

---

Equines Thrombozytenlysate als potenzförderndes  
Zellkultursupplement in der regenerativen  
Veterinärmedizin



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines

**Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei der Autorin dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autorin oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2023

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2023

© 2023 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus „Klinik für Pferde (Chirurgie, Orthopädie) mit Lehrschmiede“  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Janina Burk

# **Equines Thrombozytenlysat als potenzförderndes Zellkultursupplement in der regenerativen Veterinärmedizin**

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Doctor Medicinae Veterinariae (Dr. med. vet.)  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Alina Hagen**

Tierärztin aus Thuine

Gießen, 2023

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnold

Gutachter: Prof. Dr. Janina Burk

Prof. Dr. Natali Bauer

Tag der Disputation: 11.09.2023

Meinen Eltern

Diese Arbeit wurde unterstützt durch ein Promotionsstipendium  
der  
Akademie für Tiergesundheit e.V. (2019–2021)

## **Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Alina Hagen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

**a) Publikationen, die in die vorliegende Arbeit eingebunden sind:**

**„Scalable Production of Equine Platelet Lysate for Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Culture“**

Hagen A., Lehmann H., Aurich S., Bauer N., Melzer M., Moellerberndt J., Patané V., Schnabel C. L. und Burk J. (2021)

*Front. Bioeng. Biotechnol.* 8: 613621. Doi: 10.3389/fbioe.2020.613621

**(1. Publikation der vorliegenden Dissertation)**

**„Functional properties of equine adipose-derived mesenchymal stromal cells cultured with equine platelet lysate“**

Hagen A., Niebert S., Brandt V.-P., Holland H., Melzer M., Wehrend A. und Burk J. (2022)

*Front. Vet. Sci.* 9: 890302. Doi: 10.3389/fvets.2022.890302

**(2. Publikation der vorliegenden Dissertation)**

**b) Publikationen, die nicht in die vorliegende Arbeit eingebunden sind:**

**Vortrag Gießener Graduiertenzentrum Lebenswissenschaften (GGL) Annual Conference 2020 (29.-30.09.2020)**

**Scalable production of equine platelet lysate for multipotent mesenchymal stromal cell culture**

Hagen A.

**Poster DVG-Vet-Kongress 2020 (16.-17.10.2020)**

**A scalable protocol for equine platelet concentrate production**

Hagen A., Patané V., Lehmann H., Bauer N., Burk J.

**Vortrag Junge Physiologen Kongress 2021 (01.-02.06.2021)**

**Scalable production of equine platelet lysate for multipotent mesenchymal stromal cell culture**

Hagen A.

**Vortrag Gießener Graduiertenzentrum Lebenswissenschaften (GGL)**

**Annual Conference 2021** (29.-30.09.2021)

**Platelet lysate in the cultivation of mesenchymal stromal cells:**

**Are there differences between dogs and horses?**

Hagen A.

**„Phospholipid Profiles for Phenotypic Characterization of Adipose-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells”**

Burk J., Melzer M., Hagen A., Lips K. S., Trinkaus K., Nimptsch A. und Leopold J. (2021)

*Front. Cell Dev. Biol.* 9: 784405. Doi: 10.3389/fcell.2021.784405

**Poster Termis Kongress 2021** (15.-19.11.2021)

**Evaluation of equine platelet lysate for multipotent mesenchymal stromal cell culture**

Hagen A., Lehmann H., Brandt V.-P., Holland H., Melzer M., Moellerberndt J., Schnabel C. L. und Burk J.

**„Platelet Lysate for Mesenchymal Stromal Cell Culture in the Canine and Equine Species: Analogous but Not the Same“**

Hagen A., Holland H., Brandt V.-P., Doll C.U., Häußler T.C., Melzer M., Moellerberndt J., Lehmann H. und Burk J. (2022)

*Animals.* 12: 189. Doi:10.3390/ani12020

**Poster DVG-Vet-Kongress 2022** (13.-15.10.2022)

**Functional effects of equine platelet lysate on mesenchymal stromal cells**

Hagen A., Niebert S., Brandt V.-P., Holland H., Melzer M., Wehrend A. und Burk J.

**„Cytokines in equine platelet lysate and related blood products”**

Moellerberndt J., Hagen A., Niebert S., Büttner K. und Burk J. (2023)

*Front. Vet. Sci.* 10: 1117829. Doi: 10.3389/fvets.2023.1117829

**Inhaltsverzeichnis**

**Abkürzungsverzeichnis** ..... I

**Abbildungsverzeichnis** ..... V

**Tabellenverzeichnis** ..... V

**1 Einleitung** ..... 1

**2 Literaturübersicht** ..... 4

    2.1 Mesenchymale Stromazellen..... 4

        2.1.1 Definition ..... 4

        2.1.2 Wirkmechanismen der MSC ..... 7

            2.1.2.1 Differenzierung der MSC ..... 8

            2.1.2.2 Parakriner Effekt der MSC ..... 9

                2.1.2.2.1 Immunmodulatorische und anti-inflammatorische Wirkung ..... 10

                2.1.2.2.2 Angiogenese-induzierende, anti-apoptotische und anti-fibrotische  
                                Wirkung ..... 12

            2.1.2.3 Transfer von Molekülen aus MSC-Exosomen oder Mikrovesikeln ..... 15

            2.1.2.4 MSC-vermittelter Transfer von Organellen und/oder Molekülen durch  
                        Tunneling Nanotubes (TNTs) ..... 16

        2.1.3 Therapeutische Anwendung von MSC ..... 17

            2.1.3.1 Anwendung von humanen MSC ..... 17

            2.1.3.2 Anwendung von equinen MSC ..... 20

    2.2 Kultivierung von MSC ..... 24

        2.2.1 Zellkulturmedien und Supplemente ..... 26

            2.2.1.1 Fetales bovines Serum (FBS)..... 27

            2.2.1.2 Alternativen zum FBS ..... 31

                2.2.1.2.1 Serumfreie Medien..... 31

                2.2.1.2.2 Serum ..... 33

                2.2.1.2.3 Thrombozytenlysat (PL)..... 36

                    2.2.1.2.3.1 Humanes Thrombozytenlysat (hPL)..... 42

                    2.2.1.2.3.2 Equines Thrombozytenlysat (ePL) ..... 46

**3 Zielstellung und Hypothesen dieser Arbeit**..... 50

    3.1 Zielstellung ..... 50

    3.2 Hypothesen..... 50

<b>4 Publikationen .....</b>	<b>51</b>
4.1 Publikation 1 (Thrombozytenlysatherstellung und vergleichende Charakterisierung der eMSC) .....	51
4.2 Publikation 2 (Funktionelle Eigenschaften der eMSC mit ePL-Medium) .....	73
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>90</b>
5.1 Publikation 1 – Thrombozytenlysatherstellung und vergleichende Charakterisierung der eMSC .....	90
5.1.1 Reflexion von Material und Methoden .....	90
5.1.2 Diskussion der Ergebnisse .....	102
5.1.3 Interpretation der Publikation 1 in Bezug auf die gestellten Hypothesen..	109
5.2 Publikation 2 – Funktionelle Eigenschaften der eMSC mit ePL-Medium.....	110
5.2.1 Reflexion von Material und Methoden .....	110
5.2.2 Diskussion der Ergebnisse .....	118
5.2.3 Interpretation der Publikation 2 in Bezug auf die gestellten Hypothesen..	122
5.3 Schlussfolgerung und Ausblick.....	123
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>125</b>
<b>7 Summary .....</b>	<b>129</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>133</b>
8.1 Zitierte Rechtstexte .....	183
<b>9 Danksagung .....</b>	<b>185</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
<	kleiner als
>	größer als
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
α-MEM	alpha-Minimum Essential Medium
α-SMA	alpha-smooth muscle actin
ACS	autologous conditioned serum
ADP	Adenosindiphosphat
Ang1	Angiopoietin 1
ATMP	Arzneimittel für neuartige Therapien
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP-2,-4,-6	bone morphogenetic protein-2, -4, -6
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose
CTGF	connective tissue growth factor
CVMP	Committee for Veterinary Medicinal Products
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
EG	europäische Gemeinschaft
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	European Medicines Agency
eMSC	equine mesenchymale Stromazellen
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ePL	equines Thrombozytenlysat

et al.	und andere
EU	europäische Union
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	fetales bovines Serum
FDA	US Food and Drug Administration
Fe <sup>2+</sup>	Eisen
GAL-9	Galectin-9
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-SCF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GMP	gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice)
GTG	G-bands by trypsin using Giemsa
GvHD	graft-versus-host disease
h	Stunde
HGF	hepatocyte growth factor
HLA-DR	humanes Leukozytenantigen-DR
HLA-G5	humanes Leukozytenantigen-G5
hMSC	humane mesenchymale Stromazellen
HO-1	Hämoxygenase-1
hPL	humanes Thrombozytenlysat
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IDT	Integrated DNA Technologies
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IQR	Interquartilsabstand
IRAP	Interleukine-1 Rezeptor Antagonist Protein
ISBT	International Society of Blood Transfusion
ISCT	International Society for Cell and Gene Therapy
K <sup>+</sup>	Kalium
L	Liter
L-PRP	leukozytenreiches PRP

MCP-1	monocyte chemotactic protein -1
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MHCII	major histocompatibility complex II (Hauptgewebeverträglichkeitskomplex)
min	Minute
MIP-1α	macrophage inflammatory protein-1alpha
ml	Mililiter
mm	Milimeter
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MSC	mesenchymale Stromazellen
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
n	Anzahl
Na <sup>+</sup>	Natrium
NAP-2	neutrophil activating protein-2
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
NeuGc	N-Glykolyneuraminsäure
ng	Nanogramm
NG2	neural/glial antigen 2
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline)
PCD	vorzeitige Zentromertrennung (premature centromere division)
PDGF-BB	platelet-derived growth factor-BB
PF-4	Plättchenfaktor-4
pg	Pikogramm
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PL	Thrombozytenlysate (platelet lysate)

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPP	thrombozytenarmes Plasma (platelet-poor plasma)
P-PRP	leukozytenarmes PRP
PR	platelet releasate
PRGF	plasma rich in growth factors
PRP	thrombozytenreiches Plasma (platelet-rich plasma)
QRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RAO	recurrent airway obstruction
RNA	Ribonukleinsäuren
SA- $\beta$ -Gal	Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galactosidase
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
sHLA-G	lösliches humanes Leukozytenantigen-G
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor- $\beta$ 1
Th	T-Helferzellen
TierErzHaVerbG	Tiererzeugnisse-Handels-Verbotsgesetz
TierSchIV	Tierschutz-Schlachtverordnung
TIMPs	tissue inhibitors of metalloproteinases
TK(s)	Thrombozytenkonzentrat(e)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TNTs	tunneling nanotubes
Treg	regulatorische T-Zellen
TSG-6	Tumornekrosefaktor-induzierbares Gen-6-Protein
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
VDF	Verband der Fleischwirtschaft e.V.
VE-cadherin	vascular endothelial cadherin
VEGF-A	vascular endothelial growth factor-A
VEGFR2	VEGF-Rezeptor 2
vWF	von-Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel
Zn <sup>2+</sup>	Zink

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Stammzellarten und ihre Differenzierungspotenziale (zusammengestellt aus Caplan und Bruder 2001, De Schauwer et al. 2011, Medpertise 2022).....4

**Abbildung 2:** Wirkungsmechanismen der MSC (modifiziert nach Spees et al. 2016) 8

**Abbildung 3:** Immunmodulatorische Wirkung der MSC (modifiziert nach Regmi et al. 2019)..... 10

**Abbildung 4:** Humane MSC in klinischen Studien: die verschiedenen Anwendungsbereiche (Jovic et al. 2022)..... 18

**Abbildung 5:** Struktur der Thrombozyten mit ihren intrazellulären Organellen (modifiziert nach Anitua et al. 2004, Burnouf et al. 2016) ..... 38

**Abbildung 6:** PRP-Herstellung: Aufgetrenntes Vollblut nach Zentrifugation .....41

## Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Verschiedene Blutprodukte und ihre Eigenschaften (zusammengestellt aus den Referenzen der Literaturübersicht) ..... 37

**Tabelle 2:** Inhalt der  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten und ihre funktionellen Kategorien (modifiziert nach Anitua et al. 2004, Burnouf et al. 2016, Zamani et al. 2019) ..... 39

## 1 Einleitung

Die regenerative Medizin und die klinische Applikation von multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSC) haben in den letzten Jahrzehnten eine große Bedeutung nicht nur in der Human-, sondern auch in der Veterinärmedizin erlangt.

Als regenerative Therapeutika werden biologische Materialien wie Zellen, Wachstumsfaktoren und Matrixsubstanzen eingesetzt, um Gewebedefekte und Organe zu regenerieren und ihre Funktionsfähigkeit wiederherzustellen. Die zellbasierte Therapie wird meist allein mit MSC oder in Kombination mit anderen orthobiologischen Blutprodukten durchgeführt. Zu den orthobiologischen Blutprodukten gehören autologes konditioniertes Serum (autologous conditioned serum [ACS]), Thrombozytenkonzentrat (TK), thrombozytenreiches Plasma (PRP) oder Thrombozytenlysat (PL).

Aufgrund ihrer Herkunft aus mesodermalen Geweben bieten die MSC eine optimale Voraussetzung als biomedizinisches Therapeutikum und können sehr vielseitig eingesetzt werden. Die MSC nehmen direkt an regenerativen Prozessen teil, indem sie zur Matrix-Remodellierung und Produktion bioaktiver Proteine wie z.B. Wachstumsfaktoren und Zytokinen fähig sind. Diese Zytokine können einen anti-apoptotischen, anti-inflammatorischen oder chemotaktischen Effekt ausüben, wodurch die MSC die Immunmodulation positiv beeinflussen und z.B. die Neovaskularisierung im betroffenen Gewebe fördern oder weitere Vorläuferzellen anlocken (Singer und Caplan 2011, Voga et al. 2020). Durch diese parakrinen Signale beteiligen sich die MSC an der Entzündungs-, Proliferations- und Remodellierungsphase der Geweberegeneration und vorhandenes Narbengewebe kann dadurch reduziert und normales funktionsfähiges Gewebe induziert werden (Guillamat-Prats 2021).

Nachdem die MSC in der Humanmedizin bereits in verschiedenen Bereichen (Fekete et al. 2012) verwendet werden, haben MSC-basierte Therapien in den letzten Jahren auch in der Veterinärmedizin enorm an Interesse gewonnen. Insbesondere in der equinen Medizin wurden erste Erfolge in der Orthopädie (Smith et al. 2003, Pacini et al. 2007, Godwin et al. 2012, Renzi et al. 2013, De Schauwer et al. 2013, Smith et al. 2013, Broeckx et al. 2014, Ferris et al. 2014, Mariñas-Pardo et al. 2018, Broeckx et al. 2019) aber auch in der Wundheilung (Spaas et al. 2013, Sherman et al. 2017, Textor et al. 2018) und in der Behandlung von respiratorischen Erkrankungen wie Recurrent Airway Obstruction (RAO, equines Asthma) (Adamič et al. 2022) dokumentiert.

Die Potenz der MSC hängt von verschiedenen Faktoren, wie z.B. den In-vitro-Zellkulturbedingungen, ab. Um eine ausreichend große Anzahl an MSC für die therapeutische Applikation zu gewinnen, ist eine vorherige In-vitro-Kultivierung erforderlich, da die MSC nur in geringen Mengen in ihrem Ursprungsgewebe vorhanden sind (Pittenger et al. 1999, Koch et al. 2009). Während dieser Kultivierung können die Kulturbedingungen die Zellqualität und Effektivität der Therapie stark beeinflussen (Karnieli et al. 2017).

Der wichtigste Faktor der Kulturbedingungen ist die verwendete Proteinquelle des Kulturmediums. Dieses muss die MSC mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgen. Der aktuelle Goldstandard als Supplement zum Basalmedium für die In-vitro-Kultivierung vieler Zelltypen, inklusive MSC, ist das fetale bovine Serum (FBS) (Doucet et al. 2005, van der Valk et al. 2010, Bieback 2013, Burnouf et al. 2016). Die Verwendung dieses FBS ist allerdings mit verschiedenen Problemen behaftet. So existieren variable Kosten für das FBS aufgrund saisonal und örtlich schwankender Angebote (Jochems et al. 2002). Der Gewinnungsprozess ist ethisch äußerst umstritten (Hodgson 1995, Jochems et al. 2002, van der Valk et al. 2004) und das FBS weist eine inkonstante Qualität sowie Chargenvariabilität auf (Gstraunthaler 2003, Zheng et al. 2006, Baker 2016). Es ist ein xenogenes Produkt wodurch die Gefahr einer Immunreaktion des Empfängers (Sundin et al. 2007, Bieback 2013) sowie der Übertragung boviner Pathogene besteht (Erickson et al. 1991, World Health Organization 2006, Hawkes 2015). Um diese Probleme zu vermeiden, empfehlen die European Medicines Agency (EMA) (Guideline on the use of bovine serum, EMA 2013) und die International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT) (Karnieli et al. 2017) den Ersatz des FBS durch andere sicherere Alternativen. Vor diesem Hintergrund wurden einige Alternativen, wie kommerziell erhältliche xeno- oder serumfreie Medien, autologes oder allogenes Serum sowie PL, untersucht und vielversprechende Ergebnisse vor allem mit PL-supplementierten Medien erzielt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde das FBS in der Humanmedizin bereits in 77 % der Protokolle guter Herstellungspraxis durch humanes PL (hPL) für die Kultivierung humaner MSC (hMSC) ersetzt (Trento et al. 2018). Um dieser Entwicklung zu folgen, wurden auch erste Studien mit equinem PL (ePL) für die Kultivierung equiner MSC (eMSC) durchgeführt (Del Bue et al. 2007, Seo et al. 2013, Russell und Koch 2016, Gilbertie et al. 2018, Naskou et al. 2018, Yaneselli et al. 2019). Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist ePL eine vielversprechende Alternative zu FBS, da die eMSC ihre

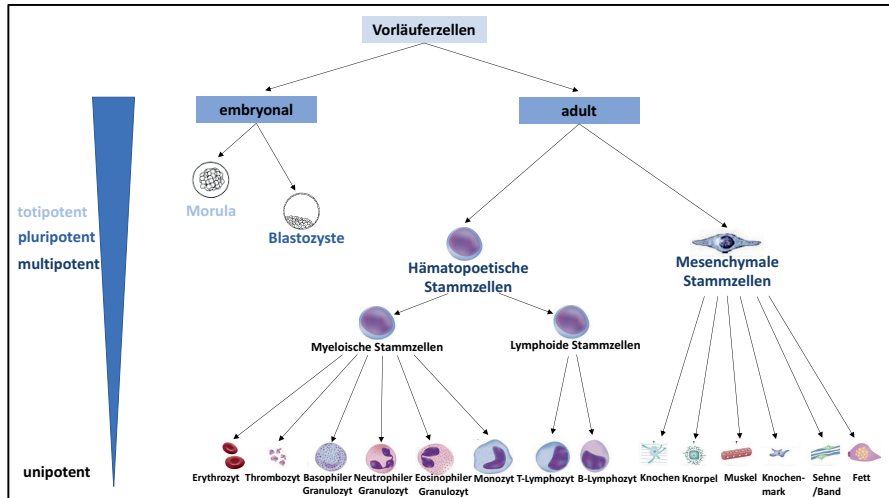
typischen Charaktereigenschaften wie Proliferationsrate, Morphologie und Differenzierung beibehalten (Seo et al. 2013, Naskou et al. 2018, Yaneselli et al. 2019). Im Gegensatz zu humanen Blutprodukten sind equine TKs als Ausgangsmaterial für ePL jedoch nicht kommerziell erhältlich, so dass eine Eigenproduktion notwendig ist. Bisher wurden zur ePL-Herstellung ein PRP-basiertes Verfahren (Del Bue et al. 2007, Seo et al. 2013, Russell und Koch 2016, Gilbertie et al. 2018, Yaneselli et al. 2019) und die Thrombozytapherese (Sumner et al. 2017, Naskou et al. 2018) veröffentlicht. Letztere ist zwar skalierbar, aber es wird eine spezialisierte Ausrüstung benötigt. Die Ansätze der verschiedenen Studien zur ePL-Herstellung waren bisher sehr unterschiedlich, wodurch die Vergleichbarkeit der Studien eingeschränkt ist. Somit sollte der erste Schritt, um ein standardisiertes ePL in größeren Mengen als Alternative zum FBS herzustellen, die Entwicklung eines standardisierten Protokolls sein.

Das Ziel dieses Projektes und der vorliegenden Dissertation war es, die Herstellung eines standardisierten ePL zu etablieren und in einem zweiten Schritt den Effekt des ePL auf die MSC zu untersuchen. Hierfür sollte das ePL in der MSC-Kultivierung mit Hinblick auf eine mögliche Verwendung in der klinischen Applikation evaluiert und mit FBS als Zellkultursupplement verglichen werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Mesenchymale Stromazellen

#### 2.1.1 Definition



**Abbildung 1:** Stammzellarten und ihre Differenzierungspotenziale (zusammengestellt aus Caplan und Bruder 2001, De Schauwer et al. 2011, Medpertise 2022)

Im Körper sind verschiedene Arten von Progenitorzellen vorhanden, aus denen sich die Vielzahl an Zelltypen des Körpers entwickeln kann. Bei diesen Vorläuferzellen wird zwischen embryonalen und adulten Stammzellen unterschieden.

Embryonale Stammzellen liegen in der frühen Embryogenese vor und besitzen bis zum Stadium der Morula ein totipotentes Differenzierungspotenzial. Somit haben sie die Fähigkeit einen vollständigen Organismus inklusive aller plazentaren Strukturen, die für die fetale Entwicklung notwendig sind, auszubilden (Mitalipov und Wolf 2009, Condic 2014, Voga et al. 2020). Durch nachfolgende Zellteilungen entsteht aus der Morula die Blastozyste, die in der inneren Zellmasse pluripotente embryonale Stammzellen enthält. Diese Zellen mit dem pluripotenten Differenzierungspotenzial können sich in die drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm differenzieren und somit jeden fetalen oder adulten Zelltyp hervorbringen, allerdings sind sie nicht in der Lage einen vollständigen Embryo auszubilden (Mitalipov und Wolf 2009, Voga et al. 2020). Da aber bei der Gewinnung der embryonalen humanen Stammzellen der

Embryo zerstört wird, ist die Forschung und therapeutische Verwendung ethisch äußerst umstritten (Ach et al. 2006). Des Weiteren untersagt das Embryonenschutzgesetz (ESchG §1 (1) 2. u. (2)) eine Erzeugung von Embryonen, ohne die Schwangerschaft einer Frau herbeiführen zu wollen und es besteht die Gefahr der Teratombildung aufgrund des hohen Differenzierungspotenzials der embryonalen Stammzellen (Suman et al. 2019). Somit werden in Deutschland therapeutisch und in der Forschung bisher weitestgehend adulte Stammzellen verwendet.

Adulte Stammzellen mesodermaler Herkunft werden ebenfalls in zwei Gruppen unterschieden. Die hämatopoetischen Stammzellen, welche das Reservoir für die Blutzellen darstellen und die MSC.

Die Abkürzung MSC steht für „Mesenchymale Stromazellen“, welche erstmals von Friedenstein et al. (1966) als knochenbildende Progenitorzellen stromalen Ursprungs beschrieben wurden. MSC sind spindelförmige Vorläuferzellen, die sich in verschiedenen Geweben des Körpers befinden. Häufig werden die MSC auch synonym als „mesenchymale Stammzellen“ bezeichnet, was fälschlicherweise suggeriert, dass es sich um dieselbe Art von Zellen handelt. Der Begriff Stammzelle bezieht sich auf Zellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und sich in spezialisierte Zellen differenzieren können (Fekete et al. 2012, Viswanathan et al. 2019). Für MSC konnte diese Differenzierungsfähigkeit bisher noch nicht zuverlässig in vivo nachgewiesen werden, weshalb die Bezeichnung Stammzelle für diese Zellen nicht korrekt wäre. Zur Klärung der Nomenklatur wurde bereits 2005 ein Positionspaper von der ISCT (Dominici et al. 2006) verfasst, in welchem auch die Minimalkriterien zur Definition von hMSC formuliert wurden. Im Jahr 2019 wurde dieses Positionspaper noch einmal ergänzt. Infolgedessen bestehen MSC nicht aus einer einheitlichen Stammzellpopulation, sondern stellen ein heterogenes Zellgemisch unter Ausschluss von hämatopoetischen und endothelialen Zellen dar (Viswanathan et al. 2019). Die Abkürzung MSC stand im Laufe der historischen Entwicklung des Namens für verschiedene Begriffe, wie marrow stromal cells, multipotent stromal cells, mesodermal stem cells, mesenchymal stromal cells (mesenchymale Stromazellen) oder seit kurzem auch medicinal signaling cells (medizinische Signalzellen) (Caplan 2017). Der Name medicinal signaling cells (medizinische Signalzellen) wurde vorgeschlagen, um die Wirkungsweise der MSC bereits in ihrem Namen zu verdeutlichen (Caplan 2017). Dennoch bezieht sich im Folgenden die Abkürzung MSC

immer auf mesenchymale Stromazellen, da dies die aktuell am häufigsten genutzte Bezeichnung darstellt.

Nach der Definition der ISCT sind MSC multipotente, plastikadhärente Zellen, die *in vitro* unter Standardkulturbedingungen eine tripotente Differenzierbarkeit (adipogen, osteogen und chondrogen) und einen spezifischen Immunphänotyp zeigen (Dominici et al. 2006). Das multipotente Differenzierungspotenzial der MSC zeichnet sich dadurch aus, dass die MSC sich im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen nur noch in verschiedene Zelltypen einer Linie differenzieren können. Aufgrund ihres mesodermalen Ursprungs können sich daher die MSC nur in Gewebe des Mesoderms, wie Knochen-, Knorpel-, Muskel-, Sehnen- und Fettgewebe, differenzieren. Allerdings muss hierzu angeführt werden, dass es mittlerweile auch Aussagen dazu gibt, dass sich multipotente Zellen unabhängig von ihrem Ursprungsgewebe in verschiedene Gewebelinien differenzieren können (Fortier 2005, De Schauwer et al. 2011). Diese Aussagen sollten aber mit Vorsicht betrachtet werden, da das Datenmaterial bisher sehr klein ist und nur wenige Studien die Funktionalität der ausdifferenzierten Zellen zeigen (Fortier 2005, Brehm 2006). *In vitro* kann die tripotente Differenzierbarkeit durch entsprechende Differenzierungsmedien induziert werden (Pittenger et al. 1999). Der Immunphänotyp der MSC kann über spezifische Oberflächenantigene im Durchflusszytometer analysiert werden. Hierfür wurden von der ISCT bestimmte In- (> 95 %) und Exklusionsmarker (< 2 %) für hMSC beschrieben (Dominici et al. 2006). Die Inklusionsmarker für hMSC sind CD105, CD73 und CD90 und zu den Exklusionsmarkern zählen CD45 (Marker für Leukozyten), CD34 (Marker für hämatopoetische Progenitorzellen und Endothelzellen), CD14 oder CD11b (Marker für Monozyten und Makrophagen), CD79 $\alpha$  oder CD19 (Marker für B-Lymphozyten) und HLA-DR (Marker für antigen-präsentierende Zellen) (Dominici et al. 2006).

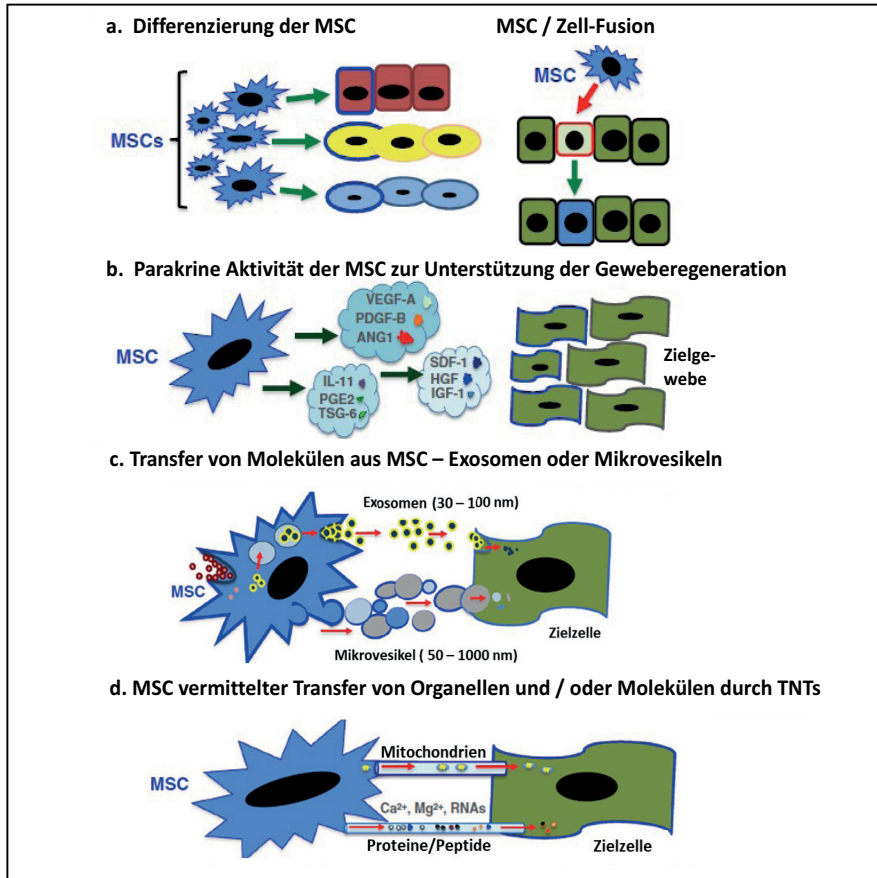
Im Gegensatz zu hMSC fehlen vergleichbare Definitionskriterien für MSC von anderen Spezies, wie dem Pferd (De Schauwer et al. 2011). Dennoch hat De Schauwer et al. (2011) angestrebt ein einheitliches Protokoll zur Charakterisierung von eMSC zu entwerfen. Demnach müssen eMSC ebenfalls plastikadhärent sein und eine tripotente Differenzierbarkeit unter Standardkulturbedingungen zeigen. Zusätzlich sollten auf den eMSC die Inklusionsmarker CD29, CD44 und CD90 nachgewiesen werden können und die Exklusionsmarker CD14, CD79 $\alpha$  und MHC II nicht. Mittlerweile konnte aber gezeigt werden, dass sowohl hMSC als auch eMSC positiv auf CD29, CD44, CD90 und CD105 sind und alle Exklusionsmarker (CD14, CD34, CD45, CD79 $\alpha$  und

MHC II) sowohl bei den hMSC als auch bei den eMSC fehlen. Der Inklusionsmarker CD73 konnte sowohl bei den hMSC als auch bei den eMSC oft nicht nachgewiesen werden (Hillmann et al. 2016). Somit sind die Minimalkriterien der hMSC weitestgehend auf die eMSC übertragbar.

Als Quelle für die MSC können verschiedene Gewebe des Körpers herangezogen werden, wobei die MSC je nach Ursprung unterschiedliche Eigenschaften besitzen, was bei der Auswahl des Entnahmeortes der MSC für die therapeutische Anwendung berücksichtigt werden sollte (Vidal et al. 2012, Voga et al. 2020). Die derzeit am häufigsten verwendeten Entnahmeorte für eMSC sind das Knochenmark (Arnhold et al. 2007, Godwin et al. 2012) und Fettgewebe (Del Bue et al. 2008, Nixon et al. 2008). Beim Pferd kann eine Knochenmarkspunktion am Sternum oder Tuberculum coxae durchgeführt werden (Stewart und Stewart 2011), allerdings ist es eine invasive Entnahmeprozedur, bei der die Gefahr von Komplikationen wie Blutungen, Infektionen, Pneumothorax oder Pneumoperikard besteht (Brehm et al. 2012). Der Anteil der eMSC an den kernhaltigen Zellen im Knochenmark ist mit 0,001–0,01 % sehr gering (Geburek und Stadler 2011). Im Gegensatz zum Knochenmark kann das Fettgewebe relativ komplikationslos an verschiedenen Stellen des Körpers entnommen werden wie z.B. intestinal, in der Glutealregion oder am stehend sedierten Pferd seitlich am Schweifansatz. Im Vergleich zum Knochenmark ist der Anteil an eMSC an den kernhaltigen Zellen im Fettgewebe mit 1–4 % (Geburek und Stadler 2011) deutlich höher. Aufgrund der unkomplizierten Gewinnung und dem bereits beschriebenen höheren Proliferationspotenzial der adipogenen eMSC haben wir uns in dieser Arbeit ausschließlich auf eMSC aus dem Fettgewebe beschränkt. Weitere Quellen, aus denen man MSC gewinnen könnte, sind peripheres Blut (Brehm et al. 2012), Synovialflüssigkeit oder -membran (Prado et al. 2015) sowie Nabelschnurblut oder Nabelschnurgewebe (Burk et al. 2013).

### **2.1.2 Wirkmechanismen der MSC**

Die Wirkmechanismen der MSC sind bis heute noch nicht vollständig geklärt, allerdings werden verschiedene Theorien diskutiert und untersucht.



**Abbildung 2:** Wirkungsmechanismen der MSC (modifiziert nach Spees et al. 2016)

### 2.1.2.1 Differenzierung der MSC

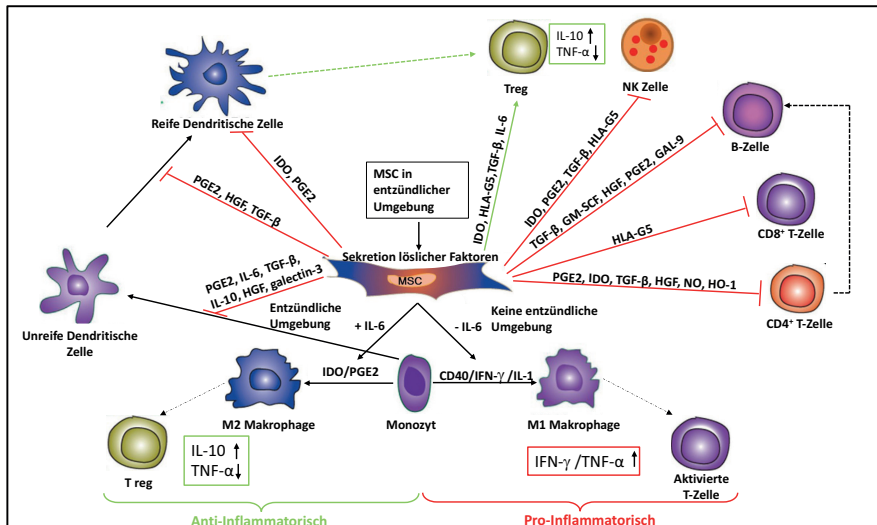
Zu Beginn der MSC-Forschung ist man davon ausgegangen, dass die Wirkung der MSC hauptsächlich auf ihrer Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Gewebetypen beruht (Miyahara et al. 2006, Quinn und Flake 2008) (**Abbildung 2a**). Die Hypothese war, dass MSC nach ihrer Transplantation an Orte mit Gewebeschädigung migrieren, dort anwachsen und sich in funktionelle Zelltypen entsprechend des Gewebes differenzieren und somit das geschädigte Gewebe wiederherstellen (Spees et al. 2016). Diese Ansicht spiegelt die damalige allgemeine Vorstellung der MSC als selbsterneuerbare Stammzellen, die sich in spezialisierte Zellen

differenzieren können, wider (Caplan und Bruder 2001). Allerdings konnten verschiedene Differenzierungen der MSC wie z.B. die tenogene Differenzierung (Raabe et al. 2013, Youngstrom et al. 2015, Burk et al. 2016) bisher nur in vitro nachgewiesen werden. Eine erfolgreiche In-vitro-Differenzierung bestätigt aber nicht auch die Fähigkeit der Zellen zur In-vivo-Differenzierung, da letztere deutlich komplexer ist (Stewart und Stewart 2011). Ein weiterer Punkt, der bei der Differenzierungstheorie beachtet werden sollte, ist die Tatsache, dass nach einer Injektion von MSC in ein verletztes Gewebe nur ein relativ kleiner Anteil der injizierten MSC an der Verletzungsstelle verbleibt (24 % nach 24 h) und die restlichen MSC über den Blutfluss im Körper verteilt werden (Becerra et al. 2013). Aufgrund der geringen Anzahl und dem kurzen Anwachsen am Ort der Schädigung ist man sich mittlerweile einig, dass sich die vielversprechende Wirkung der MSC, die bereits in verschiedenen Krankheitsmodellen gezeigt werden konnte, nicht nur durch die Differenzierung erklären lässt, sondern dass die MSC noch über andere Wirkungsmechanismen zur Geweberegeneration verfügen. Außerdem beruht die beobachtete Differenzierung der MSC in Zellen nicht-mesodermalen Ursprungs eher auf Fusionen von MSC und anderen Zellen und nicht auf der Differenzierung adulter Stammzellen, da diese in der Regel auf Gewebe der Ursprungskeimlinie beschränkt ist (Spees et al. 2016).

#### **2.1.2.2 Parakriner Effekt der MSC**

Immer mehr Hinweise deuten darauf hin, dass der primäre Wirkmechanismus der MSC auf parakrinen Signalen beruht, die zu funktionellen Veränderungen in den Immunzellen führen (Aggarwal und Pittenger 2005, Akiyama et al. 2012), sowie eine anti-apoptotische (Selek et al. 2014), anti-fibrotische (Spees et al. 2016), angiogenesefördernde (Conze et al. 2014, Machova Urdzikova et al. 2014) und chemotaktische Wirkung (Spees et al. 2016) hervorrufen können.

## 2.1.2.2.1 Immunmodulatorische und anti-inflammatorische Wirkung



**Abbildung 3:** Immunmodulatorische Wirkung der MSC (modifiziert nach Regmi et al. 2019)

Ein wichtiger Schritt im Wund-/Gewebeheilungsprozess ist die Phase der Entzündungsreaktion, in welcher Bakterien, Gewebereste, apoptotische Zellen oder Gerinnsel aus dem Defektbereich entfernt werden. Diese können MSC über ihre immunmodulatorische Wirkung, die zahlreiche molekulare Mechanismen umfasst, beeinflussen. Die entzündlichen Faktoren treten in eine Wechselwirkung mit den MSC, was zur Produktion und Freisetzung verschiedener sekretorischer Faktoren oder Chemokine (**Abbildung 2b**), die immunsuppressive Wirkungen haben, führt (Regmi et al. 2019). Durch die freigesetzten Faktoren oder über Zell-Zell-Kontakte interagieren die MSC mit zahlreichen Immunzellen (Wang et al. 2018) (**Abbildung 3**). So haben die MSC eine hemmende Wirkung auf T-Zellen, indem sie in der Lage sind die T-Zell-Proliferation durch zelluläre oder andere unspezifische mitogene Stimuli zu unterdrücken (Di Nicola et al. 2002, Regmi et al. 2019) oder die Apoptose der T-Zellen über den Fas/Fas-Liganden (Akiyama et al. 2012) zu induzieren. Durch eine Sekretion von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und anderen Faktoren werden die dendritischen Zellen zu einer erhöhten Ausschüttung des entzündungshemmenden Zytokins Interleukin (IL) 10 induziert und gleichzeitig wird die Sekretion des pro-inflammatorischen Tumor-

nekrosefaktors-alpha (TNF- $\alpha$ ) reduziert (Aggarwal und Pittenger 2005). Dies führt zu einer Verschiebung des Verhältnisses der pro-inflammatorischen T-Helferzellen (Th1 und Th17) zu Gunsten der anti-inflammatorischen Th2-Zellen (Spees et al. 2016). Durch die Inhibition der Th1- und Th17-Zellen kommt es zur Hemmung der Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )- und IL-17-Sekretion und die Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 werden stimuliert (Betz und Fox 1991, Guillaumat-Prats 2021).

Aber die MSC haben nicht nur eine immunsuppressive Wirkung auf die T-Zellen selbst, sondern auch auf die dendritischen Zellen als frühe Schnittstelle der Immunantwort. Dabei hemmen die MSC die Differenzierung der dendritischen Zellen aus Monozyten über den Faktor PGE<sub>2</sub> und reduzieren somit die IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Sekretion der dendritischen Zellen und stimulieren eine Ausscheidung von IL-10, wodurch eine Induktion der Lymphozyten unterdrückt wird (Jiang et al. 2005, Gao et al. 2017, Wang et al. 2018).

Zusätzlich haben die MSC die Fähigkeit die Aktivität der Makrophagen zu beeinflussen. Durch die MSC findet ein Shift vom pro-inflammatorischen M1-Phänotyp zum alternativen anti-inflammatorischen M2-Phänotyp statt, was die phagozytische Aktivität und die Sekretion von IL-10 und IL-6 stimuliert und die Freisetzung von IFN- $\gamma$  sowie TNF- $\alpha$  hemmt (Mosser und Edwards 2008, Zhang et al. 2010, Spees et al. 2016, Wang et al. 2018). Induziert wird dieser Shift unter anderem durch das Tumornekrosefaktor-induzierbare Gen-6-Protein (TSG-6) und PGE<sub>2</sub> der MSC (Spees et al. 2016, Voga et al. 2020).

Außerdem hemmen MSC die Proliferation der B-Zellen, ihre Differenzierung in antikörperbildende Zellen und ihre Chemotaxis (Corcione et al. 2006, Luk et al. 2017). In nicht-entzündlicher Umgebung unterstützen die MSC das Wachstum der B-Zellen und induzieren die Bildung von regulierenden B-Zellen. Wohingegen die MSC in entzündlicher Umgebung durch IFN- $\gamma$ , das unter anderem durch T-Zellen freigesetzt wird, zur Hemmung der B-Zell-Proliferation und Immunglobulin G (IgG)-Produktion stimuliert werden. Zeitgleich verlieren die MSC die Fähigkeit zur Induktion der regulierenden B-Zellen. Diese hemmende Wirkung der MSC auf die B-Zellen scheint durch den Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO)-vermittelten Tryptophan-Katabolismus abzulaufen (Luk et al. 2017).

Des Weiteren inhibieren die MSC den Effekt der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) durch immunsuppressive Faktoren wie PGE<sub>2</sub>, Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) und lösliches humanes Leukozytenantigen-G (sHLA-G), was zur Reduktion der IFN-γ-Sekretion führt und somit die Helferfunktion der NK-Zellen bei der Induktion der Th1-Reaktion durch die dendritischen Zellen verhindert (Wang et al. 2018).

#### **2.1.2.2.2 Angiogenese-induzierende, anti-apoptotische und anti-fibrotische Wirkung**

Eine adäquate Blutversorgung ist ein kritischer Punkt bei der Wundheilung und Geweberegeneration, da der Zu- und Abtransport von Geweberesten, Entzündungsmediatoren und Enzymen gewährleistet werden muss und anabole Prozesse sowie das Überleben von Zellen am Ort der Läsion stark von einer ausreichenden Sauerstoff- und Nährstoffversorgung abhängen (Carmeliet und Jain 2011). Eine unzureichende Blutversorgung während des Heilungsprozesses kann zu schlecht vaskularisiertem Narbengewebe führen, wodurch es zu Rezidiven an der Läsionsstelle kommen kann, wie es häufig bei der Heilung von Tendinopathien der Fall ist. Aus diesem Grund ist die Neovaskularisierung in der entzündlichen und proliferativen Phase des Heilungsprozesses von größter Bedeutung (Conze et al. 2014). Die MSC unterstützen die Angiogenese sowohl durch parakrine Effekte als auch durch eine Transdifferenzierung in Zellen mit funktionellen und phänotypischen Eigenschaften von Endothelzellen (Tao et al. 2016). In-vivo-Studien zeigten, dass ein großer Teil der angiogenen Wirkung der MSC über den parakrinen Weg abzulaufen scheint (Al-Khaldi et al. 2003, Wu et al. 2007). Hierbei sezernieren MSC verschiedene angiogene Wachstumsfaktoren wie Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), Hepatocyte growth factor (HGF), basic Fibroblast growth factor (bFGF), Platelet-derived growth factor (PDGF), Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), TGF-β1, Angiopoietin 1 (Ang1), IL-6 und Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) (Bronckaers et al. 2014, Kwon et al. 2014, Tao et al. 2016, Maacha et al. 2020). Der wichtigste pro-angiogene Faktor ist VEGF-A, welches seine Wirkung über den VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) vermittelt (Carmeliet und Jain 2011). VEGF-A liefert das Überlebenssignal für die Endothelzellen, reguliert ihre Migration und Differenzierung und fördert die Rekrutierung der Endothelzellen für die Angiogenese und Endothelialisierung in

verletzte Gewebe und regt dadurch die Gefäßneubildung an (Carmeliet und Jain 2011, Kwon et al. 2014, Tao et al. 2016). Des Weiteren wurde gezeigt, dass VEGF-A für die Transdifferenzierung von MSC in Endothelzellen und auch für die Gefäßbildung der MSC verantwortlich ist (Oswald et al. 2004, Haack-Sorensen et al. 2008, Wang et al. 2010, Trojahn Kølle et al. 2013). Im Zusammenhang mit der Transdifferenzierung wurde außerdem berichtet, dass isolierte MSC negativ auf die typischen Endothelzellmarker wie endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), von-Willebrand-Faktor (vWF), CD31, VEGFR1, VEGFR2 oder den Perizytenmarker Neural/Glial Antigen 2 (NG2) getestet wurden. Nach einer Transdifferenzierung der MSC in endothelzellähnliche Zellen steigt die Konzentration dieser Endothelzellmarker aber signifikant an und kapillarähnliche Strukturen entstehen (Aguilera et al. 2014, Bronckaers et al. 2014, Tao et al. 2016). Dennoch sollte man die Transdifferenzierung von MSC in Endothelzellen kritisch betrachten, da endgültige morphologische und ultrastrukturelle Beweise noch ausstehen. Bis zu dieser endgültigen Klärung ist es angebrachter von der Transdifferenzierung in endothelartige Zellen zu sprechen (Bronckaers et al. 2014). Insgesamt wurde die pro-angiogene Wirkung der MSC bereits in zahlreichen Studien in vitro und in vivo untersucht. Dabei wurde unter anderem dargestellt, dass durch eine Therapie mit MSC bei ischämischen Erkrankungen an den Hintergliedmaßen von Mäusen eine Autoamputation durch Neovaskularisierung und Wiederherstellung des Blutflusses verhindert werden konnte (Kinnaird et al. 2004, Rehman et al. 2004, Moon et al. 2006, Gangadaran et al. 2017). Außerdem führte eine Transplantation von MSC in Tiermodellen mit Myokardinfarkten zu einer deutlichen Verbesserung des linksventrikulären Auswurfs, da die MSC die Angiogenese durch pro-angiogene Wachstumsfaktoren und durch eine Differenzierung in Kardiomyozyten induzierten (Bronckaers et al. 2014).

Ein weiterer Effekt der MSC ist die Inhibition des programmierten Zelltods (Apoptose). Die Apoptose beinhaltet einen Rezeptor-abhängigen extrinsischen und einen Mitochondrien-assoziierten intrinsischen Signalweg. Beim intrinsischen Signalweg kommt es zur Aktivierung der pro-apoptotischen Faktoren, wie unter anderem Bax oder Bak, sodass das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen zu Gunsten der pro-apoptotischen Proteine verlagert wird. Dadurch kommt es zur Porenbildung in den Mitochondrien, wodurch pro-apoptotische Proteine wie Cytochrom C in das Cytoplasma der Zelle freigesetzt werden. Durch Cytochrom C

kommt es zur Bildung des „Apoptosom“-Komplexes, wodurch die Pro-Caspase 9 aktiviert wird, welche über die Aktivierung der Caspase 3 die Caspase-Kaskade einleitet und die Zelle abbaut (Kiraz et al. 2016). Dieser komplexe Vorgang des intrinsischen Signalwegs kann durch parakrine Faktoren der MSC beeinflusst werden. Einige Studien zeigten, dass nach einer MSC Applikation die Bax und Caspase 3 Konzentrationen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen deutlich reduziert waren (Zhou et al. 2013, Selek et al. 2014, Yin et al. 2014, Yao et al. 2015, Chen et al. 2017). Außerdem wurde auch eine Hochregulierung der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine (Zhou 2013, Yin et al. 2014, Yao et al. 2015, Tao et al. 2016, Chen et al. 2017) und eine verminderte Konzentration des cytosolischen Cytochrom C (Chen et al. 2017) nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass MSC die Apoptose verhindern und somit Zellen vor dem programmierten Zelltod schützen können.

Im Laufe des Wundheilungsprozesses ist ein Organismus häufig nicht in der Lage ein geschädigtes Gewebe vollständig zu regenerieren und es kommt zum Ersatz durch fibröses Narbengewebe. Eine Narbe entsteht durch eine übermäßige Kollagensynthese und Ansammlung von extrazellulären Matrix (EZM)-Komponenten (Guillamat-Prats 2021). Im normalen Geweberegenerationsprozess kommt es nach der entzündlichen Phase zu einer proliferativen Phase, in der die Läsion bedeckt und mit neuem Gewebe aufgefüllt wird. In diesem Stadium spielen die Fibroblasten eine entscheidende Rolle, denn sie differenzieren sich zu Myofibroblasten und sorgen für eine Kontraktion der Wundränder sowie die Synthese von EZM und pro-fibrotischen Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 (Usunier et al. 2014, Guillamat-Prats 2021). Durch Reepithelisierung und -endothelialisierung kommt es danach zur vollständigen Ausbildung von Narbengewebe. Unter normalen Umständen wird die provisorische EZM wieder durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren, TIMPs, ab- bzw. umgebaut, sobald ein vollständiger Gewebeersatz erfolgt ist. Bei dieser Matrixremodellierung wird das initial gebildete Kollagen III durch Kollagen I ersetzt. Im Falle einer bakteriellen Infektion, Ischämie, chronischen Entzündung oder anderer Störfaktoren kommt es zu einer dauerhaften Myofibroblastenaktivierung und dadurch zu einer überschießenden EZM-Bildung, was zu einem Funktionsverlust und einer Versteifung des Gewebes führt (Usunier et al. 2014, Guillamat-Prats 2021). Eine Applikation von MSC hat bereits in einigen Geweben wie Herz (Li et al. 2008), Lunge (Ortiz et al. 2003, Gazdhar et al. 2013, Gad et al. 2020), Leber (Rabani et al. 2010), Niere (Semedo et al. 2009) und Cornea zu einer deutlichen Reduktion solcher Fibrosen

geführt (Wu et al. 2015). Diese anti-fibrotische Wirkung der MSC beruhte einerseits auf einer Modulation der Immunzellen, aber auch auf einer Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen mit anti-fibrotischen Eigenschaften wie HGF, IL-10 und Adrenomedullin (Spees et al. 2016). Außerdem reduzieren die MSC durch ihre anti-inflammatorische Wirkung die Expression von TNF- $\alpha$  und IL-6 und unterdrücken die TGF- $\beta$ /SMAD 3 Expression, was der Hauptsignalweg für die Fibrose zu sein scheint (Usunier et al. 2014, Gad et al. 2020). Durch TGF- $\beta$ 1 werden die Fibroblasten und Myofibroblasten über einen SMAD 2/3-abhängigen Signalweg aktiviert und dadurch die Produktion fibrotischer Komponenten wie EZM,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) und Kollagen angeregt, was letztendlich zur Fibrose führt (Gad et al. 2020). In vielen Studien wurde bereits der Einfluss der MSC auf die Matrix-Remodellierung untersucht, wobei ein positiver Effekt der MSC auf die bestehende Dysbalance zwischen MMPs und TIMPs, wie sie bei einer Fibrose vorherrscht, gezeigt wurde. So konnte eine erhöhte Expression von MMP-2, MMP-9, MMP-13 und MMP-14 und eine verminderte Expression von TIMP1–4 nach MSC-Applikation dargestellt werden (Semedo et al. 2009, Rabani et al. 2010, Usunier et al. 2014, Wu et al. 2014).

### **2.1.2.3 Transfer von Molekülen aus MSC-Exosomen oder Mikrovesikeln**

Ein besonderes Interesse hat in den letzten Jahren die Wirkung der MSC über die Freisetzung von Exosomen und Mikrovesikeln gewonnen (**Abbildung 2c**). Exosomen sind 30–100 nm große extrazelluläre Vesikel, die durch den Mechanismus der Endozytose aus der Zelle freigegeben werden. Bei der Endozytose verschmilzt ein multivesikulärer Körper, der zahlreiche intraluminal Membranvesikel enthält, mit der Zellmembran und dadurch werden die Membranvesikel, welche dann als Exosomen bezeichnet werden, ausgeschüttet (Biancone et al. 2012, Spees et al. 2016). Mikrovesikel hingegen sind 50–1000 nm groß und entstehen durch Ausstülpungen der Plasmamembran. Die Exosomen und Mikrovesikel enthalten für die Ursprungszelle charakteristische zytoplasmatische Bestandteile und Oberflächenrezeptoren, wie biologisch aktive Moleküle, Lipide, Wachstumsfaktoren, Nukleinsäuren und mRNA (Biancone et al. 2012, Camussi et al. 2013). Dadurch tragen die Exosomen und Mikrovesikel zur bidirektionalen Zell-Zell-Kommunikation bei. Über spezifische Rezeptor-Liganden-Interaktionen können die Exosomen und Mikrovesikel mit den

Zielzellen in Kontakt treten und werden von diesen aufgenommen, wodurch ihr Inhalt in das Zytoplasma dieser Zellen freigesetzt wird (Biancone et al. 2012). Die enthaltene mRNA wird dabei in den Zielzellen in Proteine translatiert. Damit die Exosomen und Mikrovesikel auch therapeutisch genutzt werden können, ist ihre Gewinnung aus konditioniertem Medium, in dem die MSC kultiviert wurden, notwendig (Pachler et al. 2017). Das therapeutische Potenzial dieses zellfreien Produktes aus Exosomen und Mikrovesikeln ist insgesamt vergleichbar mit der parakrinen Wirkung der MSC, was bereits in einigen Studien gezeigt werden konnte. So wurde eine anti-inflammatorische (Lee et al. 2012, Yang et al. 2015), immunmodulatorische (Ha et al. 2020) und Angiogenese-fördernde (Komaki et al. 2017, Hu et al. 2021) Wirkung beschrieben. Zusätzlich scheinen die zellfreien Produkte aus Exosomen und Mikrovesikeln einige Vorteile gegenüber vollständigen MSC zu haben. So bieten sie eine höhere Sicherheit aufgrund einer geringeren Immunogenität, zeigen keine Tumorgenese und aufgrund ihrer geringen Größe können die Exosomen und Mikrovesikel nach der Applikation zum Zielorgan gelangen, ohne im pulmonalen Gefäßsystem abgefangen zu werden (Mendt et al. 2019).

#### **2.1.2.4 MSC-vermittelter Transfer von Organellen und/oder Molekülen durch Tunneling Nanotubes (TNTs)**

Ein weiterer Wirkmechanismus der MSC beruht auf dünnen Membrankanälen, den sogenannten Tunneling Nanotubes (TNTs) (**Abbildung 2d**), welche sich zwischen den MSC und Zielzellen ausbilden. Diese aus Aktin-Mikrofilamenten bestehenden TNTs wurden erstmalig von Rustom et al. (2004) entdeckt und haben einen Durchmesser von 50–200 nm (Rustom et al. 2004, Spees et al. 2016). Durch die TNTs erfolgt eine interzelluläre Kommunikation zwischen den Zellen und ein Austausch von zellulären Komponenten und Signalmolekülen wie zytoplasmatischen und Membranbestandteilen, Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Ionen, Pathogenen und Organellen der Zellen, wie vor allem Mitochondrien (Rustom et al. 2004, Onfelt et al. 2006, Plotnikov et al. 2010, Vallabhaneni et al. 2012). Je nach Zelltyp erfolgt der Transport durch die TNTs uni- oder bidirektional (Gerdes et al. 2007, Marzo et al. 2012). In vitro konnte bereits gezeigt werden, dass gestresste Zellen als Schutzmechanismus eine vermehrte Bildung von TNTs induzieren (Wang et al. 2011, Yasuda et al. 2011, Marzo et al. 2012) und dass

durch die Bildung von TNTs mit MSC der Stress von solchen Zellen reduziert wurde (Liu et al. 2014). So schützten MSC postischämische Endothelzellen mit dysfunktionalen Mitochondrien durch den Transfer funktioneller Mitochondrien über TNTs und reduzierten die Anzahl apoptotischer Zellen deutlich (Liu et al. 2014). Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass MSC durch den Transfer von Organellen wie Mitochondrien über TNTs die Lebensfähigkeit verschiedener geschädigter Zellen wiederherstellen (Plotnikov et al. 2008, Cselenyák et al. 2010, Plotnikov et al. 2010, Spees et al. 2016, Adamič et al. 2022) und gleichzeitig eine Art Transdifferenzierung der MSC durch die Aufnahme von Molekülen, die über TNTs verbundenen Zelle, induzieren (Plotnikov et al. 2008, Plotnikov et al. 2010).

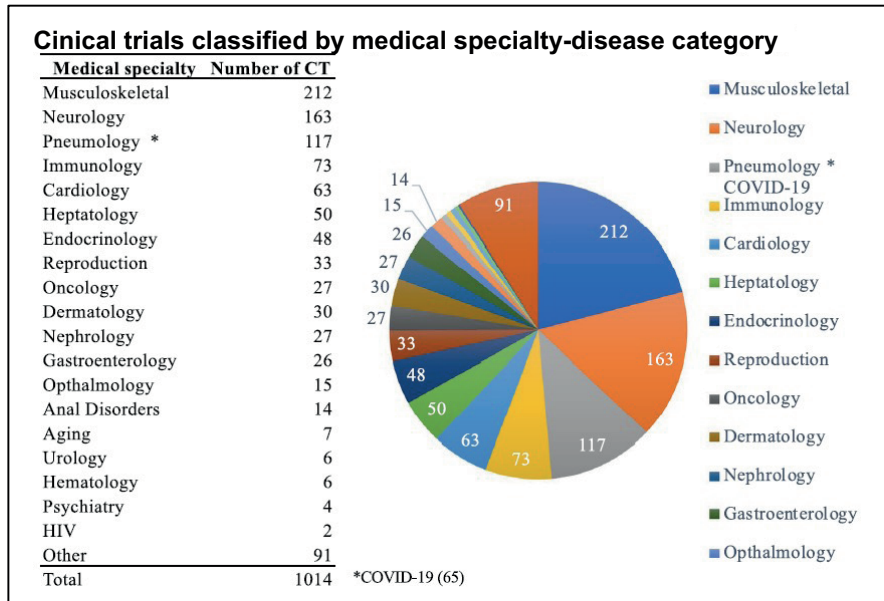
### **2.1.3 Therapeutische Anwendung von MSC**

#### **2.1.3.1 Anwendung von humanen MSC**

Aufgrund ihrer vielfältigen Wirkungsweisen und der besonderen Eigenschaften wie einer schnellen Proliferation, einer ausgeprägten Fähigkeit zur Differenzierung sowie zum Ort der Erkrankung zu migrieren, sind die MSC vielversprechende Kandidaten zur Zelltherapie bei einem großen Feld an Erkrankungen. Dabei können die MSC auf verschiedenen Wegen appliziert werden. Entweder erfolgt eine lokale Injektion bei gut zugänglichen Erkrankungen wie z.B. Osteoarthritis oder Sehnenerkrankungen, oder eine systemische Behandlung, bei der die Zellen an den Ort der Schädigung migrieren und am Prozess der Heilung teilnehmen. Die systemische Behandlung kommt bei Erkrankungen der inneren Organe oder bei Autoimmunerkrankungen zum Einsatz (Wei et al. 2013). Nachdem Lazarus et al. (1995) die erste klinisch-experimentelle Studie mit hMSC veröffentlichte, ist die Anzahl klinischer Studien mit hMSC in den letzten Jahren enorm gestiegen (Galderisi et al. 2022). So gab es zwischen den Jahren 1995–2005 auf [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) insgesamt 9 Studien (Jovic et al. 2022) und zwischen 2016–2022 waren es bereits fast 500 Studien mit hMSC (Jovic et al. 2022). Die hMSC werden bei einer Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt, bei welchen die derzeitigen Therapien keine vollständige Heilung bewirken. Somit liegt eine große Bandbreite an Bereichen vor, in denen die hMSC genutzt werden (**Abbildung 4**).

In den letzten zwei Jahren sind die meisten neuen klinischen Studien mit hMSC als Therapeutikum im Zusammenhang mit der Behandlung von COVID-19 entstanden

(Jovic et al. 2022). Dabei wurde bereits in einigen Studien ein positiver Effekt und eine sichere Anwendung der hMSC nachgewiesen (Feng et al. 2020, Meng et al. 2020, Lanzoni et al. 2021).



**Abbildung 4:** Humane MSC in klinischen Studien: die verschiedenen Anwendungsbereiche (Jovic et al. 2022)

Dennoch beziehen sich mit 212 die meisten klinischen Studien auf die Verwendung von hMSC als Therapeutikum bei muskuloskelettalen Erkrankungen, wobei die Anwendung in diesem Bereich aufgrund ihrer Differenzierungsfähigkeit in Osteo- und Chondrozyten naheliegend ist. Die häufigste muskuloskelettale Erkrankung, die mit hMSC behandelt wurde, ist die Osteoarthritis, eine degenerative Erkrankung, die vor allem am Kniegelenk vorkommt (Galderisi et al. 2022, Jovic et al. 2022). Der Gelenkknorpel weist in dem Zusammenhang eine langsam, fortschreitende Erosion auf, wodurch es zu einem zunehmend schmerzhafter werdenden Knochenabrieb kommt (Galderisi et al. 2022). Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch kein Medikament, welches die Struktur und Funktion des Gelenks wiederherstellt. Allerdings berichteten bereits viele Studien, dass eine lokale intraartikuläre Injektion von autologen hMSC einen positiven Effekt auf Knie-Osteoarthritis hat und die Funktionalität und

Schmerzhaftigkeit des erkrankten Kniegelenks deutlich verbessert wurden, ohne negative Nebeneffekte (Freitag et al. 2019, Matas et al. 2019, Prodromos et al. 2020, Galderisi et al. 2022).

Da die Neuronen des Nervensystems nur ein sehr begrenztes Regenerationspotential haben, wurden die hMSC auch als Therapeutikum bei neurologischen Erkrankungen wie z.B. Schlaganfällen, Multipler Sklerose oder Alzheimer Erkrankungen angewandt (Galderisi et al. 2022, Jovic et al. 2022). Humane MSC sind in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke problemlos ohne weitere Schädigung zu passieren und können somit die Regeneration der Neuronen durch die Produktion neurotropher Faktoren verbessern (Jovic et al. 2022).

Des Weiteren kamen die hMSC auch in der Behandlung zahlreicher immunbedingter Erkrankungen wie steroidrefraktärer Graft-versus-Host Disease (GVHD), Leukämie, oder Lymphomen zum Einsatz. Hier nutzt man die immunmodulatorische Wirkung der hMSC (Le Blanc et al. 2004, Squillaro et al. 2016, Kelly und Rasko 2021, Galderisi et al. 2022).

Der Anteil der kardiovaskulären Erkrankungen, bei denen hMSC als Therapeutikum genutzt wurden, liegt bei 63 klinischen Studien, die bereits vielversprechende Ergebnisse erlangen konnten (Squillaro et al. 2016). Die hMSC unterstützten die Regeneration des Herzmuskels und verbesserten die Kontraktilität (Squillaro et al. 2016, Galderisi et al. 2022).

Außerdem macht man sich die anti-inflammatorische, immunmodulatorische und regenerative Wirkung der hMSC bei der Therapie verschiedener Lungen- (Averyanov et al. 2020, Wick et al. 2021), Leber- (Shi et al. 2012, Zhang et al. 2012) und Nierenerkrankungen (Squillaro et al. 2016) sowie bei chronischen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn (Duijvestein et al. 2010, Ciccocioppo et al. 2015) zunutze.

Wie man anhand der hier aufgeführten größten Anwendungsbereiche der hMSC erkennen kann, haben sich die hMSC in den letzten Jahren zu einem der wichtigsten Zelltypen für neuartige Therapien entwickelt. Doch trotz des exponentiellen Anstiegs an klinischen Studien mit hMSC fehlen immer noch aussagekräftige Ergebnisse, da die meisten Studien noch in Bearbeitung sind (Squillaro et al. 2016, Galderisi et al. 2022).

Aufgrund ihrer Fähigkeit die Funktion eines geschädigten Gewebes oder Organs zu verbessern, werden hMSC von den wichtigsten Gesundheitsbehörden der Welt als Arzneimittel angesehen. Sie unterliegen daher spezifischen Regelungen, die sich vor allem auf den komplexen Prozess der Entwicklung von kommerziellen hMSC-basierten Produkten mit präklinischen und klinischen Studien bis hin zur endgültigen Registrierung und Zulassung erstrecken (López-Beas et al. 2020). Da dieser Prozess bisher sehr kompliziert und langwierig war, gab es bis zum Jahr 2020 nur 9 hMSC-basierte Produkte mit einer Marktzulassung weltweit (Alofisel; Cellgram AMI; Cartistem; Cupistem; Neuronata-R; Prochymal; Stempeucel; TEMCELL HS; STEMIRAC) (López-Beas et al. 2020). Die Verabreichung von hMSC an Patienten ist nur im Zusammenhang mit einer klinischen Studie (als hMSC-basiertes Prüfpräparat) oder nach erfolgter Marktzulassung erlaubt. Je nach Region, in der das hMSC-basierte Produkt zugelassen werden soll, gibt es unterschiedliche Regelungen, da jede Gesundheitsbehörde ihre eigenen Vorschriften hat. In Europa stuft die EMA hMSC-basierte Produkte als Arzneimittel für neuartige Therapien (ATMP) ein. Die ATMPs sind auf Genen, Geweben oder Zellen basierende Arzneimittel für die Anwendung beim Menschen und werden durch die Verordnung (EG) Nr. 1394/2007 geregelt (Arzneimittel für neuartige Therapien, Paul-Ehrlich-Institut 2012). In dieser Verordnung ist eine Ausnahme für Krankenhäuser („hospital exception“) verankert, welche die nicht routinemäßige Herstellung von ATMP in Krankenhäusern außerhalb des standardisierten Zulassungsweges unter der Verantwortung eines Arztes erlaubt. Durch diese Ausnahme ist es möglich einer individuellen ärztlichen Verschreibung eines einzelnen Patienten für ein spezielles Produkt nachzukommen und somit die regenerativen Therapeutika deutlich mehr Patienten zugänglich zu machen. Aufgrund der „hospital exception“ ist bei einer reinen „in-house“ Herstellung und Anwendung keine weitere Genehmigung durch das Paul-Ehrlich-Institut notwendig, welche bei einer Abgabe des ATMP innerhalb Deutschlands erforderlich ist (Verordnung (EG) Nr. 1394/2007; Arzneimittel für neuartige Therapien, Paul-Ehrlich-Institut 2012).

### **2.1.3.2 Anwendung von equinen MSC**

In der equinen Medizin lag der Fokus der eMSC-basierten Therapie ursprünglich auf orthopädischen Problemen, wie muskuloskelettalen und Gelenkerkrankungen.

