

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien  
Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr.sc.agr. Qendrim Zebeli)

**Etablierung eines Zellkultursystems  
mit primär kultivierten equinen  
Immunzellen aus dem Blut zur *in vitro*  
Untersuchung von  
immunmodulatorischen  
Futtermitteladditiva**

Bachelorarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Sonja Männer

Wien, Mai 2022

Wissenschaftliche Betreuerin: Assistenz Professorin Dr. rer. agr. Susanne Kreuzer-Redmer

## Abkürzungen

ACD	Acid-Citrat-Dextrose
ConA	Concanavalin A
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	foetales bovines Serum
<i>E.faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
LPS	Lipopolysaccharide
h (z.B. 24h,48h,...)	hour (engl.) Stunde
MAT	Monozytogen-Aktivierungstest
ml	Milliliter
rpm	rounds per minute (engl.) Umdrehungen pro Minute
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphat buffered saline)
PBMCs	mononukleäre Leukozyten aus dem Blut (Peripheral blood mononuclear cells)
PL	Platelet Lysate
°C	Grad Celsius
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

# Inhalt

Abkürzungen .....	2.1-3
1 Ziel der Studie .....	1
2 Einleitung .....	2
2.1 Die Rolle von FBS in <i>in vitro</i> Experimenten.....	5
2.2 Nachteile von FBS in <i>in vitro</i> Experimenten.....	6
2.3 Aktuelle Situation und Substituenten .....	6
3 Material .....	8
3.1 Probenmaterial .....	8
3.2 Zellkulturmedium und Reagenzien.....	10
4 Methode.....	12
4.1 Isolation der mononukleären Leukozyten aus dem peripheren Blut .....	12
4.2 Zellkultivierung .....	13
4.3 Messung.....	15
5 Ergebnisse .....	16
5.1 Gerinnungshemmer.....	16
5.2 Absolute Zellzahlen nach 24 Stunden .....	17
5.3 Absolute Zellzahlen nach 48 Stunden .....	19
5.4 Wachstumsrate.....	22
6 Diskussion .....	23
7 Schlussfolgerung .....	26
8 Zusammenfassung.....	27
9 Abstract .....	28
10 Abbildungsverzeichnis .....	29
11 Literaturverzeichnis .....	30

# 1 Ziel der Studie

Ziel dieser Studie ist es, ein System zur Kultivierung equiner Immunzellen zu etablieren, um in weiterer Folge immunmodulatorische Effekte *in vitro* zu untersuchen. Dies stellt einen möglichen Beitrag zum Tierschutz dar, weil sich in folgenden immunmodulatorischen Experimenten die Anzahl der Tiere und deren Beprobung auf ein Minimum reduzieren würden. Ihre Zellen könnten somit länger und besser kultiviert werden, um weitere Rückschlüsse auf immunmodulatorische Effekte *in vivo* zu erforschen. Gerade für immunmodulatorische Futtermitteladditiva kann so in folgenden Forschungen *in vitro* deren positive Auswirkung auf das equine Immunsystem genauer erforscht werden.

Dazu sollen verschiedene Kulturbedingungen getestet werden, um primäre equine Immunzellen möglichst lange und vital in Kultur erhalten zu können. Das System soll nicht nur praktikabel, sondern auch preiswert sein. Da bei der Standardprozedur in solchen Versuchen oft fetales bovines Serum zum Einsatz kommt, dies aber sehr teuer ist und einige Probleme mit sich bringt, wird hier mit Seren verschiedener Tierarten gearbeitet, um optimale Kulturbedingungen zu testen. Fokus dieser Studie liegt auf equinem, bovinem, porcinem und humanem Serum. Ein gut funktionierender Ersatz für das FBS bringt nicht nur eine Kostenminimierung in weiteren Experimenten, sondern wirft auch weniger ethische Fragestellungen auf, da zur Gewinnung von FBS ungeborenes Leben beendet werden muss.

## 2 Einleitung

Ein großes Problem der immer schneller wachsenden Globalisierung und dem vereinfachten Güter-, sowie Tier- und Menschenverkehr ist die beschleunigte Ausbreitung von Krankheitserregern. Seit 1960 boomt der Zweig der Pferdeindustrie in allen Sparten weltweit. Pferde werden über den ganzen Globus für diverse Turniere, Shows, züchterische Zwecke oder für den Freizeitbereich transportiert. Alleine zwischen 2004 und 2014 stieg die Zahl der Events, organisiert von der Fédération Equestre Internationale (FEI), um 255%. Mit der Zahl der Turniere und der Menge an Pferden stieg auch die Zahl der Krankheiten unter den equinen Teilnehmern (Dominguez et al., 2015).

Transport und fremde Umgebungen bedeuten Stress, auch für das Immunsystem. Um dieses nachhaltig zu stärken, erfordert es Wissen über die genauen Funktionen und Reaktionen auf bestimmte Stimuli.

Das Immunsystem eines Pferdes besteht, wie bei jedem uns bekannten Säugetier, aus zwei großen Teilsystemen. Diese werden angeborenes und erworbenes Immunsystem genannt. Das erworbene Immunsystem bildet sich im Laufe des Lebens als Reaktion auf diverse Antigene aus. Antigene sind körperfremde Stoffe, die potenziell pathogen sind. Das erworbene Immunsystem fungiert über antigenspezifische Antikörper. Antigen-spezifisch bedeutet, dass sich die Antikörper auf eine spezifische Art von Antigenen spezialisiert haben und im Bedarfsfall vom Körper für die Bekämpfung dieser produziert werden. Dieses System ist zwar langsamer als das angeborene Immunsystem, aber hoch spezifisch. Im Mittelpunkt dieses Systems stehen B- und T- Lymphozyten, die mit Hilfe der antigenpräsentierenden T-Helferzellen die Antigene neutralisieren oder töten. B Zellen können nach ihrer aktiven Phase zu Plasmazellen differenzieren, die Jahrzehnte lang überdauern und Schutz gegen spezifische Krankheitserreger bieten. (Schmetzer, 2009 S.4).

Das angeborene Immunsystem ist eine Vielzahl an mechanischen Barrieren und Abwehrmechanismen, dazu zählen diverse chemische, physikalische, humorale und zelluläre Abwehrmechanismen. Aufgabe dieser Systeme und Zellen ist das Auffinden und Zerstören von Antigenen jeder Art. Dieses System ist, wie der Name schon sagt, angeboren und nicht

erst nach Antigenkontakt erworben. Es richtet sich nicht primär an spezielle Antigene, sondern fungiert als globales Abwehrsystem. Monozyten und Makrophagen bilden die Brücke zwischen dem unspezifischen und spezifischen Immunsystem mit ihrer Rolle als Antigen-Präsentierende Zellen (Schmetzer, 2009 S.4-24).

Periphere Blut Leukozyten ist ein Überbegriff für verschiedene Zellen und umfasst Neutrophile, Monozyten, Eosinophile Granulozyten, Basophile Granulozyten und Lymphozyten. Der Blutkreislauf, so wie der eng damit verbundene lymphatische Kreislauf ermöglichen ihnen eine hohe Mobilität, zudem sie auch durch Gewebe wandern können. Ihre Aufgabe ist es, mit Hilfe des durch das Kompartimentsystem markierte Pathogene aufzuspüren, zu identifizieren und sie zu töten und ihre Überreste zu beseitigen. Je nach Art der Endotoxine, die von den pathogenen Bakterien abgesondert werden, treten andere Leukozyten in den Vordergrund. Monozyten und Gewebs-Makrophagen stehen normalerweise an erster Front, um das Entzündungsgeschehen zu initiieren und auszurichten (Carrick & Begg, 2008.).

