

Aus der Klinik für Pferde
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchungen zur Biodistribution multipotenter mesenchymaler Stromazellen
nach intraläsionaler Applikation in induzierte Defekte
equiner Oberflächlicher Beugesehnen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Carolin Horstmeier
aus Ibbenbüren

Leipzig, 2017

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Walter Brehm

Betreuer: Prof. Dr. Walter Brehm

Gutachter: Prof. Dr. Walter Brehm
Klinik für Pferde
Veterinärmedizinische Fakultät
Universität Leipzig

Prof. Dr. Renate Weller
Clinical Science and Services
Royal Veterinary College
University of London

Tag der Verteidigung: 23.05.2017

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Pathologie der Oberflächlichen Beugesehne.....	3
2.1.1	Definition	3
2.1.2	Ätiologie, Pathogenese, Heilung.....	3
2.1.3	Prognose.....	8
2.2	Sehndefektmodelle.....	8
2.3	Diagnostik bei Erkrankungen der Oberflächlichen Beugesehne	11
2.3.1	Routineuntersuchungen.....	11
2.3.2	MRT-Untersuchung	12
2.4	Therapieansätze.....	14
2.4.1	Konservative und chirurgische Therapiemethoden	14
2.4.2	Regenerative Therapiemethoden.....	14
2.5	Multipotente mesenchymale Stromazellen	15
2.5.1	Definition	15
2.5.2	Quellen	17
2.5.3	Wirkmechanismen.....	18
2.5.4	Einsatz bei Sehnenläsionen.....	19
2.5.5	Zelltracking	21
3	Zielstellung und Hypothesen.....	26
4	Tiere, Material und Methoden	27
4.1	Studiendesign.....	27
4.2	Probanden	29
4.3	Probandenmanagement und Diagnostik.....	29
4.3.1	Pain Score	29
4.3.2	Bewegungsprogramm	30
4.3.3	MRT-Untersuchung	30
4.4	Invasive Eingriffe	32
4.4.1	Tendiopathieinduktion	32
4.4.2	Fettentnahme.....	33
4.4.3	Zellapplikation.....	34
4.4.4	Blutentnahme.....	35
4.4.5	Biopsieentnahme.....	35

Inhaltsverzeichnis

4.4.6	Euthanasie und Probenentnahme an den Vordergliedmaßen	37
4.5	Zellisolation, -markierung und -charakterisierung.....	37
4.5.1	Isolierung, Expansion, Markierung.....	37
4.5.2	Nachweis der Zellcharakteristika.....	40
4.5.2.1	Plastikadhärenz	40
4.5.2.2	Oberflächenmarker	40
4.5.2.3	Tripotente Differenzierung.....	43
4.5.2.3.1	Osteogenese	44
4.5.2.3.2	Adipogenese.....	45
4.5.2.3.3	Chondrogenese	46
4.5.3	Nachweis der positiven Zellmarkierung	49
4.5.3.1	Nachweis der superparamagnetischen Eisenoxide	49
4.5.3.2	Rhodamin B-Nachweis.....	49
4.6	Zelltracking und Analytik.....	49
4.6.1	MRT	49
4.6.2	Durchflusszytometrische Untersuchung der Sehnenbiopsien	50
4.6.3	Durchflusszytometrische Untersuchung der Blutproben.....	51
4.6.4	Histologische Untersuchung der Gewebeproben.....	51
4.6.4.1	Preußisch Blau.....	52
4.6.4.2	DAPI	52
4.6.5	Statistische Auswertung.....	53
5	Ergebnisse	54
5.1	MSC-Charakterisierung und -Markierung	54
5.2	Langfristige Zellverfolgung mittels MRT.....	56
5.3	Markierte MSC im peripheren Blut.....	63
5.4	Markierte MSC in den Gewebeproben	63
6	Diskussion	69
7	Zusammenfassung	79
8	Summary	81
9	Literaturverzeichnis	83
10	Anhang.....	92
11	Danksagung	101

Abkürzungen

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
θ	Winkel zum Hauptmagnetfeld
\geq	größer-gleich
$>$	größer
$<$	kleiner
°	Grad
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
B_0	Hauptmagnetfeld
BMP	knochenmorphogenetisches Protein
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CNR	Kontrast-Rausch-Verhältnis („contrast-to-noise-ratio“)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
dest.	destilliert
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
FACS	Durchflusszytometrie („fluorescence-activated cell sorting“)
FBS	Fetales Bovines Serum
Fe	Eisen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOV	Sichtfeld („field of view“)
FSE	Fast Spin Echo
G	Gauge (Einheit für Kanülendurchmesser)
g	Gramm

Abkürzungen

GAG	Glykosaminoglykane
GDF	Growth and Differentiation Factor
ges.	gesamt
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
GRE	Gradientenecho („gradient echo“)
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGM	Hintergliedmaße
i.v.	intravenös
IC	Isotypkontrolle
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	insulinähnlicher Wachstumsfaktor („Insulin-like growth factor“)
IL	Interleukin
inj.	injiziert
IQR	Interquartilbereich
ISCT	International Society for Cellular Therapy
IU	Internationale Einheiten
Kat.	Kategorie
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
kontralat.	kontralateral
l	Liter
L/D	Lebend/Tot („Live/Dead“)
M.	Musculus
MA	Magic Angle
max.	maximal
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („Major Histocompatibility Complex“)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Abkürzungen

μM	Mikromolar
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
MSC	multipotente mesenchymale Stromazellen
n	Stückzahl
N	Newton
NaCL	Natriumchlorid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Nr.	Nummer
O	Sauerstoff
OBS	Oberflächliche Beugesehne
P	Passage
p.o.	per os
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PGE	Prostaglandin E
pos.	positive
ROI	Bereich von Interesse („region of interest“)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SI	Signalintensität
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis („signal-to-noise-ratio“)
SPIO	superparamagnetische Eisenoxide

Abkürzungen

ST	Schichtdicke („slice thickness“)
Std.	Stunde
STIR	Fett-Signal-Unterdrückung („Short-Tau Inversion Recovery“)
T1, T2, T2*	MRT-Wichtungen
Tab.	Tabelle
TBS	Tiefe Beugesehne
TE	Echozeit (“time to echo“)
TGF	transformierender Wachstumsfaktor („Transforming Growth Factor“)
tgl.	täglich
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	Repetitionszeit („time to repeat“)
TVV	Tierversuchsvorhaben
u.a.	unter anderem
V.	Vena
Vv.	Venae
VGM	Vordergliedmaße
w	gewichtet („weighted“)
Wo.	Woche
x	Multiplikationszeichen, Mal
x g	Zentrifugalbeschleunigung (Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Sehnenerkrankungen sind von großer Relevanz in der Pferdeorthopädie. Sie haben eine hohe wirtschaftliche und klinische Bedeutung, da sie mit 43–53 % die häufigste Erkrankung des Bewegungsapparates darstellen (THORPE et al. 2010). Dabei treten sie mit einer 97–99 %igen Wahrscheinlichkeit an den Vordergliedmaßen auf und sind hauptsächlich in der oberflächlichen Beugesehne (OBS) lokalisiert (THORPE et al. 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen der Entstehung einer Sehnenerkrankung und dem Alter sowie der Belastungsintensität besteht (DOWLING et al. 2000, PATTERSON-KANE et al. 2012).

Sehnenläsionen heilen aufgrund ihres degenerativen Charakters und der geringen regenerativen Kapazität des Sehngewebes nur unter Narbenbildung und neigen dadurch häufig zu Rezidiven (PATTERSON-KANE et al. 2012). Betroffene Pferde können oft ihr ursprüngliches Leistungsniveau nicht mehr zurückerlangen und es kommt zum Ausschluss aus dem Sport (PATTERSON-KANE et al. 2012, SCHRAMME et al. 2010a, SMITH und MCILWRAITH 2012, THORPE et al. 2010).

Eine optimale Therapie würde die ausgedehnte Rekonvaleszenzphase verkürzen, die durch die langsam fortschreitende Sehnenheilung bedingt ist, und zu einer Regeneration des Sehngewebes führen. Demgegenüber führen konventionelle Therapieansätze nicht zu einer deutlichen Verbesserung der Qualität des Sehngewebes und zeigen nur geringe positive Effekte im Sinne der Regeneration (CARVALHO et al. 2011, RICHARDSON et al. 2007). Den regenerativen Effekt soll aber die Therapie mit multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSC) herbeiführen. Sie ist in der Veterinärmedizin bereits etabliert (SMITH et al. 2003) und führt zu äußerst vielversprechenden klinischen Ergebnissen (BURK und BREHM 2011, DOWLING et al. 2000, DYSON 2004, GODWIN et al. 2012, NIXON et al. 2008, SMITH et al. 2003, SMITH et al. 2013). Der genaue Wirkungsmechanismus dieser Therapieform bleibt jedoch noch zu erforschen. So fehlen unter anderem fundierte Erkenntnisse über den Verbleib der MSC nach lokaler Applikation *in vivo*.

Der Verbleib der MSC und ihre Biodistribution kann durch eine Zellmarkierung und -verfolgung (Tracking) untersucht werden. Mehrere dieser Tracking-Methoden sind bereits in der Literatur beschrieben (BERNER et al. 2016, CARVALHO et al. 2014, GEBUREK et al. 2016, GUEST et al. 2008, SOLE et al. 2013, SPRIET et al. 2015). Unter anderem können die MSC mit superparamagnetischen Eisenoxiden (SPIO) gelabelt werden, die sowohl histologisch als auch in der Magnetresonanztomographie (MRT) detektiert werden können. Die Zuhilfenahme des Magic Angle-Effektes während MRT-Untersuchungen kann die Abgrenzbarkeit der SPIO-bedingten hypointensen Artefakte von gesundem Sehngewebe erhöhen (GEBUREK et al. 2016, YANG et al. 2013). Allerdings wurde diese Methode bisher nicht bei Pferden eingesetzt. Durch die Kombination der SPIO-Partikel

Einleitung

mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B kann durch fluoreszenzbasierte Methoden, wie die Fluoreszenzmikroskopie und die Durchflusszytometrie, der Verbleib der MSC exakter analysiert werden.

Ziel des Projektes und der vorliegenden Dissertation ist daher der Erkenntnisgewinn über die Biodistribution der MSC nach lokaler Applikation. Basierend auf diesen Erkenntnissen können Untersuchungen zum Wirkmechanismus angestrebt und die MSC-basierte Sehnentherapie weiterentwickelt werden. Weiterhin sollte die Anwendung des Magic Angle-Effektes in der MRT bezüglich Durchführbarkeit an stehenden Pferden und Effektivität des Zelltrackings evaluiert werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Pathologie der Oberflächlichen Beugesehne

2.1.1 Definition

Für die Erkrankungen der OBS als tendinöse Struktur werden eine Reihe von Bezeichnungen wie Tendinitis, Tendinose, Sehnenläsion oder -ruptur und Tendinopathie verwendet. Sehnenenerkrankungen können sowohl akut als auch chronisch auftreten und symptomatisch oder asymptomatisch verlaufen.

Bei der Tendinose handelt es sich um eine chronische Sehnenenerkrankung auf zellulärer Ebene, es fehlen klinische und histologische Entzündungsanzeichen (MAFFULLI et al. 1998, SMITH und MCILWRAITH 2012). Sie ist durch die Degenerationen der Zellen und der extrazellulären Matrix gekennzeichnet und verläuft meistens asymptomatisch. Ein häufiges Resultat sind spontan auftretende partielle oder vollständige Sehnenrupturen (HO et al. 2014, MAFFULLI et al. 1998).

Tendinitis beschreibt eine physische Überbeanspruchung der Sehne, die durch Entzündungszeichen gekennzeichnet ist. Da hier meistens jedoch keine histopathologische Untersuchung durchgeführt wird, sollte dieser Begriff nicht für überlastungsbedingte Sehnenenerkrankungen, die nur durch klinische Entzündungsanzeichen wie Umfangsvermehrung, Wärme und Druckdolenz repräsentiert sind, verwendet werden (MAFFULLI et al. 1998). Im Allgemeinen hat sich die Bezeichnung Tendinopathie etabliert, da es sich um einen Überbegriff handelt, der keinen Rückschluss auf die Ätiologie und die Symptome zulässt (FU et al. 2010, SMITH und MCILWRAITH 2012).

2.1.2 Ätiologie, Pathogenese, Heilung

Die Vordergliedmaßen tragen etwa 60 % des Körpergewichtes im Stand und deutlich mehr während des Galopps, dies führt vor allem bei hohen Geschwindigkeiten und Hindernissprüngen zu einer hohen Beanspruchung der OBS. Das ist der Grund für die hohe Inzidenz der Erkrankungen der OBS in den Vordergliedmaßen, vor allem bei Galoppfern und Springpferden (STANEK 2004, THORPE et al. 2010).

Im Gegensatz dazu sind Sehnenenerkrankungen der OBS in den Vordergliedmaßen selten bei Westernpferden, die beim Cutting eingesetzt werden (TIPTON et al. 2013). Es besteht keine geschlechterspezifische Prävalenz (PATTERSON-KANE et al. 1997a). Sehnenenerkrankungen der OBS sind häufig im mittleren Bereich des Metakarpus lokalisiert (PATTERSON-KANE und FIRTH 2009, PATTERSON-KANE et al. 1997a). Als mögliche Ursachen dafür werden die geringe Querschnittsfläche der OBS und die geringe Gefäßversorgung (PATTERSON-KANE und FIRTH 2009) in diesem Bereich angegeben. Sie treten bei Renn- und Springpferden zumeist in deren Zentrum auf, sie werden daher

Literaturübersicht

als Kernläsion bezeichnet. Begründet ist dies in der alters- und bewegungsbedingten Veränderung der Sehnencharakteristika im Sehnenzentrum. Bei Westernpferden, die in der Disziplin des Cuttings eingesetzt werden, treten vor allem Läsionen im lateralen Bereich der Sehne auf (TIPTON et al. 2013). Die klinisch erkennbare Sehnenerkrankung mit partieller oder vollständiger Ruptur von Sehnenfasern ist meist kein Resultat einer einzelnen Überbelastung. Vielmehr gehen ihr degenerative Veränderungen voraus, die zu einer Schwächung des Sehngewebes führen (THORPE et al. 2010, WARDEN 2007). Diese Degenerationen treten auf, sobald die Kapazität des zellulären Reparatursmechanismus überschritten ist, wobei sowohl die Zellen, als auch die extrazelluläre Matrix Veränderungen unterworfen sind.

Die Inzidenz der Degenerationen steigt mit zunehmendem Alter (PATTERSON-KANE et al. 2012) und sie werden durch Belastung forciert (DOWLING et al. 2000, SMITH et al. 1999, WEBBON 1977). Außerdem haben auch individuelle Charakteristika wie genetisch festgelegte Eigenschaften einen Einfluss. Im Allgemeinen beträgt die maximale Dehnbarkeit bei gesundem Sehngewebe 12–20 %, allerdings nimmt sie durch die Degeneration des Sehngewebes ab und kann dann schließlich während des Galopps (Dehnung 11–16 %) überschritten werden (DOWLING et al. 2000, SMITH et al. 2002).

Degeneriertes Sehngewebe ist zunehmend bei Pferden im Alter von ≥ 3 Jahren zu finden (DOWLING et al. 2000) und ist makroskopisch an einer bräunlichen Farbänderung des Sehnenzentrums zu erkennen (SMITH et al. 2002, THORPE et al. 2010). Histologisch tritt es unter anderem durch eine irreguläre Faserausrichtung mit Separation und Mikroläsionen einzelner Sehnenfibrillen und -fasern in Erscheinung (PATTERSON-KANE et al. 2012). Es findet eine Reduktion der Sehnenfaserdurchmesser, Metaplasie, Fibroplasie und Neovaskularisierung statt (DOWLING et al. 2000, MAFFULLI et al. 1998). Reduziert sich nun jedoch zentral der Faserdurchmesser durch die belastungsinduzierte Teilung größerer Fasern (DOWLING et al. 2000), verringert sich ebenfalls die Beanspruchbarkeit der Sehne (PATTERSON-KANE et al. 1997b).

Durch die heterogene Zellverteilung (RILEY 2008) und die Abnahme der Zellaktivität kommt es zu einer Reduktion der Kollagendichte mit anteilmäßig höherem Kollagen 3-Gehalt (MAFFULLI et al. 1998, PATTERSON-KANE et al. 2012).

Es sind Veränderung in der wellenförmigen Anordnung der kollagenen Fasern (Crimp) zu erkennen. Ab einem Alter von ≥ 10 Jahren kommt es zur altersbedingten Verringerung des Crimp-Winkels im Zentrum der Sehne (PATTERSON-KANE et al. 1997a), außerdem kommt es belastungsbedingt zu einer Reduktion des Crimp-Winkels und der Crimp-Länge (PATTERSON-KANE et al. 1998). Weil das Crimp einen mechanischen Puffer bildet, kommt es während der mechanischen Dehnung zunächst zum Verlust der Wellenform, bevor die Sehnenfasern selbst gedehnt werden (PATTERSON-KANE et al. 2012). Eine Veränderung des Crimps im Sehnenzentrum führt somit zu einer verminderten Elastizität

Literaturübersicht

und zum vorzeitigen Erreichen der maximalen Dehnbarkeit im Vergleich zur Peripherie (DOWLING et al. 2000).

Weiterhin kommt es zu einer Veränderung der nicht-kollagenen extrazellulären Matrix, da der Gehalt an Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) ebenfalls alters- und belastungsabhängig ist und COMP der strukturellen Integrität dient. Eine Studie von SMITH et al. (2002) zeigte, dass der Gehalt von Geburt bis zu einem Alter von etwa 2 Jahren (= Sehnenreifung) ansteigt und dann wieder langsam abfällt. Wird das Pferd vor der Maturität nur sehr gering oder exzessiv belastet, kommt es zu einer Reduktion im Vergleich zu Jungpferden, die auf der Koppel gehalten werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine adäquate Bewegung essentiell für die korrekte Sehnenentwicklung ist. Bei lang einwirkendem Training nach der Sehnenreifung kommt es ebenfalls zu einer Verringerung der COMP-Konzentration.

Der initiale Stimulus der Degeneration ist nicht hinreichend bekannt. Es werden jedoch zahlreiche Ursachen wie physikalisch entstandene Mikroläsionen durch Überbelastung, Sauerstoffmangel und Hyperthermie (THORPE et al. 2010) sowie negative Einflüsse endokrin-metabolischer Erkrankungen (ABATE et al. 2009, FU et al. 2010) diskutiert.

Physikalischer Stress wie vorrangig wiederkehrende Zugbelastungen sind die Hauptursache für Sehnenkrankungen (PATTERSON-KANE et al. 2012), die zu vereinzelt fibrillären Mikroläsionen führen. Diese akkumulieren durch die reduzierte regenerative Kapazität nach Abschluss der Sehnenreifung (SMITH et al. 1999), durch eine anhaltende starke Zugbelastung oder eine zu kurz gewählte Rekonvaleszenzzeit (PATTERSON-KANE et al. 2012). Das Resultat sind degenerative Veränderungen, die zu einer veränderten Kommunikation zwischen Tendinozyten und Sehnenmatrix (THORPE et al. 2010) und einer veränderten Zellaktivität führen. Die durch Zellalterung bedingte geringe physiologische Anpassungsfähigkeit auf einwirkende Kräfte (THORPE et al. 2010), die verminderte Mechanotransduktion und die verminderte Stimulierung durch Wachstumsfaktoren (SMITH et al. 2002) resultiert in einer fortschreitenden Degeneration. Dies führt zu einer vermehrten Produktion von Matrix-abbauenden Enzymen, zum Beispiel der erhöhten Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) -1 (THORPE et al. 2010). Auch die Ermüdung der an der mechanischen Funktion der OBS beteiligten Muskeln, hier des M. flexor digitalis profundus, stellt einen wichtigen Faktor bei der Entstehung von Mikroläsionen in der OBS dar. Es kommt zu einer Destabilisierung des Fesselgelenkes und dadurch zu einer höheren Zugbelastung in der OBS (THORPE et al. 2010). Weitere Ursachen für eine Überbelastung der OBS können mangelnder Trainingszustand, unkoordinierte Muskelaktivität (DOWLING et al. 2000) und ungünstige Bodenbeschaffenheit sein (ABATE et al. 2009, SMITH et al. 2014). Sowohl harter Grund bei hohen Geschwindigkeiten als auch tiefer, weicher Boden können Sehenschäden hervorrufen (TIPTON et al. 2013).

Während hoher Belastungen kommt es durch die geringe Durchblutung im Sehngewebe zu einem langsamen Wärmeabtransport. Langandauernde, hohe Temperaturen in der OBS sind die Folge

Literaturübersicht

(längere Galoppphasen: bis zu 45 °C) (WILSON und GOODSHIP 1994). Zell-zu-Zell-Kontakte werden verändert und daraus resultiert eine verminderte Kollagensynthese. Hohe Temperaturen führen vermutlich auch zu einem vermehrten Zelltod (PATTERSON-KANE et al. 2012, THORPE et al. 2010). Außerdem ist die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren erhöht, was die vermehrte Bildung von Matrix-abbauenden Enzymen fördert (THORPE et al. 2010). Es kommt wahrscheinlich zugleich durchblutungsbedingt zu einem Sauerstoffmangel, der die Zellaktivität negativ beeinflusst (WILSON und GOODSHIP 1994).

Unter den endokrin-metabolischen Erkrankungen, die einen Einfluss auf Bänder und Sehnen haben, ist bei Pferden vor allem das Cushing-Syndrom zu nennen. Neue Untersuchungen von HOFBERGER et al. (2015) haben gezeigt, dass es bei Hypophysenadenomen zu Degenerationen im Unterstützungsband der Tiefen Beugesehne (TBS) kommt. Es treten unter anderem Veränderungen in der longitudinalen Faserausrichtung sowie vermehrte Vaskularisation und Proteoglykanakkumulationen auf. Ähnliche Ergebnisse wurden bei spontan auftretenden Achillessehnenrupturen beim Menschen festgestellt, die an einem Cushing-Syndrom erkrankt waren oder einer Langzeittherapie mit Glukokortikoiden unterzogen wurden (MAFFULLI et al. 2011).

Bei der Degeneration des Sehngewebes herrscht ein größerer Grundumsatz, der zu einer inadäquaten Heilung oder ungünstigen Antwort auf zellulärer Ebene führt (THORPE et al. 2010). Durch fortschreitende Degeneration und einwirkende hohe Belastungen kommt es schließlich zur klinisch diagnostizierbaren Sehnenkrankung. Sehnenläsionen sind bei Rennpferden (National Hunt) unter 5 Jahren selten dokumentiert (TIPTON et al. 2013), bei Cutting horses treten sie jedoch vor allem unter 5 Jahren auf. Begründet ist dies möglicherweise in der unterschiedlichen Art und Intensität der Belastung (TIPTON et al. 2013).

Die Heilung von Sehnenläsionen ist durch unterschiedliche Phasen gekennzeichnet: die akute Entzündungsphase (<10 Tage), die Proliferationsphase (4–45 Tage) und die Remodellingphase (>45 Tage) (BOSCH et al. 2011).

Die akute Entzündungsphase ist durch Einblutungen und Einwanderung von Entzündungszellen charakterisiert. Die Sehnenquerschnittsfläche nimmt zu, ultrasonographisch ist eine ödematöse Schwellung feststellbar. Durch endogene Kollagenasen und Proteasen kommt es zu einer Vergrößerung der initial entstandenen Läsion (PATTERSON-KANE und FIRTH 2009), zerstörtes und nekrotisches Sehngewebe wird abgebaut (WATTS et al. 2012). VAN SCHIE et al. (2009) veröffentlichte, dass eine Vergrößerung über 4 Wochen stattfindet und dieser Effekt durch einwirkende Kräfte verstärkt wird.

In der Reparationsphase proliferieren die Fibroblasten und es wird Kollagen synthetisiert, wobei zunächst vor allem Kollagen Typ 3-Fasern gebildet werden (DOWLING et al. 2000). Diese zeichnen

Literaturübersicht

sich zwar durch eine höhere Elastizität aus, besitzen jedoch eine geringe Festigkeit. Es bildet sich ein fibroproliferatives Granulationsgewebe. Die ersten 6 Monate sind durch lose Typ 1- und Typ 3-kollagene Fasern gekennzeichnet.

In der Remodelling-Phase kommt es zu einer Reduktion des Typ 3-Fasergehaltes durch den Ersatz mit Kollagen-Typ 1-Fasern. Die kollagenen Fasern ordnen sich zunehmend in longitudinaler Ausrichtung an und werden gebündelt (WATKINS et al. 1985) und die Zelldichte nimmt im Sehngewebe ab. Dennoch sind bis zu 14 Monaten nach dem Auftreten der Sehnenkrankung Typ 3-Kollagen und schmale Kollagenfasern sowie fehlende Faserbündelung und lineare Orientierung erkennbar (DOWLING et al. 2000). Mit fortschreitender Zeit nimmt die Quervernetzung zwischen den kollagenen Fasern zu und die Dehnungs- und Struktureigenschaften verbessern sich (ABATE et al. 2009). Eine mögliche Ursache für die lang anhaltende erhöhte Sehnenquerschnittsfläche ist die Kompensation der reduzierten Elastizität des Narbengewebes (CREVIER-DENOIX et al. 1997).

Dieser Heilungsprozess wird von einigen Faktoren positiv beeinflusst. So unterstützen MMP-9 und -13 in den ersten Tagen den Kollagenabbau und MMP-3, -4 und -14 ab dem 28. Tag den Faserumbau (ABATE et al. 2009). Des Weiteren führen Wachstumsfaktoren und Mediatoren, zum Beispiel Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und Stickstoffmonoxid sowie IGF (insulinähnlicher Wachstumsfaktor) -1 und TGF (transformierender Wachstumsfaktor) - β , unter anderem zur Neovaskularisierung, Zellmigration, Fibroblastenstimulation und somit zur gesteigerten Kollagensynthese (ABATE et al. 2009, HO et al. 2014, RICHARDSON et al. 2007).

Für einen optimalen Heilungsverlauf muss gewährleistet werden, dass die Rekonvalensenzzeit ausreichend lange eingehalten wird und es darf möglichst zu keiner weiteren Überbelastung kommen. Außerdem muss eine optimale Blut- und Stoffwechselfversorgung vorliegen (ABATE et al. 2009). Die Remodellingphase dauert bei den meisten Sehnenläsionen 8–9 Monate (TIPTON et al. 2013), sie ist abhängig von der Lage und dem Ausmaß der Sehnenläsion. So zeigen Randläsionen eine bessere Heilungstendenz und zeichnen sich daher durch eine kürzere Rekonvalensenz aus, welche mit etwa 4 Monaten angegeben wird (TIPTON et al. 2013). Dahingehend beginnen die meisten Sportpferde nicht wieder vor dem 12.–16. Monat mit dem Galopptraining (DYSON 2004).

Selbst bei optimalem Heilungsverlauf wird das Ersatzgewebe jedoch nicht die strukturellen und mechanischen Eigenschaften eines intakten Sehngewebes wiedererlangen (HO et al. 2014, RICHARDSON et al. 2007), da Sehngewebe eine geringe Regenerationsfähigkeit aufweist. Dieses ist begründet durch die geringe Gefäßversorgung in der Sehne, die reduzierte Zellaktivität und die nur wenig vorliegenden Progenitorzellen im Sehngewebe (CARVALHO et al. 2011). Durch die Bildung von zellreichem, ungeordnetem fibrösem Narbengewebe kommt es zu einer reduzierten Dehnbarkeit dieses Sehnenabschnitts (RICHARDSON et al. 2007). Aus diesem Grund ist ganz klar das Verhindern einer Sehnenläsion zu präferieren. Zur Prävention gehören die Verwendung einwandfreien genetischen Materials in der Zucht, die frühzeitige und adäquate Belastung der Jungpferde, der Schutz

vor hohen und repetitiven Belastungen sowie Risikofaktoren und die Reaktivierung von ruhenden Zellpopulationen zur Reparatur der Mikroläsionen (SMITH et al. 2002).

2.1.3 Prognose

Der Heilungsprozess verläuft langsam und aufgrund der geringen Regenerationskapazität meist inadäquat, weshalb es häufig zu Rezidiven kommt (PATTERSON-KANE und FIRTH 2009). Das Sehnennarbgewebe hat veränderte biochemische und funktionelle Eigenschaften (PATTERSON-KANE und FIRTH 2009). Die hohe Rezidivrate ist der reduzierten Elastizität des Narbgewebes geschuldet, da es im angrenzenden Sehngewebe zu einer höheren Krafteinwirkung kommt (SMITH et al. 2002). Erneute Sehnenläsionen treten meistens in dem unmittelbar angrenzenden Gewebe auf (CREVIER-DENOIX et al. 1997), wobei die Prognose abhängig von dem Ausmaß und der Lage der Sehnenläsion ist. So haben Randläsionen, die bei Westernpferden (Cutting horses) auftreten, eine bessere Heilungstendenz und somit eine bessere Prognose als die typischen Kernläsionen der Spring- und Rennpferde. 20–60 % der Spring- und Rennpferde mit einer zentralen Sehnenläsion werden wieder sportlich genutzt, von diesen erleiden jedoch bis zu 80 % ein Rezidiv (DOWLING et al. 2000, TIPTON et al. 2013). TIPTON et al. (2013) publizierten Ergebnisse einer Studie, die zeigte, dass 82 % der Westernpferde wieder sportlich genutzt wurden und nur 18 % von diesen erneut eine Sehnenläsion zeigten.

2.2 Sehnendefektmodelle

Verschiedene Erkrankungen und der Erfolg möglicher Therapiemethoden müssen in Tierversuchen untersucht und evaluiert werden. In vitro- oder ex vivo-Studien geben zwar hinreichende Informationen, allerdings können in vivo-Bedingungen, insbesondere die Zellkommunikation, nicht vollständig simuliert werden. In vitro-, ex vivo- und in vivo-Ergebnisse müssen gemeinsam interpretiert werden, um die vollständige Pathophysiologie zu erfassen (DIRKS und WARDEN 2011). Es ist möglich, invasive Untersuchungen von Geweben, wie zum Beispiel die Analyse biochemischer, biomechanischer und histologischer Eigenschaften, durchzuführen, um die Ätiologie und Pathogenese von Erkrankungen besser zu verstehen und geeignete Therapeutika zu ermitteln. Tierversuche stellen ebenfalls einen wichtigen Bestandteil in der präklinischen Forschung der Humanmedizin dar. Sie sind essentiell für die Translation neuer Therapiemethoden, da die Analyse der Wirksamkeit und Sicherheit verschiedener Arzneimittel zum Beispiel von dem Bundesinstitut für Arzneimittel, der Europäischen Arzneimittel-Agentur oder der amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel gefordert wird.

Die Auswahl der Spezies stellt für einen Tierversuch und die Translation der Ergebnisse in die Humanmedizin einen wichtigen Faktor dar, identische Verhältnisse können allerdings nicht realisiert

Literaturübersicht

werden (BREHM et al. 2012). Um eine vollständige Erfassung von klinischen, funktionellen und histopathologischen Charakteristika zu erlangen, ist es daher gegebenenfalls notwendig verschiedene Tiermodelle zu kombinieren (LUI et al. 2011).

Die Tendinopathie hat große Relevanz in der Pferde- und Humanorthopädie. Die Ergebnisse von in vivo-Studien stellen somit für beide Bereiche einen Wissenszuwachs dar. Die Probenentnahme und -analyse beim Menschen wird, wenn überhaupt, erst in vorgeschrittenem Stadium der Tendinopathie durchgeführt und entsprechende Kontrollen liegen nicht vor, daher müssen Hinweise zur Pathogenese und Heilung aus Tierversuchen transferiert werden. Die OBS des Pferdes weist hierbei einen guten Modellcharakter für die menschliche Achillessehne auf (PATTERSON-KANE et al. 2012, THORPE et al. 2010). Bei keinem anderen Tier finden sich Sehnenerkrankungen natürlicher Genese, die mit der Achillessehnentendinopathie des Menschen vergleichbar sind. Es herrschen ähnliche physiologische, pathophysiologische und biomechanische Bedingungen, die in keinem anderen Tiermodell erreicht werden (PATTERSON-KANE et al. 2012). Die Ätiologie der Sehnenerkrankungen ist in beiden Spezies alters- und belastungsbedingt. Die Krafteinwirkung auf die Sehnen beläuft sich bei hohen Belastungen auf mehrere tausend Newton (KADER et al. (2002): in der Achillessehne 3786 N während Springens, bis 9000 N während des Laufens; DOWLING und DART (2005): in der OBS 6900 N während des Trabs). Bei anderen Tiermodellen, auch Großtiermodellen wie zum Beispiel das Schaf, sind die einwirkenden Kräfte deutlich geringer. Die Manipulation und Untersuchung der Sehne ist bei Pferden aufgrund ihrer Größe einfacher durchführbar. Allerdings ist ebenfalls zu beachten, dass aus diesem Grund die Haltungs- und Versuchskosten hoch sind und das Handling der Tiere schwieriger ist als bei kleineren Versuchstieren.

Es bestehen bereits etablierte Pferdemodelle für die Tendinopathie, die auf einer enzymatischen und/oder mechanischen Induktion der Sehnenläsion beruhen. Keines davon kann allerdings umfassend alle Eigenschaften einer Tendinopathie natürlicher Genese widerspiegeln und die Auswahl einer Technik stellt vielmehr einen Kompromiss dar.

Die Kollagenase-induzierte Tendinopathie wird kontrovers diskutiert, allerdings werden die Studienergebnisse für viele Erklärungen der Pathologien der OBS herangezogen (PATTERSON-KANE und FIRTH 2009). Sie soll die belastungsinduzierte Tendinopathie und die damit verbundene Freisetzung von Matrix-abbauenden Enzymen aus Entzündungszellen vor einer partiellen oder vollständigen Ruptur imitieren (SCHRAMME et al. 2010a). Aus diesem Grund gibt dieses Modell die Situation bei einer natürlichen Sehnenerkrankung nach Meinung von WATTS et al. (2012) adäquater wieder. Es gibt einige funktionelle, klinische (Hypoechogenität im Ultraschall, bewegungsbedingter Schmerz) und histologische (Degeneration, steigende Zellzahl und Vaskularisierung, inadäquate Heilung) Merkmale, die vergleichbar mit denen natürlicher Genese sind (CADBY et al. 2013, LUI et al. 2011), allerdings führt die Injektion von Kollagenase zu einer diffusen, starken und unkontrollierten Entzündungsreaktion (WATTS et al. 2012). Es kommt häufig zu keiner typischen Kernläsion, bei der

Literaturübersicht

der Defekt noch von intaktem Sehngewebe umgeben ist und die Ausdehnung reicht zum Teil bis in das Paratendineum (WATTS et al. 2012). Eine Vergrößerung der Sehnenläsion über einen Zeitraum von 6–8 Wochen wird von einigen Autoren angegeben (NIXON et al. 2008, WATTS et al. 2012). Folglich wird kritisiert, dass das Ausmaß und die Lokalisation nicht standardisierbar sind, wobei die Läsionen meistens groß und irregulär sind. Das Ausmaß der Sehnenläsion stellt jedoch den wichtigsten Faktor für den Therapieerfolg verschiedener Therapeutika dar und ist essentiell für die Vergleichbarkeit innerhalb einer Studie (SCHRAMME et al. 2010a). Außerdem wird bemängelt, dass ein Therapeutikum nicht nur in das Zentrum der Sehne und damit der Sehnenläsion appliziert werden kann (WATTS et al. 2012).

In der Studie von BALES DENT BARREIRA et al. (2008) wurde festgestellt, dass die histologischen Merkmale einer akuten Entzündung bis zu 48 Tage nach der Induktion vorhanden sind, dagegen sind sie in Sehnenkrankungen natürlicher Genese ausschließlich in den ersten zehn Tagen nachweisbar. Der chronisch-degenerative Charakter der Tendinopathie wird somit nicht hinreichend reproduziert (DIRKS und WARDEN 2011, WARDEN 2007).

Als Alternative wird in der Literatur das mechanische Verfahren beschrieben (BOSCH et al. 2011, CADBY et al. 2013, SCHRAMME et al. 2010a, VAN SCHIE et al. 2009). Einerseits kann ein Sehnensegment inklusive Peritendineum herausgeschnitten werden, wobei der Sehnendefekt nicht wieder verschlossen wird (VAN SCHIE et al. 2009, WATKINS et al. 1985). Andererseits können ausschließlich zentrale Fasern und Gefäße durch Verschieben eines Instrumentes in der Sehne ohne Beteiligung des Paratendineums zerstört werden (ausgenommen vom Eintritt des Instruments) (SCHRAMME et al. 2010a). Es handelt sich um einen perakuten Prozess, der die degenerative Pathogenese nicht wiedergeben kann. Es kommt zur Nekrose und Demarkation. Das Ausmaß der Läsion ist besser kontrollierbar, allerdings kommt es auch hier durch enzymatischen Abbau zu einer Vergrößerung. Laut SCHRAMME et al. (2010a) führt dies zu einem Einflussfaktor, der die Interpretation von therapeutischen Erfolgen erschweren kann. CADBY et al. (2013) schätzen den Einfluss der Größenvarianz nicht stark ein und halten die Induktion für standardisierbar. Studienergebnisse von SCHRAMME et al. (2010a) zeigten, dass nach der mechanischen Induktion von Sehnenläsionen zu keinem Zeitpunkt histologische Entzündungsanzeichen nachgewiesen werden konnten. Auch die klinischen Symptome einer Tendinopathie sind dabei nur in geringem Maß vorhanden. Die Organisation der Kollagene ist nach der mechanischen Induktion stärker verändert als bei der Tendinopathie natürlicher Genese (CADBY et al. 2013). Histologische Charakteristika wie die Hypervaskularisation, die Hyperzellularität und der Verlust der Matrixorganisation sowie ein Anstieg des Glykosaminoglykanen (GAG)- und MMP-Gehaltes sind ebenfalls feststellbar (CADBY et al. 2013). Im ultrasonographischen Vergleich von Läsionen natürlicher und enzymatischer Genese sowie mechanisch-induzierten Läsionen sind Gemeinsamkeiten feststellbar, allerdings gibt es unterschiedliche Zeitpunkte für die Heilungsphasen (SCHRAMME et al. 2010a). Im Vergleich ist die

Literaturübersicht

Sehnenstruktur bei Läsionen natürlicher Genese für 6 Monate, bei Läsionen nach mechanischer Induktion 5–6 Monate und Läsionen nach enzymatischer Induktion 10–14 Monate verändert (SCHRAMME et al. 2010a).