Läsionen des Sehnen- und Bandapparates sind nicht nur in der Human-, sondern auch in der Veterinärmedizin und hier besonders in der equinen Medizin ein großes Problem und haben eine hohe klinische sowie auch wirtschaftliche Relevanz, indem sie (mit 43–53 %) eine der häufigsten Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems darstellen (Thorpe et al. 2010). Eine Heilung von Sehnenläsionen ist konservativ oft sehr schwierig, da Sehngewebe aufgrund einer eingeschränkten Vaskularisierung und verminderten zellulären Aktivität eine geringe Fähigkeit zur Restitution besitzt. Im Rahmen einer natürlichen Reparatur kommt es nach einer initialen Entzündungsreaktion zur Bildung eines fibroblastenreichen Narbengewebes, welches hauptsächlich aus Kollagen III besteht und eine deutlich geringere Elastizität im Vergleich zu gesundem Sehngewebe aufweist (Richardson et al. 2007, Nixon et al. 2008, Crovace et al. 2010). Durch diese Elastizitätseinschränkung ist die Rezidivrate einer erneuten Sehnenläsion besonders im Bereich des Übergangs vom Narbengewebe zum gesunden Bereich sehr groß (Crevier-Denoix et al. 1997, Dyson 2004). Eine geeignete Therapie der Sehnenläsion sollte also darauf abzielen die ursprüngliche Struktur und Funktion des Sehngewebes wiederherzustellen. Nachdem 2003 der erste Fallbericht über die Anwendung von eMSC zur Therapie der oberflächlichen Beugesehne veröffentlicht wurde (Smith et al. 2003), haben mittlerweile einige Studien gezeigt, dass Pferde mit Tendinopathien, die mit eMSC behandelt wurden, reduzierte Rezidivraten und eine bessere Organisation der Kollagenfasern des heilenden Sehngewebes aufweisen (Dowling et al. 2000, Dyson 2004, Pacini et al. 2007, Smith et al. 2008, Burk und Brehm 2011, Godwin et al. 2012, Renzi et al. 2013, Smith et al. 2013). Zusätzlich wurde eine höhere Synthese von Kollagen I und eine Reduktion von Kollagen III 21 Wochen nach einer eMSC-Therapie nachgewiesen, wodurch die Fähigkeit zur Matrix-Remodellierung der eMSC deutlich wird (Crovace et al. 2010).

Außerdem stellen degenerative Gelenkerkrankungen wie Osteoarthritis bei Pferden einen häufigen Grund für ein frühzeitiges Karriereende oder chronische Lahmheiten dar. Auch hier liefert eine konventionelle Therapie bei Pferden nicht den endgültigen Erfolg und die Prognose für die Rückkehr in den Sport ist oft schlecht (Voga et al. 2020). In einigen Studien wurde allerdings bereits berichtet, dass durch intraartikuläre Therapien mit eMSC die Lahmheit bei den Pferden mit Osteoarthritis deutlich verbessert wurde und auch eine größere Anzahl an Pferden wieder in den Sport zurückkehrte verglichen mit einer konventionellen Therapie (Mariñas-Pardo et al. 2018, Broeckx et al. 2019).

Darüber hinaus zeigten sich die eMSC als vielversprechendes Therapeutikum gemeinsam mit Managementmaßnahmen und angepasster Hufbearbeitung bei chronisch refraktärer Hufrehe/Laminitis. Bei dieser Erkrankung liegt ein Verlust der epidermalen Stammzellen in der Huflamelle vor, wodurch das Hufepithel ein begrenztes Proliferationspotenzial aufweist. Nach einer regionalen Applikation der eMSC in die Digitalvene wurde eine verbesserte Zellproliferation, Gewebequalität sowie eine Stabilisierung der Gefäße und Kontrolle des entzündlichen Zustandes beobachtet (Morrison 2011, Angelone et al. 2017).

Neben den orthopädischen Problemen wurden die eMSC aber auch in vielen anderen Anwendungsbereichen untersucht. So zeigte die intratracheale Anwendung mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark (Barussi et al. 2016) und die intrabronchiale Nutzung von eMSC aus dem Fettgewebe (Adamič et al. 2022) bei Pferden mit RAO eine Verbesserung der klinischen Symptome und der Entzündungsreaktion im Vergleich zur Dexamethason-Therapie.

Des Weiteren trugen eMSC zu einer erfolgreichen Wundbehandlung bei Verletzungen z.B. an der distalen Gliedmaße bei. Besonders im Bereich der distalen Gliedmaße führen eine hohe Hautspannung, eine geringe Vaskularisierung und eine reduzierte Entzündungsreaktion häufig zu einer verschlechterten Wundheilung. Es kommt dann zu einer fibroproliferativen Reaktion, die zu einer dysplastischen Heilung mit überschießendem Granulationsgewebe führt (Cequier et al. 2021). Pferde und Menschen sind die einzigen beiden Spezies, die diese fibroproliferativen Wundheilungsstörungen entwickeln. Daher ist das Pferd auch ein geeignetes translationales Modell für die Pathophysiologie und Behandlung von Keloiden und hypertrophen Narben beim Menschen (Theoret und Wilmink 2013). Aufgrund ihrer vielfältigen parakrinen Aktivität konnten die eMSC bereits in einigen Studien nach lokaler oder systemischer Verabreichung zur Verbesserung und Beschleunigung der dermalen Wundheilung beitragen (Spaas et al. 2013, Textor et al. 2018, Mund et al. 2020). Auch die Anwendung von eMSC bei Dekubitalstellen neonataler Fohlen zeigte vielversprechende Ergebnisse, da eMSC eine Schlüsselrolle in der Homöostase und Heilung der Haut spielen, indem sie die Zelldifferenzierung, Immunmodulation und die Sekretion von Wachstumsfaktoren für die Reepithelisierung und Neovaskularisierung unterstützen (Chen et al. 2009, Iacono et al. 2012, Iacono et al. 2016).

Auch in der Ophthalmologie konnten positive Effekte in der Behandlung von bakteriell bedingten ulzerativen Keratitiden (Spaas et al. 2011, Marfe et al. 2012) mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und mit eMSC bei der Therapie immunbedingter Keratitiden erzielt werden (Davis et al. 2019).

Zuletzt finden sich auch zahlreiche vielversprechende Studien zur Anwendung von eMSC bei Erkrankungen der Reproduktionsorgane wie Endometriose (Mambelli et al. 2013, Mambelli et al. 2014) und Endometritis (Ferris et al. 2014, Navarrete et al. 2020) sowie bei neurologischen Erkrankungen. Allerdings konnte bei letzteren die Verbesserung der Nervenregeneration durch die eMSC-Therapie, wie sie bisher bei anderen Tierarten, z.B. Schafen, beschrieben wurde, beim Pferd bisher noch nicht eindeutig dargestellt werden (Cequier et al. 2021).

Wie man anhand der zahlreichen Studien mit eMSC sehen kann, bergen die spezifischen Eigenschaften der eMSC ein großes therapeutisches Potenzial in der equinen Medizin, wo andere herkömmliche Therapieansätze keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern. Aus diesem Grund hat das Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) der EMA einige grundsätzliche Regeln zur Nutzung von MSC in der Veterinärmedizin aufgestellt (Committee for Medicinal Products 2019). Demnach muss eine strikte mikrobiologische Kontrolle während des gesamten Herstellungsprozesses erfolgen und die Zellspender sollten nach Möglichkeit klinisch gesund und frei von übertragbaren Krankheiten sein. Das MSC-Produkt sollte aseptisch hergestellt werden.

Innerhalb der Europäischen Union (EU) liegt bisher noch keine genauere Gesetzeslage zur Therapie mit zellbasierten Produkten in der Veterinärmedizin vor. Aus diesem Grund muss jeder EU-Mitgliedstaat zunächst seine eigenen Regelungen treffen. Im Jahr 2015 hat die US Food and Drug Administration (FDA) Empfehlungen für die Verwendung von zellbasierten Produkten bei Tieren ausgesprochen (Guidance Document, FDA 2015). Demnach sollen zellbasierte Produkte, einschließlich tierischer stammzellbasierter Produkte (Animal stem cell-based products [ASCP]), als neue Tierarzneimittel behandelt werden und erfordern eine Zulassung vor dem Inverkehrbringen (Voga et al. 2020). Das erste zellbasierte Tierarzneimittel, welches chondrogen-induzierte eMSC aus dem Pferdeblut enthält (Arti-Cell® Forte), wurde 2019 zur Behandlung von gering- bis mittelgradigen wiederkehrenden Lahmheiten im Zusammenhang mit nicht infektiösen Gelenkentzündungen bei Pferden zugelassen.

Ebenfalls seit 2019 ist ein Tierarzneimittel bestehend aus umbilikalen eMSC (HorStem®) zur Therapie von leichter bis mittelschwerer Osteoarthritis bei Pferden auf dem Markt verfügbar. Ein weiteres Präparat bestehend aus tendogen gepressten eMSC aus peripherem Blut (RenuTend®) erhielt 2022 die Zulassung und dient zur Heilungsförderung von Sehnen- und Fesselträgerverletzungen bei Pferden.

## 2.2 Kultivierung von MSC

MSC sind nur in geringen Mengen in ihrem Ursprungsgewebe vorhanden. Um eine ausreichend große Anzahl an MSC für die therapeutische Applikation zu gewinnen, ist daher eine In-vitro-Kultivierung erforderlich (Pittenger et al. 1999, Bieback et al. 2008, Koch et al. 2009). Dabei stellen die Kulturbedingungen ein wichtiges Element dar und können die Sicherheit, Zellqualität und auch das therapeutische Potenzial der MSC stark beeinflussen (Karnieli et al. 2017).

Standardmäßig werden die MSC bei 37 °C, hoher Luftfeuchtigkeit (> 95 %) und 5 % CO<sub>2</sub> in Plastikzellkulturflaschen mit einem entsprechenden Zellkulturmedium kultiviert. Dabei proliferieren MSC zweidimensional (2D) als Monolayer in den entsprechenden Zellkulturflaschen. Diese 2D-Kulturtechniken wurden für die Etablierung von Primärkulturen, Zelllinien, der Differenzierung von MSC und verschiedenen analytischen Assays entwickelt. Allerdings weist diese nicht naturgemäße 2D-Kultivierung der MSC einige Einschränkungen auf. Erstens ist diese Technik sehr ineffektiv, da der Gewinn einer ausreichend großen Anzahl an MSC für die klinische Anwendung relativ langsam erfolgt. Zweitens kann es zusätzlich auch zu einer heterogenen Population an MSC und Veränderungen des Zytoskeletts der MSC kommen (Rady et al. 2020). Um diese Einschränkungen zu überwinden und die natürliche Nische der MSC nachzuahmen wurden dreidimensionale (3D) Zellkulturtechniken entwickelt, wie z.B. die Scaffold-basierte Kultur, die Sphäroidkultur oder die komplexe Kultivierung der MSC in Bioreaktoren. Bei der Scaffold-basierten Kultur ist es das Ziel Eigenschaften einer EZM zu erzeugen, die für die Funktion der Zellen erforderlich sind. Typische Scaffolds sind hierbei Hydrogele oder Gerüstsubstanzen wie z.B. dezellularisiertes Sehngewebe. Die Scaffolds erleichtern den Transport von Sauerstoff, Nährstoffen und Abfallstoffen, wodurch sich die Zellen besser vermehren und in das Gerüstgewebe einwandern können. Bei der

Sphäroidkultur haben die MSC Zell-Zell- oder Zell-EZM-Kontakt. Dabei können die Sphäroide durch unterschiedliche Techniken, wie eine hängende Tropfenkultur, eine Suspensionskultur in Ultra-Low-Attachment-Kulturplatten oder eine Rotationskultur, hergestellt werden (Rady et al. 2020). In Sphäroidkultur kultivierte MSC zeigen eine deutlich verbesserte pro-angiogene, immunsuppressive sowie wundheilungsfördernde Wirkung im Vergleich zu MSC, die in Monolayern kultiviert wurden, was für eine Förderung der parakrinen Wirkmechanismen spricht (Cheng et al. 2013, Miceli et al. 2019). Allerdings kann es bei Sphäroidkulturen ab einem Durchmesser von 1 mm zu hypoxischen Zentren mit nekrotischen Zellen kommen, da in diesem Bereich ein Nährstoffmangel und eine toxische Dosis an Metaboliten vorliegt (Haycock 2011). Bioreaktoren hingegen ermöglichen die präzise und reproduzierbare Kontrolle über viele Umgebungsbedingungen, die für die Zellkultur erforderlich sind. Dazu gehören Temperatur, pH-Wert, Strömungsgeschwindigkeit des Mediums, Sauerstoff, Nährstoffzufuhr und Abtransport von Abfallstoffen (Haycock 2011). Somit können in Bioreaktoren sehr zuverlässig große Mengen an MSC ohne den Verlust typischer MSC-Charakteristika kultiviert werden.

Zusätzlich können die Zelleigenschaften wie die Proliferationsfähigkeit und die Sekretion parakriner Faktoren der MSC durch hypoxische Bedingungen erhöht werden (Egger et al. 2017, Rady et al. 2020). Auch das Alter der Zellspender und die Zelldichte, mit der die MSC ausgesät werden, haben einen Einfluss (Rady et al. 2020). So können MSC von jüngeren Spendern eine höhere Anzahl an Zellverdopplungszyklen durchlaufen als MSC von älteren Spendern, bevor sie in den seneszenten Zustand übergehen (Stenderup et al. 2003). Des Weiteren scheint die Proliferationsfähigkeit der MSC von der Aussaatdichte zu Beginn der Kultivierung abzuhängen. So weisen MSC mit einer geringeren Aussaatdichte von 100 Zellen/cm<sup>2</sup> eine höhere Proliferationsrate auf als MSC mit einer Aussaatdichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> (Both et al. 2007). Dieser Effekt lässt sich durch die Kontaktinhibition bei höheren Zellzahlen sowie durch das Vorliegen vieler kleiner Zellen in der Log-Phase mit exponentiellem Wachstum bei niedriger Aussaatdichte, erklären (Rady et al. 2020).

### 2.2.1 Zellkulturmedien und Supplemente

Während der Kultivierung müssen die MSC mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgt werden. Aus diesem Grund ist eins der wichtigsten Elemente der Kulturbedingungen das Zellkulturmedium. Ein typisches Zellkulturmedium besteht aus Aminosäuren, Vitaminen, anorganischen Salzen, Glucose, Hormonen, Bindungsfaktoren und Serum als Quelle für Wachstumsfaktoren. Außerdem reguliert das Zellkulturmedium den pH-Wert und die Osmolalität (Arora 2013).

Das Zellkulturmedium setzt sich in der Regel aus einem Basalmedium plus spezifischen Supplementen zusammen. Als Basalmedien werden für die MSC-Kultivierung am häufigsten Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und Alpha-Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM) verwendet. Sie liefern den Grundbaustein eines Zellkulturmediums und enthalten zahlreiche Aminosäuren, Vitamine, anorganische Salze und Glucose. Außerdem enthalten die meisten kommerziell erhältlichen Produkte auch Phenolrot als pH-Indikator, da ein konstant regulierter pH-Wert wichtig für eine erfolgreiche MSC-Kultivierung ist. Die Regulierung des pH-Wertes findet durch ein natürliches Puffersystem statt, bei dem sich das gasförmige  $\text{CO}_2$  mit dem  $\text{CO}_3/\text{HCO}_3$  des Zellkulturmediums so ausgleicht, dass der pH-Wert konstant bleibt. Für dieses System ist eine Kultivierung in einem Inkubator mit 5–10 %  $\text{CO}_2$ -Gehalt notwendig. Das Phenolrot zeigt Veränderungen des pH-Wertes durch die Freisetzung von Metaboliten während des Wachstums der MSC an. Der optimale pH-Wert liegt bei 7,4, welchen das Phenolrot durch eine hellrote Farbe des Mediums anzeigt (Arora 2013).

Zusätzlich zu den Basalmedien werden in den meisten Zellkulturmedien Antibiotika oder Antimykotika verwendet. Dadurch können besonders in Primärkulturen Kontaminationen vermieden werden. Bei der Dosierung dieser Antibiotika oder Antimykotika ist es wichtig, dass mindestens die minimale Hemmkonzentration verwendet wird und die Dosen auch nicht zu hoch gewählt werden, da dies zytotoxisch wirken kann und damit ein negativer Effekt auf die Zellkultur entsteht (Nygaard et al. 2015). Allerdings sollte die Verwendung von Antibiotika mit Hinblick auf die Resistenzlage kritisch betrachtet werden und durch hygienisches und steriles Arbeiten eine Reduktion der Anwendung von Antibiotika auf Zellkulturen, bei denen ein Einsatz unumgänglich ist, wie z.B. bei Primärkulturen, erfolgen. Eine routinemäßige Verwendung von Antibiotika in der Zellkultur kann dazu führen, dass Kontaminationen mit resistenten Bakterien oder Mykoplasmen verdeckt werden (Arora 2013).

Typische Antibiotika für die Zellkultur sind Kombinationen aus Penicillin und Streptomycin sowie Tetracyclin, Gentamycin oder Kanamycin. Als Antimykotika werden üblicherweise Amphotericin B, Nystatin oder Clotrimazol verwendet.

Da das Basalmedium nicht alle Faktoren enthält, die die MSC zur Proliferation, Differenzierung und für ihren Zellmetabolismus benötigen, ist die Supplementierung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Bindungs- und Adhäsionsproteinen, Hormonen, Signalmolekülen und vielen weiteren Substanzen, die für ein erfolgreiches Zellwachstum notwendig sind, ein essenzieller Schritt bei der Herstellung von Zellkulturmedien (Arora 2013, Rady et al. 2020). Der aktuelle Goldstandard als Zellkultursupplement ist FBS (Doucet et al. 2005, van der Valk et al. 2010, Bieback 2013, Burnouf et al. 2016). Dieses FBS ist allerdings mit diversen Problemen behaftet und durch seine ethisch bedenkliche Herstellung äußerst umstritten, worauf im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird. Um diese Probleme zu vermeiden, empfehlen die EMA (Guideline on the use of bovine serum, EMA 2013) und die ISCT (Karnieli et al. 2017) den Ersatz des FBS durch andere sicherere Alternativen. Mittlerweile wurden bereits verschiedene Alternativen zum FBS untersucht, welche im Folgenden genauer erläutert werden.

### **2.2.1.1 Fetales bovines Serum (FBS)**

FBS ist das am häufigsten verwendete Zellkultursupplement bei der Kultivierung von Säugetierzellen in der Forschung und Pharmazie seit vielen Jahren, da es die wesentlichen Komponenten enthält, die die meisten Zelltypen für ihre Vermehrung benötigen.

Somit ist FBS eine komplexe Mischung aus einer Vielzahl an Bestandteilen, die für das Zellwachstum und die Funktion von Bedeutung sind. Es dient als Quelle zahlreicher Wachstumsfaktoren, Hormone, Aminosäuren, Proteine wie Fibronectin, Mineralstoffe wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$ , Vitamine (besonders fettlösliche Vitamine wie A, D, E und K) und verschiedener Bindungsproteine wie Albumin oder Transferrin, die für den Transport von Molekülen in die Zelle verantwortlich sind. Außerdem schützt das FBS die Zellen sowohl vor einer Proteolyse, indem es Proteaseinhibitoren enthält, als auch vor einer mechanischen Schädigung in Suspensionskulturen, da es die

Viskosität des Mediums erhöht, und es dient als Puffer im Zellkulturmedium. Normale Zellkulturmedien enthalten oft Anteile von 10–20 % des FBS (Arora 2013).

FBS ist ein Nebenprodukt der Nahrungsmittelindustrie, da es am Schlachthof bei der Schlachtung gravider Mutterkühe gewonnen wird. Der Fetus wird dafür aus der Gebärmutter und seinen Eihüllen entfernt und das Blut durch eine direkte Herzpunktion steril in Blutbeutel überführt. Damit das Herz für die Herzpunktion nicht zu klein ist, sollte der Fetus mindestens 3 Monate alt sein (Jochems et al. 2002). Die Blutgerinnung läuft im Anschluss bei 5 °C oder auf Eis ab und danach wird das geronnene Blut vom Schlachthof zu einem anderen Standort transportiert, wo dann die Zentrifugation und weitere Verarbeitung zu reinem Serum stattfindet. Das fertige Serum wird in Einheiten von 3 L bei –20 °C eingefroren. Diese kleineren Einheiten werden später zu größeren Batches gepoolt und sie durchlaufen drei Durchgänge einer sterilen Filtration mit 0,1 µm Sterilfiltern. Als letztes wird das FBS in einem aseptischen Prozess steril abgefüllt und schließlich als finales Produkt mit einem Analysezertifikat verkauft (European Serum Products Association (ESPA) Value Chain)

Diese Gewinnung des FBS ist ethisch äußerst umstritten, da die Blutentnahme für die Feten mit erheblichen Schmerzen und Leiden verbunden ist, vor allem wenn die Entwicklung des Fetus schon sehr weit fortgeschritten ist (Jochems et al. 2002, Van der Valk und Gstraunthaler 2017, van der Valk et al. 2018, Weber et al. 2021). Nachdem man früher davon ausgegangen ist, dass die Schlachtung gravider Kühe eine Ausnahme darstellt, ist diese Einschätzung heute nicht mehr haltbar. Anhand Erhebungen an Schlachthöfen wurde gezeigt, dass im Durchschnitt 9,6 % der geschlachteten Kühe tragend waren. Bezieht man dies auf ganz Deutschland, kommt man auf ca. 180 000 Tiere pro Jahr (Antwort der Bundesregierung 2014). 90 % dieser graviden Kühe befanden sich im zweiten oder dritten Trimester der Trächtigkeit (Riehn et al. 2011). Abweichend von diesen Zahlen ermittelte der Verband der Fleischwirtschaft e.V. (VDF) in den Jahren 2013–2014, dass nur bei 1 % der weiblichen Rinder bei der Schlachtung eine Trächtigkeit im dritten Trimester vorlag (Verband der Fleischwirtschaft e.V. 2015). Diese beiden Studien kommen zwar auf verschiedene Ergebnisse und sind aufgrund der unterschiedlichen Methodik schwer zu vergleichen, allerdings beweisen beide das regelmäßige Auftreten der Schlachtung gravider Kühe. Bis zum Jahre 2017 gab es weder in der europäischen noch der nationalen Gesetzgebung eine genaue Regelung zur Schlachtung gravider Kühe. Laut Anhang I Kapitel I Nr. 2 Verordnung (EG) Nr. 1/2005 (Tierschutztransportverordnung) gelten

Mutterkühe innerhalb der letzten 10 % der Trächtigkeit als nicht transportfähig, da durch den Transport eine erhöhte Stressbelastung bei graviden Tieren zu Schmerzen, Leiden oder Verkalbungen führen kann (Riehn et al. 2011). Dennoch kommt es aus unterschiedlichsten Gründen zu Verstößen gegen dieses Transportverbot. Seit 2017 untersagt das Tiererzeugnisse-Handels-Verbotsgesetz (TierErzHaVerbG) jedoch eine Schlachtung von Säugetieren im letzten Drittel der Trächtigkeit. Somit hat man jetzt eine rechtliche Handhabe und es bleibt nur noch zu klären, inwieweit jüngere Feten zur Schmerzwahrnehmung fähig sind.

Obwohl wissenschaftliche Untersuchungen herausgefunden haben, dass Rinderfeten zumindest im letzten Drittel der Trächtigkeit bereits leidensfähig sind (Marahrens und Schwarzlose 2013), werden weder zugelassene Tötungsmethoden noch entsprechende Anästhesien vor der Blutentnahme für die Feten angewendet. Die Tierschutz-Schlachtverordnung (TierSchIV) sieht im Grundsatz eine Tötung von Tieren nach Betäubung durch den Bolzenschuss, den Kugelschuss, die elektrische Durchströmung, die Anwendung von Gasen oder die Verabreichung eines Betäubungsmittels vor. Dabei ist das Tier als "jedes lebende Tier" definiert und es bleibt aber sowohl in der TierSchIV als auch im Tierschutzgesetz unklar, ob Tiere während der fetalen Phase der vorgeburtlichen Entwicklung unter diese Definition fallen, denn der Begriff Fetus wird in diesen Gesetzestexten nicht erwähnt. Im Tierschutzgesetz werden Feten zwar als Teil des Muttertieres angesehen und sollen auch in dem Zusammenhang geschützt werden, allerdings gibt es in der TierSchIV keine spezifischen Regelungen für die Schlachtung (Betäubung und Tötung) gravider Tiere (Marahrens und Schwarzlose 2013). Somit sind die Feten durch die aktuell geltenden tierschutzrechtlichen Vorschriften nicht geschützt und sterben durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) nach dem Tod der Mutterkuh. Insgesamt lässt sich also der Schluss ziehen, dass noch ein erheblicher Handlungsbedarf bezüglich der Gesetzgebung zur Schlachtung gravider Kühe besteht und unter diesem Hinblick auch die Frage der Schmerz- und Leidensfähigkeit der Feten noch genauer untersucht werden muss.

Dennoch sollte der Einsatz des FBS unter diesen ethischen Aspekten deutlich reduziert und auf alternative Zellkultursupplemente zurückgegriffen werden.

Zusätzlich zur ethischen Komponente ist FBS noch mit einigen weiteren Problemen behaftet. So variiert der Preis und die Verfügbarkeit des FBS sehr stark in Abhängigkeit vom weltweiten Viehbestand, den Fleisch- und Futtermittelpreisen und vielen weiteren

Bedingungen (Jochems et al. 2002, Cimino et al. 2017). Bereits 1995 wurden zur Herstellung von 500 000 L FBS 1 000 000 Feten benötigt und die Nachfrage nach FBS ist seitdem deutlich angestiegen (Hodgson 1995, Gstraunthaler 2003). Außerdem ist das FBS ein Naturprodukt, welches von saisonalen und örtlichen Schwankungen abhängt und somit eine inkonstante Qualität und Chargenvariabilität aufweist. Durch diese Varianz muss jede Charge vor Beginn von Zellkulturexperimenten aufwendig getestet werden, da es sonst zu Veränderungen in der Zellkultur und abweichenden Ergebnissen kommen kann oder Einschränkungen in der Reproduzierbarkeit zwischen den Zellkulturexperimenten verschiedener Chargen entstehen können (Gstraunthaler 2003, Zheng et al. 2006, van der Valk et al. 2010, Baker 2016). In den meisten Fällen ist FBS zusätzlich ein xenogenes Produkt, wodurch die Gefahr einer Immunreaktion des Empfängers auf applizierte Zellprodukte besteht (Sundin et al. 2007, Bieback 2013). MSC selbst sind nur in einem geringen Maße immunogen. Dennoch kann nach einer Kultivierung in FBS bei der ersten, aber vor allem bei wiederholter Verabreichung im Patienten eine Immunreaktion hervorgerufen werden. Eine Immunogenität gegenüber dem FBS kann den therapeutischen Erfolg beeinträchtigen (Horwitz et al. 2002, Sundin et al. 2007). So wurde berichtet, dass Patienten nach einer Behandlung mit Zellen, die vorher in FBS-Medium kultiviert wurden, eine eingeschränkte Wirkung der Therapie oder sogar Therapieversagen aufgrund von Antikörpern gegen Bestandteile des FBS entwickelten (Selvaggi et al. 1997, Horwitz et al. 2002, Tuschong et al. 2002). Obwohl aktuell noch einige Zulassungsbehörden xenogene Komponenten in klinischen Studien der Phase I tolerieren, sollte der Gehalt an xenogenem FBS reduziert werden, denn ein Waschverfahren oder die anschließende Kultivierung in autologem oder allogenen Serum reduziert zwar den Gehalt an xenogenem Protein, ein Restrisiko bleibt allerdings erhalten (Bieback 2013). Des Weiteren besteht durch das FBS auch die Gefahr der Übertragung boviner Pathogene, wie Viren, Bakterien oder Prionen (Erickson et al. 1991, World Health Organisation 2006, Hawkes 2015). Um eine Kontamination des FBS mit bovinen Pathogenen zu verhindern, wird jede Charge entsprechend der Richtlinien der EMA (Guideline on the use of bovine serum, EMA 2013) auf Viren und Bakterien getestet und anschließend zusätzlich noch eine Hitze- oder Gammastrahlenbehandlung durchgeführt.

Schlussendlich sollte das FBS aufgrund der beschriebenen Probleme, wie von der EMA (Guideline on the use of bovine serum, EMA 2013) und der ICST (Karnieli et al.

2017) empfohlen, durch Alternativen ersetzt werden. Einige Alternativen wurden bereits detaillierter untersucht, welche hier im Folgenden genauer erläutert werden.

### **2.2.1.2 Alternativen zum FBS**

#### **2.2.1.2.1 Serumfreie Medien**

Geeignete Alternativen zum FBS sollten eine genau definierte Zusammensetzung, einen geringeren Anteil an Verunreinigungen, niedrige Produktionskosten, eine längere Haltbarkeit und eine einfache Verfügbarkeit aufweisen (Cimino et al. 2017). Solche Ersatzstoffe werden aktuell als serumfreie, xenofreie oder chemisch definierte Medien bezeichnet. Allerdings herrscht oft Unklarheit bezüglich der Terminologie der unterschiedlichen Medien. Normalerweise bestehen komplette Zellkulturmedien aus einem definierten Basalmedium plus einem Serumzusatz (Tier- oder Humanserum). Hingegen bestehen serumfreie Medien aus einem Basalmedium und erfordern keinen Zusatz von Tier- oder Humanserum. Stattdessen enthalten sie z.B. gereinigtes Protein oder Proteinfractionen, Hormone, Wachstumsfaktoren oder Lipide (tierischer oder humaner Herkunft). Alternativ können serumfreie Medien auch andere tierische oder humane Zusätze wie z.B. PL enthalten. Serumfreie Medien gelten als chemisch undefinierte Medien, da einige Bestandteile unbekannt sind (van der Valk et al. 2010, Karnieli et al. 2017). Im Gegensatz dazu beinhalten chemisch definierte Medien nur Komponenten, deren chemische Zusammensetzung und Struktur bekannt ist, wie z.B. rekombinante oder hochgereinigte Proteine, Wachstumsfaktoren oder Zytokine (van der Valk et al. 2010, Karnieli et al. 2017). Von den serumfreien Medien müssen die xenofreien Medien in gewisser Weise abgegrenzt werden. Bei den xenofreien Medien für hMSC dürfen z.B. nur Supplemente humaner Herkunft wie hPL, humanes gereinigtes Protein oder rekombinante Proteine, Wachstumsfaktoren oder Lipide verwendet werden.

Nachdem im Jahr 1976 erstmalig durch Zusatz ausgewählter Hormone ein chemisch definiertes, serumfreies Medium hergestellt wurde (Hayashi und Sato 1976), konnten im Anschluss daran in den letzten Jahren zahlreiche Komponenten, die für die Entwicklung moderner serumfreier Zellkulturmedien nützlich sind, identifiziert werden. Zum jetzigen Zeitpunkt sind viele serum- und/oder xenofreie Medien kommerziell erhältlich und somit können mittlerweile viele verschiedene Zelllinien mit serum-

/xenofreien Medien kultiviert werden und die Zahl der zellspezifischen Medien steigt stetig. Es konnte auch bereits in einigen Studien gezeigt werden, dass verschiedene kommerziell erhältliche serumfreie/chemisch definierte Medien in der Lage sind die Morphologie, Expansion und Differenzierung der hMSC zu unterstützen (Cimino et al. 2017, Schubert et al. 2018). Interessanterweise gab es aber auch Berichte über eine Veränderung der Morphologie der hMSC nach einer Kultivierung in serumfreien Medien, wo die hMSC je nach Medium schlanker und spindelförmiger oder in vermehrten Bündeln als mit standardmäßigem FBS-Medium wuchsen (Chase et al. 2010, Gottipamula et al. 2013, Al-Saqi et al. 2014, Swamynathan et al. 2014). Die Analyse des Immunophänotyps der hMSC ergab bei der Verwendung serumfreier Medien inkonsistente Ergebnisse. So zeigten die serumfrei kultivierten hMSC in einigen Studien eine konsistente Markerexpression (Swamynathan et al. 2014, Oikonomopoulos et al. 2015, Schubert et al. 2018), wohingegen andere über einen reduzierten Gehalt an CD105 (Mark et al. 2013) oder CD90 (Al-Saqi et al. 2014) berichteten. Auch wenn die chemisch definierten Medien sich auf den ersten Blick vielversprechend zeigen, weisen sie dennoch auch einige Nachteile auf, die eine breitere Anwendung von chemisch definierten Medien bei der Expansion von hMSC im klinischen Maßstab einschränken könnten. So bleibt die genaue Zusammensetzung solcher kommerziell erhältlicher Medien für den Anwender immer ungewiss, da die Firmen diese Informationen unter Verschluss halten. Außerdem sind sie sehr zellspezifisch und ihre Herstellung ist sehr kostspielig und zeitaufwendig (Cimino et al. 2017).

Im Gegensatz zu dem sehr großen Spektrum an verschiedenen serumfreien Medien, die für die Kultivierung von hMSC zur Verfügung stehen, gibt es zum jetzigen Zeitpunkt noch kein geeignetes serumfreies kommerziell erhältliches Medium für die Veterinärmedizin. In der Studie von Schubert et al. (2018) wurden die eMSC mit humanem serumfreiem kommerziell erhältlichem Kulturmedium kultiviert. Hierbei zeigten die eMSC eine veränderte Morphologie und das Handling in der Zellkultur wurde deutlich erschwert, da die eMSC sich in Zellaggregaten anordneten und sich spontan von der Zellkulturoberfläche ablösten (Schubert et al. 2018). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die MSC speziesabhängig gewisse Adhäsionsmoleküle für ihr Wachstum benötigen, die sonst im FBS in zahlreicher Form vorhanden sind (Pilgrim et al. 2022). Des Weiteren variierte die Proliferation und der Immunophänotyp deutlich zwischen den eMSC in serumfreiem Medium und denen im Standardmedium mit FBS.

Insbesondere die Expression von CD90 wies einen Unterschied zwischen den verschiedenen Mediengruppen auf, mit einer niedrigen Prozentzahl (5,21–83,40 %) in eMSC mit serumfreiem Medium und deutlich höheren Werten im FBS-Medium (86,20–99,50 %) (Schubert et al. 2018). Diese Ergebnisse korrespondieren nicht mit anderer bereits bestehender Literatur, wo canine und eMSC, die in serumfreiem Medium kultiviert wurden, ihren Phänotyp, ihre Proliferation und den inhibitorischen Effekt auf die Lymphozytenproliferation beibehielten (Clark et al. 2016). Allerdings sekretierten canine und eMSC in der Abwesenheit von FBS eine deutlich geringere Konzentration des Schlüsselmediators PGE<sub>2</sub>, über den die MSC viele ihrer immunmodulatorischen und trophischen Wirkungen ausüben. Aufgrund der niedrigen PGE<sub>2</sub> Konzentration war die Hemmung der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion und die Fähigkeit der eMSC, die IFN- $\gamma$ -Sekretion durch aktivierte T-Zellen zu hemmen, eingeschränkt. Es sollte als Ergänzung hinzugefügt werden, dass in der Studie von Clark et al. (2016) zwar das Serum aus den Kulturbedingungen entfernt wurde, allerdings bovines Fibronectin als xenogene Komponente ergänzt worden ist. Viele der derzeit verfügbaren serumfreien Medien benötigen eine solche Vorbeschichtung der Kulturgefäße mit EZM-Proteinen, wie Fibronectin, um die Zellanhaftung der MSC zu verbessern (Cimino et al. 2017).

Insgesamt scheinen die kommerziell erhältlichen serumfreien Medien für die Kultivierung von hMSC sehr vielversprechend. Allerdings konnten bei der Kultivierung von eMSC mit diesen Medien nur inkonsistente Ergebnisse gewonnen werden. Dies könnte daran liegen, dass die detaillierte Zusammensetzung des verwendeten Mediums unbekannt ist, wodurch die Möglichkeit besteht, dass einige Inhaltsstoffe für das Pferd ungeeignet sind. Unter Anbetracht dieser Ergebnisse sollten entsprechende speziesspezifische serumfreie Medien auch für die veterinärmedizinische MSC-Kultur entwickelt und bis zu diesem Zeitpunkt auf andere Alternativen als FBS-Ersatz zurückgegriffen werden.

#### **2.2.1.2.2 Serum**

Eine logische Alternative zum FBS ist die Verwendung eines artspezifischen Serums. Dieses Serum beinhaltet keine xenogenen Komponenten und die Herstellung ist kostengünstig und ethisch nur wenig bedenklich (Cimino et al. 2017). Allerdings sollte

man auch bei artspezifischen Seren beachten, dass genau wie beim FBS Unterschiede in der Zusammensetzung bestehen (Pilgrim et al. 2022) oder artspezifische Erkrankungen übertragen werden können. Des Weiteren muss das Serum in der Zellkultur oft mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen ergänzt werden (Cimino et al. 2017).

Die Herstellung des Serums erfolgt durch Zentrifugation körpereigener oder allogener Vollblutspenden, bei denen die Gerinnung bereits abgelaufen ist. Das dadurch entstehende Serum beinhaltet bis auf die Gerinnungsfaktoren alle physiologischen in der Blutflüssigkeit gelösten Stoffe, wie Albumin, verschiedene Globuline, Elektrolyte, Nährstoffe, Abfallstoffe (wie z.B. Harnstoff), Hormone, Wachstums- und Adhäsionsfaktoren.

Bei der Kultivierung von hMSC zeigte sich das autologe Humanserum bisher mit positiven Ergebnissen. So erwies sich ein Medium, welches mit 10 % autologem Humanserum supplementiert wurde, als ebenso wirksam wie die gleiche Menge an FBS für die Isolierung und Expansion von hMSC (Stute et al. 2004, Cimino et al. 2017). Die osteogene Differenzierung der hMSC wurde durch das autologe Humanserum im Vergleich zu FBS-supplementiertem Standardmedium nicht beeinträchtigt (Yamamoto et al. 2003), sondern in einer Studie sogar verbessert (Stute et al. 2004). Ein vergleichbar positiver Effekt konnte auch mit allogenen Humanserum nachgewiesen werden. Die hMSC zeigten mit allogenen Serum eine bessere Proliferation, einen identischen Immunphänotyp und eine geringere Apoptoserate im Vergleich zu FBS-Medium (Popov et al. 2019, Thaweesaphithak et al. 2019). Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie von einer reduzierten metabolischen Aktivität der hMSC besonders mit allogenen aber auch mit autologem Humanserum berichtet. In dieser Studie erreichte die metabolische Aktivität der hMSC mit allogenen Humanserum nur 60–70 % der MSC in FBS-Medium und lag somit in einem hemmenden oder zytotoxischen Niveau (Tonarova et al. 2021). Gleichzeitig konnte Tonarova et al. (2021) aber auch zeigen, dass Serum von Spendern mit der Blutgruppe AB eine mit FBS vergleichbare metabolische Aktivität der hMSC hervorruft und nach 48 h den Metabolismus sogar stärker anregte als das FBS-supplementierte Standardmedium. Wie man anhand der Ergebnisse des AB-Serums sieht, birgt auch das artspezifische Serum einige Probleme, denn die Qualität des autologen Serums kann je nach Patient nicht immer optimal sein, vor allem nicht bei Patienten, die sich anderen Therapien unterziehen (Cimino et al. 2017). Außerdem wurde eine negative Korrelation zwischen dem Alter

des Serum-Spenders und dem Wachstum der hMSC nachgewiesen. Hier zeigte sich, dass die Verwendung von autologem Serum älterer Patienten für die hMSC-Kultivierung nicht geeignet ist, da es die Expansion der hMSC schlechter unterstützt (Shigeno und Ashton 1995). Des Weiteren kann es auch problematisch sein eine ausreichende Menge des Humanserums zu gewinnen, da das menschliche Blutvolumen begrenzt ist. Um diesen Nachteil der geringen Verfügbarkeit zu überwinden, wurden die hMSC zuerst in FBS-supplementiertem Standardmedium kultiviert und dieses dann am Ende durch autologes Humanserum und Wachstumsfaktoren ersetzt (Spees et al. 2004), wodurch eine Reduktion der FBS-Kontamination um 99,99 % erreicht werden konnte. Jedoch eliminierte der Ersatz durch Humanserum die Kontamination mit dem xenogenen Kohlenhydrat N-Glykolyneuraminsäure (NeuGc) nicht vollständig, da die hMSC das NeuGc auf ihrer Oberfläche exprimieren und somit beim Empfängerorganismus immer noch eine Immunreaktion hervorrufen können (Heiskanen et al. 2007, Cimino et al. 2017).

In der Veterinärmedizin gibt es bisher nur vereinzelte Forschungsarbeiten, in denen autologes oder allogenes Serum als Kulturmediumsupplement verwendet wurde. In diesen zeigte sich, dass eine Kultivierung mit autologem und allogenen Serum möglich ist, die eMSC aber eine bessere Proliferation und kürzere Verdopplungszeiten mit FBS-Medium aufweisen (Pezzanite et al. 2021). Bei der Verwendung von autologem Serum konnte eine leichte Steigerung der Proliferationsrate der eMSC im Vergleich zum FBS-Medium festgestellt werden (Eydt et al. 2016). Allerdings gelang die Kultivierung mit autologem Serum in zwei Fällen gar nicht, wodurch der Nachteil des autologen Serums aufgezeigt werden kann, welcher in der variablen Zusammensetzung des Serums verschiedener Individuen liegt (Eydt et al. 2016). Mit kommerziell erhältlichem allogenen Pferdeserum zeigten die eMSC im Vergleich zu FBS-Medium eine deutlich geringere Proliferation (Eydt et al. 2016). Des Weiteren besaßen die Kulturmedien mit FBS eine deutlich höhere Zytokinkonzentration im Vergleich zu Medien mit autologem oder allogenen Serum. Auch das Bakterienwachstum wurde durch die eMSC, die mit FBS-Medium kultiviert wurden, am stärksten gehemmt. Somit sind die eMSC mit FBS-Medium funktionell deutlich aktiver als die eMSC mit Serum-supplementiertem Medium (Pezzanite et al. 2021).

Diese Ergebnisse mit autologem und allogenen Serum wurden mit equinen primären bronchialen Fibroblasten bestätigt. Auch hier war die Proliferationsrate der equinen Bronchialfibroblasten, die in kommerziell erhältlichem Pferdeserum kultiviert wurden,

deutlich geringer im Vergleich zu Zellen, die mit FBS-supplementiertem Medium kultiviert wurden (Franke et al. 2014). Im Gegensatz zu den eMSC traten bei den equinen Bronchialfibroblasten morphologische Veränderungen auf, wie eine schmalere, kompaktere Form in Verbindung mit Granula im Zytoplasma. Außerdem wuchsen die Zellen in Clustern und Ketten. Ab Passage 9 nahm die Lebensfähigkeit der Bronchialfibroblasten mit Serum-supplementiertem Medium deutlich ab (Franke et al. 2014).

Insgesamt veranschaulicht die bisherige Literatur, dass eine Kultivierung der eMSC mit Serum möglich ist, die Proliferationsfähigkeit und funktionellen Eigenschaften der eMSC aber mit FBS-Medium besser ausgeprägt sind, wodurch eine Etablierung von Serum als FBS-Alternative nicht empfehlenswert ist.

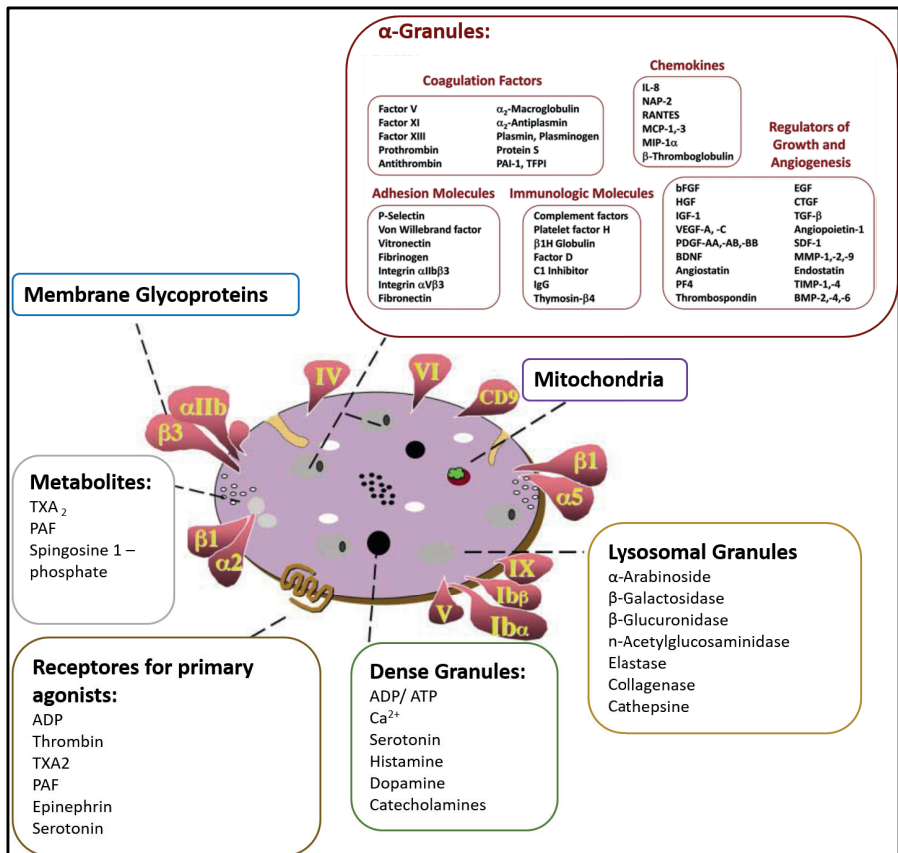
#### **2.2.1.2.3 Thrombozytenlysat (PL)**

Eine vielversprechende Alternative zum FBS sind aktuell verschiedene Blutprodukte. Neben dem Blutserum, welches aus dem Vollblut hergestellt werden kann, gibt es noch einige Thrombozyten-basierte Produkte, die sich durch ihre Herstellungsweise unterscheiden. In den letzten Jahren haben sich viele verschiedene Verfahren und Bezeichnungen am Markt etabliert, wodurch es teilweise schwer geworden ist den Überblick zu behalten, um welches Präparat es sich tatsächlich handelt. In **Tabelle 1** sind die derzeit wichtigsten Blutprodukte mit ihren Eigenschaften aufgeführt.

**Table 1: Verschiedene Blutprodukte und ihre Eigenschaften (zusammengestellt aus den Referenzen der Literaturübersicht)**

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Eigenschaften</b>
<b>PRP</b>	Platelet-rich Plasma	Thrombozytenangereichertes Blutplasma	Aus dem Vollblut separiertes Blutplasma, in dem die Thrombozyten durch Zentrifugation über deren Konzentration im Vollblut angereichert sind
<b>L-PRP (Lr-PRP)</b>	Leukocyte-rich PRP	Leukozytenreiches PRP	PRP mit Anteilen der Leukozytenfraktion als weiterer zellulärer Bestandteil
<b>P-PRP (Lp-PRP)</b>	Leukocyte-poor PRP	Leukozytenarmes PRP	PRP mit geringem Leukozytenanteil
<b>PPP</b>	Platelet-poor Plasma	Thrombozytenarmes Blutplasma	PPP entsteht, wenn die oberste Schicht des aufgetrennten Vollblutes erneut zentrifugiert wird. Dabei entsteht ein PRP mit hoher Thrombozytenkonzentration im unteren Bereich und das PPP bildet die obere Schicht
<b>PL</b>	Platelet Lysate	Thrombozytenlysat	Mit Wachstumsfaktoren, Chemokinen, und Zytokinen angereichertes Blutplasma, das durch mechanische Lyse der Thrombozyten durch Gefrier-/Auftauzyklen entsteht
<b>PR/PRGF</b>	Platelet Release/Plasma Rich in Growth Factors	Wachstumsfaktorangereichertes Blutplasma	Mit Wachstumsfaktoren, Chemokinen, und Zytokinen angereichertes Blutplasma, das durch chemische Aktivierung der Thrombozyten durch Calciumchlorid- oder Thrombinbehandlung entsteht
<b>ACS</b>	Autologous conditioned serum	Körpereigenes konditioniertes Blutserum	Zellfreies Serum ohne Gerinnungsfaktoren mit einem hohen Gehalt an körpereigenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren z.B. Interleukin-1 Rezeptor Antagonist Protein (IRAP), die durch Inkubation von venösem Vollblut in Anwesenheit einer definierten Oberfläche und Koagulation des Blutes freigesetzt wurden

Die Thrombozyten spielen nicht nur in der Blutgerinnung eine wichtige Rolle, sondern auch in der Wundheilung und Geweberegeneration. Aus diesem Grund kommen die verschiedenen Thrombozyten-basierten Produkte als Supplement für die Zellkultur oder als biologisches Therapeutikum, um natürliche Heilungsprozesse zu unterstützen, in Frage. Die Thrombozyten sind anukleäre, sichelförmige Blutzellen, die zahlreiche sekretorische Granula besitzen (**Abbildung 5**), welche für ihre Funktion entscheidend sind. Es gibt drei verschiedene Arten der sekretorischen Granula:  $\alpha$ -Granula,  $\delta$ -Granula (Dense Granula) und lysosomale Granula, wobei die  $\alpha$ -Granula den größten Anteil ausmachen. So enthält jeder Thrombozyt 50–80  $\alpha$ -Granula mit einer Größe von 200–500 nm, was ca. 10 % des Thrombozytenvolumens darstellt.



**Abbildung 5:** Struktur der Thrombozyten mit ihren intrazellulären Organellen (modifiziert nach Anitua et al. 2004, Burnouf et al. 2016)

Diese  $\alpha$ -Granula sind mit zahlreichen Chemokinen, Enzymen, Wachstums- und Adhäsionsfaktoren gefüllt. Die relevantesten Faktoren für die Zellkultur sind gemeinsam mit ihrer Funktion in **Tabelle 2** aufgeführt (Blair und Flaumenhaft 2009, Schallmoser et al. 2009, Astori et al. 2016, Burnouf et al. 2016).

Die Wachstumsfaktoren und Chemokine wie z.B. PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1, bFGF, IGF-1, VEGF-A und Epidermal growth factor (EGF) können nach ihrer Freisetzung durch Thrombozytenaktivierung andere Zellen parakrin beeinflussen und chemotaktisch wirken (Golebiewska und Poole 2015). Somit besitzen die Thrombozyten durch diese zahlreichen Faktoren aus den unterschiedlichen Granula ein sehr breites Wirkungsspektrum. Die bekannteste Funktion der Thrombozyten ist die Beteiligung an der Hämostase, wo sie zum Ablauf der gesamten Gerinnungskaskade und dem anschließenden Wundheilungsprozess beitragen, indem sie die Vaskularisierung wieder herstellen und einen bindegewebigen Wundverschluss initiieren. Außerdem können die Thrombozyten eine pro- oder anti-inflammatorische sowie antimikrobielle Wirkung ausüben (Blair und Flaumenhaft 2009, Golebiewska und Poole 2015).

**Tabelle 2:** Inhalt der  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten und ihre funktionellen Kategorien (modifiziert nach Anitua et al. 2004, Burnouf et al. 2016, Zamani et al. 2019)

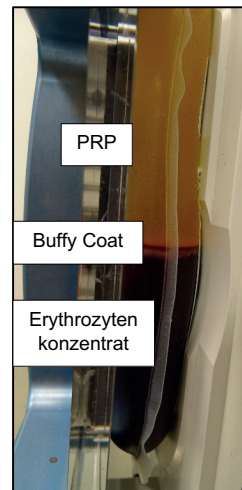
Kategorie	Bezeichnung	Funktion
<b>Mitogene Faktoren: Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine</b>	Basic fibroblast growth factor (bFGF)	Multifunktional, Wundheilung, Angiogenese, Knochenheilung, Proliferation, Differenzierung, Migration, Heilung der Cornea, Haarwachstum, Embryonalentwicklung, vermittelt Stoffwechselfunktionen
	Vascular endothelial growth factor-A, -C (VEGF-A, C)	Vaskularisierung, Angiogenese, Mitose vaskulärer Endothelzellen, Induktion der Metalloproteinase-Synthese, Differenzierung, Chemotaxis, Knochenheilung, Neurogenese, Neuroprotektiv
	Platelet-derived growth factor-AA, -AB, -BB (PDGF-AA, -AB, -BB)	Mitogen, Chemotaxis, Wundheilung, Stimulation der Zellproliferation, Migration, Angiogenese, Entwicklung

		von Neuronen, Knochenheilung, Reepithelisierung
	Epidermal growth factor (EGF)	Wundheilung, Mitose und Migration von Keratinozyten, Angiogenese, Reepithelisierung, Heilung der Cornea
	Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	Proliferation, Differenzierung, Migration, Regeneration des Bindegewebes, Reepithelisierung, Förderung der Angiogenese, Wundheilung, extrazelluläre und Knochenmatrix-Synthese durch Induktion der Osteoblasten
	Hepatocyte growth factor (HGF), Angiopoietin-1 (Ang1), Metalloproteinasen (MMPs), Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)	Regulation der Angiogenese, Chemotaxis, Proliferation, Differenzierung
<b>Adhäsionsmoleküle</b>	P-Selectin, von-Willebrand-Faktor (vWF), Vitronektin, Fibrinogen, Fibronektin, Integrine	Zellkontakt, Gerinnung, Zusammensetzung der extrazellulären Matrix
<b>Gerinnungs- und fibrinolytische Faktoren</b>	Faktor V, XI, XIII, Prothrombin, Antithrombin, $\alpha_2$ -Macroglobulin, $\alpha_2$ -Antiplasmin, Plasmin, Plasminogen, Protein S, Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1), Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)	Regulation der Thrombinproduktion, Angiogenese, Plasminproduktion und Gefäßmodellierung
<b>Immunologische Moleküle</b>	Komplementfaktoren, Platelet factor H, $\beta$ 1H Globulin, Faktor D, C1 Inhibitor, IgG, Thymosin- $\beta$ 4	Immunreaktion

Um diese Thrombozyten-basierten Faktoren für die weitere Nutzung zu konzentrieren, muss ein TK hergestellt werden. Dieses kann auf drei unterschiedlichen Wegen gewonnen werden. Entweder es erfolgt eine direkte Entnahme reiner Thrombozyten durch eine Thrombozytapherese mittels einer speziell dafür vorgesehenen Maschine oder es werden über die Buffy-Coat- oder die PRP-Methode aus Vollblutspenden GMP-konforme TKs produziert.

Ein PRP wird hergestellt, indem antikoaguliertes Blut zuerst sanft zentrifugiert wird (Soft Spin). Dabei teilen sich die Blutbestandteile nach deren Größe und Gewicht auf und in der obersten Schicht sammelt sich das Plasma mit den darin enthaltenen Thrombozyten, Proteinen und anderen Zellbestandteilen. Die Erythrozyten setzen sich unten ab und in der Zwischenschicht bildet sich der sogenannte Buffy Coat, der hauptsächlich aus Thrombozyten und Leukozyten besteht (**Abbildung 6**).

Gewinnt man das mit Thrombozyten angereicherte Plasma ohne Anteile des Buffy Coats, erhält man ein P-PRP; mit Anteilen des Buffy Coats erhält man ein L-PRP. Durch eine zweite stärkere Zentrifugation (Hard Spin) der separierten obersten Schicht kann eine weitere Konzentration der Thrombozyten im PRP erreicht werden oder die Gewinnung von PPP erfolgen. Bei der Buffy-Coat-Methode werden die Thrombozyten direkt aus dem Buffy Coat gewonnen, indem antikoaguliertes Blut zuerst stark zentrifugiert wird (Hard Spin) und dann durch eine zweite sanfte Zentrifugation (Soft Spin) die Thrombozyten aus dem abgetrennten Buffy Coat von den Leukozyten separiert werden.



**Abbildung 6:**  
*PRP-Herstellung:  
Aufgetrenntes Vollblut  
nach Zentrifugation*

Um die verschiedenen Faktoren aus den Thrombozyten freizusetzen, müssen diese aktiviert werden. Hierbei gibt es zwei unterschiedliche Arten der Aktivierung. Erstens die mechanische Aktivierung durch Gefrier-/Auftauzyklen oder Ultraschallbehandlung oder zweitens die chemische Aktivierung durch Calciumchlorid-, Thrombin- oder Solvent/Detergent-Behandlung (Burnouf et al. 2016, Strunk et al. 2018, Schallmoser et al. 2020). Bei einer chemischen Aktivierung setzen die Thrombozyten ihre Faktoren durch Exozytose in das umgebende Medium frei und ein PR/PRGF entsteht.

Im Gegensatz dazu beinhaltet eine mechanische Aktivierung eine Lyse der Thrombozyten, wobei die Zellen vollständig zerstört und die bioaktiven Substanzen aus den Granula freigesetzt werden. Die dabei entstehenden Zellfragmente müssen im Anschluss an die Lyse durch Zentrifugations- und Filtrationsschritte entfernt werden (Burnouf et al. 2016, Strunk et al. 2018). Bei dieser Lyse der Thrombozyten entsteht das PL, welches sich mittlerweile als vielversprechende Alternative zum FBS als Zellkultursupplement besonders in der Humanmedizin, aber teilweise auch schon in der Veterinärmedizin, erwiesen hat. Das PL ist ein zellfreies, protein- und wachstumsfaktorreiches Produkt, dessen Herstellung im Vergleich zum FBS ethisch unbedenklicher ist. Es beinhaltet keine xenogenen Komponenten, wodurch das Risiko einer immunologischen Reaktion oder Infektionsübertragung reduziert werden kann (Bieback 2013, Burnouf et al. 2016, Schallmoser et al. 2020). Allerdings liegt zum jetzigen Zeitpunkt keine Standardisierung des Herstellungsprotokolls und der Art der Thrombozytengewinnung für die Herstellung des PLs als Zellkultursupplement vor (Henschler et al. 2019). Durch die Tatsache, dass das PL einen direkten Kontakt zu den kultivierten Zellen hat, stellt es eine kritische Komponente in der Zellkultur dar, die die Sicherheit, Qualität und Potenz des finalen Zellproduktes beeinflussen kann. Aus diesem Grund besteht ein dringender Bedarf an der Durchführung kontrollierter und standardisierter Studien. Denn nur auf diesem Wege kann eine Entwicklung GMP-konformer Herstellungsprotokolle erreicht und damit auch eine genauere Definition des Produktes PL, sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin, gewährleistet werden (Strunk et al. 2018, Bieback et al. 2019, Henschler et al. 2019). In den nächsten Abschnitten soll somit der derzeitige Stand zu den Eigenschaften, der Verwendung und Herstellung des hPL und ePL erläutert werden.

#### **2.2.1.2.3.1 Humanes Thrombozytenlysat (hPL)**

In der Humanmedizin werden zu Transfusionszwecken kontinuierlich Vollblutspenden oder reine Thrombozyten über Thrombozytapheresen gewonnen. Für eine Zulassung dieser Blutprodukte zur Transfusion bei erkrankten Patienten muss eine Freiheit von Infektionskrankheiten gewährleistet sein, weshalb alle erforderlichen Tests an diesen Produkten durchgeführt werden (Strunk et al. 2018). Aus dem Vollblut können entweder durch die PRP- oder die Buffy-Coat-Methode TKs hergestellt werden. Die

Haltbarkeit dieser TKs beschränkt sich bei einer Lagerung unter permanenter Agitation bei  $22 \pm 2$  °C auf maximal 5–7 Tage, um das Risiko eines bakteriellen Wachstums zu vermeiden (Corash 2011, Burnouf et al. 2016). Selbst in einer gut organisierten Blutbank müssen 10–20 % der TKs entsorgt werden, da sie nicht innerhalb des definierten Zeitraums zu Transfusionszwecken verwendet wurden (Jonsdottir-Buch et al. 2013, Schallmoser et al. 2020). Andererseits können diese TKs am Ende ihres Haltbarkeitszeitraums bei  $-80$  °C eingefroren werden und dann als Ausgangsmaterial für die hPL-Produktion dienen. Die Sicherheit dieser nachhaltigen Verwendung der abgelaufenen TKs wurde bereits in mehreren Studien bestätigt, in denen sich keine Unterschiede zwischen frischen und gelagerten TKs als Quelle für hPL zeigten (Bieback 2013, Astori et al. 2016, Burnouf et al. 2016). Ebenso geht auch die International Society of Blood Transfusion (ISBT) von einem begrenzten Risiko eines Bakterienwachstums und somit einer sicheren Verwendung älterer eingefrorener TKs aus (Strunk et al. 2018, Schallmoser et al. 2020).

Aus diesem Grund steht in der Humanmedizin immer eine gewisse Menge an frischen oder abgelaufenen/gefrorenen TKs für die hPL-Produktion zur Verfügung.

Die derzeit in Europa am häufigsten verwendete Methode zur Produktion von hPL in der Humanmedizin ist die Buffy-Coat-Methode zur Herstellung der TKs und eine anschließende Lyse der Thrombozyten durch wiederholte Gefrier-/Auftauzyklen (Gulliksson 2012, Burnouf et al. 2016). Hierbei steht eine systematische Analyse der optimalen Anzahl und Temperatureinstellungen der Gefrier-/Auftauzyklen bisher noch aus. Die ISBT empfiehlt eine Anzahl von 3–5 Gefrier-/Auftauzyklen und Temperaturen von  $-70$  °C und  $+37$  °C, um eine maximale Freisetzung von Wachstumsfaktoren zu erreichen (Strunk et al. 2018, Schallmoser et al. 2020).

Des Weiteren ist die Zusammensetzung der TKs stark spenderabhängig und Faktoren wie das Geschlecht, das Alter, die Blutgruppe und die Thrombozytenanzahl haben einen Einfluss auf die Zellkultur (Horn et al. 2010, Lohmann et al. 2012). Diese spenderbedingten Schwankungen lassen sich nicht vollständig vermeiden, allerdings kann eine Chargenvariabilität des hPL durch das Poolen einer großen Anzahl von Spendern verringert werden (Schallmoser und Strunk 2013, Burnouf et al. 2016, Bieback et al. 2019). Dieses Pooling erhöht jedoch das Risiko einer Kontamination mit hämatogen übertragbaren Krankheitserregern. Aus diesem Grund sollte die Anzahl der gepoolten Blutprodukte begrenzt werden, wie es das Europäische Arzneibuch

(Kapitel 5.2.12) (The European Pharmacopoeia 2019) empfiehlt, es sei denn, das hPL und/oder die TKs werden einer Pathogeninaktivierung oder -reduktion unterzogen. Im Prozess jeder PL-Herstellung sollte routinemäßig ein Sterilitätsnachweis, der die Freiheit von Viren, Bakterien, Mykoplasmen, Pilzen und Endotoxinen bestätigt, durchgeführt werden (Viau et al. 2017, Bieback et al. 2019, Henschler et al. 2019, Schallmoser et al. 2020).

Die bereits beschriebene Vielfalt an Thrombozyten-basierten Faktoren sowie ihr breites Wirkungsspektrum führte zu einem immer größer werdenden Interesse an Thrombozyten-basierten Produkten, wie PRP und hPL, in der Humanmedizin. Der wissenschaftliche Hintergrund einer Thrombozyten-basierten Therapie liegt darin, dass eine Injektion von PRP oder PL in einen Bereich geschädigten Gewebes dazu führt, dass die biologisch aktiven Faktoren der Thrombozyten (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine) die Gewebereparatur einleiten, indem sie die Hämostase, Synthese von Bindegewebe und Revaskularisierung initiieren (Everts et al. 2020).

Das PRP wurde bereits erfolgsversprechend in einigen medizinischen Bereichen wie der Dermatologie (Gupta et al. 2019), der Herzchirurgie (Kirmani et al. 2017), der plastischen Chirurgie (Willemsen et al. 2018, Hasiba-Pappas et al. 2022), der orthopädischen Chirurgie (Mucedzi und Roberts 2017), bei Schmerztherapien (Cengiz et al. 2019), bei Wirbelsäulen-/Rückenerkrankungen (Tuakli-Wosornu et al. 2015, Xuan et al. 2020), bei Osteoarthrosen (Lana et al. 2019, Belk et al. 2020) und bei muskuloskelettalen Erkrankungen in der Sportmedizin (Filardo et al. 2018, Mariani und Pulsatelli 2020) eingesetzt.

Aber nicht nur als Orthobiologikum wurde das PRP vielseitig angewandt, sondern auch als Zellkultursupplement in der hMSC-Kultivierung. Hierbei zeigte sich mit PRP eine deutlich verbesserte Proliferation und Migration (Goedecke et al. 2011, Rubio-Azpeitia und Andia 2014, Anitua et al. 2022) und das PRP verzögerte die Seneszenz der hMSC und sorgte für eine bessere chromosomale Stabilität als FBS (Rubio-Azpeitia und Andia 2014). Außerdem konnte demonstriert werden, dass das PRP die Wundheilungsfähigkeit der hMSC steigert, indem es das pro-angiogene Potenzial sowie die Proliferation, Migration und Überlebensfähigkeit der hMSC verbessert und gleichzeitig die Differenzierungsfähigkeit der hMSC nicht beeinträchtigt (Mahmoudian-Sani et al. 2018, Hersant et al. 2019). Eine kombinierte Verabreichung von PRP und hMSC

scheint die Wundheilung effizienter zu fördern als die Verabreichung von PRP oder hMSC allein.

Das PL stellt eine praktikable Alternative zum PRP dar und ist gleichzeitig ein hochwertiger und vielversprechender xenofreier Ersatz des FBS in der Zellkultur. Vergleichbar mit dem PRP sind auch beim PL als körpereigenes Produkt bisher keine Nebenwirkungen bekannt. Allerdings weist das PL gegenüber dem PRP einige Vorteile auf. So liegen beim PL die biologisch aktiven Faktoren der Thrombozyten bereits freigesetzt im Produkt vor und eine weitere Aktivierung der Thrombozyten entfällt. Im Gegensatz zum PRP ist das PL ein zellfreies Produkt, bei dem alle Zellmembranen und Zellreste nach der Lyse durch Filtration entfernt wurden. Aufgrund dieser Eigenschaften ist eine tiefgekühlte Lagerung des PL für längere Zeit ohne Probleme möglich, wohingegen das PRP sehr temperatursensitiv ist und nicht bei Temperaturen  $< 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden kann (Zamani et al. 2019).

Auch hPL wird in der Humanmedizin in verschiedenen Bereichen zunehmend als orthobiologisches Therapeutikum verwendet. So wurde berichtet, dass eine intraartikuläre Injektion von hMSC, autologem hPL und Dexamethason bei einem humanen Patienten mit Osteoarthritis des Knies zu einer signifikanten Verringerung des Knorpeldefekts führte (Centeno et al. 2008). Ebenfalls konnte in einer Studie mit 56 Patienten gezeigt werden, dass das hPL nach dreimaliger Injektion die Regeneration von geschädigtem Gewebe bei lateraler Epicondylitis des Ellenbogengelenks förderte und eine normale Funktion des Gelenks wiederhergestellt werden konnte (Tan et al. 2016). Außerdem wurde hPL erfolgreich in der Behandlung humaner Alopezie eingesetzt und induzierte ein verbessertes follikuläres Wachstum und eine höhere Haardichte (Cole et al. 2017). Ein weiterer umfangreicher Bereich, in dem hPL verwendet wird, ist die Therapie okulärer Erkrankungen; hier verbessert das hPL die Symptome und Reepithelisierung cornealer Defekte (Geremicca et al. 2010, Abu-Ameerh et al. 2019). Des Weiteren scheint hPL auch in der Behandlung von Infertilität und GvHD positive Effekte zu haben (Zamani et al. 2019).

Obwohl eine standardisierte Herstellung des hPL noch aussteht, konnten mittlerweile schon einige Studien nachweisen, dass hPL für die Kultivierung der hMSC besser geeignet ist als FBS (Doucet et al. 2005, Blande et al. 2009, Mojica-Henshaw et al. 2013, Mohammadi et al. 2016, Becherucci et al. 2018, Schallmoser et al. 2020) und dass die hMSC bei einer Kultivierung mit hPL die Definitionskriterien der ISCT

(Dominici et al. 2006, Mojica-Henshaw et al. 2013, Becherucci et al. 2018) erfüllen. So zeigten die hMSC bei einer Kultivierung mit hPL eine bessere Expansion, eine kürzere Zellverdopplungszeit, eine Aufrechterhaltung des zellspezifischen Immunphänotyps sowie der Differenzierungsfähigkeit (Ben Azouna et al. 2012, Becherucci et al. 2018, Barro et al. 2020, Guiotto et al. 2020, Schallmoser et al. 2020, Kirsch et al. 2021, Palombella et al. 2022). Außerdem verzögerte das hPL die Seneszenz der hMSC in gleicher Weise wie auch das PRP (Griffiths et al. 2013). Ebenso regulierte das hPL die pro-apoptotischen Faktoren tBid und Bim herunter (Refolo et al. 2014), während es gleichzeitig die anti-apoptotischen Faktoren Bcl-xL und Survivin hochregulierte (Refolo et al. 2014). Folglich scheint das hPL eine schützende Wirkung auf Zellen vor Apoptose zu haben (Carr et al. 2014, Refolo et al. 2014).

