

Aus der Klinik für Pferde
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Optimierung der Transportbedingungen von mesenchymalen Stromazellen für die
klinisch-therapeutische Anwendung am Pferd**

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

eingereicht von
Miguel Angel Espina Medina
aus Curicó, Chile

Leipzig, 2018

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
Leipzig

Prof. Dr. Michael Röcken, Klinik für Pferde, Veterinärmedizinische Fakultät
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Verteidigung: 02.10.2018

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Der Ursprung mesenchymaler Stromazellen	2
2.2	Klassifizierung der MSC	3
2.3	Charakterisierung der MSC	4
2.4	Quellen von MSC	4
2.5	Ablauf der MSC-Therapie beim Pferd	4
2.6	Empfehlungen der EMA zur klinisch-therapeutischen Anwendung zellbasierter Therapien	6
2.7	Rechtliche Aspekte	7
2.8	Tetrazoliums Salze zur Bestimmung der Zellaktivität (WST-1-Reagenztest)	9
2.9	Zielstellung dieser Arbeit	10
2.10	Hypothese dieser Arbeit	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Versuchspferde	11
3.2	Allgemeine Schritte für die gesamte Studie	11
3.2.1	Knochenmarkentnahme beim Pferd	11
3.2.2	Blutentnahme beim Pferd	13
3.2.3	Probenverarbeitung und Zellkultur	13
3.2.4	Isolation der MSC	14
3.2.5	Bestimmung der Zellzahl	15
3.2.6	Expansion der MSC	16
3.2.7	Kryokonservierung	16
3.2.8	Auftauen der MSC	16
3.2.9	Bestimmung der Zellvitalität	17
3.2.10	Kumulative Populationsverdopplungen (kPV) der MSC	18
3.2.11	Differenzierungspotentiale der MSC	18
3.2.11.1	Differenzierung in Monolayer-Zellkultur für die adipogene und osteogene Linie .	19
3.2.11.1.1	Adipogene Differenzierung	19
3.2.11.1.2	Osteogene Differenzierung	22
3.2.11.2	Chondrogene Differenzierung (dreidimensionales Modell)	25
3.3	Studiendesign – allgemeine Darstellung	32
3.3.1	<u>Teil 1</u> : Untersuchung zur Ermittlung des optimalen Transportbehälters	33
3.3.1.1	Studiendesign zum ersten Teil der Studie	33
3.3.1.2	Zeit ₀ : Vorbereitung der Kontrolle	33

3.3.1.3	Zeit ₀ : Vorbereitung der Versuchsbedingungen nach 24 Stunden	34
3.3.1.4	Transportbehälter	34
3.3.1.5	Zeit ₁ : Auswertung der Transportbehälter nach 24 Stunden Inkubationszeit	35
3.3.2	<u>Teil 2</u> : Untersuchung zum optimalen Verhältnis von Medium-Temperatur-Zeit	36
3.3.2.1	Studiendesign zum zweiten Teil der Studie	36
3.3.2.2	Untersuchungsbedingungen	37
3.3.2.3	Auswertung der Kontrolle und der Konditionsbedingungen	37
3.3.3	<u>Teil 3</u> : Untersuchung zur optimalen Zellkonzentration	38
3.3.3.1	Studiendesign zum dritten Teil der Studie	38
3.3.3.2	Untersuchungsbedingungen	39
3.3.3.3	Auswertung der Kontrolle und der Konditionsbedingungen	39
3.4	Statistische Auswertung	40
4	Ergebnisse	41
4.1	<u>Teil 1</u> : Behälter	41
4.1.1	Evaluierung der Endvolumen pro Behälter	41
4.1.2	Evaluierung der Zellvitalität	42
4.1.2.1	Evaluierung der Zellvitalität durch Trypanblau-Färbung	42
4.1.2.2	Evaluierung der Zellvitalität durch WST-1-Reagenztest	43
4.1.3	Proliferationsverhalten der MSC	44
4.1.4	Evaluierung des Differenzierungspotentials der MSC	45
4.1.4.1	Adipogene Differenzierung	45
4.1.4.2	Osteogene Differenzierung	47
4.1.4.3	Chondrogene Differenzierung	49
4.2	<u>Teil 2</u> : Medium, Temperatur und Zeit	53
4.2.1	Evaluierung der Zellvitalität	53
4.2.1.1	Evaluierung der Zellvitalität durch Trypanblau-Färbung	53
4.2.1.2	Evaluierung der Zellvitalität durch WST-1-Reagenztest	54
4.2.2	Proliferationsverhalten der MSC	56
4.2.3	Evaluierung des Differenzierungspotentials der MSC	58
4.2.3.1	Adipogene Differenzierung	58
4.2.3.2	Osteogene Differenzierung	59
4.2.3.3	Chondrogene Differenzierung	61
4.3	<u>Teil 3</u> : Zellkonzentration	64
4.3.1	Evaluierung der Zellvitalität	64
4.3.1.1	Evaluierung der Zellvitalität durch Trypanblau-Färbung	64
4.3.1.2	Evaluierung der Zellvitalität durch WST-1-Reagenztest	65
4.3.2	Proliferationsverhalten der MSC	66
4.3.3	Evaluierung des Differenzierungspotentials der MSC	67

4.3.3.1	Adipogene Differenzierung	67
4.3.3.2	Osteogene Differenzierung	69
4.3.3.3	Chondrogene Differenzierung	71
5	Diskussion	74
5.1	Zielsetzung der geplanten Durchführung	74
5.2	Diskussion zum Material	75
5.3	Vorversuche	76
5.3.1	Inkubationsbedingungen	76
5.3.2	Sechster Behälter	76
5.3.3	WST-1-Reagenztest	77
5.3.4	Adipogene Differenzierung	77
5.3.5	Chondrogene Differenzierung	78
5.3.6	Kryokonservierungsmedium in der Pferdereproduktionsmedizin	79
5.3.7	Die Auswirkung von Druck auf die Zellmembran	80
5.4	Diskussion der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur	80
5.4.1	Diskussion des ersten Teils der Studie	80
5.4.2	Diskussion des zweiten Teils der Studie	82
5.4.3	Diskussion des dritten Teils der Studie	87
5.4.4	Schlussfolgerungen	87
6	Zusammenfassung	89
7	Summary	91
8	Literaturverzeichnis	93

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
d	Tag
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eMSC	equiner Mesenchymale Stromazellen
et al.	und andere (Mitarbeiter)
FBS	Fetales Bovines Serum
G	Gauge (Einheit für Kanülendurchmesser)
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
i.v.	intravenös

IE	Internationale Einheiten
inkl.	Inklusive
ISCT	International Society for Cellular Therapy
kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
kPV	kumulative Populationsverdopplung
L	Liter
M	Median
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
MHCII	Histokompatibilitätskomplex II
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
MNC	Mononukleäre Zellen
MSC	Mesenchymale Stromazellen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
P	Passage
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
pg	Pikogramm

s	Sekunde
Tab.	Tabelle
T°	Temperatur
TGF β	Transforming Growth Factor β
u.a.	und andere
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
v.a.	vor allem
x	Multiplikationszeichen, Mal
xg	Gravitationskonstante (9,81 m/s ²)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Regenerative Medizin und damit die Behandlungsmöglichkeiten verschiedenster beschädigter Gewebe haben in den letzten Jahren eine dynamische Entwicklung durchlaufen. So konnte z. B. die Anwendung zellbasierter Therapien immer mehr an Bedeutung gewinnen. Ein bestimmter Typ adulter mononukleärer Zellen (MNZ) – mesenchymale Stromazellen (MSC) – spielt dabei als therapeutische Unterstützung des körpereigenen Heilungsprozesses eine besondere Rolle. Die Behandlung vieler Störungen, Schädigungen oder Verletzungen, die noch vor wenigen Jahren aussichtslos schien, ist heute durch Verwendung von MSC erfolgversprechender.

In der Veterinärmedizin ist die MSC-Therapie inzwischen für viele Tierärzte eine gefragte therapeutische Möglichkeit, weshalb ihr klinischer Einsatz, insbesondere in der Pferdeorthopädie, stark zugenommen hat. Sportpferde sind Athleten, die durch ihre starke körperliche Belastung orthopädisch sehr anfällig sind. Eine Lahmheit aufgrund von Sehnen- und Gelenkerkrankungen ist daher eine häufige Ursache einer klinischen Konsultation bei Pferden (FUBINI et al, 1999; DYSON et al. 2003).

Im Allgemeinen setzt sich die Therapie aus folgenden Schritten zusammen: Beispielsweise nach der Entnahme einer Knochenmarkprobe werden die MSC des Pferdes im Labor isoliert, vermehrt und nach einer bestimmten Kulturdauer zur Behandlung des Patienten (z. B. per Injektion) versandt. Dabei stellt sich die Frage nach dem optimalen Schutz der Zellen bzw. der bestmöglichen Aufrechterhaltung der Zelleigenschaften und -vitalität während des Transports, um für die Behandlung eine optimale Qualität der Zellen zu erreichen.

Aus diesem Grund ist es notwendig, eine geeignete Evaluierung und Optimierung des Transports von MSC bis hin zur optimalen Freisetzung im Patienten garantieren zu können. In dieser Studie wurden die MSC verschiedenen experimentellen Transportbedingungen ausgesetzt, um den Einfluss der unterschiedlichen Behälter und der Umgebungsbedingungen wie Temperatur, Lager- und Transportdauer, Suspensionsmedium und Zellkonzentration auf die Eigenschaften der MSC evaluieren zu können.

2 Literaturübersicht

2.1 Der Ursprung mesenchymaler Stromazellen (MSC)

Mesenchymale Stromazellen (MSC) sind eine undifferenzierte Population von Zellen und können aus einem bilateral symmetrischen Tier vor oder nach abgeschlossener Embryonalentwicklung (vor oder nach der Geburt) isoliert werden. Die Zellen der ersten Entwicklungsphasen haben noch die gleiche Morphologie und Funktion, was sich während der Keimblattbildung jedoch ändert. Während der einsetzenden Differenzierung kommt es durch Induktion zur Herausbildung neuer Zellstrukturen und Eigenschaften. In welche Richtung die Entwicklung führt, ist determiniert. Die Grundlage für die Differenzierung besteht in der Fähigkeit, spezifische Enzymmuster und damit zellspezifische Proteine zu bilden. Dies steht in Zusammenhang mit der Aktivierung bzw. Blockierung bestimmter Gene (SCHNORR und KRESSIN 2011). Die Mesenchymbildung erfolgt nach der Entstehung der triploblastischen Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm) und geht sowohl vom Mesoderm als auch von der ektodermalen Prächordalplatte Mesentoderm aus. Der Begriff „Mesenchym“ darf nicht mit dem Begriff des mittleren Keimblattes des Embryoblasten „Mesoderm“ verwechselt werden (SCHNORR und KRESSIN 2011).

Fortsatzreiche mesenchymale Zellen und interzelluläre Flüssigkeit bilden das embryonale Bindegewebe. Das Mesenchym ist von besonderer Bedeutung für den Stofftransport des Keimlings und bewirkt die frühe Blut- und Gefäßbildung.

MSC wurden zum ersten Mal beim Menschen als fibroblastenartige Zellen, mit Plastikadhärenz und osteogener Differenzierungsfähigkeit aus dem Knochenmark beschrieben (FRIEDENSTEIN et al. 1968).

Es wird angenommen, dass im Falle einer Gewebeschädigung nach der Geburt MSC zur Initiierung der Regeneration aus den perivaskulären Nischen kleiner Gefäße über den Blutkreislauf mobilisiert werden können (CRISAN et al. 2008, FEKETE et al. 2012). Aus dem Mesenchym gehen ferner die Binde- und Stützsubstanzen des Bewegungsapparates hervor. MSC charakterisieren sich im Vergleich zu totipotenten und pluripotenten Stammzellen durch eine eingeschränkte Differenzierungsfähigkeit und sind als Zellen mit Multipotenz eingeordnet, d.h. sie können sich zu chondrogenen, osteogenen, myogenen, adipogenen und tenogenen Zelllinien differenzieren, die embryologisch alle dem Mesoderm zuzuordnen sind (GEBUREK und STADLER 2011). Früh entstandene differenzierte Zellgruppen oder Organe können sich auf die Bildung weiterer Organe induktiv auswirken (SCHNORR und KRESSIN 2011).

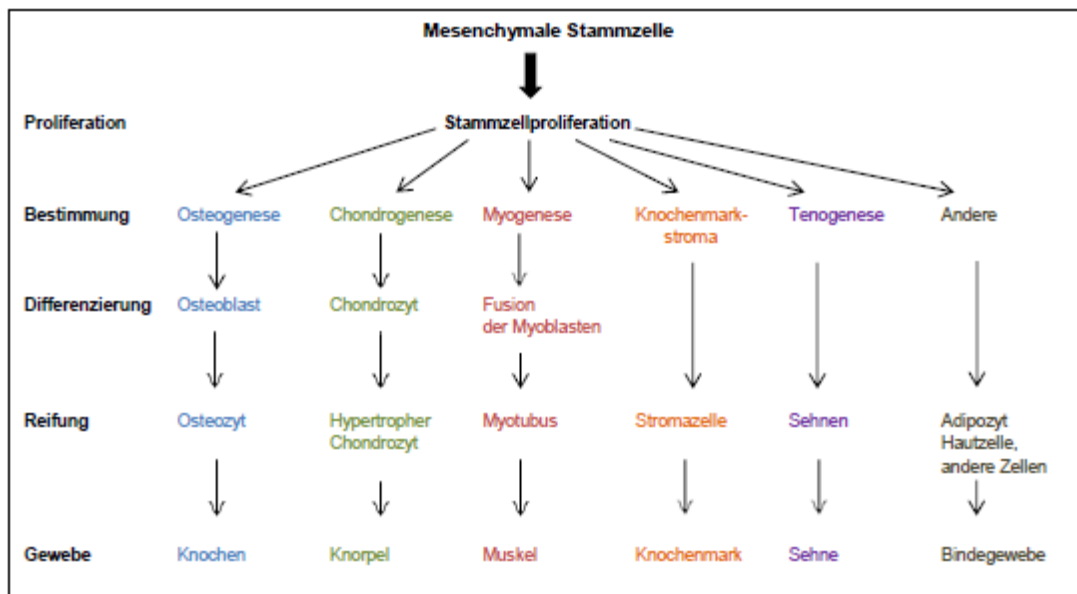


Abb. 1: Allgemeine Darstellung des mesenchymalen Differenzierungsprozesses. Es ist wichtig zu beachten, dass dieses Schema nur einzelne Linienwege ohne Bewegung der Zellen zwischen diesen Differenzierungswegen darstellt, was als „Plastizität“ der MSC bezeichnet ist. Modifiziert nach CAPLAN et al. 2001 und BURK et al. 2011.

