

Zellkultur-Überwachung

On-line-pH- und -DO-Messungen in Mikrocarrier-basierter hMSC-Kultur

VALENTIN JOSSEN¹, CARMEN SCHIRMAIER¹, GERNOT T. JOHN², DIETER EIBL¹, REGINE EIBL¹

¹ DEPARTMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT, INSTITUT FÜR BIOTECHNOLOGIE, ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN, WÄDENSWIL, SCHWEIZ

² PRESENS PRECISION SENSING GMBH, REGENSBURG

Spinner flasks are often used for microcarrier-based cultivations of human mesenchymal stem cells (hMSCs). Normally, they are not equipped with pH and dissolved oxygen (DO) probes. This application note describes the cultivation of hMSCs in single-use spinner flasks equipped with optical pH (SP-HP8) and DO (SP-PSt3) sensors for the first time. While reaching peak cell numbers between 4.1×10^7 cells and 5.9×10^7 cells in two cultivation runs, reliable DO and pH data were delivered.

DOI: 10.1007/s12268-015-0597-4
© Springer-Verlag 2015

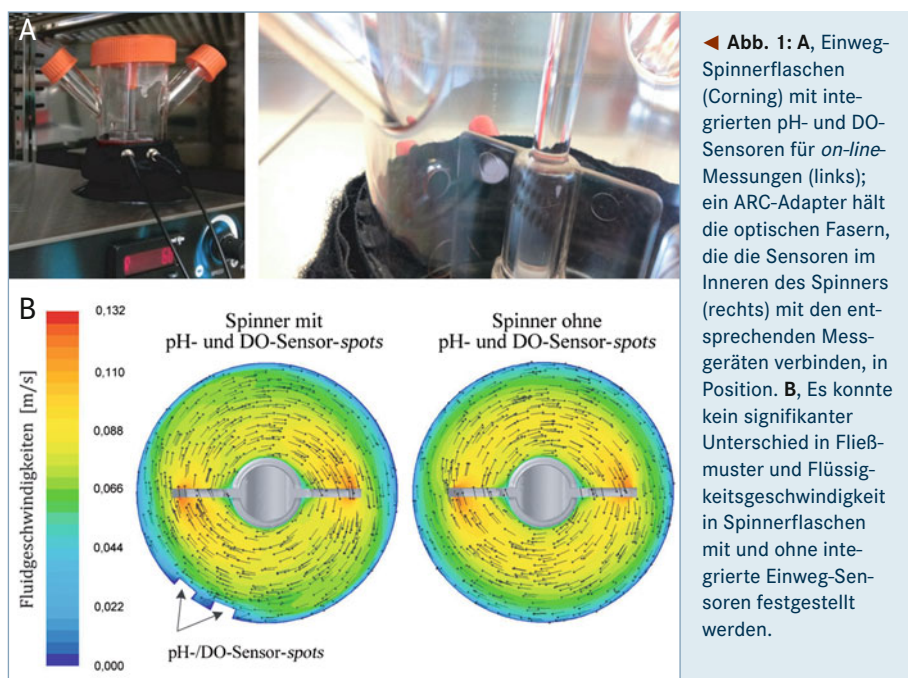
Einweg-Spinnerflaschen haben sich in den letzten Jahren für die Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) im Milliliter-Maßstab etabliert [1–3]. Scree-

nings für Zellkulturmedien, verschiedene Mikrocarrier-Typen und Prozessparameter können in diesen Kulturgefäßen schnell und einfach durchgeführt werden [4]. Spinnerfla-

