

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
PD DR. MED. MARKUS LOIBL
ORTHOPÄDIE UND UNFALLCHIRURGIE

Platelet-Rich Plasma as an Autologous and Proangiogenic Cell Delivery System

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jessica Zahn

2020

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
PD DR. MED. MARKUS LOIBL
ORTHOPÄDIE UND UNFALLCHIRURGIE

Platelet-Rich Plasma as an Autologous and Proangiogenic Cell Delivery System

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jessica Zahn

2020

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

PD Dr. Markus Loibl

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Lukas Prantl

Tag der mündlichen Prüfung:

30.11.2019
14.01.2020

In Erinnerung an meine verstorbenen Großeltern

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis.....	3
2. Abkürzungsverzeichnis.....	5
3. Zusammenfassung.....	6
3.1 Hintergrund.....	6
3.2 Hypothese	6
3.3 Methoden.....	6
3.4 Ergebnisse	7
3.5 Resümee.....	8
4. Einleitung	9
4.1 Tissue Engineering.....	9
4.2 Endotheliale und mesenchymale Zellen.....	9
4.3 PRP.....	10
4.4 Ziel der Studie.....	10
5. Material und Methoden.....	11
5.1 Zellisolation und Zellkultur	11
5.2 MSC Zellfärbung	11
5.3 PRP Herstellung.....	11
5.4 Inkorporation von Zellen in PRP Gele.....	12
5.5 Mikroskopie und Bildanalyse.....	12
5.6 Genexpressionsanalyse	13
5.7 Histologie.....	13
5.8 Statistik.....	14
6. Ergebnisse.....	15

6.1 Kontraktion der PRP Gele mit inkorporierten MSCs.....	15
6.2 Stabilität der Netzwerke in HUVEC/ MSC Co-Kulturen nach 14 Tagen.....	15
6.3 Genexpressionsanalyse von angiogenen Markern.....	16
6.4 Immunhistologische Analyse von CD146 und Cx 43.....	17
7. Diskussion der wesentlichen Ergebnisse	18
7.1 PRP als geeignetes Trägermedium für Zellen.....	18
7.2 Stabile Netzwerkstrukturen in Abhängigkeit von MSCs.....	18
7.3 MSCs als Perizyten-ähnliche Stabilisatoren.....	18
8. Schlussfolgerung.....	20
9. Literaturverzeichnis	21
10. Danksagung	
11. Originalarbeit	

2. Abkürzungsverzeichnis

α MEM	α -Minimum eagle medium
Ang 1	Angiopoietin 1
bFGF	basic fibroblast growth factor
CD146/ MCAM	Cluster of differentiation 146/ Melanoma cell adhesion molecule
Cx 43	Connexin 43
dH ₂ O	Destilliertes Diwasserstoffmonoxid
d0	Tag 0
d7	Tag 7
d14	Tag 14
EGM-2	Endothelial Cell Growth Medium 2
EPC	Endothelial progenitor cell
FBS	Fetal blood serum
GFP	Green fluorescent protein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
H ₂ O	Diwasserstoffmonoxid
H ₂ O ₂	Diwasserstoffdioxid
MNC	Mononuclear cell
MSC	Mesenchymal stem cell/ Mesenchymale Stammzellen
NG-2	Neuron-glia antigen
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR β 1	Platelet-derived growth factor receptor β 1
PRP	Platelet-Rich-Plasma/ Thrombozytenangereichertes Plasma
VEGF A	Vascular endothelial growth factor A
RFP	Red fluorescent protein
100 H	100% HUVECs
100 M	100% MSCs
75 HM	75% HUVECs – 25% MSCs
50 HM	50% HUVECs – 50% MSCs

3. Zusammenfassung

3.1 Hintergrund

Angiogenese ist eine unabdingbare Voraussetzung für die frühen Stadien der Wundheilung und trägt in Geweben, wie z.B. Knochen, entscheidend dazu bei, dass Gewebe wiederhergestellt werden können. Im klinischen Kontext ist es oft eine Herausforderung, dass ausreichend Gefäße in Geweben im kurzen Zeitfenster neuentstehen. Es wurde gezeigt, dass die Prozesse der Neo-Vaskularisierung für implantierte Trägermaterialien eine große Zeitspanne benötigen, sodass die Blutversorgung nicht ausreichend für diese Trägermaterialien gewährleistet werden kann. Trägermaterialien mit bereits bestehenden Gefäßkonstrukten haben dahingegen den Vorteil, dass sie von einem schnellen Anschluss an das Blutsystem profitieren und somit eine vielversprechende Alternative darstellen.

Das autologe Produkt Platelet-Rich-Plasma stellt in der Literatur ein wichtiges Trägermedium für Zellen, z.B. für mesenchymale Stammzellen dar, da es angiogene Eigenschaften enthält, die Vaskularisierungsprozesse begünstigen.

3.2 Hypothese

Das so genannte „Tissue Engineering“, also die Gewebeneuzüchtung, mit angezüchteten Endothelzellen und Gefäßkonstrukten ist eine Vorgehensweise, das Problem der zeitintensiven Gewebeheilung überwinden zu können. PRP als autologes, pro-angiogenes Material könne hier als Gewebeersatzmaterial verwendet werden.

3.3 Methoden

PRP wurde aus menschlichem Thrombozytenkonzentrat gewonnen. MSCs wurden aus dem Knochenmark von 4 Patienten isoliert, das jeweils bei orthopädischen operativen Eingriffen entnommen wurde. Es wurden Mono- sowie Co-Kulturen von zuvor PKH26® rot gefärbten MSCs und GFP exprimierenden HUVECs erstellt, die jeweils in PRP in folgenden Verhältnissen resuspendiert wurden: 100 H, 100 M, 75 HM, 50 HM. Anschließend wurde Thrombin hinzugefügt, um das Gelieren einzuleiten, sodass dreidimensionale Gele entstanden. Diese wurden bei 37 °C inkubiert und die

Neuformation von Netzwerken in den Gelen wurde mittels Time Lapse Microscopy bis zu den Zeitpunkten d0, d7, d10 und d14 analysiert.

Die Auswertung der Netzwerkformation erfolgte mit Axiovision Software, indem die tubulären Strukturen manuell mit polygonalen Flächen markiert und anschließend mit einer KS400 Software sowie einem benutzerdefinierten Macro ausgewertet wurden. An d0, d7 und d14 wurde aus allen Kulturen RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und folgende Gene mittels quantitativer PCR analysiert: Ang 1, CD146, NG-2, Cx 43, Collagen IV, PDGFR β 1, Tie 2 Rezeptor und VEGF A. Nach d14 wurden die Gele mittels Snapfreezing und Immunhistologie auf Cx 43 und CD146 Expression untersucht.

3.4 Ergebnisse

In 100 M entstanden zu keinem Zeitpunkt gefäßähnliche Netzwerke. Nach d3 waren Neuentstehungen von Netzwerken in den Kulturen 100 H, 75 HM und 50 HM abzuzeichnen. Die Netzwerke organisierten sich in diesen Kulturen definierter und komplexer bis zu d7. Im Gegensatz zu 100 H blieben die zellulären Netzwerke in den Co-Kulturen bis d14 stabil im Vergleich zu d0 für alle Zeitpunkte ($p < 0.01$). In 100 H gingen die Netzwerkstrukturen ab d10 deutlich zurück und sanken auf ein vergleichbares Level wie an d0 ($p > 0.05$). Den größten Beitrag zur Netzwerkformation lieferten die HUVECs. Das Zellverhältnis von HUVECs und MSCs blieb allerdings über die Zeit in einer vergleichbaren Konzentration wie an d0, obwohl die relative Prozentzahl von grünem (HUVECs) und rotem (MSCs) Fluoreszenzsignal bis d3 für die jeweiligen Mono- und Co-Kulturen zunahm.

Die Genexpressionsanalyse zeigte einige Tendenzen auf jedoch keine eindeutige, statistisch signifikante differentielle Regulation der analysierten Marker. Die VEGF Expression in den Co-Kulturen blieb stabil im Gegensatz zu 100 H, wo eine Abnahme der Expression zu beobachten war ($p < 0.05$). Parallel zu der zügigen Netzwerkformation in den Co-Kulturen konnte eine nicht statistisch signifikante Zunahme der Expression von Ang 1 detektiert werden. Der korrelierende Tie 2 Rezeptor zeigte kein vergleichbares Muster. Der Perizytenmarker PDGFR β 1 zeigte eine generelle Zunahme der Expression in allen Kulturen. NG-2 zeigte eine höhere Expression in den Co-Kulturen als in den Mono-Kulturen, jedoch mit $p > 0.05$. Bezüglich der Zellkontaktproteine Cx 43 und Collagen IV wurde lediglich für Cx 43 eine

geringe Zunahme der Expression in 100 M detektiert, wohingegen keine Veränderungen für Collagen IV gefunden wurden.

Die immunhistologische Auswertung für CD146 und Cx 43 zeigte ein CD146 Signal, wenn HUVECs in den Kulturen involviert waren. Das CD146 Signal für 100 M war vergleichbar mit der Negativkontrolle. Cx 43 Signale waren nur zu sehen, wenn die Kulturen MSCs enthielten.

3.5 Resümee

Die Stabilität der zellulären Netzwerke ist abhängig von der Zellpopulation und nur über die Zeitspanne von 2 Wochen stabil, wenn MSCs und HUVECs co-kultiviert wurden. MSCs sind somit essentiell für die Stabilität der Netzwerke, wobei sie möglicherweise zu Perizyten differenzieren. Die hohe Zellviabilität kombiniert mit den dreidimensionalen, kapillarähnlichen Strukturen, die schon nach kurzer Zeit beobachtet wurden, legen nahe, dass PRP als autologes und pro-angiogenes Trägermaterial für die Wiederherstellung vaskularisierten Gewebes, wie z.B. Knochen verwendet werden kann.

4. Einleitung

4.1 Tissue Engineering

Angiogenese ist eine Voraussetzung dafür, dass vaskularisiertes Gewebe, wie z.B. Knochen, heilen und regenerieren kann [1]. Dabei entstehen neue Kapillaren von bereits existierenden Gefäßen, um die Expansion der Gefäßformation zu unterstützen. Im Falle großer muskuloskelettaler Defekte ist das umliegende Gewebe üblicherweise beschädigt und eine ausreichende Versorgung von Sauerstoff und Nährstoffen kann beim defekten Gewebe nicht mehr durch den reduzierten Blutstrom garantiert werden [2]. Hier werden im klinischen Alltag verschiedene Transplantatträger eingesetzt, wie z.B. allogene oder synthetische Knochentransplantate, die allerdings das Problem der insuffizienten Re-Vaskularisierung des Knochendefekts nicht beheben. Es wurde wissenschaftlich gezeigt, dass Transplantate nicht schnell genug vaskularisiert wurden, aber dass im Gegensatz dazu Transplantate mit vorbestehenden Kapillaren schnell Anschluss an bereits existierende Gefäße im Organismus fanden [3-5]. Zellbasiertes Tissue Engineering könnte hierfür eine Alternative im Kontext der herausfordernden Neo-Vaskularisation darstellen, um zum Einen den Prozess des Einwachsens vorbestehender Kapillaren in bereits existierende Gefäße zu beschleunigen und zum Anderen, um die limitierende Distanz zwischen den wachsenden Gefäßen zu minimieren [6]. Somit liegt es nahe, dass Tissue Engineering mit prä-vaskularisiertem Gewebe favorisiert wird. Allerdings wurde bis dato noch keine klinisch anwendbare Strategie entwickelt, obwohl es zahlreiche wissenschaftliche Forschungen dazu gibt.

4.2 Endotheliale und mesenchymale Zellen

Im Hinblick auf die Gefäßneuentstehung ist es offensichtlich, dass endotheliale (Vorläufer-) Zellen, wie z.B. EPCs oder HUVECs benötigt werden, um angiogene Prozesse in die Wege zu leiten. Mesenchymale Stammzellen sind zu einem zentralen Bestandteil regenerativer Therapien geworden. Bei zellbasiertem Tissue Engineering konnte auf unterschiedliche Weise bisher gezeigt werden, dass vaskularisierende Prozesse durch MSCs und Fibroblasten gefördert werden [7-10]. Um dies zu ermöglichen, benötigen die Zellen Wachstumsfaktoren, die allerdings in der rekombinanten Form extrem teuer sind und kontrovers in Diskurs stehen [11]. Hier

setzt das Prinzip an, die durch Thrombozyten freigesetzte Wachstumsfaktoren auf autologem Wege zu verwenden. Diese Wachstumsfaktoren enthalten u.a. pro-angiogene Faktoren, wie z.B. platelet-derived growth factor (PDGF) oder transforming growth factor β (TGF- β) [12]. Dass beispielsweise thrombozytenangereicherte Wachstumsfaktoren als Supplemente für EPCs effektiv genutzt werden können, haben vorangehende Arbeiten gezeigt [10, 13, 14].

4.3 PRP

PRP ist ein suspendiertes Plasma, was mindestens 200.000 – 1.000.000 Thrombozyten/ μ l aufweist [15]. PRP kann heutzutage durch kommerziell erhältliche Zentrifugen aus Blut gewonnen werden und wird in verschiedenen, vornehmlich orthopädischen Anwendungsbereichen verwendet [16-18]. Es stellt ein Spektrum unterschiedlicher, pro-angiogener Wachstumsfaktoren zur Verfügung, die durch die im PRP enthaltenen Thrombozyten freigesetzt werden. Obwohl PRP vielseitig verwendet wird, gibt es keine einheitliche Definition zur PRP Herstellung. Die Variation der Herstellungsverfahren ist nicht zu vernachlässigen und erschwert den Vergleich der Studienlage. Um PRP als Trägermedium im klinischen Ausblick zu verwenden, kann es z.B. mithilfe von Thrombin und/ oder Calcium in die Form eines Gels gebracht werden. Diese PRP Gele können zudem als autologe Trägermedien für MSCs verwendet werden, wie bereits gezeigt wurde [19].

4.4 Ziel der Studie

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die angiogenen Eigenschaften von PRP Gelen zu untersuchen und darüber hinaus zu evaluieren, ob die PRP Gele als autologe Trägermedien für prä-vaskularisierte Strukturen verwendet werden können, um frühe Prozesse der Neo-Vaskularisierung zu fördern.

5. Material und Methoden

5.1 Zellisolation und Zellkultur

MNCs wurde aus Knochenmark von 4 Patienten isoliert, das jeweils bei orthopädischen operativen Eingriffen entnommen wurde. Die Patienten wurden zuvor ausreichend informiert und erklärten sich dazu bereit. Das Verfahren wurde durch die Ethikkommission (EK Regensburg 12-101-0127) geprüft. Die Isolation von MNCs erfolgte mit Ficoll (Histopaque®-1077, Sigma) durch Dichtezentrifugation. MNCs wurden in α MEM (Gibco) unter Zusatz von 10% FBS (Seraplus, Pan) und 5 ng/ml bFGF (R&D Systems) bei einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ cm^2 kultiviert. Nach 4 Tagen wurden die nicht adhärenenten hämatopoetischen Zellen entfernt, die MSCs durch ihre Adhärenz an die Plastikflaschen selektiert und weiter bis zu einer Konfluenz von 80% expandiert. Bei Erreichen dieser Konfluenz wurden die MSCs mit einer Dichte von 3×10^3 Zellen/ cm^2 rekultiviert. Alle MSCs wurden in Passage 2 bis 4 verwendet.