2.2 Klassifizierung der MSC

In Studien mit derselben Zellpopulation, in denen unter dem Begriff „MSC“ verschiedene Zellgruppen bezeichnet wurden, kann es aufgrund von Verwechslungen zu irreführenden Angaben hinsichtlich der Zelleigenschaften und -aktivitäten kommen. Häufig werden die Bezeichnungen „mesenchymale Stammzellen“, „mesenchymale Stromazellen“ oder einfach „Stammzellen“ synonym verwendet (HORWITZ et al. 2005). Zur Klärung der MSC-Nomenklatur gab es erst im Jahr 2005 eine offizielle Stellungnahme der International Society for Cellular Therapy (ISCT). Zellen, die innerhalb der Kultur eine fibroblastische Morphologie und eine Plastikadhärenz aufweisen, sollen als „multipotente mesenchymale Stromazellen“ bezeichnet werden, egal aus welchem Gewebe sie isoliert wurden, während der Begriff „mesenchymale Stammzellen“ nur für Zellen verwendet werden soll, die bestimmte Kriterien wie das der Differenzierungsfähigkeit erfüllen. Das weltweit verwendete Akronym „MSC“ darf für beide Zellpopulationen verwendet werden (wie es inzwischen auch geläufig ist), allerdings soll genau angegeben werden, aus welcher Zellpopulation die MSC isoliert wurden (HORWITZ et al. 2005).

Für die praktische Anwendung in der Pferdemedizin wird derzeit am häufigsten der Begriff „Stammzellen“ verwendet (BURK et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wird das Akronym „MSC“ für multipotente mesenchymale Stromazellen verwendet.

2.3 Charakterisierung der MSC

In den Eingaben der zweiten Stellungnahme der ISCT (DOMINICI et al. 2006) werden folgende Charakteristika der MSC festgelegt: Plastikadhärenz in Zellkulturflaschen unter Standardkulturbedingungen, Selbstreplikation, tripotente mesenchymale Differenzierungsfähigkeit in drei Richtungen (adipogen, chondrogen und osteogen) und Expression der Zellmarker über 95 % der Cluster of Differentiation (CD): CD 73, CD 90 und CD 105 sowie ≤ 2 % der Zellmarker CD 14 oder 11b, CD 34, CD 45, CD 79 oder CD 19 und Histokompatibilitätskomplex II (MHCII). Es ist wichtig zu beachten, dass die Kreuzreaktivität zwischen Pferde-MSC und humanen Antikörpern, die von der ISCT beschrieben wird, nicht immer vollständig kompatibel ist (SCHAUWER et al. 2012).

2.4 Quellen von MSC

Ursprünglich können MSC von adulten Tieren aus unterschiedlichen mesenchymalen Geweben isoliert werden, wie z. B. Fettgewebe (ZUK et al. 2004), Synovialmembran (DE BARI et al. 2003), Synovialflüssigkeit (JONES et al. 2004), peripherem Blut (KUZNETSOV et al. 2001), Nabelschnurblut (KÖGLER et al. 2004), Nabelschnurmatrix (WANG et al. 2004) und Sehngewebe (SALINGCARNBORIBOON et al. 2003).

Die am häufigsten genutzte Quelle für MSC in 218 klinischen Studien stellt mit 56 % das Knochenmark (KM) dar, gefolgt von Nabelschnurblut mit 17 % und Fettgewebe mit 12 % (SHARMA et al. 2014). Die meist genutzte KM-Punktionsstelle beim Pferd ist das Sternum, welches im Vergleich zum Hüfthöcker (*Tuber coxae*) eine höhere Konzentration von MSC bereithält (DELLING et al. 2012). Trotzdem ist der Anteil von MSC an der Gesamtheit der MNZ gering im Vergleich zum Fettgewebe. Etwa 2 % der MNZ des Fettgewebes sind MSC (DAHLGREN 2009), wohingegen dieser Wert beim Pferdeknochenmark nur zwischen 0,001 bis 0,01 % liegt (PITTINGER et al. 1999). Es ist auch bekannt, dass die Anzahl von MSC mit zunehmendem Alter sinkt (CAPLAN 2007).

2.5 Ablauf der MSC-Therapie beim Pferd

Der Zyklus der MSC-Therapie läuft wie folgt: Eine Knochenmarksprobe wird entnommen und zum Labor geschickt. Dort wird die Fraktion der MNZ isoliert (buffy coat) und in einer Zellkulturflasche ausgesät. Aufgrund der Plastikadhärenz-Charakteristika der MSC, welche sich in der Regel innerhalb von 24 Stunden auf dem Boden der Zellkulturflasche absetzen, können die adhärenen Zellen aus der gesamten Zellpopulation der MNZ-Fraktion durch den Prozess des Waschens der Kulturflaschen getrennt werden (nicht adhärenen Zellen werden verworfen). Die verbleibenden adhärenen Zellen werden weiter in der Zellkulturflasche

kultiviert und vermehrt (Proliferationsfähigkeit der MSC). Wenn die Zellen in der Zellkulturflasche eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht haben, werden sie von der Flasche getrennt und in weiteren Flaschen ausgesät (Passagieren der Zellen), um eine höhere Anzahl von Zellen zu erreichen. Nach einer bestimmten Kulturdauer (in der Regel 2 bis 4 Wochen) bzw. wenn die gewünschte Anzahl von MSC erreicht wurde, werden diese in der Regel undifferenziert zur weiteren Behandlung des Patienten (meist durch Injektion) zurückgeschickt. Wenn die Proliferationsfähigkeit der MSC optimal ist, kann ein Teil für eine spätere Behandlung durch Kryokonservierung gelagert werden. Das Einfrieren von MSC ist von großem Vorteil, da der Zyklus der MSC-Therapie drastisch verkürzt wird und somit eine schnellere Fortsetzung der Therapie möglich ist. MSC können zur Behandlung von demselben Pferdes (autolog), von einem anderen Pferd (allogen) oder von einer anderen Tierart (xenogen) verwendet werden (PIGGOT et al. 2013).

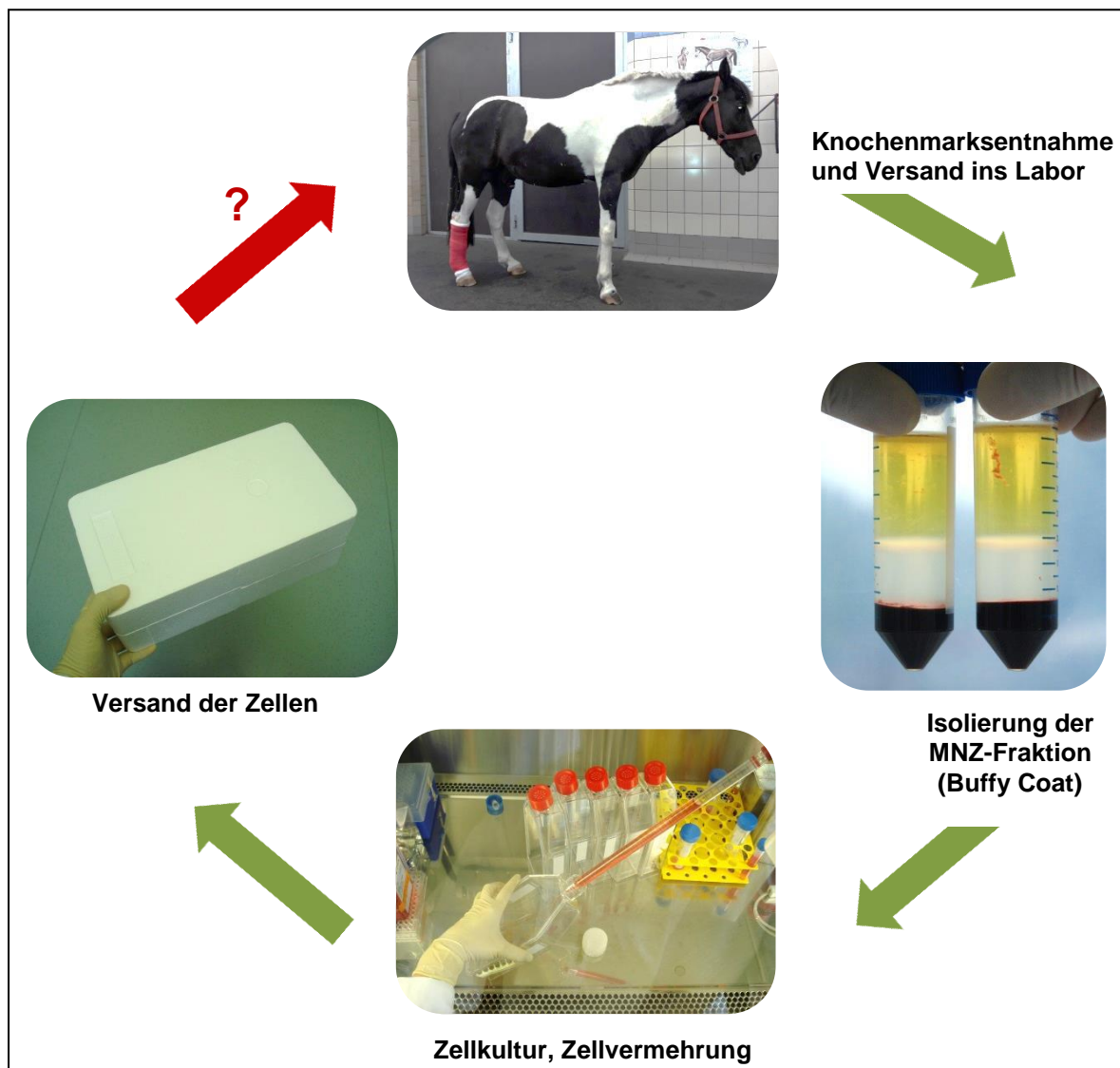


Abb. 2: Allgemeiner Zyklus der autologen MSC-Therapie beim Pferd.

2.6 Empfehlungen der EMA zur klinisch-therapeutischen Anwendung zellbasierter Therapien

Der effektive Dosierungsbereich einer Stammzelltherapie sollte, sofern es im jeweiligen Fall keine begründeten Gegenargumente gibt, mittels Dosierungsstudien etabliert werden.

Ebenso sollte eine sichere und effektive Behandlungsmethode gefunden und dabei wenn möglich auch eine effektive Mindestdosierung festgelegt werden.

Wenn eine systematische Prüfung der korrekten Dosierung nicht möglich ist wie z. B. in Fällen, die eine direkte Verabreichung in das betroffene Gewebe verlangen (z. B. Zentrales Nervensystem und Myokardium), ist es probat, eine klinische Studie beim Menschen mit einer Dosis zu beginnen, die eine therapeutische Wirkung haben könnte, solange die Sicherheit auf der Grundlage der verfügbaren nichtklinischen Nachweise gerechtfertigt ist. Sowohl beim Mensch als auch beim Pferd gibt es in der Literatur bis jetzt keine klare Aussage über die optimale Anzahl von MSC zur therapeutischen Behandlung. Studien beim Menschen beschrieben MSC-Dosierungen (pro Kilogramm Körpermaße), welche zwischen $0,5 \times 10^6$ bis 8×10^6 MSC/kg liegen (LE BLANC et al. 2004, ZHOU et al. 2010, PÉREZ-SIMON et al. 2011, PRASAD et al. 2011, BARON et al. 2010, MÜLLER et al. 2008, KOÇ et al. 2000). Die Applikation der MSC erfolgt bei orthopädischen Indikationen lokal (BURK et al. 2011). Bei der ersten beschriebenen MSC-Behandlung beim Pferd wurden insgesamt $6,4 \times 10^5$ MSC in einem Sehnenschaden verteilt (SMITH et al. 2003). Weitere Studien zeigen je nach Größe des Sehnenschadens MSC-Dosierungen von 10 bis 50×10^6 MSC (RICHARDSON et al. 2007, PIGGOT et al. 2013, FORTIER et al. 2011). Bei Habronemiasis beim Pferd wurden zum Zweck einer Immunomodulationswirkung 10×10^6 MSC intravenös (i. v.) verwendet (ESTRADA et al. 2008).

Die Qualität der MSC hat direkten Einfluss auf den Erfolg der Therapie. Das „Reflection paper on stem cell-based medical products“ (2011) der EMA beschreibt folgende Schwerpunkte, die den Begriff der Qualität für zellbasierte Therapie definieren:

- Identität (Identity):

Die Identität der MSC definiert sich über die Selbstreplikationsfähigkeit bzw. Proliferationsfähigkeit und die Expression verschiedener Oberflächenmarker. Das Ausgangsmaterial (z. B. Knochenmark, Fettgewebe, Nabelschnurgewebe) besteht häufig aus einem Gemisch verschiedener Zellpopulationen und die Art der Verarbeitung dieser Proben kann die gewünschte Endpopulation der Zellen drastisch beeinflussen. Deshalb ist es sehr wichtig, dass die Identität einer Endpopulation von Zellen zu therapeutischen Zwecken auf ihre Identität geprüft wird. Durch die Identifizierung der Oberflächenmarker können Zelltyp, Pluripotenz,

Abstammungslinie, Funktionalität und Enddifferenzierungsgrad der Zellen zur Festlegung der Identität der Zellen verwendet werden.

- Reinheit (Purity):

Dieser Begriff bezieht sich auf die Minimierung nicht zellartiger Fremdmaterialien, die in bestimmten Fällen den Erfolg einer Therapie negativ beeinflussen können.

- Potenz (Potency):

Die Potenz eines Zellproduktes kann u. a. in Abhängigkeit der Expression von Substanzen, Proteinen, Differenzierungsfähigkeit und seinen Immuncharakteristika identifiziert werden. Das bedeutet, dass der Differenzierungsstatus eines Zellproduktes als Grundlage für die Fähigkeit einer Zelltherapie extrapoliert werden kann, um seine therapeutische Fähigkeit festlegen zu können. Dafür sollten die am besten geeigneten Tests durchgeführt werden. In-vivo-Studien können auch als Grundlage von Zellmigration und Aktivität der Zellen benutzt werden.

- Tumorigenität und Genstabilität (Tumourigenicity and genomic stability):

Da sowohl bei somatischen Zellen als auch bei undifferenzierten Zellen das Risiko der Entstehung von Neoplasien besteht, sollte die genomische Stabilität während der Herstellung eines Zellproduktes (wie z. B. während des Anlegens der Zellkultur und/oder des Transports) geprüft werden. Hierfür sind bestimmte Laborverfahren und Charakteristika wie z. B. zyto genetische Analyse, Telomeraseaktivität, Proliferationsfähigkeit und Seneszenz relevant.

2.7 Rechtliche Aspekte

Der Einsatz von MSC im klinischen Alltag benötigt strikte Kontrolle, doch leider begann in Deutschland, anderen Ländern Europas und der Welt der kommerzielle Versand von MSC, ohne dass im Vorfeld der Einfluss verschiedener Lager- und Transportmethoden auf die Qualität der MSC wissenschaftlich untersucht wurde. Hinsichtlich straf- und arbeitsrechtlicher Fallstricke beim Umgang mit MSC im veterinärmedizinischen Bereich, erschien im Oktober 2015 die erste Publikation zur Klärung der arzneimittelrechtlichen Einordnung (FALTUS et al. 2015).

Bei der Nutzung von Stammzellen gibt es verschiedene Ansichten hinsichtlich ihrer rechtlichen Einordnung. Im Sinne des Arzneimittelgesetzes (AMG) sind zellbasierte Tiertherapeutika als vollwertige Arzneimittel zu behandeln und die Herstellung eines (stamm-) zellbasierten Therapieproduktes für den Veterinärbereich ist daher nach

§ 13 Abs. 1 AMG grundsätzlich genehmigungspflichtig. Allerdings ist das Tierarzneimittelrecht nicht in der Lage, die Gruppe der zellbasierten Tiertherapeutika entsprechend ihrer Verbreitung und Bedeutung ausreichend zu regulieren (FALTUS et al. 2015).

