

AUS DER CHIRURGISCHEN TIERKLINIK
DER VETERINÄRMEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT LEIPZIG

KLINISCHE ANWENDUNG UND VERGLEICHENDE CHARAKTERISIERUNG
EQUINER MESENCHYMALER STROMAZELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES
DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE (DR. MED. VET.)
DURCH DIE VETERINÄRMEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT LEIPZIG

EINGEREICHT VON
JANINA BURK
AUS BAD NAUHEIM

LEIPZIG, 2012

MIT GENEHMIGUNG DER VETERINÄRMEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT LEIPZIG

DEKAN: PROF. DR. UWE TRUYEN

BETREUER: PROF. DR. WALTER BREHM

GUTACHTER: PROF. DR. WALTER BREHM
CHIRURGISCHE TIERKLINIK
VETERINÄRMEDIZINISCHE FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT LEIPZIG

PROF. DR. LUTZ-FERDINAND LITZKE
KLINIK FÜR PFERDE
JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIEßEN

TAG DER VERTEIDIGUNG: 06.11.2012

DIESE ARBEIT WURDE UNTERSTÜTZT DURCH PROMOTIONSSTIPENDIEN

DER

AKADEMIE FÜR TIERGESUNDHEIT E.V. (2009-2010)

UND DER

STUDIENSTIFTUNG DES DEUTSCHEN VOLKES (2010-2012).

MEINEN ELTERN.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungen..... | I |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Hypothesen..... | 6 |
| 3 Ziele..... | 6 |
| 4 Publikationen..... | 7 |
| 4.1 Publikation 1 (Klinische Anwendung equiner MSCs) | 7 |
| 4.2 Publikation 2 (Vergleichende Charakterisierung equiner MSCs) | 24 |
| 5 Diskussion..... | 52 |
| 5.1 Reflexion von Material und Methoden..... | 52 |
| 5.2.1 Publikation 1..... | 52 |
| 5.2.2 Publikation 2..... | 54 |
| 5.2 Klinische Anwendung von MSCs zur Behandlung von Sehnenerkrankungen beim Pferd..... | 60 |
| 5.3 Vergleichende in-vitro-Charakterisierung equiner MSCs aus verschiedenen Gewebequellen | 65 |
| 5.4 Eignung von MSCs aus verschiedenen Quellen für die Behandlung von Sehnenerkrankungen.. | 68 |
| 5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick | 73 |
| 6 Zusammenfassung | 75 |
| 7 Summary | 77 |
| 8 Literaturverzeichnis..... | 79 |
| 9 Danksagung..... | 89 |

ABKÜRZUNGEN

| | | |
|---------------|----------|--|
| Rahmentext | MSC(s) | Multipotente mesenchymale Stromazelle(n) |
| | FCS | Fötales Kälberserum |
| | MTS | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium |
| | MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid |
| Publikation 1 | MSC(s) | Multipotente mesenchymale Stromazelle(n) |
| | OBS | Oberflächliche Beugesehne |
| | FT | Fesselträger |
| Publikation 2 | MSC(s) | Multipotent mesenchymal stromal cell(s) |
| | BM | Bone marrow |
| | BM-MSCs | Bone marrow derived MSCs |
| | AdT | Adipose tissue |
| | Ad-MSCs | Adipose tissue derived MSCs |
| | UCB | Umbilical cord blood |
| | UCB-MSCs | Umbilical cord blood derived MSCs |
| | UCT | Umbilical cord tissue |
| | UCT-MSCs | Umbilical cord tissue derived MSCs |
| | TdT | Tendon tissue |
| | Td-MSCs | Tendon derived MSCs |
| | PBS | Phosphate buffered saline |
| | MNC(s) | Mononuclear cell(s) |
| | DMEM | Dulbecco's modified eagle medium |
| | FBS | Fetal bovine serum |
| | GT | Generation time |
| | PD | Population doubling rate |
| | MTS | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium |
| | PR | Proliferation rate |
| | IOD | Index of osteogenic differentiation |
| | RT-PCR | Reverse transcriptase-polymerase chain reaction |
| | mRNA | Messenger ribonucleic acid |
| | cDNA | Complementary deoxyribonucleic acid |
| | GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase |
| | BMP-12 | Bone morphogenetic protein-12 |

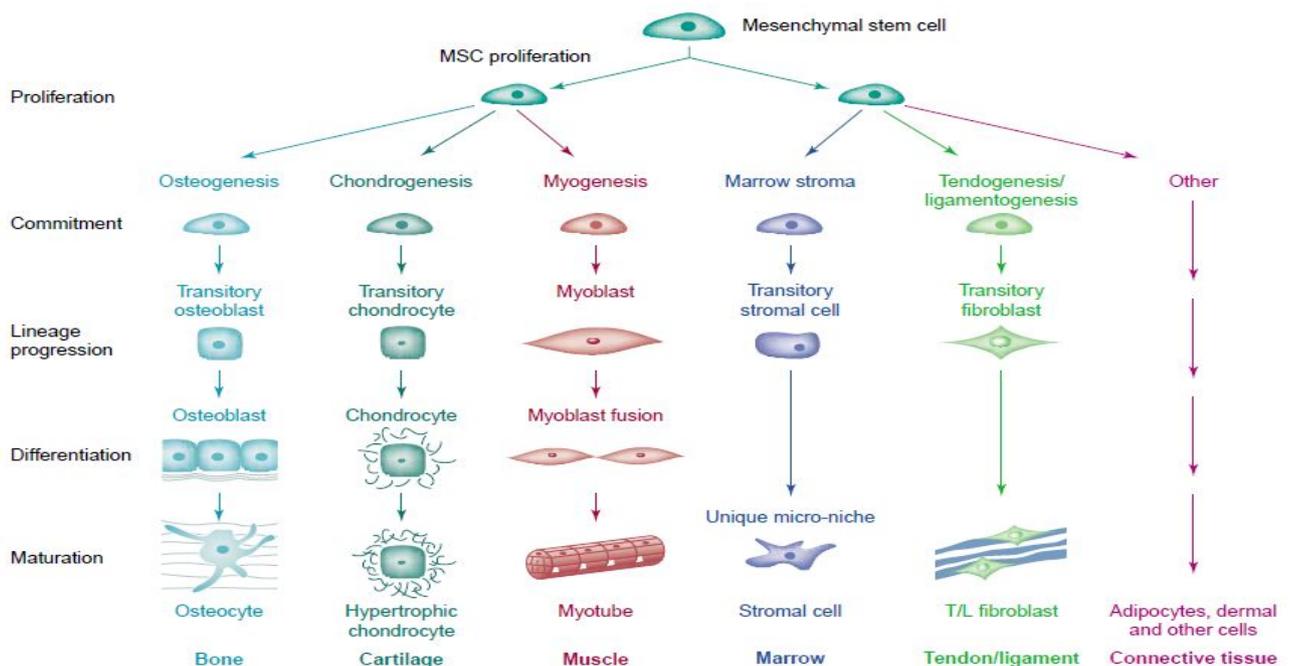
1 EINLEITUNG

Stammzellen gewinnen aufgrund ihres großen Potentials für die regenerative Therapie zahlreicher Erkrankungen immer mehr an Bedeutung, sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin. Speziell für den Einsatz in der Pferdeorthopädie sind unter den verschiedenen definierten Stammzelltypen die adulten, multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSCs) von großer Relevanz, da sie sich für die Unterstützung der Regeneration muskuloskelettaler Gewebe eignen.

MSCs werden über ihre Eigenschaft der Plastikadhärenz unter Standardzellkulturbedingungen und ihr tripotentes Differenzierungspotential in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten definiert sowie – zumindest im Falle humaner MSCs – über die Expression eines bereits bekannten Oberflächenmarkersets (FRIEDENSTEIN et al. 1966; PITTENGER et al. 1999; DOMINICI et al. 2006). Außerdem sind sie gekennzeichnet durch ihre Fähigkeit zur Selbstreplikation und Differenzierung in Zelltypen weiterer mesenchymaler Gewebe, unter anderem Sehnen und Bänder (CAPLAN und BRUDER 2001) (Abbildung 1). Diese Eigenschaften machen MSCs zu attraktiven biomedizinischen Therapeutika für orthopädische Erkrankungen, wobei beim Pferd derzeit die Behandlung von Sehnenkrankungen im Vordergrund steht.

Abbildung 1:

Vereinfachtes Schema des mesengenischen Prozesses (CAPLAN und BRUDER 2001)



Sehnenerkrankungen treten gerade bei Sportpferden häufig auf und kennzeichnen aufgrund hoher Rezidivraten von bis zu 80 % (DOWLING et al. 2000) langfristig oftmals das Ende der sportlichen Karriere des Tieres. Für Vielseitigkeitspferde wurde beispielsweise erhoben, dass 43,4 % aller Trainingsverletzungen Sehnen und Bänder betrafen, wobei die Oberflächliche Beugesehne (Endsehne des *M. flexor digitalis superficialis*) mit 33,3 % und der Fesselträger (*M. interosseus medius*) mit 30,6 % fast gleichermaßen häufig betroffen waren (SINGER et al. 2008). Bei Rennpferden stellt der Anteil der Sehnenverletzungen einen ähnlich hohen Anteil dar, wobei hier am häufigsten, mit einer Prävalenz von 11,1 %, die Oberflächlichen Beugesehnen der Vordergliedmaßen betroffen sind (KASASHIMA et al. 2004).

Ist eine klinisch manifeste Sehnenverletzung bzw. –erkrankung aufgetreten, folgt auf eine kurze Entzündungsphase innerhalb der Sehne die Reparatur, wobei trotz lang andauernder, komplexer Umbauvorgänge der Kollagenstrukturen die ursprünglichen biomechanischen Eigenschaften der Sehne nicht mehr erreicht werden (RICHARDSON et al. 2007). Verschiedenste konventionelle Therapieansätze medikamentöser oder chirurgischer Art führten nicht zu den erhofften Erfolgen oder werden zumindest sehr kontrovers diskutiert (DOWLING et al. 2000; DYSON 2004).

Mit dem Ziel, eine tatsächliche Regeneration anstelle der narbigen Reparatur zu erreichen und somit das klinische Ergebnis der Patienten langfristig zu verbessern, rücken nun biomedizinische Therapieansätze und besonders der Einsatz von MSCs in den Fokus der aktuellen Forschung.

Erstmalig wurde die therapeutische Anwendung equiner MSCs aus Knochenmark zur Behandlung equiner Sehnenerkrankungen 2003 in einem Fallbericht beschrieben (SMITH et al. 2003), basierend auf einer 2001 publizierten Studie zur Übertragung autologen Knochenmarks (HERTHEL 2001). Mittlerweile wurden einige klinische Studien publiziert, die dafür sprechen, dass dieses Therapiekonzept, welches auf der intraläsionalen Applikation von zuvor im Zellkulturlabor isolierten und expandierten MSCs beruht, tatsächlich zu einem besseren klinischen Ergebnis führt als konventionelle Therapieansätze. Die nach MSC-Behandlung erhobenen Rezidivraten nach Verletzungen der Oberflächlichen Beugesehne liegen zwischen 10 und 27,4 % (PACINI et al. 2007; SMITH 2008; GODWIN et al. 2012), was bedeutend geringer erscheint als nach konventioneller bzw. medikamentöser Therapie (42 bis 44,4 %) (DYSON 2004). Allerdings beziehen sich diese Daten jeweils auf das gesamte in der entsprechenden Studie untersuchte Patientengut; die Aufschlüsselung nach Nutzungsdisziplin zeigt, dass Pferde, die für Flach- oder Hürdenrennen genutzt werden, unabhängig vom Behandlungsregime häufiger Rezidive erleiden als andere Sportpferde (DYSON 2004; SMITH 2008). In diesem Zusammenhang erscheint wichtig, dass in die

bisherigen Studien zur MSC-Behandlung vor allem Rennpferde einbezogen wurden. Außerdem beziehen sich die hier genannten Studien zur klinischen Anwendung von MSCs ausschließlich auf die Behandlung von Erkrankungen der Oberflächlichen Beugesehne. In Deutschland finden jedoch Dressur-, Spring- und Freizeitsport deutlich größeren Zuspruch als der Rennsport. Dementsprechend spiegeln diese bisherigen Ergebnisse die potentielle Situation im deutschen Patientenaufkommen nur unzureichend wider. Insbesondere in Bezug auf die MSC-Behandlung von den besonders bei Dressur- und Springpferden häufiger auftretenden Fesselträgererkrankungen (MURRAY et al. 2006) liegen kaum Ergebnisse vor.

Weiterhin ist noch sehr wenig über den Wirkmechanismus der MSCs bekannt. Bisherige Studien im Pferdmodell weisen darauf hin, dass die hauptsächliche Wirkung der Zellen darin zu finden ist, dass sie die Sehnenarchitektur innerhalb der heilenden Läsion verbessern (NIXON et al. 2008; SCHNABEL et al. 2009; CROVACE et al. 2010), während eine Beeinflussung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix nur in einer dieser Studien nachweisbar war (CROVACE et al. 2010). Ob diese Veränderungen auf einer tenogenen Differenzierung der MSCs, die durch das natürliche Umfeld innerhalb der Sehnenläsion hervorgerufen wird, beruhen, wie ursprünglich hypothetisiert (SMITH et al. 2003), oder eher auf einer stimulierenden und immunmodulatorischen Wirkung aufgrund der Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch die MSCs (STEWART und STEWART 2011), ist bislang noch unklar. Auf der Suche nach Optimierungsmöglichkeiten für den klinischen Einsatz von MSCs erscheint es daher sehr wichtig, zunächst ein tieferes Verständnis grundlegender Eigenschaften equiner MSCs zu erlangen, wobei nicht nur in-vivo-, sondern auch in-vitro-Studien von essentieller Bedeutung sind.

Großen Einfluss auf das klinische Resultat könnte unter anderem die MSC-Quelle, also das für die Isolierung der Zellen herangezogene Gewebe, ausüben. Während MSCs für die klinische Anwendung beim Pferd zurzeit vor allem aus Knochenmark oder Fettgewebe isoliert werden (DEL BUE et al. 2008; GODWIN et al. 2012), ist bekannt, dass sie in zahlreichen weiteren Geweben und Körperflüssigkeiten zu finden sind (DA SILVA MEIRELLES et al. 2006; YOSHIMURA et al. 2007). Beim Pferd wurde die Isolierung von MSCs bisher unter anderem aus Geburt-assoziierten Geweben wie Nabelschnurmaterial und Plazenta sowie aus muskuloskelettalen Geweben wie Sehne oder Zahnhalteapparat beschrieben (KOCH et al. 2007; HOYNOWSKI et al. 2007; CARRADE et al. 2011; MENSING et al. 2011; LOVATI et al. 2011a).

Equine MSCs aus Knochenmark und Fettgewebe werden nicht nur klinisch angewendet, sondern wurden bisher auch am intensivsten in vitro charakterisiert (FORTIER et al. 1998; ARNHOLD et

al. 2007; VIDAL et al. 2007; BRAUN et al. 2010; RADCLIFFE et al. 2010; RANERA et al. 2011). Ein auf der Hand liegender Vorteil dieser MSC-Quellen ist die Möglichkeit, sie relativ einfach am stehenden Pferd zu gewinnen, was für autologe Anwendungen von Bedeutung ist. Andererseits kann die Entnahme aber in Einzelfällen zu Komplikationen führen (DURANDO et al. 2006). Weiterhin ist bekannt, dass sich mit steigendem Donoralter die Qualität von MSCs aus Knochenmark verringert (HILFIKER et al. 2011).

MSCs aus Nabelschnurblut und –gewebe weisen bisherigen Studien zufolge potentielle Vorteile gegenüber MSCs aus den „herkömmlichen“ Quellen Knochenmark und Fettgewebe auf. Zum einen ist die Entnahme dieser Gewebe nicht invasiv, somit schmerzfrei und führt zu keinerlei Nachteilen für das Fohlen (BARTHOLOMEW et al. 2009). Weiterhin besteht die Vermutung, dass MSCs aus diesen Geburt-assoziierten Geweben eine bessere Qualität und einen naiveren Charakter sowie breiteres Differenzierungspotential aufweisen, da sie zum einen Marker wie Oct-4 und SSEA-4 bzw. SSEA-1, die mit embryonalen Zellen assoziiert werden, exprimieren und zum anderen in Zelltypen ekto- bzw. endodermaler Gewebe differenziert werden konnten (HOYNOWSKI et al. 2007; REED und JOHNSON 2008). In humanen MSCs aus Nabelschnurblut wurden außerdem längere Telomere vorgefunden als in MSCs aus Knochenmark, was für eine längere Lebensdauer von ersteren spricht (KOGLER et al. 2004). Allerdings besteht bei Nabelschnurblut als MSC-Quelle der Nachteil, dass in bisherigen Studien nicht aus allen Nabelschnurblut-Proben MSCs isoliert werden konnten. Für equines Material wurde eine Erfolgsrate von 80 % beschrieben (SCHUH et al. 2009), was zumindest ein besseres Ergebnis darstellt, als in den meisten humanmedizinischen Studien (KERN et al. 2006; SECCO et al. 2008) beschrieben wurde. Erfolgsraten von 100 % werden dagegen für die Isolierung von MSCs aus Nabelschnurgewebe beschrieben (SECCO et al. 2008). Hier besteht allerdings, besonders beim Pferd aufgrund des Abfohlens in Stallumgebung, eine hohe Gefahr der Probenkontamination, weswegen der Einsatz von Desinfektiva und Antibiotika bei der Probennahme unerlässlich erscheint (PASSERI et al. 2009).

MSCs aus Sehngewebe wiederum sind möglicherweise speziell für die Behandlung von Sehnerkrankungen besonders gut geeignet, während sie gleichzeitig tripotentes Differenzierungspotential aufweisen (SALINGCARNBORIBOON et al. 2003; BI et al. 2007; LOVATI et al. 2011a). So erfolgte die Wiederbesiedelung zellfreier Sehnenmatrices durch aus Sehngewebe isolierte Zellen schneller und unter Produktion größerer Mengen an extrazellulärer Matrix als durch Zellen aus Knochenmark (STEWART et al. 2009). In humanem perivaskulären Sehngewebe konnten Zellen nachgewiesen werden, die sowohl Charakteristika von Tenozyten als auch von Progenitorzellen aufwiesen (TEMPFER et al. 2009). Diese vermutlich für

Progenitorzellen aus Sehngewebe spezifischen Eigenschaften lassen vermuten, dass Sehngewebe eine sehr vielversprechende Zellquelle für die Pferdeorthopädie ist.

Vergleichende Studien an humanen MSCs sowie auch erste vergleichende Studien an equinen MSCs zeigen, dass durchaus große Unterschiede zwischen den in-vitro-Eigenschaften von MSCs aus verschiedenen Geweben bestehen (WAGNER et al. 2005; KERN et al. 2006; VIDAL et al. 2007; NOEL et al. 2008; VIDAL et al. 2008; BERG et al. 2009; KALTZ et al. 2010; TOUPADAKIS et al. 2010; LOVATI et al. 2011b; VIDAL et al. 2012). Dies führt zu der Annahme, dass das Ursprungsgewebe gleichermaßen einen Einfluss auf das Verhalten von MSCs in vivo hat, und dass durch Verwendung der optimalen Zellquelle das klinische Ergebnis positiv beeinflusst werden könnte.

Die klinische Umsetzung dieser Hypothese erfordert jedoch zunächst bessere Kenntnisse der therapeutisch relevanten Charakteristika equiner MSCs aus verschiedenen Quellen im Vergleich. Bisherige vergleichende Studien an equinen MSCs sind jedoch wenig umfassend in der Hinsicht, dass entweder nur zwei verschiedene MSC-Quellen direkt miteinander verglichen wurden (VIDAL et al. 2007; VIDAL et al. 2008; BERG et al. 2009), und/oder speziell eine bestimmte Eigenschaft der MSCs, z. B. ihr osteogenes Differenzierungspotential (TOUPADAKIS et al. 2010) oder das Auftreten von Seneszenz (VIDAL et al. 2012), fokussiert wurde. Weiterhin schließt keine dieser Studien Sehngewebe als potentielle MSC-Quelle mit ein. Darüber hinaus existieren bislang keine Publikationen, die die Migrationseigenschaften und das Sehnenregenerationspotential equiner MSCs aus verschiedenen Quellen vergleichen, obwohl diese Eigenschaften für die klinische Anwendung von großer Relevanz sind.

2 HYPOTHESEN

- 1a. Die intraläsionale Applikation von autologen MSCs zur Behandlung equiner Sehnen- bzw. Bänderkrankungen verbessert das klinische Ergebnis im Vergleich zur konventionellen Behandlung.
- 1b. Dieser Therapieansatz ist nicht nur für Erkrankungen der Oberflächlichen Beugesehne, sondern auch für Erkrankungen anderer tendinöser oder ligamentöser Strukturen, insbesondere des Fesselträgers, geeignet.
- 2a. Equine MSCs, die aus verschiedenen Geweben stammen, unterscheiden sich in Eigenschaften, die potentiell relevant für den Erfolg der klinischen Anwendung sind.
- 2b. Equine MSCs aus Nabelschnurblut und -gewebe weisen aufgrund ihres juvenilen, naiveren Charakters ein höheres Proliferations- und Differenzierungspotential auf als MSCs aus adulten Geweben.
- 2c. Equines Sehngewebe enthält Zellen, die aufgrund ihrer Eigenschaften als MSCs zu bezeichnen sind und gleichzeitig dem Phänotyp von Tenozyten nahestehen.

3 ZIELE

1. Ziel der klinischen Studie war es, die nach MSC-Therapie zu erwartenden Erfolgsraten für die Behandlung von Erkrankungen der Oberflächlichen Beugesehne und des Fesselträgers zu erheben und Einflussfaktoren auf dieses Ergebnis aufzuzeigen.
2. Ziel der in-vitro-Studie war es, equine MSCs aus den derzeit populärsten Gewebequellen im direkten Vergleich zu untersuchen, um die Grundkenntnisse zur Biologie equiner MSCs zu erweitern, Unterschiede zwischen MSCs aus verschiedenen Quellen aufzuzeigen und so eine Aussage darüber treffen zu können, welche MSC-Quellen sich für die therapeutische Anwendung eignen.

4 PUBLIKATIONEN

4.1 PUBLIKATION 1 (KLINISCHE ANWENDUNG EQUINER MSCs)

STAMMZELLENTHERAPIE VON SEHNENVERLETZUNGEN – KLINISCHE ERGEBNISSE VON 98 FÄLLEN

STEM CELL THERAPY OF TENDON INJURIES – CLINICAL OUTCOME IN 98 CASES

Janina Burk und Walter Brehm

Pferdeheilkunde 27 (2011); 2: 153-161

Stammzellentherapie von Sehnenverletzungen - klinische Ergebnisse von 98 Fällen

Stem cell therapy of tendon injuries - clinical outcome in 98 cases

Janina Burk ^{1,2}, Walter Brehm ^{1,2}

1) Chirurgische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

2) Translationszentrum für Regenerative Medizin, Universität Leipzig

Schlüsselwörter:

Mesenchymale Stammzellen, Knochenmark, Tendinitis, Fesselträger, M. interosseus, Oberflächliche Beugesehne, Langzeitergebnisse, Pferd

Keywords:

mesenchymal stem cells, bone marrow, tendinitis, suspensory ligament, superficial digital flexor tendon, long term results, horse

Zusammenfassung

Sehnenverletzungen zählen zu den häufigsten orthopädischen Verletzungen des Sportpferdes. Bisherigen Studien zufolge hat die intraläsionale Applikation von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) einen positiven Einfluss auf die Sehnenheilung. So können durch Behandlung von Sehnenverletzungen mit MSCs die nach konventioneller Therapie hohen Rezidivraten deutlich gesenkt werden.

Ziel dieser Studie war die Bewertung von Erfolg und Sicherheit der MSC-Therapie bei 98 Pferden, die an Sehnen- bzw. Bandverletzungen litten (zumeist an Fesselträger (FT) oder Oberflächlicher Beugesehne (OBS)). Außerdem wurden mögliche Einflüsse des Erkrankungsstadiums, der Nutzungsdisziplin und des Alters der Patienten sowie der betroffenen Sehnenstruktur (FT vs. OBS) auf die Erfolgchancen der MSC-Therapie analysiert. Von 58 Tieren lagen hierfür auch Langzeitergebnisse über einen Beobachtungszeitraum von mindestens 12 Monaten nach der MSC-Applikation vor. Bei diesen Pferden war die Behandlung in 84,5 % der Fälle als erfolgreich einzustufen. Dabei zeigten Pferde mit akuten oder chronischen Erkrankungen bessere Ergebnisse (86,2 % bzw. 91,7 %) als solche, die mit rezidivierenden Erkrankungen vorgestellt worden waren (50,0 %) und 6- bis 12-jährige Tiere bessere Ergebnisse (88,9 %) als ältere (75,0 %). Reit- und Sportpferde erlitten seltener Rezidive (10,0 %) als Galopp- (27,3 %) und Trabrennpferde (66,6 %). FT und OBS konnten gleichermaßen erfolgreich behandelt werden, allerdings scheint innerhalb des FTs die Lokalisation der Verletzung von Bedeutung für den Heilungserfolg zu sein.

Diese Fallstudie bestätigt die bislang vorliegenden positiven Ergebnisse zur regenerativen Sehnentherapie mit MSCs. Darüber hinaus zeigt sich, dass MSCs bei Verletzungen des FTs wie auch der OBS gleichermaßen erfolgreich eingesetzt werden können.

Summary

Tendon injuries are among the most common orthopedic injuries in competition and race horses. It has already been reported that the intralesional injection of mesenchymal stem cells (MSCs) results in a better tendon healing and reduces re-injury rates compared to conventional therapies.

The aim of this study was to evaluate success and safety of MSC-therapy in horses suffering from tendon and ligament injuries and to identify factors that influence the success of MSC-therapies.

98 horses had presented with tendon or ligament injuries, of which approximately two-thirds were suspensory ligament (SL) lesions and one-third superficial digital flexor tendon (SDFT) lesions. All horses had been treated with an intralesional injection of autologous bone marrow MSCs and follow-up information was obtained by the responsible practitioner. MSC-therapy associated complications and the MSC-treatment success rate were assessed based on the data obtained for all 98 horses. Treatment success was defined as return to intended use and/or return to full training without re-injury. Follow-up information over a period longer than 12 months could be obtained for 58 horses. For these 58 horses, data was additionally analyzed with regard to the questions whether the disease stage at which the MSCs

had been applied, the discipline in which horses used to perform, the age of the horses, or the injury localization (SL vs. SDFT) influence the treatment success rate.

In 6 out of 98 cases treatment-associated complications such as transient swellings had been observed; however, this had no effect on the clinical outcomes. The success rate after more than 12 months after treatment (n = 58) was 84.5 %. Patients with acute or chronic disease showed overall better results (82.2 % and 91.7 %, respectively) than horses that had presented with recurrent disease (50.0 %). Generally, six to twelve year old horses showed a higher success rate (88.9 %) compared to older horses (75.0 %). Competition horses reinjured less frequently (10.0 %) than flat (27.3 %) and trot race horses (66.6 %). The success rate did not vary between horses with SL or SDFT injuries. However, the localization of the lesion within the SL seems to play a role concerning the treatment success.

The results of this case study confirm the positive results reported in previous studies on regenerative tendon therapy with MSCs. Furthermore, it shows that MSC-therapy is not only successful in the treatment of SDFT lesions but also leads to promising results in the treatment of SL injuries.

Einleitung

Verletzungen der Sehnen und Bänder, insbesondere der Oberflächlichen Beugesehne (OBS) und des Fesselträgers (FT), zählen mit einem Anteil von 46 % zu den wichtigsten muskuloskelettalen Verletzungen des Sportpferdes (Kasashima et al., 2004; Smith, 2008a). Für Tendinitiden der OBS wurden in verschiedenen Studien Inzidenzen von 11-43 % beschrieben (Dowling et al., 2000). Bezüglich der Häufigkeit von FT-Verletzungen existiert bislang noch wenig Literatur. Dennoch stellen auch diese einen bedeutenden Anteil der Verletzungen an Sehnen und Bändern dar (Kasashima et al., 2004; Ely et al., 2009).