Lange Zeitspannen hoher körperlicher Belastung supprimieren nachgewiesenermaßen die Zirkulation der Monozyten und neutrophilen Granulozyten im Blut sowie deren oxidative burst capacity. Moderate Belastung zeigte keinerlei Auswirkungen, wohingegen in erfolgreichen Distanzpferden ein erhöhter Spiegel an peripheren Granulozyten nachgewiesen werden konnte. Auch in ihrer genetischen Ausstattung zeigten erfolgreiche Distanzpferde, im Gegensatz zu ihren weniger erfolgreichen Kollegen, eine größere Anzahl hinaufregulierter Genexpressionen ihrer Leukozyten. Diese ist nur eine der vielen, noch nicht gänzlich erforschten, Wechselwirkungen der Leukozyten zu ihrer Umwelt, welche eine Schlüsselrolle im Immunsystem einnehmen (Carrick & Begg, 2008).

Aus diesem Grund sind Forschungen mit PBMCs für die Tiergesundheit besonders interessant. Sie werden oft als Zellmodell genutzt, um die direkten Effekte von immunmodulierenden Substanzen genauer zu erforschen. Diese variieren je nach Spezies. Die Methoden zur Isolierung von humanen PBMCs sind mittlerweile relativ gut erforscht, doch im Tierreich sind noch einige Verbesserungen im Prozess der Isolierung und anschließenden Kultivierung vorzunehmen. Solche funktionierenden Zellsysteme können nicht nur im

Bereich der Immunmodellierung mit Zusatzfutterstoffen genutzt werden, sondern auch zur Erforschung verschiedener Toxine verwendet werden. Ein großer Vorteil ist hier der tierschonende Umgang, da sich die Frequenz der Blutabnahme minimiert und sich somit der Stress für die verwendeten Tiere vermindert (Larsberg et al., 2021).



## 2.1 Die Rolle von FBS in *in vitro* Experimenten

Neben *in vivo* Experimenten gibt es auch zahlreiche *in vitro* Versuche, um komplexe Vorgänge im tierischen sowie menschlichen Körper zu verstehen. *In vitro* Versuche sind ein essenzieller Weg, um Tierversuche am lebenden Tier so oft wie möglich zu vermeiden. Hierfür benötigt man ein Medium, welches die Zellen auch außerhalb des Körpers möglichst lange am Leben erhält. Seit den Anfängen der *in vitro* Zellexperimente sind Forscher weltweit auf der Suche nach dem optimalen Nährmedium. Das erste publizierte *in vitro* Experiment mit Froschnervenfasern verwendete Froschllymphe, doch schon bald kamen weitere tierische und auch synthetische Medien zum Einsatz, wie zum Beispiel Modified Eagles Medium (MEM) und Dulbecco's MEM (DMEM), um nur einige Namen zu nennen. Nicht für alle Zellen waren diese Medien ein optimales Nährmedium. 1958 entdeckte man erstmals, dass die natürliche Wachstumsfähigkeit von Zellen länger erhalten blieb, wenn dem Nährmedium fötales bovines Serum (FBS) zugesetzt wird. Seit dem Zeitpunkt ist es ein nicht wegzudenkendes Substrat in der Zellforschung. Zudem ist es leicht erhältlich, da es ein Nebenprodukt der Schlachtkette ist. Teuer macht es schlussendlich die komplexe Aufbereitung, bis es als Nährmedium für die Forschung verkauft werden kann (van der Valk et al., 2017).

FBS ist Serum, sprich Blut ohne Zellen oder Gerinnungsfaktoren, welches von ungeborenen Kälbern gewonnen wird. Der Fetus sollte mindestens drei Monate alt sein, sonst ist die Gewinnung aufgrund des zu kleinen Herzens zu schwierig. Mittels Cardiopunktion wird, so steril wie möglich, Blut abgenommen und aufbereitet. Dies geschieht noch am Schlachthof selbst. Im Serum enthalten sind am Ende des Aufbereitungsprozesses noch Hormone, Wachstumsfaktoren und Nährstoffe, die das Zellwachstum und deren Vitalität ermöglichen (Jochems et al., 2002).

Um den weltweiten Bedarf zu decken, werden schätzungsweise 2.000.000 bovine Feten jährlich benötigt. Die Zahl ist steigend. Da nur ungefähr 8% der Schlachtrinder tragend sind, ist die Produktionsrate von FBS sehr abhängig von vielen unberechenbaren Faktoren, wie zum Beispiel die aktuelle Nachfrage an Rindfleisch. Auch die Qualität und Zusammensetzung variiert je nach Alter des Fetus und Herstellers. FBS stellt eine potenzielle Keimquelle dar, da

eine mikrobielle und virale Kontamination nie komplett ausgeschlossen werden kann (van der Valk et al., 2018).

Vor allem seit der BSE Krise 1989 steht FBS im potenziellen Verdacht, mit Prionen kontaminiert zu sein und der Ruf nach neuen Nährmedien wurde immer größer (van der Valk, 2022).

## **2.2 Nachteile von FBS in *in vitro* Experimenten**

Optimal ist FBS in Zellkulturversuchen nicht immer, denn in Versuchen mit equinen PBMCs konnte ein deutlicher Anstieg der prokoagulierenden Aktivität gezeigt werden. Hierbei spielte es keine Rolle ob hitzedeaktiviertes FBS genommen wurde oder nicht (Okano et al., 2006).

FBS kommt auch in Monozytogen-Aktivierungstest (MAT) zum Einsatz. Dieser Test dient dem Nachweis von Pyrogenen in pharmazeutischen Versuchen und auch als Ersatz für den Kaninchen-Pyrogentest. Der Test mit mononukleären Zellen erfordert die Zugabe von Serum, meist FBS. In neueren Versuchen wurde eine Substitution mit humanem Serum angestrebt. Im Vergleich zum FBS schnitt humanes Serum zwar schlechter ab, wenn es um die Empfindlichkeit zur Detektion von Endotoxinen ging, erwies sich aber als deutlich besser bei Detektion von Nicht-Endotoxin-Pyrogenen (NEPs). Somit lässt sich FBS im MAT doch nicht immer komplett ersetzen (Molenaar-de Backer et al., 2021).

Auch beim Auftauprozess von PBMCs kommt FBS zum Einsatz. Gerade in dieser sensiblen Phase ist es wichtig, eine möglichst hohe Anzahl an vitalen Zellen zu erhalten. Hier erwies sich bei humanen PBMCs eine Lösung mit einer geringen Konzentration an FBS am effizientesten (Hønge et al., 2017).

## **2.3 Aktuelle Situation und Substituenten**

Nicht nur aus ethischen, sondern auch aus Qualitätsgründen gibt es mittlerweile viele Ansätze FBS zu ersetzen. Das reicht von serumfreien Medien, Medien ohne tierischen Komponenten (xeno free media) bis zu Seren von diversen Tierarten. Auch humanes Platelet lysate kann eine Alternative darstellen (van der Valk et al., 2017).

Für Equine Mesenchymale Stammzellen eignet sich zum Kultivieren das Platelet lysate (PL) besser als FBS. Somit werden potenzielle Pathogene vermieden und PL wirkt sich weniger auf den Phänotyp der kultivierten Zellen und ihre immunomodulatorische Kapazität aus (Naskau C. et al. 2018).

Synthetisch erzeugte Nährmedien sind meist sehr zellspezifisch hergestellt. Je nach Zelllinie oder Spezies gibt es eigens dafür optimierte FBS- freie und sogar teilweise komplett tierproduktfreie (xeno free media) Nährlösungen. Die Veterinärmedizinische Universität in Utrecht hat für diesen Zweck eine eigene Datenbank eingerichtet. Hier werden die weltweit zusammengetragenen Forschungsergebnisse nach verschiedenen Parametern aufgeschlüsselt und stehen meist unentgeltlich zur Verfügung. (3Rs-Centre Utrecht Life Sciences Department of Animals in Science and Society Faculty of Veterinary Medicine)

Ziel dieser Arbeit war es, FBS mit anderen Seren als Medium-Supplement zu testen. Des Weiteren wurde der Einfluss von zwei verschiedenen Antikoagulanzen bei der Blutabnahme auf die Zellzahl untersucht. Diese Arbeit dient als wertvolle Grundlage für weiterführende Arbeiten. Dies ist aktuell zum Zeitpunkt dieser Arbeit ein noch relativ wenig erforschtes Gebiet, welches vor allem in der Sportpferde- und Freizeitpferdebranche einen wichtigen Beitrag zur physischen Gesundheit der Tiere liefern könnte.