Aber nicht nur bei der Kultivierung der hMSC, sondern auch bei der Expansion anderer humaner Zellen, die an der Wundheilung beteiligt sind, wie Endothelzellen, Monozyten, Fibroblasten und Keratinozyten, konnte hPL positive Effekte bewirken (Barsotti, et al. 2013).

Die Ergebnisse dieser Studien verdeutlichen, dass das hPL eine Vielzahl positiver Effekte auf die Isolierung und Kultivierung von hMSC und auch anderen humanen Zellen hat und somit auch für die spätere klinische Anwendung dieser Zellen von Vorteil sein kann. Aus diesem Grund kann das hPL als eine vielversprechende und effiziente xenofreie Alternative zum FBS angesehen werden und das FBS wurde bereits in 77 % der Protokolle guter Herstellungspraxis durch hPL ersetzt (Trento et al. 2018).

#### **2.2.1.2.3.2 Equines Thrombozytenlysat (ePL)**

Im Gegensatz zur Humanmedizin werden in der Pferdemedizin keine routinemäßigen Vollblutspenden zu Transfusionszwecken in speziell dafür vorgesehenen Blutbanken durchgeführt. Aus diesem Grund gibt es nicht die Möglichkeit bei der ePL-Herstellung auf bereits gewonnene oder abgelaufene TKs zurückzugreifen, sondern es ist erforderlich neue Vollblutspenden durchzuführen. Vergleichbar zur Humanmedizin können die TKs für die ePL-Herstellung auch auf drei unterschiedlichen Wegen gewonnen werden: entweder aus antikoaguliertem Vollblut durch die PRP- oder Buffy-

Coat-Methode oder direkt durch Thrombozytapherese. In der Literatur wurden bisher nur die PRP-Methode (Del Bue et al. 2007, Seo et al. 2013, Russell und Koch 2016, Gilbertie et al. 2018, Yaneselli et al. 2019) und die Thrombozytapherese (Naskou et al. 2018) veröffentlicht, wobei erstere in der Mehrzahl der equinen Studien genutzt wurde. Im Gegensatz zur Humanmedizin wurde das Blut für die Herstellung der equinen TKs in Spritzen abgenommen und dann mittels PRP-Methode aufbereitet (Seo et al. 2013, Russell und Koch 2016, Gilbertie et al. 2018, Yaneselli et al. 2019) und nicht mit Blutbeuteln und größeren Ausgangsmengen gearbeitet. Auch in der Pferdemedizin unterscheiden sich die Herstellungsprotokolle der verschiedenen Studien, wie in Publikation 1 Tabelle 3 dieser Arbeit aufgelistet. Damit eine Vergleichbarkeit der Studien uneingeschränkt möglich ist, sollte ein standardisiertes Protokoll, um ePL in größeren Mengen herzustellen, entwickelt werden.

Die Anwendung Thrombozyten-basierter Produkte hat in den letzten Jahren auch in der Pferdemedizin enorm an Bedeutung gewonnen. So wurde das PRP im Bereich der Sportpferdemedizin zur Behandlung von Band- und Sehnenverletzungen eingesetzt (Argüelles et al. 2008, Waselau et al. 2008, Bosch et al. 2010, Zuffova et al. 2013, Geburek et al. 2016, Montano et al. 2021). Nach ersten Erfolgen in der Therapie von Tendinopathien wurden auch erfolgreiche Behandlungen mit PRP in anderen Bereichen, wie bei degenerativen Gelenkerkrankungen/Osteoarthritis (Broeckx et al. 2014, Garbin und Olver 2020), bei gynäkologischen Problemen (Metcalf 2014, Dawod et al. 2021) sowie in der Wundheilung (Carter et al. 2003, Pereira et al. 2019) durchgeführt. Allerdings gibt es auch kontroverse Studien zur Anwendung von PRP bei Pferden. So zeigte eine Studie an Pferden mit Osteochondrosis, dass die PGE<sub>2</sub>-Konzentration in der Synovialflüssigkeit 48 h nach der Gelenksinjektion mit PRP deutlich erhöht war (Machado et al. 2019), wodurch das PRP eine eher pro-inflammatorische Wirkung hatte. In einer anderen Studie bewirkte das PRP eine vermehrte Bildung von Granulationsgewebe in der Wundheilung und keine Verbesserung der Heilungsqualität (Monteiro et al. 2009). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Skepsis gegenüber der klinischen Wirksamkeit von PRP verstärkt. Allerdings beruhen die unterschiedlichen Ergebnisse, die sowohl experimentell als auch in klinischen Behandlungen erzielt wurden, wahrscheinlich eher auf den Zell- und Zytokinprofilen sowie auf den verschiedenen Anwendungsmethoden (Garbin et al. 2021). Das biologische Profil und die Konzentration an Thrombozyten und Leukozyten sowie der Gehalt an Wachstumsfaktoren und Zytokinen hängt von der Art der

Herstellung ab, die sich in den verschiedenen Studien stark unterscheidet. Darüber hinaus verstärkt die genetische und physiologische Variabilität der Pferdepatienten die Uneinheitlichkeit der PRP-Wirksamkeit (Garbin et al. 2021). Neben der klinischen Anwendung des PRP wurde dieses auch bereits als Zellkultursupplement angewandt und untersucht. Dabei beeinflusste das PRP die zellspezifischen Charakteristika positiv und induzierte die Differenzierung der eMSC (Castro et al. 2014).

Interessanterweise gibt es im Gegensatz zum PRP nur sehr wenige In-vivo-Studien, in welchen das ePL als Orthobiologikum Anwendung fand. Es wurde berichtet, dass eine intraartikuläre Injektion von ePL bei Pferden mit Osteoarthritis zu einer temporären Verbesserung der Lahmheit geführt hat (Tyrnenopoulou et al. 2016, Perrone et al. 2020), da die Aktivität von MMP-9 und MMP-2 reduziert und die Konzentration an Glykosaminoglykanen und TIMP-1 durch das ePL erhöht wurden (Perrone et al. 2020). Des Weiteren unterstützt das ePL die Regeneration von Skelettmuskelerkrankungen (Fukuda et al. 2022) und scheint bei einer intrauterinen Behandlung von Stuten, die als anfällig für persistierende belegungsinduzierte Endometritiden eingestuft wurden, die Entzündungsreaktion nach dem Deckakt zu reduzieren (Colombo et al. 2022).

Um den Entwicklungen in der Humanmedizin zu folgen, wurden bereits einige Studien mit ePL als Zellkultursupplement für die eMSC-Kultivierung durchgeführt (Del Bue et al. 2007, Seo et al. 2013, Russell und Koch 2016, Gilbertie et al. 2018, Naskou et al. 2018, Yaneselli et al. 2019, Even et al. 2022). Die eMSC zeigten mit ePL eine ähnliche Proliferationsrate, Morphologie und Differenzierung wie mit FBS-Medium (Seo et al. 2013, Naskou et al. 2018). Des Weiteren konnte dokumentiert werden, dass durch das ePL keine Veränderung des Immunophänotyps oder der immunmodulatorischen Eigenschaften der eMSC erfolgt (Naskou et al. 2018, Yaneselli et al. 2019). Dennoch inhibierten die eMSC die T-Zell-Proliferation stärker nach einer Kultivierung mit equinem Serum als mit autologem oder gepooltem ePL, wobei die Inhibition mit FBS-supplementiertem Medium am geringsten war (Even et al. 2022). Bisher konnte nur einmal eine deutlich gesteigerte Proliferation der eMSC mit ePL-Medium im Vergleich zu FBS-Medium festgestellt werden, allerdings wurde in dieser Studie eine 20 %-ige Supplementierung mit ePL verwendet (Yaneselli et al. 2019). In zwei equinen Studien wurde über ein dosisabhängiges Wachstum der eMSC in ePL-Medium berichtet (Del Bue et al. 2007, Russell und Koch 2016), wobei bis zu einer Konzentration von 30 % kein signifikanter Unterschied zwischen dem gepoolten ePL- und FBS-Medium

bestand. Ab einer Konzentration von mehr als 30 % ePL im Medium zeichneten sich signifikante Unterschiede zwischen den Medien ab, wobei die proliferative Reaktion der eMSC auf ePL abnahm und die auf FBS weiter anstieg (Russell und Koch 2016).

Auf Grundlage der bisherigen humanen und equinen Studien stellt das PL eine vielversprechende Alternative zum FBS als Zellkultursupplement dar. Allerdings waren die Herstellungsprotokolle in den bisherigen Studien sehr variabel, wodurch die Vergleichbarkeit der Studien eingeschränkt ist und eine Skalierbarkeit und Standardisierung fehlt. Daher ist die Entwicklung eines skalierbaren und standardisierten ePL sowie der Vergleich des hergestellten ePL mit FBS als Zellkultursupplement in der Kultivierung von eMSC mit Hinblick auf eine mögliche Verwendung in der klinischen Applikation Gegenstand dieser Arbeit.

### **3 Zielstellung und Hypothesen dieser Arbeit**

#### **3.1 Zielstellung**

1. Das Ziel der ersten Studie war es ein standardisiertes Protokoll zur ePL-Herstellung zu etablieren und das dadurch gewonnene ePL als Zellkultursupplement bei der In-vitro-Kultivierung von eMSC im Vergleich zu FBS, besonders im Hinblick auf die Beeinflussung der zellspezifischen Charakteristika der eMSC, zu untersuchen.
2. Das Ziel der zweiten Studie war es, den Einfluss des ePL auf die funktionellen Eigenschaften der eMSC, wie Zellfitness oder pro-angiogenes Potenzial, im Vergleich zu FBS zu analysieren.

#### **3.2 Hypothesen**

- 1a. Die Buffy-Coat-Methode ist nützlich, um equine TKs mit erhöhter Thrombozyten- und erniedrigter Leukozytenzahl herzustellen.
- 1b. Die eMSC weisen nach einer Kultivierung mit den verschiedenen Zellkultursupplementen ePL und FBS ähnliche zellspezifische Charakteristika auf.
- 2a. Das ePL-Medium unterstützt die Zellfitness und die genetische Stabilität der eMSC.
- 2b. Die eMSC besitzen nach einer Kultivierung mit ePL- und FBS-Medium ähnliche funktionelle Eigenschaften.

## 4 Publikationen

### 4.1 Publikation 1 (Thrombozytenlysatherstellung und vergleichende Charakterisierung der eMSC)

#### **Scalable Production of Equine Platelet Lysate for Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Culture**

Alina Hagen<sup>1</sup>, Hendrik Lehmann<sup>2</sup>, Sophie Aurich<sup>3</sup>, Natalie Bauer<sup>4</sup>, Michaela Melzer<sup>1</sup>, Julia Moellerberndt<sup>1</sup>, Valeria Patané<sup>4</sup>, Christiane L. Schnabel<sup>5</sup> und Janina Burk<sup>1\*</sup>

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 2021; 8: 613621

DOI: 10.3389/fbioe.2020.613621

*<sup>1</sup> Equine Clinic (Surgery, Orthopedics), Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany*

*<sup>2</sup> Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany*

*<sup>3</sup> Institute of Hygiene and Infectious Diseases of Animals, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany*

*<sup>4</sup> Department of Veterinary Clinical Sciences, Clinical Pathology and Clinical Pathophysiology, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany*

*<sup>5</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Immunology, Leipzig University, Leipzig, Germany*



# Scalable Production of Equine Platelet Lysate for Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Culture

A. Hagen<sup>1</sup>, H. Lehmann<sup>2</sup>, S. Aurich<sup>3</sup>, N. Bauer<sup>4</sup>, M. Melzer<sup>1</sup>, J. Moellerberndt<sup>1</sup>, V. Patané<sup>4</sup>, C. L. Schnabel<sup>5</sup> and J. Burk<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Equine Clinic (Surgery, Orthopedics), Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany, <sup>2</sup> Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany, <sup>3</sup> Institute of Hygiene and Infectious Diseases of Animals, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany, <sup>4</sup> Department of Veterinary Clinical Sciences, Clinical Pathology and Clinical Pathophysiology, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany, <sup>5</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Immunology, Leipzig University, Leipzig, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Dominik Egger,  
University of Natural Resources and  
Life Sciences Vienna, Austria

### Reviewed by:

Thierry Burnouf,  
Taipei Medical University, Taiwan  
Ólafur Eysteinn Sigurjonsson,  
Reykjavik University, Iceland

### \*Correspondence:

J. Burk  
janina.burk@vetmed.uni-giessen.de

### Specialty section:

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

**Received:** 02 October 2020

**Accepted:** 16 December 2020

**Published:** 21 January 2021

### Citation:

Hagen A, Lehmann H, Aurich S,  
Bauer N, Melzer M, Moellerberndt J,  
Patané V, Schnabel CL and Burk J  
(2021) Scalable Production of Equine  
Platelet Lysate for Multipotent  
Mesenchymal Stromal Cell Culture.  
Front. Bioeng. Biotechnol. 8:613621.  
doi: 10.3389/fbioe.2020.613621

Translation of multipotent mesenchymal stromal cell (MSC)-based therapies is advancing in human and veterinary medicine. One critical issue is the *in vitro* culture of MSC before clinical use. Using fetal bovine serum (FBS) as supplement to the basal medium is still the gold standard for cultivation of many cell types including equine MSC. Alternatives are being explored, with substantial success using platelet lysate-supplemented media for human MSC. However, progress lags behind in the veterinary field. The aim of this study was to establish a scalable protocol for equine platelet lysate (ePL) production and to test the ePL in equine MSC culture. Whole blood was harvested into blood collection bags from 20 healthy horses. After checking sample materials for pathogen contamination, samples from 19 animals were included. Platelet concentrates were prepared using a buffy coat method. Platelets, platelet-derived growth factor BB, and transforming growth factor  $\beta 1$  concentrations were increased in the concentrates compared with whole blood or serum ( $p < 0.05$ ), while white blood cells were reduced ( $p < 0.05$ ). The concentrates were lysed using freeze/thaw cycles, which eliminated the cells while growth factor concentrations were maintained. Donor age negatively correlated with platelet and growth factor concentrations after processing ( $p < 0.05$ ). Finally, all lysates were pooled and the ePL was evaluated as culture medium supplement in comparison with FBS, using adipose-derived MSC from four unrelated donor horses. MSC proliferated well in 10% FBS as well as in 10% ePL. However, using 5 or 2.5% ePL entailed highly inconsistent proliferation or loss of proliferation, with significant differences in generation times and confluencies ( $p < 0.05$ ). MSC expressed the surface antigens CD90, CD44, and CD29, but CD73 and CD105 detection was low in all culture media. Adipogenic and osteogenic differentiation led to similar results in MSC from different culture media. The buffy coat method is useful to produce equine platelet concentrate with increased platelet and reduced white blood cell content in large scales. The ePL obtained supports MSC expansion similar as FBS when used at the same concentration (10%). Further investigations into equine MSC functionality in culture with ePL should follow.

**Keywords:** mesenchymal stromal cells, platelet concentrate, platelet lysate, fetal bovine serum, equine, cell culture

## INTRODUCTION

Cell-based therapies are promising tools for regenerative treatment of human and animal diseases. While some approaches have already been successfully implemented in clinical practice, most are still in developmental stages. In horses, particularly treatment of orthopedic conditions with multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) has a well-documented history (Smith, 2003; Pacini et al., 2007; Godwin et al., 2012; Renzi et al., 2013; Schauer et al., 2013; Ferris et al., 2014; Mariñas-Pardo et al., 2018; Broeckx et al., 2019). One current challenge in the development of successful cell-based products, irrespective of the target species, is the implementation of manufacturing processes that comply with legal regulations and maintain cellular potency. As most research focuses on cell therapies for human patients, it remains particularly challenging to adopt suitable procedures for cells derived from large animal species. However, this is crucial with respect to the treatment of companion animals as well as for the use of large animal species in translational studies. Both, clinical application and translational aspects apply to the equine species.

The cell culture medium is a critical element in cell manufacturing processes and may strongly impact on cell quality and efficacy of therapies. To supply the cells with hormones, nutrients, and growth factors, the supplementation of basal medium with fetal bovine serum (FBS) is still the gold standard for *in vitro* culture of many cell types, including equine MSC (Doucet et al., 2005; van der Valk et al., 2010; Bieback, 2013; Burnouf et al., 2016). However, the use of FBS is afflicted with several problems, including an expected shortage of supply (Jayme et al., 1988; Jochems et al., 2002), the ethically critical harvesting procedures (Hodgson, 1995; Jochems et al., 2002; van der Valk et al., 2004), inconsistent quality (Gstraunthaler, 2003; Zheng et al., 2006; Baker, 2016), and its xenogeneic use with the possibility of recipient immune reactions (Sundin et al., 2007; Bieback, 2013) and transmission of bovine pathogens (Erickson et al., 1991; World Health Organization, 2006; Hawkes, 2015). For these reasons, efforts should be made to reduce or replace the use of FBS. In this line, both the European Medicines Agency (EMA) (European Medicines Agency, London, 2013) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) (Karnieli et al., 2017) have recommended the control of quality and safety of FBS and if possible, its replacement. Several alternatives to using FBS have been explored, with most encouraging results using chemically defined/serum-free or platelet lysate (PL)-supplemented media.

For human MSC, commercially available serum-free culture media were developed. However, when investigating the applicability of such serum-free media in equine adipose-derived MSC, we observed differences in morphology and expression of the surface marker CD90, as well as increased aggregation and spontaneous detachment of these MSC (Schubert et al., 2018). These results underlined that culture condition requirements are species-specific with regard to nutrient and growth factor supplementation. Consequently, the use of commercially available serum-free media for large animal MSC is not a consummate approach.

Production and use of human PL (hPL) for MSC cultivation was first reported in 2005 (Doucet et al., 2005). Platelets (PLT) exhibit an important role not only in primary hemostasis but also in wound healing and tissue regeneration. Their  $\alpha$ -granules are rich in chemokines and growth factors, such as platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor (IGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), adhesion factors, and enzymes (Blair and Flaumenhaft, 2009; Schallmoser et al., 2009; Astori et al., 2016; Burnouf et al., 2016). When released upon PLT activation, these factors support cell proliferation and recruitment (Golebiewska and Poole, 2015). Therefore, PL was considered as a suitable acellular culture media supplement. By now, several studies have shown that hPL is better suited for human MSC expansion than FBS (Blande et al., 2009; Mojica-Henshaw et al., 2013; Mohammadi et al., 2016; Becherucci et al., 2018; Schallmoser et al., 2020), and that the MSC cultured with hPL fulfill the definition criteria recommended by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) in 2006 (Dominici et al., 2006; Mojica-Henshaw et al., 2013; Becherucci et al., 2018). Interestingly, it was reported that hPL already replaces FBS in 77% of the good manufacturing practice protocols for MSC production in human medicine (Trento et al., 2018), demonstrating significant progress.

In order to follow this development, first studies have already been carried out with equine PL (ePL) for equine MSC cultivation (Del Bue et al., 2007; Seo et al., 2013; Russell and Koch, 2016; Gilbertie et al., 2018; Naskou et al., 2018; Yaneselli et al., 2019). The equine MSC cultured with ePL showed similar proliferation rates, a fibroblast-like morphology, trilineage differentiation, and improved viability compared with FBS-supplemented cultures (Seo et al., 2013; Naskou et al., 2018) and maintained their immunomodulatory properties (Naskou et al., 2018; Yaneselli et al., 2019). Thus, based on the current state of knowledge, ePL is a promising alternative to FBS for the cultivation of equine MSC. However, in contrast to human blood products, availability of ePL is very limited, entailing the necessity of in-house production. So far, published ePL production procedures mainly include platelet-rich-plasma-based methods in small-scale syringe format (Del Bue et al., 2007; Seo et al., 2013; Russell and Koch, 2016; Gilbertie et al., 2018; Yaneselli et al., 2019) and a plateletpheresis-based method (Naskou et al., 2018), which is scalable but requires specialized equipment. Hence, the procedures used by different laboratories comprise highly distinct approaches, limiting the comparability between studies.

The aim of this study was to provide an ePL production protocol which does not rely on specialized equipment, could easily be adopted by other laboratories, and is scalable to production of large batches. For this purpose, we evaluated a procedure based on the most commonly used techniques in human medicine (Burnouf et al., 2016), a buffy coat-based method to obtain PLT concentrate, followed by repeated freeze/thaw cycles for PLT lysis. In a second step, we tested the obtained ePL in comparison with FBS for its suitability for MSC culture.

## MATERIALS AND METHODS

### Blood Collection

Whole blood for ePL preparation was collected over a period of 2 months from 20 healthy warmblood horses of similar breeds (5 geldings, 14 mares, and 1 stallion) aged 4–15 years (median: 9 years; interquartile range (IQR): 6) after approval by the local regulatory authority (i.e., regional council Giessen, A14/2019). These donor horses had not received any medication in the last 2 weeks as confirmed by their owners. Furthermore, their health status was evaluated by clinical examination and blood tests comprising complete blood counts with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) whole blood, blood chemistry with Li-heparin blood and serum, as well as microbiological and virological analyses as specified below.

The whole blood was obtained aseptically from the jugular vein. One milliliter lidocaine hydrochloride 2% was administered subcutaneously at the venipuncture site. A permanent venous catheter (12 G) was inserted in cranial direction and fixed with non-resorbable sutures. First, blood samples were collected into tubes for the blood tests specified above, as well as for an erythrocyte sedimentation rate test.

A total of 2 L whole blood was then collected into four 600 ml commercial blood bags loaded with 70 ml citrate-phosphate-dextrose (CPD; Composelect, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) (500 ml whole blood in each), which had been connected via a four-way connector (LS-four-way-connector, B. Braun, Melsungen, Germany) using a sterile tube welder (Compodock, Fresenius Kabi). A blood donation scale (MW5001 electronic, Biotrans GmbH, Dreieich, Germany) was used to standardize the filling volume of the blood bags. After the blood collection was completed, the samples were placed in a CompoCool<sup>®</sup> Box (Fresenius Kabi) containing butane-1,4-diol cooling plates to cool the whole blood to 20°C within a short time and to improve temperature uniformity. The blood was left there for at least 2 h and a maximum of 3 h until processing in the laboratory. Three of the four blood bag samples per horse were processed as described in the following.

### Platelet Concentrate and Lysate Preparation

The blood bags were centrifuged at  $711 \times g$  for 20 min using a commercial centrifuge designed for blood separation (Hettich Rotanta 460R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttingen, Germany) with acceleration settings of 1, deceleration settings of 0, at 22°C, for blood component separation. The buffy coat was recovered by separating the plasma, and the erythrocyte concentrate by a top-bottom method with a blood-separating device (Optipress<sup>®</sup> II; Fenwal, Baxter S.A., Maurepas, France). The buffy coat was left to rest for 1 h, then 70 ml plasma were added again for resuspension. The resuspended buffy coat was then centrifuged at  $159 \times g$  for 10 min, acceleration 1, deceleration 0, at 22°C, in the same centrifuge. After that, the resulting supernatant, corresponding to the concentrate, was separated using a manual press (NPBI Holland) (Figure 1).

The concentrates from the three separate blood collection bags from each horse were then pooled in transfer bags (R6R2021,

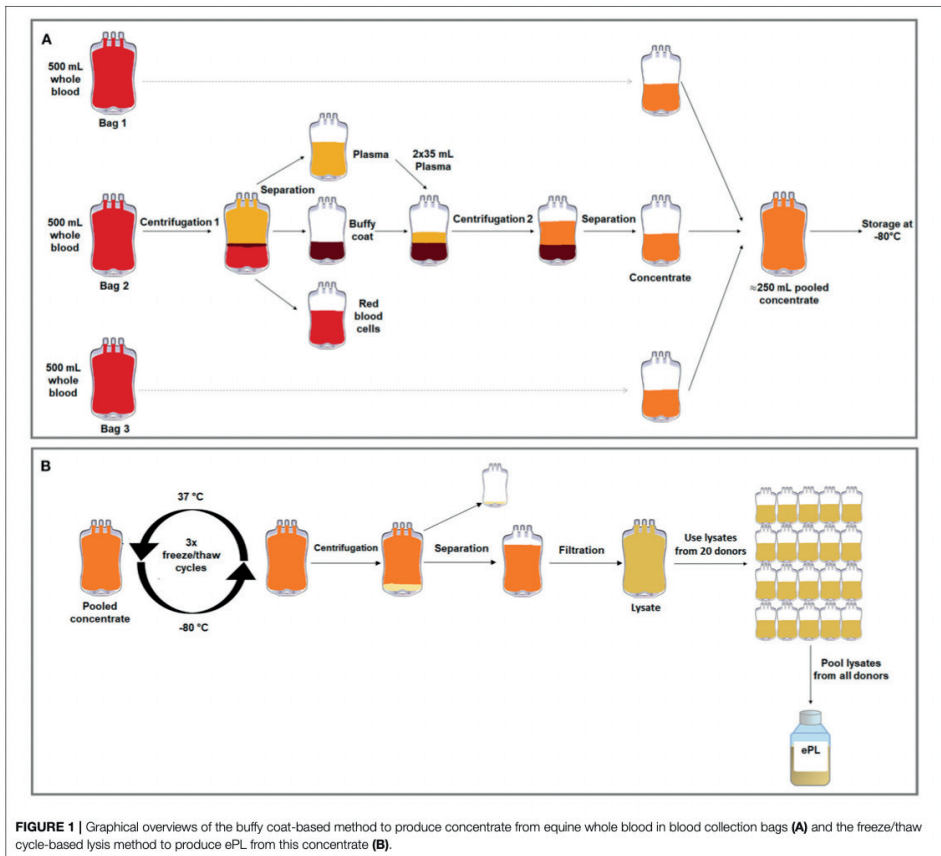
CompoFlex, Fresenius Kabi) to obtain one bag of concentrate per horse, referred to as “concentrate pooled,” and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . In order to lyse the PLT, three freeze/thaw cycles were performed, in which the PLT concentrate was thawed at  $37^{\circ}\text{C}$  in a dry heating device designed to thaw frozen products intended for infusion under continuous agitation (Plasmatherm, Barkey GmbH & CO.KG, Leopoldshoehe, Germany) for 4 h and then frozen again at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 20 h. Afterwards, the bags were centrifuged at  $4,000 \times g$  for 30 min, acceleration 9, deceleration 2, in the same centrifuge described above. The supernatant, corresponding to the lysate, was filtered *via* gravity using Macopharma Plas4 filters (Lot 11290588BM, Macopharma, Langen, Germany) for cell debris removal. The PLT lysate from each donor was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , until the lysate units from all suitable horses ( $n = 19$ ) were pooled under aseptic conditions (Figure 1). The lysate from the remaining horse was not included due to a positive herpes virus finding.

### Microbiological and Virological Assessment

Absence of pathogens was confirmed in blood samples from the individual animals as well as in the final pooled ePL before its use in cell culture. This comprised a bacteriological analysis with Oxoid signal blood culture system (BC0100M, Oxoid Limited, Hampshire, England), incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 7 days. On days 1, 2, 4, and 6, the cultured blood was streaked on blood agar (Blood Agar Base, Oxoid, Wesel, Germany) containing 5% defibrinated sheep blood and on water-blue metachrome-yellow lactose agar (Water-blue Metachrome-yellow Lactose Agar acc. to Gassner, sifin diagnostics, Berlin, Germany). The plates were incubated under aerobic conditions at  $37^{\circ}\text{C}$  for 48 h. Additionally, Brain-Heart-Infusion agar (Brain Heart Infusion Agar, Oxoid) was incubated under microaerobic conditions (10%  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ ) and analyzed after 24 and 48 h. Schaedler agar (BBL<sup>™</sup> Schaedler Agar, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) and Columbia agar (Columbia Agar (base), E. Merck, Darmstadt, Germany) were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 72 h under anaerobic conditions in a jar using AnaeroGen<sup>™</sup> gas sachets (AnaeroGen<sup>™</sup> 2.5L, Oxoid). For selective culturing of fungi, Kimmig agar (Agar for fungi (base) acc. to Kimmig modified, E. Merck) was incubated for 72 h at  $28^{\circ}\text{C}$  under aerobic conditions. Lastly, a 16S ribosomal RNA gene polymerase chain reaction analysis for mycoplasmas (van Kuppeveld et al., 1992) was performed. In addition, a virological examination for equine herpes virus 1 and 4 (virus genome detection), equine arteritis virus (antibody detection by serum neutralization test), equine infectious anemia virus (antibody detection), and virus cultivation in cell culture was commissioned.

### Platelet and Leukocyte Counts

Complete blood counts were obtained from samples harvested at different processing stages using an automated flow cytometric hematology analyzer (ADVIA 2120i, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany) with Multispecies software MS 5.9. This included EDTA blood samples, citrated whole blood samples from each blood collection bag before further processing, plasma samples from each collection bag, concentrate samples from each



collection bag, pooled concentrate from each animal, lysate from each animal, and the final ePL pooled from all horses.

### Growth Factor Quantification and Chemical Analyses

Growth factor concentrations were analyzed in serum, plasma, pooled concentrate, and lysate from each horse, as well as in the final pooled ePL. All samples including the concentrates had been stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before the growth factors were measured. For comparison, the same growth factors were also measured in the FBS which was used as standard cell culture medium supplement. Specifically, platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) were quantified using the respective Quantikine ELISA kits (catalog

numbers #DBB00 and #DB100B, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), which have been used for equine samples in previous studies (Anderson et al., 1998; Desjardins et al., 2004; Donnelly et al., 2006; Boswell et al., 2014; McClain and McCarrel, 2019). Procedures were performed according to the product manuals, which included TGF- $\beta$ 1 activation with hydrochloric acid, and samples were analyzed using an Infinite F50 (Tecan) plate reader and the corresponding Magellan software (Tecan Ltd., Maennedorf, Switzerland).

Furthermore, in the same samples, according to the chemical quality analysis of FBS, electrolyte and total protein analyses were performed using a blood gas and electrolyte analyzer (Cobas b 123 POC system, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The total protein and albumin content

was determined using a clinical chemistry analyzer C400 (Pentra C400 Option I.S.E, HORIBA ABX SAS, Montpellier, France).

### MSC Culture With FBS and ePL Media Supplements

The final pooled ePL was evaluated as cell culture supplement for equine adipose-derived MSC, in comparison with FBS. Adipose-derived MSC had been harvested from four healthy standardbred horses (three geldings, one stallion) aged 5–9 years (median: 8 years; IQR: 1) in the framework of an unrelated previous study as approved by the respective local authority (Landesdirektion Leipzig, TV34/13). MSC had been isolated by collagenase digestion and expanded in FBS-supplemented culture medium until cryopreservation. The cells were thawed and seeded in Dulbecco's modified Eagle's medium (1 g/L glucose; Gibco®, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Germany) supplemented with either 10% FBS (Lot: 2078409, Gibco®, ThermoFisher Scientific) or 10, 5, and 2.5% ePL, 1% penicillin-streptomycin, and 0.1% gentamycin. When using ePL, 1 U/ml heparin-natrium (B. Braun, Melsungen, Germany) was additionally added to the culture medium. MSC were then cultured under standard conditions (humidified atmosphere, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) for at least one passage prior to any experiment to allow for possible adaptations to the respective culture media. All experiments were performed using the MSC from all donor horses and except for the flow cytometry experiments, mean values from technical replicates were used for further statistical analyses.

### Cell Proliferation and Viability Assays

For estimation of the generation time, population doublings in passages 2 and 3 were evaluated. MSC were seeded at a density of 3,000 cells/cm<sup>2</sup> and incubated for 5 days, with a medium change after 3 days. Phase-contrast photomicrographs were obtained at standardized settings using a Nikon Eclipse Ts2-FL microscope with a DS-Fi3 camera (Nikon GmbH, Duesseldorf, Germany) at day 5 before passaging. Cells were then trypsinized and counted using a hemocytometer and trypan blue for exclusion of dead cells. The generation times were calculated using the following formula:

$$\text{Generation time} = \frac{\text{days in culture}}{\frac{\ln\left(\frac{\text{cell count harvest}}{\text{cell count seeding}}\right)}{\ln 2}}$$

Using Fiji ImageJ software, the images obtained before passaging were uniformly enhanced in contrast, a background subtraction was done and images were binarized, with adapted thresholds for each image, and the confluent area within each image was measured. In addition, MSC metabolic activity was measured at day 1 and 5 using a tetrazolium compound (MTS) assay according to the manufacturer's instructions (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Mannheim, Germany). The mean absorbance at day 5 was divided by the mean absorbance at day 1 as an indicator for metabolic activity.

### Immunophenotyping

Immunophenotypic analyses were performed in passage 3 MSC to assess the presence of inclusion and exclusion marker antigens recommended for MSC characterization, based on procedures established previously for equine MSC (Paebst et al., 2014). Briefly, MSC were analyzed by flow cytometry for CD29, CD44, CD73, CD90, and CD105, as well as for CD14, CD34, CD45, CD79α, and MHC-II. First, MSC were detached in ice-cold 0.01 M EDTA using cell scrapers to prevent loss of surface molecules due to enzymatic detachment. Next, cells were successively incubated with fixable viability dye (1:1,000; eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780, ThermoFisher Scientific) for 20 min, the respective blocking sera (15% goat serum for CD73 staining and 5% mouse or rat serum for all other stainings, all Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), followed by the antibodies detailed in Table 1. Incubation steps were performed protected from light for 15 min at 4°C, with interjacent washing steps in staining buffer (phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.01% sodium azide and 10% FBS). Finally, all cells were fixed in 2% paraformaldehyde, washed with PBS, and stored in staining buffer overnight at 4°C. For CD79α staining, fixation and permeabilization solutions (BD Cytotfix/Cytoperm™, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) were used according to the manufacturer's instructions. Flow cytometric measurements of a minimum of 20,000 events per sample were performed on an LSR Fortessa II (BD) equipped with FACS Diva 6.2 software (BD). Data was analyzed using FlowJo™ v10.7 software (FlowJo, LLC, BD Biosciences, Ashland, OR, USA). Live MSC were gated as large cells after duplet exclusion and marker expression gates were set based on the corresponding isotype-, secondary antibody- or conjugate controls.

### Trilineage Differentiation

The *in vitro* differentiation assays were performed in passage 2 MSC cultured in 10% FBS, 10% ePL, or 2.5% ePL. The MSC differentiation assay was not performed with 5% ePL, as previous approaches had already shown a tendency for a higher ePL concentration to be more potent and therefore the differentiation was only conducted with one low ePL concentration (2.5%).

For adipogenic differentiation, MSCs were seeded at 1,500 cells/cm<sup>2</sup> and incubated for 3 days under standard culture conditions. Then, standard medium was replaced by StemPro™ adipogenic differentiation medium (catalog number A1007001, Gibco®, ThermoFisher Scientific) with 0.1% gentamycin and 5% rabbit serum. After 7 days of incubation, samples were fixed with 50% ethanol for 20 min and stained with Oil Red O and hematoxylin counterstain. The intensity of adipogenic differentiation was assessed by two blinded observers using a scoring system based on the percentage of differentiated cells and the size and arrangement of lipid droplets in these cells, as previously described (Gittel et al., 2013).

For osteogenic differentiation, MSC were seeded at 1,000 cells/cm<sup>2</sup> and incubated for 3 days under standard culture conditions. Then, standard medium was replaced by StemPro™ osteogenic differentiation medium (catalog number A1007201, Gibco®, ThermoFisher Scientific) with 0.1% gentamycin.

**TABLE 1** | Antibodies used for immunophenotyping.

Subset	Antibody	Host species, isotype	Clone	Reactivity	Company	References	Dilution
I	CD29-A488	Mouse IgG1	TS2/16	Anti-human	Biologend, San Diego, CA	Schauer et al. (2012) and Paebst et al. (2014)	1:20
I	CD44-APC	Rat IgG2b	IM7	Anti-mouse	BD, Franklin Lakes, NJ	Schauer et al. (2012) and Paebst et al. (2014)	1:100
IV	CD73	Mouse IgG1	10F1	Anti-human	Abcam, Cambridge, UK	Schauer et al. (2012) and Paebst et al. (2014)	1:5
III	CD90-APC	Mouse IgG1	5E10	Anti-human	BD, Franklin Lakes, NJ	Hillmann et al. (2016)	1:100
II	CD105-PE	Mouse IgG1	SN6	Anti-human	Bio-Rad, Hercules, CA/ Serotec, Kidlington, UK	Schauer et al. (2012) and Paebst et al. (2014)	1:10
II	CD14-APC	Mouse IgG1	134620	Anti-human	R&D, Minneapolis, MN	Braun et al. (2010) and Paebst et al. (2014)	1:50
V	CD14 biotinylated	Mouse IgG1	105	Anti-equine	Cornell University, Dr. Bettina Wagner	Kabithé et al. (2010)	1:1,500
III	CD34-FITC	Mouse IgG3	43A1	Anti-human	AdipoGen Lifesciences, San Diego, CA	Paebst et al. (2014)	1:25
II	CD45-A488	Mouse IgG2a	F10-89-4	Anti-human	Bio-Rad, Hercules, CA/ Serotec, Kidlington, UK	Schauer et al. (2012) and Paebst et al. (2014)	1:5
VI	CD79 $\alpha$ -PE	Mouse IgG1	HM57	Anti-human	Bio-Rad, Hercules, CA/ Serotec, Kidlington, UK	Schauer et al. (2012) and Paebst et al. (2014)	1:50
I	MHCII (equine), PE	Mouse IgG1	CVS20	Anti-equine	Bio-Rad, Hercules, CA/ Serotec, Kidlington, UK	Kydd et al. (1994) and Lunn et al. (1998), Schauer et al. (2012), and Paebst et al. (2014)	1:25
IV	Goat anti-mouse Ig3, FITC	Polyclonal IgG		Anti-mouse	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas		1:100
V	SAV-APC	APC streptavidin			Biologend, San Diego, CA		1:250

Isotyp control	Corresponding antibody	Host species	Company	Dilution
IgG1 $\kappa$ , A488	CD29	Mouse	Biologend, San Diego, CA	1:20
IgG2b $\kappa$ , APC	CD44	Rat	Biologend, San Diego, CA	1:100
IgG2a $\kappa$ , APC	CD90	Mouse	Biologend, San Diego, CA	1:100
IgG1 $\kappa$ , PE	CD105	Mouse	Biologend, San Diego, CA	1:10
IgG1 $\kappa$ , APC	CD14 (Clone:134620)	Mouse	Biologend, San Diego, CA	1:50
IgG3 $\kappa$ , FITC	CD34	Mouse	Biologend, San Diego, CA	1:25
IgG2a $\kappa$ , A488	CD45	Mouse	Biologend, San Diego, CA	1:5
IgG1 $\kappa$ , PE	CD79 $\alpha$	Mouse	Biologend, San Diego, CA	1:50
IgG1 $\kappa$ , PE	MHCII	Mouse	Biologend, San Diego, CA	1:50

This medium was changed twice weekly for 21 days of incubation. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and von Kossa staining was performed to detect extracellular mineralization. Bright field photomicrographs were obtained, and mean grayscale values were extracted using Fiji ImageJ software.

Chondrogenic differentiation of MSC was performed in pellet culture with 500,000 cells per pellet. MSC were washed in PBS before StemPro™ chondrogenic differentiation medium (catalog number A1007101, Gibco®, ThermoFisher Scientific), and 0.1% gentamycin were added, and then centrifuged at 280 × g at 4°C for 5 min to form a cell pellet. Medium was changed twice a week until day 21. Pellets were fixed with 4% paraformaldehyde for 12 h, paraffin sections prepared and stained with Alcian blue and Masson's Trichrome. Samples were evaluated by two blinded observers, based on the Grogan

score (Grogan et al., 2006) adapted to the stainings used in the current study (**Supplementary File 1**). In addition, bright field photomicrographs were analyzed using Fiji ImageJ software (Ruifrok and Johnston, 2001). This included color deconvolution and binarization of the resulting images, followed by the measurement of the percentage areas stained with the respective staining component. Results are presented as ratios of cartilaginous matrix staining and counterstaining (i.e., turquoise to purple staining for Alcian blue and blueish to red staining for Masson's trichrome).

### Statistical Analysis

Statistical analyses and graphical presentation of data were performed using IBM SPSS Statistics 26 and GraphPad Prism 8.4.3. Data obtained during blood processing ( $n = 19$ ) are presented as median and 95% confidence interval. These data

were additionally categorized based on donor age [4–9 years ( $n = 11$ ) and 10–15 years ( $n = 8$ )] and sex [female ( $n = 13$ ) and male ( $n = 6$ )] for comparisons between these groups. Data from the cell culture experiments ( $n = 4$ ) are presented as scatter plots with median and interquartile range. Correlation between parameters was evaluated based on Spearman's rank correlation, and comparisons between related samples were performed using non-parametric tests for paired samples (Friedman tests with Wilcoxon *post-hoc* tests and Bonferroni correction for multiple testing). For age and sex group comparisons, Mann-Whitney *U*-tests were computed. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Platelet Lysate Preparation

#### Absence of Pathogen Contamination

No microbiological contamination was evident in the blood samples from the donors or in the final pooled ePL. However, one donor animal tested positive for herpes viridae. Consequently, the ePL obtained from this horse was not included in the final product and data obtained were excluded from all analyses.

#### Platelet Concentration and WBC Removal

A medium whole blood volume of 504.9 ml (IQR: 25.7) yielded a medium concentrate volume of 86.2 ml (IQR: 7.1) per collected blood bag, with recovery rates of 70.2% (IQR: 19.3) of the total processed PLT and 6.3% (IQR: 2.6) of the total processed WBC. As compared with the whole blood, the obtained PLT concentrates had 4.2-fold increased PLT concentrations and 0.4-fold decreased WBC concentrations ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively). The remaining plasma showed low PLT concentrations and very low WBC concentrations ( $p < 0.01$  compared with whole blood and concentrate). After lysis of the concentrates, PLT and WBC counts in the lysates were neglectable (Figure 2).

Whole blood and concentrate PLT concentrations correlated strongly ( $p < 0.001$  and  $r = 0.743$ ). A moderate correlation was also observed between the respective WBC concentrations ( $p < 0.05$  and  $r = 0.564$ ). Furthermore, recovery rates of PLT and WBC were correlated ( $p < 0.01$  and  $r = 0.617$ ) (Figure 2).

#### Growth Factor Concentration and Chemical Analyses

After storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ , growth factor concentrations were higher in the PLT concentrates ( $p > 0.05$  for PDGF-BB and  $p < 0.01$  for TGF- $\beta$ 1) as well as in the lysates ( $p < 0.01$  for PDGF-BB and  $p < 0.05$  for TGF- $\beta$ 1), as compared with the corresponding serum. The plasma showed very low growth factor concentrations ( $p \leq 0.01$  for all comparisons, except for serum vs. plasma TGF- $\beta$ 1) (Figure 3), corresponding to its low PLT content.

Platelet concentrations in the concentrates showed moderate to strong correlations with the growth factor concentrations in the concentrates ( $p < 0.01$  and  $r = 0.599$  for PDGF-BB;  $p < 0.001$  and  $r = 0.785$  for TGF- $\beta$ 1) as well as in the lysates ( $p < 0.05$  and  $r = 0.526$  for PDGF-BB;  $p < 0.01$  and  $r = 0.626$  for TGF- $\beta$ 1). This same trend was observed for PLT concentrations in whole blood which also correlated with the growth factor concentrations in

the concentrates ( $p < 0.05$  and  $r = 0.542$  for PDGF-BB;  $p = 0.001$  and  $r = 0.687$  for TGF- $\beta$ 1) and in the lysates ( $p < 0.05$  and  $r = 0.514$  for PDGF-BB;  $p < 0.05$  and  $r = 0.503$  for TGF- $\beta$ 1) (Figure 3).

The chemical analysis of the samples from the different production steps showed a stable pH value. Electrolyte, glucose, total protein, and albumin concentrations differed between serum and the samples from lysate production as anticipated due to binding and/or dilution by the anticoagulant citrate-phosphate-dextrose used in the latter. No major changes were observed throughout blood processing. Compared with FBS, glucose and protein concentrations were higher in serum and all steps of lysate production than in FBS, while potassium and lactate concentrations were lower (Table 2).

#### Donor-Related Parameters Influencing Outcome

Donor age was linked to the outcome of blood processing, despite a lack of correlation between age and whole blood PLT or serum growth factor concentrations ( $p > 0.05$ ). Nevertheless, age was negatively correlated with PLT concentrations in the concentrates ( $p < 0.01$  and  $r = -0.582$ ), as well as with PDGF-BB and TGF- $\beta$ 1 concentrations in the concentrates ( $p < 0.01$  and  $r = -0.627$  for PDGF-BB;  $p < 0.05$  and  $r = -0.545$  for TGF- $\beta$ 1) and lysates ( $p < 0.05$  and  $r = -0.483$  for PDGF-BB;  $p < 0.05$  and  $r = -0.566$  for TGF- $\beta$ 1). When grouping the donors based on their age (4–9 vs. 10–15 years), the younger animals had higher serum PDGF-BB concentrations as well as higher PDGF-BB concentrations in the concentrates and lysates ( $p < 0.05$ ). Fewer differences were found for PLT or TGF- $\beta$ 1 concentrations between age groups (Figure 4).

No differences were observed with respect to donor sex ( $p > 0.05$  in sex group comparisons for all parameters).

Attempting to identify further attributes of suitable donor animals, parameters typically obtained by routine blood tests were also considered. EDTA whole blood PLT concentrations, similar as the respective values obtained from the blood collection bags, moderately correlated with concentrate PLT concentrations ( $p = 0.010$  and  $r = 0.573$ ), but not with the PLT recovery rate. The erythrocyte sedimentation time (median: 37 mm/30 min; IQR: 33.8) appeared to have no predictive effect at all, with no correlation observed for any relevant outcome parameter ( $p > 0.05$ ).

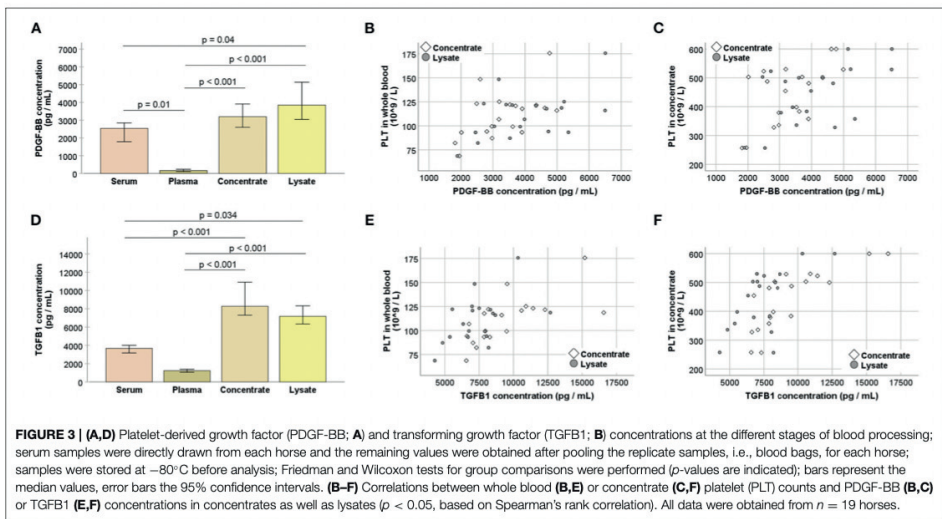
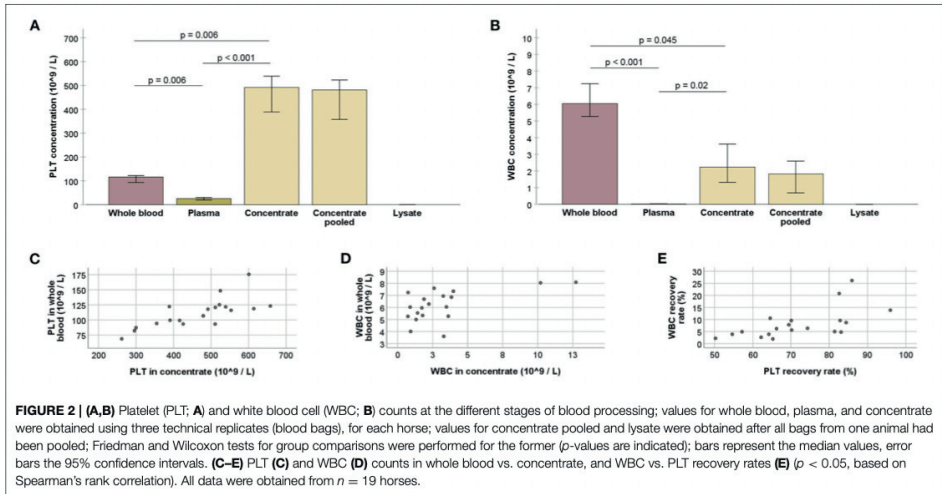
### Platelet Lysate in Equine MSC Culture

#### Growth Factors in Medium Supplements

The pooled ePL used for the cell culture experiments had a PDGF-BB concentration of 3,783 pg/ml, whereas FBS displayed a PDGF-BB concentration near or below the detection level of the assay. The concentration of TGF- $\beta$ 1 was 3,966 pg/ml in ePL and 3,380 pg/ml in FBS.

#### MSC Morphology, Proliferation, and Viability

MSC displayed the characteristic fibroblast-like morphology in all media, yet their shape tended to be more rounded in ePL-supplemented media and MSC supplemented with 10% ePL appeared to grow in more dense clusters.



The most consistent viability and proliferation was observed in medium supplemented with 10% ePL, but confluency at day 5, generation time, and metabolic activity were similar between 10% ePL MSC and 10% FBS MSC. However, proliferation was highly variable in medium supplemented with 5% ePL and insufficient in medium supplemented with 2.5% ePL. Correspondingly,

confluency was lowest in 2.5% ePL medium ( $p < 0.05$  compared with 10% ePL in passage 2), and generation time was higher in 5% ePL medium compared with FBS medium ( $p < 0.05$  in passage 2) (Figure 5). Here, it is of note that in one out of four samples in 5% ePL and in all four samples in 2.5% ePL, generation time calculation generated negative results, thus these values had to

**TABLE 2** | pH and electrolyte, glucose, lactate, total protein, and albumin concentrations at the different stages of blood processing; values for serum, plasma, concentrate, and lysate are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 19$ ).

Sample	pH	Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)	Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	Glucose (mmol/L)	Lactate (mmol/L)	Total protein (g/L)	Albumin (g/L)
Serum	7.54 $\pm$ 0.03	141.38 $\pm$ 2.01	4.26 $\pm$ 0.49	1.79 $\pm$ 0.07	106.31 $\pm$ 2.53	28.06 $\pm$ 1.39	4.63 $\pm$ 0.49	2.09 $\pm$ 0.39	59.69 $\pm$ 2.25	32.26 $\pm$ 1.44
Plasma	7.53 $\pm$ 0.03	148.71 $\pm$ 1.79	3.16 $\pm$ 0.25	<0.10	84.04 $\pm$ 2.64	19.08 $\pm$ 1.22	23.92 $\pm$ 1.23	1.55 $\pm$ 0.24	51.06 $\pm$ 1.83	27.33 $\pm$ 1.18
Concentrate	7.47 $\pm$ 0.04	147.88 $\pm$ 1.54	3.62 $\pm$ 0.29	<0.10	84.57 $\pm$ 1.73	18.44 $\pm$ 1.63	22.62 $\pm$ 1.37	2.70 $\pm$ 0.63	53.39 $\pm$ 1.75	28.11 $\pm$ 1.10
Lysate	7.50 $\pm$ 0.05	148.00 $\pm$ 1.46	3.69 $\pm$ 0.30	<0.10	84.74 $\pm$ 1.68	17.06 $\pm$ 1.19	23.01 $\pm$ 1.30	2.87 $\pm$ 0.66	53.57 $\pm$ 2.08	27.99 $\pm$ 1.10
Lysate pooled (ePL)	7.52	147.80	3.68	<0.10	84.50	16.7	23.10	2.90	54.10	27.90
Fetal bovine serum	7.45	138.60	11.21	1.27	106.60	12.7	2.20	17.70	36.80	23.00

be excluded from further comparative analyses. Yet interestingly, there were no significant differences between groups with respect to MSC metabolic activity (Figure 5).

### MSC Immunophenotype

MSC were positive for CD90, with the most consistent expression ( $\geq 92\%$  CD90<sup>+</sup> cells in all samples) in MSC cultured in 10% ePL. In addition, MSC expressed CD44 and CD29. However, MSC were largely negative for CD73 and CD105 in FBS and ePL media (Figure 6).

MSC hardly expressed CD34 (<4% in FBS medium and <2% in all ePL media), CD45 (<2% in all media), and MHC II (<2% in all media). Surprisingly, small subpopulations (up to 26.1% in 10% ePL medium) appeared to be positive for CD79 $\alpha$  (Figure 6). Furthermore, MSC CD14 staining strongly depended on the antibody used (Supplementary File 2). Using the anti-equine CD14 antibody (clone 105), the majority of MSC appeared CD14-positive ( $\geq 62\%$  CD14<sup>+</sup> cells in 10% FBS medium and  $\geq 87\%$  CD14<sup>+</sup> cells in 10% ePL medium) (Figure 6).

No statistically significant differences of the marker expressions were found between groups. Yet due to their low yield, MSC cultured in 5 or 2.5% ePL media could not be analyzed by flow cytometry in appropriate cell numbers and with appropriate controls. The attempted analysis suggested a similar but more inconsistent marker expression as in the other media, but this result is of preliminary character (data not shown).

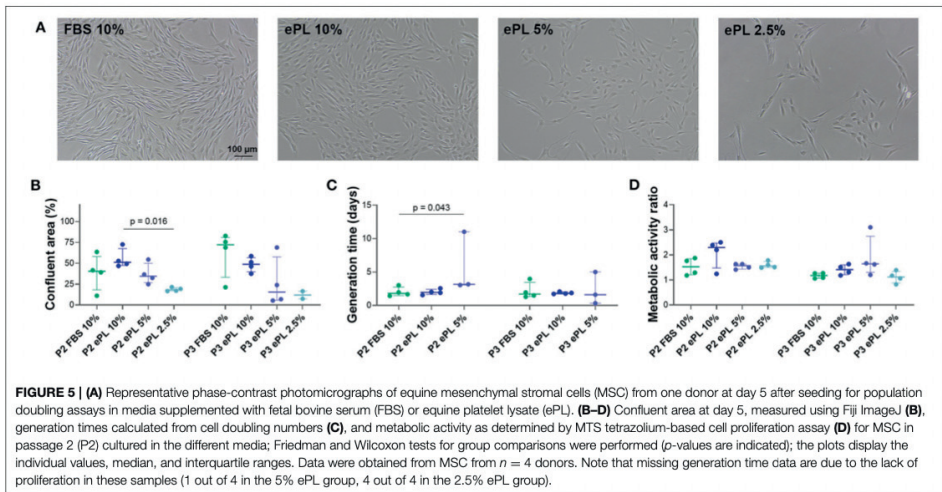
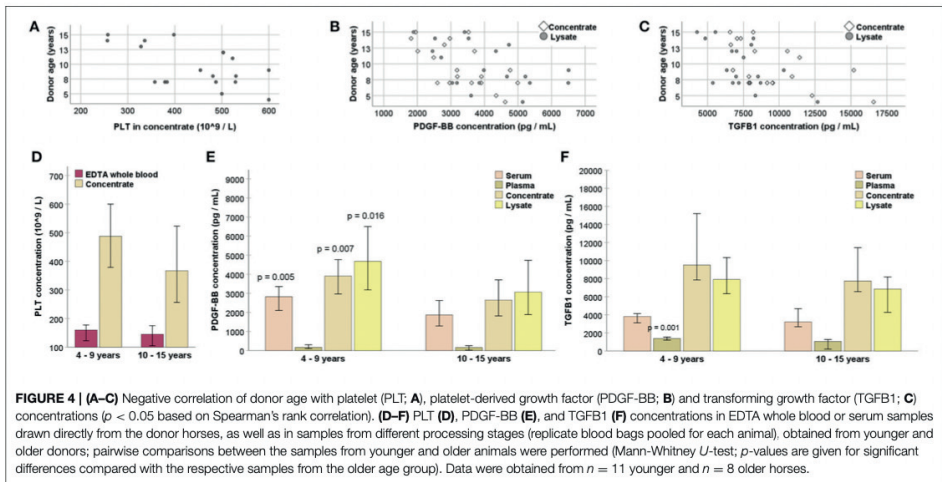
### MSC Trilineage Differentiation

Adipogenic differentiation was evident in all samples, with a high percentage of cells containing distinct lipid vacuoles. Similarly, all samples showed extensive extracellular mineral depositions after osteogenic differentiation. Chondrogenic differentiation appeared weaker in MSC expanded in 10% ePL, with the same trend being reflected by Alcian blue and Masson's trichrome stainings, yet these differences were not statistically significant (Figure 7).

## DISCUSSION

Here, we propose a buffy coat-based protocol for equine PLT concentrate and ePL production, which could provide a basis for improved xeno-free cell culture media for equine MSC expansion. The ePL was prepared without the specific plateletpheresis equipment and with quality controls at different processing steps and can be reproduced in large scales.

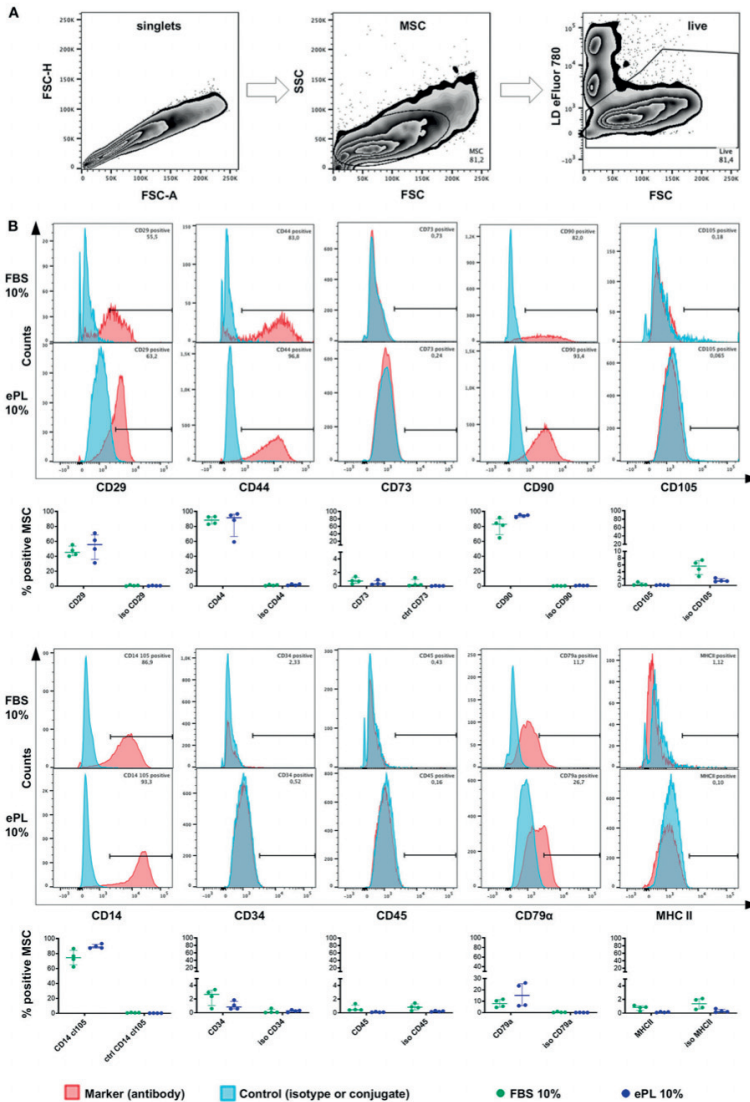
PL is produced from PLT concentrate. The shelf life of human PLT concentrates prepared for transfusion medicine is limited to 5–7 days at 22  $\pm$  2°C under permanent agitation to minimize the risk of bacterial growth (Corash, 2011; Burnouf et al., 2014). Even in well-organized blood transfusion services, 10–20% of the platelet concentrates produced have to be discarded because they were not transfused within the specified time (Schallmoser et al., 2020). Those expired PLT concentrates can be allocated for hPL production to avoid an additional donation from blood donors, because several studies showed no differences between fresh and stored PLT concentrates as a source for hPL (Bieback, 2013; Astori et al., 2016; Burnouf et al., 2016), thus a certain amount



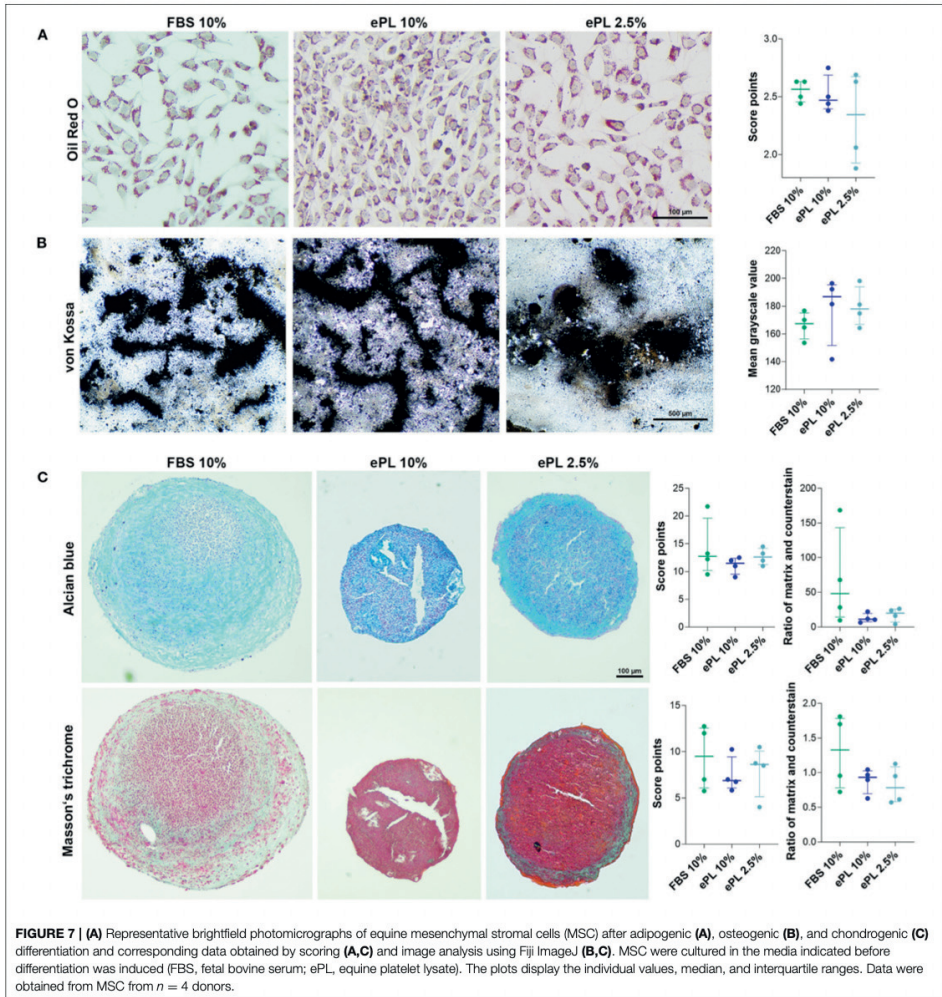
of PLT concentrate is always available for hPL production. However, in contrast to human medicine, PLT concentrates from transfusion services are not available in equine medicine and therefore, PLT concentrates must be prepared directly for ePL production.

Platelet concentrate can be obtained by three distinct procedures: Either from anticoagulated whole blood by the

buffy coat-based or the platelet-rich plasma (PRP) method or directly by plateletpheresis. In the buffy coat method, PLT are harvested directly from the buffy coat after a so-called hard spin and subsequently separated from the white blood cells in a second soft spin. In the PRP method, a first soft spin centrifugation is followed by a second hard spin centrifugation, in order to first harvest the PLT together with the plasma



**FIGURE 6** | Flow cytometry analysis of equine mesenchymal stromal cells (MSC) cultured with 10% fetal bovine serum (FBS) or 10% equine platelet lysate (ePL) after cells were mechanically detached and stained for 10 different surface markers. **(A)** Gating strategy for live MSC after duplet exclusion. **(B)** Representative examples of overlaid histograms of the surface marker staining and the respective isotype or conjugate control for MSC from one donor, and frequencies of surface marker positive MSC as % of live MSC plotted as individual values; horizontal bars mark the median and interquartile ranges. Data were obtained from MSC from  $n = 4$  donors.



supernatant and then pellet them, at which the second step might lead to reversible PLT aggregation (Gulliksson, 2012). In Europe, the buffy coat method and repeated freeze/thaw cycles represent the most commonly used techniques in human medicine, while the PRP method is not frequently used anymore (Gulliksson, 2012; Burnouf et al., 2016). In contrast, equine

PLT concentrates have only been produced by the PRP method or plateletpheresis, with the PRP method performed in most studies, using small sample volumes only. In the present study, we propose the first buffy coat-based method to produce ePL from the donor horses' whole blood collected in commercial blood bags.

For the buffy coat as well as for the PRP method, centrifugation settings are critical for the correct separation of blood components. However, neither in human nor in equine medicine, protocols are standardized. In previous equine studies using the PRP method, the centrifugation settings for the first and second steps varied as detailed in **Table 3**. In human medicine, protocols are available for the buffy coat method, but they differ not only in the centrifugation settings ( $200\text{--}3,200 \times g$  for the second centrifugation) but also in the PLT counts yielded in the concentrates ( $100\text{--}10,000 \times 10^9/L$ ) (Burnouf et al., 2016).

Using the buffy coat-based method to produce equine PLT concentrate in the present study, we yielded a median PLT count of  $484 \times 10^9/L$ . In previous equine studies, PLT counts ranged between  $591 \times 10^9/L$  and  $1,000\text{--}2,000 \times 10^9/L$  using the PRP method with multiple centrifugations (Del Bue et al., 2007; Seo et al., 2013; Russell and Koch, 2016; Gilbertie et al., 2018; Bozorgmanesh et al., 2019; Yaneselli et al., 2019) and  $350 \pm 106 \times 10^9/L$  to  $357 \pm 177 \times 10^9/L$  by plateletpheresis (Sumner et al., 2017; Naskou et al., 2018) (**Table 3**). Data regarding the buffy coat method for equine PLT concentrate production are not available for comparison. Nevertheless, the PLT concentration in the current study was in the same order of magnitude as described for the PRP method (Del Bue et al., 2007; Seo et al., 2013; Russell and Koch, 2016; Gilbertie et al., 2018; Bozorgmanesh et al., 2019; Yaneselli et al., 2019) and higher than the PLT concentrations yielded by plateletpheresis (Sumner et al., 2017; Naskou et al., 2018).