Insgesamt ist festzuhalten, dass sich die mechanisch-induzierten Sehnenläsionen für die Erforschung der Sehnenheilung eignen, allerdings kann der chronisch-degenerative Verlauf der Tendinopathie nicht imitiert werden und somit ist die Evaluierung der Pathogenese nicht möglich (CADBY et al. 2013, JAFARI et al. 2015).

Die Kombination von mechanischer und enzymatischer Induktion stellt eine weitere Alternative dar. Der zunächst mechanisch erzeugte Kanal macht die Applikation von Kollagenase ohne einen großen Widerstand möglich. Diese Methode verhindert ein Ausbreiten der Kollagenase in alle Richtungen (WATTS et al. 2012) und damit eine unkontrollierte Vergrößerung der Läsion mit ausgedehnter Beteiligung des Peritendineums. Eine geringgradige Vergrößerung über 3 Wochen ist mit der einer natürlichen Genese vergleichbar (WATTS et al. 2012). Injizierte Therapeutika verbleiben im Zentrum der Läsion, da diese von intaktem Sehngewebe und Peritendineum umgeben sind. Ergebnisse aus Ultrasonographie und MRT sowie histologischer und molekularbiologischer Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kombination einer mechanischen und enzymatischen Induktion der Situation in natürlich entstandenen Sehnenläsionen am nächsten kommt (WATTS et al. 2012).

2.3 Diagnostik bei Erkrankungen der Oberflächlichen Beugesehne

Die Diagnosestellung und Beurteilung der Sehnenerkrankung kann anhand von klinischen Symptomen, Ultraschall- und MRT-Untersuchungen und histologischen Analysen durchgeführt werden (SMITH und MCILWRAITH 2012).

2.3.1 Routineuntersuchungen

Die klinische Untersuchung kann bereits hinweisend auf eine Sehnenerkrankung sein. Es kommt je nach Zeitverlauf der Erkrankung zu einer Umfangsvermehrung der Sehne, vermehrter Wärme und Druckdolenz. Außerdem führt eine Sehnenläsion zu einer Lahmheit des Pferdes, die allerdings meist nicht für lange Zeit feststellbar ist (CADBY et al. 2013). Für eine genaue Diagnosestellung und weitere Informationen wie Lokalisation und Ausmaß sind jedoch bildgebende Diagnostika erforderlich.

Die Ultraschalluntersuchung stellte lange Zeit den einzigen Goldstandard bei der Untersuchung von Sehnen und Bändern dar (SCHRAMME et al. 2010a). Sie ist nicht-invasiv, allerdings ist die Qualität und Reproduzierbarkeit von individuellen Einflüssen, wie zum Beispiel der Erfahrung des Untersuchers, abhängig. Die Ultrasonographie dient der Diagnosestellung und kann bei der Therapieentscheidung helfen. Sie kann Hinweise für die Prognose einer Sehnenerkrankung geben und ermöglicht die Verlaufskontrolle während der Heilung (BALESDENT BARREIRA et al. 2008).

Literaturübersicht

Über regelmäßige ultrasonographische Untersuchungen kann das Bewegungsprogramm individuell angepasst und eventuell vorhandene Rezidive können festgestellt werden. Außerdem kann die Effizienz eines Therapeutikums in in vivo-Studien überprüft werden. Eine akute Sehnenläsion stellt sich im Ultraschall aufgrund von Faserverlust, Hämorrhagien und Ödemen hypoechogen dar und es ist ein Verlust der linearen Faserausrichtung feststellbar (BOSCH et al. 2011, PATTERSON-KANE et al. 1998). Handelt es sich dagegen um eine chronische Sehnenenerkrankung mit Fibrosen, ist sie durch hyperechogene Bereiche feststellbar, allerdings ist die Unterscheidung zu intaktem Sehnenewebe schwieriger.

Es können verschiedene Parameter zu Hilfe genommen werden: Sehnenquerschnittsfläche, Ausmaß (Läsionsquerschnittsfläche, -länge und -volumen) und Lokalisation der Läsion, Faserverlauf und -orientierung, peritendinöses Ödem, Kontur der Sehne und Echogenität (DOWLING et al. 2000). Außerdem gibt es verschiedene Scores, die zur Beurteilung herangezogen werden können (z.B. VALLANCE et al. (2012)).

Insbesondere die Zunahme der Sehnenquerschnittsfläche stellt einen wichtigen Parameter bei der ultrasonographischen Untersuchung dar (DOWLING et al. 2000, TIPTON et al. 2013). Während die Messung der Läsionsquerschnittsfläche aufgrund mangelnder Abgrenzbarkeit oft schwierig ist, kann diese Kenngröße leicht festgehalten werden und mit der OBS anderer Gliedmaßen verglichen werden. Die Echogenität kann lediglich einen Hinweis auf die strukturelle Integrität geben, denn die Heilungsphasen können anhand dieser Informationen nicht unterschieden werden (BOSCH et al. 2011, VAN SCHIE et al. 2009). Ein Nachteil der ultrasonographischen Untersuchung ist die Unterschätzung der Läsionsquerschnittsfläche um 18 % bei einem Verlauf von >4 Wochen im Vergleich zur MRT-Untersuchung (KARLIN et al. 2011). Da jedoch insbesondere die Faseranordnung und das Ausmaß der Läsion entscheidend für ein positives Resultat sind (DOWLING et al. 2000), ist eine MRT-Untersuchung als sinnvoll zu erachten.

2.3.2 MRT-Untersuchung

Die Durchführung von MRT-Untersuchungen bei Sehnenenerkrankungen ist in der Humanmedizin bereits als Goldstandard anzusehen (KARLIN et al. 2011, KASASHIMA et al. 2002) und auch in der Pferdeorthopädie von zunehmender Bedeutung (KASASHIMA et al. 2002, MAIR et al. 2005). Sie wurde lange aufgrund hoher Kosten, der mangelnden Verfügbarkeit von Geräten und der Tiergröße selten eingesetzt, sie hat jedoch einige Vorteile. Die MRT-Untersuchung ist reproduzierbar und es kommt nur zu einer geringen Beeinflussung der Bildqualität durch verschiedene Untersucher. Sie besitzt im Vergleich zur Ultraschalluntersuchung, vor allem bei einem chronischen Verlauf einer Sehnenenerkrankung, eine höhere Sensitivität (KARLIN et al. 2011, KASASHIMA et al. 2002). Die Durchführung bei Folgeuntersuchungen kann Rezidive reduzieren, indem das Bewegungsprogramm

Literaturübersicht

an den Heilungsverlauf angepasst werden kann, oder gegebenenfalls ein frühzeitiges Erkennen von Rezidiven möglich machen (KASASHIMA et al. 2002).

Die Ursache für den Kontrast in einer MRT-Aufnahme ist die unterschiedliche Verteilung und Dichte von Wasserstoffprotonen sowie der Anteil gebundener und frei vorliegender Wassermoleküle (MAIR et al. 2005). Durch die Anfertigung von Aufnahmen in unterschiedlichen Sequenzen kann die Sehnenläsion genauer charakterisiert werden (KARLIN et al. 2011, SMITH und MCILWRAITH 2012). T1-gewichtete (w) Sequenzen zeigen die höchste Bildauflösung anatomischer Strukturen. T2w Sequenzen haben aufgrund einer längeren Echozeit (TE) und eines verminderten Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) eine geringe Bildauflösung, sie reagieren sensitiver auf Veränderungen des Wassergehaltes eines Gewebes und sind deshalb überlegen in der Beurteilung von Gewebecharakteristika und Heilungsprozessen (MAIR et al. 2005). Bei der Short Tau Inversion Recovery (STIR)-Sequenz handelt es sich um eine fettunterdrückte Technik, die eine präzisere Erkennung geringer Grauwertunterschiede in anderen Geweben möglich macht (DELFAUT et al. 1999).

Intaktes Sehngewebe stellt sich in MRT-Aufnahmen aufgrund des geringen Wassergehaltes und der hohen Konzentration an eng gepackten kollagenen Fasern hypointens dar (CRASS et al. 1992). Akute Sehnenläsionen, die durch Hämorrhagien, Ödeme und Zellinfiltration gekennzeichnet sind, stellen sich aufgrund des höheren Wassergehaltes in allen MRT-Sequenzen als gut abgrenzbare hyperintense Bereiche in der sonst hypointensen OBS dar (FU et al. 2010, SCHRAMME et al. 2010b). Während der Heilung nimmt insbesondere die Signalintensität (SI) in T2w- und STIR-Sequenzen ab, da sie sensitiver auf Veränderungen der Wasserstoffprotonen-Konzentration und der Zelldichte reagieren (KARLIN et al. 2011, SCHRAMME et al. 2010b, SMITH und MCILWRAITH 2012). Die Hyperintensität der Sehnenläsionen über mehrere Monate in der T1w-Sequenz liegt an der Anordnung der Fasern, der Neovaskularisierung und dem hohen Gehalt an Wassermolekül-bindenden GAG (KARLIN et al. 2011, SCHRAMME et al. 2010b). In diesem Fall kann es zur Verwechslung mit geringgradigen Veränderungen in dem Sehngewebe kommen, denn hier ist ebenfalls die SI in der T1w-Sequenz erhöht und in der T2w-Sequenz nicht oder nur leicht (SMITH und MCILWRAITH 2012). In diesem Fall ist das Heranziehen von klinischen Symptomen essentiell, um zwischen einer chronischen und einer akuten Tendinopathie unterscheiden zu können. Insgesamt ist jedoch zu sagen, dass die MRT-Untersuchung eine Unterscheidung zwischen akuten und chronischen Tendinopathien möglich macht (SCHRAMME et al. 2010b) und eine adäquate Beurteilung des Heilungsverlaufes gestattet.

Zusätzlich können mit Hilfe von MRT-Untersuchungen Größe, Lokalisation und SI der Sehnenläsion festgehalten werden. Im Vergleich zur ultrasonographischen Untersuchung werden die Läsionsquerschnittsfläche und das Läsionsvolumen in T1w-Sequenzen größer und in T2w-Sequenzen kleiner dargestellt (SCHRAMME et al. 2010b).

Literaturübersicht

Es werden in der Pferdeorthopädie Hochfeld- und Niederfeld-MRT-Systeme eingesetzt. Die Hochfeld-MRT-Untersuchung einer Pferdegliedmaße liefert eine hohe Bildqualität, sie muss allerdings in Allgemeinanästhesie durchgeführt werden. Niederfeld-MRT-Untersuchungen können am stehenden, sedierten Pferd durchgeführt werden. Trotz der geringeren Bildqualität und der Anfälligkeit für Bewegungsartefakte ist dieses System für die Durchführung engmaschiger Untersuchungen zu bevorzugen, da die Belastung und das Narkoserisiko der Pferde sowie die anfallenden Kosten reduziert werden können.

2.4 Therapieansätze

Ein optimales Therapeutikum würde den Heilungsprozess beschleunigen und zur Regeneration des Sehngewebes führen, welches anschließend möglichst die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Ursprungsgewebes aufweisen sollte.

2.4.1 Konservative und chirurgische Therapiemethoden

Bisher wurden viele verschiedene konservative Therapien eingesetzt. Physikalische (z.B. Kältetherapie), medikamentöse (z.B. Entzündungshemmer, intra- und peritendinöse Hyaluronsäure-Injektion) und chirurgische (z.B. Sehnsplitting) Therapien sollen die Entzündungsreaktion reduzieren und/oder den Heilungsprozess anregen (DOWLING et al. 2000, NIXON et al. 2008). Diese Therapieansätze konnten jedoch zu keiner signifikanten Verbesserung der Sehnenheilung führen. Die Regeneration von Sehngewebe kann durch konservative Therapiemethoden nicht erreicht werden, es kann lediglich die Funktionalität des fibrösen Narbengewebes geringgradig verbessert werden (HO et al. 2014). Bisher hat sich nur die Durchführung eines kontrollierten Bewegungsprogrammes (NIXON et al. 2008, SMITH et al. 2002), um Rezidive durch zu frühe Belastung zu verhindern, bewährt. Es sollte durch regelmäßiges Monitoring angepasst werden. Die Bewegung verbessert die Ausrichtung der heilenden Sehnenfasern in Zugrichtung und verringert den Elastizitätsverlust, sie ist somit essentiell während der Rekonvaleszenzphase (ASPENBERG 2007, DOWLING et al. 2000).

2.4.2 Regenerative Therapiemethoden

Einen aussichtsreichen Therapieansatz stellt die regenerative Medizin dar. Studien haben gezeigt, dass insbesondere der Einsatz von MSC erfolgsversprechende Ergebnisse liefert (GODWIN et al. 2012, NIXON et al. 2008, SMITH et al. 2013). Es besteht die Hoffnung, dass hiermit die Geweberegeneration erreicht wird oder die Reparatur des Sehngewebes entscheidend verbessert wird.

2.5 Multipotente mesenchymale Stromazellen

2.5.1 Definition

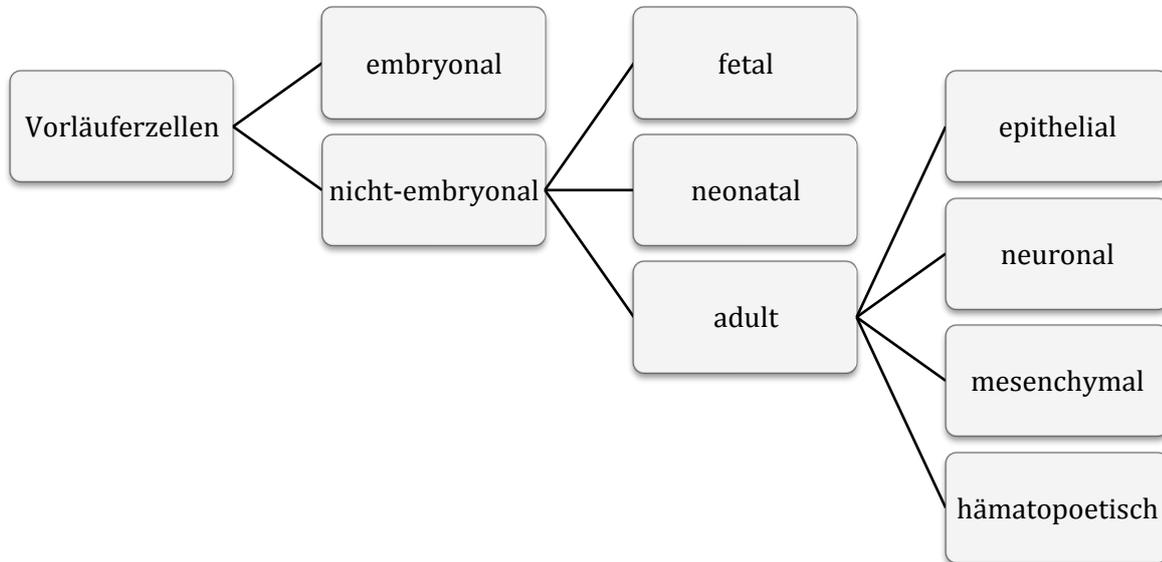


Abb. 1 Stamm- bzw. Vorläuferzellen und ihre Herkunft

Vorläuferzellen sind kernhaltige, hypoimmunogene Zellen, aus denen sich die verschiedenen Zelltypen des Körpers entwickeln können. Sie können autologen oder allogenen Ursprungs sein. Der Vorteil autologer Vorläuferzellen ist die geringe Immunogenität (RICHARDSON et al. 2007), allerdings wurden bisher auch bei allogenen Einsatz keine negativen Ergebnisse festgehalten (GUEST et al. 2008). Die Möglichkeit einer zeitnahen Therapie durch das Anlegen einer Zellbank mit allogenen Zellen ist außerdem als positiv zu bewerten (GEBUREK und STADLER 2011), allerdings ist hierbei die Übertragung von Krankheiten potentiell möglich (LAW und CHAUDHURI 2013).

Embryonale Stammzellen sind in der frühen Embryogenese (Morula) totipotent und später pluripotent (Blastozyste). Sie können sich in Gewebe aller drei Keimblätter entwickeln. Doch aufgrund dieser Eigenschaft und der damit verbundenen potentiellen Entstehung von Teratomen sowie der ethischen Diskussion hinsichtlich ihrer Gewinnung beim Menschen werden sie in Deutschland nicht zur Therapie verwendet. Die Erzeugung von menschlichen Embryonen "zu einem anderen Zweck als der Herbeiführung einer Schwangerschaft" ist laut Embryonenschutzgesetz untersagt (ANON. 2011).

Adulte Vorläuferzellen, zu denen auch MSC gehören, werden dagegen bereits in der regenerativen Medizin eingesetzt (HO et al. 2014). Die Bezeichnung „mesenchymale Stromazellen“ hat sich in der Forschung im Vergleich zur Bezeichnung „mesenchymalen Stammzellen“ etabliert, da die plastikadhärenten Zellen nicht aus einer einheitlichen Stammzellpopulation bestehen, sondern

Literaturübersicht

vielmehr aus einem heterogenen Zellgemisch (HORWITZ et al. 2005). Mesenchymale Stammzellen besitzen möglicherweise umfangreichere Eigenschaften, wie zum Beispiel ein langandauerndes Überleben mit Zellerneuerung in vivo und die in vivo-Multipotenz mit der Fähigkeit der Geweberegeneration (GEBUREK und STADLER 2011, HORWITZ et al. 2005, KOCH et al. 2009). Somit wird der Begriff „mesenchymale Stromazellen“ verwendet, ohne einen Rückschluss über die Homogenität der Zellpopulation sowie das biologische und therapeutische Potential zuzulassen. Eine genauere Bezeichnung der Zellen wird dann häufig durch den Zusatz „multipotent“ erreicht. Die Abkürzung MSC wird in der Literatur sowohl für mesenchymale Stromazellen als auch für mesenchymale Stammzellen verwendet. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wird diese Abkürzung jedoch ausschließlich für den Begriff „multipotente mesenchymale Stromazellen“ Verwendung finden.

MSC können sich in Zellen von Geweben des Mesoderms wie Fett-, Sehnen-, Muskel-, Knochen- und Knorpelgewebe differenzieren. Humane MSC zeichnen sich durch eine Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen, eine tripotente Differenzierbarkeit in vitro und einen definierten Immunphänotyp aus (DOMINICI et al. 2006). In der Zellkultur werden die Fibroblasten-ähnlich wachsenden, plastikadhärenten Zellen isoliert. Die MSC müssen in vitro unter Zusatz von Differenzierungsmedien ein tripotentes Differenzierungspotential (adipogen, chondrogen, osteogen) aufweisen. Bei der Immunphänotypisierung im Durchflusszytometer kann die Expression bestimmter In- (>95 %) und Exklusionsmarker (<2 %), die für humane MSC von dem „Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy“ (ISCT) definiert wurden (DOMINICI et al. 2006), überprüft werden. Zu den Inklusionsmarkern gehören CD 105, CD 73, CD 90 und zu den Exklusionsmarkern werden Antigene wie CD 45 (Leukozytenmarker), CD 34 (Marker für hämatopoetische Progenitorzellen und Epithelzellen), CD 14 oder CD 11b (Monozyten- und Makrophagenmarker), CD 79a oder CD 19 (B-Lymphozytenmarker) und MHC II (Marker für antigenpräsentierende Zellen) gezählt. Durch das Fehlen von MHC II sind MSC für das Immunsystem hypoimmunogen und können daher auch allogene eingesetzt werden.

Die Plastikadhärenz und das tripotente Differenzierungspotential sind ebenfalls Eigenschaften von MSC anderer Spezies (DE SCHAUWER et al. 2011). PAEBST et al. (2014) haben vergleichende Untersuchungen zur Immunphänotypisierung bei equinen MSC durchgeführt, die gezeigt haben, dass sowohl Quellen- als auch individuelle Unterschiede in der Markerexpression vorliegen. Keine Zellquelle konnte die Kriterien der ISCT für humane MSC vollständig erfüllen, aber equine MSC adipogenen Ursprungs zeigten die meisten Übereinstimmungen. Für die Inklusionsmarker wurden inhomogene Ergebnisse für CD 105 und 90 sowie meist eine fehlende Expression von CD 73 bei verschiedenen Zellquellen festgehalten. Zum Beispiel wurde CD 90 lediglich von MSC aus Fettgewebe exprimiert. Die Exklusionsmarker waren bei den MSC fast jeder Herkunft negativ. Es wurde festgestellt, dass CD 29 und CD 44 bei equinen MSC konstant nachweisbar waren. Da alle

Literaturübersicht

Inklusionsmarker auch von anderen Zelltypen exprimiert werden, ist es von großer Bedeutung, die Expression verschiedener Marker in Kombination zu interpretieren (DOMINICI et al. 2006, PAEBST et al. 2014). Für eine Charakterisierung der Zellen als MSC sind somit die drei Kriterien (Plastikadhärenz, tripotentes Differenzierungspotential, Immunophänotyp) in Verbindung zu setzen.

2.5.2 Quellen

Zahlreiche Gewebe dienen als Quellen für die MSC-Gewinnung. Das Knochenmark wurde als erstes Ursprungsgewebe verwendet. Als Entnahmeort dienen vor allem das Sternum und das Tuber coxae (STEWART und STEWART 2011). Allerdings handelt es sich zum Beispiel bei der Entnahme aus dem Brustbein um einen invasiven schmerzhaften Eingriff, der zu Blutungen, Infektionen, Pneumothorax und –pericard führen kann (BREHM et al. 2012, VIDAL et al. 2007). Die Zellausbeute im Knochenmarkpunktat ist vergleichsweise gering (NIXON et al. 2008), ebenso wie die Proliferationsrate (STEWART und STEWART 2011). Die Zellalterung beginnt bereits nach 30 Verdopplungen, wohingegen es bei Zellen aus Nabelschnur- und Fettgewebe 60–80 Verdopplungen sind (VIDAL et al. 2012). Im Vergleich zu MSC anderer Quellen sind die des Knochenmarks durch die höchste osteogene Differenzierbarkeit charakterisiert (BREHM et al. 2012), allerdings wird die Gefahr einer Sehnenmineralisierung in der Praxis als gering eingestuft (GEBUREK und STADLER 2011). Gegenüber MSC adipogenen Ursprungs ist das chondrogene Differenzierungspotential höher und gegenüber MSC aus Nabelschnurblut niedriger (BREHM et al. 2012).

MSC, die aus Fettgewebe isoliert werden, zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate und geringe Zellalterung in vitro aus (BREHM et al. 2012). Die Probengewinnung kann an vielen Stellen erfolgen (z.B. Glutealregion seitlich des Schweifansatzes, Sternum, intestinal). Die Fettentnahme seitlich des Schweifansatzes ist am stehenden, sedierte Pferd problemlos möglich und führt nur selten zu Komplikationen. Im Vergleich zum Knochenmark können aus Fettgewebe viele MSC generiert werden (Fett: 1–4 % aller kernhaltigen Zellen; Knochenmark: 0,001–0,01 %) (GEBUREK und STADLER 2011, TAYLOR et al. 2007). Im Vergleich zu anderen Zellquellen weisen diese MSC eine geringere Osteo- und Chondrogenese auf (STEWART und STEWART 2011). Sie zeichnen sich jedoch durch eine höhere immunsuppressive Wirkung aus (STEWART und STEWART 2011). BURK et al. (2013b) konnten nachweisen, dass die Kollagen 1A2-Expression am höchsten und die Expression der Sehnenmarker Skleraxis und Tenascin-C am zweithöchsten in MSC adipogener Herkunft sind, was einen positiven Effekt auf die Sehnenheilung haben könnte.

Ebenfalls ist es möglich MSC aus peripherem Blut zu isolieren. Eine Blutprobenentnahme ist nicht-invasiv, es können allerdings nur wenige Progenitorzellen gewonnen werden (BREHM et al. 2012). Außerdem sind die Zellen während der Kultivierung, des Auftauens und des Passagierens sehr fragil (BREHM et al. 2012).

Nabelschnurblut und –gewebe (perivaskuläres Gewebe: Wharton-Sülze) sowie Fruchtwasser und

Literaturübersicht

Gewebe der Placenta sind als Quelle für die MSC-Isolierung sehr vielversprechend, da sie ein hohes Differenzierungs- und Proliferationspotential aufweisen (BURK et al. 2013b, CARRADE et al. 2012). Aus Nabelschnurgewebe können viele MSC gewonnen werden (BURK et al. 2013b). Die osteogene Differenzierbarkeit bei MSC dieses Ursprungs zeigt eine geringere Mineralisierung (BURK et al. 2013b). Die Probengewinnung ist nicht-invasiv und einfach durchführbar. Es kann eine Zellbank eingerichtet werden und dadurch ist eine schnelle, terminierte Therapie möglich. Es muss allerdings beachtet werden, dass diese Gewebe nur unter unsterilen Bedingungen gewonnen werden können und es dadurch zu bakteriellen Kontaminationen kommen kann (BURK et al. 2013b).

Weitere Quellen wie Sehnen und Bänder, Synovia und Muskelgewebe können ebenfalls zur Isolierung von MSC dienen. Für die Anwendung bei Sehnenläsionen werden zur Zeit vor allem MSC aus Knochenmark und Fettgewebe favorisiert (GEBUREK und STADLER 2011).

2.5.3 Wirkmechanismen

Über die Wirkmechanismen der MSC ist noch wenig bekannt. Die Therapieoptimierung und Translation sind somit eingeschränkt. Es werden bei der Sehnenheilung derzeit hauptsächlich zwei Hypothesen zum Wirkmechanismus der MSC diskutiert. Diese sind zum einen die Differenzierung der MSC in ausgereifte Tendinozyten, welche daraufhin extrazelluläre Matrix produzieren und ein hochwertiges Ersatzgewebe liefern könnten, und zum anderen die indirekte Beeinflussung der Heilungsprozesse über Zell-zu-Zellkontakte und Sekretion von löslichen Faktoren (u.a. Wachstumsfaktoren, Zytokine) (BREHM et al. 2012, GEBUREK und STADLER 2011, RICHARDSON et al. 2007, SMITH et al. 2003).

Zu den indirekten Effekten gehören die Immunmodulation, die Stimulation der Neovaskularisation und die Anregung der Vorläuferzellen aus dem Para- und Ependineum zur Synthese extrazellulärer Matrix. MSC wirken antifibrotisch und antiapoptotisch (GEBUREK und STADLER 2011, NIXON et al. 2008, TAYLOR et al. 2007). Bei der Entzündungsmodulation durch die MSC (STEWART und STEWART 2011) kann die T-Zellproliferation und -aktivierung supprimiert und eine Reifung der dendritischen Zellen gehemmt werden (CARRADE et al. 2012, KOCH et al. 2009, LAW und CHAUDHURI 2013, YAGI et al. 2010). Es wird ein immunsuppressives Milieu durch Sekretion verschiedener Faktoren (z.B. PGE-2 und IL-6) erzeugt und es findet eine negative Rückkopplung in Form einer Sekretionshemmung von TNF- α und IFN- γ statt (BREHM et al. 2012, CARRADE et al. 2012, KOCH et al. 2009, LAW und CHAUDHURI 2013, YAGI et al. 2010). Die Immunreaktion von T-Lymphozyten und die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wird vermindert und somit werden Entzündungsreaktionen beendet (CAPLAN 2009, CARRADE et al. 2012, STEWART und STEWART 2011), was sich positiv auf die Sehnenheilung auswirken könnte. Allerdings sind auch immunstimulierende Effekte der MSC möglich (GLENN und WHARTENBY 2014). Es ist außerdem zu beachten, dass es Unterschiede in der in vitro-

Literaturübersicht

Immunmodulation und dem *in vivo*-Verhalten gibt (CARRADE et al. 2012).

In vitro ist die Differenzierung von MSC zu Tendinozyten möglich (BURK et al. 2016b, LOVATI et al. 2012, RAABE et al. 2013, VIOLINI et al. 2009). Die Expression verschiedener Sehnenmarker und Proteine wie Decorin, Tenomodulin, Tenascin-C, Skleraxis, Smad 8 oder Kollagen 1 steigt zum Beispiel während der Kokultivierung mit nativem Sehnengewebe, dem Zusatz von Wachstumsfaktor GDF-5 oder BMP-12 oder bei einwirkenden Zugkräften (KUO und TUAN 2008, LOVATI et al. 2012, RAABE et al. 2013, VIOLINI et al. 2009). Außerdem ist auch der Phänotyp der MSC Tendinozyten-ähnlich. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass das *in vitro*-Differenzierungspotential nicht dem Verhalten *in vivo* entspricht (STEWART und STEWART 2011).

Es existieren *in vitro*-Untersuchungen sowohl zur tenogenen Differenzierbarkeit (KUO und TUAN 2008, PARK et al. 2010, VIOLINI et al. 2009) als auch zur Immunmodulation (CARRADE et al. 2012), durch die beide Wirkmechanismen denkbar sind. Allerdings können *in vitro* die typischen Gewebedegenerationen in Verbindung mit entzündlichen Prozessen sowie die speziellen biomechanischen Verhältnisse in der Sehne nicht vollständig simuliert werden. Der Wirkmechanismus intratendinös applizierter MSC wurde *in vivo* bisher nicht hinreichend untersucht und konnte daher nicht vollständig geklärt werden. Einige Studien haben jedoch gezeigt, dass nach kurzer Zeit nur noch wenige Zellen vorhanden sind, die trotzdem einen positiven Effekt auf die Sehnenheilung haben (GUEST et al. 2008). Diese Beobachtungen deuten auf einen parakrinen Wirkmechanismus der MSC hin. Ergebnisse von Studien mit humanen und equinen MSC lassen vermuten, dass die indirekte Beeinflussung der Sehnenheilung potentiell von größerer Bedeutung ist (GEBUREK und STADLER 2011, NIXON et al. 2008).

Ein für das Verständnis essentieller, aber noch ungeklärter Aspekt ist der Verbleib injizierter MSC *in vivo*, weshalb weitere *in vivo*-Studien zum Wirkmechanismus und zur Biodistribution unerlässlich sind. Um diese Frage beantworten zu können, ist es notwendig die applizierten MSC zu markieren und damit eine Zellverfolgung *in vivo* möglich zu machen.

2.5.4 Einsatz bei Sehnenläsionen

Der Einsatz von MSC bei der Behandlung von Sehnenerkrankungen ist in der Pferdemedizin etabliert und wird bereits seit 2003 (SMITH et al. 2003) durchgeführt. Verschiedene Studien ergaben aussichtsreiche Ergebnisse (CARVALHO et al. 2011, CROVACE et al. 2007, FRISBIE und SMITH 2010, HO et al. 2014, NIXON et al. 2008). Durch den Einsatz der MSC verbessert sich die Struktur der extrazellulären Matrix und es kommt zu einer höheren Faserdichte mit verbesserter Organisation der kollagenen Fasern und einer Reduktion der Entzündungszellinfiltration im Vergleich zu unbehandelten Sehnenläsionen (CROVACE et al. 2010, NIXON et al. 2008). Es wird sowohl eine erhöhte als auch eine verringerte Vaskularisierung der MSC-behandelten Sehnenläsionen von

Literaturübersicht

verschiedenen Autoren beschrieben (CONZE et al. 2014, NIXON et al. 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es zu einer Änderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix kommt, wobei die Expression von Kollagen 1 und COMP erhöht und die von Kollagen 3 verringert wird (CROVACE et al. 2010). COMP steigert die strukturelle Integrität, indem es die Kollagenfibrillen bindet und die Anordnung verbessert (NIXON et al. 2008). Auch ultrasonographisch konnte gezeigt werden, dass die Ausrichtung der kollagenen Fasern nach der MSC-Applikation verbessert ist, der prozentuale Anteil rupturierter Sehnenfasern schneller abnimmt und dementsprechend die Echogenität im Vergleich rascher ansteigt (BALESDENT BARREIRA et al. 2008, BREHM et al. 2012).

Diese vielversprechenden Ergebnisse wurden durch klinische Fallkontrollstudien untermauert (GODWIN et al. 2012, SMITH et al. 2013). Zum Beispiel zeigten BURK und BREHM (2011), dass das Auftreten rezidivierender Sehnenläsionen bei MSC-behandelten Patienten mit 10–30 % im Vergleich zu konservativ behandelten Pferden mit bis zu 80 %iger Rezidivrate deutlich geringer war .

Trotz erfolgsversprechender Aussichten gibt es auch beim klinischen Einsatz ungeklärte Aspekte. Sowohl der Behandlungszeitpunkt als auch die Behandlungsdosis der MSC sind nicht genau definiert. RICHARDSON et al. (2007) erachten es als essentiell, die Zellsuspension nicht während der initialen Entzündungsreaktion, jedoch vor dem Einsetzen einer Fibrose zu applizieren. Dies bedeutet in der Regel, dass die Injektion innerhalb des ersten Monats nach Insult erfolgen sollte. HU et al. (2007) machten Untersuchungen an Ratten mit induzierten Herzinfarkten, die zeigten, dass eine Zellapplikation nach einer Woche bessere Ergebnisse erzielte als eine Stunde, zwei Wochen oder einen Monat nach der Induktion. Unterstützt konnte dieses Ergebnis durch Erkenntnisse einer Studie von SOLE et al. (2013) werden, in der gezeigt wurde, dass MSC nach lokaler Perfusion erst 10 Tage nach Läsionsinduktion eine vermehrte Akkumulation im Zielgewebe zeigten, nicht aber in 3 Tage alten Läsionen. GEBUREK und STADLER (2011) veröffentlichten hingegen, dass der Einsatz in der Proliferationsphase (4.–45. Tag nach Insult) erfolgen sollte. Die Zelldosis, die zu einer Verbesserung der Sehnenheilung führt, ist nicht bekannt. In einer Veröffentlichung von FRISBIE und SMITH (2010) wird angenommen, dass die optimale Zellzahl mehrere Millionen (Mio) beträgt. Vergleichende Untersuchungen wurden bisher jedoch nicht durchgeführt (DAHLGREN 2009, KOCH et al. 2009). Lediglich die Orientierung an angegebenen Konzentrationen in der Literatur ist möglich (RICHARDSON et al. 2007).

Die optimale Applikationsform der MSC bei zentralen Sehnenläsionen stellt die direkte, intraläsionale Injektion dar (TRELA et al. 2014), da durch dieses Verfahren eine hohe Zellkonzentration unmittelbar im Defekt erzeugt wird (BECERRA et al. 2013, SOLE et al. 2013). Untersuchungen haben gezeigt, dass die intraläsionale Applikation zu keiner vermehrten Druckdolenz oder ultrasonographischen Vergrößerung der Sehne oder der Läsion führt (CARVALHO et al. 2011).

Eine intravenöse Applikation oder regionale Perfusion der MSC ist generell auch möglich, da den MSC die Eigenschaft des gezielten Einwanderns in geschädigtes Gewebe (Homing) zugeschrieben wird

Literaturübersicht

(CARVALHO et al. 2014, SOLE et al. 2012, SOLE et al. 2013). Allerdings geschieht dieses inkonsistent und inadäquat und somit ist ihre Bedeutung bei der Behandlung von Sehnenenerkrankungen als gering einzuschätzen (BECERRA et al. 2013). Die lokale Perfusion stellt lediglich eine Alternative bei einer umfangreichen Sehnenläsion oder Unzugänglichkeit der Sehne dar. Mit Hilfe szintigraphischer Untersuchungen konnte aufgrund der geringen Auflösung nicht geklärt werden, ob die radioaktiv markierten MSC nach lokaler Perfusion die Gefäße verlassen (BECERRA et al. 2013). Die Durchführung einer lokalen intraarteriellen Perfusion ist am stehenden Pferd problematisch, außerdem führt sie bei Verwendung eines Stauschlauches zu Komplikationen in Form von Thromben. Durch die intravenöse Perfusion konnte nicht dieselbe Zellkonzentration wie durch die intraarteriellen Perfusion erreicht werden. Außerdem zeigte sich bei der Durchführung der lokalen intravenösen Perfusion am stehenden, sedierten Pferd eine höhere Varianz und eine geringe initiale Konzentration im Sehnenewebe sowie eine reduzierte Persistenz und Distribution der markierten Zellen im Vergleich zu der Durchführung in Allgemeinanästhesie (SOLE et al. 2012, SOLE et al. 2013, SPRIET et al. 2015, TRELA et al. 2014). Außerdem führt die intravenöse Injektion zu einer Akkumulation der applizierten MSC im Lungenfeld und ein Homing konnte in diesem Versuch nicht nachvollzogen werden (BECERRA et al. 2013). Der klinische Einsatz dieser Applikationsformen ist daher insgesamt als fraglich einzuordnen.

2.5.5 Zelltracking

Der Begriff „Zelltracking“ beschreibt den Nachweis lebender Zellen über Raum und Zeit in einem Gewebe. Für diese Nachverfolgung ist eine Markierung der Zellen notwendig. Der Verbleib der MSC nach lokaler Applikation ist für das Verständnis des Wirkungsmechanismus von großer Bedeutung. Die Lokalisation, die Verteilung mit möglicher Migration und die Viabilität der MSC kann beurteilt werden. Bislang wurden im Hinblick auf die MSC-Behandlung von Sehnenenerkrankungen Studien mit folgenden verschiedenen Markierungsmethoden durchgeführt:

Technetium-99

Die Markierung von MSC mit dem Radionukleotid Technetium-99 und der szintigraphischen Untersuchung führt zur in vivo-Darstellbarkeit der Zellen (BECERRA et al. 2013, SOLE et al. 2012, SOLE et al. 2013, SPRIET et al. 2015, TRELA et al. 2014). Allerdings ist die Zellverfolgung nur über einen sehr kurzen Zeitraum von 24 Stunden möglich und die geringe Auflösung szintigraphischer Aufnahmen führt zu einer reduzierten Detektierbarkeit kleiner Zellkonzentrationen und deren exakten Lokalisation (SOLE et al. 2012).

Literaturübersicht

Fluoreszierende Proteine

Eine weitere Möglichkeit der Zellverfolgung stellt die Transfektion der MSC mit grünfluoreszierendem Protein (GFP) dar (GUEST et al. 2008, 2010). Die Markierung mit diesem Signalmolekül ist stabil und das Markergen wird auch bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Somit können die Zellen über einen längeren Zeitraum dargestellt werden und die Zellexpansion ist detektierbar. Die MSC-Integration und Viabilität kann beurteilt werden. Es ist eine Auswertung von Gewebe- und Blutproben mittels Fluoreszenz-basierter Verfahren möglich. Allerdings ist eine kontinuierliche nicht-invasive Zellverfolgung in einem Gewebe eines lebenden Großtieres nicht durchführbar.

