PLoS one* 2017; 12: e0181406.
- 381 Castiglia S, Mareschi K, Labanca L, Lucania G, Leone M, Sanavio F, Castello L, Rustichelli D, Signorino E, Gunetti M, Bergallo M, Bordiga AM, Ferrero I, Fagioli F. Inactivated human platelet lysate with psoralen: a new perspective for mesenchymal stromal cell production in Good Manufacturing Practice conditions. *Cytotherapy* 2014; 16: 750–763.
- 382 Almeida CR, Vasconcelos DP, Gonçalves RM, Barbosa MA. Enhanced mesenchymal stromal cell recruitment via natural killer cells by incorporation of inflammatory signals in biomaterials. *Journal of the Royal Society, Interface* 2012; 9: 261–271.
- 383 Copland IB, Garcia MA, Waller EK, Roback JD, Galipeau J. The effect of platelet lysate fibrinogen on the functionality of MSCs in immunotherapy. *Biomaterials* 2013; 34: 7840–7850.
- 384 Hemedá H, Kalz J, Walenda G, Lohmann M, Wagner W. Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy* 2013; 15: 1174–1181.
- 385 Schallmoser K, Rohde E, Reinisch A, Bartmann C, Thaler D, Drexler C, Obenauf AC, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum. *Tissue engineering. Part C, Methods* 2008; 14: 185–196.
- 386 Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* 1994; 79: 1015–1024.
- 387 Thornton SC, Mueller SN, Levine EM. Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science (New York, N.Y.)* 1983; 222: 623–625.
- 388 Laner-Plamberger S, Lener T, Schmid D, Streif DA, Salzer T, Öller M, Hauser-Kronberger C, Fischer T, Jacobs VR, Schallmoser K, Gimona M, Rohde E. Mechanical fibrinogen-depletion supports heparin-free mesenchymal stem cell propagation in human platelet lysate. *Journal of translational medicine* 2015; 13: 354.
- 389 Italiano JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement GL. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood* 2008; 111: 1227–1233.

- 390 Kamykowski J, Carlton P, Sehgal S, Storrie B. Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet α -granules. *Blood* 2011; 118: 1370–1373.
- 391 Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien P-A. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science (New York, N.Y.)* 2006; 312: 104–107.
- 392 Lesurtel M, Clavien P-A. Platelet-derived serotonin: translational implications for liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2014; 60: 30–33.
- 393 Myronovych A, Murata S, Chiba M, Matsuo R, Ikeda O, Watanabe M, Hisakura K, Nakano Y, Kohno K, Kawasaki T, Hashimoto I, Shibasaki Y, Yasue H, Ohkohchi N. Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. *Journal of hepatology* 2008; 49: 363–372.
- 394 Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews* 2009; 23: 177–189.
- 395 Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews. Immunology* 2011; 11: 264–274.
- 396 Scully D, Naseem KM, Matsakas A. Platelet biology in regenerative medicine of skeletal muscle. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2018; 223: e13071.
- 397 Reible B, Schmidmaier G, Moghaddam A, Westhauser F. Insulin-Like Growth Factor-1 as a Possible Alternative to Bone Morphogenetic Protein-7 to Induce Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *International journal of molecular sciences* 2018; 19.
- 398 Mizuno M, Katano H, Otabe K, Komori K, Matsumoto Y, Fujii S, Ozeki N, Tsuji K, Koga H, Muneta T, Matsuyama A, Sekiya I. Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA/AB in human serum are potential indicators of the proliferative capacity of human synovial mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy* 2015; 6: 243.
- 399 Kore-Grodzicki B, Tauber-Finkelstein M, Chain D, Shaltiel S. Vitronectin is phosphorylated by a cAMP-dependent protein kinase released by activation of human platelets with thrombin. *Biochemical and biophysical research communications* 1988; 157: 1131–1138.
- 400 Sander HJ, Slot JW, Bouma BN, Bolhuis PA, Pepper DS, Sixma JJ. Immunocytochemical localization of fibrinogen, platelet factor 4, and beta thromboglobulin in thin frozen sections of human blood platelets. *The Journal of clinical investigation* 1983; 72: 1277–1287.
- 401 Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 2015; 13: 2141–2151.
- 402 Wencel-Drake JD, Painter RG, Zimmerman TS, Ginsberg MH. Ultrastructural localization of human platelet thrombospondin, fibrinogen, fibronectin, and von Willebrand factor in frozen thin section. *Blood* 1985; 65: 929–938.
- 403 Leiter O, Walker TL. Platelets: The missing link between the blood and brain? *Progress in neurobiology* 2019; 183: 101695.
- 404 Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Klüter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2002; 31: 615–619.
- 405 Kaushansky K, Levi MM, Williams WJ (Hrsg.). *Williams hematology. Hemostasis and thrombosis.*
- 406 Gowder SJT. *New Insights into Cell Culture Technology.* InTech 2017.

