

Technische Universität München

Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie

Einfluss der Entnahmetechnik auf das Regenerative Potential von Mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe

Dr. med. univ. Dominik Duscher

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Arndt Friedrich Schilling
2. Prof. Dr. Jürgen Ruland

Die Dissertation wurde am 12.04.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 03.07.2018 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS | 1 |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 3 |
| EINLEITUNG | 5 |
| PATIENTEN UND METHODEN | 12 |
| <i>Fettgewebe und SVF-Gewinnung</i> | 12 |
| <i>Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS)</i> | 13 |
| <i>In vitro ASC-Viabilität</i> | 14 |
| <i>In vitro osteogene Differenzierung</i> | 15 |
| <i>In vitro adipogene Differenzierung</i> | 16 |
| <i>In vitro chondrogene Differenzierung</i> | 16 |
| <i>Realtime Quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) Analyse</i> | 17 |
| <i>In-vivo-Wundheilungsmodell</i> | 18 |
| <i>Beurteilung der Wundvaskularität</i> | 19 |
| <i>Statistische Analyse</i> | 20 |
| ERGEBNISSE | 21 |
| <i>Publikation I:</i> | 21 |
| <i>Suction-Assisted Liposuction Does Not Impair The Regenerative Potential of Adipose-Derived Stem Cells</i> | 21 |
| <i>Publikation II:</i> | 23 |
| <i>Ultrasound-Assisted Liposuction Does Not Compromise The Regenerative Potential of Adipose-Derived Stem Cells</i> | 23 |
| <i>Publikation III:</i> | 25 |
| <i>Vergleich des regenerativen Zytokinprofils von Adipose-Derived Stromal Cells (ASCs) gewonnen mittels Abdominoplastik, Suction-Assisted Liposuction (SAL) und Ultrasound-Assisted Liposuction (UAL)</i> | 25 |
| DISKUSSION | 27 |
| <i>Teil 1: Mesenchymale Stammzelltherapie zur Förderung der Wundheilung</i> | 27 |
| Stammzellenanwendungen in der Wundheilung | 29 |
| Optimierung von Stammzellfunktionalität durch Subpopulationsselektion | 31 |
| <i>Teil 2: Mesenchymale Stammzelltherapie zur Rekonstruktion von Weichteildefekten</i> | 35 |
| Aktuelle Strategien für die Rekonstruktion von Weichteildefekten | 35 |
| Zelluläre Antwort auf Gewebeschämie nach Lipofilling | 37 |
| Charakterisierung der Adipose-Derived Stromal Cells und Prinzip des CAL | 38 |
| Die Rolle der ASC in der Fetttransplantation | 40 |
| Die Balance zwischen Zellkonzentration und Transplantvolumen | 41 |
| Einflussfaktoren auf die ASC-Funktionalität | 43 |
| ZUSAMMENFASSUNG | 45 |
| BIBLIOGRAPHIE | 47 |
| DANKSAGUNG | 57 |
| APPENDIX | I |
| Publikation I | I |

Publikation II
Publikation III
Curriculum Vitae inklusive Publikationsliste

II
III
IV

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Adipose-Derived Stromal Cells (ASCs)

Stromal Vascular Fraction (SVF)

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1)

Suction-Assisted Liposuction (SAL)

Mechanically-Assisted Liposuction (MAL)

Laser-Assisted Liposuction (LAL)

Water-Assisted Liposuction (WAL)

Radiofrequency-Assisted Liposuction (RFAL)

Ultrasound-Assisted Liposuction (UAL)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

Fetal Bovine Serum (FBS)

Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

Runt-assoziiertes Transkriptionsfaktor 2 (RUNX2)

Osteopontin (OPN)

Osteocalcin (OCN)

quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ (PPAR- γ)

Fatty-Acid-Binding-Protein 4 (FABP4)

Lipoproteinlipase (LPL)

Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Goat (Gt)

Rabbit (Rb)

mesenchymale Stammzellen (MSCs)

Hepatocyte Growth Factor (HGF)

Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2/bFGF)

Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF-1)

Bone Marrow-Mesenchymal Stromal Cell (BM-MSC)

Cell-Assisted Lipotransfer (CAL)

Green Fluorescent Protein (GFP)

EINLEITUNG

Methoden für die Entfernung von Fett aus verschiedenen Regionen des Körpers wurden im letzten Jahrhundert auf diverse Weisen optimiert. Der erste dokumentierte Fall von gezielter Fettgewebsentfernung fand im Jahre 1921 statt, als Charles Dujarrier eine Uteruskürette verwendete, um das subkutane Fett an Waden und Knien eines Patienten zu reduzieren. Dies führte allerdings zu einer Verletzung der Oberschenkelarterie und zu der Notwendigkeit, das Bein zu amputieren (Sterodimas, Boriani et al. 2012). Des Weiteren wurden En-bloc-Gewebe-Resektionen eingesetzt, obwohl die Popularität der Technik durch die resultierenden großen Narben begrenzt war. Weitere Versuche folgten, Fett über die Kürette zu entfernen, bis schließlich zuerst von Arpad und Giorgio Fischer in den 1970er Jahren die Verwendung einer stumpfen Kanüle, wie sie auch heute in abgewandelter Form noch gebräuchlich ist, beschrieben wurde (Fischer 1990).

Derzeit werden jedes Jahr mehr als 400.000 Fettabsaugungen (= Liposuctionen) allein in den Vereinigten Staaten durchgeführt (ASAPS 2016). Die Liposuction wird heute als ein verhältnismäßig sicheres Verfahren angesehen. Seit die moderne Fettabsaugung entwickelt wurde, liegt der Fokus auf der Feinabstimmung der Technik zur Verbesserung von Faktoren wie Hautretraktion, Blutverlust sowie operativem Aufwand und Zeiteinsatz (Chung, Zimmermann et al. 2013). Alle neuen und innovativen Methoden dienen daher primär der Erleichterung des Vorgangs der Fettabsaugung und einer Verminderung assoziierter Komplikationen

und nicht einer größtmöglichen Überlebensrate der gewonnenen Zellen (Berry and Davies 2011).

In letzter Zeit haben Chirurgen und Forscher gleichermaßen begonnen, die Nützlichkeit des aspirierten Fettgewebes zu studieren. Lipoaspirat ist eine Quelle für medizinisch nutzbares Material, was gewöhnlich verworfen wird. Das Haupteinsatzgebiet ist die kürzlich entstandene Technik der Fetttransplantation (Lipofilling/Lipotransfer), die als Methode der Wahl zur Wiederherstellung von Weichgewebsdefiziten in die tägliche Praxis der Plastischen Chirurgie Einzug gehalten hat (Choi, Gimble et al. 2010). Allerdings ist diese Technik bislang hinsichtlich der Ergebnisse unvorhersehbar. Die oft schlechte Volumenretention des transplantierten Fetts ist wahrscheinlich ein Resultat des zurzeit noch unvollständigen Verständnisses der zugrunde liegenden Physiologie von Fetttransplantaten und ihrer Komponenten. Es hat sich gezeigt, dass mesenchymale Adipose-derived Stromazellen (ASCs) eine Population von multipotenten Zellen sind, die sich in verhältnismäßig hohen Anteilen im Fettgewebe finden (Choi, Gimble et al. 2010). Sie spielen eine entscheidende Rolle für die Effektivität von Lipotransfers. Zum einen ist für eine möglichst erfolgreiche Fetttransplantation eine Unversehrtheit des zellulären Anteils des Lipoaspirats Voraussetzung (Rigotti, Marchi et al. 2007, Yoshimura, Suga et al. 2009), zum anderen konnte demonstriert werden, dass eine Supplementierung von Lipoaspiraten mit ASCs eine signifikant verbesserte Fetttransplantateinheilung und

eine erhöhte Vaskularität der Transplantate bewirkte (Kolle, Fischer-Nielsen et al. 2013). In der aktuellen Forschung werden ASCs nicht nur eingesetzt, um Fetttransplantate weiter zu verbessern und die Retentionsrate zu erhöhen, sie werden auch zur Verbesserung der Wundheilung genutzt (Garg, Rennert et al. 2014). Zusätzlich können ASCs erfolgreich bei kritischen knöchernen Defekten des Schädels eingesetzt werden, um zur Knochenregeneration beizutragen (Walmsley, Hu et al. 2016).

Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe sind aufgrund ihres regenerativen Potentials schon in zahlreichen Fachgebieten der Medizin im klinischen Einsatz (Duscher, Barrera et al. 2016). MSCs weisen multiple Differenzierungsmöglichkeiten zu beispielsweise Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Myozyten, Neuronalzellen oder Kardiomyozyten (Halvorsen, Wilkison et al. 2000, Safford, Hicok et al. 2002, Zuk, Zhu et al. 2002, Rangappa, Fen et al. 2003, Zhu, Zhou et al. 2010) auf. Zusätzlich verfügen sie über parakrine Funktionen und sind im Rahmen der Fettabsaugung verhältnismäßig leicht zu gewinnen. Diese gesammelten Eigenschaften machen ASCs zu einer vielversprechenden endogenen Ressource zur Verbesserung und Erweiterung der rekonstruktiven und ästhetischen Möglichkeiten in der Plastischen Chirurgie.

Um regenerative Zellen aus dem Lipoaspirat zu gewinnen, wird durch enzymatische oder nicht enzymatische Extraktionsverfahren die sogenannte ‚Stromal Vascular

Fraction' (SVF) isoliert. Diese heterogene Zellpopulation besteht aus Fibroblasten, Immunzellen, Prä-Adipozyten, Perizyten, Epithelzellen und ASCs (Zuk, Zhu et al. 2002, Astori, Vignati et al. 2007). Die SVF kann entweder direkt zur Zelltherapie eingesetzt (Gentile, Scioli et al. 2015) oder weiter aufbereitet werden, um mittels Zellkultivierung oder Durchflusszytometrie reine ASCs zu gewinnen (Zhu, Heydarkhan-Hagvall et al. 2013, Garg, Rennert et al. 2014, Walmsley, Atashroo et al. 2015, Kosaraju, Rennert et al. 2016, Walmsley, Senarath-Yapa et al. 2016). Ihre therapeutische Wirkung entfalten ASCs durch die Sekretion einer Vielzahl von proregenerativen Faktoren, wie proangiogenetische und immunmodulierende Zytokine (VEGF, MCP1 etc.), wodurch sie in die Regelkreisläufe umliegender Zellen eingreifen können (Kilroy, Foster et al. 2007, Lee, Xia et al. 2009). Um eine therapeutisch wirksame Sekretion von regenerativen Zytokinen zu gewährleisten, muss ein ausreichendes Überleben der transplantierten Zellgruppen gesichert sein. Eine schonende Gewinnung ist deshalb essentiell (Chung, Zimmermann et al. 2013, Ross, Shayan et al. 2014).

Auf Grund zahlreicher unterschiedlicher Durchführungsmöglichkeiten der Fettgewinnung, der Aufbereitung und Implantation von Fett und mangelnder Vergleichsstudien zu diesen Themen sind viele Abläufe der Transplantation noch nicht standardisiert. Besonders, da das Überleben bzw. die Volumenretention von Fetttransplantaten nicht nur von den einzelnen Prozessschritten, sondern auch durch individuelle Faktoren wie Alter oder Begleiterkrankungen (z. B. Diabetes)

beeinflusst wird, ist eine Standardisierung des Prozesses der Transplantation von besonderer Relevanz, damit die Ergebnisse zuverlässig sind (Duscher, Maan et al. 2014, Rennert, Sorkin et al. 2014).

Durch den intensiven Forschungsaufwand der letzten Jahrzehnte in dem Gebiet der Liposuction im Rahmen ästhetischer oder rekonstruktiver Anwendungen wurden verschiedenste Methoden und Geräte zur Gewinnung, Aufbereitung und Transplantation entwickelt (Shridharani, Broyles et al. 2014). Die traditionell verwendete Suction-assisted Liposuction (SAL), bei der das Fett nach Infiltration einer Tumescenzlösung unter Vakuum mittels Kanüle aus dem Gewebe gelöst wird, stellt noch immer den Goldstandard dar (Scuderi, Tenna et al. 2005, Venkataram 2008, Chung, Zimmermann et al. 2013). Zusätzlich dazu entstanden komplexere Methoden, wie die mechanische Zerstörung des Zellnetzwerkes (mechanisch assistierte Liposuction – MAL) mit nachfolgender Absaugung, die Auflockerung des Gewebes durch Laser (LAL) oder Wasser (WAL) sowie die primäre Verflüssigung der Fettzellen mittels Radiofrequenz (RFAL) oder Ultraschall (UAL). Das Grundprinzip der Ultraschall-unterstützten Fettabsaugung besteht darin, elektrische Energie in Vibrationen umzuwandeln, was zu thermischen, kavitativen und mechanischen Effekten führt, die die Fragmentierung von Fett zur Folge haben (Berry and Davies 2011). Die Verwendung von Ultraschallenergie bei der Fettabsaugung wurde erstmals in den späten 1980er und 1990er Jahren von Scuderi und Zocchi (Zocchi 1992) mit der Rationale

entwickelt, dass die Energie das Fettgewebe selektiv auflösen und dadurch eine Erleichterung der Entfernung mit verminderter Blutung erlauben würde (de Souza Pinto, Abdala et al. 2006). Die Auswirkungen auf die Zellen des Lipoaspirats sind jedoch bisher noch unklar.

Viele jüngere Studien beschäftigen sich mit den Möglichkeiten, das Überleben der transferierten Zellen positiv zu beeinflussen, mit teils inkonklusiven Resultaten (Matsumoto, Sato et al. 2006, Kølle, Fischer-Nielsen et al. 2013, Sinno, Wilson et al. 2016). Als gesichert gilt, dass ein zu hoher negativer Druck (>-700 mmHg) und ein zu kleiner Kanülendurchmesser (<5 mm) beim Absaugen die Zellen des Lipoaspirats beschädigen (Zielins, Brett et al. 2016). Des Weiteren hatte der Einsatz von LAL in einer Studie von Chung et al. eine signifikante Reduktion der Anzahl, Viabilität, Proliferationsfähigkeit und regenerativen Funktionalität in vivo von ASCs im Vergleich zu ASCs aus Standard SAL Lipoaspirat zur Folge (Chung, Zimmermann et al. 2013). Der Einfluss anderer gängiger Liposuctionverfahren auf die Eigenschaften von ASCs ist weitgehend unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ASCs, die unter minimaler Manipulation aus Abdominoplastik-Resektaten gewonnen wurden, mit ASCs, die aus SAL- und UAL-Proben isoliert wurden, hinsichtlich ihrer regenerativen Funktionalität zu vergleichen. Hierzu wurde eine In-vitro-Evaluation von Proliferation, Migration, Differenzierungsvermögen und der für die klinische Effektivität von Zelltherapeutika

essentiellen Zytokinausschüttung durchgeführt. Zudem wurde im Tiermodell die Fähigkeit zur Gewebserneuerung und Wundheilung sowie Angiogeneseförderung überprüft. Die Arbeit wurde in drei Phasen durchgeführt, sodass daraus drei Publikationen hervorgingen:

1. Vergleich von ASCs isoliert aus exzidiertem Fettgewebe mit SAL ASCs
2. Vergleich von SAL ASCs mit UAL ASCs
3. Vergleich von ASCs gewonnen mittels Fettgewebsexzision, SAL und UAL

Dieses Vorgehen ermöglichte eine systematische und umfassende Evaluation der verschiedenen gängigen Methoden zur ASC-Gewinnung. In allen Experimenten diente der Patient als seine eigene Kontrolle. Durch strukturiertes Vorgehen und Entnahme der Fettgewebeproben durch verschiedene Techniken an jeweils gleichen Probanden konnte so eine weitestgehende Unabhängigkeit von der beträchtlichen Varianz der Zellfunktionalität zwischen verschiedenen Spendern erreicht werden.

PATIENTEN UND METHODEN

Fettgewebe und SVF-Gewinnung

Lipoaspirat wurde mittels UAL und SAL vom Abdomen gesunder weiblicher Patientinnen gesammelt, die sich freiwillig einem Eingriff zur Körperformung unterzogen. Als UAL-System wurde das VASER Lipo System (Solta Medical, Hayward, CA, <http://www.solta.com>) verwendet. Dieses System arbeitet durch eine Abgabe von Vibrationen mit einer Frequenz von 36.000 Hz und einer Wellen-Amplitudenlänge von 71–76 mm, die in 5–12 Watt resultieren (Panetta, Gupta et al. 2009). Gewebsextraktion erfolgte mittels einer 5 mm Aspirationskanüle und einem negativen Druck von ca. 700 mmHG. Im Anschluss an die Entnahme der Lipoaspiratproben erfolgte eine En-bloc-Gewebsexzision bei denselben Probandinnen im Sinne einer Abdominoplastik.

Zur Gewinnung der SVF aus dem SAL- und UAL-Lipoaspirat wurde dieses im Rahmen der enzymatischen Isolation (Zhu, Heydarkhan-Hagvall et al. 2013) mit sterilem Phosphat-gepuffertem NaCl gewaschen, um Öl-, Blut- und Tumescenzrückstände zu entfernen. Danach wurde das Fettgewebe mit Typ-II-Kollagenase (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) in Medium 199 (Cellgro; Manassas; VA) in einem 37°-Wasserbad mit 180 rpm für 30 Minuten enzymatisch verdaut. Die gesamte Mischung wurde bei 1500 RPM für 20 Minuten bei 4° zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der zelluläre Bestand wurde mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Invitrogen; Carlsbad, CA) mit 10 % fetal bovine serum

(FBS) versetzt, durch einen Zellfilter mit 100 µm Poren (Corning; Corning, NY) gefiltert und erneut bei 1500 RPM für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Der übrige zelluläre Teil wurde mit einem Puffer zur Lysierung von roten Blutkörperchen versetzt und einmal mehr zentrifugiert, um die SVF zu gewinnen. Die durch Abdominoplastik gewonnenen Proben wurden manuell in wenige Millimeter kleine Stücke zerteilt. Das weitere Prozedere zur SVF-Isolation war gleich dem der Lipoaspirat-Proben.

Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS)

Unserer Arbeitsgruppe gelang es zu demonstrieren, dass die Zellkultivierung einen signifikanten Effekt auf das Genexpressionsprofil von ASCs hat (Januszyk, Rennert et al. 2015). Um eine hohe translationale Relevanz zellbiologischer Studien gewährleisten zu können, sollten daher primäre Zellen herangezogen werden. Dies respektierend, wurde in der frisch gewonnenen SVF durch sofortiges Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) der ASC Bestandteil identifiziert und isoliert. ASCs wurden durch das Profil der Oberflächenmarker CD45-/CD31-/CD34+ (Suga, Matsumoto et al. 2009, Chung, Zimmermann et al. 2013, Garza, Paik et al. 2014) charakterisiert unter Verwendung von antihumanen, monoklonalen Maus-Antikörper CD31-PE, CD 45-PeCy7 und CD34-APC (BD Biosciences; San Jose, CA) und Propidiumiod wurde verwendet, um tote Zellen zu extrahieren. Die Analyse wurde mit Hilfe einer BD-FACSAria Maschine (BD Biosciences) durchgeführt.

In vitro ASC-Viabilität

Die Viabilität der frisch isolierten ASCs wurde mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid(MTT)-Test für metabolische Aktivität nach dem vorgegebenen Protokoll des Herstellers (Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA) evaluiert. Die Zellen wurden in dem Kulturmedium mit einer Dichte von 20.000 Zellen pro Vertiefung in 96-Well-Platten ausgesät. Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und der Zellstoffwechsel wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen ausgewertet. Die Absorption jeder Vertiefung wurde bei 540 nm unter Verwendung eines Mikrotiterplattenlesegeräts (SPECTRAMax 384 Plus, Molecular Devices Ltd., Sunnyvale, CA, <http://www.moleculardevices.com>) bestimmt. Alle Assays wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt.

In vitro osteogene Differenzierung

ASCs wurden frisch isoliert mittels FACS und in Standard-Sechs-Well-Gewebekulturplatten (1×10^5 Zellen pro Vertiefung) in dreifacher Ausfertigung ausgesät. Die Zellen wurden mindestens bis zu 80 % Konfluenz kultiviert, bevor sie einem osteogenen Differenzierungsmedium ausgesetzt wurden, das aus DMEM (1 g Glucose/l) ergänzt mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin, 100 µg/ml Ascorbinsäure und 10 mM β -Glycerophosphat bestand. Eine Alizarin-Rotfärbung wurde nach 14 Tagen durchgeführt und quantifiziert, um den Grad der extrazellulären Mineralisierung zu messen (Panetta, Gupta et al. 2009, Chung, Zimmermann et al. 2013). Die gefärbten Zellen wurden bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit 2 ml einer Lösung, bestehend aus 20 % Methanol, 10 % Essigsäure, unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Absorption der Proben wurde mittels eines Spektralphotometers (Biochrom Ltd., Cambridge, England) bei 450 nm gemessen. Eine photometrische Quantifizierung der alkalischen Phosphatase-Färbung wurde nach sieben Tagen durchgeführt, wie zuvor bereits beschrieben wurde (Rustad, Wong et al. 2012) (ImageJ, National Institute of Health, Bethesda, MD, www.nih.gov). Des Weiteren wurde die Genexpression der osteogenen Marker Runt-related-Transkriptionsfaktor-2 (RUNX2), Osteopontin (OPN) und Osteocalcin (OCN) durch eine quantitative Polymerase-Kettenechtzeitreaktion (qRT-PCR) nach 14 Tagen der Differenzierung analysiert.

In vitro adipogene Differenzierung

Zur adipogenen Differenzierung wurden ASCs frisch mittels FACS isoliert und in Standard-Sechs-Well-Gewebekulturplatten ($1,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung) in dreifacher Ausfertigung ausgesät. Nach der Anhaftung wurden die Zellen mit einem adipogenen Differenzierungsmedium versetzt, das aus DMEM (1 g Glucose/l) ergänzt mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 ug/ml Insulin, 1 uM Dexamethason, 0,5 mM Methylxanthin und 200 uM Indomethacin bestand. Eine Oil-red-O-Färbung wurde nach sieben Tagen Inkubation durchgeführt und photometrisch analog der alkalischen Phosphatase-Färbung quantifiziert (siehe oben). Schließlich wurden die Expressionsniveaus der adipogenen Gene Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ (PPAR- γ), Fettsäure-bindendes Protein 4 (FABP4) und Lipoproteinlipase (LPL) nach sieben Tagen der Differenzierung durch qRT-PCR untersucht.

In vitro chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung wurde mit Hilfe eines im Handel erhältlichen Kits (StemPro® Chondrogenese Differentiation Kit, Life Technologies, CA, USA, www.thermofisher.com) laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Frisch mittels FACS isolierte ASCs wurden zu einer dichten Zelllösung von $1,6 \times 10^7$ Zellen/ml in ein Nährmedium resuspendiert. Jeweils 5 ul der Zellsuspension wurde danach für zwei Stunden kultiviert. Anschließend wurde ein chondrogenes Differenzierungsmedium

hinzugefügt und für zwei Wochen kultiviert. Die entstandenen Zellaggregate wurden histologisch geschnitten und zur Darstellung der Glykosaminoglykane mit Alcianblau gefärbt.

Realtime Quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) Analyse

Die RNA der Zellen wurden durch Verwendung eines RNeasy Mini Kits (Qiagen, Valencia, CA, <http://www.qiagen.com>) nach dem vorgegebenen Protokoll des Herstellers gewonnen. Eine reverse Transkription wurde durchgeführt und die Genexpression wurde durch qRT-PCR mit dem PRISM 7900HT Sequenz-Detektionssystem (Applied Biosystems, Foster City, CA, <http://www.appliedbiosystems.com>) und SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) untersucht. Die Menge an PCR-Produkten wurde durch Verwendung einer externen Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Standardkurve und der Software ‚LightCycler‘ (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, <https://lifescience.roche.com>) ausgewertet. Alle Werte wurden auf Basis der GAPDH-Expression in den Proben normalisiert. Alle Experimente wurden dreimal wiederholt. Die spezifischen Primer für die Genexpression wurden mit Hilfe einer Primer-Datenbank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>) konfiguriert.

In-vivo-Wundheilungsmodell

Zwischen acht und zwölf Wochen alte männliche Crl:CD-1-Foxn1nu-Mäuse (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, www.criver.com) wurden randomisiert in mehrere Behandlungsgruppen eingeteilt: Hydrogel-Kontrolle oder Hydrogel mit menschlichen ASCs frisch isoliert mittels FACS aus UAL- und SAL-Lipoaspirat bzw. Abdominoplastik-Resektaten. Das Collagen-Pullulan-Hydrogel wurde wie zuvor beschrieben (Rustad, Wong et al. 2012) hergestellt. Für eine effiziente Besiedelung der Hydrogele wurden $2,5 \times 10^5$ menschliche ASCs in Phosphat-gepuffertem Kochsalz (PBS) suspendiert und 15 μ l dieser PBS-Lösung wurde auf hydrophobes Wachspapier pipettiert. Das Hydrogel wurde ebenfalls auf das Papier platziert und die Zellen wurden aktiv in die Poren des Scaffolds durch kapilläre, hydrophobe und entropische Kräfte aufgenommen (Garg, Rennert et al. 2014). Es wurden je zwei 6 mm tiefe Wunden am Rücken jeder Maus erzeugt und mittels aufgenähten Silikonringen stabilisiert, um einer Wundkontraktion vorzubeugen und Heilung durch Granulation und Reepithelialisierung zu ermöglichen (Wong, Rustad et al. 2011). In der Kontrollgruppe wurde ein 6 mm großes Stück mit PBS gesättigtes Hydrogel in jedes Wundbett eingebracht, in den ASC-Gruppen ein 6 mm großes Stück Hydrogel besiedelt mit humanen ASCs (suspendiert in PBS). Alle Wunden wurden mit einem okklusiven Verband (Tegaderm, 3M, St. Paul, MN, www.3m.com) abgedeckt. Digitale Fotos wurden direkt postoperativ und an den Tagen 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15 angefertigt. Die

Fläche der Wunde im Heilungsverlauf wurde mit ImageJ Software (National Institute of Health, Bethesda, MD, www.nih.gov) gemessen.

Beurteilung der Wundvaskularität

Die Vaskularität von geheilten Wunden wurde durch immunhistochemische Färbung für den Endothelien Zellmarker CD31 beurteilt. Dafür wurden Wunden nach kompletter Heilung exzidiert und mittels Paraffinhistologie verarbeitet. Die immunhistochemische Färbung für CD31 wurde an 7 µm dicken Paraffinschnitten durchgeführt, wie zuvor beschrieben (Rustad, Wong et al. 2012). Die Objektträger wurden von Paraffin befreit, in PBS gewaschen und für zwei Stunden in einer befeuchteten Kammer mit einer Blockerlösung inkubiert. Der primäre Antikörper (1: 100 Rb α CD31, Ab28364, Abcam, Cambridge, UK, www.abcam.com) wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, gefolgt von einer sekundären Antikörperfärbung (1: 400 AF547 Gt α Rb, Life Technologies, NY, <http://www.lifetechnologies.com>). Die Zellkerne wurden mit einer DAPI-Kernfärbung visualisiert. ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, www.nih.gov) wurde verwendet, um die Immunofluoreszenzbilder zu quantifizieren, wie dies zuvor beschrieben wurde (Rustad, Wong et al. 2012).

Statistische Analyse

Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc.), der statistische Vergleich mittels ANOVA für multiples Testen und ggf. die Korrektur der Alphafehler-Kumulierung bei multipler Testung mit der Bonferroni-Methode. Ein p-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

ERGEBNISSE

Publikation I:

Suction-Assisted Liposuction Does Not Impair the Regenerative Potential of Adipose-Derived Stem Cells

Duscher D, Luan A, Rennert RC, Atashroo D, Maan ZN, Brett EA, Whittam AJ, Ho N, Lin M, Hu MS, Walmsley GG, Wenny R, Schmidt M, Schilling AF, Machens HG, Huemer GM, Wan DC, Longaker MT, Gurtner GC.

J Transl Med. 2016 May 6;14(1):126. DOI: 10.1186/s12967-016-0881-1

IF 2016: 3.93

Kurzfassung:

Aus Fettgewebe gewonnene Stammzellen (ASCs) sind reichlich in Lipoaspirat vorhanden, das sicher und einfach durch das minimal-invasive Verfahren der Fettabsaugung gewonnen werden kann. In der klinischen Praxis gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Methoden der Liposuction mit unklaren Auswirkungen auf das regenerative Potential der ASCs. Das Ziel dieser Studie war es daher, die Funktionalität von ASCs, die mittels der Standardtechnik der Vacuum-assistierten Liposuction (SAL) gewonnen wurden, mit ASCs zu vergleichen, die unter minimaler Manipulation mittels Gewebsresektion gewonnen wurden. Gepaarte Proben aus Lipoaspirat und Abdominoplastik-Resektaten von drei weiblichen Patientinnen wurden entnommen und verarbeitet, um die Stromal Vascular Fraction (SVF) zu isolieren. Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) wurde

verwendet, um aus der SVF ASC zu extrahieren und die ASC-Frequenz im Gewebe zu bestimmen. Danach wurden die Viabilität und die Fähigkeit zur Differenzierung der Zellen untersucht. Die adipogene und die osteogene Differenzierungskapazität wurden in vitro unter Verwendung von phänotypischen Färbungen und Quantifizierung der entsprechenden Genexpression geprüft. Schließlich wurden die ASCs in einem In-vivo-Wundheilungsmodell verwendet, um ihr Regenerationspotential zu bewerten. In Proben des SAL-Lipoaspirats waren signifikant weniger ASCs vorhanden als in der gleichen Menge reseziertem Fettgewebe. Die Viabilität in beiden Gruppen war vergleichbar. SAL ASCs zeigten eine vermehrte Expression der adipogenen Marker FABP-4 und LPL. Dies führte allerdings nicht zu einem Unterschied in der adipogenen Differenzierungskapazität. Hinsichtlich der osteogenen Differenzierungsfähigkeit konnten weder funktionell noch auf der Genexpressionsebene Unterschiede nachgewiesen werden. Sowohl SAL ASCs als auch ASCs aus Gewebsresektion verbesserten die kutane Heilung und Vaskularisierung signifikant in vivo, wobei kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand. Es kann daher zusammengefasst werden, dass mittels SAL ASCs mit voller Kapazität zur Differenzierung und Geweberegeneration gewonnen werden können. Die Vakuum-assistierte Liposuction ist daher eine geeignete Methode, um Material für zellbasierte Therapien zu erhalten.

Der Abdruck des kompletten Manuskripts befindet sich im Appendix.

Publikation II:

Ultrasound-Assisted Liposuction Does Not Compromise the Regenerative

Potential of Adipose-Derived Stem Cells

Duscher D, Atashroo D, Maan ZN, Luan A, Brett EA, Barrera J, Khong SM, Zielins ER, Whittam AJ, Hu MS, Walmsley GG, Pollhammer MS, Schmidt M, Schilling AF, Machens HG, Huemer GM, Wan DC, Longaker MT, Gurtner GC.

Stem Cells Transl Med. 2016 Feb;5(2):248-57. doi: 10.5966/sctm.2015-0064. Epub 2015 Dec 23.

IF 2016: 5.71

Kurzfassung:

Humane mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind sowohl wegen ihrer Fähigkeit zur Differenzierung als auch wegen ihrer Kapazität zur Ausscheidung von proregenerativen Zytokinen in den Fokus der regenerativen Medizin geraten. Mesenchymale Stammzellen, die aus Fettgewebe (ASCs) isoliert wurden, sind wegen ihrer einfachen Gewinnung mittels Liposuction und ihres reichlichen Vorkommens im Lipoaspirat von besonderem Interesse. Zurzeit finden in der Klinik zahlreiche Liposuctionverfahren praktische Anwendung, jedoch ist wenig über die Auswirkung der unterschiedlichen Methoden auf die Funktionalität von ASCs bekannt. In dieser Studie vergleichen wir die regenerativen Fähigkeiten von ASCs, die mittels Ultraschall-Liposuction der dritten Generation (UAL) gewonnen wurden, mit ASCs, die durch Standard Vacuum-unterstützte Liposuction (SAL) isoliert wurden. Aus den Lipoaspiraten wurde die Stromal Vaskular Fraction (SVF) entnommen und aus dieser unter Verwendung von Fluoreszenz unterstützter

Zellsortierung (FACS) basierend auf einem etablierten Oberflächenmarker-Profil (CD34+, CD31-, CD45-) ASCs isoliert. Die mittlere Ausbeute und Viabilität der Zellen wurden verglichen und die Fähigkeit zur Differenzierung ASCs wurde beurteilt. Schließlich wurde das Regenerationspotential von ASCs unter Verwendung eines In-vivo-Modells für die Geweberegeneration untersucht. Lipoaspirate, die mittels UAL und SAL gewonnen wurden, zeigten einen äquivalenten ASC-Gewinn und eine äquivalente Viabilität der Zellen. UAL ACSs waren in ihrer osteogenen, adipogenen oder chondrogenen Differenzierungsfähigkeit nicht beeinträchtigt. Des Weiteren zeigte eine qRT-PCR-Analyse eine vergleichbare Expression der meisten osteogenen und adipogenen sowie wichtiger regenerativer Gene zwischen den beiden ASC-Gruppen. Kutane Regeneration und Neovaskularisation wurden in einem murinen Wundheilungsmodell unter Behandlung mit UAL und SAL ASCs im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant verbessert und es gab keine signifikanten Unterschiede im Heilungsverlauf zwischen den Zelltherapiegruppen. Es kann daraus geschlossen werden, dass UAL ein erfolgreiches Verfahren zur Gewinnung von vollständig funktionalen ASCs für den therapeutischen Einsatz in der regenerativen Medizin darstellt. Zellen, die mit diesem alternativen Ansatz zur Liposuction gewonnen werden, sind für die Verwendung in Zelltherapeutika und Tissue-Engineering-Konstrukten geeignet.

Der Abdruck des kompletten Manuskripts befindet sich im Appendix.

Publikation III:

Vergleich des regenerativen Zytokinprofils von Adipose-Derived Stromal Cells (ASCs) gewonnen mittels Abdominoplastik, Suction-Assisted Liposuction (SAL) und Ultrasound-Assisted Liposuction (UAL)

Aitzetmüller MM, Machens HG, Schilling AF, Duscher D

Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie. 2017. DOI: 10.1055/s-0043-118596

IF 2016: 0.69

Kurzfassung:

Mesenchymale Stammzellen sind aufgrund ihres regenerativen Potentials schon in zahlreichen Fachgebieten der Medizin im klinischen Einsatz. In der Plastischen Chirurgie stehen vor allem Fettstammzellen (Adipose-Derived Stromal Cells=ASCs) aus Lipoaspirat im Mittelpunkt der jüngeren Forschung. Die Fähigkeit zur Ausschüttung von regenerativen Zytokinen ist der Schlüsselmechanismus im therapeutischen Einsatz von ASCs. Es sind zurzeit eine Vielzahl an Methoden und Geräten zur Lipoaspiratgewinnung in der klinischen Anwendung. Bei den meisten dieser Geräte sind die Auswirkungen auf die regenerativen Eigenschaften der ASCs noch weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Studie ist der Vergleich der Expression von wesentlichen regenerativen Zytokinen von ASCs, die mittels dreier Standardverfahren der Plastischen Chirurgie gewonnen wurden: Abdominoplastik, Suction-Assisted Liposuction (SAL) und Ultrasound-Assisted Liposuction (UAL). UAL- und SAL-Lipoaspirate wurden jeweils von drei gesunden weiblichen

Probanden gewonnen, bevor eine Abdominoplastik an denselben Patienten durchgeführt wurde. ASCs wurden aus UAL- und SAL-Lipoaspiraten sowie aus den Abdominoplastik-Resektaten isoliert und die RNA-Expression von wichtigen regenerativen Zytokinen (HGF (Hepatocyte Growth Factor), FGF-2 (Basic Fibroblast Growth Factor), MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1), SDF-1 (Stromal Cell-derived Factor 1) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) verglichen. Es zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Expression von HGF, FGF-2, SDF-1 und VEGF zwischen den einzelnen Proben, jedoch eine signifikant erhöhte Expression von MCP-1 in ASCs, die aus UAL-Lipoaspirat gewonnen wurden. Demnach stellt UAL bezüglich des Einflusses auf das ASC-Expressionsprofil von Schlüsselzytokinen der Gewebserneuerung eine ebenso gute Methode wie SAL dar. Sowohl UAL- als auch SAL-Lipoaspirate sind für die Gewinnung von funktionellen ASCs geeignet, vergleichbar mit minimal manipulierten Zellen aus Abdominoplastik-Resektaten.

Der Abdruck des kompletten Manuskripts befindet sich im Appendix.