Besides PLT counts, WBC removal is a central aspect in PLT concentrate production and near-complete WBC depletion by filtration is recommended by the guidelines for transfusion procedures (Wildt-Eggen et al., 2001; European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion, 2020; Schallmoser et al., 2020). Leukocytes can enhance PLT aggregation and thromboxane release, and, thus, promote further recruitment of activated PLT, as *in vitro* studies with human PLT have shown (Faraday et al., 2001; Hoareau et al., 2014). However, it should be differentiated between conventional intravenous PLT transfusion and other applications of PLT concentrates, such as local injections in regenerative therapies, where leukocyte removal is controversial (DeLong et al., 2012; Lana et al., 2019). With respect to concentrates for PL production as MSC culture supplement, it is unclear whether a reduction of leukocytes is necessary or whether leukocytes in the concentrate may be even useful in the sense of MSC priming. Yet, as this remains to be investigated, we aimed at a reduction of leukocytes in the present work. In a previous experiment (unpublished data), we had aimed to produce PLT concentrate by sedimentation of whole blood, followed by hard spin centrifugation of the supernatant similar to the PRP method. We had obtained higher PLT counts than with the buffy coat method presented here, but the leukocytes were also concentrated compared with the whole blood (unpublished data), which was in accordance with previous equine studies (Ionita et al., 2014; Bozorgmanesh et al., 2019). Furthermore, we did not succeed to deplete WBC using leukocyte reduction filters for the equine PLT concentrates. The filters were immediately clogged, which could be due to the different characteristics of equine PLT compared with human

PLT (Roscher, 2019) or a stronger activation of the PLT in the filter and thus an increased surface activity. Therefore, to avoid increased leukocyte values, we used the buffy coat method for the preparation of ePL. In this line, it needs to be acknowledged that plateletpheresis, while requiring costly and specific equipment, has an even better outcome with respect to leukocyte reduction, with  $0.15 \times 10^9$  WBC/L (Sumner et al., 2017; Naskou et al., 2019).

Lysis of PLT concentrate releases growth factors and chemokines from the PLT. Repeated freeze/thaw cycles are mainly used for this purpose, but direct PLT activation by calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ), sonication, or solvent/detergent treatment is also feasible (Astori et al., 2016; Burnouf et al., 2016; Schallmoser et al., 2020). In contrast to the method presented here, using three freeze/thaw cycles, other equine studies used only one (Del Bue et al., 2007; Seo et al., 2013; Russell and Koch, 2016; Yaneselli et al., 2019) or two freeze/thaw cycles and three centrifugation steps (Sumner et al., 2017; Naskou et al., 2018). During the last centrifugation after lysis, again different centrifugation forces were used (**Table 3**). A systematic analysis determining the optimal number and conditions of the freeze/thaw cycles and centrifugation settings is still pending.

In the present study, the growth factor concentrations in the PLT concentrates were in a similar range as in the ePL, suggesting that PLT lysis is already evident after one freezing step, which was necessary to store the concentrates until the ELISA analyses were performed. However, unexpectedly, we found a discrepancy between the median TGF- $\beta$ 1 concentration in the individual lysates of one horse and its concentration measured in the pooled ePL. This suggests that there is TGF- $\beta$ 1 activation during final processing steps, possibly leading to successively less activatable TGF- $\beta$ 1 over a short time. This issue should be further investigated and procedures or materials used improved. In previous studies, similar (PDGF-BB: 3.5 ng/ml and TGF- $\beta$ 1: 6.1 ng/ml) (Sumner et al., 2017) or higher (PDGF-BB: 5.2 ng/ml and TGF- $\beta$ : 24.5 ng/ml) (Russell and Koch, 2016) growth factor concentrations were found in ePL prepared from plateletpheresis- or PRP method-derived concentrates, respectively. Furthermore, corresponding to previous data (Russell and Koch, 2016), we could not detect PDGF-BB in FBS. Yet, the concentrations of growth factors measured may not only vary depending on the PL preparation process, but they are also affected by the assay specificity (Doucet et al., 2005; Textor and Tablin, 2012; Sumner et al., 2017), thus direct comparisons between studies or samples from different species are not entirely conclusive.

It was previously reported that breed, sex, and age of the donors can influence the cellular and growth factor profile of equine PLT products. Female horses and horses aged <5 years showed significantly higher concentrations of PDGF-BB and TGF- $\beta$ 1 in blood products. For PDGF, this was also observed in pony breeds (Giraldo et al., 2013). These findings were partially reproduced in our study, in which the PLT and growth factor concentrations in the PLT concentrates and lysates were negatively correlated with the age of the horses. To overcome the individual variations, pooling of the ePL from a large number of animals is beneficial for producing uniform batches.

**TABLE 3** | Preparation technique for equine platelet (PLT) concentrate and PLT lysate and resulting PLT counts in the platelet concentrates in previous publications from 2007 to 2019.

References	First centrifugation	Second centrifugation	Final PLT concentration	Lysis
Del Bue et al. (2007)	350 × g, 10 min	510 × g, 10 min	1,000–2,000 × 10 <sup>9</sup> /L	Single freeze/thaw cycle + centrifugation (20,000 × g, 10 min)
Seo et al. (2013)	230 × g, 10 min, 10°C	900 × g, 15 min, 10°C	1,000 × 10 <sup>9</sup> /L	Single freeze/thaw cycle + centrifugation (1,600 × g, 30 min, 10°C)
Russell and Koch (2016)	200 × g, 15 min	400 × g, 15 min	1,000 × 10 <sup>9</sup> /L	Single freeze/thaw cycle + centrifugation (4,000 × g, 15 min)
Yaneselli et al. (2019)	200 × g, 10 min	1,500 × g, 20 min	591 × 10 <sup>9</sup> /L	Single freeze/thaw cycle + centrifugation (1,600 × g, 30 min)
Bozorgmanesh et al. (2019)	1,000 × g, 5 min 45 s	2,000 × g, 8 min	713,333 × 10 <sup>9</sup> /L	5 freeze/thaw cycles + centrifugation (20,000 × g, 20 min)
Gilbertie et al. (2018)	250 × g, 15 min	1,500 × g, 15 min	1,226.38 × 10 <sup>9</sup> /L	
Sumner et al. (2017) and Naskou et al. (2018)	Plateletpheresis		357 ± 177 × 10 <sup>9</sup> /L	2 freeze/thaw cycles + 3 centrifugation cycles (4,800 × g, 1.60 min and 2/3. 30 min) + centrifugation (3,485 × g, 10 min, 4°C)

Nevertheless, it remains recommendable to harvest the blood samples from young donor horses in uniform cohorts in order to obtain PLT concentrate and ePL of high quality.

We further compared the obtained ePL with FBS, in terms of their potential to support equine adipose-derived MSC expansion. PL is an attractive alternative to FBS, which could solve several issues related to FBS. First, it is an allogenic product, which reduces the possibility of recipient immune reaction, and secondly, harvesting the materials for ePL production is ethically less critical. However, given that the use of MSC and other cell types in large animal models and veterinary medicine will further increase, ePL would be required in large quantities for MSC expansion. Furthermore, producing large batches of ePL according to standardized protocols would support consistent cell culture conditions. In this respect, it is a major advantage that horses tolerate regular blood collection of large amounts up to 8 L (16 ml/kg bodyweight) very well, and there are no adverse effects in the hematological variables (Malikides et al., 2000).

When analyzing the MSC proliferation kinetics, the most consistent viability and proliferation was observed in medium supplemented with 10% ePL. There were no major differences between 10% ePL MSC and 10% FBS MSC with respect to the proliferation parameters assessed. This supports the notion that ePL can be used as a replacement of FBS for equine MSC expansion. Our results are in agreement with the findings of two other studies, one using the PRP method (Seo et al., 2013) and the other using plateletpheresis (Naskou et al., 2018) to produce PLT concentrate and ePL. Furthermore, two other equine studies showed a dose-dependent proliferation of MSC in ePL medium (Del Bue et al., 2007; Russell and Koch, 2016). Yet only in one study, using supplementation with 20% ePL, MSC proliferation was actually increased as compared with FBS (Yaneselli et al., 2019). In comparison with these results, it is well-documented that hPL supplementation increases human bone marrow- and adipose-derived MSC proliferation as compared with FBS (Doucet et al., 2005; Blande et al., 2009; Cholewa

et al., 2011; Becherucci et al., 2018). As already suggested earlier (Naskou et al., 2018), we also tested different concentrations of ePL for equine MSC cultivation. However, the proliferation was highly variable in medium supplemented with 5% ePL and insufficient in medium supplemented with 2.5% ePL. This is again in conflict with the findings in human medicine, where basal media supplemented with 5% hPL resulted in a significant increase in the proliferation rates of human MSCs compared with supplementation with FBS (Griffiths et al., 2013). Here, species-specific differences become evident. In contrast to an optimal growth factor content in 5% hPL for improved expansion of human MSC, the growth factor content in a medium supplemented with 5 or 2.5% ePL was not sufficient to support consistent equine MSC expansion. The different PLT concentrations in human and equine whole blood are a probable reason for this. The reference range for PLT counts in humans is 150–450 × 10<sup>9</sup>/L (Burnouf et al., 2016), but only 94–232 × 10<sup>9</sup>/L in horses (Stokol, 2020). Based on the resulting higher PLT count in the human PLT concentrates, it is not surprising that the growth factor concentrations reported for hPL (Klatte-Schulz et al., 2018) appear higher than in ePL, which may explain that less hPL is needed to support cell growth.

Human MSC characterization, as recommended by the ISCT, includes the evaluation of the positive marker antigens CD73, CD90, and CD105 and the exclusion marker antigens CD14, CD34, CD45, CD79α, and HLA-DR (Dominici et al., 2006). For equine MSC, it was suggested to further include CD29 and CD44 as inclusion markers (Paebst et al., 2014; Hillmann et al., 2016). Until today, the scarcity of reliable commercially available monoclonal antibodies specific for equine cells is a major drawback (Schauwer et al., 2011). The current analysis revealed that the immunophenotype of MSC cultured in media supplemented with FBS or ePL is similar. There were no significant differences in the expression of positive markers CD29, CD44, CD90, CD73, and CD105, while CD73 and CD105 were largely negative in all media. Furthermore, the MSC did not express the exclusion markers CD34, CD45, and MHC II.

These observations are widely comparable with other equine and human studies, where similar expression of surface markers was observed with different media (Doucet et al., 2005; Horn et al., 2010; Mojica-Henshaw et al., 2013; Yaneselli et al., 2019). Lack of CD73 in equine MSC is also in accordance with most previous equine studies (Ranera et al., 2011; Schauerer et al., 2012; Paebst et al., 2014; Hillmann et al., 2016) while CD105 has shown both high (Braun et al., 2010) or minimal or variable expressions in previous studies (Ranera et al., 2011; Schauerer et al., 2012; Paebst et al., 2014). However, in one previous study, a CD45<sup>+</sup> population was observed in MSC cultured with FBS as well as with ePL, and CD90 expression was found in a higher percentage of MSC cultured with FBS compared with ePL (Naskou et al., 2018). In contrast, we observed the most consistent expression of CD90 in MSC cultured with 10% ePL media and expression of CD45 was almost undetectable in all media. Furthermore, we made an interesting observation of CD14 detection on the majority of MSC when using an equine-specific antibody for CD14 (Kabithé et al., 2010; Wagner et al., 2013; Bonelli et al., 2017; Schnabel et al., 2019; Larson et al., 2020; Patel et al., 2020). According to the ISCT, CD14 should not be expressed on human MSC (Dominici et al., 2006) as it is a glycolipid anchored membrane glycoprotein expressed on monocytes and macrophages (Tesfaigzi, 2006; Braun et al., 2010) and a leukocyte-secreted molecule in response to LPS stimulation and inflammation, as demonstrated in horses (Wagner et al., 2013). Previously, we described equine MSC as CD14 negative (Paebst et al., 2014). These analyses were based on an anti-human CD14 antibody (clone 134620), which stains putative monocytes in equine peripheral mononuclear blood cells but not equine MSC (Paebst et al., 2014) (Supplementary File 2), but its exact specificity for equine CD14 has not been shown. In the current work, we used an equine-specific antibody for the flow cytometric analysis (clone 105, Kabithé et al., 2010), which discriminates the monocyte population in peripheral blood mononuclear cells more clearly (Supplementary File 2). While our current finding of equine MSC staining positive for CD14 is in accordance with previous studies (Braun et al., 2010; Hackett et al., 2011), it remains to be clarified if the cells actually express the whole functional CD14 molecule or only part of it, or if the MSC bind soluble CD14 present in FBS and ePL. On human MSC, cross-reactive epitopes have been observed, despite absence of the complete CD14 molecule (Pilz et al., 2011). The details and relevance of our finding of CD14<sup>+</sup> equine MSC here will be subject of further research.

We finally verified MSC *in vitro* trilineage differentiation potential. In accordance with previous studies, the MSC expanded in ePL showed no significant differences in osteogenic and adipogenic differentiation (Doucet et al., 2005; Schallmoser et al., 2007; Ben Azouza et al., 2012; Naskou et al., 2018). Interestingly, MSC expanded in medium supplemented with 2.5% ePL differentiated into both adipocytes and osteocytes, although their proliferation had not been satisfying in this medium. In addition, we obtained unexpected results in chondrogenic differentiation, which was weaker in MSC expanded in 10% ePL medium than when expanded in FBS or 2.5% ePL medium. In contrast, others reported that

chondrogenic differentiation was improved in equine and human MSC cultured with ePL (Mishra et al., 2009; Shih et al., 2011; Gottipamula et al., 2012; Naskou et al., 2018). It is widely discussed in the literature that MSC express the chondrogenic markers aggrecan and Sox 9 and extracellular cartilage matrix depending on the amount of (platelet-derived) growth factors (Mishra et al., 2009; Prins et al., 2009; Shih et al., 2011; Rubio-Azpeitia and Andia, 2014). In this context, TGF- $\beta$  appeared to be crucial for chondrogenic differentiation (Grimaud et al., 2002; Chapman et al., 2020). A possible and pragmatic explanation for the discrepancy observed here could be that MSC expanded in 10% ePL medium would have needed more extensive washing steps to remove the ePL completely before being transferred to the chondrogenic differentiation medium.

The current study provides the first evaluation of a buffy coat-based protocol for ePL production. The method presented has several advantages over previously described protocols for equine PLT concentrate and ePL production and complies much better with the current state of the art in human medicine. Therefore, it can serve as a basis to improve the culture of equine MSC and other equine cell types. MSC characterization in the present study was limited in that only four MSC donor horses were investigated, and because so far, we only investigated basic properties of MSC but not their functionality in clinically relevant settings. Based on the herein obtained results, it appears highly promising to continue with the functional characterization of equine MSC in conjunction with their culture in ePL.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

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

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Regional council Giessen, Germany. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AH: conception of the study and complete experimental design (together with JB), sample acquisition, blood processing, and MSC culture experiments, sample and data analysis, data interpretation and drafting of the manuscript (together with JB). HL: substantial contribution to the experimental design, help with blood processing, analysis, and data interpretation (blood processing). SA: substantial contribution to the experimental design, microbiological analysis, and data interpretation (microbiology). NB: substantial contribution to the experimental design and data interpretation (blood processing). MM: contribution to the experimental design, MSC culture experiments, sample analysis (MSC culture and differentiation). JM: contribution to the experimental

design, help with sample acquisition, histology, sample analysis (blood processing and MSC differentiation). VP: contribution to the experimental design, help with blood processing, and hematological sample analyses (blood processing). CS: substantial contribution to the experimental design, sample and data analysis, data interpretation, and drafting of the manuscript (flow cytometry experiments). JB: conception of the study and complete experimental design (together with AH), help with MSC culture experiments, data analysis, data interpretation and drafting of the manuscript (together with AH). All authors have critically revised the manuscript for important intellectual content and approved the publication of its content.

## FUNDING

This work was in part funded by the Akademie fuer Tiergesundheits e.V. (doctoral scholarship, AH).

## REFERENCES

- Anderson, L. D., Raub, R. H., Grieger, D. M., Morris, J., and Weber, J. D. (1998). Transforming growth factor- $\beta$ 1 concentrations in equine synovial fluid. *J. Equine Vet. Sci.* 18, 109–113. doi: 10.1016/S0737-0806(98)80289-X
- Astori, G., Amati, E., Bambi, F., Bernardi, M., Chierigato, K., Schäfer, R., et al. (2016). Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res. Ther.* 7:93. doi: 10.1186/s13287-016-0352-x
- Baker, M. (2016). Reproducibility: respect your cells! Numerous variables can torpedo attempts to replicate cell experiments, from the batch of serum to the shape of growth plates. But there are ways to ensure reliability. *Nature* 537, 433–435. doi: 10.1038/537433a
- Becherucci, V., Piccini, L., Casamassima, S., Bisin, S., Gori, V., Gentile, F., et al. (2018). Human platelet lysate in mesenchymal stromal cell expansion according to a GMP grade protocol: a cell factory experience. *Stem Cell Res. Ther.* 9:124. doi: 10.1186/s13287-018-0863-8
- Ben Azouza, N., Jenhani, F., Regaya, Z., Berraies, L., Ben Othman, T., Ducrocq, E., et al. (2012). Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. *Stem Cell Res. Ther.* 3:6. doi: 10.1186/s13287-012-0019-7
- Bieback, K. (2013). Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfus. Med. Hemother.* 40, 326–335. doi: 10.1159/000354061
- Blair, P., and Flaumenhaft, R. (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 23, 177–189. doi: 10.1016/j.blre.2009.04.001
- Blande, I. S., Bassaneze, V., Lavini-Ramos, C., Fae, K. C., Kalil, J., Miyakawa, A. A., et al. (2009). Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion* 49, 2680–2685. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02346.x
- Bonelli, F., Meucci, V., Divers, T. J., Wagner, B., Intorre, L., and Sgorbini, M. (2017). Kinetics of plasma procalcitonin, soluble CD14, CCL2 and IL-10 after a sublethal infusion of lipopolysaccharide in horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 184, 29–35. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.12.010
- Boswell, S. G., Schnabel, L. V., Mohammed, H. O., Sundman, E. A., Minas, T., and Fortier, L. A. (2014). Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am. J. Sports Med.* 42, 42–49. doi: 10.1177/0363546513507566
- Borzogianes, R., Magdesian, K. G., Sutton-Burges, J. W., Owens, S. D., and Tablin, F. (2019). Equine platelet concentrate preparation and validation. *J. Vet. Intern. Med.* 33, 1500–1506. doi: 10.1111/jvim.15472
- Braun, J., Hack, A., Weis-Klemm, M., Conrad, S., Tremel, S., Kohler, K., et al. (2010). Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 71, 1228–1236. doi: 10.2460/ajvr.71.10.1228
- Broecks, S. Y., Seys, B., Suls, M., Vandenberghe, A., Mariën, T., Adriaensens, E., et al. (2019). Equine allogeneic chondrogenic induced mesenchymal stem cells are an effective treatment for degenerative joint disease in horses. *Stem Cells Dev.* 28, 410–422. doi: 10.1089/scd.2018.0061
- Burnouf, T., Goubran, H. A., and Seghatchian, J. (2014). Multifaceted regenerative lives of expired platelets in the second decade of the 21<sup>st</sup> century. *Transfus. Apher. Sci.* 51, 107–112. doi: 10.1016/j.transci.2014.08.006
- Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M. B. C., and Schallmoser, K. (2016). Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 76, 371–387. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.065
- Chapman, H.-S., Gale, A. L., Dodson, M. E., Linardi, R. L., and Orved, K. F. (2020). Autologous Platelet lysate does not enhance chondrogenic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells despite increased TGF- $\beta$ 1 concentration. *Stem Cells Dev.* 29, 144–155. doi: 10.1089/scd.2019.0239
- Cholewa, D., Stiehl, T., Schellenberg, A., Bokermann, G., Joussen, S., Koch, C., et al. (2011). Expansion of adipose mesenchymal stromal cells is affected by human platelet lysate and plating density. *Cell Transplant.* 20, 1409–1422. doi: 10.3727/096368910X557218
- Corash, L. (2011). Bacterial contamination of platelet components: potential solutions to prevent transfusion-related sepsis. *Expert Rev. Hematol.* 4, 509–525. doi: 10.1586/hem.11.53
- Del Bue, M., Riccò, S., Conti, V., Merli, E., Ramoni, R., and Grolli, S. (2007). Platelet lysate promotes *in vitro* proliferation of equine mesenchymal stem cells and tenocytes. *Vet. Res. Commun.* 31, 289–292. doi: 10.1007/s11259-007-0099-z
- DeLong, J. M., Russell, R. P., and Mazzocca, A. D. (2012). Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy* 28, 998–1009. doi: 10.1016/j.arthro.2012.04.148
- Desjardins, I., Theoret, C., Joubert, P., Wagner, B., and Lavoie, J.-P. (2004). Comparison of TGF- $\beta$ 1 concentrations in bronchoalveolar fluid of horses affected with heaves and of normal controls. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 101, 133–141. doi: 10.1016/j.vetimm.2004.03.008
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, L., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905
- Donnelly, B. P., Nixon, A. J., Haupt, J. L., and Dahlgren, L. A. (2006). Nucleotide structure of equine platelet-derived growth factor-A and -B and expression in horses with induced acute tendonitis. *Am. J. Vet. Res.* 67, 1218–1225. doi: 10.2460/ajvr.67.7.1218
- Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Lljense, J.-R., Begot, L., Holy, X., et al. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute

- for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* 205, 228–236. doi: 10.1002/jcp.20391
- Erickson, G. A., Bolin, S. R., and Landgraf, J. G. (1991). Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. *Dev. Biol. Stand.* 75, 173–175.
- European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion (2020). *Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components*. Technical Report. Council of Europe.
- European Medicines Agency, London (2013). *Guideline on the Use of Bovine Serum in the Manufacture of Human Biological Medicinal Products*. Technical Report EMA/CHMP/BWP/457920/2012 rev 1. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). European Medicines Agency.
- Faraday, N., Scharpf, R. B., Dodd-o, J. M., Martinez, E. A., Rosenfeld, B. A., and Dorman, T. (2001). Leukocytes can enhance platelet-mediated aggregation and thromboxane release via interaction of P-selectin glycoprotein ligand 1 with P-selectin. *Anesthesiology* 94, 145–151. doi: 10.1097/0000542-200110000-00025
- Ferris, D. J., Frisbie, D. D., Kistiday, J. D., McIlwraith, C. W., Hague, B. A., Major, M. D., et al. (2014). Clinical outcome after intra-articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Vet. Surg.* 43, 255–265. doi: 10.1111/j.1532-950X.2014.12100.x
- Gilbertie, J. M., Long, J. M., Schubert, A. G., Berglund, A. K., Schaar, T. P., and Schnabel, L. V. (2018). Pooled platelet-rich plasma lysate therapy increases synovioyte proliferation and hyaluronic acid production while protecting chondrocytes from synovioyte-derived inflammatory mediators. *Front. Vet. Sci.* 5:150. doi: 10.3389/fvets.2018.00150
- Giraldo, C. E., López, C., Álvarez, M. E., Samudio, I. J., Prades, M., and Carmona, J. U. (2013). Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet. Res.* 9:29. doi: 10.1186/1746-6148-9-29
- Gittel, C., Brehm, W., Burk, J., Juelke, H., Staszky, C., and Ribitsch, I. (2013). Isolation of equine multipotent mesenchymal stromal cells by enzymatic tissue digestion or explant technique: comparison of cellular properties. *BMC Vet. Res.* 9, 1–14. doi: 10.1186/1746-6148-9-221
- Godwin, E. E., Young, N. J., Duthia, J., Beamish, I. C., and Smith, R. K. W. (2012). Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet. J.* 44, 25–32. doi: 10.1111/j.2042-3306.2011.00363.x
- Golebiowska, E. M., and Poole, A. W. (2015). Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 29, 153–162. doi: 10.1016/j.blre.2014.10.003
- Gottipamula, S., Sharma, A., Krishnamurthy, S., Majumdar, A. S., and Seetharam, R. N. (2012). Human platelet lysate is an alternative to fetal bovine serum for large-scale expansion of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biotechnol. Lett.* 34, 1367–1374. doi: 10.1007/s10529-012-0893-8
- Griffiths, S., Baraniak, P. R., Copland, I. B., Nerem, R. M., and McDevitt, T. C. (2013). Human platelet lysate stimulates high-passage and senescent human multipotent mesenchymal stromal cell growth and rejuvenation *in vitro*. *Cytotherapy* 15, 1469–1483. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.020
- Grimaud, E., Heymann, D., and Rédini, F. (2002). Recent advances in TGF- $\beta$  effects on chondrocyte metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 241–257. doi: 10.1016/S1359-6101(02)00004-7
- Grogan, S. P., Barbero, A., Winkelmann, V., Rieser, F., Fitzsimmons, J. S., O'Driscoll, S., et al. (2006). Visual histological grading system for the evaluation of *in vitro*-generated neocartilage. *Tissue Eng.* 12, 2141–2149. doi: 10.1089/ten.2006.12.2141
- Gstraunthaler, G. (2003). All $\beta$ es to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX* 20, 275–281.
- Gulliksson, H. (2012). Platelets from platelet-rich-plasma versus buffy-coated-platelets: what is the difference? *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 34, 76–77. doi: 10.5581/1516-8484.20120024
- Hackett, C. H., Flaminio, M. J., and La, F. (2011). Analysis of CD14 expression levels in putative mesenchymal progenitor cells isolated from equine bone marrow. *Stem Cells Dev.* 20, 721–735. doi: 10.1089/scd.2010.0175
- Hawkes, P. W. (2015). Fetal bovine serum: geographic origin and regulatory relevance of viral contamination. *Bioresour. Bioprocess.* 2:34. doi: 10.1186/s40643-015-0063-7
- Hillmann, A., Ahrberg, A. B., Brehm, W., Heller, S., Josten, C., Paebs, F., et al. (2016). Comparative characterization of human and equine mesenchymal stromal cells: a basis for translational studies in the equine model. *Cell Transplant.* 25, 109–124. doi: 10.3727/096368915X687822
- Hoareau, G. L., Jandrey, K. E., Burges, J., Bremer, D., and Tabin, F. (2014). Comparison of the platelet-rich plasma and buffy coat protocols for preparation of canine platelet concentrates. *Vet. Clin. Pathol.* 43, 513–518. doi: 10.1111/vcp.12195
- Hodgson, J. (1995). To treat or not to treat: that is the question for serum: as regulations on serum importation stagnate the industry moves toward treatment options. *Biotechnology* 13, 333–334; 337–338; 341–343. doi: 10.1038/nbt0495-333
- Horn, P., Bokermann, G., Cholewa, D., Bork, S., Walenda, T., Koch, C., et al. (2010). Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 12, 888–898. doi: 10.3109/14653249.2010.501788
- Ionita, J.-C., Kissich, C., Gottschalk, J., Einspanier, A., Köller, G., Winter, K., et al. (2014). Comparison of cellular and growth factor concentrations in equine Autologous Conditioned Plasma® (ACP) and manually prepared Platelet Rich Plasma (mPRP). *PHK* 30, 195–201. doi: 10.21836/PEM20140208
- Jayne, D. W., Epstein, D. A., and Conrad, D. R. (1988). Fetal bovine serum alternatives. *Nature* 334, 547–548. doi: 10.1038/334547a0
- Jochems, C. E. A., van der Valk, J. B. F., Stafleu, F. R., and Baumann, V. (2002). The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern. Lab. Anim.* 30, 219–227. doi: 10.1177/026119290203000208
- Kabithé, E., Hillegas, J., Stokol, T., Moore, J., and Wagner, B. (2010). Monoclonal antibodies to equine CD14. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 138, 149–153. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.07.003
- Karnieli, O., Friedner, O. M., Allickson, J. G., Zhang, N., Jung, S., Fiorentini, D., et al. (2017). A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy* 19, 155–169. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.11.011
- Klatte-Schulz, F., Schmidt, T., Uckert, M., Scheffler, S., Kalus, U., Rojewski, M., et al. (2018). Comparative analysis of different platelet lysates and platelet rich preparations to stimulate tendon cell biology: an *in vitro* study. *Int. J. Mol. Sci.* 19:212. doi: 10.3390/ijms19010212
- Kydd, J., Antczak, D. F., Allen, W. R., Barbis, D., Butcher, G., Davis, W., et al. (1994). Report of the First International Workshop on Equine Leucocyte Antigens, Cambridge, UK, July 1991. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 42, 3–60. doi: 10.1016/0165-2427(94)90088-4
- Lana, J. F., Macedo, A., Ingraio, I. L. G., Huber, S. C., Santos, G. S., and Santana, M. H. A. (2019). Leucocyte-rich PRP for knee osteoarthritis: current concepts. *J. Clin. Orthop. Trauma* 10, S179–S182. doi: 10.1016/j.jcot.2019.01.011
- Larson, E. M., Babasyan, S., and Wagner, B. (2020). Phenotype and function of IgE-binding monocytes in equine *Culicoides* hypersensitivity. *PLoS ONE* 15:e0233537. doi: 10.1371/journal.pone.0233537
- Lunn, D. P., Holmes, M. A., Antczak, D. F., Agerwal, N., Baker, J., Bendali-Ahcene, S., et al. (1998). Report of the Second Equine Leucocyte Antigen Workshop, Squaw Valley, California, July 1995. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62, 101–143. doi: 10.1016/S0165-2427(97)00160-8
- Malikides, N., Mollison, P. J., Reid, S. W., and Murray, M. (2000). Haematological responses of repeated large volume blood collection in the horse. *Res. Vet. Sci.* 68, 275–278. doi: 10.1053/rvsc.2000.0376
- Mariñas-Pardo, L., García-Castro, J., Rodríguez-Hurtado, I., Rodríguez-García, M. I., Núñez-Naveira, L., and Hermida-Prieto, M. (2018). Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Horse Allo 20) for the treatment of osteoarthritis-associated lameness in horses: characterization, safety, and efficacy of intra-articular treatment. *Stem Cells Dev.* 27, 1147–1160. doi: 10.1089/scd.2018.0074
- McClain, A. K., and McCarrel, T. M. (2019). The effect of four different freezing conditions and time in frozen storage on the concentration of commonly measured growth factors and enzymes in equine platelet-rich plasma over six months. *BMC Vet. Res.* 15:292. doi: 10.1186/s12917-019-2040-4
- Mishra, A., Tummala, P., King, A., Lee, B., Kraus, M., Tse, V., et al. (2009). Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng. C Methods* 15, 431–435. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0534
- Mohammadi, S., Nikbakht, M., Malek Mohammadi, A., Zahed Panah, M., Ostadali, M. R., Nasiri, H., et al. (2016). Human platelet lysate as a xeno free alternative of

- fetal bovine serum for the *in vitro* expansion of human mesenchymal stromal cells. *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* 10, 161–171.
- Mojica-Henshaw, M. P., Jacobson, P., Morris, J., Kelley, L., Pierce, J., Boyer, M., et al. (2013). Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy* 15, 1458–1468. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.06.014
- Naskou, M. C., Sumner, S., Berenzny, A., Copland, I. B., and Peroni, J. F. (2019). Fibrinogen-depleted equine platelet lysate affects the characteristics and functionality of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 28, 1572–1580. doi: 10.1089/scd.2019.0070
- Naskou, M. C., Sumner, S. M., Chocallo, A., Kemelmakher, H., Thoresen, M., Copland, I., et al. (2018). Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 9:75. doi: 10.1186/s13287-018-0823-3
- Pacini, S., Spinabella, S., Trombi, L., Fazzi, R., Galimberti, S., Dini, F., et al. (2007). Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.* 13, 2949–2955. doi: 10.1089/ten.2007.0108
- Paebst, F., Pichler, D., Brehm, W., Heller, S., Schroeck, C., Tárnok, A., et al. (2014). Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: an approach toward a standardized definition. *Cytometry A* 85, 678–687. doi: 10.1002/cyto.a.22491
- Patel, R. S., Tomlinson, J. E., Divers, T. J., van de Walle, G. R., and Rosenberg, B. R. (2020). Single cell resolution landscape of equine peripheral blood mononuclear cells reveals diverse immune cell subtypes including T-bet + B cells. Available online at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.077362v1> doi: 10.1101/2020.05.077362 (accessed October 02, 2020).
- Pilz, G. A., Braun, J., Ulrich, C., Felka, T., Warstat, K., Ruh, M., et al. (2011). Human mesenchymal stromal cells express CD14 cross-reactive epitopes. *Cytometry A* 79, 635–645. doi: 10.1002/cyto.a.21073
- Prins, H. J., Rozemuller, H., Vonk-Griffioen, S., Verweij, V. G., Dhert, W. J., Slaper-Cortenbach, I. C., et al. (2009). Bone-forming capacity of mesenchymal stromal cells when cultured in the presence of human platelet lysate as substitute for fetal bovine serum. *Tissue Eng. Part A* 15, 3741–3751. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0666
- Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vázquez, F. J., Remacha, A. R., Bernal, M. L., et al. (2011). Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144, 147–154. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.06.033
- Renzi, S., Riccio, S., Dotti, S., Sesso, L., Grolli, S., Cornali, M., et al. (2013). Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: a clinical report. *Res. Vet. Sci.* 95, 272–277. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.01.017
- Roscher, K. (2019). *Platelets in equids - an underrated biomarker?* DVG Service GmbH. Available online at: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2019/14904/> (accessed October 01, 2020).
- Rubio-Azpeitia, E., and Andia, I. (2014). Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: *in vitro* experience. *Muscles Ligaments Tendons J.* 4, 52–62. doi: 10.11138/mltj/2014.4.1.052
- Ruifrok, A. C., and Johnston, D. A. (2001). Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 23, 291–299.
- Russell, K. A., and Koch, T. G. (2016). Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture - too much of a good thing? *Equine Vet. J.* 48, 261–264. doi: 10.1111/evj.12440
- Schallmoser, K., Bartmann, C., Rohde, E., Reinisch, A., Kashofer, K., Stadelmeyer, E., et al. (2007). Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion* 47, 1436–1446. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01220.x
- Schallmoser, K., Henschler, R., Gabriel, C., Koh, M. B. C., and Burnouf, T. (2020). Production and quality requirements of human platelet lysate: a position statement from the working party on cellular therapies of the international society of blood transfusion. *Trends Biotechnol.* 38, 13–23. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.06.002
- Schallmoser, K., Rohde, E., Bartmann, C., Obenaus, A. C., Reinisch, A., and Strunk, D. (2009). Platelet-derived growth factors for GMP-compliant propagation of mesenchymal stromal cells. *Biomed. Mater. Eng.* 19, 271–276. doi: 10.3233/BME-2009-0591
- Schauer, C., de Meyer, E., van de Walle, G. R., and van Soom, A. (2011). Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology* 75, 1431–1443. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.008
- Schauer, C., de Piepers, S., van de Walle, G. R., Demeyere, K., Hoogewijs, M. K., Govaere, J. L. J., et al. (2012). In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry A* 81, 312–323. doi: 10.1002/cyto.a.22026
- Schauer, C., de van de Walle, G. R., van Soom, A., and Meyer, E. (2013). Mesenchymal stem cell therapy in horses: useful beyond orthopedic injuries? *Vet. Q.* 33, 234–241. doi: 10.1080/01652176.2013.800250
- Schnabel, C. L., Babayyan, S., Freer, H., and Wagner, B. (2019). CXCL10 production in equine monocytes is stimulated by interferon-gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 207, 25–30. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.11.016
- Schubert, S., Brehm, W., Hillmann, A., and Burk, J. (2018). Serum-free human MSC medium supports consistency in human but not in equine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cell culture. *Cytometry A* 93, 60–72. doi: 10.1002/cyto.a.23240
- Seo, J.-p., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., et al. (2013). Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for *in vitro* expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Res. Vet. Sci.* 95, 693–698. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.04.024
- Shih, D. T.-B., Chen, J.-C., Chen, W.-Y., Kuo, Y.-P., Su, C.-Y., and Burnouf, T. (2011). Expansion of adipose tissue mesenchymal stromal progenitors in serum-free medium supplemented with virally inactivated allogeneic human platelet lysate. *Transfusion* 51, 770–778. doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02915.x
- Smith, R. K. W. (2003). Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet. J.* 35, 99–102. doi: 10.2746/042516403775467388
- Stokol, T. (2020). Hematology red flags: the value of blood smear examination in horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 36, 15–33. doi: 10.1016/j.cveq.2019.11.001
- Sumner, S. M., Naskou, M. C., Thoresen, M., Copland, I., and Peroni, J. F. (2017). Platelet lysate obtained via plateletpheresis performed in standing and awake equine donors. *Transfusion* 57, 1755–1762. doi: 10.1111/trf.14124
- Sundin, M., Ringdén, O., Sundberg, B., Nava, S., Götherström, C., and Le Blanc, K. (2007). No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica* 92, 1208–1215. doi: 10.3324/haematol.11446
- Tesfaigzi, M. D. (2006). *CD14 - an overview* | ScienceDirect Topics. Available online at: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/cd14> (accessed October 01, 2020).
- Textor, J. A., and Tablin, F. (2012). Activation of equine platelet-rich plasma: comparison of methods and characterization of equine autologous thrombin. *Vet. Surg.* 41, 784–794. doi: 10.1111/j.1532-950X.2012.01016.x
- Trento, C., Bernardo, M. E., Nagler, A., Kuçi, S., Bornhäuser, M., Köhl, U., et al. (2018). Manufacturing mesenchymal stromal cells for the treatment of graft-versus-host disease: a survey among centers affiliated with the European society for blood and marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 24, 2365–2370. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.07.015
- van der Valk, J., Brunner, D., Smet, K., de Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L. E., et al. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicol. In Vitro* 24, 1053–1063. doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.016
- van der Valk, J., Mellor, D., Brands, R., Fischer, R., Gruber, F., Gstraunthaler, G., et al. (2004). The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol. In Vitro* 18, 1–12. doi: 10.1016/j.tiv.2003.08.009
- van Kuppeveld, F. J., van der Logt, J. T., Angulo, A. F., van Zoest, M. J., Quint, W. G., Niesters, H. G., et al. (1992). Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2606–2615. doi: 10.1128/AEM.58.8.2606-2615.1992

- Wagner, B., Ainsworth, D. M., and Freer, H. (2013). Analysis of soluble CD14 and its use as a biomarker in neonatal foals with septicemia and horses with recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 155, 124–128. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.05.018
- Wildt-Eggen, J., de Schrijver, J. G., and Bins, M. (2001). WBC content of platelet concentrates prepared by the buffy coat method using different processing procedures and storage solutions. *Transfusion* 41, 1378–1383. doi: 10.1046/j.1537-2995.2001.41111378.x
- World Health Organization (2006). *WHO Guidelines on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies*. Available online at: <https://www.who.int/bloodproducts/cs/TSE/PUBLISHEDREPORT.pdf?ua=1> (accessed October 02, 2020).
- Yaneselli, K., Barrachina, L., Remacha, A. R., Algorta, A., Vitoria, A., Cequier, A., et al. (2019). Effect of allogeneic platelet lysate on equine bone marrow derived mesenchymal stem cell characteristics, including immunogenic and immunomodulatory gene expression profile. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 217:109944. doi: 10.1016/j.vetimm.2019.109944
- Zheng, X., Baker, H., Hancock, W. S., Fawaz, F., McCaman, M., and Pungor, E. (2006). Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnol. Prog.* 22, 1294–1300. doi: 10.1021/bp060121o

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

Copyright © 2021 Hagen, Lehmann, Aurich, Bauer, Melzer, Moellerberndt, Patané, Schnabel and Burk. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

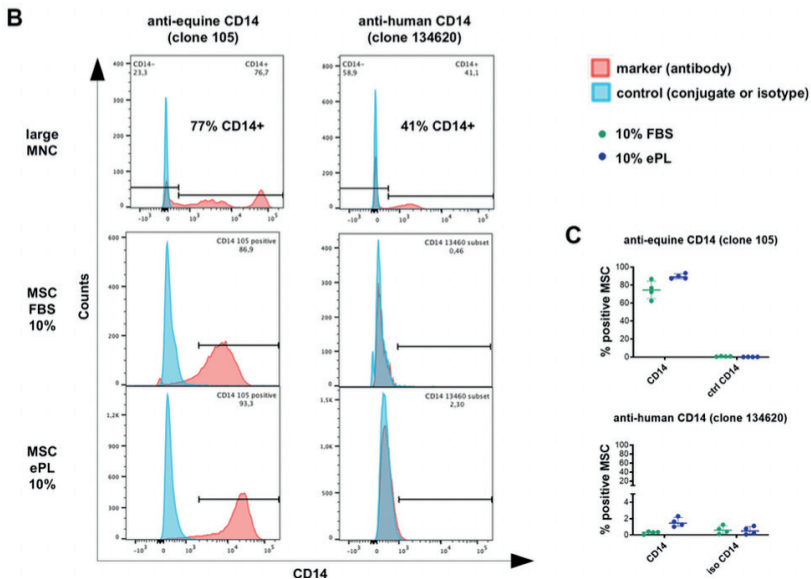
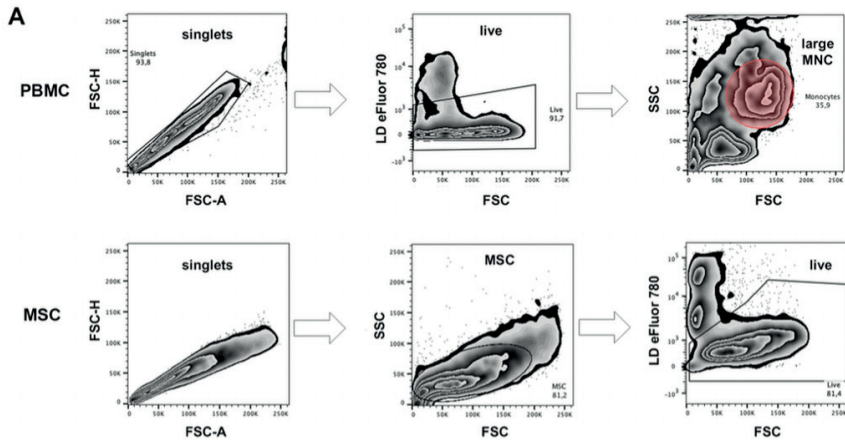
Hagen et al., Supplementary file 1:  
Adapted Grogan score for semiquantitative analysis of chondrogenic differentiation

Score categories	Score
<b>A) Uniformity and lightblue*<sup>1</sup>/ blueish*<sup>2</sup> of Alcian blue/ Masson's Trichrome stain</b>	
No stain	0
Weak staining of poorly formed matrix	1
Moderately even staining	2
Even strong stain	3
<b>B) Distance between cells/ amount of matrix accumulated</b>	
High cell densities with no matrix in between (no spacing between cells)	0
High cell densities with little matrix in between (cells < 1 cell-size apart)	1
Moderate cell density with matrix (cells approx. 1 cell-size apart)	2
Low cell density with moderate distance between cells (> 1 cell) and an extensive matrix	3
<b>C) Cell morphologies represented</b>	
Condensed/ necrotic/ pycnotic bodies	0
Spindle/ fibrous	1
Mixed spindle/ fibrous with rounded chondrogenic morphology	2
Majority rounded/ chondrogenic	3
<b>D) % of differentiated areas of the pellet in field of view (10x magnification)</b>	
0 - 5%	0
5 - 30%	1
30 - 60%	2
60 - 100%	3
* <sup>1</sup> = Alcian blue staining	
* <sup>2</sup> = Masson's Trichrome staining	

Hagen et al., Supplementary file 2:

Flow cytometric analysis of CD14 expression on equine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and equine mesenchymal stromal cells (MSC) using the antibody clones 105 and 134620

Equine cryopreserved PBMC after 2 h medium incubation or mechanically detached MSC cultured with 10% fetal bovine serum (FBS) or 10% equine platelet lysate (ePL) were stained for surface CD14 and analyzed by flow cytometry. Either biotinylated anti-equine CD14 clone 105 (Kabithé et al., 2010) was used (followed by Streptavidin-APC) or anti-human CD14 clone 13460 (Paebst et al., 2013) (directly conjugated with APC). The gating strategies are illustrated for each cell type by zebra plots; large mononuclear cells (MNC) in PBMC comprise mainly monocytes and few large lymphocytes (A). Examples of overlaid histograms of the surface marker staining and the respective conjugate or isotype control are shown (B). The frequencies of surface marker positive MSC as % of live MSC are plotted, horizontal bars mark the median and interquartile range of n=4 (C).



#### 4.2 Publikation 2 (Funktionelle Eigenschaften der eMSC mit ePL-Medium)

##### **Functional properties of equine adipose-derived mesenchymal stromal cells cultured with equine platelet lysate**

Alina Hagen<sup>1</sup>, Sabine Niebert<sup>1</sup>, Vivian-Pascal Brandt<sup>2</sup>, Heidrun Holland<sup>2</sup>, Michaela Melzer<sup>1</sup>, Axel Wehrend<sup>3</sup> und Janina Burk<sup>1\*</sup>

Frontiers in Veterinary Science 2022; 9: 890302

DOI: 10.3389/fvets.2022.890302

*<sup>1</sup> Equine Clinic (Surgery, Orthopedics), Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany*

*<sup>2</sup> Saxon Incubator for Clinical Translation (SIKT), University of Leipzig, Leipzig, Germany*

*<sup>3</sup> Clinic for Obstetrics, Gynecology and Andrology of Large and Small Animals, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany*



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Cristina Esteves,  
University of Edinburgh,  
United Kingdom

REVIEWED BY  
Lyndah Chow,  
Colorado State University,  
United States  
Lauren Virginia Schnabel,  
North Carolina State University,  
United States

\*CORRESPONDENCE  
Janina Burk  
janina.burk@vetmed.uni-giessen.de

SPECIALTY SECTION  
This article was submitted to  
Veterinary Regenerative Medicine,  
a section of the journal  
Frontiers in Veterinary Science

RECEIVED 05 March 2022  
ACCEPTED 11 July 2022  
PUBLISHED 09 August 2022

CITATION  
Hagen A, Niebert S, Brandt V-P,  
Holland H, Melzer M, Wehrend A and  
Burk J (2022) Functional properties of  
equine adipose-derived mesenchymal  
stromal cells cultured with equine  
platelet lysate.  
*Front. Vet. Sci.* 9:890302.  
doi: 10.3389/fvets.2022.890302

COPYRIGHT  
© 2022 Hagen, Niebert, Brandt,  
Holland, Melzer, Wehrend and Burk.  
This is an open-access article  
distributed under the terms of the  
[Creative Commons Attribution License  
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or  
reproduction in other forums is  
permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s)  
are credited and that the original  
publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic  
practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# Functional properties of equine adipose-derived mesenchymal stromal cells cultured with equine platelet lysate

Alina Hagen<sup>1</sup>, Sabine Niebert<sup>1</sup>, Vivian-Pascal Brandt<sup>2</sup>,  
Heidrun Holland<sup>2</sup>, Michaela Melzer<sup>1</sup>, Axel Wehrend<sup>3</sup> and  
Janina Burk<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Equine Clinic (Surgery, Orthopedics), Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany, <sup>2</sup>Saxon Incubator for Clinical Translation (SIKT), University of Leipzig, Leipzig, Germany, <sup>3</sup>Clinic for Obstetrics, Gynecology and Andrology of Large and Small Animals, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany

Successful translation of multipotent mesenchymal stromal cell (MSC)-based therapies into clinical reality relies on adequate cell production procedures. These should be available not only for human MSC, but also for MSC from animal species relevant to preclinical research and veterinary medicine. The cell culture medium supplementation is one of the critical aspects in MSC production. Therefore, we previously established a scalable protocol for the production of buffy-coat based equine platelet lysate (ePL). This ePL proved to be a suitable alternative to fetal bovine serum (FBS) for equine adipose-derived (AD-) MSC culture so far, as it supported AD-MSC proliferation and basic characteristics. The aim of the current study was to further analyze the functional properties of equine AD-MSC cultured with the same ePL, focusing on cell fitness, genetic stability and pro-angiogenic potency. All experiments were performed with AD-MSC from  $n = 5$  horses, which were cultured either in medium supplemented with 10% FBS, 10% ePL or 2.5% ePL. AD-MSC cultured with 2.5% ePL, which previously showed decreased proliferation potential, displayed higher apoptosis but lower senescence levels as compared to 10% ePL medium ( $p < 0.05$ ). Non-clonal chromosomal aberrations occurred in 8% of equine AD-MSC cultivated with FBS and only in 4.8% of equine AD-MSC cultivated with 10% ePL. Clonal aberrations in the AD-MSC were neither observed in FBS nor in 10% ePL medium. Analysis of AD-MSC and endothelial cells in an indirect co-culture revealed that the ePL supported the pro-angiogenic effects of AD-MSC. In the 10% ePL group, more vascular endothelial growth factor (VEGF-A) was released and highest VEGF-A concentrations were reached in the presence of ePL and co-cultured cells ( $p < 0.05$ ). Correspondingly, AD-MSC expressed the VEGF receptor-2 at higher levels in the presence of ePL ( $p < 0.05$ ). Finally, AD-MSC and 10% ePL together promoted the growth of endothelial cells and induced the formation of vessel-like structures in two of the samples. These data further substantiate that buffy-coat-based ePL is a valuable supplement for equine AD-MSC culture

media. The ePL does not only support stable equine AD-MSc characteristics as demonstrated before, but it also enhances their functional properties.

## KEYWORDS

mesenchymal stromal cells (MSC), platelet lysate, equine, cell fitness, functional properties, co-cultivation

## Introduction

Mesenchymal stromal cells (MSC) offer regenerative properties, but their potency depends on several environmental factors, including cell culture conditions. *In vitro* cultivation of MSC is inevitable to obtain a sufficiently large number of MSC for therapeutic applications, as MSC are only present in small numbers in their tissue of origin (1, 2). During this *in vitro* cultivation, the culture conditions strongly influence the cell quality and efficacy of therapy (3). The culture medium, which is required to provide the MSC with nutrients and growth factors, is one of the most important elements of the culture conditions. The current gold standard supplement to basal medium for *in vitro* cultivation of many cell types, including MSC, is fetal bovine serum (FBS) (4–7). However, the use of FBS is not without problems and a reduction or replacement of FBS was recommended by the European Medicines Agency (EMA) (8) and the International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT) (3). As platelet lysate is a promising cell culture supplement and it already replaces FBS in human medicine in 77% of good manufacturing practice protocols (9), equine platelet lysate (ePL) could replace FBS in equine MSC culture in an analogous way. Several studies have already shown that ePL is a suitable alternative for FBS in equine MSC culture and that basic MSC characteristics are not altered with ePL (10–14). Nevertheless, conflicting results have also been reported, showing a dose-dependent proliferation of equine MSC with ePL in two studies (15, 16), with MSC proliferation decreasing at ePL concentrations higher than 30% (15). In another study, in which platelet-derived growth factors were not released by freeze-thaw cycles but by CaCl<sub>2</sub> activation, an adversely altered morphology of equine BM-MSc was described (17). The studies on ePL published so far by several research groups have used neither uniform protocols for the preparation of the platelet concentrates nor for the activation or release of the platelet-derived factors, which limits the comparability between the different studies. Therefore, we have previously reported the first scalable buffy-coat-based protocol for ePL production, and we have shown that this ePL supports equine AD-MSc expansion and differentiation similar to FBS when used in the same concentration (10%) (13, 14). Yet, as MSC are capable to adapt their functions to their environment (18, 19), prior to its introduction into the clinically used protocol, it remains crucial to further

investigate the effects of ePL on MSC fitness, safety and functional characteristics.

Alterations in cell fitness can be triggered by stress factors in the cell culture conditions. The same stressors can influence the cell cycle of MSC in different ways, which entail a mitotically inactive, senescent state or the programmed cell death, apoptosis (20). In contrast to this, irreversible cell damage results in necrosis, a passive cell death that is accompanied by an inflammatory reaction (21). During MSC expansion culture, stressors should be kept at a minimum, resulting in low levels of cell death or senescence.

Regarding the safety of a cell-based product, its genomic integrity is of major relevance (22). The genetic stability of human MSC after cultivation with human PL (hPL) has already been investigated several times (23–25). In this context, a comparable or even higher genetic stability was already shown with hPL compared to FBS (23, 24). However, the genetic stability of equine MSC has so far only been studied with FBS (22, 26–28). For this reason, in the present study, we analyzed the genetic stability of equine AD-MSc cultivated with either FBS or ePL.

The best-known functional properties of MSC rely on the modulation and support of other cell types by paracrine signaling and cell-to-cell contacts. Neovascularization represents a critical issue in wound healing and tissue regeneration, because anabolic processes and the survival of (cell) transplants strongly rely on sufficient oxygen and nutrient supply. Studies investigating the effect of MSC in wound healing have not yielded consistent results in clinical trials (29, 30). Nevertheless, it was shown that human MSC have a positive effect on the treatment of ischemic tissue by releasing angiogenic factors (29). In addition, others demonstrated that platelets or platelet-containing preparations can be used to promote the regenerative potential of human AD-MSc (30) and several studies have reported an improved therapeutic efficacy of MSC from different sources induced by platelet rich plasma (31–33). After numerous promising studies have reported the preservation of the basic characteristics of human BM- and AD-MSc with hPL (34–37), and functional studies using hPL (38, 39) have also been carried out in human medicine, the time has come to perform functional assays for ePL as well.

In the present study, we aimed to test whether the cell fitness and angiogenic potency of the equine AD-MSC is synergistically supported by ePL, comparing MSC cultivated with FBS or ePL in terms of their apoptotic, necrotic and senescent state, genetic stability as well as their angiogenic potency.

## Materials and methods

### AD-MSC culture, cell fitness analysis and karyotyping

#### AD-MSC culture with FBS and PL media supplements

Adipose-derived (AD-) MSC were obtained from seven horses aged 2 to 8 years (median: 5 years; IQR: 2), either after euthanasia due to unrelated reasons or within the framework of a previous study approved by the respective local authority (Landesdirektion Leipzig, TV34/13). AD-MSC isolation was performed by collagenase digestion in accordance to the protocol described in (40). The AD-MSC were expanded in FBS-supplemented culture medium and then cryopreserved in passage (P) 1, in cryomedium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 1 g/L glucose; Gibco<sup>®</sup>, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Germany) with 40% FBS and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich GmbH, München, Germany) using a freezing container (Mr Frosty, Nalgene, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Germany), and stored in liquid nitrogen.

For the current experiments, the cells were thawed and seeded in DMEM supplemented with 10% FBS (Lot: 2078409, Gibco<sup>™</sup>, ThermoFisher Scientific), 10% ePL or 2.5% ePL. To all media, 1% penicillin-streptomycin and 0.1% gentamycin were added. To ePL media, 1 U/ml heparin-natrium (B. Braun, Melsungen, Germany) was additionally added. The ePL used in this study had been produced from whole blood obtained from  $n = 19$  horses (approved by the regional council Giessen, A14/2019) using a buffy-coat based protocol as previously described (13). This protocol included production of a platelet concentrate with 4.2-fold increased platelet concentrations and 0.4-fold decreased white blood cell concentrations, and freeze/thaw cycles to lyse the platelets before the lysates from all donors were pooled.

AD-MSC were cultivated in the respective culture media under standard culture conditions (humidified atmosphere, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) for at least one passage prior to their use in the experiments to allow for adaptation to the culture media. All experiments were carried out using AD-MSC from  $n = 5$  donors as biological replicates, whereby the same donors were used for the AD-MSC

cell fitness analyses and the karyotyping, or the co-culture experiment, respectively.

#### Apoptosis and necrosis assay

An apoptosis and necrosis live-cell assay (catalog#: JA1011, RealTime-Glo<sup>™</sup> Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay, Promega, Mannheim, Germany) was performed in P3 and P5 to analyze cell death. This involved measuring the apoptosis marker phosphatidylserine on the outer cell membrane and determining the level of necrosis using a fluorescent and cell-impermeable DNA dye. For this purpose, the AD-MSC were seeded at 5,000 cells/cm<sup>2</sup> in a 96-well plate and the assay was performed according to the manufacturer's instructions. On day 5, the extent of apoptosis was determined by luminescence measurement and the intensity of necrosis by fluorescence measurement, using an Infinite M PLEX plate reader (Tecan Ltd., Maennedorf, Switzerland).

#### Senescence assay

To evaluate the aging process of the AD-MSC, a cellular senescence activity assay [catalog#: ENZ-KIT129-0120, Enzo Life Sciences (ELS) AG, Lausen, Switzerland] was performed according to the manufacturer's instructions in P3 and P5. For this purpose, the AD-MSC were seeded at 3,000 cells/cm<sup>2</sup> in a 12-well plate and incubated for 5 days, with a medium change on day 3. On day 5, the medium was removed and after a washing step with phosphate-buffered saline (PBS), AD-MSC were lysed on ice with a lysis buffer containing 0.5% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and a cell scraper. The lysate was centrifuged at 14,000 x g for 10 min at 4 °C and the supernatant was frozen at -80 °C. When all samples had been collected, they were thawed and SA- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) activity was measured using the fluorescent substrate in the Infinite M PLEX plate reader.

#### Karyotype analyses

The equine karyotype analysis was conducted according to a previously described protocol for equine stem cells (41). Chromosome preparation was performed on P5 AD-MSC monolayer cultures in 10% FBS or 10% ePL medium, using standard cytogenetic techniques (colcemid treatment, hypotonic treatment and methanol/acetic acid fixation). GTG analyses were carried out according to (42, 43) for cytogenetic analyses on metaphase cells. In total, 125 metaphase cells per group (25 metaphase cells per sample) were analyzed to exclude clonal occurrence of chromosomal aberrations.

## Endothelial cell culture and angiogenesis assays

### Collection of umbilical cord arteries and endothelial cell isolation

Umbilical cords from 4 foals were collected immediately after birth and 10 cm length of the umbilical cord was placed in a jar with PBS and 5% penicillin-streptomycin for transport. In the laboratory, the umbilical cord was first washed in 70% ethanol and then again in PBS. Next, the vein and Wharton's jelly tissue were removed and the umbilical arteries were carefully dissected. One artery was used to recover endothelial cells for co-culture experiments as described below, and the other artery was subjected to an arterial ring assay as described in [Supplementary material 1](#). In order to obtain the endothelial cells, the respective umbilical artery was filled with collagenase I [Gibco™, ThermoFisher Scientific; 0.8 mg/ml in Hank's Balanced Salt Solution (HyClone Laboratories, Logan, Utah, USA)] and the ends were closed with clamps. Then the umbilical artery was incubated for 30 min at 37 °C and massaged twice during this time. After the incubation period, the content of the artery was transferred to a centrifuge tube and the artery was massaged again while washed with PBS, which was also transferred to the same centrifuge tube thereafter. The isolated cells were pelleted (390 x g, 5 min), washed with PBS and seeded in tissue-culture-coated flasks in FBS-supplemented medium until cryopreservation in liquid nitrogen.

### Co-culture of AD-MSC and endothelial cells

For the co-culture, a 12-well transwell system was used and the wells representing the bottom compartment were filled with 600 µl of either rat collagen I matrix (Cultrex, Minneapolis, MN, USA) or ePL matrix. The rat collagen I matrix was prepared according to the manufacturer's instructions. The ePL matrix consisted of DMEM, 10% ePL and 1% penicillin-streptomycin, and coagulation of the matrix was allowed in the absence of heparin. The matrices were prepared 24 h before seeding the cells.

Next, P3 AD-MSC from five horses were co-cultured with P3 endothelial cells from one foal. For this purpose,  $2.5 \times 10^4$  endothelial cells per well were seeded on the matrices and  $1.0 \times 10^4$  AD-MSC were seeded per insert (0.4 µm PET insert; Falcon® Cell Culture Inserts, Corning, NY, USA). Wells with collagen matrix were filled with 10% FBS-supplemented medium and wells with ePL matrix were filled with 10% ePL-supplemented medium, and cells were incubated for three days. Controls using AD-MSC from each donor or the endothelial cells only were prepared correspondingly.

### Vascular endothelial growth factor in ePL and cell culture supernatants

To analyze the level of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) in the cell culture supernatants from the co-cultivation of the endothelial cells and AD-MSC, an equine VEGF-A ELISA (catalog#: ELE-VEGFA, Ray Biotech, Norcross, GA, USA) was performed according to the manufacturer's instructions. For this purpose, the cell culture supernatants were obtained on the third day of co-cultivation and frozen at -80 °C until the assay was performed. The ELISA was read on the Infinite M PLEX plate reader. Data from the cell culture supernatants were normalized by subtracting the results from the respective cell culture media before further comparison.

### Fluorescence staining and microscopy

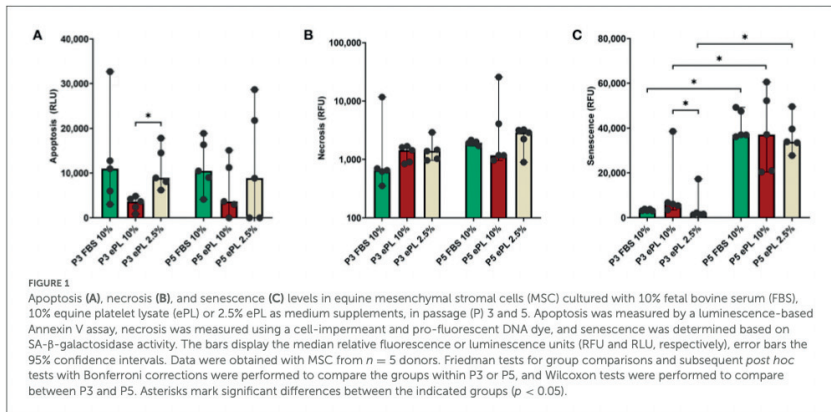
For morphological evaluation, endothelial cells were stained with lectin (Lectin from *Bandeiraea simplicifolia*, FITC conjugated, Sigma Aldrich) and AD-MSC were stained with phalloidin (Dylight™ 554 Phalloidin, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); DAPI (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) was used for counterstaining of nuclei. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Carl Roth GmbH) for 30 min. Then the endothelial cells were permeabilized with PBS (containing  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ ) + 0.25% Triton X-100 (Carl Roth GmbH) for 30 min at room temperature. Next, 5% bovine serum albumin (Carl Roth GmbH), dissolved in distilled water, was added as a blocking solution for 30 min at 37 °C. After removing the blocking solution, the lectin (0.1 mg/ml, diluted in 0.9% saline solution) was added and incubated overnight at 4 °C. The AD-MSC were stained with phalloidin (1:200) for 30 min. Cells were washed with PBS + 0.1% Triton X-100 three times for 15 min, then DAPI (1:1000) was added for 30 min for nuclear staining. Directly after staining of the endothelial cells and AD-MSC, three images were obtained from each replicate at standardized settings using a Leica DMI6000 B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Photomicrographs were analyzed using Fiji ImageJ software to determine endothelial cell counts.

### Quantitative RT-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

The relative gene expression of angiogenesis-related factors ([Table 1](#)) in AD-MSC was analyzed by qRT-PCR. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1 (HPRT1) were used as reference genes. Total RNA of the AD-MSC was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with an on-column DNase treatment, according to the manufacturer's instructions. The obtained RNA was converted to cDNA using the Reverse Transcriptase RevertAid

TABLE 1 Equine primers for real-time PCR.

Gene	Primer sequence	Accession no.	PCR product (bp)
eGAPDH	For: CGATGGTGAAGTCTGGAGTAAA Rev: TGGCGACAATATCCACTTTGC	NM_001163856.1	93
eHPRT1	For: ATCTTTGCTGACCTGCTGGA Rev: AGGTCATCTCCACAATCACTT	XM_023634464.1	147
eVEGFR2	For: TCGGAAATGACACTGGAGCC Rev: TACACCACTCCATGTGGTC	XM_023638078.1	130
eACTA2	For: GACCCTGTTCACGCATCTT Rev: CGGAGAGGACGTTGTTAGCAT	XM_001503035.6	125
eCDH5	For: TGTGTTACGACCACTTGT Rev: GTACACGACAGAGGCATGGT	XM_001495895.5	127
eHGF	For: GAACAGTGCAGACCAATGTGC Rev: GGGAACGAGGCACTCGTT	XM_014739139.2	108
eANGPT1	For: CCTGATCTTACACGGTGTGA Rev: TCAGATTGGATGGCCACAA	XM_001494946.6	122

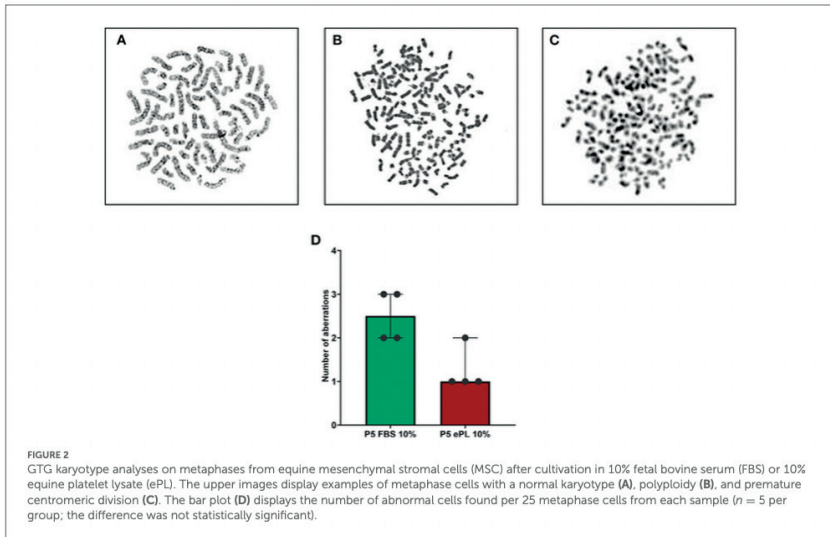


H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific GmbH). QRT-PCR was performed using SYBR Green Mastermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and a qTowerG (Analytik Jena GmbH, Jena, Germany). In each qPCR reaction, 1 μl (corresponding to 30 ng RNA) was used as template. The primers (Table 1) were designed using PrimerBlast (NCBI) and synthesized at IDT (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium). The performance of the PCR reaction was determined by a melting curve and a dilution series of pooled experimental cDNA. The relative quantification of gene expression changes was performed based on the Pfaffl formula (44), using the respective geomean

CT values of all FBS control samples for normalization within the formula.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS software version 28 (IBM, Ehningen, Germany) and GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For paired comparisons involving three different culture media, Friedman tests and subsequent *post hoc* tests with Bonferroni corrections were performed. For pairwise comparisons between passages or



corresponding groups in the co-culture experiments, Wilcoxon tests were performed. Differences were considered as significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### AD-MSC fitness and genetic stability

#### Apoptosis, necrosis and senescence

The AD-MSC showed lower apoptosis levels in 10% ePL medium than in 2.5% ePL medium ( $p < 0.05$  in P3). No significant differences were found regarding necrosis. The SA- $\beta$ -gal activity, indicating senescence, strongly increased from P3 to P5 in all three media ( $p < 0.05$ ). Surprisingly, AD-MSC cultivated with 2.5% ePL medium displayed the lowest SA- $\beta$ -gal activity ( $p < 0.05$  for 2.5% ePL vs. 10% ePL in P3) (Figure 1).