- 407 Johansson L, Klinth J, Holmqvist O, Ohlson S. Platelet lysate: a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture? *Cytotechnology* 2003; 42: 67–74.
- 408 Wicki AN, Walz A, Gerber-Huber SN, Wenger RH, Vornhagen R, Clemetson KJ. Isolation and Characterization of Human Blood Platelet mRNA and Construction of a cDNA Library in λ gt11. *Thromb Haemost* 1989; 61: 448–453.
- 409 Coppinger JA, O'Connor R, Wynne K, Flanagan M, Sullivan M, Maguire PB, Fitzgerald DJ, Cagney G. Moderation of the platelet releasate response by aspirin. *Blood* 2007; 109: 4786–4792.
- 410 Milioli M, Ibáñez-Vea M, Sidoli S, Palmisano G, Careri M, Larsen MR. Quantitative proteomics analysis of platelet-derived microparticles reveals distinct protein signatures when stimulated by different physiological agonists. *Journal of Proteomics* 2015; 121: 56–66.
- 411 Chamata ES, Bartlett EL, Weir D, Rohrich RJ. Platelet-Rich Plasma: Evolving Role in Plastic Surgery. *Plastic and reconstructive surgery* 2021; 147: 219–230.
- 412 Motosko CC, Khouri KS, Poudrier G, Sinno S, Hazen A. Evaluating Platelet-Rich Therapy for Facial Aesthetics and Alopecia: A Critical Review of the Literature. *Plastic and reconstructive surgery* 2018; 141: 1115–1123.
- 413 Pallotta I, Kluge JA, Moreau J, Calabrese R, Kaplan DL, Balduini A. Characteristics of platelet gels combined with silk. *Biomaterials* 2014; 35: 3678–3687.
- 414 Pascale MR de, Sommese L, Casamassimi A, Napoli C. Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. *Transfusion medicine reviews* 2015; 29: 52–61.
- 415 Andia I, Maffulli N. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology* 2013; 9: 721–730.
- 416 Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2004; 62: 489–496.
- 417 Hsu WK, Mishra A, Rodeo SR, Fu F, Terry MA, Randelli P, Canale ST, Kelly FB. Platelet-rich plasma in orthopaedic applications: evidence-based recommendations for treatment. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2013; 21: 739–748.
- 418 Mishra AK, Skrepnik NV, Edwards SG, Jones GL, Sampson S, Vermillion DA, Ramsey ML, Karli DC, Rettig AC. Efficacy of platelet-rich plasma for chronic tennis elbow: a double-blind, prospective, multicenter, randomized controlled trial of 230 patients. *The American journal of sports medicine* 2014; 42: 463–471.
- 419 Hall MP, Band PA, Meislin RJ, Jazrawi LM, Cardone DA. Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2009; 17: 602–608.
- 420 Stacey MC, Mata SD, Trengove NJ, Mather CA. Randomised double-blind placebo controlled trial of topical autologous platelet lysate in venous ulcer healing. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2000; 20: 296–301.
- 421 Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *The American journal of sports medicine* 2009; 37: 2259–2272.
- 422 Al-Ajlouni J, Awidi A, Samara O, Al-Najar M, Tarwanah E, Saleh M, Awidi M, Hassan FA, Samih M, Bener A, Dweik M. Safety and Efficacy of Autologous Intra-articular Platelet Lysates in Early and Intermediate Knee