Quantum dots

CARVALHO et al. (2014) haben intraläsional applizierte MSC mit fluoreszierenden Nanokristallen (Quantum dots) markiert. Diese können mittels histologischer Untersuchungen und fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie im behandelten Sehngewebe und mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie im peripheren Blut detektiert werden. Eine nicht-invasive Detektion der markierten Zellen in vivo ist jedoch wiederum nicht möglich. Darüber hinaus ist die intrazytoplasmatische Markierung mit Quantum dots für ein Langzeittracking im Sehngewebe ungeeignet.

Superparamagnetisches Eisenoxid

Die Markierung mit SPIO-Partikeln stellt eine weitere Möglichkeit des Zelltrackings dar (ADDICOTT et al. 2011, BOURZAC et al. 2014). Es handelt sich um einen Dextran-umhüllten Eisenoxidkern, der mehrere tausend zwei- und dreiwertige Eisenatome enthält (GRIMM et al. 2007) (Magnetit: $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]_4\text{O}_4$). Die Dextran-Hülle dient der Stabilisierung und ist aufgrund ihrer biologischen Abbaubarkeit gut verträglich. Sie ermöglicht die Aufnahme der SPIO-Partikel in die MSC über Endozytose, so dass sie in zytoplasmatischen Vesikeln vorliegen.

Sie stellen sich in der MRT, vor allem in T1w- und T2*w-Sequenzen, als hypointense Bereiche dar, da sie durch eine Magnetfeldstörung zu einem Suszeptibilitätsartefakt führen. Die SPIO-Partikel wirken als negatives Kontrastmittel und verkürzen die T2-Relaxationszeit. Es kommt zu lokalen Inhomogenitäten des Magnetfeldes und zur Spin-Dephasierung (GRIMM et al. 2007, LIU und FRANK 2009, ROGERS et al. 2006). Dieser Effekt ist allerdings sowohl von der Zellzahl als auch von der Konzentration der SPIO-Partikel in einer Zelle, und dementsprechend von der Zellproliferation, abhängig (WANG et al. 2009, YANG et al. 2013).

Dieses Verfahren bietet gegenüber den oben genannten Methoden große Vorteile, da es sich nicht um einen radioaktiven Stoff handelt und die applizierten Zellen in vivo über mehrere Wochen kontinuierlich und nicht-invasiv detektiert werden können. Außerdem können die umgebenden

Literaturübersicht

Strukturen mittels MRT dargestellt werden und somit ist *in vivo* gleichzeitig eine langfristige Untersuchung der Biodistribution und der Sehnenheilung durch die Auswertung der verschiedenen MRT-Sequenzen möglich. Erste Studien haben gezeigt, dass Zellmarkierung mit SPIO-Partikeln und der MRT-Detektion auch im Pferdmodell durchführbar sind (BERNER et al. 2016, GEBUREK et al. 2016). Die Zellmarkierung mit SPIO-Partikeln hat keinen oder nur geringen Einfluss auf die *in vitro*-Eigenschaften der MSC, allenfalls bei der Markierung mit einer hohen Eisenpartikelkonzentration (ADDICOTT et al. 2011, BOURZAC et al. 2014, CRABBE et al. 2010, JÜLKE et al. 2015, SCHARF et al. 2015, WANG et al. 2009). In einer Studie von ADDICOTT et al. (2011) wurde festgestellt, dass bei einer Eisenkonzentration von $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ die Effizienz der Markierung bei $\geq 95 \%$ liegt und die MSC nach einer Markierung mit $20 \mu\text{g}$ Molday ION Rhodamin B/ml 15 pg Fe/ MSC enthalten. Die Viabilität der Zellen wird erst ab einer Konzentration von $30 \mu\text{g/ml}$ beeinflusst. Bei höheren Konzentrationen kommt es nur zu einer geringen Erhöhung der Eisenpartikelkonzentration in der Zelle, welche keinen großen Einfluss auf den Kontrast in der MRT hat. Ihren Erkenntnissen nach ist $20 \mu\text{g Fe/ml}$ die optimale Eisenkonzentration für die SPIO-Markierung im Hinblick auf die Überlebensrate, die Effizienz der Markierung und die Eisenpartikelaufnahme.

In einem Versuch von WANG et al. (2009) wurde gezeigt, dass die SPIO-Markierung keinen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung der MSC hat, allerdings konnte dies in verschiedenen Versuchen nicht bestätigt werden (JÜLKE et al. 2015, SCHARF et al. 2015). Dieses ist jedoch nicht von großer Bedeutung für die Therapie von Sehnenkrankungen. In *in vivo*-Studien konnten bisher ebenfalls keine negativen Resultate festgestellt werden (BERNER et al. 2016, DELLING et al. 2015a, YANG et al. 2013). In einer *in vitro*-Studie von JÜLKE et al. (2015) wurden SPIO-Partikel unterschiedlicher Anbieter verglichen. Dabei zeichnete sich Molday ION Rhodamine B (BioPAL, Inc., Worcester, USA) durch einen hohen, ausschließlich intrazellulären Gehalt von Eisenpartikeln und eine hohe Markierungseffizienz aus. Es konnte konstant ein hypointenses Signal in der MRT detektiert werden.

In einer Studie von DELLING et al. (2015b) zeigte sich im Schafmodell, dass die intraartikuläre Applikation von vitalen SPIO-markierten MSC zu langanhaltenden hypointensen Artefakten in der Synovialmembran führten. Hingegen war nach der Applikation von nicht-vitalen MSC lediglich ein schwächeres und inkonsistentes hypointenses Signal feststellbar. Die Applikation von freien SPIO-Partikeln führte nur zu einem hyperintensiven Signal in der Synovia, jedoch ausschließlich direkt nach der Injektion. Auch WANG et al. (2009) berichteten, dass die in der MRT sichtbaren hypointensen Artefakte im Wesentlichen durch intrazelluläres Eisenoxid in MSC verursacht werden.

Die Nachweisgrenze der SPIO-markierten MSC hängt von der Schichtdicke (ST) der MRT-Aufnahmen ab (LIU und FRANK 2009). Mit zunehmender Schichtdicke nimmt die Bildqualität ab und Gewebegrenzflächen sind schlechter abgrenzbar, welches als Partialvolumeneffekt bezeichnet wird. Dieser tritt vor allem auf, wenn die Schichtdicke die Dimension der abzubildenden Struktur überschreitet und es dadurch zu einer Überlagerung der Signale kommt (NITZ et al. 2007). Ab einer

Literaturübersicht

Zellkonzentration von 10^5 sind die SPIO-markierten MSC in vitro zuverlässig als hypointenser Artefakt in der Niederfeld-MRT darstellbar (BERNER et al. 2016). Dabei ist die Signalveränderung in der MRT umso stärker, desto höher die Zellanzahl und SPIO-Konzentration in einer Zelle sind (ADDICOTT et al. 2011, LIU und FRANK 2009, SCHARF et al. 2015). Es gibt unterschiedliche Angaben zum Verhalten während der Zellteilung. Die Hersteller von Molday ION Rhodamin B BioPAL weisen in ihren Anwendungshinweisen daraufhin, dass die SPIO-Partikel in gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben werden und somit über 4 Generationen nachweisbar sind (BIOPHYSICS ASSAY LABORATORY 2016). Hingegen wird von anderen berichtet, dass es nicht zu einer Halbierung der SPIO-Partikel während der Zellteilung kommt (BOURZAC et al. 2014). Übereinstimmung besteht darin, dass es durch die Zellteilung zu einer Verdünnung der SPIO-Partikeln in der Zellpopulation kommt, also die Markierung individueller Zellen abnimmt, und es damit zu einer Reduktion des hypointensen Artefaktes in der MRT kommt (BOURZAC et al. 2014, JÜLKE et al. 2015, WANG et al. 2009). Eine weitere Ursache dafür kann die Verstoffwechselung in Lysosomen oder die Exozytose der SPIO-Partikel darstellen (BOURZAC et al. 2014, JÜLKE et al. 2015). Die applizierte Zellzahl in einer in vivo-Studie zum Zweck des Zelltrackings sollte hoch gewählt werden, da die Detektion von einigen Faktoren, wie Zellproliferation, -viabilität und -migration abhängig ist (BOURZAC et al. 2014).

Eine präzise Abgrenzung der hypointensen SPIO-Artefakte vom umliegenden hypointensen, gesunden Sehngewebe ist in Standard-MRT-Sequenzen schwierig (GEBUREK et al. 2016). Durch die parallel orientierten kollagenen Fasern, den geringen Gehalt an Wassermolekülen und die verbesserte Dipol-Dipol-Wechselwirkung weist gesundes Sehngewebe kein oder nur ein sehr geringes MRT-Signal auf, da die T2-Relaxationszeit aufgrund der schnellen Dephasierung der Protonen nach der Anregung kurz ist (BUSONI und SNAPS 2002, HAYES und PARELLADA 1996, WERPYPY et al. 2010).

Diese Schwierigkeit kann durch die Zuhilfenahme des Magic Angle-Effektes überwunden werden (BURK et al. 2013a, YANG et al. 2013). Der Magic Angle tritt bei MRT-Sequenzen mit geringen Echozeiten wie Protonen-, T1w-, T2*w- und STIR-Sequenzen auf (WERPYPY et al. 2010). Das zu untersuchende Sehngewebe wird in einem Winkel (θ) von $54,75^\circ \pm 10^\circ$ zum Hauptmagnetfeld (B_0) orientiert. Die T2-Relaxationszeit-Verlängerung und die daraus resultierende Zunahme der SI des gesunden Sehngewebes sind die Folgen einer Minimierung der Dipol-Dipol-Interaktionen ($3\cos\theta - 1 = 0$) (BUSONI und SNAPS 2002, BYDDER et al. 2007, FULLERTON und RAHAL 2007, HAYES und PARELLADA 1996). Die Dipol-Interaktionen der Wasserstoffprotonen sind parallel zu den kollagenen Fasern orientiert und somit werden sie bei einer Winkeländerung der Sehne zum Hauptmagnetfeld reduziert (HAYES und PARELLADA 1996). ERICKSON et al. (1991) haben Untersuchungen zum Einfluss der Sehnenorientierung im Hauptmagnetfeld (B_0) durchgeführt. Diese zeigten, dass die SI des Sehngewebes deutlich bei Aufnahmen im Magic Angle ($\approx 55^\circ$) zunimmt. Eine intermediäre SI war bei einer Sehnenorientierung zum Hauptmagnetfeld von 45° und 65° sowie keine erhöhte SI bei 0° und 90° zu beobachten. Es kommt zu einer Kontrastverstärkung mit hyperintenser

Literaturübersicht

Darstellung des Sehngewebes und daher ist die Abgrenzung hypointenser SPIO-Artefakte einfacher möglich. Diese Technik wurde im Zusammenhang mit SPIO-markierten MSC bisher *in vivo* nur in einem Kaninchenmodell angewendet (YANG et al. 2013) und ist für die equine OBS nicht etabliert.

Eine Quantifizierung der im Gewebe vorhandenen MSC ist mittels MRT nur indirekt möglich (LIU und FRANK 2009). Eine histologische Untersuchung ist notwendig, um die Zellassoziation der SPIO-Partikel, die Viabilität und die Integration der markierten MSC im Sehngewebe beurteilen zu können. Die Eisenpartikel lassen sich mittels Preußisch Blau anfärben. Zudem lässt sich die SPIO-Markierung mit Fluoreszenzmarkierungen wie GFP oder Rhodamin B kombinieren, welches den Informationsgehalt durch Kombinierbarkeit von *in vivo*-, *ex vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen erhöht.

3 Zielstellung und Hypothesen

Die bisherigen Studien zur MSC-Behandlung equiner Sehnenerkrankungen werfen die Fragen auf, ob die MSC langfristig intratendinös vorhanden sind, wie die Biodistribution der Zellen ist und auf welche Weise sie während dieses Zeitraumes wirken, um die bisher empirisch nachgewiesenen langfristigen Verbesserungen zu erzielen.

Eine umfassende Untersuchung der lokalen Distribution intraläsional applizierter MSC über einen langen Zeitraum sowie die Untersuchung einer potentiellen systemischen Verteilung und gezielten Einwanderung der MSC in anderes geschädigtes Gewebe wurde bisher nicht durchgeführt und ist wesentliches Anliegen dieser Dissertation.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Aufschluss über die Darstellbarkeit SPIO-markierter MSC als hypointense Artefakte in MRT-Aufnahmen zu geben, nach Injektion der Zellen in induzierte Sehnenläsionen im Großtiermodell Pferd und über einen Beobachtungszeitraum von 24 Wochen. Weiterhin sollte in diesem Zusammenhang evaluiert werden, ob der Magic Angle-Effekt genutzt werden kann, um in equinen OBS bei stehenden, sedierten Pferden den Informationsgehalt der MRT zu erhöhen. Schließlich sollten die MRT-Ergebnisse hinsichtlich des Zellverbleibes histologisch überprüft und ergänzende Untersuchungen zur möglichen systemischen Distribution der MSC durchgeführt werden.

Es wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- Nach intratendinöser Injektion SPIO-markierter MSC sind dadurch bedingte hypointense Artefakte über mindestens 12 Wochen darstellbar.
- Es kommt zu einer Reduktion der Signalintensität und Dimension der hypointensen Artefakte im Laufe der Beobachtungszeit.
- Die Erzeugung des Magic Angle-Effektes in der OBS stehender, sedierter Pferde ist im Niederfeld-MRT möglich.
- Durch die Nutzung des Magic Angle-Effektes erhöht sich die Abgrenzbarkeit hypointenser Artefakte von gesundem, hypointensen Sehngewebe und steigert somit die Sensitivität der Methode.
- Die in der MRT beobachteten hypointensen Artefakte sind SPIO-markierten Zellen zuzuordnen, was durch histologische Untersuchungen verifiziert werden kann.
- Die MSC zeigen eine lokale Migration am Ort ihrer Injektion, jedoch keine systemische Biodistribution und keine Einwanderung in anderes geschädigtes Gewebe.

4 Tiere, Material und Methoden

4.1 Studiendesign

Die vorliegend beschriebene in vivo-Studie sollte Ergebnisse zur vergleichenden Sehnenheilung und Biodistribution der markierten MSC, die zur intraläsionalen Zelltherapie eingesetzt wurden, liefern. Um diese Ziele zu erreichen, wurden mit Genehmigung des Tierversuchsvorhabens durch die lokale Ethikkommission (Tierversuchsvorhaben TVV 34/13, Landesdirektion Sachsen, Dienststelle Leipzig, vom 25.11.2013) sechs Pferde als Versuchstiere verwendet. Sehnenläsionen wurden in den OBS aller vier Gliedmaßen mechanisch-enzymatisch induziert. Drei Wochen später wurden autologe, mit Eisenpartikeln und Rhodamin B markierte MSC beziehungsweise lediglich Serum als Placebo unter Ultraschallkontrolle intraläsional appliziert. Die Pferde wurden regelmäßig klinisch untersucht sowie Ultraschalluntersuchungen durchgeführt. Durch die MRT konnten die applizierten Zellen basierend auf ihrer Eisenmarkierung dargestellt werden. Außerdem wurden in einem Zeitraum von sieben Tagen vor und nach der Zellapplikation mehrere venöse Blutproben entnommen um gegebenenfalls enthaltene Rhodamin B-positive MSC zu detektieren. Drei Wochen nach der Zellapplikation wurden Biopsien aus den OBS der Hintergliedmaßen entnommen, um in der frühen Phase der Sehnenheilung Untersuchungen durchzuführen. 24 Wochen nach Zellapplikation wurden die Tiere euthanasiert und die vollständigen OBS der Vordergliedmaßen entnommen. Die Gewebeprobe wurden histologischen Untersuchungen, der Durchflusszytometrie und molekularbiologischen Untersuchungen zugeführt. Ziele des Projektes waren die Beurteilung der Sehnenheilung sowie die Verfolgung der SPIO-markierten MSC. Die Ergebnisse sollten Hinweise zum Wirkmechanismus der applizierten MSC geben, um die regenerativen Therapiemöglichkeiten von Sehnenkrankungen in der Veterinärmedizin zu verbessern.

Diese Monographie befasst sich mit der Biodistribution der MSC und ihrem Verbleib im Gewebe, inklusive Zellmarkierung und Tracking der gelabelten Zellen in der Sehne mittels MRT, sowie im venösen Blut und in Gewebeprobe mittels Histologie und Durchflusszytometrie.

Tiere, Material und Methoden

Tab. 1 Übersicht zum Versuchsablauf (HGM = Hintergliedmaße; VGM = Vordergliedmaße;
min = Minuten; Wo. = Wochen)

	Invasive Eingriffe	Klinische und bildgebende Untersuchungen	Bewegungsprogramm	Labor
-4 Wo.		Eingangsuntersuchung	Paddock	
-3 Wo.	Tendinopathie-induktion und Fettentnahme		Boxenruhe	Zellisolation und -expansion
Tag 0	Zell- bzw. Serumapplikation	Folgeuntersuchung vor und nach der Applikation	Boxenruhe	Zellmarkierung und -vorbereitung für die Applikation sowie Zellcharakterisierung
Tag 0-1 Wo.	Blutprobenentnahme			Probenanalyse
1 Wo.		Folgeuntersuchung	Boxenruhe	
2 Wo.		Folgeuntersuchung	10 min Schritt	
3 Wo.	Sehnen- (HGM) und Muskelbiopsie-entnahmen	Folgeuntersuchung	10 min Schritt	Probenanalyse
4 Wo.		Folgeuntersuchung	10 min Schritt	
5 Wo.			15 min Schritt	
6 Wo.		Folgeuntersuchung	15 min Schritt	
7 Wo.			20 min Schritt	
8 Wo.		Folgeuntersuchung	20 min Schritt	
9 Wo.			25 min Schritt	
11 Wo.			30 min Schritt	
12 Wo.		Folgeuntersuchung	30 min Schritt	
13 Wo.			35 min Schritt	
15 Wo.			40 min Schritt	
17 Wo.			40 min Schritt und 5 min Trab	
21 Wo.			35 min Schritt und 10 min Trab	
24 Wo.	Euthanasie und Probenentnahme (VGM)	Folgeuntersuchung	35 min Schritt und 10 min Trab	Probenanalyse

4.2 Probanden

Es wurden in die in-vivo Studie sieben Traber eingeschlossen. Ein Proband diente als Pilotpferd, um die Abläufe des Versuches zu optimieren und um zu beurteilen, ob der Versuchsaufbau die benötigten Ergebnisse liefern kann. Bei dreien der Traber handelte es sich um Stuten und bei zweien um Hengste. Die restlichen zwei Tiere waren Wallache. Es wurden nur Pferde zwischen drei und zehn Jahren für die Studie verwendet, da es durch gegebenenfalls bessere Heilungstendenzen bei jüngeren Tieren und eine höhere Inzidenz von Vorerkrankungen an dem Bewegungsapparat bei älteren Pferden zu Verzerrungen der Ergebnisse kommen könnte. Die Körpermasse (KM) lag zwischen 400 und 550 kg. Die Probanden mussten vor Beginn des Versuches sowohl frei von Allgemeinerkrankungen als auch frei von Lahmheit und Vorerkrankungen der oberflächlichen Beugesehne sein. Diese Pathologien wurde im Rahmen einer klinischer Untersuchung, Ultraschall- und MRT-Untersuchung ausgeschlossen.

4.3 Probandenmanagement und Diagnostik

Die sechs Pferde wurden für die Hauptstudie zwei Gruppen à drei Pferden zugeordnet, um das Projektmanagement bewältigen zu können.

Sowohl vor als auch nach der Tendinopathieinduktion wurden die Pferde regelmäßig klinisch untersucht und Ultraschall- und MRT-Untersuchungen der Gliedmaßen durchgeführt (siehe **Tab. 1** Eingangs- und Folgeuntersuchung). Bis zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme an den Hintergliedmaßen (drei Wochen nach der Zellapplikation) wurden alle vier Gliedmaßen, danach nur noch die Vordergliedmaßen, in die Untersuchungen einbezogen.

4.3.1 Pain Score

Der Allgemeinzustand der Probanden wurde anhand eines Pain Scores an den zehn Tage nach der Tendinopathieinduktion und nach der Biopsieentnahme kontrolliert. Morgens und abends wurden die Vitalparameter und das Allgemeinverhalten des Tieres festgehalten. Einmal täglich wurde die tierärztliche Beurteilung anhand des Pain Scores dokumentiert (GITTEL et al. 2014). Die Parameter wurden in Anlehnung an bestehende Pain Scores festgelegt (BUSSIÈRES et al. 2008, PRITCHETT et al. 2003, RAEKALLIO et al. 1997, VAN LOON et al. 2014). Es wurden das Allgemeinverhalten, die Vitalparameter, die Maulschleimhäute, die Gliedmaßenbelastung (im Stand und im Schritt) mit Pulsation der Arteriae (Aa.) palmares digitales laterales und mediales und das OP-Gebiet (Manipulation des Pferdes am Verband und Druckdolenz, gegebenenfalls Schwellung und Sekretabfluss nach Entfernung des Verbandes) beurteilt. In diesem Scoring wurden für die erhobenen

Befunde Punkte vergeben. Die Gesamtpunktzahl entschied über eine zusätzliche Schmerzmittelmedikation und gab gegebenenfalls Anlass zu weiteren Maßnahmen (z.B. intensivmedizinische Betreuung, Wundbehandlung und Einsatz von Antibiose). Genauere Erläuterungen zum Pain Scores und das weitere Vorgehen sind im Anhang (**Anlage 1** und **Anlage 2**) einsehbar.

4.3.2 Bewegungsprogramm

Alle Probanden wurden ab der dritten Woche nach der Zellapplikation einem kontrollierten Bewegungsprogramm unterzogen, welches sich an den auf dem Havemeyer Symposium 2007 aufgestellten Richtlinien orientierte (SMITH und MCILWRAITH 2012). Dieses begann mit 10 min Schritt an der Hand beziehungsweise auf einem Laufband und steigerte sich bis zur 21. Woche auf 35 min Schritt und 10 min Trab an der Longe beziehungsweise auf dem Laufband pro Tag (**Tab. 1**).

4.3.3 MRT-Untersuchung

a) Technische Daten

Für die MRT-Untersuchung wurde ein 0,27 Tesla Niederfeld-MRT-System (Standing Equine MRI, EQ2, Hallmarq Veterinary Imaging, Guildford, UK) verwendet. Dieses System ist geeignet, um Regionen distal des Karpus und des Tarsus stehender, sedierter Pferde zu untersuchen. Der hufeisenförmige Permanentmagnet ist über einer flachen Grube installiert und kann dadurch in drei Dimensionen bewegt werden, die zu untersuchende Region konnte somit optimal im Magnetfeld positioniert werden.

Die Einstellungen der MRT-Sequenzen sind nachfolgend tabellarisch dargestellt (**Tab. 2**).

Tab. 2 Einstellung der MRT-Sequenzen (GRE: gradient echo; FSE: fast spin echo; STIR short tau inversion recovery; TR: time to repeat; TE: time to echo; ST: slice thickness; FOV: field of view)

Sequenz	TR (ms)	TE (ms)	Flip angle	ST (mm)	Gap (mm)	FOV (mm)	Matrix
T1w GRE	52	8	50°	5	1	171x171	256x256
T2*w GRE	68	13	25°	5	1	171x171	256x256
T2w FSE	1544	88	90°	5	1	171x171	256x256
STIR	2336	22	90°	5	1	171x171	256x256

b) Vorbereitung der Probanden

Den Probanden wurde lateral an jeder zu untersuchenden Gliedmaße in definierter Höhe eine Fischölkapsel mit Hilfe einer Mullbinde angebracht, um in den MRT-Aufnahmen lateral und medial

Tiere, Material und Methoden

unterscheiden zu können und einen Fixpunkt zur Höhe unterschiedlicher anatomischer Strukturen zu erhalten. Ein Röhrenwatteverband gewährleistete den optimalen Halt der MRT-Spule.

Den Pferden wurde zunächst ein Venenkatheter in die Vena (V.) jugularis eingelegt und sie erhielten intravenös (i.v.) eine an ihre KM angepasste Sedierung durch Romifidin (0,04 mg/kg KM i.v.) und Butorphanol (0,02 mg/kg KM i.v.). Anschließend wurden sie mittels Dauertropfinfusion (20 mg Detomidin und 10 mg Butorphanol in 500 ml NaCl-Lösung) in einem tiefsedierten Zustand gehalten.

c) Durchführung

Die zu untersuchenden Gliedmaßen der Pferde wurden nacheinander in dem hufeisenförmigen Permanentmagneten positioniert und die Spule angelegt, gegebenenfalls später noch einmal versetzt und die unterschiedlichen Sequenzen aufgenommen.

Zum einen wurden Standard-Aufnahmen aller vier Gliedmaßen erstellt, indem die zu untersuchenden Gliedmaßen 90° zum horizontalen Hauptmagnetfeld (B_0) orientiert wurden (**Abb. 2B**). Das Pferd wurde so positioniert, dass sich die Schenkel des Permanentmagneten lateral und medial der zu untersuchenden Gliedmaße befunden haben. Folgende Sequenzen wurden in transversaler Ebene von dem gesamten Läsionsbereich erstellt: T1w GRE-, T2*w GRE-, T2w FSE- und STIR-Sequenzen.

Zum anderen wurden die Metakarpalregionen der Vordergliedmaßen in einem annähernd 55° -Winkel (Magic Angle) zum horizontal verlaufenden Hauptmagnetfeld orientiert (**Abb. 2A**). Die Methode musste an dem Pilotpferd der Studie etabliert werden, da diese Untersuchungstechnik bisher noch an keinem lebenden Pferd Anwendung gefunden hatte. Die Pferde wurden im MRT-Raum um 90° gedreht, sodass sich die Schenkel des Permanentmagneten dorsal und palmar der zu untersuchenden Gliedmaße lokalisiert waren. Zusätzlich wurde dann das Bein im Bereich des Karpus angewinkelt, sodass die OBS etwa im 55° -Winkel zum Magnetfeld orientiert war. Während dieser Positionierung wurden transversale T1w und T2*w GRE-Sequenzen erstellt.

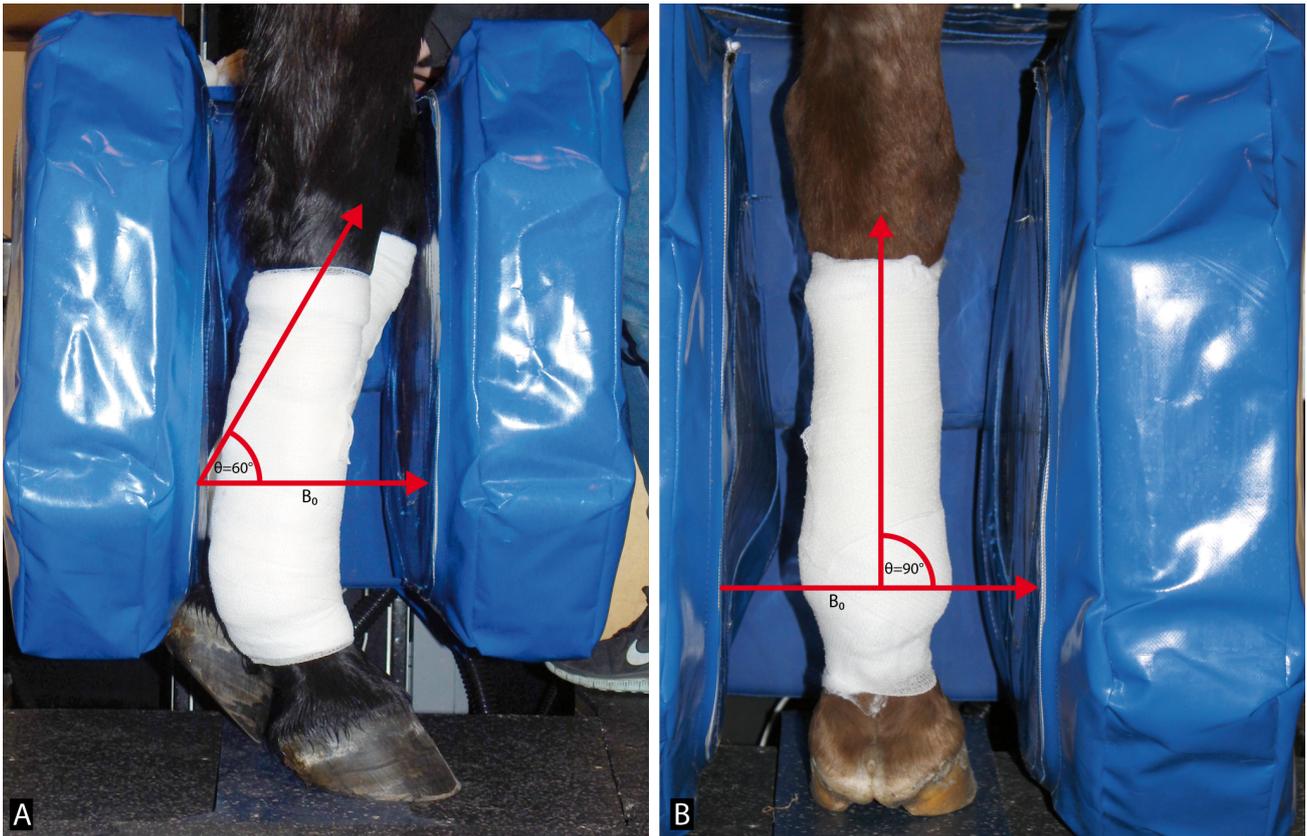


Abb. 2 Positionierung der Gliedmaßen im Permanentmagnetes eines equinen Niederfeld-MRT: **(A)** Magic Angle, **(B)** Standard 90°

4.4 Invasive Eingriffe

4.4.1 Tendiopathieinduktion

Die Tendinopathien wurden an allen vier OBS jedes Pferdes experimentell durch die Injektion des Enzyms Kollagenase unter Allgemeinanästhesie über einen mechanisch erzeugten Zugang induziert. Diese Vorgehensweise basiert auf etablierten Tendinopathiemodellen (SCHRAMME et al. 2010a, WATTS et al. 2012, WILLIAMS et al. 1984).

Zunächst wurde den Pferden eine Braunüle in die V. jugularis eingelegt. Sie wurden sediert (Romifidin 0,04 mg/kg KM und Butorphanol 0,02 mg/kg KM i.v.) und die Vollnarkose wurde mit Diazepam (0,08 mg/kg KM i.v.) und Ketamin (2,2 mg/kg KM i.v.) eingeleitet und per Inhalationsnarkose (Isofluran) und „Triple drip“ (Romifidin 30 mg und Ketamin 3 g in 500 ml Myolaxin (Guaifenesin 15 %)) als Dauertropfinfusion je nach Bedarf erhalten. Das Tier wurde in Seitenlage gelagert und an jeder Gliedmaße mit Hilfe einer Esmarch-Binde eine künstliche Blutleere erzeugt, um eine optimale Sicht während der Operation zu gewährleisten. Die Metakarpi und -tarsi wurden geschoren und antiseptisch mittels Jodseife, 70 %igem Ethanol und Jodlösung vorbereitet.

Tiere, Material und Methoden

Es wurde an den Vordergliedmaßen mittig auf der Strecke zwischen Os carpi accessorium und Sporn und an den Hintergliedmaßen zwischen oberem und mittlerem Drittel der Strecke zwischen Griffelbeinköpfchen und Sporn plantar ein von proximal nach distal verlaufender, etwa 2 cm langer Hautschnitt mit Hilfe eines 22er Skalpell gesetzt. Das Peritendineum wurde durch eine Stichinzision mit einem 11er Skalpell geöffnet. Durch diese Stichinzision wurde eine Knochenmarkextraktionskanüle (11 G; 3 mm Außendurchmesser) in die oberflächliche Beugesehne eingeführt und unter rotierender Bewegung flach 2 cm nach proximal vorgeschoben. Der Mandrin wurde aus der Knochenmarkextraktionskanüle entfernt und 0,2 ml Kollagenaselösung (4,8 mg/ml, in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)) in die Sehne injiziert. Danach wurde die Punktionskanüle innerhalb der Sehne 1 cm nach distal zurückgezogen und dort weitere 0,2 ml Kollagenaselösung injiziert. Daraufhin wurde die Knochenmarkspunktionskanüle unter Druck mit Gazetupfern entfernt. Das Peritendineum und die Unterhaut wurden fortlaufend genäht (Faden: MonoPlus 2-0, schneidende Nadel) und die Haut mit Einzelheften verschlossen (Faden: Dafilon 2-0, schneidende Nadel). An allen vier Gliedmaßen wurden Druckverbände angelegt, diese wurden nach sieben Tagen einmal gewechselt und nach insgesamt 14 Tagen entfernt. Zu diesem Zeitpunkt wurden ebenfalls die Fäden gezogen.

Die Probanden erhielten perioperativ Medikamente, die in **Tab. 3** mit ihren Dosierungen aufgeführt sind.

Tab. 3 Perioperative medikamentöse Versorgung der Versuchspferde (tgl. = täglich; p.o. = per os)

Tage nach	Wirkstoff und Dosierung
Tendinopathieinduktion	
Tag 0	- 2x tgl. 1,1 mg/kg KM Flunixin-Meglumin i.v. - präoperativ: 6,6 mg/kg KM Gentamicin und 20.000 IU/kg KM Benzylpenicillin-Natrium G i.v. - 10 Std. postoperativ: 20.000 IU/kg KM Benzylpenicillin-Natrium G i.v.
Tag 1-4	- 2x tgl. 0,55 mg/kg KM Flunixin-Meglumin p.o.
Tag 5-6	- 0,55 mg/kg KM Flunixin-Meglumin 1x tgl. p.o.
Tag 0-10	- nach Bedarf (Pain Score, Abschnitt 3.3.2)
Tag 0-4	- 2,2 mg/kg KM Omeprazol p.o.

4.4.2 Fettentnahme

Während der Operation der Tendinopathieinduktion wurden außerdem etwa 9 g subkutanes Fettgewebe eine Hand breit seitlich des Schweifansatzes entnommen. Der Bereich wurde

Tiere, Material und Methoden

ausgeschoren und ebenfalls antiseptisch vorbereitet. Es wurde ein Hautschnitt von 5 cm Länge mit einem 22er Skalpell gesetzt, das Unterhautfettgewebe mittels gebogener Metzenbaumschere abpräpariert und in ein mit Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) gefülltes steriles Transportgefäß verbracht. Durch Einzelhefte wurde die Unterhaut (Faden: Monoplus 2-0, schneidende Nadel) und die Haut (Faden: Dafilon 2-0, schneidende Nadel) verschlossen, Jodspray auf den verschlossenen Wundbereich aufgetragen und eine Wundauflage mit Hilfe eines Klebeflieses befestigt. Die Wundabdeckung wurde regelmäßig gewechselt und die Fäden nach zehn Tagen entfernt.

Aus dem entnommenen Fettgewebe wurden anschließend im Zellkulturlabor MSC zur späteren intraläsionalen Applikation isoliert und expandiert.

4.4.3 Zellapplikation

Drei Wochen nach der Tendinopathieinduktion fand die Zell- bzw. Serumapplikation am stehenden Pferd statt. Dazu wurden die Probanden mit Detomidin (0,004 mg/kg KM i.v.) und Butorphanol (0,02 mg/kg KM i.v.) sediert und Leitungsanästhesien durchgeführt. Die Einstichstellen der Leitungsanästhesien wurden mit Hilfe von 70 %igem Ethanol desinfiziert. An beiden Vordergliedmaßen wurde die Nervi ulnares palmar etwa 10 cm proximal des Os carpi accessoriums zwischen dem Musculus ulnaris lateralis und dem Musculus flexor carpi ulnaris anästhesiert. Dazu wurde eine 20 G Kanüle zwischen die Muskelbäuche eingeführt und 10 ml Lidocainhydrochlorid 2 % während des Zurückziehens der Kanüle injiziert. An beiden Hintergliedmaßen wurde eine hohe Plantarnerven-anästhesie durchgeführt. Jeweils eine 20 G Kanüle wurde medio- bzw. laterodistal des Tarsometatarsalgelenkes axial zum Griffelbein vorgeschoben, bis die Kanüle den Metatarsus berührt. In der Tiefe wurden 5 ml Lidocainhydrochlorid 2 % appliziert, während des Zurückziehens der Kanüle wurden weitere 5 ml injiziert. Zusätzlich wurde der Injektionsbereich mit 1–2 ml Lidocainhydrochlorid 2 % infiltriert. Der palmare beziehungsweise plantare Bereich der Röhre wurde geschoren und antiseptisch vorbereitet. In jeweils eine zufällig gewählte Vorder- und Hintergliedmaße wurden jeweils 10 Mio autologe, SPIO-markierte (Molday ION Rhodamine B, BioPAL, Inc., Worcester, USA) MSC, die in 1 ml autologem Serum suspendiert waren, unter Ultraschallkontrolle mit Hilfe einer 20 G Kanüle intraläsional injiziert. In die Sehnen der jeweils kontralateralen Gliedmaßen wurde 1 ml autologes Serum als Kontrolle injiziert. Anschließend wurden Schutzverbände für zwei Tage angelegt. Die Pferde erhielten am Tag der Applikation 1,1 mg/kg KM Flunixin-Meglumin i.v. und am Folgetag 0,55 mg/kg KM Flunixin-Meglumin p.o.. Diese Analgesie wurde allerdings individuell mittels Pain Score angepasst.

4.4.4 Blutentnahme

Aufgrund früher Teilergebnisse der ersten drei Versuchspferde wurde eine Änderungsanzeige zum Tierversuchsvorhaben gestellt. In dieser wurde beantragt, dass vor und nach der Zellapplikation mehrmals venöses Blut von der zweiten Versuchsgruppe entnommen werden sollte, um eine mögliche systemische Distribution der gelabelten MSC detektieren zu können.

Es wurden pro Versuchspferd jeweils 30 ml venöses Blut aus den Vv. jugulares an elf Zeitpunkten vor und nach der Zellapplikation entnommen und in Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)-Blutröhrchen verbracht. Die Blutproben wurden unmittelbar vor und 1, 4, 8, 12 und 24 Stunden sowie 2, 3, 4, 5 und 6 Tage nach der Zellapplikation gewonnen. Hierfür wurde ein Venenverweilkatheter genutzt, der bereits für die Operation zur Biopsieentnahme gelegt wurde.

Im Labor wurden mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation die mononukleären peripheren Blutzellen separiert, Lebend-/Tot-gefärbt und im Durchflusszytometer gegebenenfalls Rhodamin B-positive Zellen detektiert (**Abschnitt 4.6.3**).