DISKUSSION

Teil 1: Mesenchymale Stammzelltherapie zur Förderung der Wundheilung

Die Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der die Koordination von mehreren physiologischen Mechanismen voraussetzt, um eine effektive Reaktion auf eine Gewebeerletzung zu gewährleisten. Die physiologische Wundheilung besteht aus mehreren verschiedenen, aber überlappenden Phasen – Hämostase und Entzündungen, Proliferation und Reifung –, die unter normalen Umständen zu einer Narbenbildung führen (Gurtner, Werner et al. 2008). Die Wundreparatur bewegt sich innerhalb eines Spektrums von pathologisch verlangsamter Heilung (d. h. chronische, nicht heilende Wunden) bis hin zu pathologischer, überschießender Heilung (d. h. hypertrophische Narben und Keloide) mit physiologischer Heilung, einschließlich Narbenbildung, als gesundem Mittelmaß.

Die Mehrheit der Gewebe des Körpers ist in der Lage, eine Wundreparatur nach einer Störung der Gewebeintegrität durchzuführen (Gurtner, Werner et al. 2008). Die Wundversorgung ist ein zentraler Bestandteil der chirurgischen Praxis: Sowohl akute (z. B. Traumata, Verbrennungen, Verletzungen bei Operationen) als auch chronische Wunden (z. B. Druckgeschwüre, venöse Geschwüre, diabetische Geschwüre) müssen adäquat versorgt werden. Jedes Jahr werden Milliardenbeträge für die Wundversorgung benötigt (Sen, Gordillo et al. 2009). Die Versorgung chronischer Wunden ist besonders kostenintensiv, da sie oft ein

verlängertes Follow-up mit wiederholten Interventionen erfordern. Es wird geschätzt, dass 1 % der Bevölkerung einmal im Leben unter einer chronischen Wunde leidet (Crovetti, Martinelli et al. 2004).

Das Management chronischer Wunden weist oftmals suboptimale klinische Ergebnisse auf, daher ist die Versorgung dieser Wunden ein bedeutendes Einsatzgebiet für neuartige Therapien. Während die normale Wundheilung zu einer regelrechten Narbenbildung führt, können beeinträchtigte Wundheilungsprozesse zu einer Narbenbildung, die ästhetisch nicht ansprechend ist, oder sogar zu einer chronischen, nicht heilenden Wunde führen. Zu den Faktoren, die die physiologische Heilung stören, gehören unter anderem Alterung, sitzender Lebensstil, ein schlechter psychologischer Gesundheitszustand, Rauchen und chronische Krankheiten wie Diabetes (Cole-King and Harding 2001). Insbesondere Diabetes ist oft mit einer chronischen Wundbildung in Form von nicht heilenden diabetischen Geschwüren verbunden (Duscher, Neofytou et al. 2015). Eine unkontrollierte Diabeteserkrankung beeinträchtigt die Neutrophil- und Makrophagenmigration zum Wundbett. Die resultierende Verzögerung bei der Wundheilung prädisponiert die Patienten dazu, diabetische Fußgeschwüre zu entwickeln, die wiederum infiziert werden können und ein chirurgisches Debridement oder eine Amputation erfordern. Ein besseres Verständnis der chronischen Wundpathophysiologie kann dazu beitragen, potentielle Einsatzmöglichkeiten für stammzellbasierte Therapien bei nicht heilenden Wunden

zu identifizieren (Duscher, Rennert et al. 2014). Letztlich muss es das Ziel sein, kostengünstige Therapien zu entwickeln, die die Lebensqualität der Patienten deutlich verbessern kann. Stammzellen bieten hierfür vielversprechende Möglichkeiten (Blakytny and Jude 2006).

Stammzellenanwendungen in der Wundheilung

Damit Zellen als Stammzellen klassifiziert werden können, müssen sie zwei Kriterien erfüllen: Sie müssen eine Fähigkeit zur Selbsterneuerung haben und sie müssen in der Lage sein, eine asymmetrische Teilung zu vollziehen, um in spezialisierte Zelltypen zu differenzieren (Weissman 2000). Diese Eigenschaften verleihen den Stammzellen eine Reihe von einzigartigen Fähigkeiten, die genutzt werden könnten, um die Regeneration und Reparatur von beschädigtem Gewebe zu unterstützen. Untersuchungen mit Modellen der Gewebeverletzung, in denen gezeigt wurde, dass schwere Verletzungen zu einer dramatischen Zunahme der Anzahl der im Blut zirkulierenden Stammzellen führen (Kucia, Ratajczak et al. 2004), stützen diese These. Weiterhin wurde festgestellt, dass zirkulierende Zellen aus dem Knochenmark an Wunden zu finden sind, wo sie sich auch in nicht hämatopoetische Hautstrukturen differenzierten (Badiavas, Abedi et al. 2003).

Die Mehrheit der Studien, die potentielle stammzellbezogene Wundheilungstherapien betrachteten, konzentrierten sich auf adulte Stammzellen, vor allem mesenchymale Stammzellen (MSCs). MSCs sind in der Lage, sich selbst

zu erneuern und haben großes Potential für die Behandlung von Gewebeschäden gezeigt (Nakagawa, Akita et al. 2005). MSCs können aus dem Knochenmark eines Patienten, dem Fettgewebe, dem Nabelschnurblut und der Dermis gewonnen werden (Duscher, Barrera et al. 2016). Autologe MSCs weisen nicht nur kein Risiko der Abstoßung auf, sie hemmen auch die entzündliche Reaktion im Wundbett, die eine wirksame Geweberegeneration beeinträchtigen kann (Bajada, Mazakova et al. 2008). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass MSCs aus dem Knochenmark (BM-MSCs) höhere Mengen an Kollagen, Wachstumsfaktoren und angiogenen Faktoren synthetisieren als native dermale Fibroblasten, was sie als Wundaufgabe zur Verbesserung der Heilung interessant macht (Falanga, Iwamoto et al. 2007). Obwohl BM-MSCs konsequent zur Erhöhung der Rate der Wundheilung in einer Vielzahl von Szenarien geführt haben, gibt es auch einige Nachteile dieser Therapien. Zum Beispiel sinkt die Population von BM-MSCs innerhalb des Knochenmarks während des Alterungsprozesses, was die Verwendung von autologen BM-MSCs bei der Behandlung von älteren Patienten erschweren könnte (Rao and Mattson 2001).

Die chirurgische Manipulation und die Gewinnung von Fettgewebe ist in der Regel ein einfaches Verfahren, das Gewebe selbst ist hingegen überraschend komplex. Das Fettgewebe besteht aus einer Fülle von Zellen, einschließlich Adipozyten, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Lymphozyten sowie Adipose-derived Stromazellen (ASCs). ASCs sind pluripotente Zellen, die in

der Lage sind, sich in Knochen, Knorpel, Sehne und Fett zu differenzieren, vorausgesetzt, sie werden unter den notwendigen Bedingungen kultiviert (Gimble and Guilak 2003, Strem, Hicok et al. 2005). Sie teilen dieses Potential mit BM-MSCs, werden aber aufgrund ihrer breiten Verfügbarkeit und der verhältnismäßig leichten Gewinnung von ausreichenden Zellzahlen bevorzugt (Duscher, Barrera et al. 2016). Es wurde gezeigt, dass ASCs die Fibroblasten-Proliferation durch die Sekretion von parakrinen Faktoren fördert, was letztlich die Geschwindigkeit der Wundheilung erhöht (Kim, Park et al. 2007). Eine weitere Studie zeigte, dass hypoxische Bedingungen, wie sie in Wunden typischerweise vorliegen, ASCs zu einer Hochregulierung der Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF veranlassen, was zu einem beschleunigtem Wundverschluss beitragen kann (Lee, Xia et al. 2009). Die Behandlung mit ASCs kann in Mausmodellen einen Erfolg bei der diabetischen Wundheilung und bei ischämischen Lappen erzielen (Gao, Qiao et al. 2011, Hollenbeck, Senghaas et al. 2012, Zografou, Papadopoulos et al. 2013). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme des immensen Potentials von ASCs in künftigen Wundmanagement-Applikationen.

Optimierung von Stammzellfunktionalität durch Subpopulationsselektion

Obwohl gezeigt wurde, dass ASCs verschiedenste regenerative Prozesse fördern können, gibt es auch Hinweise darauf, dass ihre Funktionsfähigkeit beim Einsatz in der diabetischen und alternden Population beeinträchtigt sein kann (Duscher, Rennert et al. 2014, Rennert, Sorkin et al. 2014). Diese Verringerung der

regenerativen Funktionalität beeinflusst direkt das Verwendungspotential von gealterten und diabetischen ASCs in zellbasierten Therapien. Um diese Einschränkungen zu überwinden, können mikrofluidische Einzelzelltranskriptionsanalysen kombiniert mit neuartigen bioinformatischen Ansätzen zur Identifizierung und Isolierung von ASC-Subpopulationen mit erhöhtem regenerativen Potential Anwendung finden (Rennert, Januszyk et al. 2016).

Maßgeblich für diese Methode ist der mikrofluidikbasierte Ansatz, der die Einzelzelltranskriptionsuntersuchung mit fortgeschrittener statistischer Analyse kombiniert (Januszyk and Gurtner 2013). Diese Technik beruht auf der quantitativen Multiplex-PCR, um gleichzeitig die Expression von 96 Genen über hunderte von einzelnen Zellen zu charakterisieren, was Korrelationen höherer Ordnung in Expressionsmustern ermöglicht. Mit Hilfe einer neuartigen Berechnungsmethode, die Prinzipien der Informationstheorie und der Fuzzy-Logik anwendet, können Untergruppen von Zellen entsprechend ihrer Transkriptionssignaturen dargestellt werden. Im Gegensatz zu üblichen populationsbasierten Analysen, wie z. B. Microarray, ermöglicht diese Technik die Visualisierung der Heterogenität der verschiedenen Zellen sowie die Identifizierung unterschiedlicher Zelluntergruppen.

Unter Verwendung dieser Methodik wurde die Einzelzelltranskriptionsanalyse an menschlichen und murinen jungen, gealterten und diabetischen Proben durchgeführt, um gleichzeitig die Expression von 96 angiogenen, Stammzell-, Differenzierungs- und Oberflächenantigenen zu charakterisieren. Eine bioinformatische Clusteranalyse wurde genutzt, um eine ASC-Subpopulation mit einer erhöhten Expression von progenerativen Genen zu identifizieren und sie mit Oberflächenmarkern für eine prospektive Isolation über FACS zu korrelieren. Die identifizierte Subpopulation wurde hinsichtlich der Proliferation, der angiogenen Fähigkeit, des regenerativen Zytokinprofils und der Überlebenskapazität im Vergleich zur Elternpopulation und einer negativen Selektion in vitro beurteilt. Ihr regeneratives Potential wurde in vivo mit einem murinen Modell der kutanen Wundheilung bestimmt.

Die Einzelzelltranskriptionsanalyse, gefolgt von der Clusterbildung für progenerative Genexpressionsprofile, zeigte eine transkriptional definierte Subpopulation innerhalb von murinen und menschlichen ASCs, die durch eine Überexpression von multiplen Stammzellgenen und proangiogenen Genen gekennzeichnet ist. Diese Subpopulation wurde anschließend mit der Expression von Zelloberflächenmarkern korreliert. Reproduzierbarkeit und Oberflächenmarkertreue wurden über mehrere Proben hinweg bestätigt. Die Isolierung über FACS und die In-vitro-Beurteilung der identifizierten Zellpopulation zeigten eine verlängerte Retention von Vorläufer-assoziierten

Oberflächenantigenen, Überleben und Hochregulierung von angiogenen Zytokinen sowie eine erhöhte proliferative Kapazität und Klonogenität im Vergleich zu Zellen ohne diese Marker und der Mutterpopulationen (Rennert, Januszyk et al. 2016). Die Untersuchung von ASCs, die von gealterten und diabetischen Proben für die Evaluierung ihrer Subpopulationsdynamik gewonnen wurden, zeigte eine signifikante Verminderung dieses funktional eventuell potenteren Zellclusters. Schließlich wurden die Experimente in vivo fortgesetzt, um die regenerativen Fähigkeiten dieses ‚Clusters of Interest‘ in einem diabetischen murinen Wundmodell zu beurteilen. Die neu definierte Subpopulation verbesserte die Heilung im Vergleich zu Mutterpopulationen, was zu einer vollständig normalisierten Heilung von diabetischen Wunden führte. Dies zeigt, dass funktionell unterschiedliche ASC-Subpopulationen transkriptional identifiziert und mit der Oberflächenmarkerexpression für prospektive Isolation und Anwendungen verknüpft werden können. Die Anreicherung für eine ASC-Population mit einem verbesserten regenerativen Potential führte zu einer deutlichen Wirksamkeitsverbesserung der zellbasierten Therapie von diabetischen Wunden in vivo. Wir identifizierten zusätzlich eine alters- und diabetesbedingte Erschöpfung dieses potenten Zellclusters – ein potentieller pathophysiologischer Mechanismus, der den beeinträchtigten therapeutischen Fähigkeiten dieser Zellen zugrunde liegen könnte.

Teil 2: Mesenchymale Stammzelltherapie zur Rekonstruktion von

Weichteildefekten

Weichteildefekte sind ein allgegenwärtiges Problem in der Plastischen Chirurgie. Sie haben eine Vielzahl von möglichen Ursachen, wie z. B. kraniofaziale Anomalien, Malignome oder Traumata. Besonders häufig ist die Rekonstruktion von Weichgewebedefekten nach Resektionen im Zuge von malignen Erkrankungen notwendig. So wünscht sich die Mehrzahl der Frauen, die sich einer Mastektomie unterzogen hat, eine Wiederherstellung oder bestmögliche Angleichung der Brust, was nachweislich zu einer signifikant besseren Lebensqualität führt (Cagli, Cogliandro et al. 2014). In ähnlicher Weise ist es notwendig, bei Kindern mit kraniofazialen Anomalien, wie z. B. der hemifazialen Mikrosomie, einer Erkrankung, bei der eine Hälfte des Gesichts unterentwickelt ist, oder dem Parry-Romberg-Syndrom (idiopathische progressive hemifaziale Atrophie), rekonstruktive Eingriffe zur Wiederherstellung der Gesichtssymmetrie durchzuführen (Hoehnke, Eder et al. 2007, Sterodimas, Huanquipaco et al. 2009, Tanna, Broer et al. 2012).

Aktuelle Strategien für die Rekonstruktion von Weichteildefekten

Bei der chirurgischen Rekonstruktion von Weichgewebedefekten wird traditionell vor allem der Gewebetransfer in Form von Lappen und Hauttransplantaten eingesetzt. Ein Lappen, bestehend aus Gewebe mit dazugehöriger Blutversorgung, kann

mehrere Gewebearten enthalten. Während Lappen bei komplexen, dreidimensionalen Defekten bevorzugt werden, haben Hauttransplantate, die keine designierte Blutversorgung benötigen, den Vorteil einer geringeren Entnahmemorbidity, allerdings kann bei diesem Verfahren die Körperkontur nicht korrigiert werden (Pollhammer, Duscher et al. 2015, Pollhammer, Duscher et al. 2016, Santema, Poyck et al. 2016).

Erstmals beschrieben im 19. und 20. Jahrhundert und kürzlich repopularisiert von Sidney Coleman (Coleman 1998), sind Fetttransplantate in den letzten Jahren ein integraler Bestandteil der Weichgeweberekonstruktion geworden (Carpaneda and Ribeiro 1993, Coleman 2001). Klinisch können Eigenfetttransplantationen (Fatgrafting oder Lipofilling) vielseitig zur Rekonstruktion von Weichteildefekten oder für ästhetische Korrekturen am ganzen Körper eingesetzt werden. Das Anwendungsspektrum reicht von der Angleichung der Gesichtssymmetrie von Patienten mit Parry-Romberg-Syndrom (Slack, Tabit et al. 2014) bis zur Wiederherstellung der weiblichen Brust (Claro, Figueiredo et al. 2012). Die Technik wird immer häufiger eingesetzt, allerdings wird in einer Vielzahl von Studien über die rekonstruktive und kosmetische Anwendung von Lipofilling eine variable Resorptionsrate des transplantierten Materials (zwischen 10 und 80%) beschrieben (Wetterau, Szpalski et al. 2012, Herold, Ueberreiter et al. 2013, Ross, Shayan et al. 2014). Diese Inkonsistenz der Ergebnisse ist der Grund für den derzeit erheblichen Forschungsaufwand zur Verbesserung dieses Verfahrens. So

wurde in aktuellen Studien mit dem Ziel, der Variabilität der Resorption entgegenzuwirken, das Verfahren des zellunterstützten Lipotransfers (cell assisted lipotransfer, CAL) beschrieben. Das Prinzip des CAL ist eine Anreicherung der Fetttransplantate mit zusätzlichen regenerativen Progenitorzellen aus dem SVF des autologen Fettgewebes. (Matsumoto, Sato et al. 2006)

Zelluläre Antwort auf Gewebeschämie nach Lipofilling

Eine Ischämie und die daraus resultierende Hypoxie sowie Nährstoffunterversorgung sind unweigerlich mit dem Prozess des Fat-Graftings verbunden. In jüngeren Studien wurde versucht, die molekularen und zellulären Ereignisse, die in Fett nach einer Transplantation auftreten, genauer zu bestimmen. Suga et al. untersuchten die Auswirkungen einer Ischämie auf murines Leistenfett (Suga, Eto et al. 2010) und wiesen eine Apoptose von Gefäßendothelzellen, Adipozyten und hämatopoetischen Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden in ischämischer Umgebung nach. Im Gegensatz dazu wurden ASC (durch Durchflusszytometrie als CD45-/CD34+/-/CD31-Zellen definiert) als verhältnismäßig resistent gegenüber hypoxischen Bedingungen beschrieben. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ASCs direkt zur Fettgeweberegeneration beitragen (Suga, Eto et al. 2010). Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde in einer anderen Studie derselbe Prozess über einen zweiwöchigen Zeitraum untersucht, diesmal unter Verwendung von Transplantationen muriner Leistenfettpolster unter den Skalp (Eto, Kato et al. 2012). Ähnlich wie die vorausgegangene Studie konnte

innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Transplantation ein starker Rückgang an lebensfähigen Adipozyten entdeckt werden. Das Absterben der Adipozyten dauerte einige Tage an und erst ab Tag sieben wurde wieder eine Vermehrung der lebensfähigen Adipozyten beobachtet.

Genauere Untersuchungen über längere Zeiträume bestätigen eine allgemein gültige Sequenz von Abläufen nach der Fetttransplantation, die mit dem klinischen Verlauf von Lipofilling ohne CAL (Kolle, Fischer-Nielsen et al. 2013) übereinstimmen: Ein großer Teil der transferierten Adipozyten sterben innerhalb der ersten Woche ab. Nach dieser Apoptose-Welle folgt eine Adipozyten-Regeneration in den peripheren Zonen/Zwischenzonen mit einer relativen Konsolidierung der Volumina nach 3–6 Monaten. Die Frage, ob der Einfluss durch die parakrine Sekretion von regenerativen Faktoren der ischämiebeständigen ASCs oder durch Differenzierung derselben (Kato, Mineda et al. 2014) überwiegt oder ob ein kombinierter Effekt vorliegt, ist Gegenstand vieler Studien (Yoshimura, Sato et al. 2008, Nie, Yang et al. 2011, Tabit, Slack et al. 2012).

Charakterisierung der Adipose-Derived Stromal Cells und Prinzip des CAL

Die SVF besteht aus verschiedenen Zellen, unter denen auch die Adipose-Derived Stromal Cells (ASCs) zu finden sind. Diese heterogene Gruppe von multipotenten Zellen besitzt die Fähigkeit, sich in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren (Zuk, Zhu et al. 2002). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass ASCs

eine Vielzahl von proregenerativen Faktoren, wie anti-entzündliche und proangiogenetische Moleküle (IL-10 und VEGF), sezernieren (Salgado, Reis et al. 2010, Duscher, Rennert et al. 2014). Insbesondere eine ischämische Umgebung kann die Ausschüttung dieser Proteine stimulieren (Thangarajah, Vial et al. 2009, Kapur and Katz 2013). Daher sind Therapiekonzepte basierend auf der Übertragung von ASCs besonders attraktiv in der rekonstruktiven Chirurgie, bei der Entzündung und Hypoxie oftmals das Transplantationsareal beherrschen.

Auf den regenerativen Eigenschaften der ASCs beruht auch das Prinzip des CAL. Der Grundgedanke für die Verwendung von ASCs zur Anreicherung von Fetttransplantaten beim CAL beruhte auf der Tatsache, dass ASC im Lipoaspirat im Vergleich zu intaktem, exzidiertem Fett nur wenig vorkommen (Yoshimura, Shigeura et al. 2006). Daher sollte ein Lipoaspirat, das mit zusätzlichen ASCs angereichert ist, das normale Fettgewebe weitaus besser repräsentieren und damit auch die Einheilung eines solchen Transplantats bei autologem Lipotransfer wesentlich verbessern (Matsumoto, Sato et al. 2006).

Die Rolle der ASC in der Fetttransplantation

Initial herrscht im Fetttransplantat Ischämie vor. Genauer gesagt weisen Fetttransplantate nach der Injektion drei ‚Zonen‘ auf: eine umlaufende überlebende Zone, eine entzündliche regenerierende Zone und eine zentrale nekrotische Zone. Während Gewebe in der Entzündungszone letztendlich regeneriert wird, bleibt die zentrale Zone nekrotisch mit vollständig abgestorbenen Adipozyten und ASCs ohne Beitrag zum Transplantationsvolumen (Carpaneda and Ribeiro 1993, Kato, Mineda et al. 2014). Eine Möglichkeit, den Verlust von transplantierten Zellen zu vermindern und damit die Volumenretention nach Lipofilling zu verbessern, stellt die Supplementierung der Transplantate mit zusätzlichen ASCs dar.

Das Konzept des CAL wurde erstmals 2006 beschrieben: Matsumoto et al. konnten demonstrieren, dass eine Supplementierung von Lipoaspiraten mit SVF eine signifikant verbesserte Fetttransplantatretention und eine erhöhte Vaskularität der Transplantate bewirkte. Bei Experimenten mit Hilfe von transgenen Mäusen und mit GFP(green fluorescent protein)-markierten Zellen, kamen Matsumoto et al. zu dem Schluss, dass der beschriebene Effekt hauptsächlich durch das Differenzierungspotential der ASCs bestimmt wird (Matsumoto, Sato et al. 2006). Die Ergebnisse jüngerer Studien deuten auf eine parakrine Wirkung der ASCs im Fetttransplantat hin (Suga, Glotzbach et al. 2014, Garza, Rennert et al. 2015) und lassen den proangiogenetische Effekt der Progenitorzellen als Schlüsselement der ASC-Wirkung im CAL erscheinen. Unter Verwendung von Luciferase-

exprimierenden menschlichen ASCs waren Garza et al. in der Lage, den Verbleib der implantierten ASCs nach CAL zu verfolgen und die Zellen an verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation sequenziell zu isolieren. Das Ergebnis zeigte, dass die Mehrzahl der ASCs nicht langfristig im Transplantat überleben (nur 2 % blieben zehn Tage nach Transplantation erhalten). Mittels Einzelzelltranskriptionsanalyse der aus CAL-Transplantaten isolierten ASCs konnte die überwiegende Expression von angiogenen (z. B. FGF2 und VEGFA), nicht aber adipogenen Genen nachgewiesen werden (Garza, Rennert et al. 2015). Dies deutet auf eine parakrine angiogenetische und nicht adipogene Wirkung der ASCs im CAL hin. Zusätzlich haben Studien mit transgenen GFP⁺-Mäusen gezeigt, dass die Revaskularisierung von Fetttransplantaten hauptsächlich von Zellen des Empfängergebiets vermittelt wird (Dong, Peng et al. 2015). Diese Erkenntnis ist ein weiterer Hinweis gegen die Theorie der adipogenen oder vaskulogenen Differenzierung der ASCs nach CAL.

Die Balance zwischen Zellkonzentration und Transplantvolumen

Aufgrund ihrer verhältnismäßig einfachen Handhabung und der leichten Verfügbarkeit von transgenen Mäusen findet ein Großteil der Forschung über Fetttransplantate in Mausmodellen statt. Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, sollten nach Möglichkeit menschliche ASCs und menschliches Fettgewebe in der Forschung verwendet werden. Dies ist nur möglich, wenn die Aktivität des Immunsystems bei den Modellen reduziert ist, also

immunkomprimierte Mäuse verwendet werden (Watanabe, Numata et al. 2004). In Experimenten mit BALB/c-Mäusen konnte festgestellt werden, dass CAL mit ca. 85.000 Zellen pro Milliliter Fett langfristig die Retention von transplantiertem Fett verbessert (Zhu, Zhou et al. 2010). Angesichts der Tatsache, dass die benötigte Menge an Zellen, die für den Einsatz im CAL bestimmt sind, auch die Menge an Lipoaspirat beeinflusst, stellt sich die Frage, wie viele Zellen notwendig sind, um positive Veränderungen zu bewirken. Diese Fragestellung wurde durch ein murines CAL-Xenograft-Modell untersucht, indem die Zahl an SVF-Zellen, die dem Fett hinzugefügt wurden, titriert wurde. Es wurde herausgefunden, dass das Hinzufügen von 50.000 SVF-Zellen (die niedrigste Zahl) pro Milliliter Fetttransplantat zu den deutlichsten Verbesserungen in der Volumenretention und Vaskularität führt. Im Gegensatz dazu bewirkt die Zugabe von 50 Millionen SVF-Zellen (die höchste Zahl im Versuch) eine signifikant verringerte Fetttransplantatretention und Vaskularität (Paik, Zielins et al. 2015). Als Grund für diese Unterschiede wird die Zell-Zell-Konkurrenz um ohnehin schon knappe Ressourcen in der hypoxischen Transplantatumgebung hypothetisiert. Diese Erkenntnisse werden durch die Arbeit von Li et al. (Li, Li et al. 2017) gestützt, in der ähnliche Konzentrationen von ASCs als optimal für CAL bestimmt wurden. Diese Ergebnisse stehen in starkem Kontrast zu denen der ersten randomisierten klinischen Studie über CAL, wo 20 Millionen ASCs pro Milliliter Fett verwendet wurden (Kolle, Fischer-Nielsen et al. 2013). Aufgrund der unterschiedlichen

Ergebnisse sind weitere klinische Versuchsreihen notwendig, um die optimale Dosierung von ASCs im CAL zu bestimmen.

Einflussfaktoren auf die ASC-Funktionalität

Angesichts der Rolle, die ASCs bei der Förderung der Fetttransplantatretention spielen könnten, darf die bekannte funktionelle Heterogenität von ASCs als Einflussfaktor nicht außer Acht gelassen werden. ASCs sind heterogen in ihrem Genexpressionsprofil und es ist wahrscheinlich, dass proangiogene und proadipogene ASC-Subpopulationen zusammen mit den schon identifizierten proosteogenen Fraktionen vorliegen (Levi, Wan et al. 2011, Rennert, Januszyk et al. 2016). Ein logischer nächster Schritt sind wissenschaftliche Bestrebungen, diese potenten Subpopulationen mittels Einzelzell-Genexpressionsanalyse zu identifizieren und ähnlich wie oben beschrieben für therapeutische Zwecke zu isolieren. Durch eine solche Subpopulationsselektion könnten eventuell auch die bekannten negativen Einflussfaktoren auf die zelluläre Funktionalität umgangen werden. Zusätzlich zur Lipoaspirationstechnik und zu dem Gesundheitszustand des Spenders sind andere entscheidende Faktoren für die Funktionalität der ASCs das Patientenalter (El-Ftesi, Chang et al. 2009, Choudhery, Badowski et al. 2014, Duscher, Rennert et al. 2014) und die Fettentnahmestelle (Jurgens, Oedayrajsingh-Varma et al. 2008, Aguenta, Fanganiello et al. 2012). Weitere Studien sind notwendig, um Einflüsse auf die ASC-Funktionalität genauer

bestimmen zu können und daraus klinische Vorteile für die Rekonstruktion von Weichteildefekten durch Eigenfetttransplantation abzuleiten.

ZUSAMMENFASSUNG

Gewebsdefekte stellen eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem dar und die mit ihnen verbundenen negativen psychosozialen Auswirkungen auf einzelne Patienten sind enorm. Traditionelle Rekonstruktionsverfahren bleiben wertvolle Werkzeuge in der klinischen Praxis. Die wachsende Prävalenz von chronischen Krankheiten wie Diabetes und Krebs führt zu einem Anstieg von chronischen Wunden und komplexen Konturdefekten. Es ist daher erforderlich, dass bewährte Techniken mit neuartigen zellbasierten Therapien ergänzt werden, um die Grenzen dessen zu erweitern, was medizinisch möglich ist. Trotz der jüngsten Fortschritte und erster klinischer Studien werden zellbasierte Therapien für die Haut- und Weichteilregeneration in der Praxis noch wenig genutzt. Die Umsetzung wird durch Faktoren wie Sicherheit, Kosten und Integrität der therapeutisch genutzten Zellen eingeschränkt. In dieser Arbeit konnte durch strukturierte Evaluation die regenerative Funktionalität von ASCs, die durch UAL und SAL gewonnen wurden, mit ASCs, die unter minimaler Manipulation aus Abdominoplastik-Resektaten isoliert wurden, verglichen werden. Hierzu wurde eine In-vitro-Evaluation der Proliferation, der Migration, des Differenzierungsvermögens und der für die klinische Effektivität von Zelltherapeutika essentiellen Zytokinausschüttung durchgeführt. Als nächstes wurden im Tiermodell die Fähigkeit zur Gewebserneuerung und Wundheilung sowie zur Angiogeneseförderung überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass alle evaluierten Methoden der Liposuction geeignet sind, um Lipoaspirat mit funktionell intakten

ASCs zu gewinnen. Diese Daten schaffen die Grundlage für einen effektiven Einsatz der Zellen in klinischen Therapien. Weitere translationale Tests und Innovationen, die sich am Schnittpunkt von Ingenieurwesen, Biologie und Medizin ergeben, sind notwendig, um die klinische Anwendung dieses vielversprechenden neuen Behandlungsparadigmas zu ermöglichen.

BIBLIOGRAPHIE

Aguena, M., R. D. Fanganiello, L. A. Tissiani, F. A. Ishiy, R. Atique, N. Alonso and M. R. Passos-Bueno (2012). "Optimization of parameters for a more efficient use of adipose-derived stem cells in regenerative medicine therapies." Stem Cells Int 2012: 303610.

ASAPS (2016). "Cosmetic Surgery National Data Bank Statistics, available at: <https://www.surgery.org/sites/default/files/ASAPS-Stats2016.pdf>." Abrufdatum: 10.05.2017

Astori, G., F. Vignati, S. Bardelli, M. Tubio, M. Gola, V. Albertini, F. Bambi, G. Scali, D. Castelli, V. Rasini, G. Soldati and T. Moccetti (2007). ""In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells." J Transl Med 5: 55.

Badiavas, E. V., M. Abedi, J. Butmarc, V. Falanga and P. Quesenberry (2003). "Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing." J Cell Physiol 196(2): 245-250.

Bajada, S., I. Mazakova, J. B. Richardson and N. Ashammakhi (2008). "Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine." J Tissue Eng Regen Med 2(4): 169-183.

Berry, M. G. and D. Davies (2011). "Liposuction: a review of principles and techniques." J Plast Reconstr Aesthet Surg 64(8): 985-992.

Blakytyn, R. and E. Jude (2006). "The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes." Diabet Med 23(6): 594-608.

Cagli, B., A. Cogliandro, M. Barone and P. Persichetti (2014). "Quality-of-life outcomes between mastectomy alone and breast reconstruction: comparison of patient-reported BREAST-Q and other health-related quality-of-life measures." Plast Reconstr Surg 133(4): 594e-595e.

Carpaneda, C. A. and M. T. Ribeiro (1993). "Study of the histologic alterations and viability of the adipose graft in humans." Aesthetic Plast Surg 17(1): 43-47.

Choi, J. H., J. M. Gimble, K. Lee, K. G. Marra, J. P. Rubin, J. J. Yoo, G. Vunjak-Novakovic and D. L. Kaplan (2010). "Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration." Tissue Engineering Part B: Reviews 16(4): 413-426.

Choudhery, M. S., M. Badowski, A. Muise, J. Pierce and D. T. Harris (2014). "Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation." J Transl Med 12: 8.

Chung, M. T., A. S. Zimmermann, K. J. Paik, S. D. Morrison, J. S. Hyun, D. D. Lo, A. McArdle, D. T. Montoro, G. G. Walmsley and K. Senarath-Yapa (2013). "Isolation of Human Adipose - Derived Stromal Cells Using Laser - Assisted Liposuction and Their Therapeutic Potential in Regenerative Medicine." Stem cells translational medicine 2(10): 808-817.

Chung, M. T., A. S. Zimmermann, K. J. Paik, S. D. Morrison, J. S. Hyun, D. D. Lo, A. McArdle, D. T. Montoro, G. G. Walmsley and K. Senarath-Yapa (2013). "Isolation of Human Adipose - Derived Stromal Cells Using Laser - Assisted Liposuction and Their Therapeutic Potential in Regenerative Medicine." Stem cells translational medicine 2(10): 808-817.

Chung, M. T., A. S. Zimmermann, K. J. Paik, S. D. Morrison, J. S. Hyun, D. D. Lo, A. McArdle, D. T. Montoro, G. G. Walmsley, K. Senarath-Yapa, M. Sorkin, R. Rennert, H. H. Chen, A. S. Chung, D. Vistnes, G. C. Gurtner, M. T. Longaker and D. C. Wan (2013). "Isolation of human adipose-derived stromal cells using laser-assisted liposuction and their therapeutic potential in regenerative medicine." Stem Cells Transl Med 2(10): 808-817.

Claro, F., Jr., J. C. Figueiredo, A. G. Zampar and A. M. Pinto-Neto (2012). "Applicability and safety of autologous fat for reconstruction of the breast." Br J Surg 99(6): 768-780.

Cole-King, A. and K. G. Harding (2001). "Psychological factors and delayed healing in chronic wounds." Psychosom Med 63(2): 216-220.

Coleman, S. R. (1998). "Structural fat grafting." Aesthet Surg J 18(5): 386, 388.

Coleman, S. R. (2001). "Structural fat grafts: the ideal filler?" Clin Plast Surg 28(1): 111-119.

Crovetti, G., G. Martinelli, M. Issi, M. Barone, M. Guizzardi, B. Campanati, M. Moroni and A. Carabelli (2004). "Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds." Transfus Apher Sci 30(2): 145-151.

de Souza Pinto, E. B., P. C. Abdala, C. M. Maciel, P. dos Santos Fde and R. P. de Souza (2006). "Liposuction and VASER." Clin Plast Surg 33(1): 107-115, vii.

Dong, Z., Z. Peng, Q. Chang, W. Zhan, Z. Zeng, S. Zhang and F. Lu (2015). "The angiogenic and adipogenic modes of adipose tissue after free fat grafting." Plast Reconstr Surg 135(3): 556e-567e.

Duscher, D., J. Barrera, V. W. Wong, Z. N. Maan, A. J. Whittam, M. Januszyk and G. C. Gurtner (2016). "Stem Cells in Wound Healing: The Future of Regenerative Medicine? A Mini-Review." Gerontology 62(2): 216-225.

Duscher, D., Z. N. Maan, V. W. Wong, R. C. Rennert, M. Januszyk, M. Rodrigues, M. Hu, A. J. Whitmore, A. J. Whittam, M. T. Longaker and G. C. Gurtner (2014). "Mechanotransduction and fibrosis." J Biomech 47(9): 1997-2005.

Duscher, D., E. Neofytou, V. W. Wong, Z. N. Maan, R. C. Rennert, M. Inayathullah, M. Januszyk, M. Rodrigues, A. V. Malkovskiy, A. J. Whitmore, G. G. Walmsley, M. G. Galvez, A. J. Whittam, M. Brownlee, J. Rajadas and G. C. Gurtner (2015). "Transdermal deferoxamine prevents pressure-induced diabetic ulcers." Proc Natl Acad Sci U S A 112(1): 94-99.

Duscher, D., R. C. Rennert, M. Januszyk, E. Anghel, Z. N. Maan, A. J. Whittam, M. G. Perez, R. Kosaraju, M. S. Hu, G. G. Walmsley, D. Atashroo, S. Khong, A. J. Butte and G. C. Gurtner (2014). "Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells." Sci Rep 4: 7144.

El-Ftesi, S., E. I. Chang, M. T. Longaker and G. C. Gurtner (2009). "Aging and diabetes impair the neovascular potential of adipose-derived stromal cells." Plast Reconstr Surg 123(2): 475-485.