GFP-exprimierende HUVECs (Angio-Proteomie) wurden auf beschichteten Zellplatten (Speed Coating Solution, PELObiotech) in EGM-2 Medium (Lonza) mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen/ cm^2 bis zu einer 80% Konfluenz kultiviert. Zellen wurden in Passage 7-9 verwendet.

5.2 MSC Zellfärbung

Für die Bildgebung lebender Zellen wurden die MSCs mit einem roten PKH67® Fluoreszenzfarbstoff (Sigma Aldrich) vorab gefärbt. Nach dem Lösen der Zellen von der Plastikflasche wurde die gewünschte Anzahl an Zellen mit serumfreiem α MEM Medium gewaschen, zentrifugiert (400g, 5 min), in Diluent C (Sigma) resuspendiert und mit einem 40 μm Zellfilter gefiltert. Anschließend wurde die Färbelösung für 5 min hinzugegeben, mit FBS wurde die Färbung gestoppt und die Zellen wurden dreimal mit Medium gewaschen, bevor sie gezählt wurden.

5.3 PRP Herstellung

Die Herstellung von PRP erfolgte aus menschlichem, leukozyten-reduziertem Thrombozytenkonzentrat (1000×10^3 Thrombozyten/ μl ; < 2 Leukozyten/ μl), was durch Apherese gewonnen wurde. Die Thrombozytenkonzentrate wurden zentrifugiert (2000g, 20 min), das Pellet in der Hälfte des Originalvolumen resuspendiert und durch

Ultraschallwellen homogenisiert (15 min), bevor das PRP (finale Konzentration von 2000×10^3 Thrombozyten/ μl) bei -20°C gelagert wurde. PRP Proben von verschiedenen Spendern wurden vor jeder weiteren Anwendung gepoolt ($n=3$).

5.4 Inkorporation von Zellen in PRP Gele

Die Mono- und Co-Kulturen wurden in folgenden Verhältnissen in PRP resuspendiert: 100 H, 100 M, 75 HM, 50 HM. Die Gelierung wurde durch Zugabe von menschlichem Thrombin (Tisseel, Baxter, 5 U/ ml) sowie Inkubation bei 37°C für 15-30 min induziert. Die Gele wurden in EGM-2 mit $5 \mu\text{M}$ ϵ -aminocaproic acid (Sigma) unter Standardbedingungen kultiviert und alle 2 Tage mit neuem Nährmedium versorgt. Die Zelldichte war stets 2.5×10^3 Zellen/ μl Gel. Es wurden Volumen von $20 \mu\text{l}$ in μ -slides (Ibidi) für Time Lapse Mikroskopie sowie $120 \mu\text{l}$ große Gele in 96 Mikrotiterplatten für die Histologie und Genexpressionsanalyse verwendet.

5.5 Mikroskopie und Bildanalyse

Die PRP Gele in den μ -slides wurden in einen „onstage“- Inkubator gebracht, der mit einem EVOS FL Auto Cell Imaging System (ThermoFisher Scientific) verbunden war, um die Netzwerkformationen der Zellen mittels Zeitraffer (Time Lapse) zu verfolgen. MSCs wurden mittels RFP und HUVECs mittels GFP Filter detektiert. Es wurden für 14 Tage alle 3 Stunden Bilder von zuvor festgelegten Regionen der jeweiligen Gele gemacht. Die Bildkombinationen aus rotem und grünem Fluoreszenzsignal wurden jeweils in die Axiovision Software (Zeiss) importiert, Netzwerkformationen wurden manuell mit einer polygonalen Flächen markiert und anschließend mit der KS400 Software (Zeiss) sowie einem benutzerdefinierten Macro ausgewertet. Ein individueller Schwellenwert für rotes und grünes Fluoreszenzsignal wurde festgelegt, woraufhin die jeweilige Fläche, die das Fluoreszenzsignal der zuvor festgelegten Regionen beinhaltet, kalkuliert werden konnte.

Am Ende des Experiments wurden konfokale Bilder von den Gelen mittels LSM 510 (Zeiss) gemacht, was mit einem Argon und HeNe1 Laser ausgestattet und an einem Axiovert200m Mikroskop angebracht ist. Anschließend erfolgte die Auswertung mit einer ZEN black Software (Zeiss), wo jeweils mit 10x und 20x Objektiven gearbeitet wurde.

5.6 Genexpressionsanalyse

An d0, d7 und d14 wurden für alle Kulturen zwei PRP Gele gepoolt und RNA extrahiert. Hierfür wurden die gepoolten Gele in 1 ml TriReagent (Sigma) mit 5 µl Polyacryl Carrier (Molecular Research Center) lysiert und in einen TissueLyser (Qiagen) bei 25 Hz für 7 min gebracht. Nach der Zentrifugation (1200g, 10 min, 4 °C), wurde 10% Bromchlorpropan hinzugefügt und erneut zur Phasenseparation zentrifugiert (1200g, 15 min, 4 °C). Die obere, wässrige Phase wurde gesammelt und die RNA wurde mittels gekühltem 70% Ethanol präzipitiert. Für die RNA Reinigung wurden RNeasy columns (Qiagen) nach Gebrauchsanleitung verwendet. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde mit einem NanoDrop System (Witec GmbH) gemessen. Alle Proben wurden bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Die cDNA wurde von 600 ng RNA mittels TaqMan® Reverse Transcription Reagenzien (Applied Biosystems, Invitrogen) mit randomisierten Hexamerprimern synthetisiert. Die Real-time PCR wurde mit 6 ng cDNA und TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) mittels einer Quant Studio 6 Flex Maschine (Applied Biosystems) durchgeführt. TaqMan Gene Expression Assays wurden zur spezifischen Gendetektion für folgende Gene verwendet: Ang 1 (Hs00181613_m1), CD146 (Hs00174838), NG-2 (Hs00426981_m1), Cx 43 (Hs00748445_s1), Collagen IV (Hs00266237_m1), PDGFRβ1 (Hs00182163_m1) und Tie 2 Rezeptor (Hs00176096). VEGF A wurde mittels des Vorwärtsprimers 5'-GCC CAC TGA GGA GTC CAA CA-3', des Rückwärtsprimers 5'-TCCTATGTG CTG GCC TTG GT-3' und der Sonde 5'-CAC CAT GCA GAT TAT GCG GAT CAA ACC T-3' (Microsynth) detektiert. Als endogene Kontrolle wurde human 18s (Hs99999901_m1, ThermoFisher Scientific) verwendet. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen und die Daten wurden mittels der komparativen $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode relativ zu d0 ausgewertet.

5.7 Histologie

Die Mono- und Co-Kulturen wurden nach d14 mit PBS gewaschen und in gefrierfertige Formen mit Tissue Freezing Medium (Jung) gebracht. Nach 15 min Inkubationszeit wurden die Proben mit Isopentan eingefroren und bei -20 °C gelagert. An einem Gefriermikrotom wurden 20 µm Schnitte wurden aus den Proben erstellt. Für die Immunhistologie wurden die Schnitte in 70% Methanol (15 min) fixiert, in H₂O rehydriert und in 99.5% Methanol mit 30% H₂O₂ inkubiert (30 min), um die endogene Peroxidaseaktivität zu blocken. Danach wurde die unspezifische Antikörperbindung

mit Pferdeserum (1:20) bei Raumtemperatur geblockt (60 min). Die primären Antikörper Cx 43 (ThermoFisher Scientific) und CD146 (abcam) wurden nun für 30 min auf den Schnitten inkubiert (Endkonzentrationen: 5 µg/ µl Cx 43; 1 µg/ µl CD146). Die Kontrollschnitte wurden mit PBS mit 0.1% Tween (PBST) inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal mit PBST gewaschen und mit ABC Komplex (Vectastain ABC kit) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBST wurden die Schnitte mit ImmunPACT DAB im Dunkeln inkubiert (4 min) und nach einigen Wasserwechseln in dH₂O wurden die Schnitte mit Prolong Gold antifade Reagenz mit DAPI (ThermoFisher Scientific) eingedeckt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur gelagert. Bilder der Schnitte wurden mit einem Axioplan2 Mikroskop (Zeiss) gemacht, das mit einer AxioCamHRc Kamera und einer AxioVision Software (Zeiss) ausgestattet ist.

5.8 Statistik

Alle Werte werden als Durchschnitt \pm Standardabweichung des Durchschnitts (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit der GraphPad Prism 7 Software gemacht. Die Normalverteilung der Daten wurde durch den Shapiro-Wilk Normalitätstest geprüft. Die Unterschiede zwischen den Experimentengruppen wurden mit den Two-way ANOVA und Tukey's post hoc Tests geprüft.

6. Ergebnisse

6.1 Kontraktion der PRP Gele mit inkorporierten MSCs

PRP Gele ohne inkorporierte Zellen behielten ihre originale Form bei, während ein Zusammenziehen von PRP Gelen, in denen Zellen inkorporiert waren, beobachtet werden konnte. Innerhalb der ersten Woche war die stärkste Kontraktion der Gele in denjenigen mit inkorporierten MSCs zu beobachten, die nahezu auf die Hälfte ihres originalen Volumens geschrumpft sind. Gele mit Co-Kulturen schrumpften ebenfalls, jedoch nicht gleichermaßen wie Gele mit 100 M. Gele mit 100 H waren hingegen nicht betroffen. In der 2. Woche war die Kontraktion immer noch zu beobachten, aber in geringerer Geschwindigkeit als in der ersten Woche. Da die größte Volumenminderung in Gelen mit MSCs zu beobachten war, ist anzunehmen, dass die Zahl der inkorporierten MSCs für diesen Effekt verantwortlich ist.

6.2 Stabilität der Netzwerke in HUVEC/ MSC Co-Kulturen nach 14 Tagen

Durch die Time Lapse Mikroskopie konnte die Formation von zellulären Netzwerken verfolgt werden. In MSC Mono-Kulturen waren zu keinem Zeitpunkt Netzwerke vorhanden, weswegen sie auch aus der nachfolgenden Auswertung der Netzwerkanalyse rausgenommen wurden (siehe unten).

In 100 H konnten Netzwerkformationen nach d3 gesehen werden. Die Komplexität und das Ausknospen der Netzwerke nahm in 100 H bis d10 zu. Danach destabilisierten sich die Netzwerke und an d14 waren sie nahezu komplett verschwunden. In den beiden Co-Kulturen konnten gleichermaßen Netzwerkformationen nach d3 detektiert werden. Nach d7 waren definierte Netzwerke zu sehen und im Gegensatz zu 100 H blieben auch die Netzwerke auch über die Zeit bis d14 stabil. Oftmals fiel es schwer, die 3D Strukturen durch die Time Lapse Mikroskopie in hoher Qualität aufzunehmen, weswegen nach d14 konfokale Bilder noch gemacht wurden, die gleichwertige Bildergebnisse der Netzwerkformation lieferten wie die Time Lapse Mikroskopie. Was jedoch auf den konfokalen Bildern besser abzuzeichnen war, war, dass die MSCs zu den Netzwerken insofern beitrugen, indem sie sich in die Netzwerke integrierten.

Bezugnehmend auf die Time Lapse Bilder wurde die zelluläre Netzwerkformation in den verschiedenen Kulturen analysiert. Zunächst wurde der relative Anteil an grünem (HUVECs) und rotem (MSCs) Fluoreszenzsignal untersucht. Nach d3 konnte ein

leichter Anstieg an grünem Fluoreszenzsignal in allen Kulturen beobachtet werden. Danach blieb das zu detektierende Signal konstant (75 HM) oder sank auf das Ausgangsniveau (100 H, 50 HM). Ähnlich verhielt sich das rote Fluoreszenzsignal. Auf Grund dessen ist zu sagen, dass die Zellkonzentration über die gesamte Zeitspanne des Experiments im nahezu gleichen Verhältnis stand und somit PRP ein geeignetes Milieu für die beiden Zelltypen für 14 Tage darstellt.

Die Auswertung der Effizienz der Netzwerkformation zeigte, dass die Netzwerke zum größten Teil während der ersten 3 Tage in allen Kulturen entstanden (alle $p < 0.01$ an d3 im Vergleich zu d0). Für die Co-Kulturen 75 HM und 50 HM blieben die Netzwerkformationen mit minimalen Unterschieden zwischen den beiden Co-Kulturen über die Zeit stabil (beide $p < 0.01$ an allen Zeitpunkten im Vergleich zu d0). Während in 100 H die Geschwindigkeit und der relative Anteil an zellulären Netzwerken vergleichbar war wie in den Co-Kulturen, destabilisierten sich die Netzwerke in 100 H nach d7 und sanken auf das Ausgangsniveau wie an d0. An d14 waren in 100 H signifikant weniger zelluläre Netzwerke detektierbar als in 50 HM ($p < 0.05$) oder 75 HM ($p < 0.001$). Nach d14 konnten die Netzwerke nur noch in den Co-Kulturen beobachtet werden. Daraus ist zu schließen, dass die MSCs für die Stabilität der Netzwerke verantwortlich sind.

Zuletzt wurde noch der relative Anteil der HUVECs und der MSCs an den gemessenen zellulären Netzwerken der jeweiligen Kultur analysiert. Dies zeigte, dass HUVECs in den zellulären Netzwerken jeder Kultur mit einem relativen Anteil von 55% bis 87% involviert waren, abhängig vom jeweiligen Zeitpunkt und der jeweiligen Kultur. Im geringeren Ausmaß als die HUVECs trugen die MSCs mit 21% bis 34% zu den Netzwerken bei. Das Fluoreszenzsignal außerhalb der gemessenen Netzwerke blieb über die Zeit nahezu konstant und weist die Zahl der Zellrekrutierung zu den Netzwerken auf.

6.3 Genexpressionsanalyse von angiogenen Markern

Im Hinblick auf die Genanalyse wurden alle PRP Gele an d7 und d14 bezüglich der Gene, die an angiogenen Prozessen und der Vaskularisation beteiligt sind, untersucht. Obwohl VEGF ein wichtiger Baustein in der Gefäßentstehung ist, wurden keine Unterschiede der VEGF-Expression festgestellt. Die Expression von VEGF blieb in den CoKulturen und in 100 M gleich und nahm in 100 H ab. Dies könnte damit zusammenhängen, dass sowohl PRP als auch das Nährmedium EGM-2 VEGF zu

einem hohen Anteil beinhalten. Für Ang 1, ein weiterer wichtiger angiogener Wachstumsfaktor, konnte eine geringe Hochregulation in allen Kulturen an d14 gesehen werden, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Der Angiopoietin-Rezeptor Tie 2 zeigte allerdings kein ähnliches Muster, sondern blieb meist unverändert und konnte in den CoKulturen an d14 mit verringerter Expression detektiert werden. Zu den Perizytenmarkern, CD146, NG-2 und PDGFR β 1 ist zu sagen, dass hier ein Trend für eine verstärkte Expression von CD146 für 100 M an d7 beobachtet werden konnte, wohingegen die NG-2-Expression für 100 M verringert war. In 100 H fehlte die NG-2 Expression allerdings vollständig und in den Co-Kulturen war sie nahezu konstant (alle $p > 0.05$). Eine Zunahme der Expression konnte für PDGFR β 1 an d14 mit großen Abweichungen innerhalb der unterschiedlichen Donoren detektiert werden, mit der höchsten Regulation für 100 H.