Die Leitlinien hinsichtlich Gewinnung, Lagerung, Transport und Verabreichung von Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich sind in Deutschland durch das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit geregelt (BVL). Diese Behörde ist auch für die Zulassung von zellbasierten Tierarzneimittel gemäß § 77 Abs. 3 AMG zuständig. Hinsichtlich der Behandlung von Pferden eröffnen FALTUS et al. (2015), dass Stammzellen auf Basis der Verordnung (EG) Nr. 470/2009 des Europäischen Parlaments eingestuft werden, die ebenso für lebensmittelliefernde Equiden gilt, weshalb Pferdestammzellen, gleichgültig ob autolog, allogon oder xenogen, ohne weitere Einschränkungen angewendet werden können. Bei der Durchführung der vorliegenden Studie wurden die Richtlinien der FDA und EMA berücksichtigt, jedoch sind diese nur Empfehlungen und gelten nicht als offiziell verpflichtende Regelung.

In der vorliegenden Studie wurden alle geplanten Forschungsziele erreicht, allerdings konnten aufgrund des Studiendesigns nicht alle bei der EMA und FDA definierten qualitativen Aspekte der MSC umfassend evaluiert werden. Da es zu einer Verminderung der Zellvitalität als Folge einer Erhöhung des Detritus kam, war der Faktor „Reinheit“ direkt beeinträchtigt. Leider gibt es noch keine sichere Methode der effektiven Dosierung von MSC, weshalb sich schwer sagen lässt, wo die untere Grenze einer effektiven „Reinheits-MS- Behandlung“ liegt. Eine Veränderung des „Reinheit“-Faktors könnte den Erfolg der Therapie beeinflussen, entsprechende Studien fehlen jedoch.

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene, dem Markt für Tierärzte zugängliche Modelle und Materialien als Behälter evaluiert. Im Teil 1 der Studie konnten die Vorteile eines Spritzenmodells gezeigt werden, nicht zuletzt, da das Spritzen die am häufigsten verwendete Methode zur MSC-Applikation beim Pferd darstellt und die MSC daher in einer Spritze sofort anwendungsbereit sind. Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass alle evaluierten Spritzenmodelle vom Hersteller auf der Innenseite mit Silikonöl beschichtet wurden und es bis jetzt keine Studie gibt, die sich mit dem Einfluss von Silikonöl auf MSC während des Transports beschäftigt hätte. Proteinaggregation und Partikelbildung in Fertigspritzen aus Glas ist jedoch ein der pharmazeutischen Industrie bekannter Effekt (JONES et al. 2005, GERHARDT et al. 2014). Es sind noch viele Fragen zu klären, um eine optimale Qualität der MSC bei der Lieferung gewährleisten zu können. Es sollten daher noch weitere Forschungsschritte wie z. B. eine Charakterisierung der MSC und eine molekulare Evaluierung des Genmaterials, beispielsweise durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nach dem Transport, einbezogen werden.

2.8 Tetrazoliumsalze zur Bestimmung der Zellaktivität (WST-1-Reagenztest)

In der Literatur werden die Begriffe zur Messung der „Zellaktivität“ und/oder „Zellvitalität“ (beide mithilfe von Tetrazoliumsalzen) häufig synonym verwendet (BERRIDGE et al. 1996, NGAMWONGSATIT et al. 2008, PESKIN et al. 2000, TAN et al. 2000).

Die Bestimmung der Zellvitalität mit Tetrazoliumsalzen misst die Aktivität der mitochondrialen und zytosolischen Dehydrogenasen lebender Zellen unabhängig davon, ob sie zu diesem Zeitpunkt DNA synthetisieren (LINDL und GSTRANTHALER 2008).

Die gebrauchsfertige Lösung WST-1 dringt in die Zellen ein, ein Tetrazoliumring wird sowohl durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System im Zytosol als auch von aktiven Mitochondrien aufgebrochen und die Neubildung der gelben Substanz Formazan entsteht. Das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System ist Teil der mitochondrialen Atmungskette und damit nur in vitalen Zellen aktiv. Durch dieses Prinzip der Neubildung von Formazan wurde die metabolische Aktivität der Zellen durch Photometrie gemessen. Diese Werte korrelieren direkt mit der Menge an aktiven bzw. vitalen Zellen (LINDL und GSTRANTHALER 2008).

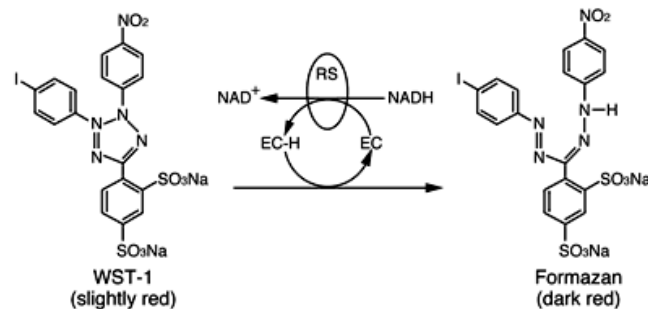


Abb. 3: Spaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat) zu Formazan. EC = electron coupling reagent, RS = mitochondrial succinate-tetrazolium reductase-system (Figur entnommen aus dem bei dieser Studie verwendeten Tetrazolium-Kit „Cell Proliferation Reagent WST-1“ Prospekt, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD).

2.9 Zielstellung dieser Arbeit

Allgemeines Ziel:

In erster Linie sollen die Transportbedingungen von MSC für die klinisch-therapeutische Anwendung am Pferd optimiert werden. Ziel ist dabei ist, die optimale Bedingung zu identifizieren, durch die die MSC ohne Einfluss auf ihre Vitalität, biologischen Eigenschaften und Qualität zum Patienten transportiert werden zu können.

Spezifische Ziele:

- Teil 1: Identifikation eines optimalen Transportbehälters für den Versand von MSC.
- Teil 2: Identifikation der optimalen Beziehung zwischen verschiedenen Transportmedien der MSC, der Transportdauer und der Transporttemperatur (positiver und negativer Temperaturbereich).
- Teil 3: Definition der optimalen Zellkonzentration für den Transport und die klinische Anwendung.

2.10 Hypothese dieser Arbeit

H₀: Die Vitalität und die Eigenschaften der MSC werden durch die verschiedenen evaluierten Transportbedingungen dieser Studie nicht beeinflusst. Das heißt, der Transport der MSC kann nicht optimiert werden.

H₁: Die Vitalität und die Eigenschaften der MSC werden durch die verschiedenen evaluierten Transportbedingungen dieser Studie beeinflusst. Das heißt, der Transport der MSC kann optimiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchspferde

Für jeden Teil der Studie wurden jeweils sechs gesunde, adulte Wallache der Rasse Warmblut (Deutsches Reitpferd) herangezogen. Zum Zeitpunkt der Probeentnahme waren alle Pferde zwischen 15 und 16 Jahre alt und hatten ein Körpergewicht zwischen 500 und 550 kg.

Zum Zeitpunkt der Probeentnahme waren alle Pferde im Besitz der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig (Lehr- und Versuchsgut Oberholz).

Die Bearbeitung der Proben bzw. die Zellisolierung, Zellkultur, Lagerung und In-vitro-Studie wurden im Labor des Translationszentrums für Regenerative Medizin (TRM) der Universität Leipzig durchgeführt.

Das Knochenmark der Pferde für Teil 1 und Teil 3 dieser Studie wurde gleichzeitig entnommen und nach der Bearbeitung im Labor (Isolierung und Zellkultur) für eine spätere Verwendung bei -150 °C gelagert. Die Proben der Pferde für den zweiten Teil des Versuches wurden direkt (d. h. ohne Kryokonservierung) verwendet. Die Zuordnung der Pferde in die drei verschiedenen Gruppen erfolgte randomisiert.

Die Studie erfolgte nach ethischen Richtlinien im Rahmen eines Tierversuches und wurde bei der Landesdirektion Leipzig gemeldet:

Aktenzeichen: V 12/09

Kurzbezeichnung: Bestimmung Transportbehälter

Bezeichnung des Versuchsvorhabens: „Gewinnung von Knochenmark zur Bestimmung eines Transportbehälters zum Transport von mesenchymalen Stammzellen“

3.2 Allgemeine Schritte für die gesamte Studie

3.2.1 Knochenmarkentnahme beim Pferd

Für die Entnahme von Knochenmark (KM) beim Pferd sind in der Literatur unterschiedliche Protokolle und Punktionsstellen beschrieben, benutzt wurde ein modifiziertes Protokoll von SELTON et al. (2006) und KASASHIMA et al. (2010). Die verwendeten Materialien dieses Verfahrens sind in folgender Tabelle aufgeführt, folgend schließt sich die genaue Beschreibung der KM-Entnahme an.

Tab. 1: Materialien für die Knochenmarkentnahme beim Pferd.

	Bezeichnung, Produkt	Hersteller
<i>Chemikalien und Medikamente</i>	Butorphanol, Torbugesic	<i>Fort Dodge</i> , Würselen, BRD
	Detomidin, Detogesic	<i>Fort Dodge</i> , Würselen, BRD
	Ethanol 70 %	<i>PKH</i> , Halle, BRD
	Flunixin-Meglumine, Meflosyl	<i>Fort Dodge</i> , Würselen, BRD
	Glutaraldehyd, Helipur®	<i>B. Braun</i> , Melsungen, BRD
	Heparin, Heparin-Natrium Braun	<i>B. Braun</i> , Melsungen, BRD
	Iodalkohol, Braunoderm®	<i>B. Braun</i> , Melsungen, BRD
	Jod-Pulverspray, Jod-PVP-Spray	<i>Albrecht</i> , Aulendorf, BRD
	Jodseife, Braunosan Vet®	<i>B. Braun</i> , Tuttlingen, BRD
	Ketamin, Ursotamin®	<i>Serumwerk Bernburg</i> , Bernburg, BRD
	Lidocainhydrochlorid 2 %	<i>Bela-pharm</i> , Vechta, BRD
	Phenylbutazon, Phenylbutazon-Gel PH	<i>cp-pharma</i> , Burgdorf, BRD
	<i>Verbrauchsgegenstände</i>	Einmalskalpell (Nr. 15)
Einwegspritzen, LUER Norm-Ject		<i>Henke, Sass, Wolf</i> , Tuttlingen, BRD
Flexüle (14 G), Braunüle MT Luer Lock		<i>B. Braun</i> , Melsungen, BRD
Einmalhandschuhe (steril), Vasco® OP Sensitive		<i>B. Braun</i> , Melsungen, BRD
Einmalhandschuhe (unsteril) Gentle Skin		<i>Meditrade</i> , Kiefersfelden, BRD
Einmalkanülen (18 G, 20 G, 23 G), Neolus®		<i>Terumo</i> , Leuven, Belgien
Jamshidi-Nadel (J.-Nadel bzw. Knochenmark-Punktionskanüle, 11 G)		<i>Angiotech</i> , Gainesville, USA
Mullkompressen (steril und unsteril)		<i>NOBA Verbandmittel</i> , Wetter, BRD
<i>Geräte</i>	Schermaschine	<i>Oster</i> , McMinnville, USA
	Ultraschallgerät, Logiq 5 Expert	<i>GE Healthcare</i> , München, BRD

Die KM-Entnahme erfolgte am stehenden, sedierten Pferd aus dem Sternum. Nach Sedierung mit Detomidin (0,01 mg/kg i. v.) und analgetischer Prämedikation mit Butorphanol (0,02 mg/kg i. v.) wurde das Gebiet um die Punktionsstelle geschoren. Mittels Ultraschall wurde die korrekte Punktionsstelle zwischen dem vierten und fünften Sternalsegment aufgesucht und die darüberliegende Haut aseptisch vorbereitet. Zur Lokalanästhesie wurde ein 5 ml Lidocain-Depot direkt am Periost des vierten oder fünften Sternalsegments sowie entlang des Stichkanals bis zur Unterhaut appliziert. Die Haut über der Punktionsstelle wurde mit einem Skalpell (Nr. 15) etwa 5 mm lang inzidiert. Die Jamshidi-Nadel bzw. KM-Punktionskanüle wurde ventral in die Inzision eingeführt, die darunterliegende Muskulatur

senkrecht zum Hautniveau durchstoßen und die Spitze der Jamshidi-Nadel auf dem zu punktierenden Sternalsegment aufgesetzt. Unter vorsichtigen Drehbewegungen wurde die Jamshidi-Nadel weitere 2 cm tief in die Markhöhle des Sternalsegments geführt. Zunächst wurde der Mandrin der Jamshidi-Nadel entfernt und eine heparinisierte 20 ml-Spritze (mit 10 000 IE Heparin) aufgesetzt. Der korrekte Sitz der Jamshidi-Nadel wurde mittels Aspiration überprüft. Daraufhin wurden je 20 ml KM pro Spritze aspiriert. Pro Pferd wurden insgesamt circa 40 ml KM aus ein bis zwei Sternalsegmenten aspiriert.

Im Anschluss wurde die Punktionsstelle mit Jod-Pulverspray versorgt. Dem Pferd wurde einmalig entweder Phenylbutazon (4,5 mg/kg oral) oder Flunixin-Meglumine i. v. (0,8 mg/kg i. v.) zur Analgesie verabreicht.

Die KM-Proben wurden umgehend gekennzeichnet und innerhalb von vier Stunden in sterilen verschlossenen Entnahmespritzen bei Raumtemperatur für die weitere Bearbeitung zum Labor transportiert.

3.2.2 Blutentnahme beim Pferd

Die Blutentnahme wurde für die Pferde der zweiten und dritten Gruppe zeitgleich mit der KM-Entnahme durchgeführt. Dafür wurde die Haut auf der linken Halsseite im Bereich des Übergangs zwischen dem oberen und mittleren Drittel der linken Jugularvene gereinigt und desinfiziert. Eine 18 G-Nadel wurde in die Vene eingeführt und das Blut anschließend mithilfe einer heparinisierten 20 ml-Spritze (mit 10 000 IE Heparin) gewonnen. Die Herstellung der Heparin-Konzentration bei den Blutproben erfolgte auf die gleiche Weise wie bei den KM-Proben, auch die Transportbedingungen zum Labor waren dieselben wie die unter 2.1 aufgeführten.

3.2.3 Probenverarbeitung und Zellkultur

Die Bearbeitung der Proben und die meisten Schritte dieser Studie wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank Klasse 2 durchgeführt (WHO Laboratory Biosafety Manual, 2004.)

Die Materialien für das Protokoll und die detaillierte Beschreibung des Verfahrens sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Materialien für die allgemeine Zellkultur.