schen werden allerdings nicht standardmäßig für die Kultivierung von hMSCs eingesetzt, da sie keine Echtzeit-Überwachung von Schlüsselparametern zulassen, welche die Kulturergebnisse stark beeinflussen können. Die hier aufgeführte Studie untersuchte die Verlässlichkeit von Gelöst-Sauerstoff (DO) und pH-Werten, die *on-line* mit optischen Sensoren (PreSens GmbH) während einer Mikrocarrier-basierten Expansion von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe (hADSCs) gemessen wurden. Die Sensoren, in Form kleiner und flacher *Sensor-spots*, wurden an der Innenwand eines 125-Milliliter-Spinners (Corning) angebracht. Die optischen Fasern zum Auslesen der Sensoren wurden dann an der Außenwand gegenüber von den *Sensor-spots* mit einem ARC-Adapter fixiert und mit einem pH- und Sauerstoffmeter (pH-1 mini, OXY-4 mini, PreSens GmbH) verbunden (**Abb. 1A**). Es muss erwähnt werden, dass konventionelle Elektroden nicht in den verwendeten Spinners eingesetzt werden können, da zwischen dem Rührer und der Reaktorwand nicht ausreichend Platz vorhanden ist. Die winzigen Abmessungen der *Sensor-spots* sind hier von Vorteil. Darüber hinaus stören oder verändern die Einweg-Sensoren das Fließverhalten des Kulturmediums im Spinner nicht (**Abb. 1B**).

Material und Methoden

Die Kultivierungsuntersuchungen wurden mit hADSCs (zweite Passage) eines einzelnen Spenders durchgeführt, der zuvor informiert worden war und zugestimmt hat. Die Zellen wurden von der Lonza Cologne GmbH zur Verfügung gestellt und mit kommerziell erwerblichen Polystyrol-Mikrocarrieren in einem speziell entwickelten Serum-reduzierten Medium (5 % fetales Kälberserum, FBS) kultiviert. Parallel zu den überwachten Spinners wurden Standard-Spinnerflaschen (Kontrollspinner), in denen keine *Sensor-spots* angebracht waren, als Kontrolle verwendet. Entsprechend dem Messintervall wurden aus den Kontrollspinners



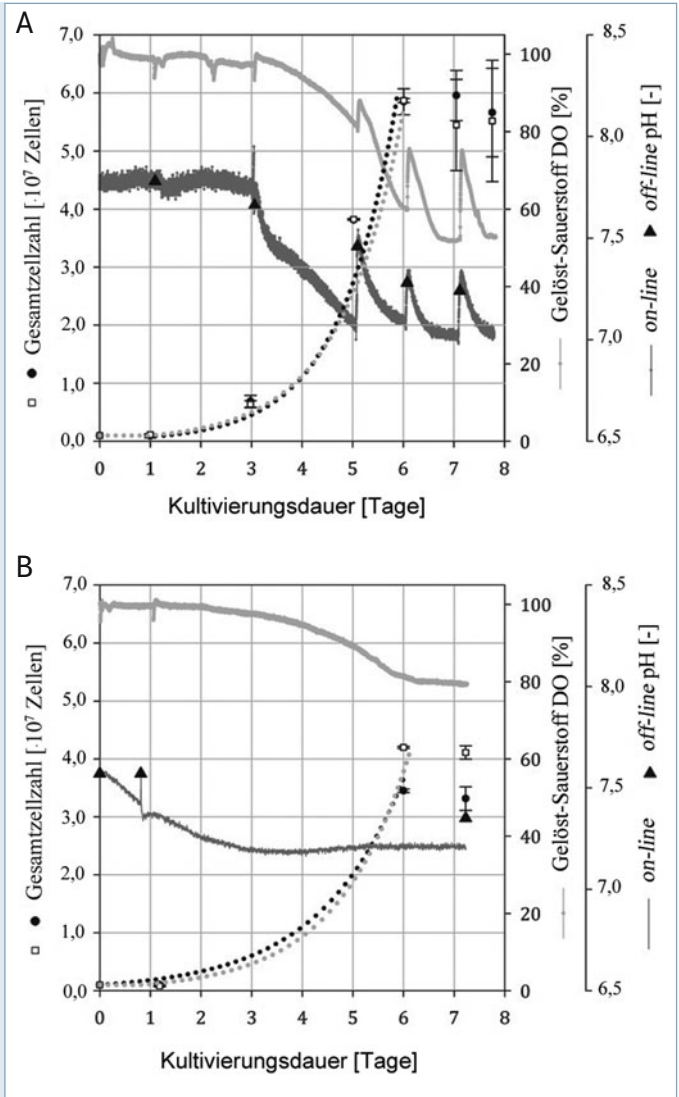
Proben für *off-line*-Analysen entnommen. Vor dem Inokulieren der Kultivierungssysteme mit Zellen wurde ein Gramm der Polystyrol-Mikrocarrier (Wachstumsfläche: 360 cm²) in den Spinner gegeben. Daraufhin wurde Serum-reduziertes, vorgewärmtes Kulturmedium hinzugefügt, bis ein Arbeitsvolumen von 115 Millilitern erreicht wurde. Die Mikrocarrier-Medium-Suspension wurde für drei Stunden gerührt, um sowohl das Medium als auch die Sensoren zu equilibrieren. Danach wurden die pH- und DO-Sensoren kalibriert und die Spinner mit 1×10^6 hADSCs inokuliert. Während der ersten Stunde nach der Inokulation wurden die Spinner nicht gerührt, um ein Adhären der Zellen auf den Mikrocarriern zu ermöglichen. Anschließend wurden die hADSCs bei 60 rpm, 37 °C, 80 Prozent Luftfeuchtigkeit und fünf Prozent CO₂ für sieben bis acht Tage kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Probenahme durchgeführt, um die Zelldichte (Dreifachmessung) mit dem NucleoCounter NC-100 (ChemoMetec) zu bestimmen. Für die Messung des Glukose- und Laktatgehalts wurde das Cedex Bio (Roche Diagnostics) verwendet. Zusätzlich wurde der pH-Wert *off-line* gemessen (Mettler Toledo). Der *on-line*-pH-Sensor wurde rekaliert, wenn die *off-line*-pH-Werte eine Abweichung von mehr als pH 0,1 zeigten.