- Osteoarthritis in Humans: A Prospective Open-Label Study. *Clinical journal of sport medicine: official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine* 2015; 25: 524–528.
- 423 Frautschi RS, Hashem AM, Halasa B, Cakmakoglu C, Zins JE. Current Evidence for Clinical Efficacy of Platelet Rich Plasma in Aesthetic Surgery: A Systematic Review. *Aesthetic surgery journal* 2017; 37: 353–362.
- 424 Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 1999; 14: 529–535.
- 425 DelRossi AJ, Cernaianu AC, Vertrees RA, Wacker CJ, Fuller SJ, Cilley JH, Baldino WA. Platelet-rich plasma reduces postoperative blood loss after cardiopulmonary bypass. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1990; 100: 281–286.
- 426 Hee HT, Majd ME, Holt RT, Myers L. Do autologous growth factors enhance transforaminal lumbar interbody fusion? *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 2003; 12: 400–407.
- 427 Margolis DJ, Kantor J, Santanna J, Strom BL, Berlin JA. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes care* 2001; 24: 483–488.
- 428 Trapasso M, Spagnolo F, Marchi F, Strada P, Santi P, Scala M. Regenerative Surgery for the Definitive Repair of a Vasculitic Nonhealing Ulcer Using Platelet-derived Growth Factors and Noncultured Autologous Cell Suspension. *Plastic and reconstructive surgery. Global open* 2013; 1: 1–3.
- 429 Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, Vanderheyden M, Ostojic M, Dens J, El Nakadi B, Banovic M, Beleslin B, Vrolix M, Legrand V, Vrints C, Vanoverschelde JL, Crespo-Diaz R, Homsy C, Tendera M, Waldman S, Wijns W, Terzic A. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 61: 2329–2338.
- 430 Sánchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* 2009; 39: 345–354.
- 431 Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood reviews* 2015; 29: 153–162.
- 432 Radosevich M, Goubran HA, Burnouf T. Fibrin Sealant: Scientific Rationale, Production Methods, Properties, and Current Clinical Use. *Vox sanguinis* 1997; 72: 133–143.
- 433 Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM. Platelet-rich plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): surgical adjuvants, preparations for in situ regenerative medicine and tools for tissue engineering. *Current pharmaceutical biotechnology* 2012; 13: 1121–1130.
- 434 Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang C-Q, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 2014; 4: 3–9.
- 435 Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1997; 55: 1294–1299.
- 436 Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Endodontology* 1998; 85: 638–646.