Die erfolgreiche Behandlung von Sehnenverletzungen gestaltet sich oft schwierig, da sich nach konservativer Therapie im verletzten Areal fibröses Narbengewebe bildet. Dieses weist eine gegenüber dem originären Sehnengewebe reduzierte Elastizität auf (Richardson et al., 2007), was zu hohen Rezidivraten von bis zu 80 % führt (Dowling et al., 2000). Es existieren vielfältige beschriebene chirurgische oder medikamentelle Therapieansätze, deren Erfolg allerdings in den meisten Fällen nicht eindeutig belegt werden konnte (Dowling et al., 2000; Dyson, 2004).

Dagegen stellt die Behandlung mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) eine vielversprechende therapeutische Möglichkeit dar. In den letzten Jahren konnte durch histologische und ultrasonografische Untersuchungen gezeigt werden, dass nach MSC-Applikation in Sehnenläsionen die Struktur des dort neu gebildeten Kollagenfaserarrangements signifikant verbessert ist, im Vergleich zu nicht behandelten Läsionen (Smith et al., 2003; Mountford et al., 2006; Smith, 2008a; Schnabel et al., 2009). Dies spricht dafür, dass intraläsional injizierte MSCs die Heilung dahingehend beeinflussen, dass anstelle der narbigen Reparatur eine tatsächliche Regeneration des Sehnengewebes stattfindet. In der Tat zeigen erste klinische Ergebnisse, dass nach MSC-Therapie von Sehnenläsionen die Rezidivraten deutlich geringer sind als nach konservativer Behandlung (Pacini et al., 2007; Smith, 2008a).

Weitere klinische Studien müssen diese vielversprechenden Ergebnisse verifizieren. Überdies beziehen sich fast alle bisherigen Studien nur auf die MSC-Behandlung der OBS. Über den Behandlungserfolg bei Verletzungen anderer wichtiger Strukturen, wie des FTs, ist uns nur ein Fallbericht (Mountford et al., 2006) bekannt.

In dieser Fallstudie wurden daher die Ergebnisse nach MSC-Behandlung unterschiedlicher tendinöser Strukturen, vornehmlich des FTs und der OBS, von insgesamt 98 Pferden zusammengestellt.

Material und Methoden

Das Patientengut bestand aus 98 Pferden verschiedenen Geschlechts, Rasse, Nutzung und Alters, wobei 48,0 % der Pferde zwischen 7 und 12 Jahren alt waren und 70,5 % als Reit- bzw. Sportpferde, meist im Spring- oder Dressursport, genutzt wurden (Tabelle 1).

Die Patienten waren in einem Zeitraum von 2 Jahren aufgrund von Lahmheit in den mitwirkenden Kliniken vorgestellt und dort klinisch und ultrasonografisch untersucht worden. Weiterführende Untersuchungen wie diagnostische Anästhesien wurden nach Ermessen der behandelnden Tierärzte durchgeführt, bis eine sichere Diagnosestellung möglich war. Bei allen Pferden wurde letztendlich als Lahmheitsursache eine Sehnen- bzw. Bänderkrankung festgestellt. Bestand die Lahmheit vorberichtlich seit höchstens 6 Wochen, wurde die Erkrankung als akut eingestuft, bei länger bestehenden Lahmheiten als chronisch. Wurden die Tiere mit einem Rezidiv einer früher behandelten Verletzung vorgestellt, wurde die Erkrankung als rezidivierend eingestuft.

Nach Diagnosestellung und Einverständniserklärung der Besitzer wurden alle Pferde mit autologen MSCs behandelt.

Zur Gewinnung autologer MSCs wurde Knochenmark unter Sedation und Lokalanästhesie durch Punktion des Sternums nach beschriebenen Methoden (Smith, 2008b) entnommen. Im Zellkulturlabor wurde aus dem Knochenmark mittels Ficoll®-Dichtegradientenzentrifugation die mononukleäre Zellfraktion isoliert, in Kulturflaschen ausgesät und die plastikadhärenten MSCs nach bereits etablierten Standardprotokollen (Smith et al., 2003) expandiert, bis - in den meisten Fällen nach drei bis fünf Wochen - eine Zellzahl von mindestens 10 Millionen erreicht war. Die MSCs wurden in 3,5 ml autologem Knochenmarküberstand suspendiert und an den behandelnden Tierarzt zurück gesandt.

Die MSC-Suspension wurde dem Patienten vor Ort unter Sedation und Leitungsanästhesie sowie ultrasonografischer Kontrolle direkt intraläsional injiziert, wie beschrieben bei Smith (2008b). Nach Ermessen des jeweiligen behandelnden Tierarztes und basierend auf den Ergebnissen von klinischen und ultrasonografischen Nachuntersuchungen wurden die Pferde einem kontrollierten, eingeschränkten Bewegungsprogramm in Anlehnung an Dyson (2004) unterstellt. Die MSC-Behandlung fand in allen Fällen nur einmalig statt.

Anschließend wurden Informationen über den Verbleib der Pferde beziehungsweise ihren Wiedereintritt in den Sport durch eine Befragung der behandelnden Tierärzte eingeholt. Bei Pferden, die wieder in ihrer früheren sportlichen Verwendung, inklusive Wettkampfeinsätzen, waren („Sport“) und solchen, die wieder regulär trainiert wurden, ohne dass

die Lahmheit wieder aufgetreten war („Training“), wurde das Ergebnis als erfolgreich bewertet. Waren die Tiere noch in der Rehabilitationsphase, wurde das Ergebnis mit „rekonvaleszent“ bezeichnet. Ergebnisse der Pferde, bei denen im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv der behandelten Sehnenverletzung („Rezidiv“) oder eine Sehnenverletzung kontralateral („Rezidiv kontralateral“) aufgetreten war sowie der Pferde, die aus dem Sport zurückgezogen worden waren („Rückzug“), wurden als nicht erfolgreich zusammengefasst.

Die Patientendaten aller 98 Tiere wurden ausgewertet hinsichtlich der möglichen Auswirkung der Nutzung des Pferdes auf die Lokalisation der Sehnenkrankung (FT vs. OBS) sowie der Ergebnisse und eventueller Komplikationen der MSC-Behandlung.

Für 58 Pferde lagen Langzeitergebnisse über einen Zeitraum von mindestens 12 Monaten nach der MSC-Behandlung vor. Die klinischen Ergebnisse dieser 58 Pferde wurden noch einmal separat dargestellt und mögliche Auswirkungen des Stadiums der Erkrankung vor der Behandlung (akut / chronisch / rezidivierend), der Nutzung und des Alters der Tiere sowie der Lokalisation der Verletzung auf das klinische Ergebnis der MSC-Behandlung analysiert.

Die statistische Auswertung wurde für alle nominalen Variablen mittels χ^2 -Test und Fisher's Exact Test durchgeführt, metrische Variablen wurden außerdem im Student's T-Test analysiert. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse

Ergebnisse aller 98 Patienten:

Bezüglich der Lokalisation der Verletzungen lagen signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Nutzungsgruppen vor. Reit- und Sportpferde litten häufiger an Erkrankungen des FTs, Galopp- bzw. Trabrennpferde dagegen häufiger an Erkrankungen der OBS ($p = 0,013$ bzw. $p = 0,017$): Von den 62 vorgestellten Reit- und Sportpferden, die an FT oder OBS betroffen waren, wiesen 71,0 % eine Verletzung des FTs und 29,0 % eine Verletzung der OBS auf. Weitere 5 Reit- und Sportpferde wurden mit Verletzungen anderer tendinöser Strukturen, wie der Tiefen Beugesehne (TBS) oder ihres Unterstützungsbandes sowie der Kollateralbänder des Fesselgelenkes, vorgestellt. Dagegen waren von insgesamt 19 Galopprennpferden nur 36,8 % am FT und 63,2 % an der OBS betroffen. Die insgesamt 8 Trabrennpferde wurden zu 25,0 % aufgrund einer FT-Erkrankung und zu 75,0 % aufgrund einer OBS-Erkrankung vorgestellt (Diagramm 1). FT-Erkrankungen verteilten sich zu 61,5 % auf die Vordergliedmaßen und zu 38,5 % auf die Hintergliedmaßen, während OBS-Verletzungen zu 96,2 % in den Vordergliedmaßen lokalisiert waren.

55,1 % der Pferde litten unter akuten, 21,4 % unter chronischen und 10,2 % unter rezidivierenden Sehnenkrankungen. Bei 13,3 % der Tiere war nicht bekannt, wie lange die Lahmheit bereits bestanden hatte (Tabelle 1).

Die Ergebnisse der Nachuntersuchungen aller 98 Patienten wiesen auf eine erfolgreiche Behandlung in 81,6 % der Fälle hin. 55 dieser Pferde waren zum Zeitpunkt der Befragung wieder in ihrer vorherigen Verwendung im Sport und weitere

25 im Training. 12,2 % der Pferde hatten dagegen entweder ein Rezidiv der alten Verletzung oder eine erneute Sehnenverletzung kontralateral erlitten. Außerdem waren 2,0 % der Pferde ganz aus dem Sport zurückgezogen worden. Die übrigen 4,1 % der 98 Pferde waren noch rekonvaleszent (Diagramm 2).

Bei 93,9 % der Patienten verlief die MSC-Behandlung ohne jegliche Komplikationen. 6,1 % der Pferde zeigten nach der Applikation der MSCs eine transiente Schwellung im Injektionsbereich. Dies hatte jedoch keinerlei Auswirkung auf den Heilungserfolg, zum Zeitpunkt der Befragung konnte die Behandlung bei allen dieser Pferde als erfolgreich bewertet werden (im Sport oder Training).

Ergebnisse 12 Monate nach Behandlung:

Von den insgesamt 58 Patienten, für die auch Ergebnisse nach einem Beobachtungszeitraum von mindestens 12 Monaten nach der MSC-Behandlung vorlagen, waren nach diesem Zeitraum 43 Pferde wieder in ihrer vorherigen Verwendung im Sport und 6 Pferde im Volltraining. Das Ergebnis der MSC-Behandlung ist demnach in 49 (84,5 %) Fällen als erfolgreich zu bewerten. Rezidive der alten Verletzung oder an der kontralateralen Gliedmaße waren bei 7 Pferden aufgetreten, weitere 2 Pferde waren ganz aus dem Sport genommen worden. Insgesamt ist die Behandlung also in 9 (15,5 %) Fällen als nicht erfolgreich zu bewerten (Diagramm 2).

Es sind Tendenzen erkennbar, dass Erkrankungsstadium, Nutzungsrichtung und Alter der Tiere einen Einfluss auf die Erfolgsrate der MSC-Behandlung haben. Allerdings lassen sich an den hier zur Verfügung stehenden Fällen keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen ($p > 0,5$).

Pferde mit einer akuten Verletzung (< 6 Wochen) ($n = 29$) konnten zu 82,2 % und Pferde mit einem chronischen Leiden (> 6 Wochen) ($n = 12$) zu 91,7 % erfolgreich behandelt werden. Dagegen wurde bei den Pferden, die bereits bei der Vorstellung unter einer rezidivierenden Sehnenenerkrankung litten ($n = 6$), nur bei 50,0 % ein Erfolg erzielt (Tabelle 2).

Bei Reitpferden verschiedener Nutzungsrichtungen ($n = 40$) war die Behandlung in 90,0 % der Fälle erfolgreich; die Dressurpferde darunter ($n = 3$) waren alle erfolgreich behandelt worden. Bei Galopprennpferden ($n = 11$) lag die Erfolgsrate bei 72,7 %; von den Trabrennpferden ($n = 3$) konnte jedoch nur eines erfolgreich behandelt werden (Tabelle 2).

Junge Pferde (3 bis 6 Jahre, $n = 12$), darunter 2 Trab- und 8 Galopprennpferde, waren zu 75,0 % erfolgreich behandelt worden. Tiere im mittleren Alter (7 bis 12 Jahre, $n = 27$), darunter hauptsächlich Reitpferde ($n = 23$), erreichten eine Erfolgsrate von 88,9 %, während ältere Tiere (13 bis 16 Jahre, $n = 8$), ebenfalls vor allem Reitpferde ($n = 7$), wiederum zu 75,0 % erfolgreich behandelt worden waren (Tabelle 2).

Bei Pferden, bei denen die Verletzung in der OBS lokalisiert war ($n = 19$), war die Behandlung zu 84,2 % erfolgreich. Bei Erkrankungen der TBS ($n = 1$) oder des Unterstützungsbandes der TBS ($n = 2$) war die Behandlung in allen Fällen erfolgreich. Pferde, die unter Läsionen an verschiedenen Lokalisationen des FTs litten ($n = 36$), konnten insgesamt zu

83,3 % erfolgreich behandelt werden (Tabelle 2). Dabei lagen die Erfolgsraten für Läsionen am FT-Ursprung (n = 18) bei 94,4 %, für Läsionen am FT-Körper (n = 7) bei 71,4 % und für Läsionen an einem FT-Schenkel (n = 8) bei 62,5 %. Es waren jedoch keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem Behandlungserfolg von FT- Verletzungen an Vorder- bzw. Hintergliedmaßen erkennbar.

Diskussion

Die Patientenpopulation dieser in Deutschland und der Schweiz durchgeführten Studie mit einem deutlich höheren Anteil an Reit- und Sportpferden als an Galopprennpferden kann vermutlich als recht repräsentativ für die in hier ansässigen Pferdepraxen und -kliniken vorgestellte Patientenpopulation angesehen werden. Unter den Patienten dieser Studie waren knapp zwei Drittel der Tiere am FT und nur etwa ein Drittel an der OBS erkrankt, was auf den hohen Anteil an FT-Leiden unter den vorgestellten Reit- und Sportpferden (71,0 %) zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass gerade die Behandlung von FT-Erkrankungen in der hiesigen Pferdepraxis einen hohen Stellenwert einnimmt.

In anderen Studien werden Verletzungen der OBS als am häufigsten vorkommende Sehnen- bzw. Bänderverletzung angegeben (Ely et al., 2009), allerdings beziehen sich diese Angaben nur auf Rennpferde und sind daher eher repräsentativ für andere Länder. Unter anderem in Großbritannien wird daher die Behandlung von OBS-Verletzungen mit Stammzellen intensiv beforscht (Smith, 2008a; Guest et al., 2010), während es bisher kaum veröffentlichte Daten zur MSC-Therapie von FT-Erkrankungen gibt.

Die vorliegende Studie liefert hierzu – nach unserer Kenntnis erstmalig - auf größeren Fallzahlen basierende Ergebnisse, die dazu ermutigen, MSCs verstärkt zur Behandlung von FT-Erkrankungen einzusetzen.

Die Erfolgsrate der MSC-Behandlung nach einem Beobachtungszeitraum von mindestens 12 Monaten, unabhängig davon, welche Sehnenstruktur betroffen war, lag bei insgesamt 84,5 %. Ein Vergleich mit den klinischen Ergebnissen aller Pferde, die zum Teil noch vor weniger als 12 Monaten behandelt worden waren, und ein Vergleich mit den Ergebnissen der Pferde, bei denen die Behandlung bereits über 18 Monate zurücklag, zeigt, dass nur minimale Unterschiede bezüglich der Erfolgsraten nach diesen unterschiedlichen Zeiträumen existieren (Diagramm 2). Daher ist zu vermuten, dass die klinischen Ergebnisse nach dem in dieser Studie gewählten Zeitraum von 12 Monaten nach der Behandlung Aussagen über den Langzeiterfolg der MSC-Therapie zulassen.

In ähnlichen Studien wurden diejenigen Pferde mit einbezogen, von denen klinische Ergebnisse entweder nach einem Zeitraum von 2 Jahren nach der Diagnose der Sehnenverletzung (Pacini et al., 2007) oder nach einem Zeitraum von 48 Wochen nach der MSC-Injektion (Smith, 2008a) vorlagen. Die Verletzungen waren hier immer in der OBS lokalisiert. Pacini et al. (2007) konnten berichten, dass 9 von 10 Pferden erfolgreich mit autologen MSCs behandelt worden waren, wobei es sich bei allen Pferden um Galopper handelte. In der nicht mit Stammzellen behandelten Kontrollgruppe erlitten alle 15 Tiere ein Rezidiv, nach einem mittleren Zeitraum von 7 Monaten. In der Studie von Smith (2008a) konnten von 106 Pferden aus verschiedenen Disziplinen Ergebnisse der Sehnen-therapie mit MSCs präsentiert werden; insgesamt

kamen Rezidive bei 15 % der Patienten vor (Rezidive an der kontralateralen Gliedmaße mit eingeschlossen), jedoch war die Häufigkeit des Auftretens abhängig von der Nutzungsdisziplin: National Hunt Pferde erlitten zu 13 % ein Rezidiv, Flachrennpferde zu 36 % und andere Sportpferde wiederum zu 13 %. Die Erfolgsraten in diesen beiden Publikationen sind daher mit unseren Ergebnissen vergleichbar und liegen in allen Fällen zwischen 80 und 90 %. Somit kann die vorliegende Studie die vielversprechenden Ergebnisse aus den bisherigen Veröffentlichungen bestätigen.

Nach konventioneller Behandlung von Tendinitiden der OBS dagegen werden Rezidivraten von bis zu 80 % beschrieben (Dowling et al., 2000). Dyson (2004) publizierte Rezidivraten nach OBS-Verletzungen von 23-43 % für Reitpferde und 66 % für Flachrennpferde, nach konventioneller Behandlung ohne medikamentelle Therapie. Diese wiesen außerdem keine signifikanten Unterschiede auf zu den Rezidivraten von Pferden, die entweder mit Hyaluronsäure, Beta Aminopropionitril Fumarat oder polysulfatierten Glykosaminoglykanen behandelt worden waren. Ähnliche Ergebnisse, jedoch für Erkrankungen des FTs, lieferte eine Studie von Rijkenhuizen et al. (2007). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Erfolg nach konservativer Therapie, Injektion von Kortikosteroiden, Injektion von unaufbereitetem Knochenmark, Stoßwellentherapie oder chirurgischer Intervention festgestellt werden. Die Erfolgsrate aller behandelten Pferde mit FT-Erkrankung, unabhängig von der Therapieform, lag bei 63,2 %. Die Behandlung von Sehnen- und Bänderverletzungen mit MSCs führte also bisherigen Studien zufolge zu deutlich höheren Erfolgsraten beziehungsweise niedrigeren Rezidivraten als konventionelle und medikamentelle Therapien.

Gleichzeitig scheint die Applikation autologer MSCs eine sichere Behandlungsmöglichkeit darzustellen. Bei 93,9 % der 98 Patienten wurden keinerlei Komplikationen dokumentiert. Geringe Komplikationen wie vorübergehende Schwellungen am Applikationsort hatten keinerlei Auswirkungen auf den Behandlungserfolg.

In der vorliegenden Studie konnten keine relevanten Unterschiede des Behandlungserfolgs bei Patienten mit akuter oder chronischer Tendinitis festgestellt werden. Es war jeweils eine hohe Erfolgsrate gegeben, wobei Patienten mit chronischer Tendinitis sogar noch erfolgreicher behandelt werden konnten (81,2 % vs. 92,7 %). Dies steht im Gegensatz zu bisherigen klinischen Erfahrungen: es wurde berichtet, dass Pferde, bei denen die MSCs erst zu einem späteren Zeitpunkt appliziert wurden, und demzufolge erst nach stattgefundener Fibrosierung der Läsion, schlechtere Heilungsaussichten haben. Der günstigste Zeitpunkt für die Applikation der MSCs wurde mit 1 bis 2 Monaten nach dem Verletzungsereignis angegeben, da zu diesem Zeitpunkt die Entzündungsreaktion in der Sehne so weit voran geschritten ist, dass sich Granulationsgewebe gebildet hat, welches die MSCs aufnehmen kann, die Fibrosierung der Läsion aber noch nicht zu weit fortgeschritten ist (Smith und Webbon, 2005). In einer weiteren Studie konnte Smith (2008) feststellen, dass bei erfolgreich behandelten Tieren das Intervall zwischen Verletzungsereignis und MSC-Injektion signifikant kürzer war als bei denjenigen, die ein Rezidiv erlitten (44 vs. 83 Tage). Auf diesen Ergebnissen basiert auch die in dieser Studie vorgenommene Einteilung zwischen akuten Tendinitiden, bei denen das Verletzungsereignis weniger als 6 Wochen zurücklag, und chronischen, bei denen das Verletzungsereignis mindestens 6 Wochen zurücklag.

Allerdings konnten auch in der vorliegenden Studie Patienten, die bereits mit einem Rezidiv einer alten Sehnenverletzung vorgestellt worden waren, nur zu 50,0 % erfolgreich behandelt werden. Dies könnte zum einen damit zu begründen sein, dass diese Pferde möglicherweise eine insgesamt weniger belastbare Sehnenstruktur aufwiesen.

Zum anderen war bei diesen Pferden vermutlich das Narbengewebe innerhalb der Sehnenläsion bereits zum Zeitpunkt der Vorstellung sehr stark ausgebildet und die Elastizität der Sehne somit schon im Vorfeld verringert. Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, dass sich die hier vorgenommene Unterscheidung zwischen chronischen und rezidivierenden Erkrankungen vor allem auf den Vorbericht der Besitzer stützt, weswegen die Abgrenzung dieser Gruppen vermutlich nicht ganz einheitlich erfolgen konnte.

Wie oben bereits erwähnt, hat die Nutzungsdisziplin der Pferde einen großen Einfluss auf die Heilungschancen von Sehnenverletzungen. So zeigten Reit- und Sportpferde sehr gute Behandlungsergebnisse nach MSC-Therapie (Erfolgsrate 90,0 %). Auch bei Galopprennpferden lag die Erfolgsrate mit 72,7 % zumindest deutlich höher als nach konservativem Management beschriebene 34,0 % (Dyson, 2004). Bei Trabrennpferden konnte in dieser Studie nur eines von drei Pferden erfolgreich therapiert werden. Allerdings kann anhand der hier vorliegenden geringen Fallzahl an Trabern noch keine Aussage über den Nutzen der MSC-Therapie in dieser Patientengruppe getroffen werden.

Ebenso scheint ein Einfluss des Patientenalters auf den Heilungserfolg zu existieren. Das hier im Vergleich zu der 7 bis 12 jährigen Gruppe ungünstigere Ergebnis bei den 3 bis 6 jährigen Tieren (88,9 % vs. 75,0 %) ist allerdings vermutlich damit zu begründen, dass fast alle Pferde dieser Gruppe im Galopp- oder Trabrennsport waren. Die Verteilung der Nutzungsrichtungen in der Gruppe der 7 bis 12 jährigen und der Gruppe der über 12 Jahre alten Tiere war jedoch vergleichbar (85,2 % bzw. 87,5 % Reitpferde). Hier kann festgestellt werden, dass bei den älteren Tieren mit 75,0 % eine geringere Erfolgsrate gegenüber den 7 bis 12 jährigen (88,9 %) erzielt wurde. Dies ist möglicherweise auf die Tatsache zurückzuführen, dass bei MSCs aus dem Knochenmark bei steigendem Alter des Donors die Anzahl, Differenzierungskapazität und Lebensdauer der Zellen verringert ist (Kern et al., 2006) und demzufolge MSCs älterer Patienten nach der Applikation weniger Einfluss auf den Heilungsprozess nehmen könnten. Ebenso ist es denkbar, dass bei den älteren Pferden in einigen Fällen bereits vor der Feststellung der akuten Verletzung eine subklinische Tendinitis bestand. Es ist bekannt, dass mit zunehmendem Alter von Pferden degenerative Veränderungen wie Fibroplasie, chondroide Metaplasie und Neovaskularisation in der Sehne auftreten, die zu einer Schwächung des Sehnengewebes führen können (Dowling et al., 2000). Möglicherweise können injizierte MSCs unter solchen Bedingungen aufgrund der bereits vorherrschenden Fibroplasie schlechter die Heilung beeinflussen, so wie es bei Patienten mit rezidivierender Tendinitis auch der Fall ist.

Der Gesamterfolg aller FT-Behandlungen war fast identisch mit dem nach OBS-Behandlung. Allerdings scheinen Unterschiede bezüglich der innerhalb des FTs betroffenen Struktur zu bestehen. FT-Ursprungsdesmopathien zeigten mit 94,4 % den besten Behandlungserfolg - obwohl gerade für Erkrankungen des FT-Ursprungs publiziert wurde, dass nur 12,5 % von 32 betroffenen Pferden nach konventioneller Therapie wieder dauerhaft im Sport einsetzbar waren. Diese Daten bezogen sich jedoch nur auf Desmopathien der Hintergliedmaßen (Dyson, 1991). Dagegen hat die Behandlung der FT-Schenkel dieser Studie zufolge weniger gute Erfolgschancen (62,5 %). Möglicherweise ist der höhere Behandlungserfolg der MSC-Therapie am FT-Ursprung damit zu begründen, dass dort der Verbleib der MSCs im Läsionsbereich besser gegeben ist als im Bereich der FT-Schenkel, wo aufgrund der in dieser Region befindlichen Gelenke mehr Beweglichkeit herrscht. Obwohl allgemein für FT-Erkrankungen der Hintergliedmaßen eine ungünstigere

Prognose angenommen wird, konnten in dieser Studie keine eindeutigen Unterschiede bezüglich des Behandlungserfolgs bei Vorder- und Hintergliedmaßen festgestellt werden.

Die vorliegende Studie wurde als multizentrische Fallstudie durchgeführt. Durch enge Kooperation mit allen beteiligten Tierärzten wurde zwar eine größtmögliche Vereinheitlichung der Behandlungsprozedur angestrebt, trotzdem ist unter klinischen Bedingungen eine vollständige Standardisierung bei großen Fallzahlen kaum möglich. Daher sind gewisse Unterschiede in der Beurteilung der klinischen Ergebnisse zwischen den behandelnden Tierärzten nicht auszuschließen. Ein weiteres Defizit dieser Studie ist das Fehlen einer echten Kontrollgruppe mit randomisiert und verblindet zugeordneten Patienten. Auch dies wäre aber aus ethischen Gründen und aufgrund mangelnder Kooperation der meisten Patientenbesitzer unter klinischen Bedingungen kaum durchführbar gewesen. Als Kontrollgruppe wurden daher Daten aus der Literatur (Dyson, 2004) herangezogen, so wie es in ähnlichen Studien ebenfalls praktiziert wurde (Smith, 2008a). Aufgrund der recht großen Fallzahl der vorliegenden Studie und der Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit denen aus bislang vorliegenden Publikationen (Pacini et al., 2007; Smith, 2008a) ist trotz der genannten Defizite davon auszugehen, dass diese Studie Aussagen über den Behandlungserfolg der MSC-Sehnentherapie zulässt.

Zukünftige Studien werden zeigen, ob sich diese bisherigen vielversprechenden Ergebnisse weiterhin bestätigen, insbesondere hinsichtlich der Eignung der Stammzellentherapie für Pferde verschiedener Nutzungsrichtungen und verschiedenen Alters. Überdies gibt es zahlreiche Ansätze, den Einsatzbereich der MSC-Therapie zu erweitern und die klinischen Ergebnisse noch zu verbessern. Solche Möglichkeiten, wie zum Beispiel die gleichzeitige Applikation von Wachstumsfaktoren (Schnabel et al., 2009), die Vordifferenzierung der MSCs in tenogene Richtung (Violini et al., 2009), oder die Verwendung alternativer Quellen für MSCs (Koch et al., 2007; Passeri et al., 2009) sind zwar noch nicht für die klinische Anwendung etabliert, können aber für die Zukunft von großer Bedeutung sein.