## 3 Material

### 3.1 Probenmaterial

Für diese Studie wurden uns drei miteinander verwandte Araberstuten sowie zwei männliche Tiere und ein Araberwallach aus einer anderen Zucht von der Familie Mauritsch freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Abb.I). Alle sechs Pferde wurden im gleichen Stall ausgebildet und starteten im Distanzsport. Zum Zeitpunkt der Blutabnahme wurden alle sechs klinisch untersucht und als gesund befunden. Vorerkrankungen sind keine vermerkt. Jedem Pferd wurden 16 ml Blut aus der *Vena jugularis* auf der linken Seite mit einem Vacutainer-System entnommen. Wir verwendeten hierzu EDTA und Natrium-Heparin Röhrchen, um die Blutgerinnung zu unterbinden.

Die Proben wurden gekühlt unter einer Stunde ins Labor transportiert. Um ein möglichst umfangreiches Testergebnis zu bekommen, wurden die Stuten, Wallache und der Hengst aus verschiedenen Lebensabschnitten genommen, da wir je nach Alter und Geschlecht eine andere Immunkompetenz erwarten und so ein möglichst durchschnittliches Ergebnis bekommen.



**Darika**  
**AUT 036855**  
Stute  
\* 05.05.1989



**Darissa**  
**OE-AV 3852**  
Stute  
\* 05.09.2008



**Diamantina**  
...  
Stute  
\* ...




**Dalmatina**  
**OE-AU 4056301503**  
Stute  
\* 09.05.2003



**Midoun**  
**OE-AU 10064495**  
Hengst  
\* 23.04.2000



**Meknes**  
**OE-AU 04001503484**  
Wallach  
\* 21.06.2006



**Aldeano**  
**ESP 02677**  
Wallach  
\* 01.01.1994

**Abbildung I** Verwandtschaftsbeziehungen der Araber der Familie Mauritsch. Die Stute Diamantina wurde nicht als Spender verwendet, da sie zum Zeitpunkt der Studie nicht mehr lebte. Aldeano ESP 02677 stammt aus einer spanischen Zucht und ist auch im Besitz der Familie Mauritsch.

### 3.2 Zellkulturmedium und Reagenzien

Geräte	Firma
Centrifuge Mega Star 1.6R	VWR
Cell counter, Countess 3 FL	VWR
Laminar Flow Hood, MSC-Advantage	Thermo Scientific
Incubator, HeraCell VIOS 160i	Thermo Scientific
Steel bath, Precision GP 10	Thermo Scientific

<b>Lösungen</b>	<b>Firma</b>
Cell cultivation medium, 500 mL RPMI Medium 1640 (1X) with L-Glutamine	Thermo Scientific
Phosphate buffered saline, 500 mL, PBS (1X) without CaCl <sub>2</sub> /MgCl <sub>2</sub>	Gibco
DAPI	Gibco
Trypanblau	Thermo Fisher

Die benötigten Seren sind kommerziell erhältliche Seren der Firma Gibco und Thermo Fisher aus den USA. Das equine Serum wurde aus den gesammelten Proben gezogen. Dank der Hilfe von Dr. Georg Männer konnte das Serum der Autorin zur Verfügung gestellt werden. Zudem wurden folgende Verbrauchsmaterialien verwendet: Pipetten(spitzen), 24-Well-Platten, Filtersysteme, Reaktionsgefäße in diversen Größen, DAPI, Histopaque-1077 - Lösung.

## 4 Methode

### 4.1 Isolation der mononukleären Leukozyten aus dem peripheren Blut

Jegliche Arbeitsschritte wurden, sofern möglich, unter dem Lamina Air Flow gemacht, um eine Fremdkontamination zu vermeiden. Als ersten Arbeitsschritt wurde das RTU-Medium mit einer 1%igen Pen/Strep Lösung versetzt und im Wärmebad auf Körpertemperatur erwärmt. Da Pferde eine durchschnittliche Körpertemperatur von 38 °C besitzen, wählten wir diese Temperatur (Baumgartner, 2009, S.80).



*Abbildung II Cryotube mit Pferdeblut und Histopaque-1077 -Lösung nach Zentrifugation. Schichtung von oben nach unten: Plasma (gelb), Zellwolke (weiß) und Zellpellet (dunkel).*

Aus den gesammelten peripheren Blutproben wurden mononukleäre Leukozyten (PBMCs) für die Proliferations-Assays pro Pferd isoliert. Dazu wurde das EDTA oder Heparin Blut 1 zu 1 mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) versetzt und dann vorsichtig auf eine Histopaque-1077-Lösung geschichtet, um durch eine Dichtegradientenzentrifugation bei 25min bei 20 Grad Celsius und 2000 Runden pro Minute (rpm) zentrifugiert eine Trennung



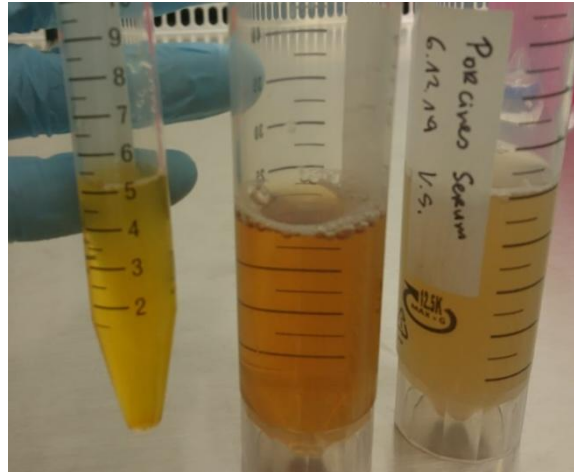
der Blutbestandteile zu erlangen. Plasma in der obersten Lage, vitale Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen in der mittleren Zellwolke und ganz am Boden des Reaktionsgefäßes ein Pellet von hypertonen Erythrozyten (Abb.II). Die oberste Schicht Plasma wurde nun vorsichtig abpipetiert und für die kommenden Schritte in 50 ml Reaktionsgefäßen gekühlt aufbewahrt.

Mit Hilfe einer 1250µL Filterspitze wurde der Zellwolke, die Schicht mit den PBMCs, vorsichtig in ein 15ml Tube transferiert und bis 12ml mit PBS aufgefüllt und kühl gestellt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 1200rpm wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, um das Pellet am Boden des Tubes nicht zu zerstören, da sich hier jetzt die wichtigen PBMCs befinden.

## 4.2 Zellkultivierung

Die isolierten PBMCs wurden im weiteren Arbeitsschritt zu 1 mL auf Platten transferiert und mit den verschiedenen Seren (Abb.III) vermengt. Zudem wurde je pro Serumprobe eine mit Concanavalin A (2 µL) und eine mit LPS (1 µL) versetzt, eine Kontrollgruppe ohne Zusatz gelassen. Jeweils eine Charge der Platten kam in den Inkubator, für anschließende Zählungen mit dem bildbasierten Zellenzählgerät (Countess 3, Thermo Scientific Inc.). Diese wurden im Inkubator HeraCell der Firma Thermo Scientific bei 38 °C inkubiert.

Zu den Zellen in den 24h Well-Platten wurden bei jeder Serumart Proben mit Concanavalin A (ConA) und Lipopolysacchariden (LPS) versetzt. Dies diente als positiv Kontrolle, da diese Stoffe T-Zell Mitogene sind und die Zellen zur Proliferation bringen. Dies gilt besonders für LPS, da es ein wichtiges bakterielles Antigen ist und somit eine bakterielle Infektion für die Zellen simuliert.