- 437 Moreira Teixeira LS, Leijten JCH, Wennink JWH, Chatterjea AG, Feijen J, van Blitterswijk CA, Dijkstra PJ, Karperien M. The effect of platelet lysate supplementation of a dextran-based hydrogel on cartilage formation. *Biomaterials* 2012; 33: 3651–3661.
- 438 Chen B, Sun H-H, Wang H-G, Kong H, Chen F-M, Yu Q. The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. *Biomaterials* 2012; 33: 5023–5035.
- 439 Oliveira SM, Santo VE, Gomes ME, Reis RL, Mano JF. Layer-by-layer assembled cell instructive nanocoatings containing platelet lysate. *Biomaterials* 2015; 48: 56–65.
- 440 Santo VE, Popa EG, Mano JF, Gomes ME, Reis RL. Natural assembly of platelet lysate-loaded nanocarriers into enriched 3D hydrogels for cartilage regeneration. *Acta biomaterialia* 2015; 19: 56–65.
- 441 Hara Y, Steiner M, Baldini MG. Platelets as a source of growth-promoting factor(s) for tumor cells. *Cancer research* 1980; 40: 1212–1216.
- 442 Umeno Y, Okuda A, Kimura G. Proliferative behaviour of fibroblasts in plasma-rich culture medium. *Journal of cell science* 1989; 94 (Pt 3): 567–575.
- 443 King GL, Buchwald S. Characterization and partial purification of an endothelial cell growth factor from human platelets. *The Journal of clinical investigation* 1984; 73: 392–396.
- 444 Aldén A, Gonzalez L, Persson A, Christensson K, Holmqvist O, Ohlson S. Porcine platelet lysate as a supplement for animal cell culture. *Cytotechnology* 2007; 55: 3–8.
- 445 Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, Sarr MG, Bartunek J, Dietz AB, Terzic A. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell transplantation* 2011; 20: 797–811.
- 446 Wang X, Hu X, Dulińska-Molak I, Kawazoe N, Yang Y, Chen G. Discriminating the Independent Influence of Cell Adhesion and Spreading Area on Stem Cell Fate Determination Using Micropatterned Surfaces. *Scientific reports* 2016: 28708.
- 447 Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell* 1996; 84: 359–369.
- 448 Kim BW (Hrsg. 2017). *Clinical Regenerative Medicine in Urology*. Springer Singapore, Singapore, 2017.
- 449 Noh S, Myung N, Park M, Kim S, Zhang S-U, Kang H-W. 3D Bioprinting for Tissue Engineering. In: Kim BW (Hrsg.). *Clinical Regenerative Medicine in Urology* 105–123. Springer Singapore, Singapore, 2017.
- 450 Fu C, Bai H, Zhu J, Niu Z, Wang Y, Li J, Yang X, Bai Y. Enhanced cell proliferation and osteogenic differentiation in electrospun PLGA/hydroxyapatite nanofibre scaffolds incorporated with graphene oxide. *PloS one* 2017: e0188352.
- 451 Ren T, Ren J, Jia X, Pan K. The bone formation in vitro and mandibular defect repair using PLGA porous scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part A* 2005; 74: 562–569.
- 452 Barro L, Nebie O, Chen M-S, Wu Y-W, Koh MB, Knutson F, Watanabe N, Takahara M, Burnouf T. Nanofiltration of growth media supplemented with human platelet lysates for pathogen-safe xeno-free expansion of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2020; 22: 458–472.
- 453 Papadimitropoulos A, Piccinini E, Brachat S, Braccini A, Wendt D, Barbero A, Jacobi C, Martin I. Expansion of human mesenchymal stromal cells from fresh bone marrow in a 3D scaffold-based system under direct perfusion. *PloS one* 2014; 9: e102359.

- 454 Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ, Maguire PB. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 2004; 103: 2096–2104.
- 455 Marra MA, Kucaba TA, Dietrich NL, Green ED, Brownstein B, Wilson RK, McDonald KM, Hillier LW, McPherson JD, Waterston RH. High throughput fingerprint analysis of large-insert clones. *Genome research* 1997; 7: 1072–1084.
- 456 Wilson JG, Liu KD, Zhuo H, Caballero L, McMillan M, Fang X, Cosgrove K, Vojnik R, Calfee CS, Lee J-W, Rogers AJ, Levitt J, Wiener-Kronish J, Bajwa EK, Leavitt A, McKenna D, Thompson BT, Matthay MA. Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial. *The Lancet Respiratory Medicine* 2015; 3: 24–32.
- 457 Raddatz L, Kirsch M, Geier D, Schaeske J, Acreman K, Gentsch R, Jones S, Karau A, Washington T, Stiesch M, Becker T, Beutel S, Scheper T, Lavrentieva A. Comparison of different three dimensional-printed resorbable materials: In vitro biocompatibility, In vitro degradation rate, and cell differentiation support. *Journal of biomaterials applications* 2018; 33: 281–294.