#### AD-MSC genetic stability

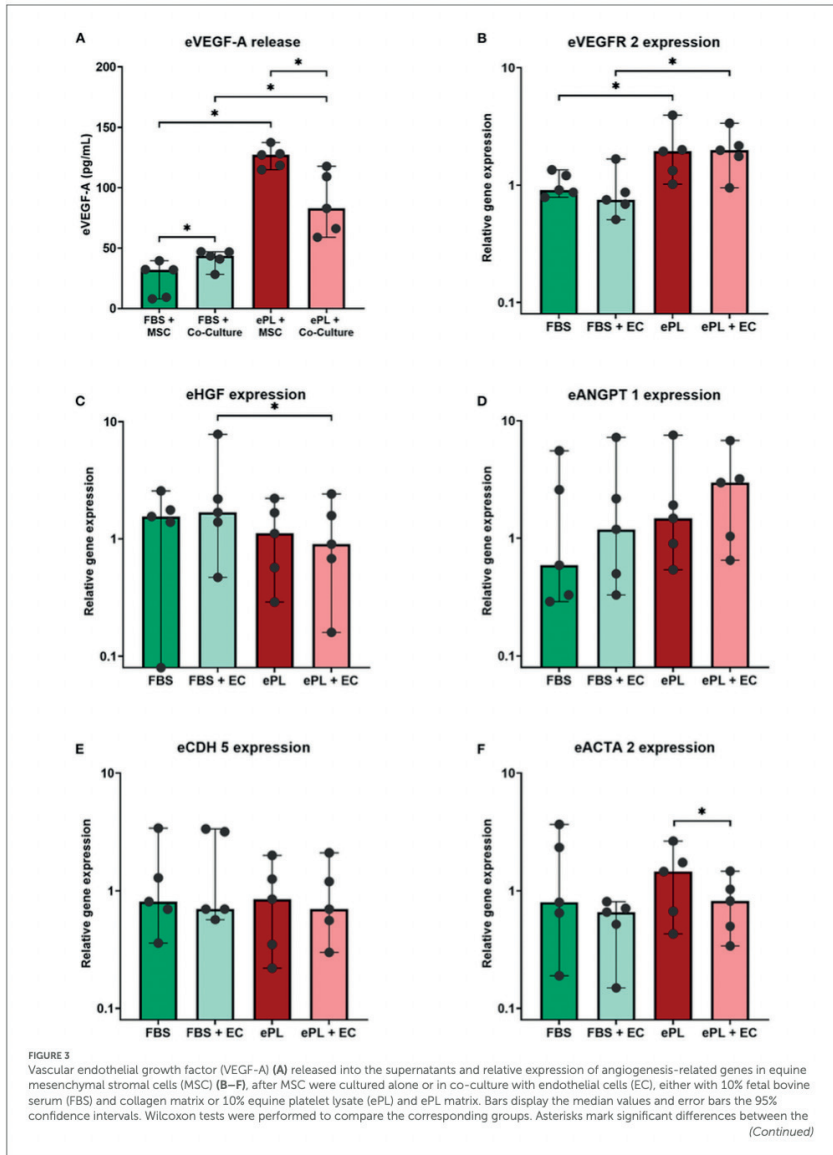
Applying cytogenetic analyses (GTG), equine AD-MSC cultured with 10% ePL showed chromosomal aberrations in 6 out of 125 (4.8%) analyzed metaphases. Chromosomal aberrant metaphases included polyploidy (5 out of 6 aberrant metaphase cells) and premature centromeric division (PCD; 1 out of 6 aberrant metaphase cells). According to the international system for human cytogenomic nomenclature (ISCN 2020),

the PCD may be used to describe premature separation of centromeres in metaphases (45). The PCD may affect one or more chromosomes in a fraction of the cells. AD-MSC cultured with 10% FBS showed chromosomal aberrations in 10 out of 125 (8%) analyzed metaphases, at which polyploidy was detected in all chromosomal aberrant metaphases. Nevertheless, the results did not suggest the presence of clonal numerical and/or structural chromosomal aberrations in the analyzed metaphases, neither in AD-MSC cultured with ePL nor in AD-MSC cultured with FBS. Figure 2 illustrates the observed aberrations and displays the numbers of aberrations found per donor.

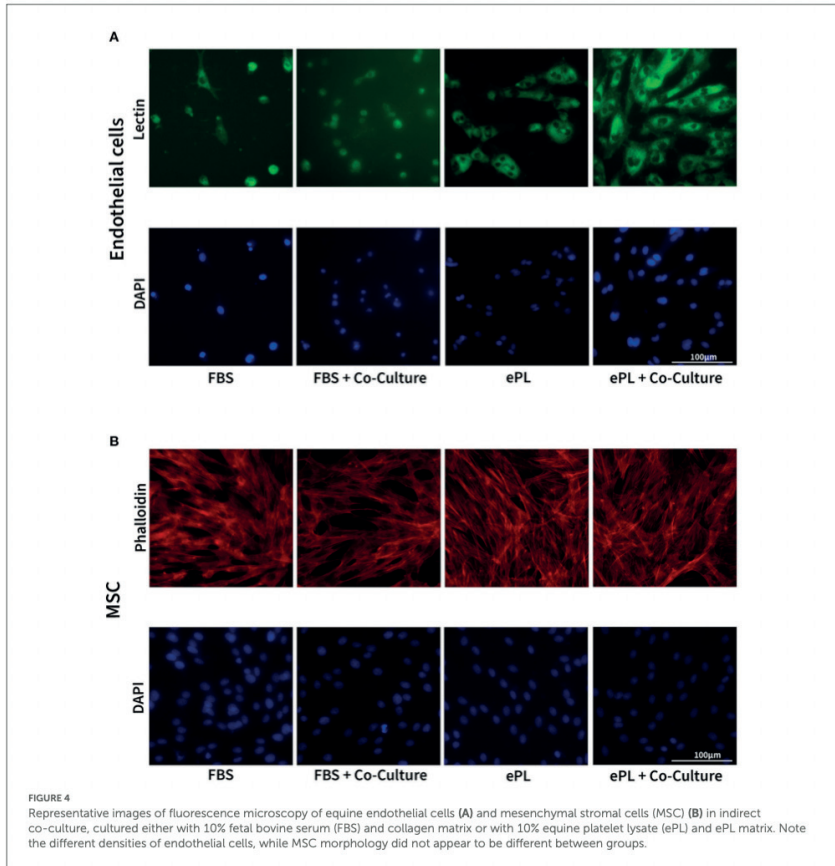
### Pro-angiogenic effects of ePL and AD-MSC

#### Vascular endothelial growth factor in ePL and cell culture supernatants

The 10% ePL medium contained 246 pg/mL VEGF-A, but no VEGF-A was detected in 10% FBS medium. Analyzing the cell culture data normalized to the respective medium, it was evident that AD-MSC released VEGF-A in all conditions, while no VEGF-A was measured in supernatants from endothelial cells with FBS medium and collagen matrix (data not shown). The cell culture supernatants from the groups with ePL medium



**FIGURE 3** Indicated groups ( $p < 0.05$ ). With respect to VEGF-A release, it is of note that the data shown were normalized by subtracting the results obtained with FBS- or ePL-supplemented medium alone, thus they are indicative for VEGF-A released by the cells and from the ePL matrix. Endothelial cells from  $n = 1$  donor were co-cultured with MSC from  $n = 5$  donors.



and matrix showed significantly higher VEGF-A concentrations than with FBS medium and collagen matrix ( $p < 0.05$  for both AD-MSC alone and co-culture), which may be due to higher VEGF-A release by the AD-MSC as well as VEGF-A release from the ePL matrix. The concentration of VEGF-A was highest after

the co-cultivation of AD-MSC and endothelial cells in 10% ePL medium and ePL matrix ( $p < 0.05$  compared to AD-MSC alone in 10% ePL medium and matrix), and lowest after co-culture in 10% FBS medium and collagen matrix ( $p < 0.05$  compared to AD-MSC alone in 10% FBS and collagen matrix) (Figure 3A).

### Expression of angiogenesis-related genes in AD-MSC

AD-MSC showed an increased gene expression of VEGFR2 (Figure 3B), encoding for VEGF receptor-2, with 10% ePL medium and matrix, both in AD-MSC alone and in co-culture with endothelial cells ( $p < 0.05$ ), demonstrating their response to the higher VEGF-A levels in these culture conditions.

The gene expression of CDH5, encoding for the endothelial cell junction marker VE cadherin, was not different between groups (Figure 3E). The expression of ACTA2, encoding for the pericyte-related  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), was highest in AD-MSC cultured alone with 10% ePL but decreased in the respective co-culture ( $p < 0.05$ ) (Figure 3F).

No major differences between groups were observed in the expression of HGF and ANGPT1, genes encoding for the pro-angiogenic hepatocyte growth factor and angiopoietin-1 (Ang-1), respectively. The expression of HGF was lower in the ePL co-culture than in the FBS co-culture, but despite statistical significance ( $p < 0.05$ ), this difference was relatively small (Figure 3C). ANGPT1 expression increased in the presence of ePL and AD-MSC, but this in turn was not significant (Figure 3D).

### Effects of ePL and AD-MSC on endothelial cell growth and morphology

The endothelial cells appeared to be more functional with 10% ePL medium and matrix than in 10% FBS medium and collagen matrix. This was evident in the arterial ring assay, at which they exhibited more outgrowth and migration with ePL (Supplementary material 1), as well as in the co-culture assay with AD-MSC. In the latter, again more consistent endothelial cell growth was observed with ePL (Figure 4). Furthermore, the endothelial cell arrangement indicated the formation of capillaries in two of the samples co-cultured with AD-MSC and with ePL, but not in the other groups (Figure 5).

The AD-MSC showed no difference regarding cell density and cytoskeleton appearance between groups (Figure 4).

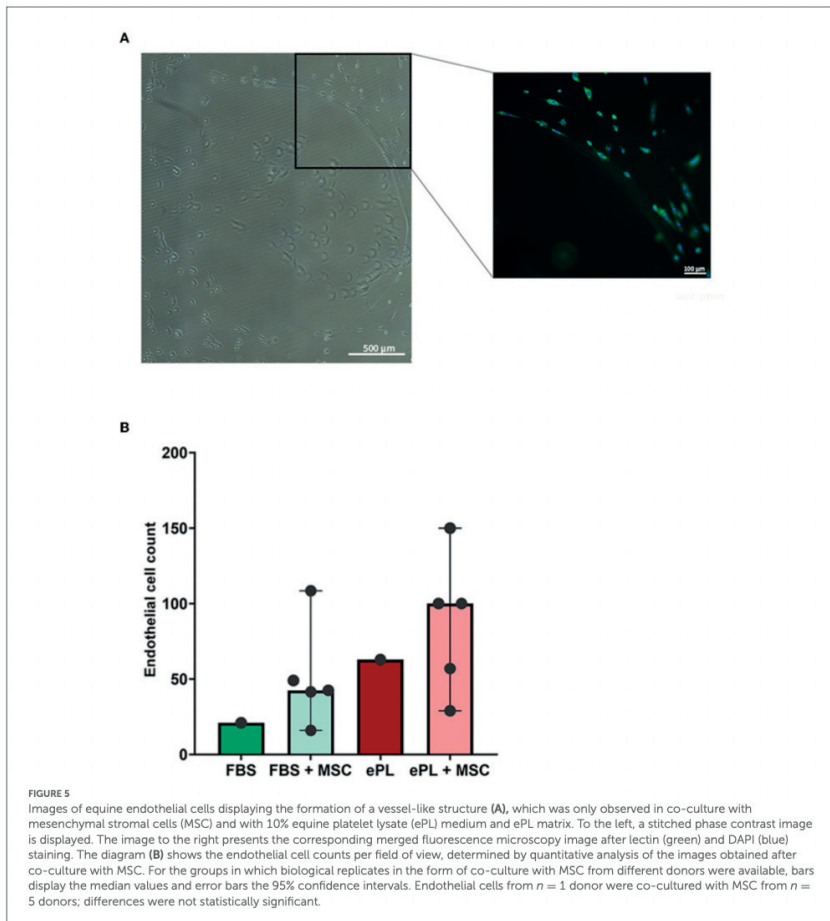
## Discussion

In this study, we demonstrated that ePL positively influences the cell fitness and genetic stability of equine AD-MSC and at the same time promotes the pro-angiogenic properties of equine AD-MSC and endothelial cells. The current work is based on a recent study (13) in which we had evaluated a protocol for the production of an ePL cell culture supplement, manufactured on the basis of a leukocyte-reduced platelet concentrate and pooled from healthy donor animals. In this previous work, we had evaluated the suitability of this ePL for equine AD-MSC culture with a focus on feasibility of MSC expansion and the

minimal criteria for MSC definition, as suggested by the ISCT (46). Aiming to further ensure that the ePL does not compromise the biological and functional properties of the MSC, we now analyzed apoptosis, necrosis, senescence, genetic stability, and pro-angiogenic potency of the equine AD-MSC cultivated in FBS- or ePL-supplemented medium. This revealed that the cell culture medium supplemented with 10% ePL does not only enable equine AD-MSC expansion, but also appears to improve AD-MSC pro-angiogenic functionality.

MSC have a limited capacity for replication and after a certain number of divisions, these cells either enter a senescent state or die by programmed cell death (apoptosis) (47, 48). So far, we had observed that equine AD-MSC expansion is well feasible with culture medium supplemented with 10% ePL, but limited with 2.5% ePL, as underlined by the respective generation times and metabolic activities until P5 (13, 14). To further elucidate this issue, we here investigated equine AD-MSC senescence and apoptosis, as these stress reactions could be triggered by altered cell culture conditions (49, 50). We found that the limited proliferation observed with 2.5% ePL (13, 14) was rather due to increased apoptosis than senescence. However, we also observed a significantly increased activity of the senescence marker SA- $\beta$ -gal in all media from P3 to P5. This was not unexpected, but is not fully consistent with other human studies that have analyzed senescence of human BM- and AD-MSC cultured with FBS or 5% hPL (51, 52). Surprisingly, one of these studies showed negative SA- $\beta$ -gal activity up to P7 in both media (52). In the other study, SA- $\beta$ -gal activity was only determined from P5 onwards, showing significantly lower activity in human BM-MSC cultured with hPL (51). Both studies concluded that senescence in human BM- and AD-MSC cultured with hPL is lower than in BM- and AD-MSC cultured with FBS, which we could not reproduce for equine AD-MSC. However, the equine AD-MSC showed lower apoptosis levels in 10% ePL medium than in 2.5% ePL medium ( $p < 0.05$  in P3). Interestingly, it was shown that platelet products such as platelet lysate downregulated the pro-apoptotic factors tBid and Bim (53). At the same time, the anti-apoptotic factors Bcl-xL and survivin were upregulated (53). Thus, platelet lysate seems to have a protective effect on cells against apoptosis (53, 54), which could explain our finding and is consistent with the high proliferation rates of the equine AD-MSC cultured with 10% ePL. Our results are in agreement with the findings of other equine studies comparing ePL and FBS. In this context, two studies showed similar proliferation rates with ePL and FBS (10, 11).

MSC proliferation is crucial as the cells have to be expanded *in vitro* prior to their therapeutic use, in order to obtain a sufficiently large number of cells. However, during *in vitro* expansion of cells, there is a risk of genetic transformation (50, 55). Therefore, as interest in the clinical use of equine MSC is becoming more and more widespread, the safety profile of the cultivated MSC needs monitoring. Several studies have



demonstrated that human BM- and AD-MSC have a low risk of tumorigenicity (55–57), and it was shown that cytogenetic aberrations cause a reduction or arrest of cell proliferation followed by an elimination of the affected cells (22). In the study presented here, genetic stability of P5 equine AD-MSC tended to be higher after cultivation with 10% ePL than with 10% FBS. This corresponds to the findings we have already reported for canine AD-MSC and platelet lysate (14), and is consistent with

studies that already demonstrated that hPL does not adversely alter the genetic stability of human BM- and AD-MSC (23, 24, 58). Nevertheless, and most importantly, neither equine AD-MSC cultured with FBS nor equine AD-MSC cultured with ePL displayed clonal aberrations, which if present would have warranted their exclusion from clinical use.

The primary mechanisms of action of MSC are based on paracrine signaling and cell-to-cell contacts. Due to

the paracrine release of biologically active substances such as cytokines, chemokines or growth factors, MSC have an immunomodulating and pro-angiogenic effect and can participate in the regeneration of damaged or inflamed tissues (25, 59). Several studies have already shown that murine and human MSC of different sources migrate into ischemic tissue and improve vascular perfusion by releasing pro-angiogenic substances (29, 60–63). Vascular perfusion plays a crucial role in the regeneration of damaged tissues, as it is responsible for the oxygen and nutrient supply, as well as for the removal of waste products (64, 65). Therefore, we chose to evaluate AD-MSC functionality based on their pro-angiogenic potency.

During neovascularization, human BM-MSC support the endothelial cells by acting as perivascular cells and stabilizing the newly formed vessels (64). In this process, the human BM-MSCs were also described to differentiate into endothelial cells or smooth muscle cells by interacting with endothelial cells (64, 66, 67). Pericyte recruitment and attachment along the newly formed vessels is of tremendous importance. However, the migration of endothelial cells is independent of pericyte migration, indicating that endothelial cells and pericytes only have indirect contact *via* the basement membrane. As a consequence, communication between endothelial cells and pericytes mainly takes place *via* paracrine substances and rarely *via* direct contact (68). For this reason, we chose indirect co-culture *via* transwells in our study. This co-culture system allows an exchange of soluble substances, but no direct contact of the cells.

The paracrine factors involved in angiogenesis are HGF, VEGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and Ang-1 (61, 69). However, the most important growth factor for angiogenesis is VEGF-A, which is the survival signal for the endothelial cells and induces the formation of new vessels (60, 61, 68, 70). In contrast to 10% FBS medium, 10% ePL medium already contained a significant concentration of VEGF-A. Furthermore, consistent with other studies (24, 71), we observed a significantly higher VEGF-A release in the cell culture supernatants with ePL medium than with FBS medium, adding to the VEGF-A already present in the ePL-supplemented medium. In ePL medium, the VEGF-A release was further increased in co-culture, so that the highest VEGF-A concentrations were measured in the equine AD-MSC and endothelial cell co-culture with ePL medium, suggesting a synergism of ePL and AD-MSC in providing high concentrations of VEGF-A. The effect of VEGF-A is mediated *via* the VEGF-receptor-2. In accordance with others (66, 67), our data underlined the relationship between these two, as the VEGFR2 gene expression levels followed a similar trend as the VEGF-A protein concentrations.

VEGF-A has also been shown to be responsible for the differentiation of human BM-MSC into endothelial cells (66, 67), and to stimulate the proliferation (72) and tube formation

of human BM- and AD-MSC (24, 66, 67). However, the low and unchanging CDH5 (encoding for VE cadherin) expression in equine AD-MSC did not support the assumption that endothelial cell differentiation had been induced in the current experiments. Based on the close relationship of equine BM- and AD-MSC and pericytes (73), MSC differentiation into this cell type might be more likely. Alpha-SMA expression is related to the regulatory function of the pericytes and involved in the control of vasoconstriction in arterioles and capillaries *via* endothelin-1 pathways (68). Co-cultivation of endothelial progenitor cells or human umbilical vein endothelial cells increased ACTA2 (encoding for  $\alpha$ -SMA) expression in human BM-MSC in a time-dependent manner (64), indicating that BM-MSC differentiate into pericytes during co-cultivation. In the current study, we observed no increase but rather a small decrease in ACTA2 expression after co-cultivation, which could be due to the lack of the direct cell contacts previously reported as necessary for the differentiation of human BM-MSC into pericytes induced by endothelial cells (64, 74).

Finally, demonstrating equine AD-MSC functionality when cultured with ePL, their pro-angiogenic effects could be observed in the endothelial cells. Equine PL medium, together with the equine AD-MSC, appeared to provide trophic support for the endothelial cells, leading to higher cell counts in the co-culture experiments. In addition, ePL medium alone increased the outgrowth of endothelial cells in the arterial ring assay (Supplementary material 1). Last not least, although not observed in all biological replicates, only ePL and equine AD-MSC together induced tube formation in the endothelial cells. Considering these results, platelets can improve the effect of equine AD-MSC, as the pro-angiogenic potency of AD-MSC was higher with ePL medium than with FBS medium.

Despite the promising results, some limitations of the study presented here must be taken into account. For instance, the MSC were all isolated in FBS and then cryopreserved in P1. After thawing, the MSC were allowed to adapt to the ePL media for one passage, but the change of medium could still have had an impact on viability and proliferation. Another aspect worth discussing is the large variability within our data. Given that the ePL was pooled, this variability represents the differences between the AD-MSC from different donor horses, demonstrating that differences in cell quality and behavior have to be expected, irrespective of the medium used.

In summary, in this study, ePL supported cell fitness similarly as FBS. The biological properties of equine AD-MSC were positively influenced by ePL, as shown by improved pro-angiogenic effects. Thus, ePL seems to be a safe and promising cell culture supplement and a replacement of FBS by ePL in equine AD-MSC cultivation can be recommended. Moreover, based on the positive influence on the pro-angiogenic effect of equine AD-MSC, further *in vivo* studies should be conducted

to establish ePL in therapeutic use alone or in combination with MSC.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Author contributions

AH: conception of the study and complete experimental design (together with JB), MSC culture experiments, sample and data analysis, data interpretation, and drafting of the manuscript (together with JB). SN: substantial contribution to the experimental design, MSC culture experiments, and sample and data analysis (qPCR). V-PB: sample analysis (karyotype analyses). HH: substantial contribution to the experimental design, sample and data analysis, data interpretation, and drafting of the manuscript (karyotype analyses). MM: MSC culture experiments and sample analysis (fluorescence microscopy). AW: sample acquisition (umbilical cord samples). JB: conception of the study and complete experimental design (together with AH), data interpretation and drafting of the manuscript (together with AH). All authors have critically revised the manuscript for important intellectual content and approved the publication of its content.

## Funding

This work received funding by a scholarship (AH) from the Animal Health Academy (Akademie fuer Tiergesundheit; Aft).

## References

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. (1999) 284:143–7. doi: 10.1126/science.284.5411.143
- Koch TG, Berg LC, Betts DH. Current and future regenerative medicine - principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can Vet J*. (2009) 50:155–65.
- Karnieli O, Friedner OM, Allickson JG, Zhang N, Jung S, Fiorentini D, et al. A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy*. (2017) 19:155–69. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.11.011
- Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. (2005) 205:228–36. doi: 10.1002/jcp.20391
- Bieback K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfus Med Hemother*. (2013) 40:326–35. doi: 10.1159/000354061
- van der Valk J, Brunner D, Smet K, Fex Svenningsen A, Honegger P, et al. Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine

## Acknowledgments

The authors acknowledge all members of the research group for their help and input, and the Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Biomedical Research Center Seltersberg (BFS), Justus-Liebig-University Giessen for providing access to the Leica DMI6000 B microscope.

## Conflict of interest

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

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.890302/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY MATERIAL 1  
Arterial ring assay using equine umbilical cord arteries.

- serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro*. (2010) 24:1053–63. doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.016
- Burnout T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser, K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. (2016) 76:371–87. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.065
- European Medicines Agency, London Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). *Guideline on the Use of Bovine Serum in the Manufacture of Human Biological Medicinal*. (2013). Technical Report EMA/CHMP/BWP/457920/2012.
- Trento C, Bernardo ME, Nagler A, Kuçi S, Bornhäuser M, Köhl U, et al. Manufacturing mesenchymal stromal cells for the treatment of graft-versus-host disease: a survey among centers affiliated with the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. (2018) 24:2365–70. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.07.015
- Seo JR, Kambayashi Y, Itho M, Haneda S, Yamada K, Furuoka H, et al. Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci*. (2013) 95:693–8. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.04.024

11. Naskou MC, Sumner SM, Choccalo A, Kemelmakher H, Thoresen M, Copland I, et al. Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* (2018) 9:75. doi: 10.1186/s13287-018-0823-3
12. Yaneselli K, Barrachina L, Remacha AR, Algorta A, Vitoria A, Cequier A, et al. Effect of allogeneic platelet lysate on equine bone marrow derived mesenchymal stem cell characteristics, including immunogenic and immunomodulatory gene expression profile. *Vet Immunol Immunopathol.* (2019) 217:109944. doi: 10.1016/j.vetimm.2019.109944
13. Hagen A, Lehmann H, Aurich S, Bauer N, Melzer M, Moellerberndt J, et al. Scalable production of equine platelet lysate for multipotent mesenchymal stromal cell culture. *Front Bioeng Biotechnol.* (2021) 8:613621. doi: 10.3389/fbioe.2020.613621
14. Hagen A, Holland H, Brandt V-P, Doll CU, Hütflöcher TC, et al. Platelet lysate for mesenchymal stromal cell culture in the canine and equine species: analogous but not the same. *Animals (Basel).* (2022) 12. doi: 10.3390/ani12020189
15. Russell KA, Koch TG. Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture - too much of a good thing? *Equine vet. J.* (2016) 48:261–4. doi: 10.1111/evj.12440
16. Del Bue M, Riccò S, Conti V, Merli E, Ramoni R, Grolli S, et al. Platelet lysate promotes in vitro proliferation of equine mesenchymal stem cells and tenocytes. *Vet Res Commun.* (2007) 31:289–92. doi: 10.1007/s11259-007-0099-z
17. Caprio CR, Andrews CH. *The Effect of Replacing Fetal Bovine Serum with Platelet Releaseate on the Characterization of MSCs.* Undergraduate Research Scholars Program. (2018).
18. Vallés G, Bensiamar F, Crespo L, Arruero B, Vilabos N, Saldaña L, et al. Topographical cues regulate the crosstalk between MSCs and macrophages. *Biomaterials.* (2015) 37:124–33. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.028
19. Luk F, Carreras-Planella L, Korevaar SS, Witte SFH, Borrás FE, et al. Inflammatory conditions dictate the effect of mesenchymal stem or stromal cells on B cell function. *Front Immunol.* (2017) 8:1042. doi: 10.3389/fimmu.2017.01042
20. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest.* (2018) 128:1238–46. doi: 10.1172/JCI95148
21. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* (2019) 43:582–92. doi: 10.1002/cbin.11137
22. Alizadeh AH, Briah R, Villagomez DAF, King WA, Koch TG. Cell identity, proliferation, and cytogenetic assessment of equine umbilical cord blood mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev.* (2018) 27:1219–38. doi: 10.1089/scd.2018.0105
23. Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, Sarr MG, Bartunek J, et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant.* (2011) 20:797–811. doi: 10.3727/096368910X543376
24. Trojahn Kelle SF, Oliveri RS, Glavinic PV, Kirchoff M, Mathiasen AB, Elberg JJ, et al. Pooled human platelet lysate versus fetal bovine serum—investigating the proliferation rate, chromosome stability and angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells intended for clinical use. *Cytotherapy.* (2013) 15:1086–97. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.01.217
25. Skific M, Golemovic M, Crkvenac-Gornik K, Vrhovac R, Gohubic Cepulic B. Comparative analysis of biological and functional properties of bone marrow mesenchymal stromal cells expanded in media with different platelet lysate content. *Cells Tissues Organs.* (2018) 205:226–39. doi: 10.1159/000492581
26. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Iacopetti I, Sampaolosi M, Mascarello F, et al. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. *Tissue Eng Part C Methods.* (2010) 16:771–81. doi: 10.1089/ten.tec.2009.0512
27. Maia L, Landim-Alvarenga FC, Mota D, Assis Golim LS, Lauffer-Amorim M, et al. Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. *Microsc Res Tech.* (2013) 76:618–24. doi: 10.1002/jemt.22208
28. Mazurkevych A, Malyuk M, Bezdiezhenykh N, Starodub L, Kharkevych Y, Brusko E, et al. Immunophenotypic characterization and cytogenetic analysis of mesenchymal stem cells from equine bone marrow and foal umbilical cords during in vitro culture. *J Vet Res.* (2016) 60:339–47. doi: 10.1515/jvetres-2016-0051
29. Yong KW, Choi JR, Mohammadi M, Mitha AP, Sanati-Nezhad A, Sen A, et al. Mesenchymal stem cell therapy for ischemic tissues. *Stem Cells Int.* (2018) 2018:8179075. doi: 10.1155/2018/8179075
30. Levoux J, Prola A, Lafuste P, Gervais M, Chevallier N, Koumhaiz Z, et al. Platelets facilitate the wound-healing capability of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer and metabolic reprogramming. *Cell Metab.* (2021) 33:283–99. doi: 10.1016/j.cmet.2020.12.006
31. Qian Y, Han Q, Chen W, Song J, Zhao X, Ouyang Y, et al. Platelet-Rich plasma derived growth factors contribute to stem cell differentiation in musculoskeletal regeneration. *Front Chem.* (2017) 5:89. doi: 10.3389/fchem.2017.00089
32. Mahmoudian-Sani MR, Rafeei F, Amini R, Saidjima M. The effect of mesenchymal stem cells combined with platelet-rich plasma on skin wound healing. *J Cosmet Dermatol.* (2018) 17:650–69. doi: 10.1111/jocd.12512
33. Hersant B, Sid-Ahmed M, Braud L, Jourdan M, Baba-Amer Y, Meningaud J, et al. Platelet-Rich plasma improves the wound healing potential of mesenchymal stem cells through paracrine and metabolism alterations. *Stem Cells Int.* (2019) 2019:1234263. doi: 10.1155/2019/1234263
34. Becherucci V, Piccini L, Casamassima S, Bisin S, Gori V, Gentile F, et al. Human platelet lysate in mesenchymal stromal cell expansion according to a GMP grade protocol: a cell factory experience. *Stem Cell Res Ther.* (2018) 9:124. doi: 10.1186/s13287-018-0863-8
35. Viau S, Lagrange A, Chabrand L, Lorant J, Charrier M, Rouger K, et al. A highly standardized and characterized human platelet lysate for efficient and reproducible expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* (2019) 21:738–54. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.04.053
36. Kirsch M, Rach J, Handke W, Selsam A, Pappelova I, Strauß S, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum, and platelet lysate in 2D and 3D systems. *Front Bioeng Biotechnol.* (2021). 8:598389. doi: 10.3389/fbioe.2020.598389
37. Palombella S, Perucca Orfei C, Castellini G, Gianola S, Lopa S, Mastrogiacomo M, et al. Systematic review and meta-analysis on the use of human platelet lysate for mesenchymal stem cell cultures: comparison with fetal bovine serum and considerations on the production protocol. *Stem Cell Res Ther.* (2022) 13:142. doi: 10.1186/s13287-022-02815-1
38. Losi P, Barottili MC, Foffa I, Buscemi M, De Almeida CV, Fabbri M, et al. In vitro human cord blood platelet lysate characterisation with potential application in wound healing. *Int Wound J.* (2020). 17:65–72. doi: 10.1111/iwj.13233
39. Tancharoen W, Angusuchawan S, Marmek R, Narakornsak S, Pothacharoen P. The effects of human platelet lysate versus commercial endothelial growth medium on the endothelial differentiation potential of human amniotic fluid mesenchymal stem cells. *In: Heliyon.* (2020) 6:e04873. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04873
40. Burk J, Ribitsch I, Gittel C, Juelke H, Kasper C, Staszyc C, et al. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet J.* (2013) 195:98–106. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.06.004
41. Raudsepp, Terje. (2021): Chromosomal Analysis. In: *John Dasciano and Patrick McCue (Hg.): Equine Reproductive Procedures.* Texas: Wiley, p. 89–95. doi: 10.1002/9781119556015.ch22
42. Seabright M. Human chromosome banding. *Lancet.* (1972) 299:967. doi: 10.1016/S0140-6736(72)91541-3
43. Seabright M. The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. *Chromosoma.* (1972) 36:204–10. doi: 10.1007/BF00285214
44. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* (2001) 29:e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
45. McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* ISCN 2020. Munich: Karger AG. (2020).
46. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells, the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* (2006) 8:315–7. doi: 10.1080/14653240600859595
47. Campisi J, Di d'Adda Fagnaga F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2007) 8:729–40. doi: 10.1038/nrm2233
48. Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* (2014) 15:1139–53. doi: 10.15252/embr.201439245
49. Schallmoer K, Bartmann C, Rohde E, Bork S, Guelly C, Obenaus AC, et al. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica.* (2010) 95:867–74. doi: 10.3324/haematol.2009.011692
50. Neri S. Genetic stability of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine applications: a fundamental biosafety aspect. *Int J Mol Sci.* (2019) 20. doi: 10.3390/ijms20102406
51. Griffiths S, Baranik PR, Copland IB, Nerem RM, McDevitt TC. Human platelet lysate stimulates high-passage and senescent human multipotent mesenchymal stromal cell growth and rejuvenation in vitro. *Cytotherapy.* (2013) 15:1469–83. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.020

52. Søndergaard RH, Follin B, Lund LD, Juhl M, Ekblond A, Kastrup J, et al. Senescence and quiescence in adipose-derived stromal cells: Effects of human platelet lysate, fetal bovine serum and hypoxia. *Cytotherapy*. (2017) 19:95–106. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.09.006
53. Refolo MG, D'Alessandro R, Lippolis C, Messa C, Carella N, Cavallini A, et al. Modulation of Doxorubicin mediated growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells by platelet lysates. *Anticancer Agents Med Chem*. (2014) 14:1154–60. doi: 10.2174/1871520614666140604120226
54. Carr BI, Cavallini A, D'Alessandro R, Refolo MG, Lippolis C, Mazzocca A, et al. Platelet extracts induce growth, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma in vitro. *BMC Cancer*. (2014) 14:43. doi: 10.1186/1471-2407-14-43
55. Roemeling-van Rhijn M, de Klein A, Douben H, Pan Q, van der Laan LJ, Ijzermans JN, et al. Culture expansion induces non-tumorigenic aneuploidy in adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. (2013) 15:1352–61. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.07.004
56. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res*. (2007) 67:9142–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4690
57. Zaman WSWK, Makpol S, Sathapan S, Chua KH. Long-term in vitro expansion of human adipose-derived stem cells showed low risk of tumorigenicity. *J Tissue Eng Regen Med*. (2014) 8:67–76. doi: 10.1002/term.1501
58. Schallmoser K, Rohde E, Reinisch A, Bartmann C, Thaler D, Drexler C, et al. Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum. *Tissue Eng Part C Methods*. (2008) 14:185–96. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0060
59. Voga M, Adamic N, Vengust M, Majdic G. Stem Cells in Veterinary Medicine-Current State and Treatment Options. *Front Vet Sci*. (2020) 7:278. doi: 10.3389/fvets.2020.00278
60. Schlosser S, Denzler C, Schweizer R, Eberli D, Stein JV, Enzmann V, et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cells enhance vascular regeneration in ischemic murine skin. *Microvasc Res*. (2012) 83:267–75. doi: 10.1016/j.mvr.2012.02.011
61. Kwon HM, Hur SM, Park KY, Kim CK, Kim YM, Kim HS, et al. Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vascul Pharmacol*. (2014) 63:19–28. doi: 10.1016/j.vph.2014.06.004
62. Tao H, Han Z, Han ZC, Li Z. Proangiogenic features of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Stem Cells Int*. (2016) 2016:1314709. doi: 10.1155/2016/1314709
63. Gangadaran P, Rajendran RL, Lee HW, Kalimuthu S, Hong CM, Jeong SY, et al. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells activates VEGF receptors and accelerates recovery of hindlimb ischemia. *J Control Release*. (2017). 264:112–26. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.08.022
64. Goerke SM, Plaha J, Hager S, Strassburg S, Torio-Padron N, Stark GB, et al. Human endothelial progenitor cells induce extracellular signal-regulated kinase-dependent differentiation of mesenchymal stem cells into smooth muscle cells upon cocultivation. *Tissue Eng Part A*. (2012) 18:2395–405. doi: 10.1089/ten.tea.2012.0147
65. Conze P, van Schie HT, van Weeren R, Staszky C, Conrad S, Skutella T, et al. Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions. *Regen Med*. (2014) 9:743–57. doi: 10.2217/rme.14.55
66. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. (2004) 22:377–84. doi: 10.1634/stemcells.22-3-377
67. Haack-Sørensen M, Friis T, Bindlev L, Mortensen S, Johnsen HE, Kastrup J, et al. Comparison of different culture conditions for human mesenchymal stromal cells for clinical stem cell therapy. *Scand J Clin Lab Invest*. (2008) 68:192–203. doi: 10.1080/00365510701601681
68. Chiaverina G, Blasio D, Monica L, Accardo V, Palmiero M, et al. Dynamic interplay between pericytes and endothelial cells during sprouting angiogenesis. *Cells*. (2019) 8:8091109. doi: 10.3390/cells8091109
69. Maacha S, Sidahmed H, Jacob S, Gentilcore G, Calzone R, Grivel J, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stromal cells in angiogenesis. *Stem Cells Int*. (2020) 2020:4356359. doi: 10.1155/2020/4356359
70. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. (2011) 473:298–307. doi: 10.1038/nature10144
71. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kaschofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. (2007) 47:1436–46. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01220.x
72. Shibuya M. VEGF-VEGFR signals in health and disease. *Biomol Ther (Seoul)*. (2014) 22:1–9. doi: 10.4062/biomolther.2013.113
73. Esteves CL, Sheldrake TA, Dawson L, Menghini T, Rink BE, Amilon K, et al. Equine mesenchymal stromal cells retain a pericyte-like phenotype. *Stem Cells Dev*. (2017) 26:964–72. doi: 10.1089/scd.2017.0017
74. Lozito TP, Kuo CK, Taboas JM, Tuan RS. Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. *J Cell Biochem*. (2009) 107:714–22. doi: 10.1002/jcb.22167



## *Supplementary Material to Hagen et al.*

### **1 Arterial Ring Assay**

#### Method:

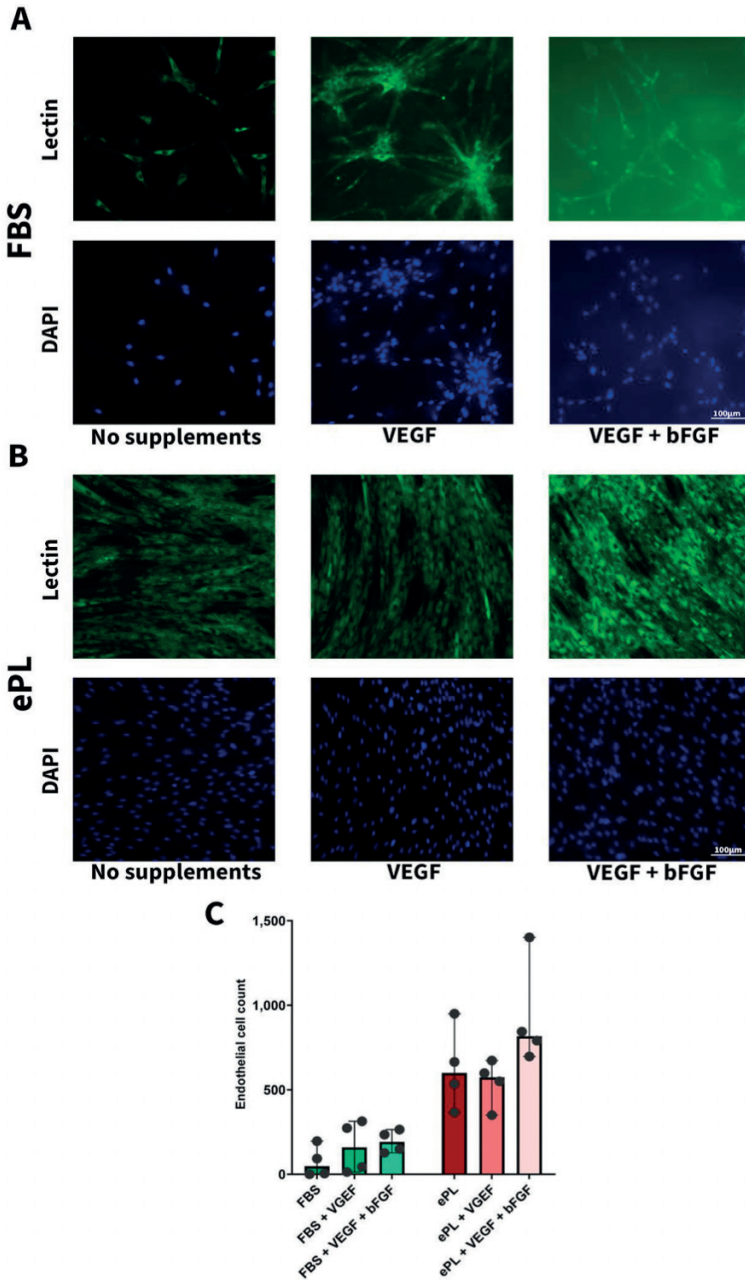
Fresh umbilical artery rings from  $n = 4$  foals were cut into 3 mm thick rings. Prior to placing the arterial rings in the 24-well plate, 50  $\mu\text{l}$  of either a bovine collagen matrix I (Gibco™, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Germany) or equine platelet lysate (ePL) matrix were added to the bottom of the wells, and further 50  $\mu\text{l}$  were later added above the arterial rings. The 3 mg/ml bovine collagen I matrix was produced according to the manufacturer's instructions. The ePL matrix used in this experiment was prepared from ePL obtained by a sedimentation-based method, which involved 1 h sedimentation and then centrifugation of the obtained supernatant at  $878 \times g$  for 20 min at 22 °C to produce the platelet concentrate. This method retained more leukocytes than the buffy-coat-based method otherwise used for ePL production (Hagen et al., 2021), and we had chosen to use this type of matrix for the arterial ring assay to better mimic a wound healing environment. For ePL matrix formation, DMEM was mixed with 10% ePL, 1% penicillin-streptomycin but no heparin. The matrices were incubated for 1.5 h at 37 °C for curing. Afterwards, the culture medium was added. The arterial rings with collagen matrix were cultivated in 10% FBS-supplemented medium and those with ePL matrix were cultivated in 10% ePL-supplemented medium, using the buffy-coat-based ePL as in the other experiments. Part of the arterial rings were supplemented with 30 ng/mL equine VEGF-A (Kingfisher Biotech, Inc., St. Paul, MN, USA) and 30 ng/mL bFGF (Gibco™, ThermoFisher Scientific) once at the beginning of the cultivation period of 21 days. After cultivation, samples were stained with lectin-FITC and DAPI, and the migration of the endothelial cells from the arterial ring was examined by fluorescence microscopy and image analysis with Fiji ImageJ software.

#### Results:

In all groups with 10% ePL medium, more outgrowth from the umbilical arteries and superior expansion of the endothelial cells was observed. VEGF-A and bFGF supplementation tended to improve endothelial cell migration and expansion in both media, but the effect was weaker than the effect of the ePL. The highest endothelial cell densities were achieved with ePL medium + VEGF-A + bFGF (Supplementary Figure 1).

### **2 Supplementary Figure 1**

Representative images of fluorescence microscopy of the endothelial cells migrated from the umbilical arteries, cultured in either 10% FBS (**A**) or 10% ePL medium (**B**) and supplemented with either VEGF-A or VEGF-A + bFGF. The diagram (**C**) shows the endothelial cell counts per field of view, determined by quantitative analysis of the images obtained after 21 days of cultivation. Bars display the median values and error bars the 95% confidence intervals. Arterial rings were prepared from  $n = 4$  donors.



## **5 Diskussion**

### **5.1 Publikation 1 – Thrombozytenlysatherstellung und vergleichende Charakterisierung der eMSC**

#### **5.1.1 Reflexion von Material und Methoden**

In der ersten In-vitro-Studie dieser Dissertation ging es zunächst um die hochskalierbare Herstellung eines standardisierten ePL. Im zweiten Schritt fand eine Evaluierung des gewonnenen ePL als Zellkultursupplement bei der In-vitro-Kultivierung von eMSC im Vergleich zu FBS, besonders im Hinblick auf die Beeinflussung der zellspezifischen Charakteristika der eMSC, statt.

Das ePL wurde aus dem Vollblut von  $n = 20$  klinisch gesunden Spenderpferden mittels Buffy-Coat-Methode hergestellt. Es wurden  $n = 20$  Spenderpferde verwendet, da es in der Literatur keine einheitlichen Angaben zur Menge an gepoolten Spendern gibt, die notwendig sind, um die individuelle Variabilität der Spender auszugleichen. In einer Studie wurde von 5 Spendern (Hemeda et al. 2014) gesprochen und in einer anderen von 2–52 (Burnouf et al. 2016). Da eine große Menge ePL für die Zellkultur und auch weitere geplante Experimente hergestellt werden sollte, wurden jeweils 2 L Vollblut von den 20 Spenderpferden entnommen. Für die Entnahme des Vollblutes lag eine Genehmigung im Rahmen einer Tierversuchsanzeige durch das Regierungspräsidium Gießen (A14/2019) vor. Da die ePL-Herstellung auf einem Qualitätsniveau vergleichbar zur Humanmedizin erfolgen sollte, mussten die Spenderpferde gewisse Einschlusskriterien erfüllen. Es mussten Warmblüter zwischen 3–15 Jahren sein, die in den letzten zwei Wochen vor der Blutentnahme keine Medikamente erhalten hatten und auch sonst klinisch gesund waren. Die klinische Gesundheit wurde durch eine allgemeine Untersuchung des Pferdes vor der Blutentnahme sowie durch eine hämatologische und chemische Blutuntersuchung überprüft. Zusätzlich wurde das Blut aller Spender bakteriologisch und mykologisch auf Sterilität, sowie virologisch auf Freiheit von hämatogen übertragbaren Erkrankungen wie Equines Herpesvirus 1 und 4 (Virusdetektion), Equines Arteritis Virus (Antikörnernachweis mittels Serumneutralisationstest) sowie Equines infektiöses Anämievirus (Antikörnernachweis) untersucht. Die Auswahl der mikrobiologischen und virologischen Untersuchungen richtete sich unter anderem nach den Leitlinien zur Gewinnung, Lagerung, Transport und Verabreichung von Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich (2011) und das Endprodukt ePL sollte hinsichtlich der Qualität für eine In-vivo-Anwendung geeignet

sein. Durch diese Untersuchungen auf Sterilität und Virusfreiheit konnte auf eine spätere Pathogenreduktion durch UV-Lichtbehandlung ohne (Viau et al. 2017) oder mit Psoralen (Castiglia et al. 2014) verzichtet werden. Ein Spenderpferd wurde positiv auf Equines Herpesvirus 2 (EHV2) getestet und somit aus der Studie ausgeschlossen, sodass im weiteren Verlauf die ePL-Herstellung und auch die Erhebung aller Daten mit  $n = 19$  durchgeführt wurde. In Anlehnung an eine Studie in der beschrieben wurde, dass Rasse, Geschlecht und Alter die Zellzahlen und Wachstumsfaktorkonzentrationen in Thrombozyten-basierten Produkten beeinflussen (Giraldo et al. 2013), wurde das Kriterium festgelegt, dass alle Spenderpferde Warmblüter sein mussten und maximal 15 Jahre alt. Auch in den Vorversuchen zu dieser Studie zeigte sich, dass jüngere Pferde höhere Thrombozytenkonzentrationen besitzen als ältere und somit wurde versucht möglichst junge Spenderpferde für die Studie zu gewinnen. Zeitgleich zu jeder Vollblutspende wurde eine Blutsenkungsreaktion durchgeführt, um zu beurteilen, ob Abnormalitäten im Sedimentationsverhalten des Blutes vorliegen. Das Pferdevollblut weist im Vergleich zum Vollblut von anderen Tierarten oder dem Menschen eine äußerst schnelle Blutsenkung auf, was auf die besonders ausgeprägte Geldrollenbildung der Erythrozyten zurückzuführen ist (Osbaldiston 1971). Die Blutsenkung wird zwar nicht durch Alter, Geschlecht oder Tageszeit beeinflusst, allerdings hat die Rasse des Pferdes einen Einfluss, wobei Vollblüter eine langsamere Senkung als Warmblüter zeigen (Van Zijl 1948). Aufgrund der guten Sedimentationseigenschaften des Pferdevollblutes wurde während der Etablierung des Protokolls zur ePL-Herstellung auch eine modifizierte PRP-Methode, in der die erste Soft-Spin-Zentrifugation durch eine Sedimentation von 60 min ersetzt war, durchgeführt. Der dadurch entstandene Überstand entsprach einem PRP und wurde mithilfe einer Handpresse gewonnen. Dieses PRP wurde zur weiteren Konzentrierung erneut zentrifugiert (Hard Spin,  $1111 \times g$  20min) und anschließend der Überstand bis auf 70 ml abgepresst. Diese 70 ml Plasma wurden mit dem Pellet aufgeschwenkt und das daraus gewonnene TK als Ausgangsmaterial der ePL-Herstellung verwendet. Diese Methode wurde mit der Buffy-Coat-Methode verglichen und es zeigte sich eine deutlich höhere Thrombozytenkonzentration durch die Sedimentationsmethode als durch die Buffy-Coat-Methode. Allerdings wurden gleichzeitig auch die Leukozyten durch die Sedimentationsmethode stark konzentriert, was mit früheren Studien an Pferden übereinstimmte (Ionita et al. 2014, Bozorgmanesh et al. 2019). Neben der Thrombozytenkonzentration ist die Reduktion der Leukozyten ein zentraler Aspekt bei der

Herstellung von TKs, und eine Leukozytendepletion durch Filtration wird in den Leitlinien für Transfusionsverfahren empfohlen (De Wildt-Eggen et al. 2001, Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components 2020, Schallmoser et al. 2020), da Leukozyten beim Empfänger zahlreiche unerwünschte Wirkungen auslösen können. Hierzu gehören in der Humanmedizin die Alloimmunisierung gegen HLA-Antigene, die febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktion, die Übertragung leukozytenständiger Krankheitserreger, die GvHD und die Beeinflussung immunologischer Funktionen beim Empfänger. Durch eine geringe Leukozytenzahl können die meisten der unerwünschten Wirkungen verhindert werden, außer der GvHD, die nur durch eine Bestrahlung der Blutprodukte verhindert werden kann. Daher dürfen in der Humanmedizin nur noch Erythrozytenkonzentrate und TKs verwendet werden, bei denen eine Leukozytendepletion durchgeführt wurde und die  $< 1 \times 10^6$  Leukozyten pro Einheit enthalten (Sachs und Bux 2010, Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components 2020). Des Weiteren können Leukozyten die Thrombozyten-Aggregation und die Thromboxanfreisetzung verstärken und damit die weitere Rekrutierung von aktivierten Thrombozyten fördern, wie In-vitro-Studien mit humanen Thrombozyten gezeigt haben (Faraday et al. 2001, Hoareau et al. 2014). Es ist jedoch zwischen herkömmlichen TKs zur intravenösen Transfusion und anderen Anwendungen von TKs, wie z. B. als Orthobiologikum bei lokalen Injektionen in der regenerativen Therapie, bei denen die Entfernung von Leukozyten umstritten ist, zu unterscheiden (DeLong et al. 2012, Lana et al. 2019). In Bezug auf TKs zur PL-Produktion als Zellkultursupplement für die MSC-Kultivierung ist unklar, ob eine Reduktion der Leukozyten notwendig ist oder ob Leukozyten im Konzentrat sogar im Sinne eines MSC-Primings nützlich sein können. Da dies jedoch noch zu untersuchen ist, wurde in der Arbeit zu Publikation 1 eine Reduktion der Leukozyten angestrebt. Der Versuch der Leukozytendepletion mit Hilfe von Leukozytenreduktionsfiltern war bei den equinen TKs nicht praktikabel, da die Filter sehr schnell verstopft waren. Dies kann auf die unterschiedlichen Eigenschaften der equinen und humanen Thrombozyten zurückgeführt werden (Roscher 2018) oder auf eine stärkere Aktivierung der Thrombozyten im Filter und damit eine erhöhte Oberflächenaktivität. Um erhöhte Leukozytenwerte zu vermeiden, wurde daher die Buffy-Coat-Methode für die Herstellung von ePL in der Publikation 1 verwendet. Allerdings wurde für jedes Spenderpferd ein Blutbeutel zusätzlich mit der Sedimentationsmethode aufbereitet

und das dadurch entstandene ePL als Matrix in der Zellkultur für Publikation 2 angewandt.

In Europa stellt die Buffy-Coat-Methode und wiederholte Gefrier-/Auftauzyklen zur Lyse die derzeit am häufigsten verwendete Methode zur hPL-Herstellung in der Humanmedizin dar (Gulliksson 2012, Burnouf et al. 2016). In Anlehnung an die dort verwendeten Protokolle wurde das in der Publikation 1 beschriebene Protokoll zur ePL-Herstellung entwickelt. Hierfür wurde das Vollblut in einem Mehrbeutelssystem mit 70 ml der Antikoagulans Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD) entnommen. Die Wahl der geeigneten Antikoagulanzen wurde im Vorfeld intensiv untersucht, da das Antikoagulans die Wirksamkeit des endgültigen Thrombozytenproduktes beeinflussen kann (Arora und Agnihotri 2017). Das Ziel war es, die Aggregation und Aktivierung der Thrombozyten während der Antikoagulation des Blutes auf ein Minimum zu reduzieren und ein Maximum an naiven Thrombozyten zu gewinnen. Dies erfolgte am besten bei einer Antikoagulation des Vollblutes mit CPD, weshalb dieses Antikoagulans bei allen Spendern verwendet wurde. Die Vollblutbeutel wurden zu Beginn einer Hard-Spin-Zentrifugation (711 x g, 20 min) zur Separation der einzelnen Blutkomponenten unterzogen. Die Auftrennung in die einzelnen Bestandteile Plasma, Buffy Coat und Erythrozytenkonzentrat erfolgte durch die Top-Bottom-Methode mithilfe eines automatisierten Blutkomponenten-Extraktors (Optipress® II). An dieser Stelle wurde ein programmierbarer Blutkomponenten-Extraktor verwendet, da dadurch eine standardisierte und automatische Auftrennung der Blutbestandteile erfolgen konnte. Der resultierende Buffy Coat wurde nach einer 1-stündigen Ruhepause mit 70 ml des gewonnenen Plasmas resuspendiert. An dieser Stelle wäre auch eine partielle oder vollständige Resuspendierung in einer entsprechenden Additivlösung wie z.B. SSP+ möglich gewesen, einerseits um Plasma zur Transfusion bei erkrankten Patienten zu erhalten oder um die Stabilität des Produktes zu verbessern. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die Additivlösungen eine Aufrechterhaltung des pH-Wertes und einen reduzierteren Glukoseverbrauch bewirkten (Zheng et al. 2006, Haines et al. 2021). Allerdings scheint der Gewinn an Thrombozyten mit Plasma höher zu sein als mit den Additivlösungen, was vermutlich auf die unterschiedliche Viskosität zurückzuführen ist, da die Additivlösungen eine ähnliche Viskosität wie Wasser besitzen und das Plasma aufgrund der löslichen Proteine eine höhere Viskosität aufweist (Zheng et al. 2006, Haines et al. 2021). In der Arbeit zu Publikation 1 wurde aus diesem Grund Plasma zur Resuspendierung des Buffy Coats verwendet, da

möglichst viele Thrombozyten gewonnen werden sollten und im Pferdebereich bisher noch keine Ergebnisse zur Verträglichkeit solcher Additivlösungen vorliegen.

Der resuspendierte Buffy Coat wurde daraufhin erneut mit einem Soft Spin zentrifugiert (159 x g, 10 min) und der entstandene Überstand, der das sogenannte TK darstellt, wurde mittels einer Handpresse vollständig abgepresst. Die erneute Verwendung eines automatisierten Blutkomponenten-Extraktors hätte das Protokoll an dieser Stelle noch weiter standardisiert, allerdings war es bei dem vorhandenen Blutkomponenten-Extraktor nicht möglich ein entsprechendes Programm für diesen Schritt einzustellen. Die gewonnenen 3 Beutel TK jedes Spenderpferdes wurden gepoolt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Zur Lyse der Thrombozyten wurden drei Gefrier-/Auftauzyklen durchgeführt, da diese Methode einfach, effizient und ökonomisch ist und, wie bereits beschrieben, die am häufigsten genutzte Methode zur Lyse von Thrombozyten in Europa darstellt. Alternativ wäre eine Aktivierung durch Calciumchlorid, Ultraschall- oder Solvent-/Detergent-Behandlung möglich gewesen (Astori et al. 2016, Burnouf et al. 2016, Schallmoser et al. 2020). In den bisherigen equinen Studien zur ePL-Herstellung wurden entweder ein Gefrier-/Auftauzyklus (Del Bue et al. 2007, Seo et al. 2013, Russell und Koch 2016, Yaneselli et al. 2019) oder zwei mit drei zusätzlichen Zentrifugationsschritten angewandt (Sumner et al. 2017, Naskou et al. 2018). Die optimale Anzahl an Gefrier-/Auftauzyklen ist bisher noch unbekannt und variiert voraussichtlich zwischen 1–5 Zyklen und entsprechende Untersuchungen in diesem Bereich stehen noch aus (Burnouf et al. 2016). In einer Studie wurde die optimale Anzahl an Zyklen im Hinblick auf die Wachstumsfaktorkonzentration untersucht und dabei ergab eine Anzahl von 3–5 Zyklen die höchsten Konzentrationen (Strandberg et al. 2017) und auch die ISBT empfiehlt eine Anzahl von 3 – 5 Gefrier-/Auftauzyklen und Temperaturen von  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , um eine maximale Freisetzung von Wachstumsfaktoren zu erreichen (Strunk et al. 2018, Schallmoser et al. 2020). Somit wurden unter Anbetracht dieser Ergebnisse in der Publikation 1 drei Gefrier-/Auftauzyklen durchgeführt, wofür die Proben jeweils 20 h bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Ultratiefkühlschrank und 4 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter permanenter Agitation (Plasmatherm Barkey GmbH & CO.KG) gelagert wurden. Im Anschluss an die Gefrier-/Auftauzyklen wurde eine Zentrifugation mit  $4000\text{ x g}$  für 30 min durchgeführt mit einer anschließenden Filtration, um die noch vorhandenen Zellreste nach der Lyse zu

entfernen. Das ePL von allen 19 Spenderpferden wurde gepoolt, um den individuellen Einfluss der Spender und die Chargenvariabilität möglichst gering zu halten.

Alle Zentrifugationseinstellungen, die während der ePL-Herstellung verwendet wurden, beruhten auf eigenen Vorversuchen, da es nicht möglich war die Einstellungen aus der Humanmedizin zu übernehmen. Equines Blut muss mit deutlich geringeren Zentrifugalkräften zentrifugiert werden als humanes. Außerdem gab es weder in der Human- noch in der Pferdemedizin standardisierte Protokolle zur PL-Herstellung, die übernommen werden konnten. In anderen Studien zur ePL-Herstellung wurde bisher neben der Thrombozytapherese immer nur die PRP-Methode verwendet und dabei variierten die Zentrifugationseinstellungen zwischen den verschiedenen Studien enorm, weshalb diese in der Publikation 1 in der Tabelle 3 zur Verdeutlichung aufgeführt wurden. Im Gegensatz dazu waren in der Humanmedizin zwar Protokolle für die Buffy-Coat-Methode vorhanden, die sich jedoch nicht nur in den Zentrifugationseinstellungen (200–3200 x g für die zweite Zentrifugation), sondern auch bei der gewonnenen Thrombozytenkonzentration im TK deutlich unterschieden ( $100\text{--}10\,000 \times 10^9/\text{L}$ ) (Burnouf et al. 2016). Um den Verlauf der Thrombozyten- und Leukozytenkonzentration während der ePL-Herstellung in den Arbeiten zu Publikation 1 zu analysieren, wurden die Blutbeutel an sämtlichen Herstellungsschritten gewogen und Proben zur hämatologischen Untersuchung gewonnen.

Das ePL enthält plasmatische Koagulationsfaktoren wie Fibrinogen. In einigen Studien wurde empfohlen eine Fibrinogendepletion durchzuführen, da bei Zugabe von calciumhaltigen Kulturmedien eine physiologische Koagulation des Kulturmediums mit ePL abläuft und ein viskoelastisches Fibringel entsteht (Laner-Plamberger et al. 2015). Außerdem wurde bereits demonstriert, dass das Fibrinogen die immunmodulierenden Eigenschaften der hMSC negativ beeinflusst und die Adhäsion peripherer humaner NK-Zellen aus dem Blut erhöht, wodurch nicht nur die Gewebereparatur, sondern auch eine verstärkte Entzündungsreaktion ausgelöst wird (Almeida et al. 2012, Copland et al. 2013). Dennoch wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine Fibrinogendepletion verzichtet und stattdessen wurde dem Kulturmedium 1 U/ml Heparin-Natrium zugesetzt, um eine spontane Koagulation des Kulturmediums zu verhindern. Mittlerweile ist auch eine Pferdestudie zur Fibrinogendepletion von ePL publiziert worden, in welcher eine reduzierte Wachstumsfaktorkonzentration nach der Fibrinogendepletion sowie eine Verringerung der Proliferation und immunmodulatorischen

Fähigkeiten der eMSC im Vergleich zu fibrinogenhaltigem ePL nachgewiesen wurde (Naskou et al. 2019). Trotz dieser Ergebnisse sollte unter dem Ziel einer xenofreien Zellkultur bei einer erneuten Herstellung des ePL eine Fibrinogendepletion durchgeführt werden, da das verwendete Heparin-Natrium aus Schweinemukosa hergestellt wird und somit ein xenogener Zusatz des Kulturmediums ist, der vermieden werden sollte.

Die Konzentration an Wachstumsfaktoren im gewonnenen gepoolten ePL sowie in seinen Vorstufen (Serum, Plasma, gepooltes TK und Lysat jedes Spenderpferdes) wurde mittels kommerziell erhältlicher Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Kits quantifiziert. Alle Proben wurden vor der Messung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. PDGF-BB und TGF- $\beta$ 1 Quantikine ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), welche bereits in früheren equinen Studien bei Pferdeproben Anwendung fanden (Anderson et al. 1998, Desjardins et al. 2004, Donnelly et al. 2006, Boswell et al. 2014, McClain und McCarrel 2019), wurden in der Arbeit zu Publikation 1 entsprechend der Herstellervorgaben einschließlich der TGF- $\beta$ 1-Aktivierung mit Salzsäure zur Quantifizierung der Wachstumsfaktoren verwendet. Die Intra- und Inter-Assay-Genauigkeit für die Messung von Pferdeproben im TGF- $\beta$ 1 ELISA wurde bereits untersucht (Anderson et al. 1998, Desjardins et al. 2004), wobei eine Spezifität des Anti-human TGF- $\beta$ 1 für equines TGF- $\beta$ 1 gezeigt wurde und somit sichergestellt ist, dass der ELISA das equine TGF- $\beta$ 1 zuverlässig nachweist. Außerdem wurde in Bezug auf PDGF veröffentlicht, dass das equine PDGF-B (aber nicht PDGF-A) eine Nukleotid- und Peptidsequenzhomologie von  $> 90\%$  mit der humanen Version des PDGF aufweist (Donnelly et al. 2006), wodurch eine Verwendung humaner PDGF-BB ELISA-Kits für equine Proben möglich ist. Zusätzlich wurde der humane PDGF-BB Quantikine ELISA bereits erfolgreich in mehreren equinen Studien eingesetzt (Donnelly et al. 2006, Boswell et al. 2014, McClain und McCarrel 2019). Im Vergleich zu den Wachstumsfaktoren im ePL sowie seinen Vorstufen wurden PDGF-BB und TGF- $\beta$ 1 ebenfalls im FBS bestimmt. Hierbei ist allerdings die möglicherweise eingeschränkte Spezifität des Assays für bovine Wachstumsfaktoren als Restriktion zu beachten (siehe unten). In der Publikation 1 wurden nur die Wachstumsfaktoren PDGF-BB und TGF- $\beta$ 1 untersucht, da sie einen Einfluss auf die MSC-Kultivierung im Hinblick auf Proliferation und Differenzierung haben. In zukünftigen Untersuchungen sollten aber auch noch weitere Wachstumsfaktoren sowie Zytokine in Bezug auf

Geweberegeneration/Wundheilung sowie Entzündungsmodulation analysiert werden. Aus diesem Grund wurden in einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe als Zusatz zur vorliegenden Arbeit die Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , -4, -6 und -10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in den Serum-, Plasma-, TK- und ePL-Proben jedes Pferdes mithilfe von Sandwich-ELISA untersucht. Die Zytokinkonzentrationen im Serum, Plasma, TK und ePL waren ähnlich und korrelierten signifikant. Allerdings gab es eine große interindividuelle Variabilität der Zytokinkonzentrationen zwischen den verschiedenen Spenderpferden. Bei genauerer Analyse konnte ein Zusammenhang zwischen abnormen Befunden in der Blutchemie der Spenderpferde und hohen Zytokinkonzentrationen in den Proben nachgewiesen werden. Somit könnte eine Blutchemie nützlich sein, um die Zytokinkonzentration in Blutprodukten vorherzusagen, was für die Verwendung des ePL als Therapeutikum oder in der Zellkultur von großer Bedeutung sein könnte (Moellerberndt et al. 2023). Zusätzlich zur Quantifizierung der Wachstumsfaktoren wurden in der vorliegenden Arbeit in den gleichen Proben, die für die ELISA verwendet wurden, auch noch die Elektrolyt-, Totalprotein- sowie Albumin-Gehalte entsprechend der chemischen Qualitätsanalyse des FBS bestimmt.

In der anschließenden Zellkultur wurde evaluiert, ob eine Kultivierung der eMSC aus Fettgewebe in ePL-supplementiertem Kulturmedium möglich ist und inwiefern sich die zellspezifischen Charakteristika im Vergleich zu eMSC, welche in FBS-Medium kultiviert wurden, unterscheiden.

Die Gewinnung der dafür verwendeten eMSC erfolgte von 4 Spenderpferden im Zusammenhang mit einer vorherigen Studie der eigenen Arbeitsgruppe (Landesdirektion Leipzig TV34/13), wobei das Fettgewebe an der Kruppe lateral des Schweifansatzes entnommen wurde. Aus dem gewonnenen Fettgewebe wurden die MSC mittels Kollagenase-Digestion entsprechend des etablierten Protokolls der Arbeitsgruppe (Gittel et al. 2013) gewonnen und in FBS-Medium bis zur ersten Passage kultiviert und dann kryokonserviert. Für den Vergleich der Zellkultur-supplemente FBS und ePL wurden die kryokonservierten eMSC entsprechend des standardmäßig in der Arbeitsgruppe genutzten Protokolls aufgetaut und in Kulturmedium entweder mit 10 % FBS oder mit 10 %, 5 % oder 2,5 % ePL, sowie 1 % Penicillin-Streptomycin und 0,1 % Gentamycin unter Standardkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) für eine Passage zur Adaptation der eMSC an die verschiedenen Kulturmedien kultiviert. Wie bereits angemerkt wurden die Kulturmedien, die ePL

enthielten mit 1 U/ml Heparin-Natrium versetzt, um eine Koagulation zu vermeiden. Alle eMSC wurden zu Beginn in FBS-Medium isoliert und kryokonserviert. Erst nach dem Auftauen wurde das Kulturmedium teilweise auf ePL-Medium umgestellt. Es ist ungewiss, inwiefern dieser Supplementwechsel zu einer Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit und Proliferation der eMSC geführt hat. Allerdings wurde berichtet, dass hMSC, die erst in FBS-Medium kultiviert und dann in hPL-Medium überführt wurden, eine verbesserte Proliferation, geringere Seneszenz und kleinere Zellgröße im Vergleich zu kontinuierlich in FBS-Medium kultivierten hMSC zeigten (Griffiths et al. 2013).

Im Anschluss an die Passage zur Adaptation wurden die eMSC in die verschiedenen Versuchsansätze überführt. Dabei wurden je Spender pro Medium zwei technische Replikate angelegt, aus deren Daten ein Median ermittelt und in die statistische Auswertung der biologischen Replikate einbezogen wurde.

Zur Bestimmung der Generationszeiten wurde eine standardmäßig in der Zellkultur genutzte Methode verwendet, auf die daher hier nicht näher eingegangen wird. Um weitere Daten zur Zellproliferation zu erhalten, wurden jeweils an Tag 5 vor dem Passagieren der eMSC Aufnahmen mit standardisierten Einstellungen an einem Phasenkontrastmikroskop (Nikon Eclipse Ts2-FL) mit einer DS-Fi3 Kamera aufgenommen. Die Zellkonfluenz auf diesen Bildern wurde mit der Software Fiji Image J bestimmt. Dafür wurde der Kontrast der Bilder einheitlich verstärkt, der Hintergrund subtrahiert und dann jedes Bild binarisiert mit einem entsprechend auf jedes Bild angepassten Grenzwert. So konnte an jedem Bild die konfluente Fläche bestimmt werden. Zusätzlich wurde ein MTS-Assay, der eine photometrische Bestimmung der metabolischen Aktivität in der Zellkultur ermöglicht, durchgeführt. Hierfür wurde ein kommerziell erhältliches Assay-Kit (Cell Titer 96R Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet, bei dem eine Umwandlung der Tetrazolium-Verbindung in ein kolorimetrisch messbares Formazan-Produkt abhängig vom Energiestoffwechsel der eMSC erfolgt. Insgesamt ergaben die verschiedenen Untersuchungen zur Zellproliferation für die Kulturmedien mit 10 % FBS und 10 % ePL weitestgehend übereinstimmende Ergebnisse. Allerdings sind die Ergebnisse des MTS-Assays für die eMSC, die in 2,5 % ePL-Medium kultiviert wurden, kritisch zu reflektieren, da die Proliferation der eMSC mit 5 % ePL- und 2,5 % ePL-Medium sehr variabel und insuffizient war, sodass eine Berechnung der

Generationszeit für die eMSC in 2,5 % ePL-Medium nicht möglich war. Im Gegensatz dazu war im MTS-Assay kein Unterschied hinsichtlich der metabolischen Aktivität der eMSC zwischen den verschiedenen Kulturmedien mit 10 % FBS, 10 % ePL, 5 % ePL oder 2,5 % ePL zu erkennen. Eine mögliche Begründung für dieses Phänomen könnte sein, dass die eMSC bei einer Kultivierung mit 5 % ePL- oder 2,5 % ePL-Medium zwar nur eine geringe Verdopplung zeigen, dennoch aber metabolisch ähnlich aktiv sind wie die eMSC in 10 % FBS- oder 10 % ePL-Medium. Eine andere mögliche Erklärung könnte aber auch sein, dass die eMSC in 10 % FBS- oder 10 % ePL-Medium so schnell proliferieren, dass es durch eine hohe Konfluenz zu einer Kontaktinhibition kommt und die eMSC somit keine aktive Proliferation mehr zeigen und daher auch für die MTS-Reagenz nur noch schwer zu detektieren sind. Unter Betrachtung dieser Ergebnisse scheint der MTS-Assay für die Untersuchung sehr unterschiedlich schnell proliferierender Zellen nur eingeschränkt geeignet zu sein.

Um eine vollständige Charakterisierung der eMSC in den verschiedenen Medien entsprechend der Empfehlungen der ISCT (Dominici et al. 2006) durchzuführen, wurden der Immunophänotyp und die tripotente Differenzierungsfähigkeit der eMSC untersucht. Die Immunophänotypisierung mittels Durchflusszytometrie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Christiane Schnabel durchgeführt. Aufgrund des insuffizienten Wachstums der eMSC mit 5 % oder 2,5 % ePL-Medium wurde der Immunophänotyp nur an den eMSC in 10 % FBS- und 10 % ePL-Medium bestimmt. Entsprechend bereits veröffentlichter equiner Studien zur Immunophänotypisierung von eMSC (Paebst et al. 2014, Hillmann et al. 2016) wurden die Inklusionsmarker CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105 sowie die Exklusionsmarker CD14, CD34, CD45, CD79 $\alpha$  und MHC II analysiert. Des Weiteren wurde zur Bestimmung des Anteils vitaler eMSC eine Lebend-Tot-Färbung verwendet. Interessanterweise zeigte sich der Nachweis einer möglichen CD14-Expression der eMSC abhängig vom verwendeten Antikörper. Unter Verwendung eines Anti-Human-CD14-Antikörpers (Klon 134620) konnte die Expression von CD14 auf den eMSC als negativ beschrieben werden, vergleichbar zu vorherigen equinen Studien, welche den gleichen Klon verwendeten und eine positive Expression von CD14 auf equinen Monozyten, aber nicht auf eMSC nachwiesen (Paebst et al. 2014). Die genaue Spezifität dieses Anti-Human-CD14 Antikörpers für equines CD14 konnte allerdings bisher noch nicht gezeigt werden. In der Arbeit zu Publikation 1 wurde für die durchflusszytometrische Analyse ein pferdespezifischer Antikörper (Klon 105, Kabithe et al. 2010) verwendet. Mit diesem

pferdespezifischen Antikörper (Klon 105) wurde CD14 auf der Mehrheit der eMSC dargestellt. Dieses Ergebnis einer positiven CD14-Färbung von eMSC stimmt mit einer anderen equinen Studien in der Literatur überein, die ebenfalls eine CD14-Expression auf eMSC mit dem Klon 105 nachgewiesen hat (Hackett et al. 2011). Allerdings sollte CD14 laut der ISCT nicht auf hMSC exprimiert werden (Dominici et al. 2006), da es ein Glykolipid-verankertes Membranglykoprotein ist, welches auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (Tesfaigzi und Daheshia 2006, Braun et al. 2010). Es dient als Rezeptor für den Komplex aus bakteriellem LPS und LPS-Bindungsprotein und ist gleichzeitig mit dem Toll-like Rezeptor 4 auf der Zelloberfläche assoziiert (Wagner et al. 2013) und somit an der pro-inflammatorischen Wirkung beteiligt. Aus diesem Grund sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden, ob die eMSC tatsächlich das gesamte funktionelle CD14-Molekül oder nur einen Teil davon exprimieren, oder ob die eMSC eventuell lösliches CD14 binden, welches in FBS und ePL vorhanden ist, da das Phänomen in beiden Medien auftrat. In der Publikation 1 wurden aufgrund dieser neuen interessanten Beobachtung die Ergebnisse zu beiden Antikörpern mithilfe eines Supplements (Supplement 2) angefügt, wo die beiden Antikörper an equinen PBMC und eMSC in 10 % FBS und 10 % ePL-Medium untersucht wurden. Die Varianz zwischen den beiden Antikörpern verdeutlicht das Problem bei der Immunophänotypisierung equiner Zellen. Da es nur wenige kommerziell erhältliche Antikörper für Pferde gibt, muss häufig auf Antikörper gegen andere Spezies zurückgegriffen werden, die dann zunächst validiert und etabliert werden müssen.

Die tripotente Differenzierung der eMSC in Passage 2 wurde jeweils mit kommerziell erhältlichen Differenzierungsmedien (Gibco®, ThermoFisher Scientific) nach einer Kultivierung in 10 % FBS-, 10 % ePL- und 2,5 % ePL-Medium durchgeführt und wie zuvor beschrieben, ausgewertet (Brandt et al. 2018). Auf eine Differenzierung der eMSC in 5% ePL-Medium wurde verzichtet, da sich bereits in vorherigen Versuchen gezeigt hatte, dass die eMSC in höher konzentriertem ePL-Medium eine bessere Expansion aufweisen als in geringer konzentriertem und somit wurde nur eine niedrige ePL-Konzentration mit dem 2,5 % ePL-Medium untersucht. Für die adipogene Differenzierung musste dem Differenzierungsmedium Kaninchenserum zugesetzt werden, um die Lipidvakuolenbildung zu aktivieren. Zur Auswertung wurde eine Oil Red O-Färbung kombiniert mit einer Hämatoxylin-Gegenfärbung angewandt. Die Intensität der adipogenen Differenzierung wurde von zwei verblindeten Personen

anhand eines Punktesystems, das wie zuvor beschrieben (Gittel et al. 2013) auf dem Prozentsatz der differenzierten Zellen sowie der Größe und Anordnung der Lipidtropfen in diesen Zellen basierte, bewertet. Bei der osteogenen Differenzierung wurde eine von Kossa-Färbung zum Nachweis der extrazellulären Mineralisierung durchgeführt. Während in anderen Studien die quantitative Beurteilung der osteogenen Differenzierung mittels einer Absorption bei 492 nm für gefärbte differenzierte und undifferenzierte Kontrollen stattfand, wurden in Publikation 1 lichtmikroskopische Aufnahmen erstellt und daran die mittleren Graustufenwerte mit der Software Fiji Image J extrahiert und evaluiert. Die chondrogene Differenzierung wurde in Pelletkultur untersucht und die anschließend von den Pellets angefertigten Paraffinschnitte mit Alcianblau und Masson's Trichrom gefärbt. Die Bewertung der chondrogenen Differenzierung erfolgte durch zwei verblindete Personen auf der Grundlage des Grogan Scores (Grogan et al. 2006). Eine entsprechende Adaptation des Scores an die zwei unterschiedlichen Färbungen wurde durchgeführt und im Supplement 1 der Publikation 1 aufgeführt. Wie schon bei der osteogenen Differenzierung wurden auch für die chondrogene Differenzierung lichtmikroskopische Aufnahmen erstellt und diese zur Auswertung der Qualität der chondrogenen Differenzierung genutzt. Dafür wurde bei den Aufnahmen mithilfe der Software Fiji Image J vergleichbar zu Ruifrok und Johnston (2001) eine Farbdekonvolution und Binarisierung durchgeführt und anschließend der prozentuale Anteil der jeweiligen Färbekomponenten der gefärbten Pellets bestimmt. Das Verhältnis aus Knorpelmatrix- und Gegenfärbung wurde ermittelt und zusätzlich zum Groganscore zur Beurteilung der chondrogenen Differenzierung der eMSC nach einer Kultivierung in den drei verschiedenen Medien herangezogen. Optimal wäre eine weitere Auswertung der chondrogenen Differenzierung durch eine qPCR oder Proteinanalyse gewesen, allerdings konnte dies aufgrund unzureichender Zellzahlen in einigen eMSC-Proben, die mit 2,5 % ePL-Medium kultiviert wurden, nicht ausgeführt werden. Die eMSC in 10 % ePL-Medium zeigten eine schwächere chondrogene Differenzierung als die eMSC in 10 % FBS- und 2,5 % ePL-Medium. Im Gegensatz dazu beschrieben andere Studien eine gesteigerte chondrogene Differenzierung mit ePL- und hPL-Medium (Mishra et al. 2009, Shih et al. 2011, Gottipamula et al. 2012, Naskou et al. 2018). Eine mögliche Erklärung für diese beobachtete Diskrepanz könnten zusätzlich benötigte Waschschriffe zur vollständigen Entfernung des ePL sein, die durchgeführt werden sollten, bevor die eMSC in das Differenzierungsmedium überführt werden. In diesem

Zusammenhang scheinen weitere Untersuchungen notwendig zu sein, um die Differenzierung mit ePL-Medium zu optimieren.

Für die gesamte Publikation 1 wurden die eMSC nur in 3 Passagen untersucht, da die eMSC bei Pferden in der Regel nur bis Passage 3 oder 4 therapeutisch eingesetzt werden. Der Grund dafür ist, dass die eMSC bis zu diesem Zeitpunkt als stabil angesehen werden und erst danach die Entwicklung genetischer Instabilitäten beginnt (Yang et al. 2018). Dementsprechend wurden die Untersuchungen der eMSC in den verschiedenen Medien auf die Passagen 2-4 beschränkt, da die Ergebnisse so auch Hinweise für die spätere klinische Anwendung liefern.

### **5.1.2 Diskussion der Ergebnisse**

Vorrangiges Ziel der ersten Studie dieser Dissertation war die Herstellung eines standardisierten ePL und die weitere Evaluierung des gewonnenen ePL als Zellkultursupplement bei der In-vitro-Kultivierung von eMSC im Vergleich zu FBS. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Buffy-Coat-Methode verwendet, um ein standardisiertes ePL herzustellen. Die Buffy-Coat-Methode entspricht dem aktuellen Stand der Technik in der Humanmedizin und unterstützt durch eine wissenschaftliche Kooperation mit Dr. Hatim Hemeda PL BioScience GmbH, konnten Standardisierung und Qualitätskontrollen bei der ePL-Herstellung in Anlehnung an den Ablauf bei der Produktion von hPL erfolgen. Während der ePL-Herstellung wurden mehrere Qualitätskontrollen in verschiedenen Verarbeitungsschritten sowie im fertigen gepoolten ePL durchgeführt. Mittels bakteriologischer/mykologischer sowie virologischer Untersuchungen wurden weder in den Vollblutproben der Spender noch im endgültigen ePL-Pool bakteriologische/mykologische Verunreinigungen festgestellt. Ein Spenderpferd wurde jedoch positiv auf Herpesviridae getestet. Das ePL dieses Pferdes wurde nicht in das Endprodukt mit aufgenommen und die gewonnenen Daten dieses Pferdes wurden von allen Analysen ausgeschlossen.

Entsprechend der Anforderungen an die Qualitätskontrollen bei der Herstellung von TKs in der Humanmedizin wurden auch für Publikation 1 das Volumen, die Thrombozyten-, Leukozyten- und Wachstumsfaktorkonzentrationen sowie der pH-Wert der unterschiedlichen Vorstufen der ePL-Herstellung bestimmt. Somit konnte aus

einem Vollblutvolumen von 504,9 ml im Median (IQR: 25,7) ein TK-Volumen von 86,2 ml im Median (IQR: 7,1) pro entnommenem Blutbeutel gewonnen werden. Dies erfüllt die Anforderungen der Humanmedizin, wo aus einem Vollblutbeutel > 40 ml TK mit mindestens  $60 \times 10^9$  Thrombozyten gewonnen werden müssen (Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components 2020). In der Veterinärmedizin existieren bisher noch keine vergleichbaren Anforderungen an die Qualitätskontrollen, weshalb für die Publikation 1 die humanmedizinischen Anforderungen als Richtwerte verwendet wurden. Durch die Buffy-Coat-Methode wurden im Median 70,2 % (IQR: 19,3) der Thrombozyten aus dem Vollblut im TK zurückgewonnen und eine Gesamtthrombozytenzahl von  $484 \times 10^9/L$  erreicht, was einer 4,2-fachen Erhöhung der Thrombozytenkonzentration entsprach. Im Vergleich dazu lagen die Thrombozytenkonzentrationen in anderen equinen Studien zur ePL-Herstellung zwischen  $591 \times 10^9/L$  und  $1\ 000\text{--}2\ 000 \times 10^9/L$  unter Verwendung der PRP-Methode mit mehreren Zentrifugationen (Del Bue et al. 2007, Seo et al. 2013, Russell und Koch 2016, Gilbertie et al. 2018, Bozorgmanesh et al. 2019, Yaneselli et al. 2019) und  $350 \pm 106 \times 10^9/L$  bis  $357 \pm 177 \times 10^9/L$  durch Thrombozytapherese (Sumner et al. 2017, Naskou et al. 2018) (Tabelle 3 Publikation 1). Daten zur Buffy-Coat-Methode für die ePL-Herstellung liegen bisher zum Vergleich nicht vor. Allerdings lag die Thrombozytenkonzentration in der Publikation 1 in der gleichen Größenordnung wie für die PRP-Methode in anderen Studien beschrieben (Del Bue et al. 2007, Seo et al. 2013, Russell und Koch 2016, Gilbertie et al. 2018, Bozorgmanesh et al. 2019, Yaneselli et al. 2019) und sogar höher als die Thrombozytenkonzentrationen, die durch Thrombozytapheresen erzielt wurden (Sumner et al. 2017, Naskou et al. 2018). Des Weiteren entspricht die erlangte Thrombozytenkonzentration der equinen TKs ebenfalls der Größenordnung der Thrombozytenkonzentration ( $100\text{--}10\ 000 \times 10^9/L$ ) (Burnouf et al. 2016) in humanen TKs und erfüllt somit gleichzeitig auch die Anforderungen der humanen Qualitätskriterien an ein TK.

Von den Leukozyten aus dem Vollblut wurden im Median 6,3 % (IQR: 2,6) in den TKs zurückgewonnen und somit eine Leukozytenkonzentration von rund  $2 \times 10^9/L$  in den TKs erreicht, was einer 0,4-fachen Reduktion der Leukozyten entspricht. Der Richtwert in der Humanmedizin liegt bei einer Leukozytenkonzentration von  $0,05 \times 10^9$  pro Einheit (Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components 2020). In der vorliegenden Arbeit lag die Leukozytenkonzentration pro Einheit bei  $0,15 \times 10^9$  und somit nur minimal oberhalb der Richtwerte der Humanmedizin. Dennoch

zeigte sich, dass eine Thrombozytapherese zwar kostspieliger ist und spezielle Geräte erfordert, aber im Hinblick auf die Leukozytenkonzentration mit  $0,15 \times 10^9/L$  ein noch besseres Ergebnis bei der Leukozytenreduktion im Vergleich zur Buffy-Coat-Methode erzielt (Sumner et al. 2017).

Das für die Zellkulturexperimente verwendete gepoolte ePL wies eine PDGF-BB-Konzentration von 3,8 ng/ml auf, während FBS eine PDGF-BB-Konzentration nahe oder unterhalb der Nachweisgrenze des Assays aufwies. Die Konzentration von TGF- $\beta$ 1 betrug 3,96 ng/ml im ePL und 3,4 ng/ml im FBS. Die Wachstumsfaktorkonzentrationen in den TKs befanden sich in einem ähnlichen Bereich wie die des ePL. Dies deutet darauf hin, dass die Lyse der Thrombozyten bereits nach einem Gefrierschritt, der für die Lagerung der TK-Proben bis zur Durchführung der ELISA-Analysen erforderlich war, nahezu vollzogen ist. Unerwarteterweise zeigte sich eine Diskrepanz zwischen dem Median der TGF- $\beta$ 1-Konzentration der einzelnen Lysate der Pferde und der gemessenen Konzentration im gepoolten ePL, was darauf hindeutet, dass eine TGF- $\beta$ 1-Aktivierung während der letzten Verarbeitungsschritte stattfindet, die möglicherweise zu sukzessive weniger aktivierbarem TGF- $\beta$ 1 im gepoolten ePL führt. Dieses Ergebnis sollte weiter untersucht und die verwendeten Verfahren oder Materialien analysiert und gegebenenfalls verbessert werden. In früheren Studien, welche die PRP-Methode oder Thrombozytapherese zur ePL-Produktion verwendet haben, wurden ähnliche (PDGF-BB: 3,5 ng/ml und TGF- $\beta$ 1: 6,1 ng/ml) (Sumner et al. 2017) oder sogar höhere (PDGF-BB: 5,2 ng/ml und TGF- $\beta$ 1: 24,5 ng/ml) (Russell und Koch 2016) Wachstumsfaktorkonzentrationen im ePL ermittelt. In einer anderen Studie, in der ebenfalls der Quantikine ELISA zur Bestimmung der PDGF-BB-Konzentration verwendet wurde, konnte in gleicher Weise kein PDGF-BB im FBS nachgewiesen werden (Russell und Koch 2016). Jedoch sollte in diesem Zusammenhang beachtet werden, dass die gemessenen Wachstumsfaktorkonzentrationen nicht nur je nach PL-Herstellungsverfahren variieren, sondern dass sie auch durch die Spezifität des ELISA beeinflusst werden (Doucet et al. 2005, Textor und Tablin 2012, Sumner et al. 2017), so dass direkte Vergleiche zwischen Studien oder Proben von verschiedenen Spezies nicht immer eindeutig möglich sind. Für bovine Proben wie das FBS ist eine vergleichbare Homologie zu humanem PDGF-BB bisher nicht bekannt und somit kann eine nicht vorhandene Spezifität des Assays der Grund für geringe bzw. nicht detektierbare PDGF-BB-Konzentrationen im FBS sein. Ob dies die Ursache für die in bisherigen Studien gering erscheinende PDGF-BB-

Konzentration im FBS ist, sollte in weiterführenden Untersuchungen mit einem für die bovine Spezies validierten ELISA evaluiert werden.

Des Weiteren wurde bereits berichtet, dass Rasse, Geschlecht und Alter der Spender das Wachstumsfaktorprofil der equinen TKs beeinflussen. Weibliche Pferde und Pferde im Alter von < 5 Jahren wiesen signifikant höhere Konzentrationen an PDGF-BB und TGF- $\beta$ 1 in Blutprodukten auf. Für PDGF-BB wurde dies auch bei Ponyrassen beobachtet (Giraldo et al. 2013). Diese Ergebnisse wurden in Publikation 1 teilweise reproduziert, wobei die Thrombozyten- und Wachstumsfaktorkonzentrationen in den TKs und Lysaten negativ mit dem Alter der Pferde korreliert waren. Um die individuellen Schwankungen auszugleichen und einheitliche Chargen herzustellen, wurde das ePL der 19 Pferde gepoolt. Dennoch bleibt es empfehlenswert, die Blutproben von jungen Spenderpferden einheitlicher Rassen zu entnehmen, um ein TK und ePL von hoher Qualität zu erhalten.

Zusätzlich zur Analyse der Thrombozyten-, Leukozyten-, und Wachstumsfaktorkonzentrationen wurden der Elektrolyt-, Glukose-, Laktat-, Totalprotein- und Albumingehalt der unterschiedlichen Vorstufen der ePL-Herstellung in Anlehnung an die Qualitätskontrollen beim FBS bestimmt. Dabei ergab sich ein stabiler pH-Wert bei den unterschiedlichen Vorstufen. Die Elektrolyt-, Glukose-, Laktat-, Totalprotein- und Albuminkonzentrationen zeigten in den Proben aus der Lysatherstellung geringe Unterschiede zum Serum, was durch die Bindung an und/oder die Verdünnung durch das verwendete Antikoagulans CPD erklärt werden kann. Ein Zusammenhang mit der Verarbeitung des Blutes konnte bei den Veränderungen nicht hergestellt werden. Im Vergleich zum FBS waren die Glucose- und Proteinkonzentrationen im equinen Serum und in allen Schritten der Lysatherstellung höher als im FBS, während die Kalium- und Laktatkonzentrationen im FBS höher waren, was auf speziesspezifische Unterschiede zurückgeführt werden kann.

Das gewonnene gepoolte ePL wurde schließlich mit FBS im Hinblick auf die Eignung als Zellkultursupplement für die In-vitro-Kultivierung von aus Fettgewebe gewonnenen eMSC verglichen. Dabei wurde das ePL entsprechend früheren Empfehlungen (Naskou et al. 2018) in drei unterschiedlichen Konzentrationen angewandt (2,5 %, 5 % und 10 %), wohingegen das FBS nur in der standardmäßig verwendeten Konzentration (10 %) genutzt wurde. Die eMSC zeigten in allen Medien die charakteristische

fibroblastenähnliche Morphologie, allerdings war die Form der eMSC, die mit ePL-Medium kultiviert wurden, eher rundlich und sie schienen in dichteren Clustern zu wachsen. Das Wachstum in dichteren Clustern konnte bei den eMSC mit ePL-Medium in einer anderen equinen Studie ebenfalls nachvollzogen werden, hingegen erschienen dort die eMSC kleiner und spindelförmiger als die mit FBS-Medium (Seo et al. 2013). Diese subtil unterschiedliche Morphologie der eMSC mit ePL-Medium könnte auch auf die verschiedenen Quellen der eMSC zurückzuführen sein, da in der Studie von Seo et al. (2013) Knochenmark-eMSC und in der hier vorliegenden Studie Fettgewebe-eMSC verwendet wurden. Wie bereits beschrieben, können die MSC aus verschiedenen Quellen unterschiedliche Eigenschaften bezüglich der Proliferations- und Differenzierungskapazität haben (Burk et al. 2013).

Bei der Analyse der Proliferationskinetik konnte die konsistenteste Lebensfähigkeit und Proliferation bei den eMSC, die mit 10 % ePL-Medium kultiviert wurden, beobachtet werden. Allerdings war die Konfluenz an Tag 5, die Generationszeit und die metabolische Aktivität der eMSC mit 10 % ePL- und 10 % FBS-Medium ähnlich. Mit 5 % ePL-Medium war die Proliferation sehr variabel und mit 2,5 % ePL-Medium äußerst unzureichend, wodurch die Konfluenz in 2,5 % ePL-Medium am geringsten war und die Generationszeit in 5 % ePL-Medium länger als in 10 % FBS-Medium. Hier ist anzumerken, dass die Berechnung der Generationszeit bei einer von vier Proben in 5 % ePL-Medium und bei allen vier Proben in 2,5 % ePL-Medium zu negativen Ergebnissen führte, so dass diese Werte von den weiteren Vergleichsanalysen ausgeschlossen werden mussten. Interessanterweise gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die metabolische Aktivität der eMSC. Allerdings konnte in einer weiterführenden Studie mit teilweise den gleichen eMSC und der gleichen Charge ePL gezeigt werden, dass die metabolische Aktivität der eMSC, die mit 10 % ePL-Medium kultiviert wurden, im Vergleich zu FBS- und 2,5 % ePL-Medium am höchsten war (Hagen et al. 2022). Das insuffiziente Wachstum der eMSC mit niedriger konzentriertem ePL-Medium steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus der Humanmedizin. Dort bewirkte das 5 % hPL-Medium eine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate der hMSC im Vergleich zur Supplementierung mit FBS (Griffiths et al. 2013). Hier werden artspezifische Unterschiede deutlich. Denn im Gegensatz zu 5 % hPL-Medium, wo der Wachstumsfaktorgehalt optimal für die Proliferation der hMSC ist, reicht der Wachstumsfaktorgehalt in 5 % oder 2,5 % ePL-Medium nicht aus, um eine konsistente Proliferation der eMSC zu

unterstützen. Eine mögliche Ursache hierfür könnten die unterschiedlichen Thrombozytenkonzentrationen in humanem und equinem Vollblut sein. Der Referenzbereich für Thrombozyten beim Menschen liegt bei  $150\text{--}450 \times 10^9/\text{L}$  (Burnouf et al. 2016), bei Pferden jedoch nur bei  $94\text{--}232 \times 10^9/\text{L}$  (Stokol 2020). Auch wenn die Thrombozytenzahl in den equinen TKs der vorliegenden Studie den humanen Richtwerten entsprach, kann die höhere Thrombozytenzahl im Vollblut des Menschen dennoch zu höheren Thrombozytenzahlen in den humanen TKs führen. Aufgrund dessen ist es nicht überraschend, dass die für hPL berichteten Wachstumsfaktorkonzentrationen (Klatte-Schulz et al. 2018) höher erscheinen als in ePL, was erklären könnte, dass weniger hPL benötigt wird, um die Proliferation zu unterstützen.

Die Proliferationsergebnisse in der Publikation 1 stimmen mit den Erkenntnissen zweier anderer equiner Studien überein, von denen eine die PRP-Methode (Seo et al. 2013) und die andere die Thrombozytapherese (Naskou et al. 2018) zur Herstellung der TKs und des ePL verwendet hat. Darüber hinaus zeigten zwei weitere equine Studien eine dosisabhängige Proliferation der eMSC in ePL-Medium (Del Bue et al. 2007, Russell und Koch 2016). Doch nur bei einer Supplementierung mit 20 % ePL wurde die Proliferation der eMSC im Vergleich zu FBS deutlich erhöht (Yaneselli et al. 2019). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen mit eMSC führte eine Kultivierung der hMSC aus Knochenmark und Fettgewebe mit hPL-Medium im Vergleich zu FBS-Medium zu einer erhöhten Proliferation der hMSC (Doucet et al. 2005, Blande et al. 2009, Cholewa et al. 2011, Becherucci et al. 2018).

Der Immunphänotyp der eMSC nach der Kultivierung mit 10 % FBS- oder 10 % ePL-Medium wurde in dieser Studie mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Diese Analyse ergab, dass der Immunphänotyp der eMSC, die in FBS- oder ePL-Medium kultiviert wurden, ähnlich ist. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Inklusionsmarker CD29, CD44, CD90, CD73 und CD105, während CD73 und CD105 in allen Medien weitestgehend negativ waren. Darüber hinaus wiesen die eMSC auch keine Expression der Exklusionsmarker CD34, CD45 und MHC II auf. Diese Beobachtungen sind vergleichbar mit anderen equinen und humanen Studien, bei denen eine ähnliche Expression von Oberflächenmarkern in verschiedenen Medien beobachtet wurde (Doucet et al. 2005, Horn et al. 2010, Mojica-Henshaw et al. 2013, Yaneselli et al. 2019, Even et al. 2022). Das Fehlen von CD73 in eMSC steht ebenfalls

im Einklang mit den meisten früheren equinen Studien (Ranera et al. 2011, De Schauwer et al. 2012, Paebst et al. 2014, Hillmann et al. 2016), während CD105 in früheren Studien sowohl eine hohe (Braun et al. 2010) als auch eine sehr niedrige oder variable Expression gezeigt hat (Ranera et al. 2011, De Schauwer et al. 2012, Paebst et al. 2014). In einer Studie wurde eine CD45+-Population in den eMSC nachgewiesen, deren Anteil nach einer Kultivierung mit FBS-Medium deutlich höher als nach einer Kultivierung mit ePL-Medium war (Naskou et al. 2018). Des Weiteren wurde ebenfalls darüber berichtet, dass die eMSC mit FBS-Medium einen höheren Prozentsatz CD90 exprimierten als mit ePL-Medium (Naskou et al. 2018). Im Gegensatz dazu stellte sich in der hier aufgeführten Studie die konsistenteste Expression von CD90 in eMSC, die mit 10 % ePL-Medium kultiviert wurden, dar und die Expression von CD45 war in allen Medien fast nicht nachweisbar. Die CD14-Expression variierte abhängig vom verwendeten Antikörper. So konnte CD14 auf der Mehrheit der eMSC nachgewiesen werden, wenn ein pferdespezifischer Antikörper für CD14 (Klon 105, Kabithe et al. 2010) verwendet wurde, wie es auch in der Literatur für diesen Antikörper-Klon bereits beschrieben wurde. Unter Verwendung eines Anti-Human-CD14-Antikörpers (Klon 134620) konnte keine Expression von CD14 auf den eMSC nachgewiesen werden, was im Einklang mit der Empfehlung der ISCT steht, wonach CD14 auf Monozyten, aber nicht auf MSC vorliegen sollte (Dominici et al. 2006). In vorherigen equinen Studien, welche ebenfalls den Anti-Human-CD14-Antikörper verwendeten, konnte eine Expression von CD14 auf Monozyten, aber nicht auf eMSC nachgewiesen werden (Paebst et al. 2014). Da aber die genaue Spezifität dieses Anti-Human-CD14-Antikörpers für equines CD14 bisher noch nicht endgültig geklärt ist (Tesfaigzi und Daheshia 2006, Braun et al. 2010), sollten weitere Untersuchungen zur CD14-Expression der eMSC durchgeführt werden. In der vorliegenden Studie wurden im Supplement 2 die Ergebnisse zu beiden Antikörpern mit equinen PBMC und eMSC nach einer Kultivierung mit 10 % FBS- und 10 % ePL-Medium dargestellt.

Bei der tripotenten Differenzierung zeigten die eMSC in den verschiedenen Medien in Übereinstimmung mit früheren Studien keine signifikanten Unterschiede in der osteogenen und adipogenen Differenzierung (Doucet et al. 2005, Schallmoser et al. 2007, Ben Azouna et al. 2012, Naskou et al. 2018). Überraschenderweise differenzierten sich auch die eMSC, die mit 2,5 % ePL-Medium kultiviert wurden problemlos in Adipozyten und Osteozyten, obwohl die Proliferation in diesem Medium

eher insuffizient war. Bei der chondrogenen Differenzierung mit 10 % ePL-Medium ergaben sich unerwartete Ergebnisse, denn die eMSC in 10% ePL-Medium wiesen eine geringere chondrogene Differenzierung als die eMSC in 10 % FBS- oder 2,5 % ePL-Medium auf. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu anderen Studien, in denen berichtet wurde, dass die chondrogene Differenzierung von eMSC und hMSC durch die Kultivierung mit PL verbessert wurde (Mishra et al. 2009, Shih et al. 2011, Gottipamula et al. 2012, Naskou et al. 2018). Außerdem wurde bereits nachgewiesen, dass MSC während der chondrogenen Differenzierung die chondrogenen Marker Aggrecan und Sox 9 sowie die extrazelluläre Knorpelmatrix je nach Konzentration der Wachstumsfaktoren aus den Thrombozyten exprimieren (Prins et al. 2009, Mishra et al. 2009, Shih et al. 2011, Rubio-Azpeitia und Andia 2014). Eine entscheidende Rolle für die chondrogene Differenzierung scheint TGF- $\beta$  zu spielen (Grimaud et al. 2002, Chapman et al. 2020). Eine Dysbalance oder Inhibition der Differenzierung durch andere Faktoren im ePL, die im 10 % ePL-Medium höher konzentriert sind als im 2,5 % ePL-Medium, könnten eine mögliche Erklärung für die schwächere Differenzierung der eMSC nach der Kultivierung in 10 % ePL-Medium sein. Daher lässt sich vermuten, dass eventuell umfangreichere Waschschriffe notwendig sind, um das ePL vollständig zu entfernen, bevor die eMSC in das chondrogene Differenzierungsmedium überführt werden. Somit sollten in diesem Zusammenhang weitere Untersuchungen bezüglich der chondrogenen Differenzierung der eMSC mit ePL-Medium durchgeführt werden.

### **5.1.3 Interpretation der Publikation 1 in Bezug auf die gestellten Hypothesen**

Das Ziel der ersten Studie, ein standardisiertes Protokoll zur ePL-Herstellung zu etablieren, wurde in der Arbeit zu Publikation 1 erfolgreich umgesetzt. Dabei erwies sich die vor der Durchführung der Studie aufgestellte erste Hypothese, dass die Buffy-Coat-Methode nützlich ist, um equine TKs mit erhöhter Thrombozyten- und erniedrigter Leukozytenzahl herzustellen, als korrekt. Es konnte in der vorliegenden Studie das erste Buffy-Coat-basierte ePL in Anlehnung an die humanmedizinischen Standards hergestellt werden, welches eine 4,2-fach erhöhte Thrombozyten- und eine 0,4-fach reduzierte Leukozytenkonzentration aufwies. Nach der erfolgreichen Herstellung des ePL konnte auch das weitere Ziel der ersten Studie, das ePL als Zellkultursupplement bei der In-vitro-Kultivierung von eMSC im Vergleich zu FBS besonders im Hinblick auf

die Beeinflussung der zellspezifischen Charakteristika der eMSC zu untersuchen, erfolgreich umgesetzt werden. Hierbei erwies sich auch die zweite aufgestellte Hypothese, dass die eMSC nach einer Kultivierung mit den verschiedenen Zellkultursupplementen ePL und FBS ähnliche zellspezifische Charakteristika aufweisen, als korrekt. In der Publikation 1 wurden zwar nur die von der ISCT als Basischarakterisierung der MSC vorgegebenen Eigenschaften im Vergleich zwischen ePL- und FBS-Medium untersucht, allerdings zeigten sich hier zwischen den Medien keine größeren Unterschiede und das 10 % ePL-Medium unterstützte die Proliferation der eMSC ähnlich wie das FBS-Medium. Somit kann das ePL als eine vielversprechende Alternative zum FBS angesehen werden und ist in der Lage die eMSC-Kultivierung zu verbessern. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse der Publikation 1 sollten weitere Untersuchungen der funktionellen Eigenschaften der eMSC mit ePL durchgeführt werden, wie es in der nachfolgenden Publikation 2 erfolgt ist.

## **5.2 Publikation 2 – Funktionelle Eigenschaften der eMSC mit ePL-Medium**

### **5.2.1 Reflexion von Material und Methoden**

In der ersten Studie (Publikation 1) wurde das ePL standardisiert hergestellt und in Zellkultorexperimenten zur Basischarakterisierung untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass dieses ePL die Expansion und Differenzierung von eMSC vergleichbar zum FBS-Medium unterstützt, wenn es in der gleichen Konzentration (10 %) verwendet wird (Hagen et al. 2021, Hagen et al. 2022). Da MSC jedoch in der Lage sind, ihre Funktionen an ihre Umgebung anzupassen (Vallés et al. 2015, Luk et al. 2017), ist es vor der Einführung dieses ePL in die klinische Anwendung von entscheidender Bedeutung den Effekt des ePL auf die Zellfitness, Sicherheit und funktionellen Eigenschaften der eMSC ausführlich zu untersuchen. Somit war es das Ziel der zweiten In-vitro-Studie, den Einfluss des gewonnenen ePL auf die funktionellen Eigenschaften der eMSC, wie Zellfitness oder pro-angiogenes Potenzial, vergleichend zum FBS zu analysieren.

Hierfür wurden eMSC mit den in Publikation 1 beschriebenen Methoden aus Fettgewebe von aus anderen Gründen euthanasierten Pferden oder im

Zusammenhang mit einer vorherigen Studie der eigenen Arbeitsgruppe (Landesdirektion Leipzig TV34/13) (n = 7) isoliert und in den drei unterschiedlichen Kulturmedien entweder mit 10 % FBS, 10 % ePL oder 2,5 % ePL kultiviert. Das verwendete ePL entsprach dem mittels Buffy-Coat-Methode und Gefrier-/Auftauzyklen gewonnenen gepoolten ePL aus der Arbeit zu Publikation 1 und wurde in der hier beschriebenen Studie in der gleichen Charge verwendet. Eine mögliche Beeinflussung der Zellfitness könnte durch den Supplementwechsel entstanden sein, da alle eMSC in FBS-Medium isoliert und kryokonserviert und erst nach dem Auftauen teilweise in ePL-Medium überführt wurden. Zwar wurden die eMSC in der Publikation 1 ebenfalls zuerst in FBS-Medium isoliert und kryokonserviert, was zu keiner offensichtlichen Beeinflussung der eMSC geführt hat, allerdings ist es dennoch ungewiss, inwiefern dieser Supplementwechsel einen Einfluss auf die eMSC hatte. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass hMSC, die nach einer Kultivierung in FBS-Medium in hPL-Medium überführt wurden, eine verbesserte Proliferation, geringere Seneszenz und kleinere Zellgröße im Vergleich zu kontinuierlich in FBS-Medium kultivierten hMSC aufwiesen (Griffiths et al. 2013).

Alle Experimente zur Zellfitness-Analyse wurden mit eMSC von n = 5 der 7 Spender als biologische Replikate durchgeführt, wobei die gleichen Spender für die Zellfitness-Analysen und die Karyotypisierung verwendet wurden. Für die Angiogenese-Co-Kultur-Assays wurden ebenfalls n = 5 der 7 Spender verwendet, wobei sich dort 2 Spender von den eMSC, die zur Zellfitness-Analyse verwendet wurden, aufgrund nur begrenzt zur Verfügung stehender Zellzahlen unterschieden.

Nach der Adaptation an die unterschiedlichen Kulturmedien wurden die eMSC in die verschiedenen Versuchsansätze überführt. MSC haben nur eine begrenzte Replikationskapazität und nach einer bestimmten Anzahl von Teilungen treten diese Zellen entweder in einen seneszenten Zustand ein oder sterben durch den programmierten Zelltod (Apoptose) (Campisi und Di d'Adda Fagagna 2007, Childs et al. 2014). Da diese Stressreaktionen durch veränderte Zellkulturbedingungen ausgelöst werden können (Schallmoser et al. 2010, Neri 2019), wurden die Seneszenz und Apoptose der eMSC untersucht. Für letzteres wurde ein Apoptose- und Nekrose-Assay für lebende Zellen verwendet (RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay, Promega, Mannheim, Deutschland), der die Exposition des Apoptosemarkers Phosphatidylserin an der äußeren Zellmembran misst und das

Ausmaß der Nekrose mit einem fluoreszierenden und zellundurchlässigen DNA-Farbstoff bestimmt.

Entsprechend der Empfehlungen, dass bei der Beurteilung therapeutischer Zellpräparate auch die zelluläre Seneszenz als Qualitätskriterium untersucht werden sollte (Turinetto et al. 2016), wurde in der Publikation 2 ein zellulärer Seneszenz-Assay (ENZ-KIT129-0120, Enzo Life Sciences (ELS) AG, Lausen, Schweiz) gemäß der Herstelleranweisungen in Passage 3 und 5 durchgeführt. Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) ist derzeit der am häufigsten verwendete Biomarker für seneszente Zellen. Das Färbeverfahren ist einfach und zuverlässig, aber die Ergebnisse lassen sich kaum quantifizieren und es werden fast ausschließlich die vergrößerten, spät-seneszenten Zellen positiv für SA- $\beta$ -Gal gefärbt, was die Detektion der früh-seneszenten Zellen ausschließt (Turinetto et al. 2016). Eine weitere Möglichkeit die Seneszenz der MSC zu ermitteln, ist die Nutzung der Verkürzung der Telomerlängen als Indikator für die Seneszenz. Allerdings kann eine stressinduzierte Seneszenz auch unabhängig von der Zellteilung und Telomerverkürzung auftreten und kann somit durch diese Methode nicht erfasst werden (Turinetto et al. 2016). Auch die Anzahl der Zellpassagen kann zur Vorhersage der replikativen Seneszenz genutzt werden. Da aber die Aussaatdichten und der Zeitpunkt des Passagierens stark variieren, führt die Anzahl der Passagen unter nicht-standardisierten Bedingungen zu unzuverlässigen Ergebnissen. Außerdem werden Ereignisse wie Apoptose, Nekrose oder Verluste beim Passagieren nicht beachtet, was zeigt, dass eine Vorhersage, bei welcher Passage sich MSC einem seneszenten Zustand nähern, schwierig ist (Turinetto et al. 2016). Aus diesem Grund wurde hier ein kommerziell erhältliches SA- $\beta$ -Gal Detektionskit verwendet, da dadurch quantitative Ergebnisse ermittelt werden konnten, was mit einer Färbung für SA- $\beta$ -Gal, wie sie in anderen Studien verwendet wurde (Griffiths et al. 2013, Søndergaard et al. 2016), nicht so zuverlässig möglich ist (Griffiths et al. 2013, Turinetto et al. 2016). Zu diesem Zweck wurden die eMSC mit 3.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einer 12-Well-Platte ausgesät und 5 Tage in ihrem entsprechendem Medium mit 10% FBS, 10% ePL oder 2,5% ePL inkubiert. An Tag 5 wurde das Medium entfernt und die eMSC auf Eis mit einem Lysepuffer, der 0,5 % Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) enthielt, lysiert. Da sich die eMSC in den Vorversuchen durch den Lysepuffer allein nicht ausreichend von der Plastikoberfläche der Wellplatte ablösen, wurden zusätzlich Zellschaber verwendet, um eine

vollständige Lyse der eMSC zu erreichen. Anschließend wurde das Lysat bei 14 000 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand bei -80 °C eingefroren. Nach der Probengewinnung von allen Spendern fand die Messung der SA- $\beta$ -Gal-Aktivität an den aufgetauten Überständen mit einem fluoreszierenden Substrat statt.

Da bei der In-vitro-Expansion von Zellen das Risiko einer genetischen Transformation besteht (Roemeling-van Rhijn et al. 2013, Neri 2019) und aufgrund des immer größer werdenden Interesses an der klinischen Verwendung von eMSC das Sicherheitsprofil der kultivierten eMSC überwacht werden muss, wurde eine Karyotyp-Analyse in Kooperation mit Dr. Heidrun Holland und ihrem Team am Sächsischen Inkubator für klinische Translation durchgeführt. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass hMSC aus Knochenmark und Fettgewebe ein geringes Risiko der Tumorigenität aufweisen (Bernardo et al. 2007, Zaman et al. 2012, Roemeling-van Rhijn et al. 2013). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass zytogenetische Aberrationen zu einer Verringerung oder einem Stillstand der Zellproliferation führen, woraus eine Eliminierung der betroffenen Zellen resultiert (Alizadeh et al. 2018). Bei der Analyse des eMSC Karyotyps in dieser Studie wurde nach einem zuvor beschriebenen Protokoll für eMSC vorgegangen (Raudsepp 2021). Nach einer Kultivierung der eMSC in 10 % FBS- oder 10 % ePL-Medium wurde eine Chromosomenpräparation unter Verwendung zytogenetischer Standardtechniken (Colcemid-Behandlung, hypotonische Behandlung und Methanol/Essigsäure-Fixierung) durchgeführt. Mithilfe bereits beschriebener Verfahren für zytogenetische Analysen an Metaphasezellen (Seabright 1972a, 1972b) wurden reproduzierbare Bandenmuster durch die Behandlung mit Trypsin und Färbung mit Giemsa (G-bands by trypsin using Giemsa [GTG]-Analysen) erzeugt. Insgesamt wurden 125 Metaphasezellen pro Gruppe (25 Metaphasezellen pro Probe) analysiert, um das klonale Auftreten von Chromosomenaberrationen auszuschließen. Für eMSC, die mit 2,5 % ePL-Medium kultiviert wurden, konnte keine Karyotyp-Analyse durchgeführt werden, da aufgrund des insuffizienten Wachstums zu wenige proliferierende eMSC für die Analyse vorhanden waren.

Im zweiten Teil der Publikation 2 wurde der Einfluss des ePL auf das pro-angiogene Potenzial der eMSC untersucht. Dafür wurden die Nabelschnüre von n = 4 Fohlen in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen unmittelbar nach der Geburt entnommen und dann im Labor für die Isolierung von Endothelzellen für die Co-Kultur-Assays und Gewinnung von

Arterienringen verwendet. Eine Schwierigkeit bei der Gewinnung der Nabelschnüre war das Management der Proben, da die unsterile Umgebung der Geburtswege und der Stallumgebung bei der Geburt zu Kontaminationen des Probenmaterials führen können und damit auch zum Eintrag von Kontaminationen in die Zellkultur. Aus diesem Grund wurden die Nabelschnüre direkt nach der Geburt auf einer Länge von 10 cm relativ plazentanah entnommen und in ein Transportgefäß mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), versetzt mit 5 % Penicillin-Streptomycin, gegeben. Im Labor wurden die Nabelschnüre zunächst für 3 min in 70 %igem Ethanol gewaschen und dann erneut mit PBS abgespült. Diese antiseptische Vorgehensweise reichte in der hier aufgeführten Studie zur Vermeidung von Kontaminationen aus. Allerdings war dies überraschend, da zuvor berichtet wurde, dass nur Proben, die entweder für 24 h in Medium mit 5 % Penicillin-Streptomycin und 2 % Amphotericin B gelagert oder welche die erst mit Chlorhexidin desinfiziert und dann in antibiotikahaltiges Medium überführt wurden, für die Zellkultur geeignet sind (Bartholomew et al. 2009, Passeri et al. 2009).

Die Nabelschnurvene und das Wharton`s-Jelly-Gewebe wurden entfernt und die Nabelschnurarterien freipräpariert. Die eine Nabelschnurarterie wurde zur Gewinnung von Endothelzellen für die Co-Kultur-Assays verwendet und die andere für den Arterien-Ring-Assay. Die Endothelzellen wurden aus der Nabelschnurarterie durch Kollagenase-Digestion isoliert wie bei Jaffe et al. (1973) für die Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (human umbilical vein endothelial cells [HUVEC]) beschrieben. Aufgrund der Größe und Dicke der equinen Nabelschnurarterie im Vergleich zur humanen wurde die Inkubationszeit in der vorliegenden Arbeit von 15 min (Jaffe et al. 1973) auf 30 min verlängert. Die gewonnenen equinen Endothelzellen wurden bis zur Kryokonservierung in 10 % FBS-Medium kultiviert.

Die primären Wirkmechanismen der MSC beruhen auf parakrinen Signalen und Zell-Zell-Kontakten, wodurch die MSC die Endothelzellen bei der Neovaskularisierung als perivaskuläre Zellen unterstützen und die neu formierten Gefäße stabilisieren (Goerke et al. 2012). Es wurde beschrieben, dass die MSC sich in diesem Prozess in Endothelzellen oder in Zellen mit dem Phänotyp von Smooth Muscle Cells/Perizyten differenzieren (OSWALD et al. 2004, Haack-Sorensen et al. 2008, Goerke et al. 2012). Allerdings zeigte sich die Migration der Endothelzellen unabhängig von der Perizytenmigration, was bedeutet, dass die Endothelzellen und Perizyten nur indirekten Kontakt über die Basalmembran hatten. Somit lässt sich die Konsequenz

daraus ziehen, dass die Endothelzellen und Perizyten hauptsächlich über parakrine Substanzen kommunizieren und nur zu einem sehr geringen Anteil über den direkten Zell-Zell-Kontakt (Chiaverina et al. 2019). Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung, welchen Einfluss das ePL auf die Co-Kultur von eMSC und Endothelzellen hat, ein Transwell-System ausgewählt, da dies einen Austausch löslicher Substanzen über die Transwellmembran ermöglicht, aber keinen direkten Kontakt der Zellen.

Für die Co-Kultur wurden in 12-Well-Platten 600 µl einer ePL- oder einer Ratten-Kollagen I Matrix, die nach Herstellerangaben produziert wurde, aufgebracht. Die ePL-Matrix wurde aus dem ePL der Sedimentationsmethode hergestellt. Auf die Produktion dieses ePL mittels Sedimentationsmethode wurde bereits in der Publikation 1 eingegangen, weshalb diese hier nicht erneut beschrieben wird. Durch die Sedimentationsmethode wurde eine höhere Leukozytenkonzentration erreicht als durch die Buffy-Coat-Methode und somit stellt die ePL-Matrix ein adäquate Wundheilungsumgebung für die Angiogenese dar. Für die Herstellung der ePL-Matrix wurde DMEM mit 10 % ePL und 1 % Penicillin-Streptomycin ohne den Zusatz von Heparin gemischt. Das ePL-Medium bildete ohne Zugabe eines Antikoagulans wie Heparin innerhalb von 1 h ein Hydrogel, wie auch bereits in der Literatur beschrieben (Walenda et al. 2012). Der Hauptbestandteil des Gels war ein Fibringerüst, welches sich normalerweise in der letzten Phase der Gerinnungskaskade zu einem netzartigen Gerinnsel polymerisiert. Bei der Bildung des ePL-Gels lösen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im DMEM-Kulturmedium die Polymerisation des Fibrinogens, welches noch im ePL enthalten ist, zur Fibrinmatrix aus. Das ePL-Gel stellte eine geeignete 3D-Matrix für die Zellkultur dar, denn die eMSC zeigten eine 3D-Expansion an der Grenzfläche zwischen dem ePL-Gel und dem ePL-Medium. Auch mit einer Matrix aus hPL wurde bereits eine bessere Expansion in der 3D-Matrix als auf der normalerweise verwendeten 2D-Plastikoberfläche nachgewiesen (Walenda et al. 2012). In der vorliegenden Studie wurden die Endothelzellen eines Fohlens auf den Matrizes ausgesät und in den entsprechenden Transwells die eMSC in Passage 3, die bereits vorher entsprechend standardmäßig verwendeter Protokolle aufgetaut und eine Passage in ihrem jeweiligen Kulturmedium mit 10 % FBS oder 10 % ePL kultiviert wurden. Die Wells mit Kollagenmatrix wurden mit 10 % FBS-Medium gefüllt und die mit ePL-Matrix mit 10 % ePL-Medium.

Bei der Auswertung der Co-Kultivierung wurde der Gehalt des bedeutendsten pro-angiogenen Wachstumsfaktors VEGF-A bestimmt, die Expression von Genen, die im Zusammenhang mit der Angiogenese stehen, untersucht und der Effekt der zwei verschiedenen Kulturmedien auf das Wachstum und die Morphologie der Endothelzellen und eMSC analysiert. Die Bestimmung des Gehalts an VEGF-A wurde an den Zellkulturüberständen, die an Tag 3 der Co-Kultivierung gewonnen wurden, mittels eines VEGF-A ELISA (ELE-VEGFA, Ray Biotech, Norcross, GA, USA) entsprechend der Herstellervorgaben durchgeführt. Es wurde hier der Wachstumsfaktor VEGF-A von den sämtlichen Wachstumsfaktoren, die einen Einfluss auf die Angiogenese haben, ausgewählt, da es der wichtigste Wachstumsfaktor für die Angiogenese ist, der das Überlebenssignal für die Endothelzellen liefert und die Gefäßneubildung induziert (Carmeliet und Jain 2011, Schlosser et al. 2012, Kwon et al. 2014, Chiaverina et al. 2019). Zusätzlich wurde der Gehalt des VEGF-A im ePL allein gemessen und auch in den jeweiligen Ausgangskulturmedien, sodass diese ermittelten Konzentrationen von den Konzentrationen in den Überständen subtrahiert werden konnten.

Zur Beurteilung der Zellmorphologie wurden die Endothelzellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit Lectin aus der Glücksbohne (*Banisteria speciosa*), welches an den  $\alpha$ -D-Galaktosyl-Resten auf der Endothelzellmembran spezifisch bindet, angefärbt. Somit diente Lectin als Endothelzellmarker und die Fluoreszenzfärbung wurde in Anlehnung an ein bereits verwendetes Protokoll (Baker et al. 2011) durchgeführt. Gleichzeitig wurden die Aktin-Mikrofilamente der eMSC mit einer Phalloidin-färbung dargestellt. Für die Phalloidin-färbung wurden die eMSC ebenfalls mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und das Phalloidin (1:200) für 30 min aufgetragen. Zur Darstellung der Zellkerne erhielten sowohl die Endothelzellen als auch die eMSC eine Kernfärbung mit DAPI (1:1000) für 15 min. Unmittelbar im Anschluss an die Fluoreszenzfärbungen wurde die Mikroskopie durchgeführt, wobei unter gleichbleibenden Einstellungen jeweils 3 Bilder je Replikat angefertigt wurden. Mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms Fiji Image J wurden anhand dieser Bilder die Endothelzellzahlen ermittelt und ein Median aus den drei Bildern je Replikat errechnet.

Die relative Genexpression von Faktoren, die im Zusammenhang mit der Angiogenese stehen, wie eVEGFR2 (VEGF-Rezeptor 2), eACTA2 ( $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin), eCDH5 (VE-Cadherin), eHGF (Hepatocyte growth factor) und eANGPT1 (Angiopoetin-

1), wurde in den eMSC mittels quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) analysiert. ACTA 2 ist ein wichtiger Perizytenmarker und eCDH5 kodiert für das Adhäsionsmolekül VE-Cadherin der Endothelzellen. Durch die Untersuchung dieser beiden Faktoren sollte die Differenzierung der eMSC während der Angiogenese in Richtung Perizyten oder Endothelzellen genauer evaluiert werden. Die Basensequenzen der Boten-Ribonukleinsäuren (mRNA) wurden aus der Datenbank des National Centre for Biotechnology Information (NCBI) entnommen und die Primer mittels PrimerBlast (NCBI) entworfen und bei Integrated DNA Technologies (IDT) synthetisiert. Die durchgeführte PCR-Reaktion wurde anhand einer Schmelzkurve sowie einer Verdünnungsreihe gepoolter cDNA beurteilt. Für die relative Quantifizierung der Genexpressionsveränderungen wurde die Expression der Zielgene ins Verhältnis zur Expression der Referenzgene Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) gesetzt. Zur Auswertung der PCR wurde der  $C_T$ -Wert verwendet, der den Zyklus bezeichnet, an dem die Fluoreszenz des Genproduktes die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. In der hier vorliegenden Studie wurden die Genexpressionsveränderungen auf der Grundlage der Pfaffl-Formel (Pfaffl 2001) unter Verwendung der jeweiligen geometrischen  $C_T$ -Werte aller FBS-Kontrollproben zur Normalisierung innerhalb der Formel berechnet.

Der Arterien-Ring-Assay wurde in Anlehnung an den erstmals 1982 berichteten Aorten-Ring-Assay durchgeführt, wo Ringe aus Ratten-Aorten verwendet wurden (Nicosia et al. 1982). Er dient dazu die grundlegenden Mechanismen der Angiogenese zu untersuchen und die Wirksamkeit von pro- oder anti-angiogenen Substanzen zu evaluieren (Nowak-Sliwinska et al. 2018). In dieser Studie wurden dafür in Anlehnung an bereits verwendete Protokolle (Nicosia et al. 1982, Baker et al. 2011, Iqbal et al. 2017, Chiaverina et al. 2019) mit dem Skalpell 3 mm dicke Ringe der Nabelschnurarterie geschnitten. Diese Arterien-Ringe wurden in einer 24-Well-Platte platziert, in der vorher eine EZM vorgelegt wurde. Als EZM wurde hier eine bovine Kollagen I Matrix, die nach Herstellerangaben produziert worden ist, sowie eine ePL-Matrix, wie bereits für den Co-Kultur-Versuch beschreiben, verwendet. Es wurden jeweils 50  $\mu$ l dieser Matrix auf den Boden des Wells aufgebracht und dann nach einer Inkubation noch eine zusätzliche Schicht oberhalb des Arterien-Rings. Die Arterien-Ringe in der Kollagenmatrix wurden mit 10 % FBS-Medium und die in der ePL-Matrix mit 10 % ePL-Medium für 21 Tage kultiviert. Das Kulturmedium einiger Arterien-Ringe wurde zu

Beginn des Kultivierungszeitraums mit 30 ng/ml VEGF-A und 30 ng/ml bFGF supplementiert, um zu evaluieren, ob ein initial höherer Gehalt dieser Wachstumsfaktoren die Angiogenese verstärkt, da VEGF und bFGF laut der Literatur die Endothelzellproliferation induzieren (Basilico und Moscatelli 1992, Carmeliet und Jain 2011, Tancharoen et al. 2020). Die Auswertung des Arterien-Ring-Assays erfolgte vergleichbar zur Auswertung der eMSC- und Endothelzell-Co-Kultivierung. Die aus den Arterien ausgewanderten Endothelzellen wurden mittels Lectin- und DAPI-Färbung dargestellt und eine Quantifizierung der Endothelzellzahl wurde mithilfe der Software Fiji Image J erlangt.

### **5.2.2 Diskussion der Ergebnisse**

Das Ziel der zweiten In-vitro-Studie war es den Einfluss des ePL auf die funktionellen Eigenschaften der eMSC, wie Zellfitness oder pro-angiogenes Potenzial im Vergleich zu FBS zu analysieren.

Dabei zeigte sich, dass die eMSC in 10 % ePL-Medium in Passage 3 und 5 die geringsten Apoptosewerte im Vergleich zur Kultivierung in 10 % FBS- und 2,5 % ePL-Medium aufwiesen, wobei nur zwischen 10 % ePL- und 2,5 % ePL-Medium in Passage 3 ein signifikanter Unterschied vorlag. Hinsichtlich der Nekrose wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Kulturmedien festgestellt. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen in anderen Studien überein, wo berichtet wurde, dass Thrombozytenprodukte wie PL die pro-apoptotischen Faktoren tBid und Bim herunterregulieren und gleichzeitig die anti-apoptotischen Faktoren Bcl-xL und Survivin hochregulieren (Refolo et al. 2014). Zusätzlich exprimierten die hMSC mit hPL-Medium mehr anti-apoptotische Gene und die mit FBS-Medium mehr pro-apoptotische Gene (De Becker et al. 2022). Die bisherigen Studien zur Apoptose bezogen sich auf Untersuchungen mit hPL und vergleichbare Studien zu ePL liegen bisher nicht vor. Das ePL scheint aber vergleichbar zum hPL eine schützende Wirkung auf Zellen vor Apoptose zu haben (Carr et al. 2014, Refolo et al. 2014), was im Einklang mit den hohen Proliferationsraten der eMSC mit 10 % ePL-Medium in den eigenen bisherigen Studien steht (Hagen et al. 2021, Hagen et al. 2022).

Auf Basis der gewonnenen Ergebnisse in Publikation 2 scheint die eingeschränkte Proliferation der eMSC, die mit 2,5 % ePL-Medium kultiviert wurden, eher aus einer erhöhten Apoptoserate als aus einem seneszenten Zustand zu resultieren, da ein Anstieg der Aktivität des Seneszenzmarkers SA- $\beta$ -Gal in allen drei Medien von Passage 3 zu 5 beobachtet werden konnte. Überraschenderweise wiesen die eMSC, die mit 2,5 % ePL-Medium kultiviert wurden, die geringste SA- $\beta$ -Gal-Aktivität auf. Dies könnte allerdings auf eine geringere Zellzahl infolge der eingeschränkteren Zellverdopplung im Laufe der 5 Tage Inkubation zurückzuführen sein. Zwischen 10 % FBS- und 10 % ePL-Medium war kaum ein Unterschied bei der SA- $\beta$ -Gal-Aktivität zu erkennen, was sich konträr zu den bisherigen humanen Studien darstellte, in welchen die hMSC nach einer Kultivierung mit hPL-Medium eine deutlich geringere SA- $\beta$ -Gal-Aktivität aufwiesen als nach einer Kultivierung mit FBS-Medium (Griffiths et al. 2013, De Becker et al. 2022). Eine mögliche Erklärung für diese Differenz in den Ergebnissen zu vorherigen Studien könnte sein, dass in der Publikation 2 die eMSC nur bis Passage 5 untersucht wurden, da die eMSC bei Pferden in der Regel nur bis Passage 3 oder 4 therapeutisch eingesetzt werden. Bis zu diesem Zeitpunkt werden die eMSC als stabil angesehen und erst danach kann es zur Entwicklung genetischer Instabilitäten kommen (Yang et al. 2018). Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen der eMSC in den verschiedenen Medien auf die Passagen 3 bis 5 beschränkt, da die Ergebnisse so auch Hinweise für die spätere klinische Anwendung liefern. Allerdings konnte in einer humanen Studie bis Passage 7 keine Seneszenz in beiden Medien nachgewiesen werden (Søndergaard et al. 2016) und in einer anderen Studie wurde die SA- $\beta$ -Gal-Aktivität erst ab Passage 5 bestimmt und ab Passage 10 konnte ein Anstieg beobachtet werden (Griffiths et al. 2013). Hingegen berichteten De Becker et al. (2022) von einer geringeren Seneszenz der hMSC in hPL bereits in Passage 4 (De Becker et al. 2022). Somit sollte in einer weiterführenden Untersuchung die Seneszenz der eMSC mit 10 % FBS- und 10 % ePL-Medium in höheren Passagen beurteilt werden, um herauszufinden, ob sich der seneszente Zustand der eMSC zwischen den Medien bei höherer Passagezahl ändert, oder ob sich die hMSC und eMSC an diesem Punkt unterscheiden.

Die genetische Stabilität der eMSC in Passage 5 war nach der Kultivierung mit 10 % ePL-Medium tendenziell höher als mit 10 % FBS-Medium. So zeigten die eMSC, die mit 10 % ePL-Medium kultiviert wurden, unter Anwendung zytogenetischer Analysen (GTG) in 6 von 125 (4,8 %) analysierten Metaphasen chromosomale Aberrationen. Zu

den chromosomal aberranten Metaphasen gehörten Polyploidie (5 von 6 aberranten Metaphasezellen) und vorzeitige zentromerische Teilung (Premature centromere division [PCD], 1 von 6 aberranten Metaphasezellen). Nach dem internationalen System für die zytogenomische Nomenklatur des Menschen (ISCN 2020) kann die PCD zur Beschreibung einer vorzeitigen Trennung der Zentromere in Metaphasen verwendet werden (McGowan-Jordan et al. 2020). Die PCD kann ein oder mehrere Chromosomen in einem Teil der Zellen betreffen. Im Gegensatz dazu wiesen die eMSC, die mit 10 % FBS-Medium kultiviert wurden, in 10 von 125 (8 %) analysierten Metaphasen Chromosomenaberrationen auf, wobei in allen chromosomal aberranten Metaphasen Polyploidie festgestellt wurde. Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen einer eigenen Studie mit caninen MSC und caninem PL (Hagen et al. 2022) und stimmen ebenfalls mit anderen humanen Studien überein, die bereits berichteten, dass hPL die genetische Stabilität von hMSC aus Knochenmark und Fettgewebe nicht nachteilig verändert (Schallmoser et al. 2008, Crespo-Diaz et al. 2011, Trojahn Kølle et al. 2013). Auch die eMSC wiesen weder nach einer Kultivierung mit 10 % FBS- noch mit 10 % ePL-Medium klonale numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberrationen in den analysierten Metaphasen auf, die sonst zum Ausschluss von der klinischen Verwendung geführt hätten.

Bei der Untersuchung des pro-angiogenen Effektes des ePL und der eMSC ergab sich ein VEGF-A Gehalt von 246 pg/ml im 10 % ePL-Medium. Das ePL allein enthielt 1397 pg/ml VEGF-A. Im Gegensatz dazu konnte im FBS-Medium kein VEGF-A mit dem equinen VEGF-A ELISA nachgewiesen werden. Auch im FBS allein war mit diesem ELISA kein VEGF-A nachweisbar. Dieses unerwartete Ergebnis im FBS kann eventuell auf eine nicht vorhandene Spezifität des equinen VEGF-A ELISA für bovines VEGF-A zurückgeführt werden und weitere Untersuchungen mit einem anderen VEGF-A ELISA sollten für das FBS durchgeführt werden. Der VEGF-A Gehalt im ePL lag in einem vergleichbaren Bereich wie im hPL, wo Werte wie  $103 \pm 0,96$  pg/ml (Tancharoen et al. 2020),  $740 \pm 110$  pg/ml (Barsotti et al. 2013) oder 5 000–10 000 pg/ml (Burnouf et al. 2016) beschrieben wurden. Nach einer Normalisierung auf das jeweilige Kulturmedium zeigte sich, dass die eMSC unter allen Bedingungen VEGF-A freisetzen, wohingegen die Endothelzellen bei alleiniger Kultivierung in FBS-Medium kein VEGF-A produzierten. In Übereinstimmung mit anderen Studien (Schallmoser et al. 2007, Trojahn Kølle et al. 2013) stellte sich eine signifikant höhere VEGF-A Freisetzung in den Zellkulturüberständen mit ePL-Medium im Vergleich zu FBS-

Medium dar. Der Effekt des VEGF-A wird über den VEGFR2 vermittelt. Wie bereits in der Literatur beschrieben (Oswald et al. 2004, Haack-Sorensen et al. 2008), liegt eine Beziehung zwischen VEGF-A und VEGFR2 vor, was in der hier vorliegenden Studie bestätigt werden konnte, da die VEGFR2 Genexpression dem Trend der VEGF-A-Konzentration folgte. So exprimierten die eMSC VEGFR2 mit 10 % ePL-Medium sowohl allein als auch in Co-Kultur mit den Endothelzellen deutlich stärker, sodass eine Beziehung zum VEGF-A-Anstieg und 10 % ePL-Medium zu erkennen war. Die Genexpression von eCDH5, welches für das Adhäsionsmolekül VE-Cadherin kodiert, war für die unterschiedlichen Gruppen der Co-Kultivierung annähernd gleich niedrig und unverändert, was gegen eine Differenzierung der eMSC in Richtung Endothelzellen in der vorliegenden Studie spricht. Aufgrund der engen Verwandtschaft der eMSC mit Perizyten (Esteves et al. 2017) ist eine Differenzierung der eMSC in diesen Zelltyp wahrscheinlicher. Die Expression von ACTA2 ( $\alpha$ -SMA) steht im Zusammenhang mit der regulatorischen Funktion der Perizyten und ist an der Kontrolle der Vasokonstriktion in Arteriolen und Kapillaren beteiligt (Chiaverina et al. 2019). Bei einer Co-Kultivierung mit endothelialen Vorläuferzellen oder HUVECs konnte die ACTA2-Expression in hMSC zeitabhängig erhöht werden, was darauf hindeutet, dass sich die hMSC während einer Co-Kultivierung in Perizyten differenzieren (Goerke et al. 2012). Gegensätzlich zu diesen Beobachtungen war in der vorliegenden Studie die eACTA2 Expression der eMSC, die allein mit 10 % ePL-Medium kultiviert wurden, am höchsten, entwickelte aber in der entsprechenden Co-Kultur mit 10 % ePL-Medium einen leichten Rückgang. Diese Abnahme der eACTA2-Expression nach der Co-Kultivierung könnte auf das Fehlen direkter Zellkontakte zurückzuführen sein, da zuvor berichtet wurde, dass eine Differenzierung der hMSC in Perizyten nur bei direktem Zellkontakt zwischen den Endothelzellen und hMSC möglich ist (Lozito et al. 2009, Goerke et al. 2012).