Eto, H., H. Kato, H. Suga, N. Aoi, K. Doi, S. Kuno and K. Yoshimura (2012). "The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes." Plast Reconstr Surg 129(5): 1081-1092.

Falanga, V., S. Iwamoto, M. Chartier, T. Yufit, J. Butmarc, N. Kouttab, D. Shryer and P. Carson (2007). "Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds." Tissue Eng 13(6): 1299-1312.

Fischer, G. (1990). "Liposculpture: the " correct" history of liposuction. Part I." Dermatologic Surgery 16(12): 1087-1089.

Gao, W., X. Qiao, S. Ma and L. Cui (2011). "Adipose-derived stem cells accelerate neovascularization in ischaemic diabetic skin flap via expression of hypoxia-inducible factor-1alpha." J Cell Mol Med 15(12): 2575-2585.

Garg, R. K., R. C. Rennert, D. Duscher, M. Sorkin, R. Kosaraju, L. J. Auerbach, J. Lennon, M. T. Chung, K. Paik and J. Nimpf (2014). "Capillary Force Seeding of Hydrogels for Adipose, R. Kosaraju, L. J. Auerbach, J. Lennon Stem cells translational medicine 3(9): 1079-1089.

Garg, R. K., R. C. Rennert, D. Duscher, M. Sorkin, R. Kosaraju, L. J. Auerbach, J. Lennon, M. T. Chung, K. Paik, J. Nimpf, J. Rajadas, M. T. Longaker and G. C.

Gurtner (2014). "Capillary force seeding of hydrogels for adipose-derived stem cell delivery in wounds." Stem Cells Transl Med 3(9): 1079-1089.

Garza, R. M., K. J. Paik, M. T. Chung, D. Duscher, G. C. Gurtner, M. T. Longaker and D. C. Wan (2014). "Studies in fat grafting: Part III. Fat grafting irradiated tissue--improved skin quality and decreased fat graft retention." Plast Reconstr Surg 134(2): 249-257.

Garza, R. M., R. C. Rennert, K. J. Paik, D. Atashroo, M. T. Chung, D. Duscher, M. Januszyk, G. C. Gurtner, M. T. Longaker and D. C. Wan (2015). "Studies in fat grafting: Part IV. Adipose-derived stromal cell gene expression in cell-assisted lipotransfer." Plast Reconstr Surg 135(4): 1045-1055.

Gentile, P., M. G. Scioli, A. Orlandi and V. Cervelli (2015). "Breast Reconstruction with Enhanced Stromal Vascular Fraction Fat Grafting: What Is the Best Method?" Plast Reconstr Surg Glob Open 3(6): e406.

Gimble, J. and F. Guilak (2003). "Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential." Cytotherapy 5(5): 362-369.

Gurtner, G. C., S. Werner, Y. Barrandon and M. T. Longaker (2008). "Wound repair and regeneration." Nature 453(7193): 314-321.

Halvorsen, Y. C., W. O. Wilkison and J. M. Gimble (2000). "Adipose-derived stromal cells--their utility and potential in bone formation." Int J Obes Relat Metab Disord 24 Suppl 4: S41-44.

Herold, C., K. Ueberreiter, M. N. Busche and P. M. Vogt (2013). "Autologous fat transplantation: volumetric tools for estimation of volume survival. A systematic review." Aesthetic Plast Surg 37(2): 380-387.

Hoehnke, C., M. Eder, N. A. Papadopoulos, A. Zimmermann, G. Brockmann, E. Biemer and L. Kovacs (2007). "Minimal invasive reconstruction of posttraumatic hemi facial atrophy by 3-D computer-assisted lipofilling." J Plast Reconstr Aesthet Surg 60(10): 1138-1144.

Hollenbeck, S. T., A. Senghaas, I. Komatsu, Y. Zhang, D. Erdmann and B. Klitzman (2012). "Tissue engraftment of hypoxic-preconditioned adipose-derived stem cells improves flap viability." Wound Repair Regen 20(6): 872-878.

Januszyk, M. and G. C. Gurtner (2013). "High-Throughput Single-Cell Analysis for Wound Healing Applications." Adv Wound Care (New Rochelle) 2(9): 457-469.

Januszyk, M., R. C. Rennert, M. Sorkin, Z. N. Maan, L. K. Wong, A. J. Whittam, A. Whitmore, D. Duscher and G. C. Gurtner (2015). "Evaluating the Effect of Cell

Culture on Gene Expression in Primary Tissue Samples Using Microfluidic-Based Single Cell Transcriptional Analysis." Microarrays 4(4): 540-550.

Jurgens, W. J., M. J. Oedayrajsingh-Varma, M. N. Helder, B. Zandiehoulabi, T. E. Schouten, D. J. Kuik, M. J. Ritt and F. J. van Milligen (2008). "Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies." Cell Tissue Res 332(3): 415-426.

Kapur, S. K. and A. J. Katz (2013). "Review of the adipose derived stem cell secretome." Biochimie 95(12): 2222-2228.

Kato, H., K. Mineda, H. Eto, K. Doi, S. Kuno, K. Kinoshita, K. Kanayama and K. Yoshimura (2014). "Degeneration, regeneration, and cicatrization after fat grafting: dynamic total tissue remodeling during the first 3 months." Plast Reconstr Surg 133(3): 303e-313e.

Kilroy, G. E., S. J. Foster, X. Wu, J. Ruiz, S. Sherwood, A. Heifetz, J. W. Ludlow, D. M. Stricker, S. Potiny and P. Green (2007). "Cytokine profile of human adiposeynamic total tissue remodeling during the first 3 months." tissue: implications for actors." Journal of cellular physiology 212(3): 702-709.

Kim, W. S., B. S. Park, J. H. Sung, J. M. Yang, S. B. Park, S. J. Kwak and J. S. Park (2007). "Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts." J Dermatol Sci 48(1): 15-24.

Kølle, S.-F. T., A. Fischer-Nielsen, A. B. Mathiasen, J. J. Elberg, R. S. Oliveri, P. V. Glovinski, J. Kastrup, M. Kirchhoff, B. S. Rasmussen and M.-L. M. Talman (2013). "Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial." The Lancet 382(9898): 1113-1120.

Kolle, S. F., A. Fischer-Nielsen, A. B. Mathiasen, J. J. Elberg, R. S. Oliveri, P. V. Glovinski, J. Kastrup, M. Kirchhoff, B. S. Rasmussen, M. L. Talman, C. Thomsen, E. Dickmeiss and K. T. Drzewiecki (2013). "Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial." Lancet 382(9898): 1113-1120.

Kosaraju, R., R. C. Rennert, Z. N. Maan, D. Duscher, J. Barrera, A. J. Whittam, M. Januszyk, J. Rajadas, M. Rodrigues and G. C. Gurtner (2016). "Adipose-Derived Stem Cell-Seeded Hydrogels Increase Endogenous Progenitor Cell Recruitment and Neovascularization in Wounds." Tissue Eng Part A 22(3-4): 295-305.

Kucia, M., J. Ratajczak, R. Reca, A. Janowska-Wieczorek and M. Z. Ratajczak (2004). "Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury." Blood Cells Mol Dis 32(1): 52-57.

Lee, E. Y., Y. Xia, W. S. Kim, M. H. Kim, T. H. Kim, K. J. Kim, B. S. Park and J. H. Sung (2009). "Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF." Wound Repair Regen 17(4): 540-547.

Levi, B., D. C. Wan, J. P. Glotzbach, J. Hyun, M. Januszyk, D. Montoro, M. Sorkin, A. W. James, E. R. Nelson, S. Li, N. Quarto, M. Lee, G. C. Gurtner and M. T. Longaker (2011). "CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) signaling." J Biol Chem 286(45): 39497-39509.

Li, K., F. Li, J. Li, H. Wang, X. Zheng, J. Long, W. Guo and W. Tian (2017). "Increased survival of human free fat grafts with varying densities of human adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma." J Tissue Eng Regen Med 11(1): 209-219.

Matsumoto, D., K. Sato, K. Gonda, Y. Takaki, T. Shigeura, T. Sato, E. Aiba-Kojima, F. Iizuka, K. Inoue and H. Suga (2006). "Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection." Tissue engineering 12(12): 3375-3382.

Matsumoto, D., K. Sato, K. Gonda, Y. Takaki, T. Shigeura, T. Sato, E. Aiba-Kojima, F. Iizuka, K. Inoue, H. Suga and K. Yoshimura (2006). "Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection." Tissue Eng 12(12): 3375-3382.

Nakagawa, H., S. Akita, M. Fukui, T. Fujii and K. Akino (2005). "Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing." Br J Dermatol 153(1): 29-36.

Nie, C., D. Yang, J. Xu, Z. Si, X. Jin and J. Zhang (2011). "Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis." Cell transplantation 20(2): 205-216.

Paik, K. J., E. R. Zielins, D. A. Atashroo, Z. N. Maan, D. Duscher, A. Luan, G. G. Walmsley, A. Momeni, S. Vistnes, G. C. Gurtner, M. T. Longaker and D. C. Wan (2015). "Studies in Fat Grafting: Part V. Cell-Assisted Lipotransfer to Enhance Fat Graft Retention Is Dose Dependent." Plast Reconstr Surg 136(1): 67-75.

Panetta, N. J., D. M. Gupta, M. D. Kwan, D. C. Wan, G. W. Commons and M. T. Longaker (2009). "Tissue harvest by means of suction-assisted or third-generation ultrasound-assisted lipoaspiration has no effect on osteogenic potential of human adipose-derived stromal cells." Plast Reconstr Surg 124(1): 65-73.

Pollhammer, M. S., D. Duscher, Z. N. Maan, M. Schmidt and G. M. Huemer (2015). "Gigantic LCFA-SCIP Mosaic Flap for Upper Extremity Reconstruction." Plast Reconstr Surg Glob Open 3(9): e506.

Pollhammer, M. S., D. Duscher, M. Schmidt and G. M. Huemer (2016). "Recent advances in microvascular autologous breast reconstruction after ablative tumor surgery." World J Clin Oncol 7(1): 114-121.

Rangappa, S., C. Fen, E. H. Lee, A. Bongso and E. K. Sim (2003). "Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes." Ann Thorac Surg 75(3): 775-779.

Rao, M. S. and M. P. Mattson (2001). "Stem cells and aging: expanding the possibilities." Mech Ageing Dev 122(7): 713-734.

Rennert, R. C., M. Januszyk, M. Sorkin, M. Rodrigues, Z. N. Maan, D. Duscher, A. J. Whittam, R. Kosaraju, M. T. Chung, K. Paik, A. Y. Li, M. Findlay, J. P. Glotzbach, A. J. Butte and G. C. Gurtner (2016). "Microfluidic single-cell transcriptional analysis rationally identifies novel surface marker profiles to enhance cell-based therapies." Nat Commun 7: 11945.

Rennert, R. C., M. Sorkin, M. Januszyk, D. Duscher, R. Kosaraju, M. T. Chung, J. Lennon, A. Radiya-Dixit, S. Raghvendra, Z. N. Maan, M. S. Hu, J. Rajadas, M. Rodrigues and G. C. Gurtner (2014). "Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose-derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations." Stem Cell Res Ther 5(3): 79.

Rigotti, G., A. Marchi, M. Galie, G. Baroni, D. Benati, M. Krampera, A. Pasini and A. Sbarbati (2007). "Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells." Plastic and reconstructive surgery 119(5): 1409-1422.

Ross, R. J., R. Shayan, K. L. Mutimer and M. W. Ashton (2014). "Autologous fat grafting: current state of the art and critical review." Ann Plast Surg 73(3): 352-357.

Rustad, K. C., V. W. Wong, M. Sorkin, J. P. Glotzbach, M. R. Major, J. Rajadas, M. T. Longaker and G. C. Gurtner (2012). "Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold." Biomaterials 33(1): 80-90.

Safford, K. M., K. C. Hicok, S. D. Safford, Y. D. Halvorsen, W. O. Wilkison, J. M. Gimble and H. E. Rice (2002). "Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells." Biochem Biophys Res Commun 294(2): 371-379.

Salgado, A. J., R. L. Reis, N. J. Sousa and J. M. Gimble (2010). "Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine." Curr Stem Cell Res Ther 5(2): 103-110.

Santema, T. B., P. P. Poyck and D. T. Ubbink (2016). "Skin grafting and tissue replacement for treating foot ulcers in people with diabetes." Cochrane Database Syst Rev 2: CD011255.

Scuderi, N., S. Tenna, C. Spalvieri and F. De Gado (2005). "Power-assisted lipoplasty versus traditional suction-assisted lipoplasty: comparative evaluation and analysis of output." Aesthetic plastic surgery 29(1): 49-52.

Sen, C. K., G. M. Gordillo, S. Roy, R. Kirsner, L. Lambert, T. K. Hunt, F. Gottrup, G. C. Gurtner and M. T. Longaker (2009). "Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy." Wound Repair Regen 17(6): 763-771.

Shridharani, S. M., J. M. Broyles and A. Matarasso (2014). "Liposuction devices: technology update." Med Devices (Auckl) 7: 241-251.

Sinno, S., S. Wilson, N. Brownstone and S. M. Levine (2016). "Current Thoughts on Fat Grafting: Using the Evidence to Determine Fact or Fiction." Plast Reconstr Surg 137(3): 818-824.

Slack, G. C., C. J. Tabit, K. A. Allam, H. K. Kawamoto and J. P. Bradley (2014). "Parry-Romberg reconstruction: beneficial results despite poorer fat take." Ann Plast Surg 73(3): 307-310.

Sterodimas, A., F. Boriani, E. Magarakis, B. Nicaretta, L. Pereira and Y. Illouz (2012). "Thirtyfour years of liposuction: past, present and future." Eur Rev Med Pharmacol Sci 16(3): 393-406.

Sterodimas, A., J. C. Huanquipaco, S. de Souza Filho, F. A. Bornia and I. Pitanguy (2009). "Autologous fat transplantation for the treatment of Parry-Romberg syndrome." J Plast Reconstr Aesthet Surg 62(11): e424-426.

Strem, B. M., K. C. Hicok, M. Zhu, I. Wulur, Z. Alfonso, R. E. Schreiber, J. K. Fraser and M. H. Hedrick (2005). "Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells." The Keio journal of medicine 54(3): 132-141.

Suga, H., H. Eto, N. Aoi, H. Kato, J. Araki, K. Doi, T. Higashino and K. Yoshimura (2010). "Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells." Plast Reconstr Surg 126(6): 1911-1923.

Suga, H., J. P. Glotzbach, M. Sorkin, M. T. Longaker and G. C. Gurtner (2014). "Paracrine mechanism of angiogenesis in adipose-derived stem cell transplantation." Ann Plast Surg 72(2): 234-241.

Suga, H., D. Matsumoto, H. Eto, K. Inoue, N. Aoi, H. Kato, J. Araki and K. Yoshimura (2009). "Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells." Stem Cells Dev 18(8): 1201-1210.

Tabit, C. J., G. C. Slack, K. Fan, D. C. Wan and J. P. Bradley (2012). "Fat grafting versus adipose-derived stem cell therapy: distinguishing indications, techniques, and outcomes." Aesthetic plastic surgery 36(3): 704-713.

Tanna, N., P. N. Broer, J. Roostaeian, J. P. Bradley, J. P. Levine and P. B. Saadeh (2012). "Soft tissue correction of craniofacial microsomia and progressive hemifacial atrophy." J Craniofac Surg 23(7 Suppl 1): 2024-2027.

Thangarajah, H., I. N. Vial, E. Chang, S. El-Ftesi, M. Januszyk, E. I. Chang, J. Paterno, E. Neofytou, M. T. Longaker and G. C. Gurtner (2009). "IFATS collection: Adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia." Stem Cells 27(1): 266-274.

Venkataram, J. (2008). "Tumescent liposuction: a review." Journal of cutaneous and aesthetic surgery 1(2): 49.

Walmsley, G. G., D. A. Atashroo, Z. N. Maan, M. S. Hu, E. R. Zielins, J. M. Tsai, D. Duscher, K. Paik, R. Tevlin, O. Marecic, D. C. Wan, G. C. Gurtner and M. T. Longaker (2015). "High-Throughput Screening of Surface Marker Expression on Undifferentiated and Differentiated Human Adipose-Derived Stromal Cells." Tissue Eng Part A 21(15-16): 2281-2291.

Walmsley, G. G., M. S. Hu, H. P. Lorenz and M. T. Longaker (2016). "A System for the Surveillance of Stem Cell Fate and Function." Stem Cell and Translational Investigation 3.

Walmsley, G. G., K. Senarath-Yapa, T. L. Wearda, S. Menon, M. S. Hu, D. Duscher, Z. N. Maan, J. M. Tsai, E. R. Zielins, I. L. Weissman, G. C. Gurtner, H. P. Lorenz and M. T. Longaker (2016). "Surveillance of Stem Cell Fate and Function: A System for Assessing Cell Survival and Collagen Expression In Situ." Tissue Eng Part A 22(1-2): 31-40.

Watanabe, H., K. Numata, T. Ito, K. Takagi and A. Matsukawa (2004). "Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains." Shock 22(5): 460-466.

Weissman, I. L. (2000). "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution." Cell 100(1): 157-168.

Wetterau, M., C. Szpalski, A. Hazen and S. M. Warren (2012). "Autologous fat grafting and facial reconstruction." J Craniofac Surg 23(1): 315-318.

Wong, V. W., K. C. Rustad, J. P. Glotzbach, M. Sorokin, M. Inayathullah, M. R. Major, M. T. Longaker, J. Rajadas and G. C. Gurtner (2011). "Pullulan hydrogels improve mesenchymal stem cell delivery into high-oxidative-stress wounds." Macromolecular bioscience 11(11): 1458-1466.

Yoshimura, K., K. Sato, N. Aoi, M. Kurita, T. Hirohi and K. Harii (2008). "Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells." Aesthetic plastic surgery 32(1): 48-55.

Yoshimura, K., T. Shigeura, D. Matsumoto, T. Sato, Y. Takaki, E. Aiba-Kojima, K. Sato, K. Inoue, T. Nagase, I. Koshima and K. Gonda (2006). "Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates." J Cell Physiol 208(1): 64-76.

Yoshimura, K., H. Suga and H. Eto (2009). "Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation."

Zhu, M., S. Heydarkhan-Hagvall, M. Hedrick, P. Benhaim and P. Zuk (2013). "Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates." J Vis Exp(79): e50585.

Zhu, M., Z. Zhou, Y. Chen, R. Schreiber, J. T. Ransom, J. K. Fraser, M. H. Hedrick, K. Pinkernell and H. C. Kuo (2010). "Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention." Ann Plast Surg 64(2): 222-228.

Zielins, E. R., E. A. Brett, M. T. Longaker and D. C. Wan (2016). "Autologous Fat Grafting: The Science Behind the Surgery." Aesthet Surg J 36(4): 488-496.

Zocchi, M. (1992). "Ultrasonic liposculpturing." Aesthetic plastic surgery 16(4): 287-298.

Zografou, A., O. Papadopoulos, C. Tsigris, N. Kavantzias, E. Michalopoulos, T. Chatzistamatiou, A. Papassavas, C. Stavropoulou-Gioka, I. Dontas and D. Perrea (2013). "Autologous transplantation of adipose-derived stem cells enhances skin graft survival and wound healing in diabetic rats." Ann Plast Surg 71(2): 225-232.

Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim and M. H. Hedrick (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell 13(12): 4279-4295.

DANKSAGUNG

Danken möchte ich zuerst meinem Betreuer Professor Arndt Schilling, für sein tatkräftiges Engagement und die fachmännische Betreuung dieser Arbeit. Ich freue mich auf die zukünftige Zusammenarbeit und einen Ausbau des Austausches zwischen Göttingen und München. Ebenfalls großer Dank gilt meinem Mentor Professor Hans-Günther Machens, der mich stets fördert und mir meine Traumlaufbahn als Surgeon-Scientist ermöglicht.

Mein Dank gilt insbesondere auch den Mitarbeitern der Experimentellen Plastischen Chirurgie der TU München. Ich könnte mir kein besseres Team wünschen und bin gespannt auf die gemeinsamen wissenschaftlichen Abenteuer von morgen.

Zuletzt und am meisten möchte ich meiner Familie und besonders meiner Katharina für die immerwährende Unterstützung danken. Sie sind nur allzu oft die Leidtragenden, wenn das Privatleben wieder einmal wegen der beruflichen Passion zu kurz kommt.

APPENDIX

Publikation I

RESEARCH

Open Access



Suction assisted liposuction does not impair the regenerative potential of adipose derived stem cells

Dominik Duscher^{1,2,4*}, Anna Luan¹, Robert C. Rennert¹, David Atashroo¹, Zeshaan N. Maan¹, Elizabeth A. Brett¹, Alexander J. Whittam¹, Natalie Ho¹, Michelle Lin¹, Michael S. Hu¹, Graham G. Walmsley^{1,3}, Raphael Wenny², Manfred Schmidt², Arndt F. Schilling⁴, Hans-Günther Machens⁴, Georg M. Huemer², Derrick C. Wan¹, Michael T. Longaker^{1,3} and Geoffrey C. Gurtner^{1*}

Abstract

Background: Adipose-derived stem cells (ASCs) have been identified as a population of multipotent cells with promising applications in tissue engineering and regenerative medicine. ASCs are abundant in fat tissue, which can be safely harvested through the minimally invasive procedure of liposuction. However, there exist a variety of different harvesting methods, with unclear impact on ASC regenerative potential. The aim of this study was thus to compare the functionality of ASCs derived from the common technique of suction-assisted lipoaspiration (SAL) versus resection.

Methods: Human adipose tissue was obtained from paired abdominoplasty and SAL samples from three female donors, and was processed to isolate the stromal vascular fraction. Fluorescence-activated cell sorting was used to determine ASC yield, and cell viability was assayed. Adipogenic and osteogenic differentiation capacity were assessed in vitro using phenotypic staining and quantification of gene expression. Finally, ASCs were applied in an in vivo model of tissue repair to evaluate their regenerative potential.

Results: SAL specimens provided significantly fewer ASCs when compared to excised fat tissue, however, with equivalent viability. SAL-derived ASCs demonstrated greater expression of the adipogenic markers FABP-4 and LPL, although this did not result in a difference in adipogenic differentiation. There were no differences detected in osteogenic differentiation capacity as measured by alkaline phosphatase, mineralization or osteogenic gene expression. Both SAL- and resection-derived ASCs enhanced significantly cutaneous healing and vascularization in vivo, with no significant difference between the two groups.

Conclusion: SAL provides viable ASCs with full capacity for multi-lineage differentiation and tissue regeneration, and is an effective method of obtaining ASCs for cell-based therapies.

Background

Adipose tissue has recently been identified as a promising source of multipotent cells for use in regenerative

medicine. Adipose-derived stem cells (ASCs) are cells of mesenchymal origin with a capacity to differentiate through adipogenic, osteogenic, and chondrogenic lineages, among others [1, 2]. Notably, in contrast to bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs), ASCs derived from adipose tissue are abundant [3] and relatively easily obtainable [1, 2, 4]. Due to their high yield in adipose tissue, ASCs additionally have the potential to be used in clinical therapy without the need for expansion in culture.

*Correspondence: dominikduscher@me.com; ggurtner@stanford.edu

¹ Hagey Laboratory for Pediatric Regenerative Medicine, Division of Plastic Surgery, Department of Surgery, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

² Section of Plastic, Aesthetic and Reconstructive Surgery, Johannes Kepler University, Linz, Austria

Full list of author information is available at the end of the article

The potential utility of ASCs in tissue engineering and cell-based regenerative therapies has been confirmed in a variety of pre-clinical and clinical applications. For example, pullulan-collagen hydrogel scaffolds seeded with ASCs have been demonstrated to increase vascularity and improve wound healing [5, 6]. With regard to skeletal regenerative potential, implantation of an ASC-seeded hydroxyapatite-coated poly (lactic-co-glycolic acid) scaffold into a critical-sized calvarial defect resulted in significant healing of the defect within 8 weeks [7, 8]. Finally, the adipogenic and angiogenic capabilities of ASCs have been utilized in the technique of cell-assisted lipotransfer (CAL), in which fat grafts are enriched with their native ASCs to improve retention and variability [9–12].

However, there exist a variety of different methods to obtain adipose tissue in clinical practice, with unclear impact on the viability and regenerative potential of ASCs. The current standard method for fat harvest for regenerative medicine purposes is liposuction. Specifically, suction-assisted lipoaspiration (SAL) [13], which uses manual movement of a small suction cannula to mechanically disrupt the adipose tissue, is most widely used [14, 15]. Previous work from our laboratory has demonstrated that relative to SAL, laser-assisted liposuction (LAL) leads to reduced ASC viability and in vivo regenerative potential [16], while ultrasound-assisted liposuction (UAL) does not affect ASC yield, proliferation, differentiation or capacity for tissue regeneration [17]. However, it remains to be determined what effects SAL itself has on key ASC characteristics. Therefore, the aim of this study was to determine the effects of SAL on ASC yield, viability, in vitro adipogenic and osteogenic differentiation capabilities, as well as in vivo regenerative potential by comparing ASCs derived from SAL lipoaspirates and those from resected adipose tissue.

Methods

Human adipose tissue collection and stromal vascular fraction isolation

Human adipose tissue was obtained from three healthy female donors after informed consent under approval of the Stanford University Institutional Review Board (Protocol no. 2188). Both abdominoplasty and suction-assisted lipoaspiration specimens were collected from each patient. Patients were female, 36–54 years of age, and had no known comorbidities. SAL was performed at a negative pressure of 760 mmHg using a 5 mm rounded, blunt cannula.

Lipoaspirate was processed to obtain the stromal vascular fraction as described previously [2]. Briefly, lipoaspirate was washed with sterile phosphate-buffered saline, followed by removal of the oil and blood/saline layers. The remaining fat layer was digested with Type II collagenase

(Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) in Medium 199 (Cellgro; Manassas, VA, USA) in a 37 °C water bath at 180 rpm for 30 min. The mixture was centrifuged at 1500g for 20 min at 4 °C and the supernatant was discarded. The cellular pellet was re-suspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) with 10 % fetal bovine serum (FBS), filtered through a 100 µm pore size cell strainer (Corning; Corning, NY, USA), centrifuged at 300g for 15 min, and the supernatant was discarded once again. The cell pellet was then re-suspended in red cell lysis buffer and centrifuged once more time before re-suspending the stromal vascular fraction (SVF) in complete medium. Excised abdominoplasty specimens were de-epithelialized, mechanically minced into small pieces, and then digested and processed in the same manner as the lipoaspirate samples.

Fluorescence-assisted cell sorting analysis

Our group recently demonstrated significant differences in the transcriptional profiles of primary ASCs when compared to cultured cells stressing the importance of using primary or very early passage cells in all translational studies [18]. Therefore we utilized freshly isolated SVF and stained it for immediate fluorescence-activated cell sorting (FACS) to identify the ASC fraction. ASCs were defined by the established surface marker profile CD45-/CD31-/CD34+ [16, 19, 20]. Mouse anti-human monoclonal antibodies CD31-PE, CD45-PeCy7, and CD34-APC (BD Biosciences; San Jose, CA, USA) were used and propidium iodide staining was employed to exclude dead cells. Analysis was performed using a BD FACSAria machine (BD Biosciences).

In vitro viability assay

Freshly extracted ASCs from SAL and excisional fat were seeded into a 96-well plate for determination of viability by MTT assay (Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit, Invitrogen; Carlsbad, CA, USA).

In vitro osteogenic differentiation

ASCs derived from SAL lipoaspirates and excised adipose tissue at passage two were cultured in osteogenic differentiation media (ODM), containing 10 % FBS, 1 % penicillin/streptomycin, 100 µg/mL ascorbic acid, and 10 mM β-glycerol 2-phosphate [21]. An alkaline phosphatase assay (Sigma-Aldrich) was performed after 7 days in culture with ODM, and mineralization was assessed using Alizarin Red staining at day 14. Alizarin Red staining was extracted with 20 % methanol and 10 % acetic acid in distilled water, and quantified using a spectrophotometer at 450 nm.

Total RNA was harvested immediately prior to beginning osteogenic stimulation with ODM at day 0, then

again at day 7 and day 14 in osteogenic culture, and processed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen; Hilden, Germany). Reverse transcription was performed using TaqMan Reverse Transcription Reagents (Invitrogen). An ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) was used to perform quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) with Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) as the reporter. qRT-PCR analysis was conducted to detect gene expression levels of the early osteogenic marker Runt-related transcription factor-2 (*RUNX-2*) as well as the late osteogenic marker osteocalcin (*OCN*). Expression levels of *RUNX-2* and *OCN* were normalized to beta-actin expression values.

In vitro adipogenic differentiation

Cells from both groups were passaged twice and seeded in standard 6-well plates in triplicate at equal density. After reaching 70 % confluence, ASCs were cultured in adipogenic differentiation medium (ADM), consisting of DMEM, 10 % FBS, 1 % penicillin/streptomycin, 10 µg/mL insulin, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM methylxanthine, and 200 µM indomethacin. Lipid accumulation was determined using Oil Red O (ORO) staining after 7 days in culture with ADM. Staining was imaged using a Leica DC300 camera and Leica DM IL inverted contrasting microscope at 10× magnification, then extracted with isopropanol, and quantified by absorbance spectrophotometry at 520 nm.

Total RNA was harvested at day 0 and day 7 of adipogenic induction culture. Expression levels of the adipogenic differentiation markers peroxisome proliferator-activated receptor γ (*PPAR-\gamma*), fatty acid binding protein 4 (*FABP4/AP2*), and lipoprotein lipase (*LPL*) were determined at two time points during adipogenic differentiation. Gene expression values were normalized to beta-actin.

Animals

All mice were housed in the Stanford University Veterinary Service Center in accordance with NIH and institution-approved animal care guidelines. All procedures were approved by the Stanford Administrative Panel on Laboratory Animal Care.

In vivo excisional wound model

Nude male Crl:CD-1-*Foxn1*^{nu} mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA <http://www.criver.com>) between 8 and 12 weeks of age were randomized to three treatment groups: unseeded hydrogel control or hydrogel seeded with human ASC isolated from SAL lipoaspirates or resected adipose tissue. Pullulan-collagen hydrogel was produced as and seeded as described previously [5,

22]. Briefly, 2.5×10^5 human ASCs suspended in 15 µL of PBS solution were pipetted onto hydrophobic wax paper and the hydrogel absorbed the cells actively by capillary, hydrophobic and entropic forces [5]. As previously described [23], two 6 mm full thickness wounds were created at the dorsum of each mouse. Each wound was held open by donut shaped silicone rings sutured on with 6-0 nylon sutures to prevent wound contraction and allow for healing by granulation. Wounds were covered with an occlusive dressing (Tegaderm, 3 M, St. Paul, MN, <http://www.3m.com>). Photographs were taken on days 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13 and 15 and wound area was measured using ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD, <http://www.nih.gov>) (n = 8 wounds/group).

Assessment of wound vascularity

To evaluate wound vascularity, immunohistochemical staining for the endothelial cell marker CD31 was performed as described previously (n = 8 wounds/condition) [22]. Briefly, wounds were harvested upon closure and processed for paraffin sectioning. Seven micron thick paraffin sections were stained with primary antibody (1:100 Rb α CD31, Ab28364, Abcam, Cambridge, UK, <http://www.abcam.com>) overnight at 4 °C, followed by secondary antibody staining (1:400 AF547 Gt α Rb, Life Technologies, Grand Island, NY, USA <http://www.lifetechnologies.com>). Cell nuclei were visualized with the nuclear stain DAPI. ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA <http://www.nih.gov>) was used to binarize immunofluorescent images taken with the same gain, exposure, and excitation settings as previously described [22]. Intensity threshold values were set automatically and quantification of CD31 staining was determined by pixel-positive area per high power field.

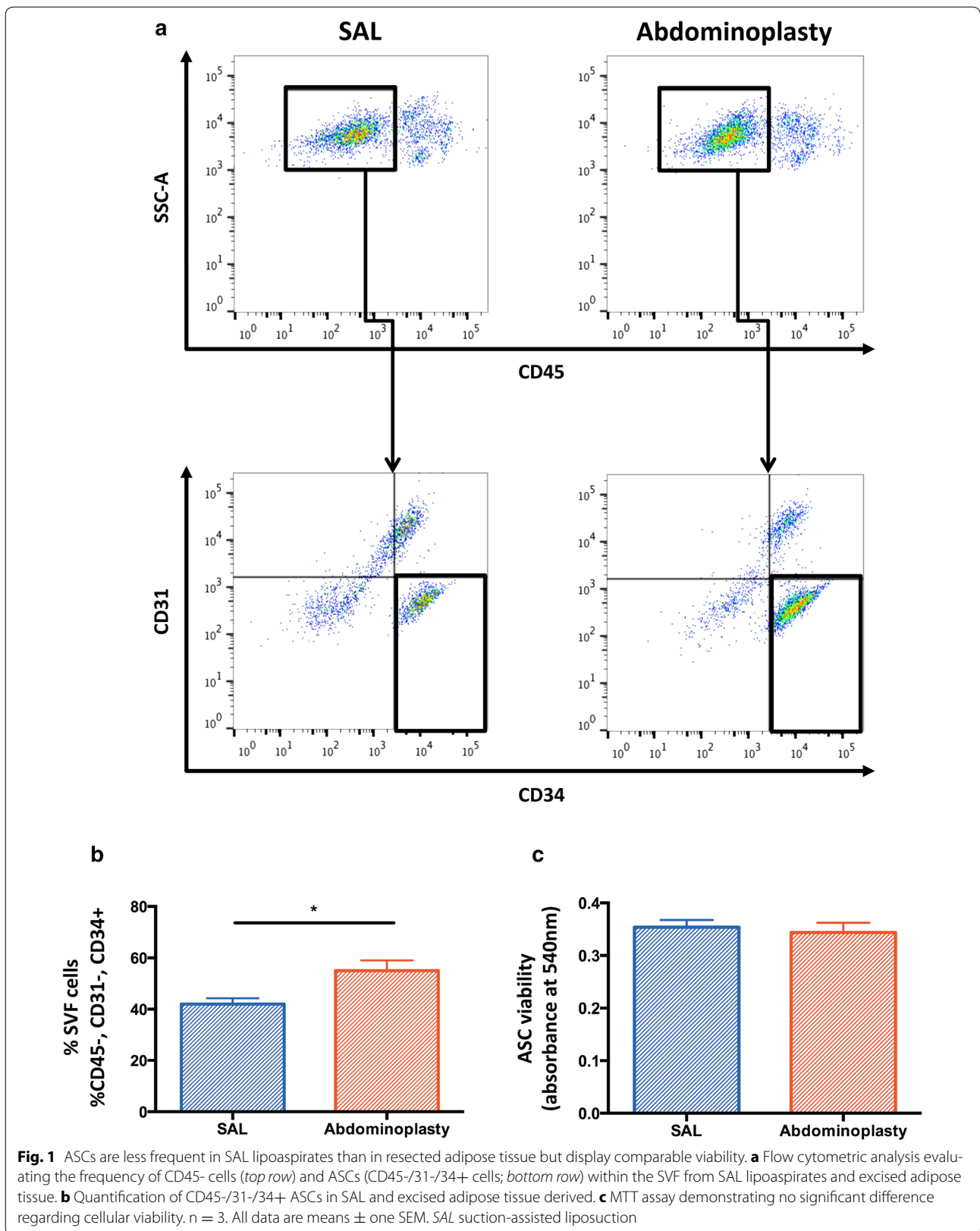
Statistical analysis

Data are shown as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc.). Statistical comparisons were made using Student's t-tests and ANOVAs, with Bonferroni corrections for multiple comparisons where appropriate. A *p value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

SAL yields a decreased frequency of ASCs

ASC yield was assessed in freshly harvested SVF from lipoaspirates and resected adipose tissue to determine if SAL impacts ASC frequency. FACS analysis showed greater frequency of ASCs in SVF harvested from excisional fat compared to those from SAL (*p < 0.05) (Fig. 1a). The average yield of ASCs in processed SAL specimens was 42.4 %, and in processed abdominoplasty specimens was 55.8 % (Fig. 1b).



SAL does not compromise ASC viability

A reduction of ASC yield in SAL lipoaspirates, did not result in an impaired ASC viability. An MTT assay was performed to assess the impact of SAL on ASC viability when compared to excision. Cell viability was not significantly different between ASCs harvested by SAL or excision ($p = 0.53$) (Fig. 1c).

Osteogenic differentiation potential

In order to determine the osteogenic differentiation potential of ASCs isolated from either SAL or excisional fat samples, ASCs were cultured in ODM for 14 days. There were no significant differences detected in alkaline phosphatase activity after 7 days in ODM ($p = 0.44$) (Fig. 2a) or in mineralization of the extracellular matrix at day 14, as measured by Alizarin Red assay ($p = 0.06$) (Fig. 2b). Similarly, there were no significant differences in expression of the osteogenic differentiation markers *RUNX-2* or *OCN* between the SAL- and excision-derived ASCs, at any time points assessed (Fig. 2c).