Stammzellkultur in Spinnerflaschen

In **Abbildung 2** sind die zeitabhängigen Profile der absoluten Zellzahl und der pH- (*on-line/off-line*) sowie DO-Messungen von zwei unabhängigen hADSC-Kultivierungen dargestellt. Bei allen Kultivierungen wurde eine Adaptionsphase (Lag-Phase) von einem Tag beobachtet. Im ersten Kulturdurchgang wurde im optischen Spinner eine maximale Zellzahl von $5,95 \times 10^7$ hADSCs am siebten Tag erreicht. Im Kontrollspinner war die maximale Zellzahl mit $5,84 \times 10^7$ hADSCs am Tag 6 am höchsten (**Abb. 2A**). Die simulierten Wachstumskurven zeigen in beiden Spinnerflaschen ein vergleichbares Zellwachstum innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase. Die Zellen vermehrten sich mit einer mittleren Wachstumsrate (μ) von 0,83 pro Tag (Verdopplungszeit: 20,1 Stunden), was in guter Übereinstimmung zu früheren Untersuchungen war [4]. Das Zellwachstum wurde nur durch die verfügbare Mikrocarrier-Oberfläche beschränkt.

In der Kultivierung 1 (**Abb. 2A**) sank die DO-Konzentration von 100 auf 52 Prozent ab,