4.4.5 Biopsieentnahme

Drei Wochen nach der Zellapplikation wurden an den Hintergliedmaßen jedes Pferdes etwa 0,2 x 0,3 x 2 cm große Biopsien im Bereich der Sehnenläsionen entnommen.

Die Pferde wurden in Allgemeinanästhesie (**Abschnitt 4.4.1**) in Seitenlage gelagert, die Hinterbeine wurden mit Esmarch-Binden versehen, geschoren und antiseptisch vorbereitet. Es wurde mit einem 22er Skalpell ein 3 cm langer Hautschnitt gesetzt. Die Höhen der maximalen Läsion und der Bereich der hypointensen Artefakte wurden zuvor anhand der MRT-Untersuchung bestimmt. Mit Hilfe eines Skalpells wurden die Sehnenproben aus makroskopisch verändertem Sehngewebe steril entnommen. Anschließend wurden die Sehne, das Peritendineum und die Unterhaut fortlaufend genäht (Faden: Monoplus 2-0, schneidende Nadel) sowie die Haut mit Einzelheften verschlossen (Faden: Dafilon 2-0, schneidende Nadel).

Die Sehnenprobe wurde transversal in zwei Teile geteilt. Ein Teil diente der histologischen Untersuchung (4 %ige Paraformaldehydfixierung, 7 Tage). Aus dem anderen wurde mit Hilfe einer enzymatischen Digestion Zellen gewonnen (Transportmedium bis Digestion: HBSS) und enthaltene markierte MSC anhand des intrazellulären Rhodamin B im Durchflusszytometer detektiert (**Abschnitt 4.6.2**).

Außerdem wurden aufgrund früher Teilergebnisse bei den Pferden der zweiten Versuchsgruppe jeweils zwei Biopsien von Unterhautfett- und Muskelgewebe aus der Glutealregion entnommen. Eine der Biopsien wurde im Bereich der Fettentnahme und die andere auf der kontralateralen Seite von unbeschädigtem subkutanem Fett- und Muskelgewebe entnommen. Eine histologische Untersuchung (Färbung: DAPI, Preußisch Blau) sollte klären, ob die gelabelten MSC in Gewebe, die drei Wochen

Tiere, Material und Methoden

zuvor durch chirurgische Manipulation einem lokalen Entzündungsreiz (Region der Fettgewinnung für die Zellisolation) ausgesetzt worden waren, migrieren und somit Hinweise für das Homing von MSC vorliegen.

Schließlich wurden im Zuge eines anderen genehmigten Tierversuches (TVV 32/15, Institut für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik der Universität Leipzig) bei zwei Pferden Muskelbiopsien entnommen. Bei diesen Pferden war ebenfalls sechs Wochen zuvor subkutanes Fettgewebe seitlich des Schweifansatzes entnommen worden, sie hatten jedoch zu keinem Zeitpunkt markierte MSC erhalten. Diese Proben dienten als Kontrolle und sollten die Spezifität der Preußisch Blau-Färbung überprüfen und falsch-negative Ergebnisse ausschließen.

Bei diesem Eingriff wurden wiederum die Haare geschoren und die Haut antiseptisch vorbereitet. Es wurde ein 1 cm langer Hautschnitt gesetzt. Die im Durchmesser etwa 0,5 cm großen Muskelbiopsien wurden mit Hilfe einer Biopsiestanze, Skalpell und Schere entnommen. Auftretende Blutungen wurden zunächst mit Mullkompressen tamponiert und die Muskulatur anschließend einzeln adaptiert (Faden: Monoplus 2-0, schneidende Nadel). Die Haut wurde mit Einzelknopfheften (Faden: Dafilon 2-0, schneidende Nadel) verschlossen.

Die Muskelbiopsien wurden für 7 Tage in 4 %igem Paraformaldehyd fixiert.

Die Versuchspferde wurden perioperativ medikamentös versorgt (**Tab. 4**).

Tab. 4 Perioperative medikamentöse Versorgung der Versuchspferde

Tag nach Biopsieentnahme	Wirkstoff und Dosierung
Tag 0	- 2x tgl. 1,1 mg/kg KM Flunixin-Meglumin i.v. - präoperativ: 6,6 mg/kg KM Gentamicin und 20.000 IU/kg KM Benzylpenicillin-Natrium G i.v. - - 10 Std. postoperativ: 20.000 IU/kg KM Benzylpenicillin-Natrium G i.v.
Tag 1	- 2x tgl. 0,55 mg/kg KM Flunixin-Meglumin p.o.
Tag 2–4	- 0,05 mg/kg KM Flunixin-Meglumin 1x tgl. p.o.
Tag 0–10	- nach Bedarf (Pain Score, Abschnitt 3.3.2)
Tag 0–2	- 2,2 mg/kg KM Omeprazol p.o.

4.4.6 Euthanasie und Probenentnahme an den Vordergliedmaßen

24 Wochen nach der Zellapplikation wurden die Probanden schmerzlos euthanasiert. Dazu wurden die Pferde in Allgemeinanästhesie (**Abschnitt 4.4.1**) gelegt und anschließend durch eine Bolusinjektion von T61 (6 ml/50 kg KM i.v.) eingeschläfert.

Die vollständigen OBS der Vordergliedmaßen wurden steril entnommen und mit Hilfe der kurz zuvor erhobenen MRT-Bilder und makroskopischer Befunde in Abschnitte unterteilt (**Tab. 5**). Anhand dieser Einteilung wurden die in 1 cm lange Stücke geteilten Sehnenproben beschriftet.

Tab. 5 Einteilung der Sehnenabschnitte

Gesunder Sehnenbereich / keine hyperintense Signale in der MRT proximal
Übergangsregion proximal
Hyperintense Signal / Sehnenläsion sichtbar in der MRT proximal
Maximaler Läsionsbereich
Hyperintense Signal / Sehnenläsion sichtbar in der MRT distal
Übergangsregion distal
Gesunder Sehnenbereich / keine hyperintense Signale in der MRT distal

Die Proben wurden in der Medianen der Läsion in zwei Teile geteilt, wobei der laterale Teil der histologischen Untersuchung (4 %ige Paraformaldehydfixierung, 14 Tage) diene und der mediale Teil für PCR-Analysen bei -80°C eingefroren wurde.

4.5 Zellisolation, -markierung und -charakterisierung

4.5.1 Isolierung, Expansion, Markierung

Aus dem entnommenen subkutanen Fettgewebe wurde im Zellkulturlabor über drei Wochen die MSC zur späteren autologen Applikation isoliert und expandiert (**Abb. 3**).

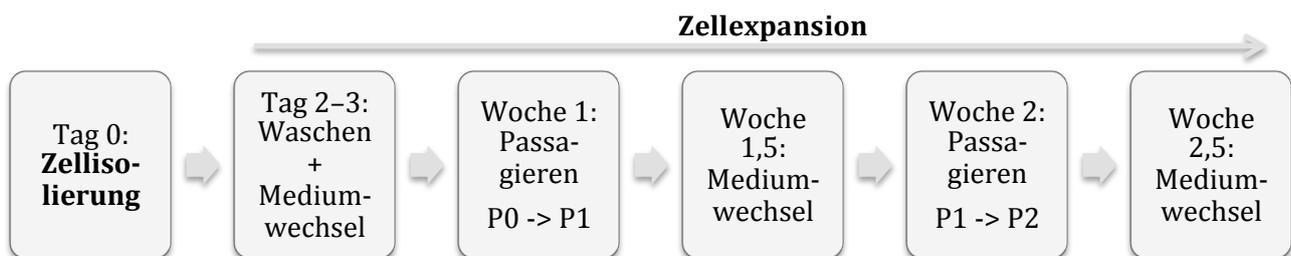


Abb. 3 Übersicht zum zeitlichen Ablauf der Zellisolation und -expansion (P = Passage)

Tiere, Material und Methoden

a) Zellisolation (Tag 0)

Unter sterilen Bedingungen wurden zunächst Bindegewebsreste und eventuell anhaftendes Muskelgewebe von dem Fettgewebe entfernt. Das Fettgewebe wurde gewogen und daraufhin in etwa 1 mm große Stücke zerkleinert. Jeweils 1–1,25 g Fettgewebe inkubierte mit 12,5 ml Kollagenase-Lösung (0,8 mg/ml, in HBSS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,1 % Gentamicin) zwei bis vier Stunden bei 37 °C in einem schüttelnden Wasserbad, bis das Gewebe möglichst vollständig enzymatisch verdaut war. Anschließend wurden durch Zentrifugation die Zellpellets gewonnen und in Standardkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 20 % Fetales Bovines Serum (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,1 % Gentamicin) resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und jeweils 2–3 Mio Zellen in zwei T175 Zellkulturflaschen (Flasks) ausgesät. Diese wurden in den Brutschrank verbracht und dort bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

b) Zellexpansion

Tag 2–3: Waschen und Mediumwechsel

Zwei bis drei Tage nach der Zellisolation wurde aus den Zellkulturflaschen das Zellkulturmedium und darin enthaltene nicht adhärente Bestandteile wie Erythrozyten und Gewebereste abgesaugt, jede wurde mit 20 ml PBS gewaschen und anschließend 20 ml neues Standardkulturmedium hinzugefügt.

Woche 1: Passagieren P0 → P1

Etwa eine Woche nach Zellisolation zeigten die adhärennten Zellen eine Konfluenz von etwa 80 %. Zu diesem Zeitpunkt wurden sie von der Passage (P) 0 zur P1 passagiert. Die Ablösung der Zellen wurde durch eine 5-minütige Inkubation mit 4 ml einer 0,05 %igen Trypsin-EDTA-Lösung (diluiert mit PBS) erreicht. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und mit Hilfe der Zentrifugation die Zellpellets gewonnen. Diese wurde in Kultivierungsmedium resuspendiert, die Zellzahlen bestimmt und jeweils 500.000–600.000 Zellen in vier T175 Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellkulturflaschen wurden in den Brutschrank verbracht und bei Standardkulturbedingungen inkubiert.

Woche 2: Passagieren P1 → P2

Das Passagieren der P1 zur P2 wurde wie die oben beschriebene Passage von der P0 zur P1 durchgeführt. Es wurden jeweils 500.000–600.000 Zellen pro T175 Zellkulturflasche in insgesamt 16 Zellkulturflaschen ausgesät.

Woche 1,5 und 2,5: Mediumwechsel

Das gebrauchte Zellkulturmedium wurde aus den Zellkulturflaschen entfernt und jeweils 20 ml neues Kulturmedium hinzugegeben.

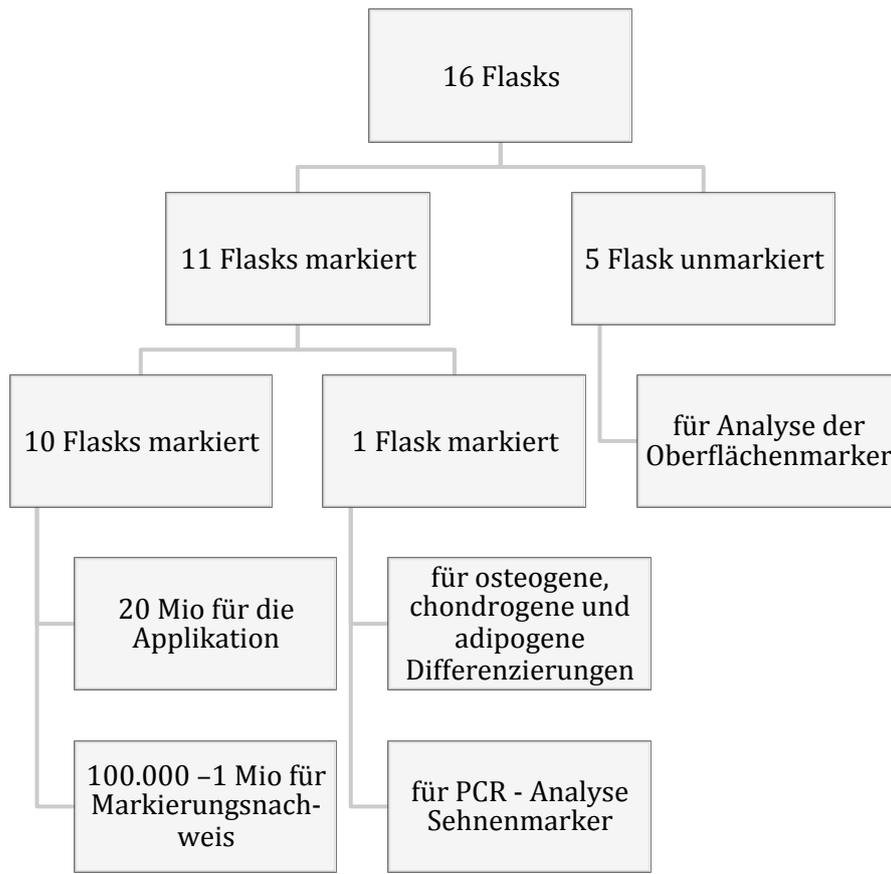


Abb. 4 Übersicht Verwendung der expandierten MSC

c) Zellmarkierung und Aufbereitung zur Injektion

Vor der Zellapplikation fand die Markierung der MSC mit SPIO-Partikeln, die zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B gekoppelt sind (Molday ION Rhodamine B, BioPAL, Inc., Worcester, USA), statt. Dies diente der Nachverfolgbarkeit der MSC als hypointense Artefakte in der MRT, der Anfärbbarkeit mit Preußisch Blau in Gewebeschnitten und der Unterscheidung zwischen markierten und unmarkierten Zellen durch fluoreszenzbasierte Mikroskopie und Durchflusszytometrie.

Die MSC von elf der insgesamt 16 Zellkulturflaschen inkubierten hierzu ab dem Tag vor der Zellinjektion für zwanzig Stunden mit dem Molday ION Rhodamine B-Reagent bei einer Eisenkonzentration von 25 µg/ml unter Standardkulturbedingungen.

Am Tag der Zell- und Serumapplikation wurde von dem jeweiligen Probanden Serum gewonnen. Die gelabelten MSC wurden drei Stunden vor geplanter Applikation mit Hilfe von Trypsin-EDTA abgelöst, dies geschah durch eine 5-minütige Inkubation im Brutschrank mit jeweils 6 ml Trypsin pro Zellkulturflasche. Für die Zellapplikation wurden pro Pferd 20 Mio der markierten Zellen in 2 ml autologem Serum resuspendiert und in zwei 1 ml-Spritzen (à 10 Mio MSC) aufgezogen. Außerdem wurden zwei 1 ml-Spritzen lediglich mit Serum für die Serumapplikation steril vorbereitet.

Die übrigen abgelösten Zellen der elf markierten Zellkulturflaschen wurden für den Nachweis der Zellmarkierung und des Differenzierungspotentials sowie für die Sehnenmarkeranalyse in der PCR-Untersuchung genutzt. Die unmarkierten MSC aus fünf Zellkulturflaschen dienten der Analyse der Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie.

4.5.2 Nachweis der Zellcharakteristika

Gemäß der ISCT sind humane MSC über Plastikadhärenz, spezifische CD-Oberflächenmarker und tripotente Differenzierung definiert (DOMINICI et al. 2006).

4.5.2.1 Plastikadhärenz

Infolge der durchgeführten Waschvorgänge und Medienwechsel während der Zellisolation und -expansion wurden ausschließlich die plastikadhärenten Zellen selektiert.

4.5.2.2 Oberflächenmarker

Die MSC wurden mittels Antikörper (AK)-gekoppelter Fluoreszenzmarkierung im Durchflusszytometer immunophänotypisiert. Dabei handelte sich es um den Nachweis der Positivmarker CD 29, CD 44, CD 73, CD 90, CD 105 und der Negativmarker CD 14, CD 34, CD 45, CD 79 α , MHC II (DOMINICI et al. 2006, PAEBST et al. 2014), um die MSC zu charakterisieren (**Tab. 6**). Diese Analyse wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Tab. 6 Antikörper und Verdünnungen (APC = Allophycocyanin, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin) (PAEBST et al. 2014)

Antikörper	Klon	Reaktivität	Hersteller	Verdünnung
CD 29-Alexa488	TS2/16	Anti-Human	Biologend, San Diego, Kalifornien, USA	1:20
CD 44-APC	IM7	Anti-Ratte	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	1:100
CD 73, unkonjugiert	10f1	Anti-Human	Abcam, Cambridge, Großbritannien	1:5
CD 90-APC	Thy1-A1	Anti-Human	R&D, Minneapolis, Minnesota, USA	1:50
CD 105-PE	SN6	Anti-Human	Serotec, Kidlington, Großbritannien	1:10
CD 14-APC	134620	Anti-Human	R&D, Minneapolis, Minnesota, USA	1:50

Tiere, Material und Methoden

Minnesota, USA				
CD 34, unkonjugiert	43A1	Anti-Human	Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA	1:100
CD 45-Alexa488	F10-89-4	Anti-Human	Serotec, Kidlington, Großbritannien	1:5
CD 79 α -PE	HM57	Anti-Human	Serotec, Kidlington, Großbritannien	1:2,5
MHC II, unkonjugiert	CVS20	Anti-Pferd	Serotec, Kidlington, Großbritannien	1:50
Rabbit anti mouse, PE		Anti-Maus	Serotec, Kidlington, Großbritannien	II 1:50
Goat anti mouse, FITC		Anti-Maus	Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA	CD 34 1:100 CD 73 1:5

Die unmarkierten MSC aus den fünf Zellkulturflaschen wurden nach dem Protokoll von PAEBST et al. (2014) abgelöst und gefärbt. Wie dort beschrieben, wurde jeder Zellkulturflasche 6 ml eiskalte 0,05 M EDTA-Lösung hinzugegeben und für 10 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellablösung fand ausschließlich mit einem Zellscraper statt, um die Oberflächenmoleküle nicht enzymatisch zu verändern. Die Zellzahl wurde bestimmt und die MSC anschließend gleichmäßig auf zehn Wells einer 96er Wellplatte und zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt.

Als Kontrollen wurden eine Probe nativ belassen („unstained“) und eine weitere lediglich Lebend-/Tot-gefärbt. Es wurden außerdem für jeden Antikörper entsprechende Isotypkontrollen in der gleichen Verdünnung angefertigt (**Tab. 7**). Die Antikörper für CD 73 und CD 79 α wurden einzeln verwendet. CD 105, CD 45 und CD 14, CD 90 und 34 sowie CD 44, CD 29 und MHC II wurden zusammen in jeweils einem Well angefärbt. Die Isotypkontrollen wurden mit dem gleichen Versuchsaufbau angesetzt. Um tote MSC darstellen und bei der Analyse ausschließen zu können, wurden die Zellen Lebend-/Tot-gefärbt (Farbstoff 1:1000 in PBS verdünnt). Außer bei der antikörpergekoppelten Fluoreszenzfärbung von CD 44 (Serum von Ratten, Verdünnung 1:500) wurde zur Vermeidung unspezifischer Bindungen mit Mausserum (Verdünnung 1:500) geblockt. Zusätzlich wurde bei CD 34, CD 73 und MHC II Kaninchen- und Ziegen-Serum verwendet.

Tab. 7 Isotypkontrollen (PAEBST et al. 2014)

Isotypkontrolle/ Fluorochrom	Antikörper	Hersteller
IgG1 κ / PE	CD 79α, CD 105, MHCII	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
IgG1 κ /Alexa488	CD 29	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
IgG1 κ /APC	CD 14	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
IgG1 κ /FITC	CD 73	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
IgG2a κ /Alexa488	CD 45	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
IgG2a κ /APC	CD 90	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
IgG2b κ /APC	CD 44	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
IgG3 κ /FITC	CD 34	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA

Die Färbung der direkt auf der Oberfläche lokalisierten Marker erfolgte nach folgendem Protokoll lichtgeschützt in den Wells:

Tab. 8 Färbeprotokoll für Oberflächenmarker (PFA = Paraformaldehyd)

Arbeitsschritt	Dauer
Zentrifugieren	300 g, 4 °C, 5 min
Pellet mit 50 µl Lebend-/Tot-Farbstoff Gebrauchslösung resuspendieren	4 °C, 20 min
Waschen mit PBS	
Pellet in 20 µl des jeweiligen Serums (abhängig vom Ursprung der AK) resuspendieren	4 °C, 15 min
Waschen mit PBS	
Inkubation mit 20 µl AK-Lösung	4 °C, 15 min
Waschen mit Färbe-Puffer (PBS, 3 % FBS, 0,1 % Natriumazid)	
Waschen mit PBS	
Wiederholen der letzten 3 Schritte, bis alle Antigene des Sets gefärbt sind	
Inkubation mit 2 %igem PFA zur Fixation	4 °C, 15 min
Waschen mit PBS	
Aufbewahrung in Färbe-Puffer	4 °C

Die Färbung des intrazellulären Proteins CD 79 α wurde lichtgeschützt in Eppendorfgläsern wie folgt durchgeführt:

Tab. 9 Färbeprotokoll für intrazelluläres Protein CD 79 α

Arbeitsschritt	Dauer
Zentrifugieren	380 g, 20 °C, 5 min
Pellet mit 50 μ l Lebend/Tot-Farbstoff Gebrauchslösung resuspendieren	4 °C, 20 min
Waschen mit PBS	
Inkubation mit 100 μ l Fix & Perm Reagenz A	RT, 15 min
Waschen mit Färbe-Puffer	
Inkubation mit 100 μ l Fix & Perm Reagenz B	RT, 15 min
Waschen mit PBS	
Inkubation mit 20 μ l AK-Lösung	RT, 15 min
Waschen mit Färbe-Puffer	
Waschen mit PBS	
Inkubation mit 0,1 %igem PFA zur Fixation	RT, 15 min
Waschen mit PBS	
Aufbewahrung in Färbe-Puffer	

Für etwa acht Stunden wurden die Proben lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt, bis sie mit dem Durchflusszytometer FACS Canto II untersucht wurden. Das Durchflusszytometer mit einem blauen Laser (solid state, 488 nm), einem roten Laser (HeNe, 633 nm) und einem violetten Laser (solid state, 405 nm) arbeitet mit der FACS Diva Software. Es wurde eine Kompensation für die verschiedenen Farbstoffe durchgeführt und als Kontrollen wurden ungefärbte und Lebend-/Tot-gefärbte Zellen derselben Probe eingesetzt. Die weitere Analyse erfolgte mit der Software FlowJo. Bei dieser erfolgte mittels Gating ein Ausschluss von Dubletten und toten Zellen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde im Vergleich mit der Isotypkontrolle zur Bestimmung der positiven Zellen verwendet und der Prozentsatz berechnet. Zur Darstellung wurden Histogramme verwendet.

4.5.2.3 Tripotente Differenzierung

Durch die Inkubation mit verschiedenen Differenzierungsmedien wurden die markierten MSC der adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierung zugeführt. Anschließend wurden die Zellen und die von ihnen gebildete extrazelluläre Matrix angefärbt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Kameramikroskopes von Olympus und des Programmes Olympus Cell^A festgehalten und die Differenzierung beurteilt.

4.5.2.3.1 Osteogenese

a) Induktion der osteogenen Differenzierung

Die Zellen wurden als Monolayer mit einer Aussaatdichte von 526 MSC/cm² zunächst für 3–4 Tage mit Standardkulturmedium unter Standardkulturbedingungen kultiviert.

Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von 80 % wurde die osteogene Differenzierung induziert. Dazu wurden die Zellen insgesamt 21 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium (**Tab. 10**) bei Standardkulturbedingungen inkubiert. Mediumwechsel erfolgten 2x wöchentlich. Am Ende der osteogenen Differenzierung wurde das Medium von allen Zellen abgenommen und einmalig mit PBS gewaschen, anschließend erfolgte eine 10-minütige Fixierung mit 4 %igem Paraformaldehyd. Die 12er Wells wurden bei –20 °C aufbewahrt, bis die Von Kossa-Färbung vorgenommen wurde.

Tab. 10 Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums

DMEM Ham's F12
10 % FBS
100 µM L-Ascorbat-2-Phosphat
100 nM Dexamethason
10 mM β-Glycerophosphat
0,1 % Gentamicin

b) Von Kossa-Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung

Die fixierten Zellen wurden mit Aqua bidest gewaschen. Danach erfolgte die 30-minütige Inkubation mit 5 %iger Silbernitrat-Lösung bei Raumtemperatur und Tageslicht. Die Färbelösung wurde abgesaugt und zweimal mit Aqua bidest gewaschen. Anschließend erfolgte der zweite Färbeschritt mit 1 %iger Pyrogallol-Lösung für 3 min bei Raumtemperatur. Es folgte erneut ein zweimaliger Waschgang mit Aqua bidest. Die Färbung wurde mit Hilfe von 5 %iger Natriumthiosulfat-Lösung fixiert.

Mit der Von Kossa-Färbung werden Calcium-haltige Strukturen schwarz gefärbt. Calcium-Ionen in Carbonaten und Phosphaten werden gegen Silberionen ausgetauscht und anschließend werden die Silber-Ionen unter Lichteinwirkung zu metallischem Silber reduziert (RIEDELSHEIMER 2015).

c) Mikroskopische Auswertung der osteogenen Differenzierung

Die Auswertung der Von Kossa-gefärbten osteogen differenzierten MSC erfolgte qualitativ unter dem Mikroskop. Das Vorkommen schwarz angefärbter Mineralisierung wurde untersucht. Die

Differenzierung galt als positiv, sobald schwarze Mineralablagerungen vorhanden waren und als negativ, wenn keine schwarze Färbung sichtbar war.

4.5.2.3.2 Adipogenese

a) Induktion der adipogenen Differenzierung

Die Zellen wurden als Monolayer mit einer Aussaatdichte von 1579 MSC/cm² zunächst mit Standardkulturmedium unter Standardkulturbedingungen kultiviert.

Nach drei Tagen wurde die adipogene Differenzierung induziert, indem adipogenes Differenzierungsmedium (**Tab. 11**) aufgebracht und erneute drei Tage unter Standardkulturbedingungen kultiviert wurde. Am Ende der adipogenen Differenzierung wurde das Medium von allen Zellen abgenommen und einmalig mit PBS gewaschen, danach erfolgte die Fixierung für 20 min mit 50 %igem Ethanol. Die 12er Wells wurden bei -20 °C bis zur Durchführung der Oil Red O-Färbung aufbewahrt.

Tab. 11 Zusammensetzung des adipogenen Differenzierungsmediums

DMEM Ham's F12
15 % Kaninchenserum
1 µM Dexamethason
100 µM Indomethacin
500 µM 3-Isobuthyl-1-Methylxanthin
700 nM Insulin
0,1 % Gentamicin

b) Oil Red O-Färbung zum Nachweis der adipogenen Differenzierung

Die fixierten Zellen wurden zunächst einmalig mit Aqua bidest gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit der Oil Red O-Gebrauchslösung (3,5 mg/ml Stocklösung (diluiert in Isopropanol) als 3:5-Verdünnung mit Aqua bidest) für 10 min bei Raumtemperatur. Die Färbelösung wurde abgesaugt und die Zellen 2x mit 50 %igem Ethanol abgespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin nach Mayer für 2 min bei Raumtemperatur. Es folgte das Spülen der Wells unter Leitungswasser und das Trocknen über Nacht.

Mit der Oil Red O-Färbung färben sich intrazelluläre Lipidvakuolen rosarot an. Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin färbt Zellkerne blau.

c) Mikroskopische Auswertung der adipogenen Differenzierung

Die Auswertung der Oil Red O-gefärbten adipogen differenzierten MSC erfolgte qualitativ unter dem Mikroskop. Das Vorliegen rosarot angefärbter, intrazellulärer Lipidvakuolen wurde in allen Wells

beurteilt. Die Differenzierung galt als positiv, wenn rosarot angefärbte Vakuolen vorhanden waren und als negativ, wenn keine solchen Vakuolen sichtbar waren.

4.5.2.3.3 Chondrogenese

a) Induktion der chondrogenen Differenzierung

Für jedes Versuchspferd wurden zwei MSC-Pelletkulturen angesetzt. Dazu wurden pro 15 ml Falcon 500.000 Zellen in 3 ml des chondrogenen Differenzierungsmediums (**Tab. 12**) resuspendiert.

Tab. 12 Zusammensetzung des chondrogenen Differenzierungsmediums

DMEM High Glucose (4,5 g/l)
1 % ITS+
100 nM Dexamethason
100 µM L-Ascorbat-2-Phosphat
400 µM Prolin
0,1 % Gentamicin
10 ng/ml TGF- β 1

Anschließend wurde die Zellsuspension bei 280 g für 5 min zentrifugiert, sodass sich ein flaches Zellpellet am Boden absetzte. Der Deckel wurde um eine halbe Umdrehung gelockert, damit ein Gasaustausch stattfinden konnte, und insgesamt für 21 Tage unter Standardkulturbedingungen kultiviert. Das kugelförmige Zellpellet wurde täglich vom Boden des Falcons gelöst und Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich. Am 21. Tag der Differenzierung wurde das Kulturmedium abgesaugt und das Pellet über Nacht mit 4 %igem Paraformaldehyd fixiert.

b) Histologie zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung

Die fixierten Pellets wurden in Leitungswasser gewässert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet (siehe **Tab. 13**).

Tab. 13 Protokoll der Paraffineinbettung im Einbettautomat

Arbeitsschritte	Dauer
Entwässerung mit Leitungswasser	1 Std.
Ethanol 30 %ig	1 Std.
Ethanol 50 %ig	5 Std.
Ethanol 70 %ig	1 Std.
Ethanol 80 %ig	2 Std.
Ethanol 96%ig	2 Std.
Isopropanol	2 Std.
Isopropanol	1 Std.
Isopropanol	2 Std.
Essigsäure-N-Buthylester	3 Std.
Essigsäure-N-Buthylester	1 Std.
Paraffin	2 Std.
Paraffin	2 Std.

Von jedem Pellet wurden 6 µm dicke Schnitte angefertigt. Vor Beginn der Färbung wurden die Paraffinschnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert (**Tab. 14**).

Tab. 14 Entparaffinierung und Rehydrierung

Arbeitsschritte	Dauer
Xylol	10 min
Xylol	10 min
Ethanol 96%ig	5 min
Ethanol 80%ig	1 min
Ethanol 70%ig	1 min
Ethanol 50%ig	1 min
Aqua dest.	bis Färbung

Trichrom-Masson-Färbung

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden zunächst für 60 min bei 60 °C in Bouin'scher Lösung inkubiert. Sie wurden 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und danach für 10 min in eine Weigert's Eisenhämatoxylin-Lösung (Verhältnis 1:1 der Lösung A und Lösung B)

Tiere, Material und Methoden

überführt. Anschließend wurden sie 10 min in Leitungswasser gewaschen und 5x in 1 %iger Essigsäure getaucht. Die 30-minütige Färbung mit Ponceau-Fuchsin (0,75 mg/ml Ponceau und 0,25 mg/ml Fuchsin, dilutiert in 1 %iger Essigsäure) wurde durch zweimaliges Eintauchen in 1 %ige Essigsäure beendet. Es erfolgte eine 2-minütige Inkubation in Phosphor-Wolframsäure (20 mg/ml in Aqua dest.), gefolgt von einem Waschgang in 1 %iger Essigsäure. Die Gegenfärbung erfolgte mit Fast Green-Lösung (2 mg/ml, Dilution in 1 %iger Essigsäure) für 5 min. Der Färbeschritt wurde durch erneutes Eintauchen in 1 %ige Essigsäure beendet und die Schnitte der Dehydrierung (2–3 min in 96 %igem Ethanol und 10 min in Xylol) zugeführt. Danach wurden sie mit Roti Histokit eingedeckt. Bei der Trichrom-Masson Färbung werden Kollagene grün-blau, Zellkerne blau-schwarz und Zytoplasma rot gefärbt.

Safranin O-Färbung

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden zunächst für 15 min mit Safranin O (0,4 g Safranin + 200 ml Aqua dest. + 2 ml 100 %ige Essigsäure) gefärbt, gefolgt von dreimaligem Waschen in Aqua dest.. Der zweite Färbeschritt erfolgte für 15 Sekunden in einer Fast Green-Lösung (2 mg/ml, Dilution in 1 %iger Essigsäure), dieser wurde wiederum durch dreimaliges Waschen in Aqua dest. beendet. Die Schnitte wurden der Dehydrierung zugeführt und mit Roti Histokit eingedeckt.

Mit der Safranin O-Färbung werden Kollagene orange und Zellen grün gefärbt.

Alzian Blau-Färbung

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden zunächst für 3 min in 3 %ige Essigsäure überführt. Anschließend erfolgte der erste Färbeschritt mit Alzian Blau (0,01 g/ml dilutiert in 3 %ige Essigsäure) für 1,5 Stunden. Die Schnitte wurden 5x in Leitungswasser eingetaucht und dann dem zweiten Färbeschritt mit Nuclear Fast Red (10 min) zugeführt. Dieser wurde mit dreimaligem Eintauchen in Aqua dest. beendet. Die Schnitte wurden dehydriert und mit Roti Histokit eingedeckt.

Bei der Alzian Blau-Färbung werden Glykosaminoglykane (saure Mukopolysaccharide) türkis-blau gefärbt. Mit der Gegenfärbung Nuclear Fast Red färben sich die Zellkerne rot.

c) Mikroskopische Auswertung der chondrogenen Differenzierung

Die Auswertung der gefärbten chondrogen differenzierten MSC und der gebildeten extrazellulären Matrix erfolgte bei allen drei Färbungen qualitativ unter dem Mikroskop.

Bei den mit Trichrom Masson gefärbten Schnitten wurde die Präsenz grün angefarbter Kollagene und Knorpellakunen untersucht. Das Vorliegen von rot gefärbtem Kollagen wurde bei den Safranin O-gefärbten Schnitten beurteilt. Mit der Alzian Blau-Färbung erfolgte die Untersuchung auf türkis gefärbte saure Mukopolysaccharide.

4.5.3 Nachweis der positiven Zellmarkierung

4.5.3.1 Nachweis der superparamagnetischen Eisenoxide

Die intrazellulär gelegenen superparamagnetischen Eisenoxid-Partikel wurden lichtmikroskopisch durch die Preußisch Blau-Färbung nachgewiesen. Dazu wurden die markierten MSC als Monolayer mit einer Aussaatdichte von 526 MSC/cm² für 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen kultiviert.

Anschließend wurde die Zellen für 15 min mit 4 %igem Paraformaldehyd fixiert. Sie wurden für 15 min mit dem Preußisch Blau-Färbekit (BioPAL, MHS16, Worcester, USA) bei Raumtemperatur gefärbt. Die Färbelösung wurde abgesaugt und einmalig mit PBS gewaschen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Kameramikroskopes von Olympus und des Programmes Olympus Cell^A festgehalten und beurteilt. Preußisch Blau färbt die intrazellulären Eisenpartikel blau. Der Prozentsatz der Preußisch Blau-positiven Zellen wurde bestimmt.

4.5.3.2 Rhodamin B-Nachweis

In der Durchflusszytometrie erfolgte der Rhodamin B-Nachweis frisch markierter MSC. Vom Hersteller BioPAL wird für den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B ein Emissionsmaximum im Bereich von 579–581 nm angegeben. Die Zellen wurden Lebend-/Tot-gefärbt, um tote Zellen in der Durchflusszytometrie detektieren zu können. Gefärbte gelabelte und ungefärbte Kontrollzellen wurden mit 2 % Paraformaldehyd fixiert. Die Rhodamin B-Fluoreszenz wurde im Durchflusszytometer FACS Canto II durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe analysiert. Die Datenanalyse wurde mit Hilfe von FlowJo Software durchgeführt.

4.6 Zelltracking und Analytik

4.6.1 MRT

Um den Vergleich der MRT-Bilder der verschiedenen Sequenzen über den zeitlichen Verlauf ermöglichen zu können, wurden diese zunächst entsprechend ihrer anatomischen Lokalisation innerhalb des Röhrbeins zugeordnet und nummeriert. Die Zuordnung der Positionen der T1w-Sequenzen der Standard-Aufnahmen (90°) an den verschiedenen Zeitpunkten erfolgte im Konsensus zweier Untersucher. Die korrespondierenden T2*w-Aufnahmen (90°) sowie die T1w- und T2*w-Aufnahmen im Magic Angle (54°) wurden danach anhand der bereits zugeordneten Standard-T1-Sequenzen bestimmt. Die Auswertung der Lokalisation, der SI und der Dimension der hypointensen Artefakte wurde im Synedra Viewer und Mathematica durchgeführt.

Zur Identifizierung von gelabelten Zellen wurden die sortierten T1w- und T2*w-Sequenzen (90° und 54°) verblindet und randomisiert. Das Vorhandensein von hypointensen Artefakten wurde qualitativ

durch zwei Untersucher in Übereinstimmung untersucht. Die MRT-Bilder, die hypointense Artefakte aufwiesen, wurden unterschiedlichen Kategorien (Kategorie 1 (Kat. 1): höchstwahrscheinlich SPIO-bedingte hypointense Artefakte oder Kategorie 2 (Kat. 2): unspezifische hypointense Bereiche) zugeordnet. MRT-Aufnahmen mit solchen Artefakten wurden dann einer quantitativen Untersuchung zugeführt. Die SI der hypointensen Artefakte und des umgebenden gesunden Gewebes der OBS wurden mit Hilfe einer kreisförmigen „Region of Interest“ (ROI, 1 mm²) bestimmt. Die SI der Sehnenläsion wurde nur in 90°-Aufnahmen bestimmt, da die Abgrenzung zwischen Läsion und gesundem Sehnenewebe in den Magic Angle-Aufnahmen nicht eindeutig möglich war. Die Standardabweichung (SD) des Hintergrundes wurde für den gesamten Hintergrund in jeder Aufnahme bestimmt und diente zur Normierung der anderen SI. Es wurde das Signal-Rausch-Verhältnis ($SNR = SI / SD \text{ Hintergrund}$) und das Kontrast-Rausch-Verhältnis ($CNR = (SI \text{ OBS} - SI \text{ Artefakt}) / SD \text{ Hintergrund}$) berechnet. Außerdem wurden die Flächen der Kat. 1-Artefakte und die zugehörigen SI durch Freihandmessungen ermittelt. Mit Hilfe der Artefaktflächen konnte das Volumen der SPIO-gelabelten Zellen in der oberflächlichen Beugesehne berechnet werden. Die Flächen wurden hierzu addiert und näherungsweise mit 6 mm multipliziert (5 mm Schichtdicke + 1 mm Abstand zwischen zwei Aufnahmen (Gap)). Alle Messungen wurden dreimal durch einen Untersucher wiederholt und die Mittelwerte wurden für weitere Analysen genutzt.

