

Alexandra Schulz
Dr. med.

Humane Alternativen zum Standardsupplement fötales Kälberserum bei der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe

Fach/Einrichtung: Chirurgie
Doktorvater: Professor Dr. med Günter Germann

Mesenchymale Stammzellen aus humanem Fettgewebe besitzen die Fähigkeit der Selbsterneuerung und können sich zu Zellen unterschiedlichster Gewebe differenzieren. Des Weiteren besitzen sie ein immunmodulatorisches Potenzial und sind in der Lage verschiedene Wachstumsfaktoren zu sezernieren. Ihre Gewinnung erfolgt minimalinvasiv und risikoarm. Dies macht sie für die Regeneration von defektem Gewebe, die Therapie von Graft-versus-Host-Reaktionen, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen interessant.

In der Zellkultur von mesenchymalen Stammzellen enthalten herkömmliche Expansionsmedien sowie Medien für die adipogene und osteogene Differenzierung fötales Kälberserum. Dies ist reich an Komponenten wie Hormonen und Wachstumsfaktoren, welche wichtig für Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Reifung und Stoffwechsel sind. Zusätzlich besteht jedoch das Risiko einer Kontamination mit Viren, Bakterien, Mykoplasmen, Endotoxinen, Pilzen, Prionen und Immunglobulinen. Eine solche Kontamination kann bei einer späteren klinischen Anwendung *in vivo* zu Entzündungen, allergischen Reaktionen und schwerwiegenden Erkrankungen führen. Aufgrund dessen ist eine Kultivierung sowie Differenzierung frei von fötalem Kälberserum wünschenswert. Mögliche humane Alternativen zu fötalem Kälberserum sind autologes oder allogenes Humanserum, humanes Plasma, Nabelschnurblutserum oder humane Plättchenderivate wie Plättchenlysat. Eine weitere Möglichkeit um ohne fötales Kälberserum zu arbeiten, besteht in der serumfreien Zellkultur.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Humanserum, Humanserum von plättchenarmem Plasma und plättchenreiches Plasma als Mediumzusätze an Stelle von fötalem Kälberserum geeignet sind. Dies wurde sowohl für die Expansion als auch für die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung überprüft.

Es wurden mesenchymale Stammzellen von acht Spendern aus Fettgewebsaspirat isoliert, bis Passage 4 kultiviert und anschließend adipogen, osteogen und chondrogen differenziert. Als Expansionsmedium diente Verfaillie-Medium mit Zusatz von fötalem Kälberserum oder einer humanen Alternative. Als humane Alternativen wurde Humanserum, plättchenarmes Plasma

und plättchenreiches Plasma genutzt. Fötale Kälberserum und Humanserum wurden ohne oder mit den Wachstumsfaktoren EGF und PDGF-BB kombiniert. Folgende Kombinationen wurden somit für die Expansion getestet: Verfaillie + fötales Kälberserum + Wachstumsfaktoren / Verfaillie + fötales Kälberserum ohne Wachstumsfaktoren / Verfaillie + Humanserum + Wachstumsfaktoren / Verfaillie + Humanserum ohne Wachstumsfaktoren / Verfaillie + plättchenarmes Plasma ohne Wachstumsfaktoren / Verfaillie + plättchenreiches Plasma ohne Wachstumsfaktoren. Für das adipogene und osteogene Differenzierungsmedium wurde entweder fötales Kälberserum, Humanserum oder plättchenreiches Plasma genutzt. Die chondrogene Differenzierung erfolgte serumfrei. Die Zellen, die zuvor in den unterschiedlichen Zellkulturmedien expandiert wurden, wurden einzeln chondrogen differenziert. Die Proliferationsgeschwindigkeiten sowie die Differenzierungsfähigkeit der mesenchymalen Stammzellen in den unterschiedlichen Medien wurden verglichen.

Die von der International Society for Cellular Therapy empfohlenen minimalen Kriterien zur Definition von mesenchymalen Stammzellen wurden von den in dieser Arbeit kultivierten Zellen aus allen Medien erfüllt. Es wurden keine Veränderungen des Phänotyps unter den verschiedenen Mediumzusätzen beobachtet.

Die kürzeste Generationszeit wiesen die mesenchymalen Stammzellen in Verfaillie + plättchenreiches Plasma auf. Signifikante Unterschiede bestanden zu den Generationszeiten der mesenchymalen Stammzellen aus den anderen Medien ohne Wachstumsfaktoren. Zu Verfaillie + fötales Kälberserum + Wachstumsfaktoren und Verfaillie + Humanserum + Wachstumsfaktoren bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die höhere Proliferationsgeschwindigkeit unter plättchenreichem Plasma konnte durch die erhöhten Zytokinkonzentrationen, insbesondere von PDGF, EGF und bFGF, erklärt werden.

Die beste adipogene Differenzierbarkeit zeigten die mesenchymalen Stammzellen aus Verfaillie + Humanserum + Wachstumsfaktoren, die schlechteste die aus Verfaillie + plättchenreiches Plasma. Hohe Konzentrationen an PDGF, EGF, bFGF und TGF- β wirkten sich negativ auf die Adipogenese aus.

Es konnte gezeigt werden, dass Medium mit plättchenreichem Plasma für die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe besser geeignet ist als Medium mit fötalem Kälberserum + Wachstumsfaktoren. Dies galt nicht für Humanserum + Wachstumsfaktoren. Verschiedene Konzentrationen an TNF- α , TGF- β 1, EGF und bFGF waren für die Unterschiede verantwortlich. Hohe Konzentrationen dieser Zytokine in plättchenreichem Plasma führten zu einer Verbesserung der osteogenen Differenzierbarkeit.

Die Expansion der mesenchymalen Stammzellen in Verfaillie + plättchenreiches Plasma oder Verfaillie + Humanserum + Wachstumsfaktoren führte zu einer verbesserten chondrogenen Differenzierbarkeit im Vergleich zur Expansion in Verfaillie + fötales Kälberserum + Wachstumsfaktoren. Plättchenreiches Plasma war Humanserum + Wachstumsfaktoren überlegen. Hierfür waren die kürzere Generationszeit und die höheren Konzentrationen an bFGF und TGF- β während der Expansion verantwortlich.

Es konnte somit geschlussfolgert werden, dass humane Alternativen (Humanserum und plättchenreiches Plasma) als Supplemente in der Zellkultur von mesenchymalen Stammzellen aus humanem Fettgewebe genauso gut bzw. besser geeignet sind als fötales Kälberserum. Die Wahl des passenden Supplements sollte je nach Differenzierungsvorhaben bzw. geplantem klinischen Einsatzgebiet getroffen werden.