Danksagung

Die Autoren danken PD Dr. Pierre Mainil-Varlet, Dr. Constanze Csaki, Vreni Winkelmann und Chantal Pauli der Osteo-Articular Research Group des Instituts für Pathologie der Universität Bern, Dr. Urs Geissbühler und der Abteilung für klinische Radiologie des Departementes für klinische Veterinärmedizin der Universität Bern sowie Dr. Petra Ohnemus und der Pferdeklinik an der Rennbahn Baden Baden-Iffezheim, Dr. Hans-Georg Stihl mit Dr. Cosima von Saldern und der Pferdeklinik Ins, Dr. Werner Jahn mit Julie Pokar und Volker Sill und der Pferdeklinik Bargteheide, Dr. Martin Stöckli und der Tierklinik Dalchenhof, der Tierarztpraxis Dr. Olaf Bey, Dr. Rüdiger Brems und der Tierärztlichen Klinik für Pferde Wolfesing, Dr. Theo Tschanz und der Pferdeklinik Neugraben AG und Dr. Aleksandar Vidovic und der Tierärztlichen Klinik für Pferde Altforweiler für ihre Mitarbeit, sowie der Akademie für Tiergesundheit und der Studienstiftung des deutschen Volkes für ihre Unterstützung.

Literaturverzeichnis

- Dowling,B.A., Dart,A.J., Hodgson,D.R., and Smith,R.K. (2000). Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Vet. J.* 32, 369-378.
- Dyson,S. (1991). Proximal suspensory desmitis: clinical, ultrasonographic and radiographic features. *Equine Vet. J.* 23, 25-31.
- Dyson,S.J. (2004). Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet. J.* 36, 415-419.
- Ely,E.R., Avella,C.S., Price,J.S., Smith,R.K., Wood,J.L., and Verheyen,K.L. (2009). Descriptive epidemiology of fracture, tendon and suspensory ligament injuries in National Hunt racehorses in training. *Equine Vet. J.* 41, 372-378.
- Guest,D.J., Smith,M.R., and Allen,W.R. (2010). Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Vet. J.* 42, 636-642.
- Kasashima,Y., Takahashi,T., Smith,R.K., Goodship,A.E., Kuwano,A., Ueno,T., and Hirano,S. (2004). Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine Vet. J.* 36, 346-350.
- Kern,S., Eichler,H., Stoeve,J., Kluter,H., and Bieback,K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294-1301.
- Koch,T.G., Heerkens,T., Thomsen,P.D., and Betts,D.H. (2007). Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC. Biotechnol.* 7, 26.
- Mountford,D.R., Smith,R.K., and Patterson-Kane,J.C. (2006). Mesenchymal stem cell treatment of suspensory ligament branch desmitis; post mortem findings in a 10 year old Russian Warmblood gelding- a case report. *Pferdeheilkunde* 22, 559-563.
- Pacini,S., Spinabella,S., Trombi,L., Fazzi,R., Galimberti,S., Dini,F., Carlucci,F., and 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, 2949-2955.
- Passeri,S. et al. (2009). Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol. Int.* 33, 100-105.
- Richardson,L.E., Dudhia,J., Clegg,P.D., and Smith,R. (2007). Stem cells in veterinary medicine- attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol.* 25, 409-416.

Schnabel,L.V., Lynch,M.E., van der Meulen,M.C., Yeager,A.E., Kornatowski,M.A., and Nixon,A.J. (2009). Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *J. Orthop. Res.* 27, 1392-1398.

Smith,R.K. (2008a). Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil. Rehabil.* 30, 1752-1758.

Smith,R.K. (2008b). Stem cell therapy for tendon and ligament injuries in the horse- technique and outcome. *Pferdeheilkunde* 24, 513-518.

Smith,R.K., Korda,M., Blunn,G.W., and 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, 99-102.

Smith,R.K. and Webbon,P.M. (2005). Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? *Br. J. Sports Med.* 39, 582-584.

Violini,S., Ramelli,P., Pisani,L.F., Gorni,C., and Mariani,P. (2009). Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC. Cell Biol.* 10, 29.

Prof. Dr. med. vet. habil. Walter Brehm

FTA für Pferde und Pferdechirurgie, Dipl. ECVS

Direktor der Chirurgischen Tierklinik

Veterinärmedizinische Fakultät

Universität Leipzig

Chirurgische Tierklinik

An den Tierkliniken 11

04103 Leipzig

brehm@vetmed.uni-leipzig.de

Tabelle 1:

Verteilung von Geschlecht, Rasse, Nutzungsrichtung, Alter, Erkrankungsstadium und Lokalisation der Verletzung im Patientengut (n=98)

| | | | | |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------|------------|
| Geschlecht | Stuten | Hengste | Wallache | unbekannt |
| Anzahl | 27 | 23 | 44 | 4 |
| Rasse | Warmblut | Vollblut | Traber | andere * |
| Anzahl | 60 | 19 | 8 | 11 |
| Nutzung | Reit- und Sportpferd ** | Galopprennen | Trabrennen | andere *** |
| Anzahl | 67 | 18 | 9 | 4 |
| Alter | 3-6 Jahre | 7-12 Jahre | 13-16 Jahre | unbekannt |
| Anzahl | 24 | 47 | 13 | 14 |
| Erkrankungsstadium | akut (<6 Wochen) | chronisch (>6 Wochen) | rezidivierend | unbekannt |
| Anzahl | 54 | 21 | 10 | 13 |
| Lokalisation der Verletzung | FT | OBS | andere **** | |
| Anzahl | 57 | 36 | 5 | |

*Quarterhorse, Islandpony, Araber, Mix, unbekannt

**Dressur, Springen, Vielseitigkeit, Freizeit, Western, Distanz

***Fahrsport, unbekannt

****Tiefe Beugesehne (TBS), Unterstützungsband der TBS, Kollateralband des Fesselgelenks

Tabelle 2:

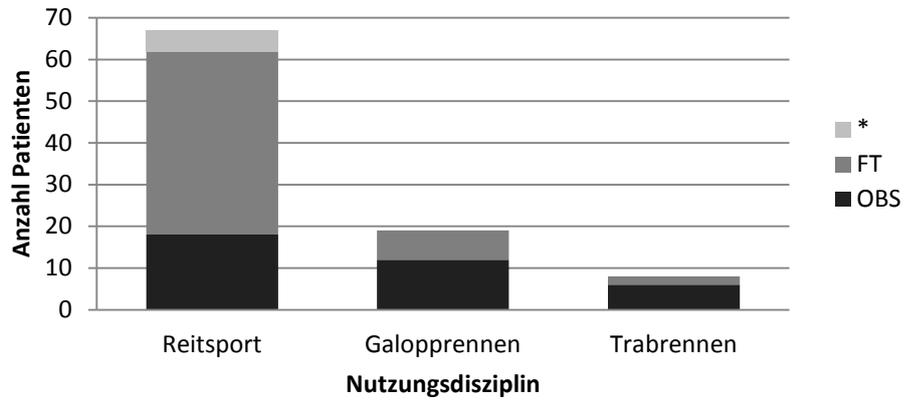
Erfolgsraten in Abhängigkeit von Erkrankungsstadium, Nutzungsrichtung und Alter der Pferde und der Lokalisation der Verletzung, mindestens 12 Monate nach der MSC-Behandlung

| | | | |
|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Erkrankungsstadium | akut (< 6 Wochen) (n = 29) | chronisch (> 6 Wochen) (n = 12) | rezidivierend (n = 6) |
| Erfolgsrate in % | 82,2 % | 91,7 % | 50,0 % |
| Nutzungsrichtung | Reit- und Sportpferde (n = 40) | Galopprennpferde (n = 11) | Trabrennpferde (n = 3) |
| Erfolgsrate in % | 90,0 % | 72,7 % | 33,3 % |
| Alter | 3-6 Jahre (n = 12) | 7-12 Jahre (n = 27) | 13-16 Jahre (n = 8) |
| Erfolgsrate in % | 75,0 % | 88,9 % | 75,0 % |
| Betroffene Struktur | FT (n = 36) | OBS (n = 19) | TBS/Unterstützungsband (n = 3) |
| Erfolgsrate in % | 83,3 % | 84,2 % | 100,0 % |

Anmerkung: Als erfolgreiche Behandlung wurde es bewertet, wenn der Patient 12 Monate nach der MSC-Injektion entweder wieder im Sport oder im Volltraining war, ohne ein Rezidiv erlitten zu haben.

Diagramm 1:

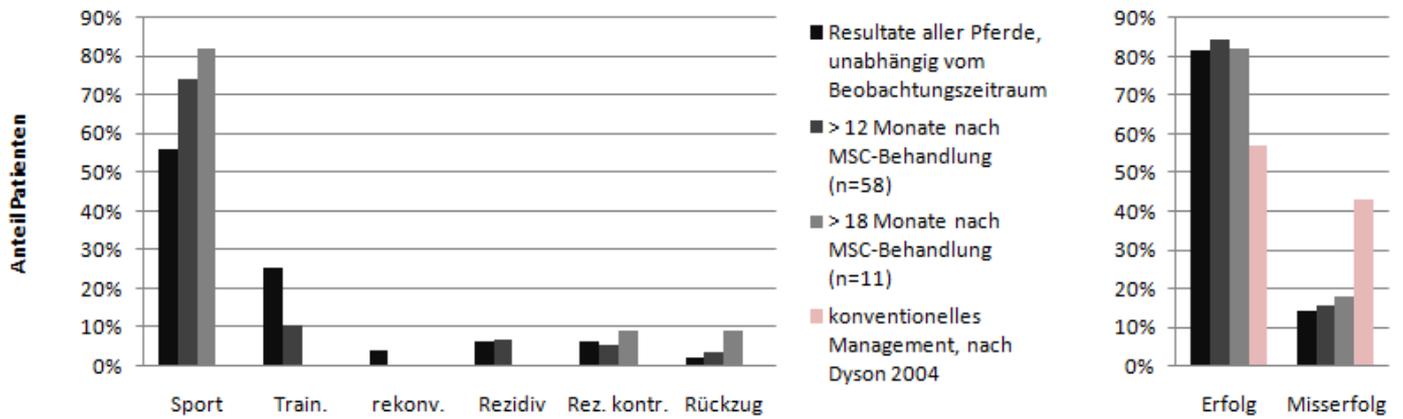
Betroffene Sehnen- und Bandstrukturen in Bezug auf die Nutzungsdisziplin der Patienten



*Tiefe Beugesehne (TBS), Unterstützungsband der TBS oder Kollateralbänder des Fesselgelenks

Diagramm 2:

Behandlungsergebnisse nach unterschiedlichen Beobachtungszeiträumen



links: Train.: Training/Volltraining; rekonv.: rekonvaleszent; Rez. kontr.: Sehnenverletzung kontralateral; Rückzug: ganz aus dem Sport zurückgezogen

rechts: Erfolg: Sport und Training zusammengefasst; Misserfolg: Rezidive und Rückzug aus dem Sport zusammengefasst; Rekonvaleszente nicht berücksichtigt

4.2 PUBLIKATION 2 (VERGLEICHENDE CHARAKTERISIERUNG EQUINER MSCs)

**GROWTH AND DIFFERENTIATION CHARACTERISTICS OF EQUINE
MESENCHYMAL STROMAL CELLS DERIVED FROM DIFFERENT SOURCES**

Janina Burk, Iris Ribitsch, Claudia Gittel, Henriette Juelke, Cornelia Kasper, Carsten Staszky und
Walter Brehm

The Veterinary Journal (2012); im Druck

Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources ★

Janina Burk ^{a, b, *}, Iris Ribitsch ^{a, b}, Claudia Gittel ^a, Henriette Juelke ^b, Cornelia Kasper ^c, Carsten Staszuk ^d, Walter Brehm ^{a, b}

^a *Large Animal Clinic for Surgery, Universitaet Leipzig, An den Tierkliniken 21, 04103 Leipzig, Germany*

^b *Translational Centre for Regenerative Medicine (TRM), Universitaet Leipzig, Philipp-Rosenthal-Straße 55, 04103 Leipzig, Germany*

^c *Department for Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences BOKU, Muthgasse 18, 1190 Vienna, Austria*

^d *Institute of Anatomy, University of Veterinary Medicine, Foundation, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany*

* Corresponding author. Tel.: +49 173 9913469.

E-mail address: burk@rz.uni-leipzig.de (J. Burk).

★ Preliminary results were presented as a poster at the World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany, december 2011 (Burk et al., 2011).

Abstract

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are a promising therapeutic tool for the treatment of equine tendon and other musculoskeletal injuries. While bone marrow is considered the 'gold standard' source of these cells, various other tissues contain MSCs with potentially useful features. The aim of this study was to compare clinically relevant characteristics of MSCs derived from bone marrow, umbilical cord blood and tissue and from adipose tissue and tendon. Cell yield, proliferation, migration, tendon marker expression and differentiation into adipocytes, chondrocytes and osteoblasts was assessed, quantified and compared. Numbers of MSCs obtained from adipose, tendon or umbilical cord tissue were 222-fold higher than those obtained from bone marrow or cord blood. Those cells derived from tendon and adipose tissue exhibited most rapid proliferation. Osteogenic differentiation was most prominent in MSCs derived from bone marrow, and was weak in MSCs derived from umbilical cord blood and tissue. In contrast, the highest levels of chondrogenic differentiation were observed in MSCs derived from these sources. Collagen 1A2 expression was highest in adipose- and tendon-derived MSCs, while scleraxis expression was highest in cord blood- and in tendon-derived MSCs. The findings indicate that MSCs from different sources display significantly diverse properties, which may impact on their therapeutic application.

Keywords: Horse; Mesenchymal stromal cell (MSC); Differentiation; Tendon

Introduction

The treatment of equine orthopaedic conditions with mesenchymal stromal cell (MSC)-based regenerative therapies has gained growing attention in the last decade. Evidence to date suggests these cells improve regeneration in tissues with poor healing properties through their ability to: self-renew; differentiate towards several mesodermal lineages; supply growth factors; and release immunomodulatory cytokines (Richardson et al., 2007; Stewart and Stewart, 2011). Various experimental and clinical studies have demonstrated that the treatment of tendon injuries with MSCs results in significantly improved re-arrangement of the collagen fibres and considerably reduces re-injury rates compared to conventional treatment (Smith et al., 2003; Pacini et al., 2007; Nixon et al., 2008; Smith, 2008; Schnabel et al., 2009; Crovace et al., 2010; Godwin et al., 2011). Furthermore, some studies suggest a beneficial effect of MSCs in the treatment of osteoarthritis (Wilke et al., 2007; McIlwraith et al., 2011).

Currently, bone marrow (BM) and adipose tissue (AdT) are the most commonly used sources of MSCs in equine regenerative medicine. However, MSCs with promising features have also been identified in other tissues (Ribitsch et al., 2010), and taking advantage of these alternative sources might further improve MSC therapy.

Equine MSCs derived from umbilical cord blood (UCB) or tissue (UCT) were first characterised by Koch et al. (2007) and Hoynowski et al. (2007), respectively. In addition to the advantage of non-invasive collection, it is hypothesised that, because these umbilicus-derived cells express markers associated with an embryonic phenotype (Hoynowski et al., 2007; Reed and Johnson, 2008), they may provide a pool of more primitive progenitor cells with broader differentiation capacities (Moretti et al., 2010). Furthermore, human UCB-MSCs have longer telomeres than BM-MSCs and might therefore have a longer lifespan than other adult MSCs (Kogler et al., 2004).

Tendon-derived MSCs (Td-MSCs) may be more similar to the tenocyte phenotype than MSCs derived from other sources, potentially making them suitable for the treatment of tendon injuries. Stewart et al. (2009) demonstrated that when seeded on cell-free tendon scaffolds, the viability and collagen III mRNA expression of equine tendon-derived cells were greater than their BM-derived equivalents, although the trilineage differentiation potential of these cells was not investigated in this study. In mice and rabbits, Td-MSCs can form tendon-like tissue *in vivo*, in addition to being able to differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes *in vitro* (Salingcarnboriboon et al., 2003; Bi et al., 2007; Zhang and Wang, 2010). Although recently, cells isolated from equine tendons have been shown to display the capacity to trilineage differentiation (Lovati et al., 2011a), studies on equine Td-MSCs remain rare, despite the intensive research into the use of MSCs in the treatment of tendon injuries in the horse (Smith et al., 2003; Pacini et al., 2007; Nixon et al., 2008; Smith, 2008; Schnabel et al., 2009; Crovace et al., 2010; Godwin et al., 2011).

While studies have confirmed the *in vitro* multipotency of equine MSCs derived from different sources, controversy exists concerning the proliferative capacity, life-span, and trilineage differentiation potential of various MSC cell lines (Toupadakis et al., 2010; Lovati et al., 2011b; Vidal et al., 2011), and comprehensive comparative studies are rare. Furthermore, to our knowledge, no studies comparing the tendon regeneration potential of MSCs from different sources have been published. Similarly, although considered to be central to the successful 'homing' and engraftment of MSCs in

vivo (Li et al., 2009), the migration potential of equine MSCs derived from different sources has not been assessed. The aim of this study was to comparatively characterise equine MSCs from BM, AdT, UCB, UCT and TdT, with an emphasis on the assessment of properties such as cell proliferation, migration, differentiation and tendon marker expression, which might influence the outcome of MSC therapy.

Materials and methods

Sample collection

Samples of UCB and UCT were collected from 12 foals immediately after birth at the Saxonian Horse Stud (Saechsisches Hauptgestuet), Graditz, Germany, and at The Large Animal Clinic for Theriogenology and Ambulatory Services, University of Leipzig, Germany. The umbilical cord was clamped, the cord vein was punctured and UCB was collected into heparinised syringes (500 IU Heparin-Na/mL, B. Braun Melsungen AG). Subsequently, a 10 cm length of the umbilical cord was obtained, washed in ethanol, iodine and saline solution, and placed in PBS (PAA Laboratories GmbH), supplemented with 500 IU/mL penicillin, 0.5 mg/mL streptomycin (5 % penicillin-streptomycin, PAA Laboratories GmbH), 0.05 mg/mL gentamycin (Invitrogen) and 2.5 µg/mL amphotericin (Invitrogen) for transportation.

Bone marrow was collected from 12 adult horses (median age, 4.5 years; interquartile range, 11.0) according to standard surgical procedures. Briefly, the horses were sedated, the sternal region was prepared aseptically and following local anaesthesia, the sternum was punctured with an 11 G bone marrow aspiration needle and a sample was aspirated into a heparinised syringe. Seven of these horses were subsequently euthanised, 6 g of SC AdT was harvested from the supragluteal region, and a 5 cm length of TdT was taken from the mid-metacarpal region of the superficial digital flexor tendon.

Samples were stored at room temperature and processed within 24 h. All procedures were approved by the local ethics committee (Landesdirektion Leipzig, A 13/10).

Isolation and culture of MSCs

Mononuclear cells (MNCs) were separated from UCB and BM by standard density gradient centrifugation (327 *g* at 20 °C for 30 min) using a polysaccharide solution (Ficoll-Paque Premium, GE Healthcare). Prior to processing the solid tissue samples (UCT, AdT, and TdT), UCT was dissected from the cord vessels and TdT was separated from the paratenon. Subsequently, tissues were minced and digested in a collagenase I solution (Invitrogen) (Table 1). Isolated MNCs were seeded into culture flasks containing low concentration glucose (1 g/L) Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Invitrogen), supplemented with 20 % fetal bovine serum (FBS) (Sigma Aldrich), 100 IU/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin (1 % penicillin-streptomycin) and 0.05 mg/mL gentamycin. The seeding density of MNCs was approximately 500,000 MNCs/cm² for UCB- and BM-MNCs and approximately 50,000 MNCs/cm² for MNCs from the

solid tissues, respectively. For the UCB and UCT cell cultures, 0.5 µg amphotericin/mL of medium was added until first passaging.

Cells were allowed to attach for 2 days under standard culture conditions (37 °C and 5 % CO₂), and were then washed with PBS to remove non-adherent MNCs. Medium was changed twice weekly until the colonies were confluent, at which time MSCs were trypsinised. After first passaging, MSCs from eight UCB, eight UCT, 10 BM and seven AdT and TdT samples were used for all further experiments. The remaining samples were used in experiments unrelated to this study.

Expansion and proliferation assays

To assess MSC expansion and generation times (GTs), passage (P) 1 to P7 MSCs from all sources were seeded at a density of 3,000 MSCs/cm². Cell cultures were checked daily and the medium changed twice weekly, until cells were 80 % confluent and MSCs were passaged by trypsinisation. Population doubling rates (PDs) and GTs were calculated as follows:

$$PD = (\text{cell count harvest}/\text{cell count seeding})/\ln 2$$

$$GT = 1/(\text{PD}/\text{days in culture})$$

As some samples underwent senescence (defined as having a negative PD before P8), a Kaplan-Meier analysis of sample survival was performed, and only non-senescent samples were included in the PD and GT calculations. At P3 and P8, a tetrazolium (MTS) assay (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay, Promega) was performed to evaluate cell proliferation rates (PRs). The MSCs were seeded in 96 well plates (1000 cells/well). At days 1 and 7, MTS reagent was added and formazan production was assessed photometrically, according to the manufacturer's instructions. PRs were calculated using the following formula:

$$PR = \text{optical density day 7}/\text{optical density day 1}$$

Spheroid culture and migration assay

Passage 3 MSCs were cultured in 'hanging drops' (5000 cells/drop) for 24 h until spheroid formation was observed. Spheroids were then harvested, seeded and cultured under standard conditions, which allowed MSC migration from the spheroids onto the culture plates. After another 24 h, the migration area was determined (Fig. 1).

Trilineage differentiation assays

For adipogenic differentiation, P3 MSCs were incubated in adipogenic differentiation medium (DMEM-F12 [PAA

Laboratories GmbH], supplemented with 15 % rabbit serum, 1 μ M dexamethasone, 100 μ M indomethacin, 500 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine, 700 nM bovine insulin [all Sigma Aldrich], and antibiotics) for 3 days. The intensity of adipogenic differentiation was assessed by two 'blinded' observers using a scoring system based on Oil Red O staining (Gittel et al., 2011) (Table 2). For osteogenic differentiation, P3 MSCs were cultured in osteogenic differentiation medium (DMEM-F12 supplemented with 10 % FBS, 100 μ M L-ascorbate-2-phosphate, 10 mM β -glycerophosphate, 100 nM dexamethasone [all Sigma Aldrich] and antibiotics) for 21 and 35 days, followed by von Kossa staining. For positively-stained samples, the index of osteogenic differentiation (IOD) was determined as described by Ostanin et al. (2008). Briefly, optical densities of stained differentiated and control samples were measured photometrically ($\lambda=492$ nm) and the IOD calculated as follows:

$$\text{IOD} = \text{optical density (differentiated)} / \text{optical density (control)}$$

Chondrogenic differentiation of P3 MSCs was performed in pellet culture as described by Giovannini et al. (2008). Chondrogenic differentiation medium consisted of high concentration glucose (4.5 g/L) DMEM (PAA Laboratories GmbH), 10 ng/mL human TGF- β 1 (Acris Antibodies), 1 % ITS+ premix (BD Biosciences), 100 nM dexamethasone, 100 μ M L-ascorbate-2-phosphate, 400 μ M proline (Sigma Aldrich) and antibiotics. After incubation for 21 days, paraffin sections were prepared and stained with Alcian blue and Masson's Trichrome stains. Qualitatively positive samples were further stained with Safranin O and evaluated by two 'blinded' observers using the 'Bern score' based on three criteria: uniformity and darkness of the Safranin O stain; distance between cells and amount of matrix accumulated; and cell morphology (Grogan et al., 2006).

Non-induced MSCs from different sources were used as negative controls for each of the stains (data not shown).

Real Time RT-PCR

mRNA from the P3 MSCs was isolated and transcribed into cDNA using commercially available kits (RNeasy Mini Kit and Omniscript RT Kit, Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Primers for GAPDH (forward, 5'-CCAGAACATCATCCCTGCTT-3'; reverse, 5'-CGTATTTGGCAGCTTTCTCC-3') and collagen 1A2 (forward, 5'-GAAGATGGTCACCCTGAAAA-3'; reverse, 5'-AGGTTACCCTTCACACCTG-3') were designed using Primer3 online software. The scleraxis primers (forward, 5'-ACAGAAAGACGGCGATTCGGAGTT-3'; reverse, 5'-AAAGTTCCAGTGGGTCTGGGCAA-3') had previously been evaluated at the Institute of Anatomy, University of Veterinary Medicine, Foundation, Hannover. Quantitative RT-PCR was performed using a SYBR green master mix (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories). Genes were amplified in 40 cycles of 90 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems). Copy numbers were obtained from standard curves and normalised to GAPDH RNA expression.

Statistical analysis

Kruskal-Wallis one way analyses of variance and subsequent Mann-Whitney *U* tests were performed to analyse differences among the sample groups (IBM PASW Statistics 18 software). The level of significance was set at $\alpha = 0.05$.

Results

Sample collection and cell yield

Samples of UCB, UCT and BM were collected without adverse effects to the donors. Although a lower volume of BM was collected and processed compared to UCB, significantly higher total MNC yields were obtained from BM ($P < 0.01$). Furthermore, the numbers of MNCs obtained/g solid tissue (UCT, AdT, and TdT) varied significantly, with AdT providing the highest and UCT the lowest numbers (UCT vs. AdT, $P < 0.001$; UCT vs. TdT, $P < 0.01$) (Table 3). The isolation of MSCs with a fibroblast-like phenotype was achieved in all samples, with significant differences between the P0 culture times ($P < 0.01$). The MSC yield/seeded MNCs/days of culture (P0) was similar between UCB and BM samples and also within the solid tissue samples. However, the MSC yield from solid tissues was 222-fold higher than the yield from UCB and BM ($P < 0.001$) (Table 3). Two UCT-MSC samples had to be discarded due to bacterial or fungal contamination which became evident after MNC seeding.

Proliferation and migration of MSCs

The MSCs from all sources exhibited short GTs at P1, indicating rapid proliferation. With increasing passages, UCB- and BM-MSCs displayed lower replication rates while Ad-MSCs and Td-MSCs continued to proliferate rapidly, reaching P8 in a shorter period of time ($P < 0.01$) (Table 3). Furthermore, 6/8 UCB-MSC samples and 7/10 BM-MSC samples underwent senescence before P8 (Fig.2). Significant differences between the GTs of the different sample types were evident at P2, P3, P4 and P6, respectively ($P < 0.05$) (Fig.3). Proliferation rates, determined by MTS assays, supported the results obtained by calculation of PDs and GTs. However, differences in PRs were only significant at P8 ($P < 0.05$) (Fig.3).

MSCs from all sources formed spheroids when cultured in hanging drops and migrated from the spheroids after seeding. Ad- and Td-MSCs migrated faster than UCT- and BM-MSCs, covering a significantly larger area on the culture dish within 24 h ($P < 0.01$) (Table 4).

Trilineage differentiation

Cells from all sources contained intracellular lipid droplets, as visualised by Oil Red O staining, indicating early-stage

adipogenic differentiation (Fig.4). There were no significant differences between the different sample types, except between Td- and UCT-MSCs ($P < 0.05$) (Table 4). Osteogenic differentiation, marked by extracellular calcium deposition (Fig.4), was pronounced in BM-, Ad- and Td-MSCs at day 21 and increased further until day 35. In contrast, osteogenic differentiation was weak in UCB- and UCT-MSCs, and only UCT-MSCs showed a slight increase in this form of differentiation between day 21 and 35. In one UCT-MSC sample calcium deposition was not detectable at any timepoint. Median IOD values supported this observation and were significantly higher in BM-, Ad- and Td-MSCs at day 21 ($P \leq 0.01$) and 35 ($P < 0.05$) (Table 4).