Nach der Entblindung konnte beurteilt werden, ob die subjektive Bewertung von hypointensen Artefakten in Bezug auf den Zeitpunkt und die Gliedmaße korrekt war. Außerdem konnte sowohl die Detektierbarkeit SPIO-bedingter hypointensier Artefakte über den zeitlichen Verlauf und auch eine mögliche Abnahme der SI und eine Volumenabnahme der SPIO-markierten MSC über den Versuchszeitraum untersucht werden. Darüber hinaus konnten die durchgeführten Aufnahme-Techniken evaluiert und der Nutzen des Magic Angle-Effektes bewertet werden. In den 90°-Aufnahmen wurde des Weiteren die Lokalisation der hypointensen Artefakte für jedes Bild festgehalten, wodurch die lokale Zellverteilung beurteilt werden konnte. Diese gliederte sich in folgende Kategorien: ausschließlich intratendinös, überwiegend intratendinös, in gleichem Maß intratendinös und im umliegenden Gewebe, überwiegend im umliegenden Gewebe und ausschließlich im umliegenden Gewebe.

4.6.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der Sehnenbiopsien

Die Aufbereitung der Sehnenbiopsien und ihre durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe. Ein Teil jeder Sehnenbiopsie der Hintergliedmaßen wurde enzymatisch digestiert (5,6 mg/ml Kollagenaselösung, 6 Stunden bei 37 °C) und die gewonnenen Zellen in 100 µl Farbe-Puffer resuspendiert und bis zur durchflusszytometrischen Untersuchung

lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Mit Hilfe des Zellsortierers BD Aria III wurde der Anteil Rhodamin B-positiver Zellen bestimmt. Anhand von Molday ION Rhodamine B-markierten MSC als Positivkontrolle und ungefärbten MSC als Negativkontrolle wurden die Daten ausgewertet. Dazu wurde die FlowJo Software genutzt.

4.6.3 Durchflusszytometrische Untersuchung der Blutproben

Die entnommenen EDTA-Blutproben (**Abschnitt 4.4.4**) der zweiten Versuchsgruppe wurden im Labor weiterverarbeitet. Mononukleäre periphere Blutzellen wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe eines Leukozytenseparationsmediums aus dem Blut separiert, Lebend-/Tot-gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

Es wurden für jeden Blutentnahmezeitpunkt 15 ml Separationsmedium in ein 50 ml Falcon vorgelegt und mit EDTA-Blut (1:1 verdünnt mit PBS) vorsichtig überschichtet. Die Proben wurden 20 min ohne Bremse bei 327 g zentrifugiert. Bei dieser Dichtegradientenzentrifugation entstehen vier Schichten: die oberste Schicht wird durch das Plasma gebildet, die zweite Schicht ist der sogenannte Buffy Coat mit den enthaltenen mononukleären Zellen, die dritte Schicht wird durch das Leukozytenseparationsmedium gebildet und die unterste Schicht ist durch Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen charakterisiert.

Mit Hilfe einer Pipette wurde nur der Buffy Coat gewonnen und in ein neues Falcon überführt. Das Reaktionsgefäß wurde mit PBS aufgefüllt, bei 437 g 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet anschließend mit 100 µl Lebend-/Tot-Farbstoff (Verdünnung 1:1000 in PBS) resuspendiert und 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellen mit PBS gewaschen. Nach einer 15-minütigen Fixierung der Zellen in 2 %igem Paraformaldehyd wurde erneut mit PBS gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur durchflusszytometrischen Untersuchung bei Dunkelheit und 4 °C gelagert. Als Negativkontrollen dienten die mononukleären Zellen der Blutprobe vor der intraläsionalen MSC-Injektion.

Die Rhodamin B-Fluoreszenz wurde im Durchflusszytometer FACS Canto II durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe analysiert. Die Datenanalyse wurde mit Hilfe der FlowJo Software durchgeführt.

4.6.4 Histologische Untersuchung der Gewebeproben

Die Sehnen- und Muskelproben wurden histologisch mit Hilfe der Preußisch Blau-Färbung lichtmikroskopisch untersucht, um SPIO-markierte MSC darstellen zu können. Die Kernfärbung mit DAPI diente der fluoreszenzbasierten Untersuchung Rhodamin B-positiver MSC.

Tiere, Material und Methoden

Die Proben wurden eine Woche (Sehnen- und Muskelbiopsien) beziehungsweise zwei Wochen (Sehnenproben der Vordergliedmaßen) in 4 %igem Paraformaldehyd fixiert. Die fixierten Proben wurden in Leitungswasser gewässert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Es wurden 3 µm dicke Paraffinschnitte als erhaltene Dienstleistung durch das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig angefertigt. Diese wurden vor Beginn der unterschiedlichen Färbungen in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert (**Tab. 14**).

4.6.4.1 Preußisch Blau

a) Färbeprotokoll

Zwei nicht aneinandergrenzende Schnitte jeder Biopsie und jedes Sehnenabschnittes wurde mit Preußisch Blau und Nuclear Fast Red als Gegenfärbung gefärbt. Die Färbung wurde ebenfalls als erhaltene Dienstleistung durch das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig durchgeführt.

b) Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der gefärbten Paraffinschnitte erfolgte verblindet und semiquantitativ nach dem Digitalisieren der Schnitte durch den Panoramic Scanner von 3DHISTECH mit Hilfe des Programmes Panoramic Viewer.

Alle Zellen mit Fibroblasten-ähnlicher Morphologie und blau gefärbtem intrazellulären Eisen wurden durch zwei Untersucher unabhängig voneinander ausgezählt. Die Flächen jedes histologischen Schnittes wurden mit Hilfe des Programmes Mathematica ermittelt und die Anzahl der blau gefärbten Zellen pro 10 mm² berechnet.

4.6.4.2 DAPI

a) Färbeprotokoll

Zwei nicht aneinandergrenzende Schnitte jeder Biopsie und jedes Sehnenabschnittes, die jedoch mit den korrespondierenden Preußisch Blau-Schnitten aneinandergrenzten, wurden mit DAPI Kerngefärbt.

Die entparaffinierten und rehydrierten histologischen Schnitte wurden 2x 5 min in PBS überführt und 20 min in einer 0,3 %igen Triton X 100-Lösung inkubiert. Triton X erhöht die Permeabilität der Zellmembran, somit konnte der fluoreszierende DNA-Farbstoff in die Zelle eindringen. Die 10-minütige Kernfärbung wurde mit einer 0,2 µg/ml konzentrierten DAPI-Lösung in Dunkelheit durchgeführt. Der Färbeprozess wurde durch dreimaliges Spülen mit PBS beendet. Die Schnitte

wurden in 96 %igem Ethanol und Rotihistol rehydriert und anschließend mit Hilfe von Kaisers Glycerin-Gelatine eingedeckelt.

b) Auswertung

Die Auswertung der gefärbten Paraffinschnitte erfolgte qualitativ nach dem Digitalisieren der Schnitte durch den Panoramic Scanner mit Hilfe des Programmes Panoramic Viewer.

Das Vorliegen fluoreszierender Rhodamin B-positiver Zellen wurde bei allen Schnitten untersucht und im Zusammenhang mit korrespondierenden Preußisch Blau-gefärbten Schnitten evaluiert. Ein Schnitt galt als positiv, sobald eine rot-fluoreszierende spindelförmige Zelle mit blau-fluoreszierendem Zellkern vorhanden war.

Zusätzlich wurden exemplarische Schnitte durch eine dritte Person am inversen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM, TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) untersucht. Die Fluoreszenzfarbstoffe DAPI und Rhodamin B wurden bei 375 nm bzw. 561 nm nacheinander angeregt und in einem Überlagerungsbild dargestellt. Die Bilder wurden mit der Software Leica Application Suite Advanced Fluorescence und Adobe Photoshop bearbeitet und analysiert.

4.6.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SPSS. Es wurden die deskriptive Statistik berechnet und Boxplots erzeugt. Alle Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht.

Für nicht-normal-verteilte Daten wurde der Mann-Whitney-U Test benutzt. Bei Vergleichen von gepaarten Gruppen wurden der Friedman Test und der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewendet. Hierbei wurde zur deskriptiven Statistik der Medianwert mit zugehörigem Interquartilsabstand (IQR) angegeben. Es wurden keine Tests für normal-verteilte Daten durchgeführt, da es keine Gruppeneinteilung gab, für die durchgängig eine Normalverteilung vorlag.

Dabei wurden Ergebnisse als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$.

5 Ergebnisse

5.1 MSC-Charakterisierung und -Markierung

Die durchflusszytometrische Untersuchung der In- und Exklusionsmarker zeigte folgende Ergebnisse:

Tab. 15 Expression der In- und Exklusionsmarker (IQR = Interquartilabstand)

Inklusionsmarker	Median (IQR)
CD 29	61,9 % (IQR: 55,4 %)
CD 44	90,6 % (IQR: 14,1 %)
CD 90	6,5 % (IQR: 29,6 %)
CD 105	25,6 % (IQR: 15,3 %)
CD 73	0 %
Exklusionsmarker	
CD 14	
CD 34	
CD 45	0–2 %
CD 79 α	
MHC II	

Die Zellmarkierung mit Molday ION Rhodamine B wurde lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch untersucht, sie zeigte eine hohe Effizienz. Der Medianwert der Preußisch Blau-positiven MSC betrug 100 % (IQR: 2,7 %) (**Abb. 5**). Zusätzlich wurden diese Ergebnisse durch die durchflusszytometrische Analyse Rhodamin B-positiver MSC (Median: 99,8 %, IQR: 0,4 %) bestätigt.

Ergebnisse

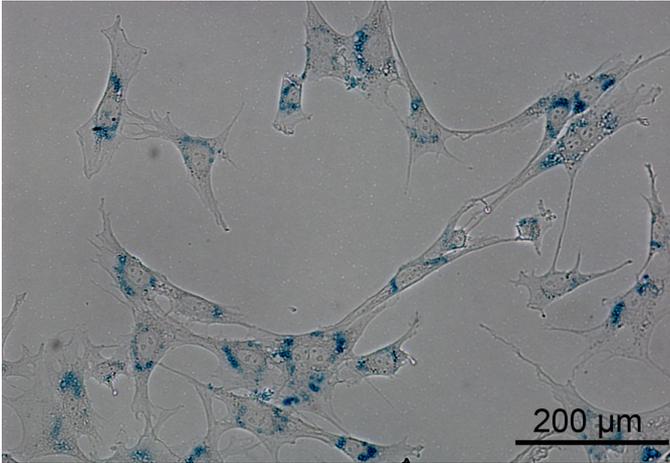


Abb. 5 Nachweis der intrazellulären Eisenoxid-Partikel in undifferenzierten, frisch markierten MSC mit Hilfe von Preußisch Blau. Modifiziert nach BURK et al. (2016a).

Die markierten MSC der verschiedenen Pferde wiesen alle ein tripotentes Differenzierungspotential auf (**Abb. 6**). Die Zellen der adipogenen Differenzierung waren durch intrazelluläre Lipidvakuolen gekennzeichnet. Extrazelluläre mineralisierte Matrix konnte mit Hilfe der Von Kossa-Färbung bei osteogen differenzierten MSC angefärbt werden. In der chondrogenen Pelletkultur bildeten die differenzierten MSC Glykosaminoglykane und Kollagen.

Die Persistenz der SPIO-Partikel in Form von bräunlicher Akkumulationen in der Nähe des Zellkernes war in der chondrogenen Pelletkultur über 21 Tage zu beobachten. Im Gegensatz dazu waren nur einzelne adipogen differenzierte Zellen Preußisch Blau-positiv nach sieben Tagen. Keine Preußisch Blau-positiven Zellen konnten 21 Tage nach Induktion der osteogenen Differenzierung detektiert werden.

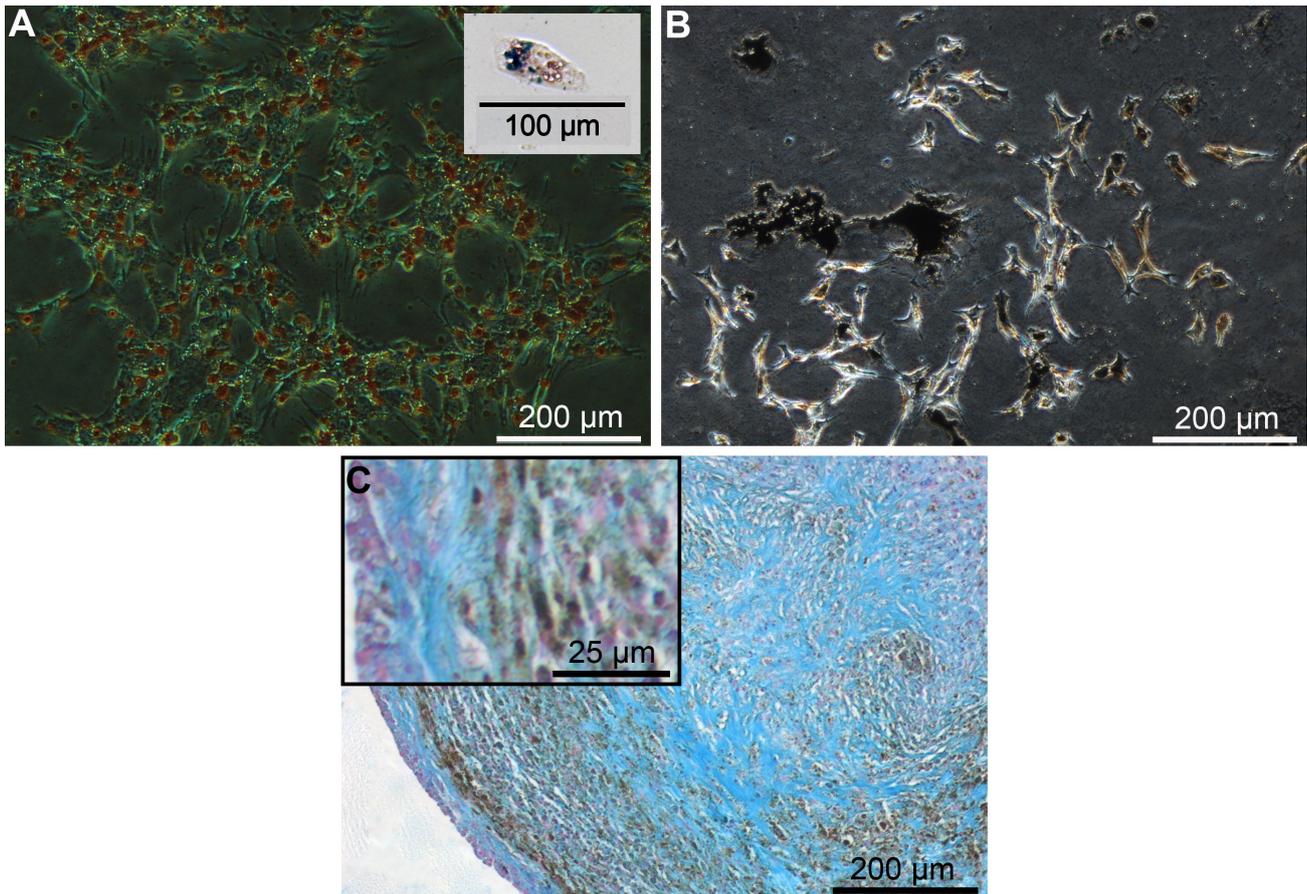


Abb. 6 Exemplarische Bilder der tripotenten Differenzierung markierter MSC; **(A)** Oil Red O-Färbung der Lipidvakuolen nach adipogener Differenzierung; die Vergrößerung zeigt eine adipogen differenzierte Zelle mit persistierenden Preußisch Blau-positiven SPIO-Partikeln; **(B)** Von Kossa-Färbung der Mineralisationen nach osteogener Differenzierung; **(C)** Alcian Blau-Färbung von Glykosaminoglykanen der chondrogenen differenzierten Pelletkultur, bräunliche Akkumulationen in der Nähe der Zellkerne weisen auf SPIO-Partikel hin. Modifiziert nach BURK et al. (2016a).

5.2 Langfristige Zellverfolgung mittels MRT

Der Magic Angle-Effekt konnte in allen untersuchten OBS im Niederfeld-MRT-System erzeugt werden, jedoch war der realisierbare Winkel der OBS zum statischen Magnetfeld eher $\theta = 60^\circ$ statt 54° (**Abb. 2**). Der Effekt führte zu einem hyperintensiven Signal der OBS.

Ein signifikanter Anstieg des SNR der OBS konnte in den Magic-Angle-Aufnahmen im Vergleich zu $\theta = 90^\circ$ -Aufnahmen in den T1w- und T2*w-Sequenzen über den kompletten Untersuchungszeitraum festgestellt werden ($p < 0,001$) (**Abb. 7**).

Ergebnisse

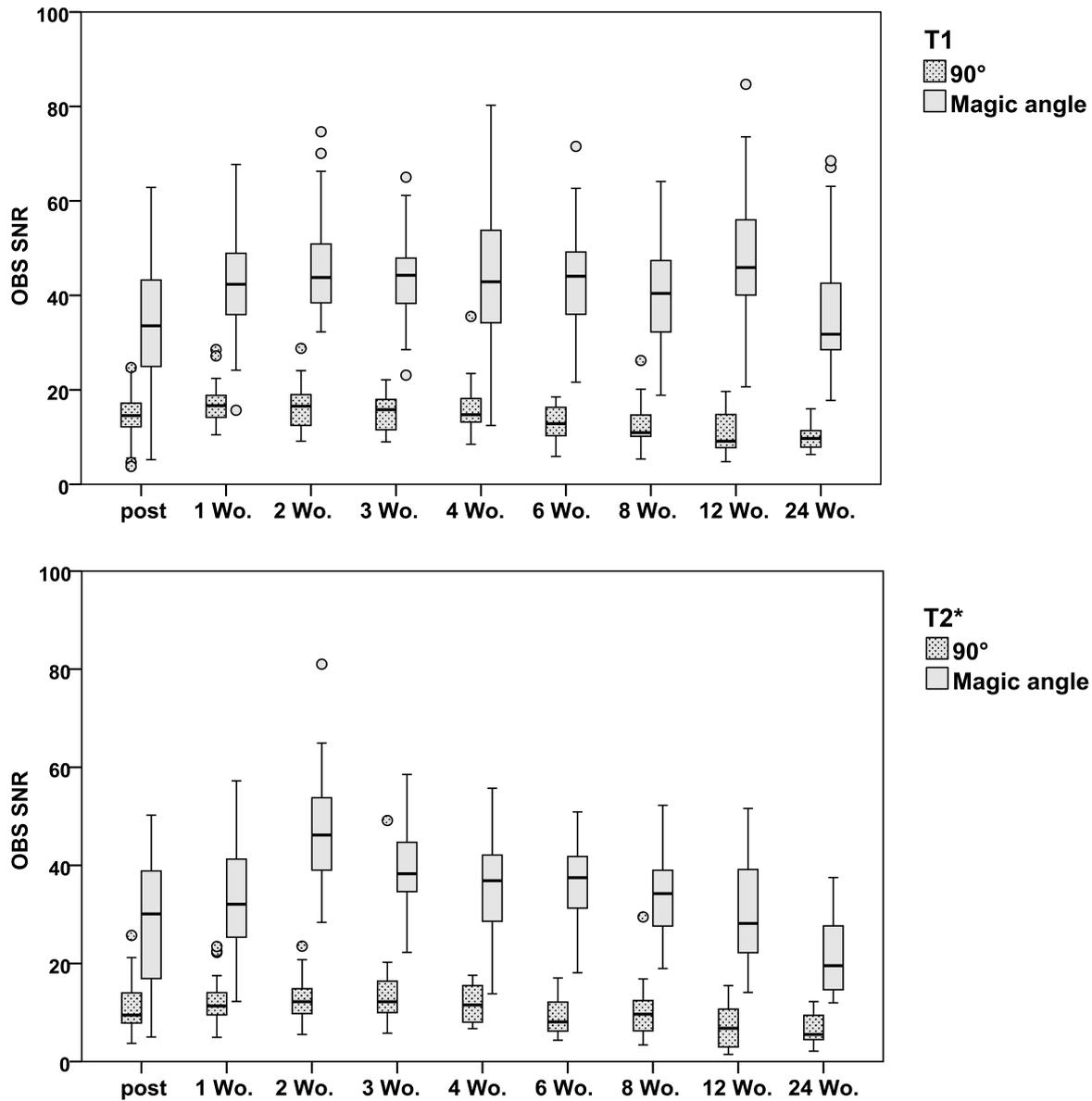


Abb. 7 Die Boxplots veranschaulichen die signifikant höheren SNR-Werte der OBS in Magic Angle-Aufnahmen (55°) im Vergleich zu den Standard-Aufnahmen (90°) in T1w- (**oben**) und T2*w- (**unten**) Sequenzen über den zeitlichen Verlauf ($p < 0,001$).

Die Darstellung der markierten MSC in Form von hypointensen Artefakten war nach der Zellinjektion in den behandelten Beinen aller Pferde über 24 Wochen in T1w- und T2*w MRT-Sequenzen der Standard- und Magic Angle-Aufnahmen möglich (**Abb. 8**).

Ergebnisse

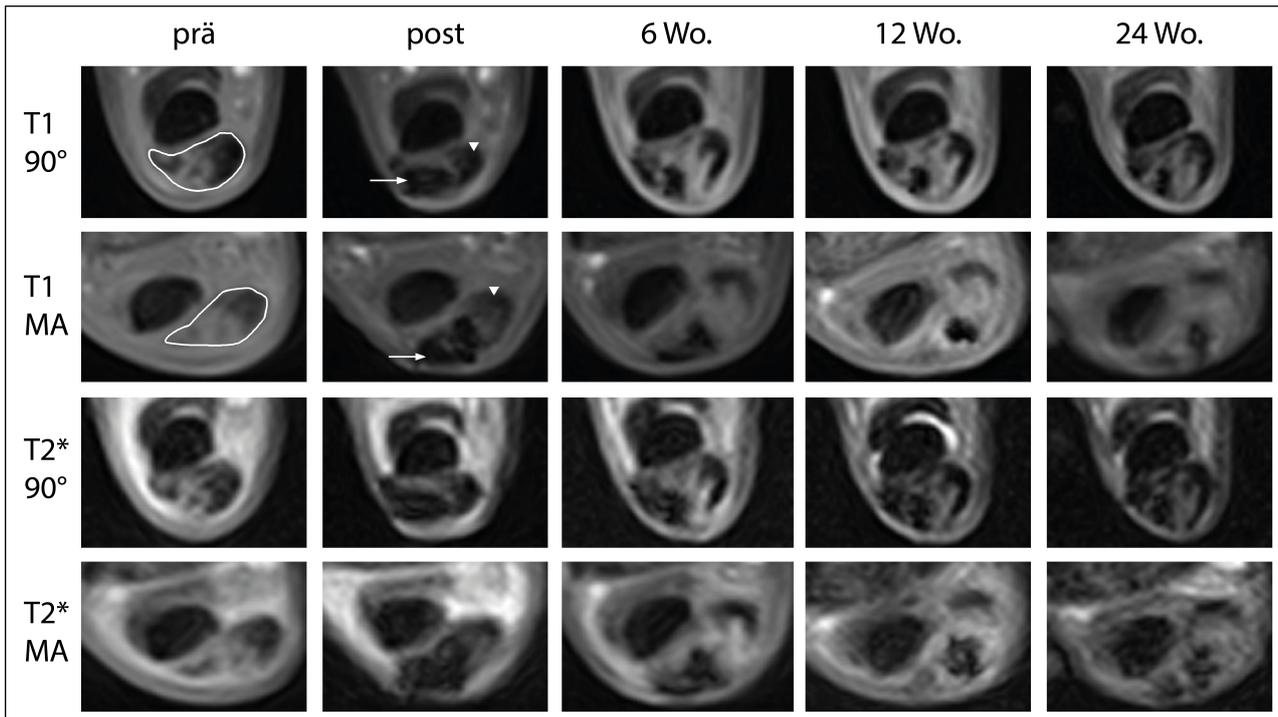


Abb. 8 Exemplarische T1w- und T2*w-MRT-Aufnahmen der OBS eines Pferdes von derselben Lokalisation kurz vor und nach der MSC-Injektion sowie 6, 12 und 24 Wochen nach der Applikation. Die OBS mit hyperintensiven Sehnenläsionen sind zur Verdeutlichung weiß umrandet. Nach der Injektion der SPIO-markierten MSC sind diese als hypointense Artefakte (Pfeil) sichtbar. Gesundes Sehngewebe (Pfeilspitze) stellt sich in Standard-MRT-Aufnahmen (90°) hypointens dar und ist somit schwer von den SPIO-bedingten Artefakten zu unterscheiden. Der Anstieg des Grauwertes von gesundem Sehngewebe in Magic Angle (MA)-Aufnahmen ermöglicht eine leichtere Abgrenzung der hypointensen SPIO-Artefakte.

Bei der verblindeten Beurteilung wurden hypointense Bereiche in Aufnahmen von Gliedmaßen, die keine markierten MSC enthielten (vor der Zellapplikation (n = 10 von 140) und am kontralateralen Bein (n = 24 von 140)) sämtlich der Kat. 2 (definiert als unspezifische hypointense Bereiche) zugeordnet. Folglich ist die Identifizierung falsch-positiver Artefakte möglich. Zu betonen ist, dass die hypointensen Bereiche, die der Kat. 2 zugeordnet wurden, vor allem in den T1w-Sequenzen der Magic Angle-Aufnahmen ein signifikant höheres SNR aufwiesen im Vergleich zu denen der Kat.1 ($p < 0,001$) (**Abb. 9**). Aus diesem Grund war bei der verblindeten Beurteilung eine Kategorisierung möglich. Nichtsdestotrotz war die Festlegung eines SNR-Grenzwertes für die Bestimmung SPIO-bedingter Artefakte nicht möglich.

Ergebnisse

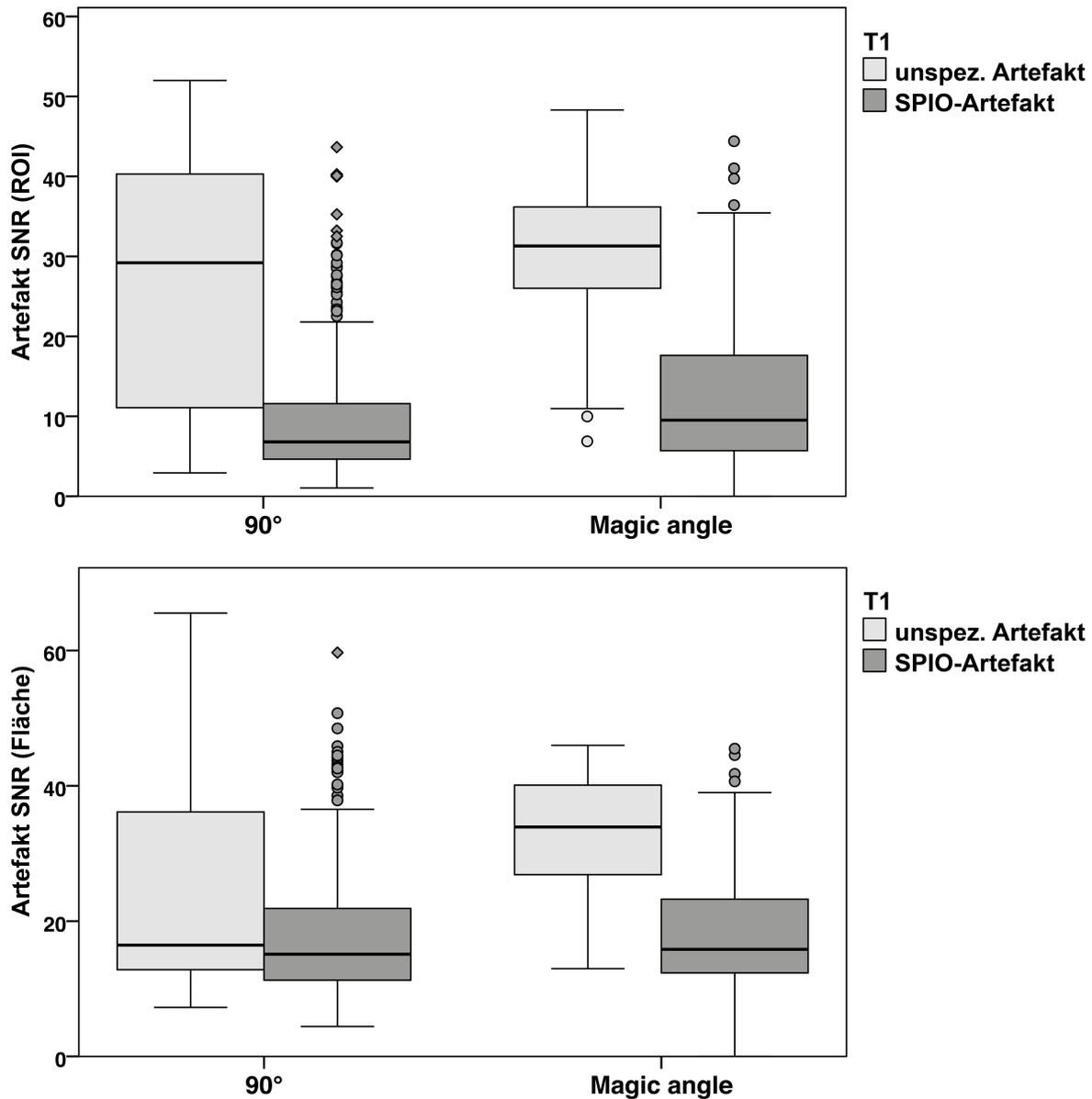


Abb. 9 Die Boxplots zeigen die Unterschiede der SNR-Werte SPIO-bedingter (Kat. 1) und unspezifischer (Kat. 2) hypointenser Artefakte in T1w 90°- und Magic Angle-Aufnahmen. Die Grauwerte der unterschiedlichen Zeitpunkte sind für diese Darstellung zusammengefasst. Sowohl die SNR-Werte der Artefakt-ROIs (**oben**) als auch die der Artefakt-Flächen (**unten**) der unspezifischen hypointensen Bereiche (Kat. 2) sind signifikant höher als die SNR-Werte der SPIO-bedingten Artefakte (Kat. 1) ($p < 0,001$). Dennoch kann kein SNR-Grenzwert zur Erkennung falsch-positiver Artefakte definiert werden.

In Standardaufnahmen konnten die SPIO-bedingten hypointensen Artefakte außerordentlich gut abgegrenzt werden, wenn diese durch hyperintensives Gewebe der Sehnenläsion umgeben waren. Eine eindeutige Abgrenzung dieser bei der Lokalisation im gesunden hypointensen Sehngewebe war

Ergebnisse

jedoch nur mit Hilfe des Magic Angle-Effektes möglich. Diese Beobachtungen konnten durch die SNR-Werte des Artefaktes, der Läsion und der OBS begründet werden (**Abb. 10**).

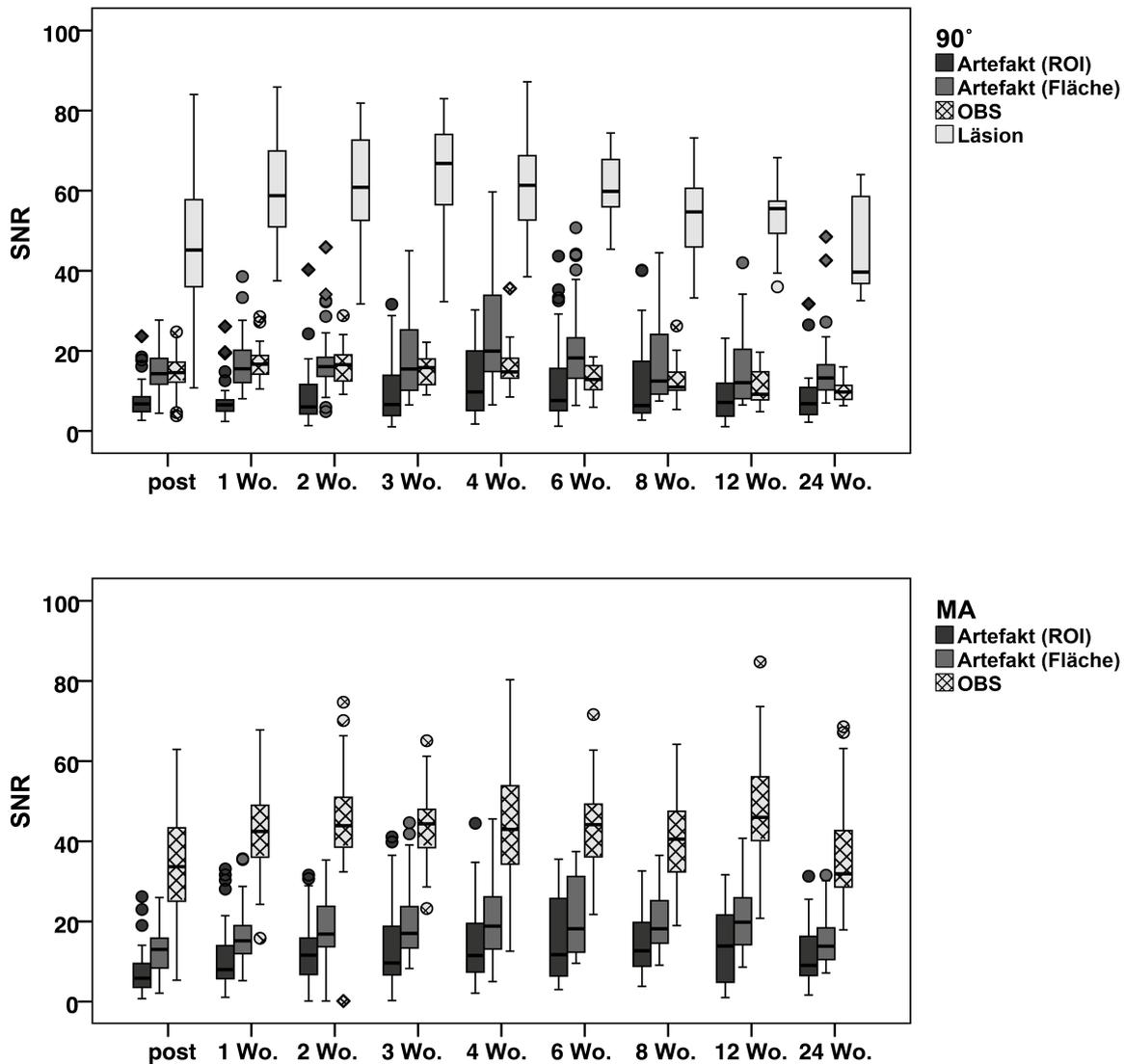


Abb. 10 Die Diagramme illustrieren die SNR-Werte der Artefakt-ROI, der Artefakt-Fläche, der OBS und der Läsion (nur in 90°-Aufnahmen) in T1w-Sequenzen über den zeitlichen Verlauf. Die SNR-Werte der hypointensen Artefakte und der OBS sind in 90°-Aufnahmen (**oben**) ähnlich, daher ist die Unterscheidung der hypointensen Artefakte von gesundem, hypointensem Sehnengewebe schwierig. Der SNR-Wert der Läsion ist dagegen signifikant höher gegenüber des SNR-Wertes der hypointensen Artefakte ($p < 0,001$). In den Magic Angle (MA)-Aufnahmen (**unten**) ist dagegen der SNR-Wert der OBS signifikant höher im Vergleich zur Artefakt-SNR ($p < 0,001$). Die Abgrenzung der hypointensen Artefakte ist somit besser möglich.

In 90°-Aufnahmen waren die SNR der Läsionen in T1w- und T2*w-Sequenzen zu allen Zeitpunkten signifikant höher als die Artefakt-SNR ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu waren die SNR der OBS im

Ergebnisse

ähnlichen Wertebereich wie die Artefakt-SNR, insbesondere bei Betrachtung der SNR der vollständigen Artefakt-Flächen. In den T1w- und T2*w-Sequenzen der Magic Angle-Aufnahmen aller Untersuchungszeitpunkte zeigten sich signifikant höhere SNR der OBS im Vergleich zu den Artefakt-SNR ($p < 0,001$). Diese Beobachtung wird durch die CNR-Werte der OBS und der Artefakte gestützt, die in den T1w- und T2*w-Sequenzen mit Magic Angle-Effekt zu jedem Zeitpunkt signifikant höher waren im Vergleich zu den 90°-Aufnahmen ($p < 0,001$) (**Abb. 11**).

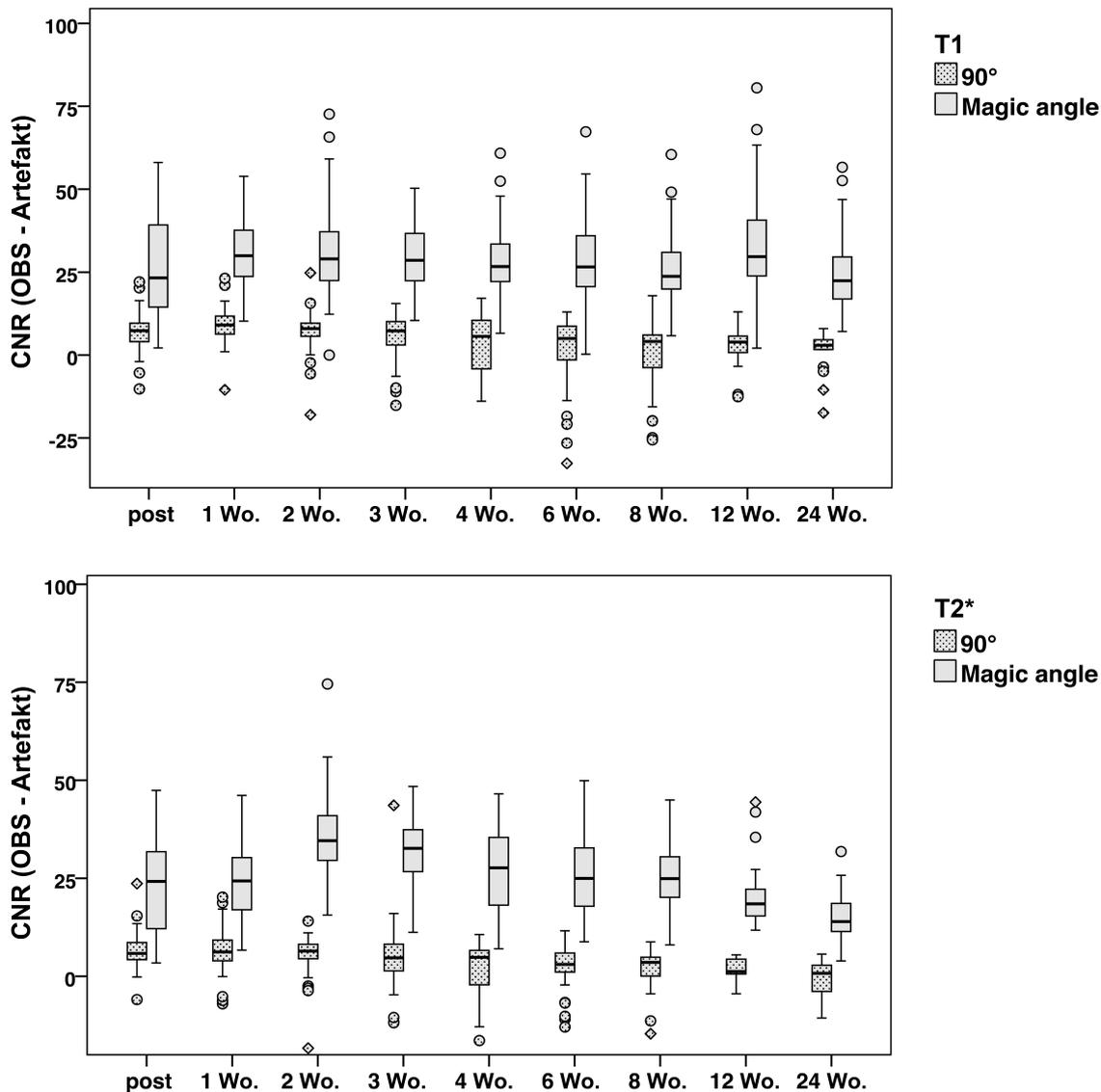


Abb. 11 Die Diagramme stellen die signifikant höheren CNR-Werte der Magic Angle-Aufnahmen im Vergleich zu den 90°-Aufnahmen in T1w (**oben**)- und T2*w (**unten**)-Sequenzen über den zeitlichen Verlauf dar ($p < 0,001$).

Das SNR der Kat. 1-Artefakte veränderte sich über die gesamte Untersuchungszeit nicht signifikant und blieb konstant niedrig (**Abb. 10**). Sie war in T2*w-Sequenzen stets kleiner als in den T1w

Ergebnisse

Sequenzen ($p < 0,05$ bei 90°). Es konnten bei den 90° -Aufnahmen keine signifikanten Unterschiede der SI zwischen Vorder- und Hintergliedmaßen festgestellt werden. Die CNR-Werte der Standard-T1w-Sequenzen wurden nicht durch eine Signalabnahme während der Sehnenheilung beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den T2*w-Sequenzen der 90° - und Magic Angle-Aufnahmen eine Abnahme der OBS-SNR über die Zeit und somit ebenfalls eine Abnahme der CNR (**Abb. 7** und **Abb. 11**). Trotz dieser Reduktion waren die Unterschiede der CNR beider Aufnahmetechniken bis zur 24. Untersuchungswoche signifikant ($p < 0,001$).

Es zeigte sich allerdings in T1w- und T2*w-Sequenzen beider Aufnahmetechniken eine Reduktion der Flächen und der Volumina der hypointensen Artefakte (**Abb. 12**). Sie waren an den Vordergliedmaßen in Woche 12 und 24 signifikant kleiner im Vergleich zu früheren Untersuchungszeitpunkten ($p < 0,05$). Demnach nimmt vermutlich die Anzahl der SPIO-markierten MSC im Laufe der Versuchszeit ab. Trotz der besseren Abgrenzbarkeit hypointensiver Artefakte im Magic Angle konnten bei der Berechnung der Artefaktvolumina keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Aufnahmetechniken festgestellt werden.

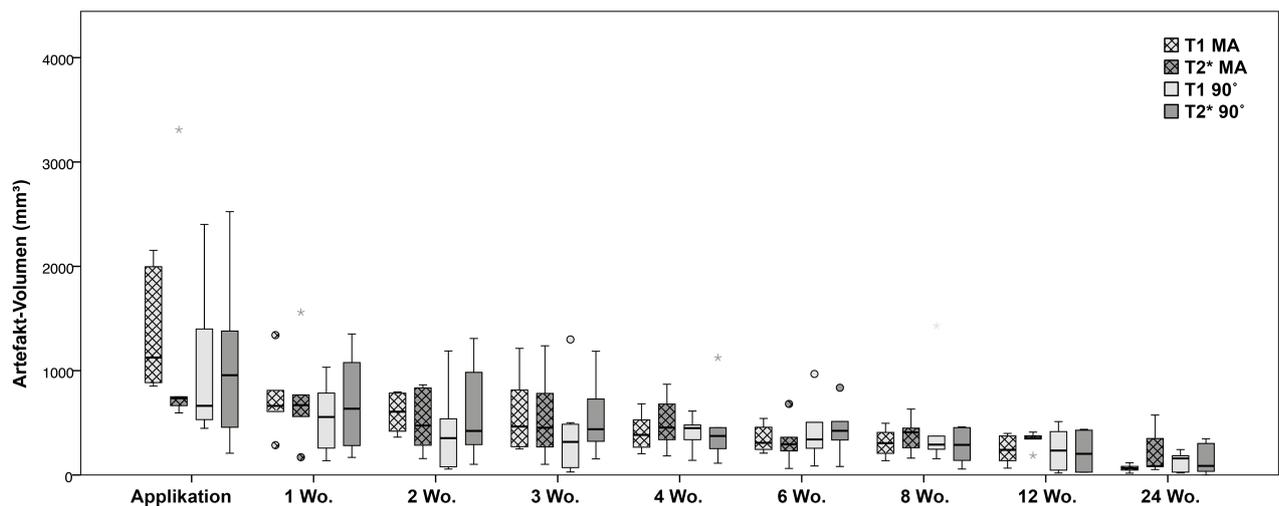


Abb. 12 Die Boxplots zeigen die Reduktion des Artefakt-Volumens über den zeitlichen Verlauf, die in den T1w- und T2*w-Sequenzen beider Aufnahmetechniken zu erkennen ist. Eine signifikante Verringerung des Volumens liegt 12 und 24 Wochen nach Zellapplikation im Vergleich zu den früheren Untersuchungszeitpunkten vor ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede des Volumens zwischen den beiden Aufnahmetechniken konnten nicht festgestellt werden.

Die Lokalisation der Artefakte wurde ausschließlich in den T1w-Sequenzen der 90° -Aufnahmen beurteilt. Die Artefakte waren bei zehn von zwölf behandelten Beinen über den gesamten Untersuchungszeitraum intratendinös und auch im Peritendineum und in der Unterhaut lokalisiert. Bei dreien von ihnen waren die Zellen später weiter zentral (also mehr intraläsional) lokalisiert. Bei einem der zwölf Beine befanden sie sich lediglich in der Unterhaut. Bei einem anderen waren die

Ergebnisse

Artefakte zunächst intratendinös lokalisiert und binnen der ersten Woche waren sie nur noch in der Unterhaut sichtbar.

5.3 Markierte MSC im peripheren Blut

In der durchflusszytometrischen Untersuchung der Blutproben, die in regelmäßigen Abständen vor und nach der Zelinjektion entnommen wurden, konnten wenige Rhodamin B-positive Zellen detektiert werden. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen variierte stark zwischen den drei untersuchten Pferden. Die höchsten Zellzahlen im peripheren Blut wurden innerhalb der ersten 24 Stunden nach Zellapplikation detektiert. Die höchsten Konzentrationen von Rhodamin B-positiven MSC reichten von $9.079/10^6$ Zellen in einer Blutprobe 8 Stunden nach Zelinjektion eines Tieres bis hin zu $513/10^6$ und $304/10^6$ Zellen in den Blutproben 12 Stunden nach Zelinjektion der beiden anderen Probanden. Die Ergebnisse weisen auf eine systemische Distribution markierter Zellen im Blutkreislauf hin.

5.4 Markierte MSC in den Gewebeproben

Die Sehnenbiopsien der Hintergliedmaßen und die Sehnenproben der Vordergliedmaßen wurden lichtmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zudem wurden durchflusszytometrische Untersuchungen der Sehnenbiopsien durchgeführt.

Preußisch Blau-positive Strukturen konnten nach der MSC-Injektion in allen Sehnenläsionen nach 3 und 24 Wochen beobachtet werden. Unspezifische Anfärbungen waren nur zu einem geringen Anteil vorhanden, der Großteil Preußisch Blau-positiver Strukturen war intrazellulär in Fibroblast-ähnlichen Zellen lokalisiert. Die positive Preußisch Blau-Anfärbbarkeit war nicht nur in dem mit MSC behandelten Sehngewebe vorhanden, sondern auch im Sehngewebe der kontralateralen Gliedmaße (**Abb. 13**) sowie im subkutanen Gewebe und in der Muskulatur im Bereich der Fettentnahmestelle.

Ergebnisse

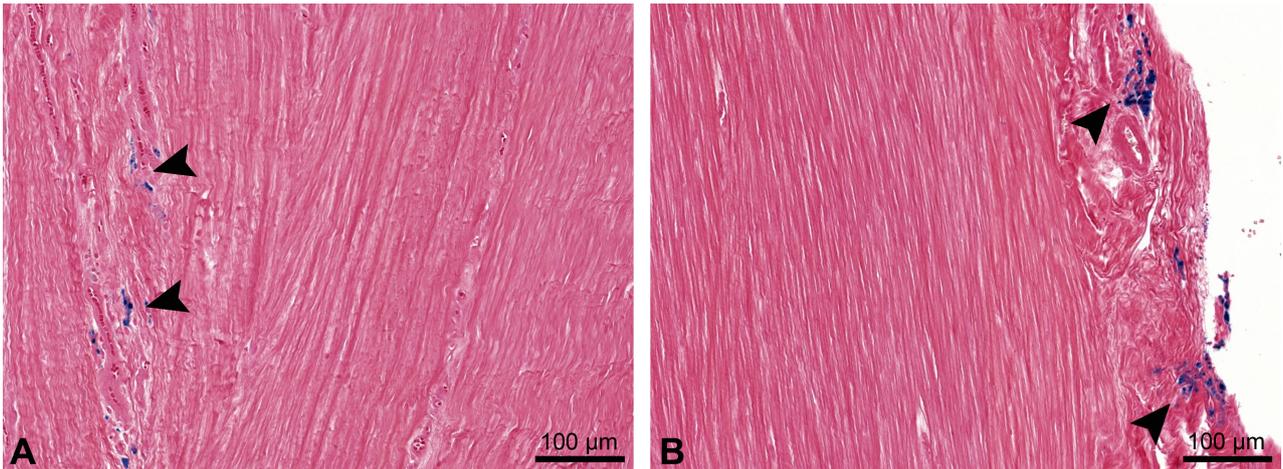


Abb. 13 Exemplarische Preußisch Blau-gefärbte histologische Schnitte der Sehnenläsion 24 Wochen nach der MSC-Applikation. Die Pfeilspitzen markieren Ansammlungen von Preußisch Blau-positive Strukturen, die größtenteils in Fibroblasten-ähnlichen Zellen enthalten sind. **(A)** Sehnenläsion, in die lediglich Serum als Kontrolle injiziert wurde; **(B)** Sehnenläsion, in die SPIO-markierte MSC injiziert wurden. Modifiziert nach BURK et al. (2016a).

Vergleichende Untersuchungen des subkutanen Gewebes und der Muskulatur im Bereich der Fettentnahmestelle von Kontrolltieren zeigten, dass auch bei diesen Proben, allerdings in einem geringeren Umfang, zellartige Strukturen mit Hilfe der Preußisch Blau-Färbung dargestellt werden konnten (**Abb. 14**).

Ergebnisse

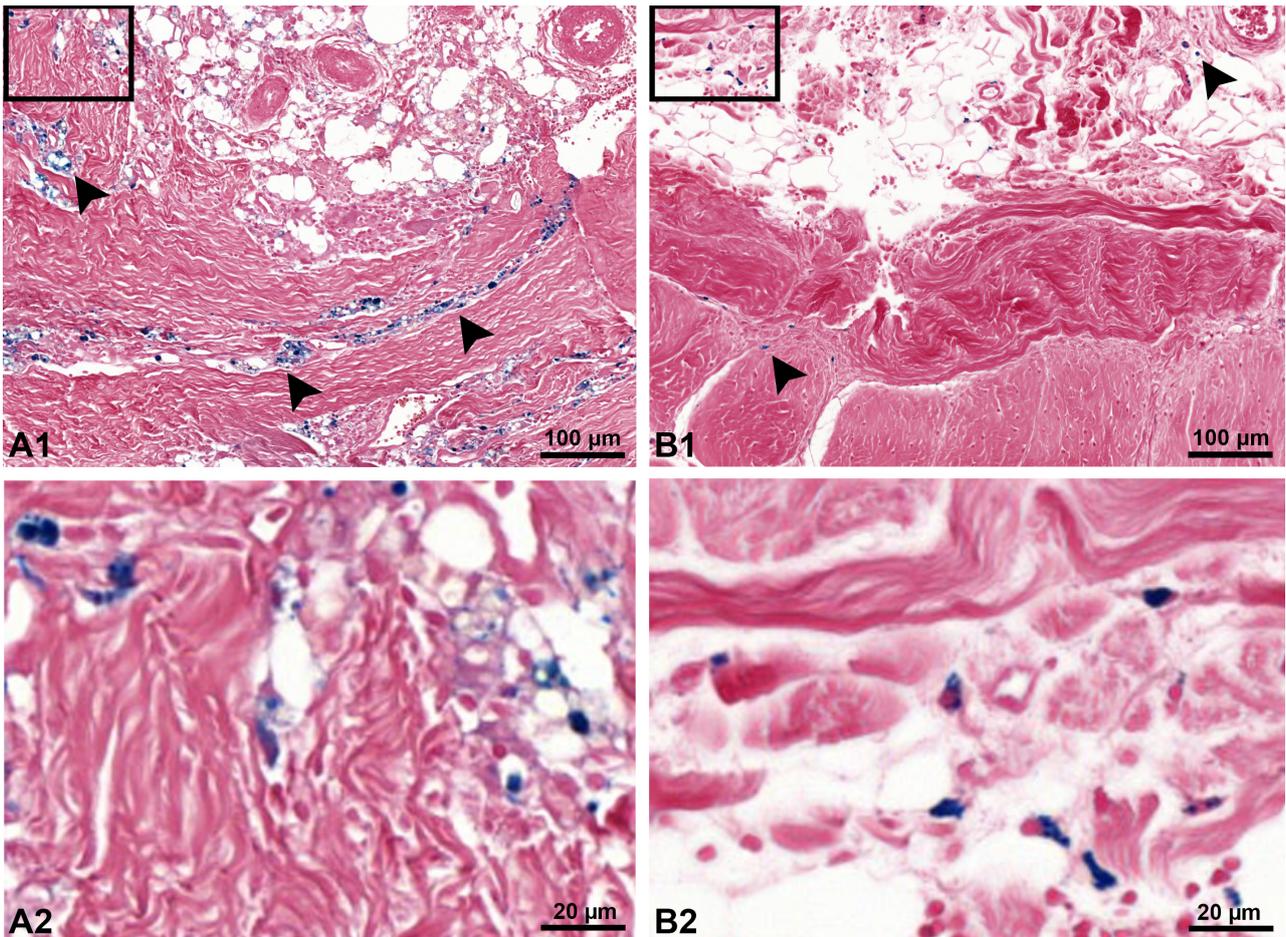


Abb. 14 Exemplarische Preußisch Blau-gefärbte histologische Schnitte von Muskel- und Unterhautnarbengewebe 6 Wochen nach chirurgischer Manipulation. **(A)** zeigen histologische Schnitte des Narbengewebes eines intratendinös mit SPIO-markierten MSC-behandelten Tieres mit einer höheren Anzahl an Preußisch Blau-positiven Zellen (Pfeilspitzen) im Vergleich zu **(B)** histologischen Schnitten eines unbehandelten Kontrolltieres. **(A2)** und **(B2)** zeigen einen vergrößerten Bildausschnitt von **(A1)** und **(B1)** dar. (BURK et al. 2016a)

Im Gegensatz dazu war die Färbung des gesunden angrenzenden Sehngewebes sowie der Unterhaut und der Muskulatur der kontralateralen Kruppenregion der Studientiere negativ.

Die Anzahl zellassoziierter Preußisch Blau-positiver Strukturen war in den Sehnenbiopsien der Hintergliedmaßen (3 Wochen nach Zellapplikation) höher als in den Sehnenproben der Vordergliedmaßen (24 Wochen nach Zellapplikation). Der Vergleich zwischen den Gliedmaßen zeigte, dass drei Wochen nach Zellapplikation in dem MSC-behandelten Bein und im kontralateralen Bein kein Unterschied in der Anzahl nachgewiesen werden konnte. 24 Wochen nach Zellinjektion lagen in dem behandelten Bein die Preußisch Blau-positiven Zellen im Vergleich zum kontralateralen Bein in einer höheren Quantität vor. Allerdings waren diese Ergebnisse statistisch nicht signifikant (**Abb. 15**).

Ergebnisse

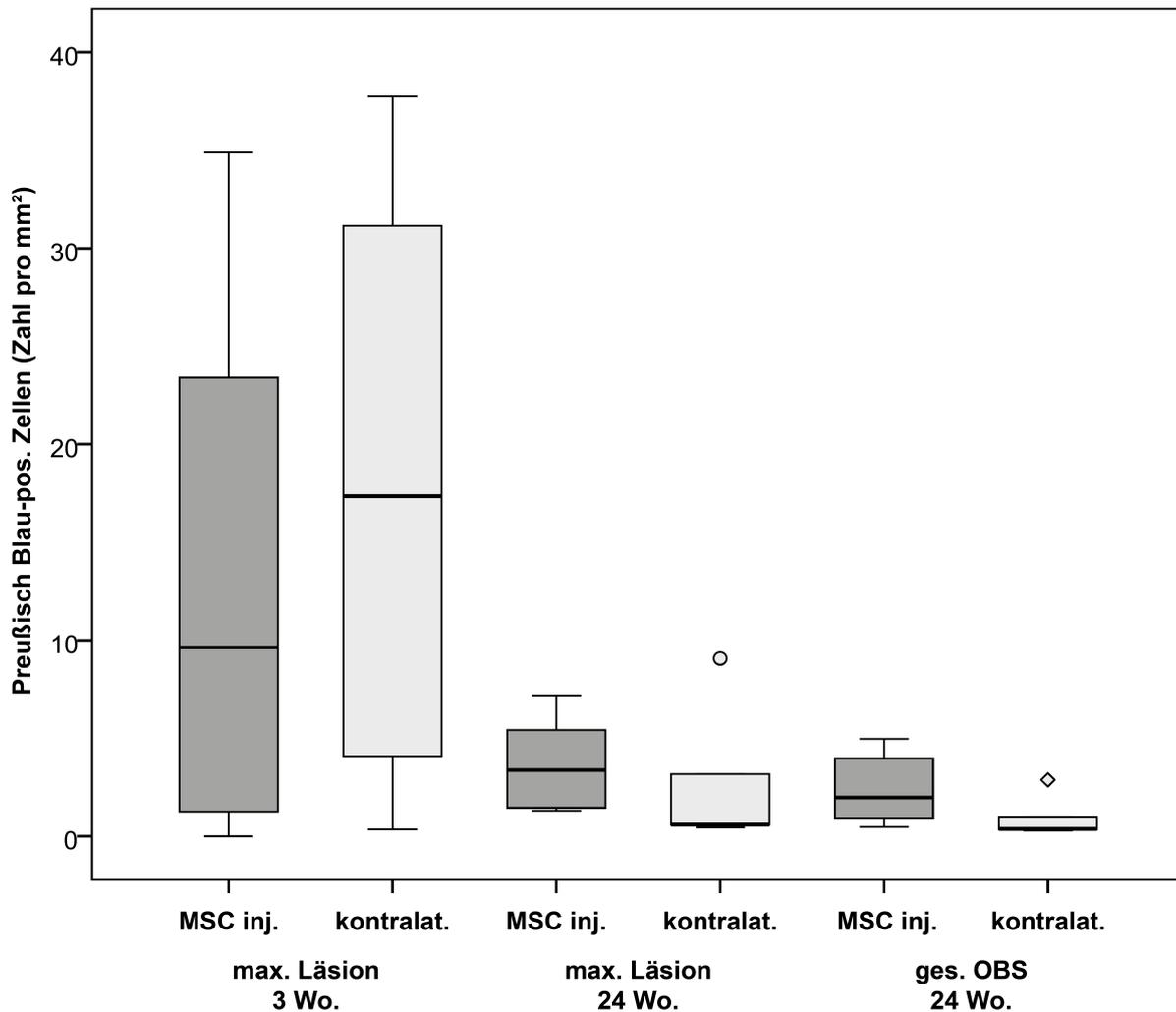


Abb. 15 Die Boxplots veranschaulichen die Anzahl Preußisch Blau positiver, Fibroblasten-ähnlicher Zellen in den histologischen Schnitten der maximalen Läsion 3 und 24 Wochen nach Zellapplikation sowie der Mittelwert von allen Sehnenabschnitten jeder OBS 24 Wochen nach Zellapplikation. Modifiziert nach BURK et al. (2016a) (max. = maximale; ges. = gesamte; inj. = injiziert; kontrat. = kontralateral)

Fluoreszenzmikroskopisch konnte ebenfalls die Präsenz von Rhodamin B-positiven Zellen im MSC-injizierten und kontralateralen Bein, jedoch in einer geringeren Quantität, festgestellt werden. Es konnten auch einzelne Rhodamin B-positive Strukturen, die vermutlich extrazellulär lokalisiert waren, beobachtet werden (**Abb. 16**).

Ergebnisse

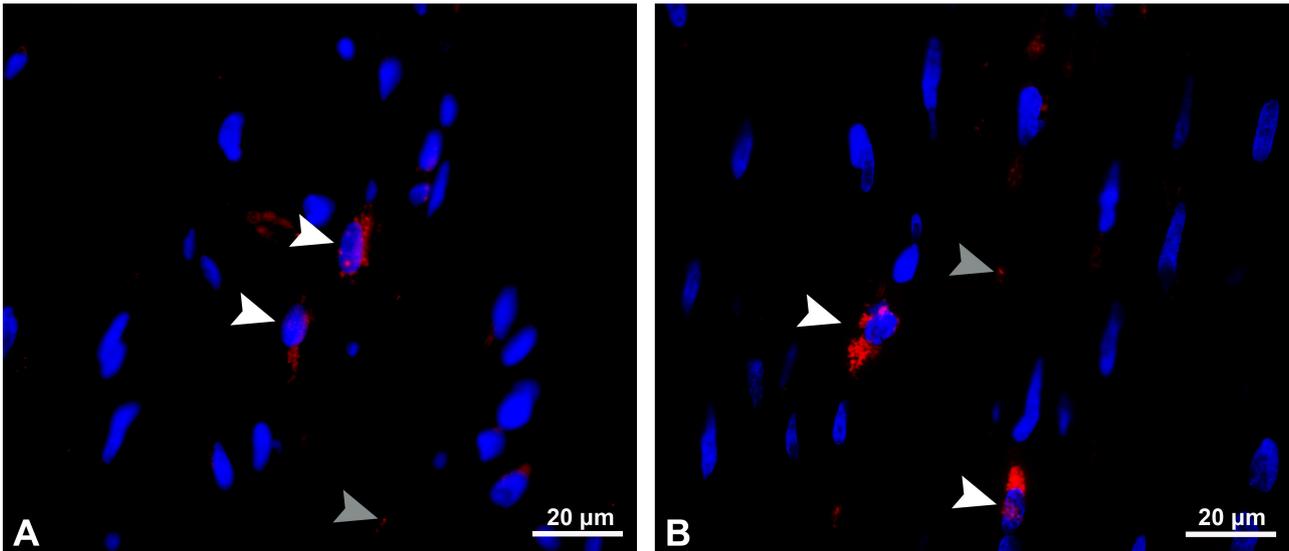


Abb. 16 Exemplarische Rhodamin B-Fluoreszenz (rot) der markierten MSC und DAPI-Färbung der Kerne (blau) histologischer Schnitte der Sehnenläsion 24 Wochen nach der MSC-Applikation. Die weißen Pfeilspitzen markieren zellassoziierte Rhodamin B-positive Partikel. Die grauen Pfeilspitzen kennzeichnen vermutlich extrazelluläre, unspezifische rot-fluoreszierende Partikel. **(A)** Sehnenläsion, in die lediglich Serum als Kontrolle injiziert wurde; **(B)** Sehnenläsion, in die SPIO-markierte MSC injiziert wurden. Modifiziert nach BURK et al. (2016a).

Es konnte in den Sehnenbiopsien fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch nicht bestätigt werden, dass die Rhodamin B-positiven Zellen in den MSC-behandelten Beinen in gleicher Anzahl vorlagen wie in den kontralateralen Gliedmaßen. In der durchflusszytometrischen Untersuchung der Biopsien betrug der Medianwert an Rhodamin B-positiven Zellen im MSC-injizierten Bein 2,5 % (IQR: 3,1 %) und im Kontrollbein lediglich nur 0,5 % (IQR: 0,5 %) (**Abb. 17**).

Ergebnisse

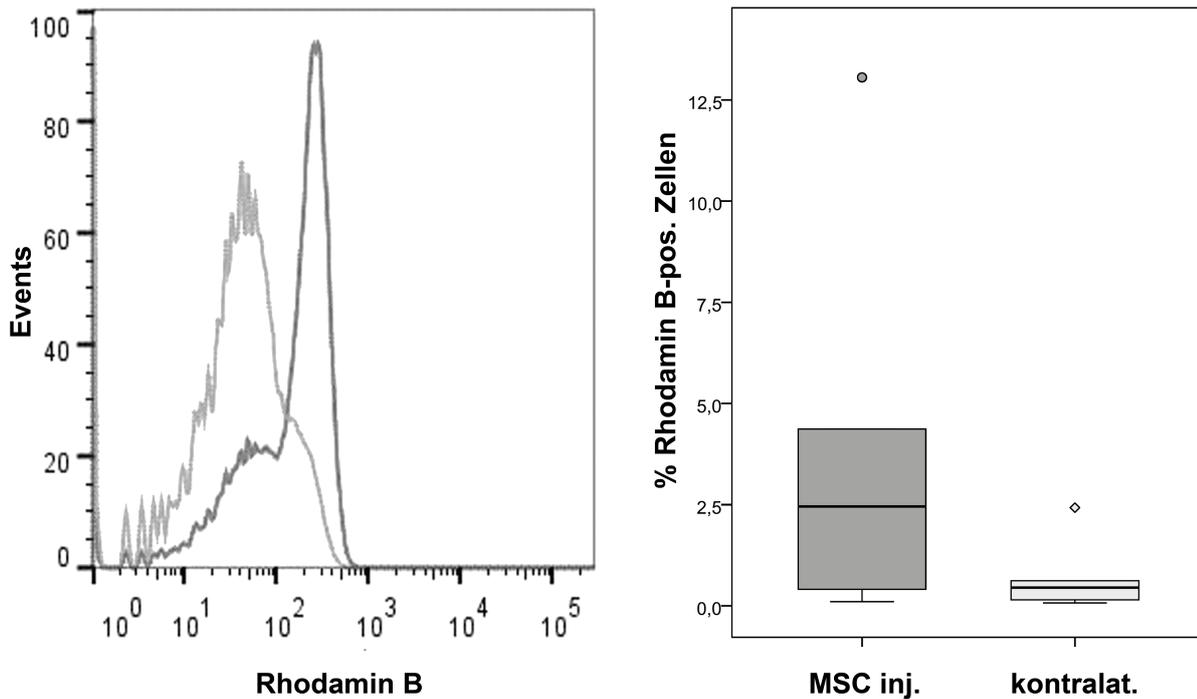


Abb. 17 Das charakteristische Histogramm (**links**) veranschaulicht die Anzahl der Events (Zellen) im Vergleich zu der Intensität der Rhodamin B-Fluoreszenz. Hellgrau = ungefärbte Kontrollzellen, dunkelgrau = Rhodamin B-positive Zellen, die aus der Sehnenbiopsie 3 Wochen nach intraläsionaler Injektion von markierten MSC gewonnen wurden. Die Boxplots (**rechts**) illustrieren den Prozentsatz der Rhodamin B-positiven Zellen an den isolierten Zellen der Sehnenbiopsien. Dunkelgrau = mit markierten MSC-behandelte Sehnenläsion, hellgrau = kontralaterale Sehnenläsion, in die lediglich Serum appliziert wurde. Modifiziert nach BURK et al. (2016a). (pos. = positiver)

Preußisch Blau- und Rhodamin B-positive Zellen waren vor allem in Gruppen im verbreiterten Endo- und Peritendineum lokalisiert. Häufig waren sie mit Blutgefäßen assoziiert oder sie lagen gerichtet zwischen unreifen Sehnenfasern.

6 Diskussion

Wesentliches Ziel der durchgeführten Studie und dieser Dissertation war die umfassende Untersuchung der lokalen Distribution intraläsional applizierter MSC über einen langen Zeitraum sowie die Untersuchung einer potentiellen systemischen Verteilung und gezielten Einwanderung der MSC in anderes geschädigtes Gewebe. Weiterhin sollte geklärt werden, ob der Magic Angle-Effekt genutzt werden kann, um in equinen OBS bei stehenden, sedierten Pferden den Informationsgehalt in der MRT signifikant zu erhöhen. Viele der in dieser Arbeit formulierten Hypothesen (**Abschnitt 3**) konnten bestätigt werden, während einige sich als ungültig herausgestellt haben. Im Folgenden sollen nun detailliert Studiendesign, Methodik und Ergebnisse des Zelltrackings diskutiert werden.

Die Einschätzung der Belastung von Tieren während eines Tierversuches ist Voraussetzung für die Genehmigung und Durchführung. Im Tierschutzgesetz ist verankert, dass Versuche an Wirbeltieren nur durchgeführt werden dürfen, wenn die zu erwartenden Schmerzen, Leiden oder Schäden der Versuchstiere im Hinblick auf den Versuchszweck ethisch vertretbar sind (ANON. 2016). Die perioperative Belastung und Analgesie der Versuchspferde wurde mit Hilfe des Pain Scores überwacht und falls erforderlich wurden zusätzlich Analgetika gegeben.

In dieser Studie musste keines der Pferde aufgrund schwerwiegender Befunde oder fehlender Ansprechbarkeit auf mehrmalige Schmerzmittelapplikationen und andere therapeutische Maßnahmen aus der Studie ausgeschlossen werden. Allerdings kam es bei einzelnen Pferden im Anschluss an die Untersuchungen eines Tages zu Koliksymptomen, die möglicherweise durch den langen Untersuchungszeitraum während desselben Tages in Verbindung mit der langen Sedationsdauer verursacht wurden. Da an den Pferden in den ersten 6 Wochen des Versuches drei invasive Eingriffe (Tendinopathieinduktion, Zellinjektion, Biopsieentnahme) durchgeführt wurden, kam es zu einer zusätzlichen Beanspruchung. Insgesamt jedoch ist die Belastung der Versuchspferde während des gesamten Zeitraumes der Studie von 24 Wochen als akzeptabel anzusehen.

Die Begrenzung des Untersuchungszeitraumes auf 24 Wochen hat sich für den Versuch als zweckdienlich herausgestellt, obwohl der Abschluss der Sehnenheilung mit 12 Monaten und länger angegeben wird (DOWLING et al. 2000). Nach Meinung von VAN SCHIE et al. (2009) findet jedoch die Remodellingphase hauptsächlich vom 45.-120. Tag statt und somit kann der gewählte Versuchszeitraum für ausreichend lang erachtet werden. Zu beachten ist allerdings, dass die experimentellen Sehnenläsionen in dieser in vivo-Studie auch 24 Wochen nach MSC-Applikation ultrasonographisch, magnetresonanztomographisch und histologisch noch nachgewiesen werden konnten. Demnach muss davon ausgegangen werden, dass der Heilungsprozess der artifiziellen Tendinopathien noch nicht vollständig abgeschlossen war.

Diskussion

Die Erzeugung dieser Defekte in den OBS war mit Hilfe einer kombinierten mechanisch-enzymatischen Vorgehensweise bei allen Versuchspferden möglich. Allerdings ist anzumerken, dass es, wie auch in der Literatur beschrieben (SCHRAMME et al. 2010a), durch die Kollagenase-Injektion zu umfangreichen, in ihrer Größe nicht kontrollierbaren Sehnenläsionen mit Ausdehnung bis in das Peritendineum kam und eine Standardisierung deshalb schwierig war. Somit waren Unterschiede im Ausmaß und in der Lokalisation der Läsionen innerhalb eines Versuchspferdes als auch zwischen den Versuchspferden. Die von WATTS et al. (2012) vorgeschlagene Kombination mit einem mechanischen Verfahren konnte der unkontrollierbaren Vergrößerung der Sehnenläsionen in dieser Studie vollständig nicht entgegenwirken.

Einen weiteren invasiven Eingriff der Studie stellte die Entnahme von Sehnenbiopsien aus den OBS der Hintergliedmaßen drei Wochen nach der Zellapplikation dar. Auch dieser Eingriff konnte an allen zwölf OBS erfolgreich durchgeführt werden. Es stellte allerdings trotz der vorhandenen MRT-Aufnahmen eine Herausforderung dar, intraoperativ den maximalen Bereich der Sehnenläsion zu identifizieren. In der Literatur ist diese Probengewinnung in Form einer Feinnadelbiopsie als ein Verfahren mit keiner oder nur geringer Belastung für das Pferd beschrieben (WAGELS 2000). In der vorliegenden Studie wurden wesentlich größere Sehnenproben entnommen, allerdings konnte auch hier keine schwerwiegende Belastung der Versuchstiere beobachtet werden. Ob die Biopsieentnahmen eine Lahmheit an der entsprechenden Hintergliedmaße induzierte, konnte jedoch nur schwer beurteilt werden, da an beiden Hintergliedmaßen gleichzeitig Sehnenproben entnommen wurden. Festzustellen ist jedoch, dass es bei einem der sechs Pferde zu einer postoperativen Komplikation in Form einer Nahtdehiszenz im Bereich einer Biopsieentnahmestelle kam.

Für die Applikation von MSC stellt die direkte intraläsionale Injektion den Goldstandard dar (TRELA et al. 2014). Sie wurde in der Studie unter Ultraschallkontrolle durchgeführt und für die Festlegung des Injektionsortes zunächst der maximale Läsionsbereich bestimmt. In allen Fällen konnte die intraläsionale Positionierung der Spitze der Kanüle ultrasonographisch bestätigt und zum Teil auch eine Flüssigkeitsbewegung innerhalb der Sehnenläsion während der Applikation beobachtet werden. Die Durchführung dieses Verfahrens ist unverzichtbar, allerdings kann ein Zurücklaufen der Zellsuspension in das Peritendineum und die Unterhaut während oder kurz nach der Injektion nicht detektiert werden.

Zwingend notwendig bei einer derartigen Studie ist die Verwendung einer Kontrolle in der Sehnenläsion der kontralateralen Gliedmaße, da sowohl ein positiver als auch ein negativer Effekt durch die Punktion der Sehnenläsion nicht ausgeschlossen werden kann. Es wird sowohl von einer Vergrößerung der Läsion durch die Punktion berichtet (WATTS et al. 2012) als auch von einer Förderung der Kollagenorganisation und der Läsionsreduktion durch die Punktion und es führt durch das Abfließen von Hämatomen und Ödemen zu einer Verringerung des Druckes (DOWLING et al. 2000). Als Kontrolle wurde autologes Serum für die Injektion an der kontralateralen Gliedmaße

Diskussion

verwendet, da dieses auch zur Suspension der MSC vor Applikation verwendet wurde, jedoch ein potentieller therapeutischer Effekt nicht ausgeschlossen werden kann (GEBUREK und STADLER 2011). Um den Einfluss des Serums auf die Sehnenheilung ausschließen und ausschließlich die Wirksamkeit der MSC untersuchen zu können, wurde diese Vorgehensweise gewählt.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Studie ist die langfristige Verfolgung der MSC im Körper. Dabei weisen einzelne Vorgehensweisen unterschiedliche Limitationen auf und die Wahl einer geeigneten Methode ist anspruchsvoll. Durch die Kombination verschiedener Ansätze können jedoch diese Limitierungen teilweise umgangen und der Informationsgehalt einer Studie erhöht werden. Die nachfolgende Zusammenfassung der Ergebnisse durchgeführter Zelltracking-Studien verschiedener Arbeitsgruppen zeigt die Heterogenität der Beobachtungen und lässt keine einheitliche Schlussfolgerung bezüglich der Biodistribution der MSC zu.

Die Ergebnisse der MSC-Markierung mit Technetium-99 und der szintigraphischen Detektion von BECERRA et al. (2013) und SOLE et al. (2013) lassen auf einen nur unvollständigen Verbleib der Zellen in der Sehnenläsion schließen. Lediglich 24 % der applizierten Zellen waren nach 24 Stunden noch intraläsional vorhanden. Allerdings kann es durch die Abspaltung des Radionuklids zu einer Unterschätzung der MSC im behandelten Bein kommen (SPRIET et al. 2015).

Weniger als 5 % der anfänglich applizierten GFP-transfizierten MSC konnten bereits zehn Tage nach der Injektion in der Sehnenläsion identifiziert werden, nach 60–90 Tagen waren es weniger als 1 % (GUEST et al. 2010). Diese Erkenntnisse weisen auf ein mangelndes Überleben der MSC hin, da es keinen Hinweis auf Zellmigration in andere geschädigte Bereiche gab. Der geringe Nachweis kann allerdings auch durch die geringe Anzahl an injizierten MSC (1×10^6) verursacht sein (BERNER et al. 2016, GEBUREK et al. 2016, SCHARF et al. 2015).

Im Gegensatz dazu konnte in einem Schafmodell die Persistenz der mit einem rotfluoreszierendem Protein-markierten MSC sechs Wochen nach Applikation festgehalten werden (LACITIGNOLA et al. 2014). In der Studie von GUEST et al. (2008) wurden die injizierten Zellen vor allem intraläsional und ein geringer Anteil im angrenzenden Sehnengewebe nachgewiesen. Sie zeigten eine Tendinozyten-ähnliche Morphologie und waren in das gesunde Sehnengewebe integriert. Dieser Eindruck kann jedoch auch fälschlicherweise durch eine Fusion von markierten MSC und Tendinozyten zustande kommen. Im kontralateralen Sehnengewebe, nicht aber in der Sehnenläsion, konnten nur sehr wenige Zellen detektiert werden, was als unspezifische Färbung interpretiert wurde.