Neben angiogenen Markern wurden auch Proteine für Zell-Zell-Kontakte untersucht: Cx 43 als ein Protein für kommunizierende Zell-Zell-Kontakte, was nur mit einer gering höheren Expression in 100 M beobachtet werden konnte. Keine Veränderung zeigte das Basalmembranprotein Collagen IV.

6.4 Immunhistologische Analyse von CD146 und Cx 43

An Kryoschnitten wurde immunhistologisch das Proteinlevel von CD146 und Cx 43 untersucht. Ein CD146 Signal war vorhanden, wenn HUVECs in den Kulturen involviert waren, wohingegen das CD146 Signal für 100 M vergleichbar mit der Negativkontrolle war. Cx 43 Signale waren nur zu sehen, wenn die Kulturen MSCs enthielten.

7. Diskussion der wesentlichen Ergebnisse

7.1 PRP als geeignetes Trägermedium für Zellen

Damit bei großen, muskuloskelettalen Defekten, der Blutstrom, der die Nährstoffe und den Sauerstoff mit sich bringt, garantiert ist, müssen Prozesse der Re-Vaskularisierung stattfinden. Oftmals ist hier die Zeit ein limitierender Faktor, da das Einwachsen von neuen Gefäßen lange dauert [3]. Das Ziel der Studie, aus PRP Gelen ein geeignetes Trägermedium mit bereits bestehenden kapillarähnlichen Strukturen herzustellen, konnte mittels des Experiments erreicht werden. Es konnte bestätigt werden, dass sich PRP als Trägermedium sowohl für Mono- als auch für Co-Kulturen aus HUVECs und MSCs über eine Zeit von 14 Tagen eignet, was in Übereinstimmung mit der vorherigen Arbeit von Jalowiec et al. (2016) [19] ist.

Dass PRP Gele über die Zeit in Abhängigkeit von MSCs an Volumen verlieren, könnte für die Anwendung *in vivo* eine Limitation sein. Das Schrumpfen der Gele, das mit der höchsten Volumenreduktion nach 7 Tagen zu beobachten war, stand allerdings nicht in direktem Zusammenhang mit der Ausbildung zellulärer Netzwerke, die sich bereits nach 3 Tagen schon abzeichneten.

7.2 Stabile Netzwerkstrukturen in Abhängigkeit von MSCs

Bereits nach 3 Tagen entstand der größte Teil der Netzwerke in den Co-Kulturen, die über die Zeit stabil blieben. Diese schnelle Formation von neuentstandenen Netzwerken könnte durch die Wachstumsfaktoren des PRPs stimuliert werden [18]. Tatsächlich waren die Zellen unmittelbar der Freisetzung von Wachstumsfaktoren ausgesetzt, nachdem die Zellen in PRP resuspendiert wurden und Thrombin die Gelisierung aktivierte.

Parallel zu vorherigen Studien [7, 8, 20] konnte auch im vorliegenden Experiment demonstriert werden, dass es vorteilhaft ist, die Zellen in Co-Kulturen zu bringen. Nur so waren stabile, zelluläre Netzwerke über 14 Tage zu beobachten.

7.3 MSCs als Perizyten-ähnliche Stabilisatoren

Damit auf lange Sicht die neuentstandenen Gefäße stabil bleiben, ist die Rekrutierung muraler Zellen, Perizyten oder glatter Muskelzellen, erforderlich [21]. Bevor Perizyten jedoch für die Stabilität neuer Gefäße rekrutiert werden, findet deren Stimulation zur

Migration und Proliferation statt. Perizyten sind vereinzelt an Diskontinuitäten der Basalmembran mit Endothelzellen zu finden [22]. Auch MSCs haben die Fähigkeit in einen Perizyten-ähnlichen Phänotyp zu differenzieren wie Loibl et al. (2014) [23] demonstriert haben. Diese Arbeit verdeutlichte, dass die Genexpressionen von NG-2 und CD146 in MSCs verstärkt waren, wenn sie mit EPCs co-kultiviert wurden. Darüber hinaus konnte zudem Herrmann et al. (2014) zeigen, dass mit PRP co-kultivierte EPCs und MSCs auf PU-Gerüsten Vaskularisierungsprozesse förderten, was bis hin zu deren Implantation *in vivo* nachgewiesen werden konnte [10]. Auch weitere Arbeiten konnten bestätigen, dass MSCs einen Perizyten-ähnlichen Phänotyp annehmen können [14].

Perizytenmarker, wie z.B. CD146 [24], NG-2 [25] und PDGFR β 1 [26] sind in Abhängigkeit ihrer Lokalisation zu finden [27]. Auch in der vorliegenden Studie sind diese Perizytenmarker untersucht worden und wie oben beschrieben war ein Trend zu verzeichnen, dass MSCs in einen Phänotyp differenzierten, der den Perizyten gleicht. Dies ist vor allem wegen der höheren NG-2 Expression in Co-Kulturen im Vergleich zu den HUVEC Monokulturen festzustellen. Außerdem konnte eine generelle Verstärkung der PDGFR β 1 Expression in allen Kulturen beobachtet werden. Der PDGF β / PDGFR β Signalweg ist entscheidend für die Perizytenexpansion und deren Migration entlang der Gefäße [28]. Das erklärt die vermehrte Expression von PDGFR β 1 in den Co-Kulturen. Aber auch in den HUVEC Monokulturen war dies zu beobachten, was vermuten lässt, dass dies eine Antwort auf den erhöhten Bedarf an muralen Zellen sein könnte. Da Veränderungen in der Genexpression nur vorübergehend detektierbar sind, liegt es nahe, dass nicht alle Veränderungen an den hier untersuchten zwei Zeitpunkten erfasst werden konnten.

8. Schlussfolgerung

Diese Studie konnte zum ersten Mal von einem autologen Trägermedium berichten, das ein Konstrukt aus prä-vaskularisierten, zellulären Netzwerken beinhaltet. Der Vorteil der Co-Kultur aus MSCs und HUVECs wurde insofern deutlich, als dass die Netzwerke in Co-Kulturen über eine Zeitspanne von 2 Wochen stabil blieben. Die MSCs haben in diesem Fall einen wesentlichen Beitrag zur Netzwerkstabilisation geleistet, indem sie möglicherweise in einen Perizyten-ähnlichen Phänotyp differenzierten. Somit konnte gezeigt werden, dass PRP als autologes Trägermedium für Zellen geeignet ist und Prozesse im Hinblick auf die Neo-Vaskularisierung fördern kann.

9. Literaturverzeichnis

- [1] R. A. D. Carano and E. H. Filvaroff, "Angiogenesis and bone repair," *Drug Discovery Today*, vol. 8, pp. 980–989, 2003.
- [2] E. O. Johnson, T. Troupis, and P. N. Soucacos, "Tissue-engineered vascularized bone grafts: basic science and clinical relevance to trauma and reconstructive microsurgery," *Microsurgery*, vol. 31, pp. 176–182, 2011.
- [3] F. A. Auger, L. Gibot, and D. Lacroix, "The pivotal role of vascularization in tissue engineering," in *Annual Review of Biomedical Engineering*, M. L. Yarmush, Ed., vol. 15, pp. 177–200, Annual Reviews, Palo Alto, 2013.
- [4] M. W. Laschke, Y. Harder, M. Amon et al., "Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes," *Tissue Engineering*, vol. 12, pp. 2093–2104, 2006.
- [5] P. L. Tremblay, V. Hudon, F. Berthod, L. Germain, and F. A. Auger, "Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice," *American Journal of Transplantation*, vol. 5, pp. 1002–1010, 2005.
- [6] M. W. Laschke and M. D. Menger, "Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation," *European Surgical Research*, vol. 48, pp. 85–92, 2012.
- [7] O. Tsigkou, I. Pomerantseva, J. A. Spencer et al., "Engineered vascularized bone grafts," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, pp. 3311–3316, 2010.
- [8] L. L. Ren, D. Y. Ma, B. Liu et al., "Preparation of three-dimensional vascularized MSC cell sheet constructs for tissue regeneration," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 301279, 10 pages, 2014.
- [9] X. Chen, A. S. Aledia, S. A. Popson, L. Him, C. C. Hughes and S. C. George, "Rapid anastomosis of endothelial progenitor cell-derived vessels with host vasculature is promoted by a high density of cotransplanted fibroblasts," *Tissue Engineering Part A*, vol. 16, pp. 585–594, 2010.
- [10] M. Herrmann, A. Binder, U. Menzel, S. Zeiter, M. Alini, and S. Verrier, "CD34/CD133 enriched bone marrow progenitor cells promote neovascularization of tissue engineered constructs in vivo", *Stem Cell Research*, vol. 13, pp. 465-477, 2014.

- [11] E. Groppa, S. Brkic, E. Bovo et al., "VEGF dose regulates vascular stabilization through semaphorin3A and the neuropilin-1(+) monocyte/TGF-1 paracrine axis," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 7, pp. 1366–1384, 2015.
- [12] A. Lubkowska, B. Dolegowska, and G. Banfi, "Growth factor content in PRP and their applicability in medicine," *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, vol. 26, pp. 3S–22S, 2012.
- [13] S. Lippross, M. Loibl, S. Hoppe et al., "Platelet released growth factors boost expansion of bone marrow derived CD34(+) and CD133(+) endothelial progenitor cells for autologous grafting," *Platelets*, vol. 22, pp. 422–432, 2011.
- [14] F. Duttonhoefer, R. Lara de Freitas, T. Meury et al., "3D scaffolds co-seeded with human endothelial progenitor and mesenchymal stem cells: evidence of prevascularisation within 7 days," *European Cells & Materials*, vol. 26, pp. 49–64, 2013, discussion -5.
- [15] R. E. Marx, "Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?," *Implant Dentistry*, vol. 10, pp. 225–228, 2001.
- [16] X. Xie, C. Zhang, and R. S. Tuan, "Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 16, p. 204, 2014.
- [17] B. MatteoDi, M. Loibl, L. Andriolo et al., "Biologic agents for anterior cruciate ligament healing: a systematic review," *World Journal of Orthopedics*, vol. 7, pp. 592–603, 2016.
- [18] G. Filardo, E. Kon, B. MatteoDi et al., "Platelet-rich plasma injections for the treatment of refractory Achilles tendinopathy: results at 4 years," *Blood Transfusion*, vol. 12, pp. 533–540, 2014.
- [19] J. M. Jalowiec, M. D'Este, J. J. Bara et al., "An in vitro investigation of platelet-rich plasma-gel as a cell and growth factor delivery vehicle for tissue engineering," *Tissue Engineering Part C, Methods*, vol. 22, pp. 49–58, 2016.
- [20] J. L. Ma, F. Yang, S. K. Both et al., "In vitro and in vivo angiogenic capacity of BM-MSCs/HUVECs and AT-MSCs/ HUVECs cocultures," *Biofabrication*, vol. 6, p. 10, 2014.
- [21] S. Reginato, R. Gianni-Barrera, and A. Banfi, "Taming of the wild vessel: promoting vessel stabilization for safe therapeutic angiogenesis," *Biochemical Society Transactions*, vol. 39, pp. 1654–1658, 2011.]

- [22] A. Armulik, G. Genove, and C. Betsholtz, "Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises," *Developmental Cell*, vol. 21, pp. 193–215, 2011.
- [23] M. Loibl, A. Binder, M. Herrmann et al., "Direct cell-cell contact between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells induces a pericyte-like phenotype in vitro," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 395781, 10 pages, 2014.
- [24] Q. Li, Y. Yu, J. Bischoff, J. B. Mulliken, and B. R. Olsen, "Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin," *The Journal of Pathology*, vol. 201, pp. 296–302, 2003.
- [25] F. J. Huang, W. K. You, P. Bonaldo, T. N. Seyfried, E. B. Pasquale, and W. B. Stallcup, "Pericyte deficiencies lead to aberrant tumor vascularization in the brain of the NG2 null mouse," *Developmental Biology*, vol. 344, pp. 1035–1046, 2010.
- [26] E. A. Winkler, R. D. Bell, and B. V. Zlokovic, "Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling," *Molecular Neurodegeneration*, vol. 5, p. 11, 2010.
- [27] L. Diaz-Flores, R. Gutierrez, J. F. Madrid et al., "Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche," *Histology and Histopathology*, vol. 24, pp. 909–969, 2009.
- [28] A. Armulik, A. Abramsson, and C. Betsholtz, "Endothelial/pericyte interactions," *Circulation Research*, vol. 97, pp. 512–523, 2005.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an verschiedene Personen richten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst gilt mein Dank meinem Doktorvater PD Dr. Markus Loibl, der mir diese Arbeit in Kooperation mit dem AO Forschungsinstitut in Davos ermöglichte und wissenschaftlich mitgestaltet hat. Durch seinen Kontakt nach Davos habe ich die Chance gesehen, ein Forschungsprojekt an einem international anerkannten Institut durchzuführen. Darüber hinaus hat er mich sowohl während meiner Forschungsarbeiten als auch bei meinen Studienreisen hierzu immer unterstützt und motiviert. Er war und ist zu jeder Zeit trotz eigener hoher Arbeitsbelastung erreichbar, wofür ich ihm sehr dankbar bin.

Mein besonderer Dank geht an Dr. rer. nat. Marietta Herrmann, die meine Betreuerin vor Ort am AO Forschungsinstitut in Davos war. Sie hat mir Tag für Tag geholfen, mein Projekt in dieser limitierten Zeitspanne durchzuziehen. Durch ihre exzellente Expertise und ihre professionelle Führung habe ich vor Ort in kurzer Zeit alle notwendigen Fertigkeiten beigebracht bekommen, die sowohl innerhalb als auch außerhalb des Forschungslabors gefordert wurden. Danken möchte ich ihr sowohl für die stetige Erreichbarkeit, obwohl sie nun selbst eine eigene Forschungsabteilung leitet, als auch für die Freundschaft, die dadurch entstanden ist.

Ich möchte dem AO Forschungsinstitut in Davos danken, das mir die vielen notwendigen Materialien und Geräte zur Verfügung gestellt hat. Besonderer Dank gilt hierbei Prof. Dr. Mauro Alini, dem Gruppenleiter, der jederzeit Vertrauen und Zuversicht in mein Projekt gesteckt hat und mich sofort Teil seines Teams hat werden lassen. Auch Dr. Sophie Verrier möchte ich meinen Dank widmen. Die komplikationslose und hervorragende Zusammenarbeit hat mir nicht nur sehr viel Spaß gemacht, sie war auch effektiv, was zu einem großen Anteil dem Institut zu verdanken ist.