Anhang

Weitere Projekte, die während der Promotionszeit bearbeitet wurden

A.1 Analyse der Zusammensetzung von Thrombozytenlysat und die Entwicklung eines Fingerprinting-Systems zur Chargencharakterisierung

Das hPL stellt eine vielversprechende Alternative zu dem kommerziellen Mediumsupplement FKS dar. Wie in Kapitel 2.5 näher erläutert, zeigt es unter anderem einen positiven Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von MSCs. Jedoch konnte bislang die Ursache dafür nicht abschließend geklärt werden. Obwohl vermutet wird, dass die Zusammensetzung des hPLs eine entscheidende Rolle spielt, konnten die einzelnen Bestandteile im Detail und in ihrer Konzentration bislang nicht vollständig identifiziert werden^{1,454}. Zur variablen Beeinflussung der Zelleigenschaften, zur Chargenstandardisierung, aber insbesondere zur langfristigen Herstellung eines universellen chemisch definierten Mediums ist es entscheidend die zellfördernden Bestandteile zu identifizieren und zu definieren^{1,370}. Zur Entwicklung eines zeit- und kostengünstigen Systems wurde im Rahmen dieser Arbeit begonnen die Bestandteile des hPL näher zu analysieren und ein Chargen-Fingerprinting-System zu entwickeln. Solche Systeme bieten eine schnelle und parallele Untersuchung vieler Proben und stellen somit eine gute Möglichkeit zur Qualitätsuntersuchung und Bewertung dar⁴⁵⁵. Innerhalb dieses Projektes wurden die Auswirkungen (Proliferation, Differenzierung) unterschiedlicher hPL-Chargen, sowie der Bestandteile des hPLs untersucht und in Zusammenhang mit den enthaltenen Proteinen (SDS-PAGE, 2D Gelelektrophorese) gesetzt. Auf diese Weise soll zukünftig eine Beurteilung der Qualität verschiedener hPL-Chargen erleichtert und eine Standardisierung ermöglicht werden.

A.2 Untersuchung verschiedener Zellvereinzlungsstrategien für mesenchymale Stammzellen

Aufgrund ihrer vielen positiven Eigenschaften zählen MSCs zu den für eine Anwendung in der regenerativen Medizin bedeutendsten Zellen. Allerdings besteht vom Schritt der *in vitro* Kultivierung bis hin zur Anwendung *in vivo* nach wie vor ein großer Optimierungsbedarf⁴⁵⁶. Bedingt durch die Komplexität der Vorgänge und die Sensitivität der MSCs müssen immer wieder neue Teilbereiche weiter erforscht und optimiert werden, um einen zukunftssträchtigen Umgang und eine optimale Anwendung von MSCs gewährleisten zu können. Einen dieser Teilbereiche umfasst die Zellvereinzlung. Um Zellen optimal in Gewebe oder Organe einbringen zu können, müssen die Zellen *ex vivo* expandiert und anschließend vereinzelt vorliegen. Hierbei gilt es große Zellzahlen zu erreichen, jedoch der Entstehung großer Agglomerate vorzubeugen. Agglomerierte Zellen eignen sich zum einen nicht für eine präzise Transplantation und sind zum anderen in ihrer Funktionalität beeinträchtigt. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten hPL konnte in Langzeitproliferationsstudien vermehrt das Auftreten von Zellagglomeraten beobachtet werden. Während des Projekts konnten bei der Verwendung von hPL eine verstärkte Zelladhäsion an die Zellkulturoberfläche, sowie eine Ausbildung einer EZM beobachtet werden. Aus

diesem Grund wurden verschiedene Zellvereinzelungsstrategien und ihr Einfluss auf die Zellqualität untersucht. Hierfür wurden verschiedene Dissoziationsreagenzien miteinander verglichen. Sowohl die Abtrennung der Zellen als auch das Zellwachstum nach der Behandlung wurde untersucht. Mittels eines Durchflusszytometers (DFZ) wurde die Langzeitauswirkung der Reagenzien auf die Zellen analysiert. Auf diese Weise konnten die Vor- und Nachteile der verschiedenen Dissoziationsreagenzien herausgearbeitet und das vielversprechendste Reagenz zur Zellvereinzelung gefunden werden.