<i>Chemikalien, Lösungen, und Zusätze</i>	Bezeichnung	Hersteller
	Penicillin (10.000 IE/ml)/ Streptomycin (10.000 µl/ml)	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
	Destilliertes Wasser	<i>Roth, Karlsruhe, BRD</i>
	DMSO	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>

	Fetal Bovine Serum (FBS)	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim, BRD
	Ficoll Paque™ PREMIUM	<i>GE Healthcare</i> , Uppsala, Schweden
	DMEM low glucose (1 g Glucose/l) mit 25 mM HEPES, mit L-Glutamin	<i>PAA</i> , Pasching, Österreich
	Dubecco's Phosphate Buffered Saline ohne Ca & Mg, (PBS)	<i>PAA</i> , Pasching, Österreich
	Trypanblau 0,4 %	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim, BRD
	Trypsin/EDTA 1x (0,05/0,02 % in PBS)	<i>PAA</i> , Pasching, Österreich
	L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrat (Vitamin C)	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim, BRD
Verbrauchsgegenstände	Kryoröhrchen, Cryo.s™	<i>Greiner bio-one</i> , Frickenhausen, BRD
	Einfrierbox, Nalgene® Mr Frosty	<i>Nalge Nunc</i> , Rochester, USA
	Einwegspritzen, LUER Norm-Ject®	<i>Henke, Sass, Wolf</i> , Tuttlingen, BRD
	Reaktionsgefäße	<i>Greiner bio-one</i> , Frickenhausen, BRD
	Glas-Pasteurpipetten	<i>Roth</i> , Karlsruhe, BRD
	Einmalhandschuhe, rotiprotect®-Nitril	<i>Roth</i> , Karlsruhe, BRD
	Kanülen (18 G), Neolus® Einmalkanülen	<i>Terumo</i> , Leuven, Belgien
	Kulturflaschen, cellstar® tissue culture flasks	<i>Greiner bio-one</i> , Frickenhausen, BRD
	Parafilm	<i>Roth</i> , Karlsruhe, BRD
	Plastik-Pasteurpipetten	<i>Roth</i> , Karlsruhe, BRD
	Pipettenspitzen, easy load	<i>Greiner bio-one</i> , Frickenhausen, BRD
	Serologische Pipetten	<i>Greiner bio-one</i> , Frickenhausen, BRD
	Sterile Filter 0,45 µm	<i>VWR</i> , Darmstadt, BRD
	Zellkulturplatten, cellstar® well plates	<i>Greiner bio-one</i> , Frickenhausen, BRD
	Zellsieb, BD Falcon™ cell strainer	<i>BD Biosciences</i> , Erembodegem, Belgien
	Zentrifugenröhrchen, Falcon™ Tube	<i>BD Biosciences</i> , Erembodegem, Belgien
	Absauger, micro-classic Pipettierhelfer	<i>Brand</i> , Wertheim, BRD
Geräte	Einkanalpipetten, Pipetman Neo	<i>Gilson</i> , Villiers-le-Bel, Frankreich
	Inkubator, Heracell® 240	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, USA
	Mikroskop, Leica DMIL	<i>Leica Microsystems</i> , Wetzlar, BRD
	Mikroskop, Nikon eclipse T _i -S	<i>Nikon Instruments</i> , Melville, USA
	Pipettierhilfe, pipet aid portable XP	<i>Drummond</i> , Broomall, USA
	Präzisionswaage, Sartorius LA 120 S	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, BRD
	Sterilbank, Biowizard	<i>Kojair</i> , Vilppula, Finnland
	Vortexer, Vortex-Genie 2	<i>Scientific Industries</i> , New York, USA
	Wasserbad, ED-7AB Badthermostat	<i>Julabo</i> , Seelbach, BRD
	Zählkammer, Neubauer-improved	<i>Marienfeld-Superior</i> , Lauda-Königshofen, BRD
	Zentrifuge, Rotina 420R	<i>Hettich</i> , Bäch, Schweiz
	Tiefgefrierschrank -80 °C	
	Tiefgefrierschrank -150 °C	

3.2.4 Isolation der MSC

Die MSC wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurde das aspirierte KM zunächst aus den Spritzen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und durch

Zentrifugation die zelluläre Fraktion vom Knochenmarküberstand (KMÜ) getrennt (10 min, 600 xg, 10 °C). Der KMÜ wurde mit einer Plastikpipette abgenommen, durch ein Zellsieb filtriert, in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei –80 °C gelagert.

Die Bearbeitung der Blutproben zur Plasmagewinnung wurde mithilfe der gleichen Methode durchgeführt.

Die mononukleäre Zellfraktion (MNZ) des Knochenmarks wurde mit PBS auf ein durch 30 teilbares Endvolumen aufgefüllt und gut gemischt. Je 30 ml mit PBS-verdünntem KM wurden daraufhin auf einen 15 ml-Dichtegradienten (Ficoll™) geschichtet. Nach der Zentrifugation (20 min, 1.000 xg, 20 °C, ohne Bremse) wurde mit einer Plastik-Pasteurpipette die Schicht der mononukleären Zellfraktion („buffy coat“) vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Herauswaschen des Dichtegradienten aus der Zellsuspension wurde die MNZ mit PBS auf 45 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (10 min, 600 xg, 4 °C). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet wiederum in 45 ml PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert (5 min, 600 xg, 4 °C). Im Anschluss wurde das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert, und die Zellzahl der MNZ anhand einer Trypanblau-Färbung in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt (hierbei wurden nur große MNZ gezählt).

Die MNZ jeder Probe wurden in eine T₇₅-Zellkulturflasche mit Basiskulturmedium (glukosearmes DMEM inkl. 10 % FBS, 1 % Pen/Strep und 8,9 µg/ml Vitamin C) ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid in feuchter Atmosphäre inkubiert. Nach den 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen, und weiter im Basiskulturmedium bei oben genannten Bedingungen inkubiert.

3.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung für alle Vorgänge des Versuchs wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Nach der Zentrifugation der Zellen wurde die Flüssigkeit abgesaugt und jedes Falconröhrchen (15 oder 50 ml) für 30 Sekunden verkehrt herum aufgestellt, um die restliche Flüssigkeit entfernen zu können. Dann wurde das verbliebene Zellpellet mit einer bekannten Menge an PBS gelöst, wovon für die Zellzählung je 20 µl Zellflüssigkeit mit 20 µl Trypanblau gemischt und in die Neubauer-Kammer eingeführt wurden. Hierfür wurde folgende Formel verwendet: $[(\text{Anzahl an lebenden Zellen} / 8) \times 20.000 \times \text{Menge an ml der Zellsuspension}]$. Die verwendete Menge an PBS zur Zellzählung wurde für jeden Schritt der Studie standardisiert.

3.2.6 Expansion der MSC

Das Basiskulturmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die erste Passage erfolgte bei einer Zellkonfluenz von circa 80 %. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Ablösung der Zellen von der Kulturflasche mikroskopisch kontrolliert und bei Bedarf durch leichtes Klopfen vorangetrieben. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 5 ml Basiskulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Herauswaschen des Trypsins durch Zentrifugation (5 min, 600 xg, 4 °C) wurde der Überstand abgegossen, das Zellpellet im Basiskulturmedium resuspendiert und die Zellzahl nach der Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Proben für den ersten und dritten Teil des Versuchs eingefroren, während die Proben, welche für den zweiten Teil des Versuchs vorgesehen waren, direkt bis Passage 3 (P₃) weiter expandiert wurden. Eine Aussaatdichte von mindestens 2857 MSC/cm² wurde für alle weiteren Passagen benutzt (500.000 Zellen/T₁₇₅ Kulturflasche). Die Proben, welche für den ersten und dritten Teil des Versuchs benutzt wurden, wurden bei einer Zellkonfluenz von 80 % als P₀ (aus T₇₅-Zellkulturflaschen) für einen späteren Gebrauch eingefroren. Für alle Teile des Versuchs wurden Zellen aus einer P₃ verwendet.

3.2.7 Kryokonservierung

Die in Suspension vorliegenden MSC wurden zentrifugiert (5 min, 600 xg, 4 °C), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in einem Einfriermedium (FBS + 10 % DMSO) resuspendiert bzw. vorsichtig gemischt. Die neue Zellsuspension wurde unverzüglich in Kryoröhrchen überführt und mithilfe einer Einfrierbox mit Isopropanol schrittweise 1 °C/min bis auf –80 °C heruntergekühlt. Nach einer circa zwölfstündigen Zelllagerung bei –80 °C wurde im nächsten Schritt die Temperatur der Zellen im Tiefgefrierschrank bis auf –150 °C gesenkt. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen solange gelagert, bis sie für Teil 1 und 3 der Studie gebraucht wurden.

3.2.8 Auftauen der MSC

Die Zellen wurden aus –150 °C direkt in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Dieser Prozess wurde bei allen Zellen bzw. Konditionen für jeden Teil des Versuchs zeitgleich durchgeführt. Mit einer Pipette wurde die Zellsuspension in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen eingeführt, die Kryoröhrchen wurden mit 2 ml PBS gewaschen und wieder in das 50 ml-Zentrifugenröhrchen eingeführt. Die im verdünnten Einfriermedium erhaltenen Zellen wurden mit 30 ml PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert (5 min, 600 xg, 4 °C). Nach dem

Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet im Basiskulturmedium resuspendiert und die Zellen in T₇₅-Zellkulturflaschen ausgesät.

Für den zweiten und dritten Teil des Versuchs wurde die Zellvitalität nach dem Auftauen durch zwei Methoden berechnet – je nachdem wurden die Zellen mithilfe von phenolrotfreiem Medium (ohne Zusätze) oder mithilfe von PBS resuspendiert. Im Folgenden werden die Methoden näher erläutert.

3.2.9 Bestimmung der Zellvitalität

Die Evaluierung der Zellvitalität wurde für alle Teile des Versuchs anhand zweier paralleler Methoden durchgeführt, die folgend näher erläutert werden.

Bestimmung der Zellvitalität durch Trypanblau-Färbung

Nach der Zellzählung wurden Zellen, die angefärbt waren, als tote Zellen betrachtet. Der Prozentsatz an lebenden Zellen wurde mit der Auswertung nach der Formel $[(\text{ungefärbte Zellen} / (\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen})) \times 100]$ errechnet.

Bestimmung der Zellvitalität (bzw. Zellaktivität) mit dem WST-1-Reagenztest

Die verwendeten Materialien zur Bestimmung der Zellvitalität anhand des WST-1-Reagenztests sind nachfolgend angezeigt:

Tab. 3: Materialien zur Bestimmung der Zellvitalität mit dem WST-1-Test.

	Material	Hersteller
<i>Chemikalien</i>	Cell Proliferation Reagent WST-1 (gebrauchsfertig)	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD</i>
<i>Medien</i>	DMEM high glucose (4,5 g Glucose/l) mit Natriumpyruvat, mit L-Glutamin	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
<i>Gerät</i>	Photometer	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA</i>
<i>Verbrauchsgegenstände</i>	24- und 96-Well-Zellkulturplatten, cellstar® well plates	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen, BRD</i>

Für den ersten Teil des Versuchs wurde pro Bedingung eine Standardzellzahl von 600.000 Zellen in 500 µl berechnet bzw. entnommen und in 24-Well-Kulturplatten eingebracht. Für den zweiten und dritten Teil des Versuchs wurde anstelle einer Standardzellzahl wie im ersten Teil des Versuchs mit einer Standardmenge gearbeitet. Es wurde eine Menge von 500 µl festgelegt und etabliert. Außerdem wurde wie im ersten Teil eine Äquivalenz von circa 500.000 Zellen berechnet. Für alle Teile der Studie wurden 500 µl Zellsuspension pro Bedingung in 24-Well-Kulturplatten transferiert, 50 µl WST-1-Lösung dazugegeben und anschließend die Well-Kulturplatte vorsichtig für 30 Sekunden manuell

bewegt. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden wurde durch photometrische Messung die Entstehung von Formazan bestimmt. Hierfür wurden die 24-Well-Platten zentrifugiert (5 min, 400 xg, 4 °C) und davon 100 µl Überstand von jeder Bedingung entnommen und in 96-Well-Platten gegeben. Die Messung der optischen Dichte durch Photometrie wurde mit einer Wellenlänge von 570 und 630 nm durchgeführt, für alle Messungen wurden die Zellen in phenolrotfreiem Medium resuspendiert. Zur Herstellung aller Basalwerte wurden 500 µl phenolrotfreies Medium (ohne Zellen) mit 50 µl WST-1-Lösung abgemessen. Für die Evaluierung und Darstellung der Ergebnisse wurden die Werte von 570 minus 630 nm verwendet.

3.2.10 Kumulative Populationsverdopplungen (kPV) der MSC

Die Einflüsse der verschiedenen extrazellulären Transportbedingungen wurden auf das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht. Dafür musste für jede untersuchte Bedingung eine Kontrolle ab Zeit 0 (Z_0) vor dem Eintreten jeder Kondition durchgeführt werden. Alle Werte wurden inner- und außerhalb der bestimmten Bedingungen verglichen.

Das Verfahren der kPV erfolgte nach konstantem Passagieren und Aussäen der MSC nach einer bestimmten Zeit in einer Aussaatdichte von 500 MSC/cm² (12.500 MSC/T₂₅-Kulturflasche). Die Passage der Zellen erfolgte alle sieben Tage (von P₄ bis P₇) – die variable Zeit wurde zur Errechnung der kPV daher in Tagen gemessen. Für die Zellzählung jeder Passage wurden die Zellen in 500 µl resuspendiert.

Zur Bestimmung der kPV wurden die Generationszahl (n) und Generationszeit (t_g) errechnet und die kumulative Darstellung dieser Ergebnisse logarithmisch angezeigt. Die Generationszahl (n) wurde durch die Formel $n = N_0 \times 2^n$ errechnet, wobei N_0 der Zahl der Zellen zum Zeitpunkt 0 entspricht. Hieraus folgte durch Logarithmieren $\log N = \log N_0 + n \times \log 2$. Anschließend folgt $n = ([\log N - \log N_0] / \log 2)$.

Nach der Errechnung der Generationszahl pro Bedingung, wurde die Generationszeit errechnet. Dabei wurde die Formel $t_g = t / n$ verwendet, wobei t der Dauer der Kultur in Tagen (7) und n der Generationszahl entspricht. Daraus ergibt sich $t_g = ([\log 2 \times t] / [\log N - \log N_0])$.

3.2.11 Differenzierungspotentiale der MSC

Vor und nach der Exposition der MSC unter den verschiedenen Versuchsbedingungen wurden die Differenzierungseigenschaften der MSC im Hinblick auf die adipogene, osteogene und chondrogene Linie festgestellt. Dafür wurden zwei Differenzierungsmodelle ausgewählt. Die adipogene sowie die osteogene Differenzierung wurden in einer Monolayer-Zellkultur durchgeführt, während die chondrogene Differenzierung in einem dreidimensionalen Modell (chondrogene Pellets) erstellt wurde. Alle Evaluierungen wurden

im Doppelansatz durchgeführt. Die Materialien sowie die jeweiligen Differenzierungsprotokolle und Methoden zur Evaluation werden im Folgenden erklärt.

3.2.11.1 Differenzierung in Monolayer-Zellkultur für die adipogene und osteogene Linie

Pro Versuchsbedingung wurden 5.000 MSC entnommen und in einer Aussaatdichte von 5.000 MSC/cm² in einer 12-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden mit einem Basiskulturmedium (1 ml) unter den Standardbedingungen von Kohlendioxid und Feuchtigkeit kultiviert, bis eine Zellkonfluenz von 80 % erreicht war. Danach wurde das Basiskulturmedium abgesaugt und 1 ml Induktionsmedium je nach Art der Differenzierung dazu gegeben (osteo- oder adipogene Linie), um die Zelldifferenzierung zu starten. Abhängig von der Kulturdauer und Art der Differenzierung wurde das Medium zweimal wöchentlich gewechselt.

3.2.11.1.1 Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung erfolgte unter standardisierten Kulturbedingungen mit adipogenem Induktionsmedium nach einer Kulturdauer von drei Tagen. Die Wirkstoffe für die Herstellung des Mediums sowie ihre Quantität und genaue Durchführung sind je nach Art der Differenzierung angezeigt.

Materialien

Tab. 4: Materialien zur Herstellung der adipogenen Differenzierung.

	Material	Hersteller
<i>Basismedium</i>	DMEM Ham's F-12 mit L-glutamin	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
	Kaninchenserum	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Penicillin/Streptomycin	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
<i>Wirkstoffe</i>	Dexamethason	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Indomethacin	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Insulin	<i>Invitrogen, Karlsruhe, BRD</i>
	Isobutyl-Methylxantin (IBMX)	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
<i>Gebrauchsmittel</i>	Ethanol	<i>Roth, Karlsruhe, BRD</i>
	Destilliertes Wasser	<i>Roth, Karlsruhe, BRD</i>
	Steril-Filter	<i>VWR, Darmstadt, BRD</i>
	24-Well-Zellkulturplatten, BD Falcon™ Tube	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen, BRD</i>
	Einwegspritzen, LUER Norm-Ject®	<i>Henke, Sass, Wolf, Tuttlingen, BRD</i>

Vorbereitung der Zusatzstoffe und ihre Stock-Konzentrationen

- *Dexamethason*: 1 g lyophilisiertes Dexamethason wurde mit 0,225 ml absolutem Ethanol gelöst und steril filtriert. Danach wurde die erhaltene Lösung mit 25,5 ml PBS verdünnt und nochmals steril filtriert.
Erhaltene Stock-Konzentration: 38,83 µg/ml
- *Indomethacin*: 35,78 mg Indomethacin wurden in 10 ml Ethanol gelöst und steril filtriert.
Erhaltene Stock-Konzentration: 3,58 mg/ml
- *Insulin*: 5 ml Insulin (4 mg/ml) wurden mit 75 ml sterilem destilliertem Wasser gemischt.
Erhaltene Stock-Konzentration: 0,25 mg/ml
- *IBMX*: 111,1 mg IBMX wurden in 10 ml Ethanol gelöst und steril filtriert.
Erhaltene Stock-Konzentration: 11,11 mg/ml

Die verwendeten Endkonzentrationen der Zusatzstoffe, die auf das Basismedium gegeben wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tab. 5: Zusammenfassung der Endkonzentrationen des adipogenen Kulturmediums.

Basismedium	Zusatz	Endkonzentration
DMEM/ Ham's F-12 mit L-Glutamin, inkl. 5 % Kaninchenserum und 1 % Pen/Strep	Dexamethason	3,36 µg/ml
	Indomethacin	31 µg/ml
	Insulin	8,6 µg/ml
	Isobutylmethylxanthin	96 µg/ml

Vorgehen

Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 72 Stunden mit Induktionsmedium bzw. adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Aufgrund der kurzen Kulturdauer war das Wechseln des Mediums bei dieser Methode nicht notwendig. Zur Auswertung der adipogenen Differenzierung wurde nach Ende der Kulturdauer das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit PFA (4 %) fixiert.

Auswertung

Tab. 6: Materialien zur Auswertung der adipogenen Differenzierung.

	Material	Hersteller
<i>Färbung</i>	Oil Red O	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim, BRD
	Mayers Hematoxilin	<i>Roth</i> , Karlsruhe, BRD
<i>Gebrauchsmittel</i>	Isopropanol	<i>Roth</i> , Karlsruhe, BRD
	Paraformaldehyd	<i>Roth</i> , Karlsruhe, BRD
	Sterilfilter (0,2 µm)	<i>VWR</i> , Darmstadt, BRD
	Doppeldestilliertes Wasser (DDW)	<i>Roth</i> , Karlsruhe, BRD
<i>Geräte</i>	Mikroskop, Nikon eclipse T – S	<i>Nikon Instruments</i> , Melville,

		USA
	Präzisionswaage, Sartorius LA 120 S	Sartorius AG, Göttingen, BRD
	Absauger, microclassic Pipettierhelfer	Brand, Wertheim, BRD

Oil Red O-Färbung zum Nachweis der adipogenen Differenzierung

Eine 4 %-ige Paraformaldehydlösung wurde mithilfe destillierten Wassers hergestellt und die Zellen wurden für eine Stunde fixiert. Nach der Fixierung wurde das Paraformaldehyd von den Zellen abgesaugt und die Zellen zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen.

Anschließend wurde eine 60 %-ige Isopropanol-Lösung auf Basis von DDW hergestellt und die Zellen über 5 Minuten mit dieser Lösung abgedeckt. Danach wurde das Isopropanol abgenommen und die Zellplatten wurden bei Raumtemperatur getrocknet. Für die Färbung wurde eine 0,5 %-ige Oil Red O-Färbelösung mit einer Basis aus 60 %-igem Isopropanol hergestellt, gemischt, filtriert und bodenbedeckend auf die abgetrockneten Zellen pipettiert. Die Inkubation der Zellen mit der Färbelösung erfolgte lichtgeschützt über vier Stunden.

Anschließend wurde die Färbelösung abgesaugt und die Zellen viermal mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen.

Zur Gegenfärbung wurden die Zellen für weitere 5 Minuten mit Mayers Hämatoxilin-Lösung inkubiert und danach mit vollentsalztem Wasser gewaschen.

Mikroskopische Auswertung der adipogenen Differenzierung

Pro Bedingung wurden beide Wells komplett durchmustert und eine semi-quantitative Auswertung der Zellmorphologie und der Oil Red O-gefärbten Zellen über ein eigenes Score-System durch eine Punktzahl-Bewertung von 0 bis 3 durchgeführt.

Eine Probe wurde als negativ (0) bewertet, wenn keine Fettvakuolen beziehungsweise Veränderungen der Zellmorphologie in Richtung adipogene Differenzierung oder rotgefärbte Lipidtröpfchen gefunden wurden.

Eine Probe wurde als positiv (1) bewertet, sobald intrazellulär gelegene Fettvakuolen gefunden wurden.

Abhängig von der Präsenz der Oil Red O-Färbung wurden die Proben mit 2 bewertet, sofern ein schwacher Nachweis an Lipidtröpfchen gefunden wurde, während ein deutlicher beziehungsweise stärkerer Nachweis der Lipidtröpfchen mit 3 bewertet wurde.

Eine Fotodokumentation der Proben wurde erstellt.

3.2.11.1.2 Osteogene Differenzierung

Der Nachweis der osteogenen Zelldifferenzierung erfolgte anhand der Bestätigung des Vorhandenseins Alkalischer Phosphatase (AP) und extrazellulären Kalziums.

Diese wurden abhängig von der Kulturdauer für eine Auswertung nach 14 Tagen als frühere Osteogenese, für eine Auswertung nach 21 Tagen als spätere Osteogenese gekennzeichnet. Der Nachweis von AP erfolgte nach 14 Tagen, der Nachweis von extrazellulärem Kalzium nach 21 Tagen.

Materialien

Tab. 7: Materialien zur frühen und späteren osteogenen Differenzierung.

	Material	Hersteller
<i>Basismedium</i>	DMEM Ham's F-12 mit L-glutamin	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
	Fetal Bovine Serum	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Penicillin (10.000 IE/ml)/ Streptomycin (10.000 µl/ml)	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
<i>Wirkstoffe</i>	L-ascorbic acid 2-phosphate sesqui- magnesium salt hydrat	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Dexamethason	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	β-Glycerophosphat	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
<i>Färbung</i>	Alkalische Phosphatase Färbekit	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Alizarinrot	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Paraformaldehyd	<i>Roth, Karlsruhe, BRD</i>
	Sterilfilter (0,2 µm)	<i>VWR, Darmstadt, BRD</i>
	Doppeldestilliertes Wasser (DDW)	<i>Roth, Karlsruhe, BRD</i>
<i>Verbrauchs- gegenstand</i>	24-Well-Zellkulturplatten, BD Falcon™ Tube	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen, BRD</i>
<i>Geräte</i>	Mikroskop, Nikon eclipse T – S	<i>Nikon Instruments, Melville, USA</i>
	Präzisionswaage Sartorius LA 120 S	<i>Sartorius AG, Göttingen, BRD</i>
	Absauger, micro-classic Pipettierhelfer	<i>Brand, Wertheim, BRD</i>

Vorbereitung der Zusatzstoffe und ihre Stock-Konzentrationen

- *Vitamin C:* 25,61 mg Vitamin-C-Pulver wurden abgewogen und in 10 ml erwärmtem DMEM low glucose (1 g Glucose/l) mit 25 mM HEPES und L-Glutamin gelöst sowie anschließend steril filtriert.
Erhaltene Stock-Konzentration: 2,56 mg/ml
- *Dexamethason:* 1 mg lyophilisiertes Dexamethason wurde mit 0,225 ml absolutem Ethanol gelöst und steril filtriert. Danach wurde die erhaltene Lösung mit 25,5 ml PBS verdünnt und nochmals steril filtriert.
Erhaltene Stock-Konzentration: 38,83 µg/ml

- *β-Glycerophosphat*: 5,4 g β-Glycerophosphat-Pulver wurden abgewogen und in 25 ml DMEM low glucose (1 g Glucose/l) mit 25 mM HEPES und L-Glutamin gelöst sowie anschließend steril filtriert.

Erhaltene Stock-Konzentration: 216 mg/ml

Die verwendeten Endkonzentrationen der Zusatzstoffe, die auf ein Basismedium gegeben wurden, sind in der folgenden Tabelle in µg/ml angegeben:

Tab. 8: Osteogene Differenzierungsmedium, Endkonzentrationen.

Basismedium	Zusätze	Endkonzentration
DMEM/ Ham's F-12 mit L-Glutamin, inkl. 10 % FBS und 1 % Pen/Strep	Dexamethason	$3,8 \times 10^2$ µg/ml
	β-Glycerophosphat	$2,12 \times 10^3$ µg/ml
	Vitamin C	25 µg/ml

Vorgehen

Beim Erreichen einer 80 %-igen Konfluenz der ausgesäten Zellen wurden die frühere und spätere Osteogenese mit dem gleichen Differenzierungsmedium angefertigt bzw. induziert (Tabelle 8). Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert, das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

Am Ende der beiden Kulturzeiten (14 und 21 Tage) wurde das Medium von allen Zellen abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und eine Stunde mit 4 %-igem Paraformaldehyd fixiert.

Der Nachweis der osteogenen Differenzierung erfolgte nach zwei Protokollen, welche anschließend aufgeführt sind.

A) Alkalische Phosphatase-Färbung zum Nachweis der frühen osteogenen Differenzierung

Nach der Fixierung wurde das Paraformaldehyd von den Zellen abgesaugt, und die Zellen wurden zweimal mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde die angefertigte Färbelösung der AP-Färbekits bodenbedeckend auf die Zellen pipettiert. Dafür wurden vorher 25 µl Natriumnitrit mit 25 µl FBB-Alkalilösung gemischt (Diazoniumsalzlösung) und nach 2 Minuten Standzeit auf 1 ml VE-Wasser pipettiert. Anschließend wurden zur verdünnten Diazoniumsalzlösung 25 µl Naphtol AS-BI dazugegeben und gemischt. Auf Basis von 1 ml VE-Wasser wurde eine AP-Färbung hergestellt. Wegen des labilen Zustandes der angemischten AP-Färbung wurde die Lösung nach der Fixierungszeit in einer der Anzahl an Wells entsprechenden Menge hergestellt.

Nach dem Pipettieren der AP-Färbelösung wurden die Zellen über 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Färbelösung abgesaugt und die Wells mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach 2 Minuten wurde das VE-Wasser wiederum abgesaugt und eine Gegenfärbung über weitere 2 Minuten mit Neutralrot-Lösung durchgeführt. Zum Schluss wurden die Zellen vorsichtig mit Leitungswasser gewaschen und luftgetrocknet.

zu A) Mikroskopische Auswertung der früheren Osteogenese

Mithilfe der AP-Färbekits ist die Aktivität der AP durch das Erscheinen von blau gefärbten Granula im Zytoplasma nachweisbar. Die Intensität und Präsenz an blauen Strukturen am Well der Kulturplatte wurde semi-quantitativ von 0 bis 3 über ein eigenes Score-System ausgewertet. Die Proben wurden als negativ (0) bewertet, wenn keine blau gefärbten Strukturen in beiden Wells pro Bedingung gefunden wurden. Positive Proben wurden in Abhängigkeit von der Intensität und Anzahl an blauen Granula von 1 (schwache Färbung) über 2 (mittlere Färbung) bis 3 (starke Färbung) bewertet. Eine Fotodokumentation der Proben wurde erstellt.

B) Alizarinrot-Färbung zum Nachweis der späten osteogenen Differenzierung

Eine filtrierte 2 %-ige Alizarinrot-Färbelösung auf Basis von VE-Wasser wurde hergestellt. Das Paraformaldehyd wurde von den fixierten Zellen abgesaugt und die Zellen mit der Alizarinrot-Färbelösung bodenbedeckend auf die Zellen pipettiert. Den Zellen wurde eine Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur gegeben. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Färbelösung abgesaugt, und die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

Die Alizarinrot-Färbung ermöglicht den Nachweis von Kalziumdepots mittels einer roten Färbung der vorhandenen mineralisierten Matrix.

zu B) Mikroskopische Auswertung der späten osteogenen Differenzierung

Für das Vorhandensein extrazellulär gelegener Kalziumdepots wurde eine semi-quantitative Bewertung an beiden Wells aller Bedingungen über ein eigenes Score-System durchgeführt. Eine Probe wurde als negativ (0) bewertet, wenn in keinem der beiden Wells rot angefärbte Kalziumdepots gefunden wurden. Eine Probe wurde als positiv (1) bewertet, sobald mindestens eine schwache rote Färbung gefunden wurde. Eine Probe wurde mit 2 oder 3 bewertet, wenn eine mittlere bzw. starke Färbung gefunden wurde. Eine Fotodokumentation der Proben wurde erstellt.

3.2.11.2 Chondrogene Differenzierung

Materialien

Tab. 9: Materialien zur Evaluierung der chondrogenen Differenzierung.

	Material	Hersteller
<i>Basismedium</i>	DMEM high glucose (4,5 g Glucose/l) mit Natriumpyruvat, mit L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
<i>Wirkstoffe</i>	Dexamethason	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim, BRD
	Human transforming growth factor β_1 (hTGF β_1)	<i>BD Biosciences</i> , Erembodegem, Belgien
	ITS+ Universal Culture Supplement Premix (ITS+ Premix)	<i>BD Biosciences</i> , Erembodegem, Belgien
	Penicillin (10.000 IE/ml)/ Streptomycin (10.000 μ l/ml)	PAA, Pasching, Österreich
	Prolin	<i>Roth</i> , Karlsruhe, BRD
	L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrat	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim, BRD
<i>Färbung</i>	Alkalische Phosphatase Färbekit	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim, BRD
	Alizarinrot	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim, BRD
	Paraformaldehyd	<i>Roth</i> , Karlsruhe, BRD
	Sterilfilter (0,2 μ m)	VWR, Darmstadt, BRD
	Doppeldestilliertes Wasser (DDW)	
<i>Geräte</i>	Mikroskop, Nikon eclipse T – S	<i>Nikon Instruments</i> , Melville, USA
	Präzisionswaage Sartorius LA 120 S	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, BRD

Vorbereitung der Zusatzstoffe und ihre Stock-Konzentrationen:

- *Dexamethason*: 1 mg Dexamethason wurde in 1 ml absolutem Ethanol gelöst und anschließend mit 24,48 ml PBS verdünnt und steril filtriert.
Erhaltene Stock-Konzentration: 39,25 μ g/ml
- *hTGF β_1* : Zunächst wurde eine Rekonstitutionslösung hergestellt. Dafür wurden 9,416 ml DDW mit 584 μ l HCL (0,25 %) und 0,01 g BSA gemischt und steril filtriert. Von dieser Rekonstitutionslösung wurde 1 ml in eine Ampulle mit 5 μ g hTGF β_1 gemischt.
Erhaltene Stock-Konzentration: 5 ng/ μ l bzw. 5 μ g/ml
- *ITS+ Premix*: wurde original verwendet (100 X).
- *Prolin*: 115,6 mg Prolin wurden in 2,5 ml DDW gelöst und steril filtriert.
Erhaltene Stockkonzentration: 46,24 mg/ml
- *Vitamin C*: 96,93 mg Vitamin C wurden in 1 ml DDW gelöst und steril filtriert.
Erhaltene Stock-Konzentration: 96,93 mg/ml

Die verwendeten Endkonzentrationen der Zusatzstoffe, die auf ein Basismedium gegeben wurden, sind in der folgenden Tabelle in μ g/ml angegeben.