Chondrogenic differentiation (Fig.5), as determined by Alcian blue and Masson's trichrome staining, was evident in all UCB- and UCT-MSCs, but only in 6/10 BM-MSC, 5/7 Ad-MSC, and 6/7 Td-MSC samples, respectively. The evaluation of Safranin O-stained sections of these qualitatively positive samples using the Bern score revealed that UCB-MSCs displayed the highest chondrogenic differentiation capacity, followed by UCT-MSCs, whereas BM-MSCs scored lowest. However, differences in this score were only significant between UCB- and BM-MSCs or Td-MSCs ($P < 0.05$ in each case) (Table 4).

Tendon marker expression

All MSC samples exhibited basal gene expression of collagen 1A2 and scleraxis (Fig.6). The highest levels of collagen 1A2 expression were found in Ad-MSCs, followed by Td-MSCs, whereas BM-MSCs had the lowest expression of collagen 1A2. Differences were significant between: Ad-MSCs and BM-MSCs ($P < 0.01$); Ad-MSCs and UCB-MSCs ($P < 0.05$); and between Td-MSCs and BM-MSCs ($P < 0.05$). Scleraxis was expressed at the highest levels in UCB-MSCs, followed by Td-MSCs. Differences in scleraxis expression were significant between UCB-MSCs and UCT-MSCs ($P < 0.001$).

Discussion

In this study, we compared the proliferation, migration, trilineage differentiation capacity and expression of tendon markers in equine MSCs derived from BM, AdT, UCB, UCT and TdT. Our results reveal significant differences between MSCs derived from these sources, indicating potential advantages and disadvantages for the use of each type of MSCs in particular clinical applications.

The number of readily available, viable MSCs plays a crucial role with regard to treatment success when autologous MSCs are used, as successful treatment requires the application of a sufficient quantity of MSCs shortly after the injury has occurred (Godwin et al., 2011). In addition to their importance in direct therapy, high cell yields and viability also facilitate the cryopreservation of these cells.

The present study was successful in isolating fibroblast-like MSCs using standard protocols in all samples, irrespective

of their source. However, MSC yields and proliferation were significantly higher in all solid tissues (UCT, AdT, and TdT) compared to BM and UCB. As not all samples used in this study were donor-matched, it should be considered that there might have been donor age-related effects on cell yield and proliferation. However, donor age did not correlate with cell yields or GTs (data not shown). Furthermore, our findings are consistent with a recently published study by Vidal et al. (2011) which specifically investigated population doubling and senescence of BM-, Ad- and UCT-MSCs, including the assessment of senescence markers and telomere lengths. Kern et al. (2006) reported that senescence ratios of human MSCs in early passages were highest in UCB-MSCs and lowest in Ad-MSCs. Interestingly, in the same study, UCB-MSCs that had not undergone early senescence replicated most rapidly and had the longest lifespan.

The ability of MSCs to migrate is fundamental to their systemic application (Li et al., 2009), and in supporting graft integration in local therapies. Guest et al. (2010) showed that BM-MSCs remained close to their site of injection in artificially-induced tendon lesions, unlike embryonic stem cells, which became widely distributed in the surrounding tissue. In the current study, we demonstrated that Td-, Ad- and UCB-MSCs migrate faster than BM-MSCs, suggesting their graft integration *in vivo* may be enhanced. We chose to combine migration assays with the spheroid culture of MSCs, as this technique has been shown to enhance differentiation potential (Wang et al., 2009). In clinical cases that do not require a scaffold, the injection of MSC spheroids might be a feasible approach in introducing viable MSCs with enhanced differentiation potential.

Multilineage potential was evident in all MSC samples, demonstrating the multipotential character of these cells, although not all samples followed all differentiation pathways. Significant differences were found in the osteogenic and chondrogenic differentiation potential of the cells, indicating that the source of the cells used may be important in the treatment of bone or cartilage defects.

As evaluated in previous experiments, UCB-MSCs demonstrated poor adipogenic differentiation when using standard protocols (Gittel et al., 2011), which is in accordance with Koch et al. (2007). Rabbit serum has been reported to enhance adipogenic differentiation (Janderova et al., 2003; Koch et al., 2007; Giovannini et al., 2008). We therefore used a differentiation medium supplemented with rabbit serum, which led to distinct adipogenic differentiation of all MSC samples within 3 days. Incubation with rabbit serum for a longer period, however, can lead to cell detachment (Gittel et al., 2011).

BM-MSCs exhibited particularly intense osteogenic differentiation, while UCB- and UCT-MSCs displayed comparatively little calcium deposition. Our findings support those of Toupadakis et al. (2011), who intensively characterised and compared the osteogenic differentiation potential of equine MSCs from different sources. However, albeit less than that of MSCs derived from other sources, the osteogenic potential of equine UCB- and UCT-MSCs has been shown (Hoynowski et al., 2007; Koch et al., 2007; Reed and Johnson, 2008; Passeri et al., 2009), and UCB-MSCs have formed bone-like matrices within hydroxyapatite scaffolds (Figueroa et al., 2011). Photometric measurement, according to Ostanin et al. (2008), could not detect any differences between differentiated and control samples of UCB- and UCT-MSCs, although only samples showing qualitative evidence of calcium deposition were included. However, as the optical density was significantly increased in differentiated BM-, Ad- and Td-MSC samples compared to their respective

controls, the IOD, although not a very sensitive parameter, was considered suitable to roughly quantify differences in osteogenic differentiation capacity.

Chondrogenic differentiation was most prominent in UCB-MSCs, as suggested by Berg et al. (2009). BM-MSCs displayed the weakest chondrogenic potential in the present study, although in other studies, intense chondrogenic differentiation was observed with equine BM-MSCs (Giovannini et al., 2008), which was even superior to that of Ad-MSCs (Vidal et al., 2008). Lovati et al. (2011) found evidence of weak chondrogenic differentiation in BM-MSCs but, contrary to our findings, could not induce chondrogenesis in UCT-MSCs. These conflicting results emphasise that the adjustment of culture conditions and differentiation media with respect to the origin of MSCs is essential in achieving optimal chondrogenesis.

One of the reasons this is the first study to compare the tendon regeneration potential of MSCs derived from different sources is the difficulty associated with achieving tenogenic differentiation (Hoffmann and Gross, 2007; Aslan et al., 2008; Butler et al., 2008). To date, there has only been one study that has attempted the tenogenic differentiation of equine MSCs, through exposure to BMP-12 (Violini et al., 2009). Not only is the induction of tenogenic differentiation challenging, but verification of this process is also complex, as there seems to be no clear demarcation between mature tenocytes and fibroblasts. Currently, gene expression analysis of tendon markers is most commonly used to identify tenogenic properties (Chen et al., 2008; Omae et al., 2009; Taylor et al., 2009; Park et al., 2010; Sharma and Snedeker, 2010). However, it must be considered that results obtained at an mRNA level do not always reflect protein expression by the cells in question.

In analysing gene expression markers in different musculoskeletal tissues, Taylor et al. (2009) found high expression of collagen 1A2 and scleraxis in equine tendon, suggesting these markers are suitable in the evaluation of tenogenesis. While the use of collagen 1A2, the most abundant protein in tendon extracellular matrix, as a tendon marker is self-evident, scleraxis plays a crucial role in tendon development (Schweitzer et al., 2001; Shukunami et al., 2006). In the present study, investigating basal tendon marker expression in undifferentiated, monolayer-cultured MSCs, Td-MSCs expressed both important markers, collagen 1A2 and scleraxis, at high levels contemporaneously. This supports the hypothesis that Td-MSCs, while also being capable of adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation, may be the optimal cell type for MSC-based tendon therapy.

Concerning autologous Td-MSC therapies, donor site morbidity is a major problem, especially when using the superficial digital flexor tendon as a cell source. Nevertheless, for autologous Td-MSC therapy, it is possible to harvest the tissue from less functionally essential tendons, such as the digital extensor tendons. Moreover, in veterinary medicine, allogeneic MSC application as an 'off-the-shelf' product has repeatedly been proposed. In the horse, the application of allogeneic BM- and placentally-derived MSCs did not lead to increased immune responses, compared to the application of autologous MSCs (Guest et al., 2008; Carrade et al., 2011). Furthermore, the clinical outcome of tendon therapy using either allogeneic or autologous Ad-MSCs, was equally favourable (Del Bue et al., 2008). However, the immunological properties of Td-MSCs remain to be investigated.

Analysis of surface marker expression patterns will have to provide further insights into the characteristics of equine MSCs from different sources. So far, the establishment of a uniform set of markers for equine MSCs, which corresponds to the criteria set for human MSCs (Dominici et al., 2006), remains elusive, as most commercially available antibodies do not recognise their corresponding equine epitopes (De Schauwer et al., 2011). However, initial studies in this area have proved promising (Braun et al., 2010, Radcliffe et al., 2010, Ranera et al., 2011; De Schauwer et al., 2012), and provide a platform from which we can further extend our understanding of equine stem cell biology.

Conclusions

Equine AdT contains high numbers of highly viable MSCs with reliable migration and differentiation capacities, and is therefore a convenient cell source for autologous or allogeneic regenerative therapies. However, in specific clinical settings, it may be beneficial to take advantage of MSC source-specific differentiation capacities. Although Td-MSCs may be especially suitable for tendon therapy, further in vivo studies will be required to substantiate our in vitro findings.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

The authors acknowledge: the Saxonian horse stud, Graditz, Germany; Prof. Dr. A. Sobiraj (Large Animal Clinic for Theriogenology and Ambulatory Services) and Dr. I. Vervuert (Institute of Animal Nutrition, Nutrition Diseases and Dietetics) for facilitating sample collection; Prof. Dr. A. Bader, Prof. Dr. P. Seibel (both at The Centre for Biotechnology and Biomedicine) and Prof. Dr. J. Seeger (Institute of Veterinary Anatomy) for kindly providing the laboratory facilities; Dr. U. Delling (Large Animal Clinic for Surgery), Dr. N. Hambruch and Dr. J. Haeger (both at The Institute of Anatomy, University of Veterinary Medicine, Foundation, Hannover, Germany) and K. Mutz (Institute of Technical Chemistry, Leibniz University, Hannover, Germany) for providing scientific and technical advice (all at University of Leipzig, Germany, unless otherwise stated). The work presented in this paper was made possible by funding from the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF, PtJ-Bio, 0315883), as well as from the Mehl-Muelhens Foundation, the Akademie fuer Tiergesundheit e.V. and the Studienstiftung des deutschen Volkes.

References

- Aslan, H., Kimelman-Bleich, N., Pelled, G., Gazit, D., 2008. Molecular targets for tendon neof ormation. *The Journal of Clinical Investigation* 118, 439-444.
- Berg, L., Koch, T., Heerkens, T., Bessonov, K., Thomsen, P., Betts, D., 2009. Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 22, 363-370.
- Bi, Y., Ehrichiou, D., Kilts, T.M., Inkson, C.A., Embree, M.C., Sonoyama, W., Li, L., Leet, A.I., Seo, B.M., Zhang, L., Shi, S., Young, M.F., 2007. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nature Medicine* 13, 1219-1227.
- Braun, J., Hack, A., Weis-Klemm, M., Conrad, S., Treml, S., Kohler, K., Walliser, U., Skutella, T., Aicher, W.K., 2010. Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research* 71, 1228-1236.
- Burk, J., Ribitsch, I., Gittel, C., Julke, H., Brehm, W., 2011. Comparison of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Regenerative Medicine* 6 (Suppl 2), 302-302.
- Butler, D.L., Juncosa-Melvin, N., Boivin, G.P., Galloway, M.T., Shearn, J.T., Gooch, C., Awad, H., 2008. Functional tissue engineering for tendon repair: A multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bioscaffolds, and mechanical stimulation. *Journal of Orthopaedic Research* 26, 1-9.
- Carrade, D.D., Owens, S.D., Galuppo, L.D., Vidal, M.A., Ferraro, G.L., Librach, F., Buerchler, S., Friedman, M.S., Walker, N.J., Borjesson, D.L., 2011. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placental derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy* 13, 419-430.
- Chen, Y.J., Huang, C.H., Lee, I.C., Lee, Y.T., Chen, M.H., Young, T.H., 2008. Effects of cyclic mechanical stretching on the mRNA expression of tendon/ligament-related and osteoblast-specific genes in human mesenchymal stem cells. *Connective Tissue Research* 49, 7-14.
- Crovace, A., Lacitignola, L., Rossi, G., 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. *Veterinary Medicine International* 2010, 250978.
- De Schauwer, S.C., Meyer, E., van de Walle, G.R., Van, S.A., 2011. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: A plea for uniformity. *Theriogenology* 75, 1431-1443.
- De Schauwer, C., Piepers, S., van de Walle, G.R., Demeyere, K., Hoogewijs, M.K., Govaere, J.L., Braeckmans, K., Van, S.A., Meyer, E., 2012. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry Part A* 81, 312-323.

- Del Bue, M., Ricco, S., Ramoni, R., Conti, V., Gnudi, G., Grolli, S., 2008. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: Their association in vitro and in vivo. *Veterinary Research Communications* 32 (Suppl 1), S51-S55.
- Dominici, M., Le, B.K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Figuroa, R.J., Koch, T.G., Betts, D.H., 2011. Osteogenic differentiation of equine cord blood multipotent mesenchymal stromal cells within coralline hydroxyapatite scaffolds in vitro. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 24, 354-362.
- Giovannini, S., Brehm, W., Mainil-Varlet, P., Nestic, D., 2008. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation* 76, 118-129.
- Gittel, C., Burk, J., Ribitsch, I., Brehm, W., 2011. Efficiency of adipogenic differentiation methods in mesenchymal stromal cells from diverse sources. *Regenerative Medicine* 6 (Suppl 2), 203-203.
- Godwin, E.E., Young, N.J., Dudhia, J., Beamish, I.C., Smith, R.K., 2011. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal* 44, 25-32.
- Grogan, S.P., Barbero, A., Winkelmann, V., Rieser, F., Fitzsimmons, J.S., O'Driscoll, S., Martin, I., Mainil-Varlet, P., 2006. Visual histological grading system for the evaluation of in vitro-generated neocartilage. *Tissue Engineering* 12, 2141-2149.
- Guest, D.J., Smith, M.R., Allen, W.R., 2008. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Veterinary Journal* 40, 178-181.
- Guest, D.J., Smith, M.R., Allen, W.R., 2010. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal* 42, 636-642.
- Hoffmann, A. and Gross, G., 2007. Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches. *International Orthopaedics* 31, 791-797.
- Hoynowski, S.M., Fry, M.M., Gardner, B.M., Leming, M.T., Tucker, J.R., Black, L., Sand, T., Mitchell, K.E., 2007. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362, 347-353.

- Janderova, L., McNeil, M., Murrell, A.N., Mynatt, R.L., Smith, S.R., 2003. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obesity Research* 11, 65-74.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., Bieback, K., 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294-1301.
- Koch, T.G., Heerkens, T., Thomsen, P.D., Betts, D.H., 2007. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnology* 7, 26.
- Kogler, G., Sensken, S., Airey, J.A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R.V., Fischer, J., Rosenbaum, C., Greschat, S., Knipper, A., Bender, J., Degistirici, O., Gao, J., Caplan, A.I., Colletti, E.J., Meida-Porada, G., Muller, H.W., Zanjani, E., Wernet, P., 2004. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *The Journal of Experimental Medicine* 200, 123-135.
- Li, G., Zhang, X.A., Wang, H., Wang, X., Meng, C.L., Chan, C.Y., Yew, D.T., Tsang, K.S., Li, K., Tsai, S.N., Ngai, S.M., Han, Z.C., Lin, M.C., He, M.L., Kung, H.F., 2009. Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta: Implication in the migration. *Proteomics* 9, 20-30.
- Lovati, A.B., Corradetti, B., Lange, C.A., Recordati, C., Bonacina, E., Bizzaro, D., Cremonesi, F., 2011a. Characterization and differentiation of equine tendon-derived progenitor cells. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 25, S75-S84.
- Lovati, A.B., Corradetti, B., Lange, C.A., Recordati, C., Bonacina, E., Bizzaro, D., Cremonesi, F., 2011b. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Veterinary Research Communications* 35, 103-121.
- McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Rodkey, W.G., Kisiday, J.D., Werpy, N.M., Kawcak, C.E., Steadman, J.R., 2011. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy* 27, 1552-1561.
- Moretti, P., Hatlapatka, T., Marten, D., Lavrentieva, A., Majore, I., Hass, R., Kasper, C., 2010. Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues: Primitive cells with potential for clinical and tissue engineering applications. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* 123, 29-54.
- Nixon, A.J., Dahlgren, L.A., Haupt, J.L., Yeager, A.E., Ward, D.L., 2008. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *American Journal of Veterinary Research* 69, 928-937.
- Omae, H., Zhao, C., Sun, Y.L., An, K.N., Amadio, P.C., 2009. Multilayer tendon slices seeded with bone marrow stromal cells: a novel composite for tendon engineering. *Journal of Orthopaedic Research* 27, 937-942.

- Ostanin, A.A., Petrovskiy, Y.L., Shevela, E.Y., Kurganova, E.V., Drobinskaja, A.N., Dobryakova, O.B., Lisukova, E.V., Chernykh, E.R., 2008. A new approach to evaluation of osteogenic potential of mesenchymal stromal cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 146, 534-539.
- Pacini, S., Spinabella, S., Trombi, L., Fazzi, R., Galimberti, S., Dini, F., Carlucci, F., Petrini, M., 2007. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Engineering* 13, 2949-2955.
- Park, A., Hogan, M.V., Kesturu, G.S., James, R., Balian, G., Chhabra, A.B., 2010. Adipose-derived mesenchymal stem cells treated with growth differentiation factor-5 express tendon-specific markers. *Tissue Engineering Part A* 16, 2941-2951.
- 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., Coli, A., 2009. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biology International* 33, 100-105.
- Radcliffe, C.H., Flaminio, M.J., Fortier, L.A., 2010. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells and Development* 19, 269-282.
- Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vazquez, F.J., Remacha, A.R., Bernal, M.L., Zaragoza, P., Rodellar, C., Martin-Burriel, I., 2011. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 144, 147-154.
- Reed, S.A., Johnson, S.E., 2008. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *Journal of Cellular Physiology* 215, 329-336.
- Ribitsch, I., Burk, J., Dellling, U., Geissler, C., Gittel, C., Julke, H., Brehm, W., 2010. Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* 123, 219-263.
- Richardson, L.E., Dudhia, J., Clegg, P.D., Smith, R., 2007. Stem cells in veterinary medicine-attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends in Biotechnology* 25, 409-416.
- Salingcarnboriboon, R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Obinata, M., Amagasa, T., Nifuji, A., Noda, M., 2003. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Experimental Cell Research* 287, 289-300.
- Schnabel, L.V., Lynch, M.E., van der Meulen, M.C., Yeager, A.E., Kornatowski, M.A., Nixon, A.J., 2009. Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of Orthopaedic Research* 27, 1392-1398.

- Schweitzer, R., Chyung, J.H., Murtaugh, L.C., Brent, A.E., Rosen, V., Olson, E.N., Lassar, A., Tabin, C.J., 2001. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* 128, 3855-3866.
- Sharma, R.I. and Snedeker, J.G., 2010. Biochemical and biomechanical gradients for directed bone marrow stromal cell differentiation toward tendon and bone. *Biomaterials* 31, 7695-7704.
- Shukunami, C., Takimoto, A., Oro, M., Hiraki, Y., 2006. Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Developmental Biology* 298, 234-247.
- Smith, R.K., 2008. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disability and Rehabilitation* 30, 1752-1758.
- Smith, R.K., Korda, M., Blunn, G.W., 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 Veterinary Journal* 35, 99-102.
- Stewart, A.A., Barrett, J.G., Byron, C.R., Yates, A.C., Durgam, S.S., Evans, R.B., Stewart, M.C., 2009. Comparison of equine tendon-, muscle-, and bone marrow-derived cells cultured on tendon matrix. *American Journal of Veterinary Research* 70, 750-757.
- Stewart, M.C. and Stewart, A.A., 2011. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27, 243-261.
- Taylor, S.E., Vaughan-Thomas, A., Clements, D.N., Pinchbeck, G., Macrory, L.C., Smith, R.K., Clegg, P.D., 2009. Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems. *BMC Musculoskeletal Disorders* 10, 27.
- Toupadakis, C.A., Wong, A., Genetos, D.C., Cheung, W.K., Borjesson, D.L., Ferraro, G.L., Galuppo, L.D., Leach, J.K., Owens, S.D., Yellowley, C.E., 2010. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *American Journal of Veterinary Research* 71, 1237-1245.
- Vidal, M.A., Robinson, S.O., Lopez, M.J., Paulsen, D.B., Borkhsenius, O., Johnson, J.R., Moore, R.M., Gimble, J.M., 2008. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Surgery* 37, 713-724.
- Vidal, M.A., Walker, N.J., Napoli, E., Borjesson, D.L., 2011. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells and Development* 21, 273-283.
- Violini, S., Ramelli, P., Pisani, L.F., Gorni, C., Mariani, P., 2009. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biology* 10, 29.

Wang, W., Itaka, K., Ohba, S., Nishiyama, N., Chung, U.I., Yamasaki, Y., Kataoka, K., 2009. 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 30, 2705-2715.

Wilke, M.M., Nydam, D.V., Nixon, A.J., 2007. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *Journal of Orthopaedic Research* 25, 913-925.

Zhang, J., Wang, J.H., 2010. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes. *BMC Musculoskeletal Disorders* 11, 10.

Table 1:

Conditions for tissue digestion for mononuclear cell isolation from solid tissues. Collagenase I concentrations and incubation times were evaluated in previous experiments (data not shown). Tissue digestion was performed at 37 °C with continuous shaking. UCT, umbilical cord tissue; AdT, adipose tissue; TdT, tendon tissue.

| | Collagenase I /mL | Incubation time |
|-----|-------------------|-----------------|
| UCT | 2.4 mg | 6 h |
| AdT | 0.8 mg | 4 h |
| TdT | 5.6 mg | 6 h |

Table 2:

Semi-quantitative scoring system used in the evaluation of adipogenic differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs).

| % of differentiated cells of all MSCs in 10x magnification field | | Size and arrangement of lipid droplets | |
|--|-------------|--|--|
| 0 | 0 – 5 % | 0 | No droplets |
| 1 | >5 – 50 % | 1 | Predominantly isolated and small (<1/3 of nuclear diameter) |
| 2 | >50 – 80 % | 2 | Predominantly medium-sized (approximately 1/3 of nuclear diameter) surrounding nucleus |
| 3 | >80 – 100 % | 3 | Predominantly large (>1/3 of nuclear diameter) merging around nucleus |

Table 3:

Cell yields and culture times. Data presented as medians (interquartile range). MSC, mesenchymal stromal cell; MNC, mononuclear cell; UCB, umbilical cord blood; BM, bone marrow; UCT, umbilical cord tissue; AdT, adipose tissue; TdT, tendon tissue.

| | Processed sample volume / wet weight | Mononuclear cell yield total | Mononuclear cell yield/ tissue unit | Days P0 | MSC yield/ MNCs /days | Days until P8 * |
|------------|--------------------------------------|---|---|-------------------------------|--|-----------------------------|
| UCB | 146 mL (30 mL) | 18.7 x 10 ⁶ (13.0 x 10 ⁶) | 1.1 x 10 ⁵ /mL (0.9 x 10 ⁵ /mL) | 11.5 (5.25) ^{d, e} | 1.1 x 10 ⁻³ (17.9 x 10 ⁻³) | 82.5 (16.5) ^{d, e} |
| BM | 32.5 mL (20 mL) | 46.0 x 10 ⁶ (33.1 x 10 ⁶) ^a | 11.3 x 10 ⁵ /mL (8.6 x 10 ⁵ /mL) ^a | 14.0 (3.0) ^{c, d, e} | 1.5 x 10 ⁻³ (1.5 x 10 ⁻³) | 72.0 (32.0) ^{d, e} |
| UCT | 5.2 g (0.5 g) | 0.8 x 10 ⁶ (1.8 x 10 ⁶) | 1.6 x 10 ⁵ /g (3.4 x 10 ⁵ /g) | 10.0 (3.75) ^{d, e} | 275.0 x 10 ⁻³ (362.3 x 10 ⁻³) ^{a, b} | 60.0 (26.5) |
| AdT | 5.6 g (0.9 g) | 9.7 x 10 ⁶ (10.3 x 10 ⁶) | 17.8 x 10 ⁵ /g (15.5 x 10 ⁵ /g) ^c | 6.0 (1.5) | 251.4 x 10 ⁻³ (265.3 x 10 ⁻³) ^{a, b} | 59.0 (17.0) |
| TdT | 5.2 g (0.4 g) | 3.6 x 10 ⁶ (2.3 x 10 ⁶) | 6.8 x 10 ⁵ /g (5.7 x 10 ⁵ /g) ^c | 7.0 (1.5) | 280.6x 10 ⁻³ (216.7 x 10 ⁻³) ^{a, b} | 53.0 (8.5) |

^a significantly higher values compared to UCB.

^b significantly higher values compared to BM.

^c significantly higher values compared to UCT.

^d significantly higher values compared to AdT.

^e significantly higher values compared to TdT.

* Samples that underwent senescence before P8 not included.

Table 4:

Results of migration and trilineage differentiation assays. Data presented as medians (interquartile range). For quantification of osteogenic and chondrogenic differentiation intensity, only samples with qualitative evidence of differentiation were included. MSC, mesenchymal stromal cell; UCB-MSC, umbilical cord blood-derived MSC; BM-MSC, bone marrow-derived MSC; UCT-MSC, umbilical cord tissue-derived MSC; AdT-MSC, adipose tissue-derived MSC; TdT-MSC, tendon-derived MSC.

| | Migration area (mm ²) | Adipogenic differentiation score | Osteogenic differentiation index (day 21) | Osteogenic differentiation index (day 35) | Chondrogenic differentiation score |
|---------|-----------------------------------|----------------------------------|---|---|------------------------------------|
| UCB-MSC | 0.161 (0.267) | 5.0 (1.5) | 1.10 (0.48) | 0.97 (0.71) | 6.000 (4.500) ^{c, d} |
| UCT-MSC | 0.090 (0.124) | 4.5 (1) | 1.02 (0.22) | 1.21 (0.28) | 3.500 (1.500) |
| BM-MSC | 0.097 (0.186) | 5.0 (2.25) | 3.65 (3.04) ^{a, b} | 6.78 (4.18) ^{a, b} | 1.000 (2.625) |
| AdT-MSC | 0.237 (0.033) ^b | 5.5 (0) | 2.24 (0.62) ^{a, b} | 3.72 (1.50) ^{a, b} | 2.500 (0.750) |
| TdT-MSC | 0.352 (0.213) ^{b, c} | 5.5 (0) ^b | 2.83 (1.24) ^{a, b} | 4.26 (1.47) ^{a, b} | 1.875 (2.750) |

^a significantly higher values compared to UCB-MSCs.

^b significantly higher values compared to UCT-MSCs.

^c significantly higher values compared to BM-MSCs.

^d significantly higher values compared to Td-MSCs.

Fig. 1.:

Migration assay by spheroid culture of tendon derived mesenchymal stromal cells (MSCs). Attachment of the spheroid 4 h after seeding (a), and MSC migration 12 h (b), and 24 h (c), after seeding, respectively. At 24 h, the area covered by the remaining spheroid (area B) was measured and subtracted from the area covered by migrating MSCs including the spheroid (A), to determine the migration area (d). Scale bars as indicated.