A.3 Vergleichende Untersuchungen von 3D-Zellkultursystemen unter Einfluss von Thrombozytenlysat

Im Vergleich zu den traditionellen 2D-Zellkultursystemen imitieren 3D-Zellkultursysteme besser die *in vivo* Umgebung der Zellen. Physiologische Zell-Zell-, Zell-Matrix-Kontakte und -Interaktionen, das Diffusionsverhalten sowie physiologische Gradienten (Signalmoleküle, Metaboliten und Sauerstoff) können nur in 3D-Zellkultursystemen simuliert und analysiert werden (Kapitel 2.3)^{34,182}. Aus diesen Gründen werden stetig mehr *in vitro* 3D-Zellkulturtechniken angewendet^{195,360}. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene 3D-Kultivierungssysteme (Sphäroide (Matrix-freie Zellaggregate), Polyethylenglykol-Fibrinogen (PF) und GelMA Hydrogele, sowie einer hPL-Matrix) miteinander verglichen. Zusätzlich wurde der Einfluss von hPL auf MSCs im Vergleich zu FKS und HS untersucht. Hierfür wurden das Zellwachstum, die Zellausbreitung und der Differenzierungsgrad der MSCs in den verschiedenen Hydrogelen und Sphäroiden analysiert. Auf diese Weise konnten die Vor- und Nachteile der verschiedenen Techniken gegenübergestellt werden.

A.4 Vergleichende Analysen 3D-gedruckter resorbierbarer Biomaterialien

Biodegradierbare Materialien spielen eine immer entscheidendere Rolle für die Medizin (Kapitel 2.3.2). Mittels der spezifischen Zusammensetzung von Biopolymeren kann die Geschwindigkeit der Degradation optimal an die der Geweberegeneration im Körper angepasst werden^{276,282}. Bislang werden Materialien für resorbierbare und biodegradierbare Implantate (z.B. Polymilchsäure oder Poly-Caprolacton-Polymere) noch intensiv untersucht. Sie sind in der Lage, die obligatorischen Anforderungen wie mechanische Festigkeit und die für hochwertige Implantate erforderlichen Eigenschaften zu erfüllen. Die Kombination der degradierbaren Biopolymere mit der individuellen additiven Fertigungstechnik eignet sich optimal zur Herstellung personalisierter Implantate. In diesem Projekt konnten vier resorbierbare 3D-gedruckte Materialien hinsichtlich ihrer *in vitro* Biokompatibilität, ihrer *in vitro* Abbaurate, der Zelladhäsion und des Zellverhaltens auf diesen Materialien sowie der Unterstützung der osteogenen Differenzierung von hAD-MSCs bewertet werden. Unter Einfluss von hPL konnte auf allen vier Materialien eine verstärkte osteogene Differenzierung erreicht werden (in Kooperation⁴⁵⁷).

Betreute Abschlussarbeiten

Bachelorarbeiten:

Oliver Jeske, 2018:

Untersuchung verschiedener Zellvereinzlungsstrategien für mesenchymale Stammzellen

Luise Birnstein, 2019 (Teile der Arbeit wurden in Kapitel 3.2 verwendet):

Einfluss von Thrombozytenlysät auf die Differenzierung und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen in Hydrogelen

Sandra Mielke, 2019 (Ein Teil der Arbeit wurde in Kapitel 3.1 verwendet):

Vergleichende Untersuchungen von 3D-Zellkultursystemen unter Einfluss von Thrombozytenlysät,

Annabelle-Christin Herder, 2019 (Teile der Arbeit wurden in Kapitel 3.3 verwendet):

Untersuchung des Wachstums mesenchymaler Stammzellen auf resorbierbaren Konstrukten unter Einfluss von Thrombozytenlysät

Annalea Brüggemann, 2019:

Analyse der Zusammensetzung von Thrombozytenlysät und die Entwicklung eines *Fingerprinting*-Systems zur Chargencharakterisierung