CARVALHO et al. (2014) markierten die MSC mit Quantum dots. Diese konnten sieben Tage nach der Injektion im behandelten Bein und im peripheren Blut mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie und Histologie detektiert werden, allerdings nicht in der kontralateralen, unbehandelten Sehnenläsion.

Weiterhin wurden bereits in vivo-Studien mit SPIO-markierten MSC durchgeführt (GEBUREK et al. 2016, SCHARF et al. 2015, YANG et al. 2013). In einer in vivo-Studie mit Schafen konnten die SPIO-

Diskussion

markierten Zellen über sieben Tage intraläsional histologisch eruiert werden, diese Ergebnisse kongruieren mit den hypointensen Bereichen in der MRT (SCHARF et al. 2015). Es zeigte sich, dass der Hauptanteil der GFP-transfizierten SPIO-markierten Zellen im Injektionsbereich zu finden war. Hinweise auf eine Migration der MSC innerhalb der Sehnenläsion waren ebenfalls feststellbar. Außerdem wurden Signalauslöschungen im Bereich der Sehnnenscheide detektiert, aber diese Beobachtung ist nach Meinung der Autoren auf ein Zurücklaufen der injizierten Zellsuspension aus dem Stichkanal zurückzuführen. Nach 14 Tagen waren weiterhin hypointense Artefakte darstellbar, allerdings konnten in der histologischen Untersuchung nur noch wenige oder keine SPIO-Partikel intrazellulär nachgewiesen werden. Außerdem waren diese überwiegend nicht GFP-positiv. Dies lässt auf einen frühzeitigen Zelluntergang schließen, da sowohl die SPIO-Partikel als auch die GFP-Markierung nach einer erfolgten Zellteilung detektierbar bleibt.

Dementgegen war in einer anderen Studie neun Wochen nach Zellapplikation stets eine hohe Anzahl an Zellen histologisch nachweisbar (GEBUREK et al. 2016), allerdings zeigte sich auch hier eine Abnahme der initial verabreichten Zellen über den zeitlichen Verlauf.

Ein Grund für die differierende Nachweisbarkeit in den verschiedenen Studien könnte der Einsatz unterschiedlicher Zellzahlen sein (siehe oben; 1×10^6 vs. 10×10^6). In Kaninchensehnen wurden die SPIO-markierten MSC über drei Wochen mittels MRT- und histologischer Untersuchungen sichtbar gemacht (YANG et al. 2013). Bei einer Schafstudie von DELLING et al. (2015b) zeigte sich zwölf Wochen nach intraartikulärer Applikation SPIO-markierter MSC die anhaltende Viabilität der Zellen. In der Arbeit von BERNER et al. (2016) wurde für das MSC-Tracking ein Niederfeld-MRT genutzt. Die Sehnenläsionen natürlicher Genese und die injizierten MSC in Form von hypointensen Artefakten konnten über den gesamten Studienverlauf von acht Wochen nachverfolgt werden. Da es sich bei den Probanden um Patientenpferde handelte, konnten allerdings keine histologischen Proben gewonnen und untersucht werden. Umfangreiche Untersuchungen zur systemischen Biodistribution SPIO-markierter MSC wurden in bisherigen Studien nicht durchgeführt und so wurde beispielsweise von GEBUREK et al. (2016) die kontralaterale Gliedmaße nicht histologisch untersucht.

Wie in den genannten Studien zu erkennen ist, hat sich die MRT als Detektionssystem für eine langfristige Zellverfolgung als geeignet herausgestellt, da es nicht-invasiv ist und regelmäßige Untersuchungen über einen langen Zeitraum erlaubt. Außerdem ist in verschiedenen MRT-Sequenzen die Beurteilung der Sehnenheilung aufgrund von Veränderungen der Signalintensitäten zeitgleich möglich.

So waren in dieser Studie über den vollständigen Untersuchungszeitraum von 24 Wochen die Sehnenläsionen in den MRT-Aufnahmen stets sichtbar. Die Lokalisation der hypointensen Artefakte war hilfreich für die subjektive Erkennung und so konnten die direkt intraläsional lokalisierten, jedoch die Signalauslöschung nicht zur Demarkation der Sehnenläsion führte, und solche, die in der Subkutis lokalisiert waren, leicht erkannt werden.

Diskussion

Ein Nachteil dieses Detektionssystems stellt die zum Teil schwierige Abgrenzung von SPIO-bedingten hypointensen Artefakten und dem hypointensen gesunden Sehnengewebe dar (GEBUREK et al. 2016), da die Signalintensitäten im gleichen Bereich angesiedelt sind. Eine genaue Ansprechbarkeit der Artefaktfläche im gesamten Sehnengewebe ist daher nahezu unmöglich. Außerdem ist die Identifizierung des SPIO-Artefaktes bei vollständiger Signalüberlagerung der hyperintensen Sehnenläsion in Standard-MRT-Sequenzen schwierig und es kann zu falsch-negativen Ergebnissen kommen.

Eine präzise Abgrenzung ist aber durch die Zuhilfenahme des Magic Angle-Effektes möglich (BURK et al. 2013a, YANG et al. 2013), da es zu einer Kontrastverstärkung kommt und dadurch die Sensitivität des MRT-Detektionssystems erhöht werden kann. Im Magic Angle kommt es zu einer Zunahme der Signalintensität des gesunden Sehnengewebes, weshalb sich folglich lediglich die SPIO-Artefakte hypointens darstellen. Bisher wurde über diesen Effekt in vivo im Zusammenhang mit der SPIO-Artefakt-Abgrenzung nur bei Kaninchen berichtet (YANG et al. 2013), wobei jedoch kein Vergleich zu Standard-MRT-Aufnahmen gemacht wurde.

In der vorliegenden in vivo-Studie war die Erzeugung des Magic Angle-Effektes über 24 Wochen in equinen OBS möglich und konnte erstmals für die verbesserte Detektion von SPIO-Artefakten genutzt werden. Die Anwendung dieser Technik ist im Niederfeld-MRT-System möglich, wobei der erreichbare Winkel zwischen der OBS und dem Hauptmagnetfeld allerdings durch die Schenkel des Permanentmagneten und die Tiergröße eingeschränkt wird und eine Standardisierung daher nur schwer möglich ist. Weiterhin ist zu beachten, dass diese Aufnahmetechnik ausschließlich durch erfahrenes Personal und mit trainierten Versuchspferden durchgeführt werden sollte, da sie ein nicht unerhebliches Risiko in sich birgt.

Die Verwendung des Magic Angle-Effektes ermöglicht beim Zelltracking auch in equinen OBS eine verbesserte Abgrenzbarkeit SPIO-bedingter hypointenser Artefakte im Sehnengewebe im Vergleich zu den Standard-Aufnahmen. Es ist jedoch zu sagen, dass keine signifikanten Unterschiede in den Artefakt-Volumina zwischen den beiden Aufnahmetechniken bestehen. Folglich wurden die Artefakte in Aufnahmen beider Techniken weitgehend gleich interpretiert. Als mögliche Gründe hierfür können die Erfahrung der ausmessenden Person und Zufälligkeit genannt werden.

Durch die Detektion hypointenser Artefakte konnte im Ablauf der Studie festgestellt werden, dass trotz Ultraschall-gestützter Zellinjektion bei elf von zwölf Beinen MSC direkt nach der Applikation in der Unterhaut lokalisiert werden konnten. Diese Tatsache spricht allerdings vielmehr für ein Zurücklaufen der Zellsuspension aus dem Stichkanal als für eine Zellwanderung. Zudem konnten ähnliche Beobachtungen auch in anderen Studien gemacht werden (BERNER et al. 2016, GEBUREK et al. 2016), was eine Evaluierung der Injektionstechnik notwendig erscheinen lässt. Eine weitere Ursache könnte die Tendinopathieinduktion unter Verwendung von Kollagenase sein. So ist beschrieben, dass es durch das Enzym zu umfangreichen Entzündungsreaktionen kommt und keine

Diskussion

Kernläsion erzeugt wird, die von intaktem Sehngewebe umgeben ist, und es somit zum Ablaufen der intraläsional applizierten Zellsuspension kommt (WATTS et al. 2012).

Die Spezifität des MRT-Detektionssystems sollte durch die qualitative Evaluierung und quantitative Messungen überprüft werden. Es zeigte sich, dass die subjektive Erfassung hypointenser SPIO-Artefakte erstaunlich präzise war. Keine hypointensen Artefakte wurden im Kontrollbein oder vor der Zellapplikation den SPIO-Artefakten (Kat. 1) zugeordnet, sondern wurden als unspezifische Artefakte (Kat. 2) kategorisiert. Diese Beobachtung verdeutlicht eine korrekte Identifizierung falsch-positiver Artefakte und bestätigt das gewählte Kategorisierungssystem.

Unspezifische hypointense Artefakte können an Übergängen zwischen verschiedenen Geweben aufgrund einer starken Magnetisierung entstehen. Das subjektiv exakte Ansprechen falsch-positiver Artefakte ließ sich auch durch quantitative Messungen bestätigen, allerdings konnte kein SNR-Grenzwert zwischen Artefakten der Kat. 1 und 2 in Magic Angle- und Standard-Aufnahmen festgelegt werden. Begründet ist dies durch wenige niedrige Ausreißer der SNR-Werte von falsch-positiven Artefakten und den Partialvolumeneffekt. Der Partialvolumeneffekt ist von der Schichtdicke der MRT-Aufnahmen abhängig. Durch ihn kann es zu Signalüberlagerungen und somit zum Anstieg der Signalintensität insbesondere kleiner Artefakte kommen. Diese Beobachtungen sind nicht in Übereinstimmung mit BERNER et al. (2016), die eine Quantifizierung des Signals für sicherer ansahen als die subjektive Evaluierung. Hieran erkennt man die Schwierigkeit der korrekten Identifizierung der SPIO-Artefakte und die Bedeutung der Kombination quantitativer und qualitativer Analysen.

Zudem stellte sich die Frage nach der Veränderung der Signalintensität und der Dimension der SPIO-bedingten hypointensen Artefakte in der MRT im zeitlichen Verlauf. In der Studie von BERNER et al. (2016) wurde eine Zunahme der Signalintensität der SPIO-Artefakte beobachtet. Während der Zellproliferation kommt es zur Reduktion des SPIO-Gehaltes insgesamt und auch zur Zunahme des Signals jeder Zelle (LIU und FRANK 2009). Die Signalveränderung ist nach Meinung von LIU und FRANK (2009) durch die Konzentration der Nanopartikel und nicht durch die Anzahl der Zellen beeinflusst.

In dieser in vivo-Studie war dahingegen die Signalintensität der SPIO-bedingten hypointensen Artefakte (Kat. 1) über den Untersuchungszeitraum konstant niedrig. Sowohl die Anzahl applizierter markierter MSC als auch die Versuchsdurchführung waren bei beiden Studien identisch, der einzige Unterschied bestand in der Verwendung von autologen (diese in vivo-Studie) bzw. allogenen (BERNER et al. (2016) MSC. Ein möglicher Grund für die Zunahme der Signalintensität könnte die vermehrte Phagozytose allogener Zellen sein. Die Reduktion der Artefakt-Flächen und der Artefakt-Volumina in dieser in vivo-Studie lässt jedoch die Schlussfolgerung zu, dass es zu einer Abnahme der SPIO-markierten MSC kommt. Es ist nicht nur die SPIO-Konzentration in einer Zelle von Bedeutung, sondern ebenfalls die Anordnung der markierten Zellen zueinander. So führt zum Beispiel erst eine gewisse Anzahl injizierter MSC zur Signalauslöschung. Wie Agar-Gel-Phantom-Untersuchungen unserer

Diskussion

Arbeitsgruppe gezeigt haben, entstehen hypointense Artefakte im Niederfeld-MRT-System erst ab einer Konzentration von 100.000 markierter MSC (Zellmarkierung wie in dieser in vivo-Studie mit 25 µg Fe/ml) (BERNER et al. 2016). Es ist allerdings nicht definiert wie viele Zellen in einem bestimmten Sehnenvolumen vorhanden sein müssen, um detektiert werden zu können.

Aus diesem Detektionsminimum SPIO-markierter MSC ergibt sich, dass die lokale Migration geringerer Zellzahlen oder gar einzelner Zellen nicht feststellbar ist. In der vorliegenden Studie war eine Zellbewegung in vier von zwölf Beinen in der magnetresonanztomographischen Untersuchung sichtbar. In drei von diesen waren die hypointensen Artefakte weiter zentral lokalisiert, wohingegen sie in einem Bein eine Woche nach Injektion nur noch in der Unterhaut gefunden werden konnten.

Eine Ausbreitung der Zellen zu weiter entfernten Bereichen, also die Detektion von hypointensen Bereichen an anderen Lokalisationen oder gar am kontralateralen Bein konnte nicht beobachtet werden. Zudem ist es nicht möglich, eine systemische Verteilung markierter MSC mittels MRT zu detektieren. Die Gründe dafür sind zum einen die Größe des Versuchstieres, die es notwendig macht einzelne Körperteile in verschiedenen Untersuchungen zu messen. Zum anderen spielt die oben beschriebene begrenzte Sensitivität des Niederfeld-MRT für SPIO-markierte Zellen eine Rolle. Im Gegensatz dazu konnten in Agar-Gel-Phantom-Versuchen von ADDICOTT et al. (2011) und SCHARF et al. (2015) mit einem Hochfeld-MRT bereits SPIO-markierte Zellen ab einer Konzentration von 1.000 bzw. 10.000 Zellen detektiert werden. Hier muss jedoch betont werden, dass auch mit einem Hochfeld-MRT keine einzelnen SPIO-markierten Zellen dargestellt werden können und es bei sehr hohen Zellzahlen zu einem überschießenden Suszeptibilitätsartefakt kommt (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe). Nichtsdestotrotz stellen die geringere Bildauflösung und die relativ große Schichtdicke im Niederfeld-MRT-System Limitationen dieser Studie dar.

Die gewählte Schichtdicke von 5mm und die Sortierung der MRT-Aufnahmen und die Zuordnung zu entsprechenden Höhen bei der Auswertung macht eine Detektion geringer räumlicher Veränderungen hypointenser Artefakte schwierig. So können Aufnahmen einer zugeordneten Position über den zeitlichen Verlauf aufgrund der Schichtdicke von 5 mm und dem Abstand zwischen zwei Aufnahmen von 1 mm bis zu 6 mm voneinander abweichen. Trotz dieser Limitationen ist dennoch das Niederfeld-MRT-System für eine langfristige Zellverfolgung und Durchführung regelmäßiger Untersuchungen zu präferieren, da Hochfeld-MRT-Untersuchungen in Allgemeinanästhesie durchgeführt werden müssen. Letzteres hat gravierende Nachteile, da beispielsweise eine 1 %ige Mortalitätsrate aufgrund des Narkoserisikos besteht (JOHNSTON et al. 2002) oder es während der Aufstehphase zu hohen Zugbelastungen in der OBS kommen kann, was womöglich die Sehnenheilung negativ beeinflusst.

Die MRT als einziges Detektionssystem hat jedoch deutliche Limitationen, wenn es darum geht Aussagen über die MSC-Assoziation und die MSC-Viabilität und ihre Integration in dem Sehngewebe zu machen. Um die Sensitivität der Zelldetektion zu erhöhen und Ergebnisse auf Zellebene zu erlangen, muss auf andere Untersuchungsmethoden zurückgegriffen werden.

Diskussion

Histologische Untersuchungen können Aufschluss über die SPIO-Zellassoziation geben. Die Validierung SPIO-bedingter Artefakte in der MRT ist somit anhand der Analyse histologischer Gewebeschnitte möglich. Die Viabilität und lokale Verteilung der SPIO-markierten MSC kann beurteilt werden und eine Analyse des Sehngewebes in Bezug auf die Sehnenheilung kann durchgeführt werden. Auch hier können jedoch aufgrund der Größe des Versuchstieres lediglich einzelne Bereiche untersucht werden. Obwohl die histologische Untersuchung von Gewebeschnitten eine bewährte Methode zur Validierung von MRT-Ergebnissen ist, eignet sie sich jedoch nicht für eine langfristige kontinuierliche Zellverfolgung *in vivo*.

Um in der Histologie die SPIO-Partikel sichtbar zu machen, eignet sich das Anfärben mit Preußisch Blau. In der lichtmikroskopischen Untersuchung kann dann damit die Lokalisation und Integrität der positiven Zellen im Sehngewebe beurteilt werden. Diese Färbemethode wird als Goldstandard für die Identifizierung der SPIO-Partikel in Gewebeproben verwendet (SCHARF et al. 2015, YANG et al. 2013) und dient der Differenzierung von hypointensen Artefakten, die durch SPIO oder Hämorrhagien entstanden sind (SCHARF et al. 2015). Häufig wird in diesem Zusammenhang jedoch nicht beachtet, dass die Preußisch Blau-Färbung nicht spezifisch für SPIO-Partikel ist, sondern vielmehr Fe³⁺-Ionen anfärbt und üblicherweise als Nachweismethode für Erythrozytenabbauprodukte oder Siderophagen verwendet wird. Somit kann es zu einer Preußisch Blau-positive Färbung in hämorrhagischem Gewebe kommen, obwohl keine SPIO-Partikel vorhanden sind.

Um dieses zu evaluieren wurden Kontrollproben von beschädigtem Gewebe gefärbt. Es zeigte sich zwar eine geringere Konzentration, es konnten jedoch ebenfalls intrazelluläre Strukturen mit Preußisch Blau angefärbt werden. Außerdem können SPIO-Partikel durch Zellyse frei oder nach Phagozytose in anderen Zellen vorliegen (SCHARF et al. 2015, WANG et al. 2009). Die Zellassoziation der Preußisch Blau-positiven Strukturen lässt die Schlussfolgerung zu, dass freie, extrazelluläre SPIO-Partikel auch 24 Wochen nach Zellapplikation keinen Hauptbestandteil ausmachen. Es ist allerdings möglich, dass die SPIO-Partikel nicht mehr in den initial markierten MSC vorhanden sind, sondern in Makrophagen durch Phagozytose freier SPIO-Partikel oder SPIO-markierter MSC lokalisiert sind (LIU und FRANK 2009, SCHARF et al. 2015, WANG et al. 2009). In einer Studie von PAWELCZYK et al. (2008) wurde jedoch ein Übergang von Eisen während der Phagozytose von SPIO-markierten MSC auf Makrophagen mit <10 % beschrieben. Basierend auf einer immunohistochemischen Färbung von Makrophagenmarkern in einigen Vorversuchen und der differierenden Morphologien von MSC und Makrophagen kann eine umfangreiche Beteiligung dieser als eher unwahrscheinlich erachtet werden. Eine Bestätigung dieser Hypothese wäre zum Beispiel durch eine kombinierte Markierung der MSC mit SPIO und GFP möglich (SCHARF et al. 2015). Folglich ist die Preußisch Blau-Färbung aufgrund ihrer Spezifität nicht als alleinige Methode für den Nachweis SPIO-markierter MSC geeignet. Die Kombination mit einer weiteren Technik der Zellmarkierung und -detektion ist notwendig.

Diskussion

Die Limitation der Abgrenzung SPIO-positiver Zellen von Zellen mit Eisen-haltigen Blutabbauprodukten konnte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Rhodamin B-positiven Zellen überwunden werden. Ein weiteres Indiz dafür, dass ein Teil der Preußisch Blau-positiven Zellen durch Blutabbauprodukte hervorgerufen wird, ist, vor allem in den Sehnenbiopsien, die geringere Anzahl festgestellter Rhodamin B-positiver Zellen im Sehnengewebe. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit denen einer Studie von SCHARF et al. (2015), in der die MSC GFP-transfiziert und SPIO-markiert waren. Zwei Wochen nach Zellapplikation waren weniger GFP-markierte MSC als Preußisch Blau gefärbte Strukturen detektierbar. Die Erklärung für diese Ergebnisse durch die Autoren war allerdings, dass es sich bei den Preußisch Blau-positiven Strukturen zum Teil um freie SPIO-Partikel gehandelt hat (SCHARF et al. 2015). Dies konnte in unserer Studie nicht bestätigt werden, da die positive Färbung intrazellulär lokalisiert war. Obwohl der Nachweis von GFP eine hohe Spezifität für das Vorhandensein transfizierter MSC hat, ist dieses Protein nicht an SPIO-Partikel gebunden. Aus diesem Grund ist es nicht möglich das Schicksal der SPIO-Partikel über die Detektion des GFP zu ermitteln. Es ist also ebenfalls denkbar, dass die Differenz zwischen Preußisch Blau- und GFP-positiven Strukturen durch das Vorkommen von Blutabbauprodukten zustande kommt.

In der durchgeführten Studie wurden SPIO-Partikel eingesetzt, die direkt an Rhodamin B gekoppelt sind. Der Rhodamin B-Nachweis hat eine höhere Spezifität als die Anfärbung der SPIO-Partikel mit Preußisch Blau. Im Hinblick auf die Quantifizierung markierter Zellen kann die Fluoreszenzmikroskopie deshalb wertvolle Informationen liefern. Die Abgrenzung Rhodamin-positiver Zellen ist zum Teil jedoch aufgrund von Autofluoreszenz des Sehnengewebes und der Erythrozyten schwierig. Infolge dessen wurden in dieser Studie die fluoreszenzmikroskopischen Schnitte des Sehnengewebes lediglich qualitativ ausgewertet, um zu verhindern, dass falsch-positive Ergebnisse bei einzelnen Zellen zu verfälschten quantitativen Ergebnissen führen.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Sehnenbiopsien drei Wochen nach Zellapplikation bestätigte die deskriptive Evaluierung mit dem Ergebnis, dass in der Probe der MSC-behandelten Seite mehr Rhodamin B-positive MSC vorhanden waren im Vergleich zur kontralateralen Sehnenbiopsie. Das Vorkommen einer geringen Anzahl von markierten Zellen in der Sehnenläsion auf der kontralateralen Seite wird durch die Präsenz von MSC im peripheren Blut in den ersten Stunden nach Zellapplikation gestützt. Diese Beobachtung wurde ebenfalls in der Studie von CARVALHO et al. (2014) gemacht. Die Ergebnisse beider Studien lassen die Annahme zu, dass die Zellen vor allem zum Zeitpunkt der Zellapplikation in das Blutssystem übergehen. Ein Grund dafür kann die Verletzung von kleinen Gefäßen mit der Injektionskanüle sein. Es gibt einige Untersuchungen darüber warum MSC gezielt in geschädigtes Gewebe einwandern (SOHNI und VERFAILLIE 2013). Sind die Progenitorzellen in das Blutgefäßsystem übergetreten, migrieren sie durch Chemokine und Integrine zu geschädigten Geweben. Der Nachweis markierter Zellen im Kontrollbein nach lokaler MSC-Applikation ist jedoch

Diskussion

bisher in anderen Studien noch nicht beobachtet worden (CARVALHO et al. 2014, GUEST et al. 2008, LACITIGNOLA et al. 2014). Zudem ist nach Meinung von GAO et al. (2001) die Effizienz des Homings mit nur 1–2 % der infundierten MSC als sehr gering einzuschätzen (Verwendung von MSC aus Knochenmark). Einen weiteren Hinweis auf die systemische Biodistribution könnte eine histologische Untersuchung der regionalen Lymphknoten geben (GEBUREK et al. 2016).

Die klinische Relevanz der Biodistribution der MSC nach lokaler Injektion ist als unbedeutend einzuschätzen, da es nur zu einer geringen Reduktion der injizierten Zellkonzentration in der behandelten Sehnenläsion kommt. Die Ergebnisse sind jedoch elementar für die Einschätzung des Studiendesigns und die Bewertung des Therapieerfolges. Die Nutzung kontralateraler Sehnenläsionen als Negativkontrolle in einer in vivo-Studie ist generell anerkannt, da man so die Anzahl der Versuchstiere und individuelle Unterschiede reduzieren kann (CROVACE et al. 2007, SCHRAMME et al. 2010a). Da allerdings bisher nicht bekannt ist, welche Zellkonzentration die Sehnenheilung positiv beeinflusst (BECERRA et al. 2013), muss auch die Wanderung einzelner Zellen als kritisch betrachtet werden. Dann nämlich handelt es sich bei der kontralateralen Sehnenläsion nach einer potentiellen Migration der MSC um keine Negativkontrolle mehr. Zukünftig ist es notwendig dosisabhängige Studien durchzuführen, um die effektive Zelldosis zu ermitteln.

In dieser in vivo-Studie sollte die langfristige Zellverfolgung Aufschluss über die Biodistribution wie die lokale Persistenz und systemische Verteilung von intraläsional applizierten MSC geben. Eines der Hauptresultate ist die erfolgreiche Detektion der MSC und deren Verbleiben in der behandelten Sehnenläsion über 24 Wochen nach lokaler Zellapplikation. Dies wird durch das konstant niedrige Signal der Artefakte in der MRT und die Detektion markierter Zellen in entsprechenden histologischen Proben belegt. Der Magic Angle-Effekt kann in equinen OBS zudem zur verbesserten Detektion SPIO-bedingter Artefakte in der MRT genutzt werden. Die Zellzahl in der Sehnenläsion nahm über die Zeit ab, was aufgrund des abnehmenden Volumens der hypointensen Artefakte und histologischer Ergebnisse geschlussfolgert werden konnte. Nichtsdestotrotz war 24 Wochen ein nicht zu vernachlässigender Teil der initial injizierten MSC vital und in das Sehnenewebe integriert. Die damit nachgewiesene Persistenz der MSC über einen langen Zeitraum würde es ihnen erlauben, kontinuierlich Einfluss auf lokale regenerative Prozesse zu nehmen. Eine weitere zentrale Erkenntnis dieser Studie ist die systemische Zirkulation SPIO-markierter MSC und die Distribution in anderes geschädigtes Gewebe wie die Sehnenläsion der kontralateralen Gliedmaße. Die Ergebnisse dieser in vivo-Studie liefern somit einen maßgeblichen Beitrag zum Kenntnisstand zu Biodistribution und Persistenz von MSC nach lokaler Applikation. Sie sind damit von großer Bedeutung für das Verständnis des Wirkmechanismus der MSC-Therapie von Sehnenenerkrankungen und können als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen.

7 Zusammenfassung

Carolin Horstmeier

Untersuchungen zur Biodistribution multipotenter mesenchymaler Stromazellen nach intraläsionaler Applikation in induzierte Defekte equiner Oberflächlicher Beugesehnen

Klinik für Pferde, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Dezember 2016

82 Seiten, 17 Abbildungen, 15 Tabellen, 128 Literaturangaben, 4 Anhänge

Schlüsselwörter: Tendinopathie, Oberflächliche Beugesehne, multipotente mesenchymale Stromazellen, Biodistribution, Tracking, superparamagnetische Eisenoxide, Magnetresonanztomographie

Einleitung: Die Tendinopathie der Oberflächlichen Beugesehne (OBS) ist eine häufig auftretende orthopädische Erkrankung beim Pferd, die meist zu einer langfristigen oder sogar endgültigen Leistungsdepression führt. Bisher besteht kein therapeutischer Goldstandard, jedoch wird die Therapie mit multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSC) als aussichtsreich erachtet. Der Verbleib und der Wirkmechanismus dieser Zellen nach lokaler Applikation sind nicht hinreichend bekannt. Eine kombinierte Markierung der MSC mit superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (SPIO) und dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B ermöglicht die Analyse der Biodistribution mit Hilfe von Magnetresonanztomographie (MRT), histologischen und fluoreszenzbasierten Untersuchungen.

Ziele: Wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der lokalen Distribution intraläsional applizierter MSC sowie die Untersuchung einer potentiellen systemischen Verteilung und gezielten Einwanderung in anderes geschädigtes Gewebe. Weiterhin sollte die Anwendung des Magic Angle-Effektes in der MRT bezüglich Durchführbarkeit an stehenden Pferden und Effektivität des Zelltrackings evaluiert werden.

Tiere, Material und Methoden: Bei 6 Pferden wurden im mittleren Teil der metakarpalen/-tarsalen OBS aller 4 Gliedmaßen Sehnenläsionen auf mechanisch-enzymatischem Wege induziert. Die für die Applikation aus Fettgewebe der Glutealregion gewonnenen, autologen MSC wurden mit Molday ION Rhodamine B (BioPAL, Inc., Worcester, USA) markiert. 3 Wochen nach Defektinduktion erfolgte die intraläsional Applikation der markierten MSC in die OBS einer Vorder- und einer Hintergliedmaße und

Zusammenfassung

Serum in die kontralateralen Kontrolldefekte. Im Zeitraum der Zellapplikation wurden mehrere venöse Blutproben durchflusszytometrisch auf Rhodamin B-positive Zellen hin untersucht. Insgesamt erfolgten 10 MRT-Untersuchungen der Vordergliedmaßen bis zur 24. Woche nach Zellapplikation in denen Standard- und Magic Angle-Aufnahmen angefertigt wurden. Bis zur 3. Woche nach Zellapplikation erfolgten 4 Standard-MRT-Untersuchungen der Hintergliedmaßen. T1- und T2*-gewichtete Sequenzen dienten bei beiden Aufnahmetechniken der Beurteilung SPIO-bedingter hypointenser Artefakte. 3 Wochen nach der Zellapplikation wurden Biopsien aus den OBS der Hintergliedmaßen entnommen. Zum gleichen Zeitpunkt erfolgte die Entnahme von subkutanem Fett- und Muskelgewebe aus dem Bereich der Fettentnahmestelle und aus der unbeschädigten kontralateralen Glutealregion. 24 Wochen nach Zellapplikation wurden die Tiere euthanasiert und die OBS der Vordergliedmaßen entnommen. Alle Gewebeproben wurden histologisch (Preußisch Blau Färbung) und fluoreszenzbasiert (Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie) untersucht.

Ergebnisse: SPIO-bedingte hypointense Artefakte waren über 24 Wochen in MRT-Aufnahmen der MSC-behandelten OBS vorhanden. Die Signalintensität war konstant niedrig, jedoch verringerte sich das Volumen der hypointensen Artefakte mit der Zeit. Diese ließ ein Abnehmen der Zahl markierter MSC vermuten, was in histologischen Analysen bestätigt wurde. Der Magic Angle-Effekt konnte in allen OBS der Vordergliedmaßen und zu allen Zeitpunkten erzeugt werden. Die Abgrenzbarkeit der hypointensen Artefakte gegenüber dem in Standard-MRT-Aufnahmen hypointensen gesunden Sehngewebe erhöhte sich, jedoch gab es keine Unterschiede in der Volumenmessung der SPIO-bedingten hypointensen Artefakte zwischen Standard- und Magic Angle-Aufnahmen. Histologisch konnten intrazelluläre Preußisch Blau-positive Zellen in den MSC-behandelten und kontralateralen Sehnenläsionen sowie in anderem geschädigten Gewebe detektiert werden. Diese Beobachtungen bestätigten sich durch den Nachweis Rhodamin B-positiver Zellen. Durchflusszytometrische Untersuchungen von Blutproben zeigten, dass Rhodamin B-positive Zellen vor allem innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Zellapplikation im venösen Blut vorhanden waren. Die intraläsional applizierten MSC verblieben hauptsächlich in der behandelten Sehnenläsionen, welches durch das konstant niedrige Signal der Artefakte in der MRT und durch die Detektion markierter Zellen in entsprechenden histologischen Proben belegt wurde.

Schlussfolgerung: Eine langfristige Verfolgung SPIO-markierter MSC ist in vivo im MRT durch beide Aufnahmetechniken möglich. Die Abgrenzbarkeit SPIO-bedingter hypointenser Artefakte kann durch den Magic Angle-Effekt erhöht werden. Allerdings ist die Sensitivität der Zellverfolgung in der MRT begrenzt und somit kann eine geringe Zellmigration nicht detektiert werden. Trotz der Hinweise auf eine systemische Verteilung und Migration der markierten Zellen in anderes geschädigtes Gewebe, verbleibt ein Großteil der markierten MSC nach der intraläsionalen Injektion in der behandelten OBS.

8 Summary

Carolin Horstmeier

A biodistribution study of multipotent mesenchymal stromal cells after intralesional injection in induced lesions of equine superficial digital flexor tendons

University Equine Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in December 2016

82 pages, 17 figures, 15 tables, 128 references, 4 appendices

Keywords: tendinopathy, superficial digital flexor tendon, multipotent mesenchymal stromal cells, biodistribution, tracking, superparamagnetic iron oxide, magnetic resonance imaging

Introduction: Tendinopathy in superficial digital flexor tendon (SDFT) is a frequently occurring orthopaedic disease in horses, which usually results in long-term or even in a permanent decrease in the performance. So far there is no therapeutic gold standard. The therapy with multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) has shown promising results. Still, the fate of these cells and their mechanism of action after local injection are not completely understood. The labelling of MSC with superparamagnetic iron oxides (SPIO) and Rhodamine B enables the analysis of the biodistribution using magnetic resonance tomographic, histological and fluorescence based examinations.

Objectives: Main objective of this work was the comprehensive investigation of the local distribution of intralesional injected MSC. Additionally, a potential circulation in the blood system and a possible migration into other damaged tissue was analysed. Furthermore, the feasibility of the magic angle effect in SDFT MRI scans of standing sedated horses and its effectiveness for cell tracking was part of the study.

Animals, Material and Methods: Tendon lesions were induced by a mechanic-enzymatic procedure in all mid-metacarpal/-metatarsal SDFT of 6 horses. The autologous MSC, gained from adipose tissue of the gluteal region, were labelled with Molday ION Rhodamine B (BioPAL, Inc., Worcester, USA). Three weeks after induction of the tendon lesions, labelled MSC were injected into the SDFT of one fore- and one hind leg and serum in the contralateral control lesions. During the first week following cell injection, peripheral blood samples were collected and assessed for Rhodamine B-positive cells by flow cytometry. Overall 10 MRI examinations of the forelegs were performed until week 24 after cell application, in which standard and magic angle images were taken. Four standard MRI examinations were performed until week three after injection of the hind legs. T1 and T2* weighted sequences served for the evaluation of SPIO-induced hypointense artefacts in the case of both recording

Summary

techniques. Three weeks after cell injection, tendon biopsies were taken from both hind legs. At the same time subcutaneous and muscle tissue was collected from the area where adipose tissue was previously obtained and from the contralateral gluteal region. Tendon samples of both forelegs were taken at week 24 after euthanasia. All tissue samples were then assessed by histology (Prussian blue staining) and fluorescence-based methods (fluorescence microscopy, flow cytometry).

Results: Until week 24, hypointense artefacts induced by SPIO particles were visible in the MSC-injected limbs. The signal intensity consistently remained low but the artefact volume decreased over time, which suggested that the number of labelled MSC decreases over time as well. Histology confirmed the smaller number of MSC. The magic angle effect was feasible in the SDFT of all forelegs and at all time points. It improves the discrimination of hypointense artefacts because healthy tendon tissue now presents as hyperintense regions. However, there were no significant differences between the artefact volumes between standard and magic angle images. Prussian Blue-positive structures were detected in all MSC-treated tendon lesions and also in other damaged tissue. The presence of Rhodamine B-positive cells confirmed these findings. Using flow cytometry, Rhodamine B-positive cells were detected in the peripheral blood, especially in the first 12 hours after MSC injection. The majority of applied cells remained at the injection site, which is verified by the constantly low signal intensity of the artefacts and the detection of labelled cells in corresponding histological samples.

Conclusion: Longitudinal tracking of SPIO-labelled MSC in vivo is feasible by both MRI recording techniques. The delineation of the SPIO-induced hypointense artefacts is higher in magic angle images. However, the sensitivity of MRI for cell tracking is limited, so that minor cell movements cannot be detected. Despite the indications for systemic circulation and migration of the labelled cells into other damaged tissue, the majority of the applied labelled MSC remain at the injection site after intralesional injection.

9 Literaturverzeichnis

- Abate M, Silbernagel KG, Siljeholm C, Di Iorio A, De Amicis D, Salini V, Werner S, Paganelli R. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res Ther.* 2009;11:235 (doi: 10.1186/ar2723).
- Addicott B, Willman M, Rodriguez J, Padgett K, Han D, Berman D, Hare JM, Kenyon NS. Mesenchymal stem cell labeling and in vitro MR characterization at 1.5 T of new SPIO contrast agent: Molday ION Rhodamine-B. *Contrast Media Mol Imaging.* 2011;6:7-18.
- Anon. (2011). Embryonenschutzgesetz (ESchG) vom 21.11.2011. BGBl. I S. 2228 §2 (2).
- Anon. (2016). Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 18.7.2016. BGBl. I S. 1666 §7a (2)3.
- Aspenberg P. Stimulation of tendon repair: mechanical loading, GDFs and platelets. A mini-review. *Int Orthop.* 2007;31:783-9.
- Balesdent Barreira AP, Alves ALG, Salto ME, Arnorint RL, Kohoyagawa A, Menarim BC, Mota LS. Autologous implant of bone marrow mononuclear cells as treatment of induced equine tendinitis. *Int J Appl Res Vet Med.* 2008;6:46-54.
- Becerra P, Valdés Vázquez MA, Dudhia J, Fiske-Jackson AR, Neves F, Hartman NG, Smith RK. Distribution of injected technetium(99m)-labeled mesenchymal stem cells in horses with naturally occurring tendinopathy. *J Orthop Res.* 2013;31:1096-102.
- Berner D, Brehm W, Gerlach K, Gittel C, Offhaus J, Paebst F, Scharner D, Burk J. Longitudinal Cell Tracking and Simultaneous Monitoring of Tissue Regeneration after Cell Treatment of Natural Tendon Disease by Low-Field Magnetic Resonance Imaging. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1207190 (doi: 10.1155/2016/).
- BioPhysics Assay Laboratory. Cell Labeling Method using Molday ION Rhodamine BTM (CL-50Q02-6A-50), a Fluorescent Cationic USPIO (zitiert vom 23.11.2016) <<http://www.biopal.com/pdf-downloads/application-notes/application-note-3.pdf>>.
- Bosch G, René van Weeren P, Barneveld A, van Schie HT. Computerised analysis of standardised ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons following treatment with intratendinous platelet rich plasma or placebo. *Vet J.* 2011;187:92-8.
- Bourzac CA, Koenig JB, Link KA, Nykamp SG, Koch TG. Evaluation of ultrasmall superparamagnetic iron oxide contrast agent labeling of equine cord blood and bone marrow mesenchymal stromal cells. *Am J Vet Res.* 2014;75:1010-7.
- Brehm W, Burk J, Delling U, Gittel C, Ribitsch I. Stem cell-based tissue engineering in veterinary orthopaedics. *Cell Tissue Res.* 2012;347:677-88.
- Burk J, Berner D, Brehm W, Hillmann A, Horstmeier C, Josten C, Paebst F, Rossi G, Schubert S, Ahrberg AB. Long-Term Cell Tracking following Local Injection of Mesenchymal Stromal Cells in the Equine Model of Induced Tendon Disease. *Cell Transplant.* 2016a;(doi: 10.3727/096368916X692104).