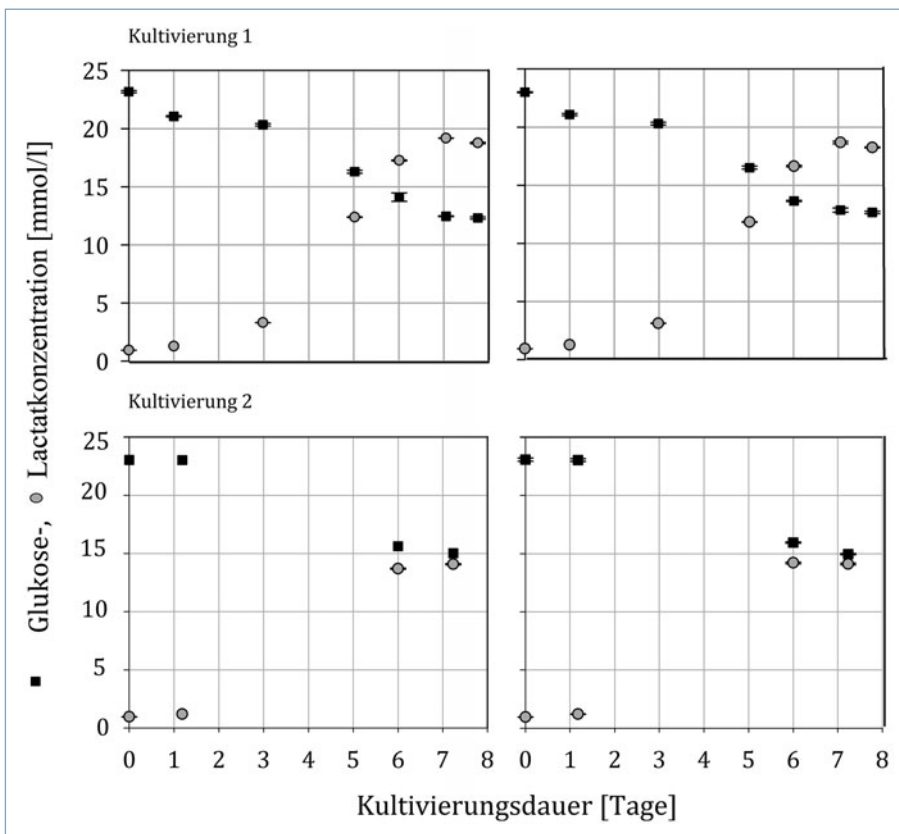
► **Abb. 2:** Zeitabhängiges Profil der absoluten Zellzahl, pH- (*on-line/off-line*) und DO-Messungen zweier unabhängiger durchgeführter Kulturen von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe (hADSC): **A**, Kultivierung 1; **B**, Kultivierung 2. Die dargestellten Zellzahlen für den optischen (●) und den Kontrollspinner (□) basieren auf Dreifachmessung mit NucleoCounter NC-100 (ChemoMetec; Standardabweichung der Dreifachmessung als Balken abgebildet). Die Kurven zwischen den gemessenen Gesamtzellzahlen (gepunktete Linien) des optischen (schwarz) und des Kontrollspinners (grau) wurden simuliert und basieren auf der berechneten spezifischen Wachstumsrate (μ). Proben wurden in der Kultur 1 an den Tagen 0, 1, 3 und 5–8 genommen, in der Kultur 2 an den Tagen 0, 1 und 7.



wobei ein spezifischer Sauerstoffverbrauch (q_{O_2}) von $4,7 \times 10^{-17}$ mol s⁻¹ pro Zelle errechnet wurde. Verglichen mit Literaturdaten ($2,50 \times 10^{-17}$ [5] bis $2,5 \times 10^{-18}$ mol s⁻¹ [6]) lag der errechnete Sauerstoffverbrauch der hMSCs im typischen Bereich. Die *on-line*-Messungen zeigten, dass die Probenahmen an den Tagen 3, 5, 6, 7 und 8 einen starken Einfluss auf das Kultursystem hatten. Der Gasaustausch intensivierte sich während der Probeentnahme, was in ansteigenden DO- und pH-Werten (Signalaussschläge) resultierte. Aber auch die *off-line*-pH-Messungen zeigten ähnliche Werte wie die *on-line*-Messungen, mit einer mittleren Abweichung von unter zwei Prozent. Diese kleine Abweichung zeigt, dass die optischen pH-Sensoren im Spinner zuverlässige Messwerte liefern, wohingegen die Probenahme immer zu einer Störung des Systems führt.