Für die Unterstützung und teils nötige Aushilfe im Labor möchte ich meiner damaligen Sitznachbarin am Arbeitsplatz Maria Hildebrand danken.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Christoph Sprecher, der mir bei der Bildgebung am Laser wie auch bei dem benutzerdefinierten Makro sehr geholfen hat. Er hatte zu jeder Zeit das nötige technische Wissen parat.

Meinen Eltern, Hartmut und Petra, sowie meinem Bruder, Bastian Zahn, möchte ich ganz besonders danken. Sie standen nicht nur mit Rat und Vertrauen jeder Zeit hinter mir, sondern haben mir in der kurzzeitig sehr schweren, trauernden Zeit geholfen, mein Projekt in Vollständigkeit und Effektivität durchzuziehen. Danke für die dafür notwendigen Fahrten und eure Besuche!

Ein weiterer Dank gilt meiner Patin und all denjenigen Freunden, die mich während des Projekts und Zuhause in der Endphase mit dem nötigen Zuspruch motiviert haben. Obwohl dies leider meine verstorbenen Großeltern nicht mehr konnten, sollen auch sie hier erwähnt werden. Ohne sie wäre ich nicht mit der notwendigen Zielstrebigkeit und dem Selbstvertrauen ausgestattet, die es für dieses Projekt gebraucht hat.

Mein endloser Dank gilt meinem Freund Kilian Macht. Er half mir ganz besonders mit fundierten Ratschlägen, uneingeschränkter Unterstützung und Motivation. Seine Zuversicht und sein Vertrauen, was er immerzu in mich steckt, haben mir vor allem in der Anfertigung sowie Fertigstellung der Arbeit und der dazugehörigen Publikation geholfen.

11. Originalarbeit

Research Article

Platelet-Rich Plasma as an Autologous and Proangiogenic Cell Delivery System

Jessica Zahn,^{1,2} Markus Loibl,² Christoph Sprecher,¹ Michael Nerlich,² Mauro Alini,¹ Sophie Verrier,¹ and Marietta Herrmann¹

¹AO Research Institute Davos, Clavadelstrasse 8, 7270 Davos Platz, Switzerland

²Department of Trauma Surgery, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany

Correspondence should be addressed to Sophie Verrier; sophie.verrier@aofoundation.org

Received 20 January 2017; Accepted 20 June 2017

Academic Editor: Michal A. Rahat

Copyright © 2017 Jessica Zahn et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Angiogenesis is a key factor in early stages of wound healing and is crucial for the repair of vascularized tissues such as the bone. However, supporting timely revascularization of the defect site still presents a clinical challenge. Tissue engineering approaches delivering endothelial cells or prevascularized constructs may overcome this problem. In the current study, we investigated platelet-rich plasma (PRP) gels as autologous, injectable cell delivery systems for prevascularized constructs. PRP was produced from human thrombocyte concentrates. GFP-expressing human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) were encapsulated in PRP gels in different proportions. The formation of cellular networks was assessed over 14 days by time-lapse microscopy, gene expression analysis, and immunohistology. PRP gels presented a favorable environment for the formation of a three-dimensional (3D) cellular network. The formation of these networks was apparent as early as 3 days after seeding. Networks increased in complexity and branching over time but were only stable in HUVEC-MSC cocultures. The high cell viability together with the 3D capillary-like networks observed at early time points suggests that PRP can be used as an autologous and proangiogenic cell delivery system for the repair of vascularized tissues such as the bone.

1. Introduction

Angiogenesis is crucial for healing and regeneration of vascularized tissues such as the bone [1]. In this process, new capillaries sprout from preexisting vessels to support expanding vascular networks. In the case of large musculoskeletal defects, the surrounding tissue is usually damaged, which may pose a problem since an adequate supply of oxygen and nutrients at the injury site is essential for proper healing [2]. To date, this constitutes still a clinical challenge, because on the one hand, the distance which can be reached by angiogenic sprouting is limited, and on the other hand, the ingrowth of new vessels is a slow process with 5 $\mu\text{m}/\text{h}$ [3].

Replacement of the damaged tissue might be a suitable option but is often constricted by the availability of transplantable graft material, for example, bone grafts. Cell-based tissue engineering strategies may overcome these

problems. However, it has been shown that the ingrowth of vessels into grafts, as well as the repopulation with endothelial cells into grafts, is not rapid enough to ensure a sufficient blood supply of the grafted cells/tissue [4–6]. In contrast, preformed networks could be linked to existing vessels within 2–4 days [6, 7]. These findings strongly suggest the use of prevascularized constructs [8].

Cell-based prevascularization of tissue-engineered constructs, using endothelial cells [9–12], endothelial progenitor cells (EPCs) [13–15], or microvascular fragments [16], showed promising results, supporting a fast anastomosis to the host vascular system. Interestingly, it has variously been shown that mural cells, such as mesenchymal stem cells (MSCs), or fibroblasts further promote the vascularization process [9, 10, 13, 15].

The culture and expansion of EPCs and endothelial cells, for example, HUVECs, require proangiogenic growth

factors. Such recombinant growth factors are expensive and discussed controversially [17]. The supplementation of growth medium with autologous growth factors would be desirable for clinical application. Platelets are part of the blood and contain more than 5000 proteins. About 300 of the contained proteins, especially growth factors and cytokines, are released upon activation [18–20]. The release of cytokines, chemokines, and growth factors induces proliferation and activation of the cells that are involved in wound healing such as fibroblasts, neutrophils, monocytes, smooth muscle cells, and MSC [21]. In addition, our previous work has demonstrated that platelet-derived growth factors can be efficiently used as culture supplement for EPCs [15, 22, 23].

In the last two decades, the treatment with platelet-related plasma (PRP), defined as suspended plasma which contains at least 200,000–1,000,000 platelets/ μl suspended plasma [24], is upcoming. PRP can be produced by commercial centrifuges and is used for various clinical applications in the field of orthopedics, for example, cartilage repair [25, 26], ligament healing [27–29], and tendon healing [30–32]. Although PRP provides a spectrum of growth factors released by platelets, there is no common definition of PRP preparations and often PRP products have not been systematically tested in clinical trials [33–35], both hindering comparisons between different studies.

Thrombin and/or calcium chloride are commonly used to activate platelets in PRP [36], which provokes the release of biomolecules and cleavage of fibrinogen resulting in the formation of a fibrin gel. Therefore, activated PRP can be used as an autologous hydrogel [37–39]. Taking advantage of an autologous system, PRP has been applied for various *in vitro* and *in vivo* studies. Due to its high content of growth factors, such as platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor β (TGF- β), and insulin-like growth factor (IGF) [40], PRP has been used for various applications of musculoskeletal regeneration, orthopedics, and the treatment of ischemic diseases [13, 41–44]. We have recently demonstrated that PRP gels can be used as a cell delivery system for MSCs [33]. In this study, we showed that PRP sustained viability and promoted proliferation of encapsulated MSCs in a platelet concentration-dependent manner.

Based on promising preliminary data [45], the aim of the present study was to investigate the angiogenic properties of PRP gels and to evaluate whether PRP can be used as an autologous delivery system for prevascularized structures supporting early neovascularization.

2. Methods

2.1. Bone Marrow- (BM-) Derived Mononuclear Cell (MNC) Isolation and Cell Culture. BM aspirates were obtained from vertebra of patients undergoing orthopedic surgery after informed consent and approval by the local ethics committee (EK Regensburg 12-101-0127). Mononucleated cells (MNCs) were isolated from BM aspirates ($n = 4$) by density centrifugation with Ficoll (Histopaque®-1077, Sigma). MNCs were seeded in tissue culture flasks at a density of 5×10^4 cells/ cm^2 in αMEM (Gibco) containing 10% FBS (Seraplus, Pan)

and 5 ng/ml bFGF (R&D Systems). After 4 days in culture, nonadherent hematopoietic cells were removed. Mesenchymal stem cells (MSCs) selected by adherence to cell culture plastic were further expanded with a change of medium every 3 days. Cells were passaged when 80% confluency was reached, detached using 1% trypsin-EDTA and reseeded at a density of 3×10^3 cells/ cm^2 . All MSCs were used from passages 2 to 4.

GFP-expressing HUVEC cells (HUVEC-GFP, Angio-Proteomie) were cultured on coated plates (Speed Coating Solution, PELOBiotech) in complete EGM-2 growth medium (Lonza) at a seeding density of 5×10^3 cells/ cm^2 and subcultured upon 80% confluency. Cells were used in passages 7–9.

2.2. Cell Labeling of MSCs. For live cell imaging, MSCs were labeled with PKH26® Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling (Sigma Aldrich) prior encapsulation in PRP gels. After detaching and counting of cells, the desired amount of cells were pipetted in a new falcon tube, washed with serum-free αMEM and centrifuged at 400g for 5 min. Cells were resuspended in Diluent C (Sigma) and filtered using a 40 μm cell strainer, and dye working solution was added (2 μl PKH26 Red/ 1×10^6 MSCs) and incubated for 5 min at room temperature. The labeling reaction was stopped by addition of FBS (SeraPlus), and cells were washed three times with medium and the cell count was determined.

2.3. Preparation of PRP. PRP was produced from human leukocyte-depleted thrombocyte concentrates (blood bank, Kantonsspital Graubünden, Chur, Switzerland) obtained by apheresis containing 1000×10^3 platelets/ μl and less than 2 leukocytes/ μl . In order to reach an approximately 10-fold increased platelet concentration compared to physiological blood concentration ($150\text{--}300 \times 10^3$ platelets/ μl), the platelet concentrates were centrifuged at 2000g for 20 min. The resulting pellet was resuspended in half of the original volume of platelet-depleted plasma, resulting in PRP with 2000×10^3 platelets/ μl . PRP was homogenized by sonication for 15 min and stored at -20°C until use. PRP samples ($n = 3$) were pooled and randomly matched to normalize for any donor-specific influences.

2.4. Encapsulation of Cells in PRP Gels. For the incorporation of cells into PRP gels, PRP aliquots (pool of 3 donors) were thawed. Cells were seeded in PRP gels at a density of 2.5×10^3 cells per μl gel. For time-lapse microscopy, a gel volume of 20 μl was seeded in μ -slides (μ -Slide Angiogenesis, Ibidi); for histology and gene expression analysis, 120 μl gels were prepared in 96-well plates. Monocultures of each cell type and cocultures were performed as follows: 100% MSCs (100 M), 100% HUVECs (100 H), 75% HUVECs–25% MSCs (75 HM), and 50% HUVECs–50% MSCs (50 HM). Cells were resuspended in PRP and gelation induced by addition of human thrombin (Tisseel, Baxter, final concentration 5 U/ml) and incubation at 37°C for 15–30 min. All gels were cultured under static conditions at 37°C and 5% CO_2 in

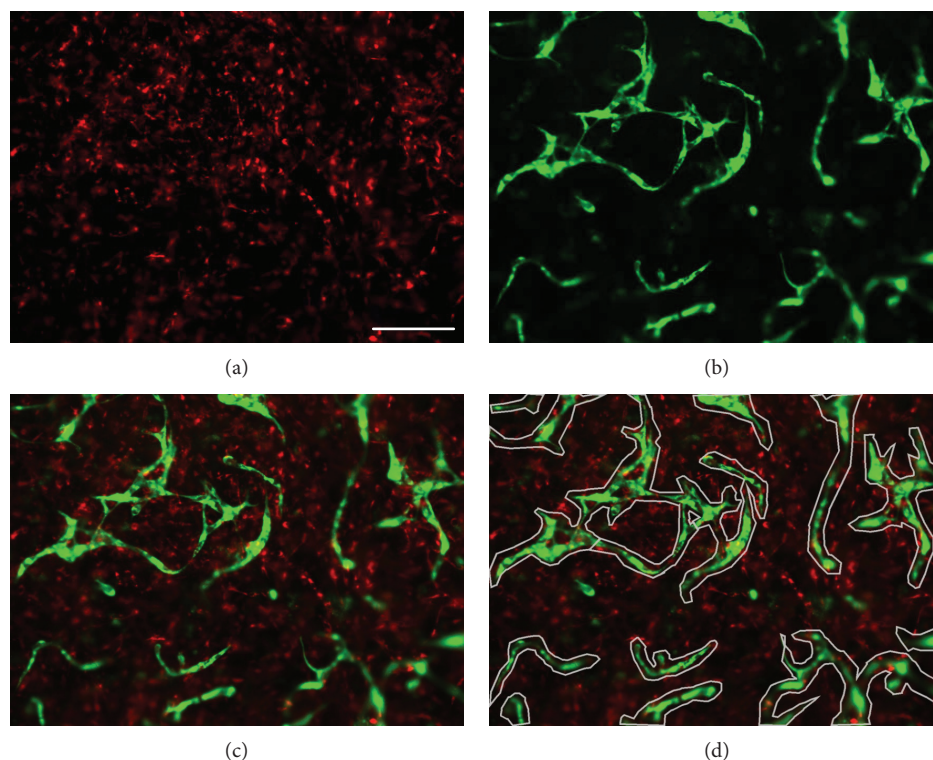


FIGURE 1: Network analysis. Image analysis method of PRP gels (seeding density: 2.5×10^3 cells/ μ l gel) with encapsulated PKH26 Red-labeled MSCs and GFP-HUVECs (green). Shown are representative pictures of a 50% HUVEC–50% MSC coculture after 14 days of culture. (a) Red-labeled MSCs, (b) GFP-labeled HUVECs, and (c) combined image. (d) Tubular structures are marked with the polygons (grey). Scale bar = 200 μ m.

EGM-2 growth medium (Lonza) with 5 μ M ϵ -aminocaproic acid (Sigma).

2.5. Microscopy and Image Analysis. The μ -slides with PRP gels were placed in an onstage incubator linked to an EVOS™ FL Auto Cell Imaging System (ThermoFisher Scientific). The cellular network formation capacity of HUVECs and MSCs in different proportions was analyzed using time-lapse microscopy. Regions of interest were defined before starting of the time lapse to allow tracking of individual cells. Pictures were taken every three hours for 14 days and medium changed every two days. At the end of the experiment, gels were imaged using a LSM 510 confocal imaging system, equipped with an argon and a HeNe1 laser, and mounted on an Axiovert200m microscope with ZEN black software (all Zeiss). Gels were imaged using the 10x and 20x objective at 1272×1272 and 2028×2028 pixel, respectively.

Image analysis of cellular networks was performed as described before [46]. In brief, the PKH26 Red-labeled MSCs (Figure 1(a)) were imaged with the RFP filter and GFP-HUVECs (Figure 1(b)) with the GFP filter (both ThermoFisher Scientific). The combined images of both fluorescences (Figure 1(c)) generated with the EVOS FL Auto Cell Imaging System (ThermoFisher Scientific) were imported in Axiovision Software (version 4.9.1, Zeiss). For quantification of cellular networks, any tubular structures were marked with a polygon area (Figure 1(d)) and the area measured. The image analysis was performed with the KS400 software

(Zeiss) and a custom-made macro. An individual threshold was set for the images of the red-labeled MSCs and GFP-HUVECs, and the area of the respective fluorescent dye within the region of interest was calculated.