Literaturverzeichnis

- Burk J, Berner D, Erbe I, Offhaus J, Winter K, Brehm W. MRI of superparamagnetic iron oxide-labeled mesenchymal stromal cells in tendon tissue using the magic-angle effect. *World Conference on Regenerative Medicine*; 2013 Oct 23-25; Leipzig, Germany 2013a. p. 69.
- Burk J, Brehm W. Stammzellentherapie von Sehnenverletzungen - klinische Ergebnisse von 98 Fällen. *Pferdeheilkd.* 2011;27:153-61.
- Burk J, Plenge A, Brehm W, Heller S, Pfeiffer B, Kasper C. Induction of Tenogenic Differentiation Mediated by Extracellular Tendon Matrix and Short-Term Cyclic Stretching. *Stem Cells Int.* 2016b;2016:7342379 (doi: 10.1155/2016/).
- Burk J, Ribitsch I, Gittel C, Juelke H, Kasper C, Staszyc C, Brehm W. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet J.* 2013b;195:98-106.
- Busoni V, Snaps F. Effect of deep digital flexor tendon orientation on magnetic resonance imaging signal intensity in isolated equine limbs-the magic angle effect. *Vet Radiol Ultrasound.* 2002;43:428-30.
- Bussi eres G, Jacques C, Lainay O, Beauchamp G, Leblond A, Cador e JL, Desmaizi eres LM, Cuvelliez SG, Troncy E. Development of a composite orthopaedic pain scale in horses. *Res Vet Sci.* 2008;85:294-306.
- Bydder M, Rahal A, Fullerton GD, Bydder GM. The magic angle effect: a source of artifact, determinant of image contrast, and technique for imaging. *J Magn Reson Imaging.* 2007;25:290-300.
- Cadby JA, David F, van de Lest C, Bosch G, van Weeren PR, Snedeker JG, van Schie HT. Further characterisation of an experimental model of tendinopathy in the horse. *Equine Vet J.* 2013;45:642-8.
- Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol.* 2009;217:318-24.
- Carrade DD, Lame MW, Kent MS, Clark KC, Walker NJ, Borjesson DL. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Med.* 2012;4:1-11 (doi: 0.3727/215517912x647217).
- Carvalho AM, Alves ALG, de Oliveira PGG,  lvarez LEC, Amorim RL, Hussni CA, Deffune E. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *J Equine Vet Sci.* 2011;31:26-34.
- Carvalho AM, Yamada AL, Golim MA,  lvarez LE, Hussni CA, Alves AL. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. *Equine Vet J.* 2014;46:635-8.
- Conze P, van Schie HT, van Weeren R, Staszyc C, Conrad S, Skutella T, Hopster K, Rohn K, Stadler P, Geburek F. Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions. *Regen Med.* 2014;9:743-57.
- Crabbe A, Vandeputte C, Dresselaers T, Sacido AA, Verdugo JM, Eyckmans J, Luyten FP, Van Laere K, Verfaillie CM, Himmelreich U. Effects of MRI contrast agents on the stem cell phenotype. *Cell Transplant.* 2010;19:919-36.
- Crass JR, Genovese RL, Render JA, Bellon EM. Magnetic resonance, ultrasound and histopathologic correlation of acute and healing equine tendon injuries. *Vet Radiol Ultrasound.* 1992;33:206-16.

Literaturverzeichnis

- Crevier-Denoix N, Collobert C, Pourcelot P, Denoix JM, Sanaa M, Geiger D, Bernard N, Ribot X, Bortolussi C, Bousseau B. Mechanical properties of pathological equine superficial digital flexor tendons. *Equine Vet J Suppl.* 1997;23-6.
- Crovace A, Lacitignola L, De Siena R, Rossi G, Francioso E. Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. *Vet Res Commun.* 2007;31 281-3.
- 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 (doi: 10.4061/2010/).
- Dahlgren LA. Management of tendon injuries. In: Robinson NE, Sprayberry KA, Hrsg. *Current Therapy in Equine Medicine.* 6. Aufl. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. p. 518-23.
- De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology.* 2011;75:1431-43.
- Delfaut EM, Beltran J, Johnson G, Rousseau J, Marchandise X, Cotten A. Fat suppression in MR imaging: techniques and pitfalls. *Radiographics.* 1999;19:373-82.
- Delling U, Brehm W, Ludewig E, Winter K, Julke H. Longitudinal Evaluation of Effects of Intra-Articular Mesenchymal Stromal Cell Administration for the Treatment of Osteoarthritis in an Ovine Model. *Cell Transplant.* 2015a;24:2391-407.
- Delling U, Brehm W, Metzger M, Ludewig E, Winter K, Julke H. In Vivo Tracking and Fate of Intra-Articularly Injected Superparamagnetic Iron Oxide Particle-Labeled Multipotent Stromal Cells in an Ovine Model of Osteoarthritis. *Cell Transplant.* 2015b;24:2379-90.
- Dirks RC, Warden SJ. Models for the study of tendinopathy. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2011;11:141-9.
- Dominici M, Le Blanc K, 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;8:315-7.
- Dowling BA, Dart AJ. Mechanical and functional properties of the equine superficial digital flexor tendon. *Vet J.* 2005;170:184-92.
- Dowling BA, Dart AJ, Hodgson DR, Smith RKW. Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Vet J.* 2000;32:369-78.
- Dyson SJ. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet J.* 2004;36:415-9.
- Erickson SJ, Cox IH, Hyde JS, Carrera GF, Strandt JA, Estkowski LD. Effect of tendon orientation on MR imaging signal intensity: a manifestation of the "magic angle" phenomenon. *Radiology.* 1991;181:389-92.
- Frisbie DD, Smith RK. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Vet J.* 2010;42:86-9.

Literaturverzeichnis

- Fu SC, Rolf C, Cheuk YC, Lui PP, Chan KM. Deciphering the pathogenesis of tendinopathy: a three-stages process. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol*. 2010;2 (doi: 10.1186/1758-2555-2-30).
- Fullerton GD, Rahal A. Collagen structure: the molecular source of the tendon magic angle effect. *J Magn Reson Imaging*. 2007;25:345-61.
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells, tissues, organs*. 2001;169:12-20.
- Geburek F, Mundle K, Conrad S, Hellige M, Walliser U, Van Schie HT, Van Weeren R, Skutella T, Stadler PM. Tracking of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells with in vivo magnetic resonance imaging and histology after intralesional treatment of artificial equine tendon lesions - a pilot study. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7 (doi: 10.1186/s13287-016-0281-8).
- Geburek F, Stadler P. Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden. Terminologie, Herstellung, biologisches Potenzial und In-vitro-Effekte. *Tierarztl Prax Großtiere*. 2011;39:373-83.
- Gittel C, Burk J, Horstmeier C, Brehm W. Assessment of pain scoring systems in horses following induced orthopaedic pain. *AVA Autumn Meeting; 2014 Aug 24-26; Wien, Österreich. Veterinary Anaesthesia and Analgesia; 2014. p. A39.*
- Glenn JD, Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World journal of stem cells*. 2014;6:526-39.
- 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.
- Grimm J, Kircher MF, Weissleder R. Cell Tracking. Prinzipien und Anwendungen. *Radiologe*. 2007;47:25-33.
- 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;40:178-81.
- 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;42:636-42.
- Hayes CW, Parellada JA. The magic angle effect in musculoskeletal MR imaging. *Top Magn Reson Imaging*. 1996;8:51-6.
- Ho JO, Sawadkar P, Mudera V. A review on the use of cell therapy in the treatment of tendon disease and injuries. *J Tissue Eng*. 2014;5:1-18 (doi: 0.1177/2041731414549678).
- Hofberger S, Gauff F, Licka T. Suspensory ligament degeneration associated with pituitary pars intermedia dysfunction in horses. *Vet J*. 2015;203:348-50.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7:393-5.

Literaturverzeichnis

- Hu X, Wang J, Chen J, Luo R, He A, Xie X, Li J. Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007;31:438-43.
- Jafari L, Vachon P, Beaudry F, Langelier E. Histopathological, biomechanical, and behavioral pain findings of Achilles tendinopathy using an animal model of overuse injury. *Physiol Rep.* 2015;3:e12265 (doi: 10.4814/phy2.).
- Johnston GM, Eastment JK, Wood JLN, Taylor PM. The confidential enquiry into perioperative equine fatalities (CEPEF): mortality results of Phases 1 and 2. *Vet Anaesth and Analg.* 2002;29:159-70.
- Jülke H, Veit C, Ribitsch I, Brehm W, Ludewig E, Delling U. Comparative Labeling of Equine and Ovine Multipotent Stromal Cells With Superparamagnetic Iron Oxide Particles for Magnetic Resonance Imaging In Vitro. *Cell Transplant.* 2015;24:1111-25.
- Kader D, Saxena A, Movin T, Maffulli N. Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management. *Br J Sports Med.* 2002;36:239-49.
- Karlin WM, Stewart AA, Durgam SS, Naughton JF, O'Dell-Anderson KJ, Stewart MC. Evaluation of experimentally induced injury to the superficial digital flexor tendon in horses by use of low-field magnetic resonance imaging and ultrasonography. *Am J Vet Res.* 2011;72:791-8.
- Kasashima Y, Kuwano A, Katayama Y, Taura Y, Yoshihara T. Magnetic resonance imaging application to live horse for diagnosis of tendinitis. *J Vet Med Sci.* 2002;64:577-82.
- Koch TG, Berg LC, Betts DH. Current and future regenerative medicine - principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can Vet J.* 2009;50:155-65.
- Kuo CK, Tuan RS. Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2008;14:1615-27.
- Lacitignola L, Staffieri F, Rossi G, Francioso E, Crovace A. Survival of bone marrow mesenchymal stem cells labelled with red fluorescent protein in an ovine model of collagenase-induced tendinitis. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2014;27:204-9.
- Law S, Chaudhuri S. Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges. *Am J Stem Cells.* 2013;2:22-38.
- Liu W, Frank JA. Detection and quantification of magnetically labeled cells by cellular MRI. *Eur J Radiol.* 2009;70:258-64.
- Lovati AB, Corradetti B, Cremonesi F, Bizzaro D, Consiglio AL. Tenogenic differentiation of equine mesenchymal progenitor cells under indirect co-culture. *Int J Artif Organs.* 2012;35:996-1005.
- Lui PP, Maffulli N, Rolf C, Smith RK. What are the validated animal models for tendinopathy? *Scand J Med Sci Sports.* 2011;21:3-17.
- Maffulli N, Khan KM, Puddu G. Overuse tendon conditions: time to change a confusing terminology. *Arthroscopy.* 1998;14:840-3.
- Maffulli N, Longo UG, Maffulli GD, Rabitti C, Khanna A, Denaro V. Marked pathological changes proximal and distal to the site of rupture in acute Achilles tendon ruptures. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19:680-7.

Literaturverzeichnis

- Mair TS, Kinns J, Jones RD, Bolas NM. Magnetic resonance imaging of the distal limb of the standing horse. *Equine Vet Educ.* 2005;17:74-8.
- Nitz WR, Runge VM, Schmeets SH, Faulkner WH, Desai NK. *Praxiskurs MRT: Anleitung zur MRT-Physik über klinische Bildbeispiele.* 1. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2007.
- 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;69:928-37.
- Paebst F, Piehler D, Brehm W, Heller S, Schroeck C, Tárnok A, Burk J. Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: an approach toward a standardized definition. *Cytometry A.* 2014;85:678-87.
- 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;16:2941-51.
- Patterson-Kane JC, Becker DL, Rich T. The pathogenesis of tendon microdamage in athletes: the horse as a natural model for basic cellular research. *J Comp Pathol.* 2012;147:227-47.
- Patterson-Kane JC, Firth EC. The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. *Vet J.* 2009;181:79-89.
- Patterson-Kane JC, Firth EC, Goodship AE, Parry DA. Age-related differences in collagen crimp patterns in the superficial digital flexor tendon core region of untrained horses. *Aust Vet J.* 1997a;75:39-44.
- Patterson-Kane JC, Wilson AM, Firth EC, Parry DA, Goodship AE. Comparison of collagen fibril populations in the superficial digital flexor tendons of exercised and nonexercised thoroughbreds. *Equine Vet J.* 1997b;29:121-5.
- Patterson-Kane JC, Wilson AM, Firth EC, Parry DA, Goodship AE. Exercise-related alterations in crimp morphology in the central regions of superficial digital flexor tendons from young thoroughbreds: a controlled study. *Equine Vet J.* 1998;30:61-4.
- Pawelczyk E, Arbab AS, Chaudhry A, Balakumaran A, Robey PG, Frank JA. In vitro model of bromodeoxyuridine or iron oxide nanoparticle uptake by activated macrophages from labeled stem cells: implications for cellular therapy. *Stem Cells.* 2008;26:1366-75.
- Pritchett LC, Ulibarri C, Roberts MC, Schneider RK, Sellon DC. Identification of potential physiological and behavioral indicators of postoperative pain in horses after exploratory celiotomy for colic. *Appl Anim Behav Sci.* 2003;80:31-43.
- Raabe O, Shell K, Fietz D, Freitag C, Ohrndorf A, Christ HJ, Wenisch S, Arnhold S. Tenogenic differentiation of equine adipose-tissue-derived stem cells under the influence of tensile strain, growth differentiation factors and various oxygen tensions. *Cell Tissue Res.* 2013;352:509-21.
- Raekallio M, Taylor PM, Bennett RC. Preliminary Investigations of Pain and Analgesia Assessment in Horses Administered Phenylbutazone or Placebo After Arthroscopic Surgery. *Vet Surg.* 1997;26:150-5.
- Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R. Stem cells in veterinary medicine--attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol.* 2007;25:409-16.

Literaturverzeichnis

- Riedelsheimer B. Färbungen. In: Mulisch M, Welsch U, Hrsg. Romeis - Mikroskopische Technik. 19. Aufl. Heidelberg: Springer Spektrum; 2015. p. 228.
- Riley G. Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4:82-9.
- Rogers WJ, Meyer CH, Kramer CM. Technology insight: in vivo cell tracking by use of MRI. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3:554-62.
- Scharf A, Holmes S, Thoresen M, Mumaw J, Stumpf A, Peroni J. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a means to track mesenchymal stem cells in a large animal model of tendon injury. *Contrast Media Mol Imaging*. 2015;10:388-97.
- Schramme M, Hunter S, Campbell N, Blikslager A, Smith R. A surgical tendonitis model in horses: Technique, clinical, ultrasonographic and histological characterisation. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2010a;23:231-9.
- Schramme M, Kerekes Z, Hunter S, Labens R. MR Imaging Features of Surgically Induced Core Lesions in the Equine Superficial Digital Flexor Tendon. *Vet Radiol Ultrasound*. 2010b;51:280-7.
- Smith R, McIlwraith W, Schweitzer R, Kadler K, Cook J, Caterson B, Dakin S, Heinegard D, Screen H, Stover S, Crevier-Denoix N, Clegg P, Collins M, Little C, Frisbie D, Kjaer M, van Weeren R, Werpy N, Denoix JM, Carr A, Goldberg A, Bramlage L, Smith M, Nixon A. Advances in the understanding of tendinopathies: a report on the Second Havemeyer Workshop on equine tendon disease. *Equine Vet J*. 2014;46:4-9.
- Smith RK, Birch H, Patterson-Kane J, Firth EC, Williams L, Cherdchutham W, van Weeren WR, Goodship AE. Should equine athletes commence training during skeletal development?: changes in tendon matrix associated with development, ageing, function and exercise. *Equine Vet J Suppl*. 1999;30:S201-9.
- Smith RK, Birch HL, Goodman S, Heinegård D, Goodship AE. The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration - hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2002;133:1039-50.
- 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.
- Smith RK, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J. Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *PloS one*. 2013;8:e75697 (doi: 10.1371/journal.pone.0075697).
- Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int*. 2013;2013:130763 (doi: 10.1155/2013/).
- Sole A, Spriet M, Galuppo LD, Padgett KA, Borjesson DL, Wisner ER, Brosnan RJ, Vidal MA. Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using (99m) Tc-HMPAO. *Equine Vet J*. 2012;44:594-9.

Literaturverzeichnis

- Sole A, Spriet M, Padgett KA, Vaughan B, Galuppo LD, Borjesson DL, Wisner ER, Vidal MA. Distribution and persistence of technetium-99 hexamethyl propylene amine oxime-labelled bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced tendon lesions after intratendinous injection and regional perfusion of the equine distal limb. *Equine Vet J.* 2013;45:726-31.
- Spriet M, Buerchler S, Trela JM, Hembrooke TA, Padgett KA, Rick MC, Vidal MA, Galuppo LD. Scintigraphic tracking of mesenchymal stem cells after intravenous regional limb perfusion and subcutaneous administration in the standing horse. *Vet Surg.* 2015;44:273-80.
- Stanek C. Tendinopathien. In: Dietz O, Litzke LF, Hrsg. Lehrbuch der allgemeinen Chirurgie für Tiermediziner. 6 Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2004. p. 223.
- Stewart MC, Stewart AA. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2011;27:243-61.
- Taylor SE, Smith RKW, Clegg PD. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J.* 2007;39:172-80.
- 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;42:174-80.
- Tipton TE, Ray CS, Hand DR. Superficial digital flexor tendonitis in cutting horses: 19 cases (2007-2011). *J Am Vet Med Assoc.* 2013;243:1162-5.
- Trela JM, Spriet M, Padgett KA, Galuppo LD, Vaughan B, Vidal MA. Scintigraphic comparison of intra-arterial injection and distal intravenous regional limb perfusion for administration of mesenchymal stem cells to the equine foot. *Equine Vet J.* 2014;46:479-83.
- Vallance SA, Vidal MA, Whitcomb MB, Murphy BG, Spriet M, Galuppo LD. Evaluation of a diode laser for use in induction of tendinopathy in the superficial digital flexor tendon of horses. *Am J Vet Res.* 2012;73:1435-44.
- van Loon JP, Jonckheer-Sheehy VS, Back W, van Weeren PR, Hellebrekers LJ. Monitoring equine visceral pain with a composite pain scale score and correlation with survival after emergency gastrointestinal surgery. *Vet J.* 2014;200:109-15.
- van Schie HT, Bakker EM, Cherdchutham W, Jonker AM, van de Lest CH, van Weeren PR. Monitoring of the repair process of surgically created lesions in equine superficial digital flexor tendons by use of computerized ultrasonography. *Am J Vet Res.* 2009;70:37-48.
- 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;36:613-22.
- 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;21:273-83.
- 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 biology.* 2009;10 (doi: 10.1186/1471-2121-10-29).

Literaturverzeichnis

- Wagels R. Die Biopsie der oberflächlichen und tiefen Beugesehne - Methodik und klinische Verlaufsuntersuchung [Dissertation med. vet.]. Hannover: TiHo Hannover; 2000.
- Wang L, Deng J, Wang J, Xiang B, Yang T, Gruwel M, Kashour T, Tomanek B, Summer R, Freed D, Jassal DS, Dai G, Glogowski M, Deslauriers R, Arora RC, Tian G. Superparamagnetic iron oxide does not affect the viability and function of adipose-derived stem cells, and superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging identifies viable cells. *Magn Reson Imaging*. 2009;27:108-19.
- Warden SJ. Animal models for the study of tendinopathy. *Br J Sports Med*. 2007;41:232-40.
- Watkins JP, Auer JA, Morgan SJ, Gay S. Healing of surgically created defects in the equine superficial digital flexor tendon: effects of pulsing electromagnetic field therapy on collagen-type transformation and tissue morphologic reorganization. *Am J Vet Res*. 1985;46:2097-103.
- Watts AE, Nixon AJ, Yeager AE, Mohammed HO. A collagenase gel/physical defect model for controlled induction of superficial digital flexor tendonitis. *Equine Vet J*. 2012;44:576-86.
- Webbon PM. A post mortem study of equine digital flexor tendons. *Equine Vet J*. 1977;9:61-7.
- Werpy NM, Ho CP, Kawcak CE. Magic Angle Effect in Normal Collateral Ligaments of the Distal Interphalangeal Joint in Horses Imaged with a High-Field Magnetic Resonance Imaging System. *Vet Radiol Ultrasound*. 2010;51:2-10.
- Williams IF, McCullagh KG, Goodship AE, Silver IA. Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. *Res Vet Sci*. 1984;36:326-38.
- Wilson AM, Goodship AE. Exercise-induced hyperthermia as a possible mechanism for tendon degeneration. *J Biomech*. 1994;27:899-905.
- Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, Yarmush ML. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant*. 2010;19:667-79.
- Yang Y, Zhang J, Qian Y, Dong S, Huang H, Boada FE, Fu FH, Wang JH. Superparamagnetic iron oxide is suitable to label tendon stem cells and track them in vivo with MR imaging. *Ann Biomed Eng*. 2013;41:2109-19.

10 Anhang

1. Vitalparameter

a) Herzfrequenz (Schläge/min):	0: ≤40	1: >40-56	2: >56
b) Atemfrequenz (Atemzüge/min):	0: ≤16	1: >16-36	2: >36
c) innere Körpertemperatur (in °C):	0: 37,0-38,0	1: 38,1-39,5/35,5-36,9	2: >39,5/<35,5

2. Allgemeinverhalten

- 0:** Tier steht und bewegt sich normal in der Box, nimmt an Umgebung teil
- 1:** Tier steht aber bewegt sich wenig in der Box, nimmt an Umgebung teil
- 2:** Tier nimmt wenig an Umgebung teil oder liegt vermehrt (>1/3 des Tages; Brustbauchlage), steht aber bei Ansprechen auf
- 4:** Tier apathisch oder liegt vermehrt (>2/3 des Tages in Brustbauchlage oder >1h in Seitenlage), steht aber bei Ansprechen auf
- 6:** Tier liegt, steht bei Ansprechen nicht auf, aber kann aufgetrieben werden
- 8:** Tier liegt fest und kann nicht aufgetrieben werden

3. Mauschleimhäute

- 0:** blassrosa, KFZ <2sec
- 1:** ggr.-mgr. gerötet oder blass, KFZ <2sec
- 2:** hgr. gerötet oder blass oder KFZ >2sec
- 4:** verwaschen oder KFZ >4sec

4. Belastung der Gliedmaßen

- 0:** normale Bewegung, keine vermehrte Pulsation der Mittelfußarterie
- 1:** ggr. ungleichmäßige Bewegung/ Wendeschmerz, keine vermehrte Pulsation der Mittelfußarterie
- 2:** mgr. ungleichmäßige Bewegung/ Wendeschmerz, keine vermehrte Pulsation der Mittelfußarterie
- 4:** läuft nur sehr unwillig oder lahmt hgr. oder vermehrte Pulsation der Mittelfußarterie

5. OP-Gebiet

a) Beurteilung von Druckempfindlichkeit unter Verband:

0: nein **1:** ggr. **2:** mgr. **3:** hgr.

b) Manipulation an Verband/ Gliedmaße (scheuern, aufstampfen):

0: nein **1:** ggr. **2:** mgr. **3:** hgr.

Bei hgr. Druckschmerz oder hgr. Manipulation am Verband: Verband entfernen und zusätzlich c) und d) beurteilen:

c) Schwellung (Erhabenheit in cm): **0:** <0,5 **1:** 0,5-2 **2:** >2

d) Sekretabfluss: **0:** nein **1:** serös **2:** mukös

Anlage 1 Parameter Pain Score (ggr. = geringgradig, mgr. = mittelgradig, hgr. = hochgradig)

Gesamt-Painscore <8 und Einzel-Scores <4 in allen Punkten (1.-5.):

- keine zusätzliche Analgesie/ Behandlung/ Diagnostik notwendig

Gesamt-Painscore ≥8:

- zusätzlich Gabe von 1,1 mg / kg KG Flunixin i.v./p.o.

Bei bestehender Abweichung des Gesamt-Painscores:

- es werden zusätzlich 0,02 mg / kg KG Butorphanol i.v. gegeben

Einzel-Scores ≥4: Einleitung der jeweilig entsprechenden Maßnahmen

- ad 1.-3.: Intensivmedizinische Betreuung und eingehende Untersuchung,; ggf. Blutuntersuchung, Behandlung mit Metamizol, Vitamin C, Infusionstherapie und weiteres Monitoring)

- ad 4.: Weitere Diagnostik und Therapie (eingehende Untersuchung, ggf. Röntgen der distalen Gliedmaße und Einleitung von Hufreheprophylaxe)

- ad 5.: Weitere Diagnostik und Therapie, ggf. Wundbehandlung und Antibiose

Painscore von 16 und fehlender Ansprechbarkeit auf wiederholte

Schmerzmittelapplikation und therapeutische Maßnahmen:

- spätestens nach 24 h wird das Tier schmerzlos durch eine befugte Person euthanasiert

Anlage 2 Weitere Vorgehensweise gemäß Pain Scoring

Anhang

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank 37 °C, 5 % CO ₂ , 90 % rH	BBD 6220 Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
Einbettautomat	Histokinette	Apparate Armin Lüdi, Bern, Schweiz
Hämazytometer	Neubauer-improved Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Kameramikroskop	IX51 Inverses Mikroskop	Olympus America Inc., Center Valley, Pennsylvania
Laser-Scanning-Mikroskop	LSM, TCS SP5	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop	Eclipse TE2000-S	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Pannoramic Scanner	Pannoramic Scan II	3DHISTECH Ltd., Budapest, Ungarn
Photometer	Tecan Safire	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Zellsortierer	FACS Aria III	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
<hr/>		
Software	Bezeichnung	Hersteller
Adobe Photoshop	Adobe Photoshop CS	Adobe Systems, München, Germany
FACSDiva	BD FACSDiva 6.1.3 Software	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
FlowJo Software	FlowJo V10.0.7	Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA
Leica Application Suite Advanced Fluorescence	Leica Application Suite Advanced Fluorescence 2.6.0	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mathematica	Mathematica 10.1	Wolfram Research, Inc., Champaign, IL, USA
Olympus Cell^A	Olympus Cell^A	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland
Pannoramic Viewer	Pannoramic Viewer 1.15.4	3DHISTECH Ltd., Budapest, Ungarn
SPSS	SPSS Statistics 22	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
Synedra Viewer	Synedra ViewPersonal, Version 3.4.0.2	Synedra Information Technologies GmbH, Innsbruck, Österreich
<hr/>		
Verbrauchsmaterialien	Bezeichnung	Hersteller
4-er Well Platte	6-er Well Platte	BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA
12-er Well Platte	12-er Well Platte	BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA
96-er Mikrotiterplatte	96-er Mikrotiterplatte	BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA

Anhang

FACS-Tubes	Röhre 5 ml, 75 x 12 mm, Polystyrol	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Objekttträger, verschiedene Farben	Superfrost, geschliffen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflasche	Tissue Culture Flask 12,5 cm ² , 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA
Zellkulturplatte	Tissue Culture Dish (10 cm)	Nalge Nunc International Corporation, Rochester, USA
Zellschaber	Zellschaber 24 cm	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

Chemikalien, Lösungen, Zusätze	Bezeichnung	Hersteller
3-IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine I5879	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Acid Fuchsin	Acid Fuchsin 84600	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Alzian-Blau	Alcian Blue 8GX Powder A5268	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ascorbat-2-P	L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate A8960	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Beads	BD CompBeads Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
Bouin'sche Lösung	Bouin's solution HT101128	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Collagenase (20 mg/ml)	Collagenase Typ I Pulver	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DAPI	DAPI	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dexamethason	Dexamethason D2915	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 1 g/l D-Glucose, L- Glutamin, Pyruvat	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM/HAM's F-12	DMEM/HAM's F-12 with L- Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Östereich
DMEM High Glucose	DMEM High Glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Östereich
EDTA 0,05 M	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eiweiß-Glycerin	Eiweiß-Glycerin	Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig, Deutschland
Essigsäure	Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Anhang

Ethanol 50%, 70%, 80%, 96%	Ethanol 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Färbe-Puffer → PBS	Phosphate Buffered Saline ohne Ca und Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
→ 3 % FBS	Fetales Bovines Serum Lot.Nr. 047K3395	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
→ 0,1 % Na-Azid	Natriumazid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fast Green	Fast Green FCF F7252	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fc-Block	Human TruStain FcX (Fc Receptor Blocking Solution)	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
FBS	Fetales Bovines Serum Lot.Nr. 047K3395	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fix & Perm	Fix & Perm Cell Fixation & Permeabilization Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Genta	Gentamicin (50 mg/ml)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
β-Glycerophosphat	β-Glycerophosphate disodium salt hydrate G9891	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution, 500 ml	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Indomethacin	Indomethacin I7378 [1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indoleacetic acid]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Insulin	Insuline from Bovine Pancreas I6634	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ITS+	ITS+ premix	BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA
Kaisers Glycerin-Gelatine	Kaisers Glycerin-Gelatine phenolfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaninchen Serum	Rabbit Serum R4505	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Lebend/Tot-Farbstoff	Fixable E-Fluor 780	eBioscience, Inc., San Diego, Kalifornien, USA
Leukozytenseparationsmedium	Ficoll-Paque™ PREMIUM, 1.077 g/ml	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Mayer's Hämatoxylin	Mayer's Hematoxylin S3309, Ready-to-use aqueous solution	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
NaOH 0,1 M	NaOH 0,1 M	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Anhang

Natriumthiosulfat	Sodium thiosulfate pentahydrate 217247	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Nuclear Fast Red	Nuclear Fast Red solution N3020	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Oil Red O Pulver	Oil Red O Pulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd 4 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Phosphate Buffered Saline ohne Ca und Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Pen/Strep	Penicillin (10.000 IE/ml) Streptomycin (10.000 µg/ml)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phosphor-Wolframsäure	Phosphotungstic acid hydrate P4006	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ponceau Xylidine	Ponceau Xylidine P2395	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Preußisch Blau	Prussian Blue Reagent Pack, MHS16	BioPhysics Assay Laboratory (BioPAL), Inc., Worcester, USA
Prolin	L-Proline	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pyrogallol	Pyrogallol P0381	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Roti Histokit	Roti Histokit	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotihistol	Rotihistol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Safranin O	Safranin O 84120	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Silbernitrat	Silver nitrate AgNO ₃ 209139	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
SPIO	Molday ION Rhodamine B	BioPhysics Assay Laboratory (BioPAL), Inc., Worcester, USA
TGF β1	TGF β1	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
Trypan Blau	Trypan Blue Stain (0,4 %)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Trypsin EDTA 0,5 %	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
VE-Wasser Weigert's Eisenhämatoxylin	VE-Wasser Weigert's iron hematoxylin solution HT1079	Aus der Leitung Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Xylol	Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG,

Anhang

Serum, hitzeinaktiviert		Karlsruhe, Deutschland
→ Maus	Mouse Serum M5905	Sigma-Aldrich Chemie
→ Ratte	Rat Serum R9759	GmbH, Steinheim,
→ Kaninchen	Rabbit Serum R4505	Deutschland
→ Ziege	Goat Serum G9023	

Anlage 3 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software, Chemikalien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur und die Probenanalyse

Anhang

Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Benzyloxyphenylpenicillin-Natrium	Penicillin G 10 Mega IE	InfectoPharm Arzneimittel und Consilium GmbH, Heppenheim, Deutschland
Biopsiestanze	Biopsy Punch	Kruuse, Langeskov, Dänemark
Braunoderm	Braunoderm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Butorphanol	Alvegesic (10 mg/ml)	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Dafilon 2/0 schneidende Nadel	Dafilon 2/0 schneidende Nadel	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Dafilon 3/0 schneidende Nadel	Dafilon 3/0 schneidende Nadel	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Detomidin	Domosedan (10 mg/ml)	Orion Pharma GmbH, Hamburg, Deutschland
Diazepam	Diazepam-Lipuro (5 mg/ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalskalpelle 11er, 15er, 22er	Einmalskalpelle 11er, 15er, 22er	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Ethanol 70%	Ethanol 70%	PKH GmbH, Halle, Deutschland
Fischölkapseln	Omega-3 Kapseln Plus Vitamin E	PRO DIMI PHARMA GmbH & Co. KG, Dortmund, Deutschland
Flexüle	Braunüle MT	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Flunixin-Meglumin	Flunidol RPS (50 mg/ml)	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Flunixin-Meglumin	Flunidol 5 % Applikator	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Gentamicin	Genta (100 mg/ml)	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Guaifenesin	Myolaxin 15%	Vétoquinol GmbH, Ravensburg, Deutschland
Isofluran	Isofluran CP	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Jodseife	Degraseptin	Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland
Jodspray	VET-SEPT Spray (50 mg/ml)	Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland
Ketamin	Ursotamin (100 mg/ml)	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Klebeflies	Fixomull stretch	BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Knochenmarkextraktionskanüle	Knochenmarkextraktionskanüle	Walter Veterinär-Instrumente e.K., Baruth/Mark, Deutschland

Anhang

Laufband	Sascotec Elite-Horsetrainer	Sascotec GmbH, Stavern, Deutschland
Lidocainhydrochlorid	Lidocainhydrochlorid 2 %	Bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland
Melolin	Melolin 10 x10 cm, 10 x 20 cm	Smith and Nephew GmbH, Hamburg, Deutschland
Monoplus 2/0 schneidende Nadel	Monoplus 2/0 schneidende Nadel	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natriumchloridlösung	NaCl 0,9 % Inf.-Lsg.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Niederfeld-MRT	Standing Equine MRI, EQ2	Hallmarq Veterinary Imaging, Guildford, UK
Omeprazol	Gastrogard	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Ringer	Ringer Spüllösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Romifidin	Sedivet (10 mg/ml)	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland
T61	T61	Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Ultraschallgerät	Ultraschallgerät GE LOGIQ 5 Expert; 10 MHz, Linearschallkopf	GE Healthcare, München, Deutschland
Venenverweilkatheter	Milacath	MILA International, Inc., Kentucky, USA
Vicryl Plus 2-0	Vicryl Plus 2-0, flache Rundkörperringnadel	Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland

Anlage 4 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Medikamente für den klinischen Teil der Studie

11 Danksagung

Für die Durchführung der Studie und Anfertigung dieser Dissertation habe ich die Hilfe und Unterstützung vieler Personen erhalten, denen ich auf diesem Wege für ihre Mühe ausdrücklich danken möchte.

Allen voran sei hier natürlich mein Doktorvater Prof. Dr. Walter Brehm erwähnt, der mir überhaupt erst die Durchführung der Studie ermöglicht hat und, trotz des oft sehr vollen Terminkalenders, immer ein offenes Ohr hatte.

Ganz besonders muss ich mich auch bei meiner Betreuerin Dr. Janina Burk-Luibl bedanken. Nicht nur, weil ihre Tür immer offen stand, um Probleme und Fachliches ausdauernd mit mir zu diskutieren, sondern weil sie sich selbst im Mutterschutz noch die Zeit genommen hat, um meine Arbeit gründlich gegenzulesen.

Unabdingbar bei den Arbeiten waren vor allem auch meine Kollegen aus dem Sächsischen Inkubator für klinische Translation und der Klinik für Pferde, die mir nicht nur mit fachlicher Unterstützung zur Seite standen. Ihr Beistand und ihre Freundschaft werden mich diese Zeit nie vergessen lassen und ich bin glücklich, Teil einer solchen Gruppe sein zu dürfen.

Hier gebührt Aline Hillmann großer Dank, die mich beim klinischen Teil der Studie und bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchungen unterstützt hat. Vielen Dank sage ich für ihre uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft, mir einen Teil ihres großen labortechnischen Wissens weiterzugeben.

Eine große Hilfe war Patrick Scheibe, der immer dann sofort eine Lösung hatte, wenn ich an die Grenzen meines technischen Wissens stieß. Er stand mir bei der Korrektur meiner Monographie zur Seite und seine Hinweise haben stets geholfen, meine Arbeit zu verbessern. Für sein zeitliches Engagement und die vielen Diskussionen möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Großer Dank gilt auch Dr. Annette Ahrberg für das Mitwirken bei der Induktion der Sehnenläsionen und den Biopsieentnahmen und Dr. Felicitas Päßt für die Durchführung durchflusszytometrischer Untersuchungen. Sehr zeitintensiv war die Sortierung der MRT-Aufnahmen, bei der mich Dr. Dagmar Berner unterstützt hat. Für ihre Zeit, die sie mir geopfert hat, und für die Beratung bei der Auswertung der magnetresonanztomographischen Aufnahmen gilt ihr besondere Anerkennung. Das Gleiche gilt für

Danksagung

Dr. Susanna Schubert, die sich um die Anfertigung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen gekümmert hat. Dr. Karsten Winter sei gedankt für die fachliche Beratung bei der magnetresonanztomographischen Bildanalyse sowie für die Digitalisierung der histologischen Schnitte. Eine große Hilfe war die Veterinär-Pathologie, die für mich die histologischen Präparate geschnitten und die Preußisch Blau-Färbung durchgeführt hat.

Unabdingbar waren all meine Freunde mit ihrer Ausdauer, Ruhe und Geduld, womit sie mir zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben. Insbesondere sei dort meine Kollegin Dr. Ina Erbe genannt, mit der man im wahrsten Sinne des Wortes Pferde stehlen kann. Das gilt auch für meine beste Freundin aus Schulzeiten, Annika Raddatz, auf deren Unterstützung und Zusammenhalt ich trotz der Entfernung und des Zeitmangels immer zählen konnte.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die immer und ausnahmslos für mich da war und die oft ihre eigenen Belange meinem Wohlergehen untergeordnet hat. Ich möchte meinem Bruder Jan Frederik und dessen Frau Nele danken, deren Unterstützung und Beistand mir immer sicher waren. Ganz besonders jedoch möchte ich meinen Eltern sagen, wie froh ich bin, dass sie immer an mich geglaubt haben, dass sie mich gestärkt haben, wenn ich eine starke Schulter brauchte, und dass sie mich getröstet haben, wenn ich Trost brauchte. Auf euren unermüdlichen Einsatz kann ich mich immer verlassen und dafür möchte ich euch von ganzem Herzen danken.