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Veröffentlichungen (antichronologisch, *peer-reviewed*)

Kirsch M. (85 %), Rach J., Handke W., Seltsam A., Pepelanova I., Strauß S, Vogt P.,Scheper T. Lavrentieva A. (2020):

Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum and platelet lysate in 2D and 3D systems

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology(2020), doi: 10.3389/fbioe.2020.598389

Kirsch M. (80 %), Herder A-C., Boudot C., Karau A., Rach J., Handke W., Seltsam A., Scheper T. Lavrentieva A. (2020):

Xeno-Free *In Vitro* Cultivation and Osteogenic Differentiation of hAD-MSCs on Resorbable 3D Printed RESOMER®

MDPI Materials(2020), doi: 10.3390/ma13153399

Kirsch M. (80 %), Birnstein L., Pepelanova I., Handke W., Rach J., Seltsam A., Scheper T. Lavrentieva A. (2019): Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Formulated with Human Platelet Lysate Supports Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation and Enhances the Hydrogel's Mechanical Properties

MDPI Bioengineering(2019), doi: 10.3390/bioengineering6030076

Siller I.G., Enders A., Steinwedel T., Epping N-M., Kirsch M. (2 %), Lavrentieva A., Scheper T., Bahnemann J. (2019): Real-Time Live-Cell Imaging Technology Enables High-Throughput Screening to Verify in Vitro Biocompatibility of 3D Printed Materials

MDPI Materials(2019), doi: 10.3390/ma12132125

Raddatz L, Kirsch M. (25 %), Geier D., Schaeske J., Acreman K., Gentsch R., Jones S., Karau A., Washington T., Stiesch M., Becker T., Beutel S., Scheper T., Lavrentieva A. (2018): Comparison of different three dimensional-printed resorbable materials: In vitro biocompatibility, In vitro degradation rate, and cell differentiation support

Journal of Biomaterials Applications(2018), doi: 10.1177/0885328218787219

Konferenzen und Workshops (antichronologisch)

Poster/Vortrag

Kirsch M., Birnstein L., Rach J., Handke W., Seltsam A., Pepelanova I., Lavrentieva A. (2019): Human Platelet Lysate in GelMA based Hydrogels as a 3D Cell Culture System, 46th ESAO Congress, Hannover, Germany

Egger D., Giménez A.M., Kirsch M., Scheper T., Lavrentieva A., Kasper Cornelia (2018): MSCs isolation in 3D cell culture conditions: challenges, modeling and perspectives, DECHEMA 3D Cell Culture 2018, Freiburg, Germany

Raddatz L., Schmitz C., Gellermann P., Kirsch M., Geier D., Beutel S., Becker T., Scheper T., Pepelanova I., Lavrentieva A. (2018) Characterization of GelMa and alginate hydrogels for bioprinting: printability, polymerization and biocompatibility. DECHEMA 3D Cell Culture 2018, Freiburg, Germany

Workshops

Cellular Bioprocess Technology Short Course, Prof. Wei-Shou Hu, University of Minnesota, 2019

ISBT Human Platelet Lysate– Current Standards and Future Developments, Burnouf T., Gabriel C., Henschler R., Koh M., Schallmoser K., Zürich, Swiss, 2018

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Hanna Marline Kirsch

Geburtsdatum/-ort: 13.01.1992 in Langenhagen

Ausbildung

Seit 2017 Promotionsvorhaben im Fach Chemie: Institut für Technische Chemie, LUH, Hannover, Deutschland

2014 – 2016 Masterstudium, M. Sc. Im Fach Life Science, LUH, Hannover

2011 – 2014 Bachelorstudium, B. Sc. Im Fach Life Science, LUH, Hannover

2004 - 2011 Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Elsa-Brändström-Schule Hannover

Beruflicher Werdegang

Seit 2017 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Promotion) am Institut für Technische Chemie, LUH, Hannover

2014- 2017 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Technische Chemie, LUH, Hannover

2015 Internationales Forschungspraktikum, TECHNION, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel