

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Klinik für Pferdechirurgie

Leitung: Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med. vet. Florian Jenner, Dipl. ACVS Dipl. ECVS

**Gewinnung von extrazellulären Vesikeln (EVs) aus fetalen ovinen
mesenchymalen Stammzellen und Chondrozyten
mittels Hollow-Fiber Bioreactor – eine Methodenetablierung**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Felix Braun, BSc

Wien, im Mai 2023

Die vorliegende Diplomarbeit wurde in der Klinik für Pferdechirurgie - Abteilung VETERM - unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr.ⁱⁿ med. vet Iris Gerner, PhD und Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med. vet. Florian Jenner, Dipl. ACVS Dipl. ECVS ausgeführt.

Begutachterin: Ass. -Prof. Dr. med. vet. Franziska Dengler

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig unter Anleitung verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

.....

(Datum)

.....

(Felix Braun)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen	IX
Zusammenfassung	XI
Abstract	XIII
1. Literaturübersicht.....	15
1.1. Stammzellen und Chondrozyten	15
1.1.1. Adulte und fetale Stammzellen.....	15
1.1.2. Systematik mesenchymaler Stammzellen	15
1.1.3. MSC – Identifikation	17
1.1.4. Hyaliner Gelenknorpel – Vorkommen, Architektur und Funktion	18
1.1.5. Hyaliner Gelenknorpel – Zusammensetzung und Organisation	19
1.1.6. Osteoarthrose beim Menschen	20
1.1.7. Osteoarthrose beim Pferd	21
1.2. Regenerative Medizin	22
1.2.1. Allgemeines	22
1.2.2. Probleme der cartilaginären Geweberegeneration	23
1.2.3. MSC wirken parakrin	23
1.3. Extrazelluläre Vesikel.....	24
1.3.1. Allgemeines	24
1.3.2. Klassifikation und Biogenese.....	25
1.3.3. Die Rolle von EVs im physiologischen Zusammenhang	28
1.3.4. Die Rolle von EV im Zusammenhang mit Osteoarthritis	28
1.3.5. EVs und miRNA	29
1.3.6. EVs als mögliches diagnostisches Instrument, Biomarker.....	30
1.3.7. Therapeutisches Potenzial von EVs	30

1.3.8. EVs in der Geweberegeneration	31
1.4. Techniken der Zellkultur	33
1.4.1. Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Zellkultur	33
1.4.2. Nachteile und Beschränkungen der 3D-Zellkultur	34
1.4.3. Chemisch definiertes, serumfreies Kulturmedium	34
1.5. Hollow-Fiber Bioreactor Technologie	36
1.5.1. Aufbau des Hohlfaserbioreaktors	36
1.5.2. Beschaffenheit und Selektivität der Hohlfasern	38
1.5.3. Kultivierung im Bioreaktor	38
1.5.3.1. Hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen	39
1.6. Untersuchung der Zellviabilität im Hohlfaser-Bioreaktor	39
1.6.1. Stoffwechsel von Zellen in Kultur	39
1.7. Fragestellung	40
2. Material und Methoden	41
2.1. Aseptische Arbeitstechnik	41
2.2. Herkunft und Isolation von fetalen ovinen MSCs und Chondrozyten	41
2.2.1. Isolierung fetaler oviner MSCs aus Nabelschnurblut	43
2.2.2. Isolierung fetaler oviner Chondrozyten	44
2.3. Zellzählung	45
2.4. Versuche im Monolayer vor Inbetriebnahme des Hohlfaser-Bioreaktors	45
2.4.1. Vergleich der metabolischen Aktivität – MTT-Test	45
2.4.2. Vergleich der Zellproliferation	46
2.4.3. Vergleich des Glucoseverbrauchs im Kulturmedium (MesenCult™)	46
2.4.4. Vergleich des Phänotypes im Monolayer an Tag 1 und Tag 5 in MesenCult™ ...	47
2.5. Inbetriebnahme des Hohlfaser-Bioreaktors	47
2.5.1. Anzahl Bioreaktoren	47
2.5.2. Überprüfung der eingesetzten Medien und Lösungen im NTA	48
2.5.3. Vorkultivieren des Hohlfaser-Bioreaktors	48
2.5.4. Einsäen der Zellen in den Hohlfaser-Bioreaktor	49
2.5.5. Mediumwechsel	49

2.5.6. Bestimmung der Zellzahl und Überprüfung der Zellmorphologie	49
2.6. Bestimmung der Metaboliten und Ernte des Sekretoms	50
2.6.1. Bestimmung von Glucose, Laktat und Ammoniak	50
2.6.2. Ernte des Sekretoms und den darin befindlichen EVs	50
2.6.3. Aufreinigung und Anreicherung der EVs – Tangential – Flow - Filter (TFF)	51
2.6.4. EV Produktion und Messung der Partikel im Monolayer	51
2.6.5. Charakterisierung und Zählung extrazellulärer Vesikel	52
2.6.6. Methoden der Datenanalyse	52
3. Ergebnisse	53
3.1 Ergebnisse aus den Vorversuchen im Monolayer bzw. 96-Well-Platte	53
3.1.1. MTT-Test, Messung der metabolischen Aktivität	53
3.1.2. Vergleich der Zellproliferation	57
3.1.3. Messung der Glucosekonzentration in MesenCult™ von MSCs und Chondrozyten im Monolayer	59
3.1.4. Glucoseverbrauch [mg/dl] pro 100.000 Zellen und Stunde	61
3.1.5. Untersuchung des Phänotyps in MesenCult™ im Monolayer	63
3.2. Ergebnisse aus dem Hohlfaser-Bioreaktor	65
3.2.1. Überprüfung der eingesetzten Medien und Lösungen auf Partikel im NTA	65
3.2.2. Messung nicht adhärenter Zellen und Überprüfung der Zellmorphologie	66
3.2.3. Glucose-, Laktat- und Ammoniakkonzentration im Medium des Bioreaktors von MSCs und Chondrozyten	67
3.2.4. Anzahl Partikel/ml pro 14 Mio. MSCs aus dem Bioreaktor und Monolayer	71
3.2.5. Anzahl Partikel/ml pro 14 Mio. Chondrozyten aus dem Bioreaktor und Monolayer	72
4. Diskussion	74
4.1. Ergebnisse aus den Vorversuchen im Monolayer	74
4.1.1. MTT Test – Metabolische Aktivität und Zellproliferation	74
4.1.2. Glucoseverbrauch von MSCs und Chondrozyten in chemisch definiertem, serumfreiem Medium (MesenCult™)	75
4.2. Ergebnisse aus dem Bioreaktor	77
4.2.1. Überprüfung der eingesetzten Medien und Lösungen auf Partikel im NTA	77

4.2.2. Überprüfung der Zelladhäsion und Zellmorphologie von MSCs im Bioreaktor	77
4.2.3. Messungen der Glucose-, Laktat- und Ammoniakkonzentration im Bioreaktor ..	78
4.2.4 Isolierte Partikel/ml aus dem Bioreaktor und Monolayer	80
Fazit.....	82
Danksagung	83
Literaturverzeichnis.....	84

Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1 Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen.....	17
Abb. 2 Histologischer Querschnitt eines menschlichen Fingergelenks.....	19
Abb. 3 Biogenese von EVs und Interaktion mit Zielzellen	27
Abb. 4 Die drei Theorien des Kokultur-Ansatzes.....	32
Abb. 5 Hohlfaserkartusche verbunden mit Medium Reservoir (1)	37
Abb. 6 Längsschnitt durch eine semi-permeable Hohlfaser	37
Abb. 7 Querschnitt einer Hohlfaser-Bioreaktorkartusche.....	38
Abb. 8 MTT - Test, OD (optische Dichte) (490 nm) von adulten Chondrozyten in DMEM, NutriStem™ und MesenCult™	54
Abb. 9 MTT - Test, OD (optische Dichte) (490 nm) von Chondrozyten in DMEM, NutriStem™ und MesenCult™	55
Abb. 10 MTT - Test, OD (optische Dichte) (490 nm) von MSCs in DMEM, NutriStem™ und MesenCult™	56
Abb. 11 Zellzahl nach vier tägiger Kultivierung in unterschiedlichen Medien.....	57
Abb. 12 Kultivierung von MSCs und Chondrozyten in DMEM (+FBS) für 24 h und anschließend in NutriStem™	58
Abb. 13 Glucosekonzentration [mg/dl] in MesenCult™ des Monolayers von MSCs in unterschiedlichen Zelldichten.....	59
Abb. 14 Glucosekonzentration [mg/dl] in MesenCult™ des Monolayers von Chondrozyten in unterschiedlichen Zelldichten.....	60
Abb. 15 Glucoseverbrauch [mg/dl] pro 100.000 MSCs und Stunde in MesenCult™ im Monolayer.....	62
Abb. 16 Glucoseverbrauch [mg/dl] pro 100.000 Chondrozyten und Stunde in MesenCult™ im Monolayer.....	62
Abb. 17 Aufnahme des Phänotyps von MSCs in MesenCult™. A: Zelldichte 1 Mio., Maßstab: 1000 µm; B: Tote MSCs am Tag 5 (20x Objektiv).....	63
Abb. 18 Aufnahme des Phänotyps von Chondrozyten in MesenCult™. A: Zelldichte 1 Mio., Maßstab 1000 µm; B: Chondrozyten mit verändertem Phänotyp am Tag 5 (40x Objektiv)..	64
Abb. 19 Messung der Partikel/ml \leq 200 nm von A: STEMMac™ ohne Supplement und STEMMac™ mit Supplement B: HEPES und Water High Quality sterile.	65

Abb. 20 Nicht an die Hohlfaser Membran adhärerten MSCs. A: Maßstab 400 µm, B: Maßstab 100 µm.	66
Abb. 21 Konzentrationen von Glucose im Medium vor und nach Verwendung sowie Laktat nach Verwendung im MSCs - Bioreaktor.	68
Abb. 22 Konzentrationen von Glucose im Medium vor und nach Verwendung sowie Laktat nach Verwendung im Chondrozyten - Bioreaktor.	68
Abb. 23 Glucoseverbrauch [mg/dl] pro 100.000 MSCs und Stunde im Bioreaktor.	69
Abb. 24 Glucoseverbrauch [mg/dl] von 100.000 Chondrozyten pro Stunde im Bioreaktor.	69
Abb. 25 Messung der Ammoniak-Konzentration vor und nach Einsatz des Mediums im Bioreaktor.	70
Abb. 26 Von MSCs stammende isolierte Partikel/ml aus dem Bioreaktor und Monolayer. ..	71
Abb. 27 Von Chondrozyten stammende isolierte Partikel/ml aus dem Bioreaktor und Monolayer.	72

Tabellen

Tab. 1 Klassifikation von EVs.	26
Tab. 2 Vergleich serumhaltiger Medien und chemisch definierten, serumfreier Medien	35
Tab. 3 Ausrüstung	42
Tab. 4 Hilfsstoffe.	42
Tab. 5 Verbrauchsmaterial.	43

Abkürzungen

ACI	Autologe Chondrozytenimplantation
ARF6	ADP-Ribosylierungsfaktor 6
CA	Celluloseacetat
Ca	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
cHFB	zylindrische Hohlfaserbioreaktoren
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECS	Extracapillärer Raum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
EV	Extrazelluläre Vesikel
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fötale Kälberserum
FGF-1	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-1
FLS	Fibroblastenähnliche Synoviozyten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	Hohlfaser
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
MFGE8	Milk fat globule-EGF factor 8 protein
Mg	Magnesium
miRNA	micro Ribonukleinsäure
MMP	Matrix - Metalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MVB	Multi Vesicular Bodies
MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PDCD6IP	Programmed cell death 6 interacting protein
PES	Polyethersulfon
PGLA	Polymilchsäure-co-glykolsäure
PP	Polypropylen
RAB	Ras-like protein
rHFBs	rechteckige Hohlfaserbioreaktoren
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung
TFF	Tangential Flow Filter
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor TGF- β
TSG101	Tumor susceptibility gene 101
TSPN	Tetraspanine

Zusammenfassung

Neben der Möglichkeit Informationen durch direkten Zell-Zell-Kontakt auszutauschen, sind Zellen auch in der Lage durch die Abgabe von extrazellulären Vesikeln (EVs) miteinander zu kommunizieren. Wurden diese mit diverser molekularer Fracht (z.B. Proteine, Lipide und mRNA) beladenen membranumhüllten Vesikel zunächst als Störfaktoren in Diagrammen der Durchflusszytometrie betrachtet, änderte sich mit dem heutigen Wissen um ihre spezifischen Funktionen in der Zellkommunikation und dem Transport bioaktiver Moleküle die Einstellung der Wissenschaft gegenüber EVs grundlegend. Ihre Beteiligung an physiologischen wie auch pathologischen Prozessen, darunter auch die Entstehung einer Osteoarthritis, macht EVs zu potenziellen Kandidaten innerhalb der therapeutischen Intervention. Eine der größten Herausforderungen ist es, EVs in zu Forschungszwecken ausreichender Menge sowie in weiterer Folge zu Therapiezielen (mit hohem Reinheitsgrad) zu produzieren. Limitierende Faktoren stellen dabei die klassischen Methoden der Zellkultur dar. Statt wie bisher, EVs durch die Verwendung zahlreicher Zellkulturflaschen, Medien, Personal und Zeit arbeitsintensiv und teuer zu produzieren, verspricht die Verwendung eines Bioreaktors deutlich größere Mengen an EVs bei kleinerem Arbeitsaufwand bereitzustellen. Ein Beispiel hierfür stellt ein sogenannter Hohlfaser-Bioreaktor dar. Durch das Vorliegen eines durch semipermeable Hohlfasern abgedichteten Kompartiments, dem sogenannten Extrazellulärraum, erfolgt eine kontrollierte Trennung zwischen zu kultivierenden Zellen und eingesetztem Medium. Über einen definierten Molekulargewichts-Cut-Off der Hohlfasern erhalten zu kultivierende Zellen Nährstoffe bestimmter Größe und geben Abfallprodukte wie Laktat und Ammoniak zurück ins Medium. Eine Anreicherung gebildeter EVs findet bei gleichzeitiger Abschirmung vor im Medium enthaltenen Serumbestandteilen statt. Der kapillare Aufbau erlaubt durch sein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis die Kultivierung in hohen Zelldichten.

Innerhalb der regenerativen Orthopädie stellen EVs aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) und Chondrozyten potenzielle Kandidaten zur zukünftigen Behandlung einer Osteoarthritis dar. Um EVs aus beiden genannten Zellen in ausreichenden Mengen produzieren zu können, bedarf es einer erfolgreichen Langzeitkultivierung im vorgestellten Hohlfaser-Bioreaktor.

Diese Diplomarbeit ist Teil eines groß angelegten Projekts mit dem Ziel extrazelluläre Vesikel auf ihr Potential als Therapeutikum für die Behandlung von Osteoarthritis zu testen. Im Zuge dieser Arbeit soll die erfolgreiche Kultivierung fetaler oviner MSCs und Chondrozyten im Hohlfaser-Bioreaktor anhand spezifischer Parameter untersucht werden. Da in der Literatur

noch keinerlei Referenzwerte bezüglich einer erfolgreichen Kultivierung genannter primärer Zellen im Bioreaktor vorliegen und um Versuchsergebnisse mit anderen Bioreaktor-erfahrenen Laboratorien (darunter die Partnerfirma Evercyte GmbH, Wien) vergleichen zu können, wurden vor Inbetriebnahme Vorversuche im Monolayer durchgeführt um den Effekt chemisch definierter serumfreier Medien hinsichtlich Phänotyp, metabolischer Aktivität, Zellproliferation und Glucoseverbrauch der Zellen zu vergleichen. Entsprechend der erhobenen Ergebnisse, stellen MesenCult™ und NutriStem™ (zwei serumfreie Medien, die im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden) zur Langzeitkultivierung von fetalen ovinen MSCs und Chondrozyten im Bioreaktor keine optimalen Medien dar, sodass die Inbetriebnahmen der Bioreaktoren mit institutserprobtem StemMACS™ MSC Expansion Media XF durchgeführt wurden. Erste Messungen des Glucoseverbrauchs sowie ein Anstieg von Laktat und Ammoniak im Medium deuten auf eine erfolgreiche Kultivierung im Bioreaktor hin. Parallel konnten erste EV-Kollektionen durchgeführt werden und deren Gehalt nach einer Querfiltration (Tangential-Flow-Filter) im Nanoparticle-Tracking-Analyzer bestimmt werden.

Abstract

In addition to being able to exchange information through cell-cell contact directly, cells are also able to communicate with one another by releasing extracellular vesicles (EVs). While these membrane-enveloped vesicles, which are loaded with diverse molecular cargo (e.g. proteins, lipids and mRNA), were initially regarded as interfering factors in flow-cytometry diagrams, the scientific view of EVs has changed fundamentally with today's knowledge of their specific functions in cell communication and the transport of bioactive molecules. Their involvement in both physiological and pathological processes makes EVs potential candidates for therapeutic intervention. However, major challenge in this field is to produce EVs in sufficient quantities for research purposes and subsequently for therapeutic purposes (with a high degree of purity). The limiting factors are the classic methods of cell culture. Instead of producing EVs in a labor-intensive and expensive manner which requires numerous cell culture flasks, huge amounts of media, and lots of personnel and time, the use of bioreactor-systems promise to provide significantly larger quantities of EVs with less work. An example of this is a so-called hollow-fiber bioreactor. The capillary structure of this bioreactor allows the cultivation of high cell numbers on the outer surface of the capillaries (Extracellular space (ECS)). The high surface-to volume ratio facilitates accumulation of high EV-numbers. At the same time the bioreactor provides shielding from "contamination" with serum components contained in the culture medium which is pumped through the hollow-fibres. Cells cultured in the ECS receive only nutrients of a certain size due to a defined molecular weight cut-off of the hollow fibers whose walls are built of semipermeable membranes. Waste products such as lactate and ammonia are returned into the medium. In regenerative orthopedics, EVs from mesenchymal stem cells and chondrocytes are potential candidates for future treatments of osteoarthritis. In order to produce EVs from both of these two cell types in sufficient quantities for research purposes and later for therapeutic purposes, successful long-term cultivation in the hollow-fiber bioreactor is required.

This diploma thesis is part of a large-scale project with the goal of producing extracellular vesicles in sufficient quantities. In the course of this work, the successful cultivation of fetal ovine MSCs and chondrocytes in the hollow-fiber bioreactor was investigated and optimized, because the literature does not yet offer any reference values for a successful cultivation of primary cells in the bioreactor. In addition we tested different culture conditions in order to be able to compare our results with results obtained by our the partnercompany (Evercyte GmbH, Vienna). According to our results, MesenCult™ and NutriStems™ (two serum free media which

were tested within the course of this thesis) do not qualify as optimal media for the long-term cultivation of fetal ovine MSCs und chondrocytes in the bioreactor. StemMACS™ MSC Expansion Media XF, which had been tested before was identified as best medium to be used. Measurements of the glucose consumption as well as the increase of lactate and ammonia in the medium indicate a successful cultivation in the bioreactor. At the same time, the first EV collections could be carried out and their concentration after cross-filtration (tangential flow filter) was measured in a nanoparticle tracking analyzer.

1. Literaturübersicht

1.1. Stammzellen und Chondrozyten

1.1.1. Adulte und fetale Stammzellen

Adulte Stammzellen, also Stammzellen nach der Geburt, sind undifferenzierte Zellen, die in einem ansonsten differenzierten Gewebe oder Organ vorkommen. Ihre multipotente Eigenschaft, also die Fähigkeit sich in eine Vielzahl von Abkömmlingen zu differenzieren, dient der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen ab- und aufbauenden Prozessen im Körper. Als fetale Stammzellen werden Stammzellen während der Fetaphase bezeichnet. Diese Zellen haben ein Potenzial, das im Übergang zwischen den embryonalen und adulten Stammzellen liegt. Sie können sich nicht mehr wie die pluripotenten embryonalen Stammzellen in Zellen der drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm und Mesoderm) differenzieren, wachsen jedoch schneller als adulte Stammzellen (Schöler 2004, VETERM 2022).

Im Vergleich zur adulten Form weisen fetale Stammzellen ein verbessertes Homing, eine größere Plastizität, geringe Immunogenität sowie ein angeblich größeres Differenzierungspotential auf. Dennoch herrscht Uneinigkeit, ob fetale Stammzellen *in vivo* in der Lage sind, Zellen aller drei Keimblätter hervorzubringen (O'Donoghue und Fisk 2004).

Anhand spezifischer Stammzellmarker auf der Zelloberfläche können sowohl fetale als auch adulte Stammzellen in eine hämatopoetische und mesenchymale Gruppe von Stammzellen unterteilt werden. Hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind in der Lage sich in alle Zellen des Blut- und Immunsystems zu differenzieren, während MSCs Zellen des Stütz- und Bindegewebes hervorbringen können (Verfaillie et al. 2002, O'Donoghue und Fisk 2004).

1.1.2. Systematik mesenchymaler Stammzellen

Friedenstein et al. (1974) beschrieben erstmalig mesenchymale Vorläuferzellen als spindelförmige, adhären-wachsende, fibroblasten-ähnliche Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen. Wie der Begriff „mesenchymale Stammzelle“ bereits beschreibt, handelt es sich um Stammzellen, die zur Regeneration mesenchymaler Gewebe fähig sind. Demzufolge erneuern

die ausdifferenzierten Tochterzellen in Form von Myozyten, Adipozyten, Fibrozyten, Chondrozyten und Osteozyten alle Formen von Binde- und Stützgewebe, quer gestreifte Muskulatur, glatte Muskelzellen sowie Gefäßendothelien (Abb. 1) (Schöler 2004, Mobasher et al. 2009). Jiang et al. (2002) konnten in ihrer Arbeit beweisen, dass MSC *in vitro* auch in der Lage sind Zellen des ektodermalen, entodermalen und mesodermalen Keimblattes hervorzubringen.

Die vielversprechendste Quelle zur Gewinnung von MSCs stellt das Knochenmark mit einem Titer von 0,001 bis 0,01% der Mononukleären Zellen dar (Chen et al. 2008). Als geeignete Entnahmestellen fungieren das Sternum oder die Crista iliaca und das Tubae coxae des Hüftknochens. Alternativ können weitere mesenchymale Gewebe wie peripheres Blut (Kuznetsov et al. 2001), Skelettmuskulatur (Bosch et al.), Synovialmembran (de Bari et al. 2003), Synovialflüssigkeit (Jones et al. 2004), Sehngewebe (Salingcamboriboon et al. 2003), Fettgewebe (Zuk et al. 2001), Nabelschnurblut (Kögler et al. 2004) und Nabelschnurgewebe (Wang et al. 2004) herangezogen werden. Ob MSC aus unterschiedlichen Quellen eines Organismus ident sind, ist bis heute umstritten. Zwar zeigen MSCs unterschiedlicher Herkunft ähnliche phänotypische Eigenschaften, weisen jedoch ein heterogenes Proliferations- und Differenzierungspotential unter standardisierten Kulturbedingungen auf. Beispielsweise tendieren aus der Synovialmembran gewonnene hMSCs zur Differenzierung zu Chondrozyten (Sakaguchi et al. 2005).

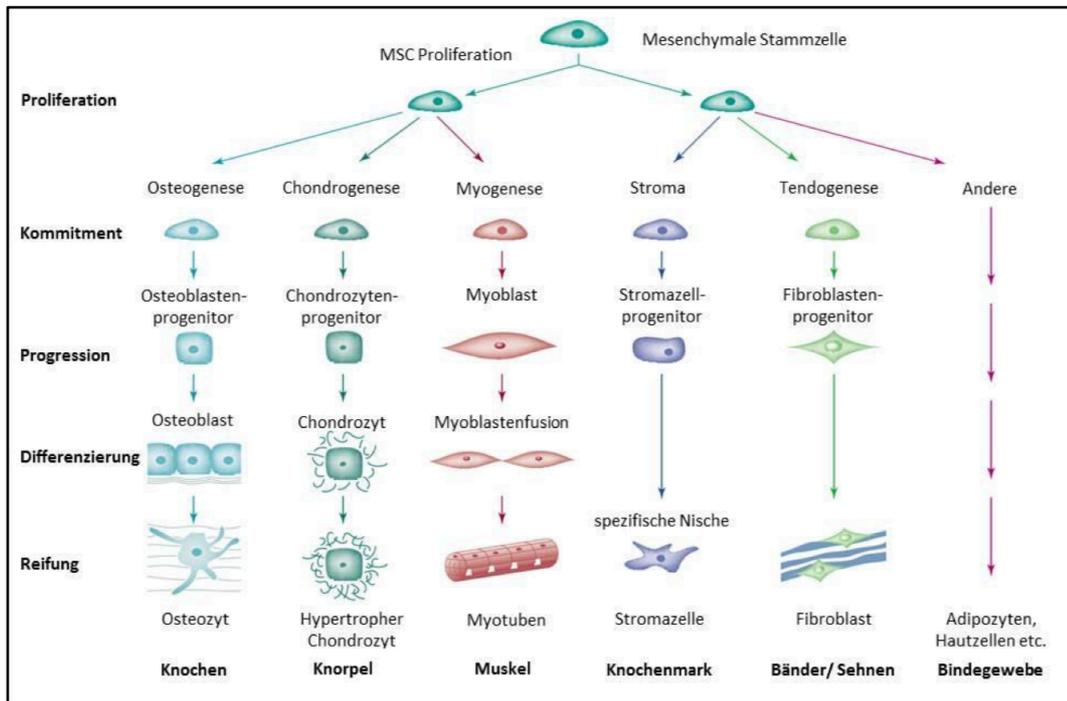


Abb. 1 Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen.

Abbildung aus Caplan und Bruder (2001).

1.1.3. MSC – Identifikation

Die genaue Identifizierung isolierter Zellen als mesenchymale Stammzellen anhand eines spezifischen Markers ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Um eine Zelle als eine mesenchymale Stammzelle definieren zu dürfen, wurden daher von der „International Society for Cellular Therapy“ (ISCT) folgende Kriterien festgelegt: Plastikadhärentes Wachstum unter standardisierten Zellkulturbedingungen, die Expression der Oberflächenantigene CD73- (Endo-5-Nukleotidase), CD90 (Thy-1), CD105 (Endoglin), keine Expression der hämatopoetischen Marker CD14, CD34 und CD45 sowie eine tripotente mesenchymale Differenzierungsfähigkeit (adipogen, chondrogen und osteogen) (Dominici et al. 2006). Es ist zu berücksichtigen, dass MSCs tierischer Herkunft nicht mit den verfügbaren humanen Antikörpern zur Identifikation der Oberflächenmarker interagieren, weshalb die Möglichkeiten der Identifizierung limitiert sind (Koch et al. 2008).

1.1.4. Hyaliner Gelenknorpel – Vorkommen, Architektur und Funktion

Hyaliner Knorpel findet sich neben seinem Vorkommen in den respiratorischen Organen (Nase, Larynx, Trachea, Bronchien), den Bogen- und Sternumabschnitten der Rippen vor allem als hyaliner Gelenknorpel in den synovialen Gelenken wieder (Bruns und Steinhagen 2000). Bei Wirbeltierembryonen bildet hyaliner Knorpel in Form eines Primordialskeletts die Vorstufe des knöchernen Skeletts. Er ermöglicht überdies in den Epiphysenfugen das Längenwachstum der Röhrenknochen (Welsch 2005).

Reifer Gelenknorpel ist ein avaskuläres und hypozelluläres Bindegewebe. Eine lymphatische oder nervale Versorgung ist nicht vorhanden (Bruns und Steinhagen 2000). Er befindet sich als weiß-bläulich glänzender Überzug an den Enden echter gelenkbildender Knochen. Durch seine kraftverteilende Wirkung reduziert er die Beanspruchung der am Gelenkaufbau beteiligten anatomischen Strukturen. Die einzigartige Kombination aus Steifheit, Elastizität und einem niedrigen Reibungskoeffizienten schützt den darunterliegenden subchondralen Knochen gegenüber einwirkenden Druckbelastungen (Mow et al. 1984).

Als strukturgebende Bestandteile des Gelenknorpels fungieren zelluläre und extrazelluläre Komponenten. Die zelluläre Einheit wird von den Knorpelzellen, den sogenannten Chondrozyten gebildet. Betrachtet man einen histologischen Querschnitt durch die Gelenkoberfläche fällt eine Zonengliederung von der Knorpeloberfläche bis zum subchondralen Knochen auf. Die zonalen Übergänge sind fließend und können in vier Schichten eingeteilt werden, wobei Dichte, Form und Ausrichtung der Chondrozyten variieren. Eine dünne Superfizialschicht - auch Tangentialfaserzone genannt - bildet die Gelenkoberfläche, gefolgt von einer Radiärzone (Mittelzone), einer tiefen Zone und der Schicht des mineralisierten Knorpels.

Der tangentielle Verlauf der zahlreichen dünnen Fasern sowie die spindelförmigen Chondrozyten kennzeichnen die oberflächliche dünne Tangentialfaserzone. Gleichzeitig weist diese Zone die höchste Zugfestigkeit auf, um Scherkräften während der Gelenkbewegung standhalten zu können (Kempson et al. 1973). In der Radiär- und tiefen Zone nehmen die jetzt rundlichen Chondrozyten in Form von isogenen Gruppen eine säulenartige Formation ein. Der Übergang vom mineralisierten Knorpel in den subchondralen Knochen erfolgt zapfenartig (Bruns und Steinhagen 2000).

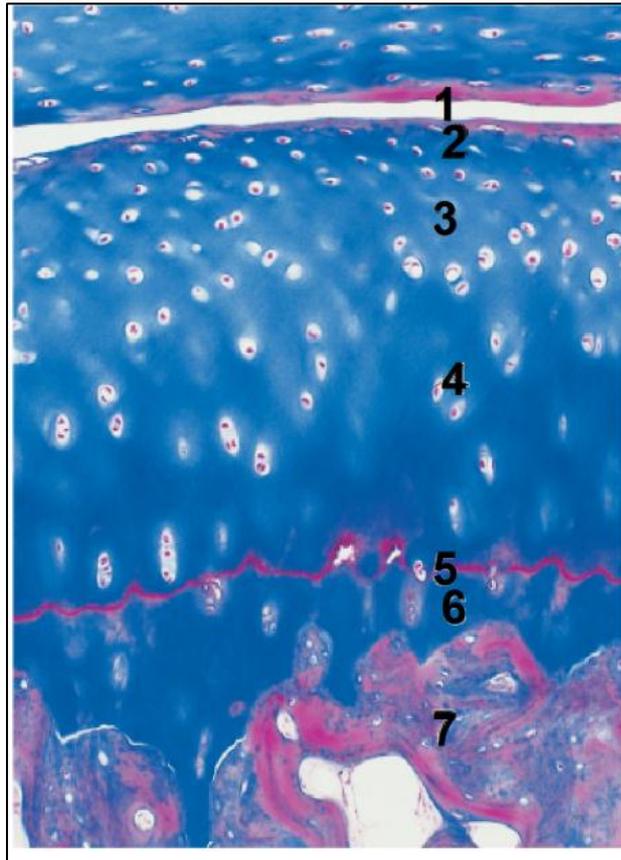


Abb. 2 Histologischer Querschnitt eines menschlichen Fingergelenks.

Darstellung eines Vertikalschnitts durch den Gelenkknorpel. Masson-Trichrom-Färbung eines Schnitts durch ein menschliches Fingergelenk (250x). 1 Gelenkspalt; 2 Superficialzone; 3 Transitionalzone; 4 Tiefe Radialzone; 5 Grenzlinie (Tide mark); 6 Zone des kalzifizierten Knorpels; 7 Subchondraler Knochen. Aus Welsch (2005).

1.1.5. Hyaliner Gelenkknorpel – Zusammensetzung und Organisation

In der biochemischen Zusammensetzung von Gelenkknorpel überwiegt mit einem Gesamtvolumen von 70-80 % das Wasser. 20–30 % des Gesamtvolumens werden von organischen und anorganischen Bestandteilen wie Kollagenen, Proteoglykanen, Proteinen, Glykoproteinen und Lipiden gebildet. Diese Bestandteile bilden die sogenannte extrazelluläre Matrix (EZM) des Gelenkknorpels. Die restlichen 1–3 % des Gesamtvolumens werden von den postmitotischen Chondrozyten und deren teilungsfähigen Vorläuferzellen, den Chondroblasten gebildet (Bruns und Steinhagen 2000). Erstere sind die spezifischen Zellen reifen Knorpelgewebes. Ihre Aufgabe besteht in der Synthese, Sezernierung und Organisation

der EZM, aber auch deren regulierten Abbau durch die Sekretion verschiedener Metalloproteinasen, lysosomale Degradation und Endozytose (Muir 1995).

Kollagene, sogenannte Strukturproteine, bilden den Hauptbestandteil der Trockenmasse der EZM und garantieren dem Knorpel seine Festigkeit. Ca. 90–95 % des Kollagens liegt als Typ II – Kollagen vor. Mit einem geringen Anteil finden sich auch die Typen VI, IX, X und XI wieder. Typ VI – Kollagen spielt eine Rolle in der Verbindung zwischen Zelle und EZM, Typ IX und XI sind essentiell für eine stabilisierende Quervernetzung im Kollagengerüst (Bruns und Steinhagen 2000).

Proteoglykane stellen – wie die Wortkomposition bereits beschreibt – eine Verknüpfung von einem zentralen Proteinanteil (core protein) mit mehreren Polysacchariden dar. Im Gelenkknorpel können mehrere Proteoglykane über sogenannte Verbindungsproteine (link proteins) an Hyaluronsäure gebunden werden, sodass hochmolekulare und komplexe Proteoglykanpolymere entstehen. Als Polysaccharidanteil kommen vorwiegend die Glykoaminglykane Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat vor. Es handelt sich um sulfatierte Glykosaminoglykane die auch aufgrund ihrer gallertartigen Eigenschaft als Mucopolysaccharide bezeichnet werden. Im physiologischen Medium weisen Glykosaminoglykane ionisierte bzw. negativ geladene Carboxyl- und Sulfatgruppen als funktionelle Gruppen auf und liegen als Polyanionen vor. Um Neutralität bezüglich der negativen Ladungen zu gewährleisten, werden Ionenbindungen mit Ca^{2+} und Na^+ aus dem interstitiellen Wasser eingegangen. Der dadurch entstehende osmotische Gradient führt zur hohen Wasserbindungskapazität der Glykosaminoglykanen (Bruns und Steinhagen 2000).

1.1.6. Osteoarthrose beim Menschen

Die Osteoarthrose (OA) ist weltweit die häufigste Gelenkerkrankung des erwachsenen Menschen (Felson 1988). Obwohl viele Fälle einer OA mild verlaufen, stellt die Erkrankung neben Diabetes und ischämischen Herzkrankheiten eine der größten Gesundheitsprobleme der Menschheit dar. Als Ursache der steigenden Prävalenz wird ein hoher „body mass index“ sowie die immer höhere Lebenserwartung angesehen (Wollheim und Burmester 2003). Kennzeichen dieser arthrotischen Erkrankung sind progressive Umbauprozesse der anatomischen Strukturen im Gelenkspalt, beginnend mit der Zerstörung des hyalinen Gelenkknorpels und in weiterer Folge der Freilegung des darunterliegenden subchondralen Knochens. Der Abbau der hyalinen Knorpelstruktur erfolgt vorwiegend durch die Störung der

kartilaginären Homoöstase. Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen auf- und abbauenden Prozessen innerhalb dieser Region führt zu einer Demontierung von den von Chondrozyten gebildeten extrazellulären Matrix-Molekülen, wie Proteoglykanen und Kollagenen (v.a. Typ II-Kollagen), einschließlich der Zellen selbst, welche für einen funktionsfähigen Gelenkknorpel verantwortlich sind (Malemud und Goldberg 1999). Beschädigtes Knorpelgewebe zeigt aufgrund avaskulärer und alymphatischer Bedingungen so gut wie keine eigenen Kapazitäten der Selbstheilung sowie eine limitierte Regenerationsfähigkeit osteochondraler Defekte. Die Nährstoffversorgung von Zellen im Gelenkspalt erfolgt ausschließlich per Diffusion durch die von Synoviozyten gebildete synoviale Gelenkflüssigkeit (Shapiro et al. 1993). Ein gängiges Tiermodell für dieses orthopädische Krankheitsbild ist das Schaf, welches bereits erfolgreich in der Erforschung der Pathogenese und Therapie von Osteoarthrose in den Hüft-, Knie- und Karpalgelenken eingesetzt wurde (Burger et al. 2007, Mastbergen et al. 2008, Orth et al. 2014).

1.1.7. Osteoarthrose beim Pferd

Mit einem Anteil von ca. 60 % stellen degenerative Gelenkerkrankungen wie z.B. OA eine Hauptursache für Lahmheiten bei Pferden dar. Da bei Pferden - im Gegensatz zur Humanmedizin - endoprothetischer Gelenkersatz als Therapieform im Endstadium (noch) nicht einsetzbar ist, ist man bemüht, biologische Verfahren zur Regeneration osteochondraler Defekte zu entwickeln. Neben der seit 20 Jahren eingesetzten autologen Chondrozytenimplantation (ACI) zur Therapie großflächiger Knorpeldefekte (Fritz 2003), eröffnet der Einsatz aktiver Biomoleküle neue Möglichkeiten der zellfreien Therapie (Richter und Diederichs 2009).

Im gesunden Gelenkknorpel besteht ein Gleichgewicht zwischen Anabolismus und Katabolismus, also zwischen aufbauenden und abbauenden Prozessen. Ein Funktionieren dieses Wechselspiels ist entscheidend für die strukturelle und funktionelle Erhaltung der EZM über die gesamte Lebensspanne eines Individuums (Goldring und Goldring 2004). Durch das Einwirken anormaler Umwelteinflüsse (Fehlbelastung, Achsenverschiebungen, Fehlfütterungen) aber auch aufgrund genetischer Ursachen kommt es durch die Freisetzung von entzündungsfördernden Faktoren zu Veränderungen des homöostatischen Gleichgewichts mit Entstehung einer OA. Im Zuge des Fortschreitens einer OA werden Chondrozyten und andere Gewebe aktiviert, was zu einem Nettoabbau der EZM des Knorpels führt. Das Frühstadium einer OA ist durch einen Aggrekanasen-induzierten

Proteoklykanverlust definiert, während im Spätstadium der Abbau des Kollagengerüsts kennzeichnend ist. Das Spätstadium wird durch verschiedene Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) induziert, die wiederum den irreversiblen Kollagenabbau mit Chondrozyten-Apoptose auslösen. Letztendlich ist die funktionelle Fähigkeit des Gewebes unwiderruflich geschädigt, sodass eine Reparatur bzw. Regeneration unmöglich ist (Esa et al. 2019).

1.2. Regenerative Medizin

1.2.1. Allgemeines

Die regenerative Medizin umfasst Therapieformen, die auf die Wiederherstellung der physiologischen Funktionen von zerstörten bzw. degenerierten Zellen oder Geweben mittels Stimulation von körpereigenen Regenerationsprozessen abzielt.

Als therapeutische Strategien der regenerativen Orthopädie werden Zelltherapien, Tissue Engineering sowie zellfreie Therapien voneinander unterschieden. MSC-Therapien gehören zu den zellhaltigen Therapien und werden insbesondere bei Erkrankungen des Fesseltrageapparates und der Beugesehnen, aber auch bei Entzündungen synovialer Strukturen und OA eingesetzt. Hierbei macht man sich die regenerationsfördernden Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen in der orthopädischen Pferdemedizin zunutze. Bisherige Therapieansätze zur Behandlung von Gelenkserkrankungen wie OA sind entweder medikamenteller oder chirurgischer Natur. Bei der medikamentellen Therapie werden vorwiegend systemisch nichtsteroidale Antiphlogistika oder Glukokortikoide bzw. Produkte aus Hyaluronsäure intraartikulär verabreicht. Die chirurgische Therapie umfasst eine arthroskopische Spülung des Gelenks, wobei die mit Entzündungsprodukten (z.B. Interleukin-1) angereicherte Synovialflüssigkeit entfernt wird. Gleichzeitig kann über den operativen Eingriff ein Débridement des degenerativ veränderten Knorpels durchgeführt werden. Jedoch vermag bis heute keine der Methoden eine Heilung der OA sicherzustellen.

1.2.2. Probleme der cartilaginären Geweberegeneration

Die mangelnde Regenerationstendenz des Knorpels hängt mit seiner besonderen Anatomie zusammen. Eine Vaskularisation des hyalinen Gelenkknorpels ist nicht gegeben. Eine lymphatische oder nervale Versorgung ist nicht bekannt. Die Versorgung des Knorpels mit Nährstoffen erfolgt durch die Gelenkschmiere, die sogenannte Synovia, welche den Knorpel durch Diffusion und „mechanische Stoffkonvektion“ ernährt. Verglichen mit anderen Bindegeweben führen diese Umstände zu der Problematik, dass im Falle einer Knorpelverletzung eine kaskadenartigen Entzündungsreaktion ausbleibt, die zu einer Migration von Zellen mit regenerativer Potenz führen würde (Bruns und Steinhagen 2000).

1.2.3. MSC wirken parakrin

Anfänglich wurde angenommen, dass bei einer auf MSCs basierender Zelltherapie, die Zellen in die Läsion einwandern und sich dort in die Zellen des zu behandelnden Gewebes differenzieren wodurch das betroffene Gewebe regeneriert wird (Börger et al. 2015). Allerdings konnten in mehreren präklinischen *in vivo* Studien nur geringe Titer an MSCs am Wirkungsort nachgewiesen werden. Vielmehr verbleiben die Zellen scheinbar nur lange genug am Wirkungsort um einen parakrinen Effekt zu entfalten (Waszak et al. 2012, Zhu et al. 2013). Dass MSCs einen therapeutischen Effekt erzielen können, ohne selbst im beeinträchtigten Gewebe präsent zu sein, konnte mit einer Reduzierung der Myokardinfarktgröße durch die Applikation von MSCs – Sekretom (Gesamtheit aller von einer Zelle freigesetzten Proteine und Metaboliten) bzw. konditioniertem Medium in einem myokardialen Infarktmodell gezeigt werden (Timmers et al. 2008, 2011).

Bei der Suche nach den aktiven Faktoren, welche die therapeutische Wirkung von MSCs-konditioniertem Serum im myokardialen Infarktmodell ausmachen, konnte die Gruppe von Lai Ruenn Chai eine Anreicherung kleiner phospholipidhaltiger Partikel (30–150 nm), sogenannter Exosomen im Medium nachweisen (Lai et al. 2010).

1.3. Extrazelluläre Vesikel

1.3.1. Allgemeines

Die Zell-zu-Zell-Kommunikation ist ein essentieller Bestandteil aller mehrzelligen Organismen. Eine Übermittlung von Informationen zwischen den Zellen kann durch die Sekretion löslicher Faktoren, durch direkte Interaktion aber auch durch die Freisetzung von membranabgeleiteten Vesikeln, sogenannte extrazelluläre Vesikel (EVs), erfolgen. EVs dürfen nicht mit dem Begriff „Sekretom“ verwechselt werden. Im Gegensatz zum Sekretom, welches die Gesamtheit aller von einer Zelle in den extrazellulären Raum sezernierten Stoffe definiert, stellen EVs als sogenannte Membranpartikel unterschiedlichen Durchmessers und Inhaltes „nur“ einen elementaren Bestandteil des Sekretoms selbst dar (siehe Klassifikation und Biogeneseweg). Erstmals wurden EVs vor ca. 40 Jahren von zwei unabhängigen Gruppen beschrieben, nachdem sie die Freisetzung von Vesikeln aus „Multi Vesicular Bodies“ aus Retikulozyten in den extrazellulären Raum beobachteten (Pan und Johnstone 1983, Harding et al. 1984). Seitdem wurden von fast allen Säugetierzelltypen einschließlich Stammzellen (Lai et al. 2011), primären Zellen des Immun- und Nervensystems (Guescini et al. 2010) sowie aus Krebszelllinien (Al-Nedawi et al. 2008), aber auch aus unterschiedlichen Körperflüssigkeiten, EVs isoliert. Ihre Bedeutung in der interzellulären Kommunikation – via Transfer von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren – wurde 1996 von Raposo et al. beschrieben und seitdem in vielen weiteren Studien belegt (Théry et al. 2009).

Der derzeitige Wissenstand bezüglich Eigenschaften und Funktionen von EVs verleiht ihnen eine Schlüsselrolle in der Regulierung von physiologischen Prozessen wie zum Beispiel Stammzellerhaltung, Gewebereparatur, Regulation immunologischer Prozesse und Blutgerinnung, aber auch in der Entstehung pathophysiologischer Prozesse (El Andaloussi et al. 2013). Das Innehaben wichtiger Schlüsselfunktionen macht EVs zu potentiellen Kandidaten neuer Therapien. Neue Erkenntnisse weisen darauf hin, dass EVs als therapeutisches Agens direkt in der Geweberegeneration und zur Modulation der Immunantwort eingesetzt werden können. Wie oben bereits beschrieben, konnte die Gruppe von Lai Ruenn Chai eine durch MSCs-EVs induzierte Geweberegeneration im myokardialen Infarktmodell nachweisen (Lai et al. 2011).

Schließlich besitzen EVs neben der informationsvermittelnden Funktion innerhalb der Zellkommunikation das Potential als Vehikel für Arzneimittel zu fungieren (Zhuang et al. 2011).

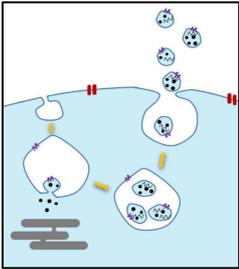
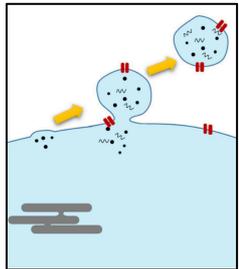
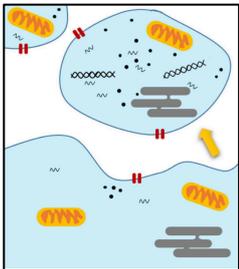
1.3.2. Klassifikation und Biogenese

EVs werden entsprechend ihres zellulären Ursprungs (Biogenese) und/oder aufgrund ihrer biologischen Funktion klassifiziert (siehe Tab. 1). Bezüglich ihrer Biogenese werden EVs in die drei Hauptklassen Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körperchen eingeteilt.

Bei Exosomen und Mikrovesikeln handelt es sich um von der Zelle stammende Vesikel, die von einer Lipiddoppelschicht eingeschlossen sind und einen Durchmesser zwischen 30 – 1000 nm aufweisen. Im Gegensatz zu den Mikrovesikeln, welche durch Knospung von der Zellemembran entstehen, werden Exosomen über den endosomalen Weg in Form von sogenannten „Multivesicular Bodies“ (MVB) generiert (siehe Abb. 3). Beide Arten von EVs enthalten zytoplasmatische Proteine, bestimmte Lipide und Ribonukleinsäuren (RNA). Im Unterschied zu Mikrovesikeln weisen Exosomen zusätzlich bestimmte typische Komponenten auf (siehe Tab. 1). Apoptotische Körperchen weisen einen Durchmesser von 500 – 2000 nm auf und entstehen durch Bläschenbildung der apoptotischen Zelle. Die Membran der Körperchen ist reich an Phosphatidylserin und ihre Fracht besteht aus Zellorganellen und Zellkernbestandteile der abgestorbenen Zelle.

Um Forschungsergebnisse bezüglich EVs zu standardisieren, wurde vor kurzem von der „International Society for Extracellular Vesicles“ (ISEV) Mindestkriterien (MISEV-Kriterien) für die EV -isolierung und -charakterisierung veröffentlicht (Théry et al. 2018). Die Anwendung der MISEV-Kriterien in der Veterinärmedizin ist allerdings durch das Fehlen tierspezifischer Antikörper, die an die EVs binden (z.B. an Oberflächenmoleküle/Tetraspanine) limitiert.

Tab. 1 Klassifikation von EVs

Vesikeltyp	Charakteristika			
	Ursprung	Größe [nm]	Marker	Inhalt
Exosomen 	Endolysosomal, intraluminale Knospung von „multivesicular bodies“ und Fusion mit der Zellmembran	30 - 150	Tetraspannine (TSPAN29 und 30), ESCRT, PDCD6IP, TSG101, Flotillin, MFGE8	mRNA, microRNA (miRNA), non-codingRNA, cytoplasmatische und Membranproteine, Membranrezeptoren und MHC-Moleküle
Mikrovesikel 	Zelloberfläche, Knospung der Zellmembran	100 - 1000	Integrine, Selektine, CD40 Liganden	mRNA, miRNA, non-coding RNAs, cytoplasmatische und Membranproteine,
Apoptotische Körperchen 	Zelloberfläche, Bläschen bestehend aus der Zellmembran apoptotischer Zellen	500 - 2000	Reich an Phosphatidylserin	Zellkernbestandteile, Zellorganellen

ESCRT, endosomal sorting complex required for transport. MFGE8, milk fat globule-EGF factor 8 protein. PDCD6IP, programmed cell death 6 interacting protein. TSG101, tumor susceptibility gene 101 protein. TSPAN29, tetraspannin 29. Tabelle modifiziert und aus El Andaloussi et al. (2013).

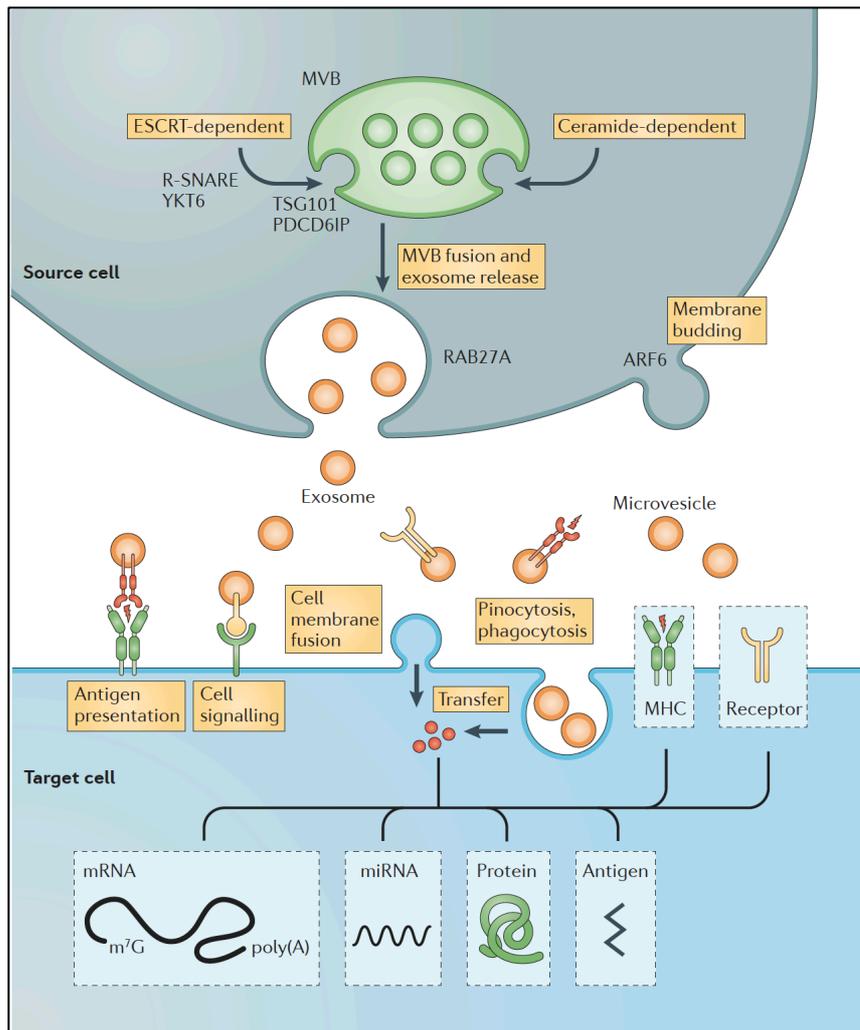


Abb. 3 Biogenese von EVs und Interaktion mit Zielzellen

Es wird angenommen, dass Exosomen eine homogene Population von Vesikeln endozytotischen Ursprungs sind, die durch Einwärtsknospen der Membran von MVBs gebildet werden. Eine Sortierung und Beladung der Exosomen ist abhängig durch ESCRT, PDCD6IP und TSG101. Exosomen werden nach der Fusion des MVB mit der Membran der Zelle ausgeschieden. Dieser Prozess ist abhängig von kleinen GTPasen wie Ras-related in brain27A (RAB27A, RAB11 und RAB31). Mikrovesikel hingegen, stellen eine heterogene Population dar, die durch das Ausknospen und anschließender Abspaltung von der Zellmembran entstehen. Dieser Prozess der Knospung wird durch regulatorische Proteine wie ADP-Ribosylierungsfaktor 6 (ARF6) kontrolliert. Aufgrund der mannigfaltigen biologischen Funktionen wie zum Beispiel Antigenpräsentation, Übertragung von MHC etc. können EVs auch als Signalosomen bezeichnet werden. Als weitere Funktionen sind EVs in der Lage über Proteine Rezeptoren der Zellmembran der Zielzelle direkt zu aktivieren, bioaktive Lipidliganden bzw. Rezeptoren sowie Transkriptionsfaktoren, Onkogene oder auch infektiöse Partikel zur Empfängerzelle zu transportieren. Abbildung 3 aus El Andaloussi et al. (2013).

1.3.3. Die Rolle von EVs im physiologischen Zusammenhang

Die Wirkung extrazellulärer Vesikel auf biologische Prozesse ist vielfältig (siehe Abb. 3). Zum einen können die Proteine bzw. bioaktiven Lipidliganden der EVs die Rezeptoren der Zielzelle direkt aktivieren. Zum anderen kann die Membran eines EVs mit der Membran der Zielzelle verschmelzen (Endozytose), wobei die molekulare Fracht wie Transkriptionsfaktoren, Onkogene, miRNA, nicht-codierende RNAs, mRNA und infektiöse Partikel transferiert werden (Camussi et al. 2011). In diesem Zusammenhang spielen EVs eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung normaler physiologischer Prozesse (Beispiele siehe oben). Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen in unterschiedlichen Signalwegen zur Kontrolle grundlegender zellulärer und biologischer Vorgänge, können EVs auch als Signalosomen bezeichnet werden (El Andaloussi et al. 2013). Beispielsweise sind EVs in der Lage die adaptive Immunantwort zu einem gewissen Grad zu triggern bzw. wirken supprimierend auf inflammatorische Prozesse (Clayton et al. 2007, Simhadri et al. 2008). Immunsuppressive Wirkungen durch EVs wurden in mehreren Szenarien nachgewiesen. Unter anderem verstärken sie die Funktion von regulatorischen T-Zellen (Clayton et al. 2007), unterdrücken natürliche Killerzellen und die Aktivität von CD8⁺-Zellen (Liu et al. 2006, Clayton et al. 2008) sowie die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen (DC) einschließlich der Reifung von DCs selbst (Yu et al. 2007).

Im Bereich der regenerativen Medizin weisen mehrere Berichte darauf hin, dass EVs einen Einfluss auf die Erhaltung und Plastizität von Stammzellen ausüben. Besonderes Augenmerk wird dabei EVs aus Stammzellen gelegt. Ihnen wird eine zentrale Rolle im Zuge der einsetzenden Geweberegeneration nach Verletzungen zugeschrieben (Camussi et al. 2011, Lai et al. 2011).

1.3.4. Die Rolle von EV im Zusammenhang mit Osteoarthritis

Wie in allen Körperflüssigkeiten befinden sich EVs auch in der synovialen Flüssigkeit des Gelenkspalts. Als mögliche Ursprungszellen synovialer EVs kommen all jene Zelltypen (z. B. neutrophile Granulozyten, Leukozyten, Monozyten, DCs, T- und B-Zellen) in Betracht, die im Synovialgelenk präsent sind einschließlich Chondrozyten und Synoviozyten. Chondrozyten sind reich an Organellen, endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat, die erforderlich sind, um große Mengen an essentiellen Matrixkomponenten zu produzieren (Esa et al. 2019).

Jede Störung der Homoöstate im Gelenk spiegelt sich in der Konzentration löslicher Faktoren (wie Zytokine, Enzyme, Wachstumsfaktoren) in der Synovialflüssigkeit und dem Inhalt von EVs wieder. Die Isolierung von EVs aus Synovialflüssigkeit ist noch relativ neu und daher weniger gut charakterisiert, sodass die meisten Ergebnisse über synoviale EVs aus *in vitro* Daten stammen (Esa et al. 2019). So stellte sich heraus, dass bezüglich Größe und Konzentration von aus Synovialflüssigkeit gewonnenen EVs kaum Unterschiede zwischen OA-Patienten und gesunden Probanden vorhanden sind (Withrow et al. 2016), was darauf hindeutet, dass im Zuge einer Pathologie die Unterschiede in der molekularen Zusammensetzung innerhalb der EVs liegen müssen. So wurde *in vitro* gezeigt, dass EVs, die aus mit proinflammatorischen Zytokin IL-1 β behandelten Synovialfibroblasten isoliert wurden (um Bedingungen von OA nachzuahmen), in der Lage waren, die MMP-13 und Aggrecanase-Expression in artikulären Chondrozyten zu induzieren, die wiederum aus gesunden Synovialgelenken stammen (Kato et al. 2014). Wie bereits oben beschrieben führen MMPs und Aggrecanasen zu einem Abbau der EZM des Knorpels, induzieren aber auch gleichzeitig über einen autokrinen Mechanismus die weitere Bildung von IL-1 β , TNF- α sowie weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8. Die vorliegende Rückkopplungsschleife der gegenseitigen Aktivierung führt letztendlich zur Bildung eines Teufelskreises des entzündungsbedingten Knorpelabbaus (Esa et al. 2019). Es ist also offensichtlich, dass EVs eine Rolle in der destruktiven Kaskade innerhalb der OA einnehmen.

1.3.5. EVs und miRNA

Wie bereits im Kapitel „Die Rolle von EVs im physiologischen Zusammenhang“ beschrieben, können EVs auch als Vehikel bzw. Träger von miRNAs fungieren. MiRNAs sind eine Gruppe nichtkodierender einzelsträngiger RNA-Moleküle mit einer Länge von 19-24 Nukleotiden. Durch ihre Hybridisierung an die 3'-untranslatierte Region von mRNA, sind sie in der Lage das Genom auf posttranskriptioneller Ebene zu modulieren. Ihre Hybridisierung bewirkt eine Degradation der Ziel-mRNA und folglich findet keine Translation des gewünschten Proteins statt. Eine Dysregulation in der Zusammensetzung der miRNA wird mit einer Vielzahl an pathologischen Zuständen verbunden (Andersen et al. 2014). Li Xin *et al* konnten in Tiermodellen von OA zeigen, dass es zu einer Abnahme eines bestimmten miRNA-Moleküls, dem miRNA-46a, kommt (Li et al. 2011). Ein weiteres miRNA-Molekül von wichtiger Bedeutung ist miRNA-140, welches stark in Chondrozyten exprimiert wird und durch seine

antiinflammatorische Wirkung eine Bedeutung innerhalb der Homöostase cartilaginären Gewebes einnimmt. Beim Vorliegen einer OA konnte eine Herabsetzung der Expression von miRNA-140 in Chondrozyten von OA - Patienten nachgewiesen werden (Esa et al. 2019). MiRNAs wurden auch in EVs von MSCs belegt und es konnte an *in vivo* Ratten-OA-Modellen gezeigt werden, dass intraartikuläre Injektionen von MSC-Exosomen teilweise die Schäden, welche im Zuge einer OA auftreten, verhindern. Bei MSC-Exosomen, die besonders reich an miRNA-150-5p waren, zeigte sich der präventive Effekt verstärkt (Tao et al. 2017). Entsprechend vorliegender Forschungsergebnisse spielt die richtige Zusammensetzung an miRNAs eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase eines gesunden Gelenks. Fehlgeleitete bzw. dysregulierte miRNAs die an der Signalkaskade der Gewebedegeneration beteiligt sind könnten eine Schlüsselfunktion bzw. einen therapeutischen Ansatz zur Deaktivierung des Entzündungsprozesses im Zuge einer OA liefern.

1.3.6. EVs als mögliches diagnostisches Instrument, Biomarker

Das Auftreten von EVs in der Synovialflüssigkeit, die von Synovialfibroblasten und Chondrozyten sowohl in gesunden als auch in oosteroarthrotischen Gelenken stammen deutet darauf hin, EVs als diagnostisches Instrument nutzen zu können. Leider liegen bisher kaum Studien vor, welche die Synovialflüssigkeit bezüglich der molekularen Zusammensetzung der EVs charakterisieren, sodass diese noch nicht als Biomarker zur Früherkennung einer OA herangezogen werden können (Reiners et al. 2017).

1.3.7. Therapeutisches Potenzial von EVs

Neben den Informationen welche EVs über den Krankheitszustand eines Individuums enthalten, könnten EVs auch ein therapeutisches Potenzial besitzen um entzündlichen Prozessen im Gewebe bzw. Gelenk entgegenzuwirken. In früheren erfolgreichen Versuchen zur Bekämpfung von Entzündungen bei experimentell induzierten Arthritiden, zeigten Liposomen, welche mit Glukokortikoiden oder einem immunsuppressiven Peptid beladen wurden, das Potenzial eines therapeutischen Effekts (Vanniasinghe et al. 2014). Darüber hinaus zeigten EVs, die von IL-10 stimulierten DCs isoliert wurden, nach periartikulärer

Injektion ebenfalls ein modulatorisches Potenzial auf die entzündliche Immunantwort in einer künstlich induzierten Arthritis. Interessanterweise hatte in derselben Studie neben der periartikulären EV-Injektion auch die systemische Injektion eine therapeutische Wirkung gezeigt (Kim et al. 2005). Im Vergleich zu den oben als Therapeutika eingesetzten beladenen Liposomen, stellen EVs die besseren Vehikel dar. Aufgrund ihres körpereigenen Ursprungs werden EVs im Vergleich zu Liposomen wahrscheinlich weniger stark abgebaut, wodurch ihre Fracht bzw. die Beladungen mit exogenen Wirkstoffen (z. B. Pharmaka) vor zellulären Degradierungsprozessen besser geschützt sind.

Von MSCs abgeleitete EVs weisen ebenfalls nachweislich immunsuppressive und entzündungshemmende Eigenschaften auf (Rezvani 2021). Beispielsweise wurden in einer klinischen Studie durch eine Behandlung mit MSCs-abgeleiteten EVs die Symptome bei einem Patienten mit therapierefraktärer Graft-versus-Host Erkrankung erheblich gemildert (Kordelas et al. 2014). Als Graft-versus-Host Reaktion wird eine systemische, zytotoxische Reaktion bezeichnet, welche nach einer Stammzelltransplantation durch die gespendeten Immunzellen gegen den Wirtsorganismus auftreten kann. Die entzündungshemmenden Eigenschaften von MSCs-EVs, möchte man sich in Zukunft bei der Wiederherstellung der Homöostase im entzündeten Gelenk zunutze machen, sodass MSC-abgeleitete EVs eine wichtige Rolle in der zukünftigen Therapie einnehmen könnten.

1.3.8. EVs in der Geweberegeneration

Aufgrund ihrer Beeinflussung in regulatorischen Prozessen wie Zellrekrutierung, -proliferation und -differenzierung verfügen EVs auch über das Potenzial als Induktoren in der Geweberegeneration zu fungieren (de Jong et al. 2014). Gegenwärtige regenerative Behandlungen des Gelenkknorpels beruhen häufig auf der Verwendung von Biomaterialien in Kombination mit *in vitro* expandierten autologen Chondrozyten (Grande et al. 2013). In diesem Zusammenhang gewinnt die Verwendung von MSCs als alternative Quelle zu autologen Knorpelzellen zunehmend an Aufmerksamkeit. Jedoch weisen MSC *in vitro* oder *in vivo* eine begrenzte Kapazität auf, neue Knorpelmatrix *de novo* zu erzeugen, es sei denn sie werden durch Wachstumsfaktoren stimuliert. Neue Fortschritte in der Kokulturtechnik, also der gemeinsamen Kultivierung von primären Chondrozyten mit allogenen MSC, lieferten zwar vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Knorpelgewebebezug, jedoch herrscht noch Uneinigkeit welche Mechanismen hinter der Kokultur-induzierten Regeneration liegen.

Einerseits wird angenommen, dass MSCs durch die Sezernierung von bioaktiven Molekülen und möglicherweise auch EVs eine trophische Wirkung auf Chondrozyten ausüben und eine Chondroinduktion auslösen (Abb. 4B). Andererseits wird angenommen, dass Chondrozyten die chondrogene Differenzierung von kokultivierten MSCs induzieren, sodass diese sich in die chondrogene Linie differenzieren (Abb. 4A). Als drittes Szenario wird eine Mischung der beiden erstgenannten Theorien beschrieben (Abb. 4C) (de Windt et al. 2014).

Wie oben bereits erwähnt scheinen als Haupteffektoren lösliche Biomoleküle und auch EVs an den Mechanismen der Zellproliferation und -differenzierung und letztendlich auch an der Geweberegeneration beteiligt zu sein. Durch das Verständnis der Beteiligung von MSCs-EVs bzw. MSCs-Sekretomen am Gewebereparaturprozess könnten diese statt der MSC selbst als zellfreie Therapeutika zur Behandlung einer OA eingesetzt werden. Zusätzlich bestünde die Möglichkeit MSCs-EVs mit bestimmten Proteinen, oder wie die bereits oben beschriebenen miRNAs zu beladen, um den Regenerationsprozess zu optimieren. Ein weiterer Vorteil für den Einsatz von MSCs abgeleiteten EVs wäre, im Vergleich zur regulierten Anwendung zellhaltiger Therapien, eine regulatorische Erleichterung in der klinischen Anwendung regenerativer Therapeutika an Patienten (Malda et al. 2016).

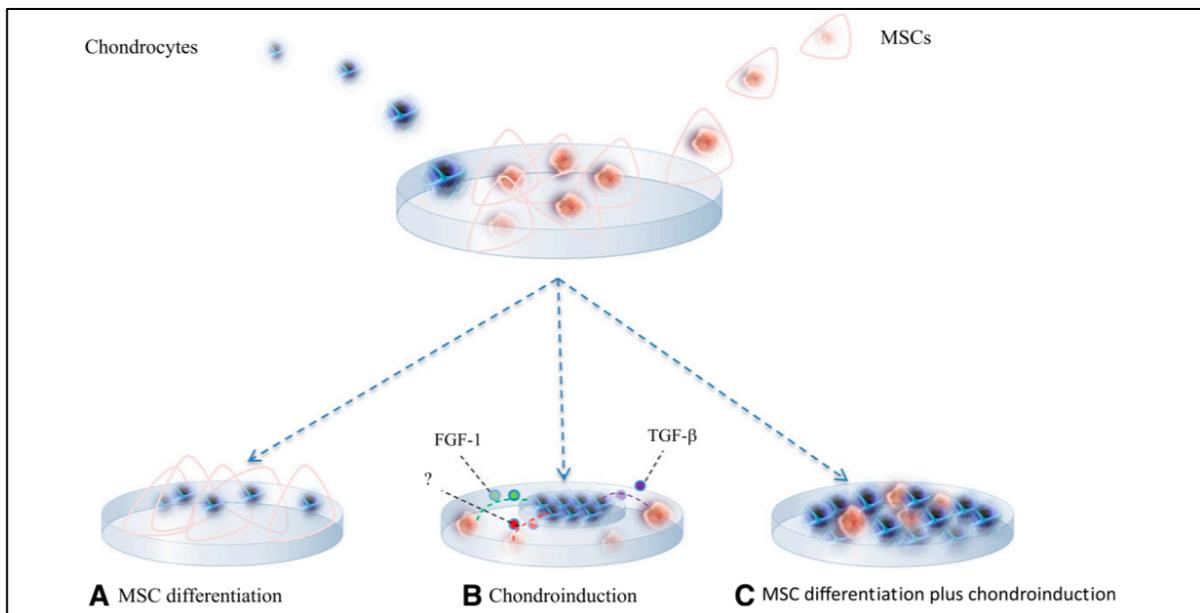


Abb. 4 Die drei Theorien des Kokultur-Ansatzes

A: Nach dem Vermischen von Chondrozyten und MSCs stimulieren Chondrozyten MSCs zur Differenzierung der chondrogenen Linie. B: Kokultur von Chondrozyten und MSCs führt zur Chondroinduktion; das bedeutet MSCs sezernieren trophische Faktoren wie Fibroblasten-Wachstumsfaktor – 1 (FGF – 1) und Transformierender Wachstumsfaktor (TGF - β) um die Proliferation von Chondrozyten zu stimulieren. C: MSCs – Differenzierung plus Chondroinduktion. Sowohl die Chondroinduktions als auch die MSC-Differenzierung tragen zur Chondrogenese bei. Abbildung aus de Windt et al. (2014).

1.4. Techniken der Zellkultur

1.4.1. Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Zellkultur

Die normale bzw. konventionelle Zellkultur wird für adhärenente Zellen in Zellkulturflaschen, Schalen oder Platten etc. durchgeführt. Hierbei liegen die kultivierten Zellen als eine Schicht auf der Oberfläche des Kulturgefäßes. Man nennt diese Form auch Monolayer-Wachstum, da die Zellen in einer Lage auf der Kulturoberfläche wachsen. In einem 3D-System soll durch die Dreidimensionalität eine räumliche Orientierung in der Zellkultur realisiert werden. Dies geschieht vorwiegend auf Basis von EZM-Matrizes (Hydrogele unterschiedlicher Zusammensetzung, z. B. kollagenhaltig) oder „Scaffolds“ (künstliche 3D-Trägerstrukturen). Um den Rahmen dieser Diplomarbeit nicht zu überschreiten wird auf eine weitere Beschreibung und Erläuterung beider Techniken verzichtet. Vielmehr wird im nachfolgenden Kapitel auf die eingesetzte Hollow-Fiber-Bioreactor Technologie eingegangen.

Zahlreiche Studien belegten mittlerweile, dass verglichen mit 2D-Kultursystemen, Zellen im dreidimensionalen Zellverband ihre gewebephysiologischen Eigenschaften wie Morphologie, Proteinexpression, Polarisierung, Signaltransduktion, Proliferation, Migration und Apoptose sowie ihre Sensibilität für Pharmaka beibehalten (Schmitz 2020). Bezüglich der Zellmorphologie unterscheiden sich Zellen in 2D gegenüber 3D enorm, wobei mit einer Erhöhung bzw. Verschiebung des Eu- zu Heterochromatinanteils die Auswirkungen auf die Struktur des Nucleus am bedeutsamsten zu sein scheinen (Storch et al. 2010). Mit Hinblick auf die Unterschiede in der zellulären Signaltransduktion zwischen 2D und 3D-Zellkultur, konnte in systemischen Studien von der Arbeitsgruppe Nils Cordes eine Abweichung im Proteinphosphorylierungsmuster festgestellt werden (Eke et al. 2013). Weil Signaltransduktionen alle Ebenen der Zellfunktionen regulieren, wird das Ausmaß für z. B. Medikamententestung und deren eingeschränkte Translatierbarkeit zum Patienten bei Verwendung von 2D-Zellkulturen klar (Schmitz 2020).

Einen weiteren Unterschied in der 2D- und 3D-Zellkultur stellt die Aufrechterhaltung eines Konzentrationsgradienten von löslichen Faktoren dar. Während in der traditionellen 2D-Zellkultur sezernierte Biomoleküle in das Kulturmedium abgegeben werden, frei diffundieren und sich nicht in der Nähe von Zellen ansammeln, dient die EZM der 3D-Zellkultur als Depot für Wachstumsfaktoren und hält einen Konzentrationsgradienten aufrecht (Schmitz 2020). Im Falle des Hollow-Fiber-Bioreactor, welcher über keine EZM verfügt, wird eine konstant gleichbleibende Versorgung mit Nährstoffen der eingesäten Zellen über ein angeschlossenes

Medium-Depot gewährleistet (siehe Abb. 5). Durch ein angeschlossenes Pumpsystem wird ein permanenter Mediumfluss zu den Zellen und damit eine im Vergleich zur 2D-Kultur konstantere Versorgung der Zellen sichergestellt.

1.4.2. Nachteile und Beschränkungen der 3D-Zellkultur

Neben den oben genannten Vorteilen der 3D-Kultivierung gibt es auch nachteilige Aspekte die bezüglich der Verwendung eines 3D-Kultursystems berücksichtigt werden müssen:

- Zellen die im 3D-System eingebettet sind, können im Gegensatz zu 2D-Monolayern nicht auf der gleichen Fokusebene im Mikroskop untersucht werden bzw. kann das gesamte 3D-Kultivierungssystem nicht mikroskopisch eingesehen werden.
- Keine visuelle Überprüfung der Zellviabilität, Rückschluss auf Zellviabilität durch Messung der Metaboliten des Zellstoffwechsels im Kulturmedium nötig

1.4.3. Chemisch definiertes, serumfreies Kulturmedium

Die gängigsten Zellkulturmedien, die für die Kultivierung von MSCs verwendet werden bestehen aus definierten Basalmedien wie Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 oder Minimum Essential Medium (α MEM). Diese Basalmedien werden nachträglich mit teuren Additiven wie a) Proteine für die Zelladhäsion, b) Lipide für zellulären Anabolismus, c) Wachstumsfaktoren und Hormonen zur Förderung des Zellwachstums und in den meisten Fällen d) fötalem Kälberserum (FBS) versetzt. Obwohl die Nachteile der Serumzugabe (Variabilität von Charge zu Charge, Risiko einer Kontamination mit Prionen, Mycoplasmen oder Zoonoseerregern) seit Jahren bekannt sind, werden serumhaltige Medien bis heute noch in vielen wissenschaftlichen Studien verwendet. Im Gegensatz dazu bieten chemisch definierte, serumfreie Medien nicht nur den Vorteil, dass alle ihre Komponenten bekannt sind, sondern sie erleichtern auch ihre Anpassungen an spezielle Anforderungen der Zellkultur (Teale et al. 2021). So können die jeweiligen Kulturanforderungen durch einen passgenauen Einsatz der einzelnen Kulturkomponenten erfüllt werden. Des Weiteren bieten chemisch definierte serumfreie Medien aufgrund ihrer reduzierten Anzahl an undefinierten Bestandteilen den Vorteil einer besseren Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen.

Ein Vergleich zwischen serumhaltigen und chemisch definierten serumfreien Medien liegt in Tabelle Nr. 2 vor. Die Anpassung an die einzelnen Komponenten des Mediums ist nicht nur abhängig von der Art der Zellen, sondern auch vom Ort ihrer Isolation. So konnte gezeigt werden, dass hMSCs in Abhängigkeit von der Herkunft des mesenchymalen Gewebes unterschiedliche Anforderungen an die Zusammensetzung des Zellkulturmediums haben (Nicolits et al. 2021). Die Anwendung chemisch definierter, serumfreier Medien bringt jedoch auch ihre eigenen Herausforderungen mit sich. Aufgrund des Fehlens von Serum als Schutz vor Scherspannungen reagieren Zellen empfindlicher auf hydrodynamischen Stress. (Teale et al. 2021).

Tab. 2 Vergleich serumhaltiger Medien und chemisch definierten, serumfreier Medien

	Serumhaltiges Medium	Chemisch definiertes, serumfreies Medium
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> - Schutz der Zellen vor Scherkräften - Inokulation mit geringer Zelldichte möglich 	<ul style="list-style-type: none"> - Keine Variabilität der Zusammensetzung von Charge zu Charge - Deutlich geringeres Kontaminationsrisiko mit Prionen, Mycoplasmen oder Toxinen - Leichtere Isolierung von Zellprodukten - Einfachere Validierung und Registrierung des Produkts - Hohe Reproduzierbarkeit - Beitrag zum Tier- und Umweltschutz
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> - Chemisch nicht definiert - Variabilität in der Zusammensetzung von Charge zu Charge - Risiko einer Kontamination mit Prionen, Mycoplasmen oder Toxinen - Kompliziertere Reinigungsverfahren zur 	<ul style="list-style-type: none"> - Zellen sind empfindlicher gegenüber hydrodynamischen Belastungen - Zellen können sich bezüglich Morphologie, Karyotyp oder Oberflächenmarker verändern - Wahl und Menge des Supplements ist abhängig vom Zelltyp

	Entfernung des Serums von Zellprodukten – Erschwerte Validierung und Registrierung des Produkts	
Beispiele	– Jedes Basalmedium zur Kultivierung von Säugetierzellen wie DMEM, α -MEM, oder RPMI 1640 inklusive Serumzusatz	– UrSuppe (Cardiocentro Ticino) – Stemline® XF (Merck) – StemPro™ MSC SFM XenoFree (Gibco) – NutriStem MSC XF (biological industries) – MesenCult™ XF-Basal Medium – StemMACS™, MSC Expansion Media XF, Mittenyi Biotec

Tabelle modifiziert und aus Teale et al. (2021)

1.5. Hollow-Fiber Bioreactor Technologie

1.5.1. Aufbau des Hohlfaserbioreaktors

Zellkultur auf Hohlfaserbasis wurde erstmals 1972 von Richard Knazek am NIH (National Institutes of Health) beschrieben. Sein damaliges Ziel war es, Nebennierentumorzellen unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen zu kultivieren um die Hormonsekretion als Reaktion auf Arzneimittelreize zu untersuchen. Biomimetische Hohlfaser-Bioreaktoren bieten eine Methode, mit der Zellen in gewebeähnlicher Dichte über einen langen Zeitraum kultiviert werden können. Ihre Hohlfasern fungieren als „künstliche Kapillaren“ und verhalten sich ähnlich wie Kapillaren im Organismus (Cadwell und Whitford 2017).

Hohlfaserbioreaktoren können entsprechend ihrem Verhältnis von Stoffaustauschoberfläche zum Bioreaktorvolumen in zwei Kategorien eingeteilt werden: zylindrische Hohlfaserbioreaktoren (cHFBs) und rechteckige Hohlfaserbioreaktoren (rHFBs). Zylindrische HFBs bestehen aus einem Bündel paralleler, semipermeabler Hohlfasern (HF), die in einem zylindrischen Gehäuse oder einer Kartusche angeordnet sind (Abb. 5). Ihr Aufbau erlaubt eine mannigfaltige Nutzung bezüglich Mediumfluss und der Lokalisation der eingesäten Zellen. Das Medium kann durch die HF und/oder durch den extrakapillaren Raum (ECS) fließen. In Bezug auf die Zelllokalisierung können die Zellen direkt in den ECS bzw. auf der Außenseite der HF

oder im Innenlumen der HFs ausgesät werden (Abb. 7). Der Nährstofftransport ist abhängig vom Verhältnis zwischen dem konvektiven Transport in der flüssigen Phase und der Diffusion durch die HF zu den Zellen. Je nach Fragestellung und zu untersuchender Zellart kann die Größe der Hohlfasern bezüglich Innenradius, Außenradius, ihre Anzahl sowie der Abstand der einzelnen Fasern zueinander variieren (Eghbali et al. 2016).

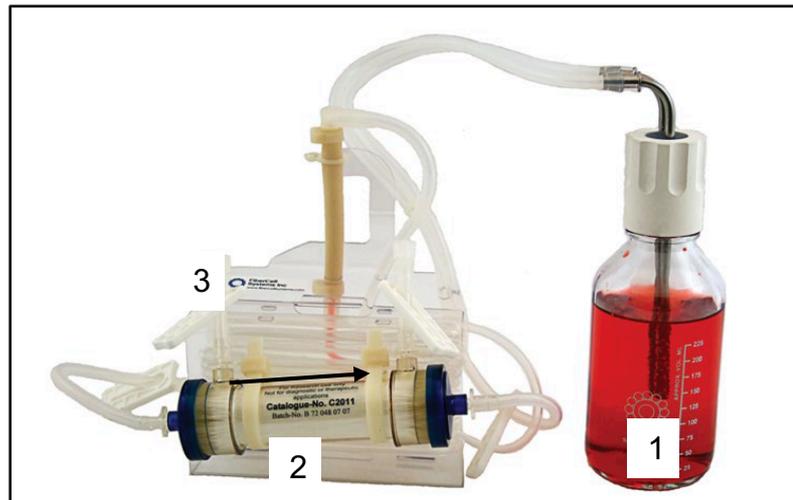


Abb. 5 Hohlfaserkartusche verbunden mit Medium Reservoir (1).

Eine Hohlfaserkartusche (2) ist ein biologisch sicheres Einwegprodukt – ein geschlossenes System zur Kultivierung von Zellen, Bakterien und Viren. Das Medium wird durch eine Pumpe durch die Hohlfasern in eine Richtung (siehe Pfeil) gepumpt. Die beiden Ports (3) bilden die Zugänge zum extracapillären Raum. An ihnen können Spritzen zur Applikation bzw. Ernte von extrazellulären Vesikeln angebracht werden. Abbildung aus Cadwell und Whitford (2017)

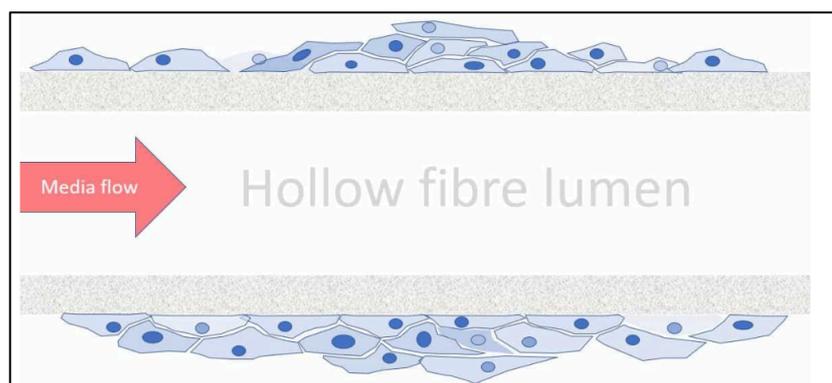


Abb. 6 Längsschnitt durch eine semi-permeable Hohlfaser

Die in den ECS inokulierten Zellen wachsen auf der Außenseite der mit Medium perfundierten semi-permeablen Hohlfaser. Kleine Moleküle wie Glucose, Metaboliten (Laktat und Ammoniak) und Antikörper können die Membran passieren. Abbildung aus KDBIO (2016).

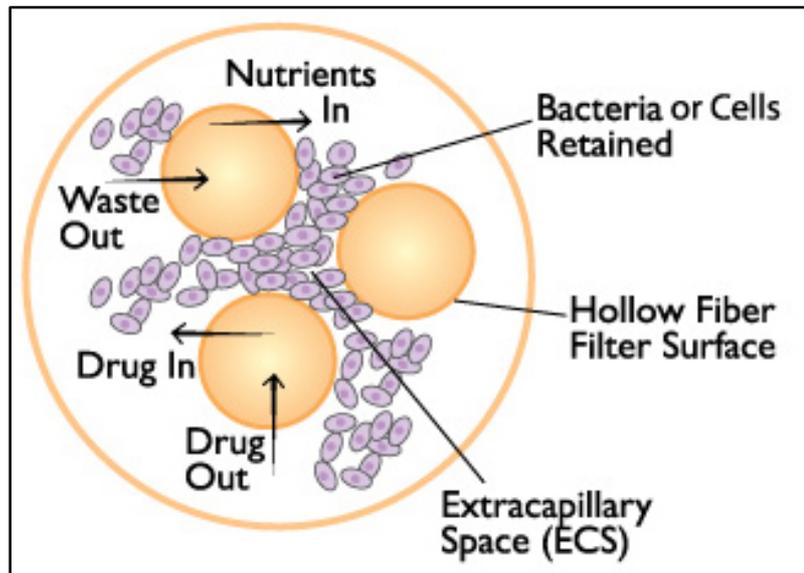


Abb. 7 Querschnitt einer Hohlfaser-Bioreaktorkartusche.

Die Zellen befinden sich im ECS bzw. auf der Außenseite der Hohlfasern, während das Kulturmedium durch das Innenlumen der HFz zirkuliert. Kleine Moleküle können bis zu einem bestimmten Molekulargewicht die semipermeablen HFz ungehindert passieren, während größere Stoffe und Zellen zurückgehalten werden. Abbildung aus Cadwell und Whitford (2017).

1.5.2. Beschaffenheit und Selektivität der Hohlfasern

Hohlfasern eines Bioreaktors können durch unterschiedliche Verfahren hergestellt werden. Je nach Herstellungsprozess und Materialtyp variieren ihre Eigenschaften bezüglich Transport, Porenmorphologie und Permeabilität. Die Permeabilität der Hohlfasermembranen wird nach dem Molekulargewichts-Cutoff (MWCO) klassifiziert, dem Molekulargewicht das zu 90% von der Membran zurückgehalten wird. Je nach Herstellungsprozess liegt der HF MWCO im Bereich von 6 bis 190 kDa. Hinsichtlich Materialtypen werden vorwiegend Polyethersulfon (PES), Celluloseacetat (CA), Polymilchsäure-co-glykolsäure (PGLA) und Polypropylen (PP) verwendet. Alle Materialien können einzeln oder in Mischungen für die HF-Fertigung verwendet werden (Diban und Stamatialis 2014).

1.5.3. Kultivierung im Bioreaktor

Neben der Kultivierung von Zellen können Hohlfaser-Bioreaktoren auch als eine effektive Methode zur Generierung unterschiedlicher Metaboliten des Zellstoffwechsels, einschließlich

extrazellulären Vesikeln verwendet werden. Im Vergleich zu den herkömmlichen statischen, zweidimensionalen polystyrolhaltigen Kulturflaschen unterscheiden sich die Kultivierungsbedingungen im Hohlfaserbioreaktor in folgenden Punkten:

- Die Zellen sind ähnlich wie *in vivo* an eine poröse, perfundierte Matrix gebunden
- der MWCO der Trägermatrix kann je nach Fragestellung angepasst werden
- großes Verhältnis von Oberfläche zum Volumen
- Zellen müssen nicht geteilt bzw. passagiert werden
- Kultivierung einer hohen Zelldichte sowie eine reduzierte Apoptose.

1.5.3.1. Hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen

In einem Bereich von 100 – 200 cm²/ml erzeugt der kleine Durchmesser der Hohlfasern ein extrem hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen im Bioreaktor, wodurch Zellen *in vivo* ähnlichen Zelldichten kultiviert werden können. Die hohe Gesamtfiltrationsrate der Hohlfasern gewährleistet einen ausreichenden Austausch primärer und sekundärer Metaboliten um Zelldichten von 1-2x10⁸/ml optimal zu versorgen. Zellkulturen mit hohen Zelldichten haben die Vorteile eines reduzierten Serumbedarfs bzw. erlauben den Einsatz serumfreier Medien in Kombination mit Serumersatz-Supplementen (Cadwell und Whitford 2017).

1.6. Untersuchung der Zellviabilität im Hohlfaser-Bioreaktor

1.6.1. Stoffwechsel von Zellen in Kultur

Der Stoffwechsel von Zellen im Gewebe unterscheidet sich deutlich von jenem von Zellen in Kultur. Die Veränderung zeigt sich meist in Form einer sehr aktiven Glykolyse mit einem hohen Verbrauch an Glucose und einer hohen Freisetzung von Laktat. Die im Medium befindliche Aminosäure Glutamin dient sowohl als Stickstoff- als auch als Energiequelle, wodurch hohe Konzentrationen des Abbauproduktes Ammoniak im Zellkulturüberstand akkumuliert. Laktat und Ammoniak haben beide einen negativen Effekt auf das Zellwachstum und beeinflussen die Produktion und Qualität der Produkte (Ritter et al. 1977). Da Zellwachstum und Zellproliferation sehr eng mit dem Stoffwechsel gekoppelt sind, kann anhand von Messungen

des Verbrauchs von Substraten bzw. der Bildung von Abbauprodukten auf die Zellviabilität geschlossen werden.

1.7. Fragestellung

Um eine möglichst hohe Ausbeute an möglichst reinen EVs im Hohlfaser-Bioreaktor zu generieren bedarf es einer erfolgreichen Langzeitkultivierung von fetalen ovinen MSCs und Chondrozyten in chemisch definierten Medien. Da es sich bei den zu vergleichenden Zellen um Primärzellen und nicht um Zelllinien handelt, musste deren erfolgreiche Kultivierung in diesem System erst etabliert werden. In dieser Diplomarbeit soll der Zellkulturerfolg anhand von Vorversuchen (Wahl eines geeigneten Zellkulturmediums) und später der Messungen spezifischer Zellstoffwechselfparameter des Zellkulturmediums bestimmt werden. Als Parameter werden der Verbrauch von Glucose sowie die Bildung von Laktat und Ammoniak herangezogen. Die von den Zellen gebildeten extrazellulären Vesikeln werden mithilfe eines NTA (Nanoparticle Tracking Analyzer) der Firma Zetaview[®] gezählt und charakterisiert. Eine erfolgreiche Langzeitkultivierung der Zellen sowie eine effiziente Produktion von EVs stellen die Grundlage für weitere Forschungsarbeiten im Institut dar.

2. Material und Methoden

Bei den Versuchen und Ergebnissen der hier vorgestellten Arbeit handelt es sich um Vorversuche bzw. präliminäre Ergebnisse und Optimierungsschritte im Rahmen der Etablierung einer neuen Methode nämlich der Kultivierung von primären ovinen Zellen (MSCs und Chondrozyten) und deren Produktion von EVs im Hollow-Fiber-Bioreactor. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wird das Projekt in der Klinik für Pferdechirurgie Abteilung VETERM fortgeführt und hinsichtlich Arbeitstechniken sowie Laborparameter noch weiter optimiert. Die nachfolgend präsentierten Labordaten wurden deskriptiv aufgearbeitet und sollen eine Übersicht der Ergebnisse darstellen. Auf die Durchführung einer induktiven Statistik wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs verzichtet.

2.1. Aseptische Arbeitstechnik

Alle Arbeitsschritte, die steril erfolgen sollten, wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Sofern erforderlich wurden Gefäße, Lösungen, Schläuche u.a. autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.2. Herkunft und Isolation von fetalen ovinen MSCs und Chondrozyten

Die in dieser Arbeit verwendeten fetalen ovinen MSC (aus Nabelschnurblut) und Chondrozyten (von verschiedenen Gelenken fetaler Schafe – Schulter, Ellbogen, Hüfte, Knie) stammen aus einem vorherigen Projekt desselben Instituts. Die entsprechende Tierversuchsgenehmigungsnummer lautet BMBWF-68.205/0100-V/3b/2018. Die Isolierung der Zellen erfolgte zwischen Tag 80 bis 87 der Trächtigkeit.

Tab. 3 Ausrüstung

Gerätschaft	Hersteller/Modell
Blutgasanalysator	Stat Profile Prime®
CellImaging	EVOS FL AUTO, biolife technologies
Glucosemessgerät	GlucCell™ Meter
Hohlfaserbioreaktor	FiberCell, Catalogue Nr. 2025D
Inkubator	ThermoFisher
Mikroskop	Olympus CKX31
Nanoparticle Tracking Analyzer	ZetaView®
Pipettierhilfe	PIPETBOY Acu; Integra
Sicherheitswerkbank (Sterilwerkbank/Laminar)	Herasafe KS12
Tangential FlowFilter	Microkros C02-E300-05-S, REPLIGEN,
Zellzählung	Countess II FI
Zentrifuge	Rotina 420R, Hettich

Tab. 4 Hilfsstoffe

Hilfsstoff	Hersteller/Modell
0,5 % Trypsin, 0,02 % EDTA	Biochrom
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure	HEPES
Amphotericin	Biochrom
Expansion Media XF Supplement	StemMACS™ MSC Expansion Media XF Supplement, Mittenyi Biotec
Heparin 5000 IE/ml	Gilvasan
MesenCult™ MSC Stimulatory Supplement	Stemcell Technologie Inc.
MesenCult™ XF-Basal Medium	Stemcell Technologie Inc.
MTT - 3 – (4,5 – Dimethylthiazol – 2- yl) – 2,5 – diphenyltetrazoliumbromid	CellTiter96®Aqueous, Promega Cooperation
NutriStem® XF Medium,	Biological Industries Israel Beik Hamet Ltd.
Penicillin, Streptomycin	Sigma

Phosphatgepufferte Salzlösung PBS -/-; +/-	Gibco™
Polysaccharidlösung	Ficoll Paque Premium; GE Healthcare; 11743219
Serumhaltiges Kulturmedium	DMEM +1% FCS, Gibco
StemMACS™ chemisch definiertes, serumfreies Medium	StemMACS™, MSC Expansion Media XF, Mitenyi Biotec

Tab. 5 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller/Modell
Reaktionsgefäß 1,5 ml	steril, SafeSeal; Sarstedt; 72.706
Serologische Pipetten	steril, Sarstedt; 5 ml: 86.1253.001; 10 ml: 86.1254.001; 25 ml: 86.1685.001; 50 ml: 86.1689.001
Spritzen 10 ml, Luer-Lock	Braun, Injekt® 10 ml, Luer-Ansatz, exzentrisch, 4606108V
T-175 Kulturflaschen	PDL-Coated EasYFlask, 132705
Waschalkohol	Ethanol, 70%
Zentrifugenröhrchen 15 ml	steril, Sarstedt; 62.554.502
Zentrifugenröhrchen 50 ml	steril, Sarstedt; 62.547.254

2.2.1. Isolierung fetaler oviner MSCs aus Nabelschnurblut

Das mit Heparin (5000 IE / ml) gewonnene Nabelschnurblut (1 ml Heparin / 10 ml Blut) wurde mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit Mg^{2+}/Ca^{2+} (PBS +/-, Gibco, Waltham, MA, USA, 14190144) (1:1) gemischt und zur Entfernung möglicher Blutkoagel oder Gewebestücke durch ein 100 μm Zellsieb (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich, 54200) filtriert. Die mononukleäre Zellfraktion wurde durch Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung der Polysaccharidlösung Ficoll Paque Premium (GE Healthcare, Chicago, IL, USA, 11743219) isoliert. Dazu wurde das gesammelte Nabelschnurblut-PBS +/- -Gemisch auf das Ficoll geschichtet und bei Raumtemperatur für 30 min bei 300 g ohne Bremse zentrifugiert (Zentrifuge: Hettich, Westfalenm Deutschland, Rotanta 460R). Der Buffy-Coat wurde mittels

Pasteurpipette abgehoben und zwei Mal mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die erhaltenen mononukleären Zellen in DMEM mit 1 g/l Glucose, 110 mg/l Natriumpyruvat (Gibco, 31885023) ergänzt mit 10 % FCS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, F7524), 1 % Pen/Strep (Sigma, St. Louis, MO, USA, P433-100ml) und 1 % Amphotericin B (Biochrom, Cambridge, UK, A 2612-50ml) in einem Inkubator bei 20 % O₂ und 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Nicht adhärenente Zellen wurden in den Folgetagen durch Waschen mit PBS und Mediumwechsel entfernt. Die Passagierung erfolgte bei Koloniekonfluenz für die erste Passage und später bei 80-90 % Konfluenz durch Trypsinierung (Trypsin 0,05 %, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,02 % (Biochrom)). Für eine Einsaat in den Hohlfaser-Bioreaktor erfolgte eine Zellexpansion auf über 10 Mio. Zellen. Eine Ausnahme stellte der erste Bioreaktor (Prototyp) mit 6 Mio. MSCs.

2.2.2. Isolierung fetaler oviner Chondrozyten

Primäre Chondrozyten wurden unter strikt sterilen Kautelen aus verschiedenen Gelenken fetaler und aus den Kniegelenken adulter Schafe isoliert. Nach der Ernte wurde der Knorpel in einer Laminar Flow Workbench in einer Petrischale in kleine Stücke (1 mm³) zerkleinert und in einer 1 mg/ml Kollagenaselösung (Typ 1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) für 4 h unter ständigem Rühren bei 37°C verdaut. Es folgte eine Waschung mit PBS und eine Filtration durch ein Zellsieb (100 µm; Greiner BioOne) um verbliebene Geweberest zu entfernen. Die erhaltenen Chondrozyten wurden zweimal in Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS β Ca/Mg) gewaschen und jeweils bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in Standardkulturmedium resuspendiert, bestehend aus DMEM (niedriger Glucosegehalt, mit L-Glutamin, (Lonza)), 10 % FBS (niedriger Endotoxingehalt; Sigma-Aldrich), 1 % Pen/Strep (Sigma, St. Louis, MO, USA, P433-100ml) und 1 % Amphotericin B (Biochrom, Cambridge, UK, A 2612-50ml). Die Chondrozyten wurden in Gewebekulturflaschen aus Polystyrol (Sarstedt) ausgesät und in einer befeuchteten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um nicht anhaftende Zellen und Gewebereste zu entfernen. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die Passagierung erfolgte bei Koloniekonfluenz für die erste Passage und später bei 80-90 % Konfluenz durch Trypsinierung (Trypsin 0,05 %, EDTA 0,02 % (Biochrom)). Für eine Einsaat in den Hohlfaser-Bioreaktor erfolgte eine Zellexpansion auf über 10 Mio. Zellen.

2.3. Zellzählung

Eine Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch The Countess® II FL Automated Cell Counter. Adhärente Zellen wurden mit PBS ohne Mg/Ca (PBS -/-, Gibco, Waltham, MA, USA, 14190169) gewaschen, von der Kulturflasche durch Trypsinierung (Trypsin 0,05 %, EDTA 0,02 % (Biochrom) gelöst, bei 540 g für 5min pelletiert und anschließend in einer definierten Menge PBS mit Mg/Ca (PBS +/+, Gibco, Waltham, MA, USA, 14190144) resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden 1:1 mit 10 µl 0,4 % Trypanblau gemischt, jeweils 10 µl in beide halbmondgeformten Probenbereiche der Zellzählkammern pipettiert und eingelesen. Es wurde mit zwei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten gearbeitet.

2.4. Versuche im Monolayer vor Inbetriebnahme des Hohlfaser-Bioreaktors

Um Ergebnisse mit anderen Laboratorien (darunter die Partnerfirma Evercyte GmbH, Wien) vergleichen zu können, wurden vor der Inbetriebnahme des Hohlfaser-Bioreaktors zur Kultivierung von primären fetalen ovinen MSCs und Chondrozyten (auch adulten Chondrozyten) Vorversuche im Monolayer (T-175-Kulturflaschen) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in denselben Medien kultiviert welche die Partnerfirma benutzt (darunter chemisch definierte, serumfreie Medien) und hinsichtlich ihres Phänotypes, der metabolischen Aktivität (MTT-Test), Zellproliferation sowie Glucoseverbrauch untersucht. Als Kulturmedien wurden DMEM, MesenCult™ und NutriStem™ verwendet. DMEM wurde mit 10 % FBS versetzt und MesenCult™ mit MesenCult™ MSC Stimulatory Supplement. NutriStem™ wurde als Komplettmedium (Supplemente bereits enthalten) eingesetzt.

2.4.1. Vergleich der metabolischen Aktivität – MTT-Test

Zur Messung der metabolischen Aktivität wurden jeweils 3000 Zellen/100 µl pro Well 20 µl CellTiter96® AQ_{ueous} in einer 96-Well-Platte zugesetzt und in einer befeuchteten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Absorption des gebildeten Formazans wurde nach einer, zwei, vier und 72 Stunden Inkubation bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch gemessen. Die Menge an umgesetztem Substrat spiegelt die metabolische Aktivität wieder.

Es wurde mit doppelten biologischen Replikaten mit jeweils drei technischen Replikaten gemessen.

2.4.2. Vergleich der Zellproliferation

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens adulter und fetaler Chondrozyten sowie MSC in unterschiedlichen Medien (DMEM, MesenCult™ und NutriStem™) erfolgte durch Zählung der Zellen durch The Countess® II FL Automated Cell Counter. Es wurden je 200.000 Zellen in eine T-175-Kulturflasche eines Mediums ausgesät, für vier Tage in einem Inkubator bei 20 % O₂ und 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert und anschließend wieder gezählt. Dies wurde in einem biologischen Replikat und zwei technischen Replikaten untersucht.

2.4.3. Vergleich des Glucoseverbrauchs im Kulturmedium (MesenCult™)

Die Konzentration an Glucose im Medium wurde jeweils nach 24, 48, 96 und 168 Stunden aus dem Monolayer gemessen. Die Messungen wurden in den genannten Intervallen an folgenden Größen an Zellpopulationen eines jeweiligen Zelltyps (MSCs oder Chondrozyten) durchgeführt: 10 Mio, 5 Mio, 2,5 Mio, 1 Mio, 500.000, 250.000, 100.000 und 50.000 Zellen. Dieser Versuch dient dem Verständnis bei welchen Zelldichten welche Abnahmen an Glucose im Medium zu erwarten sind. Später sollte analysiert werden ob diese Ergebnisse auch bei einer Kultivierung im Bioreaktor zutreffen. Biologisch einfache Replikate wurden technisch doppelt gemessen.

Um die Ergebnisse der gemessenen Glucosekonzentrationen [mg/dl] im Medium besser miteinander vergleichen zu können (auch jene Ergebnisse aus dem Bioreaktor) wurden diese mit folgender Formel zu Glucoseverbrauch [mg/dl] pro 100.000 Zellen und Stunde mit folgender Formel umgerechnet:

$$r = \frac{c_{Gluc1} - c_{Gluc2}}{x \times \Delta t} \times 100.000$$

r = Glucoseverbrauch [mg/dl] pro 100.000 und Stunde

c = Konzentration [mg/dl]

x = Zellzahl

Δt = Zeit [h]

2.4.4. Vergleich des Phänotypes im Monolayer an Tag 1 und Tag 5 in MesenCult™

Die Phänotypen von in MesenCult™ kultivierten ovinen MSC und Chondrozyten im Monolayer wurden an Tag 1 und Tag 5 dokumentiert und miteinander verglichen. Der visuelle Vergleich erfolgte mikroskopisch. Eine Fotodokumentation erfolgte durch EVOS FL AUTO, biolife technologies.

2.5. Inbetriebnahme des Hohlfaser-Bioreaktors

Die folgenden beschriebenen Methoden orientieren sich an der SOP MS-EXO1-1 Version A der Firma Evercyte GmbH (Wien, Österreich). Geringgradige Abweichungen wurden aufgrund besserer Umsetzbarkeit akzeptiert. Als Bioreaktor wurde das Modell Fibercell, Catalogue Nr. 2025D mit folgenden technischen Daten verwendet: Größe: klein; Oberfläche: 450 cm²; Fasertyp: High flux PS; Packing Density: 50 %; ECS Vol: 6,0 ml; MWCO 50 %: 20 kD; Max. Cell: 10⁸.

2.5.1. Anzahl Bioreaktoren

In der vorliegenden Diplomarbeit werden die Ergebnisse von drei Bioreaktoren präsentiert:

- 1. Bioreaktor mit 6 Mio. MSCs – 11 Tage in Betrieb (Prototyp)
- 2. Bioreaktor mit 14 Mio. MSCs – 28 Tage in Betrieb
- 3. Bioreaktor mit 14 Mio. Chondrozyten – 54 Tage in Betrieb

Der erste Bioreaktor diente der Überprüfung, ob die eingesäten Zellen an die Hohlfaser-Membran des ECS adhären sowie der Dokumentation der Zahl und Zellmorphologie nicht adhärenter Zellen. Bioreaktor zwei und drei wurden zur Messung von Glucose, Laktat und Ammoniak sowie zur Bestimmung der Anzahl an Partikel/ml (Sekretom einschließlich EVs) herangezogen.

2.5.2. Überprüfung der eingesetzten Medien und Lösungen im NTA

Um den Eigengehalt an Partikel/ml der eingesetzten Medien (StemMACS™ mit und ohne Supplemente) und Lösungen (HEPES, Water High Quality sterile) zu bestimmen wurden diese im NTA analysiert.

2.5.3. Vorkultivieren des Hohlfaser-Bioreaktors

Hinweis: Die Ergebnisse der Vorversuche mit den beiden „erhofften“ (verwendet auch von der Partnerfirma Evercyte GmbH, Wien) chemisch definierten serumfreien Medien MesenCult™ und NutriStem™ im Monolayer waren unbefriedigend und wurden als untauglich für eine Langzeitkultivierung oviner MSCs und Chondrozyten im Bioreaktor bewertet (siehe Ergebnisse und Diskussion). Stattdessen wurde im weiteren Verlauf mit StemMACS™ MSC Expansion Media XF („Standardmedium“ im Institut) weitergearbeitet.

Das System wird vor Einsaat der Zellen für insgesamt 72 Stunden mit drei unterschiedlichen Lösungen bzw. Medien vorinkubiert. Es fand jeweils eine Vorinkubierung à 24 h in der genannten Reihenfolge des intrakapillären Raumes statt: PBS mit Mg^{2+}/Ca^{2+} (PBS +/-, Gibco, Waltham, MA, USA, 14190144), StemMACS™ MSC Expansion Media XF ohne Supplements und mit StemsMACS™ MSC Expansion Media XF mit StemMACS™ MSC Expansion Media XF Supplement (Mittenyi Biotec, Auburn, CA, USA, 130-104-182) und 1 % Pen/Strep (Sigma, St. Louis, MO, USA, P433-100ml) und 1 % Amphotericin B (Biochrom, Cambridge, UK, A 2612-50ml) statt. Ein ähnliches Prozedere galt auch für den ECS, indem die Lösung bzw. Medium mithilfe 10 ml Spritzen mit Luer-Lock Anschluss eingebracht wurden. Im ECS wurde allerdings nur PBS +/- und StemMACS™ ohne Supplemente verwendet. Die Pumprate betrug durchgehend 10, was laut Hersteller einem Mediumfluss von ca. 50 ml/min entspricht (Fibercell Systems Duet Pump 2018).

2.5.4. Einsäen der Zellen in den Hohlfaser-Bioreaktor

Einzusäende Zellen (Chondrozyten und MSCs) wurden in T-175-Zellkulturflaschen (Sarstedt) auf eine Mindestanzahl von 1×10^7 Zellen expandiert. Die Zellen wurden wie im Abschnitt „Zellzählung“ gewaschen, vom Flaschenboden abtrypsiniert, pelletiert, in StemMacs™ Medium resuspendiert und gezählt. Es wurde keine spezielle Beschichtung der Hohlfasern auf extrakapillärer Seite vorgenommen – die in den Supplementen des StemMACS™ Medium enthaltenen Ingredienzien unterstützen die Adhäsion der verwendeten Zellen. Die vorkultivierten Zellen wurden als Zellsuspension in einem Volumen von 6 ml in den ECS inokuliert. Der Reaktor wurde alle 15 min geschwenkt, um die Zellen gleichmäßig im ECS zu verteilen (insgesamt 4-5 Mal). Die Spritzen zur Inokulation der Zellen verblieben an den Ports des ECS um diesen zu verschließen, die Schiebeklemmen der Ports wurden geschlossen, die Schiebeklemmen des Schlauchsystems wurden zur Mediumzirkulation geöffnet. Das gesamte Bioreaktorsystem inklusive Mediumreservoir wurde in einen Inkubator verbracht und bei 20 % O₂, 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Die Pumprate betrug durchgehend 10.

2.5.5. Mediumwechsel

Der Wechsel des Mediums erfolgte im siebentägigen Rhythmus durch Austausch der Reservoirflasche, die das Medium enthält (250ml StemMACS plus Supplemente (3,5 ml) plus 1 % Pen/Strep). Ein Wechsel erfolgte unter der sterilen Werkbank unter Verschluss aller Schiebeklemmen.

2.5.6. Bestimmung der Zellzahl und Überprüfung der Zellmorphologie

Am mit 6 Mio. MSCs beladenen Bioreaktor (erster Bioreaktor) wurde während seiner Inbetriebnahme der Anteil an nicht adhären Zellen im ECS bestimmt. Nicht adhären Zellen wurden hinsichtlich ihrer Zellmorphologie untersucht. Die erste Messung erfolgte einen Tag und die Zweite am fünften Tag nach Inokulation der Zellen. Dazu wurden wie bei der Ernte des Sekretoms aus dem ECS (siehe Kap. 2.6.2) eine mit 6 ml gefüllte Spritze (StemMACS™, MSC Expansion Media XF ohne Supplemente) an einen Port konnektiert und der Inhalt in den ECS gespritzt. Nicht adhären Zellen wurden so aus dem ECS in die Spritze, die am zweiten

Port angeschlossen war, gespült. Von den gewonnenen 6 ml wurde 1 ml zur Bestimmung der Anzahl nicht adhärenter Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden wie im Abschnitt Zellzählung gezählt und ihre Morphologie mittels EVOS FL AUTO, biolife technologies dokumentiert.

2.6. Bestimmung der Metaboliten und Ernte des Sekretoms

2.6.1. Bestimmung von Glucose, Laktat und Ammoniak

Die Bestimmung des Glucoseverbrauchs sowie der extrazellulären Metaboliten Laktat und Ammoniak erfolgte durch deren Messung im Medium. Glucose wurde zunächst mittels GlucCell™ Meter und später gemeinsam im Zuge der Laktatmessung am Blutgasanalysator Stat Profile Prime® gemessen. Die Messungen der Ammoniak-Konzentration wurde im Zentrallabor der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt. Gemessen wurde bei jedem Mediumwechsel (sowie anfangs bei der Ernte des Sekretoms einschließlich der extrazellulären Vesikel bzw. des konditionierten Mediums). Die Werte für die Konzentrationen von Glucose, Laktat und Ammoniak wurden jeweils vor und nach der Verwendung des Mediums im Bioreaktor gemessen. Glucose, Laktat und Ammoniak wurden in einfachen technischen Replikaten gemessen.

2.6.2. Ernte des Sekretoms und den darin befindlichen EVs

Zur Ernte des Sekretoms und den darin enthaltenen EVs wurden zunächst die Schiebeklemmen zum Schlauchsystem verschlossen. Eine mit 6 ml StemMACs™ Basalmedium ohne Supplemente gefüllte sterile Spritze ersetzte die am linken ECS-Port befindliche Spritze. Die Schiebeklemmen der beiden ECS-Ports wurden geöffnet und das Medium über den linken ECS-Port in den ECS appliziert. Gleichzeitig füllte sich die am rechten ECS-Port befindliche Spritze mit demselben Volumen an konditioniertem Medium bzw. Sekretom. Die Ernte wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 700 g für 5 min bei 4 °C und anschließend für 2000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert um Zellen und Zelldebris zu entfernen. Der gereinigte Überstand wurde in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur Analyse im NTA (Nanoparticle Tracking Analyzer) bei -80 °C tiefgefroren.

Eine Messung der entnommenen Proben erfolgte anschließend in aufgetauter und gepoolter Form.

2.6.3. Aufreinigung und Anreicherung der EVs – Tangential – Flow - Filter (TFF)

Durch die Verwendung eines Tangential-Flow-Filters (TFF) der Firma REPLIGEN (C02-E300-05-S) wurde die EV-Fraktion einem sterilen Aufreinigungs- und Anreicherungsprozess unterzogen. Der Filter, bestehend aus modifiziertem Polyethersulfon, weist einen Molekulargewichts-Cutoff (MWCO) von 300 kDa auf. Vor Einsatz erfolgte eine Äquibrillierung mit 5 ml 20 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Puffer (HEPES). Danach wurde das aus dem Bioreaktor bzw. vom Monolayer gewonnene und zentrifugierte Sekretum/konditionierte Medium der Zellen gefiltert. Die Querfiltration wurde solange fortgeführt bis das Permeat keine Färbung (resultierend aus roter Farbe des Mediums) mehr aufwies, gegebenenfalls wurden erneut 10 ml HEPES zugeführt. Die so gewonnenen aufgereinigten EVs wurden bis auf 1 ml Endvolumen konzentriert und in ein Low Binding Eppendorf Tube überführt. Die Querfiltration fand vor einer Analyse im NTA statt.

2.6.4. EV Produktion und Messung der Partikel im Monolayer

Parallel zur Inbetriebnahme des Bioreaktors wurden MSCs und Chondrozyten in Monolayer in je zwei T175-Flasks in StemMACS™ mit Supplements für 24 h im Inkubator bei 20 % O₂ und 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert (Zellexpansion). Es folgte eine weitere Kultivierung für 48 h in StemMACS™ ohne Supplemente. Folgende Zellzahlen wurden zu Beginn der 48 stündigen Kultivierung in StemMACS™ ohne Supplemente gemessen: MSCs: 4,75 Mio.; 2,32 Mio.; Chondrozyten: 4,72 Mio.; 2,37 Mio. Zellen. Anschließend wurde das konditionierte Medium entnommen und wie in 2.6.2. beschrieben zentrifugiert und wie in 2.6.3. querfiltriert. Eine Messung der Partikel/ml erfolgte wie in 2.6.5 beschrieben. Um gemessene Partikel/ml mit jenen des Bioreaktors vergleichen zu können, wurde die Anzahl an Partikel/ml aus dem Monolayer auf 14 Mio. Zellen extrapoliert.

2.6.5. Charakterisierung und Zählung extrazellulärer Vesikel

Eine Analyse der gewonnenen EVs erfolgte mittels NTA der Firma Zetaview[®]. Vor jeder Messung wurde das Gerät mit einer Eichlösung mit definierter Partikelzahl kalibriert. Gemessen wurde bei folgenden Einstellungen: Wellenlänge 488 nm, max. area 5000, min area: 10, min brightness: 30 und einer Temperatur von 25°C. Die Proben wurden zur optimalen Messung zuvor mit PBS ++ verdünnt. Der Verdünnungsfaktor wurde anschließend eingerechnet. Gemessen wurde in technischen Triplikaten. Die gemessenen Partikel wurden in eine Gruppe mit Partikeldurchmesser ≤ 200 nm und eine > 200 nm unterteilt.

2.6.6. Methoden der Datenanalyse

Zur Erstellung der deskriptiven Statistik wurden die Daten in Microsoft Office Excel 2016 übertragen. Zur graphischen Darstellung wurden Balken- und Liniendiagramme erstellt.

3. Ergebnisse

Bei allen genannten MSCs und Chondrozyten handelt es sich um primäre fetale ovine MSC und Chondrozyten. Handelt es sich um adulte Chondrozyten, werden diese als solche bezeichnet. Die angegebenen Werte der Diagramme stellen die Mittelwerte der technischen Replikate dar.

3.1 Ergebnisse aus den Vorversuchen im Monolayer bzw. 96-Well-Platte

3.1.1. MTT-Test, Messung der metabolischen Aktivität

Zur Evaluierung der metabolischen Aktivität adulter und fetaler Chondrozyten sowie MSCs in Basalmedium (DMEM) sowie in den chemisch definierten Medien MesenCult™ und NutriStem™ wurde ein MTT-Test durchgeführt (siehe Abbildungen 8 - 10). Durch die colorimetrische Reaktion von MTT zum optisch messbaren Formazan kann anhand der optischen Dichte – bei 490 nm – auf die metabolische Aktivität bzw. Lebensfähigkeit der eingesetzten Zellen geschlossen werden. Bei allen drei eingesetzten Medien zeigten adulte Chondrozyten zu allen gemessenen Zeiten in Abb. 7 die höchste optische Dichte. Bedeutet, dass adulte Chondrozyten im Gegensatz zu fetalen Chondrozyten und MSCs über eine höhere Aktivität von Oxidoreduktasen und Dehydrogenasen innerhalb der mitochondrialen Elektronentransportkette verfügen (Ghasemi et al. 2021). Vergleicht man die Medien untereinander erkennt man, dass die metabolische Aktivität von fetalen Chondrozyten und MSCs innerhalb der ersten vier Stunden in DMEM ähnliche Werte annimmt. Erst nach 72 Stunden erkennt man einen Unterschied in den optischen Werten mit 1,05 zu 0,7. In der Kultivierung mit MesenCult™ weisen MSCs gegenüber fetalen Chondrozyten in allen zeitlichen Messpunkten eine höhere metabolische Aktivität auf, sodass letztlich nach 72 h eine OD von 0,58 zu 0,18 gemessen werden konnte.

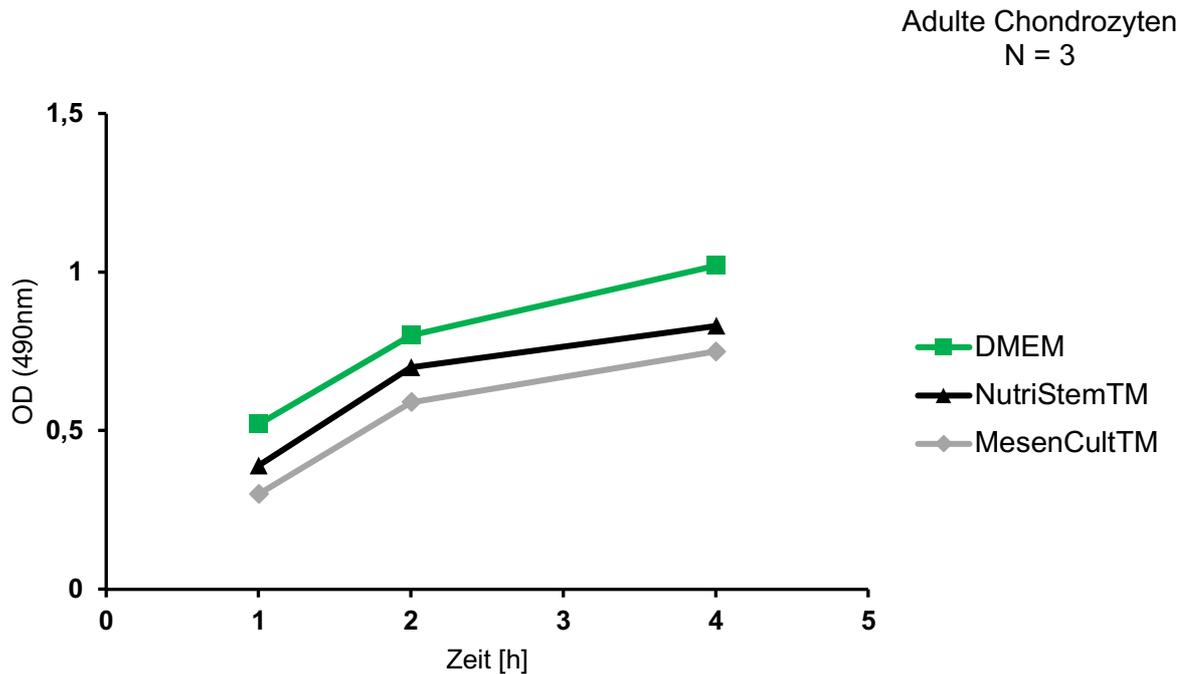


Abb. 8 MTT - Test, OD (optische Dichte) (490 nm) von adulten Chondrozyten in DMEM, NutriStemTM und MesenCultTM.

Dieser Versuch veranschaulicht die Messung der optischen Dichte bei 490 nm des gebildeten Formazan aus MTT durch adulte Chondrozyten in Abhängigkeit der Zeit. Bei allen drei eingesetzten Medien erkennt man eine Zunahme der Absorption im zeitlichen Verlauf, wobei zu Beginn eine stärkere Zunahme zu erkennen ist. Bei einer Kultivierung in DMEM zeigte sich zu allen Zeitpunkten die höchste gemessene Absorption, während bei einer Kultivierung in MesenCultTM stets die niedrigsten OD-Werte gemessen werden. Die gemessenen Absorptionen in NutriStemTM liegen dazwischen.

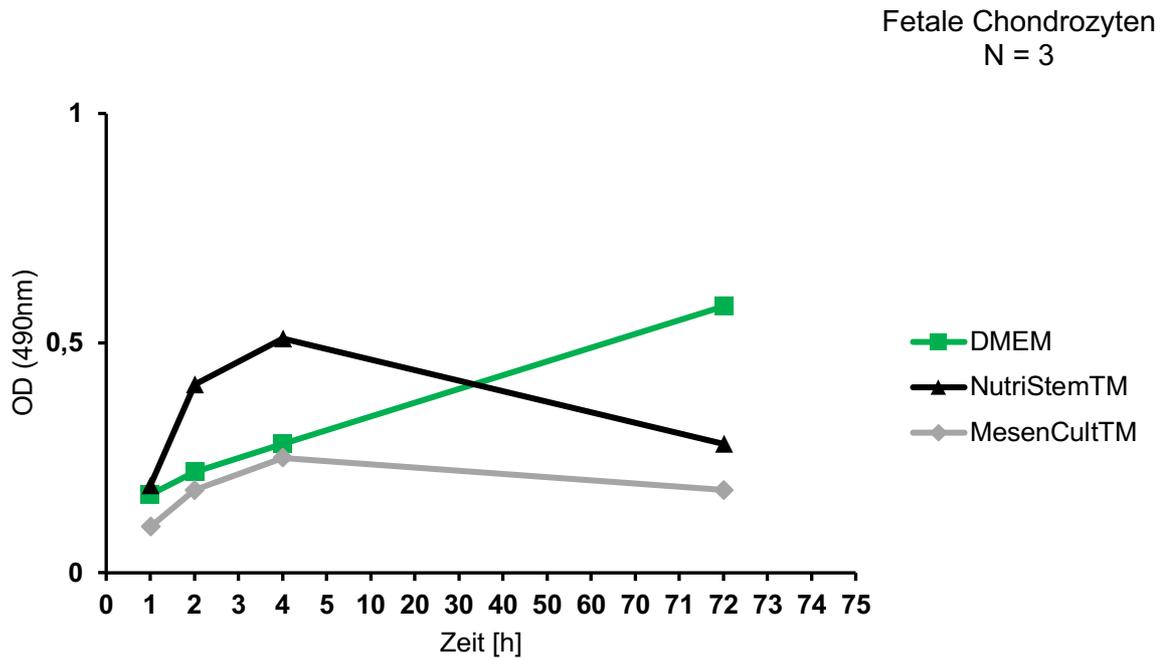


Abb. 9 MTT - Test, OD (optische Dichte) (490 nm) von Chondrozyten in DMEM, NutriStem™ und MesenCult™

Gemessene OD-Werte des von den Zellen gebildete Formazan bei einer Wellenlänge von 490 nm. In einer Kultivierung in DMEM zeigen fetale Chondrozyten eine stetige Zunahme der OD-Werte in Abhängigkeit der Zeit, sodass nach 72 h eine OD von 0,58 erreicht wurde. Bei einer Aussaat in NutriStem™ erkennt man innerhalb der ersten drei Messungen zunächst eine Zunahme der OD bis auf 0,51 um nach 72 h auf einen Wert von 0,28 zu sinken. Einen ähnlichen Verlauf zeigt sich auch in der Kultivierung in MesenCult™: Mit einer anfänglichen Zunahme der Absorption von 0,25 nach 4 h geht diese auf einen Wert von 0,18 nach 72 h zurück.

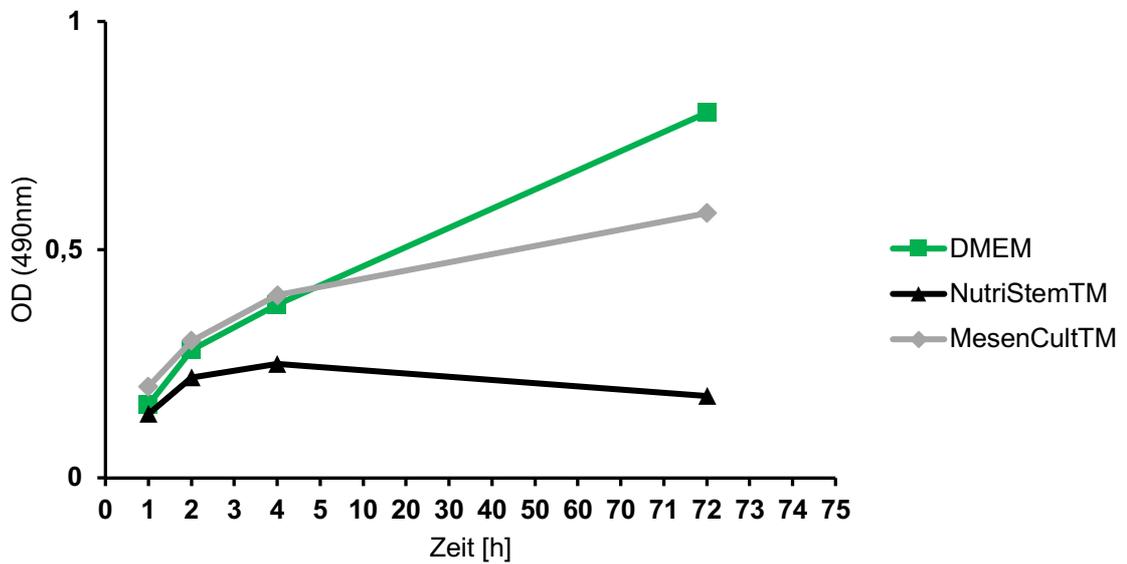
MSCs
N = 3

Abb. 10 MTT - Test, OD (optische Dichte) (490 nm) von MSCs in DMEM, NutriStem™ und MesenCult™.

Ergebnisse des MTT-Tests von in unterschiedlichen Medien kultivierte MSCs. Bei Verwendung von DMEM und MesenCult™ steigen die OD-Werte in Abhängigkeit der Zeit an, wobei innerhalb der ersten 4 h eine stärkere Zunahme zu erkennen ist. In NutriStem™ nimmt die OD bis zum Messzeitpunkt 4 h zu (0,25) um dann auf 0,18 nach 72 h abzusinken.

3.1.2. Vergleich der Zellproliferation

Im Hinblick auf die zu untersuchenden Zellproliferationen durch Messung der Zellzahl (anfangs 200.000 Zellen) nach einer vier-tägigen Kultivierung zeigen die Zellzahlen aller Zellarten in Kultivierung mit den unterschiedlichen Medien ein unterschiedliches Ausmaß der Zellproliferation. Bei einer Kultivierung in NutriStem™ zeigten sich kaum bzw. keine Anzeichen einer Proliferation bzw. sogar einen Rückgang der ursprünglich eingesäten Zellzahl, während bei einer Kultivierung in DMEM (+10 % FBS) und in MesenCult™ stets positive Zellproliferationen beobachtet werden konnte.

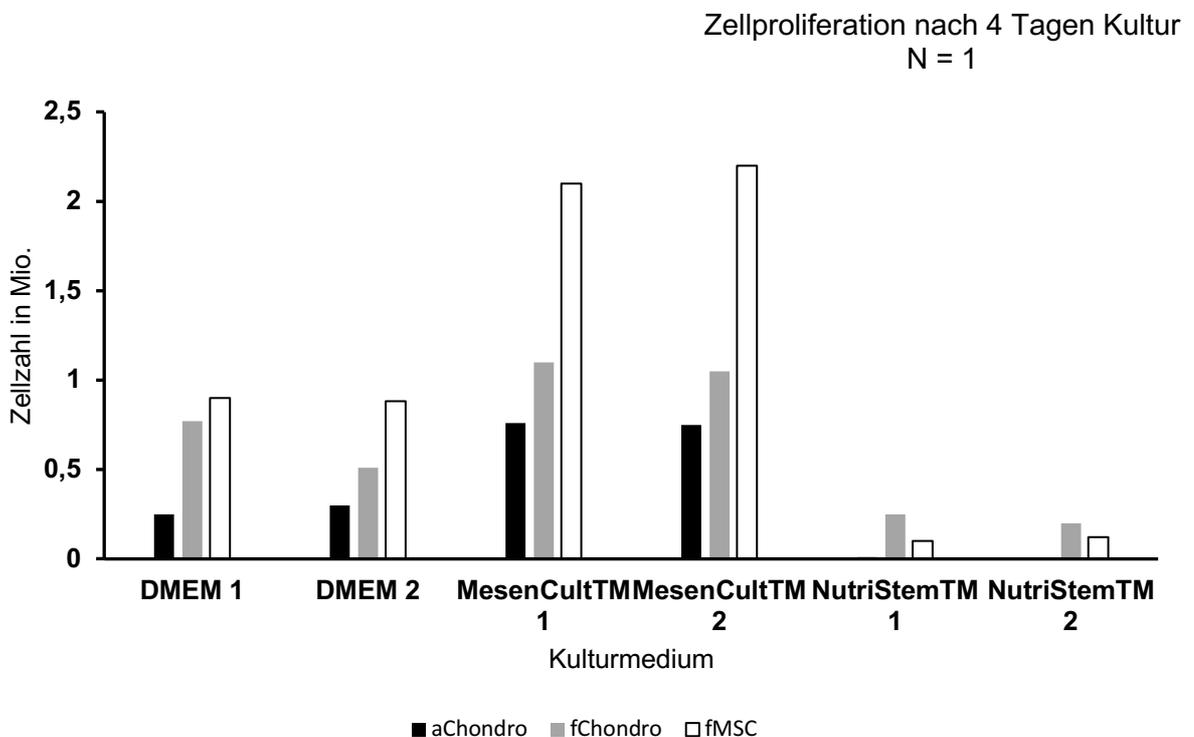


Abb. 11 Zellzahl nach vier tägiger Kultivierung in unterschiedlichen Medien

Die Zellzahl adulter (aChondro) und fetaler (fChondro) Chondrozyten sowie fetaler MSCs in Mio. nach einer vier tägigen Kultivierung in unterschiedlichen Medien. Während die höchsten gemessenen Zellzahlen aller Zelltypen bei einer Kultivierung in MesenCult™ zu allen Zeitpunkten gemessen wurden, zeigen bei einer Kultivierung in NutriStem™ die Zellzahlen stets die geringsten Werte an. Mit einer Zellzahl von bis zu 2,2 Mio. Zellen stellt eine

Kultivierung von MSCs in MesenCult™2 den am Auffälligsten höchsten Wert dar. Aber auch adulte Chondrozyten zeigen mit einer Zellzahl von bis zu 0,76 Mio. Zellen in MesenCult™ (MesenCult™1) höhere Werte gegenüber anderer eingesetzter Medien auf.

Zur weiteren Evaluierung der Nutzung von NutriStem™ und zur Abklärung ob das geringe Zellproliferationsverhalten von fetalen ovinen MSC und Chondrozyten in NutriStem™ (Abb. 11) umgangen werden kann, wurde in einem weiteren Versuch eine primäre Kultivierung der Zellen in serumhaltigen DMEM (+ 10 % FBS) für 24 h durchgeführt und anschließend eine sekundäre Kultivierung für weitere 72 h in NutriStem™. Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt.

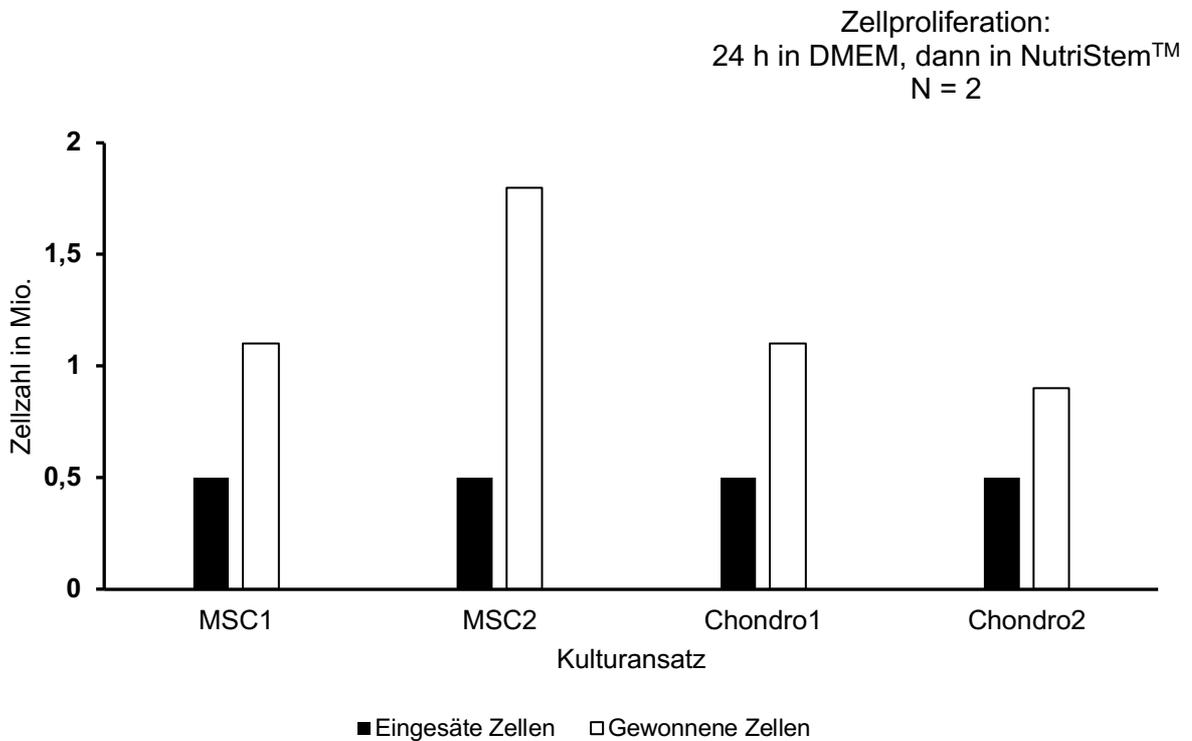


Abb. 12 Kultivierung von MSCs und Chondrozyten in DMEM (+FBS) für 24 h und anschließend in NutriStem™.

Eine Zunahme der Zellzahl von MSCs und Chondrozyten konnte nach einer primären Kultivierung in DMEM für 24 h und anschließenden Kultivierung über 72 h in NutriStem™ beobachtet werden. Bei allen Kulturansätzen (MSC1, MSC2, Chondro1, Chondro2) zeigt sich eine Zunahme der Zellzahl gegenüber der ursprünglich eingesäten Anzahl von 500.000 Zellen. Folgende Zellzahlen wurden gemessen: MSC1: 1,1 Mio. Zellen, MSC2: 1,8 Mio. Zellen, Chondro1: 1,1 Mio. Zellen und Chondro2: 0,9 Mio. Zellen.

3.1.3. Messung der Glucosekonzentration in MesenCult™ von MSCs und Chondrozyten im Monolayer

Die deutlichen Abnahmen in der Glucosekonzentration in den ersten 48 h im Vergleich zu den Intervallen 96 und 168 h deuten darauf hin, dass MSCs und Chondrozyten mit den anfänglichen Zelldichten von 10; 5; und 2,5 Mio. Zellen zu Beginn eine höhere metabolische Aktivität aufweisen als an den späteren Messpunkten. Bezüglich des geplanten Monitorings der Glucosekonzentration im Bioreaktor bedeutet dies, dass eine deutlich messbare Abnahme der Glucose bei diesen Zelldichten in den ersten 48 Stunden zu erwarten wäre. Allerdings zeigt sich im zeitlichen Verlauf (96 und 168 h) der weiteren Kultivierung ein eingestellter bzw. reduzierter Verbrauch an Glucose. Gemessene Glucosekonzentration sind Abb. 13 und 14 dargestellt.

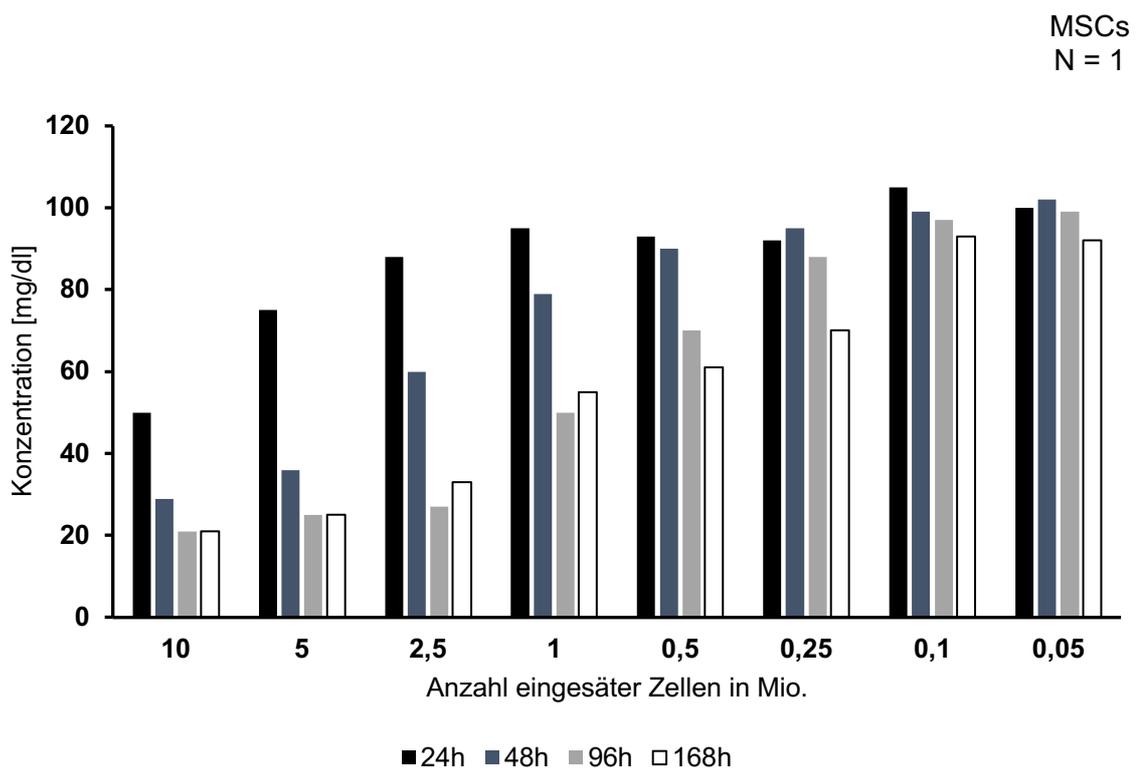


Abb. 13 Glucosekonzentration [mg/dl] in MesenCult™ des Monolayers von MSCs in unterschiedlichen Zelldichten

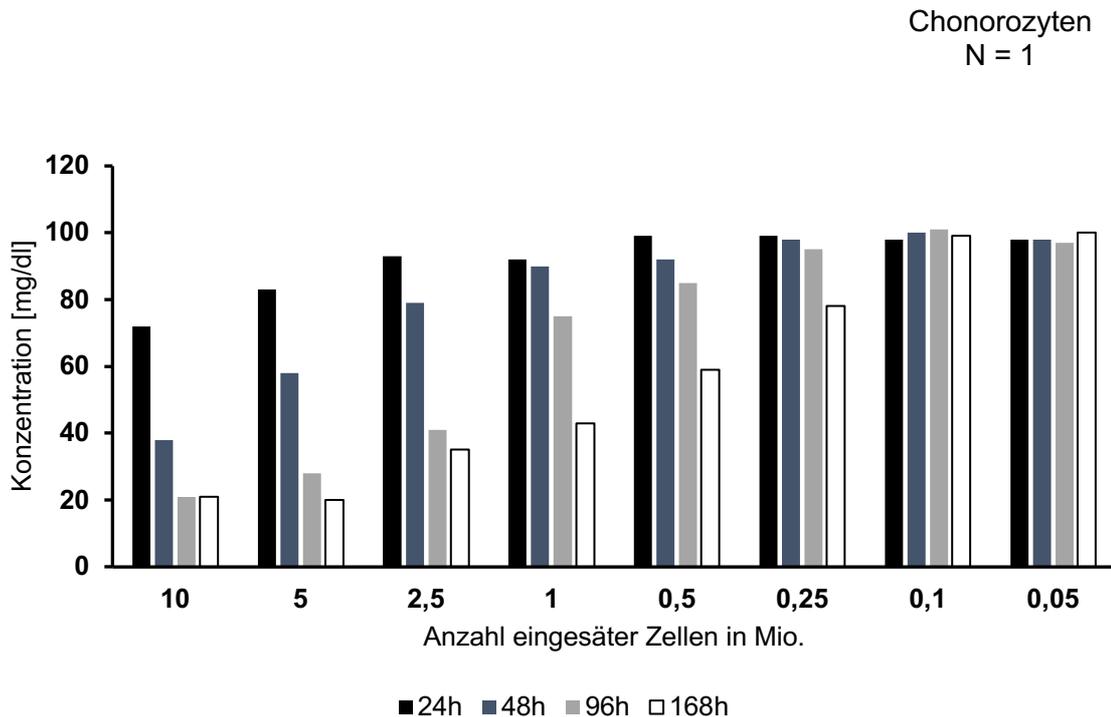


Abb. 14 Glucosekonzentration [mg/dl] in MesenCult™ des Monolayers von Chondrozyten in unterschiedlichen Zelldichten

In diesem Versuch wurde der Verbrauch der Glucose in mg/dl durch Messung der Glucosekonzentration im Medium (MesenCult™) bestimmt. Die Messungen der Konzentrationen wurden an unterschiedlichen Größen der Zellpopulationen (10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 Mio. Zellen) zu bestimmten Zeitintervallen (24; 48; 96 und 168 h) durchgeführt. Generell erkennt man sowohl bei Chondrozyten als auch bei MSCs einen deutlicheren Konzentrationsabfall im zeitlichen Verlauf bei den zu Beginn größeren Zelldichten (10 – 1 Mio. Zellen) als bei den niederen (0,5 – 0,05 Mio.). So zeigte die zu Kulturbeginn eingesäte Zelldichte von 10 Mio. MSCs nach 24 h Kulturdauer eine Reduktion der Glucosekonzentration um 50 % der Ausgangskonzentration. Nach 48 h wurden 71 % der Glucose verbraucht (Konzentration bei 29 mg/dl). Bei den ursprünglich 10 Mio. eingesäten Chondrozyten reduzierte sich die Glucose von den Zeitpunkten 24 zu 48 h um 34 mg/dl auf 38 mg/dl. 96 und 168 h nach Kulturbeginn wurden zu beiden Zeitpunkten bei beiden Zelltypen eine Konzentration von 21 mg/dl gemessen. Ähnliche Änderungen in der Glucosekonzentration ist auch bei den Zelldichten 5 und 2,5 Mio. MSCs und Chondrozyten zu erkennen, wobei der stärkste Abfall an Glucose zwischen 48 und 96 h stattfand. Bei den niedriger eingesäten Zelldichten (0,25 – 0,05 Mio.) ist die Glucosekonzentration an den ersten drei Messpunkten

annähernd konstant geblieben. Lediglich nach 168 h konnte ein leichter Rückgang der Konzentration an Glucose festgestellt werden.

3.1.4. Glucoseverbrauch [mg/dl] pro 100.000 Zellen und Stunde

Um die Ergebnisse der gemessenen Glucosekonzentrationen [mg/dl] im Medium besser miteinander vergleichen zu können (auch mit jenen aus dem Bioreaktor) wurden diese mit der in 2.4.3. beschriebenen Formel in Glucoseverbrauch [mg/dl] pro 100.000 Zellen und Stunde umgerechnet.

Negative Werte wurden zur besseren graphischen Darstellung mit Nullwerten angegeben.

Bei der Normierung des Glucoseverbrauch [mg/dl] auf 100.000 Zellen pro Stunde erkennt man in den Abbildungen 15 und 16, dass die höchsten Verbräuche pro Stunde nicht bei den hohen Zelldichten (10; 5; 2,5 Mio. Zellen) stattfanden, sondern bei jenen Zelldichten niedriger und einschließlich 1 Mio. Zellen. Die hohen Verbräuche pro Stunde ergeben sich aus einer höheren Differenz der gemessenen Glucosekonzentration zwischen zwei Messzeitpunkten geteilt durch die Anzahl an Zellen. Wie die Histogramme (Abb. 15 und 16) veranschaulichen, zeigt sich bei den höheren Zelldichten (10; 5; 2,5 Mio. Zellen) ein niedriger Glucoseverbrauch in den letzten beiden Messzeitpunkten bzw. verbrauchten die Zellen innerhalb der letzten 72 Stunden (96. zur 168. Stunde) zum Teil keine Glucose mehr. Die umgerechneten Glucoseverbräuche bei den Zelldichten 0,1 und 0,05 Mio. Zellen sind kritisch zu betrachten, da bereits in der Messung der Glucosekonzentration die Abnahmen bzw. auch Zunahmen an Glucose vermutlich aus Messfehlern herrühren.

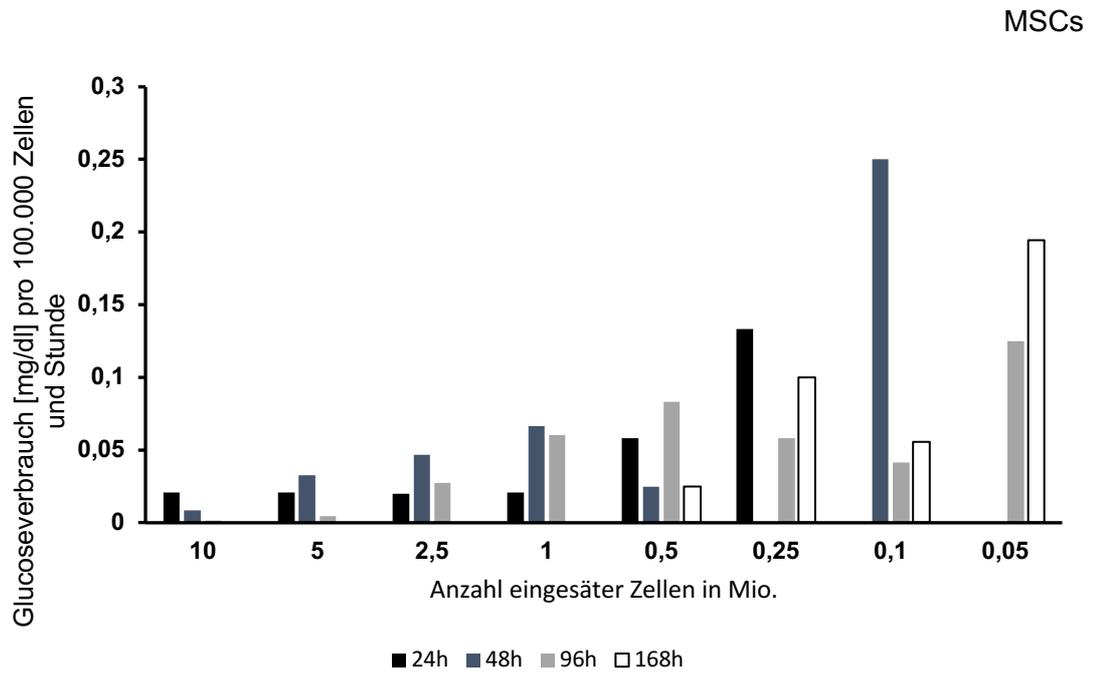


Abb. 15 Glucoseverbrauch [mg/dl] pro 100.000 MSCs und Stunde in MesenCult™ im Monolayer.

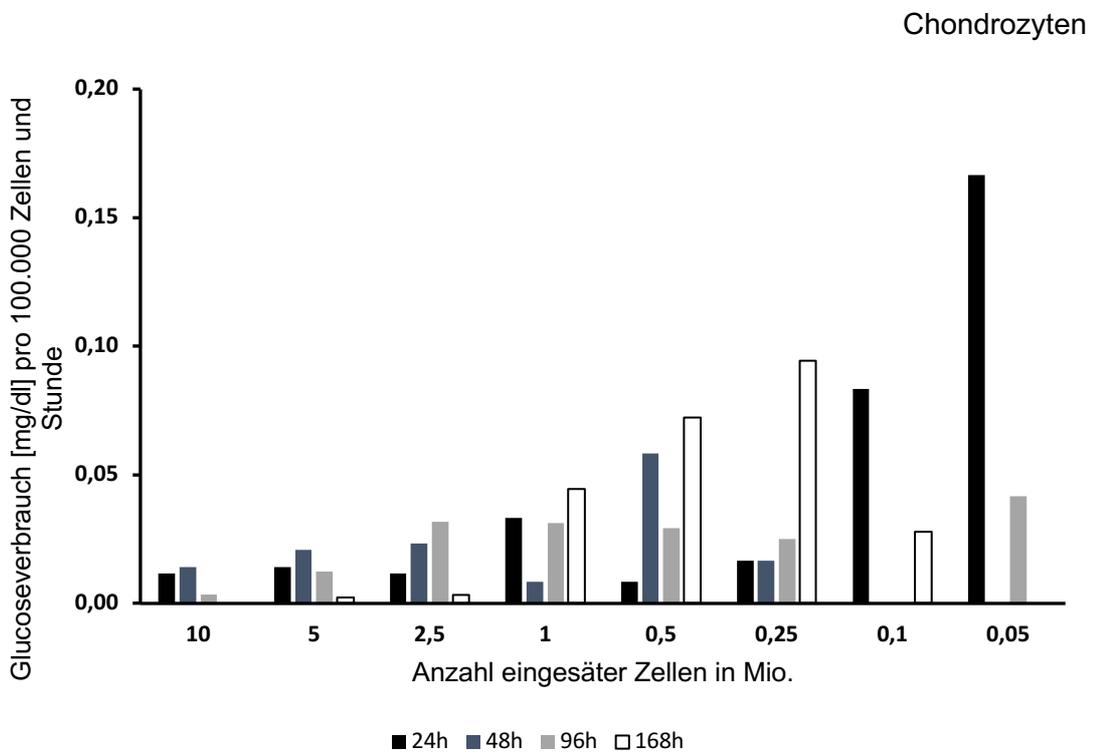


Abb. 16 Glucoseverbrauch [mg/dl] pro 100.000 Chondrozyten und Stunde in MesenCult™ im Monolayer.

3.1.5. Untersuchung des Phänotyps in MesenCult™ im Monolayer

In Abbildungen 17 und 18 wurden die Zellmorphologien von in MesenCult™ kultivierten MSCs und Chondrozyten dokumentiert. Während am Tag 5 der Kultivierung von MSCs vermehrt tote Zellen beobachtet wurden, wiesen Chondrozyten am Tag 5 einen aufgehellten Ring um das Zellinnere auf von welchem ausgehend dunkle speichenartige Linien in die Peripherie ziehen. Zieht man die Ergebnisse des MTT-Tests hinzu, zeigen Chondrozyten bereits eine Abnahme der Absorption ab Stunde vier der Messungen. Betrachtet man die Ergebnisse der Zellmorphologie gemeinsam mit jenen der metabolischen Aktivität könnte man darauf schließen, dass fetale ovine Chondrozyten keine optimalen Kulturvoraussetzungen in MesenCult™ finden. Beginnend mit einer Abnahme der metabolischen Aktivität zeigen sich die unbefriedigenden Kulturbedingungen letztendlich in einer abnormalen Zellgestalt. Da man bei einer Kultivierung im Bioreaktor weder ein Absterben von Zellen (im Bioreaktor werden sehr hohe Zelldichten eingesät) noch abnormale Zellmorphologien vorfinden möchte, wurde neben NutriStem™ auch MesenCult™ als ein für den Bioreaktor ungeeignetes Kulturmedium bewertet. Da das Institut über längerfristige Erfahrungen in der Kultivierung von fetalen ovinen MSCs und Chondrozyten mit StemMACS™ MSC Expansion Media XF verfügt, hat man sich dazu entschieden den Bioreaktor mit diesem chemisch definierten serumfreien Medium zu betreiben.

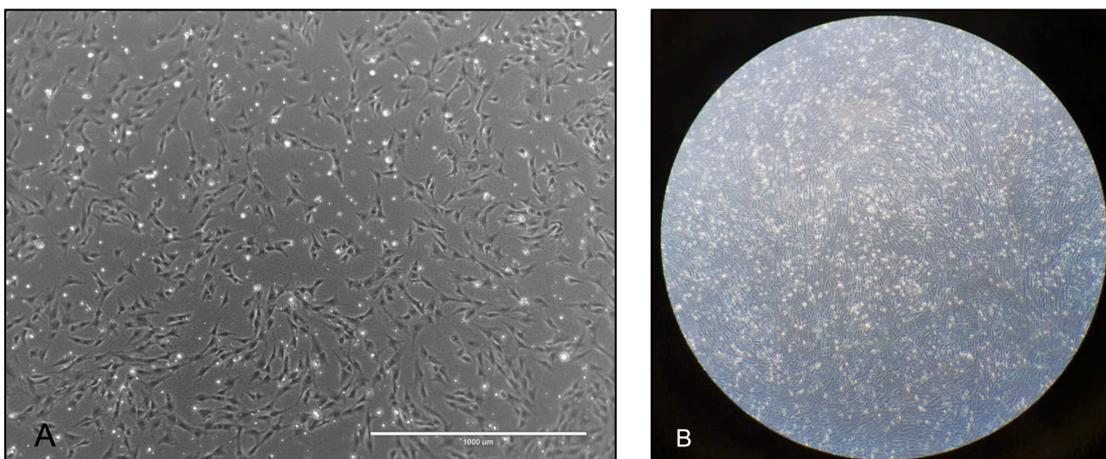


Abb. 17 Aufnahme des Phänotyps von MSCs in MesenCult™. A: Zelldichte 1 Mio., Maßstab: 1000 µm; B: Tote MSCs am Tag 5 (20x Objektiv)

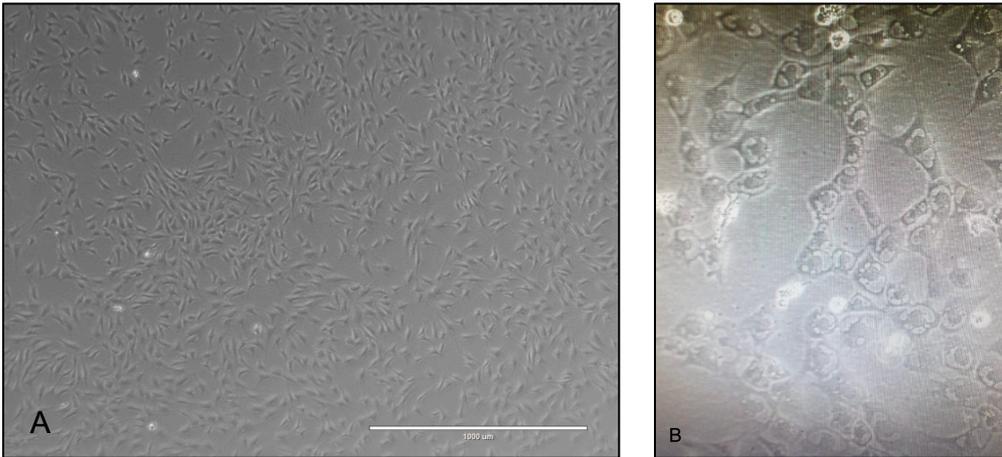


Abb. 18 Aufnahme des Phänotyps von Chondrozyten in MesenCult™. A: Zelldichte 1 Mio., Maßstab 1000 µm; B: Chondrozyten mit verändertem Phänotyp am Tag 5 (40x Objektiv).

Phänotyp von MSCs und Chondrozyten bei einer Kultivierung in MesenCult™ im Monolayer. MSCs zeigen adhärentes Plastikwachstum bei einer Zelldichte von 1 Mio. Zellen. Gelöste/abgestorbene Zellen zeigen sich in rundlicher Gestalt. Abb. 17 B zeigt eine mikroskopische Aufnahme von MSC am Tag 5 nach Kultivierung. Man erkennt einen hohen Anteil an toten Zellen. Abb. 18 A veranschaulicht adhärentes Wachstum von Chondrozyten. Die mikroskopische Aufnahme in Abb. 18 B zeigt eine abweichende Zellmorphologie von Chondrozyten am Tag 5 in MesenCult™. Man erkennt einen aufgehellten Ring um das Zellinnere von welchem ausgehend dunkle speichenartige Linien in die Peripherie ziehen.

3.2. Ergebnisse aus dem Hohlfaser-Bioreaktor

3.2.1. Überprüfung der eingesetzten Medien und Lösungen auf Partikel im NTA

Zur Sicherstellung, dass gemessene Partikel/ml auch wirklich von im Bioreaktor kultivierten Zellen stammen und keine falsch positiven Werte von eingesetzten Medien und Lösungen herrühren, wurden alle verwendeten Medien und Lösungen separat im NTA auf ihren Eigengehalt an Partikel/ml ≤ 200 nm hin untersucht. HEPES und Water High Quality sterile wiesen mit 3,42 bzw. 0,42 Mio. Partikel/ml ≤ 200 nm einen gewissen Eigenanteil an Partikeln/ml auf. Um Verfälschungen der Partikelanzahl/ml von aus dem Bioreaktor gewonnenen Partikeln zu vermeiden wurden HEPES und Water High Quality sterile vor Gebrauch mit einem 0,2 μ M Filter filtriert.

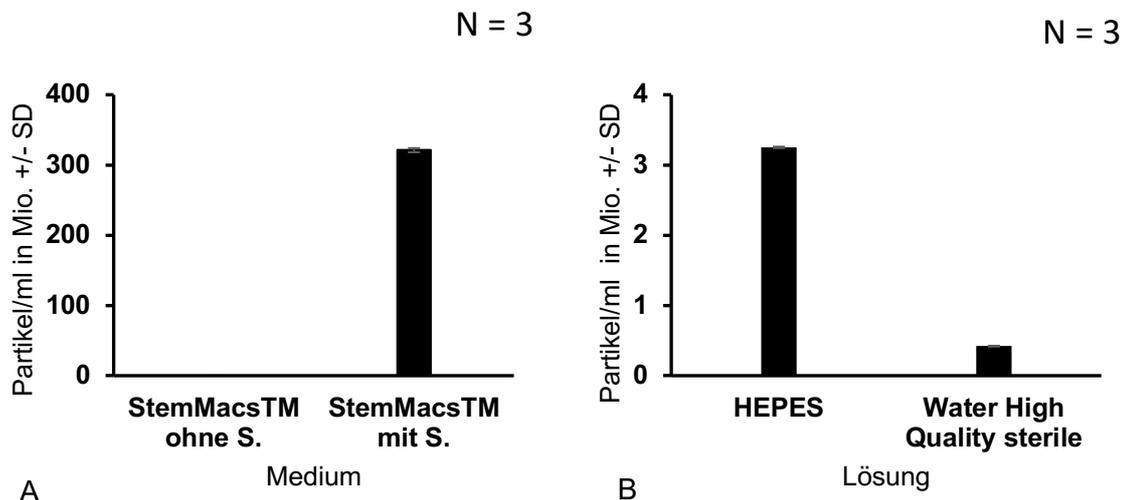


Abb. 19 Messung der Partikel/ml ≤ 200 nm von A: STEMMacs™ ohne Supplement und STEMMacs™ mit Supplement B: HEPES und Water High Quality sterile.

Überprüfung der eingesetzten Medien und Lösungen hinsichtlich ihres Eigengehalts an Partikel/ml durch Messung im NTA. Es konnten keine Partikel/ml in StemMACS™ ohne Supplemente (StemMACS™ MSC Expansion Media XF Supplement) gemessen werden. StemMACS™ mit zugeführten Supplementen wies pro ml 321 Mio Partikel ≤ 200 nm auf (Abb. 19 A). Die eingesetzten Lösungen HEPES und Water High Quality sterile wiesen 3,25 Mio. bzw. 0,42 Mio. gezählte Partikel/ml ≤ 200 nm auf (Abb. 19 B).

3.2.2. Messung nicht adhärenter Zellen und Überprüfung der Zellmorphologie

Die visuelle Überprüfung der Zellviabilität in einem 3D-Kultursystems stellt eine Schwierigkeit dar. Zur indirekten Überprüfung der Zellviabilität wurde daher der Anteil an inokulierten Zellen bestimmt, welcher nicht an die Hohlfaser-Membran im ECS adhärierte. Dieser Versuch wurde am ersten Bioreaktor durchgeführt, welcher mit 6 Mio. MSCs beladen wurde. Nach Tag 1 wurden im Mittelwert 246.450 Zellen gezählt, was 4,11 % der eingesäten Zellen entspricht. Nach Tag 5 waren es im Mittelwert 44.040 Zellen, was 0,73 % der ursprünglichen Zellzahl entspricht. Referenzwerte, inwieweit der prozentuale Anteil nicht adhärenter Zellen im ECS als zu hoch oder zu niedrig erscheint, sind in der Literatur momentan nicht auffindbar. Fest steht, dass es fünf Tage nach Inokulation zu einem Gesamtverlust von < 5 % der eingesäten Zellen kam. Man kann also davon ausgehen, dass der Großteil an eingesäten MSCs an die Hohlfaser-Membran im ECS adhärierte.

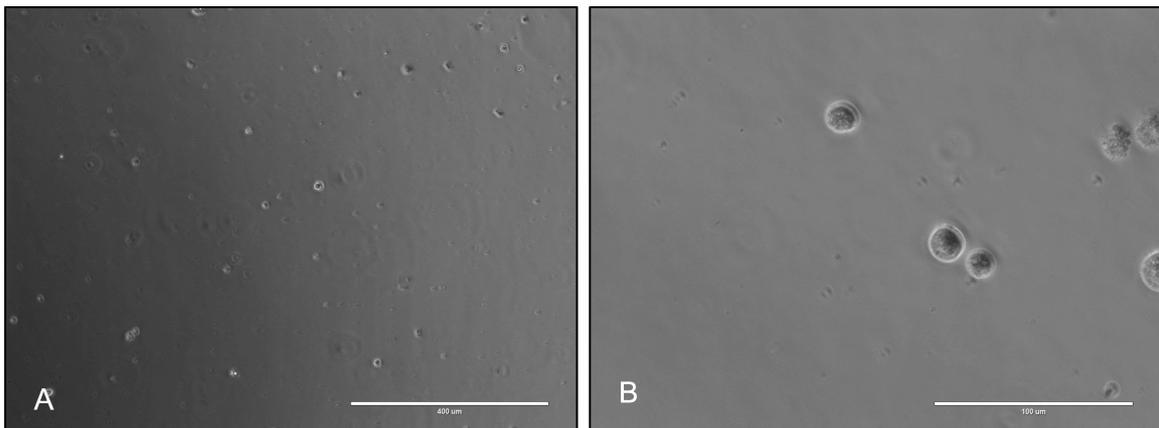


Abb. 20 Nicht an die Hohlfaser Membran adhärenter MSCs. A: Maßstab 400 µm, B: Maßstab 100 µm.

3.2.3. Glucose-, Laktat- und Ammoniakkonzentration im Medium des Bioreaktors von MSCs und Chondrozyten

Durch Messung der Abnahme der Glucose-Konzentration sowie dem Anstieg an zellulären Metaboliten (Laktat und Ammoniak) kann indirekt auf die Zellviabilität geschlossen werden. Sowohl bei MSCs als auch Chondrozyten zeigte sich eine geringe Abnahme der Glucose-Konzentration nach jedem siebentägigen Medieuminsatz. Dass die Zellen dennoch metabolisch aktiv sind, zeigt sich in der Zunahme der Laktat- und Ammoniakkonzentration im Medium. Die Messungen zeigen die Konzentrationen von Glucose und Laktat in mg/dl im Medium des Bioreaktors. Die Glucosekonzentration wurde stets vor und nach der Verwendung im Bioreaktor gemessen. Sowohl bei einer Kultivierung von MSCs als auch Chondrozyten im Bioreaktor erkennt man eine geringfügige Abnahme der Glucosekonzentration bis zum Mediumwechsel. So sank die Konzentration an Glucose des Bioreaktors mit MSCs nach einem Mediumwechsel um jeweils 7 bis 10 mg/dl (Abb. 21), während im Bioreaktor mit Chondrozyten die Abnahme zwischen 2 und 14 mg/dl betrug (Abb. 22). Zusätzlich wurden (wie auch bei Messungen der Glucosekonzentration im Monolayer) die Glucosekonzentrationen mit der in 2.4.3. beschriebenen Formel in Glucoseverbrauch [mg/dl] pro 100.000 Zellen und Stunde normiert. Die errechneten Verbräuche an Glucose (100.000 Zellen und Stunde) beziehen sich jeweils auf die Zeit bis zu einem erneuten Mediumwechsel (Abb. 23 und 24). In Hinsicht auf die Laktatkonzentration konnte bei Einsatz eines neuen Mediums keine Konzentration bestimmt werden („too low to measure“), sodass eine Messung stets nur nach einer siebentägigen Verwendung des Mediums durchgeführt werden konnte (Ausnahme: Erste beiden Messungen aus dem Bioreaktor mit Chondrozyten, die erfolgten nach 12 bzw. 14 Tagen). Der mit MSCs beladene Bioreaktor zeigte im Medium einen Laktatanstieg auf die Werte: 9, 4 und 4 mg/dl der jeweiligen Tage. Beim mit Chondrozyten beladenen Bioreaktor lagen die Laktatkonzentration vor jedem Mediumwechsel zwischen 6 und 9 mg/dl.

MSCs
N= 1

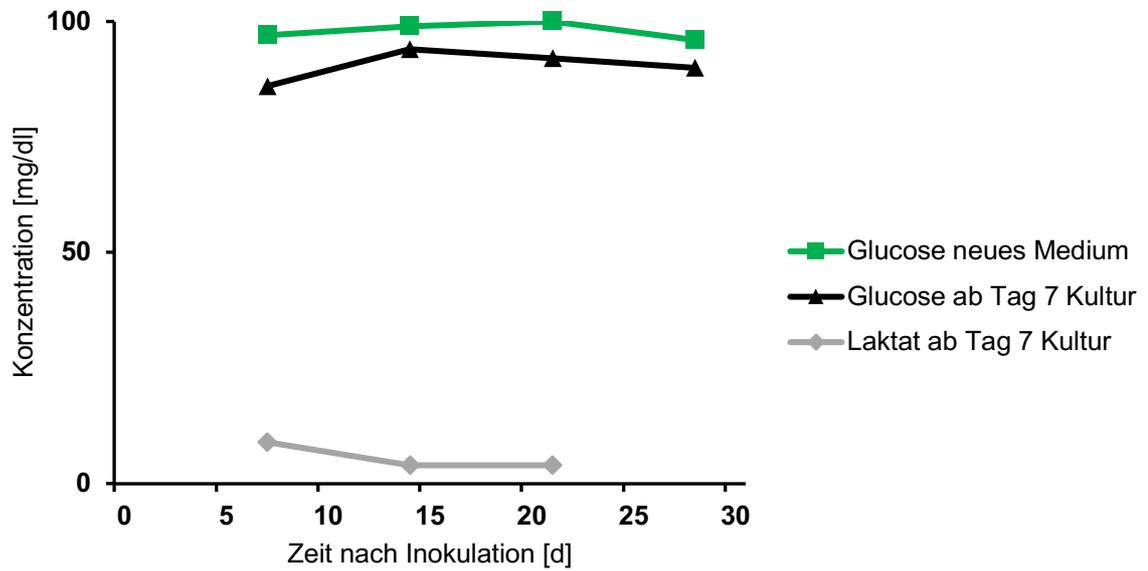


Abb. 21 Konzentrationen von Glucose im Medium vor und nach Verwendung sowie Laktat nach Verwendung im MSCs - Bioreaktor.

Chondrozyten, N= 1,

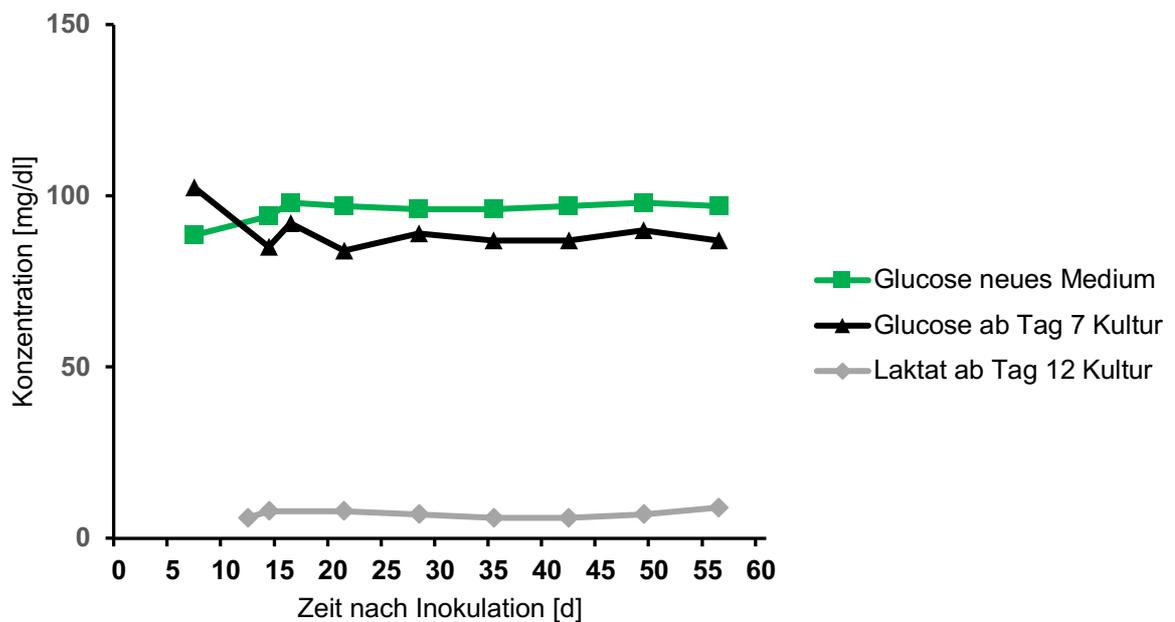


Abb. 22 Konzentrationen von Glucose im Medium vor und nach Verwendung sowie Laktat nach Verwendung im Chondrozyten - Bioreaktor.