Tab. 10: Chondrogene Differenzierungsmedium.

Basismedium	Zusatz	Endkonzentration
Glucosereiches DMEM mit Natriumpyruvat und L-Glutamin	Dexamethason	38,4 µg/ml
	hTGF β ₁	9,8 x 10 ³ µg/ml
	IST	1 : 100
	Pen/ Strep	73,4 IE bzw. µg/ml
	Prolin	45,4 µg/ml
	Vitamin C	36,8 x 10 ³ µg/ml

Vorgehen

Für die chondrogene Differenzierung wurden 1 Millionen Zellen pro Versuchsbedingung in 2 x 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben (500.000 MSC pro Röhrchen). Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 600 xg, 4 °C) und der Überstand des Mediums abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml chondrogenem Medium resuspendiert, das verbliebene Pellet durch Vortex leicht gelöst und eine neue Zentrifugation über 5 Minuten bei 280 xg und 4 °C durchgeführt. Die Zellpellets wurden für 24 Stunden bei leicht gelockertem Deckel (zur Ermöglichung des Gasaustausches) kultiviert. In dieser Zeit organisierten sich die MSC von dem ursprünglich flachen zu einem nahezu kugelförmigen Pellet um, welches dann durch Schütteln vom Röhrchenboden gelöst wurde (Vortex). Die Pellets wurden für eine Kulturdauer von 21 Tagen mit chondrogenem Differenzierungsmedium unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Am Ende der chondrogenen Differenzierung wurde das Medium abgesaugt und die Pellets wurden für eine anschließende histologische Auswertung mindestens 24 Stunden lang mit 4 %-igem Paraformaldehyd fixiert.

Auswertung

Tab. 11: Materialien zur Auswertung der chondrogenen Differenzierung.

	Material	Hersteller
<i>Vorbereitung der Einbettung</i>	Filterpapier	<i>Roth</i> , Karlsruhe. BRD
	Einbettkassetten, Histosette®	<i>Simport</i> , Quebec. Canada
<i>Entwässerung und Paraffineinbettung</i>	Ethanol	<i>Roth</i> , Karlsruhe, BRD
	Siedegrenzbenzin	
	Paraffin, Vogel Histo-Comp®	<i>Vogel</i> , Fernwald, BRD
	Entwässerungsautomat, Histokinette®	<i>Apparate Armin Lüdi</i> , Bern, Schweiz
	Rothistol	<i>Roth</i> , Karlsruhe. BRD
	Ausbettstation, Tissue Tek II	<i>Haska AG</i> , Bern. Schweiz
<i>Vorbereitung der Schnitte</i>	Objektträger, Superfrost®	<i>Menzel-Gläser</i> , Freiburg, BRD
	Deckgläschen	<i>Glaswarenfabrik Karl Hecht KG</i> , Sondheim, BRD
	Eiweißglycerin	

	Mikrotome	Leica RM 2165
	Kühlplatte, COP 30	Medite GmbH, Burgdorf, BRD
	Kühlplatte, PSI	Pool of Scientific Instruments Ltd., Basel, Schweiz
	Warmplatte, Digi-Therm	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, BRD
	Färbeküvetten	WWR, Darmstadt, BRD
	Glas-Erlenmeyerkolben	WWR, Darmstadt, BRD
	Inkubator, Heracell®	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
	Rotihistokitt®	Roth, Karlsruhe, BRD

Histologische Auswertung zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung

Die fixierten Pellets wurden einzeln in Filterpapier eingeschlagen und separat in beschriftete Einbettkassetten gelegt. Danach wurden die Pellets für eine anschließende Dehydratation mittels eines Entwässerungsautomaten 2 Stunden lang in Leitungswasser gewässert, damit eine endgültige Paraffineinbettung erfolgen konnte. Die vollständige Methode mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe in verschiedenen Zeiten und Behältern wurde wie folgt durchgeführt: Ethanol Nr. 1, 70 %, 1 Stunde; Ethanol Nr. 2, 70 %, 1 Stunde; Ethanol Nr. 1, 95 %, 1 Stunde; Ethanol Nr. 2, 95 %, 1 Stunde; Ethanol Nr. 1, 100 %, 1 Stunde; Ethanol Nr. 2, 100 %, 2 Stunden; Ethanol Nr. 3, 100 %, 2 Stunden; Siedegrenzbenzin Nr. 1, 1 Stunde; Siedegrenzbenzin Nr. 2, 1 Stunde; Siedegrenzbenzin Nr. 3, 1 Stunde; Paraffin Nr. 1, 1 Stunde und Paraffin Nr. 2, 1 Stunde.

Als die Pellets entwässert und in Paraffin eingebettet waren, wurden sie einzeln mittels warmen Paraffins in den Paraffinkassetten befestigt und für eine sofortige Fixierung für mindestens 10 Minuten auf die Kühlplatte (-20 °C) gelegt. Nachdem alle Pellets eines Versuchsteils einzeln in den Paraffinkassetten befestigt bzw. gesammelt waren, erfolgte der Schneidprozess. Von jedem Pellet wurden drei Schnitte mit einer jeweiligen Dicke von 4 µm angefertigt, welche auf eiweißglycerinbeschichtete Objektträger gebracht und über Nacht auf einer Wärmeplatte getrocknet wurden.

Vor Beginn der Färbung wurden die angefertigten Schnitte in Rothistol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Der genaue Prozess wurde wie folgt durchgeführt: Rothistol Nr. 1, 10 Minuten; Rothistol Nr. 2, 10 Minuten; Ethanol 96 %, 5 Minuten; Ethanol 80 %, 1 Minuten; Ethanol 70 %, 1 Minuten; Ethanol 50 %, 1 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte mit doppelt destilliertem Wasser gespült.

So vorbereitet wurden drei verschiedene Färbungen mit den Pellets durchgeführt. Die eigens hergestellten Färbelösungen wurden vor dem Gebrauch filtriert. Alle Färbe- und Spüllösungen hatten Raumtemperatur.

Die Materialien und die Durchführung der Färbungen sind im Folgenden beschrieben:

A) Safranin O/Fast Green-Färbung

Materialien

Tab. 12: Materialien zur Herstellung der Safranin O/Fast Green-Färbung. Differenzierungsmedium.

<i>Anwendung</i>	Material	Hersteller
<i>Färbung</i>	Safranin O	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Fast Green	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
<i>Gebrauchsmittel</i>	Essigsäure 100 %	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>

Vorgehen

Für die Vorbereitung der Safranin O-Färbung wurden erst 1 ml Essigsäure, dann 0,2 mg Safranin O auf 100 ml DDV gegeben. Die Fast Green-Färbung erfolgte getrennt. Dafür wurden 200 µl Essigsäure auf 100 ml DDV gegeben und mit 0,04 g Fast Green gemischt. Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden zunächst über 10 Minuten in einer 0,2 %-igen Safranin O-Färbelösung gefärbt und anschließend in destilliertem Wasser gespült. Danach erfolgte die Gegenfärbung mit einer 0,04 %-igen Fast Green-Färbelösung für 15 Sekunden und eine nochmalige Spülung mit destilliertem Wasser. Die Schnitte wurden auf Filterpapier getrocknet und mit Ethanol (96 %) vorsichtig abgewaschen. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte nochmals über 10 Minuten in Rothistol gegeben, vollständig auf Papier getrocknet und mit Rotihistokitt® eingedeckelt.

Mit der Safranin O/Fast Green-Methode färben sich mature Proteoglycane (Glycosaminoglycane) rotorange und Kollagen färbt sich grün.

Mikroskopische Auswertung der Safranin O-Färbung

Die Auswertung der Safranin O/Fast Green-gefärbten Schnitte der chondrogen differenzierten Zellpellets erfolgte semi-quantitativ mittels Bern-Score (GROGAN et al. 2006) am histologischen Präparat.

Für jeden Teil des Versuchs wurden die gefertigten Schnitte der jeweiligen Färbung für eine Blindbewertung von zwei unabhängigen Wissenschaftlern verblindet angeordnet und beschriftet. Jedes Präparat wurde auf drei Kategorien (A, B, C) hin untersucht und bewertet. Die Werte der drei einzelnen Kategorien wurden abschließend addiert. Anhand des Endwertes konnte das chondrogene Differenzierungspotential der verschiedenen Markierungskonditionen verglichen werden. Eine Fotodokumentation der gefärbten Schnitte wurde durchgeführt.

Tab. 13: Bern-Score zur Auswertung der chondrogenen Differenzierung nach GROGAN et al. (2006).

Kriterium und Beschreibung	Bewertung
A: Gleichmäßigkeit und Intensität der Safranin O/Fast Green-Färbung	
Keine Orange-Färbung erkennbar	0
Vereinzelt hellorange	1
Gleichmäßig satt orange	2
Gleichmäßig dunkelorange	3
B: Abstand zwischen Einzelzellen, Gehalt an produzierter ECM	
Hohe Zelldichte, Einzelzellen liegen direkt aneinander, keine ECM erkennbar	0
Hohe Zelldichte, Abstand zwischen Einzelzellen ist geringer als ein Zelldurchmesser	1
Mäßige Zelldichte, Abstand zwischen Einzelzellen entspricht etwa einem Zelldurchmesser	2
Geringe Zelldichte, Abstand zwischen Einzelzellen ist größer als ein Zelldurchmesser, hoher Gehalt an ECM	3
C: Form der Einzelzellen	
Kondensierte, nekrotische, pyknotische Körperchen	0
Spindelzellartige Zellen	1
Mix aus spindelzellartigen und rundlichen Zellen	2
Meist rundliche, chondrozytenähnliche Zellen	3

B) Alzianblau-Färbung

Materialien

Tab. 14: Materialien zur Herstellung der Alzianblau-Färbung.

Anwendung	Material	Hersteller
<i>Färbung</i>	Alzianblau 8GX	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Kernechtrot (nuclear fast red solution, gebrauchsfertig)	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
<i>Gebrauchsmittel</i>	Essigsäure 100 %	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>

Vorgehen

100 ml einer 3 %-igen Essigsäurelösung wurden auf Basis von DDV hergestellt und mit 1 g Alzianblau gemischt. Daraufhin wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte über 3 Minuten in die 3 %-ige Essigsäure gegeben. Als Nächstes erfolgte die Färbung in einer 1 %-igen Alzianblau-Färbelösung über 90 Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült und eine Gegenfärbung mit Kernechtrot über 10 Minuten durchgeführt. Nach erfolgter Gegenfärbung wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült und auf Filterpapier getrocknet. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte nochmals über 2 Minuten in absolutes Ethanol gelegt und wieder auf Filterpapier getrocknet.

Zum Schluss wurden die Schnitte über 10 Minuten in Rothistol gegeben, vollständig getrocknet und mit Rotihistokitt® eingedeckelt.

Durch Alzianblau färben sich immature Proteoglycane türkisblau. Die Gegenfärbung mit Kernechtrot färbt Zellkerne rot.

Mikroskopische Auswertung der Alzianblau-Färbung

Die Auswertung der Alzianblau-gefärbten Schnitte der chondrogen differenzierten Zellpellets erfolgte qualitativ am histologischen Präparat. Die histologischen Schnitte der Zellpellets wurden auf das Vorhandensein türkisblau angefärbter Proteoglycane hin untersucht. Dabei wurde die Intensität und Quantität der Färbung mittels eines eigens etablierten Punktesystems von 0 bis 3 bewertet, wobei 0 als negativ betrachtet wurde. Proben, die eine schwache, mittlere oder starke Färbung angezeigt hatten, wurden jeweils mit 1, 2 oder 3 bewertet. Mikroskopische Aufnahmen wurden durchgeführt.

C) Masson-Trichrom-Färbung

Materialien

Tab. 15: Materialien zur Herstellung der Masson-Trichrom-Färbung.

<i>Anwendung</i>	Material	Hersteller
<i>Färbung</i>	Bouin'sche Lösung	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Weigert'sche Eisen-Hämatoxilin-Lösungen A und B (gebrauchsfertig)	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Ponceau-Fuchsin	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Phosphorwolframsäure	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
	Fast Green FCF	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>
<i>Gebrauchsmittel</i>	Essigsäure	<i>Sigma Aldrich, Steinheim, BRD</i>

Vorgehen

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden über Nacht in Bouin'scher Lösung nachfixiert und am nächsten Tag 10 Minuten lang in fließendem Leitungswasser gespült. Zur Vorbereitung der Färbelösungen wurden 990 ml DDV mit 10 ml Essigsäure (1 %-ig) gemischt und eine Phosphorwolframsäure-Lösung hergestellt. Hierfür wurden 2 g Phosphorwolframsäure mit 100 ml Essigsäure (1 %-ig) vermischt.

Für die Ponceau-Fuchsin-Lösung wurde zunächst eine Stock-Lösung hergestellt: 0,75 g Ponceaurot wurden mit 0,25 g Fuchsin in 100 ml Essigsäure (1 %-ig) gemischt (Stock-Lösung). Für die Anfertigung der Gebrauchslösung wurden davon 10 ml entnommen und in 90 ml Essigsäure (1 %-ig) verdünnt.

Für die Fast Green-Lösung wurden 0,2 g Fast Green-Pulver mit 100 ml Essigsäure (1 %-ig) gemischt.

Nach dem Waschen wurden die Schnitte 10 Minuten in Weigert'scher Eisen-Hämatoxin-Lösung inkubiert, anschließend für weitere 10 Minuten in Leitungswasser gewaschen und für 2 Sekunden in 1 %-ige Essigsäure getaucht. Es folgte eine 30-minütige Färbung in Ponceau-Fuchsin-Lösung mit anschließender Spülung in 1 %-iger Essigsäure. Danach wurden die Schnitte über 2 Minuten in 2 %-iger Phosphorwolframsäure fixiert und wiederum in 1 %-ige Essigsäure getaucht. Letzter Färbeschritt war die 5-minütige Inkubation der Schnitte in einer 0,2 %-igen Fast Green-Färbelösung, gefolgt von einer letzten Spülung in 1 %-iger Essigsäure. Nach dieser Prozedur wurden die gefärbten Schnitte nochmals über 2 Minuten in absolutes Ethanol gelegt und auf Filterpapier getrocknet. Abschließend wurden sie über 10 Minuten in Rothistol gegeben, vollständig auf Filterpapier getrocknet und mit Rotihistokitt® eingedeckelt.