2.6. Gene Analysis. Two sample gels were taken and pooled at different time points for gene expression analysis: day 0 (d0), day 7 (d7), and day 14 (d14). For RNA extraction, pooled gels were lysed in 1 ml TriReagent (Sigma) and supplemented with 5 μ l Polyacryl Carrier (Molecular Research Center) using a TissueLyser (Qiagen) at 25 Hz for 7 min. After centrifugation at 12000g for 10 min at 4°C, 10% bromochloropropane was added and samples were centrifuged at 12000g for 15 min at 4°C for phase separation. The upper, aqueous phase was collected, and RNA was precipitated using cooled 70% ethanol. RNeasy columns (Qiagen) were used for RNA purification according to the manufacturer's instructions. RNA purity and concentration was measured with the NanoDrop system (Witec GmbH). Samples were stored at -80°C until use.

cDNA was synthesized from 600 ng RNA using TaqMan® Reverse Transcription reagents (Applied Biosystems, Invitrogen) with random hexamer primers. Real-time PCR was performed using 6 ng cDNA and TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) using a Quant Studio 6 Flex machine (Applied Biosystems). Genes of interest were detected using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) for angiopoietin 1 (Hs00181613_m1), CD146/MCAM

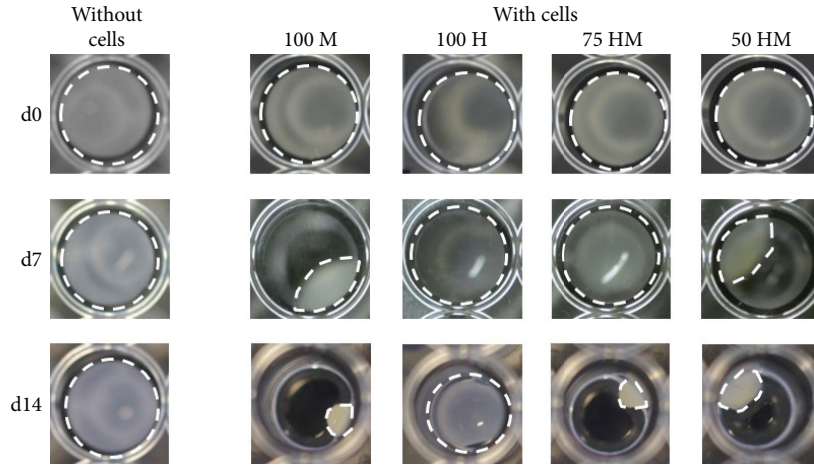


FIGURE 2: MSC mediated shrinkage of PRP gels. PRP gels (120 μ l) were seeded either with or without cells in a 96-well plate. Different types of cells were encapsulated (seeding density: 2.5×10^3 cells/ μ l gel): 100% MSCs (100 M), 100% HUVECs (100 H), 75% HUVECs–25% MSCs (75 HM), 50% HUVECs–50% MSCs (50 HM). Shown are representative pictures from day 0 (d0), day 7 (d7), and day 14 (d14). White dashed lines indicate the outline of gels. Shrinkage was only observed when MSCs were present in gels.

(Hs00174838), NG-2/CSPG 4 (Hs00426981_m1), connexin 43 (Hs00748445_s1), collagen IV (Hs00266237_m1), platelet-derived growth factor receptor β 1 (PDGFR β 1) (Hs00182163_m1), and Tie 2/Tek receptor (Hs00176096). Vascular endothelial growth factor A (VEGF A) was detected using forward primer 5'-GCC CAC TGA GGA GTC CAA CA-3', reverse primer 5'-TCCTATGTG CTG GCC TTG GT-3', and probe 5'-CAC CAT GCA GAT TAT GCG GAT CAA ACC T-3' (Microsynth). As an endogenous control, human 18s (Hs99999901_m1, ThermoFisher Scientific) was used. All samples were measured in duplicates, and data are presented relative to day 0 using the comparative $\Delta\Delta$ CT method.

2.7. Histology. Histological analysis was performed of gels with mono- and cocultures after 14 days of incubation. Gels were washed once with PBS and then placed in cryomolds with cryocompound Tissue Freezing Medium (Jung). After 15 min of incubation, samples were snap frozen in isopentane and stored at -20°C until use.

Snap-frozen samples were cut in 20 μ m thick slices. For immunohistology, cuts were fixed in 70% methanol for 15 min, rehydrated in dH_2O , and incubated for 30 min in 99.5% methanol with 30% H_2O_2 to block endogenous peroxidase activity. After blocking for unspecific antibody binding with horse serum (dilution 1:20) at room temperature for 60 min, the primary antibodies connexin 43 (ThermoFisher Scientific) and CD146 (abcam) were put onto the slides (final concentration: 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ connexin 43; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ CD146) and incubated for 30 min. Controls were incubated with PBS containing 0.1% Tween (PBST). Afterwards, slides were washed three times with PBST and incubated for 60 min with a secondary anti-mouse antibody (Vectastain ABC kit) at a dilution of 1:200. Another washing step ($3 \times$ PBST) was performed, the ABC complex of the Vectastain ABC Elite kit was applied, and slides were incubated for 30 min. After washing $3 \times$ with PBST, slides were incubated with ImmunPACT DAB in the dark for 4 min, and after several water changes

in dH_2O , slides were covered with Prolong Gold antifade reagent with DAPI (ThermoFisher Scientific). Slides were stored at room temperature until observation, and pictures were taken using an Axioplan2 microscope equipped with an AxioCamHRC camera and AxioVision software (Zeiss).

2.8. Statistics. All values are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis of data was performed with GraphPad Prism 7 software. Normal distribution of data was proven using the Shapiro-Wilk normality test. Statistical differences between experimental groups were tested by 2-way ANOVA and Tukey's post hoc test for multiple comparisons.

3. Results

3.1. Shrinkage of PRP Gels with Encapsulated MSCs. Figure 2 shows representative pictures of PRP gels with and without cells taken at different time points during the culture period. PRP gels without cells retained their original shape, while shrinkage occurred in cell-containing gels. After one week, most pronounced shrinkage could be observed in gels with MSCs monocultures, where gels shrank to nearly half of their original volume. Moreover, gels containing MSC-HUVEC cocultures (50 HM) demonstrated a reduced size, whereas HUVEC-containing gels were not affected. After two weeks, the shrinkage was still ongoing, however, at a slower rate. Again, shrinkage was most pronounced in gels containing the highest concentrations of MSCs, suggesting that this effect was dependent on the number of encapsulated MSCs.

3.2. Stable Cellular Networks Are Present in HUVEC-MSC Cocultures after 14 Days. Cellular organization within PRP gels was observed by time-lapse microscopy (Figure 3). In HUVEC monocultures, the formation of networks was present as early as 3 days after seeding. Branching and complexity of the networks increased until day 10. Afterwards, structures

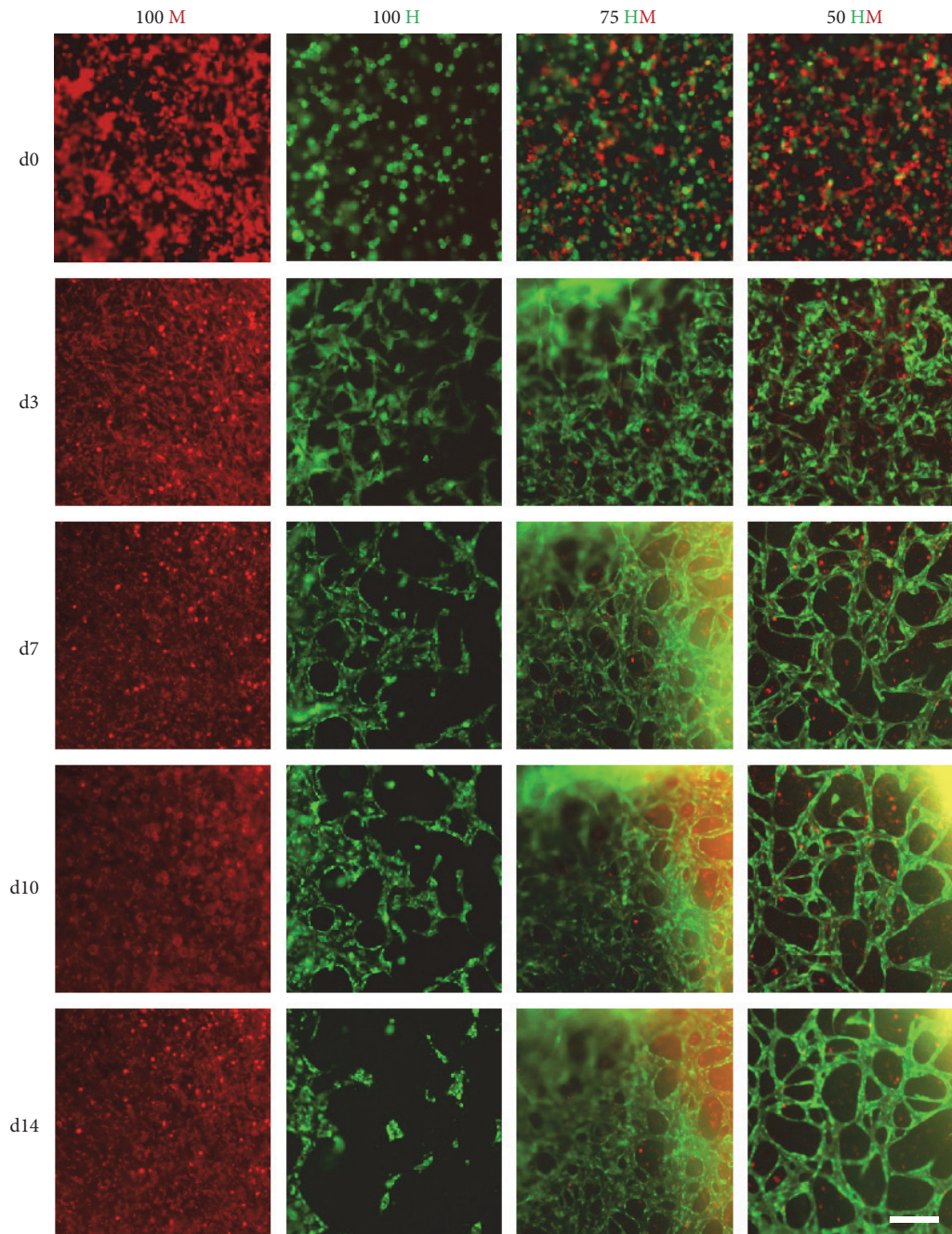


FIGURE 3: Time-lapse pictures of HUVEC and MSC mono- and cocultures. GFP-positive HUVECs (green) and PKH26 Red prestained MSCs were encapsulated in PRP (seeding density: 2.5×10^3 cells/ μ l gel) and time-lapse microscopy ran for two weeks. Four different cell proportions were seeded: 100% MSCs (100 M, first column), 100% HUVECs (100 H, second column), 75% HUVECs–25% MSCs (75 HM, third column), and 50% HUVECs–50% MSCs (50 HM, fourth column). Representative pictures of five time points are shown: day 0 (d0), day 3 (d3), day 7 (d7), day 10 (d10), and day 14 (d14). Cellular organization towards formation of tube-like networks starting from day 3 was observed in mono- and cocultures in PRP over time but not in the condition of 100% MSCs. After one week, a complex cellular network could be detected in both cocultures which was still apparent after two weeks. Cellular networks in HUVEC monocultures disintegrated after 10 days. Scale bar = 200 μ m.

became disorganized. In contrast to HUVEC monocultures, no networks could be detected in MSC monocultures. In both cocultures (75 HM and 50 HM), cellular networks were observed (Figure 3). Cells were well organized in networks already after 3 days. Defined networks could be observed after one week of culture. In contrast to the monocultures,

these networks seemed to be stable for 2 weeks. To note, the 3D nature of cellular networks often hindered a high-quality imaging. To address this issue, high-resolution images were taken with a confocal microscope at the end of the study after 14 days (Figure 4). The findings were in line with the observations from time-lapse imaging (Figure 3).

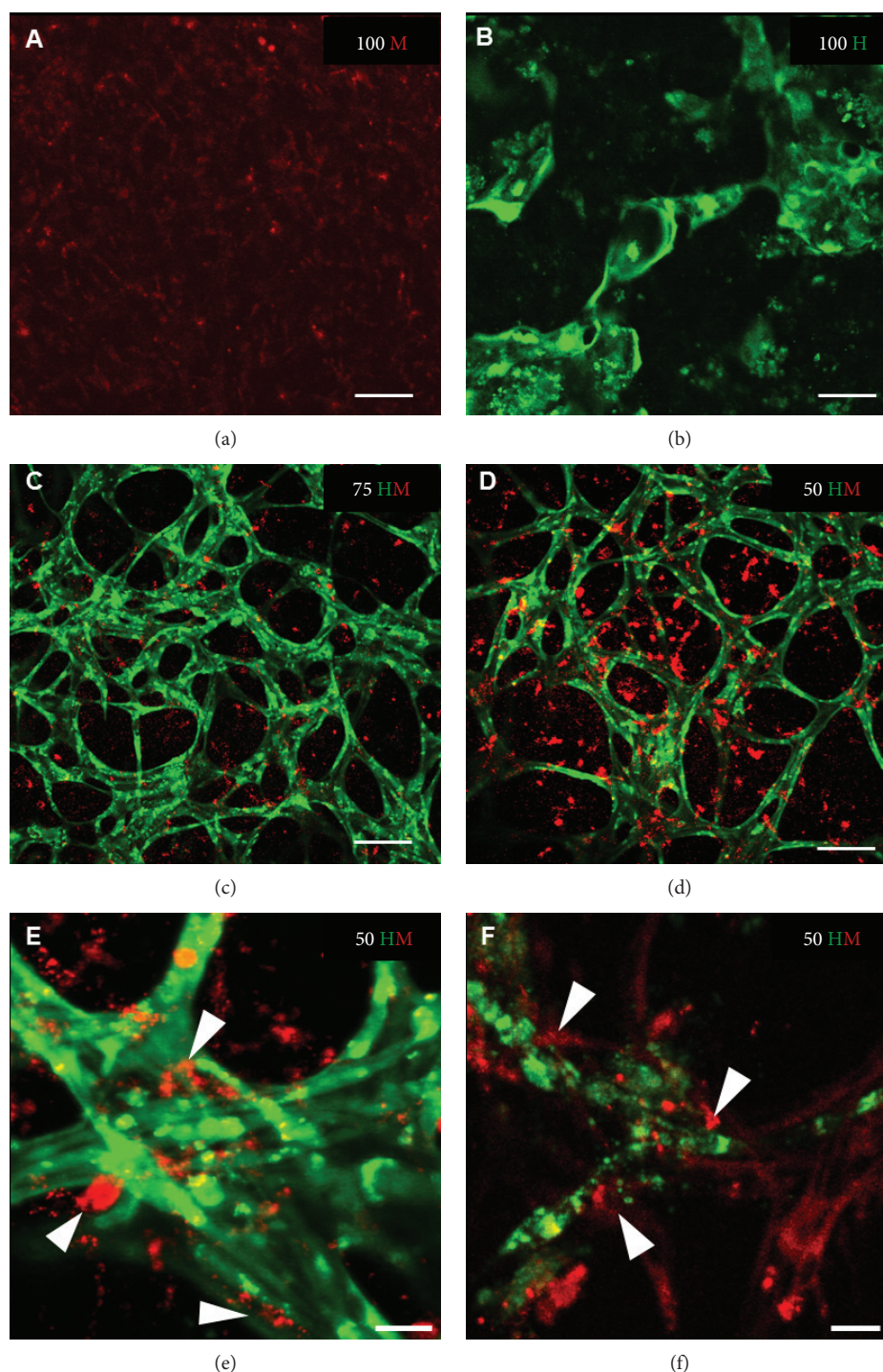


FIGURE 4: High-resolution images of HUVEC and MSC mono- and cocultures after 2 weeks. Representative images are shown from mono- and cocultures at day 14 after seeding (seeding density: 2.5×10^3 cells/ μ l gel) with (a) 100% MSCs (100 M); (b) 100% HUVECs (100 H); (c) 75% HUVECs-25% MSCs (75 HM); and (d-f) 50% HUVECs-50% MSCs (50 HM). Network formation occurred in 100 H and both cocultures but was only stable in the presence of MSCs which integrate in cellular networks as demonstrated in e and f (white arrow heads). Scale bar = 100 μ m (a-d), 25 μ m (e, f).