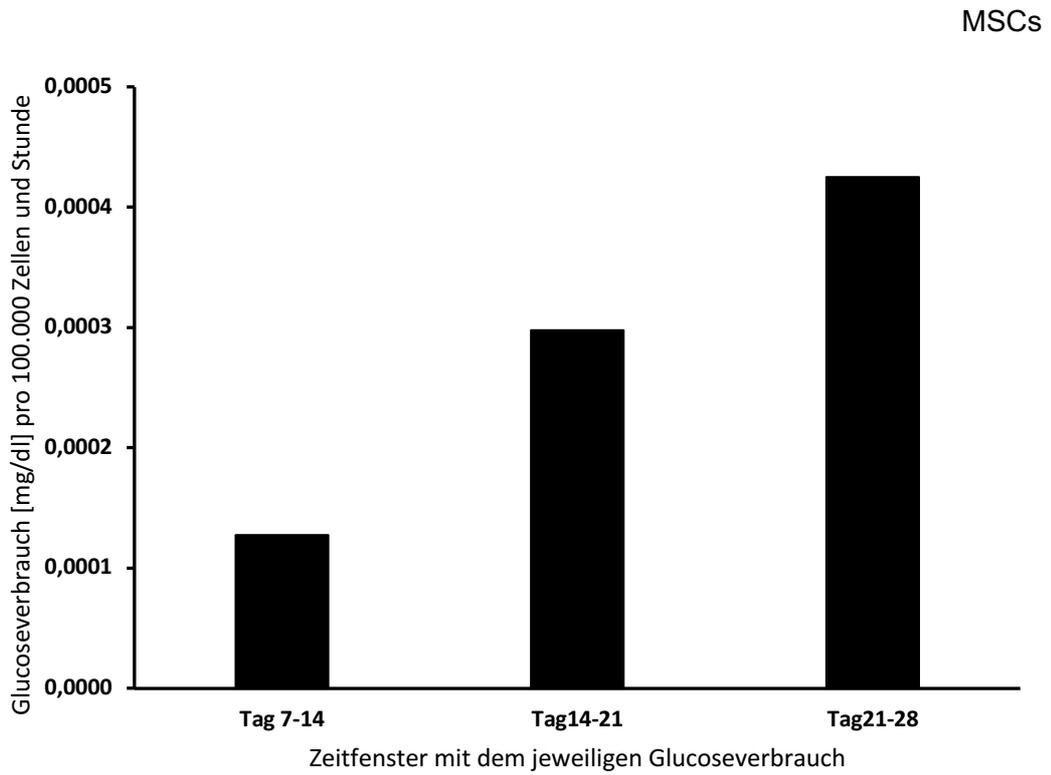


Abb. 23 Glucoseverbrauch [mg/dl] pro 100.000 MSCs und Stunde im Bioreaktor.

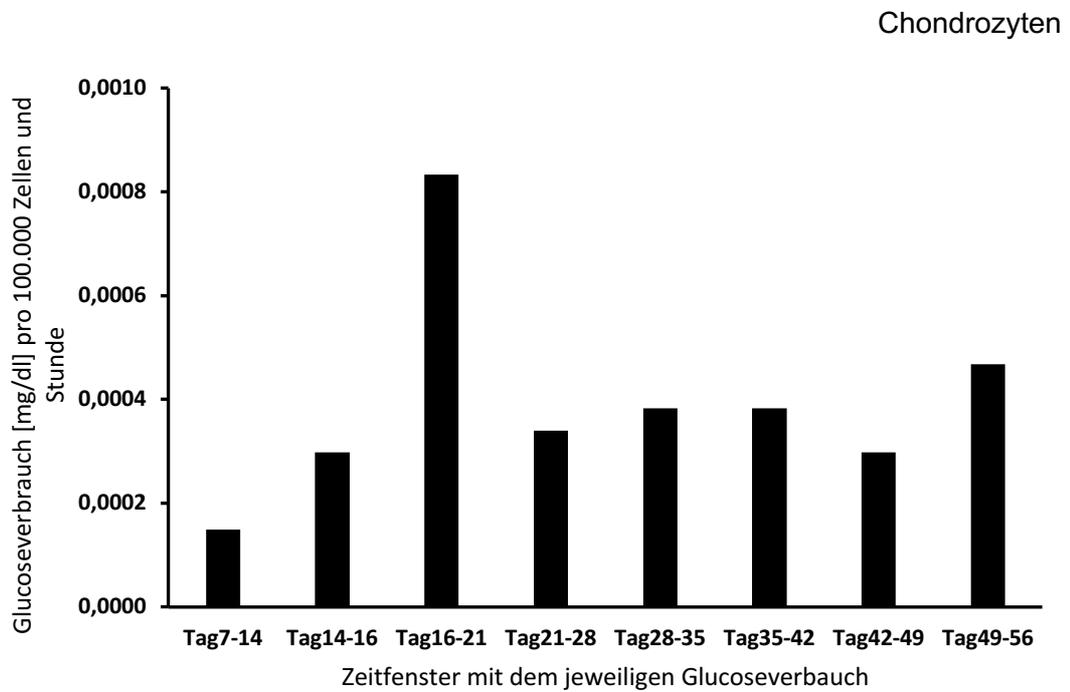


Abb. 24 Glucoseverbrauch [mg/dl] von 100.000 Chondrozyten pro Stunde im Bioreaktor.

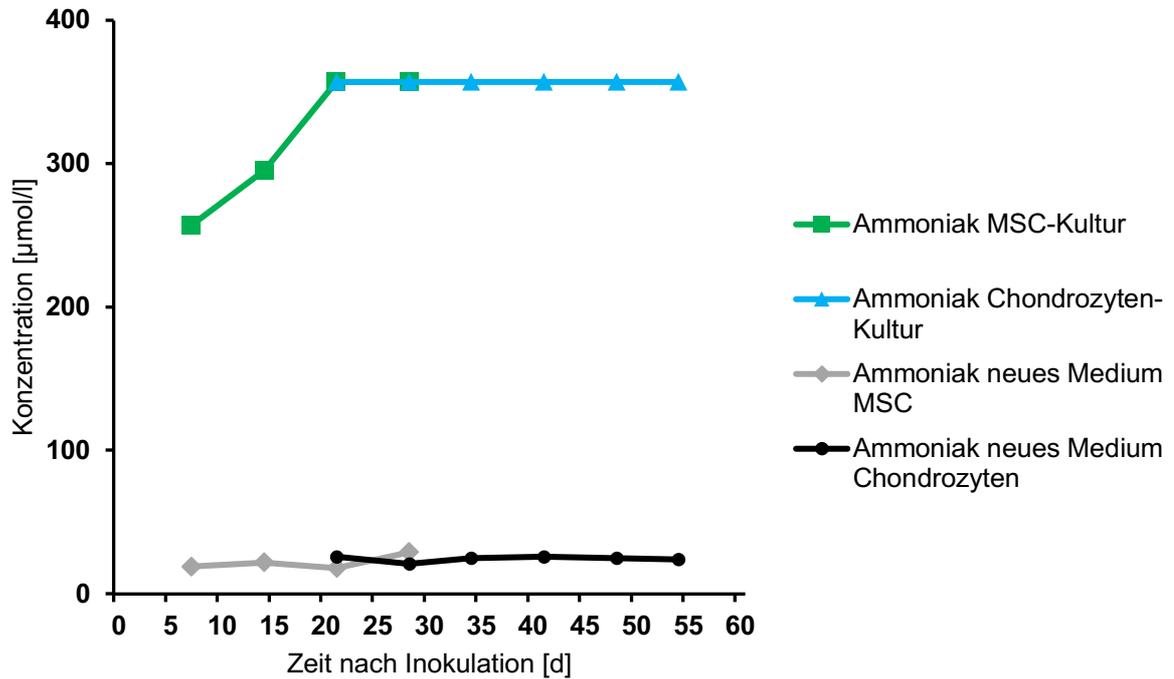


Abb. 25 Messung der Ammoniak-Konzentration vor und nach Einsatz des Mediums im Bioreaktor

Zunahme der Ammoniak-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ vor und nach Verwendung eines neuen Mediums (StemMACS™) im mit MSCs bzw. Chondrozyten beladenen Bioreaktor. Es sei darauf hingewiesen, dass die Gerätschaften des Zentrallabors der Veterinärmedizinischen Universität Wien exakte Ammoniak-Konzentration nur bis einschließlich $357 \mu\text{mol/l}$ messen können. Werte darüber werden als $> 357 \mu\text{mol/l}$ angegeben. Neue Medien wiesen vor ihrem Einsatz in den Bioreaktor Konzentrationen zwischen 18 und $24 \mu\text{mol/l}$ auf. Die Messungen wurden im siebentägigen Rhythmus durchgeführt, wobei aus technischen Gründen die Messung der Konzentration des mit Chondrozyten kultivierten Bioreaktors erst ab Tag 21 erfolgte. Hinsichtlich des mit MSCs eingesäten Bioreaktors nimmt die Ammoniak-Konzentration im Medium von der ersten Messung am Tag 7 bis zur dritten Messung am Tag 21 konstant zu ($257, 295, > 357 \mu\text{mol/l}$). Bezüglich des mit Chondrozyten inokulierten Bioreaktors betrug die Ammoniakkonzentration im Medium vor jedem Wechsel $> 357 \mu\text{mol/l}$.

3.2.4. Anzahl Partikel/ml pro 14 Mio. MSCs aus dem Bioreaktor und Monolayer

Während der Inbetriebnahme der mit jeweils 14 Mio. Zellen beladenen Bioreaktoren, wurden zu bestimmten Zeitintervallen jeweils 6 ml EV angereichertes konditioniertes Medium aus dem ECS entnommen und im NTA hinsichtlich Anzahl und Durchmesser analysiert. Gleichzeitig wurde nach 48 h konditioniertes Medium von im Monolayer ausgesäten MSCs bzw. Chondrozyten entnommen und im NTA untersucht. Die Partikelanzahl/ml aus den Monolayern wurde auf 14 Mio. Zellen extrapoliert. Die erfolgte Gruppierung in Partikel ≤ 200 und > 200 nm erlaubt eine erste Charakterisierung der gemessenen Vesikel. Exosomen werden laut Literatur bis zu einer Maximalgröße von bis zu 150 nm definiert. Betrachtet man die Ergebnisse der in Abb. 26 und Abb. 27 dargestellten Histogramme von aus MSCs und Chondrozyten isolierten Partikel/ml, erkennt man stets einen höheren Anteil an Partikel ≤ 200 nm einer jeweiligen Entnahme. Bedeutet, dass es sich beim überwiegenden Teil einer Messung um isolierte Exosomen handeln muss.

N = 3

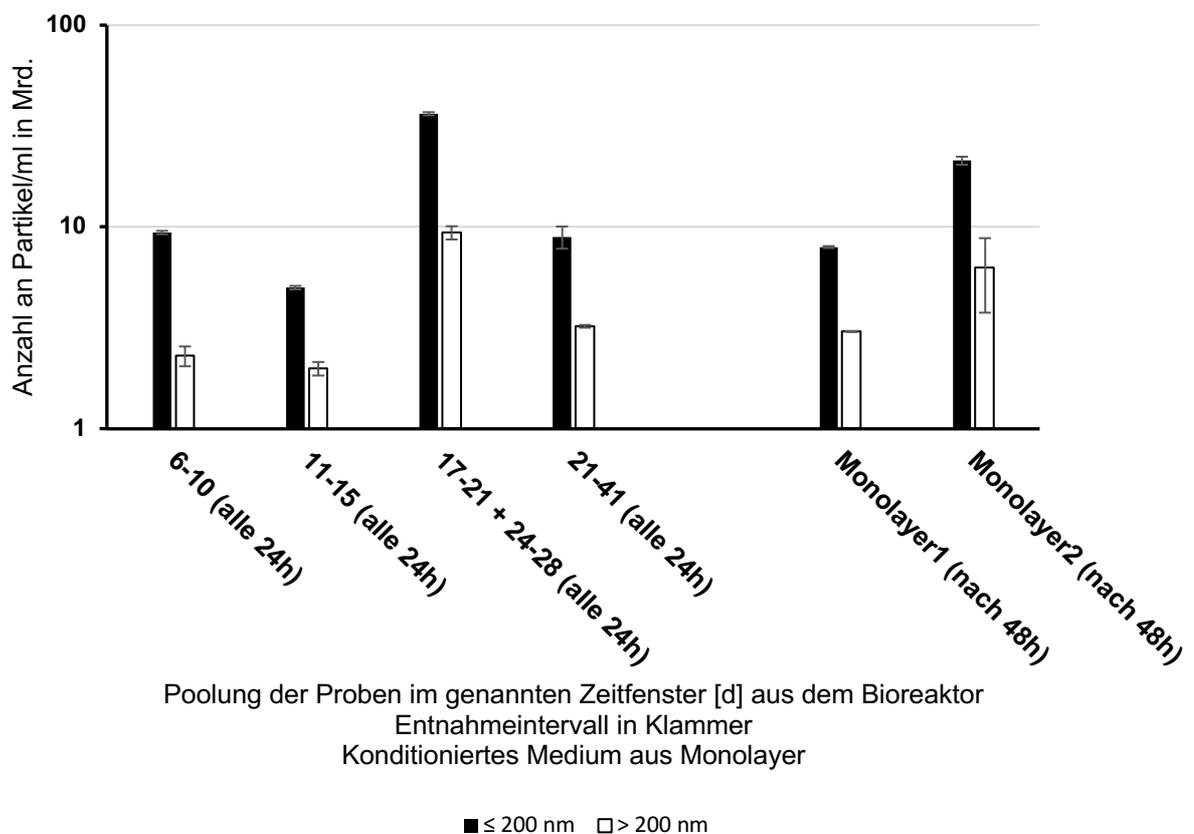


Abb. 26 Von MSCs stammende isolierte Partikel/ml aus dem Bioreaktor und Monolayer.

Die Anzahl an Partikeln/ml wurde in logarithmischer Skalierung der jeweiligen Isolierungen des Bioreaktors und der beiden angesetzten Monolayer dargestellt. Die Standardabweichung ergibt sich aus den technischen Triplikaten. Die Isolierungen bzw. Ernten aus dem mit 14 Mio. MSCs beladenen Bioreaktor fanden jeweils im 24 h Rhythmus zu den genannten Tagen statt und wurden als gepoolte Probe im NTA analysiert. Die Entnahmen aus den Monolayern fanden nach einer Kulturdauer von 48 h in serumfreiem StemMACS™ statt. Die Partikel/ml wurden hinsichtlich ihres Durchmessers in zwei Gruppen unterteilt: ≤ 200 nm und > 200 nm. Der Anteil an Partikel/ml ≤ 200 nm war sowohl bei den Proben aus dem Bioreaktor als auch aus den der beiden Monolayern anteilmäßig größer gegenüber der Gruppe > 200 nm. Alle gepoolten Proben der fünftägigen Entnahme-Intervalle á 24 h weisen jeweils eine niedrigere Anzahl an Partikel/ml als die zehntägig gepoolte Probe (17-21 + 24-28 d (alle 24h)) auf.

3.2.5. Anzahl Partikel/ml pro 14 Mio. Chondrozyten aus dem Bioreaktor und Monolayer

N = 3

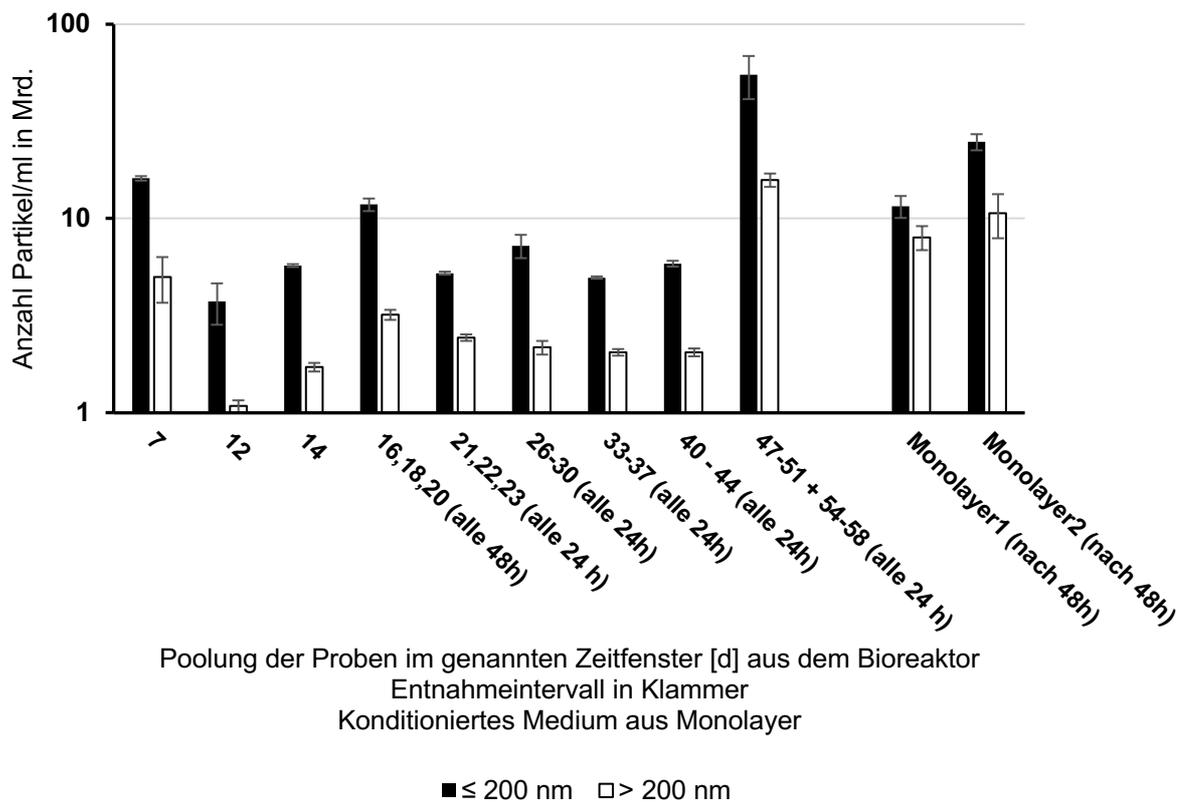


Abb. 27 Von Chondrozyten stammende isolierte Partikel/ml aus dem Bioreaktor und Monolayer

Entnommene Proben aus dem mit Chondrozyten inokulierten Bioreaktor zu den gegebenen Zeitfenstern in Tagen. Die gemessene Anzahl an Partikeln/ml ist in logarithmischer Skalierung in Mrd. angegeben. Die Standardabweichung ergibt sich aus den technischen Triplikaten. Zusätzlich ist die Anzahl an gemessenen Partikeln/ml aus den beiden Monolayern aufgetragen worden. Ähnlich wie beim mit MSCs beladenen Bioreaktor fällt der Anteil an Partikel mit einem Durchmesser von ≤ 200 nm von Chondrozyten sowohl aus dem Bioreaktor als auch aus den beiden Monolayern größer aus als derjenige > 200 nm. In den fünftägigen Zeitintervallen zwischen Tag 26 bis 44, zeigen sich mit 2,17; 2,05 und 2,05 Mrd. Partikel/ml > 200 nm auffallend ähnliche Werte. Die höchste Anzahl an Partikeln/ml (54,9 Mrd ≤ 200 nm bzw. 15,8 Mrd. > 200 nm) wurden beim zehntägigen Pool gemessen (Tag 47-51 + 54-58).

4. Diskussion

4.1. Ergebnisse aus den Vorversuchen im Monolayer

4.1.1. MTT Test – Metabolische Aktivität und Zellproliferation

Wie herausfordernd es ist, ein geeignetes chemisch definiertes serumfreies Medium zur Kultivierung von primären Zellen im Bioreaktor auszuwählen, wird bereits durch die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse der ersten beiden Vorversuchen im Monolayer (MTT-Test und Messung der Zellproliferation in unterschiedlichen Medien) deutlich. Hohe gemessene OD-Werte im MTT-Test spiegeln sich hier nur zum Teil bzw. nicht in den gemessenen Zellproliferationen wieder. MSCs wiesen bei einer Kultivierung in DMEM (+ 10% FBS) die höchsten gemessenen metabolischen Aktivitäten auf, jedoch proliferierten sie am stärksten bei einer viertägigen Kultivierung in MesenCult™. Noch auffälliger ist der Vergleich bei Kultivierung von Chondrozyten in MesenCult™ und NutriStem™. Zeigten sich bei einer Kultivierung in NutriStem™ zu allen gemessenen Zeitpunkten höhere metabolische Aktivitäten als in MesenCult™ (in den ersten vier Stunden sogar höher als in serumhaltigem DMEM), proliferierten Chondrozyten in diesem hingegen am geringsten. Schlüssigere Ergebnisse liefern bei demselben Vergleich die Ergebnisse von in NutriStem™ und MesenCult™ kultivierten MSCs. So spiegelt sich eine hohe metabolische Aktivität in einer hohen Zellproliferation in MesenCult™ wieder, während bei Verwendung von NutriStem™ niedrige metabolische Aktivitäten mit niedrigen Zellproliferationen einhergingen. Desweiteren zeigten MSCs in MesenCult™ zu allen Zeitpunkten höhere OD-Werte und Messungen der Zellproliferationen, als jene Werte von Chondrozyten. Die höhere metabolische Aktivität der MSCs gegenüber fetalen Chondrozyten könnte in der chemischen Zusammensetzung von MesenCult™ begründet sein. Die Komposition der einzelnen Bestandteile im Medium orientiert sich am Stoffwechsel von MSCs, wodurch diese gegenüber Chondrozyten ein besseres Wachstum erzielen. Ein ähnliches Ergebnis wäre auch in der Kultivierung mit NutriStem™ zu erwarten. Obwohl die Rezeptur der Medienzusammensetzung laut Hersteller ebenfalls auf den Stoffwechsel von MSCs angepasst ist („optimales Wachstum und Expansion“ („Sartorius AG“ 2023)), zeigen fetale Chondrozyten überraschenderweise zu allen gemessenen Zeitpunkten eine höhere metabolische Aktivität als MSCs. Um die Vermutung zu untermauern, dass die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe von NutriStem™ zur erfolgreichen Kultivierung von ovinen MSC und Chondrozyten ungeeignet ist, wurde in einem weiteren Versuch eine primäre 24 h

Kultur in serumhaltigem DMEM mit einer anschließenden 72h Kultur in NutriStem™ durchgeführt. Die hier deutlich erkennbare Zellexpansion von MSCs und Chondrozyten deutet daraufhin, dass die primäre 24 h Kultivierung in FBS-haltiges DMEM für eine Bereitstellung der in NutriStem™ fehlenden Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone, Proteine für die Zelladhäsion) sorgen muss, sodass eine erfolgreiche Zellexpansion in NutriStem™ für weitere 72 h sichergestellt werden kann. Dieser durch FBS-haltiges DMEM erzielte Effekt dürfte allerdings nicht von Dauer sein, da bei einer weiteren Kultivierung in NutriStem™ die Serumfaktoren (von serumhaltigem DMEM) durch die Zellen im zeitlichen Verlauf verstoffwechselt werden, sodass eine anschließende Langzeitkultivierung durch NutriStem™ nicht sicher gewährleistet werden kann. Da im Bioreaktor eine serumfreie Kultivierung angestrebt wird und der alleinige Einsatz von NutriStem™ unbefriedigende Ergebnisse bezüglich Zellproliferation und metabolischer Aktivität liefert, ist die Verwendung von NutriStem™ als Kulturmedium von fetalen ovinen MSCs und Chondrozyten im Hohlfaser-Bioreaktor als untauglich eingestuft worden.

4.1.2. Glucoseverbrauch von MSCs und Chondrozyten in chemisch definiertem, serumfreiem Medium (MesenCult™)

Ein hoher Verbrauch an Glucose von im Medium kultivierten Zellen spiegelt sich in einem hohen Metabolismus wieder. Dies gilt für eine Kultivierung von MSCs und Chondrozyten in MesenCult™ im Monolayer gleichermaßen (siehe Abb. 11, 13 und 14). Die vergleichsweise hohen gemessenen Zellproliferationen erklären die gemessenen Abnahmen an Glucose bei unterschiedlichen Zelldichten. Die deutlich sichtbaren Abnahmen der Glucose-Konzentration bei hohen Zelldichten (10; 5; und 2,5 Mio. Zellen) sind jedoch - wie die Umrechnungen in Glucoseverbrauch pro 100.000 Zellen und Stunde zeigen - nicht mit hohen Verbrauchsraten an Glucose/Zelle gleichzusetzen. So konsumierten sowohl MSCs als auch Chondrozyten bei Zelldichten von einer 1 Mio. und 0,5 Mio. pro Stunde mehr Glucose als die mit anfangs 10 Mio. eingesäte Zellen. Das bedeutet, dass die hohen Abnahmen an Glucose allein durch die hohe Zellzahl zustande kommen muss. Weiters erkennt man bei hohen Zelldichten (10; 5; und 2,5 Mio. Zellen) gegen Ende der Messungen keinen Verbrauch an Glucose mehr. Dieser reduzierte Verbrauch könnte von einer stoffwechselbedingten Änderung in der Zusammensetzung des Kulturmediums herrühren. Bereits geringe Verschiebungen des pH

Wertes des Kulturmediums spiegeln sich in einer reduzierten Konsumierung von Glucose wieder (Tsao et al. 2005). Eine pH Änderung stellt wiederum das Resultat einer Anreicherung zellulärer Metaboliten (z.B. Laktat und Ammoniak) des Glucosestoffwechsels im Medium dar, welche ab bestimmten Konzentrationen toxisch auf die zu kultivierenden Zellen wirken. Dies deutet darauf hin, dass das Unterbleiben eines weiteren Glucoseverbrauchs mit einer eventuellen Reduktion/einer Einstellung des Zellstoffwechsels der Zellen begründet und bei Unterlassung eines Mediumwechsels bis hin zum Zelltod führen kann. Ein solches Szenario ist allerdings bei einer Kultivierung im Bioreaktor aufgrund des Vorliegens eines Mediumreservoirs sowie einer Pumpvorrichtung nicht zu erwarten. Der konstante Mediumfluss durch den intrakapillären Raum versorgt die Zellen mit Nährstoffen und transportiert gleichzeitig toxische Abfallprodukte ab, welche im Reservoirvolumen auf für die Zellen unschädliche Konzentrationen verdünnt werden.

4.1.3. Vergleich des Phänotyp nach Tag 1 und Tag 5 von MSCs und Chondrozyten in chemisch definiertem, serumfreiem Medium (MesenCult™)

Dass die Herstellung primärer Zellkulturen im Gegensatz zu etablierten Zelllinien arbeitsintensiv, zeitaufwendig und oft mit unerwarteten Ereignissen einhergeht, ist bekannt. Gravierende Unterschiede zur Dauerkultur können zum einen eine begrenzte Lebensdauer (begrenzte Kulturdauer) und zum anderen das Auftreten von typischen Veränderungen, die im Kulturverlauf primärer Zellen eintreten wie zum Beispiel das Eintreten der Seneszenz, die Verringerung der Zellteilungsrate oder der Veränderung einer Zellgestalt sein (Schmitz 2020). Unerwartete Ereignisse in der Verwendung von MesenCult™ als potenzielles chemisch definiertes Medium zur Betreibung des Bioreaktors zeigten sich im Zuge der Vorversuche im Monolayer an MSC und Chondrozyten. So zeigten MSCs am Tag 5 in Kultur einen sehr hohen Anteil an toten Zellen, während Chondrozyten Abnormalitäten ihrer Zellgestalt aufwiesen. Da im Bioreaktor keine visuelle Überprüfung der Zellgestalt vorgenommen werden kann und eine hohe Sterberate der Zellen nicht toleriert wird, hat man sich dazu entschlossen das von der Partnerfirma (Evercyte GmbH, Wien) verwendete Kulturmedium MesenCult™ nicht zur Kultivierung von primären fetalen ovinen MSCs und Chondrozyten im Bioreaktor zu verwenden.