Die Funktionalität der eMSC wurde durch das ePL verstärkt, wie anhand des pro-angiogenen Effektes, den die eMSC gemeinsam mit dem ePL-Medium auf die Endothelzellen hatten, in der hier vorliegenden Studie dargestellt werden konnte. Dabei scheinen die eMSC gemeinsam mit dem ePL-Medium die Endothelzellen trophisch zu unterstützen, was zu einer höheren Zellzahl in dem Co-Kultur-Versuch führte. Durch den Arterien-Ring-Assay konnte allerdings auch gezeigt werden, dass das ePL-Medium allein ohne den Zusatz der eMSC die Expansion der Endothelzellen im Vergleich zum FBS-Medium steigert. Wie zu erwarten, wurde die Migration und

Expansion der Endothelzellen im Arterien-Ring-Assay durch die weitere Zugabe der Wachstumsfaktoren VEGF-A und bFGF induziert und die höchste Endothelzelldichte wurde mit ePL-Medium + VEGF-A + bFGF erreicht. Zusätzlich bildeten die Endothelzellen in einigen biologischen Replikaten mit ePL-Medium und in Co-Kultur mit eMSC ringartige Strukturen aus. Die Ausbildung lumenhaltiger kapillärer Strukturen, die sogenannte Tube Formation, ist eine typische angiogene Eigenschaft der Endothelzellen, wodurch ein fortgeschrittenes Angiogenesestadium repräsentiert wird. Vergleichbare Ergebnisse lieferten humane Studien, in denen die Tube Formation ebenfalls durch hPL gefördert wurde (Hofbauer et al. 2014, Fortunato et al. 2016, Tanchaeron et al. 2020). Hierbei ist anzumerken, dass in der Studie von Tanchaeron et al. (2020) kein Vergleich zu FBS-Medium durchgeführt wurde und das hPL in einer höheren Konzentration (20 %) verwendet wurde. In den zwei Studien, die einen vergleichbaren Versuchsaufbau hatten wie die Publikation 2 wurden keine Unterschiede zwischen FBS- und hPL-Medium festgestellt (Trojahn Kølle et al. 2013, Hofbauer et al. 2014). Dabei konnte in der Studie von Trojahn Kølle et al. (2013) bis zur zusätzlichen Supplementierung mit VEGF keine Tube Formation in beiden Medien nachgewiesen werden und im Gegensatz dazu bildeten die Endothelzellen bei Hofbauer et al. (2014) in beiden Medien ähnliche kapilläre Strukturen aus.

In Anbetracht der Ergebnisse der Publikation 2 können Thrombozyten die Wirkung von eMSC verbessern, da die pro-angiogene Wirkung der eMSC mit ePL-Medium höher war als mit FBS-Medium.

### **5.2.3 Interpretation der Publikation 2 in Bezug auf die gestellten Hypothesen**

Das Ziel der zweiten Studie den Einfluss des ePL auf die funktionellen Eigenschaften der eMSC, wie Zellfitness oder pro-angiogenes Potenzial, im Vergleich zu FBS zu analysieren, wurde in der Publikation 2 erfolgreich umgesetzt. Es wurde nachgewiesen, dass eine Kultivierung mit 10 % ePL-Medium die geringsten Apoptoseraten der eMSC bewirkt. Außerdem zeigten die eMSC eine höhere genetische Stabilität mit ePL- als mit FBS-Medium. Somit erwies sich die vor der Durchführung der Studie aufgestellte erste Hypothese, dass das ePL-Medium die Zellfitness und die genetische Stabilität der eMSC unterstützt, als korrekt. Auch die zweite Hypothese, dass die eMSC nach einer Kultivierung mit ePL- und FBS-Medium

ähnliche funktionelle Eigenschaften besitzen, konnte in dieser Studie mindestens bestätigt werden. Vielmehr wiesen die eMSC sogar eine verbesserte pro-angiogene Wirkung durch die Kultivierung mit 10 % ePL-Medium auf. Die Kombination aus eMSC und 10 % ePL-Medium förderte die Expansion und Migration der Endothelzellen und induzierte die Tube Formation.

### **5.3 Schlussfolgerung und Ausblick**

In dieser Arbeit wurde das erste standardisierte Buffy-Coat-basierte Protokoll zur ePL-Herstellung angewandt. Die verwendete Buffy-Coat-Methode entspricht dem aktuellen „State of the Art“ der Humanmedizin, sie benötigt kein kostspieliges Equipment wie beispielsweise die Thrombozytapherese und lieferte deutlich niedrigere Leukozytenkonzentrationen im Vergleich zur PRP-Methode. Es zeigte sich, dass spenderabhängige Faktoren wie Alter und Rasse einen Einfluss auf die individuellen Thrombozyten- und Wachstumsfaktorkonzentrationen während der ePL-Herstellung haben. Um möglichst hohe Thrombozyten- und Wachstumsfaktorkonzentrationen zu erlangen, empfiehlt es sich klinisch gesunde, möglichst junge Warmblüter als Spenderpferde zu verwenden. Die Variationen zwischen den verschiedenen Spendern konnten durch die Verwendung eines Pools aus 19 Pferden ausgeglichen werden.

Das gewonnene ePL kann als Zellkultursupplement für die Herstellung von zellbasierten Arzneimitteln genutzt werden. Aufgrund des direkten Kontakts des ePL mit den kultivierten Zellen ist es eine kritische Komponente in Bezug auf Sicherheit, Reinheit und Wirksamkeit des endgültigen Zellproduktes. Um ein optimales Zellwachstum und dadurch den größtmöglichen Therapieerfolg zu erhalten, ist es von Vorteil die eMSC unter xenofreien Verhältnissen zu kultivieren. Aus diesem Grund wird bereits seit längerem ein Ersatz des problembehafteten FBS empfohlen. Das ePL stellt eine vielversprechende Alternative zum FBS dar und ist in der Lage einige Probleme im Zusammenhang mit FBS zu lösen. So handelt es sich beim ePL um ein allogenes Produkt, wodurch eine Immunreaktion des Empfängers deutlich reduziert werden kann. Außerdem ist die Gewinnung des Blutes für die ePL-Produktion ethisch weniger umstritten und könnte mit der Gewinnung von Blutplasma zu Transfusionszwecken kombiniert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das ePL als Zellkultursupplement für die Kultivierung der eMSC geeignet ist. Es unterstützt die zelltypischen Charaktereigenschaften wie Proliferation, Differenzierung und Zellfitness der eMSC vergleichbar zum FBS. Des Weiteren werden die biologischen Eigenschaften der eMSC durch das ePL positiv beeinflusst, wie durch die verbesserten pro-angiogenen Eigenschaften der eMSC dargestellt werden konnte. Auch die Sicherheit des ePL konnte bestätigt werden, da die eMSC eine höhere genetische Stabilität mit ePL- als mit FBS-Medium aufwiesen.

Somit kann ePL als Alternative zum FBS bei der eMSC-Kultivierung empfohlen werden und bis zur erfolgreichen Etablierung und Zulassung chemisch definierter serumfreier Medien für die eMSC-Kultivierung als Zellkultursupplement dienen. Allerdings ist auch das ePL zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig definiert und die genaue Zusammensetzung sowie auch die Wirkung der einzelnen Komponenten ist bislang noch nicht genau erforscht. Weitere Studien zur Analyse der detaillierten Zusammensetzung des ePL und der Wirkung einzelner Komponenten können zur Herstellung chemisch definierter Medien und unter Umständen auch zu einem genaueren Verständnis der biologischen Prozesse in den eMSC beitragen. In diesem Zusammenhang sollte auch die immunmodulatorische Wirkung der eMSC mit ePL-Medium genauer analysiert werden. Außerdem sollten, basierend auf dem positiven Einfluss des ePL auf die pro-angiogenen Eigenschaften der eMSC, In-vivo-Studien mit ePL als Therapeutikum allein oder in Kombination mit eMSC im Bereich der Wundheilung durchgeführt werden.

Somit zeigt sich, dass weitere Arbeiten in diesem Forschungsgebiet unbedingt erforderlich sind und dass das hier vorgestellte Buffy-Coat-basierte Protokoll als Grundstein für die weitere standardisierte eMSC-Kultivierung angesehen werden kann.

## 6 Zusammenfassung

Alina Hagen

### **Equines Thrombozytenlysate als potenzförderndes Zellkultursupplement in der regenerativen Veterinärmedizin**

Klinik für Pferde (Chirurgie, Orthopädie), Justus-Liebig-Universität Gießen

#### **Eingereicht im Juni 2023**

132 Seiten, 6 Abbildungen, 2 Tabellen, 2 Publikationen, 397 Literaturangaben

**Schlüsselwörter:** Mesenchymale Stromazellen (MSC), Thrombozytenkonzentrat, Thrombozytenlysate, fetales bovines Serum, Pferd, Zellkultur, Zellfitness, funktionelle Eigenschaften, Co-Kultivierung

**Einleitung** – Die regenerative Medizin und die klinische Anwendung von multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSC) haben in der Veterinärmedizin enorm an Bedeutung gewonnen. Um eine ausreichende Anzahl der MSC für eine therapeutische Anwendung zu erhalten, ist ihre In-vitro-Kultivierung erforderlich, da die MSC in ihrem Ursprungsgewebe nur in einer geringen Menge vorhanden sind. Ein kritischer Aspekt bei der In-vitro-Kultivierung der MSC ist das Zellkulturmedium, welches die Qualität und Wirksamkeit des zellbasierten Therapeutikums stark beeinflussen kann. Derzeit ist das kritisch diskutierte fetale bovine Serum (FBS) der Goldstandard als Basalmediumsupplement für die In-vitro-Kultivierung von tierischen MSC. Es zeichnet sich jedoch ein Trend zur Verwendung von xenofreien Zellkultursupplementen ab und die European Medicines Agency (EMA) und die International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT) empfehlen den Ersatz von FBS. Während einige Alternativen untersucht wurden, hat die Verwendung von humanem Thrombozytenlysate (hPL) in der Humanmedizin vielversprechende Ergebnisse gezeigt.

**Ziele** – Das Ziel der ersten Studie war die Entwicklung eines skalierbaren Protokolls für die Herstellung von equinem Thrombozytenlysate (ePL) in Anlehnung an das hPL-Produktionsprotokoll und der Vergleich des hergestellten ePL mit FBS als Zellkultur-

supplement in der Kultivierung von equinen MSC (eMSC) im Hinblick auf die Erhaltung ihrer Basischarakteristika. Die Potenz und die funktionellen Eigenschaften der MSC sind stark von verschiedenen Umweltfaktoren abhängig. Daher zielte die zweite Studie darauf ab den Einfluss des ePL auf die Zellfitness und das pro-angiogene Potenzial der eMSC zu untersuchen.

**Material und Methoden** – In der ersten In-vitro-Studie wurde das Vollblut von 20 gesunden Pferden in Blutbeuteln entnommen. Nach einem Screening des Vollblutes auf Erregerkontamination wurde das Blut von 19 Pferden in die Studie aufgenommen. Mithilfe der Buffy-Coat-Methode wurden die Thrombozytenkonzentrate aus dem Vollblut hergestellt und anschließend durch Gefrier-/Auftauzyklen lysiert. Während des Herstellungsprozesses wurden die Thrombozyten-, Leukozyten-, Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)- und Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-Konzentrationen bestimmt. Nach der Herstellung wurde das finale, gepoolte ePL als Zellkultursupplement für die Kultivierung von eMSC aus Fettgewebe von  $n = 4$  Spenderpferden im Vergleich zu FBS bewertet. Die Generationszeit, der Immunphänotyp und das tripotente Differenzierungspotenzial der eMSC wurden unter Verwendung der drei verschiedenen Mediensupplemente 10 % FBS, 10 % ePL und 2,5 % ePL untersucht. In der zweiten Studie wurde analysiert, ob die Zellfitness und das pro-angiogene Potenzial der eMSC aus Fettgewebe durch ePL vergleichbar unterstützt werden wie durch FBS-Medium. Zu diesem Zweck wurden eMSC von  $n = 5$  Spenderpferden, die in 10 % FBS, 10 % ePL oder 2,5 % ePL-Medium kultiviert wurden, hinsichtlich ihres apoptotischen, nekrotischen und seneszenten Zustands, ihrer genetischen Stabilität und ihres pro-angiogenen Potenzials untersucht. Für die Analyse des pro-angiogenen Potenzials in Co-Kultur wurden equine Endothelzellen aus equinen Nabelschnurarterien mit Hilfe des Digestionsverfahrens gewonnen und ein Arterien-Ring-Assay auf der Grundlage von Arterien-Ringen, die ebenfalls aus diesen Nabelschnurarterien gewonnen wurden, durchgeführt. Für die Co-Kultivierung von eMSC und equinen Endothelzellen wurde ein indirektes Transwell-System verwendet. Das pro-angiogene Potenzial der eMSC wurde durch eine Messung der vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)-Konzentration in den verschiedenen Zellkulturüberständen nach der Co-Kultivierung sowie durch die Untersuchung der Genexpression von Faktoren, die mit der Angiogenese verbunden sind, mittels qRT-PCR, bewertet. Darüber hinaus wurde eine morphologische Analyse der Zellen durchgeführt, für welche die eMSC mit einer Phalloidin-Färbung und die

Endothelzellen sowohl im Arterien-Ring-Assay als auch nach der Co-Kultivierung mit eMSC mit Lektin angefärbt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS und Graphpad Software und basierte auf nicht-parametrischen Testmethoden.

**Ergebnisse** – In der Studie 1 wurde erstmals ein Buffy-Coat-basiertes Protokoll für die ePL-Produktion evaluiert. Dabei wurde eine 4,2-fach erhöhte Thrombozytenkonzentration ( $p < 0,05$ ) und eine 0,4-fach reduzierte Leukozytenkonzentration ( $p < 0,05$ ) in den Thrombozytenkonzentraten im Vergleich zum Vollblut beobachtet. Zudem zeigte sich eine Aufkonzentrierung der Wachstumsfaktoren PDGF-BB und TGF- $\beta$ 1 in den Thrombozytenkonzentraten ( $p < 0,05$  für PDGF-BB und  $p < 0,01$  für TGF- $\beta$ 1) sowie in den Thrombozytenlysaten ( $p < 0,01$  für PDGF-BB und  $p < 0,05$  für TGF- $\beta$ 1). Das Alter der Spender korrelierte negativ mit der Thrombozytenkonzentration ( $p < 0,01$  und  $r = -0,582$ ) sowie mit den PDGF-BB- ( $p < 0,01$  und  $r = -0,627$ ) und TGF- $\beta$ 1- ( $p < 0,05$  und  $r = -0,483$ ) Konzentrationen in den Thrombozytenkonzentraten. Bei der Beurteilung von ePL als Zellkultursupplement förderte das ePL die Proliferation und Basischarakteristika der eMSC in einer ähnlichen Art und Weise wie das FBS, wenn es in der gleichen Konzentration (10 %) verwendet wurde. Im Gegensatz dazu wiesen die eMSC bei der Kultivierung mit 2,5 % ePL-Medium eine inkonstante Proliferation oder sogar einen vollständigen Verlust der Proliferation auf, was sich in einer signifikant verlängerten Generationszeit und einer veränderten Konfluenz darstellte ( $p < 0,05$ ). In der Studie 2 wurde demonstriert, dass eMSC, die mit 2,5 % ePL-Medium kultiviert wurden, eine höhere Apoptose aufwiesen ( $p < 0,05$ ) als eMSC nach einer Kultivierung in 10 % ePL-Medium. Die Zellfitness der eMSC, die mit 10 % ePL-Medium kultiviert wurden, war vergleichbar mit der von eMSC mit FBS-Medium. Interessanterweise zeigten die eMSC eine höhere genetische Stabilität nach einer Kultivierung mit 10 % ePL-Medium. Etwa 8 % der eMSC mit FBS-Medium wiesen nicht-klonale Chromosomenaberrationen auf und nur 4,8 % der eMSC, die mit 10 % ePL-Medium kultiviert wurden. Klonale Aberrationen der eMSC wurden weder mit 10 % FBS- noch mit 10 % ePL-Medium beobachtet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass 10 % ePL die pro-angiogenen Eigenschaften der eMSC unterstützt, da bei der Kultivierung mit 10 % ePL-Medium eine deutlich höhere VEGF-A-Konzentration ( $p < 0,05$ ) freigesetzt wurde und der VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) vermehrt exprimiert wurde als mit FBS-Medium ( $p < 0,05$ ). Außerdem förderten die eMSC und das ePL das Wachstum von gefäßähnlichen Strukturen in zwei der Co-Kulturproben und auch im Arterien-Ring-

Assay war die Migration und Proliferation der equinen Endothelzellen mit 10 % ePL-Medium höher als mit FBS-Medium.

**Schlussfolgerung** – Aufgrund der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit ist das ePL eine vielversprechende Alternative zum FBS als Zellkultursupplement für die In-vitro-Kultivierung von eMSC. In diesem Zusammenhang hat sich die Buffy-Coat-Methode als nützliches Verfahren zur Herstellung eines standardisierten ePL in großem Maßstab erwiesen. Es sollten allerdings vorzugsweise junge Spenderpferde ausgewählt werden, um die maximal mögliche Thrombozyten- und Wachstumsfaktorkonzentration zu erhalten. Das ePL unterstützte die Proliferation und die Basischarakteristika der eMSC, wenn es in der gleichen Konzentration wie FBS (10 %) verwendet wurde. Darüber hinaus förderte das ePL die Zellfitness der eMSC vergleichbar zum FBS und die funktionellen Eigenschaften der eMSC wurden durch ePL positiv beeinflusst, was sich in den verbesserten pro-angiogenen Eigenschaften darstellte. Aufgrund dieser Ergebnisse kann das ePL als Zellkultursupplement für die Kultivierung von eMSC empfohlen werden. Jedoch sind weitere Studien notwendig, um die detaillierte Zusammensetzung des ePL zu analysieren. Aufgrund des positiven Einflusses auf die pro-angiogene Wirkung von eMSC sollten auch In-vivo-Studien im Bereich der Wundheilung durchgeführt werden, um ePL für den therapeutischen Einsatz allein oder in Kombination mit eMSC zu etablieren.

## 7 Summary

Alina Hagen

### **Equine platelet lysate as synergistically active cell culture supplement in veterinary regenerative medicine**

Equine Clinic (Surgery, Orthopedics), Justus-Liebig-University Giessen

**Submitted in June 2023**

132 pages, 6 figures, 2 tables, 2 publications, 397 references

**Keywords:** mesenchymal stromal cells (MSC), platelet concentrate, platelet lysate, fetal bovine serum, equine, cell culture, cell fitness, functional properties, co-cultivation

**Introduction** – Regenerative medicine and the clinical application of multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) have gained tremendous importance in veterinary medicine. In order to obtain a sufficient number of MSC for a therapeutic application, their in vitro cultivation is required, as there is only a small amount of MSC in their tissue of origin. One critical aspect in the in vitro cultivation of MSC is the cell culture medium, which may strongly impact the quality and efficacy of the cell-based therapeutic. Currently, the critically discussed fetal bovine serum (FBS) is the gold standard as a basal medium supplement for the in vitro cultivation of MSC in animal species. However, the trend towards the use of xeno-free culture supplements is emerging, and replacement of FBS is recommended by the European Medicines Agency (EMA) and the International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT). While several alternatives have been investigated, the use of human platelet lysate (hPL) in human medicine has shown promising results.

**Aims** – The aim of the first study was to establish a scalable protocol for equine platelet lysate (ePL) production based on hPL production protocols and to compare the obtained ePL with FBS as cell culture supplement in equine MSC (eMSC) culture regarding the preservation of their basic characteristics. The potency and functional

properties of MSC are strongly dependent on varying environmental factors. Therefore, the second study aimed to investigate the influence of ePL on cell fitness and pro-angiogenic potency of eMSC.

**Materials and methods** – In the first in vitro study, whole blood from 20 healthy horses was harvested into blood collection bags. After screening the whole blood for pathogen contamination, the blood of 19 horses was included in the study. The platelet concentrates were prepared from whole blood using the buffy coat method and subsequently lysed by freeze/thaw cycles. During the manufacturing process, platelet, leukocyte, platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) concentrations were determined. After preparation, the final pooled ePL was evaluated as a cell culture supplement for cultivation of adipose-derived eMSC of  $n = 4$  donor horses, in comparison with FBS. The generation time, immunophenotype and trilineage differentiation potential of eMSC were investigated using the three different media supplements 10 % FBS, 10 % ePL and 2,5 % ePL. The second study analyzed if the cell fitness and pro-angiogenic potential of adipose-derived eMSC is comparably supported by ePL as by FBS medium. For this purpose, eMSC from  $n = 5$  donor horses cultured in 10 % FBS, 10 % ePL or 2,5 % ePL medium were evaluated in terms of their apoptotic, necrotic and senescent state, genetic stability and pro-angiogenic potency. For analysis of pro-angiogenic potential in co-culture, equine endothelial cells were obtained from equine umbilical arteries using a digestion procedure. Additionally, an arterial ring assay was initiated based on arterial rings extracted from the umbilical arteries. An indirect transwell system was used for the co-cultivation of eMSC and equine endothelial cells. The pro-angiogenic potential of the eMSC was assessed by measuring the vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) concentration of the different cell culture supernatants after co-cultivation and by examining the gene expression of the angiogenesis-related factors using qRT-PCR. In addition, morphological analysis of the cells was performed after staining the eMSC with Phalloidin and the endothelial cells with lectin both in the arterial ring assay and after co-cultivation with eMSC. Statistical analysis was performed using IBM SPSS and GraphPad based on non-parametric tests.

**Results** – The study 1 provides the first evaluation of a buffy-coat-based protocol for ePL production. In this process, a 4.2-fold increased platelet concentration ( $p < 0.05$ ) and a 0.4-fold decreased leukocyte concentration ( $p < 0.05$ ) was observed in the

platelet concentrates in comparison to the whole blood. In addition, the concentrations of the growth factors PDGF-BB and TGF- $\beta$ 1 were increased in the platelet concentrates ( $p < 0.05$  for PDGF-BB and  $p < 0.01$  for TGF- $\beta$ 1) as well as in the platelet lysates ( $p < 0.01$  for PDGF-BB and  $p < 0.05$  for TGF- $\beta$ 1). The age of the donors correlated negatively with the platelet counts in the platelet concentrates ( $p < 0.01$  and  $r = -0.582$ ) as well as with the PDGF-BB ( $p < 0.01$  and  $r = -0.627$ ) and TGF- $\beta$ 1 ( $p < 0.05$  and  $r = -0.483$ ) concentrations in the concentrates. Evaluating the ePL as a cell culture supplement, it supported eMSC proliferation and basic characteristics similar to FBS when used in the same concentration (10 %). In contrast, during cultivation with 2.5 % ePL medium, the eMSC exhibited inconstant proliferation or even a complete loss of proliferation, as evidenced by a significantly prolonged generation time and altered confluency ( $p < 0.05$ ). The study 2 demonstrated that eMSC cultured with 2,5 % ePL medium exhibited higher apoptosis levels than eMSC after cultivation in 10 % ePL medium ( $p < 0.05$ ). The cell fitness of eMSC cultured with 10 % ePL medium was comparable to that of eMSC cultivated with FBS medium. Interestingly, the eMSC showed a higher genetic stability after cultivation with 10 % ePL medium. Roughly 8 % of the eMSC with FBS medium showed non-clonal chromosomal aberrations and only 4.8 % of the eMSC cultivated with 10 % ePL medium. Clonal aberrations of the eMSC were neither observed in 10 % FBS nor in 10 % ePL medium. In addition, it was demonstrated that ePL supported the pro-angiogenic properties of eMSC, because a significantly higher concentration of VEGF-A was released during cultivation with 10 % ePL medium ( $p < 0.05$ ) and the VEGF-receptor 2 (VEGFR2) expression was increased as compared to FBS medium. In addition, the eMSC and ePL promoted the growth of vessel-like structures in two of the co-cultured samples. Furthermore, the migration and proliferation of equine endothelial cells in the arterial-ring assay was higher with 10 % ePL than with FBS medium.

**Conclusion** – Based on the results in the present work, the ePL is a promising alternative to FBS as a cell culture supplement for in vitro cultivation of eMSC. In this regard, the buffy coat method has proven to be a useful procedure to produce a standardized ePL in large scales. However, preferably young donor horses should be selected to obtain the highest possible platelet and growth factor concentrations. The ePL supported the proliferation and basic characteristics of eMSC when used at the same concentration as FBS (10 %). In addition, ePL promoted the cell fitness of eMSC

comparably to FBS, and the functional properties of eMSC were positively affected by ePL, as evidenced by the improved pro-angiogenic properties. Based on these results, the ePL can be recommended as a cell culture supplement for eMSC cultivation. However, further studies on the detailed composition of ePL are necessary and, due to the positive influence on the pro-angiogenic effect of eMSC, in vivo studies in the field of wound healing should also be conducted to establish ePL for therapeutic use alone or in combination with eMSC.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abu-Ameerh M. A., Jafar H. D., Hasan M. H., Al Bdour M. D., Msallam M., Ababneh O. H., Alhattab D. M., Al-Kurdi B., Awidi A. A. und Awidi A. S. (2019) Platelet lysate promotes re-epithelialization of persistent epithelial defects: a pilot study. *Int Ophthalmol.* 39: 1483–1490. Doi: 10.1007/s10792-018-0968-1
- Ach J. S., Schöne-Seifert B. und Siep L. (2006) Totipotenz und Potentialität: Zum moralischen Status von Embryonen bei unterschiedlichen Varianten der Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen. *Jahrbuch für Wissenschaft und Ethik.* 11. Doi: 10.1515/9783110186406.261
- Adamič N., Prpar Mihevc S., Blagus R., Kramarič P., Krapež U., Majdič G., Viel L., Hoffman A. M., Bienzle D. und Vengust M. (2022) Effect of intrabronchial administration of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells on severe equine asthma. *Stem Cell Res. Ther.* 13: 23. Doi: 10.1186/s13287-022-02704-7
- Aggarwal S. und Pittenger M. F. (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 105(4): 1815–1822. Doi: 10.1182/blood-2004-04-1559
- Aguilera V., Briceño L., Contreras H., Lamperti L., Sepúlveda E., Díaz-Perez F., León M., Veas C., Maura R., Toledo J. R., Fernández P., Covarrubias A., Zuñiga F. A., Radojkovic C., Escudero C. und Aguayo C. (2014) Endothelium trans differentiated from Wharton's jelly mesenchymal cells promote tissue regeneration: potential role of soluble pro-angiogenic factors. *PLoS One.* 9(11): e111025. Doi: 10.1371/journal.pone.0111025
- Akiyama K., Chen C., Wang D., Xu X., Qu C., Yamaza T., Cai T., Chen W., Sun L. und Shi S. (2012) Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell stem cell.* 10(5): 544–555. Doi: 10.1016/j.stem.2012.03.007
- Alizadeh A. H., Briah R., Villagomez D. A. F., King W. A. und Koch T. G. (2018) Cell Identity, Proliferation, and Cytogenetic Assessment of Equine Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Dev.* 27(24) 1729–1738. Doi: 10.1089/scd.2018.0105

- Al-Khaldi A., Eliopoulos N., Martineau D., Lejeune L., Lachapelle K. und Galipeau J. (2003) Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene Ther.* 10: 621–629.  
Doi: 10.1038/sj.gt.3301934
- Almeida C. R., Vasconcelos D. P., Gonçalves R. M. und Barbosa M. A. (2012) Enhanced mesenchymal stromal cell recruitment via natural killer cells by incorporation of inflammatory signals in biomaterials. *J. R. Soc. Interface.* 9: 261–271. Doi:10.1098/rsif.2011.0357
- Al-Saqi S. H., Saliem M., Asikainen S., Quezada H. C., Ekblad A., Hovatta O., Le Blanc K., Jonasson A. F. und Götherström C. (2014) Defined serum-free media for in vitro expansion of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 16(7): 915–926. Doi: 10.1016/j.jcyt.2014.02.006
- Anderson L. D., Raub R. H., Grieger D. M., Morris J. und Weber J. D. (1998) Transforming growth factor- $\beta$ 1 concentrations in equine synovial fluid. *J. Equine Vet. Sci.* 18: 109-113. Doi: 10.1016/S0737-0806(98)80289-X
- Angelone M., Conti V., Biacca C., Battaglia B., Pecorari L., Piana F., Gnudi G., Leonardi F., Ramoni R., Basini G., Dotti S., Renzi S., Ferrari M. und Grolli S. (2017) The Contribution of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma to the Treatment of Chronic Equine Laminitis: A Proof of Concept. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 2122. Doi: 10.3390/ijms18102122
- Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nurden P. und Nurden A. T. (2004) Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 91: 4–15. Doi: 10.1160/TH03-07-0440
- Anitua E., Zalduendo M., Troya M., Alkhraisat M. H. und Blanco-Antona L. A. (2022) Platelet-Rich Plasma as an Alternative to Xenogeneic Sera in Cell-Based Therapies: A Need for Standardization. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 6552.  
Doi: 10.3390/ijms23126552
- Antwort der Bundesregierung (2014) Schlachtung tragender Kühe. Deutscher Bundestag, Drucksache 18/1535. Online verfügbar: <https://dserver.bundestag.de/btd/18/015/1801535.pdf> (Zuletzt besucht 06.07.2022)

- Argüelles D., Carmona J. U., Climent F., Muñoz E. und Prades M. (2008) Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Vet. Rec.* 162: 208–211. Doi: 10.1136/vr.162.7.208
- Arnhold S. J., Goletz I., Klein H., Stumpf G., Beluche L. A., Rohde C., Addicks K. und Litzke L. F. (2007) Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 68(10): 1095–1105.  
Doi: 10.2460/ajvr.68.10.1095
- Arora M. (2013) Cell Culture Media: A Review. *MATER METHODS.* 3:175.  
Doi: 10.13070/mm.en.3.175
- Arora S. und Agnihotri N. (2017) Platelet Derived Biomaterials for Therapeutic Use: Review of Technical Aspects. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 33(2): 159–167.  
Doi: 10.1007/s12288-016-0669-8
- Arzneimittel für neuartige Therapien (ATMP-Advanced therapy medicinal products) Regulatorische Anforderungen und praktische Hinweise (2012) Hrsg: Paul-Ehrlich-Institut. Online verfügbar:  
[https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/regulation/beratung/innovationsbue-ro/broschuere-atmp.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=4](https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/regulation/beratung/innovationsbue-ro/broschuere-atmp.pdf?__blob=publicationFile&v=4). (Zuletzt besucht 22.04.2023)
- Astori G., Amati E., Bambi F., Bernardi M., Chierigato K., Schäfer R., Sella S. und Rodeghiero F. (2016) Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res. Ther.* 7: 93. Doi: 10.1186/s13287-016-0352-x
- Averyanov A., Koroleva I., Konoplyannikov M., Revkova V., Lesnyak V., Kalsin V., Danilevskaya O., Nikitin A., Sotnikova A., Kotova S. und Baklaushev V. (2020) First-in-human high-cumulative-dose stem cell therapy in idiopathic pulmonary fibrosis with rapid lung function decline. *Stem Cell Transl. Med.* 9: 6–16.  
Doi: 10.1002/sctm.19-0037
- Baker M., Robinson S. D., Lechertier T., Barber P. R., Tavora B., D'Amico G., Jones D. T., Vojnovic B. und Hodivala-Dilke K. (2011) Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat. Protoc.* 7(1): 89–104. Doi: 10.1038/nprot.2011.435

- Baker M. (2016) Reproducibility: Respect your cells! Numerous variables can torpedo attempts to replicate cell experiments, from the batch of serum to the shape of growth plates. But there are ways to ensure reliability. *Nature*. 537: 433–435.  
Doi: 10.1038/537433a
- Barro L., Burnouf P.-A., Chou M.-L., Nebie O., Wu Y.-W., Chen M.-S., Radosevic M., Knutson F. und Burnouf T. (2020) Human platelet lysates for human cell propagation. *Platelets*. 32: 152–162. Doi: 10.1080/09537104.2020.1849602
- Barsotti M.C., Losi P., Briganti E., Sanguinetti E., Magera A., Al Kayal T., Feriani R., Di Stefano R. und Soldani G. (2013) Effect of Platelet Lysate on Human Cells Involved in Different Phases of Wound Healing. *PLoS One*. 8(12): e84753.  
Doi: 10.1371/journal.pone.0084753
- Bartholomew S., Owens S. D., Ferraro G. L., Carrade D. D., Lara D. J., Librach F. A., Borjesson D. L. und Galuppo L. D. (2009) Collection of equine cord blood and placental tissues in 40 thoroughbred mares. *Equine Vet. J.* 41(8): 724–728.  
Doi: 10.2746/042516409x429446
- Barussi F. C. M., Bastos F. Z., Leite L. M. B., Fragoso F. Y. I., Senegaglia A. C., Brofman P. R. S., Nishiyama A., Pimpão C. T. und Michelotto P. V. (2016) Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 232: 35–42. Doi: 10.1016/j.resp.2016.07.002
- Basilico C. und Moscatelli D. (1992) The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.* 59: 115–165. Doi: 10.1016/s0065-230x(08)60305-x
- Becerra P., Valdés Vázquez M. A., Dudhia J., Fiske-Jackson A. R., Neves F., Hartman N. G. und Smith R. K. W. (2013) Distribution of injected technetium(99m)-labeled mesenchymal stem cells in horses with naturally occurring tendinopathy. *J. Orthop. Res.* 31(7): 1096–1102. Doi: 10.1002/jor.22338
- Becherucci V., Piccini L., Casamassima S., Bisin S., Gori V., Gentile F., Ceccantini R., Rienzo E. de, Bindi B., Pavan P., Cunial V., Allegro E., Ermini S., Brugnolo F., Astori G. und Bambi F. (2018) Human platelet lysate in mesenchymal stromal cell

- expansion according to a GMP grade protocol: a cell factory experience. *Stem Cell Res. Ther.* 9: 124. Doi: 10.1186/s13287-018-0863-8
- Belk J. W., Kraeutler M. J., Houck D. A., Goodrich J. A., Dragoo J. L. und McCarty E. C. (2020) Platelet-Rich Plasma Versus Hyaluronic Acid for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Am. J. Sports Med.* 49: 249–260. Doi: 10.1177/0363546520909397
- Ben Azouna N., Jenhani F., Regaya Z., Berraeis L., Othman B. T., Ducrocq E. und Domenech J. (2012) Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. *Stem Cell Res. Ther.* 3: 6. Doi:10.1186/s13287-012-0097-7
- Bernardo M. E., Zaffaroni N., Novara F., Cometa A. M., Avanzini M. A., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone M. G., Zuffardi O. und Locatelli F. (2007) Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res.* 67(19): 9142–9149. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4690
- Betz M. and Fox B. S. (1991) Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.* 146 (1): 108–113
- Biancone L., Bruno S., Deregibus M. C., Tetta C. und Camussi G. (2012) Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27: 3037–3042. Doi: 10.1093/ndt/gfs168
- Bieback K., Schallmoser K., Klüter H. und Strunk D. (2008) Clinical Protocols for the Isolation and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells. *Transfus. Med. Hemotherapy.* 35: 286–294. Doi: 10.1159/000141567
- Bieback K. (2013) Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfus. Med. Hemotherapy.* 40: 326–335. Doi: 10.1159/000354061
- Bieback K., Fernandez-Muñoz B., Pati S. und Schäfer R. (2019) Gaps in the knowledge of human platelet lysate as a cell culture supplement for cell therapy: a

- joint publication from the AABB and the International Society for Cell & Gene Therapy. *Cytotherapy*. 21(9): 911–924. Doi: 10.1016/j.jcyt.2019.06.006
- Blair P. und Flaumenhaft R. (2009) Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 23(4): 177–189. Doi: 10.1016/j.blre.2009.04.001.
- Blande I. S., Bassaneze V., Lavini-Ramos C., Fae K. C., Kalil J., Miyakawa A. A., Schettert I. T. und Krieger J. E. (2009) Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion*. 49: 2680–2685.  
Doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02346.x
- Bosch G., van Schie H. T. M., de Groot M. W., Cadby J. A., van de Lest C. H. A., Barneveld A. und van Weeren P. R. (2010) Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *J. Orthop. Res.* 28: 211–217. Doi: 10.1002/jor.20980
- Boswell S. G., Schnabel L. V., Mohammed H. O., Sundman E. A., Minas T. und Fortier L. A. (2014) Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am. J. Sports Med.* 42: 42–49. Doi: 10.1177/0363546513507566
- Both S. K., van der Muijsenberg A. J. C., van Blitterswijk C. A., De Boer J. und De Buijn J. D. (2007) A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 13(1) 3–9. Doi: 10.1089/ten.2005.0513
- Bozorgmanesh R., Magdesian K. G., Sutton-Burges J. W., Owens S. D. und Tablin F. (2019) Equine platelet concentrate preparation and validation. *J. Vet. Intern. Med.* 33: 1500–1506. Doi: 10.1111/jvim.15472
- Brandt L., Schubert S., Scheibe P., Brehm W., Franzen J., Gross C. und Burk J. (2018) Tenogenic Properties of Mesenchymal Progenitor Cells Are Compromised in an Inflammatory Environment. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 2549.  
Doi: 10.3390/ijms19092549
- Braun J., Hack A., Weis-Klemm M., Conrad S., Tremel S., Kohler K., Walliser U., Skutella T. und Aicher W. K. (2010) Evaluation of the osteogenic and chondrogenic

- differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 71(10): 1228-1236. Doi: 10.2460/ajvr.71.10.1228
- Brehm W. (2006) Stammzellen, Stammzelltherapie– Begriffsklärung, Zusammenhänge und mögliche klinische Anwendungen. *PHK.* 22(3): 259–267
- Brehm W., Burk J., Delling U., Gittel C. und Ribitsch I. (2012) Stem cell-based tissue engineering in veterinary orthopaedics. *Cell Tissue Res.* 347: 677–688. Doi: 10.1007/s00441-011-1316-1
- Broeckx S., Zimmerman M., Crocetti S., Suls M., Mariën T., Ferguson S. J., Chiers K., Duchateau L., Franco-Obregón A., Wuertz K. und Spaas J. H. (2014) Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PLoS One.* 9(1): e85917. Doi: 10.1371/journal.pone.0085917
- Broeckx S. Y., Seys B., Suls M., Vandenberghe A., Mariën T., Adriaensen E., Declercq J., van Hecke L., Braun G., Hellmann K. und Spaas J. H. (2019) Equine Allogeneic Chondrogenic Induced Mesenchymal Stem Cells Are an Effective Treatment for Degenerative Joint Disease in Horses. *Stem Cells Dev.* 28(6): 410–422. Doi: 10.1089/scd.2018.0061
- Bronckaers A., Hilkens P., Martens W., Gervois P., Ratajczak J., Struys T. und Lambrichts I. (2014) Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol. Ther.* 143: 181–196. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.02.013
- Burk J. und Brehm W. (2011) Stammzelltherapie von Sehnenverletzungen klinische Ergebnisse von 98 Fälle. *PHK.* 27(2): 153–161
- Burk J., Ribitsch I., Gittel C., Juelke H., Kasper C., Staszyc C. und Brehm W. (2013) Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet. J.* 195: 98–106. Doi: 10.1016/j.tvjl.2012.06.004
- Burk J., Plenge A., Brehm W., Heller S., Pfeiffer B. und Kasper C. (2016) Induction of Tenogenic Differentiation Mediated by Extracellular Tendon Matrix and Short-Term Cyclic Stretching. *Stem Cells Int.* 2016: 7342379. Doi: 10.1155/2016/7342379

- Burnouf T., Strunk D., Koh M. B. C. und Schallmoser K. (2016) Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 76: 371–387. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.065
- Campisi J. und d'Adda di Fagagna F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 729–740. Doi: 10.1038/nrm2233
- Camussi G., Deregibus M. C. und Cantaluppi V. (2013) Role of stem-cell-derived microvesicles in the paracrine action of stem cells. *Biochem. Soc. Trans.* 41: 283–287. Doi: 10.1042/BST20120192
- Caplan A. I. und Bruder S. P. (2001) Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol. Med.* 7(6): 259–264. Doi: 10.1016/s1471-4914(01)02016-0
- Caplan A. I. (2017) Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl. Med.* 6: 1445–1451. Doi: 10.1002/sctm.17-0051
- Carmeliet P. und Jain R. K. (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 473(7347): 298–307. Doi: 10.1038/nature10144
- Carr B. I., Cavallini A., D'Alessandro R., Refolo M. G., Lippolis C., Mazzocca A. und Messa C. (2014) Platelet extracts induce growth, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma in vitro. *BMC Cancer*. 14:43. Doi: 10.1186/1471-2407-14-43
- Carter C. A., Jolly D. G., Worden C. E., Hendren D. G. und Kane C. J. M. (2003) Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp. Mol. Pathol.* 74: 244–255. Doi: 10.1016/s0014-4800(03)00017-0
- Castiglia S., Mareschi K., Labanca L., Lucania G., Leone M., Sanavio F., Castello L., Rustichelli D., Signorino E., Gunetti M., Bergallo M., Bordiga A. M., Ferrero I. und Fagioli F. (2014) Inactivated human platelet lysate with psoralen: a new perspective for mesenchymal stromal cell production in Good Manufacturing Practice conditions. *Cytotherapy*. 16: 750–763. Doi: 10.1016/j.jcyt.2013.12.008

- Castro F. O., Torres A., Cabezas J. und Rodríguez-Alvarez L. (2014) Combined use of platelet rich plasma and vitamin C positively affects differentiation in vitro to mesodermal lineage of adult adipose equine mesenchymal stem cells. *Res. Vet. Sci.* 96: 95–101. Doi: 10.1016/j.rvsc.2013.12.005
- Cengiz I. F., Pereira H., Espregueira-Mendes J., Reis R. L. und Oliveira J. M. (2019) The Clinical Use of Biologics in the Knee Lesions: Does the Patient Benefit? *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.* 12: 406–414. Doi: 10.1007/s12178-019-09573-3
- Centeno C.J., Busse D., Kisiday J., Keohan C., Freeman M. and Karli D. (2008) Increased Knee Cartilage Volume in Degenerative Joint Disease using Percutaneously Implanted, Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Pain Physician.* 11(3): 343-353
- Cequier A., Sanz C., Rodellar C. und Barrachina L. (2021) The Usefulness of Mesenchymal Stem Cells beyond the Musculoskeletal System in Horses. *Animals.* 11: 93. Doi: 10.3390/ani11040931
- Chapman H.-S., Gale A. L., Dodson M. E., Linardi R. L. und Ortvad K. F. (2020) Autologous Platelet Lysate Does Not Enhance Chondrogenic Differentiation of Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Despite Increased TGF- $\beta$ 1 Concentration. *Stem Cells Dev.* 29: 144–155. Doi: 10.1089/scd.2019.0239
- Chase G. L., Lakshmiopathy U., Solchaga A. L., Rao S. M. und Vemuri C. M. (2010) A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 1:8. Doi: 10.1186/scrt8
- Chen M., Przyborowski M. und Berthiaume F. (2009) Stem Cells for Skin Tissue Engineering and Wound Healing. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 37(4-5): 399–421. Doi: 10.1615/critrevbiomedeng.v37.i4-5.50
- Cheng N.-C., Chen S.-Y., Li J.-R. und Young T.-H. (2013) Short-term spheroid formation enhances the regenerative capacity of adipose-derived stem cells by promoting stemness, angiogenesis, and chemotaxis. *Stem Cells Transl. Med.* 2: 584–594. Doi: 10.5966/sctm.2013-0007
- Chen S., Zhao L., Deng X., Shi D., Wu F., Liang H., Huang D. und Shao Z. (2017) Mesenchymal Stem Cells Protect Nucleus Pulposus Cells from Compression-

- Induced Apoptosis by Inhibiting the Mitochondrial Pathway. *Stem Cells Int.* 2017: 9843120. Doi: 10.1155/2017/9843120
- Chiaverina G., Di Blasio L., Monica V., Accardo M., Palmiero M., Peracino B., Varas-Messler M., Puliafito A. und Primo L. (2019) Dynamic Interplay between Pericytes and Endothelial Cells during Sprouting Angiogenesis. *Cells*. 8: 1109.  
Doi: 10.3390/cells8091109
- Childs B. G., Baker D. J., Kirkland J. L., Campisi J. und van Deursen J. M. (2014) Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* 15: 1139–1153. Doi: 10.15252/embr.201439245
- Cholewa D., Stiehl T., Schellenberg A., Bokermann G., Joussem S., Koch C., Walenda T., Pallua N., Marciniak-Czochra A., Suschek C. V. und Wagner W. (2011) Expansion of adipose mesenchymal stromal cells is affected by human platelet lysate and plating density. *Cell Transplant.* 20: 1409–1422.  
Doi: 10.3727/096368910X 557218
- Ciccocioppo R., Gallia A., Sgarella A., Kruzliak P., Gobbi P. G. und Corazza G. R. (2015) Long-Term Follow-Up of Crohn Disease Fistulas After Local Injections of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Mayo Clin. Proc.* 90(6): 747–755.  
Doi: 10.1016/j.mayocp.2015.03.023
- Cimino M., Gonçalves R. M., Barrias C. C. und Martins M. C. L. (2017) Xeno-Free Strategies for Safe Human Mesenchymal Stem/Stromal Cell Expansion: Supplements and Coatings. *Stem Cells Int.* 2017: 6597815.  
Doi: 10.1155/2017/6597815
- Clark K. C., Kol A., Shahbenderian S., Granick J. L., Walker N. J. und Borjesson D. L. (2016) Canine and Equine Mesenchymal Stem Cells Grown in Serum Free Media Have Altered Immunophenotype. *Stem Cell Rev. Rep.* 12: 245–256.  
Doi: 10.1007/s12015-015-9638-0
- Cole J. P., Cole M. A., Insalaco C., Cervelli V. und Gentile P. (2017) Alopecia and platelet-derived therapies. *Stem Cell Investig.* 4: 88. Doi: 10.21037/sci.2017. 11.01
- Colombo I., Mislei B., Mari G., Iacono E. und Merlo B. (2022) Effect of platelet lysate on uterine response of mares susceptible to persistent mating-induced

endometritis. *Theriogenology*. 179: 204–210.

Doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.12.001

Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) (2019) Questions and Answers on Allogeneic Stem Cell-Based Products for Veterinary Use: Specific Questions on Extraneous Agents (Ema/Cvmp/Advent/803494/2016-Rev.1). Online verfügbar: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-allogenic-stem-cell-based-products-veterinary-use-specific-questions-extraneous\\_en-0.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-allogenic-stem-cell-based-products-veterinary-use-specific-questions-extraneous_en-0.pdf) (zuletzt besucht 05.07.2022)

Condic M. L. (2014) Totipotency: what it is and what it is not. *Stem Cells Dev*. 23(8): 796–812. Doi: 10.1089/scd.2013.0364

Conze P., van Schie H. T. M., van Weeren R., Staszuk C., Conrad S., Skutella T., Hopster K., Rohn K., Stadler P. und Geburek F. (2014) Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions. *Regen. Med*. 9(6): 743–757. Doi: 10.2217/rme.14.55

Copland I. B., Garcia M. A., Waller E. K., Roback J. D. und Galipeau J. (2013) The effect of platelet lysate fibrinogen on the functionality of MSCs in immunotherapy. *Biomaterials*. 34: 7840–7850. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.06.050

Corash L. (2011) Bacterial contamination of platelet components: potential solutions to prevent transfusion-related sepsis. *Expert Rev. Hematol*. 4(5): 509–525. Doi: 10.1586/ehm.11.53

Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G. L., Pistoia V. und Uccelli A. (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 107(1): 367–372. Doi: 10.1182/blood-2005-07-2657

Crespo-Diaz R., Behfar A., Butler G. W., Padley D. J., Sarr M. G., Bartunek J., Dietz A. B. und Terzic A. (2011) Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant*. 20: 797–811. Doi: 10.3727/096368910X543376

Crevier-Denoix N., Collobert C., Pourcelot P., Denoix J. M., Sanaa M., Geiger D., Bernard N., Ribot X., Bortolussi C. und Bousseau B. (1997) Mechanical properties

- of pathological equine superficial digital flexor tendons. *Equine Vet. J.* 23: 23–26.  
Doi: 10.1111/j.2042-3306.1997.tb05046.x
- Crovace A., Lacitignola L., Rossi G. und Francioso E. (2010) Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. *Vet. Med. Int.* 2010: 250978. Doi: 10.4061/2010/250978
- Cselenyák A., Pankotai E., Horváth E. M., Kiss L. und Lacza Z. (2010) Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol.* 11: 29.  
Doi: 10.1186/1471-2121-11-29
- Davis A. B., Schnabel L. V. und Gilger B. C. (2019) Subconjunctival bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy as a novel treatment alternative for equine immune-mediated keratitis: A case series. *Vet. Ophthalmol.* 22(5): 674–682.  
Doi: 10.1111/vop.12641
- Dawod A., Miro J., Elbaz H. T., Fahmy H. und Abdoon A. S. (2021) Effect of Intrauterine Infusion of Equine Fresh Platelets-Rich Plasma (PRP) or Lyophilized PRP (L-GF<sup>equina</sup>) on Ovarian Activity and Pregnancy Rate in Repeat Breeder Purebred Arabian Mares. *Animals.* 11: 1123. Doi: 10.3390/ani11041123
- De Becker A., Heestermans R., De Brouwer W., Bockstaele K., Maes K. und van Riet I. (2022) Genetic profiling of human bone marrow mesenchymal stromal cells after in vitro expansion in clinical grade human platelet lysate. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10: 1008271. Doi: 10.3389/fbioe.2022.1008271
- Del Bue M., Riccò S., Conti V., Merli E., Ramoni R. und Grolli S. (2007) Platelet lysate promotes in vitro proliferation of equine mesenchymal stem cells and tenocytes. *Vet. Res. Commun.* 31 Suppl 1: 289–292.  
Doi: 10.1007/s11259-007-0099-z
- Del Bue M., Riccò S., Ramoni R., Conti V., Gnudi G. und Grolli S. (2008) Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their

- association in vitro and in vivo. *Vet. Res. Commun.* 32 Suppl 1: S51-55.  
Doi: 10.1007/s11259-008-9093-3
- DeLong J. M., Russell R. P. und Mazzocca A. D. (2012) Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy.* 28(7): 998–1009.  
Doi: 10.1016/j.arthro.2012.04.148
- De Schauwer C., Meyer E., van de Walle G. R. und van Soom A. (2011) Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology.* 75(8): 1431–1443. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.008
- De Schauwer C., Piepers S., van de Walle G. R., Demeyere K., Hoogewijs M. K., Govaere J. L., Braeckmans K., van Soom A. und Meyer E. (2012) In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry Part A.* 81(4): 312–323.  
Doi: 10.1002/cyto.a.22026
- De Schauwer C., van de Walle G. R., van Soom A. und Meyer E. (2013) Mesenchymal stem cell therapy in horses: useful beyond orthopedic injuries? *Vet. Q.* 33(4): 234–241. Doi: 10.1080/01652176.2013.800250
- Desjardins I., Theoret C., Joubert P., Wagner B. und Lavoie J.-P. (2004) Comparison of TGF- $\beta$  1 concentrations in bronchoalveolar fluid of horses affected with heaves and of normal controls. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 101: 133–141.  
Doi: 10.1016/j.vetimm.2004.03.008
- De Wildt-Eggen J., Schrijver J. G. und Bins M. (2001) WBC content of platelet concentrates prepared by the buffy coat method using different processing procedures and storage solutions. *Transfusion.* 41: 1378-1383.  
Doi: 10.1046/j.1537-2995.2001.41111378.x
- Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P. D., Matteucci P., Grisanti S. und Gianni A. M. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 99(10): 3838–3843. Doi: 10.1182/blood.v99.10.3838
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D. und Horwitz E. (2006) Minimal criteria for

- defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8(4): 315–317.  
Doi:10.1080/14653240600855905
- Donnelly B. P., Nixon A. J., Haupt J. L. und Dahlgren L. A. (2006) Nucleotide structure of equine platelet-derived growth factor-A and-B and expression in horses with induced acute tendinitis. *Am. J. Vet. Res.* 67(7): 1218-1225.  
Doi: 10.2460/ajvr.67.7.1218
- Doucet C., Ernou I., Zhang Y., Llense J.-R., Begot L., Holy X. und Lataillade J.-J. (2005) Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* 205(2): 228–236. Doi: 10.1002/jcp.20391
- Dowling B. A., Dart A. J., Hodgson D. R. und Smith R. K. W. (2000) Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Vet. J.* 32(5): 369–378
- Duijvestein M., Vos A. C. W., Roelofs H., Wildenberg M. E., Wendrich B. B., Verspaget H. W., Kooy-Winkelaar E. M. C., Koning F., Zwaginga J. J., Fidler H. H., Verhaar A. P., Fibbe W. E., van den Brink G. R. und Hommes D. W. (2010) Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*. 59: 1662–1669.  
Doi: 10.1136/gut.2010.215152
- Dyson S. J. (2004) Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet. J.* 36(5): 415–419.  
Doi: 10.2746/0425164044868422
- Egger D., Schwedhelm I., Hansmann J. und Kasper C. (2017) Hypoxic Three-Dimensional Scaffold-Free Aggregate Cultivation of Mesenchymal Stem Cells in a Stirred Tank Reactor. *Bioengineering (Basel)*. 4(2):47.  
Doi: 10.3390/bioengineering4020047
- Erickson G. A., Bolin S. R. und Landgraf J. G. (1991) Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. *Dev. Biol. Stand.* 75: 173–175

- Esteves C. L., Sheldrake T. A., Mesquita S. P., Pesántez J. J., Menghini T., Dawson L., Péault B. und Donadeu F. X. (2017) Isolation and characterization of equine native MSC populations. *Stem Cell Res. Ther.* 8: 80.  
Doi: 10.1186/s13287-017-0525-2
- European Serum Products Association (ESPA). Value Chain. How FBS is produced. Online verfügbar: <https://serumproducts.eu/what-is-serum/>. (Zuletzt besucht 15.07.2022)
- Even K. M., Gaesser A. M., Ciamillo S. A., Linardi R. L. und Ortved K. F. (2022) Comparing the immunomodulatory properties of equine BM-MSCs culture expanded in autologous platelet lysate, pooled platelet lysate, equine serum and fetal bovine serum supplemented culture media. *Front. Vet. Sci.* 9: 958724.  
Doi: 10.3389/fvets.2022.958724
- Everts P., Onishi K., Jayaram P., Lana J. F. und Mautner K. (2020) Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 7794. Doi: 10.3390/ijms21207794
- Eydt C., Geburek F., Schröck C., Hambruch N., Rohn K., Pfarrer C. und Staszky C. (2016) Sternal bone marrow derived equine multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): investigations considering the sampling site and the use of different culture media. *Vet. Med. Sci.* 2: 200–210. Doi: 10.1002/vms3.36
- Faraday N., Scharpf R. B., Dodd-o J. M., Martinez E. A., Rosenfeld B. A. und Dorman T. (2001) Leukocytes can enhance platelet-mediated aggregation and thromboxane release via interaction of P-selectin glycoprotein ligand 1 with P-selectin. *Anesthesiology.* 94(1): 145-151.  
Doi: 10.1097/00000542-200101000-00025
- Fekete N., Rojewski M., Schmidtke-Schrezenmeier G. und Schrezenmeier H. (2012) Mesenchymale Stromazellen und ihre klinische Anwendbarkeit. *Transfusionsmedizin.* 2: 17–27. Doi: 10.1055/s-0031-1271598
- Feng Y., Huang J., Wu J., Xu Y., Chen B., Jiang L., Xiang H., Peng Z. und Wang X. (2020) Safety and feasibility of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients

with COVID-19 pneumonia: A pilot study. *Cell Prolif.* 53: e12947.

Doi: 10.1111/cpr.12947

Ferris D. J., Frisbie D. D., Kisiday J. D., McIlwraith C. W., Hague B. A., Major M. D., Schneider R. K., Zubrod C. J., Kawcak C. E. und Goodrich L. R. (2014) Clinical outcome after intra-articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Vet. Surg.* 43(3): 255–265.

Doi: 10.1111/j.1532-950X.2014.12100.x

Filardo G., Di Matteo B., Kon E., Merli G. und Marcacci M. (2018) Platelet-rich plasma in tendon-related disorders: results and indications. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 26: 1984–1999. Doi: 10.1007/s00167-016-4261-4

Fortier L. A. (2005) Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet. Surg.* 34(5): 415–423. Doi: 10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x

Fortunato T. M., Beltrami C., Emanuelli C., De Bank P. A. und Pula G. (2016) Platelet lysate gel and endothelial progenitors stimulate microvascular network formation in vitro: tissue engineering implications. *Sci. Rep.* 6: 25326. Doi: 10.1038/srep25326

Franke J., Abs V., Zizzadoro C. und Abraham G. (2014) Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. *BMC Vet. Res.* 10: 119.

Doi: 10.1186/1746-6148-10-119

Freitag J., Bates D., Wickham J., Shah K., Huguenin L., Tenen A., Paterson K. und Boyd R. (2019) Adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Regen. Med.* 14(3): 213–230.

Doi: 10.2217/rme-2018-0161

Friedenstein A. J., Piatetzky-Shapiro I. I. und Petrakova K. V. (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 16(3): 381–390.

Doi: 10.1242/dev.16.3.381

Fukuda K., Kuroda T., Tamura N., Mita H., Miyata H. und Kasashima Y. (2022) Platelet Lysate Enhances Equine Skeletal Muscle Regeneration in A Bupivacaine-Induced Muscle Injury Model. *J. Equine Vet. Sci.* 112: 103892.

Doi: 10.1016/j.jevs.2022.103892

- Gad E. S., Salama A. A. A., El-Shafie M. F., Arafa H. M. M., Abdelsalam R. M. und Khattab M. (2020) The Anti-fibrotic and Anti-inflammatory Potential of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Nintedanib in Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats. *Inflammation*. 43(1): 123–134.  
Doi: 10.1007/s10753-019-01101-2
- Galderisi U., Peluso G. und Di Bernardo G. (2022) Clinical Trials Based on Mesenchymal Stromal Cells are Exponentially Increasing: Where are We in Recent Years? *Stem Cell Rev. Rep.* 18(1) 23–36. Doi: 10.1007/s12015-021-10231-w
- Gangadaran P., Rajendran R. L., Lee H. W., Kalimuthu S., Hong C. M., Jeong S. Y., Lee S.-W., Lee J. und Ahn B.-C. (2017) Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells activates VEGF receptors and accelerates recovery of hindlimb ischemia. *J. Control. Release*. 264: 112–126. Doi: 10.1016/j.jconrel.2017.08.022
- Gao W.-X., Sun Y.-Q., Shi J., Li C.-L., Fang S.-B., Wang D., Deng X.-Q., Wen W. und Fu Q.-L. (2017) Effects of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells on differentiation, maturation, and function of dendritic cells. *Stem Cell Res. Ther.* 8(1): 48. Doi: 10.1186/s13287-017-0499-0
- Garbin L. C. und Olver C. S. (2020) Platelet-Rich Products and Their Application to Osteoarthritis. *J. Equine Vet. Sci.* 86: 102820. Doi: 10.1016/j.jevs.2019.102820
- Garbin L. C., Lopez C. und Carmona J. U. (2021) A Critical Overview of the Use of Platelet-Rich Plasma in Equine Medicine Over the Last Decade. *Front. Vet. Sci.* 8: 641818. Doi: 10.3389/fvets.2021.641818
- Gazdhar A., Susuri N., Hostettler K., Gugger M., Knudsen L., Roth M., Ochs M. und Geiser T. (2013) HGF Expressing Stem Cells in Usual Interstitial Pneumonia Originate from the Bone Marrow and Are Antifibrotic. *PLoS One*. 8(6): e65453.  
Doi: 10.1371/journal.pone.0065453
- Geburek F., Gaus M., van Schie H. T. M., Rohn K. und Stadler P. M. (2016) Effect of intralesional platelet-rich plasma (PRP) treatment on clinical and ultrasonographic parameters in equine naturally occurring superficial digital flexor tendinopathies - a randomized prospective controlled clinical trial. *BMC Vet. Res.* 12(1): 191.  
Doi: 10.1186/s12917-016-0826-1

- Geburek F. und Stadler P. (2011) Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden. *Tierarztl. Prax. Ausg. G.* 39(06) 373–383.  
Doi: 10.1055/s-0038-1623088
- Gerdes H.-H., Bukoreshtliev N. V. und Barroso J. F. V. (2007) Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett.* 581(11): 2194–2201. Doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.071
- Geremicca W., Fonte C. und Vecchio S. (2010) Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms. *Blood Transfus.* 8(2): 107–112.  
Doi: 10.2450/2009.0091-09
- Gilbertie J. M., Long J. M., Schubert A. G., Berglund A. K., Schaer T. P. und Schnabel L. V. (2018) Pooled Platelet-Rich Plasma Lysate Therapy Increases Synoviocyte Proliferation and Hyaluronic Acid Production While Protecting Chondrocytes from Synoviocyte-Derived Inflammatory Mediators. *Front. Vet. Sci.* 5: 150. Doi: 10.3389/fvets.2018.00150
- Giraldo C. E., López C., Álvarez M. E., Samudio I. J., Prades M. und Carmona J. U. (2013) Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet. Res.* 9:29. Doi: 10.1186/1746-6148-9-29
- Gittel C., Brehm W., Burk J., Juelke H., Staszky C. und Ribitsch I. (2013) Isolation of equine multipotent mesenchymal stromal cells by enzymatic tissue digestion or explant technique: comparison of cellular properties. *BMC Vet. Res.* 9: 221.  
Doi: 10.1186/1746-6148-9-221
- Godwin E. E., Young N. J., Dudhia J., Beamish I. C. und Smith R. K. W. (2012) Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet. J.* 44(1): 25–32. Doi: 10.1111/j.2042-3306.2011.00363.x
- Goedecke A., Wobus M., Krech M., Münch N., Richter K., Hölig K. und Bornhauser M. (2011) Differential effect of platelet-rich plasma and fetal calf serum on bone

- marrow-derived human mesenchymal stromal cells expanded in vitro. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5: 648–654. Doi: 10.1002/term.359
- Goerke S. M., Plaha J., Hager S., Strassburg S., Torio-Padron N., Stark G. B. und Finkenzeller G. (2012) Human endothelial progenitor cells induce extracellular signal-regulated kinase-dependent differentiation of mesenchymal stem cells into smooth muscle cells upon cocultivation. *Tissue Eng. Part A.* 18(23,24): 2395–2405. Doi: 10.1089/ten.tea.2012.0147
- Golebiewska E. M. und Poole A. W. (2015) Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 29(3): 153–162. Doi: 10.1016/j.blre.2014.10.003
- Gottipamula S., Muttigi M. S., Chaansa S., Ashwin K. M., Priya N., Kolkundkar U., Sundar Raj S., Majumdar A. S. und Seetharam R. N. (2013) Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 10: 108–119. Doi: 10.1002/term.1713
- Gottipamula S., Sharma A., Krishnamurthy S., Majumdar A. S. und Seetharam R. N. (2012) Human platelet lysate is an alternative to fetal bovine serum for large-scale expansion of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biotechnol. Lett.* 34: 1367–1374. Doi: 10.1007/s10529-012-0893-8
- Griffiths S., Baraniak P. R., Copland I. B., Nerem R. M. und McDevitt T. C. (2013) Human platelet lysate stimulates high-passage and senescent human multipotent mesenchymal stromal cell growth and rejuvenation in vitro. *Cytotherapy.* 15: 1469–1483. Doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.020
- Grimaud E., Heymann D. und Rédini F. (2002) Recent advances in TGF- $\beta$  effects on chondrocyte metabolism potential therapeutic roles of TGF- $\beta$  in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 241–257. Doi: 10.1016/s1359-6101(02)00004-7
- Grogan S. P., Barbero A., Winkelmann V., Rieser F., Fitzsimmons J. S., O'Driscoll S., Martin I. und Mainil-Varlet P. (2006) Visual histological grading system for the evaluation of in vitro-generated neocartilage. *Tissue Eng.* 12(8): 2141-2149. Doi: 10.1089/ten.2006.12.2141

- Gstraunthaler G. (2003) Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture. *ALTEX*. 20(4): 257–281. Doi: 10.14573/altex.2003.4.257
- Guidance Document (2015) Cell-Based Products for Animal Use. Food and Drug Administration (FDA). Online verfügbar: <https://www.fda.gov/media/88925/download> (Zuletzt besucht: 05.05.2023)
- Guillamat-Prats R. (2021) The role of MSC in wound healing, scarring and regeneration. *Cells*. 10: 1729. Doi: 10.3390/cells10071729
- Guiotto M., Raffoul W., Hart A. M., Riehle M. O. und Di Summa P. G. (2020) Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: a systematic review. *J. Transl. Med.* 18: 351. Doi: 10.1186/s12967-020-02489-4
- Gulliksson H. (2012) Platelets from platelet-rich-plasma versus buffy-coat-derived platelets: what is the difference? *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 34(2): 76–77. Doi: 10.5581/1516-8484.20120024
- Gupta A. K., Cole J., Deutsch D. P., Everts P. A., Niedbalski R. P., Panchaprateep R., Rinaldi F., Rose P. T., Sinclair R., Vogel J. E., Welter R. J., Zufelt M. D. und Puig C. J. (2019) Platelet-Rich Plasma as a Treatment for Androgenetic Alopecia. *Dermatol. Surg.* 45: 1262–1273. Doi: 10.1097/DSS.0000000000001894
- Ha D. H., Kim H.-K., Lee J., Kwon H. H., Park G.-H., Yang S. H., Jung J. Y., Choi H., Lee J. H., Sung S., Yi Y. W. und Cho B. S. (2020) Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. *Cells*. 9: 1157. Doi: 10.3390/cells9051157
- Haack-Sorensen M., Friis T., Bindsvlev L., Mortensen S., Johnsen H. E. und Kastrup J. (2008) Comparison of different culture conditions for human mesenchymal stromal cells for clinical stem cell therapy. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 68(3): 192–203. Doi: 10.1080/00365510701601681
- Hackett C. H., Flaminio M. J. B. F. und Fortier L. A. (2011) Analysis of CD14 expression levels in putative mesenchymal progenitor cells isolated from equine bone marrow. *Stem Cells Dev.* 20(4): 721–735. Doi: 10.1089/scd.2010.0175

- Hagen A., Lehmann H., Aurich S., Bauer N., Melzer M., Moellerberndt J., Patané V., Schnabel C. L. und Burk J. (2021) Scalable Production of Equine Platelet Lysate for Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Culture. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8: 613621. Doi: 10.3389/fbioe.2020.613621
- Hagen A., Holland H., Brandt V.-P., Doll C. U., Häußler T. C., Melzer M., Moellerberndt J., Lehmann H. und Burk J. (2022) Platelet Lysate for Mesenchymal Stromal Cell Culture in the Canine and Equine Species: Analogous but Not the Same. *Animals.* 12:189. Doi: 10.3390/ani12020189
- Haines J. M., Hwang J. K. und Wardrop K. J. (2021) The effects of additive solutions on the development of storage lesions in stored canine platelet concentrates. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 31(2): 247–255. Doi: 10.1111/vec.13031
- Hasiba-Pappas S. K., Tuca A. C., Luze H., Nischwitz S. P., Zrim R., Geißler J. C. J., Lumenta D. B., Kamolz L.-P. und Winter R. (2022) Platelet-Rich Plasma in Plastic Surgery: A Systematic Review. *Transfus. Med. Hemotherapy.* 49: 129–142. Doi: 10.1159/000524353
- Hawkes P. W. (2015) Fetal bovine serum: geographic origin and regulatory relevance of viral contamination. *Bioresour. Bioprocess.* 2: 34. Doi: 10.1186/s40643-015-0063
- Hayashi I. und Sato H. G. (1976) Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature.* 259: 132-134. Doi: 10.1038/259132a0
- Haycock J. W. (2011) 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol. Biol.* 695: 1–15. Doi:10.1007/978-1-60761-984-0\_1
- Heiskanen A., Satomaa T., Tiitinen S., Laitinen A., Mannelin S., Impola U., Mikkola M., Olsson C., Miller-Podraza H., Blomqvist M., Olonen A., Salo H., Lehenkari P., Tuuri T., Otonkoski T., Natunen J., Saarinen J. und Laine J. (2007) N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem cells.* 25: 197–202. Doi: 10.1634/stemcells.2006-0444

- Hemeda H., Giebel B. und Wagner W. (2014) Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 16: 170–180. Doi: 10.1016/j.jcyt.2013.11.004
- Henschler R., Gabriel C., Schallmoser K., Burnouf T. und Koh M. B. C. (2019) Human platelet lysate current standards and future developments. *Transfusion*. 59: 1407–1413. Doi: 10.1111/trf.15174
- Hersant B., Sid-Ahmed M., Braud L., Jourdan M., Baba-Amer Y., Meningaud J.-P. und Rodriguez A.-M. (2019) Platelet-Rich Plasma Improves the Wound Healing Potential of Mesenchymal Stem Cells through Paracrine and Metabolism Alterations. *Stem Cells Int*. 2019: 1234263. Doi: 10.1155/2019/1234263
- Hillmann A., Ahrberg A. B., Brehm W., Heller S., Josten C., Paebst F. und Burk J. (2016) Comparative Characterization of Human and Equine Mesenchymal Stromal Cells: A Basis for Translational Studies in the Equine Model. *Cell Transplant*. 25: 109–124. Doi: 10.3727/096368915X687822
- Hoareau G. L., Jandrey K. E., Burges J., Bremer D. und Tablin F. (2014) Comparison of the platelet-rich plasma and buffy coat protocols for preparation of canine platelet concentrates. *Vet. Clin. Pathol*. 43(4): 513–518. Doi: 10.1111/vcp.12195
- Hodgson J. (1995) To treat or Not to Treat: That Is the Question for Serum. As regulations on serum importation stagnate, the industry moves toward treatment options. *Biotechnology*. 13: 333-334; 337-338;341-343. Doi: 10.1038/nbt0495-333
- Hofbauer P., Riedl S., Witzeneder K., Hildner F., Wolbank S., Groeger M., Gabriel C., Redl H. und Holthöner W. (2014) Human platelet lysate is a feasible candidate to replace fetal calf serum as medium supplement for blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Cytotherapy*. 16: 1238–1244. Doi: 10.1016/j.jcyt.2014.04.009
- Horn P., Bokermann G., Cholewa D., Bork S., Walenda T., Koch C., Drescher W., Hutschenreuther G., Zenke M., Ho A. D. und Wagner W. (2010) Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 12: 888–898. Doi: 10.3109/14653249.2010.501788
- Horwitz M. E., Gordon L. P., Koo K. K. W., Marx C. J., Neel D. M., McNall Y. R., Muul L. und Hofmann T. (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal

- cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *PNAS*. 99(13): 8932–8937.  
Doi: 10.1073/pnas.132252399
- Hu J., Chen X., Li P., Lu X., Yan J., Tan H. und Zhang C. (2021) Exosomes derived from human amniotic fluid mesenchymal stem cells alleviate cardiac fibrosis via enhancing angiogenesis in vivo and in vitro. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 11(2): 348–361. Doi: 10.21037/cdt-20-1032
- Iacono E., Merlo B., Pirrone A., Antonelli C., Brunori L., Romagnoli N. und Castagnetti C. (2012) Effects of mesenchymal stem cells isolated from amniotic fluid and platelet-rich plasma gel on severe decubitus ulcers in a septic neonatal foal. *Res. Vet. Sci.* 93: 1439–1440. Doi: 10.1016/j.rvsc.2012.04.008
- Iacono E., Lanci A., Merlo B., Ricci F., Pirrone A., Antonelli C., Mariella J. und Castagnetti C. (2016) Effects of amniotic fluid mesenchymal stem cells in carboxymethyl cellulosegel on healing of spontaneous pressure sores: clinical outcome in seven hospitalized neonatal foals. *Turk. J. Biol.* 40(2): 484–492.  
Doi: 10.3906/biy-1507-147
- Ionita J.-C., Kissich C., Gottschalk J., Einspanier A., Köller G., Winter K. und Brehm W. (2014) Comparison of cellular and growth factor concentrations in equine Autologous Conditioned Plasma (ACP) and manually prepared Platelet Rich Plasma (mPRP). *PHK*. 30(2): 195–201. Doi: 10.21836/PEM20140208
- Iqbal F., Szaraz P., Librach M., Gauthier-Fisher A. und Librach C. L. (2017) Angiogenic potency evaluation of cell therapy candidates by a novel application of the in vitro aortic ring assay. *Stem Cell Res. Ther.* 8: 184.  
Doi: 10.1186/s13287-017-0631-1
- Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G. und Minick C. R. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* 52: 2745–2756.  
Doi: 10.1172/JCI107470
- Jiang X.-X., Zhang Y., Liu B., Zhang S.-X., Wu Y., Yu X.-D. und Mao N. (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-

derived dendritic cells. *Blood*. 105 (10): 4120–4126.