However, high magnification images revealed the contribution of MSCs to the networks (Figures 4(e) and 4(f)).

Based on time-lapse pictures, image analysis was performed to investigate further the formation of cellular networks in different culture conditions (Figure 5). First, we

measured the relative percentage of green and red fluorescence in the entire image, representing encapsulated HUVECs and MSCs, respectively (Figures 5(a) and 5(b)). A slight trend of increase in measured green fluorescent signal in the entire image was detected in all conditions by day 3

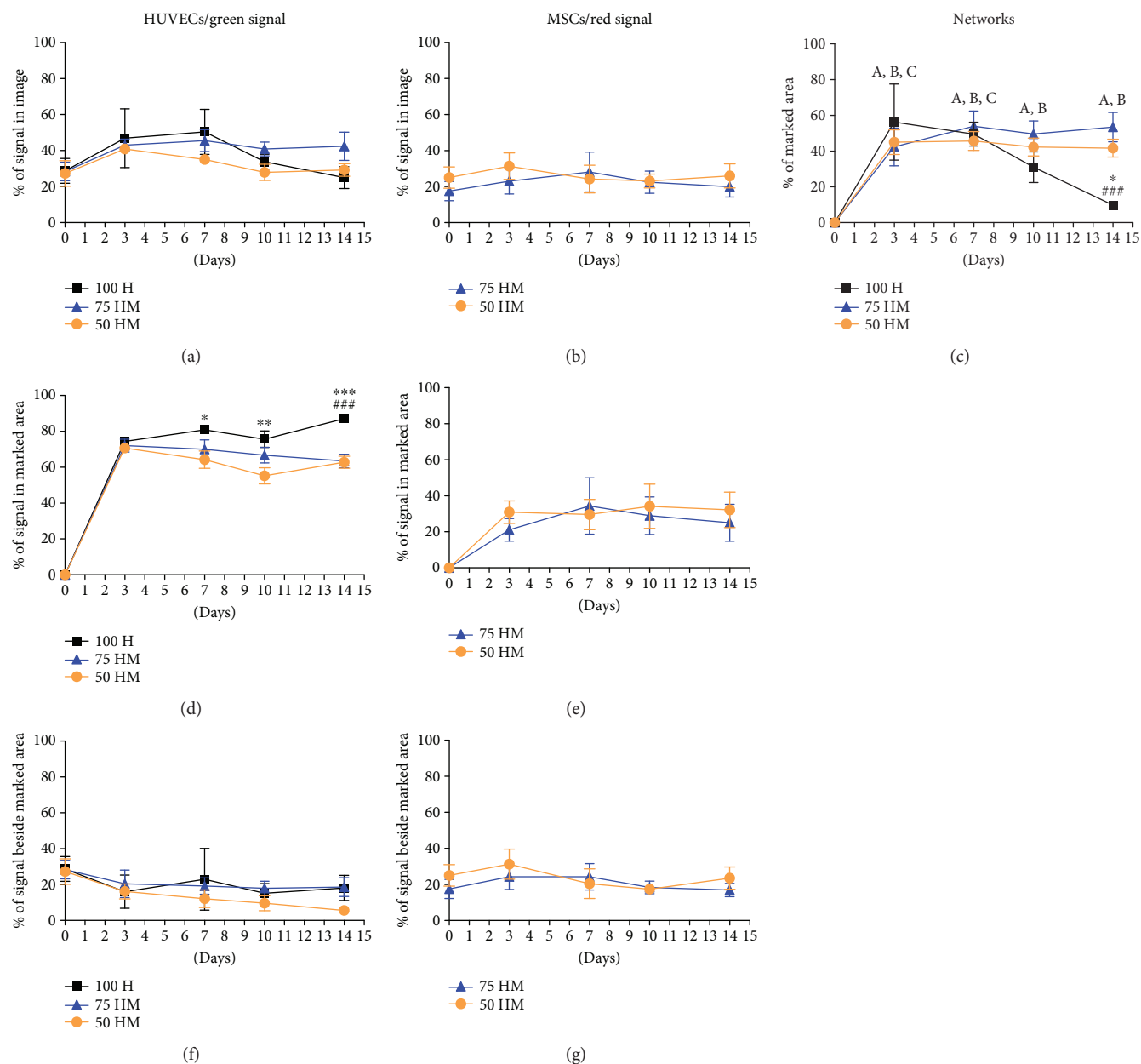


FIGURE 5: Analysis of cellular networks. Image analysis was performed of mono- and cocultures (100% HUVECs (100 H), 75% HUVECs–25% MSCs (75 HM), and 50% HUVECs–50% MSCs (50 HM)) in PRP (seeding density: 2.5×10^3 cells/ μ l gel) ($n = 3$). Networks were measured by manually marking cellular networks. The relative percentage of prestained green (HUVECs) and red (MSCs) cells was investigated for day 0, day 3, day 7, day 10, and day 14 in the following regions: relative percentage of green or red signal in the entire image (a, b), relative percentage of green or red signal in marked network area (c), relative percentage of green or red signal in marked network area (d, e), and the relative percentage of green or red signal beside marked network area (f, g). For 100 H monocultures, networks decreased after one week whereas in both cocultures, networks were present and stable after two weeks (c). Cellular networks were mainly made out of HUVECs (d), with a minor contribution of MSCs (e). Two-way ANOVA with Tukey's post hoc test for multiple comparison was applied to test for significant differences over time (compared to day 0: (A) 50 HM $p < 0.01$ (all time points); (B) 75 HM $p < 0.01$ (day 3) and $p < 0.001$ (day 7–14); and (C) 100 H $p < 0.001$ (day 3) and $p < 0.01$ (day 7)) and between different culture conditions (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to 50 HM, ### $p < 0.001$ compared to 75 HM). $n = 3$.

(Figure 5(a)), raising from $28.7 \pm 6.9\%$ to $46.9 \pm 16.4\%$, from $28.4 \pm 5.2\%$ to $43 \pm 3.3\%$, and from $27.3 \pm 7\%$ to 40.9% in 100 H, 75 HM, and 50 HM cultures, respectively (all $p > 0.05$). From there on, signals remained at a constant level, or even decreased to baseline levels with $25 \pm 6\%$, $42 \pm 7.9\%$, and $29 \pm 3.5\%$ at day 14 for 100 H, 75 HM, and

50 HM cultures, respectively. A similar pattern was observed for the red fluorescence signal, that is, the MSCs (Figure 5(b)). These findings demonstrate that over the course of the experiment, cells were apparent at least in a similar concentration as at day 0, suggesting that PRP offers an appropriate environment for cells over a time of 2 weeks.

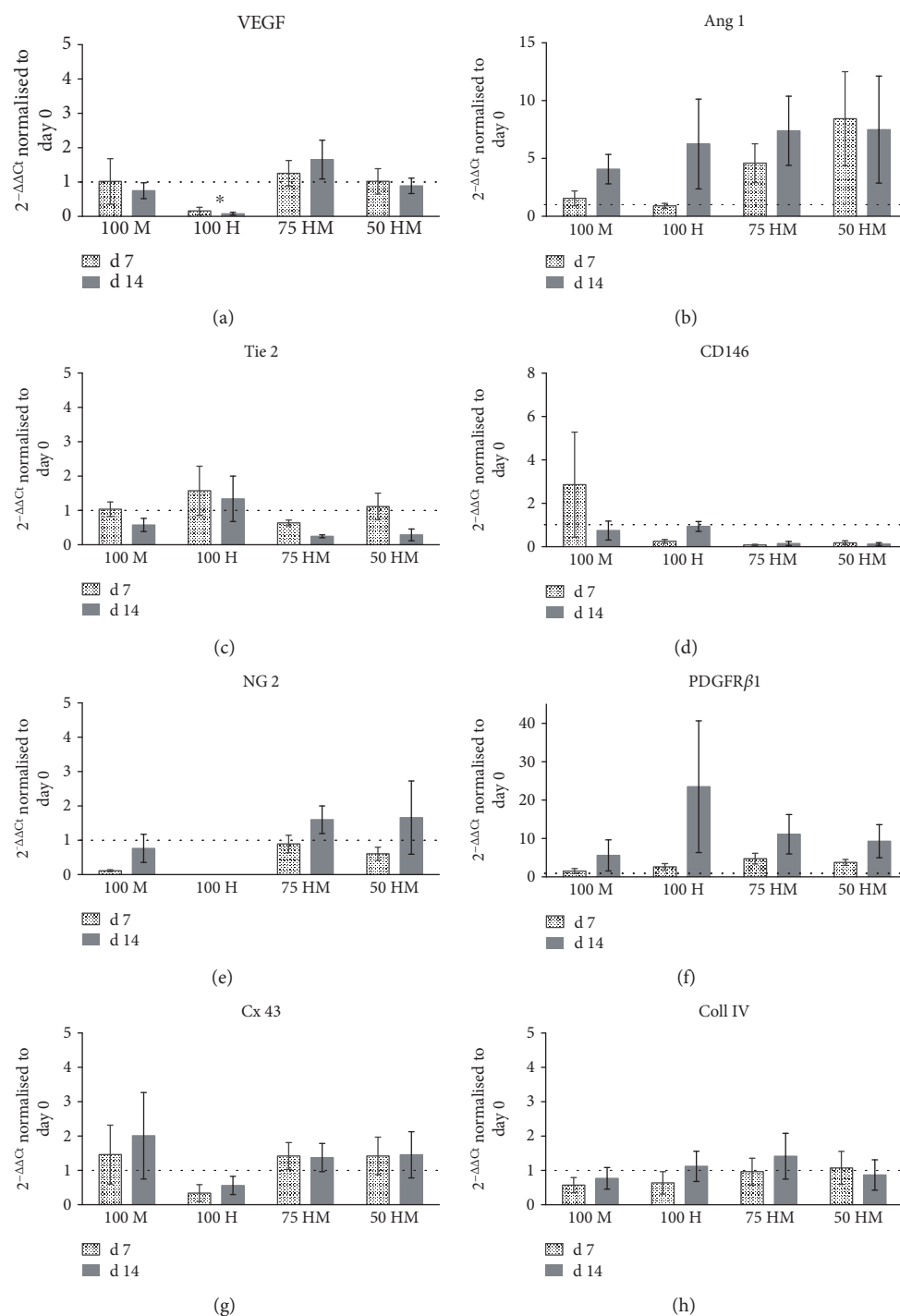


FIGURE 6: Gene expression of HUVEC and MSC mono- and cocultures in PRP at days 7 and 14. Gene expression (normalized to 18s expression) at day 7 and day 14 is displayed as fold change to day 0. Dashed lines indicate a fold change of 1, that is, unchanged gene expression. MSC monolayers (100 M), HUVEC monolayers (100 H), and cocultures 75% HUVECs–25% MSCs (75 HM) and 50% HUVECs–50% MSCs (50 HM) were investigated (seeding density: 2.5×10^3 cells/ μ l gel). (a) Gene expression of VEGF, showing downregulation in 100H cultures. (b) An upregulation of angiopoietin-1 (Ang 1), a crucial growth factor of angiogenic processes, was detected in all conditions at day 14 as well as in the cocultures on day 7. (c) Gene expression of Tie 2, one of the receptors binding Ang 1. (d–f) Depicted is the expression of pericyte markers CD146, NG 2, and PDGFR β 1, respectively. CD146 was upregulated at day 7 in MSC monolayers (d). At day 7, both cocultures showed a higher NG 2 expression compared to monolayers (e). PDGFR β 1 upregulations were detectable in all cultures at day 14 (f). MSCs upregulated connexin 43 (g), indicating the formation of gap junctions, whereas no differential regulation was observed for collagen IV (h). Two-way ANOVA with Tukey's post hoc test for multiple comparison was applied to test for differences between experimental groups; * $p < 0.05$. $n = 3$.

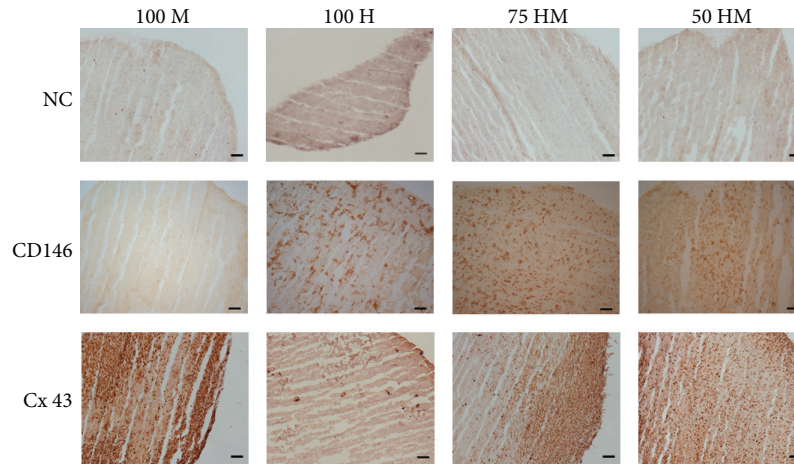


FIGURE 7: Immunohistology for CD146 and connexin 43 (Cx 43) of HUVEC and MSC mono- and cocultures in PRP at day 14. Immunohistology was performed on cryosections of mono- and cocultures with 100% MSCs (100 M), 100% HUVECs (100 H), 75% HUVECs–25% MSCs (75 HM), and 50% HUVECs–50% MSCs (50 HM) (seeding density: 2.5×10^3 cells/ μ l gel). Negative controls (NC) are shown in the first row. In comparison to the NC, positive signals of CD 146 were detectable in the presence of HUVECs, whereas connexin 43 protein levels were only apparent in a mono- or coculture with MSCs. Scale bars = 100 μ m.