Aufgrund der längerfristigen Erfahrungen in der Kultivierung von fetalen ovinen MSCs und Chondrozyten mit StemMacs™ MSC Expansion Media XF im Institut hat man sich dazu entschieden den Bioreaktor auch mit diesem chemisch definierten serumfreien Medium zu betreiben.

4.2. Ergebnisse aus dem Bioreaktor

4.2.1. Überprüfung der eingesetzten Medien und Lösungen auf Partikel im NTA

StemMACS™ MSC Expansion Media wies keine eigenen Partikel/ml auf, während bei zugesetzten Supplementen (StemMACS™ MSC Expansion Media XF Supplement) eine Konzentration von 321 Mio. Partikel/ml gemessen werden konnte. Dies bedeutet, dass der Anteil an Eigenpartikeln/ml alleinig von den zugesetzten Supplementen stammen muss. Es sei jedoch festgestellt, dass der Anteil des Eigengehalts an Partikeln/ml des supplementierten Mediums an den entnommenen Proben aus dem ECS (in welchem die Zellen mit Medium ohne Supplemente enthalten sind) aufgrund der kleinen Porengröße der Hohlfasermembranen die den Mediumraum (intrakapillärer Raum) vom ECS trennt trotzdem extrem geringer ausfällt. Die trennende Membran wurde eigens dafür konzipiert, Exosomen und andere Partikel am Übertritt aus dem intrakapillären Raum in den ECS und *vice versa* zu verhindern, damit eine möglichst reine EV-„Ernte“ generiert werden kann (Diban und Stamatialis 2014). Dies erlaubt den Rückschluss, dass gemessenen Partikel/ml von aus dem Bioreaktor stammenden Proben einen weitgehend zellulären Ursprung besitzen müssen.

4.2.2. Überprüfung der Zelladhäsion und Zellmorphologie von MSCs im Bioreaktor

Der Hersteller FiberCellSystems® (FiberCellSystems 2021) verspricht, dass hMSCs fest an die Hohlfasern des ECS adhären (auch in Gestalt von Sphäroiden) und dass selbst nach Eingabe von Trypsin kaum Zellen aus dem ECS herausgespült werden können. Die Guidelines der Firma erwähnen aber auch, dass sich ein geringer Anteil an Zellen aus dem ECS lösen könnte. Ob dieses Versprechen auch für ovine MSCs gilt, wurde durch die Spülungen des ECS am ersten Bioreaktor (6 Mio. MSC) mit jeweils 6 ml StemMACS™ ohne Supplemente

untersucht. Weil nach zwei Spülungen innerhalb der ersten 5 Tagen seit der Inbetriebnahme des Bioreaktors weniger als 5 % der eingesäten Zellen wieder aus dem ECS zurückgewonnen werden konnte, scheinen auch ovine MSCs fest an die Hohlfasermembran des ECS zu adhären. Inwieweit ein Verlust von weniger als 5 % als „geringer Anteil“ eingestuft werden kann, ist nicht beurteilbar. Ob herausgespülte MSCs noch ihre Stammzeleigenschaften beibehalten, müsste in einem weiteren nächsten Schritt durch eine Durchflusszytometrie auf deren Oberflächenantigene CD73- (Endo-5-Nukleotidase), CD90 (Thy-1), CD105 (Endoglin) sowie eine Untersuchung auf trilineage mesenchymale Differenzierungsfähigkeit (adipogen, chondrogen und osteogen) durchgeführt werden (Dominici et al. 2006).

4.2.3. Messungen der Glucose-, Laktat- und Ammoniakkonzentration im Bioreaktor

Die Gründe für eine geringgradige Abnahme der Glucose-Konzentrationen können vielfältig sein. Laut Hersteller FiberCellSystems™ ist ein Monitoring von im Bioreaktor kultivierten MSCs im Vergleich zu Hybridoma-Zellen (B-Zellen) oder immortalisierten Zellen aus den Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters (CHO) deutlich schwieriger. Während CHO bei einer eingesetzten Dichte von 1×10^9 Zellen bis zu 1g Glucose pro Tag verbrauchen, würden MSCs gerade mal 10 % davon benötigen. Dies soll mit folgender Rechnung geprüft werden:

100.000 MSCs verbrauchen pro Stunde zwischen Tag 14 und 21 0,0003 mg/dl Glucose. Also 0,0072 mg/dl am Tag.

1 Mrd. MSCs verbrauchen dann 72mg/dl Glucose am Tag. $72\text{mg/dl} \cong 0,72\text{ g/l}$

Da 250 ml Medium eingesetzt wurden: $0,72\text{ g/l} \times 0,25\text{l} = 0,18\text{ g/Tag}$

$0,18\text{ g} \cong 18\% \text{ von } 1\text{ g}$

MSCs zeigten zwischen Tag 14 und 21 der Inbetriebnahme des Bioreaktors mit 14 Mio. Zellen einen im Vergleich zu CHO-Zellen 18-prozentigen Verbrauch an Glucose pro Tag, was über dem vom Hersteller angegebenen Wert liegt. Ein weiterer Grund für den im Vergleich zum Monolayer geringen Glucoseverbrauch (dort waren die Glucoseverbräuche 2 Dezimalstellen

höher, allerdings aber auch in einem anderen Medium (MesenCult™)) ist, dass die Glutaminkonzentration im Medium einen Einfluss auf den Glucoseverbrauch von Zellen ausübt (Genzel et al. 2005). Auf diese Aussage beruft sich auch der Hersteller des Bioreaktors FiberCellSystems™, indem er behauptet, dass MSCs zur Energiegewinnung im Bioreaktor hauptsächlich die Aminosäure Glutamin aus dem Medium nutzen würden, was in der Bildung von Ammoniak ersichtlich wird (FiberCellSystems 2021). Betrachtet man den Glucosestoffwechsel auf biochemischer Ebene genauer, könnte ein geringer Glucoseverbrauch im Bioreaktor auch mangels eines Gasaustausches zwischen Zellen und Atmosphäre herrühren. Während bei einer Kultivierung im Monolayer ein regelrechter Gasaustausch zwischen Inkubator und Zellkulturflasche bzw. der Oberfläche des Mediums stattfindet, stellt das 3D-Kultursystem des Bioreaktor ein geschlossenes System dar. Inwieweit Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid in und aus dem Bioreaktor hinein und heraus diffundieren ist nicht geklärt und nicht vom Hersteller beschrieben. Fest steht, dass die Energiegewinnung aus Glucose durch aerobe Glykolyse deutlich effizienter ist, als unter anaeroben Bedingungen. Daher lässt sich auch die Vermutung aufstellen, dass Zellen im Bioreaktor ihren Energiebedarf -aufgrund des vermutlichen Sauerstoffmangels im 3D-System- nicht allein durch den Glucosestoffwechsel decken können (ein Anstieg der gemessenen Laktatkonzentrationen (durch anaerobe Glykolyse) untermauert diese Vermutung) und auf die Aminosäure Glutamin zurückgreifen müssen. Ein weiteres Argument des geringen Glucoseverbrauchs im Bioreaktor könnte auch in der niedrigen Zellproliferation in einem 3D-Kultursystem liegen. Laut Hersteller zeigen MSCs in einem Hohlfaser-Bioreaktor keine Anzeichen einer Zellproliferation und -differenzierung (FiberCellSystems 2021). Demnach scheinen die geringen gemessenen Abnahmen an Glucose-Konzentrationen für MSCs „normal“ zu sein und dürfen nicht mit einer schlechten Zellviabilität interpretiert werden. Weitere Indizien, die für eine positive Zellviabilität im Bioreaktor sprechen, stellen daher die Zunahmen der Laktat- und Ammoniakkonzentrationen nach jedem Mediumwechsel dar. Bezüglich der gemessenen Laktatkonzentrationen wiesen Chondrozyten bei fast allen Messpunkten eine höhere Konzentration als MSCs auf. Mit Hinblick auf die Ammoniakkonzentrationen wiesen Chondrozyten zu allen Messpunkten stets die maximal messbare Konzentration von $> 357 \mu\text{mol/l}$ auf während MSCs diesen Wert erst nach 21 Tagen erreichten. Setzt man beide Ergebnisse in Relation zueinander (die gleiche ausgebrachte Zahl an MSC bzw. Chondrozyten im Bioreaktor erlaubt dies – jeweils 14 Mio.), scheinen Chondrozyten einen im Vergleich zu MSCs höheren zellulären Stickstoffwechsel im Bioreaktor zu haben. Inwieweit die

gemessenen Laktat- und Ammoniakkonzentrationen die Zellviabilität von im Bioreaktor kultivierten Zellen negativ beeinflussen (z.B. Erreichen toxischer Konzentrationen) kann anhand dieser Daten nicht beurteilt werden. Dazu müssten in weiteren Versuchen mithilfe eines MTT-Assays die Lebensfähigkeit der Zellen bei unterschiedlichen Laktat- bzw. Ammoniakkonzentrationen getestet werden.

4.2.4 Isolierte Partikel/ml aus dem Bioreaktor und Monolayer

Ein Ziel dieser Vorversuche war es, Partikel von im Bioreaktor kultivierten fetalen ovinen MSCs und Chondrozyten zu gewinnen. Durch den Nachweis von Partikeln unterschiedlichen Durchmessers zu allen Entnahmezeitpunkten während des Betriebs beider Bioreaktoren mit jeweils 14 Mio. MSC und Chondrozyten konnte dieses Ziel erreicht werden. In einem nächsten Schritt müssen die gewonnenen Partikel darunter auch die gewünschten EVs charakterisiert werden. Da es sich bei vorliegenden Ergebnissen um rein physikalische Messungen des Partikeldurchmessers handelt, muss zur genauen Identifikation der gemessenen Partikel eine molekularbiologische Analyse (Western Blot, Durchflusszytometrie etc.) durch Bestimmung von vesikelspezifischen Oberflächenmarker (z.B. Tetraspanine, Phosphatidylserin etc.) wie in Tabelle 1 beschrieben wurde, durchgeführt werden. Eine genaue Charakterisierung des gesamten isolierten Sekretoms einschließlich EVs, wäre durch die Anwendung eines Massenspektrometers möglich.

Weiterhin stellt sich die Frage inwieweit durch Änderungen der Labor-Parameter (Größe der Kartusche des Bioreaktors, einzusäende Zelldichte, Pumprate etc.) die Ausbeute an Partikel/ml gesteigert werden kann. Der Hersteller FiberCellSystems™ verspricht in der Anwendung des Hohlfaser-Bioreaktors eine um 10-100-fache Isolierung an Exosomen gegenüber den herkömmlichen 2-D-Kultivierung in Zellkulturflaschen. Litao Yan und Xin Wu (2020) konnten unter Verwendung von EV-depleted FCS (ultrazentrifugiert) eine um das 7,5-fache größere Menge an Exosomen von im Hohlfaser-Bioreaktor (FiberCellSystems™) kultivierten umbilikalen-hMSCs gegenüber einer klassischen 2D-Kultivierung erzielen. Vergleicht man die Ergebnisse der isolierten Mengen an Partikeln/ml ≤ 200 nm aus dieser Arbeit, konnten im Bioreaktor im Gegensatz zum Monolayer zwar mehr Partikel/ml isoliert werden, jedoch wurde eine Vervielfältigung der Partikelkonzentration erst nach Zusammenführen mehrerer Proben erreicht. So wurden im Entnahmezeitraum von Tag 16, 18 und 20 des mit Chondrozyten beladenen Bioreaktors eine Partikelkonzentration (≤ 200 nm)

von 11,8 Mrd. /ml bei Entnahme alle 48 h isoliert. Im Monolayer kultivierte Chondrozyten wiesen nach 48 h eine Konzentration von 11,57 (Monolayer 1) bzw. 24,81 (Monolayer 2) Mrd./ml auf. Dividiert man 11,8 Mrd./ml durch drei, würde man innerhalb 48 h 3,93 Mrd. Partikel pro ml aus dem Bioreaktor erhalten, wodurch in diesem Zeitfenster keine höhere Ausbeute nachgewiesen werden konnte. Ob durch den Einsatz eines Bioreaktors mit einer größeren Kartusche, der Änderung der Pumprate oder durch eine Änderung der Zelldichte eine höhere Ausbeute an EVs bewirkt werden kann, muss durch weitere Versuche untersucht werden.

Fazit

Um EVs in zu Forschungszwecken und später auch therapeutischen Zwecken ausreichenden Mengen zu produzieren, bedarf es einer erfolgreichen Langzeitkultivierung im vorgestellten Hohlfaser-Bioreaktor. Diese Diplomarbeit trägt mit ihren präliminären Ergebnisse bezüglich einer erfolgreichen Kultivierung von fetalen ovinen MSCs und Chondrozyten im Hohlfaser-Bioreaktor einen wichtigen Beitrag innerhalb des großangelegten Projekts mit dem Ziel, EVs auf ihr Potential als Therapeutikum für die Behandlung von Osteoarthritis zu testen, bei. Durch die Durchführung von Vorversuchen wurde der potentielle Einsatz der beiden chemisch definierten serumfreier Medien MesenCult™ und NutriStem™ ausgeschlossen, sodass erste Kultivierungen im Bioreaktor mit institutsbekannten StemMACS™ MSC Expansion Media XF durchgeführt wurden. Messbare Abnahmen der Glucosekonzentration sowie ansteigende Konzentrationen an Laktat und Ammoniak deuten auf eine erfolgreiche Kultivierung beider Zellarten im Bioreaktor hin. Erste Nachweise von im Bioreaktor isolierten Partikeln mit entsprechendem Durchmesser (≤ 200 nm) deuten auf eine erfolgreiche Produktion von EVs beider Zellarten hin. Inwieweit durch Änderungen von Labor-Parametern die Ausbeute an EVs gesteigert werden kann muss durch weitere Arbeiten untersucht werden.

Danksagung

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Betreuerin Dr.ⁱⁿ med. vet. Iris Gerner, PhD, dass sie stets mit Verständnis und Professionalität auf meinen Fragen einging und mich mit Hilfestellungen auf den richtigen Weg führte.

Einen wichtigen Beitrag leistete auch Karyna Tarasova, PhD Studentin, indem sie immer ein offenes Ohr für meine Anliegen bezüglich dieser Diplomarbeit hatte.

Zu guter Letzt auch meiner Familie, die mir das Studium der Veterinärmedizin in Wien ermöglicht hat.

Literaturverzeichnis

- Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. 2008. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology*, 10(5):619–624.
- El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. 2013. Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5):347–357.
- Andersen HH, Duroux M, Gazerani P. 2014. MicroRNAs as modulators and biomarkers of inflammatory and neuropathic pain conditions. *Neurobiology of Disease*, 71:159–168.
- de Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. 2003. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *Journal of Cell Biology*, 160(6):909–918.
- Börger V, Görgens A, Rohde E, Giebel B. 2015. Therapeutisches Potenzial von extrazellulären Vesikeln aus mesenchymalen Stamm- bzw. Stromazellen. *Transfusionsmedizin - Immunhämatologie, Hämotherapie, Immungenetik, Zelltherapie*, 5(03):131–137.
- Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Cummins J, Shuler F, Ghivizzani SC, Evans C, Robbins PD, Huard J. Osteoprogenitor Cells within Skeletal Muscle.
- Bruns J, Steinhagen J. 2000. Der Knorpelschaden als präarthrotische Deformität: Biologische Grundlagen. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 42–47.
- Burger C, Mueller M, Wlodarczyk P, Goost H, Tolba RH, Rangger C, Kabir K, Weber O. 2007. The sheep as a knee osteoarthritis model: early cartilage changes after meniscus injury and repair.
- Cadwell JJS, Whitford WG. 2017. Three-dimensional cell-based assays in hollow fibre bioreactors. *Technology Platforms for 3D Cell Culture*. 327–350, John Wiley & Sons, Ltd;
- Camussi G, Deregibus M-C, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C. 2011. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *American journal of cancer research*, 1(1):98–110.
- Caplan AI, Bruder SP. 2001. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine*, 7(6):259–264.

- Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. 2008. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(5):815–820.
- Clayton A, Mitchell JP, Court J, Mason MD, Tabi Z. 2007. Human Tumor-Derived Exosomes Selectively Impair Lymphocyte Responses to Interleukin-2. *Cancer Research*, 67(15):7458–7466.
- Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. 2008. Human Tumor-Derived Exosomes Down-Modulate NKG2D Expression. *The Journal of Immunology*, 180(11):7249–7258.
- Diban N, Stamatialis D. 2014. Polymeric hollow fiber membranes for bioartificial organs and tissue engineering applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89(5):633–643.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315–317.
- Eghbali H, Nava MM, Mohebbi-Kalhari D, Raimondi MT. 2016. Hollow fiber bioreactor technology for tissue engineering applications. *International Journal of Artificial Organs*, 39(1):1–15.
- Eke I, Schneider L, Förster C, Zips D, Kunz-Schughart LA, Cordes N. 2013. EGFR/JIP-4/JNK2 Signaling Attenuates Cetuximab-Mediated Radiosensitization of Squamous Cell Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 73(1):297–306.
- Esa A, Connolly KD, Williams R, Archer CW. 2019. Extracellular vesicles in the synovial joint: Is there a role in the pathophysiology of osteoarthritis? *Malaysian Orthopaedic Journal*, 13(1):1–7.
- Felson DT. 1988. EPIDEMIOLOGY OF HIP AND KNEE OSTEOARTHRITIS. *Epidemiologic Reviews*, 10(1):1–28.
- FiberCell Systems Duet Pump. 2018. <https://www.fibercellsystems.com/wp-content/uploads/2018/10/2.2-CE-Compliant-Duet-Manual-FiberCell-Systems-1.pdf> (Zugriff 17.05.2023).
- FiberCellSystems. 2021. Hollow Fiber Bioreactor Protocol for Mesenchymal Stem Cells www.fibercellsystems.comTOORDERCALL (Zugriff 17.05.2023).
- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental hematology*, 2(2):83–92.

- Fritz J. 2003. Technik der Autologen Chondrozytentransplantation (ACT). Praxisleitfaden der Knorpelreparatur. 85–95, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg;
- Genzel Y, Ritter JB, König S, Alt R, Reichl U. 2005. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnology Progress*, 21(1):58–69.
- Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. 2021. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23).
- Goldring SR, Goldring MB. 2004. The Role of Cytokines in Cartilage Matrix Degeneration in Osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 427:S27–S36.
- Grande DA, Schwartz JA, Brandel E, Chahine NO, Sgaglione N. 2013. Articular Cartilage Repair: Where We Have Been, Where We Are Now, and Where We Are Headed. *Cartilage*, 4(4):281–285.
- Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF. 2010. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of Neural Transmission*, 117(1):1–4.
- Harding C, Heuser J, Stahl P. 1984. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *European journal of cell biology*, 35(2):256–63.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, et al. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893):41–49.
- Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D. 2004. Enumeration and Phenotypic Characterization of Synovial Fluid Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells in Inflammatory and Degenerative Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 50(3):817–827.
- de Jong OG, van Balkom BWM, Schiffelers RM, Bouten CVC, Verhaar MC. 2014. Extracellular vesicles: Potential roles in regenerative medicine. *Frontiers in Immunology*, 5(DEC).
- Kato T, Miyaki S, Ishitobi H, Nakamura Y, Nakasa T, Lotz MK, Ochi M. 2014. Exosomes from IL-1 β stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes. *Arthritis Research and Therapy*, 16(4).
- KDBIO. 2016. KDBIO. <https://www.kdbio.com/applications/3d-culture/> (Zugriff 01.05.2023).
- KEMPSON G, MUIR H, POLLARD C, TUKE M. 1973. The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 297(2):456–472.

- Kim S-H, Lechman ER, Bianco N, Menon R, Keravala A, Nash J, Mi Z, Watkins SC, Gambotto A, Robbins PD. 2005. Exosomes Derived from IL-10-Treated Dendritic Cells Can Suppress Inflammation and Collagen-Induced Arthritis. *The Journal of Immunology*, 174(10):6440–6448.
- Koch TG, Berg LC, Betts DH. 2008. Review Article *Compte rendu* Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine.
- Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg R v., Fischer J, Rosenbaum C, et al. 2004. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *Journal of Experimental Medicine*, 200(2):123–135.
- Kordelas L, Rebmann V, Ludwig A-K, Radtke S, Ruesing J, Doepfner TR, Epple M, Horn PA, Beelen DW, Giebel B. 2014. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*, 28(4):970–973.
- Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. 2001. Circulating Skeletal Stem Cells.
- Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, Salto-Tellez M, Timmers L, Lee CN, el Oakley RM, et al. 2010. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 4(3):214–222.
- Lai RC, Chen TS, Lim SK. 2011. Mesenchymal stem cell exosome: A novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regenerative Medicine*, 6(4):481–492.
- Li X, Gibson G, Kim JS, Kroin J, Xu S, van Wijnen AJ, Im HJ. 2011. MicroRNA-146a is linked to pain-related pathophysiology of osteoarthritis. *Gene*, 480(1–2):34–41.
- Liu C, Yu S, Zinn K, Wang J, Zhang L, Jia Y, Kappes JC, Barnes S, Kimberly RP, Grizzle WE, et al. 2006. Murine Mammary Carcinoma Exosomes Promote Tumor Growth by Suppression of NK Cell Function. *The Journal of Immunology*, 176(3):1375–1385.
- Malda J, Boere J, Van De Lest CHA, Van Weeren PR, Wauben MHM. 2016. Extracellular vesicles - New tool for joint repair and regeneration. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(4):243–249.
- Malemud CJ, Goldberg VM. 1999. FUTURE DIRECTIONS FOR RESEARCH AND TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS.
- Mastbergen SC, Pollmeier M, Fischer L, Vianen ME, Lafeber FPJG. 2008. The groove model of osteoarthritis applied to the ovine fetlock joint. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(8):919–928.
- Mobasher A, Csaki C, Clutterbuck AL, Rahmanzadeh M, Shakibaei M. 2009. Mesenchymal stem cells in connective tissue engineering and regenerative medicine. *Histology and Histopathology, Cellular and Molecular Biology*, 347–366.

- Mow VC, Holmes MH, Michael Lai W. 1984. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review. *Journal of Biomechanics*, 17(5):377–394.
- Muir H. 1995. The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. *BioEssays*, 17(12):1039–1048.
- Nikolits I, Nebel S, Egger D, Kreß S, Kasper C. 2021. Towards physiologic culture approaches to improve standard cultivation of mesenchymal stem cells. *Cells*, 10(4).
- O'Donoghue K, Fisk NM. 2004. Fetal stem cells. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18(6):853–875.
- Orth P, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Madry H, Cucchiari M. 2014. Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 7(1).
- Pan B-T, Johnstone RM. 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3):967–978.
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel ~willem, Leijendekker R, Hardingfl Cornelis C, Melief JM, Geuze HJ. B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles.
- Reiners KS, Dassler-Plenker J, Coch C, Hartmann G. 2017. Funktion von extrazellulären Vesikeln und Bedeutung für die labormedizinische Diagnostik. *LaboratoriumsMedizin*, 41(6):299–308.
- Rezvani M. 2021. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells and extracellular vesicles in the treatment of radiation lesions— a review. *Cells*, 10(2):1–20.
- Richter W, Diederichs S. 2009. Regenerative Medizin in der Orthopädie: Zelltherapie-Tissue Engineering - In-situ-Regeneration. *Orthopade*, 38(9):859–869.
- Ritter JB, Udo I, Prof R, Noll T. 1977. Charakterisierung tierischer Zellkulturen anhand einer Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel in München genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens-und Systemtechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. 2005. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis and Rheumatism*, 52(8):2521–2529.
- Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, Noda M. 2003. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Experimental Cell Research*, 287(2):289–300.
- Sartorius AG 2023. <https://www.sartorius.com/shop/ww/en/eur/applications-laboratory-cell-culture/msc-nutristem-xf-medium/p/05-200-1A> (Zugriff 27.04.2023).
- Schmitz S. 2020. *Der Experimentator: Zellkultur*. 4. Auflage. Jülich: Springer Spektrum.

- Schöler HR. 2004. Das Potenzial von Stammzellen: Eine Bestandsaufnahme. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 47(6):565–577.
- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. 1993. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 75(4):532–553.
- Simhadri VR, Reiners KS, Hansen HP, Topolar D, Simhadri VL, Nohroudi K, Kufer TA, Engert A, von Strandmann EP. 2008. Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS ONE*, 3(10).
- Storch K, Eke I, Borgmann K, Krause M, Richter C, Becker K, Schröck E, Cordes N. 2010. Three-Dimensional Cell Growth Confers Radioresistance by Chromatin Density Modification. *Cancer Research*, 70(10):3925–3934.
- Tao SC, Yuan T, Zhang YL, Yin WJ, Guo SC, Zhang CQ. 2017. Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. *Theranostics*, 7(1):180–195.
- Teale M, Jossen V, Eibl D, Eibl R. 2021. Chemically Defined, Xeno-Free Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) on Benchtop-Scale Using a Stirred Single-Use Bioreactor. 83–111.
- Théry C, Ostrowski M, Segura E. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(8):581–593.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, et al. 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1).
- Timmers L, Lim SK, Arslan F, Armstrong JS, Hofer IE, Doevendans PA, Piek JJ, el Oakley RM, Choo A, Lee CN, et al. 2008. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Research*, 1(2):129–137.
- Timmers L, Lim SK, Hofer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AAM, Goumans MJ, Strijder C, Sze SK, Choo A, et al. 2011. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Research*, 6(3):206–214.
- Tsao YS, Cardoso AG, Condon RGG, Voloch M, Lio P, Lagos JC, Kearns BG, Liu Z. 2005. Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 118(3):316–327.

- Vanniasinghe AS, Manolios N, Schibeci S, Lakhiani C, Kamali-Sarvestani E, Sharma R, Kumar V, Moghaddam M, Ali M, Bender V. 2014. Targeting fibroblast-like synovial cells at sites of inflammation with peptide targeted liposomes results in inhibition of experimental arthritis. *Clinical Immunology*, 151(1):43–54.
- Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. 2002. Stem Cells: Hype and Reality I. THE TELOMERE CHECKPOINT.
- VETERM. 2022. Stammzellen. <https://www.vetmeduni.ac.at/veterm/stammzellen> (Zugriff 14.05.2022)
- Wang H, Hung S, Peng S, Huang C, Wei H, Guo Y, Fu Y, Lai M, Chen C. 2004. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *STEM CELLS*, 22(7):1330–1337.
- Waszak P, Alphonse R, Vadivel A, Ionescu L, Eaton F, Thébaud B. 2012. Preconditioning Enhances the Paracrine Effect of Mesenchymal Stem Cells in Preventing Oxygen-Induced Neonatal Lung Injury in Rats. *Stem Cells and Development*, 21(15):2789–2797.
- Welsch U. 2005. Sobotta Lehrbuch Histologie. 2. Auflage. München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer Verl.
- de Windt TS, Hendriks JAA, Zhao X, Vonk LA, Creemers LB, Dhert WJA, Randolph MA, Saris DBF. 2014. Concise Review: Unraveling Stem Cell Cocultures in Regenerative Medicine: Which Cell Interactions Steer Cartilage Regeneration and How? *Stem Cells Translational Medicine*, 3(6):723–733.
- Withrow J, Murphy C, Liu Y, Hunter M, Fulzele S, Hamrick MW. 2016. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 18(1).
- Wollheim FA, Burmester GR. 2003. Die osteoarthritis (Arthrose) geht uns alle an. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 62(4):406–408.
- Yan L, Wu X. 2020. Exosomes produced from 3D cultures of umbilical cord mesenchymal stem cells in a hollow-fiber bioreactor show improved osteochondral regeneration activity. *Cell Biology and Toxicology*, 36(2):165–178.
- Yu S, Liu C, Su K, Wang J, Liu Y, Zhang L, Li C, Cong Y, Kimberly R, Grizzle WE, et al. 2007. Tumor Exosomes Inhibit Differentiation of Bone Marrow Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 178(11):6867–6875.
- Zhu XY, Lerman A, Lerman LO. 2013. Concise review: Mesenchymal stem cell treatment for ischemic kidney disease. *Stem Cells*, 31(9):1731–1736.
- Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, Ju S, Mu J, Zhang L, Steinman L, et al. 2011. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome

encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Molecular Therapy*, 19(10):1769–1779.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. 2001. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*, 7(2):211–228.