Mit der Masson-Trichom-Methode färben sich Kollagene grün, Zellkerne blauschwarz und Zytoplasma rot.

Mikroskopische Auswertung der Masson-Trichom-Färbung

Die histologischen Schnitte der Zellpellets wurden auf das Vorhandensein grün angefarbter Kollagene hin untersucht. Die Auswertung erfolgte semi-quantitativ am histologischen Präparat. Die Intensität und Quantität wurden mittels eines eigens etablierten Punktesystems von 0 bis 3 bewertet, wobei 0 ein negatives Ergebnis bezeichnete. Proben, welche eine schwache, mittlere oder starke Färbung angezeigt hatten, wurden jeweils mit 1, 2 oder 3 bewertet. Mikroskopische Aufnahmen wurden erstellt.

3.3 Studiendesign – allgemeine Darstellung

Die Untersuchungen zu den Auswirkungen auf die MSC aus dem Knochenmark wurden in drei Teile unterteilt. Dabei fand eine Überprüfung unter verschiedenen Versuchsvariablen statt. Diese Darstellung und Teilung des Versuchsaufbaus ermöglichte eine bessere Handhabung und Evaluierung der verschiedenen Versuchsbedingungen unter kontrollierten Zielstufen. Die Ergebnisse jedes Versuchsteils wurden erstmals innerhalb des Abschnitts verglichen und evaluiert, danach wurden die erwünschten/notwendigen Ergebnisse ausgewählt, um sie im nächsten Teil des Versuchs weiter evaluieren zu können. Dieses Vorgehen verbesserte die einzelne Handhabung der Konditionsbedingungen und die Zellbearbeitung, die aufgrund der hohen Anzahl an Zellen, welche pro Proband notwendig waren, sonst erschwert gewesen wäre.

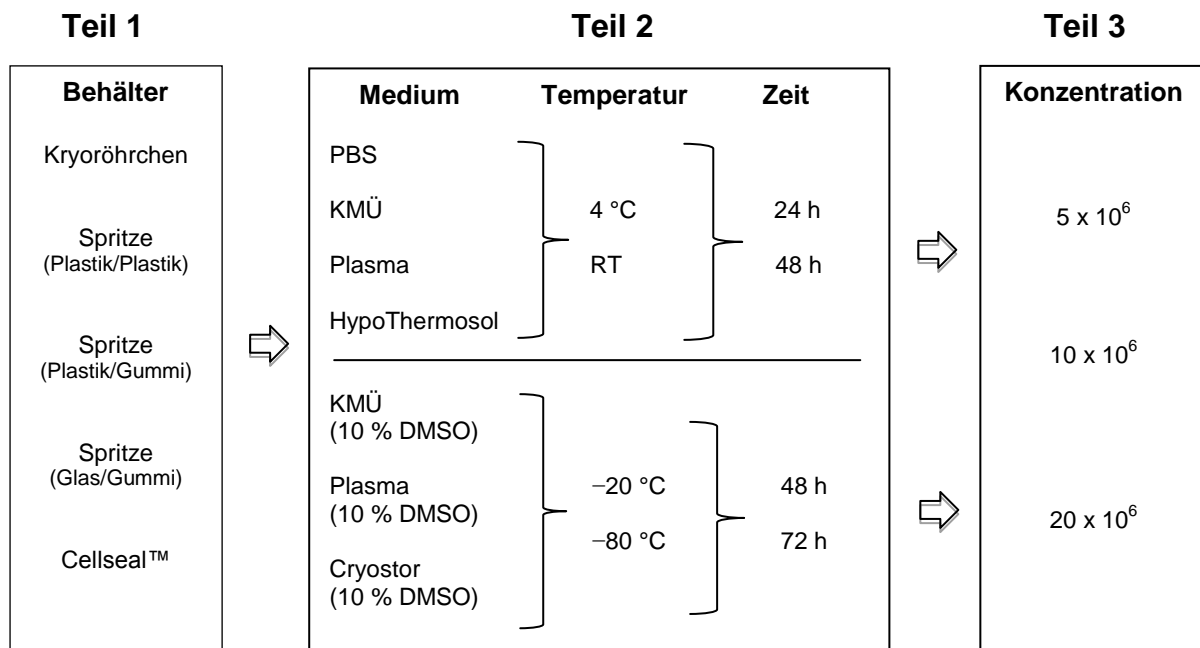


Abb. 4: Allgemeine Darstellung des Studiendesigns,
 Teil 1: Ermittlung des am besten geeigneten Transportbehälters,
 Teil 2: Ermittlung des am besten geeigneten Medium-Temperatur-Zeit-Verhältnisses,
 Teil 3: Ermittlung der am besten geeigneten Zellkonzentration.

3.3.1 Teil 1: Untersuchung zur Ermittlung des optimalen Transportbehälters

Tiefgefrorene Zellen aus P_0 wurden aufgetaut, in Zellkulturflaschen ausgesät und bis P_3 vermehrt (P_1 in $1 \times T_{75}$, P_2 in $2 \times T_{175}$ und P_3 in $8-10 \times T_{175}$). Die Zellzählung für die Herstellung der Versuchsbedingungen wurde in phenolrotfreiem Medium durchgeführt, in dem eine Mindestzellzahl von 26.627.500 pro Proband benötigt wurde ($n = 6$).

Der Moment, in dem die Herstellung der Kontrollbedingungen für Basalwerte der Zellvitalität, Zelldifferenzierung und Proliferation erfolgte, wurde als $Zeit_0$ bezeichnet. Sofort nach der Kontrollherstellung wurden 5 Millionen MSC in fünf verschiedenen Behältern unter Standardbedingungen bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Nach 24 Stunden ($Zeit_1$) wurden die Versuchsparameter der Zellen in jedem Behälter untersucht.

3.3.1.1 Studiendesign zum ersten Teil der Studie

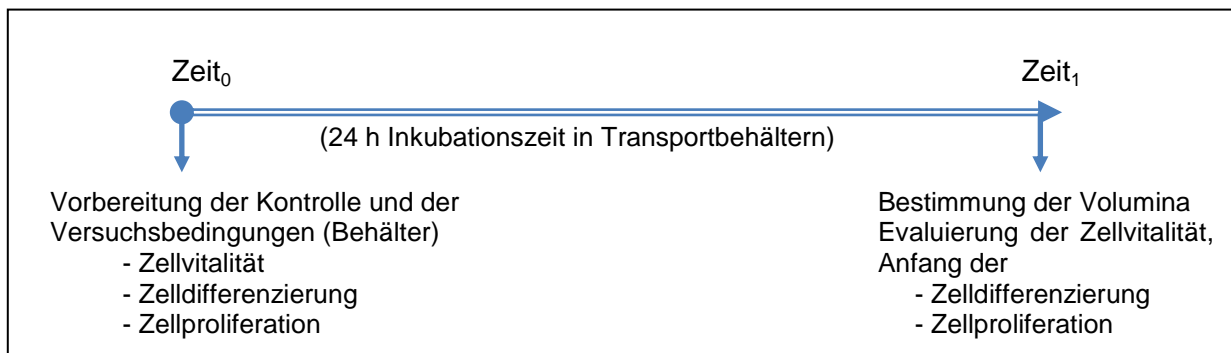


Abb. 5: Schematische Darstellung des ersten Teils der Studie.

3.3.1.2 $Zeit_0$: Vorbereitung der Kontrolle

Tiefgefrorene Zellen aus P_0 wurden aufgetaut, in Zellkulturflaschen ausgesät und bis P_3 vermehrt (P_1 in $1 \times T_{75}$, P_2 in $2 \times T_{175}$ und P_3 in $8-10 \times T_{175}$, $n = 6$). Die erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert, danach wurde umgehend eine Zellzählung und Errechnung der Vitalität mittels Neubauer-Kammer durchgeführt. Für alle Proben wurde eine Standardmenge von 6 ml an phenolrotfreiem Medium etabliert. Dieser Moment wurde als $Zeit_0$ und folgende Werte als Kontrollwerte gekennzeichnet. Anschließend wurde die bekannte Zellzahl wiederum mit phenolrotfreiem Medium in ein 50 ml-Falconröhrchen gefüllt, bis man 600.000 Zellen in 500 μ l erhielt, welche für die Herstellung der WST-1-Methode subtrahiert wurden. Nachdem die Zellentnahme für die WST-1-Methode erfolgt war, wurde die erhaltene Zellkonzentration bis auf 45 ml verdünnt. Anhand dieser neuen Zellkonzentration fand die Berechnung der benötigten Mikroliter für die Herstellung der Zelldifferenzierung und Proliferation statt.

1. Vitalität (WST-1)	1 × 600.000 MSC
2. Adipogene Diff.	2 × 5.000 MSC
3. Osteogene frühe Diff.	2 × 5.000 MSC
4. Osteogene späte Diff.	2 × 5.000 MSC
5. Chondrogene Diff.	2 × 500.000 MSC
6. Proliferation	1 × 12.500 MSC
Notwendige Zellzahl:	1.642.500 MSC

Abb. 6: Notwendige Zellzahl für die Herstellung der Kontrolle und Anordnung der Kategorien.

3.3.1.3 Zeit₀: Vorbereitung der Versuchsbedingungen für die Evaluierung nach

24 Stunden

Nach dem obengenannten Verfahren (Herstellung der Kontrolle) ist die Zellkonzentration konstant geblieben und 25.000.000 Zellen wurden in ein neues 50 ml-Falconröhrchen gegeben und zentrifugiert (5 min, 4 °C, 600 xg). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 2.500 µl DMEM low glucose und 20 %-igem FBS resuspendiert bzw. vorsichtig gelöst. Anschließend wurden 500 µl bzw. 5.000.000 Zellen mittels einer 200 µl-Pipette in fünf nummerierte Transportbehälter (1 bis 5) eingeführt. Nähere Informationen zu den Transportbehältern finden sich im folgenden Abschnitt in Abbildung 7 und der daran angeschlossenen Tabelle 16.

3.3.1.4 Transportbehälter

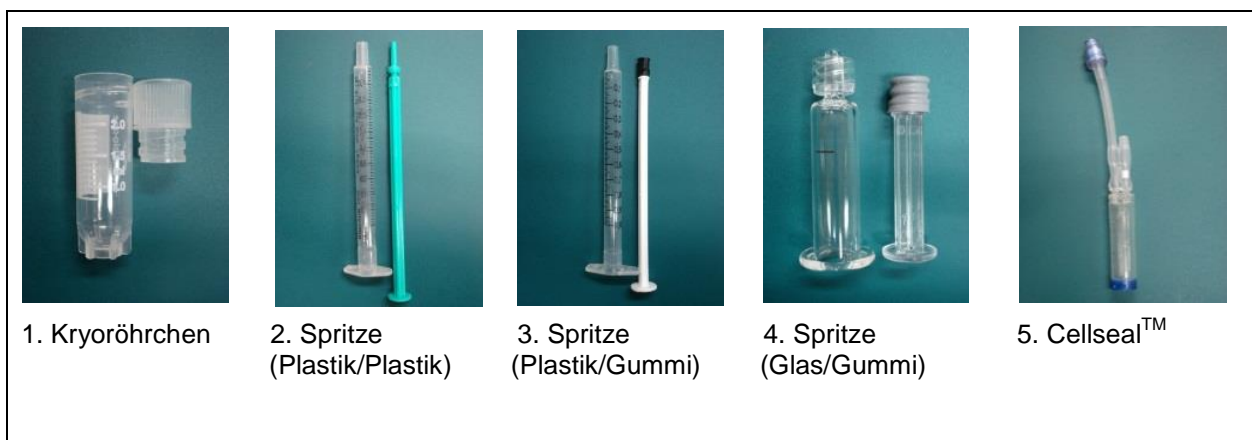


Abb. 7: In der Studie untersuchte Transportbehälter.

Tab. 16: Detailinformationen zu den in der Studie untersuchten Transportbehältern.

Behälter	Charakteristika	Hersteller; Produktnummer
1. Kryoröhrchen	Plastik Körper mit Plastikdeckel, 2 ml	<i>Greiner bio-one</i> , Frickenhausen, BRD; Art.nr.126263
2. Spritze	Pastikkörper mit Pastikkolben, 1 ml	Injekt Innohep, B. Braun, Melsungen, BRD; Art.nr. 9166017V
3. Spritze	Pastikkörper mit Gummikolben, 1 ml	<i>Henry Schein Vet</i> , Hamburg, BRD; Art.nr. 70-003
4. Spritze	Glaskörper mit Gummikolben, 2 ml	<i>Gerresheimer</i> , Düsseldorf, BRD; Art.nr. 663570002; 513010007; 423040001
5. Cellseal™	Plastikkörper, 2 ml	<i>General Biotechnology</i> , Indianapolis, USA; Art.nr. 10223-700-47

Zunächst wurden alle Behälter verschlossen, bei den Behältern Nr. 2, 3 und 4 wurde mindestens die Hälfte der Luftmenge (d. h. 500 µl Luft) abgelassen, Behälter Nr. 1 und 5 sind nicht regelbar. Alle Behälter wurden unter Standardbedingungen bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Nach 24 Stunden (Zeit₁) wurden die Versuchsparameter der Zellen in jedem Behälter untersucht.

<ul style="list-style-type: none"> - 1 x 10⁶ MSC ml - 0,5 ml/Behälter - 24 Stunden Inkubation - DMEM high glucose ohne Phenolrot - 20 % FBS 	} (5 x 10 ⁶ MSC /Behälter)
---	---------------------------------------

Abb. 8: Standardkonditionen zur Lagerung bzw. Inkubation der Zellen in den Transportbehältern.

3.3.1.5 Zeit₁: Auswertung der Transportbehälter nach 24 Stunden Inkubationszeit

Am Ende der Expositionszeit in den Behältern wurden diese leicht geschwenkt, um das formierte Zellpellet zu lösen. Der Inhalt jedes Behälters wurde in Falconröhrchen transferiert und das erhaltene Volumen mittels Pipettierung durch eine 500 µl-Pipette bestimmt. Anhand dieser Werte wurde jedes Falconröhrchen wieder wie bei Z₀ mit phenolrotfreiem Medium auf 6 ml aufgefüllt und die Zellzählung für die Bestimmung der Zellvitalität mittels Neubauer-Kammer durchgeführt. Anschließend wurden die WST-1-Methode, die Zelldifferenzierung und die Proliferation unter den gleichen wie bei Z₀ beschriebenen Standardbedingungen durchgeführt.

Praktische Eigenschaften und die Handhabung der Behälter (Vor- und Nachteile) wurden ebenfalls beachtet und vermerkt.

Abhängig vom Untersuchungsergebnis aus dem ersten Teil der Studie wurde ein Behälter zur Weiteruntersuchung für den zweiten Teil ausgewählt.