Next, we analyzed the efficiency of network formation in the different culture conditions (Figure 5(c)). Results showed that the main parts of networks were built within the first three days in all conditions, with networks covering $56.3 \pm 21.3\%$, $42.4 \pm 10.6\%$, and $45 \pm 7\%$ of the entire image area in 100 H, 75 HM, and 50 HM cultures, respectively (all $p < 0.01$ compared to day 0). For 75 HM and 50 HM cocultures, a stable high area of cellular networks which remained constant over time ($p < 0.01$ compared to day 0 for all time points) was observed with only minimal differences between both culture conditions. While the speed of initial network formation as well as the percentage of formed networks in HUVEC cultures were comparable to cocultures until day 7 ($p < 0.01$ compared to day 0 for day 3 and day 7), networks significantly decreased after 10 days, revealing similar concentrations as on day 0 ($p > 0.05$). After 14 days, networks were only observed in the cocultures with MSCs ($53.5 \pm 8.3\%$ for 75 HM and $41.7 \pm 5\%$ for 50 HM, versus $9.8 \pm 1\%$ for 100 H), which led to the suggestion that MSCs play a fundamental role in the stabilization processes of newly formed structures.

Finally, we investigated the contribution of HUVECs (Figure 5(d)) or MSCs (Figure 5(e)) to the marked network area. Analysis revealed that most HUVECs were involved in the formation of networks in all conditions with a relative contribution to the networks ranging from 55% to 87% depending on the culture condition and time point. The fast increase of the green signal measured in networks (Figure 5(d)) affirms again the speed of network formation in all conditions. Although cellular networks were less stable in 100 H monocultures, the contribution of HUVECs to the networks in these cultures was higher compared to cocultures reaching statistical significance from day 7 on (day 7: 100 H $80.9 \pm 0.2\%$ versus 50 HM $64.2 \pm 4.8\%$ ($p < 0.05$); day 10: 100 H $75.7 \pm 4.6\%$ versus 50 HM $55.2 \pm 4.6\%$ ($p < 0.01$); and day 14: 100 H $87 \pm 0.9\%$ versus 75 HM $63.4 \pm 3.8\%$

($p < 0.001$) versus 50 HM $62.8 \pm 3.3\%$ ($p < 0.001$)). With 21–34% of the network area covered by red fluorescence signal, MSCs contributed to the networks as well, however, to a lesser extent as HUVECs.

The fluorescence signal detected outside the marked network area (Figures 5(f) and 5(g)) reflects the timely recruitment of cells to the networks at a merely constant total cell number.

3.3. Analysis of Angiogenic Gene Expression in PRP Gels Containing Cellular Networks. All PRP gels were analyzed for the gene expression related to angiogenesis and vascularization at day 7 and day 14 (Figure 6). First, we measured the expression of VEGF (Figure 6(a)). Although VEGF plays an important role in terms of new vessel formation, data shows no upregulation of VEGF gene expression in PRP gels. However, in contrast to HUVEC monocultures, where VEGF expression was downregulated, gene expression remained stable in cocultures (100 H versus 75 HM $p < 0.05$ at day 14) and MSC monocultures. Of note, the lack of upregulation of VEGF might be related to the fact that both the feeding medium EGM-2 and PRP itself contain high levels of VEGF.

Another main growth factor involved in angiogenic processes is angiopoietin 1, which showed a trend of upregulation in all conditions (ranging from a fold change of 4 to 7 in the different culture conditions, $p > 0.05$) at day 14 (Figure 6(b)). In line with the efficient formation of cellular networks in cocultures, angiopoietin 1 was specifically upregulated in these cultures at day 7 (75 HM fold change: 4.6 ± 1.7 ; 50 HM fold change 8.4 ± 4) which was however not statistically significant ($p > 0.05$). In contrast to these findings, the angiopoietin receptor Tie 2 did not show a similar pattern as angiopoietin 1 (Figure 6(c)). While Tie 2 gene expression was unchanged in most culture conditions, a slight downregulation was detected in cocultures at day 14 ($p > 0.05$).

Pericytes, which are closely related to MSCs, are involved in the stabilization of newly formed vessels. Therefore, we analyzed the expression of CD146, NG-2, and PDGFR β 1 as putative pericyte markers (Figures 6(d)–6(f)). For CD146, gene expression of MSC monocultures revealed a slight upregulation on day 7 ($p > 0.05$, Figure 6(d)). In contrast, NG-2 gene expression, which was completely absent in HUVEC monocultures, was downregulated in the MSC monoculture and tended to be stable in cocultures (fold change: 100 M 0.1 versus 75 HM 0.9 ± 0.3 and 50 HM 0.6 ± 0.2 , all $p > 0.05$). Besides the lack of NG-2 expression in HUVEC monocultures, no differences in NG-2 gene regulation were observed at day 14. A trend of upregulation was apparent for PDGFR β 1 at day 14 with large variations between different cell donors (Figure 6(f)). The highest upregulation of PDGFR β 1 was detected in HUVEC monocultures (fold change 23.5 ± 17.2 , $p > 0.05$).

Apart from growth factors and their receptors, cell-to-cell contacts, as well as basal membrane proteins play an important role in angiogenesis. Connexin 43 is involved in gap junction cell-to-cell-contacts. A tendency for a slight upregulation of connexin 43 was observed in MSC monocultures (Figure 6(g)), whereas no changes were apparent in collagen IV gene expression, a basal membrane protein (Figure 6(h)).

3.4. Immunohistological Analysis of CD146 and Connexin 43. To evaluate specific markers on protein level, immunohistology was performed on cryosections for CD-146, a pericyte marker, and connexin 43, a cell-to-cell contact protein (Figure 7). CD146 was detectable in the presence of HUVECs whereas MSCs alone showed similar results than negative controls indicating that MSC alone did not express CD146 at a detectable level in 3D culture. Connexin 43 was only present in mono- or cocultures containing MSCs.

4. Discussion

In the context of musculoskeletal regeneration, for example, bone defects, limitations in the healing process often occur due to an insufficient blood supply at the defect site. Revascularization involves angiogenic sprouting of vessels from the surrounding tissue, which frequently does not occur in an appropriate time, as the ingrowth of vessels is a long-term process [3]. Therefore, prevascularized implants have been suggested as a promising treatment strategy [6–15]. The aim of this study was to create an autologous cell delivery system for prevascularized constructs within PRP hydrogels.

In the present study, we showed that PRP is indeed a suitable delivery system for HUVECs, MSCs, and cocultures of both. Cells survived for a period over 14 days which is in line with our previous work [33] demonstrating the viability of MSCs encapsulated in PRP gels for one week.

We noticed that, particularly in the presence of MSCs, PRP gels shrank over time. Upon *in vivo* implantation, shrinkage of gels and the herewith associated volume loss may be a limitation for the use of PRP as a cell delivery system. However, shrinkage of gels was not directly related to the formation of networks. In fact, cell assembly to

tube-like structures occurred as early as 3 days in cell culture, and thereby, this preceded the significant reduction of gel volume observed after 7 days. This indicates that early implantation of prevascularized PRP gels would be desirable. Short *in vitro* culture periods would also be most convenient for clinical applications. In addition, mesenchyme-driven condensation of soft matrix has been reported as an important step in the formation of organ buds and the regeneration of functional vascularized tissues [47]. Therefore, the observed shrinkage, which in line with findings from Takebe et al. was mainly driven by MSCs, may be considered as natural step in matrix remodeling.

We observed that PRP gels with cocultures of HUVECs and MSCs formed networks as early as 3 days after cell encapsulation, which were still stable after 2 weeks. This fast network formation might be stimulated by the growth factors secreted from PRP gels [33]. Indeed, since cells were resuspended in PRP upon activation with thrombin, they were immediately exposed to the growth factor release.

In agreement with earlier studies [10, 11, 48], cells (HUVECs and MSCs) took advantage of coculturing. In contrast, no stable networks could be detected in HUVEC monocultures. The maturation of new blood vessels requires the recruitment of mural cells (pericytes or smooth muscle cells) [49] to be stable in the long term. Pericytes are found as single cells, distributed at discontinuous intervals along the basal membrane, which they share with endothelial cells [50]. During angiogenesis, pericytes are stimulated for migration and proliferation before they are recruited to new vessels to contribute to stability. Recently, we have investigated the plasticity of MSCs and their ability to differentiate into a pericyte-like phenotype [51]. This study showed that MSCs upregulated the expression of pericyte markers such as NG-2 and CD146 when they are in direct coculture with bone marrow-derived EPCs [51]. Similarly, Goerke and colleagues showed differentiation of MSCs towards a smooth muscle cell phenotype when coincubated with blood derived EPCs [52]. In line with these findings, MSC supplementation has been proven to promote the formation of stable vessels in various *in vitro* and *in vivo* studies [9, 10, 13, 15, 23, 53]. For example, our previous work showed that tissue-engineered constructs composed of EPC-MSC cocultures delivered in PU scaffold in the presence of PRP, promoted vascularization upon subcutaneous implantation [15]. Furthermore, we observed that MSCs indeed display a pericyte-like phenotype in these cocultures [23].

Pericytes, best defined based on their *in vivo* localization, express several surface markers including CD146 [54, 55], NG-2 [56], α -SMA [57], and PDGFR β 1 [58], which is however dependent on their localization [59]. In the present study, we analyzed the gene expression of CD146, NG-2, and PDGFR β 1. Results gave evidence for a differentiation of MSCs into a pericyte-like phenotype as described above. This was particularly obvious by a much higher expression of NG-2 in cocultures in comparison to HUVEC monocultures. Moreover, we detected a general upregulation of PDGFR β 1 in all cultures. The PDGF β /PDGFR β pathway is critically important for the expansion of the pericyte

population and pericyte migration along growing vessels [60]. Therefore, upregulation of its gene expression in cocultures might reflect the differentiation and recruitment of MSCs towards the vessel-like structures in PRP gels. Strikingly, also HUVEC monocultures showed an upregulation of PDGFR β gene expression. Although, endothelial cells usually do not express PDGFR β 1 in high quantities and the relevance of this receptor is unclear in resting endothelium, the current literature provides evidence that PDGFR β is upregulated under circumstances of angiogenesis [61–63]. Therefore, we hypothesize that PDGFR β upregulation in HUVEC cultures might be caused by the formation of tube-like networks and possibly might be a response to the absence of supporting mural cells. Taken together, in the current study, we only detected a relatively mild increase in the expression of pericyte marker missing statistical significance. Since changes in gene expression are generally transient, it is likely that we might have missed certain changes because only two time points were assessed.

Various signaling pathways are involved in angiogenesis, and it would be of most interest to perform a broad screening of factors involved in the proangiogenic functions of PRP. In this first evaluation of PRP gel as a proangiogenic cell delivery system, we however focused on few key players in angiogenesis; future studies will thoroughly investigate the mechanism of tube-like structure formation in PRP gels. One major growth factor is angiopoietin 1 which acts as a survival signal for endothelial cells and further promotes vascular stabilization by facilitating pericyte recruitment [64, 65]. Here, we show a tendency of angiopoietin 1 upregulation, with the highest upregulations in cocultures of HUVECs and MSCs on day 7 and day 14. However, Tie 2, which is constitutively activated by basal angiopoietin 1 expression [66], was not expressed. An explanation might be the general high expression of Tie 2 on surfaces of mature endothelial cells (HUVECs) which could be seen in gene expression in monoculture conditions. In addition, Tie 2 expression may be delayed to angiopoietin 1 and therefore not be seen at the analysis time points.

In respect of angiogenesis, VEGF is another crucial growth factor for inducing new vessel formation. The fact that the applied growth medium EGM-2 as well as PRP itself already contains VEGF might be a reason why we could not find an upregulation of VEGF gene expression. Moreover, previous studies reported comparable findings since it was shown that new vessel formation is not generally associated with changes in VEGF expression [67, 68].

Moreover, we investigated the expression of the specific cell-to-cell contact protein connexin 43 and found that it was expressed in dependence of MSCs, especially on day 14. Connexin 43 is part of gap junctions and expressed on endothelial cells [69]. In addition, it was previously shown that MSCs overexpressing connexin 43 promote neovascularization [70]. Furthermore, Wang et al. proposed that connexin 43 may act as a potential target for improving the therapeutic efficacy of MSC transplantation. In line with that, we found MSC-dependent expression of connexin 43 on both gene and protein levels. Since vascular network structures were only stable in dependence of MSCs, this leads to

the hypothesis that connexin 43 expressed on MSCs may contribute to stabilization processes of cellular networks.

In this study, we present for the first time an autologous delivery system for prevascularized constructs. PRP can easily be harvested by drawing blood which may facilitate the next steps to clinical applications. The fact that PRP is more and more used in clinical studies [29, 32, 71] emphasizes its importance in musculoskeletal healing processes. We demonstrate that PRP has a great potential to support neovascularization, which is a major clinical challenge, particularly in the context of bone repair. While the study confirmed PRP as autologous and proangiogenic cell delivery system, the endothelial cell source (HUVECs) used here cannot be obtained autologously. However, at this stage, we focused on the investigation of these proangiogenic properties of PRP; future studies will address the use of autologous cell sources such as peripheral blood or bone marrow-derived EPCs.

Since the current study is an *in vitro* experiment, it cannot foresee how cellular networks will sustain in an *in vivo* environment and how cell-to-cell communication and a supposedly fast *in vivo* degradation of PRP will impact the stability of tubular structures as well as the anastomosis to the host vascular system. In addition, future studies should be conducted to optimize the system for the application *in vivo*. These studies should address the implantation technique and time point as well as cell seeding densities. Eventually, it will be interesting to test whether a delivery of cells is necessary or if the chemoattractive and proangiogenic properties of PRP themselves may be sufficient to support neovascularization.

5. Conclusion

To our knowledge, this is the first study to report on an autologous cell delivery system for the delivery of prevascularized structures. Our study shows stable formation of cellular networks by combining HUVECs and MSCs in one culture system. The contribution of MSCs, possibly differentiating into a pericyte-like phenotype, may be crucial for the stabilization of cellular networks.

In conclusion, we demonstrate that PRP can be used as an autologous, proangiogenic cell delivery system promoting early neovascularization.

Disclosure

Marietta Herrmann - Current address: IZKF Group Tissue Regeneration in Musculoskeletal Diseases, Orthopedic Center for Musculoskeletal Research, University Würzburg, Germany.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interests.

Acknowledgments

The authors wish to thank Andri Hassler and Maria Hildebrand for their technical assistance. This work was funded by the AO Foundation, and a PROMOS Fellowship

of University Regensburg was awarded to Jessica Zahn. This work was also supported by the German Research Foundation (DFG) within the funding program Open Access Publishing.