**Abbildung III** Von rechts nach links: humanes Serum, equines Serum, porcines Serum.

Um möglichst valide Ergebnisse zu erhalten, wurden PBMCs pro Pferd mit je zwei Proben angesetzt, sofern es uns die gegebene Zellzahl ermöglichte. Messungen an der Countess erfolgten zu drei verschiedenen Zeitpunkten: zuerst am Zeitpunkt T0, nach 24 Stunden und nach 48 Stunden. Zielwert waren beim Zeitpunkt T0 mindestens  $10^6$  Zellen pro Probeneinheit in den Wells, bei einem Volumen von 1 ml, in den Proliferation Assays. Diese Werte konnten wir problemlos erfüllen, da von jeder Ausgangsprobe genügend PBMCs vorhanden waren.

### 4.3 Messung

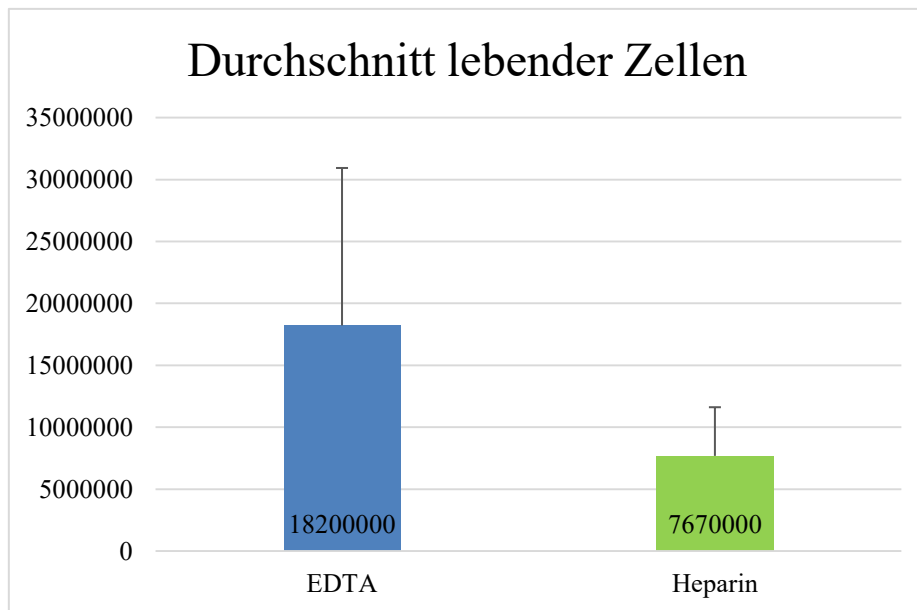
Die Messung der PBMCs erfolgte mit einer Countess 3, ein automatisierter Zellzähler der Firma Thermo Fischer SCIENTIFIC. Hierzu wurden immer 50  $\mu\text{L}$  der zu beprobenden Probe mit 1  $\mu\text{L}$  4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) blasenfrei vermischt. DAPI kann in tote Zellen eindringen und interkaliert in die DNA. Dadurch werden tote Zellen angefärbt und eine tot-lebend Diskriminierung der Zellen ist möglich. 20  $\mu\text{L}$  dieser Lösung wurden nun auf die geräteeigene Kartusche aufgebracht. Jede Probe wurde zweimal ausgewertet, um etwaigen Messfehlern vorzubeugen. Notiert wurden die Gesamtzahl der Zellen sowie die Prozentwerte der toten und lebenden Zellen, zudem auch deren durchschnittlicher Zelldurchmesser. Aus allen den doppelt gemessenen Werten wurde der Durchschnitt ermittelt und in einer Tabelle übersichtlich eingetragen.

## 5 Ergebnisse

Der Zeitpunkt  $T=0$  ist der absolute Wert der Isolation, sprich die Anzahl von Zellen, die zum Startzeitpunkt in jedem Well der 24-Well-Platten verteilt wurde. Dieser Wert ist bei allen Platten gleich. In den folgenden Graphiken wird der Zeitpunkt  $T=0$  nicht herangezogen, da zu diesem Zeitpunkt noch kein Einfluss des Serums detektiert werden kann. Zudem ist der Ausgangswert der lebenden Zellen wesentlich höher als in späteren Messungen, da durch das Transferieren einige Zellen beschädigt wurden und abstarben.

### 5.1 Gerinnungshemmer

Da schon der Prozess der Probenentnahme ein kritischer Prozess ist, der Stress für die Zellen bedeutet, hat auch der Gerinnungshemmer im Probenentnahmeröhrchen (mit jeweils einem Volumen von 9 ml) einen Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen. Wir konnten eindeutig feststellen, dass mit EDTA mehr Zellen im Durchschnitt aller gesammelten Proben gewonnen werden konnten, als die mit Natriumheparin versetzten Zellen. Im Durchschnitt war mit EDTA eine Zehnerpotenz mehr lebende Zellen vorhanden, was sich positiv auf die späteren Zellzahlen auswirkt (Abb. IV).



*Abbildung IV Vergleich der Proben mit EDTA und Heparin sowie dazugehörige Standardabweichung. Je Probe aus den mit EDTA beschichteten Röhrchen lebten zum Zeitpunkt der ersten Messung  $T=0$  durchschnittlich 18 200 000 Zellen, in den mit Heparin versetzten Proben nur 7 670 000*

## 5.2 Absolute Zellzahlen nach 24 Stunden

Die folgenden Ergebnisse wurden nach 24h in Kultur mit der Countess3 gemessen. Es wurde je Serum und Zusatzstoff der durchschnittliche Wert aller Probentypen erfasst.

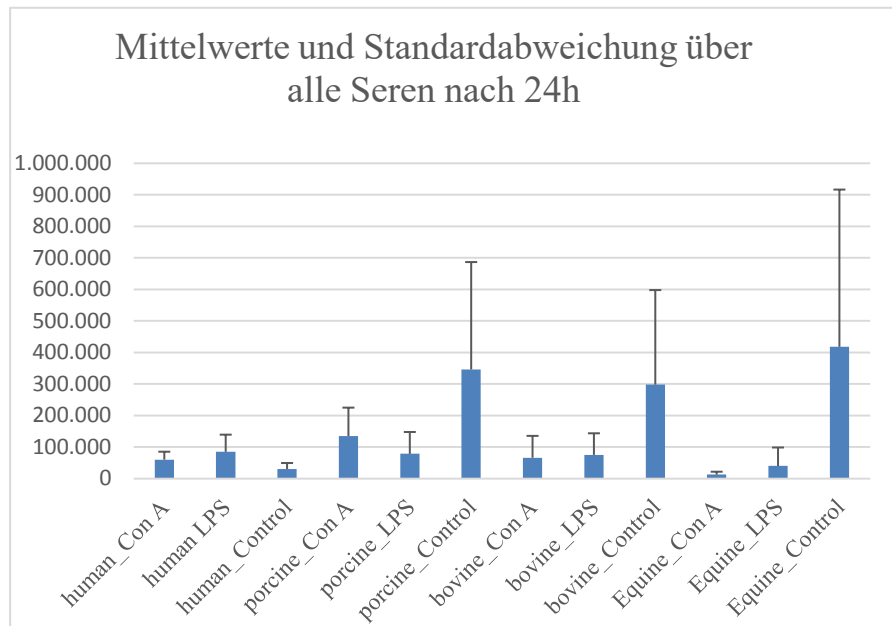
Das equine Kontrollserum führte zu diesem Zeitpunkt zu den meisten lebenden Zellen mit durchschnittlichen 418 000. Am zweitbesten erwies sich hier das porcine Kontrollserum mit 346 000 durchschnittlich lebenden Zellen. Sehr viel schlechter schnitt das humane Kontrollserum nach 24h mit nur 60100 lebenden Zellen ab (Abb.V und Abb.VI).

In der Gruppe der mit LPS versetzten Seren schnitt das humane Serum mit 85 000 lebenden Zellen am besten ab, gefolgt vom porcinen Serum (78500 lebende Zellen) und dem equinen Serum an letzter Stelle mit 40100 lebenden Zellen (Abb.V und Abb.VI).

Die Gruppe der mit ConA versetzten Seren führte zu diesem Zeitpunkt das porcine Serum (135 000 lebende Zellen) an, gefolgt vom bovinen Serum (66100 lebende Zellen) und an letzter Stelle das equine Serum mit nur mehr 12600 überlebenden Zellen (Abb.V und Abb.VI).

Serum bei 24h	Mittelwert	Standardabweichung
human_Con A	60.100	25.248
human_LPS	85.000	54.399
human_Control	30.500	18.930
porcine_Con A	135.000	90.072
porcine_LPS	78.500	69.367
porcine_Control	346.000	340.775
bovine_Con A	66.100	69.411
bovine_LPS	75.200	68.541
bovine_Control	298.000	299.961
Equine_Con A	12.600	9.234
Equine_LPS	40.100	58.564
Equine_Control	418.000	498.668

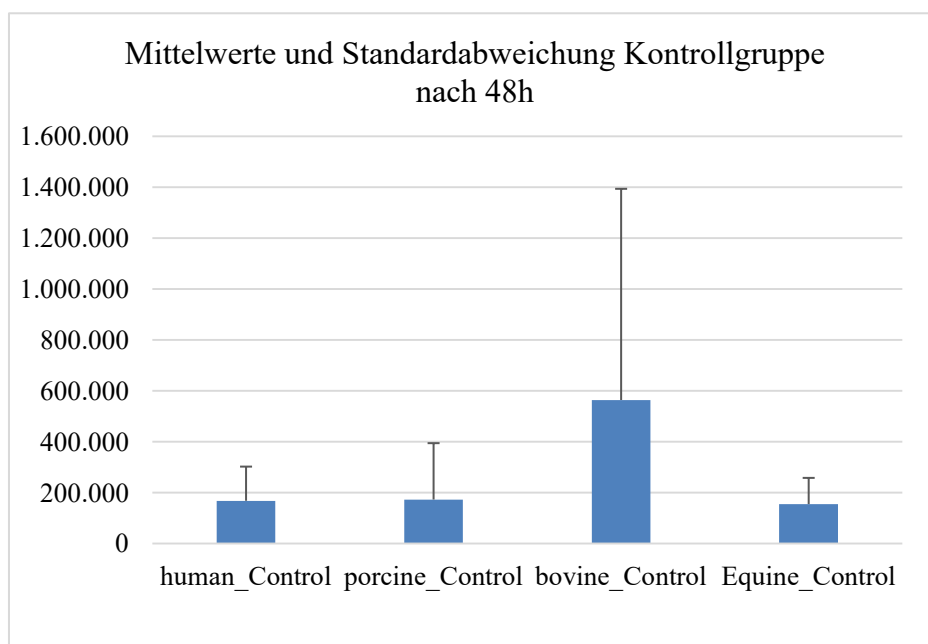
*Abbildung V Absolute Zellzahlen nach 24h samt Mittelwert und Standardabweichung*



*Abbildung VI* Lebende Zellen nach 24h samt Standardabweichung im Vergleich

### 5.3 Absolute Zellzahlen nach 48 Stunden

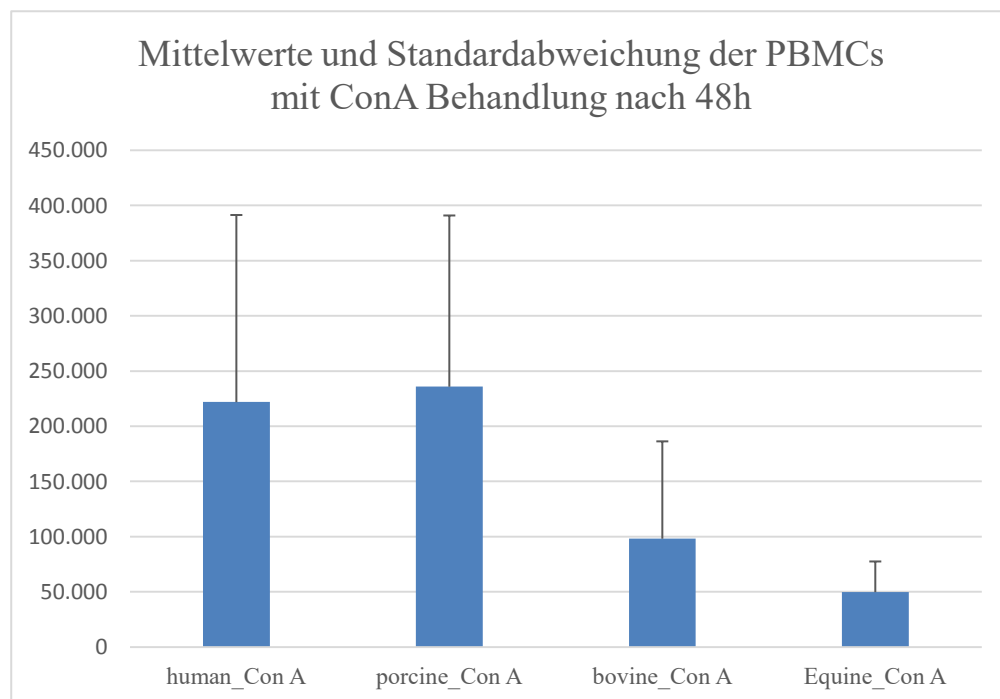
In den folgenden Absätzen werden die Ergebnisse der lebenden Zellen als Durchschnitt nach 48h beschrieben.



**Abbildung VII** Durchschnittlich lebende Zellen in der Kontrollgruppe nach 48h samt Standardabweichung im Vergleich

In den Kontrollgruppen schnitt nach 48h mit Abstand am besten das FBS ab, mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 563000 lebenden Zellen. Dieses wird gefolgt von dem equinen Serum der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 154000 lebenden Zellen. Die zwei schlechtesten Seren mit der niedrigsten durchschnittlichen Überlebensrate waren das porcine Kontrollserum (172000 Zellen) und das Schlusslicht bildete das humane Kontrollserum (167000 Zellen).

In der Gruppe der Seren die mit ConA versetzt wurden, schloss das porcine Serum mit durchschnittlich 236000 lebenden Zellen am besten ab; dicht gefolgt von humanem Serum mit 222000 durchschnittlich lebenden Zellen. Das bovine Serum zeigte hier durchschnittlich nur 98300 lebende Zellen, während das equine nur mehr 49900 Zellen vorwies.

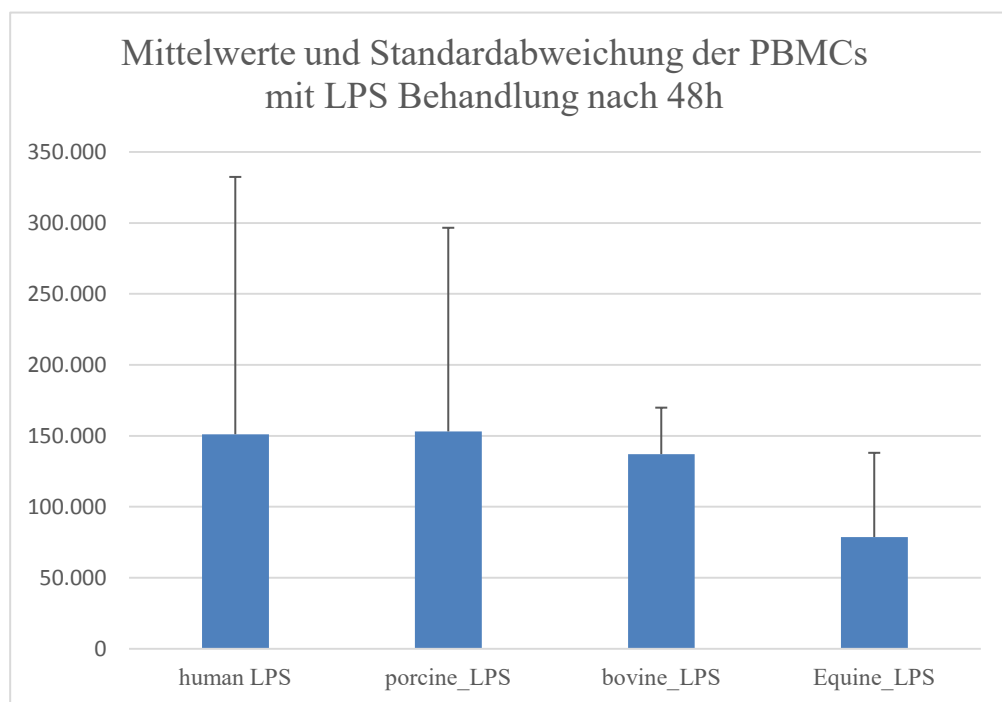




**Abbildung VIII** Durchschnittlich lebende Zellen mit ConA Behandlung nach 48h samt Standardabweichung im Vergleich

In der Gruppe, welche mit LPS versetzt wurde, erreichten die Proben mit dem porcinen Serum den besten Durchschnittswert mit 153000 Zellen. Knapp darunter lagen die Ergebnisse des humanen Serums mit 151000 Zellen. Bovines Serum erreichte im Durchschnitt hier nur 137000 lebende Zellen und das equine Serum nur 78600 Zellen.

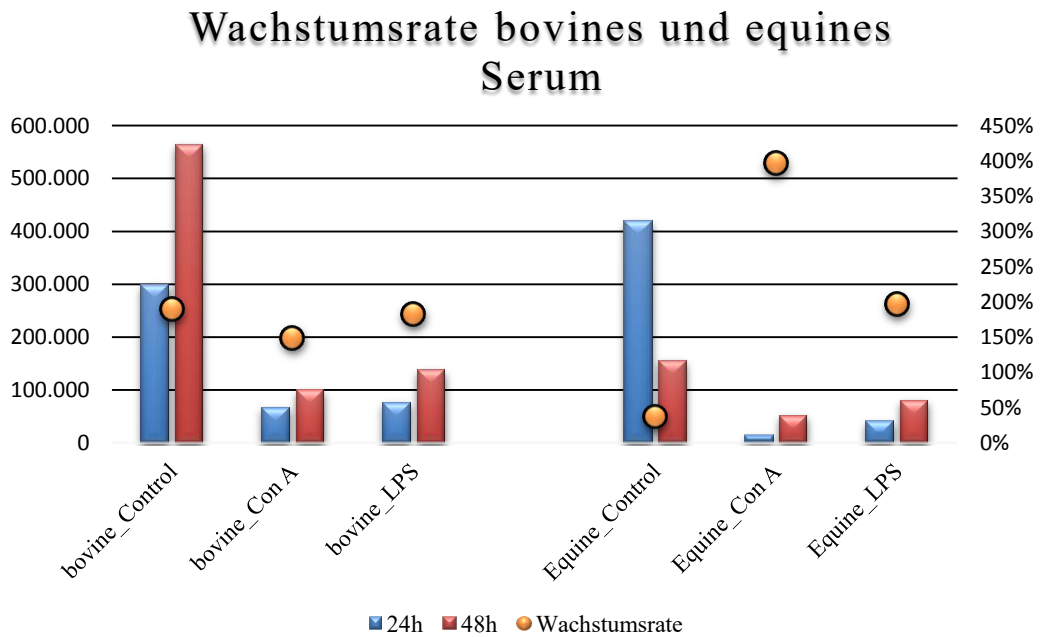
Trotzdem kann zusammenfassend gesagt werden, dass das bovine Serum in der Kontrollgruppe das beste Nährmedium ist, da wir hier die höchste Anzahl an lebenden Zellen nach 48 Stunden vorfanden (Abb. VII).



**Abbildung IX** Durchschnittlich lebende Zellen mit LPS Behandlung nach 48h samt Standardabweichung im Vergleich

## 5.4 Wachstumsrate

Neben den absoluten Zahlen ist auch die durchschnittliche Wachstumsrate der Zellen nach der Behandlung mit den Mitogenen ConA und LPS von Bedeutung für das Herausfiltern des optimalen Mediums. Hierfür wurde die durchschnittliche Wachstumsrate der lebenden Zellen von 24 Stunden auf 48 Stunden berechnet. Prozentuell schnitt sowohl in der Kontrollgruppe, als auch mit ConA versetzt, das Humane Serum mit 548% (Kontrollgruppe) und 369% (ConA) Wachstum am besten ab. Zweiten Platz belegte das equine Serum mit einer Wachstumsrate von 396% mit ConA und 196% mit LPS versetzt.



*Abbildung X* Hier wurde die Wachstumsrate mit den absoluten Zellzahlen je nach Messzeitpunkt kombiniert dargestellt. Die Wachstumsrate bezeichnet das Zellwachstum von 24h auf 28h in Prozent.

## 6 Diskussion

Da PBMCs sehr empfindliche Zellen sind, ist auch die Zeit von der Blutabnahme bis zum Verarbeiten ein kritischer Faktor. Umso länger die Proben gelagert werden, umso mehr erhöht sich die Granularität von Granulozyten, was beim Schichtungsverfahren dann ein Problem werden kann, da sie auf Grund ihrer Dichte im BuffyCoat landen können und weitere Messungen verfälschen können. Durch lange Lagerungszeiten kann es passieren, dass sie aktiviert werden und Granula freisetzen, welche Oxidativen Stress für die Lymphozyten bedeuten. Dieses kann die Lebensfähigkeit der Lymphozyten gefährden. Darum waren wir bemüht die Transportzeiten so kurz wie möglich zu halten (Betsou & Ammerlaan, 2019).

Nicht nur die Zeit zwischen Probenentnahme und Verarbeitung, sondern auch die Temperatur dabei spielte eine wichtige Rolle. Da 4 °C als optimale Temperatur angegeben wird, weil hier die Toxizität der natürlichen Killerzellen am wenigsten abnimmt und somit die Verteilung der relativen Zellzahlen konstanter bleibt, versuchten wir diese konstant zu halten. Um beste Bedingungen zu erzeugen, lagerten wir die Proben neben Kühlelementen, ohne direkten Kontakt, da wir nicht unter den Gefrierpunkt kommen wollten (Betsou & Ammerlaan, 2019).

In der Humanmedizin wird in gängigen Protokollen Natrium Heparin verwendet, welches gute Ergebnisse liefert. Wir untersuchten in dieser Studie auch die Auswirkungen zweier verschiedener Antikoagulantien (Grievink et al., 2016, S.410).

Zur Verfügungen standen hier, in diesem Experiment, EDTA und Natrium Heparin. In einer anderen Studie aus dem humanmedizinischen Bereich wurden die Gerinnungshemmer EDTA, Acid-Citrat-Dextrose (ACD) und Heparin verglichen. Die Proben wurden bis zu 24h aufbewahrt und anschließend zentrifugiert. Es konnte kein aussagekräftiger Unterschied zwischen den Antikoagulantien festgestellt werden, im Bezug auf Erholungsfähigkeit und Lebensfähigkeit der PBMCs. EDTA schien nur einen Nachteil auf die Proliferation der Cytokine-induzierten-Killerzellen (CIK) zu haben. Zudem steigert EDTA die proinflammatorischen Zytokin-mRNAs und könnte somit die weiteren Ergebnisse in folgenden Forschungen beeinflussen. ACD als Antikoagulant hat den Vorteil, dass es unter

anderem Lymphozyten mit Veränderungen durch das Epstein-Barr Virus besser konserviert, als es EDTA vermag. Es wurde aber auch betont, dass mit EDTA die relative Anzahl der CD14 Monocyten im Schnitt höher war, als mit den anderen Koagulanzen (Betsou & Ammerlaan, 2019).

In der Humanmedizin wird in gängigen Protokollen Natrium Heparin verwendet, welches gute Ergebnisse liefert (Grievink et al., 2016, S. 410)

Die Hauptfragestellung dieser Arbeit war, welches Serum die besten Ergebnisse erzielt. Hier in dieser Arbeit wurde nur auf die absoluten Lebendzahlen der Zellen eingegangen, sowie deren Fähigkeit sich im Laufe der Zeit zu vermehren, der Growth-Rate. Die Fragestellung nach dem besten Serum ist anwenderspezifisch. Zum Beispiel für den MAT Test: Während Endotoxine besser mit FBS detektiert werden, schnitt humanes Serum besser bei der Detektion von nicht-endotoxischen Pyrogenen ab. Wir konnten in unsere Arbeit und mit unserer Fragestellung keinen signifikanten Unterschied der Seren feststellen. (Molenaar-de Backer et al., 2021)

Ein großes Problem an FBS ist, dass es neben Nährstoffen auch Hormone und Wachstumsfaktoren enthält, die folgende Forschungen bezüglich Auswirkungen auf das Immunsystem, welcher Tierart auch immer, verfälschen. Zudem enthält es auch unerforschte Stoffe, die unspezifische T-Zellen aktivieren, was weitere Ergebnisse wieder verfälscht. Abgesehen von den Komponenten, ist das Versenden von FBS teilweise kritisch, da in manchen Ländern Importverbote bestehen. Zudem unterliegt FBS als tierisches Produkt immer Qualitätsschwankungen, daher sollte eigentlich jede neue Charge vor Experimenten getestet werden, was ein erheblicher Zeit- und Kostenaufwand ist. Es sollte generell nach Ersatz ohne immunmodulierende Eigenschaften gesucht werden (Germann et al., 2011).

Bovines Serum Albumin Fraktion V scheint ein angemessener Ersatz für FBS zu sein. Da die Aufbereitung und Extrahierung des bovines Serumalbumins den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte, nahmen wir bovines Serum, das somit auch zu einem gewissen Anteil des genannten Albumins enthielt. Es schnitt in der Kontrollgruppe auch am besten von allen

vorhanden Seren ab. Da es die negativen Komponenten des FBS nicht enthält, und scheinbar mit den Immunzellen der Spezies *Equus* kompatibel ist, könnte es für folgende Experimente mit Equinen Immunzellen eine angemessene Alternative zu FBS sein (Germann et al., 2011).

Es gibt mittlerweile einige wenige Produkte am Markt, um PBMCs FBS-frei zu kultivieren. Um nur einige Produkte zu nennen, die Firma Pan-Biotech produziert Nährmedien aus Schaf-, Mensch- oder Rinderblut. Auch die Firma Lonza bietet Produkte auf Maus- oder Humanblut basierend für die Forschung an PBMCs (3Rs-Centre Utrecht Life Sciences Department of Animals in Science and Society Faculty of Veterinary Medicine) an.

Ein weiterer Punkt der gegen die Verwendung von FBS spricht, ist der Kostenfaktor. Im Durchschnitt kosten 50ml FBS um die 100 Euro, je nach Hersteller. Dazu kommen noch Versandkosten. Zudem ist die Haltbarkeit begrenzt. Das gilt für jegliches Serum, aber der Vorteil liegt bei selbst erzeugtem Serum nicht nur im Preis, sondern auch in der raschen Herstellung. Man benötigt lediglich geronnenes Vollblut und sterile Filter, durch die es möglichst keimfrei gefiltert wird (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Zum Zeitpunkt dieser Bachelorarbeit sind die Forschungen bezüglich equiner PBMCs rar gesät. Dementsprechend ist auch keine Literatur zu equinem Serum als Nährmedium für equine PBMCs vorhanden, aber über die verschiedenen Auswirkungen von Fohlenplasma und dem von adulten Tieren auf die von Monozyten abstammenden Dendritischen Zellen. Da wir in dieser Studie das Serum von adulten Pferden verwendeten, würde man mit Fohlenserum andere Auswirkungen, wahrscheinlich dem FBS ähnliche, positive Proliferationsraten erwarten (Lopez et al., 2020)

Abgesehen von dem humanen Serum schnitten in der jeweiligen Serum Art die Kontrollgruppen ohne Stimulanzen am besten ab. Im Bezug auf die verwendeten Stimulanzen besitzt das equine Serum eindeutig die größte Kapazität zur Reaktion, die größte Wachstumsrate. Auch wenn die Zellen von einem sehr kleinen Ausgangswert nach 24h gestartet sind, proliferieren sie danach sehr stark. Im Vergleich zum FBS erreicht es höhere Werte und scheint somit gleich gut wie FBS, wenn nicht sogar besser zu sein.

## 7 Schlussfolgerung

Da der Rahmen und Umfang dieser Bachelorarbeit beschränkt war, kamen wir zu keinem eindeutigen Ergebnis und es wird somit zu weiteren Untersuchungen zu diesem Thema empfohlen. Zu bedenken ist, dass das equine, das porcine und das humane Serum von adulten Individuen stammt. Scheinbar enthält das fötale bovine Serum Stoffe, welche sich positiv auf die Überlebensrate der Zellen auswirken. Inwieweit sie die Proliferation anregen, konnte in diesem Versuch nicht gesagt werden, da wir hier nur absolute Tod/Lebend- Zahlen feststellen konnten. Es wäre interessant in folgenden Versuchen bovines Serum von adulten Rindern zu verwenden und die Ergebnisse mit fötalem Rinderserum gegenüberzustellen.

Zudem sollten noch Forschungen bezüglich Platelet lysate aus equinem Blut als Nährmedium betrieben werden. Platelet lysate hat eine andere Zusammensetzung als herkömmliches Serum, da es noch Wachstumsfaktoren und andere Substanzen enthält, die sich positiv auf die Proliferation auswirken könnten.

Bezüglich der Auswahl der PBMCs Spender könnte noch genauer erforscht werden, welches Geschlecht und welche Altersgruppe vitalere Zellen besitzt. Hier, in dieser Studie war die Probenanzahl zu gering, um darüber valide Aussagen zu machen.

In folgenden Experimenten wäre es noch interessant, genauere Daten zu den Zelltypen zu sammeln, sprich welche Zellen in welcher Art und Weise proliferieren, da man hier weitere Rückschlüsse über die Arbeit des equinen Immunsystems ziehen könnte. Alles in allem stellt die vorliegende Arbeit jedoch eine wichtige Grundlage für weitere Forschungen auf dem Gebiet der Zellkultur equiner PBMCs dar.

## 8 Zusammenfassung

Die Kultivierung von equinen Immunzellen ist ein noch relativ unerforschtes Thema doch bietet die Kultivierung große Chancen zum Verstehen von equinen Immunreaktionen auf definierte Stimuli. Da diese PBMCs sensible Zellen sind, ist es wichtig, ein optimales Nährmedium zu erzeugen, in dem sie nicht nur möglichst lang leben, sondern auch proliferieren können. Nur mit Zellen, die sich einige Zeit kultivieren lassen, können *in vitro* Forschungen zu immunmodulierenden Effekten funktionaler Futtermittelzusatzstoffen untersucht werden. So kann ein direkter Einfluss von diesen Substanzen auf die Zellen des Immunsystems festgestellt werden, und in dessen Folge einen Einzug in diverse Fütterungskonzepte finden. Normalerweise wird für diese Forschungszwecke bovines fetales Serum genutzt. Dieses ist nicht nur teuer in der Herstellung, sondern beinhaltet auch einige ethisch zu hinterfragende Aspekte.

Nicht nur das Serum, auf denen die PBMCs kultiviert werden, sondern auch der Gerinnungshemmer im Rahmen der Probenentnahme spielt eine wesentliche Rolle. Hier scheint EDTA von Vorteil zu sein.

In jedem der Seren war es möglich, auch nach 48h, lebende PBMCs mit dem beschriebenen Protokoll zu kultivieren. In absoluten Zahlen der lebenden Zellen schneidet eindeutig das fötale bovine Serum am besten ab. Dicht gefolgt wird dieses vom equinen Serum. Grundsätzlich ist es mit jedem der Seren gelungen, lebende equine Immunzellen zu kultivieren, doch die Ergebnisse lassen keinen eindeutigen Schluss auf ein spezielles und optimales Serum zu. Da wir keine signifikanten Unterschiede bei der absoluten Lebendzellzahl feststellen konnten, spricht nichts gegen die Verwendung von alternativen Seren. Aus Kostengründen und auch aus der Tierschutzperspektive empfiehlt es sich für kommende Experimente mit equinem Serum, trotz der guten Ergebnisse des FBS, zu arbeiten, da der Unterschied nicht so groß ist und die Proliferationsrate bei den equinen Zellen sogar besser war, sprich ein schnelleres Wachstum gegeben war.