Adipogenic differentiation potential

Cells were cultured in ADM for 7 days to determine adipogenic differentiation potential of ASCs derived from SAL or excisional fat. Lipid accumulation was confirmed by ORO staining after 7 days of culture in ADM, indicating appropriate adipogenic differentiation of ASCs. Quantification of Oil Red O staining showed no significant differences between the two groups ($p = 0.47$) (Fig. 3a). Additionally, RNA was harvested prior to induction of differentiation at day 0 and again after 7 days of culture in ADM to correlate adipogenic marker transcript expression levels with observed in vitro adipogenic differentiation. Interestingly, gene expression of the intermediate and late adipogenic differentiation markers *FABP-4/AP2* and *LPL* were significantly enhanced in ASCs harvested by SAL compared to those from excisional fat tissue (** $p < 0.01$) (Fig. 3b). This difference was seen after 7 days of adipogenic induction, but not at day 0 before induction of differentiation in ADM. Similarly, gene expression of the early adipogenic marker *PPAR-γ* showed a trend toward greater expression at day 7 in cells derived from SAL, however this did not reach statistical significance ($p = 0.06$).

SAL and excisional fat derived ASCs equally enhance wound healing

To evaluate the therapeutic functionality of SAL derived ASCs versus ASCs isolated from excisional fat in vivo, cell-seeded hydrogels [5] were applied to a previously established model of murine cutaneous healing [5, 24]. Consistent with their unimpaired in vitro functionality, ACSs obtained via SAL demonstrated comparable

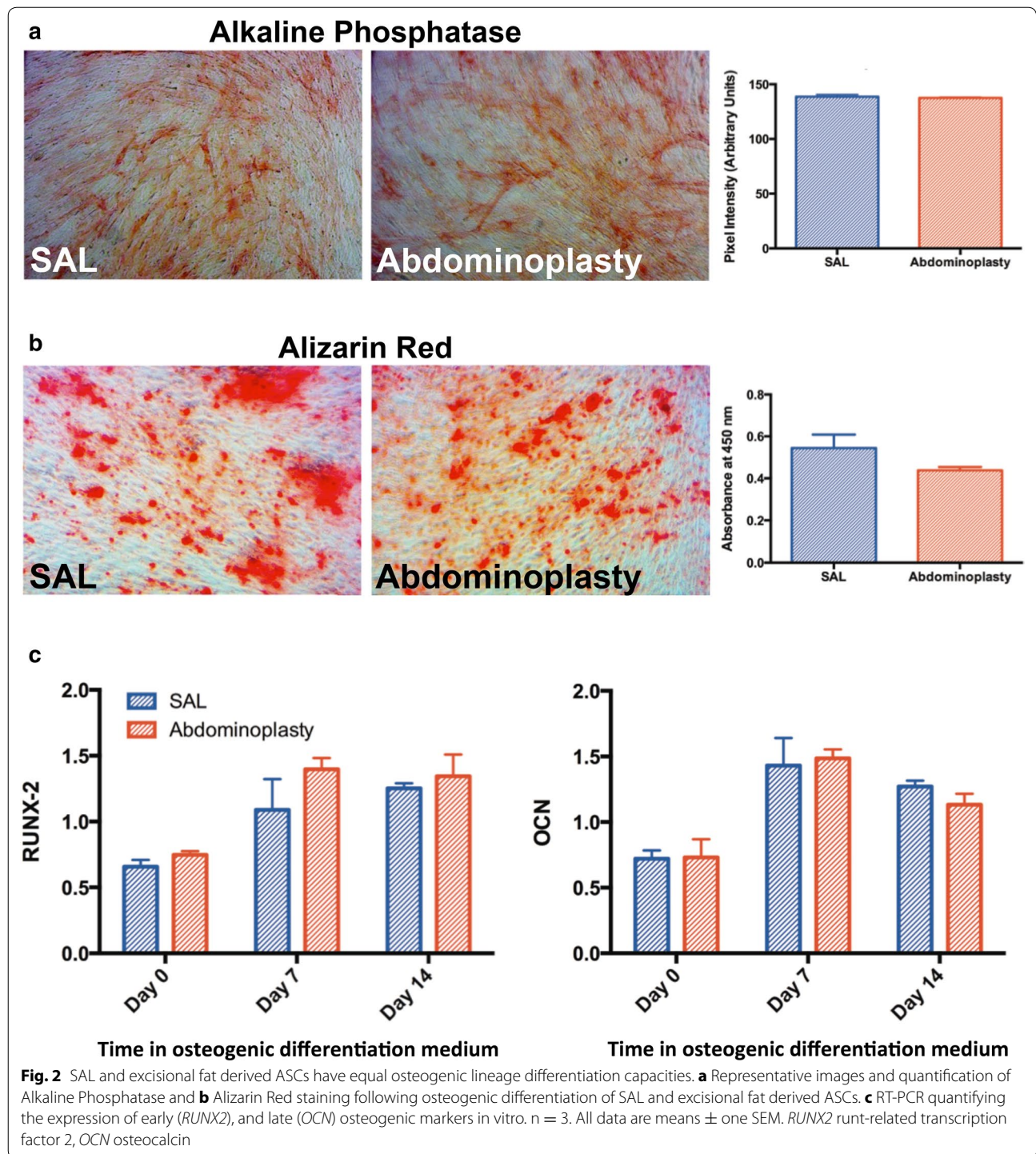
therapeutic efficacy for cutaneous regeneration versus cells isolated from abdominoplasty samples (Fig. 4a). Both ASC treatment groups displayed significantly improved healing kinetics as early as day three compared to unseeded hydrogel controls (Fig. 4b). The accelerated healing rates directly resulted in significantly faster wound closure times in the ASCs groups (11.4 and 10.8 vs. 13.8 days, ** $p < 0.01$) (Fig. 4c). These data indicate that ASCs derived from either SAL or excision both have a positive effect on in vivo regeneration.

SAL and excisional fat derived ASCs both enhance wound vascularity

Improvement of wound healing by ASCs is widely attributed to enhanced vascularization of the wound bed [17, 25–28]. Indeed, both ASC treatment groups showed significantly enhanced neovascularization compared with acellular scaffold controls (* $p < 0.05$), confirming our results regarding in vivo regenerative potential (Fig. 5). Similar to the wound healing outcomes, no significant differences between the two ASC groups could be detected. This further corroborates that in vivo regenerative potential is preserved in SAL-derived ASCs.

Discussion

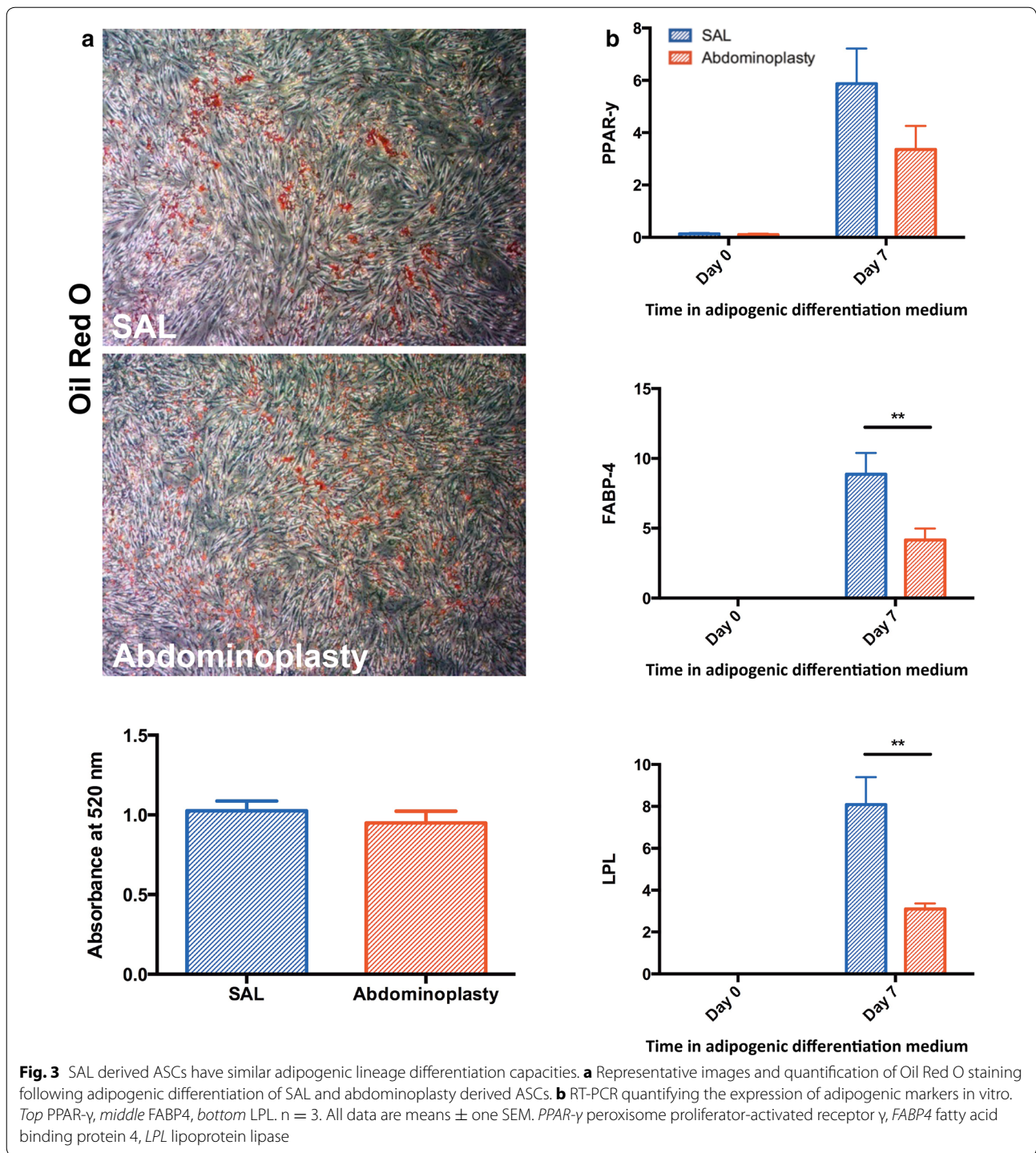
Despite exciting discoveries regarding the regenerative potential of ASCs, the use of ASCs in clinical practice is still in its infancy. This is in part due to an incomplete understanding of how various harvesting and processing methods affect ASC biology. Several different methods for fat harvest exist, whether for fat grafting in the operating room or for the isolation of ASCs in the laboratory [29–32]. With the goal of decreasing donor site morbidity with increased operative efficiency, new harvesting techniques have been developed beyond the traditional technique of resection, such as SAL, UAL, LAL, and power-assisted liposuction (PAL). However, while some of these methods may offer improvements in clinical variables such as decreased operative time, improved skin retraction, and minimized blood loss [33], the current body of literature regarding the comparative effects of these methods on preservation of the cellular contents is largely incomplete and often inconsistent. These potential effects are of interest to translational researchers utilizing ASCs in regenerative therapies, as well as to clinicians looking to improve viability of transferred fat grafts. To our knowledge, there has been no study to date that determines the effects of SAL on proliferation, differentiation potential, and wound healing when compared to the standard of excisional fat. We evaluate the characteristics of SAL and resection-derived ASCs in a laboratory setting with paired samples from patients who serve as their own controls. These controlled conditions



enable an exact assessment potentially superior to clinical comparisons utilizing one-step cell isolation protocols in the operating room.

In this study, we found that ASCs obtained from both SAL and excised abdominoplasty tissue occurred at high frequencies and viability, although excised adipose tissue

provided greater yields of ASCs when compared to SAL. Factors influencing ASC yield have been discussed controversially in the literature. In addition to harvesting technique, patient demographics can affect ASC frequency in adipose tissue. Generally, there are no detectable differences in ASC yield or proliferation with age



[19, 34]. However, high donor age and comorbidities such as diabetes significantly impair ASC functionality [19, 35] and donor gender affects ASC properties, with more robust osteogenic differentiation in ASCs from male patients [36]. Furthermore, previous studies from our group have demonstrated depot-specific differences in

ASCs, with ASCs isolated from the flank and thigh showing greater osteogenic potential but ASCs from the flank having lesser adipogenic capabilities when compared to the arm and abdomen [37].

The capability of ASCs to differentiate down multiple lineages is of critical importance in their utility in

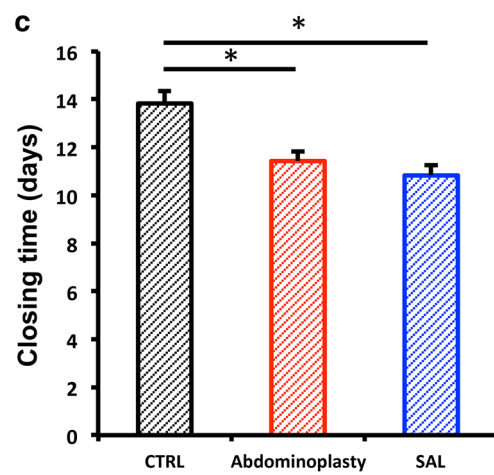
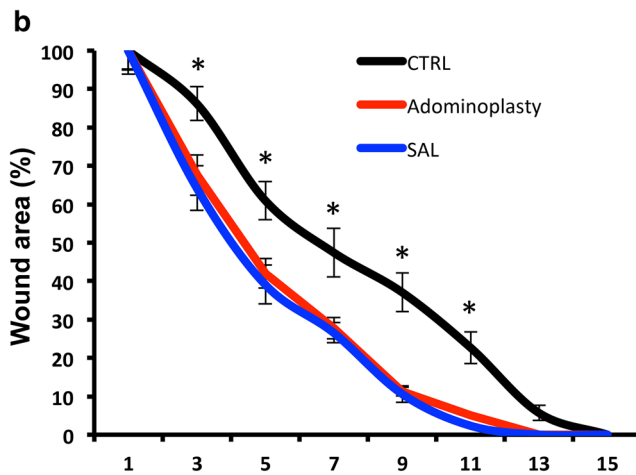
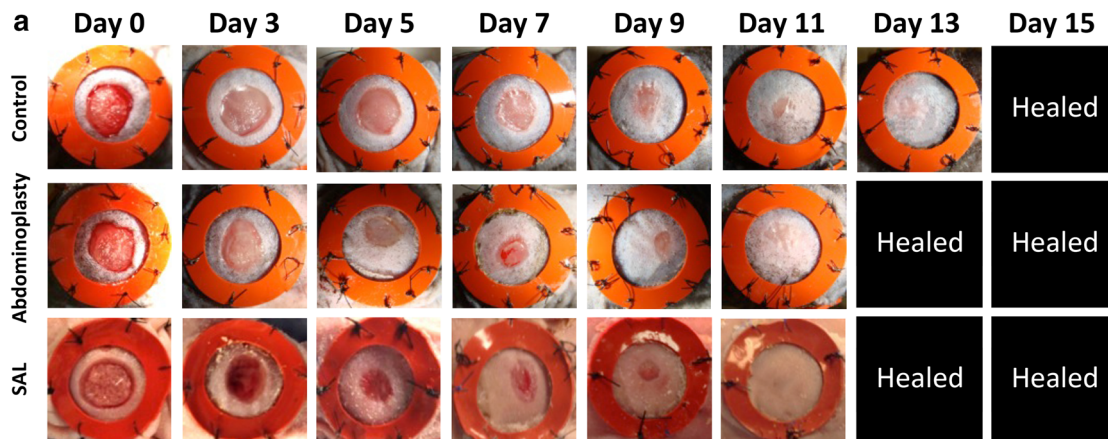
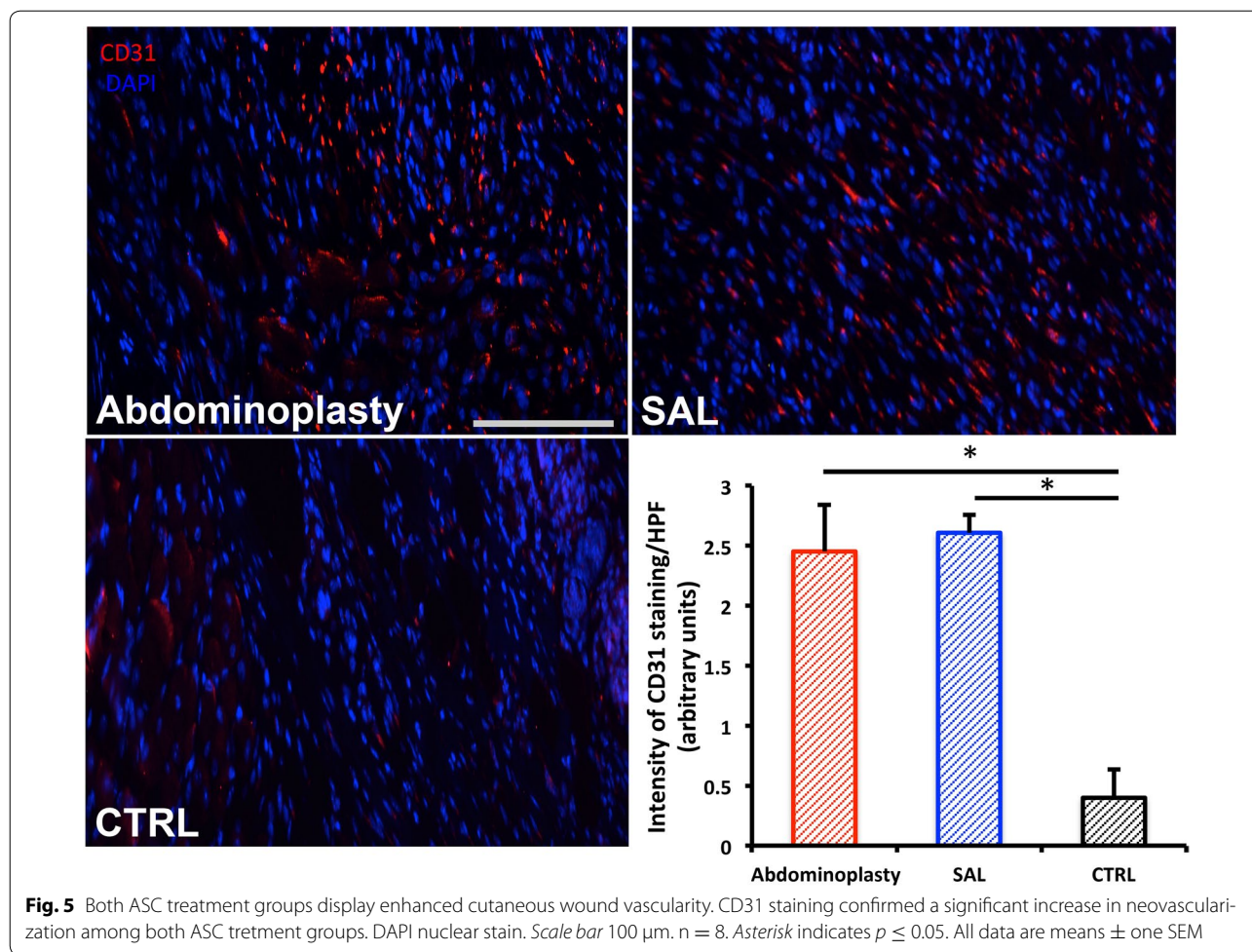


Fig. 4 Application of SAL and abdominoplasty derived ASCs are equally efficacious to enhance cutaneous healing. **a** Gross appearance, **b** wound healing kinetics, and **c** closing times of humanized excisional murine wounds treated with hydrogel seeded hASCs harvested via SAL, abdominoplasty or unseeded hydrogel. n = 8. Asterisk indicates $p \leq 0.05$. All data are means \pm one SEM

tissue engineering and cell-based regenerative therapies. Previous studies from our group have found no significant difference in osteogenic differentiation potential between suction-assisted lipoaspiration and third-generation ultrasound-generation lipoaspiration, despite the mechanical disruption delivered during ultrasound application [17]. In contrast, ASCs derived from LAL have been shown to suffer from decreased osteogenic differentiation capacity relative to those from SAL [16]. The results from this study demonstrate that SAL does not impair the osteogenic differentiation potential of ASCs. This is not surprising, since SAL delivers a mechanical effect rather than heat, and is thus an approach more similar to UAL than LAL.

Interestingly, we found that expression of adipogenic differentiation markers FABP-4 and LPL were significantly higher in SAL derived ASCs when compared to those harvested from excisional abdominoplasty fat

tissue. Expression of the early adipogenic marker PPAR- γ was also greater, although not significantly so. Our findings corroborate those in a recent study by Keck et al. [38], who determined expression of adiponectin, PPAR- γ , and GLUT4 to be significantly increased in ASCs from PAL, a technique analogous to SAL, when compared to manual aspiration. A potential explanation for these findings may be found in the cellular effects of mechanotransduction, the conversion of mechanical forces to biochemical signals [39]. It is becoming increasingly probable that ASCs are subject to significant mechanotransductive effects [40, 41], much as are other progenitor cell types. However, the literature is still developing in this area and results thus far have been inconsistent and largely focused on either adipocytes or adipose tissue as a whole [42, 43]. Due to the conflicting data regarding mechanotransduction in ASCs, one may turn to the BM-MSK literature for potential clues. Importantly, shear



stress has been previously shown to cause changes in cytoskeletal distribution in MSCs, ultimately leading to alterations in differentiation potential. Specifically, Chang et al. [44] found that shear stress led to increased expression of the early adipokine PPAR- γ and decreased expression of the early osteogenic gene RUNX-2 [44]. Here, we see similar effects in ASCs, with trends toward increased PPAR- γ and decreased RUNX-2 expression in ASCs isolated from lipoaspirates when compared to those obtained from excised adipose tissue. Therefore we may conclude that mechanical forces exerted during lipoaspiration alters ASC biology, at least at the transcriptional level. However, further work is needed to clarify these potential effects.

ASCs harbor great promise for tissue regeneration applications [5]. In this study we demonstrate that SAL-harvested ASCs have an identical potential for the enhancement of cutaneous healing when compared to ASCs derived from excisional fat. Furthermore, wounds treated with either ASC population displayed significantly greater vascularity compared to an unseeded

scaffold control group. These promising findings distinguish SAL as a reliable method for obtaining ASCs suitable and effective for regenerative medicine approaches, and an equivalent source of ASCs when compared to those derived from three-dimensionally intact adipose tissue.

Conclusion

ASCs represent a promising source of multipotent cells for tissue engineering and regenerative medicine. Suction-assisted lipoaspiration offers a possibility for relative ease of harvest of ASCs with minimal donor site morbidity. Here we show that SAL lipoaspirates provide a slightly decreased yield of viable ASCs when compared to resected adipose tissue. ASCs derived from SAL retain full multipotency and regenerative capabilities. Overall, these findings suggest that SAL is a reliable and effective method of obtaining ASCs for tissue engineering approaches and cell-based therapies when compared to the gold standard of minimally-manipulated excisional adipose tissue, and does not damage ASCs in

terms of viability, osteogenic and adipogenic differentiation capacity, wound regenerative potential, or wound neovascularization.

Authors' contributions

All listed authors contributed to the idea generation, design, and completion of this work. DD contributed to the idea generation, experimental work and manuscript preparation. AL, RCR, DA, ZNM, EAB, AJW, NH, ML, MSH and GGW contributed to the experimental work. MS, AFS, HGM, GMH, DCW, MTL and GCG guided the idea generation, experimental work and manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Hagey Laboratory for Pediatric Regenerative Medicine, Division of Plastic Surgery, Department of Surgery, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA. ² Section of Plastic, Aesthetic and Reconstructive Surgery, Johannes Kepler University, Linz, Austria. ³ Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA. ⁴ Department of Plastic Surgery and Hand Surgery, Technical University Munich, Munich, Germany.

Acknowledgements

Funding for the stem cell research conducted in our laboratory has been provided by the National Institutes of Health (R01-DK074095, R01-AG025016, R01-DE021683, R21-DE024230), the Hagey Family Endowed Fund in Stem Cell Research and Regenerative Medicine, and The Oak Foundation. The authors would like to thank Dr. Dean Vistnes at the Kaplan Cosmetic Surgery Center for lipoaspirate sample collection. Cell sorting was completed at the Stanford Shared FACS Facility.

Competing interests

DD and GCG are listed on the patent "Efficient Stem Cell Delivery Into Biomaterials Using a Novel Capillary Driven Encapsulation Technique" and GCG is listed on the patent "Intelligent Biodegradable Pullulan Regenerative Matrix for Tissue Engineering" assigned to Stanford University. AL, RCR, DA, ZNM, EAB, AJW, NH, ML, MSH, GGW, RW, MS, AFS, HGM, GMH, DCW and MTL have no potential conflicts of interest, affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed herein.

Received: 9 February 2016 Accepted: 27 April 2016

Published online: 06 May 2016

References

- Zuk PA, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211–28.
- Zuk PA, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279–95.
- Aust L, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004;6(1):7–14.
- De Ugarte DA, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174(3):101–9.
- Garg RK, et al. Capillary force seeding of hydrogels for adipose-derived stem cell delivery in wounds. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(9):1079–89.
- Kosaraju R, et al. Adipose-derived stem cell-seeded hydrogels increase endogenous progenitor cell recruitment and neovascularization in wounds. *Tissue Eng Part A*. 2016;22(3–4):295–305.
- Cowan CM, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol*. 2004;22(5):560–7.
- Walmsley GG, et al. Surveillance of stem cell fate and function: a system for assessing cell survival and collagen expression in situ. *Tissue Eng Part A*. 2016;22(1–2):31–40.
- Garza RM, et al. Studies in fat grafting: part IV. Adipose-derived stromal cell gene expression in cell-assisted lipotransfer. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(4):1045–55.
- Luan A, et al. Cell-assisted lipotransfer improves volume retention in irradiated recipient sites and rescues radiation-induced skin changes. *Stem Cells*. 2016;34(3):668–73.
- Paik KJ, et al. Studies in fat grafting: part v. cell-assisted lipotransfer to enhance fat graft retention is dose dependent. *Plast Reconstr Surg*. 2015;136(1):67–75.
- Yoshimura K, et al. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthet Plast Surg*. 2008;32(1):48–55 (**discussion 56–7**).
- Scuderi N, et al. Power-assisted lipoplasty versus traditional suction-assisted lipoplasty: comparative evaluation and analysis of output. *Aesthet Plast Surg*. 2005;29(1):49–52.
- Grazer FM. Suction-assisted lipectomy, suction lipectomy, lipolysis, and lipexeresis. *Plast Reconstr Surg*. 1983;72(5):620–3.
- Collins PC, Field LM, Narins RS. Liposuction surgery and autologous fat transplantation. *Clin Dermatol*. 1992;10(3):365–72.
- Chung MT, et al. Isolation of human adipose-derived stromal cells using laser-assisted liposuction and their therapeutic potential in regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(10):808–17.
- Duscher D, et al. Ultrasound-assisted liposuction does not compromise the regenerative potential of adipose-derived stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(2):248–57.
- Januszyk M, et al. Evaluating the effect of cell culture on gene expression in primary tissue samples using microfluidic-based single cell transcriptional analysis. *Microarrays*. 2015;4(4):540–50.
- Duscher D, et al. Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells. *Sci Rep*. 2014;4:7144.
- Suga H, et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009;18(8):1201–10.
- Levi B, Longaker MT. Concise review: adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. *Stem Cells*. 2011;29(4):576–82.
- Rustad KC, et al. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials*. 2012;33(1):80–90.
- Wong VW, et al. Pullulan hydrogels improve mesenchymal stem cell delivery into high-oxidative-stress wounds. *Macromol Biosci*. 2011;11(11):1458–66.
- Galiano RD, et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen*. 2004;12(4):485–92.
- Duscher D, et al. Stem cells in wound healing: the future of regenerative medicine? A Mini-Review. *Gerontology*. 2016;62(2):216–25.
- Hu MS, et al. Stem cell-based therapeutics to improve wound healing. *Plast Surg Int*. 2015;2015:383581.
- Bhang SH, et al. Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*. 2011;32(11):2734–47.
- Hadjipanayi E, Schilling AF. Hypoxia-based strategies for angiogenic induction: the dawn of a new era for ischemia therapy and tissue regeneration. *Organogenesis*. 2013;9(4):261–72.
- Aronowitz JA, Lockhart RA, Hakakian CS. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *Springerplus*. 2015;4:713.
- Strong AL, et al. The current state of fat grafting: a review of harvesting, processing, and injection techniques. *Plast Reconstr Surg*. 2015;136(4):897–912.
- Domenis R, et al. Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:2.
- Shridharani SM, Broyles JM, Matarasso A. Liposuction devices: technology update. *Med Devices (Auckl)*. 2014;7:241–51.
- Nagy MW, Vanek PF Jr. A multicenter, prospective, randomized, single-blind, controlled clinical trial comparing VASER-assisted Lipoplasty and suction-assisted Lipoplasty. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(4):681e–9e.
- Mojallal A, et al. Influence of age and body mass index on the yield and proliferation capacity of adipose-derived stem cells. *Aesthet Plast Surg*. 2011;35(6):1097–105.
- Rennert RC, et al. Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose-derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(3):79.

36. Aksu AE, et al. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg*. 2008;60(3):306–22.
37. Levi B, et al. Depot-specific variation in the osteogenic and adipogenic potential of human adipose-derived stromal cells. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126(3):822–34.
38. Keck M, et al. Power assisted liposuction to obtain adipose-derived stem cells: impact on viability and differentiation to adipocytes in comparison to manual aspiration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2014;67(1):e1–8.
39. Duscher D, et al. Mechanotransduction and fibrosis. *J Biomech*. 2014;47(9):1997–2005.
40. Yilgor Huri P, et al. Biophysical cues enhance myogenesis of human adipose derived stem/stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;438(1):180–5.
41. Bodle JC, Hanson AD, Lobo EG. Adipose-derived stem cells in functional bone tissue engineering: lessons from bone mechanobiology. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011;17(3):195–211.
42. Shoham N, Gefen A. Mechanotransduction in adipocytes. *J Biomech*. 2012;45(1):1–8.
43. Atashroo D, et al. Studies in fat grafting: part II. Effects of injection mechanics on material properties of fat. *Plast Reconstr Surg*. 2014;134(1):39–46.
44. Chang H, Knothe ML. Tate, structure-function relationships in the stem cell's mechanical world B: emergent anisotropy of the cytoskeleton correlates to volume and shape changing stress exposure. *Mol Cell Biomech*. 2011;8(4):297–318.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Publikation II



Ultrasound-Assisted Liposuction Does Not Compromise the Regenerative Potential of Adipose-Derived Stem Cells

DOMINIK DUSCHER,^{a,b,c,*} DAVID ATASHROO,^{a,*} ZESHAAN N. MAAN,^a ANNA LUAN,^a ELIZABETH A. BRETT,^a JANOS BARRERA,^a SACHA M. KHONG,^a ELIZABETH R. ZIELINS,^a ALEXANDER J. WHITTAM,^a MICHAEL S. HU,^a GRAHAM G. WALMSLEY,^{a,d} MICHAEL S. POLLHAMMER,^b MANFRED SCHMIDT,^b ARNDT F. SCHILLING,^c HANS-GÜNTHER MACHENS,^c GEORG M. HUEMER,^b DERRICK C. WAN,^a MICHAEL T. LONGAKER,^{a,d} GEOFFREY C. GURTNER^a

Key Words. Adult mesenchymal stem cells • Cell therapy • Ultrasound-assisted liposuction • Adipose-derived stem cells • Adipogenesis • Regenerative medicine • Fat harvest

ABSTRACT

Human mesenchymal stem cells (MSCs) have recently become a focus of regenerative medicine, both for their multilineage differentiation capacity and their excretion of proregenerative cytokines. Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) are of particular interest because of their abundance in fat tissue and the ease of harvest via liposuction. However, little is known about the impact of different liposuction methods on the functionality of ASCs. Here we evaluate the regenerative abilities of ASCs harvested via a third-generation ultrasound-assisted liposuction (UAL) device versus ASCs obtained via standard suction-assisted lipoaspiration (SAL). Lipoaspirates were sorted using fluorescent assisted cell sorting based on an established surface-marker profile (CD34+/CD31−/CD45−), to obtain viable ASCs. Yield and viability were compared and the differentiation capacities of the ASCs were assessed. Finally, the regenerative potential of ASCs was examined using an in vivo model of tissue regeneration. UAL- and SAL-derived samples demonstrated equivalent ASC yield and viability, and UAL ASCs were not impaired in their osteogenic, adipogenic, or chondrogenic differentiation capacity. Equally, quantitative real-time polymerase chain reaction showed comparable expression of most osteogenic, adipogenic, and key regenerative genes between both ASC groups. Cutaneous regeneration and neovascularization were significantly enhanced in mice treated with ASCs obtained by either UAL or SAL compared with controls, but there were no significant differences in healing between cell-therapy groups. We conclude that UAL is a successful method of obtaining fully functional ASCs for regenerative medicine purposes. Cells harvested with this alternative approach to liposuction are suitable for cell therapy and tissue engineering applications. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE* 2016;5:248–257

SIGNIFICANCE

Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) are an appealing source of therapeutic progenitor cells because of their multipotency, diverse cytokine profile, and ease of harvest via liposuction. Alternative approaches to classical suction-assisted liposuction are gaining popularity; however, little evidence exists regarding the impact of different liposuction methods on the regenerative functionality of ASCs. Human ASC characteristics and regenerative capacity were assessed when harvested via ultrasound-assisted (UAL) versus standard suction-assisted liposuction. ASCs obtained via UAL were of equal quality when directly compared with the current gold standard harvest method. UAL is an adjunctive source of fully functional mesenchymal stem cells for applications in basic research and clinical therapy.

INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (MSCs) have recently emerged as a promising therapeutic agent because of their multilineage differentiation capacity, utility in tissue engineering applications, and paracrine support of tissue repair [1, 2]. Successful tissue

healing depends on a sufficient response to tissue injury and ischemia [3]. MSCs applied to a site of injury are able to provide regenerative growth factors and cytokines, as well as function as cellular building blocks for repair [4]. The regenerative potential of MSCs can further be enhanced by using biomimetic scaffolds for their application [5, 6].

^aHagey Laboratory for Pediatric Regenerative Medicine, Division of Plastic Surgery, and ^dInstitute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, School of Medicine, Stanford University, Stanford, California, USA; ^bSection of Plastic, Aesthetic and Reconstructive Surgery, Johannes Kepler University, Linz, Austria; ^cDepartment of Plastic Surgery and Hand Surgery, Technical University Munich, Munich, Germany

* Contributed equally.

Correspondence: Geoffrey C. Gurtner, M.D., Stanford University School of Medicine, 257 Campus Drive, Stanford, California 94305, USA. Telephone: 650-736-2776; E-Mail: ggurtner@stanford.edu

Received April 7, 2015; accepted for publication October 28, 2015; published Online First on December 23, 2015.

©AlphaMed Press 1066-5099/2015/\$20.00/0

<http://dx.doi.org/10.5966/sctm.2015-0064>

Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) are a particularly interesting source for MSC-based therapy, because of their relative abundance and ease of harvest from adipose tissue [7]. Moreover, ASCs have the ability to proliferate rapidly and secrete high levels of proregenerative factors [8]. Encouraging pilot studies using human ASCs *in vivo* have confirmed their ability to heal calvarial defects [9], as well as enhance vascularization of composite ischemic tissue [10]. ASCs have several key advantages over other MSC populations, such as bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs), including the decreasing number of BM-MSCs available with age, the large volumes of bone marrow required, and the procedural risks associated with bone marrow harvest [8, 11–13].

Liposuction is a safe and reliable method of obtaining ASCs, but little is known about the effects of different liposuction techniques on the regenerative abilities of ASCs. A new approach to lipoaspiration, ultrasound-assisted liposuction (UAL), is gaining popularity for its ability to improve the process of lipoaspiration, by decreasing blood loss and tissue trauma [14]. During UAL, a specialized probe or cannula is used that transmits ultrasound vibrations into the fat tissue [15]. The vibrations lead to emulsification of the fat, making it easier to remove [16]. It has been demonstrated that UAL-derived lipoaspirates contain viable adipocytes and can be successfully used as fat grafts [17, 18]. However, certain lipoaspiration methods can have detrimental effects on ASCs [19] and little evidence exists regarding the impact of UAL on harvested ASCs. Here we sought to determine whether harvesting via UAL compromises ASC plasticity and functionality. After assessment of cell yield, viability, and metabolic activity, we characterized the differentiation abilities of UAL- and SAL-derived ASCs via osteogenic, adipogenic, and chondrogenic induction *in vitro*. Next, we examined the regenerative gene expression of these cells and specifically determined their ability to support neovascularization and cutaneous regeneration *in vivo*. Collectively, this represents, to our knowledge, the first comprehensive and independent investigation of the functionality of UAL-derived ASCs and their utility in regenerative medicine.