References

- [1] R. A. D. Carano and E. H. Filvaroff, "Angiogenesis and bone repair," *Drug Discovery Today*, vol. 8, pp. 980–989, 2003.
- [2] E. O. Johnson, T. Troupis, and P. N. Soucacos, "Tissue-engineered vascularized bone grafts: basic science and clinical relevance to trauma and reconstructive microsurgery," *Microsurgery*, vol. 31, pp. 176–182, 2011.
- [3] M. W. Laschke and M. D. Menger, "Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation," *European Surgical Research*, vol. 48, pp. 85–92, 2012.
- [4] F. A. Auger, L. Gibot, and D. Lacroix, "The pivotal role of vascularization in tissue engineering," in *Annual Review of Biomedical Engineering*, M. L. Yarmush, Ed., vol. 15, pp. 177–200, Annual Reviews, Palo Alto, 2013.
- [5] M. W. Laschke, Y. Harder, M. Amon et al., "Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes," *Tissue Engineering*, vol. 12, pp. 2093–2104, 2006.
- [6] P. L. Tremblay, V. Hudon, F. Berthod, L. Germain, and F. A. Auger, "Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice," *American Journal of Transplantation*, vol. 5, pp. 1002–1010, 2005.
- [7] M. W. Laschke, B. Vollmar, and M. D. Menger, "Inosculation: connecting the life-sustaining pipelines," *Tissue Engineering Part B, Reviews*, vol. 15, pp. 455–465, 2009.
- [8] M. W. Laschke and M. D. Menger, "Prevascularization in tissue engineering: current concepts and future directions," *Biotechnology Advances*, vol. 34, pp. 112–121, 2016.
- [9] J. Rouwkema, J. Boerde, and C. A. BlitterswijkVan, "Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct," *Tissue Engineering*, vol. 12, pp. 2685–2693, 2006.
- [10] O. Tsigkou, I. Pomerantseva, J. A. Spencer et al., "Engineered vascularized bone grafts," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, pp. 3311–3316, 2010.
- [11] L. L. Ren, D. Y. Ma, B. Liu et al., "Preparation of three-dimensional vascularized MSC cell sheet constructs for tissue regeneration," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 301279, 10 pages, 2014.
- [12] F. E. Freeman, A. B. Allen, H. Y. Stevens, R. E. Guldborg, and L. M. McNamara, "Effects of in vitro endochondral priming and pre-vascularisation of human MSC cellular aggregates in vivo," *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 6, p. 218, 2015.
- [13] X. Chen, A. S. Aledia, S. A. Popson, L. Him, C. C. Hughes, and S. C. George, "Rapid anastomosis of endothelial progenitor cell-derived vessels with host vasculature is promoted by a high density of cotransplanted fibroblasts," *Tissue Engineering Part A*, vol. 16, pp. 585–594, 2010.
- [14] H. Pang, X. H. Wu, S. L. Fu et al., "Prevascularisation with endothelial progenitor cells improved restoration of the architectural and functional properties of newly formed bone for bone reconstruction," *International Orthopaedics*, vol. 37, pp. 753–759, 2013.
- [15] M. Herrmann, A. Binder, U. Menzel, S. Zeiter, M. Alini, and S. Verrier, "CD34/CD133 enriched bone marrow progenitor cells promote neovascularization of tissue engineered constructs in vivo," *Stem Cell Research*, vol. 13, pp. 465–477, 2014.
- [16] F. S. Frueh, T. Spater, N. Lindenblatt et al., "Adipose tissue-derived microvascular fragments improve vascularization, lymphangiogenesis, and integration of dermal skin substitutes," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 137, pp. 217–227, 2017.
- [17] E. Groppa, S. Brkic, E. Bovo et al., "VEGF dose regulates vascular stabilization through semaphorin3A and the neuropilin-1(+) monocyte/TGF-1 paracrine axis," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 7, pp. 1366–1384, 2015.
- [18] L. Senzel, D. V. Gnatenko, and W. F. Bahou, "The platelet proteome," *Current Opinion in Hematology*, vol. 16, pp. 329–333, 2009.
- [19] R. P. Zahedi, U. Lewandrowski, J. Wiesner et al., "Phosphoproteome of resting human platelets," *Journal of Proteome Research*, vol. 7, pp. 526–534, 2008.
- [20] M. Ferrari, S. Zia, M. Valbonesi et al., "A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac-surgery," *The International Journal of Artificial Organs*, vol. 10, pp. 47–50, 1987.
- [21] R. M. Thushara, M. Hemshekhar, Basappa, K. Kemparaju, K. S. Rangappa, and K. S. Girish, "Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: an outlook," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 93, pp. 149–158, 2015.
- [22] S. Lippross, M. Loibl, S. Hoppe et al., "Platelet released growth factors boost expansion of bone marrow derived CD34(+) and CD133(+) endothelial progenitor cells for autologous grafting," *Platelets*, vol. 22, pp. 422–432, 2011.
- [23] F. Duttenehoefer, R. Lara de Freitas, T. Meury et al., "3D scaffolds co-seeded with human endothelial progenitor and mesenchymal stem cells: evidence of prevascularisation within 7 days," *European Cells & Materials*, vol. 26, pp. 49–64, 2013, discussion -5.
- [24] R. E. Marx, "Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?," *Implant Dentistry*, vol. 10, pp. 225–228, 2001.
- [25] C. Cavallo, G. Filardo, E. Mariani et al., "Comparison of platelet-rich plasma formulations for cartilage healing: an in vitro study," *The Journal of Bone and Joint Surgery American*, vol. 96, pp. 423–429, 2014.
- [26] X. Xie, C. Zhang, and R. S. Tuan, "Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 16, p. 204, 2014.
- [27] L. Andriolo, B. MatteoDi, E. Kon, G. Filardo, G. Venieri, and M. Marcacci, "PRP augmentation for ACL reconstruction," *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 371746, 15 pages, 2015.
- [28] H. J. Braun, A. S. Wasterlain, and J. L. Dragoo, "The use of PRP in ligament and meniscal healing," *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, vol. 21, pp. 206–212, 2013.
- [29] B. MatteoDi, M. Loibl, L. Andriolo et al., "Biologic agents for anterior cruciate ligament healing: a systematic review," *World Journal of Orthopedics*, vol. 7, pp. 592–603, 2016.
- [30] J. F. Kaux, P. V. Drion, A. Colige et al., "Effects of platelet-rich plasma (PRP) on the healing of Achilles tendons of rats," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 20, pp. 748–756, 2012.
- [31] G. Filardo, E. Kon, B. MatteoDi et al., "Platelet-rich plasma injections for the treatment of refractory Achilles tendinopathy: results at 4 years," *Blood Transfusion*, vol. 12, pp. 533–540, 2014.

- [32] A. Rowden, P. Dominici, J. D'Orazio et al., "Double-blind, randomized, placebo-controlled study evaluating the use of platelet-rich plasma therapy (PRP) for acute ankle sprains in the emergency department," *The Journal of Emergency Medicine*, vol. 49, pp. 546–551, 2015.
- [33] J. M. Jalowiec, M. D'Este, J. J. Bara et al., "An in vitro investigation of platelet-rich plasma-gel as a cell and growth factor delivery vehicle for tissue engineering," *Tissue Engineering Part C, Methods*, vol. 22, pp. 49–58, 2016.
- [34] M. Loibl, S. Lang, G. Brockhoff et al., "The effect of leukocyte-reduced platelet-rich plasma on the proliferation of autologous adipose-tissue derived mesenchymal stem cells," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 61, pp. 599–614, 2016.
- [35] M. Loibl, S. Lang, A. Hanke et al., "Leukocyte-reduced platelet-rich plasma alters protein expression of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 138, pp. 397–208, 2016.
- [36] C. E. Martinez, S. A. Gonzalez, V. Palma, and P. C. Smith, "Platelet-poor and platelet-rich plasma stimulate bone lineage differentiation in periodontal ligament stem cells," *Journal of Periodontology*, vol. 87, pp. E18–E26, 2016.
- [37] G. Gobbi and M. Vitale, "Platelet-rich plasma preparations for biological therapy: applications and limits," *Operative Techniques in Orthopaedics*, vol. 22, pp. 10–15, 2012.
- [38] D. M. Dohan Ehrenfest, I. Andia, M. A. Zumstein, C.-Q. Zhang, N. R. Pinto, and T. Bielecki, "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*, vol. 4, pp. 3–9, 2014.
- [39] K. Mautner, G. A. Malanga, J. Smith et al., "A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature," *PM & R*, vol. 7, pp. S53–S59, 2015.
- [40] A. Lubkowska, B. Dolegowska, and G. Banfi, "Growth factor content in PRP and their applicability in medicine," *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, vol. 26, pp. 3S–22S, 2012.
- [41] S. G. Boswell, L. V. Schnabel, H. O. Mohammed, E. A. Sundman, T. Minas, and L. A. Fortier, "Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 42, pp. 42–49, 2014.
- [42] A. D. Mazzocca, M. B. R. McCarthy, D. M. Chowanec et al., "The positive effects of different platelet-rich plasma methods on human muscle, bone, and tendon cells," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 40, pp. 1742–1749, 2012.
- [43] E. A. Sundman, B. J. Cole, V. Karas et al., "The anti-inflammatory and matrix restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 42, pp. 35–41, 2014.
- [44] J. Kurita, M. Miyamoto, Y. Ishii et al., "Enhanced vascularization by controlled release of platelet-rich plasma impregnated in biodegradable gelatin hydrogel," *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 92, pp. 837–844, 2011, discussion 44.
- [45] J. Zahn, M. Herrmann, M. Loibl, M. Alini, and S. Verrier, "Platelet-rich plasma as autologous cell delivery and pro-angiogenic hydrogel for bone tissue engineering," *Bone & Joint Journal*, vol. 99-B, Supplement 2, p. 87, 2017.
- [46] M. Herrmann, J. J. Bara, C. M. Sprecher et al., "Pericyte plasticity - comparative investigation of the angiogenic and multilineage potential of pericytes from different human tissues," *European Cells & Materials*, vol. 31, pp. 236–249, 2016.
- [47] T. Takebe, M. Enomura, E. Yoshizawa et al., "Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation," *Cell Stem Cell*, vol. 16, pp. 556–565, 2015.
- [48] J. L. Ma, F. Yang, S. K. Both et al., "In vitro and in vivo angiogenic capacity of BM-MSCs/HUVECs and AT-MSCs/HUVECs cocultures," *Biofabrication*, vol. 6, p. 10, 2014.
- [49] S. Reginato, R. Gianni-Barrera, and A. Banfi, "Taming of the wild vessel: promoting vessel stabilization for safe therapeutic angiogenesis," *Biochemical Society Transactions*, vol. 39, pp. 1654–1658, 2011.
- [50] A. Armulik, G. Genove, and C. Betsholtz, "Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises," *Developmental Cell*, vol. 21, pp. 193–215, 2011.
- [51] M. Loibl, A. Binder, M. Herrmann et al., "Direct cell-cell contact between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells induces a pericyte-like phenotype in vitro," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 395781, 10 pages, 2014.
- [52] S. M. Goerke, J. Plaha, S. Hager et al., "Human endothelial progenitor cells induce extracellular signal-regulated kinase-dependent differentiation of mesenchymal stem cells into smooth muscle cells upon cocultivation," *Tissue Engineering Part A*, vol. 18, pp. 2395–2405, 2012.
- [53] P. Au, J. Tam, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature," *Blood*, vol. 111, pp. 4551–4558, 2008.
- [54] Q. Li, Y. Yu, J. Bischoff, J. B. Mulliken, and B. R. Olsen, "Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin," *The Journal of Pathology*, vol. 201, pp. 296–302, 2003.
- [55] D. T. Covas, R. A. Panepucci, A. M. Fontes et al., "Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146(+) perivascular cells and fibroblasts," *Experimental Hematology*, vol. 36, pp. 642–654, 2008.
- [56] F. J. Huang, W. K. You, P. Bonaldo, T. N. Seyfried, E. B. Pasquale, and W. B. Stallcup, "Pericyte deficiencies lead to aberrant tumor vascularization in the brain of the NG2 null mouse," *Developmental Biology*, vol. 344, pp. 1035–1046, 2010.
- [57] V. Nehls and D. Drenckhahn, "The versatility of microvascular pericytes - from mesenchyme to smooth-muscle," *Histochemistry*, vol. 99, pp. 1–12, 1993.
- [58] E. A. Winkler, R. D. Bell, and B. V. Zlokovic, "Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling," *Molecular Neurodegeneration*, vol. 5, p. 11, 2010.
- [59] L. Diaz-Flores, R. Gutierrez, J. F. Madrid et al., "Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche," *Histology and Histopathology*, vol. 24, pp. 909–969, 2009.
- [60] A. Armulik, A. Abramsson, and C. Betsholtz, "Endothelial/pericyte interactions," *Circulation Research*, vol. 97, pp. 512–523, 2005.

- [61] M. Hermansson, M. Nister, C. Betsholtz, C. H. Heldin, B. Westermarck, and K. Funa, "Endothelial-cell hyperplasia in human glioblastoma - coexpression of messenger RNA for platelet-derived growth-factor (PDGF) b-cain and PDGF receptor suggests autocrine growth-stimulation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, pp. 7748–7752, 1988.
- [62] K. H. Plate, G. Breier, C. L. Farrell, and W. Risau, "Platelet-derived growth factor receptor-beta is induced during tumor-development and up-regulated during tumor progression in endothelial-cells in human gliomas," *Laboratory Investigation*, vol. 67, pp. 529–534, 1992.
- [63] M. W. Ballmoosvon, Z. J. Yang, J. Volzmann, I. Baumgartner, C. Kalka, and S. SantoDi, "Endothelial progenitor cells induce a phenotype shift in differentiated endothelial cells towards PDGF/PDGFR beta axis-mediated angiogenesis," *PLoS One*, vol. 5, p. 10, 2010.
- [64] T. Hawighorst, M. Skobe, M. Streit et al., "Activation of the Tie2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth," *The American Journal of Pathology*, vol. 160, pp. 1381–1392, 2002.
- [65] E. Fagiani and G. Christofori, "Angiopoietins in angiogenesis," *Cancer Letters*, vol. 328, pp. 18–26, 2013.
- [66] P. C. Maisonpierre, C. Suri, P. F. Jones et al., "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis," *Science*, vol. 277, pp. 55–60, 1997.
- [67] L. E. Benjamin, I. Hemo, and E. Keshet, "A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF," *Development*, vol. 125, pp. 1591–1598, 1998.
- [68] L. E. Benjamin, D. Golijanin, A. Itin, D. Pode, and E. Keshet, "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 103, pp. 159–165, 1999.
- [69] F. Villars, B. Guillotin, T. Amedee et al., "Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication," *American Journal of Physiology Cell Physiology*, vol. 282, pp. C775–C785, 2002.
- [70] D. G. Wang, F. X. Zhang, M. L. Chen, H. J. Zhu, B. Yang, and K. J. Cao, "Cx43 in mesenchymal stem cells promotes angiogenesis of the infarcted heart independent of gap junctions," *Molecular Medicine Reports*, vol. 9, pp. 1095–1102, 2014.
- [71] M. Loibl, S. Lang, L. M. Dendl et al., "Leukocyte-reduced platelet-rich plasma treatment of basal thumb arthritis: a pilot study," *BioMed Research International*, vol. 2016, Article ID 9262909, 6 pages, 2016.