In Kultur 2 (**Abb. 2B**) wurde die Probeentnahme auf die Tage 0, 1 und 7 reduziert, um

den Gasaustausch während der Probeentnahme gering zu halten. Aufgrund dessen wurden glattere Signalkurven, ohne plötzliche Ausschläge, für die DO- und pH-Werte erhalten. Die erreichten maximalen Zellzahlen der zweiten Kultivierung ($3,45 \times 10^7$ Zellen im optischen Spinner und $4,11 \times 10^7$ Zellen im Kontrollspinner) lagen 29 bis 42 Prozent niedriger als bei der ersten. Dennoch wurde ein vergleichbares Zellwachstum mit einer Wachstumsrate (μ) von 0,65 pro Tag (Verdopplungszeit: 25,6 Stunden) für den optischen als auch den Kontrollspinner erhalten. Das verringerte Zellwachstum zeigte sich auch deutlich in den DO-Messungen, mit einer Abnahme der DO-Konzentration von nur 21 Prozent (von 100 auf 79 Prozent DO). Basierend auf der ermittelten spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate (q_{O_2}) der ersten Kultivierung, konnte die Zellzahl der zweiten Kultivierung mit $4,14 \times 10^7$ Zellen simuliert und vorhergesagt werden.



▲ **Abb. 3:** Zeitabhängiges Profil der Glukose- und Laktatkonzentrationen zweier unabhängig durchgeführter Kulturen humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe (hADSC; links: optischer Spinner, rechts: Kontrollspinner).

Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass *on-line*-DO-Messungen dazu verwendet werden können, um das Zellwachstum in Spinnerflaschen zu analysieren und vorherzusagen. Die *on-line* gemessenen pH-Werte lassen darauf schließen, dass der reduzierte Gasaustausch ein rapides Absinken des pH-Wertes nach Inokulation zur Folge hatte, was das Zellwachstum behindern könnte. Die errechneten mittleren substratspezifischen Erträge lagen zwischen $1,544 \pm 0,005$ und $1,873 \pm 0,001$ Millimol Laktat pro Millimol Glukose beziehungsweise zwischen $4,61 \pm 0,42$ und $7,94 \pm 0,27$ Zellen pro Milli-

mol Glukose. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit den zeitabhängigen Substratkurven (**Abb. 3**). In unserer Anwendung konnten wir zeigen, dass *on-line*-pH- und -DO-Messungen mit optischen Sensoren von PreSens es ermöglichen, akkurate und verlässliche Werte für diese beiden Schlüsselparameter in Zellkultur zu erhalten. Damit werden Probenahmen vermindert, welche eine Störung des Systems nach sich ziehen.

Danksagung

Wir danken dem Team von Dr. Christian van den Bos von der Lonza Cologne GmbH (Deutschland) für die Bereitstellung der Zel-

len, Mikrocarrier und Kulturmedien und natürlich auch für Beratung und Erfahrungsaustausch. ■

Literatur

- [1] Schop D, Janssen FW, Borgart E et al. (2008) Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. *J Tissue Eng Regen Med* 4:126–135
- [2] Kaiser SC, Jossen V, Schirmaier C et al. (2013) Investigations of fluid flow and cell proliferation of mesenchymal adipose-derived stem cells in small-scale, stirred, single-use bioreactors. *Chem Ing Tech* 85:95–102
- [3] Hewitt CJ, Lee K, Nienow AW et al. (2011) Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Biotechnol Lett* 33:2325–2335
- [4] Schirmaier C, Jossen V, Kaiser SC et al. (2014) Scale-up of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell production in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions. *Eng Life Sci* 14:292–303
- [5] Godara P, McFarland CD, Nordon RE (2008) Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. *J Chem Tech Biotechnol* 420:408–420
- [6] Rafiq QA, Brosnan KM, Coopman K et al. (2013) Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. *Biotechnol Lett* 35:1233–1245



Valentin Jossen, Carmen Schirmaier, Gernot T. John, Dieter Eibl und Regine Eibl (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Dr. Gernot John
PreSens Precision Sensing GmbH
Josef-Engert-Straße 11
D-93053 Regensburg
Tel.: 0941-942-72-100
Fax: 0941-942-72-111
g.john@presens.de
www.presens.de