MATERIALS AND METHODS

Human ASC Isolation and Flow Cytometric Analysis

Human lipoaspirates were collected from healthy, adult, female patients with approval from the Stanford University institutional review board. Paired specimens were collected using UAL and SAL. Two lipoaspirate samples were harvested from identical sites in each patient, with SAL being performed before UAL. SAL was performed using 3.0- to 5.0-mm hollow aspiration cannulas and UAL was performed using a VASER Lipo system (Solta Medical, Hayward, CA, <http://www.solta.com>) with the following parameters: 2.9- to 3.7-mm solid probes delivered energy at a vibration frequency of 36,000 Hz and a wave amplitude ranging from 71 to 76 μm , translating into 5–12 W of vibratory power [20].

ASCs were isolated from samples of 3 patients who were between the ages 28 and 48 years, had no medical comorbidities, and were undergoing elective liposuction of the abdomen, as described previously [7]. Briefly, raw lipoaspirates were washed and treated with 0.075% collagenase type I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, <http://www.sigmaaldrich.com>) in Hanks' balanced salt solution (Cellgro, Manassas, VA, <http://www.cellgro.com>) for 1 hour at 37°C in a water bath with gentle agitation at 125 rpm. The

collagenase digest was then inactivated by adding an equal volume of standard cell culture growth medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) plus GlutaMAX [Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>], 10% fetal bovine serum, and 1% penicillin/streptomycin). The stromal vascular fraction (SVF) was pelleted by centrifugation at 300g for 5 minutes. The supernatant was then discarded, and the cell pellet was resuspended and filtered through a 100- μm cell strainer to remove undigested tissue fragments. The cells were pelleted, resuspended, and then fluorescence-activated cell sorting (FACS) was used to obtain ASCs (defined as the CD45⁻/CD31⁻/CD34⁺ cell fraction) using the following mouse anti-human monoclonal antibodies: CD31-PE, CD45-PeCy7, and CD34-APC (BD Biosciences, San Jose, CA, <http://www.bdbiosciences.com>). This surface-marker profile was chosen to exclude hematopoietic and endothelial cells, and was used in combination with propidium iodide to eliminate dead cells [21]. FACS was performed using a BD FACSAria cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA).

In Vitro ASC Metabolic Activity

Viability was compared between pooled ASCs freshly isolated via FACS from UAL and SAL lipoaspirates ($n = 3$) using an MTT assay for metabolic activity according to manufacturer's instructions (Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit; Invitrogen). Cells were seeded into 96-well plates at a density of 20,000 cells per well in culture medium. Plates were incubated at 37°C and 5% CO₂, and cellular metabolism was evaluated over 7 days. The absorbance of each well was determined using a microplate reader at 540 nm (SpectraMAX 384 Plus; Molecular Devices Ltd., Sunnyvale, CA, <http://www.moleculardevices.com>). All assays were done in triplicate.

In Vitro Osteogenic Differentiation

Pooled ASCs freshly isolated via FACS from UAL and SAL lipoaspirates ($n = 3$) were seeded in standard 6-well tissue culture plates (1.0×10^5 cells per well) in triplicate and grown to at least 80% confluence before being exposed to osteogenic differentiation medium, which consisted of DMEM (1 g/l glucose) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid, and 10 mM β -glycerophosphate. Alizarin red staining was performed and quantified after 14 days to assay extracellular mineralization, as previously described [19, 22]. Briefly, cells stained with Alizarin red were incubated with 2 ml of a solution of 20% methanol and 10% acetic acid under gentle shaking for 15 minutes at room temperature. Absorption of samples was measured at 450 nm using an Ultraspec 2100 Pro spectrophotometer (Biochrom Ltd., Cambridge, U.K., <http://www.biochrom.co.uk>). Staining of all samples was performed in triplicate, and all measurements were normalized to the total protein content of a sister well seeded at equal density. Photometric quantification of alkaline phosphatase staining was performed after 7 days. ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://www.nih.gov>) was used to binarize images taken with the same microscope settings. Intensity threshold values were set automatically and quantification of staining was determined by pixel-positive area per high-power field, as previously described [5]. Finally, gene expression of the osteogenic markers runt-related-transcription factor-2 (*RUNX2*), osteopontin (*OPN*), and osteocalcin (*OCN*) was analyzed after

14 days of differentiation by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

In Vitro Adipogenic Differentiation

For adipogenic differentiation, pooled ASCs freshly isolated via FACS from UAL and SAL lipoaspirates ($n = 3$) were seeded in triplicate into standard 6-well tissue culture plates (1.5×10^5 cells per well), and adipogenic differentiation medium consisting of DMEM (1 g/l glucose), 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 10 $\mu\text{g/ml}$ insulin, 1 μM dexamethasone, 0.5 mM methylxanthine, and 200 μM indomethacin was added after cell attachment. Oil Red O staining was performed after 7 days of incubation and photometrically quantified analog to alkaline phosphatase staining (described in the previous section). Finally, expression levels of the adipogenic genes peroxisome proliferator-activated receptor γ (*PPAR- γ*), fatty acid binding protein 4 (*FABP4*), and lipoprotein lipase (*LPL*) were examined at day 7 of differentiation by qRT-PCR.

In Vitro Chondrogenic Differentiation

Chondrogenic differentiation was performed using a commercially available kit (StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit; Life Technologies, CA, USA, <http://www.thermofisher.com>) per manufacturer protocol. Pooled ASCs freshly isolated via FACS from UAL and SAL lipoaspirates ($n = 3$) were resuspended in a dense cell solution of 1.6×10^7 cells/ml, using fully supplemented media. A 5- μl aliquot of the cell suspension was cultured in high humidity conditions for 2 hours ($n = 3$). Subsequently, chondrogenic differentiation medium was added to each well containing the cellular micromass, and cultured for 2 weeks. Cell nodules were then processed for cryosectioning, and were sectioned and histologically stained for glycosaminoglycans, using Alcian blue. Stained tissue was imaged at $\times 10$ magnification.

In Vitro Real-Time Quantitative PCR Analysis

Total RNA was harvested from cultivated cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, <http://www.qiagen.com>) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed and osteogenic, adipogenic, and regenerative gene expression was examined by qRT-PCR using the Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, <http://www.appliedbiosystems.com>) and SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The amount of PCR product was calculated using an external glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) standard curve and LightCycler software (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, <https://lifescience.roche.com>). All values were normalized on the basis of the *GAPDH* expression in the corresponding samples. All experiments were performed in triplicate. Specific primers for the genes examined were based on their PrimerBank sequences (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>) [19].

Animals

All mice were housed in the Stanford University Veterinary Service Center in accordance with National Institutes of Health and institution-approved animal care guidelines. All procedures were approved by the Stanford University Administrative Panel on Laboratory Animal Care.

In Vivo Excisional Wound Model

Eight 12-week-old nude male Crl:CD-1-*Foxn1*⁰ mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, <http://www.criver.com>) were randomized to 3 treatment groups: unseeded hydrogel control or hydrogel seeded with pooled human ASCs freshly isolated via FACS from UAL and SAL lipoaspirates from 3 donors. Pullulan-collagen hydrogel was produced as described previously [5]. To achieve capillary seeding, 2.5×10^5 human ASCs suspended in 15 μl of phosphate-buffered saline (PBS) solution was pipetted onto hydrophobic wax paper and the hydrogel was immediately placed on top. Cells were absorbed actively into the pores of the scaffold by capillary, hydrophobic, and entropic forces [6]. As previously described [23], two 6-mm, full-thickness wounds per mouse were excised from either side of the midline. Each wound was held open by donut-shaped silicone rings fastened with 6-0 nylon sutures to prevent wound contraction. For mice in the unseeded hydrogel control group, a 6-mm piece of hydrogel saturated with PBS was placed in each wound bed. For mice in the ASC-seeded hydrogel groups, a 6-mm piece of hydrogel seeded by capillary force with human ASCs (suspended in PBS) was placed in the wound bed. All wounds were covered with an occlusive dressing (Tegaderm; 3M, St. Paul, MN, <http://www.3m.com>). Digital photographs were taken on days 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15. Wound area was measured using ImageJ software (National Institutes of Health) ($n = 8$ wounds per group).

Assessment of Wound Vascularity

Vascularity of healed wounds was assessed by immunohistochemical staining for the endothelial cell marker CD31 ($n = 8$ wounds per condition). Briefly, wounds from the excisional model were harvested upon closure and processed for paraffin sectioning. Immunohistochemical staining of 7- μm -thick paraffin sections for CD31 was used to quantify wound vascularity, as described previously [5]. Briefly, slides were deparaffinized, washed in PBS, and blocked in a humidified chamber for 2 hours. Primary antibody (1:100 Rb α CD31, Ab28364; Abcam, Cambridge, U.K., <http://www.abcam.com>) was incubated overnight at 4°C, followed by secondary antibody staining (1:400 AF547 Gt α Rb; Life Technologies, Grand Island, NY, <http://www.lifetechnologies.com>). Cell nuclei were visualized with the nuclear stain 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). ImageJ software (National Institutes of Health) was used to binarize immunofluorescent images taken with the same gain, exposure, and excitation settings, as previously described [5]. Intensity threshold values were set automatically and quantification of CD31 staining was determined by pixel-positive area per high-power field.

Statistical Analysis

All values are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance analyses were performed using a Student's *t* test or one-way analysis of variance were indicated. The probability of a type I error was set at $\alpha = 0.05$.

RESULTS

UAL Does Not Compromise ASC Yield, Viability or Metabolic Activity

Initially, we assessed whether UAL-based harvesting reduces ASC yield compared with SAL. On FACS analysis, we found the viability (supplemental online Fig. 1) and frequency of ASCs within adipose tissue (defined by the percentage of CD45⁻/CD31⁻/CD34⁺ cells within the SVF [24]) to be similar between groups (Fig. 1A, 1B).

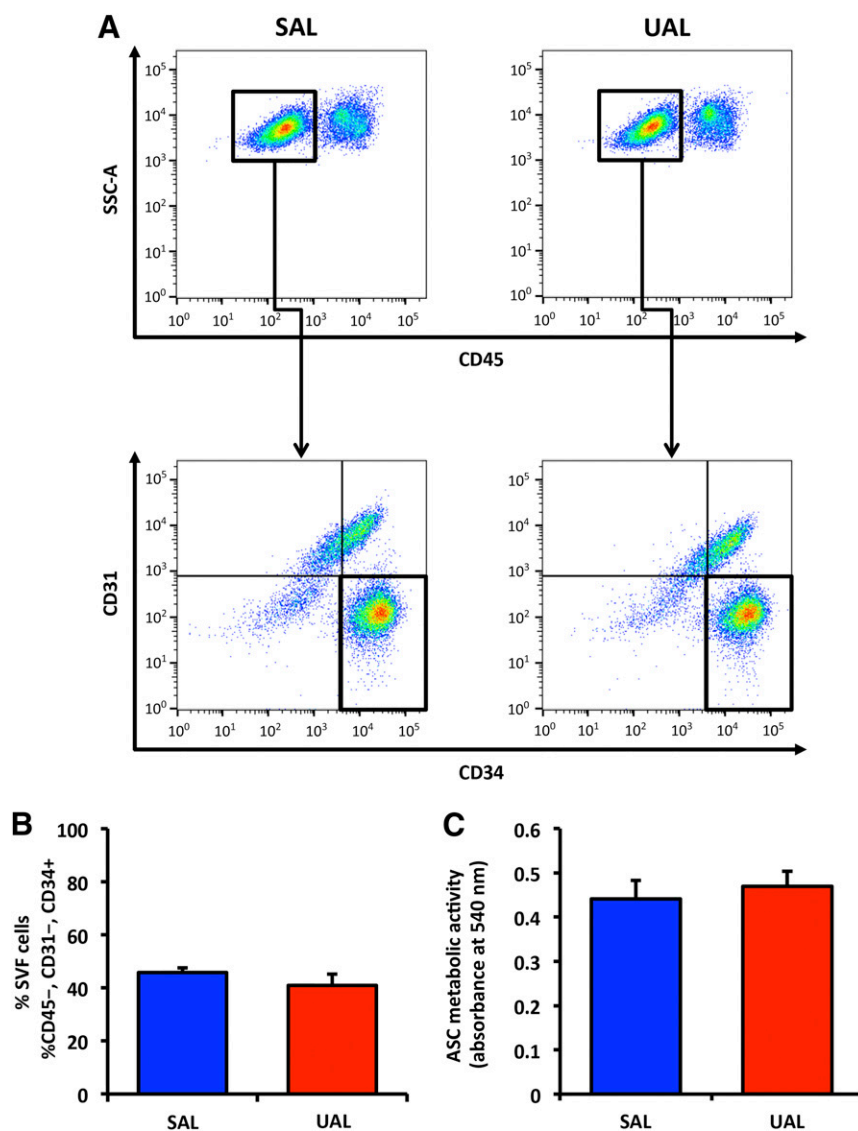


Figure 1. UAL and SAL lipoaspirates yield similar amounts of ASCs with comparable viability. **(A):** Flow cytometric analysis evaluating the percentage of CD45⁻ cells (top row) and ASCs (CD45⁻/CD31⁻/CD34⁺ cells; bottom row) within the SVF from UAL and SAL lipoaspirates. **(B):** Quantification of CD45⁻/CD31⁻/CD34⁺ ASCs in UAL- and SAL-derived SVF revealed no significant difference in ASC yield across samples. **(C):** MTT assay demonstrated no significant difference in cellular metabolic activity. $n = 3$. All data are given as mean \pm 1 SEM. Abbreviations: ASC, adipose-derived mesenchymal stem cell; SAL, suction-assisted liposuction; SVF, stromal vascular fraction; UAL, ultrasound-assisted liposuction.

ASC viability was $74\% \pm 4.8\%$ for SAL and $76\% \pm 8.2\%$ for UAL lipoaspirates. UAL lipoaspirates yielded a mean of $41\% \pm 4.2\%$, and the mean SAL lipoaspirate yield was $45\% \pm 1.7\%$ ASCs. After having established that fat tissue harvested via UAL and SAL yielded comparable amounts of progenitor cells, we next examined the metabolic activity of isolated ASCs in vitro. Consistent with our FACS results on viability, no difference in ASC metabolic activity could be detected between UAL and SAL groups (Fig. 1C).

ASCs Harvested via UAL and SAL Have a Comparable Osteogenic Differentiation Capacity

ASCs are increasingly being studied for skeletal regenerative medicine applications [25]. Therefore, we characterized the osteogenic differentiation abilities of ASCs harvested either by SAL or UAL. Consistent with previous studies [22], we found that

osteogenic differentiation capacity was not impaired in ASCs harvested using third-generation ultrasound (Fig. 2). Examining alkaline phosphatase expression after 7 days in osteogenic culture conditions revealed no significant differences between the ASC groups (Fig. 2A). Investigating the mineralization of the extracellular matrix via Alizarin red staining on day 14 of osteogenic stimulation also demonstrated similar results across samples (Fig. 2B). Osteogenic induction of ASCs over 14 days not only resulted in phenotypic differentiation but also upregulation of osteogenic gene expression. We assessed the levels of the key osteogenic genes *RUNX2*, *OPN*, and *OCN* (Fig. 2C). Interestingly, although both *RUNX2* and *OCN* showed similar expression levels after 14 days of osteogenic stimulation, *OPN* was expressed at significantly higher levels in ASCs harvested via UAL ($p < .05$). This could imply that UAL-derived ASCs are an advantageous source for bone tissue engineering or therapeutic

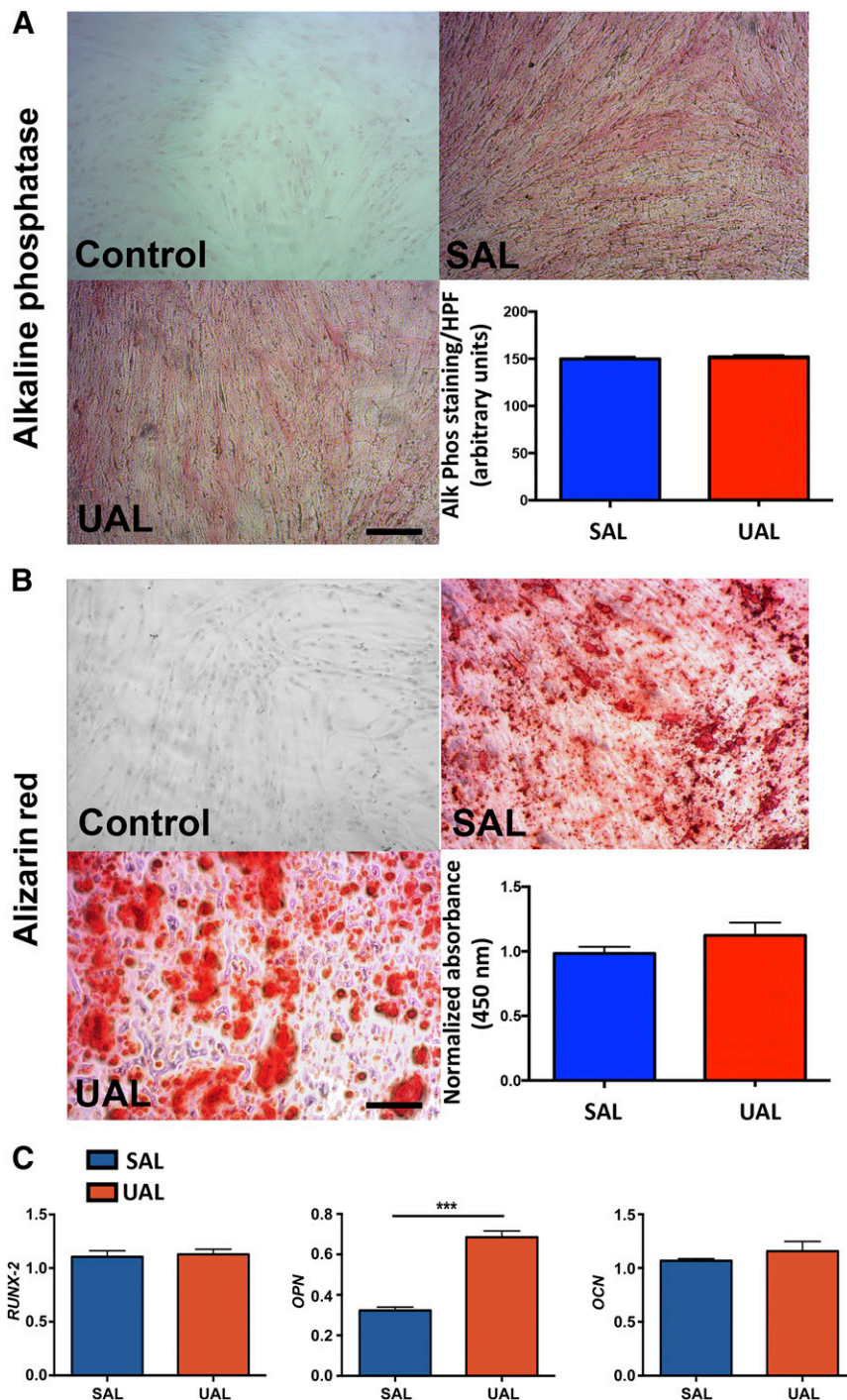


Figure 2. UAL- and SAL-derived adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) have comparable osteogenic lineage differentiation capacities. **(A, B):** Representative images and quantification of alkaline phosphatase **(A)** and Alizarin red staining **(B)** following osteogenic differentiation of UAL- and SAL-derived ASCs. **(C):** Real-time polymerase chain reaction quantifying the expression of early (*RUNX2*), intermediate (*OPN*), and late (*OCN*) osteogenic markers in UAL versus SAL ASCs in vitro. Scale bars = 100 μ m. $n = 3$. All data are given as mean \pm 1 SEM. ***, $p \leq .05$. Abbreviations: Alk phos, alkaline phosphatase; HPF, high-power field; *OCN*, osteocalcin; *OPN*, osteopontin; Phos, phosphatase; *RUNX2*, runt-related transcription factor 2; SAL, suction-assisted liposuction; UAL, ultrasound-assisted liposuction.

approaches for bone regeneration. The minor morphological difference between ASCs harvested via UAL and SAL and the trend for increased mineralization in the UAL group (Fig. 2B) may be additional hints for a slightly improved osteogenic profile of these cells.

UAL and SAL Yield ASCs With Equal Adipogenic and Chondrogenic Differentiation Capacity

Next, we examined in vitro adipogenic and chondrogenic differentiation in ASCs harvested via UAL and SAL. Consistent with preserved stemness despite ultrasound exposure, UAL-harvested

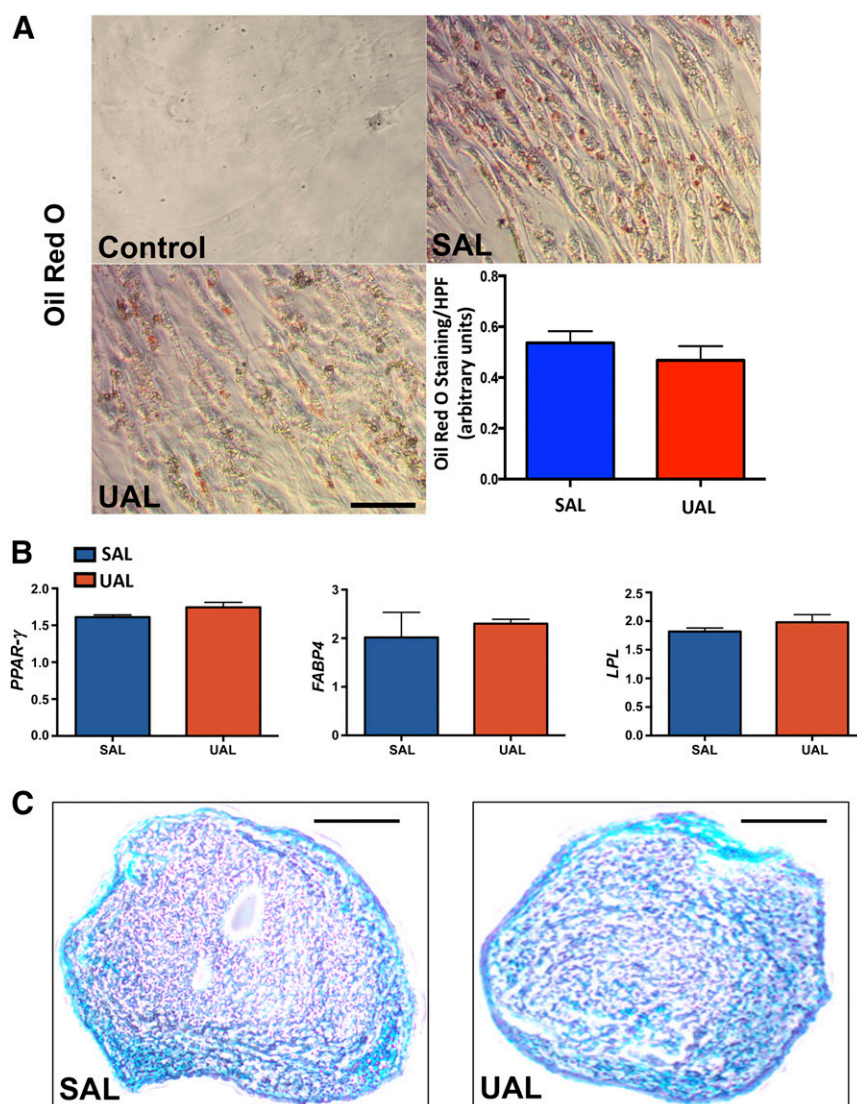


Figure 3. UAL- and SAL-derived adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) have equal adipogenic and chondrogenic lineage differentiation capacities. **(A):** Representative images and quantification of Oil Red O staining following osteogenic differentiation of UAL and SAL derived ASCs. **(B):** Real-time polymerase chain reaction quantifying the expression of selected adipogenic markers in UAL versus SAL ASCs in vitro. Scale bar = 25 μm . **(C):** Representative images of cryosectioned cartilaginous nodules differentiated from UAL and SAL ASCs stained using Alcian blue. No gross or microscopic differences could be appreciated. Scale bars = 100 μm . $n = 3$. All data are given as mean \pm 1 SEM. Abbreviations: *FABP4*, fatty acid binding protein 4; HPF, high-power field; *LPL*, lipoprotein lipase; *PPAR- γ* , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; SAL, suction-assisted liposuction; UAL, ultrasound-assisted liposuction.

ASCs differentiated into the adipogenic and chondrogenic lineage similar to ASCs harvested via SAL (Fig. 3). To characterize the adipogenic potential of ASCs, we first exposed them to adipogenic differentiation medium for 7 days in vitro before staining with Oil Red O. Comparing the staining intensity across groups revealed no significant difference between ASCs derived from UAL versus SAL lipoaspirates (Fig. 3A). Next, we compared the gene expression of key adipogenic markers, such as *PPAR- γ* , *FABP4*, and *LPL* on day 7 after adipogenic induction. In contrast to slight variations in osteogenic marker expression, no significant difference in adipogenic expression profiles could be detected between UAL- and SAL-derived ASCs (Fig. 3B). Additionally, ASCs differentiated from SAL and UAL groups exhibited histologically similar formation of cartilaginous extracellular matrix under chondrogenic differentiation on Alcian blue staining (Fig. 3C). In

aggregate, these data suggest that harvesting via UAL still allows adipogenic and chondrogenic differentiation of human ASCs.

UAL and SAL ASCs Have Similar Regenerative Growth Factor and Cytokine Expression Profiles

After assessing the plasticity of SAL and UAL ASCs, we next investigated the regenerative potential of these cells. Therefore, quantitative PCR (qPCR) was used to analyze gene expression of key regenerative cytokines and growth factors (Fig. 4). ASCs from SAL and UAL lipoaspirates were obtained using FACS, and collected for RNA processing. Comparison of relative gene expression levels revealed no significant differences between the groups for hepatocyte growth factor (*Hgf*), basic fibroblast growth factor-2 (*Fgf-2*), stromal cell-derived factor 1 (*Sdf-1*),

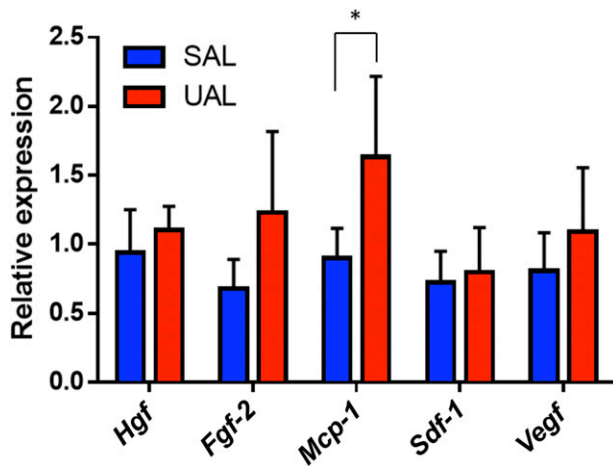


Figure 4. UAL and SAL adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) display similar regenerative growth factor and cytokine expression. Quantitative polymerase chain reaction was used to analyze gene expression for five different regenerative growth factors and cytokines. ASCs harvested from SAL and UAL lipoaspirates demonstrated comparable expression levels of *Hgf*, *Fgf-2*, *Sdf-1*, and *Vegf*. A significant difference between the groups was detectable for *Mcp-1*. $n = 3$. All data are given as mean \pm 1 SEM. *, $p \leq .05$. Abbreviations: *Hgf*, hepatocyte growth factor; *Fgf-2*, basic fibroblast growth factor; *Mcp-1*, monocyte chemoattractant protein 1; SAL, suction-assisted liposuction; *Sdf-1*, stromal cell-derived factor 1; UAL, ultrasound-assisted liposuction; *Vegf*, vascular endothelial growth factor.

and vascular endothelial growth factor (*Vegf*). However, there was a significant difference in the expression of monocyte chemoattractant protein 1 (*Mcp-1*) ($p < .05$), with higher levels in UAL ASCs suggesting a potential advantage of these cells in leukocyte chemotaxis [26].

Application of ASCs Harvested via UAL and SAL Enhances Wound Healing

Studies from our group and others have demonstrated the capacity of ASCs to support tissue repair in vivo [6, 27, 28]. To determine the therapeutic functionality of UAL-versus SAL-derived ASCs in vivo, cell-seeded hydrogels [6] were applied to a previously established model of murine cutaneous wound healing [6, 29] (Fig. 5). We found that ASCs obtained via UAL and SAL displayed equal therapeutic efficacy for cutaneous regeneration (Fig. 5A). Wounds treated with both UAL- and SAL-derived ASC-seeded hydrogels showed significantly improved healing rates as early as day 3 compared with unseeded hydrogel controls (Fig. 5B), and also had significantly faster wound closure times (11 and 11.6 days vs. 14.1 days; $p < .01$) (Fig. 5C). These findings suggest that ASCs harvested via both SAL and UAL are fully functional in therapeutic approaches for tissue cutaneous regeneration.

UAL- and SAL-Derived ASCs Enhance Wound Vascularity

Consistent with our results regarding in vivo regenerative functionality, healed wounds in both ASC treatment groups displayed significantly enhanced neovascularization compared with acellular scaffold controls ($p < .05$), with no significant differences between UAL and SAL groups (Fig. 6). These data confirm the comparable regenerative potential of ASCs harvested via SAL and UAL in vivo.

DISCUSSION

Stem cell research has led to remarkable advancements in the fields of tissue engineering and regenerative medicine. In particular, adult MSCs have garnered increasing interest for their positive impact on tissue repair [30]. MSCs have shown sufficient promise and safety in preclinical trials to warrant testing in human patients [31]. Despite the promise of MSC-based therapies, clinical translation has been slowed by the need to identify optimal cell sourcing, processing, and delivery techniques [2].

Although BM-MSCs have been studied more extensively, ASCs are an emerging stem cell population for basic science, as well as translational and clinical research [32]. ASCs have demonstrated efficacy in tissue engineering and regenerative medicine applications [33]. Specifically, we have shown successful treatment of critically sized calvarial defects in mice with ASC-seeded, apatite-coated, poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds [9] and that ASC-seeded, pullulan-collagen biomimetic scaffolds accelerate murine cutaneous wound healing and increase neovascularization [6]. Importantly, while comparable in their therapeutic efficacy [34], ASCs possess a significant clinical advantage over BM-MSCs with regard to their relative abundance and ease of harvest from subcutaneous adipose tissue [35].

The increasing clinical demand for liposuction procedures is mirrored by the recent development of novel liposuction methods such as suction- or power-assisted, laser-assisted, and ultrasound-assisted liposuction. These techniques were developed with the goal of achieving rapid tissue harvest, promoting skin tightening, and minimizing harvest-site morbidity [15]. The emergence of lipoaspirates as an important source of MSCs has led to research exploring the effects of different liposuction techniques on the harvested tissue. Given the wide variety of techniques available for use in clinical practice, this research is critically important to determine the suitability of tissue and cells derived from lipoaspirate samples for regenerative medicine purposes.

ASC viability is an important indicator of the damage inflicted on adipose tissue during harvest. Keck et al. have shown that SAL with 0.5-bar negative pressure leads to cell yield and viability comparable to manual liposuction [36]. Alternatively, laser-assisted liposuction (LAL), which uses thermolysis to selectively lyse adipocytes, has been shown to decrease ASC yield and viability as compared with SAL [19]. In this study, we demonstrate that UAL, using pulsed ultrasound energy to selectively emulsify subcutaneous adipose tissue before aspiration [37], can be an effective method for harvesting ASCs with similar yield, viability, and metabolic activity as compared with SAL and, consequently, manual liposuction. These data indicate the usefulness of UAL-derived lipoaspirates and cells in basic research and clinical applications.

The multilineage differentiation capacity of ASCs dictates their value for tissue engineering. LAL has been shown to inhibit ASC osteogenic gene induction and LAL-derived ASCs display impaired ability to heal murine calvarial defects in vivo [19]. In contrast, we found that OPN expression, an early marker of osteogenic differentiation [38], was increased in UAL-harvested ASCs as compared with those harvested by SAL. The slight increase of OPN expression could result in a subtle effect on early osteoblast development, which may lead to an advantage of UAL-derived ASCs in bone tissue engineering and healing. This

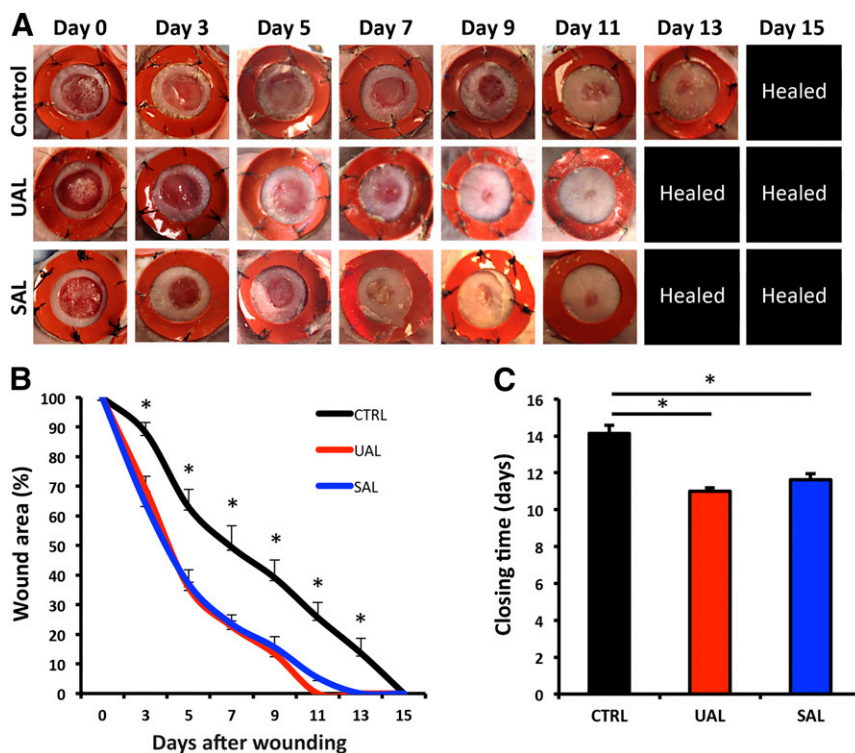


Figure 5. Application of adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) harvested via UAL and SAL equally improve excisional wound healing. **(A–C):** Gross appearance **(A)**, wound healing kinetics **(B)**, and closing times **(C)** of humanized excisional murine wounds treated with hydrogel-seeded ASCs harvested via UAL or SAL, or unseeded hydrogel. $n=8$. $*, p \leq .05$. All data are given as mean \pm 1 SEM. Abbreviations: CTRL, control; SAL, suction-assisted liposuction; UAL, ultrasound-assisted liposuction.

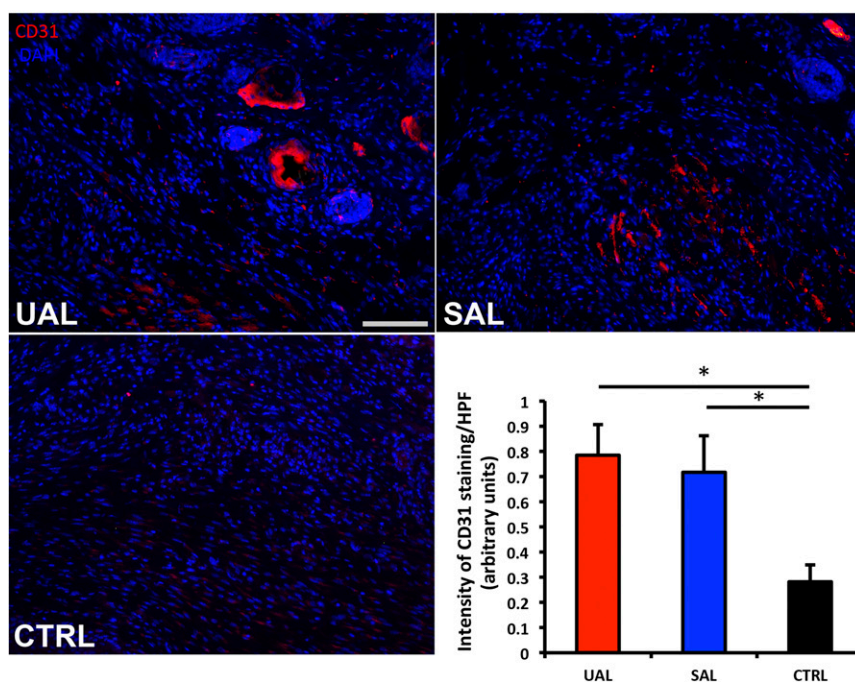


Figure 6. UAL- and SAL-derived hASC-seeded hydrogel groups improve cutaneous wound vascular density. CD31 staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) confirmed a significant increase in neovascularization among the hASC-seeded hydrogel groups. Scale bar = 100 μ m. $n=8$. $*, p \leq .05$. All data are given as mean \pm 1 SEM. Abbreviations: CTRL, control; HPF, high-power field; SAL, suction-assisted liposuction; UAL, ultrasound-assisted liposuction.

warrants further research using specific assays. However, besides the minor alterations in expression profiles, no differences in the other *in vitro* assays for osteogenic differentiation potential could be detected and, from this study, we can conclude that both UAL- and SAL-derived ASCs are capable of osteogenic differentiation.