## 9 Abstract

The cultivation of equine immune cells is still a relatively unexplored topic but offers interesting approaches to understand the equine immune system. Since these PBMCs are sensitive cells, it is important to create an optimal culture medium where they can not only live as long as possible but also proliferate. Only with cells that can be cultivated for some time can *in vitro* research on immunomodulatory effects of functional feed additives be studied. Thus, a direct influence of these substances on the cells of the immune system can be determined, and as a consequence, find its way into various feeding concepts. Usually, bovine fetal serum is used for these research purposes. This is not only expensive to produce, but also contains some ethically questionable components.

Not only the serum on which the PBMCs are cultured, but also the anticoagulant in the course of sample collection plays an essential role. Here EDTA seems to be of advantage.

In each of the sera it was possible, even after 48h, to culture live PBMCs using this method and the protocol described. In absolute numbers of living cells, the fetal bovine serum clearly performs best. This is closely followed by the equine serum. In principle, each of the sera succeeded in culturing live equine immune cells in this way, but the results do not allow a clear conclusion on a specific and optimal, serum. Since we did not find any significant differences in absolute live cell counts, there is no reason not to use alternative sera. For cost reasons and also from the animal welfare perspective, it is recommended to work with equine serum for future experiments, despite the good results of the FBS, since the difference is not so great and the proliferation rate was even better with the equine cells, i.e., faster growth was given.



## 10 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung I</i> Verwandtschaftsbeziehungen der Araber der Familie Mauritsch. Die Stute Diamantina wurde nicht als Spender verwendet, da sie zum Zeitpunkt der Studie nicht mehr lebte. Aldeano ESP 02677 stammt aus einer spanischen Zucht und ist auch im Besitz der Familie Mauritsch. ....	10
<i>Abbildung II</i> Cryotube mit Pferdeblut und Histopaque-1077 -Lösung nach Zentrifugation. Schichtung von oben nach unten: Plasma (gelb), Zellwolke (weiß) und Zellpellet (dunkel). ..	12
<i>Abbildung III</i> Von rechts nach links: humanes Serum, equines Serum, porcines Serum. ....	14
<i>Abbildung IV</i> Vergleich der Proben mit EDTA und Heparin sowie dazugehörige Standardabweichung. Je Probe aus den mit EDTA beschichteten Röhrchen lebten zum Zeitpunkt der ersten Messung $T=0$ durchschnittlich 18 200 000 Zellen, in den mit Heparin versetzten Proben nur 7 670 000 .....	17
<i>Abbildung V</i> Absolute Zellzahlen nach 24h samt Mittelwert und Standardabweichung.....	18
<i>Abbildung VI</i> Lebende Zellen nach 24h samt Standardabweichung im Vergleich .....	19
<i>Abbildung VII</i> Durchschnittlich lebende Zellen in der Kontrollgruppe nach 48h samt Standardabweichung im Vergleich.....	20
<i>Abbildung VIII</i> Durchschnittlich lebende Zellen mit ConA Behandlung nach 48h samt Standardabweichung im Vergleich.....	21
<i>Abbildung IX</i> Durchschnittlich lebende Zellen mit LPS Behandlung nach 48h samt Standardabweichung im Vergleich.....	21
<i>Abbildung X</i> Hier wurde die Wachstumsrate mit den absoluten Zellzahlen je nach Messzeitpunkt kombiniert dargestellt. Die Wachstumsrate bezeichnet das Zellwachstum von 24h auf 28h in Prozent. ....	22

# 11 Literaturverzeichnis

Schmetzer, O. (2009) Immunologie Basics. Elsevier GmbH

Baumgartner, W. (Ed.). (2009). Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere. Parey

Betsou, F., & Ammerlaan, A. (2019, Mai 11). Biospecimen Science of Blood for Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Functional Applications. <https://doi.org/10.1007/s40139-019-00192-8>

Carrick, J. B., & Begg, A. P. (2008, August). Peripheral Blood Leukocytes. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 24(2), 239-259. ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749073908000291>

Dominguez, M., Munstermann, S., De Guindos, I., & Timoney, P. (2015). Equine disease events resulting from international horse movements: Systematic review and lessons learned. *Equine Veterinary Journal*, 48, 641-653. DOI: 10.1111/evj.12523

Germann, A., Schulz, J. C., Kemp-Kamke, B., Zimmermann, H., & von Briesen, H. (2011, September). Standardized Serum-Free Cryomedia Maintain Peripheral Blood Mononuclear Cell Viability, Recovery, and Antigen-Specific T-Cell Response Compared to Fetal Calf Serum-Based Medium. *Biopreservation and Biobanking*, 9(3), 229-236. doi: 10.1089/bio.2010.0033

Grievink, H. W., Tarik, L., Klufft, C., Moerland, M., & Malone, K. E. (2016). Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreservation and Biobanking*, Volume 14. DOI: 10.1089/bio.2015.0104

Hønge, B. L., Petersen, M. S., Olesen, R., Møller, B. K., & Erikstrup, C. (2017, November 1). Optimizing recovery of frozen human peripheral blood mononuclear cells for flow cytometry. *PubMed*. Retrieved April 1, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29091947/>

Jochems CE, van der Valk JB, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim*. 2002 Mar-Apr;30(2):219-27. doi: 10.1177/026119290203000208. PMID: 11971757.

Larsberg F, Sprechert M, Hesse D, Brockmann GA, Kreuzer-Redmer S. Chicken Immune Cell Assay to Model Adaptive Immune Responses In Vitro. *Animals (Basel)*. 2021 Dec 19;11(12):3600. doi: 10.3390/ani11123600. PMID: 34944374; PMCID: PMC8697874.

Lopez BS, Hurley DJ, Giancola S, Giguère S, Hart KA. The effect of foal or adult horse plasma on equine monocyte-derived dendritic cell phenotype and function. *Vet Immunol*

Immunopathol. 2020 Oct; 228:110099. doi: 10.1016/j.vetimm.2020.110099. Epub 2020 Jul 23. PMID: 32717449.

Molenaar-de Backer, M. W. A., Gitz, E., Dieker, M., Doodeman, P., & ten Brinke, A. (2021, April 20). Performance of monocyte activation test supplemented with human serum compared to fetal bovine serum. ALTEX - Alternatives to animal experimentation. Retrieved April 1, 2022, from <https://www.altex.org/index.php/altex/article/view/2025/version/2085>

Naskou, M. C., Sumner, S. M., Chocallo, A., Kemelmakher, H., Thoresen, M., Copland, I., Galipeau, J., & Peroni, J. (2018, March 22). Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. NCBI. Retrieved April 1, 2022, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5863827/>

Okano, S., Hurley, D. J., Vandenplas, M. L., & Moore, J. N. (2006, Jun). Effect of fetal bovine serum and heat-inactivated fetal bovine serum on microbial cell wall-induced expression of procoagulant activity by equine and canine mononuclear cells *in vitro*. PubMed. Retrieved April 1, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16740096/>

Thermo Fisher Scientific Inc. Fetal Bovine Serum, qualified, Australia. Thermo Fisher. Retrieved May 17, 2022, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10099141>

3Rs-Centre Utrecht Life Sciences Department of Animals in Science and Society Faculty of Veterinary Medicine. Fetal Calf Serum Free Database. SCR\_018769. Retrieved April 1, 2022, from <https://www.fcs-free.org/>

van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W. G., Fu, J., Hickman, J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., & Gstraunthaler, G. (2017, Aug 9). Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. PubMed. Retrieved April 1, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28800376/>