Doi: 10.1182/blood-2004-02-0586

Jochems C. E. A., van der Valk J. B. F., Stafleu F. R. und Baumans V. (2002) The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern. Lab. Anim.* 30: 219–227. Doi: 10.1177/026119290203000208

Jonsdottir-Buch S. M., Lieder R. und Sigurjonsson O. E. (2013) Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 8(7): e68984.

Doi: 10.1371/journal.pone.0068984

Jovic D., Yu Y., Wang D., Wang K., Li H., Xu F., Liu C., Liu J. und Luo Y. (2022) A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. *Stem Cell Rev. Rep.* 18: 1525–1545. Doi: 10.1007/s12015-022-10369-1

Kabithe E., Hillegas J., Stokol T., Moore J. und Wagner B. (2010) Monoclonal antibodies to equine CD14. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 138: 149–153.

Doi: 10.1016/j.vetimm.2010.07.003

Karnieli O., Friedner O. M., Allickson J. G., Zhang N., Jung S., Fiorentini D., Abraham E., Eaker S. S., Yong T. K., Chan A., Griffiths S., Wehn A. K. und Oh S. (2017) A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy*. 19(2): 155–169. Doi: 10.1016/j.jcyt.2016.11.011

Kelly K. und Rasko J. E. J. (2021) Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Graft Versus Host Disease. *Front. Immunol.* 12: 761616.

Doi: 10.3389/fimmu.2021.761616

Kinnaird T., Stabile E., Burnett M. S., Shou M., Lee C. W., Barr S., Fuchs S. und Epstein S. E. (2004) Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 109: 1543–1549.

Doi: 10.1161/01.CIR.0000124062.31102.57

Kiraz Y., Adan A., Kartal Yandim M. und Baran Y. (2016) Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biol.* 37: 8471–8486.

Doi: 10.1007/s13277-016-5035-9

- Kirmani B. H., Jones S. G., Datta S., McLaughlin E. K. und Hoschitzky A. J. (2017) A meta-analysis of platelet gel for prevention of sternal wound infections following cardiac surgery. *Blood Transfus.* 15: 57–65. Doi: 10.2450/2016.0231-15
- Kirsch M., Rach J., Handke W., Seltsam A., Pepelanova I., Strauß S., Vogt P., Scheper T. und Lavrentieva A. (2021) Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cell Cultivation in Fetal Calf Serum, Human Serum, and Platelet Lysate in 2D and 3D Systems. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8: 598389. Doi: 10.3389/fbioe.2020.598389
- Klatte-Schulz F., Schmidt T., Uckert M., Scheffler S., Kalus U., Rojewski M., Schrezenmeier H., Pruss A. und Wildemann B. (2018) Comparative Analysis of Different Platelet Lysates and Platelet Rich Preparations to Stimulate Tendon Cell Biology: An In Vitro Study. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 212. Doi: 10.3390/ijms19010212
- Koch T. G., Berg L. C. und Betts D. H. (2009) Current and future regenerative medicine - Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can. Vet. J.* 50(2): 155-165
- Komaki M., Numata Y., Morioka C., Honda I., Tooi M., Yokoyama N., Ayame H., Iwasaki K., Taki A., Oshima N. und Morita I. (2017) Exosomes of human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis. *Stem Cell Res. Ther.* 8: 219. Doi: 10.1186/s13287-017-0660-9
- Kwon H. M., Hur S.-M., Park K.-Y., Kim C.-K., Kim Y.-M., Kim H.-S., Shin H.-C., Won M.-H., Ha K.-S., Kwon Y.-G., Lee D. H. und Kim Y.-M. (2014) Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vasc. Pharmacol.* 63(1): 19–28. Doi: 10.1016/j.vph.2014.06.004
- Lana J. F., Macedo A., Ingrao I. L. G., Huber S. C., Santos G. S. und Santana M. H. A. (2019) Leukocyte-rich PRP for knee osteoarthritis: Current concepts. *J. Clin. Orthop. Trauma.* 10: S179-S182. Doi: 10.1016/j.jcot.2019.01.011
- Laner-Plamberger S., Lener T., Schmid D., Streif D. A., Salzer T., Öller M., Hauser-Kronberger C., Fischer T., Jacobs V. R., Schallmoser K., Gimona M. und Rohde E. (2015) Mechanical fibrinogen-depletion supports heparin-free mesenchymal stem

cell propagation in human platelet lysate. *J. Transl. Med.* 13: 354.

Doi: 10.1186/s12967-015-0717-4

Lanzoni G., Linetsky E., Correa D., Messinger Cayetano S., Alvarez R. A., Kouroupis D., Alvarez Gil A., Poggioli R., Ruiz P., Marttos A. C., Hirani K., Bell C. A., Kusack H., Rafkin L., Baidal D., Pastewski A., Gawri K., Leñero C., Mantero A. M. A., Metalonis S. W., Wang X., Roque L., Masters B., Kenyon N. S., Ginzburg E., Xu X., Tan J., Caplan A. I., Glassberg M. K., Alejandro R. und Ricordi C. (2021) Umbilical cord mesenchymal stem cells for COVID-19 acute respiratory distress syndrome: A double-blind, phase 1/2a, randomized controlled trial. *Stem Cells Transl. Med.* 10: 660–673. Doi: 10.1002/sctm.20-0472

Lazarus H. M., Haynesworth S. E., Gerson S. L., Rosenthal N. S. und Caplan A. I. (1995). Ex-Vivo expansion and subsequent infusion of human bone-marrow-derived stromal progenitor cells (Mesenchymal Progenitor Cells)-implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* 16(4): 557–564.

Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., Götherström C., Hassan M., Uzunel M. und Ringdén O. (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 363: 1439–1441.  
Doi: 10.1016/s0140-6736(04)16104-7

Lee C., Mitsialis S. A., Aslam M., Vitali S. H., Vergadi E., Konstantinou G., Sdrimas K., Fernandez-Gonzalez A. und Kourembanas S. (2012) Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation.* 126(22): 2601–2611.  
Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.114173

Li L., Zhang Y., Li Y., Yu B., Xu Y., Zhao S. und Guan Z. (2008) Mesenchymal stem cell transplantation attenuates cardiac fibrosis associated with isoproterenol-induced global heart failure. *Transpl. Int.* 21: 1181–1189.  
Doi: 10.1111/j.1432-2277.2008.00742.x

Liu K., Ji K., Guo L., Wu W., Lu H., Shan P. und Yan C. (2014) Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvasc Res.* 92: 10–18. Doi: 10.1016/j.mvr.2014.01.008

- Lohmann M., Walenda G., Hemedá H., Jousseu S., Drescher W., Jockehoevel S., Hutschenreuter G., Zeuke M. und Wagner W. (2012) Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 7(5): e37839. Doi: 10.1371/journal.pone.0037839
- López-Beas J., Guadix J. A., Clares B., Soriano-Ruiz J. L., Zugaza J. L. und Gálvez-Martín P. (2020) An overview of international regulatory frameworks for mesenchymal stromal cell-based medicinal products: From laboratory to patient. *Med. Res. Rev.* 40(4): 1315–1334. Doi: 10.1002/med.21659
- Lozito T. P., Kuo C. K., Taboas J. M. und Tuan R. S. (2009) Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. *J. Cell. Biochem.* 107: 714–722. Doi: 10.1002/jcb.22167
- Luk F., Carreras-Planella L., Korevaar S. S., De Witte S. F. H., Borràs F. E., Betjes M. G. H., Baan C. C., Hoogduijn M. J. und Franquesa M. (2017) Inflammatory Conditions Dictate the Effect of Mesenchymal Stem or Stromal Cells on B Cell Function. *Front. Immunol.* 8: 1042. Doi: 10.3389/fimmu.2017.01042
- Maacha S., Sidahmed H., Jacob S., Gentilcore G., Calzone R., Grivel J.-C. und Cugno C. (2020) Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stromal Cells in Angiogenesis. *Stem Cells Int.* 2020: 4356359. Doi: 10.1155/2020/4356359
- Machado T. S. L., Massoco C. O., Silva L. C. L. C., Fülber J., Moreira J. J. und Baccarin R. Y. A. (2019) Effects of blood-derived products and sodium hyaluronate on equine synovial fluid cells and on synovial fluid from osteochondrotic joints of horses after arthroscopy and administration of treatment. *Am. J. Vet. Res.* 80(7): 646–656. Doi: 10.2460/ajvr.80.7.646
- Machova Urdzikova L., Sedlacek R., Suchy T., Amemori T., Ruzicka J., Lesny P., Havlas V., Sykova E. und Jendelova P. (2014) Human multipotent mesenchymal stem cells improve healing after collagenase tendon injury in the rat. *Biomed. Eng Online*. 13: 42. Doi: 10.1186/1475-925X-13-42
- Mahmoudian-Sani M.-R., Rafeei F., Amini R. und Saidijam M. (2018) The effect of mesenchymal stem cells combined with platelet-rich plasma on skin wound healing. *J. Cosmet. Dermatol.* 17(5): 650–659. Doi: 10.1111/jocd.12512

- Mambelli L. I., Winter G. H. Z., Kerkis A., Malschitzky E., Mattos R. C. und Kerkis I. (2013) A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis. *Theriogenology*. 79: 744–750.  
Doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.030
- Mambelli L. I., Mattos R. C., Winter G. H. Z., Madeiro D. S., Morais B. P., Malschitzky E., Miglino M. A., Kerkis A. und Kerkis I. (2014) Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometrosis. *PLoS One*. 9(6): e97889. Doi: 10.1371/journal.pone.0097889
- Marahrens M. und Schwarzlose I. (2013) Tierschutz/Schlachten gravider Tiere, Stellungnahme zu einem möglichen Empfindungsvermögen und der Lebensfähigkeit entwickelter Feten. Friedrich-Loeffler-Institut. Online verfügbar: <https://www.amtstierarzt.de/fachthemen/downloads-tschg?task=download.send&id=64&catid=10&m=0> (Zuletzt besucht 09.07.2022)
- Marfe G., Massaro-Giordano M., Ranalli M., Cozzoli E., Di Stefano C., Malafoglia V., Poletini M. und Gambacurta A. (2012) Blood derived stem cells: an ameliorative therapy in veterinary ophthalmology. *J. Cell. Physiol.* 227: 1250–1256.  
Doi: 10.1002/jcp.22953
- Mariani E. und Pulsatelli L. (2020) Platelet Concentrates in Musculoskeletal Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 1328. Doi: 10.3390/ijms21041328
- Mariñas-Pardo L., García-Castro J., Rodríguez-Hurtado I., Rodríguez-García M. I., Núñez-Naveira L. und Hermida-Prieto M. (2018) Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (Horse Allo 20) for the Treatment of Osteoarthritis-Associated Lameness in Horses: Characterization, Safety, and Efficacy of Intra-Articular Treatment. *Stem Cells Dev.* 27(17): 1147–1160.  
Doi: 10.1089/scd.2018.0074
- Mark P., Kleinsorge M., Gaebel R., Lux C. A., Toelk A., Pittermann E., David R., Steinhoff G. und Ma N. (2013) Human Mesenchymal Stem Cells Display Reduced Expression of CD105 after Culture in Serum-Free Medium. *Stem Cells Int.* 2013: 698076. Doi: 10.1155/2013/698076

- Marzo L., Gousset K. und Zurzolo C. (2012) Multifaceted roles of tunneling nanotubes in intercellular communication. *Front. Physiol.* 3: 72.  
Doi: 10.3389/fphys.2012.00072
- Matas J., Orrego M., Amenabar D., Infante C., Tapia-Limonchi R., Cadiz M. I., Alcayaga-Miranda F., González P. L., Muse E., Khoury M., Figueroa F. E. und Espinoza F. (2019) Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) for Knee Osteoarthritis: Repeated MSC Dosing Is Superior to a Single MSC Dose and to Hyaluronic Acid in a Controlled Randomized Phase I/II Trial. *Stem Cells Transl. Med.* 8: 215–224. Doi: 10.1002/sctm.18-0053
- McClain A. K. und McCarrel T. M. (2019) The effect of four different freezing conditions and time in frozen storage on the concentration of commonly measured growth factors and enzymes in equine platelet-rich plasma over six months. *BMC Vet. Res.* 15: 292. Doi: 10.1186/s12917-019-2040-4
- McGowan-Jordan J., Hasting R. J. und Moore S. (2020) An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. ISCN 2020. Karger AG.  
Doi: 10.1159/isbn.978-3-318-06867-2
- Medpertise (2022) Wo und wie entsteht Blut? Online verfügbar:  
<https://www.medpertise.de/blutwerte/blutbild/wo-und-wie-entsteht-blut/> (Zuletzt besucht 05.04.2022)
- Mendt M., Rezvani K. und Shpall E. (2019) Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone Marrow Transplant.* 54: 789–792.  
Doi: 10.1038/s41409-019-0616-z
- Meng F., Xu R., Wang S., Xu Z., Zhang C., Li Y., Yang T., Shi L., Fu J., Jiang T., Huang L., Zhao P., Yuan X., Fan X., Zhang J.-Y., Song J., Zhang D., Jiao Y., Liu L., Zhou C., Maeurer M., Zumla A., Shi M. und Wang F.-S. (2020) Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with COVID-19: a phase 1 clinical trial. *Signal Transduct. Target Ther.* 5: 172.  
Doi: 10.1038/s41392-020-00286-5

- Metcalf E. S. (2014) The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to Persistent Mating-Induced Endometritis (PMIE). *J. Equine Vet. Sci.* 34: 128. Doi: 10.1016/j.jevs.2013.10.087
- Miceli V., Pampalone M., Vella S., Carreca A. P., Amico G. und Conaldi P. G. (2019) Comparison of Immunosuppressive and Angiogenic Properties of Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells between 2D and 3D Culture Systems. *Stem Cells Int.* 2019: 7486279. Doi: 10.1155/2019/7486279
- Mishra A., Tummala P., King A., Lee B., Kraus M., Tse V. und Jacobs C. R. (2009) Buffered Platelet-Rich Plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng. Part C Methods.* 15(3): 431–435. Doi: 10.1089/ten.tec.2008.0534
- Mitalipov S. und Wolf D. (2009) Totipotenz, Pluripotenz and Nuclear Reprogramming. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 114: 185–199. Doi: 10.1007/10\_2008\_45
- Miyahara Y., Nagaya N., Kataoka M., Yanagawa B., Tanaka K., Hao H., Ishino K., Ishida H., Shimizu T., Kangawa K., Sano S., Okano T., Kitamura S. und Mori H. (2006) Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat. Med.* 12(4): 459–465. Doi: 10.1038/nm1391
- Moellerberndt J., Hagen A., Niebert S., Büttner K. und Burk J. (2023) Cytokines in equine platelet lysate and related blood products. *Front. Vet. Sci.* 10: 1117829. Doi: 10.3389/fvets.2023.1117829
- Mohammadi S., Nikbakht M., Malek Mohammadi A., Zahed Panah M., Ostadali M. R., Nasiri H. und Ghavamzadeh A. (2016) Human Platelet Lysate as a Xeno Free Alternative of Fetal Bovine Serum for the In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* 10(3): 161-171
- Mojica-Henshaw M. P., Jacobson P., Morris J., Kelley L., Pierce J., Boyer M. und Reems J.-A. (2013) Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy.* 15: 1458–1468. Doi: 10.1016/j.jcyt.2013.06.014
- Montano C., Auletta L., Greco A., Costanza D., Coluccia P., Del Prete C., Meomartino L. und Pasolini M. P. (2021) The Use of Platelet-Rich Plasma for

- Treatment of Tenodesmic Lesions in Horses: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical and Experimental Data. *Animals*. 11: 793.  
Doi: 10.3390/ani11030793
- Monteiro S. O., Lepage O. M. und Theoret C. L. (2009) Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am. J. Vet. Res.* 70(2): 277-82. Doi: 10.2460/ajvr.70.2.277
- Moon M. H., Kim S. Y., Kim Y. J., Kim S. J., Lee J. B., Bae Y. C., Sung S. M. und Jung J. S. (2006) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a Mouse Model of hindlimb ischemia. *Cell. Physiol. Biochem.* 17(5-6): 279-290. Doi: 10.1159/000094140
- Morrison S. (2011) Successful use of allogenic umbilical cord-derived stem cells in nonresponsive chronic laminitic cases. *J. Equine Vet. Sci.* 31: 603.  
Doi: 10.1016/j.jevs.2011.09.053
- Mosser D. M. und Edwards J. P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8(12): 958–969. Doi: 10.1038/nri2448
- Muchedzi T. A. und Roberts S. B. (2017) A systematic review of the effects of platelet rich plasma on outcomes for patients with knee osteoarthritis and following total knee arthroplasty. *Surg.* 16(4), 250–258. Doi: 10.1016/j.surge.2017.08.004
- Mund S. J. K., Kawamura E., Awang-Junaidi A. H., Campbell J., Wobeser B., MacPhee D. J., Honaramooz A. und Barber S. (2020) Homing and Engraftment of Intravenously Administered Equine Cord Blood-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Surgically Created Cutaneous Wound in Horses: A Pilot Project. *Cells*. 9: 1162. Doi: 10.3390/cells9051162
- Naskou M. C., Sumner S. M., Chocallo A., Kemelmakher H., Thoresen M., Copland I., Galipeau J. und Peroni J. F. (2018) Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 9: 75. Doi: 10.1186/s13287-018-0823-3
- Naskou M. C., Sumner S., Berezny A., Copland I. B. und Peroni J. F. (2019) Fibrinogen-Depleted Equine Platelet Lysate Affects the Characteristics and

- Functionality of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 28(23): 1572–1580.  
Doi: 10.1089/scd.2019.0070
- Navarette F., Saravia F., Cisterna G., Rojas F., Silva P. P., Rodríguez-Alvarez L., Rojas D., Cabezas J., Mançanares A. C. F. und Castro F. O. (2020) Assessment of the anti-inflammatory and engraftment potential of horse endometrial and adipose mesenchymal stem cells in an in vivo model of post breeding induced endometritis. *Theriogenology*. 155: 33–42. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.06.010
- Neri S. (2019) Genetic Stability of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications: A Fundamental Biosafety Aspect. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 2406.  
Doi: 10.3390/ijms20102406
- Nicosia R. F., Tcho R. und Leighton J. (1982) Histotypic angiogenesis in vitro: light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies. *In vitro*. 18(6): 538–549.  
Doi: 10.1007/BF02810077
- Nixon A. J., Dahlgren L. A., Haupt J. L., Yeager A. E. und Ward D. L. (2008) Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am. J. Vet. Res.* 69(7): 928–937.  
Doi: 10.2460/ajvr.69.7.928
- Nowak-Sliwinska P., Alitalo K., Allen E., Anisimov A., Aplin A. C., Auerbach R., Augustin H. G., Bates D. O., van Beijnum J. R., Bender R. H. F., Bergers G., Bikfalvi A., Bischoff J., Böck B. C., Brooks P. C., Bussolino F., Cakir B., Carmeliet P., Castranova D., Cimpean A. M., Cleaver O., Coukos G., Davis G. E., De Palma M., Dimberg A., Dings R. P. M., Djonov V., Dudley A. C., Dufton N. P., Fendt S.-M., Ferrara N., Fruttiger M., Fukumura D., Ghesquière B., Gong Y., Griffin R. J., Harris A. L., Hughes C. C. W., Hultgren N. W., Iruela-Arispe M. L., Irving M., Jain R. K., Kalluri R., Kalucka J., Kerbel R. S., Kitajewski J., Klaassen I., Kleinmann H. K., Koolwijk P., Kuczynski E., Kwak B. R., Marien K., Melero-Martin J. M., Munn L. L., Nicosia R. F., Noel A., Nurro J., Olsson A.-K., Petrova T. V., Pietras K., Pili R., Pollard J. W., Post M. J., Quax P. H. A., Rabinovich G. A., Raica M., Randi A. M., Ribatti D., Ruegg C., Schlingemann R. O., Schulte-Merker S., Smith L. E. H., Song J. W., Stacker S. A., Stalin J., Stratman A. N., van de Velde M., van Hinsbergh V. W. M., Vermeulen P. B., Waltenberger J., Weinstein B. M., Xin H., Yetkin-Arik B.,

- Yla-Herttuala S., Yoder M. C. und Griffioen A. W. (2018) Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*. 21(3): 425–532. Doi: 10.1007/s10456-018-9613-x
- Nygaard U. H., Niehues H., Rikken G., Rodijk-Olthuis D., Schalkwijk J. und van den Bogaard E. H. (2015) Antibiotics in cell culture: friend or foe? Suppression of keratinocyte growth and differentiation in monolayer cultures and 3D skin models. *Exp. Dermatol.* 24: 964–965. Doi: 10.1111/exd.12834
- Oikonomopoulos A., van Deen W. K., Manansala A.-R., Lacey P. N., Tomakili T. A., Ziman A. und Hommes D. W. (2015) Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: the effects of animal/xeno-free media. *Sci. rep.* 5: 16570. Doi: 10.1038/srep16570
- Onfelt B., Nedvetzki S., Benninger R. K. P., Purbhoo M. A., Sowinski S., Hume A. N., Seabra M. C., Neil M. A. A., French P. M. W. und Davis D. M. (2006) Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J. Immunol.* 177: 8476–8483. Doi: 10.4049/jimmunol.177.12.8476
- Ortiz L. A., Gambelli F., McBride C., Gaupp D., Baddoo M., Kaminski N. und Phinney D. G. (2003) Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *PNAS*. 100(14): 8407–8411. Doi: 10.1073/pnas.1432929100
- Osbaldiston G. W. (1971) Erythrocyte sedimentation rate studies in sheep, dog and horse. In: Bruner D.W. (eds.), *The Cornell Veterinarian*. 61(3): 386–399
- Oswald J., Boxberger S., Jørgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Bornhäuser M. und Werner C. (2004) Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *Stem Cells*. 22: 377–384. Doi: 10.1634/stemcells.22-3-377
- Pachler K., Lener T., Streif D., Dunai Z. A., Desgeorges A., Feichtner M., Öller M., Schallmoser K., Rohde E. und Gimona M. (2017) A Good Manufacturing Practice-grade standard protocol for exclusively human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles. *Cytotherapy*. 19: 458–472. Doi: 10.1016/j.jcyt.2017.01.001

- Pacini S., Spinabella S., Trombi L., Fazzi R., Galimberti S., Dini F., Carlucci F. und Petrini M. (2007) Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.* 13(12): 2949–2955. Doi: 10.1089/ten.2007.0108
- Paebst F., Piehler D., Brehm W., Heller S., Schroeck C., Tárnok A. und Burk J. (2014) Comparative Immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: An approach toward a standardized definition. *Cytometry A.* 85(8): 678–687. Doi: 10.1002/cyto.22491
- Palombella S., Perucca Orfei C., Castellini G., Gianola S., Lopa S., Mastrogiacomo M., Moretti M. und de Girolamo L. (2022) Systematic review and meta-analysis on the use of human platelet lysate for mesenchymal stem cell cultures: comparison with fetal bovine serum and considerations on the production protocol. *Stem Cell Res. Ther.* 13: 142. Doi: 10.1186/s13287-022-02815-1
- Passeri S., Nocchi F., Lamanna R., Lapi S., Miragliotta V., Giannessi E., Abramo F., Stornelli M. R., Matarazzo M., Plenteda D., Urciuoli P., Scatena F. und Coli A. (2009) Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol. Int.* 33, 100–105. Doi: 10.1016/j.cellbi.2008.10.012
- Pereira R. C. F. D., De La Côte F. D., Brass K. E., Da Silva Azevedo M., Gallio M., Cantarelli C., Dau S. L., Cezar A. S. und Inkelmann M. A. (2019) Evaluation of Three Methods of Platelet-Rich Plasma for Treatment of Equine Distal Limb Skin Wounds. *J. Equine Vet. Sci.* 72: 1–7. Doi: 10.1016/j.jevs.2017.10.009
- Perrone G., Lastra Y., González C., Caggiano N., Giménez R., Pareja R. und de Simone E. (2020) Treatment With Platelet Lysate Inhibits Proteases of Synovial Fluid in Equines With Osteoarthritis. *J. Equine Vet. Sci.* 88: 102952. Doi: 10.1016/j.jevs.2020.102952
- Pezzanite L., Chow L., Griffenhagen G., Dow S. und Goodrich L. (2021) Impact of Three Different Serum Sources on Functional Properties of Equine Mesenchymal Stromal Cells. *Front. Vet. Sci.* 8: 634064. Doi: 10.3389/fvets.2021.634064
- Pfaffl M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): e45. Doi: 10.1093/nar/29.9.e45

- Pilgrim C. R., McCahill K. A., Rops J. G., Dufour J. M., Russell K. A. und Koch T. G. (2022) A Review of Fetal Bovine Serum in the Culture of Mesenchymal Stromal Cells and Potential Alternatives for Veterinary Medicine. *Front. Vet. Sci.* 9: 859025. Doi: 10.3389/fvets.2022.859025
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S. und Marshak D. R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284: 143–147. Doi: 10.1126/science.284.5411.143
- Plotnikov E. Y., Khryapenkova T. G., Vasileva A. K., Marey M. V., Galkina S. I., Isaev N. K., Sheval E. V., Polyakov V. Y., Sukhikh G. T. und Zorov D. B. (2008) Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *J. Cell. Mol. Med.* 12(5A): 1622–1631. Doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00205.x
- Plotnikov E. Y., Khryapenkova T. G., Galkina S. I., Sukhikh G. T. und Zorov D. B. (2010) Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture. *Exp. Cell Res.* 316(15): 2447–2455. Doi: 10.1016/j.yexcr.2010.06.009
- Popov A., Scotchford C., Grant D. und Sottile V. (2019) Impact of Serum Source on Human Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation in Culture. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 5051. Doi: 10.3390/ijms20205051
- Prado A. A. F., Favaron P. O., Da Silva L. C. L. C., Baccarin R. Y. A., Miglino M. A. und Maria D. A. (2015) Characterization of mesenchymal stem cells derived from the equine synovial fluid and membrane. *BMC Vet. Res.* 11: 281. Doi: 10.1186/s12917-015-0531-5
- Prins H.-J., Rozemuller H., Vonk-Griffioen S., Verweij V. G., Dhert W. J., Slaper-Cortenbach I. C. und Martens A. C. (2009) Bone-Forming Capacity of Mesenchymal Stromal Cells When Cultured in the Presence of Human Platelet Lysate as Substitute for Fetal Bovine Serum. *Tissue Eng. Part A.* 15(12): 3741–3751. Doi: 10.1089/ten.TEA.2008.0666
- Prodromos C., Finkle S., Rumschlag T. und Lotus J. (2020) Autologous Mesenchymal Stem Cell Treatment is Consistently Effective for the Treatment of

- Knee Osteoarthritis: The Results of a Systematic Review of Treatment and Comparison to a Placebo Group. *Medicines (Basel)*. 7: 42.  
Doi: 10.3390/medicines7080042
- Quinn C. und Flake A. W. (2008) In vivo Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells: Prenatal and Postnatal Model Systems. *Transfus. Med. Hemotherapy*. 35: 239–247. Doi: 10.1159/000129129
- Raabe O., Shell K., Fietz D., Freitag C., Ohrndorf A., Christ H. J., Wenisch S. und Arnhold S. (2013) Tenogenic differentiation of equine adipose-tissue-derived stem cells under the influence of tensile strain, growth differentiation factors and various oxygen tensions. *Cell Tissue Res*. 352: 509–521. Doi: 1007/s00441-013-1574-1
- Rabani V., Shahsavani M., Gharavi M., Piryaei A., Azhdari Z. und Baharvand H. (2010) Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. *Cell Biol. Int.* 34(6): 601–605. Doi: 10.1042/CBI20090386
- Rady D., Abbass M. M. S., El-Rashidy A. A., El Moshy S., Radwan I. A., Dörfer C. E. und Fawzy El-Sayed K. M. (2020) Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: The Prospect of Human Clinical Translation. *Stem Cells Int.* 2020: 8837654.  
Doi: 10.1155/2020/8837654
- Ranera B., Lyahyai J., Romero A., Vázquez F. J., Remacha A. R., Bernal M. L., Zaragoza P., Rodellar C. und Martín-Burriel I. (2011) Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144(1-2): 147–154. Doi: 10.1016/j.vetimm.2011.06.033
- Raudsepp T. (2021) Chromosomal Analysis. In: Dascanio J. und McCue P. (Hrsg.): *Equine Reproductive Procedures*. Second Edition. Texas: *Wiley*. S.89-95.  
Doi: 10.1002/9781119556015.ch22
- Refolo M. G., D'Alessandro R., Lippolis C., Messa C., Carella N., Cavallini A. und Carr B. I. (2014) Modulation of Doxorubicin mediated growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells by platelet lysates. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 14(8): 1154–1160. Doi: 10.2174/1871520614666140604120226

- Regmi S., Pathak S., Kim J. O., Yong C. S. und Jeong J.-H. (2019) Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. *Eur. J. Cell. Biol.* 98(5-8): 151041. Doi: 10.1016/j.ejcb.2019.04.002
- Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C. J., Bovenkerk J. E., Pell C. L., Johnstone B. H., Considine R. V. und March K. L. (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 109(10): 1292–1298. Doi: 10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1
- Renzi S., Riccò S., Dotti S., Sesso L., Grolli S., Cornali M., Carlin S., Patruno M., Cinotti S. und Ferrari M. (2013) Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: a clinical report. *Res. Vet. Sci.* 95(1): 272–277. Doi: 10.1016/j.rvsc.2013.01.017
- Richardson L. E., Dudhia J., Clegg P. D. und Smith R. (2007) Stem cells in veterinary medicine-attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol.* 25(9): 409–416. Doi: 10.1016/j.tibtech.2007.07.009
- Riehn K., Domel G., Einspanier A., Gottschalk J., Lochmann G., Hildebrandt G., Luy J. und Lücker E. (2011) Schlachtung gravider Rinder – Aspekte der Ethik und des gesundheitlichen Verbraucherschutzes. *Tierärztl. Umsch.* 66: 391–405
- Roemeling-van Rhijn M., de Klein A., Douben H., Pan Q., Van der Laan L. J., IJzermans J. N., Betjes M. G., Baan C. C., Weimar W. und Hoogduijn M. J. (2013) Culture expansion induces non-tumorigenic aneuploidy in adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 15(11): 1352–1361. Doi: 10.1016/j.jcyt.2013.07.004
- Roscher K. (2018) Thrombozyten der Equiden - ein unterschätzter Biomarker. Justus-Liebig-Universität Gießen. *DVG Service GmbH Gießen.* ISBN 978-3-86345-503-3 1. Auflage 2019. Habilitationsschrift
- Rubio-Azpeitia E. und Andia I. (2014) Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles, Ligaments Tendons J.* 4(1): 52-62. Doi: 10.11138/mltj/2014.4.1.052

- Ruifrok A. C. und Johnston D. A. (2001) Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 23(4): 291–299
- Russell K. A. und Koch T. G. (2016) Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture - too much of a good thing? *Equine Vet. J.* 48(2): 261–264. Doi: 10.1111/evj.12440
- Rustom A., Saffrich R., Markovic I., Walther P. und Gerdes H.-H. (2004) Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science.* 303(5660): 1007–1010. Doi: 10.1126/science.1093133
- Sachs U. J. H. und Bux J. (2010) Gewinnung, Herstellung und Lagerung von Blut und Blutkomponenten. In: Kiefel V. und Mueller-Eckhardt C. (Hrsg.), *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, 4. Aufl. Berlin, Heidelberg: *Springer*. S. 223-243. Doi: 10.1007/978-3-642-12765-6\_16
- Schallmoser K., Bartmann C., Rohde E., Reinisch A., Kashofer K., Stadelmeyer E., Drexler C., Lanzer G., Linkesch W. und Strunk D. (2007) Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion.* 47(8): 1436–1446. Doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01220.x
- Schallmoser K., Rohde E., Reinisch A., Bartmann C., Thaler D., Drexler C., Obenauf A. C., Lanzer G., Linkesch W. und Strunk D. (2008) Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum. *Tissue Eng. Part C Methods.* 14(3): 185–196. Doi: 10.1089/ten.tec.2008.0060
- Schallmoser K., Rohde E., Bartmann C., Obenauf A. C., Reinisch A. und Strunk D. (2009) Platelet-derived growth factors for GMP-compliant propagation of mesenchymal stromal cells. *Biomed. Mater. Eng.* 19(4-5): 271–276. Doi: 10.3233/BME-2009-0591
- Schallmoser K., Bartmann C., Rohde E., Bork S., Guelly C., Obenauf A. C., Reinisch A., Horn P., Ho A. D., Strunk D. und Wagner W. (2010) Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar

- under different culture conditions. *Haematologica*. 95(6): 867–874.  
Doi: 10.3324/haematol.2009.011692
- Schallmoser K. und Strunk D. (2013) Generation of a pool of human platelet lysate and efficient use in cell culture. *Methods Mol. Biol.* 946: 349–362.  
Doi: 10.1007/978-1-62703-128-8\_22
- Schallmoser K., Henschler R., Gabriel C., Koh M. B. C. und Burnouf T. (2020) Production and Quality Requirements of Human Platelet Lysate: A Position Statement from the Working Party on Cellular Therapies of the International Society of Blood Transfusion. *Trends Biotechnol.* 38(1): 13–23.  
Doi: 10.1016/j.tibtech.2019.06.002
- Schlosser S., Dennler C., Schweizer R., Eberli D., Stein J. V., Enzmann V., Giovanoli P., Erni D. und Plock J. A. (2012) Paracrine effects of mesenchymal stem cells enhance vascular regeneration in ischemic murine skin. *Microvasc. Res.* 83(3): 267–275. Doi: 10.1016/j.mvr.2012.02.011
- Schubert S., Brehm W., Hillmann A. und Burk J. (2018) Serum-free human MSC medium supports consistency in human but not in equine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cell culture. *Cytometry Part A*. 93(1): 60–72.  
Doi: 10.1002/cyto.a.23240
- Seabright M. (1972a) Human chromosome banding. *Lancet*. 1(7757): 967.  
Doi: 10.1016/s0140-6736(72)91541-3
- Seabright M. (1972b) The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. *Chromosoma*. 36: 204–210.  
Doi: 10.1007/BF00285214
- Selek O., Buluç L., Muezzinoğlu B., Ergün R. E., Ayhan S. und Karaöz E. (2014) Mesenchymal stem cell application improves tendon healing via anti-apoptotic effect (Animal study). *Acta Orthop. Traumatol. Turc.* 48(2): 187–195.  
Doi: 10.3944/AOTT.2014.2985
- Selvaggi T. A., Walker R. E. und Fleisher T. A. (1997) Development of Antibodies to Fetal Calf Serum With Arthus-Like Reactions in Human Immunodeficiency Virus–

- Infected Patients Given Syngeneic Lymphocyte Infusions. *Blood*. 89(3): 776–779.  
Doi: 10.1182/blood.V89.3.776
- Semedo P., Correa-Costa M., Antonio Cenedeze M., Maria Avancini Costa Malheiros D., Antonia dos Reis M., Shimizu M. H., Seguro A. C., Pacheco-Silva A. und Saraiva Camara N. O. (2009) Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem cells*. 27(12): 3063–3073. Doi: 10.1002/stem.214
- Seo J-P., Tsuzuki N., Haneda S., Yamada K., Furuoka H., Tabata Y. und Sasaki N. (2013) Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Res. Vet. Sci*. 95(2): 693–698. Doi: 10.1016/j.rvsc.2013.04.024
- Sherman A. B., Gilger B. C., Berglund A. K. und Schnabel L. V. (2017) Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and stem cell supernatant on equine corneal wound healing in vitro. *Stem Cell Res. Ther*. 8(1): 120.  
Doi: 10.1186/s13287-017-0577-3
- Shi M., Zhang Z., Xu R., Lin H., Fu J., Zou Z., Zhang A., Shi J., Chen L., Lv S., He W., Geng H., Jin L., Liu Z. und Wang F.-S. (2012) Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in acute-on-chronic liver failure patients. *Stem Cells Transl. Med*. 1(10): 725–731. Doi: 10.5966/sctm.2012-0034
- Shigeno Y. und Ashton B. A. (1995) Human bone-cell proliferation in vitro decreases with human donor age. *J. Bone Joint Surg. Br*. 77(1): 139–142.  
Doi: 10.1302/0301-620X.77B1.7822372
- Shih D. T.-B., Chen J.-C., Chen W.-Y., Kuo Y.-P., Su C.-Y. und Burnouf T. (2011) Expansion of adipose tissue mesenchymal stromal progenitors in serum-free medium supplemented with virally inactivated allogeneic human platelet lysate. *Transfusion*. 51(4): 770–778. Doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02915.x
- Singer N. G. und Caplan A. I. (2011) Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu. Rev. Pathol*. 6: 457–478.  
Doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130230

- Smith R. K. W., Korda M., Blunn G. W. und Goodship A. E. (2003) Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet. J.* 35(1): 99–102. Doi: 10.2746/042516403775467388
- Smith R. K. W. (2008) Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil. Rehabil.* 30(20-22): 1752–1758. Doi: 10.1080/09638280701788241
- Smith R. K. W., Werling N. J., Dakin S. G., Alam R., Goodship A. E. und Dudhia J. (2013) Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *PLoS One.* 8(9): e75697. Doi: 10.1371/journal.pone.0075697
- Søndergaard R. H., Follin B., Lund L. D., Juhl M., Ekblond A., Kastrup J. und Haack-Sørensen M. (2016) Senescence and quiescence in adipose-derived stromal cells: Effects of human platelet lysate, fetal bovine serum and hypoxia. *Cytotherapy.* 19(1): 95–106. Doi: 10.1016/j.jcyt.2016.09.006
- Spaas J. H., Gambacurta A., Poletini M., Broeckx S., Van Hoeck F., De Schauwer C., van de Walle G. R. und Van Soom A. (2011) Purification and expansion of stem cells from equine peripheral blood, with clinical applications. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 80: 129–135
- Spaas J. H., Broeckx S., van de Walle G. R. und Poletini M. (2013) The effects of equine peripheral blood stem cells on cutaneous wound healing: a clinical evaluation in four horses. *Clin. Exp. Dermatol.* 38(3): 280–284. Doi: 10.1111/ced.12068
- Spees J. L., Gregory C. A., Singh H., Tucker H. A., Peister A., Lynch P. J., Hsu S.-C., Smith J. und Prockop D. J. (2004) Internalized antigens must be removed to prepare hypoinnogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol. Ther.* 9(5): 747–756. Doi: 10.1016/j.ymthe.2004.02.012
- Spees J. L., Lee R. H. und Gregory C. A. (2016) Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res. Ther.* 7(1): 125. Doi: 10.1186/s13287-016-0363-7

- Squillaro T., Peluso G. und Galderisi U. (2016) Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update. *Cell Transplant.* 25(5): 829–848.  
Doi: 10.3727/096368915X689622
- Stenderup K., Justesen J., Clausen C. und Kassem M. (2003) Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 33(6): 919–926. Doi: 10.1016/j.bone.2003.07.005
- Stewart M. C. und Stewart A. A. (2011) Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 27(2): 243–261. Doi: 10.1016/j.cveq.2011.06.004
- Stokol T. (2020) Hematology Red Flags: The Value of Blood Smear Examination in Horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 36(1): 15–33.  
Doi: 10.1016/j.cveq.2019.11.001
- Strandberg G., Sellberg F., Sommar P., Ronaghi M., Lubenow N., Knutson F. und Berglund D. (2017) Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate. *Transfusion.* 57(4): 1058–1065. Doi: 10.1111/trf.13998
- Strunk D., Lozano M., Marks D. C., Loh Y. S., Gstraunthaler G., Schennach H., Rohde E., Laner-Plamberger S., Öller M., Nystedt J., Lotfi R., Rojewski M., Schrezenmeier H., Bieback K., Schäfer R., Bakchoul T., Waidmann M., Jonsdottir-Buch S. M., Montazeri H., Sigurjonsson O. E., Iudicone P., Fioravanti D., Pierelli L., Introna M., Capelli C., Falanga A., Takanashi M., López-Villar O., Burnouf T., Reems J. A., Pierce J., Preslar A. M. und Schallmoser K. (2018) International Forum on GMP-grade human platelet lysate for cell propagation: summary. *Vox Sang.* 113(1): 80–87. Doi: 10.1111/vox.12593
- Stute N., Holtz K., Bubenheim M., Lange C., Blake F. und Zander A. R. (2004) Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp. Hematol.* 32(12): 1212–1225.  
Doi: 10.1016/j.exphem.2004.09.003
- Suman S., Domingues A., Ratajczak J. und Ratajczak M. Z. (2019) Potential Clinical Applications of Stem Cells in Regenerative Medicine In: Ratajczak M. Z. (eds.)

- Stem Cells, *Advances in Experimental medicine and Biology*, Vol. 1201. Cham: Springer. S.1-22. Doi: 10.1007/978-3-030-31206-0\_1
- Sumner S. M., Naskou M. C., Thoresen M., Copland I. und Peroni J. F. (2017) Platelet lysate obtained via plateletpheresis performed in standing and awake equine donors. *Transfusion*. 57(7): 1755–1762. Doi: 10.1111/trf.14124
- Sundin M., Ringdén O., Sundberg B., Nava S., Götherström C. und Le Blanc K. (2007) No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*. 92(9): 1208–1215. Doi: 10.3324/haematol.11446
- Swamynathan P., Venugopal P., Kannan S., Thej C., Kolkundkar U., Bhagwat S., Ta M., Majumdar S. A. und Balasubramanian S. (2014) Are serum-free and xeno-free culture conditions ideal for large scale clinical grade expansion of Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells? A comparative study. *Stem Cell Res. Ther.* 5(4): 88. Doi: 10.1186/scrt477
- Tan X.-X., Ju H.-Y., Yan W., Jiang H.-J., Su J.-P., Dong H.-J., Wang L.-S. und Zou D.-B. (2016) Autologous platelet lysate local injections for the treatment of refractory lateral epicondylitis. *J. Orthop. Surg. Res.* 11: 17. Doi: 10.1186/s13018-016-0349-2
- Tanchaen W., Aungsuchawan S., Markmee R., Narakornsak S. und Pothacharoen P. (2020) The effects of human platelet lysate versus commercial endothelial growth medium on the endothelial differentiation potential of human amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Heliyon*. 6(9): e04873. Doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04873
- Tao H., Han Z., Han Z. C. und Li Z. (2016) Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem Cells Int.* 2016: 1314709. Doi:10.1155/2016/1314709
- Tesfaigzi Y. und Daheshia M. (2006) CD14 - an overview, in: *Encyclopedia of Respiratory medicine*. Online verfügbar: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/cd14>. (Zuletzt besucht 23.11.2022)

- Textor J. A. und Tablin F. (2012) Activation of equine platelet-rich plasma: comparison of methods and characterization of equine autologous thrombin. *Vet. Surg.* 41(7): 784–794. Doi: 10.1111/j.1532-950X.2012.01016.x
- Textor J. A., Clark K. C., Walker N. J., Aristizobal F. A., Kol A., LeJeune S. S., Bledsoe A., Davidyan A., Gray S. N., Bohannon-Worsley L. K., Woolard K. D. und Borjesson D. L. (2018) Allogeneic Stem Cells Alter Gene Expression and Improve Healing of Distal Limb Wounds in Horses. *Stem Cells Transl. Med.* 7(1): 98–108. Doi: 10.1002/sctm.17-0071
- Thaweessaphithak S., Tantrawatpan C., Kheolamai P., Tantikanlayaporn D., Roytrakul S. und Manochantr S. (2019) Human serum enhances the proliferative capacity and immunomodulatory property of MSCs derived from human placenta and umbilical cord. *Stem Cell Res. Ther.* 10: 79. Doi: 10.1186/s13287-019-1175-3
- Theoret C. L. und Wilmlink J. M. (2013) Aberrant wound healing in the horse: naturally occurring conditions reminiscent of those observed in man. *Wound Repair Regen.* 21(3): 365–371. Doi: 10.1111/wrr.12018
- Thorpe C. T., Clegg P. D. und Birch H. L. (2010) A review of tendon injury: why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? *Equine Vet. J.* 42(2): 174–180. Doi: 10.2746/042516409X480395
- Tonarova P., Lochovska K., Pytlik R. und Hubalek Kalbacova M. (2021) The Impact of Various Culture Conditions on Human Mesenchymal Stromal Cells Metabolism. *Stem Cells Int.* 2021: 6659244. Doi: 10.1155/2021/6659244
- Trento C., Bernardo M. E., Nagler A., Kuçi S., Bornhäuser M., Köhl U., Strunk D., Galleu A., Sanchez-Guijo F., Gaipa G., Introna M., Bukauskas A., Le Blanc K., Apperley J., Roelofs H., van Campenhout A., Beguin Y., Kuball J., Lazzari L., Avanzini M. A., Fibbe W., Chabannon C., Bonini C. und Dazzi F. (2018) Manufacturing Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Graft-versus-Host Disease: A Survey among Centers Affiliated with the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 24(11): 2365–2370. Doi: 10.1016/j.bbmt.2018.07.015

- Trojahn Kølle S.-F., Oliveri R. S., Glovinski P. V., Kirchhoff M., Mathiasen A. B., Elberg J. J., Andersen P. S., Drzewiecki K. T. und Fischer-Nielsen A. (2013) Pooled human platelet lysate versus fetal bovine serum-investigating the proliferation rate, chromosome stability and angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells intended for clinical use. *Cytotherapy*. 15(9): 1086–1097. Doi: 10.1016/j.jcyt.2013.01.217
- Tuakli-Wosornu Y. A., Terry A., Boachie-Adjei K., Harrison J. R., Gribbin C. K., LaSalle E. E., Nguyen J. T., Solomon J. L. und Lutz G. E. (2015) Lumbar Intradiskal Platelet-Rich Plasma (PRP) Injections: A Prospective, Double-Blind, Randomized Controlled Study. *PM&R*. 8(1): 1-10. Doi: 10.1016/j.pmrj.2015.08.010
- Turinetto V., Vitale E. und Giachino C. (2016) Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 17(7): 1164. Doi: 10.3390/ijms17071164
- Tuschong L., Soenen S. L., Blaese R. M., Candotti F. und Muul L. M. (2002) Immune Response to Fetal Calf Serum by Two Adenosine Deaminase-Deficient Patients After T Cell Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* 13(13): 1605–1610. Doi: 10.1089/10430340260201699
- Tyrnenopoulou P., Diakakis N., Karayannopoulou M., Savvas I. und Koliakos G. (2016) Evaluation of intra-articular injection of autologous platelet lysate (PL) in horses with osteoarthritis of the distal interphalangeal joint. *Vet. Q.* 36(2): 56–62. Doi: 10.1080/01652176.2016.1141257
- Usunier B., Benderitter M., Tamarat R. und Chapel A. (2014) Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem Cells Int.* 2014: 340257. Doi: 10.1155/2014/340257
- Vallabhaneni K. C., Haller H. und Dumler I. (2012) Vascular smooth muscle cells initiate proliferation of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes. *Stem Cells Dev.* 21(17): 3104–3113. Doi: 10.1089/scd.2011.0691

- Vallés G., Bensiamar F., Crespo L., Arruebo M., Vilaboa N. und Saldaña L. (2015) Topographical cues regulate the crosstalk between MSCs and macrophages. *Biomaterials*. 37: 124–133. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.028
- Van der Valk J., Mellor D., Brands R., Fischer R., Gruber F., Gstraunthaler G., Hellebrekers L., Hyllner J., Jonker F. H., Prieto P., Thalen M. und Baumans V. (2004) The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol. In Vitro*. 18(1): 1–12. Doi: 10.1016/j.tiv.2003.08.009
- Van der Valk J., Brunner D., De Smet K., Fex Svenningsen A., Honegger P., Knudsen L. E., Lindl T., Noraberg J., Price A., Scarino M. L. und Gstraunthaler G. (2010) Optimization of chemically defined cell culture media - replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol. In Vitro*. 24(4): 1053–1063. Doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.016
- Van der Valk J. und Gstraunthaler G. (2017) Fetal Bovine Serum (FBS) - A Pain in the Dish? *Altern. Lab. Anim*. 45(6): 329–332. Doi: 10.1177/026119291704500611
- Van der Valk J., Bieback K., Buta C., Cochrane B., Dirks W. G., Fu J., Hickman J. J., Hohensee C., Kolar R., Liebsch M., Pistollato F., Schulz M., Thieme D., Weber T., Wiest J., Winkler S. und Gstraunthaler G. (2018) Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*. 35(1): 99–118. Doi: 10.14573/altex.1705101
- Van Zijl W. J. (1948) Blood sedimentation rate in the horse and the cow. *Tijdschr. Diergeneeskd*. 73(13): 485–516
- Verband der Fleischwirtschaft e.V. (2015) Trächtigkeit von Rindern bei der Schlachtung-Ergebnisse einer Verbandserhebung. Online verfügbar: <https://www.v-d-f.de/news/pm-20150908-0023>. (Zuletzt besucht 08.07.2022)
- Viau S., Chabrand L., Eap S., Lorant J., Rouger K., Goudaliez F., Sumian C. und Delorme B. (2017) Pathogen reduction through additive-free short-wave UV light irradiation retains the optimal efficacy of human platelet lysate for the expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 12(8): e0181406. Doi: 10.1371/journal.pone.0181406
- Vidal M. A., Walker N. J., Napoli E. und Borjesson D. L. (2012) Evaluation of Senescence in Mesenchymal Stem Cells Isolated from Equine Bone Marrow,

- Adipose Tissue, and Umbilical Cord Tissue. *Stem Cells Dev.* 21(2): 273–283.  
Doi: 10.1089/scd.2010.0589
- Viswanathan S., Shi Y., Galipeau J., Krampera M., Leblanc K., Martin I., Nolta J., Phinney D. G. und Sensebe L. (2019) Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy.* 21(10): 1019–1024.  
Doi: 10.1016/j.jcyt.2019.08.002
- Voga M., Adamic N., Vengust M. und Majdic G. (2020) Stem Cells in Veterinary Medicine-Current State and Treatment Options. *Front. Vet. Sci.* 7: 278.  
Doi: 10.3389/fvets.2020.00278
- Wagner B., Ainsworth D. M. und Freer H. (2013) Analysis of soluble CD14 and its use as a biomarker in neonatal foals with septicemia and horses with recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 155(1-2): 124–128.  
Doi: 10.1016/j.vetimm.2013.05.018
- Walenda G., Hemeda H., Schneider R. K., Merkel R., Hoffmann B. und Wagner W. (2012) Human platelet lysate gel provides a novel three dimensional-matrix for enhanced culture expansion of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng. Part C Methods.* 18(12): 924–934. Doi: 10.1089/ten.TEC.2011.0541
- Wang M., Su Y., Sun H., Wang T., Yan G., Ran X., Wang F., Cheng T. und Zou Z. (2010) Induced endothelial differentiation of cells from a murine embryonic mesenchymal cell line C3H/10T1/2 by angiogenic factors in vitro. *Differentiation.* 79(1): 21–30. Doi: 10.1016/j.diff.2009.08.002
- Wang M., Yuan Q. und Xie L. (2018) Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells Int.* 2018: 3057624. Doi: 10.1155/2018/3057624
- Wang Y., Cui J., Sun X. und Zhang Y. (2011) Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ.* 18(4): 732–742.  
Doi: 10.1038/cdd.2010.147
- Waselau M., Sutter W. W., Genovese R. L. und Bertone A. L. (2008) Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of

- midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 232(10): 1515–1520. Doi: 10.2460/javma.232.10.1515
- Weber T., Wirths F., Brakebusch N. und van der Valk J. (2021) Reply to comment "Animal welfare and ethics in the collection of fetal blood for the production of fetal bovine serum". *ALTEX*. 38(2): 324–326. Doi: 10.14573/altex.2103191
- Wei X., Yang X., Han Z.-P., Qu F.-F., Shao L. und Shi Y.-F. (2013) Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* 34(6): 747–754. Doi: 10.1038/aps.2013.50
- Wick K. D., Leligdowicz A., Zhuo H., Ware L. B. und Matthay M. A. (2021) Mesenchymal stromal cells reduce evidence of lung injury in patients with ARDS. *JCI insight*. 6(12): e148983. Doi: 10.1172/jci.insight.148983
- Willemsen J. C. N., van Dongen J., Spiekman M., Vermeulen K. M., Harmsen M. C., van der Lei B. und Stevens H. P. J. (2018) The Addition of Platelet-Rich Plasma to Facial Lipofilling: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Trial. *Plast. Reconstr. Surg.* 141(2): 331–343. Doi: 10.1097/PRS.0000000000004081
- Wu Y., Chen L., Scott P. G. und Tredget E. E. (2007) Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells*. 25(10): 2648–2659. Doi: 10.1634/stemcells.2007-0226
- Wu Y., Huang S., Enhe J., Ma K., Yang S., Sun T. und Fu X. (2014) Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *Int. Wound J.* 11(6): 701–710. Doi: 10.1111/iwj.12034
- Wu Y., Peng Y., Gao D., Feng C., Yuan X., Li H., Wang Y., Yang L., Huang S. und Fu X. (2015) Mesenchymal stem cells suppress fibroblast proliferation and reduce skin fibrosis through a TGF- $\beta$ 3-dependent activation. *Int. J. Low. Extrem. Wounds*. 14(1): 50–62. Doi: 10.1177/1534734614568373
- Xuan Z., Yu W., Dou Y. und Wang T. (2020) Efficacy of Platelet-rich Plasma for Low Back Pain: A Systematic Review and Meta-analysis. *J. Neurol. Surg. A Cent. Eur. Neurosurg.* 81(6): 529–534. Doi: 10.1055/s-0040-1709170

- Yamamoto N., Isobe M., Negishi A., Yoshimasu H., Shimokawa H., Ohya K., Amagasa T. und Kasugai S. (2003) Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells. *J. Med. Dent. Sci.* 50: 63–69.
- Yaneselli K., Barrachina L., Remacha A. R., Algorta A., Vitoria A., Cequier A., Romero A., Vázquez F. J., Maisonnave J. und Rodellar C. (2019) Effect of allogeneic platelet lysate on equine bone marrow derived mesenchymal stem cell characteristics, including immunogenic and immunomodulatory gene expression profile. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 217: 109944.  
Doi: 10.1016/j.vetimm.2019.109944
- Yang J., Liu X.-X., Fan H., Tang Q., Shou Z.-X., Zuo D.-M., Zou Z., Xu M., Chen Q.-Y., Peng Y., Deng S.-J. und Liu Y.-J. (2015) Extracellular Vesicles Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Protect against Experimental Colitis via Attenuating Colon Inflammation, Oxidative Stress and Apoptosis. *PLoS One.* 10(10): e0140551. Doi: 10.1371/journal.pone.0140551
- Yang Y.-H. K., Ogando C. R., Wang See C., Chang T.-Y. und Barabino G. A. (2018) Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* 9(1): 131.  
Doi: 10.1186/s13287-018-0876-3
- Yao W., Hu Q., Ma Y., Xiong W., Wu T., Cao J. und Wu D. (2015) Human adipose-derived mesenchymal stem cells repair cisplatin-induced acute kidney injury through antiapoptotic pathways. *Exp. Ther. Med.* 10(2): 468–476.  
Doi: 10.3892/etm.2015.2505
- Yasuda K., Khandare A., Burianovskyy L., Maruyama S., Zhang F., Nasjletti A. und Goligorsky M. S. (2011) Tunneling nanotubes mediate rescue of prematurely senescent endothelial cells by endothelial progenitors: exchange of lysosomal pool. *Aging.* 3(6): 597–608. Doi: 10.18632/aging.100341
- Yin F., Guo L., Meng C.-Y., Liu Y.-J., Lu R.-F., Li P. und Zhou Y.-B. (2014) Transplantation of mesenchymal stem cells exerts anti-apoptotic effects in adult rats after spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Brain Res.* 1561: 1–10.  
Doi: 10.1016/j.brainres.2014.02.047

- Youngstrom D. W., Rajpar I., Kaplan D. L. und Barrett J. G. (2015) A bioreactor system for in vitro tendon differentiation and tendon tissue engineering. *J. Orthop. Res.* 33(6): 911–918. Doi: 10.1002/jor.22848
- Zaman W. S. W. K., Makpol S., Sathapan S. und Chua K. H. (2012) Long-term in vitro expansion of human adipose-derived stem cells showed low risk of tumourigenicity. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 8(1): 67–76. Doi: 10.1002/term.1501
- Zamani M., Yaghoubi Y., Movassaghpour A., Shakouri K., Mehdizadeh A., Pishgahi A. und Yousefi M. (2019) Novel therapeutic approaches in utilizing platelet lysate in regenerative medicine: Are we ready for clinical use? *J. Cell. Physiol.* 234(109): 17172–17186. Doi: 10.1002/jcp.28496
- Zhang Q.-Z., Su W.-R., Shi S.-H., Wilder-Smith P., Xiang A. P., Wong A., Nguyen A. L., Kwon C. W. und Le A. D. (2010) Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem cells.* 28(10): 1856–1868. Doi: 10.1002/stem.503
- Zhang Z., Lin H., Shi M., Xu R., Fu J., Lv J., Chen L., Lv S., Li Y., Yu S., Geng H., Jin L., Lau G. K. K. und Wang F.-S. (2012) Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients. *J Gastroenterol. Hepatol.* 27 Suppl 2: 112–120. Doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.07024.x
- Zheng X., Baker H., Hancock W. S., Fawaz F., McCaman M. und Pungor E. (2006) Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnol. Prog.* 22(5): 1294–1300. Doi: 10.1021/bp060121o
- Zhou Y., Xu H., Xu W., Wang B., Wu H. Tao Y., Zhang B., Wang M., Mao F., Yan Y., Gao S., Gu H., Zhu W. and Qian H (2013) Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* 4(2): 34. Doi: 10.1186/scrt194

Zuffova K., Krisova S. und Zert Z. (2013) Platelet rich plasma treatment of superficial digital flexor tendon lesions in racing Thoroughbreds. *Vet Med (Praha)*. 58(4): 230–239. Doi: 10.17221/6761-VETMED

## 8.1 Zitierte Rechtstexte

Embryonenschutzgesetz (ESchG) vom 13. Dezember 1990 (BGBl. I S. 2746), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 21. November 2011 (BGBl. I S. 2228) geändert worden ist. Bundesministerium der Justiz. §1(1)2. u. (2) Online verfügbar: <https://www.gesetze-im-internet.de/eschg/BJNR027460990.html>. (Zuletzt besucht 05.07.2022)

Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components (2020) Technical Report. European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare of the Council of Europe (EDQM). ISBN: 978-92-871-8644-7. Online verfügbar: <https://www.quotidianosanita.it/allegati/allegato8291904.pdf> (Zuletzt besucht 30.11.2022)

Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products (2013) Technical Report. European Medicines Agency (EMA) EMA/CHMP/BWP/457920/2012 rev 1. Committee for Medicinal Products for Human Use. Online verfügbar: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-use-bovine-serum-manufacture-human-biological-medicinal-products-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-use-bovine-serum-manufacture-human-biological-medicinal-products-revision-1_en.pdf) (Zuletzt besucht 12.01.2023)

Leitlinien zur Gewinnung, Lagerung, Transport und Verabreichung von Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich (2011) Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Online verfügbar: [https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/05\\_Tierarzneimittel/Leitlinien\\_blutprodukte.pdf?\\_blob=publicationFile&v=5](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/05_Tierarzneimittel/Leitlinien_blutprodukte.pdf?_blob=publicationFile&v=5) (Zuletzt besucht 25.11.2022)

The European Pharmacopoeia 10.0 (2019) European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare of the Council of Europe (EDQM) ISBN: 978-92-871-8912-7.

Tiererzeugnisse-Handels-Verbotsgesetz (TierErzHaVerbG) vom 8.Dezember 2008 (BGBl. I S.2394), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 24 des Gesetzes vom 20. Dezember 2022 (BGBl. I S. 2752) geändert worden ist. Gesetz zur Durchführung unionsrechtlicher Vorschriften über Verbote und Beschränkungen hinsichtlich des Handels mit bestimmten tierischen Erzeugnissen sowie zu Haltungs- und Abgabeverboten in bestimmten Fällen (2008). Bundesministerium der Justiz. Abschnitt 3, §4. Online verfügbar: <https://www.gesetze-im-internet.de/khfeverbG/TierErzHaVerbG.pdf>. (Zuletzt besucht 08.07. 2022)

Tierschutz-Schlachtverordnung (TierSchlV) Verordnung zum Schutz von Tieren im Zusammenhang mit der Schlachtung oder Tötung und zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1099/2009 des Rates vom 20.12.2012 (BGBl. I S.2982). Abschnitt 4 §11-13; Anlage 1. Online verfügbar: [https://www.gesetze-im-internet.de/tierschlV\\_2013/BJNR298200012.html](https://www.gesetze-im-internet.de/tierschlV_2013/BJNR298200012.html) (Zuletzt besucht 08.07.2022)

Verordnung (EG) Nr. 1/2005 (Tierschutztransportverordnung), des Rates vom 22. Dezember 2004 über den Schutz von Tieren beim Transport und damit zusammenhängenden Vorgängen sowie zur Änderung der Richtlinien 64/432/EWG und 93/119/EG und der Verordnung (EG) Nr. 1255/97. Amtsblatt der Europäischen Union (2005). Anhang I Kapitel I Nr. 2. Online verfügbar: [https://www.vetmeduni.ac.at/fileadmin/\\_migrated/content\\_uploads/VO\\_EG\\_Nr\\_\\_1\\_2005.pdf](https://www.vetmeduni.ac.at/fileadmin/_migrated/content_uploads/VO_EG_Nr__1_2005.pdf) (Zuletzt besucht 08.07.2022)

Verordnung (EG) Nr. 1394/2007 des europäischen Parlaments und des Rates vom 13. November 2007 über Arzneimittel für neuartige Therapien und zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004. Online verfügbar: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1394& from=DE> (Zuletzt besucht 22.04.2023)

World Health Organization (2006) WHO Guidelines on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies. Online verfügbar: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43498/9789241547017-eng.pdf> (Zuletzt besucht 10.07.2022)

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt haben:

- Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. Janina Burk, die mir die Dissertation zu diesem interessanten Forschungsbereich ermöglicht und mich zu jeder Zeit mit Rat und Tat unterstützt hat. Bei personellem Engpass stand sie mir sogar selbst nachts im Labor zur Seite. Eine bessere und kompetentere Betreuung hätte ich mir nicht vorstellen können.
- Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Burk, die stets für mich da waren und immer ein offenes Ohr für einen fachlichen Austausch oder eine helfende Hand im Labor für mich hatten, möchte ich danken. Besonders erwähnen möchte ich hier Michaela Melzer und Julia Möllerberndt, die ich durch ihre tatkräftige Unterstützung zu allen Tages- und Nachtzeiten nicht nur als kompetente Kolleginnen sondern auch als Freundinnen schätzen gelernt habe. Auch Dr. Sabine Niebert und Hannelore Falkenstein danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der PCR.
- Meiner ehemaligen Kollegin Dr. Carla Doll und ihrem Vater Dr. Matthias Lechner-Doll danke ich für die Unterstützung bei der Beschaffung von Probenmaterial.
- Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Hendrik Lehmann, der mich bei der ePL-Herstellung unterstützte, neue Denkanstöße lieferte und durch den ich einen großen Kenntnissgewinn in der Herstellung von Blutprodukten erlangen konnte.
- Dr. Christiane Schnabel danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Durchflusszytometrie.
- Des Weiteren danke ich Dr. Heidrun Holland und ihrem Team für die Durchführung der Karyotypisierung der MSC.
- Für die anfängliche Bereitstellung der Laborräumlichkeiten und der Geräte für die Zellkultur sowie auch der fachlichen Unterstützung bedanke ich mich bei Prof. Carsten Staszzyk und den Mitarbeitern des veterinär-anatomischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Vielen Dank an die Akademie für Tiergesundheit, die mich finanziell mit einem Promotionsstipendium unterstützte.
- Abschließend möchte ich Sven und meiner lieben Familie danken, die in allen Lebenslagen für mich da waren, die nie an mir gezweifelt und mich wo immer möglich liebevoll unterstützt haben.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978 3 8359 7155 4



9 17838351971554