While previous studies have shown that SAL-derived ASCs have significantly higher expression levels of adipogenic differentiation markers [36], there were no significant differences between UAL- and SAL-derived ASCs' adipogenic gene expression profiles. Similarly, we could not detect any disadvantage for UAL-derived ASCs in a qualitative chondrogenic differentiation assay. These data suggest that UAL-harvested ASCs retain their multipotency and have comparable efficacy to SAL-derived ASCs for applications in tissue engineering. However, further *in vivo* studies are needed to confirm the full potential of UAL-harvested ASCs in hard and soft tissue engineering.

Increasingly, ASCs are studied for their enhancement of tissue regeneration [6]. Here, we show that UAL- and SAL-harvested ASCs have similar regenerative gene expression profiles and a comparable capacity for promoting cutaneous regeneration in a preclinical model of wound healing. Additionally, healed wounds treated with either UAL- or SAL-derived ASCs demonstrated significantly upregulated neovascularization compared with an unseeded-scaffold control group. These encouraging findings identify UAL as a new method for obtaining therapeutically efficacious MSCs.

CONCLUSION

In this study, we evaluated the effect of UAL on adipose-derived progenitor cell yield, viability, and functionality. We found that UAL-harvested lipoaspirates contain similar numbers of ASCs compared with SAL-derived samples. Furthermore, UAL-derived ASCs are equally viable and have similar differentiation capacities as SAL-harvested cells. Last, we could not show any

difference in therapeutic efficacy between UAL- and SAL-derived ASCs in an *in vivo* model of tissue regeneration. In aggregate, our data confirm UAL-derived lipoaspirates as a source of fully functional ASCs able to satisfy important criteria for stem cell applications in basic research and clinical therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Yujin Park for her assistance with tissue processing and staining, and Dr. Dean Vistnes at the Kaplan Cosmetic Surgery Center for lipoaspirate sample collection. Cell sorting was completed at the Stanford Shared FACS Facility. Funding for this stem cell research has been provided by the National Institutes of Health (R01-DK074095, R01-AG025016), the Hagey Family Endowed Fund in Stem Cell Research and Regenerative Medicine, and The Oak Foundation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

D.D.: conception and design, collection and/or assembly of data, manuscript writing, final approval of manuscript; D.A. and Z.N.M.: conception and design, collection and/or assembly of data; A.L., E.A.B., J.B., S.M.K., E.R.Z., A.J.W., M.S.H., and G.G.W.: collection and/or assembly of data; M.S.P. and M.S.: manuscript writing, final approval of manuscript; A.F.S., H-G.M., G.M.H., D.C.W., M.T.L., and G.C.G.: conception and design, manuscript writing, final approval of manuscript.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

D.D. and G.C.G. are listed on the patent "Efficient Stem Cell Delivery Into Biomaterials Using a Novel Capillary Driven Encapsulation Technique" and G.C.G. is listed on the patent "Intelligent Biodegradable Pullulan Regenerative Matrix for Tissue Engineering" assigned to Stanford University. The other authors indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007;213:341–347.
- Wong VW, Sorkin M, Gurtner GC. Enabling stem cell therapies for tissue repair: Current and future challenges. *Biotechnol Adv* 2013; 31:744–751.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y et al. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453:314–321.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;98:1076–1084.
- Rustad KC, Wong VW, Sorkin M et al. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials* 2012;33:80–90.
- Garg RK, Rennert RC, Duscher D et al. Capillary force seeding of hydrogels for adipose-derived stem cell delivery in wounds. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE* 2014;3:1079–1089.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–4295.
- Nakanishi C, Nagaya N, Ohnishi S et al. Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. *Circ J* 2011;75:2260–2268.
- Levi B, James AW, Nelson ER et al. Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS One* 2010;5:e11177.
- Rehman J, Traktuev D, Li J et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109:1292–1298.
- Service RF. Tissue engineers build new bone. *Science* 2000;289:1498–1500.
- Cowan CM, Shi YY, Aalami OO et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004;22:560–567.
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174:101–109.
- Nagy MW, Vanek PF Jr. A multicenter, prospective, randomized, single-blind, controlled clinical trial comparing VASER-assisted Lipoplasty and suction-assisted Lipoplasty. *Plast Reconstr Surg* 2012;129:681e–689e.
- Shridharani SM, Broyles JM, Matarasso A. Liposuction devices: Technology update. *Med Devices (Auckl)* 2014;7:241–251.
- Cimino WW. The physics of soft tissue fragmentation using ultrasonic frequency vibration of metal probes. *Clin Plast Surg* 1999;26: 447–461.
- Schafer ME, Hicok KC, Mills DC et al. *Aesthet Surg J* 2013;33:698–704.
- Fisher C, Grahovac TL, Schafer ME et al. Comparison of harvest and processing techniques for fat grafting and adipose stem cell isolation. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:351–361.
- Chung MT, Zimmermann AS, Paik KJ et al. Isolation of human adipose-derived stromal cells using laser-assisted liposuction and their therapeutic potential in regenerative medicine. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE* 2013;2:808–817.
- Cimino WW. Ultrasonic surgery: Power quantification and efficiency optimization. *Aesthet Surg J* 2001;21:233–241.
- Duscher D, Rennert RC, Januszyn M et al. Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells. *Sci Rep* 2014;4:7144.

- 22** Panetta NJ, Gupta DM, Kwan MD et al. Tissue harvest by means of suction-assisted or third-generation ultrasound-assisted lipoaspiration has no effect on osteogenic potential of human adipose-derived stromal cells. *Plast Reconstr Surg* 2009;124:65–73.
- 23** Wong VW, Rustad KC, Glotzbach JP et al. Pullulan hydrogels improve mesenchymal stem cell delivery into high-oxidative-stress wounds. *Macromol Biosci* 2011;11:1458–1466.
- 24** Suga H, Matsumoto D, Eto H et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2009;18:1201–1210.
- 25** Levi B, Longaker MT. Concise review: Adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. *STEM CELLS* 2011;29:576–582.
- 26** Carr MW, Roth SJ, Luther E et al. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3652–3656.
- 27** Suga H, Glotzbach JP, Sorkin M et al. Paracrine mechanism of angiogenesis in adipose-derived stem cell transplantation. *Ann Plast Surg* 2014;72:234–241.
- 28** Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006;12:459–465.
- 29** Galiano RD, Michaels JT, Dobryansky M et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen* 2004;12:485–492.
- 30** Reinisch A et al. Epigenetic and in vivo comparison of diverse MSC sources reveals an endochondral signature for human hematopoietic niche formation. *Blood* 2015;125:249–260.
- 31** Gir P, Oni G, Brown SA et al. Human adipose stem cells: Current clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 2012;129:1277–1290.
- 32** Glotzbach JP, Wong VW, Gurtner GC et al. Regenerative medicine. *Curr Probl Surg* 2011;48:148–212.
- 33** Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World J Stem Cells* 2014;6:312–321.
- 34** Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A et al. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev* 2012;21:2724–2752.
- 35** Kokai LE, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells: Biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl Res* 2014;163:399–408.
- 36** Keck M, Kober J, Riedl O et al. Power assisted liposuction to obtain adipose-derived stem cells: Impact on viability and differentiation to adipocytes in comparison to manual aspiration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2014;67:e1–e8.
- 37** de Souza Pinto EB, Abdala PC, Maciel CM et al. Liposuction and VASER. *Clin Plast Surg* 2006;33:107–115.
- 38** Granéli C, Thorfve A, Ruetschi U et al. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem Cell Res (Amst)* 2014;12:153–165.



See www.StemCellsTM.com for supporting information available online.

Supplemental Figure

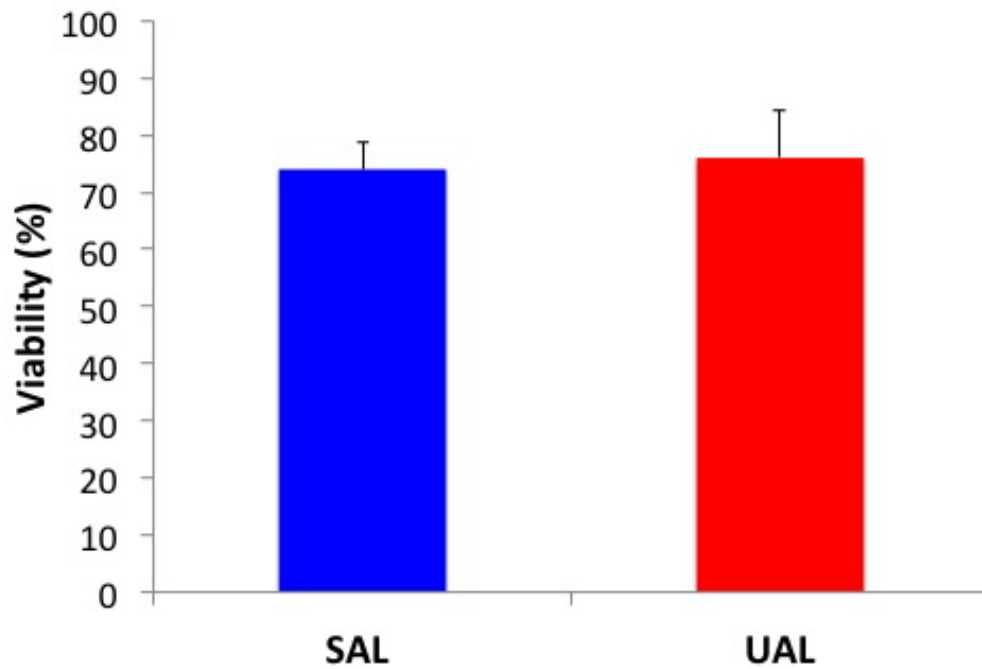


Figure S1. ASC viability in UAL and SAL lipospires was assessed by propidium iodide (PI) Staining and FACS analysis. Viable cells are shown in percentage relative to total cell number. Evaluation of three independent donors. All data are means \pm one SEM. * indicates $p \leq 0.05$.

Publikation III

Vergleich des Regenerativen Zytokinprofils von Adipose Derived Stromal Cells (ASCs) Gewonnen Mittels Abdominoplastik, Suction Assisted Liposuction (SAL) und Ultrasound Assisted Liposuction (UAL)

Comparison of the regenerative cytokine profile of adipose-derived stromal cells (ASCs) harvested via abdominoplasty, suction-assisted liposuction (SAL) and ultrasound-assisted liposuction (UAL)

Autoren

Matthias Michael Aitzetmüller¹, Hans-Günther Machens¹, Arndt F Schilling², Dominik Duscher¹

Institut

- 1 Abteilung für Experimentelle Plastische Chirurgie, Klinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
- 2 Abteilung für Forschung und Entwicklung, Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie Universitätsklinikum Göttingen

Schlüsselwörter

Adipose derived stem cells (ASCs), Liposuction, Zytokine, Abdominoplastik, Suction Assisted Liposuction (SAL), Ultrasound Assisted Liposuction (UAL)

Key words

adipose derived stem cells (ASCs), liposuction, cytokine, ultrasound assisted liposuction, suction assisted liposuction, abdominoplasty

eingereicht 24.04.2017

akzeptiert 07.08.2017

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0043-118596>
Handchir Mikrochir Plast Chir 2017; 49: 1–9
© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
ISSN 0722-1819

Korrespondenzadresse

Dr. Dominik Duscher
Abteilung für Experimentelle Plastische Chirurgie
Klinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie
Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München
Ismaninger Str. 22
81675 München

Prof. Dr. Arndt F. Schilling
Abteilung für Forschung
und Entwicklung,
Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie
und Plastische Chirurgie
Universitätsklinikum Göttingen
Robert-Koch-Str. 40
37075 Göttingen

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung Mesenchymale Stromazellen sind aufgrund ihres regenerativen Potentials schon in zahlreichen Fachgebieten der Medizin im klinischen Einsatz. In der Plastischen Chirurgie stehen vor allem Fettstammzellen (Adipose derived stromal cells = ASCs) aus Lipoaspirat im Mittelpunkt der rezenten Forschung. Die Fähigkeit zur Ausschüttung von regenerativen Zytokinen ist der Schlüsselmechanismus im therapeutischen Einsatz von ASCs. Es sind zurzeit eine Vielzahl an Methoden und Geräten zur Lipoaspiratgewinnung in der klinischen Anwendung. Bei den meisten dieser Geräte sind die Auswirkungen auf die regenerativen Eigenschaften der ASCs noch weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Studie ist der Vergleich der Expression von wesentlichen regenerativen Zytokinen von ASCs, gewonnen mittels dreier Standardverfahren der Plastischen Chirurgie: Abdominoplastik, Suction assisted Liposuction (SAL) und Ultrasound assisted Liposuction (UAL).

Patienten und Methoden UAL und SAL Lipoaspirate wurden jeweils von 3 gesunden weiblichen Probanden gewonnen, be

vor eine Abdominoplastik an denselben Patienten durchgeführt wurde. ASCs wurden aus UAL und SAL Lipoaspiraten sowie aus den Abdominoplastikresektaten isoliert und die RNA-Expression von wichtigen regenerativen Zytokinen (HGF (hepatocyte growth factor), FGF-2 (basic fibroblast growth factor), MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1), SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) und VEGF (vascular endothelial growth factor) verglichen.

Resultate Es zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Expression von HGF, FGF-2, SDF-1 und VEGF zwischen den einzelnen Proben, jedoch eine signifikant erhöhte Expression von MCP-1 in ASCs gewonnen aus UAL-Lipoaspirat.

Conclusio UAL stellt bezüglich Einfluss auf das ASC Expressionsprofil von Schlüsselzytokinen der Gewebserneuerung eine mit SAL zumindest vergleichbare Methode dar. Sowohl UAL als auch SAL Lipoaspirate sind geeignet zur Gewinnung von funktionellen ASCs vergleichbar mit minimal manipulierten Zellen aus Abdominoplastikresektaten.

ABSTRACT

Introduction Mesenchymal stem cells are already used in numerous areas of medicine. In the field of plastic surgery, the main focus of recent research has been to utilise adipose-derived stromal cells (ASCs), mainly harvested via liposuction. The ability to release regenerative cytokines is supposed to be

the key mechanism for the therapeutic efficacy of ASCs. There are currently a variety of methods and devices in clinical use for harvesting lipoaspirate and consequently ASCs. For most of these devices, the effect on the regenerative cytokine profile of ASCs is unknown. The aim of this study is to compare the expression of key regenerative cytokines of ASCs derived by three standard procedures of plastic surgery: abdominoplasty, suction-assisted liposuction (SAL) and ultrasound-assisted liposuction (UAL).

Patients and methods UAL and SAL lipoaspirates were obtained from 3 healthy female volunteers before abdominoplasty was performed in the same patients. ASCs were isolated from UAL and SAL lipoaspirates as well as from abdominoplasty resections and RNA expression of important regenerative cytokines (HGF (hepatocyte growth factor), FGF-2 (basic fibroblast growth factor), MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1), SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) and VEGF (vascular endothelial growth factor) was compared.

Results There was no difference in the expression of HGF, FGF-2, SDF-1 and VEGF between the individual samples, but we were able to demonstrate significantly increased expression of MCP-1 in ASCs obtained from UAL lipoaspirate.

Conclusion UAL and SAL lipoaspirates are suitable for obtaining functional ASCs and are comparable to minimally manipulated cells from abdominoplasty resections.

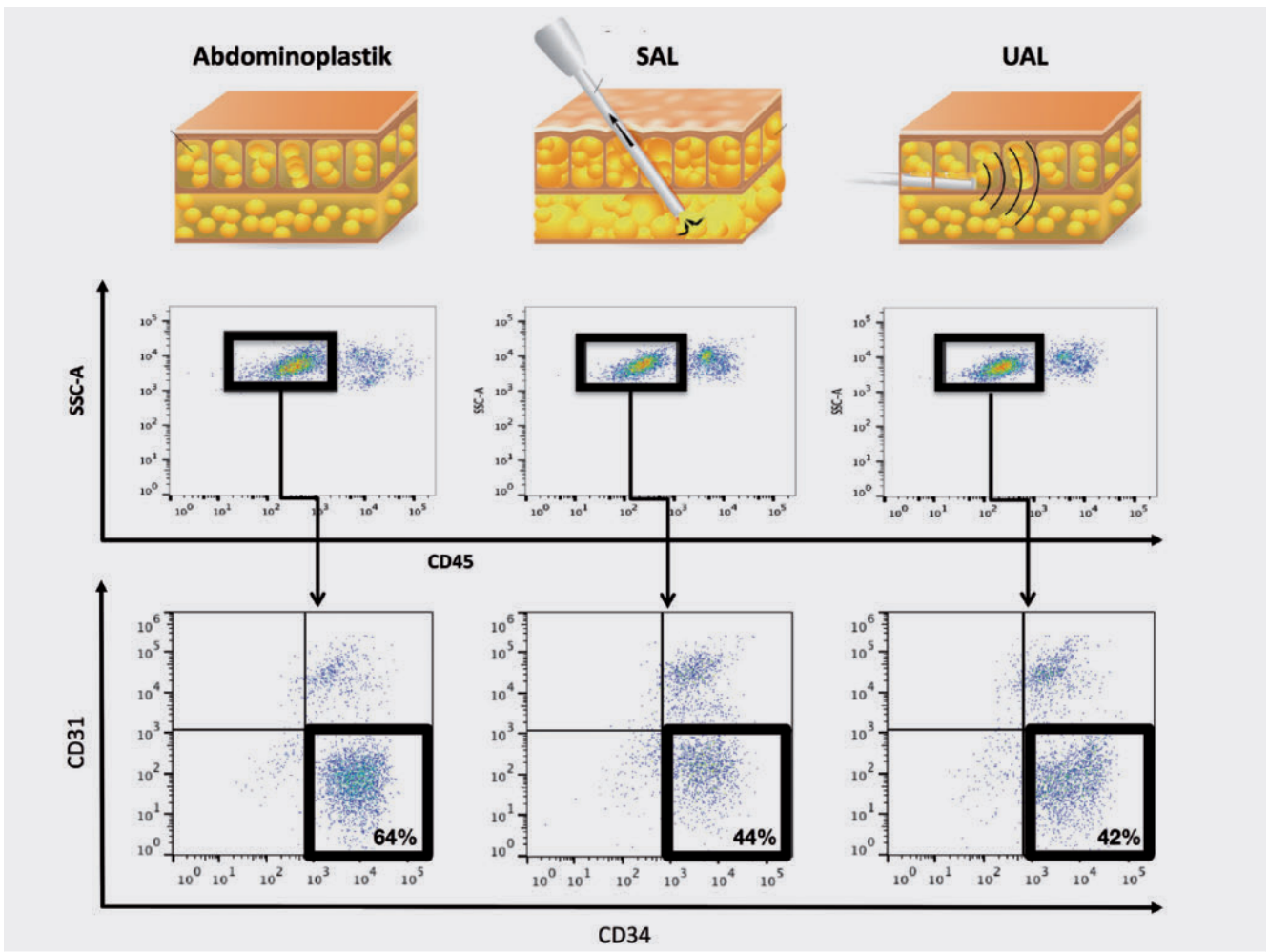
Einleitung

Mesenchymale Stromazellen sind aufgrund ihres regenerativen Potentials schon in zahlreichen Fachgebieten der Medizin im klinischen Einsatz [1, 2]. In der Plastischen Chirurgie stehen hierbei vor allem Fett-Stromazellen (Adipose derived stromal cells = ASCs) im Mittelpunkt der rezenten Forschung. Basierend auf ihren multiplen Differenzierungsmöglichkeiten zu beispielsweise Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Myozyten, Neuronalzellen oder Kardiomyozyten [3–8], ihrer parakrinen Funktionen und ihrer relativ leichten Gewinnung im Rahmen der Fettabsaugung (= Liposuction), stellen ASCs eine vielversprechende endogene Ressource zur Verbesserung und Erweiterung der rekonstruktiven und ästhetischen Möglichkeiten in der Plastischen Chirurgie dar [9]. So konnten ASCs bereits in klinischen Studien eingesetzt werden, um Knochen- oder Weichteildefekte zu beheben und um ischämische Zustände zu reversieren [10–13]. Doch die für den therapeutischen Effekt so essentiellen parakrinen Funktionen bringen nicht nur Vorteile mit sich. Aufgrund der Zytokinausschüttung, die ein Schlüsselmechanismus für das regenerative Potential ist, wird auch eine potentielle Onkogenität des Lipotransfers diskutiert [14–16]. Aufgrund der mangelnden Langzeit-Studienlage bezüglich des Zusammenhangs zwischen Lipofilling und des Auftretens von Tumor-Rezidiven, wird seine Anwendung für onkologische Rekonstruktionen in den meisten Ländern nicht empfohlen [16–19].

Um regenerative Zellen aus dem Lipoaspirat zu gewinnen, wird durch enzymatische oder nicht enzymatische Extraktionsverfahren die sogenannte Stromal Vascular Fraction (SVF) isoliert. Diese heterogene Zellpopulation besteht aus Fibroblasten, Immunzellen,

Prä-Adipozyten, Perizyten, Epithelzellen und, am wichtigsten für die regenerativen Eigenschaften, ASCs [7, 20]. Die SVF kann entweder direkt zur Zelltherapie eingesetzt [21] oder weiter aufbereitet werden, um in diesem Prozess mittels Zellkultivierung oder Durchflusszytometrie reine ASCs zu gewinnen [22–26]. Ihre therapeutische Wirkung entfalten ASCs durch die Sekretion einer Vielzahl von pro-regenerativen Faktoren, wie pro-angiogenetische und immunmodulierende Zytokine (VEGF, MCP1, etc.), wodurch sie in die Regelkreisläufe umliegender Zellen eingreifen können. Um eine therapeutisch wirksame Sekretion von regenerativen Zytokinen zu gewährleisten, muss eine ausreichende Funktionalität der transplantierten Zellgruppen gesichert sein. Eine schonende Gewinnung und ist deshalb essentiell [2, 27–29].

Durch den intensiven Forschungsaufwand der letzten Jahrzehnte in dem Gebiet der Liposuction im Rahmen ästhetischer oder rekonstruktiver Anwendungen wurden verschiedenste Methoden und Geräte zur Gewinnung, Aufbereitung und Transplantation entwickelt [30]. Die traditionell verwendete Suction-assisted Liposuction (SAL), bei der das Fett nach Infiltration einer Tumescenzlösung unter Vakuum mittels Kanüle aus dem Gewebe gelöst wird, stellt noch immer den Goldstandard dar. Zusätzlich dazu entstanden komplexere Methoden, wie die primäre Verflüssigung der Fettzellen mittels Ultraschall (UAL) oder Radiofrequenz (RFAL), die Auflockerung des Gewebes durch Laser (LAL), Wasser (WAL), die mechanische Zerstörung des Zellnetzwerkes (mechanisch assistierte Liposuction-MAL) oder die Lösung mittels Warmwassers und geringem Druck (Tissue Liquefaction Technique) mit nachfolgender Absaugung [30–34]. All diese Methoden dienen primär der Erleich-



► **Abb. 1 Gewinnung von Fettgewebe durch Abdominoplastik, SAL und UAL.** Nach Isolierung der SVF werden durch FACS die ASCs sortiert und charakterisiert und anschließend auf deren Zytokinprofil überprüft. Abkürzungen: SAL – Suction assistierte Liposuktion, UAL – Ultraschall-assistierte Liposuktion, SVF – Stromal Vascular Fraction, FACS – Fluorescence assisted Cell Sorting, ASC – Adipose Derived Stromal Cells

terung des Vorgangs der Fettabsaugung und einer Verminderung damit assoziierter Komplikationen und nicht einer größtmöglichen Überlebensrate der gewonnenen Zellen [33].

Die Fähigkeit der regenerativen Zytokinausschüttung ist einer der Schlüsselmechanismen im therapeutischen Einsatz von ASCs [35, 36]. Das Ziel dieser Studie ist der Vergleich von Expressionsprofilen von Schlüsselzytokinen der Gewebserneuerung wie HGF (hepatocyte growth factor), FGF-2 (basic fibroblast growth factor), MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1), SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) und VEGF (vascular endothelial growth factor) in ASCs gewonnen mittels dreier Standardverfahren der Plastischen Chirurgie: Abdominoplastik, Suction assisted Liposuction (SAL) und Ultrasound assisted Liposuction (UAL). Die Lipoaspiratentnahme erfolgte beim jeweils selben Patienten um die Varianz der Proben möglichst zu minimieren.

Patienten und Methoden

Nach positivem Votum der Ethikkommission (Protokoll # 2188) wurde mittels UAL und SAL Lipoaspirat von 3 gesunden, weiblichen Patienten (im Alter von 36–54 Jahren ohne bekannte Ko-Mor-

biditäten) gesammelt, welche sich freiwillig einem Eingriff zur Körperformung unterzogen. Als UAL-System wurde das „VASER Lipo System-Solta Medical, Hayward, CA, <http://www.solta.com>“ verwendet. Dieses System arbeitet durch Abgabe von Vibrationen mit einer Frequenz von 36 000 Hz und einer Wellen-Amplitudenlänge von 71–76 mm, die in 5–12 Watt resultieren [37]. Zunächst erfolgte paraumbilikal eine Infiltration mit Kleinscher Lösung. Nach Abwarten einer ausreichenden Einwirkzeit wurde randomisiert jeweils seitlich paraumbilikal mittels UAL oder SAL eine kleine Menge Lipoaspirat entnommen. Die Gewebsextraktion erfolgte in allen Fällen mittels einer 5 mm Aspirationaskanüle und einem negativen Druck von ca. 700 mmHG. Es wurde jeweils nur genug Lipoaspirat für die Laboranalyse entnommen und der Großteil des Abdomens blieb von der Liposuction verschont. Im Anschluss an die Entnahme der Lipoaspiratproben erfolgte eine en block Gewebsexcision bei selbigen Probandinnen im Sinne einer Abdominoplastik.

SVF-Isolation

Zur Gewinnung der SVF aus dem Lipoaspirat wurde dieses im Rahmen der enzymatischen Isolation [22] mit sterilem Phosphat-gewaschtem NaCl gewaschen, um Öl, Blut und Tumescenz Rückstän-

► **Tab. 1** q-PCR Gene und Primer Sequenzen

| Gene | Forward Primer (5'–3') | Reverse Primer (5'–3') |
|-------|---------------------------|---------------------------|
| HGF 1 | CTTCTGCCGGTCTCTGTTC | TCTTCTCTTCTCTGTCTTCTGC |
| FGF 2 | ATGGCAGCCGGGAGCATCACCCACG | TCAGCTCTTCCAGACATTGGAAG |
| MCP 1 | ACTGAAGCTCGTACTCTC | CTTGGGTTGTGGAGTGAG |
| SDF 1 | TGAGGCCAGGGAAGAGTGAG | GACACATGGCGATGAATGGA |
| VEGF | GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT | GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGAA |

Abkürzungen: HGF = hepatocyte growth factor, FGF-2 = basic fibroblast growth factor, MCP-1 = monocyte chemotactic protein 1, SDF-1 = stromal cell-derived factor 1, VEGF = vascular endothelial growth factor)

de zu entfernen. Danach wurde das Fett mit Typ-II Kollagenase (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) in Medium 199 (Cellgro; Manassas, VA) in einem 37° Wasserbadschüttler mit 180 rpm für 30 Minuten gelöst. Die gesamte Mischung wurde bei 1500 rpm für 20 Minuten bei 4° zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der zelluläre Bestand wurde mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Invitrogen; Carlsbad, CA) mit 10 % fetal bovine serum (FBS) versetzt, durch einen Zell Filter mit 100 µm Poren (Corning; Corning, NY) gefiltert und erneut mit 300 rpm für 15 Minuten gekühlt zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Der übrige zelluläre Teil wurde mit einem Puffer zur Lysierung von roten Blutkörperchen versetzt und zentrifugiert, um die SVF zu gewinnen. Die durch Abdominoplastik gewonnenen Proben wurden manuell in kleine Stücke zerteilt. Das weitere Prozedere zur SVF Isolation war analog zur Gewinnung aus Lipoaspirat.

Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS)

Unserer Arbeitsgruppe gelang es, in einer rezenten Studie zu demonstrieren, dass die Zellkultivierung einen signifikanten Effekt auf das Genexpressionsprofil von ASCs hat [38]. Um eine hohe translationale Relevanz zellbiologischer Studien gewährleisten zu können, sollten daher primäre Zellen herangezogen werden. Dies respektierend, wurden in der frisch gewonnenen SVF durch sofortiges Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) der ASC Bestandteil identifiziert und isoliert. ASCs wurden unter Verwendung von anti-humanen, monoklonalen Maus-Antikörper CD31-PE, CD 45-PeCy7 und CD34-APC (BD Biosciences; San Jose, CA) durch das Profil der Oberflächenmarker CD45-/CD31-/CD34+ [24, 28, 39] charakterisiert. Propidiumiod wurde verwendet, um tote Zellen zu markieren. Die Analyse wurde mit Hilfe einer BD-FACSAria Maschine (BD Biosciences) durchgeführt (► **Abb. 1**).

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) Analyse

Direkt im Anschluss an die Isolierung durch FACS wurde die gesamte RNA der Zellen durch Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Valencia, CA, <http://www.qiagen.com>) nach dem vorgegebenen Protokoll des Herstellers gewonnen. Reverse Transkription wurde durchgeführt und die regenerative Genexpression wurde durch qRT-PCR mit dem PRISM 7900HT Sequenz-Detektions-System (Applied Biosystems, Foster City, CA, [\[biosystems.com\]\(http://www.applied-biosystems.com\)\) und SYBR Green PCR Master Mix \(Applied Biosystems\) untersucht. Die Menge an PCR-Produkten wurde durch Verwendung einer externen Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase \(GAPDH\) Standard Kurve und der Software "LightCycler" \(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, <https://lifescience.roche.com>\) ausgewertet. Alle Werte wurden auf Basis der GAPDH Expression in den Proben normalisiert. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Die spezifischen Primer für die Genexpression wurde mit Hilfe einer Primer-Datenbank \(<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>\) wie in ► **Tab. 1** angeführt, konfiguriert.](http://www.applied-</p>
</div>
<div data-bbox=)

Statistische Analyse

Die Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc.). Der statistische Vergleich erfolgte mittels ANOVA für wiederholtes Testen und die Korrektur der Alphafehler Kumulierung bei multipler Testung mittels Bonferroni-Methode. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Resultate

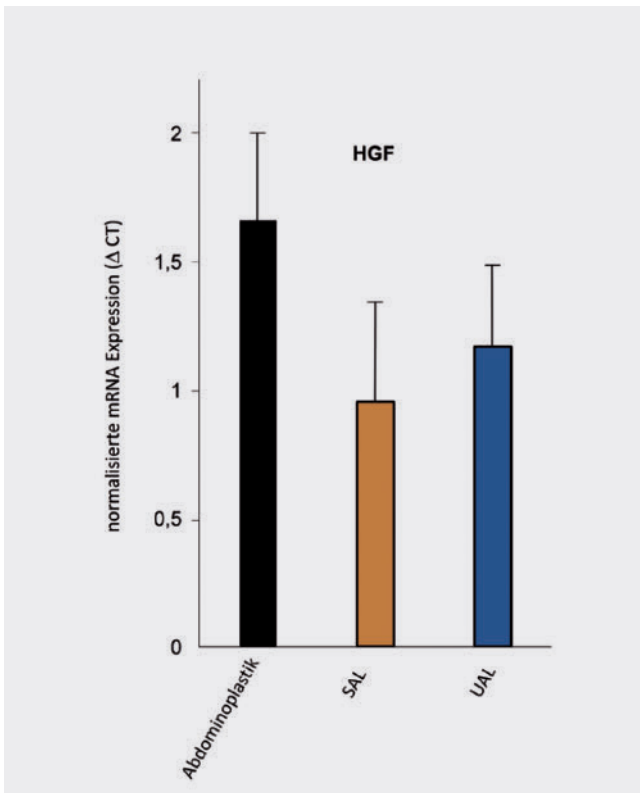
Das regenerative Potential von ASCs wird hauptsächlich durch deren Zytokinexpression repräsentiert. Um die Fähigkeit zur Produktion von Schlüsselzytokinen der Gewebsregeneration nach der Extraktion von ASCs aus SAL, UAL und Abdominoplastikresektat zu vergleichen, wurden die Expressionsprofile von HGF, b-FGF-2, MCP-1, SDF-1, und VEGF analysiert.

UAL und SAL ASCs exprimieren Zytokine in ähnlicher Höhe wie ASCs aus Abdominoplastikresektaten

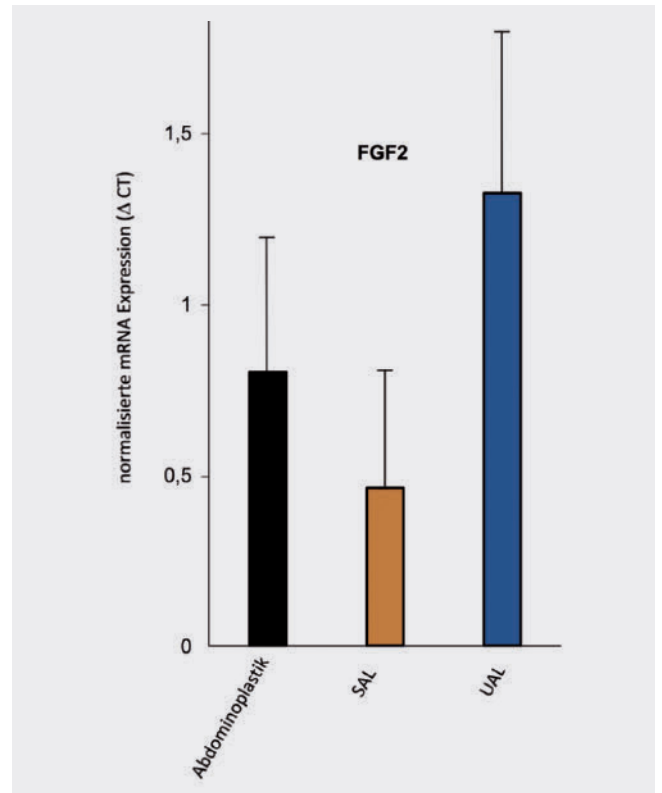
Die regenerativen Potentiale von SAL und UAL ASCs wurden in aktuellen Studien mit ASCs aus en bloc resezierten Abdominoplastikpräparaten als vergleichbar beschrieben [37, 40]. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte in unserer Evaluierung ebenfalls kein negativer Einfluss durch UAL und SAL auf Genexpressionsprofile von ASCs dargestellt werden (► **Abb. 2** – ► **Abb. 6**).