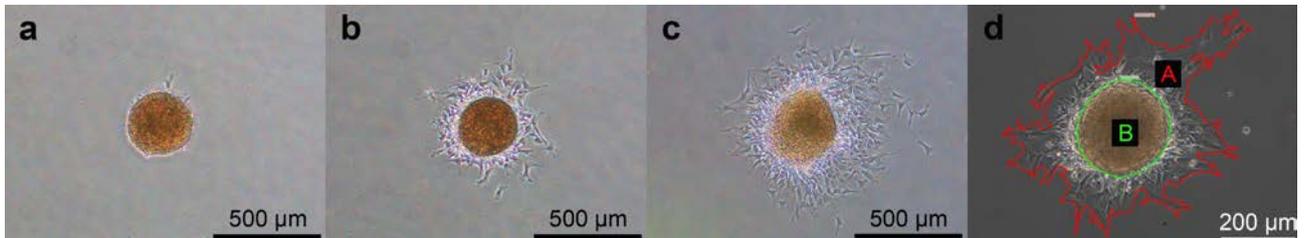


Fig.2. :

Kaplan-Meier plot of cell survival (cumulative sample survival vs. time of senescence). MSC, mesenchymal stromal cell; UCB-MSC, umbilical cord blood-derived MSC; BM-MSC, bone marrow-derived MSC; UCT-MSC, umbilical cord tissue-derived MSC; Ad-MSC, adipose tissue-derived MSC; Td-MSC, tendon-derived MSC.

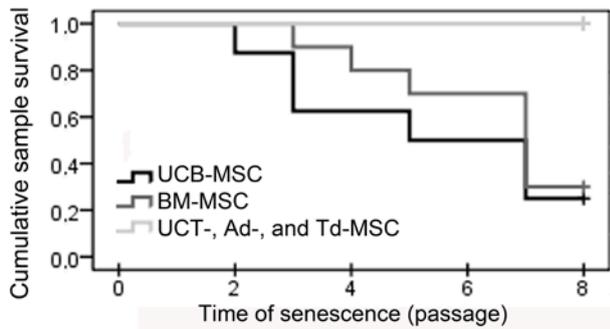


Fig.3. :

Left boxplot: generation times (GTs) of mesenchymal stromal cells (MSCs) (passage [P] 1 - 7). Black arrows indicate significantly shorter GTs compared to umbilical cord blood (UCB)-MSCs, light-coloured arrows indicate significantly shorter GTs compared to UCB-MSCs and bone marrow (BM)-MSCs. Right boxplot: proliferation rates of MSCs (P3 and P8). Arrows indicate significantly higher values compared to UCB-MSCs, UCT-MSCs and BM-MSCs. Circle indicates mild outlier; star indicates extreme outlier. MSC, mesenchymal stromal cell; UCB-MSC, umbilical cord blood-derived MSC; BM-MSC, bone marrow-derived MSC; UCT-MSC, umbilical cord tissue-derived MSC; Ad-MSC, adipose tissue-derived MSC; Td-MSC, tendon-derived MSC.

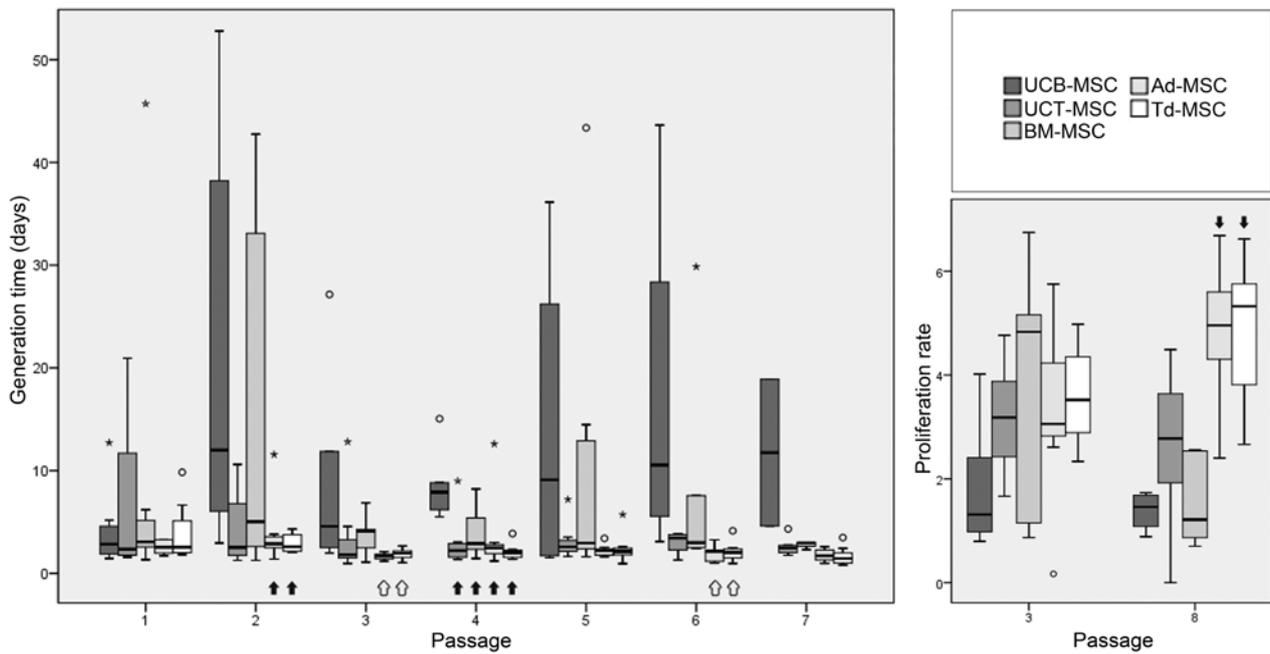


Fig.4. :

Representative photographs of adipogenic and osteogenic differentiation. Intracellular lipid droplets following induction of adipogenic differentiation, visualised by Oil Red O staining, and extracellular calcium deposition following induction of osteogenic differentiation, visualised by von Kossa (v. Kossa) staining, respectively. MSC, mesenchymal stromal cell; UCB-MSC, umbilical cord blood-derived MSC; BM-MSC, bone marrow-derived MSC; UCT-MSC, umbilical cord tissue-derived MSC; Ad-MSC, adipose tissue-derived MSC; Td-MSC, tendon-derived MSC. Scale bars as indicated.

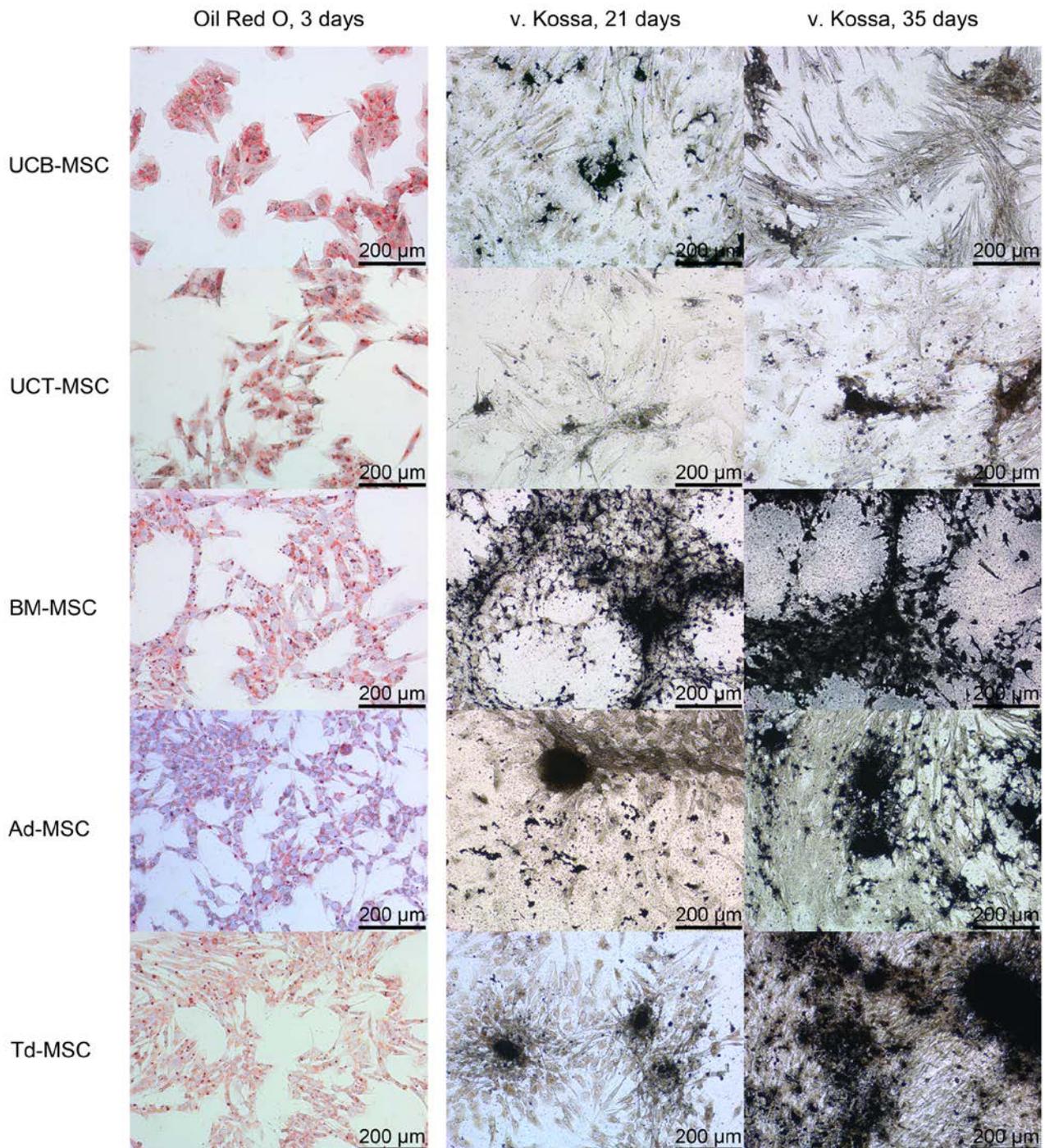


Fig.5.:

Representative photographs of chondrogenic differentiation in pellet culture 21 days after induction. Glycosaminoglycans or collagen visualised by Alcian Blue and Safranin O or Masson's trichrome staining, respectively. MSC, mesenchymal stromal cell; UCB-MSC, umbilical cord blood-derived MSC; BM-MSC, bone marrow-derived MSC; UCT-MSC, umbilical cord tissue-derived MSC; Ad-MSC, adipose tissue-derived MSC; Td-MSC, tendon-derived MSC. Scale bars as indicated.

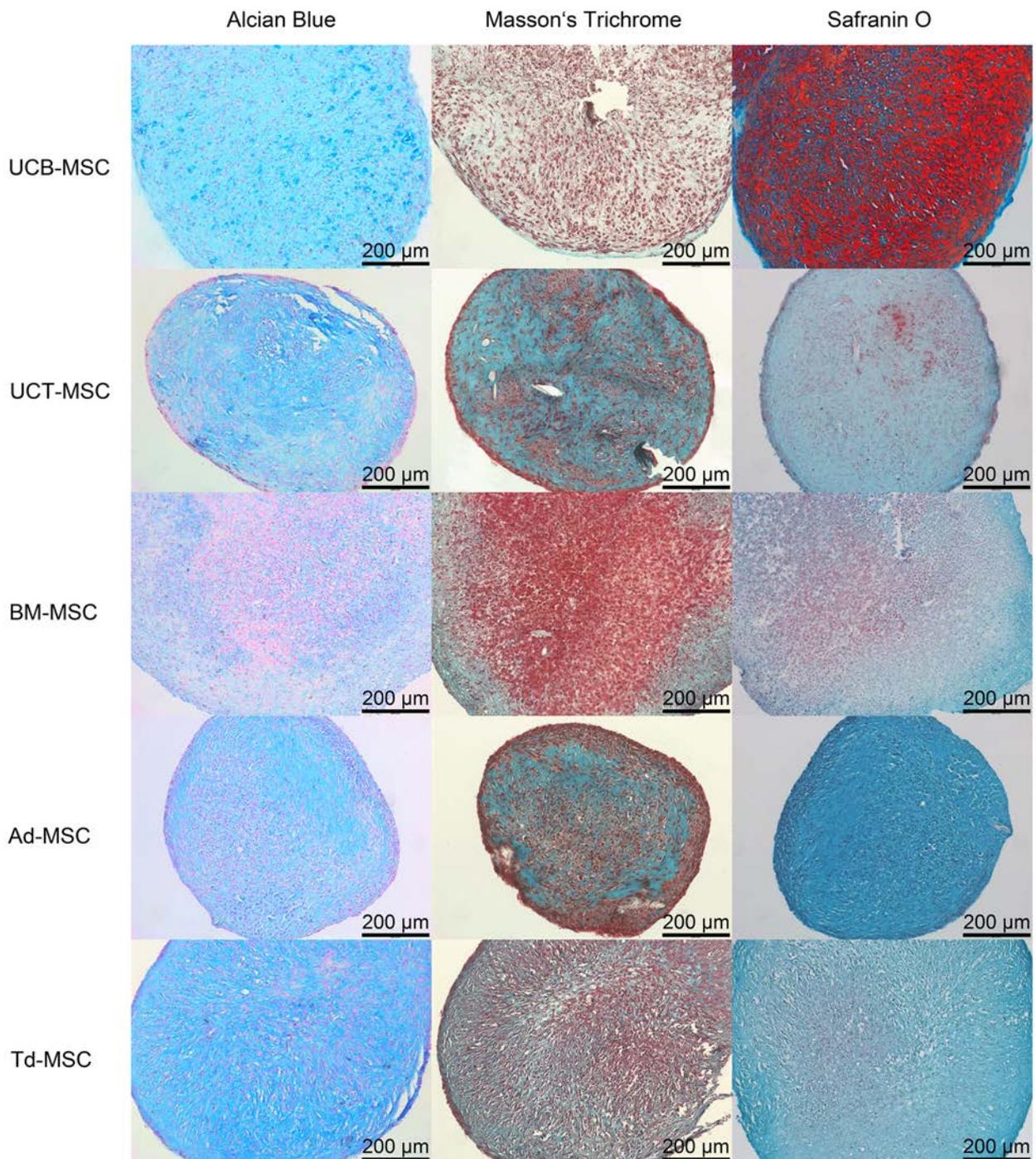
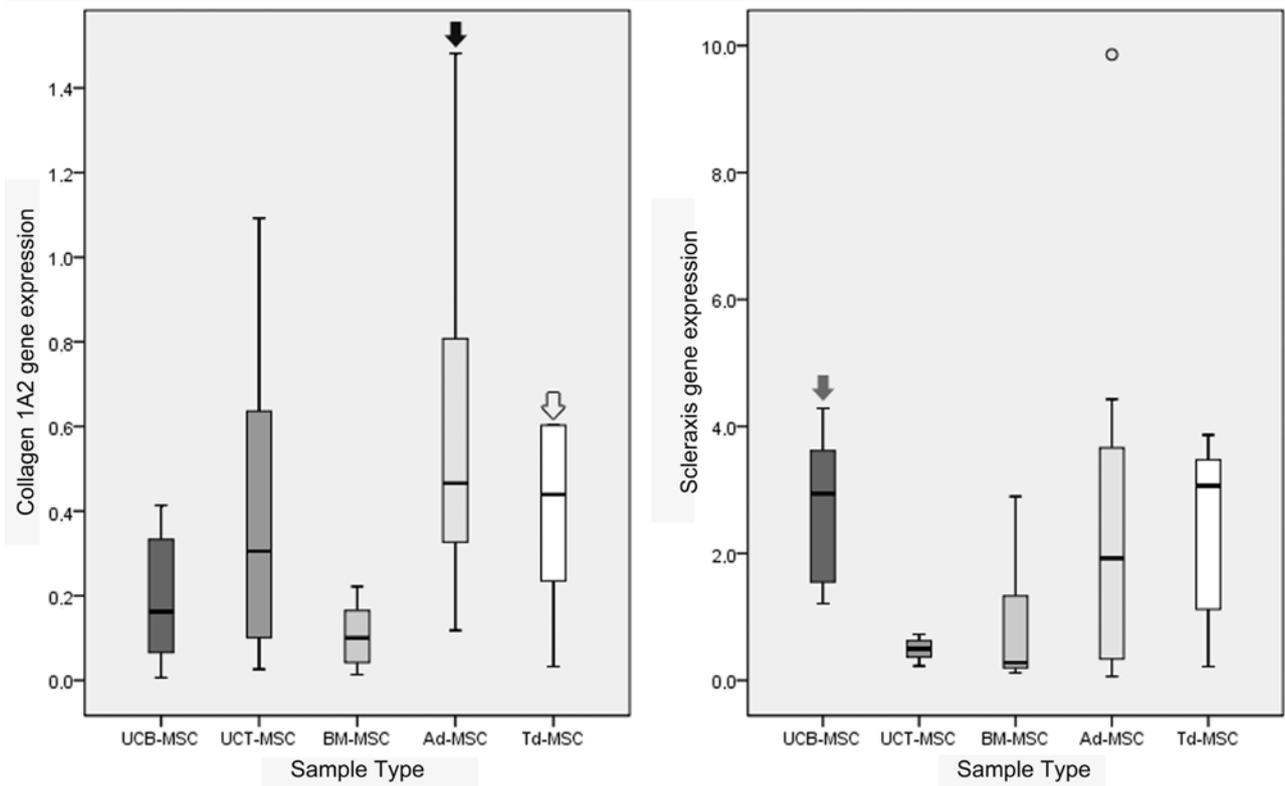


Fig.6. :

Gene expression of collagen 1A2 and scleraxis, normalised to GAPDH. Black arrow indicates significantly higher expression compared to umbilical cord blood (UCB)-mesenchymal stromal cell (MSCs) and bone marrow (BM)-MSCs. Light-coloured arrow indicates significantly higher expression compared to BM-MSCs, and grey arrow indicates significantly higher expression compared to umbilical cord tissue (UCT)-MSCs. Circle indicates mild outlier. UCT-MSC, umbilical cord tissue-derived MSC; Ad-MSC, adipose tissue-derived MSC; Td-MSC, tendon-derived MSC.



5 DISKUSSION

5.1 REFLEXION VON MATERIAL UND METHODEN

5.2.1 PUBLIKATION 1

Die in der klinischen Fallstudie (Publikation 1) veröffentlichten Ergebnisse basieren auf einer retrospektiven Auswertung von Patientendaten, die in den Jahren 2005 und 2006 erhoben wurden.

Die Patientenpopulation war relativ heterogen, wobei die Verteilung von Rasse, Alter und Nutzungsrichtung der Tiere sowie auch von Erkrankungsstadium (akut, chronisch oder rezidivierend) und Lokalisation der Erkrankung aber vermutlich als repräsentativ für die allgemein in Deutschland mit Sehnenerkrankungen vorstellig werdenden Patienten angesehen werden kann. Dennoch beeinträchtigt diese Heterogenität selbstverständlich die Genauigkeit des Ergebnisses, betrachtet man alle Pferde gemeinsam. Die Fallzahlen von 98 Pferden insgesamt bzw. von 58 Pferden mit Langzeitergebnissen erlauben zwar zunächst eine Aufteilung in zu vergleichende Gruppen nach bestimmten Parametern, wie beispielsweise nach Patientenalter, aber keinesfalls eine Aufteilung in Gruppen, die hinsichtlich aller Parameter homogen sind. Am Beispiel der Auswertung des Ergebnisses nach Altersgruppen wird diese Problematik besonders deutlich: Hier zeigten die jüngeren Pferde ein ungünstigeres Ergebnis als Pferde mittleren Alters (75 % vs. 88,9 % erfolgreich behandelt), was bisherigen Vermutungen und Angaben in der Literatur (GODWIN et al. 2012) widerspricht, aber auch höchstwahrscheinlich damit zu begründen ist, dass sich in der Gruppe der jüngeren Pferde vor allem Rennpferde befanden, die bekanntlich eine ungünstigere Prognose haben als andere Sportpferde (DYSON 2004). Ungeachtet dieser Tatsache führt bei den vorliegenden Fallzahlen selbst die Aufteilung nach jeweils einzelnen Parametern schon dazu, dass die statistische Teststärke nicht ausreicht, um Aussagen über die Signifikanz des Ergebnisses zu treffen. Trotz der genannten Nachteile ermöglichte die zur Verfügung stehende Patientenpopulation, erste auf mehreren Fällen (n = 57) basierende Daten hinsichtlich des zu erwartenden Behandlungserfolges der MSC-Therapie bei Fesselträgererkrankungen zu erheben.

Diagnostik, Behandlung und Nachkontrollen der Sehnenerkrankungen wurden von verschiedenen mitwirkenden Tierärzten durchgeführt, während die Aufbereitung der MSCs stets im selben Labor stattfand. Auch die Besitzerkommunikation, auf die sich in den meisten Fällen die Beurteilung des Erkrankungsstadiums stützt, wurde durch die behandelnden Kollegen durchgeführt. Eine

vollständige Standardisierung des Ablaufs von Diagnostik und Behandlung war unter den klinischen Bedingungen nicht realisierbar. Diese Umstände führten vermutlich trotz enger Kooperation mit den beteiligten Tierärzten zu gewissen interindividuellen Unterschieden in der Einschätzung von Diagnose und Behandlungserfolg durch die verschiedenen Kollegen. Um hier eine höhere Genauigkeit zu erzielen, wäre es von großem Vorteil gewesen, wenn sämtliche Untersuchungen und Behandlungen nach standardisierten Abläufen von einer einzelnen, erfahrenen Person durchgeführt worden wären. Allerdings war es nur durch den multizentrischen Charakter dieser Fallstudie, der aus logistischen Gründen die Einbeziehung mehrerer Untersucher erforderte, möglich, eine größere Anzahl von Fällen beurteilen zu können.

Das Fehlen einer echten Kontrollgruppe stellt ein weiteres Defizit der Studie dar. Allgemein liegt die Auswahl der Behandlungsstrategie in der Regel letztlich beim Besitzer des Patienten. Besonders bezüglich der Behandlungsoption mit MSCs, die bei vielen durch die Laienpresse geprägten Menschen entweder auf große Begeisterung oder aber große Abneigung stößt, erscheint es daher unerlässlich, die Patientenbesitzer offen über die Behandlungsstrategie zu beraten. Dies macht aber eine randomisierte Zuordnung der Patienten zu potentiellen Behandlungs- bzw. Kontrollgruppen praktisch unmöglich. Publikationen zur MSC-Behandlung equiner Sehnenerkrankungen von anderen Autoren, die ebenfalls darum bemüht waren, die Ergebnisse möglichst vieler Fälle zusammenzustellen, berichten ebenfalls von der Schwierigkeit, eine geeignete Kontrollgruppe mitzuführen (SMITH 2008; GODWIN et al. 2012). Um diesem Problem zu begegnen, wurden in diesen wie auch der vorliegenden Studie die Ergebnisse bzw. die erhobenen Rezidivraten mit bereits in der Literatur vorliegenden Daten zur konservativen Sehnenbehandlung (DYSON 2004; O'MEARA et al. 2010) verglichen. GODWIN et al. (2012) passten dabei ihr Studiendesign weitestgehend an die Studien von DYSON (2004) und O'MEARA et al. (2010) an, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen, was in der vorliegenden Studie aufgrund ihres retrospektiven Charakters nicht vollständig möglich war. Der Vergleich mit Ergebnissen aus bereits vorliegenden Studien kann aber in jedem Fall nur als Zwischenlösung angesehen werden. Um definitive Aussagen über den Einfluss der MSCs auf den Heilungserfolg treffen zu können, ist nach wie vor eine randomisierte, kontrollierte klinische Studie in großem Umfang erforderlich. Diese sollte, geht man beispielsweise von einer Rezidivrate von 30 % in der Behandlungsgruppe und von 55 % in der Kontrollgruppe aus, mindestens 100 Tiere pro Gruppe einschließen, um genügend statistische Teststärke zu besitzen (SMITH und MCILWRAITH 2012). Bei der zunehmenden Popularität der Behandlung ist zu hoffen, dass eine solche Studie in näherer Zukunft realisierbar ist.

5.2.2 PUBLIKATION 2

Die Studie zur vergleichenden Charakterisierung equiner MSCs aus verschiedenen Quellen (Publikation 2) wurde *in vitro* unter Verwendung von jeweils mindestens sieben Proben pro Zellquelle durchgeführt.

Von den als Donorpferden dienenden Fohlen wurden jeweils Nabelschnurblut und Nabelschnurgewebe gleichzeitig gewonnen. Knochenmark wurde von lebenden, adulten Donorpferden gewonnen, von denen einige Tiere in Rahmen einer anderen Studie euthanasiert wurden; von diesen euthanasierten Tieren wurden gepaarte Proben von Fett- und Sehnengewebe gewonnen. Somit wurde zwar eine größtmögliche Paarung der Proben angestrebt, um bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, eine vollständige Paarung aller Proben war jedoch nicht realisierbar, da die Fohlen nicht für eine invasive Probennahme zur Verfügung standen. Mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Mann-Whitney-U Test wurden bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse ausschließlich Tests für ungepaarte Proben verwendet, um die unvollständige Paarung der Proben zu berücksichtigen.

Nabelschnurblut und -gewebe wurden im Sächsischen Hauptgestüt Graditz und in der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Universität Leipzig gewonnen. Die Entnahme des Materials ist gut praktikabel und führt zu keinerlei Komplikationen bei Stute oder Fohlen, was auch durch andere Studien bestätigt wird (BARTHOLOMEW et al. 2009). Die Verwendung von Nabelschnurblut oder -gewebe als Quelle für MSCs ist demnach hinsichtlich des Kriteriums der Invasivität der Probennahme empfehlenswert. Allerdings bestehen hohe Anforderungen an das Management des Abfohlbetriebes, da die Probennahme unmittelbar nach der Geburt erfolgen und somit eine mit dem Ablauf der Probennahme vertraute Person während der Geburt anwesend sein muss. Bei der Gewinnung von Nabelschnurgewebe zu Zellkulturzwecken stellt außerdem die unsterile Umgebung des Geburtskanals und speziell beim Pferd hinzukommend die unsterile Stallumgebung eine Herausforderung dar, weil sie zu Kontaminationen des Probenmaterials führen. Es wurde berichtet, dass nur Proben, die für 24 Stunden in Medium, das 5 % Penicillin-Streptomycin und 2 % Amphotericin B enthielt, gelagert wurden, für die Zellkultur geeignet waren, während sofort verarbeitete Proben oder solche, die in Medium mit geringerem Penicillin-Streptomycin-Gehalt von 2 % gelagert wurden, aufgrund von Kontaminationen entsorgt werden mussten (PASSERI et al. 2009). Andere Autoren empfehlen eine Desinfektion des Nabelschnurgewebes mit Chlorhexidin und anschließende Lagerung in antibiotikahaltigem Medium, führen aber nicht näher aus, ob trotz dieser Vorgehensweise Kontaminationen in ihren

Proben vorlagen, und nur die in dieser Studie gleichzeitig gewonnenen Nabelschnurblutproben wurden einer mikrobiologischen Untersuchung unterzogen (BARTHOLOMEW et al. 2009). In der vorliegenden Studie wurden alle Nabelschnurgewebe-Proben direkt nach der Gewinnung in drei Zyklen desinfiziert, jeweils bestehend aus drei Minuten 70 % Ethanol und drei Minuten alkoholischer 1 % Povidon-Jod Lösung. Anschließend wurden die Proben in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und bis zur Verarbeitung über Nacht in phosphatgepufferter Salzlösung gelagert, mit Zusatz von 5 % Penicillin-Streptomycin, 0,1 % Gentamycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B, was den jeweiligen von den Herstellern empfohlenen Höchstkonzentrationen dieser Antibiotika bzw. Antimykotika für die Zellkultur entspricht. Außerdem wurde das Zellkulturmedium für alle aus Nabelschnurblut und -gewebe isolierten Zellen bis zur ersten Passage zusätzlich zu den immer verwendeten Antibiotika (1 % Penicillin-Streptomycin und 0,1 % Gentamycin) mit 0,5 µg/ml Amphotericin B supplementiert. Trotz dieser gründlichen antiseptischen Vorgehensweise mussten zwei der zwölf Zellkulturen aus Nabelschnurgewebe aufgrund von bakterieller oder fungaler Kontamination entsorgt werden. Dies zeigt, dass die hier angewendete antiseptische Vorgehensweise immer noch unzureichend war.

Knochenmark und Fettgewebe wurden nach allgemein für die klinische Anwendung üblichen Methoden gewonnen. Fettgewebe wurde zwar hier erst im Anschluss an die Euthanasie der Tiere entnommen, allerdings so, wie es auch am stehenden Pferd üblicherweise durchgeführt wird, mittels Hautinzision lateral des Schweifansatzes. Somit wurden für die Entnahme dieser bereits gut als MSC-Quelle etablierten Gewebe Methoden verwendet, die gewährleisten, dass das zu untersuchende Material dem bereits in klinischer Anwendung befindlichen Material entspricht.

Sehnengewebe wurde von frisch euthanasierten Tieren aus der oberflächlichen Beugesehne im mittleren Bereich des Röhrbeins gewonnen. Dies ist für potentielle klinische Anwendungen autologen Materials nicht möglich, da die oberflächliche Beugesehne für den Bewegungsablauf des Pferdes essentiell ist. In der vorliegenden Studie wurde dennoch diese Sehne als Zellquelle gewählt, da während der Planungsphase der Studie noch keinerlei Publikationen zu equinen MSCs aus Sehnengewebe existierten und es als sinnvoll anzusehen war, zunächst gerade MSCs aus der oberflächlichen Beugesehne, die Ziel der meisten klinischen Anwendungen ist, zur vergleichenden Charakterisierung der Zellen heranzuziehen. Interessanterweise verwendeten auch LOVATI et al. (2011a), die zur selben Zeit eine Studie zur Charakterisierung equiner Progenitorzellen aus Sehnengewebe durchführten, die oberflächliche Beugesehne als Zellquelle. Für die klinische Anwendung von MSCs aus Sehnengewebe ist zum einen die Verwendung autologen Materials aus der „Spatsehne“ (Endsehne des M. tibialis cranialis) oder der Endsehne des Zehenstreckers (M.

extensor digitalis communis) denkbar, zum anderen die Verwendung von allogenem Material. Die Applikation allogener MSCs aus Knochenmark bzw. Plazenta führte beim Pferd zu keiner vermehrten Immunreaktion im Vergleich zur Applikation autologer MSCs (GUEST et al. 2008; CARRADE et al. 2011). Daher ist für die klinische Anwendung beim Pferd die Verwendung allogener MSCs gut denkbar und wird viel diskutiert, da hierdurch eine MSC-Therapie ohne durch die Zellanzucht bedingte zeitliche Verzögerung und zu einem günstigeren Preis ermöglicht würde. Die immunologischen Eigenschaften equiner MSCs aus Sehngewebe sind allerdings noch unbekannt und müssten vor ihrer allogenen Anwendung untersucht werden.

Für Isolierung und Anzucht der MSCs aus verschiedenen Quellen sowie für die Berechnung von Zellverdopplungsraten und Generationszeiten wurden weitestgehend Standardzellkulturmethoden verwendet, auf die daher hier nicht näher eingegangen wird. Wichtig zu erwähnen ist allerdings die Zusammensetzung des Zellkulturmediums, da diese in Voruntersuchungen einen maßgeblichen Einfluss auf den Isolierungserfolg von MSCs aus Nabelschnurblut zeigte. Da sowohl für humanes als auch equines Material beschrieben wurde, dass nicht aus allen Nabelschnurblutproben MSCs isoliert werden konnten (KERN et al. 2006; KOCH et al. 2007; SECCO et al. 2008; SCHUH et al. 2009), wurde in dieser Arbeit angestrebt, den Zellisolierungserfolg durch die Optimierung des Kulturmediums zu verbessern. Daher wurden im Rahmen der Voruntersuchungen Colony-forming-units-Assays und Zellverdopplungsassays mit mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut durchgeführt, unter Verwendung verschiedener Konzentrationen von Glukose und Fötalem Kälberserum (FCS) im Kulturmedium. Die besten Ergebnisse wurden mit Medium, das 1 g/l Glukose und 20 % FCS enthielt, erzielt, welches daraufhin für die vorliegende Studie ausgewählt wurde. Mit diesem Medium konnten in dieser Studie aus allen vorhandenen Proben MSCs isoliert und angezchtet werden, was speziell für MSCs aus Nabelschnurblut einen sehr guten Erfolg und eine Verbesserung gegenüber den oben genannten bisherigen Studien darstellt.

Der MTS-Assay wurde durchgeführt, um neben den Generationszeiten weitere Daten zur Zellproliferation zu erhalten. Das hier verwendete, kommerziell erhältliche Assay-Kit entspricht in seinem Prinzip dem klassischen MTT-Assay, erlaubt aber die photometrische Bestimmung der Anzahl proliferierender Zellen in Kultur, beruhend auf einer vom Energiestoffwechsel der Zellen abhängigen Umwandlung der enthaltenen Tetrazolium-Verbindung in ein kolorimetrisch messbares Formazan-Produkt. Allgemein unterstützten die mittels MTS-Assay erhaltenen Ergebnisse die über Berechnung der Generationszeiten erhaltenen Aussagen zur Zellproliferation. Allerdings waren die messbaren Unterschiede in der dritten Passage kleiner als erwartet und nicht signifikant. Dies ist vermutlich damit zu begründen, dass die schnell proliferierenden MSCs aus Fett- und

Sehnengewebe in der dritten Passage bei der Messung am siebten Tag bereits höchst konfluent waren, somit aufgrund der Kontaktinhibition nicht mehr aktiv proliferieren konnten und daher in geringerem Ausmaß mittels MTS-Reagenz detektierbar waren. Damit ist das nach Herstellerprotokoll verwendete MTS-Assay Kit für den Vergleich von sehr unterschiedlich schnell proliferierenden Zellen nur begrenzt geeignet. Dennoch konnten mit dieser Methode Daten gewonnen werden, die die Ergebnisse des klassischen Zellverdopplungs-Assays zufriedenstellend unterstützten.

Das Migrationspotential der MSCs wurde im Sphäroid-Zellkultursystem untersucht. Durch die Dreidimensionalität dieses Kultursystems wurden einerseits Bedingungen geschaffen, die der in-vivo-Situation besser entsprechen als die Monolayer-Kultur. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass die Kultivierung in Sphäroiden das Differenzierungspotential von MSCs erhöht (WANG et al. 2009). Andererseits ist das Sphäroidkultursystem sehr attraktiv, da die von den MSCs gebildeten Sphäroide sehr kleine, mit bloßem Auge eben noch erkennbare Gebilde darstellen, die sich durch hohe Stabilität auszeichnen. Somit ist es für die in-vivo-Applikation von MSCs sehr gut denkbar, die Zellen als dreidimensionale Sphäroid-Zellverbände zu applizieren, was vermutlich die Überlebensfähigkeit und das Differenzierungspotential der MSCs gegenüber der Applikation einzelner, suspensierter Zellen verbessern würde. Diese Option für die MSC-Applikation setzt jedoch voraus, dass die Zellen in vivo nicht im Sphäroid verbleiben, sondern daraus auswandern und sich in das umliegende Gewebe integrieren können. Dass dies möglich ist, konnte durch den vorliegenden Versuchsaufbau bestätigt werden.

Für die Untersuchung des adipogenen Differenzierungspotentials wurde ein zuvor evaluiertes, modifiziertes Protokoll verwendet, da in der Literatur beschrieben wurde, dass sich equine MSCs aus Nabelschnurblut bei Verwendung von Standardprotokollen nicht adipogen differenzieren konnten (KOCH et al. 2007). Hierfür wurden im Rahmen der Voruntersuchungen zur vorliegenden Studie verschiedene Protokolle für die adipogene Differenzierung an equinen MSCs aus verschiedenen Quellen getestet. Insbesondere wurde die Verwendung von Kaninchenserum anstelle von FCS evaluiert, da berichtet wurde, dass dies die adipogene Differenzierbarkeit von MSCs verbessert (JANDEROVA et al. 2003; KOCH et al. 2007; GIOVANNINI et al. 2008). Tatsächlich war das Ergebnis der Differenzierung in MSCs aus allen Quellen bei Verwendung von Kaninchenserum signifikant besser, während die Zugabe anderer Supplemente, u. a. Insulin, einen geringeren Einfluss auf das Ergebnis hatte. Außerdem ergab sich durch die Verwendung von mit Kaninchenserum supplementiertem Medium eine kürzere Inkubationszeit von nur drei Tagen, im Gegensatz zu den sonst üblichen 21 Tagen, da bereits nach drei Tagen deutliche Lipidvakuolen

innerhalb der Zellen nachweisbar waren, nach einem längeren Zeitraum aber die Zellen eine Tendenz zur Ablösung von den Kulturschalen zeigten.

Für die quantitative Auswertung von mit Oil Red O angefärbten Proben ist es allgemein üblich und in der Literatur beschrieben (JANDEROVA et al. 2003), das Oil Red O aus den angefärbten Lipidvakuolen mittels Isopropanol herauszulösen und anschließend seinen Gehalt photometrisch zu bestimmen. Diese Methode erwies sich allerdings für die hier untersuchten Probentypen als unzuverlässig, da während der adipogenen Differenzierung eine sehr unterschiedlich schnelle Proliferation der Zellen vorlag und so zum Auswertungszeitpunkt stark variierende Zellzahlen in den Kulturschalen anzutreffen waren. Somit war der Oil Red O Gehalt im Isopropanol bei sehr konfluenten Proben hoch, auch wenn in den einzelnen Zellen nur wenige, kleine Lipidvakuolen zu finden waren. Andersherum war der Oil Red O Gehalt in weniger konfluenten Proben niedrig, auch wenn die einzelnen Zellen alle große Lipidvakuolen enthielten. Daher wurde während der Voruntersuchungen zur adipogenen Differenzierung ein Scoresystem für die semiquantitative Auswertung der mit Oil Red O gefärbten Proben entwickelt. Die Ergebnisse dieser Auswertungsmethode erwiesen sich auch zwischen verschiedenen Beobachtern als reproduzierbar.

Für die Untersuchung der osteogenen und chondrogenen Differenzierungskapazität konnten in der Literatur beschriebene Differenzierungsprotokolle (GIOVANNINI et al. 2008) und semiquantitative Auswertungsverfahren (GROGAN et al. 2006; OSTANIN et al. 2008) verwendet werden. Die osteogene Differenzierung wurde allerdings nicht nur, wie allgemein üblich, nach 21 Tagen ausgewertet, sondern zusätzlich auch nach 35 Tagen, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob sich die nur mäßige Differenzierung von MSCs aus Nabelschnurblut und –gewebe nach einer längeren Inkubationszeit verbessert. Tatsächlich war dies der Fall bei MSCs aus Nabelschnurgewebe, allerdings nur in sehr geringem Ausmaß, so dass in Zukunft die Differenzierung über 21 Tage als ausreichend aussagekräftig angesehen werden kann.

Die Untersuchung des Sehnenregenerationspotentials in vitro stellt, im Gegensatz zur tripotenten Differenzierung in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten, nach wie vor eine große Herausforderung dar, da die Mechanismen der tenogenen Differenzierung komplex und noch nicht vollständig verstanden sind. Ausschlaggebend ist bisherigen Erkenntnissen zufolge eine Kombination von Wachstumsfaktoren aus der Transforming Growth Factor Beta Superfamilie, intrazellulären Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren wie Smad8 und Skleraxis, aber auch mechanischer Dehnung und einer geeigneten Umgebung, die in vitro in Form von Scaffoldmaterialien realisiert werden muss (BAGNANINCHI et al. 2007; HOFFMANN und

GROSS 2007; BUTLER et al. 2008; ASLAN et al. 2008). Zwar wurde die tenogene Differenzierung equiner MSCs aus Knochenmark berichtet, als Nachweis diente in dieser Studie jedoch mangels spezifischer histologischer Färbemethoden lediglich die längliche Morphologie der Zellen sowie die rein qualitativ nachgewiesene Genexpression von Decorin und Tenomodulin (VIOLINI et al. 2009). Die Morphologie von Tenozyten in Monolayer-Kultur ist jedoch wenig spezifisch und die verwendeten Marker Decorin und Tenomodulin werden auch in anderen muskuloskelettalen Geweben exprimiert (TAYLOR et al. 2009), was eine Quantifizierung der Genexpression unerlässlich erscheinen lässt. Da insgesamt zwar einige verschiedene vielversprechende Ansätze (ALTMAN et al. 2002; WANG et al. 2005; KUO und TUAN 2008; VIOLINI et al. 2009; PARK et al. 2010), aber noch kein wiederholt aufgegriffenes und damit gut etabliertes Protokoll für die tenogene Differenzierung publiziert wurde, wurde es für die vorliegende Studie als zuverlässiger angesehen, zunächst die Basisgenexpression von Sehnenmarkern in undifferenzierten MSCs zu untersuchen, um erste vergleichende Aussagen zum Sehnenregenerationspotential der Zellen zu treffen. Als Marker wurden Kollagen 1A2 und Skleraxis herangezogen, da diese beiden Marker in nativem, equinem Sehngewebe auf hohem Level exprimiert werden (TAYLOR et al. 2009). Außerdem spielen sowohl Kollagen 1A2 als auch Skleraxis eine wichtige Rolle bei der Tenogenese, Kollagen vom Typ I als wichtigste Komponente der Extrazellulärsubstanz (BANOS et al. 2008; THORPE et al. 2010) und Skleraxis als zentraler Transkriptionsfaktor (SCHWEITZER et al. 2001; SHUKUNAMI et al. 2006).

Um Anspruch auf Vollständigkeit hinsichtlich der Charakterisierung der MSCs aus verschiedenen Quellen erheben zu können, wäre neben den in der vorliegenden Studie untersuchten Kriterien auch die Analyse der Oberflächenmarkerexpression von Bedeutung gewesen. Während solche Untersuchungen im Durchflusszytometer an humanem oder murinem Material seit einigen Jahren routinemäßig durchgeführt werden und die Definition humaner MSCs das Vorhandensein bzw. Fehlen bestimmter Marker mit einschließt (DOMINICI et al. 2006), steht diese Vorgehensweise beim Pferd jedoch noch einigen Herausforderungen gegenüber (DE SCHAUWER et al. 2011). Diese sind vor allem darin begründet, dass für Spezies, die nicht routinemäßig als Labortiere verwendet werden, kaum spezifische Antikörper kommerziell erhältlich sind. Antikörper, die für die Verwendung bei anderen Spezies hergestellt wurden, kreuzreagieren aber nur in wenigen Fällen verlässlich mit equinem Material (IBRAHIM et al. 2007). Mittlerweile existieren erste Studien, die sich grundlegend mit der Oberflächenmarkerexpression equiner MSCs befassen und erste richtungsweisende Vorschläge für die Etablierung eines einheitlichen Markersets liefern (RADCLIFFE et al. 2010; BRAUN et al. 2010; RANERA et al. 2011; DE SCHAUWER et al.

2012). Aufbauend auf diesen Studien sollte in naher Zukunft daran gearbeitet werden, auch für equine MSCs eine einheitliche Definition, die ihr Oberflächenmarkerexpressionsmuster mit einschließt, zu finden. Mit dem heutigen Kenntnisstand erscheint es aufgrund der genannten Schwierigkeiten allerdings zunächst zuverlässiger, MSCs der Spezies Pferd primär über ihre Plastikadhärenz und ihr tripotentes Differenzierungspotential zu definieren. Nur so ist gewährleistet, dass für die Identifikation der Zellen ausschließlich gut etablierte Methoden verwendet werden, was zu einer besseren Vergleichbarkeit von Studien aus verschiedenen Arbeitsgruppen beiträgt. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Studie auf die Untersuchung der Oberflächenmarkerexpression verzichtet und statt dessen angestrebt, die klinisch relevanten Charakteristika der MSCs mit reproduzierbaren Methoden zu untersuchen, um fundierte Ergebnisse als Grundlage für vergleichende Aussagen zu den MSCs aus verschiedenen Quellen zu erhalten.

5.2 KLINISCHE ANWENDUNG VON MSCs ZUR BEHANDLUNG VON SEHNENERKRANKUNGEN BEIM PFERD

Vorrangiges Ziel der ersten in diese Dissertation eingeschlossenen Studie war es, die klinischen Ergebnisse von Pferden, die aufgrund von Sehnen- und Bänderkrankungen mit autologen MSCs aus Knochenmark behandelt worden waren, zusammenzustellen, und dabei erstmalig auch Langzeitergebnisse für die MSC-Behandlung von Fesselträgererkrankungen zu erheben. Die Fallstudie lieferte das Ergebnis, dass die Behandlung von Sehnen- und Bänderkrankungen mit MSCs bei 84,5 % von 58 Pferden nach einem Jahr Beobachtungszeitraum als erfolgreich einzustufen war. Dieses im Hinblick auf die allgemein eher vorsichtig zu stellende Prognose von Sehnenkrankungen als sehr vielversprechend zu beurteilende Resultat liegt in derselben Größenordnung wie Ergebnisse aus anderen klinischen Studien zur MSC-Therapie equiner Sehnenkrankungen, die von 9 von 10 erfolgreich behandelten Pferden (PACINI et al. 2007) bzw. Rezidivraten von 18 % (SMITH 2008) oder 27,4 % (GODWIN et al. 2012) unter allen über den Beobachtungszeitraum verfolgbaren Patienten berichteten.

Während aber diese Studien hauptsächlich Rennpferde und ausschließlich Erkrankungen der oberflächlichen Beugesehne mit einbezogen hatten (PACINI et al. 2007; SMITH 2008; GODWIN et al. 2012), waren 70,5 % der in die hier vorliegende Studie aufgenommenen Patienten Reitpferde verschiedener Nutzungsrichtungen, von denen die Mehrheit (71 %) an Fesselträgererkrankungen litt. An dieser für Deutschland repräsentativeren Patientenpopulation konnte gezeigt werden, dass die MSC-Therapie auch bei der Behandlung von Fesselträgererkrankungen zu guten Ergebnissen

führt; die Erfolgsraten waren mit 84,2 % für Erkrankungen der Oberflächlichen Beugesehne und 83,3 % für Fesselträgererkrankungen, unabhängig von der Lokalisation innerhalb des Fesselträgers betrachtet, fast identisch.

Im Gegensatz zu diesen guten Ergebnissen nach MSC-Behandlung werden in einem Review-Artikel zur Tendinitis der Oberflächlichen Beugesehne allgemein Rezidivraten von bis zu 80 % beschrieben (DOWLING et al. 2000). Die von DYSON (2004) angeführten Rezidivraten nach Erkrankungen der Oberflächlichen Beugesehne lagen bei 44,2 bis 44,4 % nach konservativer Therapie, Behandlung mit Hyaluronsäure oder polysulfatierten Glykosaminoglykanen, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Behandlungsregimes zu finden waren ($p > 0,9$). O'MEARA et al. (2010) berichtete von Rezidiven bei 53 % aller in die Studie eingeschlossenen Pferde, die aufgrund von Erkrankungen der Oberflächlichen Beugesehne entweder mit intraläsionaler Injektion von Insulin-like Growth Factor Typ 1, traditionellem „Brennen“ oder Durchtrennung des Unterstützungsbandes behandelt worden waren.

Somit ist nach bislang vorliegender Literatur die Prognose von Erkrankungen der Oberflächlichen Beugesehne nach MSC-Behandlung deutlich besser einzustufen als nach anderen Behandlungsregimes. Einschränkend bezüglich der Vergleichbarkeit der hier angeführten Studien ist jedoch, dass zumeist unterschiedliche Beobachtungszeiträume gewählt wurden, die in der eigenen Fallstudie sowie bei SMITH (2008) kürzer waren als bei den zum Vergleich herangezogenen Studien zu konventionellen Therapieregimes (DYSON 2004; O'MEARA et al. 2010). GODWIN et al. (2012) allerdings wählten einen Beobachtungszeitraum von mindestens zwei Jahren nach abgeschlossener Rehabilitation, um eine bessere Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse nach MSC-Behandlung zu den nach anderen Behandlungsregimes erhobenen Ergebnissen zu gewährleisten; auch in dieser Studie war der Behandlungserfolg nach MSC-Therapie mit einer Rezidivrate von 27,4 % besser als nach anderen Behandlungsregimes.

Für Fesselträgererkrankungen sind die in der Literatur zu findenden Ergebnisse bezüglich des Behandlungserfolges nach verschiedenen Therapieregimes zwar uneinheitlicher, aber ebenfalls ungünstiger als die Ergebnisse nach MSC-Behandlung, die in der hier vorliegenden Studie erhoben werden konnten. Außerdem ist eine Unterscheidung bezüglich der Lokalisation der Verletzung innerhalb des Fesselträgers sowie der betroffenen Gliedmaßen (vorn/hinten) erforderlich. Es wurde beschrieben, dass 63,2 % von Patienten, die aufgrund von Fesselträgererkrankungen entweder konservativ, chirurgisch, mittels Stoßwellentherapie oder durch lokale Injektion von Kortikosteroiden oder unaufbereitetem Knochenmark behandelt wurden, wieder gebrauchsfähig

wurden. Es konnten dabei weder signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Behandlungsregimes, noch zwischen verschiedenen betroffenen Bereichen des Fesselträgers oder zwischen betroffenen Gliedmaßen aufgezeigt werden. Tendenziell war das Ergebnis jedoch bei Erkrankungen an den Vordergliedmaßen mit 69,1 % wieder gebrauchsfähigen Pferden besser als bei Erkrankungen an den Hintergliedmaßen mit 58,1 % wieder gebrauchsfähigen Pferden. In einer anderen Publikation wird von einer noch deutlich geringeren Erfolgsrate für Pferde, bei denen eine Fesselträgerursprungsdesmopathie an den Hintergliedmaßen diagnostiziert worden war und die konservativ oder mit Glykosaminoglykanen behandelt worden waren, berichtet; nur vier dieser 32 Pferde wurden wieder voll im Sport eingesetzt (DYSON 1991).

In der vorliegenden Studie wurde gerade bei Fesselträgerursprungserkrankungen mit einer Erfolgsrate von 94,4 % nach MSC-Behandlung ein deutlich besseres Ergebnis erzielt, während Erkrankungen der Fesselträgerschenkel allerdings nur zu 62,5 % erfolgreich behandelt worden waren. Es ließ sich jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht erkennen, ob ein Unterschied zwischen Vorder- und Hintergliedmaßen bestand. Diese ersten Daten zur MSC-Therapie von Fesselträgererkrankungen sprechen dafür, dass die Applikation von MSCs auch bei Erkrankungen des Fesselträgers, insbesondere bei Ursprungsdesmopathien, die Prognose verbessert.

Gleichzeitig wurden bislang noch keinerlei ernsthafte Komplikationen nach der Behandlung mit autologen MSCs berichtet. In der vorliegenden Studie wurden bei 92 von 98 Pferden keinerlei Nebenwirkungen der Zellinjektion festgestellt, bei den übrigen sechs Tieren kam es zu einer lokalen Schwellung, die aber in allen Fällen transient war und das Ergebnis nicht negativ beeinflusste. GODWIN et al. (2011) führten außerdem bei sechs Tieren, die eine intratendinöse MSC-Injektion erhalten hatten, szintigrafische und röntgenologische Untersuchungen durch und konnten zeigen, dass es nicht, wie von manchen Autoren befürchtet (RUI et al. 2011), durch osteogene Differenzierung der MSCs zur Knochenbildung innerhalb der Sehne gekommen war.

Die in bisherigen klinischen Studien, einschließlich der eigenen, hier vorliegenden Studie, erhobenen Ergebnisse nach MSC-Therapie von Sehnenerkrankungen erscheinen also insgesamt sehr vielversprechend. Die bislang vorhandenen Daten sprechen dafür, dass dieses relativ neue Therapiekonzept im Gegensatz zu vielen anderen früher und auch heute praktizierten Behandlungsregimes tatsächlich dazu beiträgt, das klinische Ergebnis so zu verbessern, dass langfristig mehr Pferde nach einer Sehnenverletzung wieder voll im Sport einsetzbar sind. Eine endgültige Aussage bezüglich des Nutzens der MSC-Applikation kann allerdings erst getroffen

werden, wenn eine klinische Studie mit ausreichend großer Fallzahl und entsprechender Kontrollgruppe diese bisherigen Ergebnisse bestätigen kann.

Weiteres Ziel der hier vorliegenden Fallstudie war es, mögliche Einflussfaktoren auf den Behandlungserfolg von Sehnenerkrankungen mit MSCs zu benennen. Hierzu wurden, neben der separaten Darstellung der Ergebnisse nach Lokalisation der Erkrankung, die Erfolgsraten der Behandlung auch nach Erkrankungsstadium, Nutzungsdisziplin und Altersgruppe der Patienten getrennt berechnet.

Hierbei zeigte sich zum einen, dass Pferde mit akut oder chronisch eingestuften Erkrankungen mit Erfolgsraten von 81,2 % bzw. 92,7 % häufiger erfolgreich behandelt werden konnten als solche, die mit rezidivierenden Erkrankungen vorgestellt worden waren (Erfolgsrate 50,0 %). Weiterhin war die Erfolgsrate bei Reit- und Sportpferden mit 90,0 % höher als bei Galopprennpferden mit 72,7 %. Außerdem erlitten über zwölf Jahre alte Tiere bei einer Erfolgsrate von 75,0 % häufiger Rezidive als die Tiere mittleren Alters (sieben bis zwölf Jahre), die eine Erfolgsrate von 88,9 % aufwiesen; bei den jüngeren Pferden lässt sich die ebenfalls niedrigere Erfolgsrate von 75,0 % allerdings vermutlich eher mit dem vergleichsweise höheren Anteil an Rennpferden in dieser Gruppe begründen. Wie bereits oben diskutiert, reichte die Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten nicht aus, um statistisch gesicherte Aussagen über Unterschiede zwischen den Patientengruppen treffen zu können. Allerdings entsprechen die gefundenen tendenziellen Unterschiede größtenteils den auf bisheriger Literatur und klinischen Erfahrungen basierenden Erwartungen.

Die Nutzungsdisziplin hat bekanntlich unabhängig vom Behandlungsregime einen Einfluss auf die Heilungschancen von Sehnenerkrankungen. So wurden sowohl in Studien zur MSC-Therapie als auch in Studien ohne Anwendung von MSCs bei Rennpferden jeweils höhere Rezidivraten beobachtet als bei Reit- und Sportpferden anderer Disziplinen. Dennoch traten sowohl bei Rennpferden als auch anderen Reit- und Sportpferden nach MSC-Behandlung jeweils seltener Rezidive auf als nach konservativer Therapie (DYSON 2004; SMITH 2008; GODWIN et al. 2012).

Obwohl der Einfluss des Patientenalters auf die Prognose von Sehnenerkrankungen mit Ausnahme der Studie von GODWIN et al. (2012) in den anderen bisherigen und hier diskutierten Studien nicht analysiert wurde, ist allgemein bekannt, dass bei zunehmendem Alter eines Organismus die Regenerationsfähigkeit von Organen und Geweben abnimmt. Speziell für equine Sehnen ist bekannt, dass ab einem Alter von drei Jahren vermehrt degenerative Veränderungen auftreten und dass eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten von Sehnenerkrankungen und dem

Patientenalter besteht (DOWLING et al. 2000). Außerdem ist im Falle von autologen Zelltherapien zu beachten, dass Zellqualität und –ausbeute mit steigendem Donoralter sinken (KERN et al. 2006; HILFIKER et al. 2011). So erscheint es nicht verwunderlich, dass in der vorliegenden Fallstudie die Patienten der ältesten Gruppe insgesamt eine niedrigere Erfolgsrate aufwiesen. GODWIN et al. (2012) beschrieben, dass zwar erfolgreich behandelte Pferde im Mittel jünger waren als solche, die ein Rezidiv erlitten, jedoch war dieser Altersunterschied sehr gering (9,4 vs. 10,5 Jahre). Allerdings geht aus dieser Publikation nicht hervor, wie die Altersverteilung der Gesamtpopulation war, und es wurde keine Einteilung der Patienten nach Altersgruppen vorgenommen.

Hinsichtlich des Einflusses des Erkrankungsstadiums erscheinen die Ergebnisse bisheriger Studien etwas uneinheitlicher. Einerseits wurde berichtet, dass der Zeitraum zwischen Verletzungsereignis und MSC-Applikation bei erfolgreich behandelten Pferden signifikant kürzer war als bei den Pferden, die Rezidive erlitten (44 vs. 83 Tage) (SMITH 2008). In einer weiteren Studie war dieser Zeitraum bei erfolgreich behandelten Pferden zwar ebenfalls kürzer (46,0 Tage), lag aber in derselben Größenordnung wie bei den nicht erfolgreich behandelten Tieren (53,6 Tage) (GODWIN et al. 2012). Eine Einteilung der Patienten in Gruppen basierend auf dem Erkrankungsstadium wurde bislang nur in der vorliegenden Studie durchgeführt, und anhand der hier zum Vergleich herangezogenen Publikationen (SMITH 2008; GODWIN et al. 2012) ist es nicht möglich, den genauen Erkrankungszeitraum einzelner Patienten in diesen Studien nachzuvollziehen. SMITH (2008) gibt an, dass nur Tiere mit bei Vorstellung akuten Erkrankungen in die Studie eingeschlossen wurden, während GODWIN et al. (2012) zumindest Patienten mit rezidivierender Erkrankung von der Studie ausgeschlossen hatten. Somit finden sich in keiner dieser beiden Publikationen Angaben über die Heilungschancen rezidivierender Sehnenerkrankungen, die, vermutlich aufgrund von fortgeschrittener Degeneration und Fibrosierung, erfahrungsgemäß eine ungünstigere Prognose haben. Die Ergebnisse der eigenen Fallstudie und der Studie von GODWIN et al. (2012) sprechen dafür, dass die MSC-Therapie bei Patienten mit akuten und chronischen Sehnenerkrankungen ähnlich gute Erfolgschancen hat. Dies jedoch steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von SMITH (2008) und auch zu den Annahmen, dass MSCs die Heilung am besten beeinflussen, wenn sie möglichst frühzeitig bzw. zumindest, bevor eine Fibrosierung der Läsion stattgefunden hat, appliziert werden (GUEST et al. 2010).

Faktoren wie Nutzungsdisziplin, Patientenalter und Erkrankungsstadium scheinen also der vorliegenden Studie und den anderen oben genannten Studien zufolge die Prognose von Sehnenerkrankungen nach MSC-Behandlung gleichermaßen zu beeinflussen wie nach konservativer Behandlung.

Konkret auf die MSCs zurückzuführende Einflussfaktoren müssen in der Zukunft näher untersucht werden. Zum einen scheint die applizierte Zellzahl einen Einfluss auf das klinische Ergebnis zu haben (PACINI et al. 2007; GODWIN et al. 2012), was jedoch noch mit größeren Fallzahlen zu belegen ist, zum anderen ist die Qualität der MSCs und somit ihre zellulären Eigenschaften vermutlich ausschlaggebend für den Behandlungserfolg. Die Tatsache, dass zu diesen zellulären Eigenschaften aber allgemein noch geringe Grundkenntnisse existieren, lieferte die Grundlage für die in diese Dissertation eingeschlossene in-vitro-Studie.

5.3 VERGLEICHENDE IN-VITRO-CHARAKTERISIERUNG EQUINER MSCs AUS VERSCHIEDENEN GEWEBEQUELLEN

Ziel der in diese Dissertation eingegliederten in-vitro-Studie war es, equine MSCs aus verschiedenen Gewebequellen zu charakterisieren und mögliche Unterschiede zwischen diesen MSCs aufzuzeigen. Tatsächlich zeigten sich deutliche Unterschiede in einigen, klinisch potentiell hochrelevanten Eigenschaften der MSCs.

Zunächst ließen sich zwar aus allen Gewebeproben die entsprechenden plastikadhärenten, fibroblastoiden Zellen isolieren, aber bereits die Ausbeute an MSCs nach Primärkultur war bei allen soliden Geweben (Nabelschnur-, Fett- und Sehngewebe) hochsignifikant höher als bei Nabelschnurblut oder Knochenmark. Während der weiteren Expansion der MSCs zeigte sich, dass MSCs aus den soliden Geweben, insbesondere aber diejenigen aus Sehnen- und Fettgewebe, durchweg am schnellsten proliferierten, was sich durch die in den meisten Passagen signifikant niedrigeren Generationszeiten und die in der achten Passage signifikant höheren Proliferationsraten manifestierte. Außerdem ist es ein wichtiges Ergebnis, dass etwa drei viertel aller Proben von MSCs aus Nabelschnurblut und Knochenmark aufgrund von vorzeitiger Seneszenz die achte Passage nicht erreichten. In einer anderen Publikation dagegen wurde berichtet, dass MSCs aus Knochenmark schneller proliferierten als MSCs aus Nabelschnurgewebe (LOVATI et al. 2011b), was sich möglicherweise auf die unterschiedlichen Zellkulturbedingungen zurückführen lässt. Die in der hier vorliegenden Studie beschriebenen Ergebnisse wurden allerdings mit jeweils größeren Probenzahlen je Ursprungsgewebe erzielt und werden außerdem durch eine Studie bestätigt, in der equine MSCs aus Knochenmark, Fett- und Nabelschnurgewebe speziell hinsichtlich ihrer Expandierbarkeit bzw. des Eintretens der Seneszenz verglichen wurden. Die in dieser Studie neben der Berechnung der erreichten Populationsverdopplungen verwendeten Methoden schlossen auch

die Untersuchung der Expression von Seneszenzmarkern sowie der Telomerlängen ein, um die Ergebnisse zu untermauern (VIDAL et al. 2012).

Die somit vermutlich realistischen, in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der MSCs sind von großer klinischer Relevanz. Zum einen ist es aus wirtschaftlichen Gründen sowohl für autologe als auch für allogene Anwendungen vorteilhaft, wenn in möglichst kurzer Zeit möglichst viele MSCs zur Verfügung stehen. Zum anderen ist aber das Erreichen einer großen Zellzahl auch im Sinne des einzelnen Patienten wichtig, da es für den Erfolg der therapeutischen MSC-Anwendung bisherigen Studien zufolge ausschlaggebend ist, dass für die Applikation eine Mindestzellzahl in der Größenordnung von 10 Millionen Zellen zur Verfügung steht (PACINI et al. 2007; GODWIN et al. 2012) und darüber hinaus eine Kryokonservierung der übrigen Zellen erfolgen sollte. Dies ist der vorliegenden Studie zufolge mit MSCs aus soliden Geweben schneller, kostengünstiger und zuverlässiger erreichbar als mit MSCs aus Knochenmark oder Nabelschnurblut. Dennoch sind die Wachstumseigenschaften von MSCs aus Knochenmark in der Regel ausreichend für die routinemäßige klinische Anwendung, wenn auch der benötigte Zeitraum bis zum Erhalt von 10 Millionen Zellen länger ist als bei MSCs aus soliden Geweben. Weiterhin besteht die Möglichkeit, durch optimierte Zellkulturprotokolle die Zellausbeute zu verbessern, was bei MSCs aus Nabelschnurblut beispielsweise durch auf 5 % reduzierte Sauerstoffspannung während der Inkubation im Brutschrank und Fibronectin-Beschichtung der Zellkulturschalen erreicht werden kann (SCHUH et al. 2009).

Hinsichtlich des Migrationspotentials zeigten sich weitere signifikante Unterschiede zwischen den MSCs aus verschiedenen Quellen, die interessanterweise hierbei auch zwischen MSCs aus verschiedenen soliden Geweben bestanden: MSCs aus Sehnen- und Fettgewebe erreichten nach 24 Stunden eine signifikant größere Migrationsfläche als MSCs aus Nabelschnurgewebe; letztere waren insgesamt am wenigsten migriert. MSCs aus Knochenmark waren allerdings ebenfalls nur wenig ausgewandert, MSCs aus Nabelschnurblut nahmen eine Zwischenstellung ein. Nach Applikation in Sehnenläsionen in vivo zeigten equine MSCs aus Knochenmark entsprechend den hier vorliegenden in-vitro-Ergebnissen nur eine geringe Verteilung im umliegenden Gewebe. Diese wurde allerdings mit embryonalen Stammzellen verglichen und nicht mit MSCs aus anderen Quellen (GUEST et al. 2010). Möglicherweise ist das Migrationspotential equiner MSCs aus Sehnen- und Fettgewebe auch in vivo höher, hierzu liegen allerdings noch keine Studien vor. In Verbindung mit der hohen Viabilität der MSCs aus Sehnen- und Fettgewebe würde dies eine bessere Integration des Zelltransplantates in das umliegende Gewebe erlauben.

Während nach der Modifikation des Differenzierungsprotokolles keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der adipogenen Differenzierbarkeit der MSCs aus verschiedenen Quellen vorlagen, zeigten sich bei der osteogenen und chondrogenen Differenzierung wiederum deutliche Unterschiede.

Die osteogene Differenzierung war bei MSCs aus Knochenmark am stärksten ausgeprägt, aber auch bei MSCs aus Sehnen- und Fettgewebe noch deutlich nachweisbar. MSCs aus Nabelschnurblut und -gewebe differenzierten sich nur schwach, was durch die signifikant niedrigeren Indices der osteogenen Differenzierung manifestiert wurde. Dies geht einher mit den Resultaten ähnlicher Studien (TOUPADAKIS et al. 2010; LOVATI et al. 2011b), in denen außerdem die relative Quantifizierung der Genexpression von Knochenmarkern die Ergebnisse bestätigen konnte (TOUPADAKIS et al. 2010).

Bei der chondrogenen Differenzierung dagegen erreichten in der vorliegenden Studie MSCs aus Nabelschnurblut die meisten Scorepunkte, gefolgt von MSCs aus Nabelschnurgewebe, während MSCs aus Knochenmark nur wenige Punkte erzielten. Der Vergleich mit anderen Studien führt hier zu uneinheitlichen Ergebnissen. Einerseits wurde zwar beschrieben, dass equine MSCs aus Nabelschnurblut ein höheres chondrogenes Differenzierungspotential aufweisen als MSCs aus Knochenmark (BERG et al. 2009), andererseits wurde aber in MSCs aus anderen Quellen von anderen Autoren ein niedrigeres chondrogenes Differenzierungspotential gefunden als in MSCs aus Knochenmark (VIDAL et al. 2008; GIOVANNINI et al. 2008; LOVATI et al. 2011b). Letztere hatten allerdings im chondrogenen Differenzierungsassay für alle Zellquellen nur mäßige Ergebnisse erhalten und für MSCs aus Nabelschnurgewebe sogar das Ergebnis, dass keine chondrogene Differenzierung stattgefunden hatte (LOVATI et al. 2011b), obwohl diese Zellen in der vorliegenden Studie ein durchaus zufriedenstellendes Ergebnis erreicht hatten.

Die Differenzierung der MSCs in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung wurde primär durchgeführt, um den multipotenten Charakter der isolierten Zellen zu bestätigen. Im Falle der adipogenen Differenzierung sind die erzielten Ergebnisse zumindest für das Pferd bislang nicht von klinischer Relevanz. Dagegen sind sowohl das osteogene als auch das chondrogene Differenzierungspotential equiner MSCs interessant für den Einsatz der Zellen in der Orthopädie, geht man davon aus, dass die Differenzierung lokal applizierter MSCs in vivo und ihre anschließende Synthese von Extrazellulärmatrix einen wichtigen Beitrag zur Heilung des entsprechenden Gewebes darstellt. Dies ist vor allem dann anzunehmen, wenn nicht mehr vorhandenes Gewebe ersetzt werden soll, wie z. B. bei der Frakturheilung oder fokalen

Knorpelschäden. Allerdings findet beim Pferd bei diesen beiden Indikationen bislang keine routinemäßige Anwendung von MSCs statt, es existieren lediglich experimentelle Studien zur Therapie von Knorpeldefekten mit MSC-Transplantaten (WILKE et al. 2007; MCILWRAITH et al. 2011). Bereits etwas häufiger finden in der Praxis bisher intraartikuläre Injektionen von MSC-Suspensionen zur Behandlung von Osteoarthritis bzw. Osteoarthrose statt (FRISBIE et al. 2006; FERRIS et al. 2009). Hier ist es zwar ebenfalls denkbar, dass die injizierten MSCs an geschädigten Knorpelarealen festhaften und die Heilung durch ihre Differenzierung und Matrixsynthese beeinflussen, wichtiger aber könnten in diesem Falle die immunmodulatorischen Wirkungen der MSCs sein, die in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurden.

Weitere wichtige Unterschiede zwischen MSCs aus verschiedenen Quellen wurden hinsichtlich ihrer Sehnenmarkerexpression gefunden. Hierauf wird im nächsten Abschnitt im Detail eingegangen.

Die erste für den in-vitro-Teil dieser Arbeit gestellte Hypothese, nämlich dass Unterschiede zwischen potentiell klinisch relevanten Eigenschaften von MSCs aus verschiedenen Gewebequellen bestehen, wurde durch die Ergebnisse der durchgeführten Studie vollkommen bestätigt.

Weiter bestand die Hypothese, dass MSCs aus Nabelschnurblut und –gewebe aufgrund ihres juvenileren Charakters bessere Proliferations- und Differenzierungseigenschaften aufweisen als MSCs aus adulten Geweben. Diese allgemeine Aussage kann allerdings anhand der vorliegenden Daten nicht getroffen werden. Es zeigten sich für MSCs aus allen Quellen jeweils bestimmte Vorteile, die bei MSCs aus Nabelschnurmaterial vor allem in ihrer guten chondrogenen Differenzierbarkeit lagen, aber ebenso auch Nachteile, wie beispielsweise die mäßigen Zellausbeuten und Proliferationsraten von MSCs aus Nabelschnurblut. Die nur mäßige osteogene Differenzierung von MSCs aus Nabelschnurmaterial spricht gegen ein breiteres Differenzierungspotential dieser Zellen. Um diese Hypothese vollständig widerlegen zu können, müssten allerdings weiterführende Untersuchungen, beispielsweise hinsichtlich des Differenzierungspotentials in Zelltypen anderer Keimlinien, durchgeführt werden.

5.4 EIGNUNG VON MSCS AUS VERSCHIEDENEN QUELLEN FÜR DIE BEHANDLUNG VON SEHNENERKRANKUNGEN

Ebenfalls Ziel der in diese Dissertation eingegliederten in-vitro-Studie war es, eine Aussage darüber zu treffen, welche MSC-Quelle sich potentiell am besten für die Behandlung von

Sehnenerkrankungen eignet. Dies wird hier separat diskutiert, da MSCs beim Pferd klinisch derzeit vor allem bei Sehnenerkrankungen eingesetzt werden und somit diese Aussage besondere klinische Relevanz hat.

Um die Eignung der verschiedenen MSC-Quellen für die Sehnen­therapie zu beurteilen, sind einerseits Kriterien, die die Praktikabilität der Zellgewinnung betreffen, und andererseits Kriterien, die den möglichen Einfluss der MSCs auf die Sehnenheilung betreffen, ausschlaggebend.

Für die Praktikabilität der Zellgewinnung ist zuerst die Probennahme entscheidend. Bei Knochenmark und Fettgewebe ist die Gewinnung autologen Materials unter Lokalanästhesie und Sedation recht einfach möglich. Die Knochenmarkpunktion kann am Sternum oder Tuber coxae erfolgen. Erfahrungen aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass bei der Punktion des Hüfthöckers, insbesondere bei Tieren mittleren Alters, nicht immer eine ausreichende Menge an Knochenmark gewonnen werden kann (DELLING et al. 2012) und deswegen die Punktion des Sternums zuverlässiger ist. Zwar wurde berichtet, dass bei der Sternalpunktion in Einzelfällen Komplikationen wie die Punktion des Herzens oder Herzbeutels auftreten können (DURANDO et al. 2006; KASASHIMA et al. 2011); während der Knochenmarkpunktionen für die beiden hier vorliegenden Studien bei insgesamt 110 Tieren sind allerdings keine Komplikationen beobachtet worden. Die Entnahme von Fettgewebe erfolgt in der Regel durch einen Hautschnitt lateral des Schweifansatzes, wobei keine schwerwiegenden Komplikationen zu erwarten sind. Einzig bei sehr abgemagerten Tieren ist unter Umständen an dieser Lokalisation kein Fettgewebe vorzufinden. Allerdings wird trotz des etwas höheren Risikos der Sternalpunktion gegenüber der Entnahme von Fettgewebe erfahrungsgemäß von Pferdebesitzern in einigen Fällen aus kosmetischen Gründen die Knochenmarkpunktion besser akzeptiert.

Im Vergleich zu Knochenmark und Fettgewebe gestaltet sich die Verwendung von autologem Nabelschnurmaterial und Sehngewebe schwieriger. Wie oben bereits erwähnt, ist die autologe Anwendung von aus der Oberflächlichen Beugesehne gewonnenem Material aufgrund der Morbidität der Entnahmestelle nicht möglich. Auch bei der praktikableren, alternativen Verwendung anderer autologer Sehnen als MSC-Quelle sollte bedacht werden, dass die Probennahme an den Gliedmaßen des stehenden Pferdes Risiken für den Tierarzt birgt und daher eine Allgemein­anästhesie zu befürworten wäre. Diese wiederum ist mit höherem Aufwand und Kosten sowie dem allgemeinen Narkoserisiko verbunden. Außerdem wurde noch nicht untersucht, ob aus diesen Sehnen gewonnene Zellen und aus der Oberflächlichen Beugesehne gewonnene Zellen in ihren Eigenschaften identisch sind. Bei Nabelschnurmaterial ist die Probennahme weder

mit Risiken für Stute und Fohlen noch für den Tierarzt verbunden. Allerdings bestehen, wie oben beschrieben, hohe Anforderungen an das Management des Betriebes, da die Proben unmittelbar nach der Geburt gewonnen werden müssen. Entscheidender erscheint jedoch, dass für autologe Anwendungen das Material bereits beim Fohlen entnommen und danach kryokonserviert werden muss, um dem adulten Pferd später zur Verfügung zu stehen. Dieses in der Humanmedizin mittlerweile recht verbreitete Prozedere ist aufgrund der entstehenden Kosten nur bei sehr wertvollen Sportpferden denkbar.

Aus diesen Gründen ist für die routinemäßige Anwendung von MSCs aus Nabelschnurmaterial oder Sehngewebe eher die Applikation allogener Zellen praktikabel. Wie oben bereits diskutiert, wurden bereits erste in-vivo-Studien zur allogenen Anwendbarkeit equiner MSCs durchgeführt (GUEST et al. 2008; CARRADE et al. 2011), so dass eine sichere klinische Anwendung allogener MSCs beim Pferd in der Zukunft vorstellbar ist. Damit würden die oben beschriebenen Schwierigkeiten hinsichtlich Gewinnung und Verfügbarkeit autologen Nabelschnur- und Sehnenmaterials an Bedeutung verlieren.

Neben der einfachen Durchführbarkeit der Probennahme sind für die Praktikabilität der Zellgewinnung die erreichbare Zellausbeute und die Viabilität der MSCs von großer Bedeutung. Diese Eigenschaften unterschieden sich zwischen den MSCs aus verschiedenen Quellen signifikant, worauf oben bereits detailliert eingegangen wurde. Die soliden Gewebe Sehne, Fett und Nabelschnurmatrix weisen als MSC-Quelle den grundlegenden Vorteil auf, dass aufgrund der hohen Ausbeute an höchst proliferationsfreudigen MSCs in deutlich kürzerer Zeit mehr MSCs für die klinische Anwendung und Kryokonservierung zur Verfügung stehen als bei Verwendung von Knochenmark oder Nabelschnurblut als MSC-Quelle.

Die Zellgewinnung für die Behandlung mit autologen MSCs ist demnach aus Fettgewebe am praktikabelsten, da hier sowohl die Probenentnahme als auch die schnelle Anzucht der MSCs sehr gut gelingen. Für die Behandlung mit allogenen MSCs ist die Zellgewinnung aus Sehngewebe jedoch ebenso einfach und in kurzer Zeit umsetzbar.

Das wichtigste hier untersuchte Kriterium, das den möglichen Einfluss der MSCs auf die Sehnenheilung betrifft, ist die Fähigkeit der MSCs zur tenogenen Differenzierung und Sehnenmatrixsynthese, geht man davon aus, dass diese dann in vivo zur Sehnenregeneration beiträgt. Die vorliegende in-vitro-Studie strebte einen Vergleich dieser Eigenschaften an, indem die Genexpression von Kollagen 1A2 und Skleraxis quantifiziert wurde. Die Genexpression des bei der Tenogenese zentralen Transkriptionsfaktors Skleraxis gibt dabei Aufschluss über die Neigung der

MSCs zur tenogenen Differenzierung, die Genexpression von Kollagen 1A2, dem häufigsten extrazellulären Matrixprotein gesunder Sehnen, gibt Auskunft über die Fähigkeit zur Matrixsynthese durch die MSCs. Die vergleichende Auswertung zeigte, dass Kollagen 1A2 in MSCs aus Fettgewebe am höchsten exprimiert wurde, und Sleraxis in MSCs aus Nabelschnurblut. Fast ebenso hoch wurden aber beide Marker in MSCs aus Sehngewebe exprimiert, was dafür spricht, dass diese Zellen den Tenozyten auch nach der in-vitro-Kultivierung noch nahe stehen, wie es bereits bei humanen Zellen erkannt wurde (TEMPFER et al. 2009). Interessanterweise war in MSCs aus Knochenmark die Expression beider Sehnenmarker niedriger als in MSCs aus allen anderen Quellen.

Unterstützende Ergebnisse lieferten Studien, in denen Zellen aus Sehngewebe und Knochenmark auf Scaffolds aus Sehngewebe kultiviert und ihre Proliferation sowie Matrixsynthese untersucht wurden (STEWART et al. 2009; DURGAM et al. 2012). Dabei zeigte sich zum einen, dass die Zellen aus Sehngewebe, wie auch in der vorliegenden Studie, schneller proliferierten als die Zellen aus Knochenmark. Zum anderen war in beiden Studien die Menge von neu synthetisiertem Kollagen und Glykosaminoglykanen in Scaffolds, die mit Zellen aus Sehngewebe besiedelt waren, signifikant größer. STEWART et al. (2009) berichteten außerdem, dass die Expression von Kollagen 3 und COMP mRNA in Zellen aus Sehngewebe am höchsten war, während allerdings Kollagen 1 bei den verschiedenen Zelltypen etwa auf gleichem Level exprimiert wurde. DURGAM et al. (2012) dagegen konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Expressionslevels dieser drei Marker feststellen; Kollagen 1 wurde jedoch, anders als in der eigenen, hier vorliegenden Studie, tendenziell von Zellen aus Knochenmark höher exprimiert.

Die etwas widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich der Genexpression der Kollagene in diesen beiden Studien (STEWART et al. 2009; DURGAM et al. 2012) gegenüber der vorliegenden Studie lassen sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Kulturbedingungen begründen. Es ist bekannt, dass Proteine der extrazellulären Matrix über Transmembranproteine wie z. B. Integrine Einfluss auf die zelluläre Aktivität nehmen (AUMAILLEY und GAYRAUD 1998). Bei der Kultivierung in Scaffolds, die aus gesunden Sehnen hergestellt wurden, sind die Zellen vor allem von Kollagen 1 Fasern umgeben und werden daher zur Herunterregulation der Kollagen 1 Synthese veranlasst. Möglicherweise besitzen die aus Sehngewebe stammenden Zellen, im Gegensatz zu Zellen aus Knochenmark, auf die Interaktion mit Proteinen der Sehnenmatrix abgestimmte Transmembranproteine, wodurch der Effekt der Matrix-abhängigen Genregulation bei aus Sehngewebe stammenden Zellen deutlicher ausgeprägter sein könnte.

Die Unterschiede in der Expression der Kollagen mRNA zwischen verschiedenen Zelltypen und Kulturbedingungen müssen weiter untersucht werden, da sie klinisch hochrelevant erscheinen. Durch Sehnenerkrankungen werden gerade die Zusammensetzung und Organisation der extrazellulären Matrix verändert (RILEY 2008). Physiologischerweise ist Kollagen 1 das am häufigsten vorkommende Protein in der extrazellulären Sehnenmatrix. In der initialen Heilungsphase wird jedoch vermehrt Kollagen 3 synthetisiert, das erst später durch Kollagen 1 ersetzt wird (DOWLING et al. 2000). Hierin wird ein wichtiger Ansatzpunkt für die MSCs vermutet: Neben der Tatsache, dass sich in MSC-behandelten Sehnenläsionen die Architektur des heilenden Gewebes ultrasonografisch und histologisch im Vergleich zu Kontrollläsionen signifikant verbessert darstellt (SCHNABEL et al. 2009; CROVACE et al. 2010), konnte zumindest in einer dieser Studien auch gezeigt werden, dass der Anteil an Kollagen 1 in MSC-behandelten Läsionen höher und der Anteil an Kollagen 3 niedriger war als in Kontrollläsionen (CROVACE et al. 2010). Die in diesen experimentellen in-vivo-Studien erkannten Unterschiede liefern eine mögliche Begründung für die in klinischen Fallstudien beobachteten niedrigeren Rezidivraten nach MSC-Behandlung. Durch gezielten Einsatz von MSCs, die naturgemäß viel Kollagen 1 produzieren, wie MSCs aus Fett- und Sehngewebe, lässt sich möglicherweise das klinische Ergebnis weiter verbessern.

Die Hypothese, dass sich MSCs aus Sehngewebe potentiell am besten für die Behandlung von Sehnenerkrankungen eignen, wird also von den in der hier vorliegenden in-vitro-Studie erhobenen Daten, die sowohl eine schnelle Proliferation der Zellen als auch ihre hohen Expressionslevel von Kollagen 1A2 und Skleraxis zeigen, unterstützt. Bevor allerdings ein routinemäßiger Einsatz von MSCs aus Sehngewebe stattfinden kann, sind zum einen Untersuchungen zur Verträglichkeit allogener MSCs aus Sehngewebe notwendig, um die Probengewinnung zu erleichtern, zum anderen weitere Untersuchungen zum Einfluss dieser MSCs auf die Sehnenheilung.

Neben MSCs aus Sehngewebe erscheinen jedoch auch MSCs aus Fettgewebe gut geeignet für die Behandlung von Sehnenerkrankungen, da sie ebenso gute Proliferationseigenschaften und eine hohe Kollagen 1A2 Expression aufweisen. Bis genauere Kenntnisse über equine MSCs aus Sehngewebe bestehen, ist dieser Alternative Vorzug zu gewähren, da die Anwendung der MSCs aus Fettgewebe aufgrund besserer, bereits bestehender Kenntnisse ihrer Eigenschaften und nicht zuletzt auch der gut praktikablen Verwendung autologen Materials sicherer ist.

Die derzeit am häufigsten verwendeten MSCs aus Knochenmark sind, betrachtet man die hier vorliegenden Daten, als weniger geeignet für die Behandlung von Sehnenerkrankungen anzusehen.

Allerdings spiegeln diese Daten nur einen Teil der therapeutisch potentiell relevanten Eigenschaften der MSCs wider. Neben der Differenzierung der MSCs in den benötigten Zelltyp und der darauffolgenden Matrixsynthese gelten parakrin durch die MSCs sezernierte Proteine wie Wachstumsfaktoren und immunmodulatorische Zytokine mittlerweile als essentielle Komponenten des Wirkmechanismus der Zellen (STEWART und STEWART 2011). Das Sekretionsprofil der MSCs aus verschiedenen Quellen sowie ihre Wirkungen auf andere Zellen wurden jedoch in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Um eine abschließende Aussage über die therapeutische Eignung der jeweiligen MSCs treffen zu können, müssen also weitere Studien durchgeführt werden, die diese vermutlich zum Wirkmechanismus beitragenden Eigenschaften der MSCs im Detail untersuchen.