UAL bewirkt keine Reduktion der Expression von Schlüsselzytokinen der Gewebsregeneration

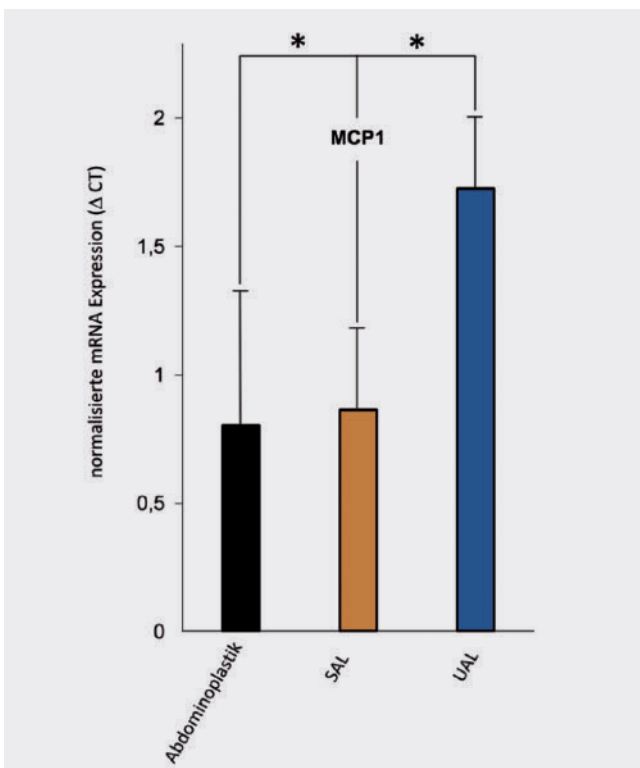
Es zeigte sich keine signifikante Reduktion der Expression von HGF, FGF-2, SDF-1, MCP-1 und VEGF in ASCs gewonnen aus UAL Lipoa-



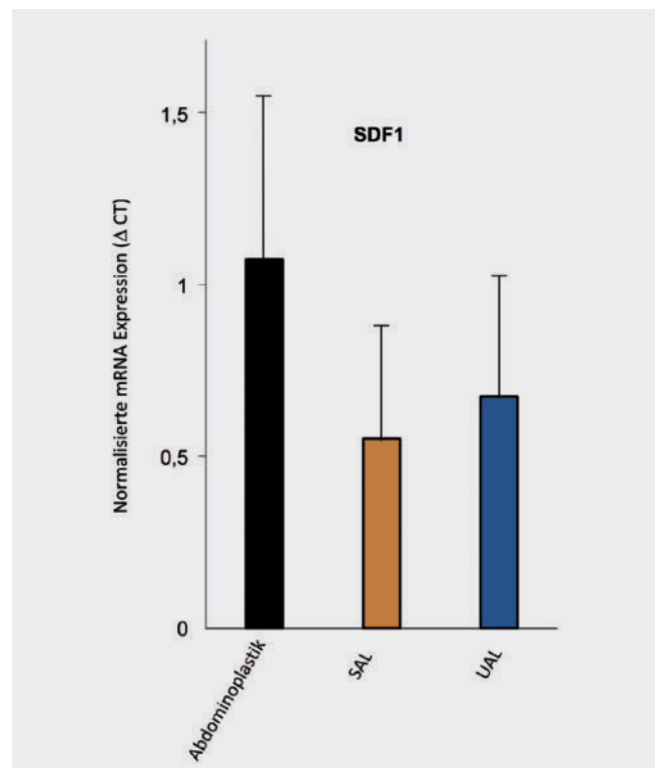
► **Abb. 2 Real time q-PCR Resultate für HGF.** Es zeigt sich keine signifikant veränderte Expression zwischen Abdominoplastik, SAL und UAL Proben, HGF = Hepatocyte Growth Factor.



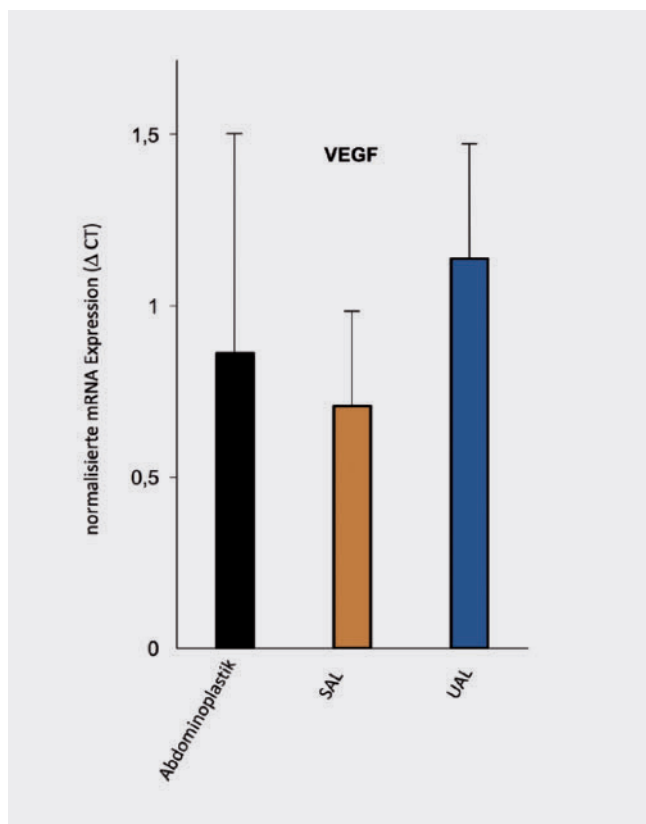
► **Abb. 3 Real time q-PCR Resultate für FGF2.** Es zeigt sich keine signifikant veränderte Expression zwischen Abdominoplastik, SAL und UAL Proben, FGF-2, basic fibroblast growth factor.



► **Abb. 4 Real time q-PCR Resultate für MCP1.** Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression von MCP1 in UAL Proben; MCP1- monocyte chemotactic protein-1.



► **Abb. 5 Real time q-PCR Resultate für SDF1.** Es zeigt sich keine signifikant veränderte Expression zwischen Abdominoplastik, SAL und UAL Proben, SDF1- stromal cell-derived factor-1.



► **Abb. 6 Real time q-PCR Resultate für VEGF.** Es zeigt sich keine signifikant veränderte Expression zwischen Abdominoplastik, SAL und UAL Proben, VEGF, vascular endothelial growth factor.

spirat verglichen mit SAL, mit dem Goldstandard der Liposuction, oder minimal manipulierten ASCs aus Abdominoplastikresektaten derselben Patienten (► **Abb. 2–6**).

UAL ASCs sind durch eine signifikant erhöhte Expression von MCP-1 charakterisiert

Ein signifikanter Unterschied wurde in der Expression von MCP-1 mit einer höheren Expression in den aus UAL gewonnenen ASCs festgestellt (► **Abb. 4**, * $p < 0,05$). Dieses Ergebnis zeigt, dass das regenerative Zytokinprofil von UAL-ASCs nicht nur gleichwertig zu SAL-ASCs und Zellen aus Abdominoplastikresektaten ist, sondern belegt sogar die erhöhte Expression eines Botenstoffs in den durch UAL gewonnene Zellen.

Diskussion

In dem Bestreben, die Gewinnung von Lipoaspirat zu optimieren, wurden zahlreiche neue Methoden für die Fettabsaugung entwickelt. Manche von diesen erreichen eine Minimierung der negativen Effekte der Liposuction, wie Blutverlust und erleichtern den Eingriff durch Auflockerung des Gewebes [41–43]. Diese Vorteile für Arzt und Patient führten zu einer vermehrten Verbreitung neuartiger Liposuctionsmethoden in den letzten Jahren. So zeigt sich die traditionelle SAL-Technik rückläufig. Im Jahre 2011 wurden in den USA nur mehr 51,4% aller Liposuctionen durch ein SAL-Gerät durchgeführt, gefolgt von PAL (23%) und einem immer größer werdenden Anteil an UAL (20,9%) [44]. Aufgrund dieser Daten kann angenom-

men werden, dass bei bis zu einem Fünftel aller Lipofillings zuvor Fett mit einem UAL Gerät gewonnen wurde. Für eine möglichst erfolgreiche Fetttransplantation ist eine Unversehrtheit des zellulären Anteils des Lipoaspirats Voraussetzung [35, 45]. Besonders einflussreich auf das Überleben von Fetttransplantaten hat sich die Fraktion von mesenchymalen Stromazellen im Fett (ASCs) erwiesen [35]. Während Adipozyten das Gros des Volumens eines Fetttransplantats stellen, haben die enthaltenen ASCs andere Funktionen. Verschiedene Studien postulieren eine unterstützende Rolle durch eine mögliche Differenzierung zu Adipozyten oder eine Inkorporation in Blutgefäße durch Differenzierung in Endothelzellen [11, 46]. Die Evidenzlage verdichtet sich allerdings eher zunehmend zugunsten einer proangiogenetischen Funktion von ASCs. Durch parakrine Signale helfen sie dem Fetttransplantat lokal bei der Neoangiogenese und somit dabei die initiale Ischämie bis zur Einheilung zu überstehen [47, 48].

In der aktuellen Literatur häufen sich Hinweise, dass sich einige Liposuctionsmethoden, wie z. B. LAL, schädlich auf die ASC-Funktionen auswirken [28]. Neuere Methoden, wie die Tissue Liquification Technik, wurden nur unzureichend in Bezug auf deren Effekt auf ASCs beleuchtet [31]. Die an Popularität zunehmende UAL-Technik wurde bereits hinsichtlich Impact auf das regenerative Potential der ASCs mit SAL ASCs verglichen und zeigte eine gleichwertige Viabilität und zelltherapeutische Funktionalität von ASCs [37]. Die therapeutische Wirkung entfalten ASCs durch die Sekretion einer Vielzahl von pro-regenerativen Faktoren, wie pro-angiogenetische und immunmodulierende Zytokine (MCP1 VEGF, etc.), wodurch sie in die Regelkreisläufe umliegender Zellen eingreifen können. Studien zeigten, dass dieses, für die therapeutischen Fähigkeiten so entscheidende, Zytokin-Profil durch mechanische Manipulation verändert werden kann [49, 50]. Bei allen Arten der Liposuction sind die Zellen signifikanten mechanischen Belastungen ausgesetzt, was potentiell Zellfunktionen beeinflusst. Deshalb ist einerseits eine möglichst minimale Manipulation der Zellen, durch Liposuctions-sowie durch Aufbereitungsmaßnahmen, und andererseits eine Geschlossenheit des Liposuction-Injektions-Systems essentiell [51, 52]. Laut Konsensus der Deutschen Gesellschaft der Plastischen und Rekonstruktiven Chirurgie (DGPRÄC) beinhaltet die minimale Manipulation Schneiden, Zentrifugieren, Filtern, Separieren, Konzentrieren und das Reinigen im Operationsaal [2]. Die Nutzung eines möglichst minimal manipulativen Verfahrens ist für die Zulassung von automatisierten Methoden zur Zellgewinnung aus Fettgewebe Voraussetzung. Auch für die klinische Anwendung von Zellpräparaten ist es wichtig sicherzustellen, dass durch Manipulationen während Gewinnung und Aufbereitung von Progenitorzellen deren Möglichkeit zur Onkogenität möglichst hintangehalten wird.

Hinsichtlich der Expression der Zytokine HGF, VEGF, FGF-1 und SDF-1 konnten keine Unterschiede zwischen SAL, UAL und Abdominoplastik-ASCs nachgewiesen werden. Nur MCP-1 zeigte eine signifikant höhere Expression in aus UAL-Proben gewonnenen ASCs. MCP-1, auch bekannt als CCL-2, wird eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl von sowohl physiologischen als auch potentiell pathologischen Zellsignalwegen zugeschrieben. Neben der schon früh erforschten und namensgebenden Eigenschaft, als chemotaktisches Molekül für Monozyten, T-Helfer-Zellen und Natürlichen Killer Zellen zu wirken und damit der Fähigkeit, maßgeblich die körpereigene

Entzündungsantwort zu steuern [53], zeigen aktuelle Publikationen eine Funktion sowohl in Wundheilung, als auch in der Entstehung von Fibrose und hypertrophen Narben [54–56]. Andere Studien zeigen gar eine signifikante Verlängerung der Wundheilung bei Fehlen von MCP-1 [57]. Ob und in wie fern eine vermehrte Expression von MCP-1 in UAL ASCs einen Vorteil für die Anwendung solcher Zellen für Wundheilungsapplikationen bringen würde, muss erst in gesonderten Studien untersucht werden.

Nicht nur die Liposuctionsmethode, sondern auch die individuelle Variabilität der Patienten kann Einfluss auf die klinische Einsetzbarkeit autologer ASCs haben [58]. So wurden zahlreiche Patienten-bezogene Faktoren beschrieben, die das regenerative Potential von ASCs reduzieren. Bei z. B. alten Patienten oder Patienten mit Diabetes ist der therapeutische Nutzen von autologem Zellmaterial durch eine deutlich verringerte regenerative Zytokinexpression stark limitiert [59, 60]. Auf Grund der Tatsache, dass vor allem alte Patienten mit diabetischen Wunden von Zelltherapien für regenerative Zwecke profitieren würden, entfernt sich so mancher Versuchsaufbau von der klinischen Praxis. Das in dieser Arbeit verwendete Studiendesign, in dem an ein und demselben Patienten vorerst eine Fettabsaugung durch zwei unterschiedliche Methoden (SAL und UAL) und danach eine Abdominoplastik durchgeführt wird, ermöglicht es den Probanden als deren eigene Kontrolle zu dienen. Somit können nicht nur die bereits nachgewiesenen beeinflussenden Faktoren als potentielle Parameter für vermindertes regeneratives Potential, sondern auch eventuell noch nicht als signifikant erwiesene individuelle Einflüsse ausgeschlossen werden, was die hier präsentierten Daten auf eine solidere Basis stellt.

Conclusio

UAL stellt bezüglich Einfluss auf das ASC Expressionsprofil von Schlüsselzytokinen der Gewebserneuerung eine mit SAL vergleichbare Methode dar. Sowohl UAL als auch SAL Lipoaspirate sind geeignet zur Gewinnung von funktionellen ASCs vergleichbar mit minimal manipulierten Zellen aus Abdominoplastikresektaten.

Interessenkonflikt

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Danksagung

Die Autoren danken Dr. Geoffrey Gurtner, Dr. Michael Longaker und Dr. Derrick Wan für die anhaltende Unterstützung.

Über die Autoren



Dr. Matthias Aitzetmüller

geboren am 12.04.1993 in Österreich studierte er Medizin in Wien. Nach Abschluss des Studiums (Juli 2016) in Mindestzeit mit ausgezeichnetem Erfolg begann er das PhD Studium „Medical Life Science and Technology“ and der TU München an der Abteilung für Experimentelle Plastische Chirurgie (Leitung: Dr. Dominik Duscher).

Seine wissenschaftlichen Schwerpunkte liegen in der angewandten regenerativen Medizin. Gemeinsam mit seiner Arbeitsgruppe versucht Matthias Aitzetmüller den Brückenschlag zwischen Basiswissenschaft und klinischer Medizin und beschäftigt sich mit adulten Stammzellen und Biomaterialien.

Literatur

- [1] Duscher D, Barrera J, Wong VW et al. Stem Cells in Wound Healing: The Future of Regenerative Medicine? A Mini-Review. *Gerontology* 2016; 62: 216–25
- [2] Giunta RE, Horch RE, Prantl L et al. [Consensus of the Deutsche Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen (DGPRAC) on Autologous Fat Grafting]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefäße* 2016; 48: 337–9
- [3] Zhu M, Zhou Z, Chen Y et al. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Annals of plastic surgery* 2010; 64: 222–8
- [4] Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM. Adipose-derived stromal cells – their utility and potential in bone formation. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity* 2000; 24 Suppl 4: S41–4
- [5] Safford KM, Hicok KC, Safford SD et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2002; 294: 371–9
- [6] Rangappa S, Fen C, Lee EH et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *The Annals of thoracic surgery* 2003; 75: 775–9
- [7] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279–95
- [8] Goepfert C, Slobodianski A, Schilling AF et al. Cartilage engineering from mesenchymal stem cells. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2010; 123: 163–200
- [9] Karagianni M, Kraneburg U, Kluter H et al. [Autologous fat grafts and supportive enrichment with adipose tissue stromal cells]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefäße* 2013; 45: 93–8
- [10] Thesleff T, Lehtimäki K, Niskakangas T et al. Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: a novel method for cranial reconstruction. *Neurosurgery* 2011; 68: 1535–40
- [11] Yoshimura K, Sato K, Aoi N et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]* 2008; 34: 1178–85
- [12] Diez-Tejedor E, Gutierrez-Fernandez M, Martinez-Sanchez P et al. Reparative therapy for acute ischemic stroke with allogeneic mesenchymal stem cells from adipose tissue: a safety assessment: a phase

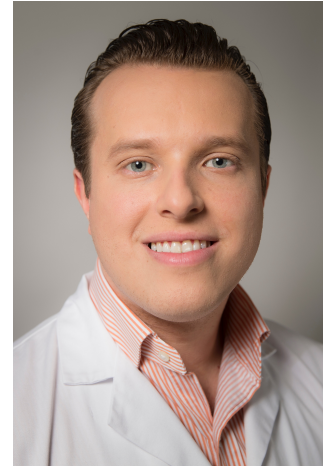
- II randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, pilot clinical trial. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases: the official journal of National Stroke Association* 2014; 23: 2694–700
- [13] Bura A, Planat-Benard V, Bourin P et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy* 2014; 16: 245–57
- [14] Largo RD, Tchang LA, Mele V et al. Efficacy, safety and complications of autologous fat grafting to healthy breast tissue: a systematic review. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS* 2014; 67: 437–48
- [15] Rigotti G, Marchi A, Stringhini P et al. Determining the oncological risk of autologous lipoaspirate grafting for post-mastectomy breast reconstruction. *Aesthetic plastic surgery* 2010; 34: 475–80
- [16] Zimmerlin L, Donnenberg AD, Rubin JP et al. Regenerative therapy and cancer: in vitro and in vivo studies of the interaction between adipose-derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates. *Tissue engineering Part A* 2011; 17(1–2): 93–106
- [17] Brenelli F, Rietjens M, De Lorenzi F et al. Oncological safety of autologous fat grafting after breast conservative treatment: a prospective evaluation. *The breast journal* 2014; 20: 159–65
- [18] Agha RA, Fowler AJ, Herlin C et al. Use of autologous fat grafting for breast reconstruction: a systematic review with meta-analysis of oncological outcomes. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS* 2015; 68: 143–61
- [19] Claro F, Figueiredo J, Zampar A et al. Applicability and safety of autologous fat for reconstruction of the breast. *British Journal of Surgery* 2012; 99: 768–80
- [20] Astori G, Vignati F, Bardelli S et al. “In vitro” and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *Journal of translational medicine* 2007; 5: 55
- [21] Gentile P, Scioli MG, Orlandi A et al. Breast Reconstruction with Enhanced Stromal Vascular Fraction Fat Grafting: What Is the Best Method? *Plastic and reconstructive surgery Global open* 2015; 3: e406
- [22] Zhu M, Heydarkhan-Hagvall S, Hedrick M et al. Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. *Journal of visualized experiments: JoVE* 2013; 79: e50585
- [23] Kosaraju R, Rennert RC, Maan ZN et al. Adipose-Derived Stem Cell-Seeded Hydrogels Increase Endogenous Progenitor Cell Recruitment and Neovascularization in Wounds. *Tissue engineering Part A* 2016; 22(3–4): 295–305
- [24] Garg RK, Rennert RC, Duscher D et al. Capillary force seeding of hydrogels for adipose-derived stem cell delivery in wounds. *Stem Cells Transl Med* 2014; 3: 1079–89
- [25] Walmsley GG, Atashroo DA, Maan ZN et al. High-Throughput Screening of Surface Marker Expression on Undifferentiated and Differentiated Human Adipose-Derived Stromal Cells. *Tissue engineering Part A* 2015; 21(15–16): 2281–91
- [26] Walmsley GG, Senarath-Yapa K, Wearda TL et al. Surveillance of Stem Cell Fate and Function: A System for Assessing Cell Survival and Collagen Expression In Situ. *Tissue engineering Part A* 2016; 22(1–2): 31–40
- [27] Ross RJ, Shayan R, Mutimer KL et al. Autologous fat grafting: current state of the art and critical review. *Annals of plastic surgery* 2014; 73: 352–7
- [28] Chung MT, Zimmermann AS, Paik KJ et al. Isolation of human adipose-derived stromal cells using laser-assisted liposuction and their therapeutic potential in regenerative medicine. *Stem cells translational medicine* 2013; 2: 808–17
- [29] Faltus T. [Legal Framework of Autologous Fat Usage in Point-of-Care Treatments in Plastic and Aesthetic Surgery – Risks of Criminal Prosecution and Infringement of Medical Law Due to Pharmaceutical Regulations]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie; Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefässe* 2016; 48: 219–25
- [30] Shridharani SM, Broyles JM, Matarasso A. Liposuction devices: technology update. *Medical devices* 2014; 7: 241–51
- [31] Dolen U, Cohen JB, Overschmidt B et al. Fat grafting with tissue liquefaction technology as an adjunct to breast reconstruction. *Aesthetic Plastic Surgery* 2016; 40: 854–62
- [32] Sterodimas A, Boriani F, Magarakis E et al. Thirtyfour years of liposuction: past, present and future. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012; 16: 393–406
- [33] Berry MG, Davies D. Liposuction: a review of principles and techniques. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS* 2011; 64: 985–92
- [34] de Souza Pinto EB, Abdala PC, Maciel CM et al. Liposuction and VASER. *Clin Plast Surg* 2006; 33: 107–15, vii
- [35] Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation 2009
- [36] Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discovery medicine* 2011; 11: 160–70
- [37] Duscher D, Atashroo D, Maan ZN et al. Ultrasound-assisted liposuction does not compromise the regenerative potential of adipose-derived stem cells. *Stem cells translational medicine* 2016; 5: 248–57
- [38] Januszyk M, Rennert RC, Sorkin M et al. Evaluating the Effect of Cell Culture on Gene Expression in Primary Tissue Samples Using Microfluidic-Based Single Cell Transcriptional Analysis. *Microarrays* 2015; 4: 540–50
- [39] Suga H, Matsumoto D, Eto H et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem cells and development* 2009; 18: 1201–10
- [40] Duscher D, Luan A, Rennert RC et al. Suction assisted liposuction does not impair the regenerative potential of adipose derived stem cells. *Journal of translational medicine* 2016; 14: 126
- [41] Abdelal MM, Aboelatta YA. Comparison of Blood Loss in Laser Lipolysis vs Traditional Liposuction. *Aesthet Surg J* 2014; 34: 907–12
- [42] Zoccali G, Orsini G, Scandura S et al. Multifrequency ultrasound-assisted liposuction: 5 years of experience. *Aesthetic Plast Surg* 2012; 36: 1052–61
- [43] Theodorou SJ, Paresi RJ, Chia CT. Radiofrequency-assisted liposuction device for body contouring: 97 patients under local anesthesia. *Aesthetic Plast Surg* 2012; 36: 767–79
- [44] Ahmad J, Eaves FF, Rohrich RJ et al. The American Society for Aesthetic Plastic Surgery (ASAPS) survey: current trends in liposuction. *Aesthetic Surgery Journal* 2011; 31: 214–24
- [45] Rigotti G, Marchi A, Galie M et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plastic and reconstructive surgery* 2007; 119: 1409–22
- [46] Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109: 656–63
- [47] Suga H, Glotzbach JP, Sorkin M et al. Paracrine mechanism of angiogenesis in adipose-derived stem cell transplantation. *Annals of plastic surgery* 2014; 72: 234–41
- [48] Garza RM, Rennert RC, Paik KJ et al. Studies in fat grafting: Part IV. Adipose-derived stromal cell gene expression in cell-assisted lipotransfer. *Plast Reconstr Surg* 2015; 135: 1045–55
- [49] Blaber SP, Webster RA, Hill CJ et al. Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *Journal of translational medicine* 2012; 10: 172
- [50] Ingber DE. Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Annals of medicine* 2003; 35: 564–77

- [51] Giunta R, Horch R, Prantl L et al. Konsensus der Deutschen Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen (DGPRÄC) zur Eigenfett-Transplantation. *Handchirurgie- Mikrochirurgie- Plastische Chirurgie* 2016; 48: 337–9
- [52] Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES et al. Taking stem cells beyond discovery: a milestone in the reporting of regulatory requirements for cell therapy. *Stem cells and development* 2011; 20: 1295–6
- [53] Dai X, Liu J, Zheng H et al. Nano-formulated curcumin accelerates acute wound healing through Dkk-1-mediated fibroblast mobilization and MCP-1-mediated anti-inflammation. *NPG Asia Materials* 2017; 9: e368
- [54] Wong VW, Rustad KC, Akaishi S et al. Focal adhesion kinase links mechanical force to skin fibrosis via inflammatory signaling. *Nature medicine* 2011; 18: 148–52
- [55] Wynn T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology* 2008; 214: 199–210
- [56] Bottazzi B, Polentarutti N, Acero R et al. Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants. *Science (New York, NY)* 1983; 220: 210–2
- [57] Low QE, Drugea IA, Duffner LA et al. Wound healing in MIP-1 α -/- and MCP-1-/- mice. *The American journal of pathology* 2001; 159: 457–63
- [58] Prantl L, Rennekampff HO, Giunta RE et al. [Current Perceptions of Lipofilling on the Basis of the New Guideline on "Autologous Fat Grafting"]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefäße* 2016; 48: 330–6
- [59] Duscher D, Rennert RC, Januszyk M et al. Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells. *Sci Rep* 2014; 4: 7144
- [60] Rennert RC, Sorkin M, Januszyk M et al. Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose-derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5: 79

Curriculum Vitae inklusive Publikationsliste

CURRICULUM VITAE

DOMINIK DUSCHER M.D.



DoB: 21.02.1987

A: Einsteinstr. 133, 81675 Munich, Germany

T: +4369912637124

E: dominikduscher@me.com

EDUCATION

Medical Doctor (Dr.med.univ.)

Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Oct 2006 – Aug 2012

Harvard Medical School, Boston, USA

Nov 2011 – Jan 2012

UCL Medical School, University College London, London, UK

Feb 2011 – Aug 2011

Facoltà di Medicina dell' Università Sapienza di Roma, Rome, Italy

Oct 2010 – Jan 2011

Thesis: *Cutaneous innervation of the ankle: an anatomical study with clinical implications*

Grade: EXCELLENT (1); American Association of Anatomists AWARD, Experimental Biology 2013

Overall Grade Point Average: 1.42 (1 = excellent)

CLINICAL Experience

Resident Plastic Surgery

Mar 2017 – present

Klinikum rechts der Isar, Technical University Munich, Germany

Resident Plastic Surgery

Apr 2015 – Feb. 2017

Kepler University Hospital, Linz, Austria

Resident Plastic Surgery

Dec 2012 – Jan 2013

Institute for Plastic Surgery, Vienna, Austria

RESEARCH Experience

Director of the Division for Experimental Plastic Surgery

Mar 2017 – present

Technical University Munich, Germany

Head of laboratory with 5 work groups and > 20 members. Advanced biomaterial solutions for wound healing and anti-scarring therapy. Clinical translation of applied regenerative medicine.

Director of Plastic Surgery Research

Apr 2015-Feb 2017

Johannes Kepler University, Linz, Austria (Prov. Doz. Dr. Georg M. Huemer)
Optimization of cell based therapeutics and clinical outcome research.

Postdoctoral Fellow

Jan 2013 – Mar 2015

Hagey Laboratory for Regenerative Medicine, Stanford University, CA, USA (Prof. Geoffrey Gurtner MD, FACS)
Research focused on stem cell and biomaterial enhanced regenerative medicine. Characterization of stem cell populations by microfluidic based single cell transcriptomics in the setting of diabetes and aging.

Research Fellow

Sep 2008 – Dec 2012

Center for Anatomy and Cell-Biology

Medical University of Vienna (Univ.lekt. Mag. Dr. Lena Hirtler, Dr. Manfred Schmidt)
Investigation of the blood supply of perforator flaps of the abdominal wall and the extremities. Studies on cutaneous innervation and ligamentous suspension of the ankle region.

BUSINESS Experience

Co-Founder, Managing Partner and Head of R&D

Aug 2016 – present

Tomorrowlabs GmbH, Vienna, Austria
Biotech company with a focus on regenerative and aesthetic medicine therapeutics. Development and distribution of cosmeceuticals.

INTERNATIONAL Experience

Plastic and Reconstructive Surgery

Jan 2012 – Feb 2012

New York-Presbyterian Hospital, **Weill Cornell Medical College**, NY, USA

Neurological Traumatology

Sep 2011

Trauma Clinic Bergmannsheil, **Ruhr Universität Bochum**, Germany

Plastic and Reconstructive Surgery

Jul 2011

Instituto Ivo Pitanguy, **Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, Brazil

Cleft Lip and Palate Surgery

Apr 2011

Addenbrooks Hospital, **University of Cambridge**, Cambridge, UK

Hand- and Microsurgery

Aug 2010

Huashan Hospital, **Fudan University Shanghai**, China

Plastic and Maxillofacial Surgery

Jun 2010

Hospital Clinic, **Universitat de Barcelona**, Spain

Vascular Surgery

Jul 2009

Universitätsklinikum Heidelberg, **Ruprecht-Karls-University Heidelberg**, Germany

AWARDS/SCHOLARSHIPS/HONORS

| | |
|---|-------------------------------------|
| Presentation Award of the European Plastic Surgery Research Council 2014 | 2014 |
| <i>'Impaired regenerative ability of aged and diabetic ASCs is caused by depletion of cell subpopulations'</i> | |
| Presentation Award of the German Society of Plastic Surgery 2014 | 2014 |
| <i>'The reduced regenerative potential of aged and diabetic adipose derived stem cells is caused by a disruption of cell subpopulation dynamics'</i> Winner out of >200 presentations | |
| Travel Award of the German Society of Plastic Surgery 2014 | 2014 |
| 'A transdermal drug delivery system for deferoxamine improves the healing of acute and prevents the occurrence of chronic diabetic wounds' | |
| Scholarship for International Communication | 2014 |
| Awarded by the Austrian Science Foundation (ÖFG) | |
| Best Paper of the Plastic Surgery Research Council 2014, nominated | 2014 |
| <i>'SDF-1 Regulates Adipose Niche Homeostasis and Adipose Derived Stromal Cell Function'</i> | |
| Biomaterial Research Prize, Stanford University, CA, USA | 2013 |
| For outstanding interdisciplinary contribution to biomaterials research | |
| Travel Grant of the Austrian Office of Science and Technology | 2014, 2013 |
| Travel support awarded by the Austrian Embassy, DC, USA | |
| Award of the American Association of Anatomists, Experimental Biology Meeting 2013 | 2013 |
| <i>'Cutaneous innervation of the ankle: an anatomical study with clinical implications'</i> | |
| Langman Platform Presentation Award Finalist, Experimental Biology Meeting 2013 | 2013 |
| <i>'The vascular basis of perforator flaps of the upper abdominal wall'</i> ; Ranked Top 7 out of >200 presentations | |
| Excellence Scholarship (Leistungsstipendium) | 2012, 2011, 2010, 2008, 2007 |
| Stipend for outstanding grades during the academic year (MUV) | |
| Max Kade Traveling Scholarship of the American Austrian Foundation | 2011 |
| Stipend for travel expenses and tuition fee (Cornell University, USA) | |
| Student Research Promotion Stipend of the MUV for the Project | 2010 |
| <i>'Induction of Functional Angiogenesis by Biomatrix Associated Co-delivery of Growth Factors'</i> | |
| Eurasia Pacific Uninet Science and Technology Scholarship | 2010 |
| Stipend for travel expenses (Fudan University, China) | |
| Erasmus Mundus Scholarship for European Academic Exchange | 2010 |
| Monthly stipend to support european academic exchange (Sapienza, Roma) | |

TEACHING/MENTORING Experience

| | |
|---|----------------|
| Research Mentor for Graduate Students | 2016 – present |
| Technical University Munich, Germany | |
| Research Mentor for Undergraduate and Graduate Students | 2013 – present |
| Stanford University School of Medicine, CA, USA; Medical University Vienna, Austria | |
| Dissection Course Tutor | 2009 – 2012 |
| Institute for Systematic Anatomy, Medical University of Vienna | |
| Anatomy Instructor | 2009 |
| Graduate School for Biomedical Engineering Vienna, Austria | |
| Career Mentoring for Prospective and First Year Medical Students | 2009 – 2010 |
| Medical University of Vienna, Grammar School Schärding am Inn | |

SPECIAL Experience

General Secretary of the European Plastic Surgery Research Council

Microsurgery Training: Basic, Advanced and Hand; Charité **Berlin**, MAZ **Linz**, Fudan University **Shanghai**

MEMBERSHIPS

Member of the Plastic Surgery Research Council

Member of the European Plastic Surgery Research Council

PUBLICATIONS/PRESENTATIONS

Manuscripts Published/Accepted

1. *Comparison of the Iron Chelator Deferoxamine and the Hydroxylase Inhibitor DMOG in Diabetic and Aged Wound Healing*

Duscher D, Januszyk M, Maan ZN, Whittam AJ, Rennert RC, Shi Y, Hu MS, Walmsley GG, Whitmore AJ, Atashroo D, Butte A, Gurtner GC

Plastic and Reconstructive Surgery 2017 Mar;139(3):695e-706e. PMID: 28234841
2. *Barbed Sutures In Body Contouring - Technical Advances and Outcome Analysis of 495 Procedures in 439 Patients*

Duscher D, Schmidt, M, Gurtner GC, Huemer, GM

Aesthetic Plastic Surgery 2016 Dec;40(6):815-821. PMID: 27699462
3. *Suction assisted liposuction does not impair the regenerative potential of adipose derived stem cells.*

Duscher D, Luan A, Rennert RC, Atashroo DA, Maan ZN, Brett EA, Whittam AJ, Ho N, Lin M, Hu MS, Walmsley GG, Wenny R, Schmidt M, Schilling AF, Machens HG, Huemer GM, Wan DC, Longaker MT, Gurtner GC

Journal of Translational Medicine 2016 May 6;14(1):126. PMID: 27153799
4. *Ultrasound Assisted Liposuction does not Compromise the Regenerative Potential of Adipose Derived Stem Cells*

Duscher D*, Atashroo DA*, Maan ZN, Luan A, Brett EA, Barrera J, Khong SM, Zielins ER, Whittam AJ, Walmsley GG, Hu MS, Schmidt M, Schilling AF, Machens HG, Huemer GM, Wan DC, Longaker MT, Gurtner GC

Stem Cells Translational Medicine 2016 Feb;5(2):248-57. PMID: 26702129
5. *Extracellular Superoxide Dismutase Deficiency Impairs Wound Healing in Advanced Age by Reducing Neovascularization and Fibroblast Function*

Fujiwara T*, Duscher D*, Rustad K, Kosaraju R, Rodrigues M, Whittam AJ, Maan ZN, Januszyk M, Gurtner GC

Experimental Dermatology 2016 Mar;25(3):206-11. PMID: 26663425
6. *Fibroblast Specific Deletion of Hypoxia Inducible Factor-1 Critically Impairs Cutaneous Neovascularization and Wound Healing*

Duscher D*, Maan ZN*, Whittam AJ, Sorkin M, Hu MS, Walmsley GG, Baker H, Januszyk M, Wong VW, Gurtner GC

Plastic & Reconstructive Surgery 2015 Nov;136(5):1004-13. PMID: 26505703

7. *Stem Cells in Wound Healing: The Future of Regenerative Medicine?*
 Duscher D*, Barrera J*, Maan ZN, Whitam AJ, Wong VW, Januszyk M, Gurtner GC
 Gerontology 2016;62(2):216-25. PMID: 26045256

8. *Aging Diminishes The Neovascular Potential Of Adipose Derived Stem Cells And Disrupts Cell Subpopulation Dynamics.*
 Duscher D*, Rennert RC*, Januszyk M*, Anghel E, Maan ZN, Whittam AJ, Perez MG, Kosaraju, R, Hu MS, Walmsley GG, Rajadas J, Longaker MT, Gurtner GC
 Nature Scientific Reports 2014 Nov 21;4:7144. PMID: 25413454

9. *Transdermal Deferoxamine Prevents Pressure Induced Diabetic Ulcers.*
 Duscher D*, Neofytou E*, Wong VW, Maan ZN, Rennert RC, Januszyk M, Rodrigues M, Inayathullah M, Malkovskiy AV, Whitmore AJ, Walmsley GG, Galvez MG, Whittam AJ, Brownlee M, Rajadas J, Gurtner GC
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 2015 Jan 6;112(1):94-9. PMID: 25535360

10. *Exercise Induces SDF-1 Mediated Release of Endothelial Progenitor Cells with Increased Vasculogenic Function.*
 Duscher D*, Chang E*, Paterno J*, Maan ZN, Chen JS, Januszyk M, Rodrigues M, Rennert RC, Bishop S, Whitmore AJ, Whittam AJ, Longaker MT, Gurtner GC
 Plastic & Reconstructive Surgery 2015 Feb;135(2):340e-50e. PMID: 25626819

11. *Capillary Force Seeding of Hydrogels for Adipose Derived Stem Cell Delivery in Wounds.*
 Duscher D*, Garg RK*, Rennert RC*, Sorkin M, Kosaraju, R, Auerbach LJ, Lennon J, Chung MT, Paik P, Nimpf J, Rajadas J, Longaker MT, Gurtner GC
 Stem Cells Translational Medicine 2014 Sep;3(9):1079-1089. PMID: 25038246

12. *Mechanotransduction and Fibrosis.*
 Duscher D, Maan ZN, Wong VW, Rennert RC, Januszyk M, Rodrigues M, Hu M, Whitmore AJ, Whittam AJ, Longaker MT, Gurtner GC
 Journal of Biomechanics 2014. Jun 27;47(9):1997-2005. PMID: 24709567

13. *Cutaneous Innervation of the Ankle: an Anatomical Study with Clinical Implications.*
 Duscher D, Wenny R, Entenfellner J, Weninger P, Hirtler L
 Clinical Anatomy 2013 Dec 17. doi: 10.1002/ca.22347. PMID: 24323871

14. *A Faster Way of Steri-Strip Application - The 3 Finger Technique.*
 Duscher D, Apfolterer S, Gärner S, Worsieg A, Bartsch R
 Aesthetic Surgery Journal 2013.