5.5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

MSCs sind aufgrund der in bisherigen in-vivo-Studien gewonnenen Ergebnisse als äußerst vielversprechendes biologisches Therapeutikum für orthopädische Erkrankungen des Pferdes anzusehen. Die meisten Daten liegen bislang zur MSC-Behandlung von Sehnenerkrankungen vor; hier scheint die Behandlung mit MSCs die Rezidivraten gegenüber konventioneller Behandlung signifikant zu verringern. Die vorliegende in-vivo-Studie konnte zu den heute insgesamt vorliegenden klinischen Daten einen wichtigen Beitrag leisten, insbesondere hinsichtlich der Behandlung von Fesselträgererkrankungen.

Dennoch sollten diese zurzeit bestehenden Ergebnisse unter dem Vorbehalt betrachtet werden, dass in keiner der größeren Fallzahlen einschließenden klinischen Studien eine Kontrollgruppe mitgeführt wurde und somit bislang kein endgültiger Beweis über die Wirksamkeit von MSCs bei Sehnenerkrankungen erbracht werden konnte. Kontrollierte, klinische Studien müssen in der Zukunft zeigen, ob sich die aktuell verfolgten Theorien und bisherigen Ergebnisse bestätigen.

Ebenso sind die Kenntnisse zu den grundlegenden Eigenschaften equiner MSCs noch unzureichend. Die vorliegende in-vitro-Studie konnte dazu beitragen, bestehende Kenntnisse zu erweitern und lieferte Ergebnisse, die einen direkten Vergleich zwischen klinisch relevanten Charakteristika der derzeit am meisten diskutierten MSC-Quellen erlauben. Somit gibt sie auch für den Praktiker Anhaltspunkte für die Auswahl einer MSC-Quelle für die therapeutische Anwendung.

Weitere grundlagenorientierte Arbeiten sind jedoch unbedingt erforderlich, um das Verständnis des Wirkmechanismus von MSCs zu verbessern, die Sicherheit der Anwendung zu erhöhen und somit

nicht zuletzt auch die Translation der im Pferdmodell gewonnenen Ergebnisse in humanmedizinische Anwendungen zu ermöglichen.

Gerade in den letzten Jahren konnten durch weltweit intensiviertere Forschungsaktivitäten bezüglich equiner MSCs wichtige neue Erkenntnisse gewonnen werden. Neben den in dieser Dissertation in größerem Detail beschriebenen Studien sind besonders die Arbeiten hinsichtlich der Oberflächenmarkerexpression equiner MSCs als richtungsweisend anzusehen (BRAUN et al. 2010; RADCLIFFE et al. 2010; RANERA et al. 2011; DE SCHAUWER et al. 2012), da diese zu einer genaueren Definition equiner MSCs führen werden.

In jedem Fall ist mit Spannung zu erwarten, welche weiteren Erkenntnisse die nächsten Jahre in diesem dynamischen Forschungsgebiet bringen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Janina Burk

„Klinische Anwendung und vergleichende Charakterisierung equiner mesenchymaler Stromazellen“

Chirurgische Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Juni 2012

78 Seiten, 1 Abbildung, 2 Publikationen, 91 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Mesenchymale Stromazellen, Pferd, Sehne, Knochenmark, Fettgewebe, Nabelschnur

Mesenchymale Stromazellen (MSCs) werden beim Pferd bereits mit vielversprechenden Ergebnissen zur Behandlung von muskuloskelettalen Erkrankungen, insbesondere von Sehnenerkrankungen, eingesetzt. In bisherigen klinischen Studien lag das Hauptaugenmerk auf der Behandlung von Erkrankungen der Oberflächlichen Beugesehne bei Rennpferden, die jedoch in Deutschland nur einen verhältnismäßig kleinen Anteil des Patientenaufkommens darstellen. Die zu erwartenden Ergebnisse nach MSC-Behandlung von Fesselträgererkrankungen sind dagegen noch nicht bekannt. Darüber hinaus sind die grundlegenden Kenntnisse zur Biologie equiner MSCs noch unzureichend, was Verständnis und Optimierung des bestehenden Therapiekonzeptes erschwert. Häufig wird die Verwendung alternativer Gewebequellen für MSCs diskutiert, wobei jedoch nur wenige vergleichende Daten zu den jeweiligen zellulären Eigenschaften vorliegen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, zum einen mehr Kenntnisse über die zu erwartenden klinischen Ergebnisse nach MSC-Behandlung von Sehnenerkrankungen zu erlangen, einschließlich Erkrankungen des Fesselträgers, zum anderen den Wissensstand hinsichtlich der in-vitro-Charakterisierung equiner MSCs zu erweitern, wobei ein Vergleich klinisch relevanter Charakteristika zwischen MSCs aus verschiedenen Gewebequellen angestrebt wurde.

In die klinische Studie wurden 98 Pferde, die aufgrund von Sehnen- und Bänderkrankungen mit MSCs behandelt worden waren, einbezogen. Von 58 dieser Tiere konnten Langzeitergebnisse nach einem Beobachtungszeitraum von mindestens einem Jahr erhoben werden. Diese wurden hinsichtlich des Behandlungserfolges sowie möglicher Einflussfaktoren ausgewertet, wobei die Behandlung als erfolgreich bewertet wurde, wenn die Patienten nach dem Beobachtungszeitraum voll trainiert oder im Sport eingesetzt werden konnten und dabei kein Rezidiv aufgetreten war. Die Behandlung mit MSCs wurde bei 84,5 % der Pferde als erfolgreich eingestuft, wobei Erkrankungen der Oberflächlichen Beugesehne mit 84,2 % und Erkrankungen des Fesselträgers mit 83,3 % gleichermaßen gute Ergebnisse zeigten. Tendenziell beeinflussten Nutzungsdisziplin, Erkrankungsstadium und Patientenalter das klinische Ergebnis ebenso wie bei konventioneller

Behandlung. Insgesamt war nach MSC-Behandlung das Auftreten von Rezidiven deutlich seltener zu beobachten als in der Literatur für die konventionelle Behandlung beschrieben wird.

Für die in-vitro-Studie zur vergleichenden Charakterisierung equiner MSCs aus verschiedenen Quellen wurden Knochenmark, Fett- und Sehngewebe sowie Nabelschnurblut und -gewebe gewonnen. Aus diesen Proben wurden jeweils die plastikadhärenten MSCs isoliert und hinsichtlich Zellausbeute, Proliferations- und Migrationseigenschaften, tripotentem Differenzierungspotential sowie der Expression der Sehnenmarker Kollagen 1A2 und Skleraxis vergleichend untersucht. Die Ausbeute an MSCs war bei allen soliden Geweben (Fett-, Sehnen-, und Nabelschnurgewebe) hochsignifikant höher ($p < 0,001$). Ebenso proliferierten MSCs aus Fett- und Sehngewebe signifikant schneller als MSCs aus Knochenmark oder Nabelschnurblut ($p < 0,01$). Von letzteren wurden darüber hinaus etwa drei viertel aller Zellkulturen vor der achten Passage seneszent. Das höchste Migrationspotential zeigten wiederum MSCs aus Sehnen- und Fettgewebe, wobei hier MSCs aus Nabelschnurgewebe das ungünstigste Ergebnis erzielten ($p < 0,01$). Die adipogene Differenzierung gelang bei MSCs aus allen Quellen vergleichbar gut. Bei der osteogenen Differenzierung erreichten MSCs aus Knochenmark das beste Ergebnis, während MSCs aus Nabelschnurblut und -gewebe nur schwach osteogen differenzierten (Tag 21: $p < 0,01$; Tag 35: $p < 0,05$). Im Gegensatz dazu erreichten MSCs aus Nabelschnurblut bei der chondrogenen Differenzierung die meisten Scorepunkte, MSCs aus Knochenmark dagegen die wenigsten ($p < 0,05$). Kollagen 1A2 wurde von MSCs aus Fettgewebe am höchsten exprimiert, Skleraxis von MSCs aus Nabelschnurblut. MSCs aus Sehngewebe exprimierten beide Sehnenmarker auf fast ebenso hohem Level. MSCs aus Knochenmark dagegen zeigten hier jeweils die niedrigste Expression ($p < 0,05$ für Kollagen 1A2).

Basierend auf den Ergebnissen der klinischen Studie ist die MSC-Therapie nach wie vor als vielversprechende Behandlungsoption für Sehnenkrankungen anzusehen und ist auch für die Behandlung von Fesselträgererkrankungen geeignet. Zukünftige, kontrollierte klinische Studien müssen jedoch die Wirksamkeit der MSC-Therapie noch weitergehend bestätigen.

Die in-vitro-Studie zeigte signifikante Unterschiede zwischen equinen MSCs aus verschiedenen Quellen auf, die bei der Auswahl einer Gewebequelle für die MSC-Isolierung für klinische Anwendungen berücksichtigt werden sollten. MSCs aus Fettgewebe erscheinen aufgrund ihrer sehr guten Proliferations- und zuverlässigen Differenzierungseigenschaften als eine gute Alternative zu MSCs aus Knochenmark für autologe Therapien. MSCs aus Sehngewebe sind den hier vorliegenden Ergebnissen zufolge besonders gut für die Behandlung von Sehnenkrankungen geeignet; vor einer routinemäßigen Anwendung dieser MSCs sollten jedoch ihre Eigenschaften weiterführend untersucht werden.

7 SUMMARY

Janina Burk

“Clinical Application and Comparative Characterisation of Equine Mesenchymal Stromal Cells”

Large Animal Clinic for Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in June 2012

78 pages, 1 figure, 2 publications, 91 references

Keywords: mesenchymal stromal cells, horse, tendon, bone marrow, adipose tissue, umbilical cord

In horses, mesenchymal stromal cells (MSCs) are used for the treatment of musculoskeletal diseases, especially tendon injuries, with promising results. Previous clinical studies mainly focused on the treatment of superficial digital flexor tendon injuries in racehorses, which, however, represent only a relatively small percentage of the overall equine case load in Germany. Average outcome to be expected following MSC treatment of suspensory ligament injuries was not yet determined. Moreover, basic knowledge on equine MSC biology is still deficient, hampering the understanding and thus the optimisation of the existing treatment regime. The use of alternative MSC sources is frequently discussed, yet to date, only few data comparing the cellular properties of equine MSCs from different sources have been published.

The aim of this study was, on the one hand, to gain more knowledge concerning the expected outcome after MSC treatment of tendon injuries, including injuries to the suspensory ligament. On the other hand, it was aimed at expanding the knowledge on equine MSC characterisation *in vitro*, thereby focusing on the comparison of clinically relevant properties of MSCs derived from different sources.

In the clinical study, 98 horses were included, all of which had received MSC treatment for tendon or ligament injuries. In 58 of these horses, long term results after a follow-up period of at least one year could be collected. These data were analysed with respect to treatment outcome and potential influencing factors. Treatment was considered successful when horses were back to full training or competition after the follow-up period, without having suffered a re-injury. The overall success rate was 84.5 %. Success rates in horses suffering from superficial digital flexor tendon injuries and in horses suffering from suspensory ligament injuries were comparably good (84.2 % and 83.3 %, respectively). Similar to conventional therapies, the sports discipline in which the horses performed, age and disease stage tended to influence the outcome. Overall, re-injury rates after MSC treatment were considerably lower than those described in the literature following conventional treatment.

For the comparative characterisation of MSCs from different sources in vitro, samples of bone marrow, adipose and tendon tissue, as well as umbilical cord blood and –tissue were collected. Plastic-adherent MSCs were isolated out of these samples and comparatively characterised focusing on cell yields, proliferation and migration properties, trilineage differentiation potential and the expression of the tendon markers collagen 1A2 and scleraxis. MSC yields were significantly higher in all solid tissues (adipose, tendon and umbilical cord tissue) ($p < 0.001$). Further, MSCs from adipose and tendon tissue proliferated significantly faster than MSCs from bone marrow or umbilical cord blood ($p < 0.01$). Moreover, approximately three quarters of the samples derived from the latter sources underwent senescence before reaching passage eight. The highest migration potential was found in MSCs derived from tendon and adipose tissue again, while MSCs from umbilical cord tissue showed the least ($p < 0.01$). The adipogenic differentiation potential was comparably good in MSCs from all different sources. The osteogenic differentiation was most distinct in MSCs from bone marrow, while MSCs from umbilical cord blood and tissue showed only weak evidence of differentiation (day 21: $p < 0.01$; day 35: $p < 0.05$). In contrast, following chondrogenic differentiation, MSCs from umbilical cord blood scored highest and MSCs from bone marrow scored lowest ($p < 0.05$). Collagen 1A2 was most highly expressed in MSCs from adipose tissue, highest scleraxis expression levels were found in MSCs from umbilical cord blood. MSCs from tendon tissue, however, expressed both markers at almost evenly high levels. Contrastingly, lowest expression levels of both markers were found in MSCs derived from bone marrow ($p < 0.05$ for collagen 1A2).

Based on the results of the clinical study, MSC therapy can still be considered a very promising treatment option for tendon diseases and is also a suitable treatment for suspensory ligament injuries. In the future, controlled clinical studies will have to further confirm the efficacy of this treatment regime.

The in-vitro-study showed significant differences between equine MSCs derived from different sources, which should be considered when choosing a MSC source for clinical applications. For autologous therapies, MSCs derived from adipose tissue appear to be a good alternative to MSCs derived from bone marrow, due to their remarkable proliferation and reliable differentiation capacities. Furthermore, according to this study, MSCs derived from tendon tissue are especially suitable for treating tendon injuries. Prior to routine clinical applicability of these MSCs, however, their properties should be further investigated.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PR, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J.* 2002;16:270-272.

Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, Addicks K, Litzke LF. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res.* 2007;68:1095-1105.

Aslan H, Kimelman-Bleich N, Pelled G, Gazit D. Molecular targets for tendon neof ormation. *J Clin Invest.* 2008;118:439-444.

Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med (Berl.).* 1998;76:253-265.

Bagnaninchi PO, Yang Y, El Haj AJ, Maffulli N. Tissue engineering for tendon repair. *Br J Sports Med.* 2007;41:e10.

Banos CC, Thomas AH, Kuo CK. Collagen fibrillogenesis in tendon development: current models and regulation of fibril assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2008;84:228-244.

Bartholomew S, Owens SD, Ferraro GL, Carrade DD, Lara DJ, Librach FA, Borjesson DL, Galuppo LD. Collection of equine cord blood and placental tissues in 40 thoroughbred mares. *Equine Vet J.* 2009;41:724-728.

Berg L, Koch T, Heerkens T, Bessonov K, Thomsen P, Betts D. Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2009;22:363-370.

Bi Y, Ehirchiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, Li L, Leet AI, Seo BM, Zhang L, Shi S, Young MF. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med.* 2007;13:1219-1227.

Braun J, Hack A, Weis-Klemm M, Conrad S, Treml S, Kohler K, Walliser U, Skutella T, Aicher WK. Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res.* 2010;71:1228-1236.

Butler DL, Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, Shearn JT, Gooch C, Awad H. Functional tissue engineering for tendon repair: A multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bioscaffolds, and mechanical stimulation. *J Orthop Res.* 2008;26:1-9.

Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 2001;7:259-264.

Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, Buerchler S, Friedman MS, Walker NJ, Borjesson DL. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy.* 2011;13:419-430.

Crovace A, Lacitignola L, Rossi G, Francioso E. 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;2010:250978.

Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119:2204-2213.

De Schauwer C, Meyer E, van de Walle GR, Van SA. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology.* 2011;75:1431-1443.

De Schauwer C, Piepers S, van de Walle GR, Demeyere K, Hoogewijs MK, Govaere JL, Braeckmans K, Van SA, Meyer E. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry A.* 2012;18:312-323.

Del Bue M, Ricco S, Ramoni R, Conti V, Gnudi G, Grolli S. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Vet Res Commun.* 2008;32 Suppl 1:S51-S55.

- Delling U, Lindner K, Ribitsch I, Juelke H, Brehm W. Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Can Vet J.* 2012;76:52-56.
- Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315-317.
- Dowling BA, Dart AJ, Hodgson DR, Smith RK. Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Vet J.* 2000;32:369-378.
- Durando MM, Zarucco L, Schaer TP, Ross M, Reef VB. Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine Vet Education.* 2006;18:75-79.
- Durgam SS, Stewart AA, Pondenis HC, Gutierrez-Nibeyro SM, Evans RB, Stewart MC. Comparison of equine tendon- and bone marrow-derived cells cultured on tendon matrix with or without insulin-like growth factor-I supplementation. *Am J Vet Res.* 2012;73:153-161.
- Dyson S. Proximal suspensory desmitis: clinical, ultrasonographic and radiographic features. *Equine Vet J.* 1991;23:25-31.
- Dyson SJ. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet J.* 2004;36:415-419.
- Ferris D, Frisbie DD, Kisiday J, McIlwraith CW, Hague B, Major M, Schneider R, Zubrod C, Watkins J, Kawcak C, Goodrich LR. Clinical evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring joint disease. *Regen Med.* 2009;4 Suppl 2:16-16.
- Fortier LA, Nixon AJ, Williams J, Cable CS. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res.* 1998;59:1182-1187.
- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966;16:381-390.

Frisbie DD, Kawcak CE, McIlwraith CW. Evaluation of Bone Marrow Derived Stem Cells and Adipose Derived Stromal Vascular Fraction for Treatment of Osteoarthritis Using an Equine Experimental Model. Proceedings of the 52nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners; 2006 Dec 2-6; San Antonio, Texas, USA. 2006;52:420-421.

Giovannini S, Brehm W, Mainil-Varlet P, Nestic D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation*. 2008;76:118-129.

Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith RK. 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*. 2012;44:25-32.

Grogan SP, Barbero A, Winkelmann V, Rieser F, Fitzsimmons JS, O'Driscoll S, Martin I, Mainil-Varlet P. Visual histological grading system for the evaluation of in vitro-generated neocartilage. *Tissue Eng*. 2006;12:2141-2149.

Guest DJ, Smith MR, Allen WR. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Vet J*. 2008;40:178-181.

Guest DJ, Smith MR, Allen WR. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J*. 2010;42:636-642.

Herthel DJ. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components. *Proc Am Ass Equine Practnrs*. 2001;47:319-321.

Hilfiker A, Kasper C, Hass R, Haverich A. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? *Langenbecks Arch Surg*. 2011;396:489-497.

Hoffmann A, Gross G. Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches. *Int Orthop*. 2007;31:791-797.

Hoynowski SM, Fry MM, Gardner BM, Leming MT, Tucker JR, Black L, Sand T, Mitchell KE. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362:347-353.

Ibrahim S, Saunders K, Kydd JH, Lunn DP, Steinbach F. Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;119:63-80.

Janderova L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes Res.* 2003;11:65-74.

Kaltz N, Ringe J, Holzwarth C, Charbord P, Niemeyer M, Jacobs VR, Peschel C, Haupl T, Oostendorp RA. Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-wide gene expression analysis of stromal cells from different sources. *Exp Cell Res.* 2010;316:2609-2617.

Kasashima Y, Takahashi T, Smith RK, Goodship AE, Kuwano A, Ueno T, Hirano S. Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine Vet J.* 2004;36:346-350.

Kasashima Y, Ueno T, Tomita A, Goodship AE, Smith RK. Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet J.* 2011;43:288-294.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006;24:1294-1301.

Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD, Betts DH. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.* 2007;7:26.

Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Meida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med.* 2004;200:123-135.

Kuo CK, Tuan RS. Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2008;14:1615-1627.

Lovati AB, Corradetti B, Lange CA, Recordati C, Bonacina E, Bizzaro D, Cremonesi F. Characterization and differentiation of equine tendon-derived progenitor cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2011a;25:S75-S84.

Lovati AB, Corradetti B, Lange CA, Recordati C, Bonacina E, Bizzaro D, Cremonesi F. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Vet Res Commun*. 2011b;35:103-121.

McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy*. 2011;27:1552-1561.

Mensing N, Gasse H, Hambruch N, Haeger JD, Pfarrer C, Staszuk C. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC Vet Res*. 2011;7:42.

Murray RC, Dyson SJ, Tranquille C, Adams V. Association of type of sport and performance level with anatomical site of orthopaedic injury diagnosis. *Equine Vet J Suppl*. 2006;411-416.

Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am J Vet Res*. 2008;69:928-937.

Noel D, Caton D, Roche S, Bony C, Lehmann S, Casteilla L, Jorgensen C, Cousin B. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res*. 2008;314:1575-1584.

O'Meara B, Bladon B, Parkin TD, Fraser B, Lischer CJ. An investigation of the relationship between race performance and superficial digital flexor tendonitis in the Thoroughbred racehorse. *Equine Vet J*. 2010;42:322-326.

Ostanin AA, Petrovskiy YL, Shevela EY, Kurganova EV, Drobinskaja AN, Dobryakova OB, Lisukova EV, Chernykh ER. A new approach to evaluation of osteogenic potential of mesenchymal stromal cells. *Bull Exp Biol Med.* 2008;146:534-539.

Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.* 2007;13:2949-2955.

Park A, Hogan MV, Kesturu GS, James R, Balian G, Chhabra AB. Adipose-derived mesenchymal stem cells treated with growth differentiation factor-5 express tendon-specific markers. *Tissue Eng Part A.* 2010;16:2941-2951.

Passeri S, Nocchi F, Lamanna R, Lapi S, Miragliotta V, Giannessi E, Abramo F, Stornelli MR, Matarazzo M, Plenteda D, Urciuoli P, Scatena F, Coli A. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol Int.* 2009;33:100-105.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-147.

Radcliffe CH, Flaminio MJ, Fortier LA. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells Dev.* 2010;19:269-282.

Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vazquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martin-Burriel I. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;144:147-154.

Reed SA, Johnson SE. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J Cell Physiol.* 2008;215:329-336.

Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R. Stem cells in veterinary medicine--attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol.* 2007;25:409-416.

Riley G. Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008;4:82-89.

Rui YF, Lui PP, Chan LS, Chan KM, Fu SC, Li G. Does erroneous differentiation of tendon-derived stem cells contribute to the pathogenesis of calcifying tendinopathy? *Chin Med J (Engl.)*. 2011;124:606-610.

Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, Noda M. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res.* 2003;287:289-300.

Schnabel LV, Lynch ME, van der Meulen MC, Yeager AE, Kornatowski MA, Nixon AJ. Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res.* 2009;27:1392-1398.

Schuh EM, Friedman MS, Carrade DD, Li J, Heeke D, Oyserman SM, Galuppo LD, Lara DJ, Walker NJ, Ferraro GL, Owens SD, Borjesson DL. Identification of variables that optimize isolation and culture of multipotent mesenchymal stem cells from equine umbilical-cord blood. *Am J Vet Res.* 2009;70:1526-1535.

Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, Lassar A, Tabin CJ. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development.* 2001;128:3855-3866.

Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells.* 2008;26:146-150.

Shukunami C, Takimoto A, Oro M, Hiraki Y. Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Dev Biol.* 2006;298:234-247.

Singer ER, Barnes J, Saxby F, Murray JK. Injuries in the event horse: training versus competition. *Vet J.* 2008;175:76-81.

Smith RK. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil.* 2008;30:1752-1758.

Smith RK, Korda M, Blunn GW, Goodship AE. 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.* 2003;35:99-102.

Smith RK, McIlwraith CW. Consensus on equine tendon disease: building on the 2007 Havemeyer symposium. *Equine Vet J.* 2012;44:2-6.

Stewart AA, Barrett JG, Byron CR, Yates AC, Durgam SS, Evans RB, Stewart MC. Comparison of equine tendon-, muscle-, and bone marrow-derived cells cultured on tendon matrix. *Am J Vet Res.* 2009;70:750-757.

Stewart MC, Stewart AA. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2011;27:243-261.

Taylor SE, Vaughan-Thomas A, Clements DN, Pinchbeck G, Macrory LC, Smith RK, Clegg PD. Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems. *BMC Musculoskelet Disord.* 2009;10:27.

Tempfer H, Wagner A, Gehwolf R, Lehner C, Tauber M, Resch H, Bauer HC. Perivascular cells of the supraspinatus tendon express both tendon- and stem cell-related markers. *Histochem Cell Biol.* 2009;131:733-741.

Thorpe CT, Clegg PD, Birch HL. A review of tendon injury: Why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? *Equine Vet J.* 2010;42:174-180.

Toupadakis CA, Wong A, Genetos DC, Cheung WK, Borjesson DL, Ferraro GL, Galuppo LD, Leach JK, Owens SD, Yellowley CE. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *Am J Vet Res.* 2010;71:1237-1245.

Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg.* 2007;36:613-622.

Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenius O, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet Surg.* 2008;37:713-724.

Vidal MA, Walker NJ, Napoli E, Borjesson DL. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells Dev.* 2012;21:273-283.

Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol.* 2009;10:29.

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33:1402-1416.

Wang QW, Chen ZL, Piao YJ. Mesenchymal stem cells differentiate into tenocytes by bone morphogenetic protein (BMP) 12 gene transfer. *J Biosci Bioeng.* 2005;100:418-422.

Wang W, Itaka K, Ohba S, Nishiyama N, Chung UI, Yamasaki Y, Kataoka K. 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2009;30:2705-2715.

Wilke MM, Nydam DV, Nixon AJ. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res.* 2007;25:913-925.

Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 2007;327:449-462.

9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle bedanke ich mich sehr herzlich bei allen, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben:

- ✧ meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. Walter Brehm, der mir die Dissertation in diesem spannenden Forschungsgebiet ermöglichte, mir seither jederzeit als kompetenter Ansprechpartner zur Verfügung stand und mich stets und in jeglicher Hinsicht großartig gefördert hat
- ✧ Frau Dr. Iris Ribitsch, für die Betreuung der Arbeit, ihre engagierte Mitarbeit im Labor und die Unterstützung in allen Lebenslagen
- ✧ allen Kollegen, die bei der klinischen Studie mitgewirkt und ihre Patientendaten zur Verfügung gestellt haben
- ✧ Frau Dr. Henriette Jülke, Herrn Prof. Dr. Carsten Staszyc und Mitarbeitern, Frau Prof. Dr. Cornelia Kasper und Mitarbeitern sowie Herrn Dr. Christoph Engel, die wertvolle Ratschläge zur Durchführung der in-vitro-Experimente, ihrer statistischen Auswertung und Anfertigung des entsprechenden Manuskripts gegeben haben
- ✧ den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe OSC-R der Chirurgischen Tierklinik, der Professuren für Stammzellbiologie und Molekulare Zelltherapie sowie des Veterinär-Anatomischen Instituts, Universität Leipzig, die mir bei der Einarbeitung in die Laborarbeit zur Seite standen
- ✧ meiner lieben Kollegin Claudia Gittel, für die lustige und gleichzeitig produktive Zusammenarbeit zu jeglichen Tages- und Nachtzeiten
- ✧ allen, die zur erfolgreichen Probengewinnung beigetragen haben, allen voran dem Sächsischen Hauptgestüt Graditz für die reibungslose Zusammenarbeit bei der Nabelschnurgewinnung, aber auch der ambulatorischen und geburtshilflichen Tierklinik und dem Lehr- und Versuchsgut Oberholz, Universität Leipzig
- ✧ Herrn Prof. Dr. Augustinus Bader, Herrn Prof. Dr. Peter Seibel und Herrn Prof. Dr. Johannes Seeger, die diese Arbeit durch die Bereitstellung ihrer Laborräumlichkeiten und Geräte für Zellkultur, PCR und Histologie ermöglichten
- ✧ der Akademie für Tiergesundheit und der Studienstiftung des deutschen Volkes, die mich durch Promotionsstipendien unterstützt haben, sowie der Mehl-Mülhens-Stiftung und dem Translationszentrum für Regenerative Medizin Leipzig für die weitere Finanzierung des Projektes
- ✧ meinen lieben Eltern, die mich stets liebevoll unterstützt und gefördert haben und mir immer sehr viel Rückhalt geben