15. *Rational Identification of Novel Surface Marker Profiles to Enhance Cell Based Therapies.*

Rennert RC*, Januszyk M*, Sorkin M*, Duscher D, Maan ZN, Whittam AJ, Findlay MW, Rodrigues M, Chung MT, Paik KJ, Glotzbach JP, Kosaraju R, Butte AJ, Gurtner GC
Nature Communications 2016, in press.

16. *Concomitant Liposuction Reduces Complications of Vertical Medial Thigh Lift in Massive Weight Loss Patients.*

Schmidt M, Pollhammer M, Januszyk M, Duscher D, Huemer GM
Plastic and Reconstructive Surgery 2016.

17. *Cell-Assisted Lipotransfer Improves Volume Retention in Irradiated Recipient Sites and Rescues Radiation-Induced Skin Changes.*

Luan A, Duscher D, Whittam AJ, Paik KJ, Zielins ER, Brett EA, Atashroo DA, Hu MS, Lee GK, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC.
Stem Cells. 2016 Mar;34(3):668-73. PMID: 26661694

18. *Evaluating the Effect of Cell Culture on Gene Expression in Primary Tissue Samples Using Microfluidic-Based Single Cell Transcriptional Analysis*

Januszyk M, Rennert RC, Sorkin M, Maan ZN, Wong LK, Whittam AJ, Whitmore A, Duscher D, Gurtner GC
Microarrays 2015, 4(4), 540-550; doi:10.3390/microarrays4040540

19. *Double-Loop Dermal Suture: A Technique for High-Tension Wound Closure.*

Pollhammer MS, Duscher D, Schmidt M, Aitzetmüller MM, Tschandl P, Froschauer SM, Huemer GM.
Aesthet Surg J. 2016 Apr;36(4):NP165-7. PMID: 26578748

20. *Murine Dermal Fibroblast Isolation by FACS.*

Walmsley GG, Maan ZN, Hu MS, Atashroo DA, Whittam AJ, Duscher D, Tevlin R, Marecic O, Lorenz HP, Gurtner GC, Longaker MT.
J Vis Exp. 2016 Jan 7;(107). PMID: 26780559

21. *The Role of Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair.*

Houshyar KS, Momeni A, Pyles MN, Cha JY, Maan ZN, Duscher D, Jew OS, Siemers F, van Schoonhoven J.
Plast Surg Int. 2016;2016:4175293. PMID: 26904282

22. *Derived Stem Cell-Seeded Hydrogels Enhance Neovascularization and Cutaneous Wound Closure via Increased Endogenous Progenitor Cell Recruitment and Functionality*

Kosaraju R, Rennert RC, Rodrigues M, Duscher D, Januszyk M, Rajadas J, Gurtner GC
Tissue Engineering 29016 Part A.

23. *Surveillance of Stem Cell Fate and Function: a System for Assessing Cell Survival and Collagen Expression in Situ*

Walmsley GG*, Senarath-Yapa S*, Wearda T, Menon S, Hu MS, Zielins ER, Duscher D, Maan ZN, Weissman IL, Gurtner GC, Lorenz HP, Longaker MT
Submitted to Tissue Engineering.

24. *A Rapid Crosslinking Injectable Hydrogel for Stem Cell Delivery, from Multifunctional Hyperbranched Polymers via RAFT Homopolymerization of PEGDA.*

Dong Y, Qin Y, Dubaa M, Killion J, Gao Y, Zhao T, Zhou D, Duscher D, Geever L, Gurtner GC, Wang W
Polymer Chemistry 2015, in press.

25. *Recent advances in microvascular autologous breast reconstruction after ablative tumor surgery.*

Pollhammer MS, Duscher D, Schmidt M, Huemer GM
World Journal of Clinical Oncology 2015, in press.

26. *Diffusion Tensor Tractography for the Surgical Management of Peripheral Nerve Sheath Tumors.*

Schmidt M, Kasparian G, Amann G, Duscher D, Aszmann OC
Neurosurgical Focus 2015, in press.

27. *Gigantic LCFA-SCIP mosaic flap for upper extremity reconstruction.*

Pollhammer MS, Duscher D, Maan ZN, Schmidt M, Huemer GM
Plastic and Reconstructive Surgery Global Open 2015, in press.

28. *High-Throughput Screening of Surface Marker Expression on Undifferentiated and Differentiated Human Adipose Derived Stem Cells.*

Walmsley GG, Atashroo DA, Maan ZN, Hu MS, Zielins ER, Tsai JM, Duscher D, Paik K, Tevlin R, Marecic O, Wan DC, Gurtner GC, Weissman IL, Longaker MT
Tissue Engineering Part A 2015, in press.

29. *Short Hairpin RNA Silencing of PHD-2 Improves Neovascularization and Functional Outcomes in Diabetic Wounds and Ischemic Limbs*

Paik KJ, Maan ZN, Duscher D, Morrison SD, Rennert RC, Sorkin M, Chung MT, Atashroo D, Hu MS, Li S, Senarath-Yapa K, McArdle A, Tevlin R, Zielins ER, Walmsley GG, Duldulao C, Wearda T, Marecic O, Wu JC, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC
PLOS One 2015, in press.

30. *Studies in Fat Grafting: Part V. Cell-Assisted Lipotransfer to Enhance Fat Graft Retention is Dose Dependent*

Paik KJ, Zielins ER, Atashroo D, Maan ZN, Duscher D, Luan A, Walmsley GG, Momeni A, Vistnes S, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC

Plastic & Reconstructive Surgery 2015, in press.

31. What Makes a Plastic Surgery Residency Program Attractive: An Applicant's Perspective

Atashroo D, Luan A, Vyas K, Zielins ER, Maan, ZN, Duscher D, Walmsley GG, Lynch MP, Davenport D, Wan DC, Longaker MT, Vasconez HC

Plastic & Reconstructive Surgery 2015, in press.

32. Impact of Surgical Innovation on Tissue Repair in the Surgical Patient

Tevlin R, Atashroo D, Duscher D, McArdle A, Gurtner GC, Wan DC, Longaker MT

British Journal of Surgery 2015 Jan;102(2):e41-55. PMID: 25627135

33. Opportunities and Challenges in Drug Delivery for Wound Healing.

Whittam AJ, Duscher D*, Maan ZN*, Wong VW, Rodrigues M, Januszyk M, Whitmore AJ, Gurtner GC

Advances in Wound Care 2016.

34. Live Fibroblast Harvest Reveals Surface Marker Shift in vitro.

Walmsley GG, Rinkevich Y, Hu MS, Montoro DT, Lo DD, McArdle A, Maan ZN, Morrison SD, Duscher D, Whittam AJ, Wong VW, Weissman IL, Gurtner GC, Longaker MT

Tissue Engineering Part C 2015 Mar;21(3):314-21. PMID: 25275778

35. Studies in Fat Grafting: Part IV. Adipose-derived stromal cell gene expression in cell assisted lipotransfer.

Garza RM, Rennert RC, Paik KJ, Atashroo D, Chung MT, Duscher D, Januszyk M, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC

Plastic & Reconstructive Surgery 2014, in press.

36. Scarless Wound Healing: Chasing the Holy Grail

Walmsley GG, Maan ZN, Wong VW, Duscher D, Hu MS, Zielins ER, Wearda T, Muhonen E, McArdle A, Wong VW, Lorenz HP, Gurtner GC, Longaker MT

Plastic & Reconstructive Surgery 2015 Mar;135(3):907-17. PMID: 25719706

37. Wound Healing: An Update.

Zielins ER, Atashroo D, Maan ZN, Duscher D, Walmsley GG, Hu MS, Marecic O, McArdle A, Senarath-Yapa K, Tevlin R, Wearda T, Paik KJ, Duldulao, Longaker MT

Regenerative Medicine 2014 9(6):817-30. PMID: 25431917

38. Murine Dorsal Ischemic Flap Model.

Hu MS*, Hong WX*, Rennert RC, Walmsley GG, Maan ZN, Duscher D, McArdle A, Zimmerman A, Chung MT, Lorenz HP, Gurtner GC, Longaker MT

Jove 2017, in press.

39. *Understanding Regulatory Pathways of Neovascularization in Diabetes*
Maan ZN, Rodrigues MR, Rennert RC, Whitmore AJ, Duscher D, Januszyk M, Hu MS, Whittam AJ, Davis CR, Gurtner GC
Expert Review of Endocrinology and Metabolism 2014 Sep, Vol. 9, No. 5 , Pages 487-501
40. *Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations.*
Rennert RC*, Sorkin M*, Januszyk M, Duscher D, Kosaraju R, Chung MT, Lennon J, Radiya-Dixit A, Raghvendra S, Maan ZN, Hu MS, Rajadas J, Rodrigues M, Gurtner GC
Stem Cell Research and Therapy 2014 Jun 18;5(3):79. PMID: 24943716
41. *The role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing.*
Hong WX*, Hu MS*, Esquivel M, Liang L, Rennert RC, McArdle A, Paik KJ, Duscher D, Gurtner GC, Lorenz HP, Longaker MTL
Advances in Wound Care 2014 May 1;3(5):390-399. PMID: 24804159
42. *Dimensions and Attachments of the Ankle Ligaments - Evaluation for Ligament Reconstruction.*
Wenny R, Duscher D, Meytap E, Weninger P, Hirtler L
Anatomical Sciences International 2014, in press. PMID: 24797869
43. *Diabetes Irreversibly Depletes Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cell Subpopulations.*
Januszyk M*, Sorkin M*, Glotzbach JP, Vial IN, Maan, ZN, Rennert RC, Duscher D, Thangarajah H, Longaker MT, Butte AJ, Gurtner GC
Diabetes 2014 Sep;63(9):3047-56. PMID: 24740572
44. *Non-Contact Low Frequency Ultrasound Therapy Enhances Neovascularization And Wound Healing In Diabetic Mice.*
Maan ZN, Januszyk M, Rennert RC, BA, Duscher D, Rodrigues M, Fujiwara T, Ho N, Whitmore AJ, Hu MS, Longaker MT, Gurtner GC
Plastic & Reconstructive Surgery 2014 Sep;134(3):402e-11e. PMID: 25158717
45. *Studies In Fat Grafting: Part III. Fat Grafting Irradiated Tissue: Improved Skin Quality And Decreased Fat Graft Retention.*
Garza RM, Paik KJ, Chung MT, Duscher D, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC
Plastic & Reconstructive Surgery 2014 Aug;134(2):249-57. PMID: 25068325
46. *Therapies for the Treatment of Cutaneous Wounds: Phase III and Launched Therapies.*
Rennert R, Rodrigues M, Wong V, Duscher D, Hu M, Maan Z, Sorkin M, Gurtner G, Longaker MT

Expert Opinion on Biological Therapy 2013 Nov;13(11):1523-41. PMID: 24093722

47. Perforator Flaps of the Upper Abdominal Wall.

Schmidt M, Tinhofer I, Duscher D, Huemer GM

Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery 2013 Sep 3. pii: S1748-6815(13)00502-0. PMID:
24074633

Manuscripts Under Revision

48. Delivery of Monocyte Lineage Cells in a Biomimetic Scaffold Enhances Tissue Repair

Walmsley GG*, Hu MS*, Weiskopf K, Duscher D, Rennert RC, Januszyk M, Maan ZN, Senarath-Yapa K, Tevlin R, Lorenz HP, Gurtner GC, Weissman IL, Longaker MT

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.

49. Age Associated Superoxide Dismutase Deficiency Impairs TGF- β 1 Mediated Myofibroblast Function During Wound Healing

Fujiwara T*, Maan ZN*, Whittam AJ, Duscher D, Gurtner GC

Submitted to Journal of Investigative Dermatology.

50. A Transdermal Deferoxamine Delivery System for the Treatment of Chronic Wounds Ready for Clinical Translation

Duscher D, Maan ZN*, Whittam AJ*, Barrera J*, Ho N, Inayathullah M, Malkovskiy AV, Wong VW, Hu MS, Walmsley GG, Atashroo A, Rajadas J, Gurtner GC

Submitted to Biomaterials.

51. Microvascular free flaps from the lower abdomen for preservation of amputation length in the lower extremity

Schmidt M, Duscher D, Pollhammer M, Huemer GM

Submitted to Microsurgery.

Books and Book Chapters

Biomechanics of Scar Formation.

Duscher D, Gurtner GC, Longaker MT

In 'The Scar Book: Formation, Mitigation, Rehabilitation and Prevention'. Krakowski AC and Shumaker PR. Wolters Kluwer, 2016

Correction of Gluteal Contour Deformities After Overaggressive Liposuction Utilizing the Deepithelialized Fasciocutaneous Infragluteal (FCI) flap.

Duscher D, Pollhammer MS, Huemer GM

In 'Liposuction'. Shiffman M. Springer 2015

The Keystone Island Flap in Lower Limb Reconstruction.

Findlay MW, Duscher D, Lee G

In 'The International Flap Manual'. Shokrollahi K, Whitaker I, Nahai F. Gazelle Distribution, 2013, ISBN: 1903378702.

Niere und Homöostase.

Duscher D, Wenny R

Maudrich Verlag, 2011, ISBN: 978-3-85175-959-4.

Patents

Verwendung von HIF-1 und HIF-1 α Aktivität verstärkenden Wirkstoffen in kosmetischen und/oder dermatologischen Zubereitungen.

Duscher D, Thor D

EU/PCT Patent Application # PCT/EP2015/025036

Efficient Stem Cell Delivery into Biomaterials using Capillary Driven Encapsulation

Duscher D, Rennert RC, Rajadas J, Gurtner GC

US Patent Application # S14-204/PROV

Oral Presentations International

1. *Prospective Selection Of Surface Marker Profiles Using Single Cell Analytics To Enhance Cell Based Therapies*

Duscher D, Rennert RC, Januszyk M, Maan ZN, Khong SM, Whittam AJ, Hu MS, Walmsley GG, Schmidt M, Huemer GM, Gurtner GC

Presented at the International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2015, Stockholm, Sweden.

2. *Characterization And Therapeutic Modulation Of A Dermal Lineage With Intrinsic Fibrogenic Potential*

Walmsley GG, Rinkevich Y, Hu MS, Maan ZN, Duscher D, Zielins ER, Lo DD, Gurtner GC, Lorenz HP, Weissman IL, Longaker MT

Presented at the International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2015, Stockholm, Sweden.

3. *Subpopulation Enrichment Enhances the Potential of Cell-Based Therapy for Diabetic Wounds*

Duscher D, Rennert RC, Januszyk M, Maan ZN, Whittam AJ, Rodrigues M, Findlay MW, Hu MS, Walmsley GG, Kosaraju R, Khong S, Atashroo D, Gurtner GC

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

4. *Transdermal Deferoxamine Prevents Pressure-Induced Diabetic Ulcers*

Duscher D, Maan ZN, Whittam AJ, Wong VW, Hu MS, Walmsley GG, Rennert RC, Rodrigues M, Whitmore AJ, Atashroo D, Zielins ER, Tevlin R, Barrera J, Rajadas J, Gurtner GC

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

5. *Progenitor Cell Recruitment to Injured Tissue is Critically Regulated by Endothelial Cell SDF1*

Maan ZN, Duscher D, Whittam AJ, Walmsley GG, Rennert RC, Januszyk M, Hu MS, Fischer LH, Vial IN, Ho N, Khong S, Zielins ER, Whitmore AJ, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

6. *Stem Cell Subpopulation Depletion in Bariatric Patients: A Novel Cause of Higher Morbidity/Mortality*

Findlay MW, Sorkin M, Rennert RC, Januszyk M, Than P, Rodrigues M, Maan ZN, Whittam AJ, Duscher D, Rivas H, Lorenz HP, Morton JM, Gurtner GC

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

7. *Macrophages from Visceral Adipose Tissue Contribute to the Onset of Insulin Resistance*

Rodrigues M, Whittam AJ, Sorkin M, Januszyk M, Kosaraju R, Rennert RC, McArdle A, Maan ZN, Duscher D, Gurtner GC

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

8. *Dipeptidyl peptidase-4 Inhibition Promotes Wound Healing in Murine Models of Type 1 and 2 Diabetes*

Whittam AJ, Maan ZN, Duscher D, Fischer LH, Ho N, Rodrigues M, Hu MS, Walmsley GG, Januszyk M, Barrera J, Whitmore AJ, Gurtner GC

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

9. *Adipose-Derived Stem Cell-Seeded Hydrogels Increase Progenitor Cell Recruitment and Functionality*

Kosaraju R, Rennert RC, Barrera J, Whittam AJ, Maan ZN, Rodrigues M, Duscher D, Januszyk M, Gurtner GC

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

10. *Tumor Stroma and Melanoma Progression Depends on Host Endothelial Cell Derived SDF-1*

Maan ZN, Hu MS, Whittam AJ, Fischer LH, Duscher D, Walmsley GG, Krampitz GW, Barrera J, Atashroo D, Rodrigues M, Whitmore AJ, Findlay MW, Lorenz HP, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

11. *Tumors and Wounds Compete for Circulating Progenitor Cells In Vivo*

Hu MS, Maan ZN, Hong WX, Walmsley GG, Rennert RC, Zhu T, Esquivel M, Atashroo D, Duscher D, Tevlin R, Zimmermann A, Chung MT, McArdle A, Gurtner GC, Lorenz HP, Giaccia A, Longaker MT

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

12. *Assessing ASC Regenerative Potential: Does Harvest Method Matter?*

Atashroo D, Brett EA, Duscher D, Maan ZN, Zielins ER, Paik K, Whittam AJ, Lin M, Luan A, McArdle A, Duldulao C, Walmsley GG, Hu MS, Tevlin R, Wan DC, Gurtner GC, Longaker MT

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

13. *Better Fat Transfer: The Specific Choices that Optimize Lipoaspirate Integrity*

Atashroo D, Wearda T, Raphael J, Paik K, Zielins ER, Walmsley GG, Hu MS, Senarath-Yapa K, Menon S, Luan A, Tevlin R, Duscher D, Maan ZN, Gurtner GC, Wan DC, Heilshorn S, Longaker MT

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

14. *Delivery of Monocyte Lineage Cells in a Biomimetic Scaffold Enhances Tissue Repair.*

Walmsley GG, Hu MS, Weiskopf K, Rennert RC, Januszyk M, Maan ZN, Duscher D, Senarath-Yapa K, Whittam AJ, Tevlin R, Atashroo D, Weissman IL, Lorenz HP, Gurtner GC

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

15. *Reducing Adult Scar Formation Through Targeted Inhibition of an Embryonic Fibroblast Lineage*

Walmsley GG, Rinkevich Y, Hu MS, Maan ZN, Tsai JM, Duscher D, Zielins ER, Lo DD, Gurtner GC, Lorenz HP, Weissman IL, Longaker MT

Presented at the Academic Surgical Congress 2015, Las Vegas, USA.

16. *Transdermal Drug Delivery of Deferoxamine Accelerates Healing and Improves Quality of Diabetic Wounds*

Duscher D, Maan ZN, Whittam AJ, Rodrigues M, Whitmore A, Davis CR, Walmsley GG, Hu MS, Rajadas J, Gurtner GC

Presented at the American College of Surgeons Annual Meeting 2014, San Francisco, USA.

17. *Reduced Regenerative Capacity of Aged Adipose Derived Stem Cells is Caused by Alterations of Cell Subpopulation Dynamics*

Duscher D, Rennert RC, Januszyk M, Maan ZN, Whittam AJ, Hu MS, Walmsley GG, Atashroo D, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the American College of Surgeons Annual Meeting 2014, San Francisco, USA.

18. *Endothelial Cell Derived Stromal-Derived Factor-1 (SDF-1) Regulates Neovascularization and Fibroblast Physiology in Response to Ischemia*

Maan ZN, Whittam AJ, Duscher D, Hu MS, Rennert RC, Fischer LH, Walmsley GG, Whitmore AJ, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the American College of Surgeons Annual Meeting 2014, San Francisco, USA. **Excellence in Research Award.**

19. *Organ-Level Autologous Tissue Engineering by Endothelium-Sparing Decellularization of the Groin Flap*

Findlay MW, Than P, Raghvendra S, Liu W, Duscher D, Gurtner GC

Presented at the American College of Surgeons Annual Meeting 2014, San Francisco, USA.

20. *Adipose-derived stromal cell gene expression in cell assisted lipotransfer.*

Garza RM, Rennert RC, Paik KJ, Atashroo D, Chung MT, Duscher D, Januszyk M, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC

Presented at the Plastic Surgery the Meeting 2014, Chicago, USA. **Best Research Presentation Award.**

21. *Adipose Derived Stromal Cells Obtained by Ultrasound Assisted Liposuction Versus Suction Assisted Liposuction: A Comparison of Their Regenerative Capacity.*

Atashroo D, Duscher D, Maan ZN, Zielins ER, Paik K, Whittam AJ, Lin M, McArdle A, Duldulao C, Walmsley GG, Hu MS, Tevlin R, Wan DC, Gurtner GC, Longaker MT

Presented at the Plastic Surgery the Meeting 2014, Chicago, USA.

22. *Impaired regenerative ability of aged and diabetic adipose derived stem cells is caused by depletion of cell subpopulations.*

Duscher D, Rennert RC, Januszyk M, Maan ZN, Whittam AJ, Rodrigues M, Walmsley GG, Hu MS, McArdle

A, Senarath-Yapa K, Atashroo D, Zielins ER, Tevlin R, Longaker MT, Gurtner GC
Presented at the European Plastic Surgery Research Council 2014, Hamburg, Germany. **Presentation Award.**

23. *Aging and diabetes impair the regenerative ability of adipose derived stem cells by a depletion of cell subpopulations.*

Duscher D, Rennert RC, Januszyk M, Maan ZN, Whittam AJ, Rodrigues M, Walmsley GG, Hu MS, McArdle A, Senarath-Yapa K, Atashroo D, Zielins ER, Tevlin R, Longaker MT, Gurtner GC
Presented at the Annual Meeting of the Swiss Society of Plastic Surgery 2014, Geneva, Switzerland.

24. *Selective Parenchymal Decellularization- A Novel Technique for High-Throughput Organ-Level Tissue Engineering.*

Findlay MW, Than P, Raghvendra S, Liu W, Duscher D, Gurtner GC
Presented at the Royal Australasian College of Surgeons Annual Scientific Congress 2014, Singapore.

25. *A Novel Transdermal Delivery System Increases The Efficacy Of Deferoxamine In A Murine Wound-Healing Model.*

Duscher D, Maan ZN, Whittam AJ, Perez MG, Rennert RC, Januszyk M, Liu W, Whitmore AJ, Rodrigues M, Davis CR, Rajadas J, Longaker MT, Gurtner GC
Presented at the Wound Healing Society Meeting 2014, Orlando, USA. **Young Investigator Award.**

26. *Aging Impairs The Neovascular Potential Of Adipose Derived Stem Cells And Selectively Depletes Cellular Subpopulations.*

Duscher D, Anghel E, Rennert RC, Maan ZN, Januszyk M, Whittam AJ, Rodrigues M, Than P, Atashroo D, Hu M, Lin M, Rajadas J, Longaker MT, Gurtner GC
Presented at the Wound Healing Society Meeting 2014, Orlando, USA.

27. *Overexpression Of Hif-1a Enhances Wound Healing Capability Of Adipose Derived Stem Cells And Decreases Distal Flap Necrosis.*

Hong W, Hu MS, Rennert RC, Morrison SD, Chung MT, Esquivel M, Duscher D, Zimmermann AS, Rajadas J, Paik KJ, Gurtner GC, Giaccia AJ, Lorenz HP, Longaker MT
Presented at the Wound Healing Society Meeting 2014, Orlando, USA.

28. *Endothelial Cell Derived Sdf-1 Regulates Neovascularization During Wound Healing.*

Maan ZN, Whittam AJ, Rennert RC, Duscher D, Rodrigues M, Than P, Davis CR, Walmsley GG, Longaker MT, Gurtner GC
Presented at the Wound Healing Society Meeting 2014, Orlando, USA.

29. *Adipose Derived Stromal Cell Function Is Regulated By Sdf-1.*

Maan ZN, Rennert RC, Duscher D, Whittam AJ, Paik KJ, Rodrigues M, Fujiwara T, Hu MS, Walmsley GG, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the Wound Healing Society Meeting 2014, Orlando, USA.

30. Comparison Of Therapeutic Adipose-Derived Stem Cell Delivery Methods For The Treatment Of Cutaneous Wounds.

Hu MS, Hong W, Rennert RC, Esquivel M, Chung MT, Zimmermann AS, Duscher D, McArdle A, Walmsley GG, Gurtner GC, Longaker MT, Lorenz HP

Presented at the Wound Healing Society Meeting 2014, Orlando, USA.

31. Aging Diminishes Adipose Derived Stem Cell Neovascular Potential and Disrupts Cell Subpopulation Dynamics.

Duscher D, Rennert RC, Januszyk M, Anghel E, Maan ZN, Whittam AJ, Rodrigues M, Than P, Atashroo D, Hu MS, Rajadas J, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the 7th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2014, Stanford, USA.

32. Global and Endothelial Cell Specific Deletion of SDF-1 Results in Delayed Wound Healing.

Maan ZN, Whittam AJ, Rennert RC, Duscher D, Walmsley GG, Rodrigues M, Hu MS, Than P, Davis CR, Paik K, Whitmore AJ, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the 7th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2014, Stanford, USA. **Best Paper Award.**

33. Overexpression of HIF-1 α Enhances the Therapeutic Effects of Adipose Derived Stem Cells and Decreases Distal Flap Necrosis.

Hong WX, Hu MS, Rennert RC, Morrison SD, Chung MT, Esquivel M, Duscher D, Zimmermann AS, Paik KJ, Gurtner GC, Giaccia AJ, Lorenz HP, Longaker MT

Presented at the 7th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2014, Stanford, USA.

34. Identification of an Adult Endothelial Progenitor Cell of Hematopoietic Origin Using Single Cell Microfluidics.

Rodrigues M, Rennert RC, Januszyk M, Sorkin M, Maan ZN, Whittam AJ, Duscher D, Gurtner GC

Presented at the 7th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2014, Stanford, USA.

35. Characterization of the Endothelial Progenitor Cell from Adult Tissue using Vav/Cre RFP-GFP Murine Model and Single Cell Microfluidics.

Rodrigues M, Rennert RC, Bishop S, Januszyk M, Maan ZN, Sorkin M, Duscher D, Gurtner GC

Presented at the Plastic Surgery Research Council 2014, NYC, USA.

36. SDF-1 Regulates Adipose Niche Homeostasis and Adipose Derived Stromal Cell Function.

Maan ZN, Rennert RC, Duscher D, Januszyk M, Paik KJ, Chung MT, Fujiwara T, Rodrigues M, Ho N, Baker H, Perez MG, Hu MS, Sorkin M, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the Plastic Surgery Research Council 2014, NYC, USA. **Best Paper Award Finalist.**

37. *Global and Endothelial Cell Specific Deletion of SDF-1 Results in Delayed Wound Healing.*

Maan ZN, Ho N, Rennert RC, Duscher D, Sorkin M, Rodrigues M, Chen JS, Vial IN, Januszyk M, Findlay M, Hu MS, Walmsley GG, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the Plastic Surgery Research Council 2014, NYC, USA. **Best Paper Award Finalist.**

38. *Short Hairpin RNA Interference Therapy for Diabetic Murine Wound Closure and Hindlimb Ischemia.*

Paik KJ, Rennert RC, Chung MT, Sorkin M, Duscher D, Atashroo D, Chen HH, Morrison SD, Zimmermann AS, Nauta A, Ko SH, Tevlin R, Zielins E, Hu MS, McArdle A, Walmsley GG, Senarath-Yapa K, Hong W, Garza RM, Duldulao C, Wearda T, Momeni A, Wu JC, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC

Presented at the Plastic Surgery Research Council 2014, NYC, USA.

39. *Not All Fat is the Same: A Comparison of the Functionality and Transcriptional Profiles of Adipose-Derived Stem Cells From the Subcutaneous and Visceral Compartments.*

Duscher D, Rennert RC, Perez MG, Sorkin M, Maan ZN, Januszyk M, Rodrigues M, Baker H, Kosaraju R, Gurtner GC

Presented at the Academic Surgical Congress 2014, San Diego, USA.

40. *SDF-1 Mediated Endothelial Cell-Stromal Interactions Regulate the Adipose Niche Microenvironment.*

Maan ZN, Rennert RC, Duscher D, Chung MT, Paik K, Fujiwara T, Rodrigues M, Ho N, Perez MG, Sorkin M, Hu M, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the Academic Surgical Congress 2014, San Diego, USA.

41. *Endothelial Cell Production of SDF-1 Critically Regulates Cytokine Expression and Neovascularization during Wound Healing.*

Maan ZN, Rennert RC, Ho N, Duscher D, Sorkin M, Rodrigues M, Chen JS, Vial N, Perez MG, Findlay M, Gurtner GC

Presented at the Academic Surgical Congress 2014, San Diego, USA.

42. *Comparison of Therapeutic Adipose-Derived Stem Cell Delivery Methods for the Treatment of Cutaneous Wounds.*

Esquivel M, Hu MS, Hong W, Rennert RC, Chung MT, Zimmermann AS, Rajadas J, Duscher D, McArdle A, Walmsley GG, Gurtner GC, Longaker MT, Lorenz HP

Presented at the Academic Surgical Congress 2014, San Diego, USA.

43. *Endothelial Cell Production of SDF-1 Promotes Progenitor Cell Recruitment and Wound Healing.*

Maan Z, Rennert RC, Sorkin M, Rodrigues M, Duscher D, Findlay M, Gurtner GC

Presented at the British Association of Plastic and Aesthetic Surgeons Winter Meeting 2013, Dublin, Ireland.

44. The Vascular Basis of Perforator Flaps of the Upper Abdominal Wall: An Anatomical Study.

Duscher D, Schmidt M, Tinhofer I, Huemer GM

Presented at the Experimental Biology Meeting 2013, Boston, USA; **Langman Platform Award Finalist.**

45. Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Seeded Within a Biomimetic Hydrogel Scaffold Upregulate Pro-Angiogenic Cytokine Expression and Accelerate Wound Closure.

Duscher D, Garg R, Rennert RC, Sorkin M, Chung MT, Kosaraju R, Rajadas J, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the 6th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2013, Palo Alto, USA.

46. Characterisation of Human Adipose Derived Stem Cells Using Single Cell Transcriptional Analysis Identifies a Functionally Distinct Subpopulation.

Sorkin M, Rennert RC, Januszyk M, Duscher D, Chung MT, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the 6th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2013, Palo Alto, USA.

47. Diabetic Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Display Functional Impairments in the Setting of a Regenerative Biomimetic Hydrogel Scaffold.

Rennert RC, Sorkin M, Januszyk M, Duscher D, Chung MT, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the 6th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2013, Palo Alto, USA.

48. Global and Endothelial cell Specific Deletion of SDF-1 Results in Delayed Wound Healing.

Maan Z, Chen JS, Vial IN, Rennert RC, Sorkin M, Rustad K, Findlay M, Duscher D, Rodrigues M, Gurtner GC

Presented at the 6th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2013, Palo Alto, USA.

49. Chemotherapeutic Treatment of Respiratory Infections in the ICU.

Izzo L, Duscher D, Caputo M, Pugliese F

Presented at the International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine 2010, Brussels, Belgium.

Oral Presentations National

1. *Selektion einer pro-angiogenetischen Subpopulation verstärkt das Potential von Adipose Derived Stem Cells für die Therapie von diabetischen Wunden*

Duscher D, Rennert RC, Januszyk M, Maan ZN, Whittam AJ, Rodrigues M, Walmsley GG, Hu MS, Atashroo D, Zielins ER, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the Joint Annual Meeting of the German and Austrian Society of Plastic Surgery 2014, Munich, Germany. **Presentation Award Winner.**

2. *Ein Transdermales Arzneimittelabgabesystem für Deferoxamin Verbessert die Heilung Akuter und Reduziert das Auftreten Chronischer Diabetischer Wunden*

Duscher D, Maan ZN, Whittam AJ, Rennert RC, Walmsley GG, Hu MS, Atashroo D, Zielins ER, Rajadas J, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the Joint Annual Meeting of the German and Austrian Society of Plastic Surgery 2014, Munich, Germany. **Travel Award Winner.**

3. *Anatomische Grundlagen der Perforator basierten medialen Oberarmklappenplastik.*

Tinhofer I, Duscher D, Weninger WJ, Huemer GM, Schmidt M

Presented at the Annual Meeting of the Austrian Society of Plastic Surgery 2013, Velden, Austria.

4. *Perforatorklappen der oberen Bauchwand - eine anatomische Studie.*

Schmidt M, Tinhofer I, Duscher D, Frey M

Presented at the Annual Meeting of the Austrian Society of Plastic Surgery 2012, Linz, Austria.

Posters

1. *Fat Grafting Irradiated Tissue: Improved Skin Quality And Decreased Fat Graft Retention*

Garza RM, Paik KJ, Chung MT, Duscher D, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC

Presented at the AAPS Annual Meeting 2014, Miami Beach, Florida, USA

2. *SDF-1 Regulates Adipose Niche Homeostasis and Adipose Derived Stromal Cell Function.*

Maan ZN, Whittam AJ, Rennert RC, Duscher D, Paik K, Rodrigues M, Fujiwara T, Hu MS, Walmsley GG, Whitmore AJ, Longaker MT, Gurtner GC

Presented at the 7th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2014, Stanford, USA.

3. *Adipose Derived Stromal Cells Obtained by Ultrasound Assisted Liposuction Versus Suction Assisted Liposuction: A Comparison of Their Regenerative Capacity.*

Atashroo D, Duscher D, Maan ZN, Whittam AJ, Lin M, Paik K, Duldulao C, Zielins E, Mcardle A, Tevlin R, Hu MS, Walmsley GG, Wearda T, Senarath-Yapa K, Marecic O, Menon S, Wan DC, Gurtner GC, Longaker MT

Presented at the 7th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2014, Stanford, USA.

4. *The Optimal Fat Graft: Evaluating the Biomechanical Effects of Diameter, Length, and Flow Rate During Fat Placement.*

Atashroo D, Wearda T, Raphael J, Zielins E, Paik K, Duldulao C, Menon S, McArdle A, Walmsley GG, Hu MS, Maan ZN, Duscher D, Tevlin R, Marecic O, Wan DC, Longaker MT

Presented at the 7th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2014, Stanford, USA.

5. *Selective Parenchymal Decellularization – A Novel Technique for High-Throuput Organ-Level Tissue Engineering.*

Findlay MW, Than P, Raghvendra S, Liu W, Duscher D, Gurtner GC

Presented at the 7th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2014, Stanford, USA.

6. *Short Hairpin RNA Interference Therapy for Diabetic Murine Wound Closure and Hindlimb Ischemia.*

Paik KJ, Rennert RC, Duscher D, Atashroo D, Maan ZN, Chen HH, Chung MT, Sorkin M, Morrison SD, Hu MS, Zimmermann AS, Nauta A, Ko SH, Tevlin R, Zielins E, McArdle A, Walmsley GG, Senarath-Yapa K, Hong W, Duldulao C, Wearda T, Marecic O, Wu JC, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC

Presented at the 7th Annual Plastic Surgery Research Symposium 2014, Stanford, USA.

7. *Comparison of Delivery Methods of Adipose-Derived Stem Cells Reveal Differential Survival and Wound Healing Outcomes.*

Hu MS, Hong W, Esquivel M, Rennert RC, Chung MT, Zimmermann AS, Rajadas J, Duscher D, McArdle A, Walmsley GG, AB, Gurtner GC, MD, Longaker MT

Presented at the Plastic Surgery Research Council 2014, NYC, USA.

8. Cutaneous Innervation of the Ankle: An Anatomical Study With Clinical Implications.

Duscher D, Raphael W, Weninger P, Hirtler L

Presented at the Experimental Biology Meeting 2013, Boston, USA; **Travel Award Winner.**

9. Perforator Flaps of the Upper Abdominal Wall.

Duscher D, Schmidt M, Tinhofer I, Huemer GM

Presented at the Experimental Biology Meeting 2013, Boston, USA

10. Dimensions of the Ankle Ligaments: Anatomical Study and Literature Review.

Duscher D, Raphael W, Weninger P, Hirtler L

Presented at the Experimental Biology Meeting 2013, Boston, USA