3.3.2 Teil 2: Untersuchung zum optimalen Verhältnis von Medium, Temperatur und Zeit

3.3.2.1 Studiendesign zum zweiten Teil der Studie

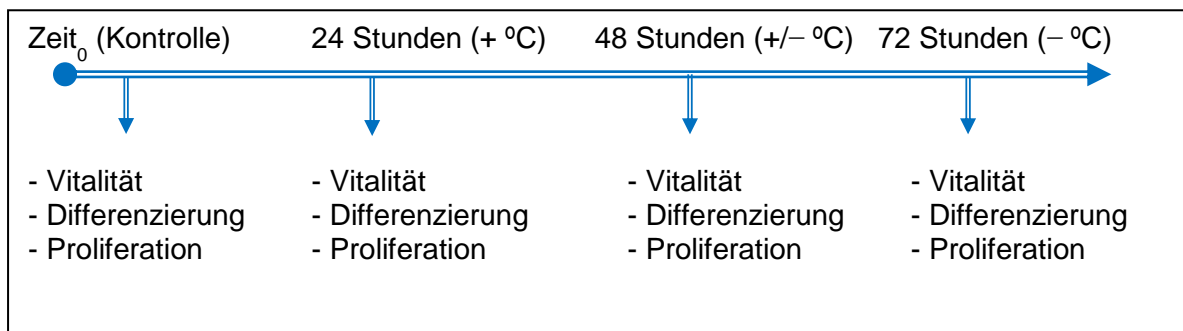


Abb. 9: Schematische Darstellung des zweiten Teils der Studie.

Zellen wurden aus dem Knochenmark isoliert ($n = 6$), in Zellkulturflaschen ausgesät und direkt bis P_3 vermehrt (P_1 in $1-2 \times T_{75}$, P_2 in $2-4 \times T_{175}$ und P_3 in $23-26 \times T_{175}$). Die erhaltene Zellsuspension wurde in Falconröhrchen zentrifugiert und die Zellzählung und Errechnung der Vitalität umgehend mittels Neubauer-Kammer durchgeführt. Anschließend wurden 29 Falconröhrchen von 0 bis 28 nummeriert, wobei 0 als Kontrolle fungierte. Die mit 1 bis 16 beschrifteten Falconröhrchen wurden für die Evaluierung des positiven Temperaturbereichs entnommen, während die mit 17 bis 28 beschrifteten Falconröhrchen für die Evaluierung der Versuchsparameter im negativen Temperaturbereich genutzt wurden.

Aus der gesamten Zellsuspension wurden 5 Millionen Zellen in jeden Behälter gegeben, die anschließend zentrifugiert wurden (5 min, 4 °C, 600 xg). Als Nächstes wurde der Überstand abgesaugt, die Falconröhrchen wurden umgedreht aufgestellt, um die gesamte Flüssigkeit abfließen lassen zu können.

Die Zellen für den negativen Temperaturbereich wurden erst zentrifugiert und vorbereitet, nachdem die Bedingungen für den positiven Temperaturbereich hergestellt worden waren. Es wurden vier verschiedene Medien für den positiven und drei für den negativen Temperaturbereich nach verschiedenen Zeiten und Temperaturen evaluiert. Es wurde eine Standardzellkonzentration von 10.000.000/ml für alle Bedingungen benutzt.

Die Zellen für die Kontrolle wurden mit phenolrotfreiem Medium resuspendiert. Die Medien für jede Versuchsbedingung sowie die jeweilige Temperatur-Zeit-Beziehung sind in der folgenden Tabelle unter dem Punkt Untersuchungsbedingungen zusammengefasst.

3.3.2.2 Untersuchungsbedingungen

Tab. 17: Anordnung der Konditionen und Darstellung der Beziehungen zwischen Medium, Temperatur und Zeit.

Bedingungen im positiven Temperaturbereich			
0. Kontrolle			
1. PBS; 4 °C; 24 h	5. KMÜ; 4 °C; 24 h	9. Plasma; 4 °C; 24 h	13. Hyp; 4 °C; 24 h
2. PBS; 4 °C; 48 h	6. KMÜ; 4 °C; 48 h	10. Plasma; 4 °C; 48 h	14. Hyp; 4 °C; 48 h
3. PBS; RT; 24 h	7. KMÜ; RT; 24 h	11. Plasma; RT; 24 h	15. Hyp; RT; 24 h
4. PBS; RT; 48 h	8. KMÜ; RT; 48 h	12. Plasma; RT; 48 h	16. Hyp; RT; 48 h
Bedingungen im negativen Temperaturbereich			
17. KMÜ; -20 °C; 48 h	21. Plasma; -20 °C; 48 h	25. Cryostor; -20 °C; 48 h	
18. KMÜ; -20 °C; 96 h	22. Plasma; -20 °C; 72 h	26. Cryostor; -20 °C; 72 h	
19. KMÜ; -80 °C; 48 h	23. Plasma; -80 °C; 48 h	27. Cryostor; -80 °C; 48 h	
20. KMÜ; -80 °C; 96 h (+ 10 % DMSO)	24. Plasma; -80 °C; 72 h (+ 10 % DMSO)	28. Cryostor; -80 °C; 72 h (gebrauchsfertig, inklusive 10 % DMSO)	

Wie beim ersten Teil des Versuchs wurde eine Standardmenge von 500 µl für alle Bedingungen genutzt. Diese wurde mit dem Zellpellet gemischt und mittels einer 200 µl-Pipette in den im ersten Teil ausgewählten Behälter gegeben. Dieses Verfahren wurde auch für die Zellen im mit 0 nummerierten Falconröhrchen (Kontrolle) durchgeführt. Alle Behälter wurden lichtgeschützt gelagert. Die Behälter, die im negativen Temperaturbereich gelagert wurden, wurden mit Parafilm® bedeckt.

3.3.2.3 Auswertung der Kontrolle und der Konditionsbedingungen

Alle Zellen aus den Behältern im positiven und negativen Temperaturbereich (inklusive Kontrolle) wurden in beschriftete 50 ml-Falconröhrchen transferiert, mit 15 ml PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert (5 min, 4 °C, 600 RCF). Nach der Zentrifugation wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Falconröhrchen wurden umgedreht aufgestellt. Die Zellpellets wurden mit 5 ml phenolrotfreiem Medium resuspendiert, gemischt und gezählt. Die Zellvitalität und die WST-1-Methode wurden anhand einer Standardmenge von 500 µl pro Falconröhrchen durchgeführt, welche in 24-Well-Platten transferiert und mit 50 µl WST-Lösung gemischt wurden.

Die nach dem WST-1-Versuch erhaltene Zellzahl wurde für jede Bedingung bestimmt und bei allen Falconröhrchen wurden 40,5 ml dazugegeben, um schließlich in 45 ml derselben Zellkonzentration wie im ersten Teil der Studie erhalten zu können. Die Messung und die weitere Durchführung der WST-1-Methode sowie weitere notwendige Schritte zur Zelldifferenzierung und Zellproliferation wurden wie in Teil 1 der Studie durchgeführt. Nach Erhalt der Ergebnisse wurde eine optimale Medium-Zeit-Beziehung für den positiven und negativen Temperaturbereich ausgewählt, um mit dem dritten Teil des Versuches fortzufahren.

3.3.3 Teil 3: Untersuchung zur optimalen Zellkonzentration

3.3.3.1 Studiendesign zum dritten Teil der Studie

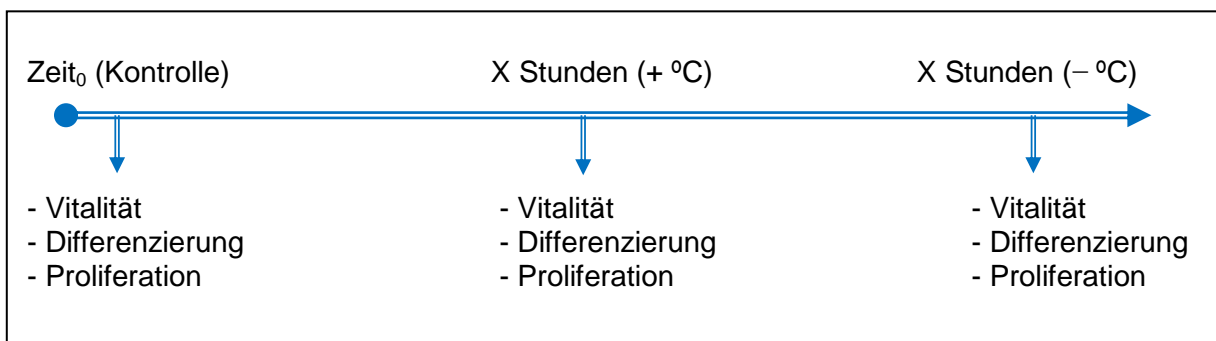


Abb. 10: Schematische Darstellung des dritten Teils der Studie.

Die Zellbearbeitung bis zum Erreichen der notwendigen Zellzahl wurde ähnlich wie beim ersten Teil durchgeführt. (Zellen aus P₀ wurden aufgetaut und bis P₃ wie folgt vermehrt: P₁ in 1-2 × T₇₅, P₂ in 2-4 × T₁₇₅ und P₃ in 18-22 × T₁₇₅, n = 6). Nach dem Passagieren der Zellen wurde die erhaltene Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Falconröhrchen wurden umgedreht aufgestellt und das Zellpellet mit 45 ml phenolrotfreiem Medium aufgefüllt. Anschließend wurde die Zellzählung und Errechnung der Vitalität mittels Neubauer-Kammer durchgeführt.

Es wurden neun Falconröhrchen mit 1 bis 9 nummeriert, die ersten drei (1 bis 3) wurden als Kontrolle gekennzeichnet. In diese wurde eine Zellzahl von 5, 10 und 20 Millionen Zellen eingegeben. Die Versuchsanordnung für die evaluierten Zellkonzentrationen des positiven und negativen Temperaturbereichs ist in folgender Tabelle zusammengefasst.

3.3.3.2 Untersuchungsbedingungen

1. Kontrolle:	5.000.000 Zellen/ml
2. Kontrolle:	10.000.000 Zellen/ml
3. Kontrolle:	20.000.000 Zellen/ml
4. Medium ⁺ ; Temperatur ⁺ ; Zeit:	5.000.000 Zellen/ml
5. Medium ⁺ ; Temperatur ⁺ ; Zeit:	10.000.000 Zellen/ml
6. Medium ⁺ ; Temperatur ⁺ ; Zeit:	20.000.000 Zellen/ml
7. Einfriermedium; Temperatur ⁻ ; Zeit:	5.000.000 Zellen/ml
8. Einfriermedium; Temperatur ⁻ ; Zeit:	10.000.000 Zellen/ml
9. Einfriermedium; Temperatur ⁻ ; Zeit:	20.000.000 Zellen/ml

Abb. 11: Versuchsanordnung zur Evaluierung von drei Zellkonzentrationen im Hinblick auf die Beziehung zwischen Behälter, Medium, Temperatur und Zeit.

Anschließend wurden die neun Falconröhrchen jedes Probanden zentrifugiert (5 min, 4 °C, 600 RCF), der Überstand abgesaugt und die Falconröhrchen umgedreht aufgestellt.

Abhängig vom Temperaturbereich wurde jedes Zellpellet mit 1000 µl eines bestimmten Mediums (siehe die Ergebnisse aus Teil 2) aufgefüllt – danach wurde das Pellet gelöst bzw. gemischt. Die Kontrolle wurde mit phenolrotfreiem Medium hergestellt.

Die neue Zellsuspension wurde wie beim zweiten Teil der Studie für beide Temperaturbereiche in einen Standardbehälter transferiert, diese wurden für eine bestimmte Zeit (siehe die Ergebnisse aus Teil 2) gelagert.

3.3.3.3 Auswertung der Kontrolle und der Konditionsbedingungen

Anschließend wurde die Auswertung der Kontrolle durchgeführt. Die 5, 10 und 20 Millionen Zellen wurden in die Versuchsbehälter transferiert, in den 15 ml PBS beschrifteten Falconröhrchen gewaschen und zentrifugiert (5 min, 4 °C, 600 RCF). Der Überstand des erhaltenen Zellpellet wurde abgesaugt. Die Falconröhren wurden umdreht aufgestellt, das Zellpellet mit 5 ml phenolrotfreiem Medium resuspendiert und für die Herstellung des WST-1-Tests gemischt. Alle Methoden des dritten Teils der Studie inklusive Auswertungen, Mengenverhältnisse und Verfahrensmethoden wurden exakt wie im zweiten Teil durchgeführt.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Studiendaten erfolgte mittels SPSS (Versionen 17, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) und EXCEL 2010 (Microsoft Inc., Redmond, Washington, USA). Für alle Datensätze wurde die deskriptive Statistik berechnet. Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mittels des Shapiro-Wilk Tests. Die Daten wurden als Median und mittlerer Interquartilabstand (IQR) dargestellt. Die Visualisierung erfolgte mittels Box-Whisker-Plots. Gruppenvergleiche wurden unter Verwendung von Friedman- bzw. Wilcoxon Tests durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt. Eine Anpassung des Signifikanzniveaus bei multiplen Vergleichen wurde mittels Bonferroni Korrektur durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Teil 1: Behälter

4.1.1 Evaluierung der Endvolumen pro Behälter

Der Vergleich des Endvolumens von FBS-DMEM suspendierten Pferde-KM-MSC ergab nach 24 Stunden bei Verwendung verschiedener Behältnisse sowie im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied. Das Volumen in Behälter Nr. 4 war am größten ($V = 453 \mu\text{l}$) und in Behälter Nr. 5 am niedrigsten ($V = 390 \mu\text{l}$). Im Vergleich der Medianwerte der Volumina erscheinen Spritzen als die bestmöglichen Behältnisse (siehe Abbildung 12 und Tabelle 18).

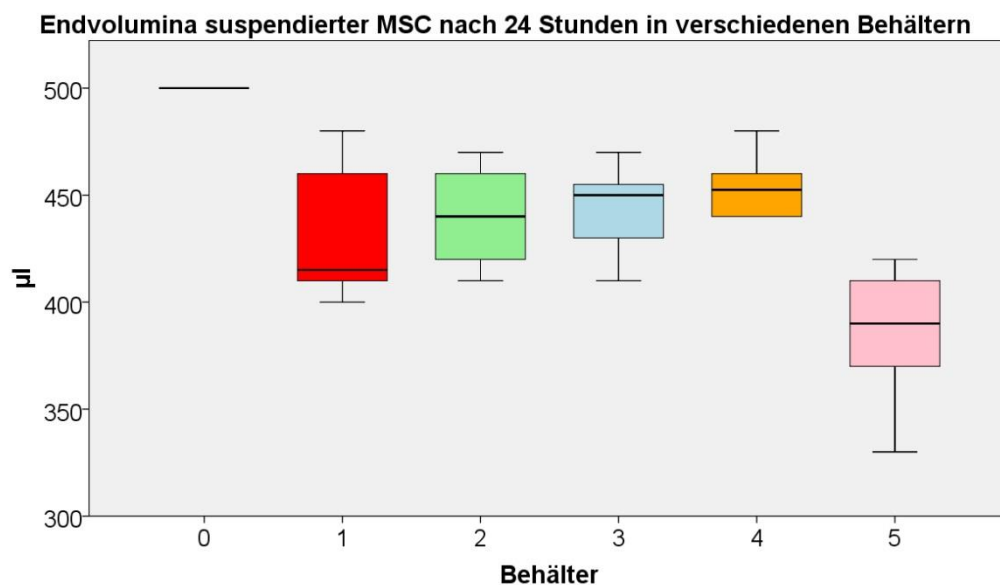


Abb. 12: Vergleich des KM-MSC-Endvolumens in μl nach 24 h Inkubationszeit. Werte sind in Median (IQR) angezeigt, wobei 0: Originalvolumen bzw. Kontrollwert; 1: Kryoröhrchen; 2: Plastikspritze mit Plastikkolben; 3: Plastikspritze mit Gummikolben, 4: Glasspritze mit Gummikolben und 5: Cellseal™.

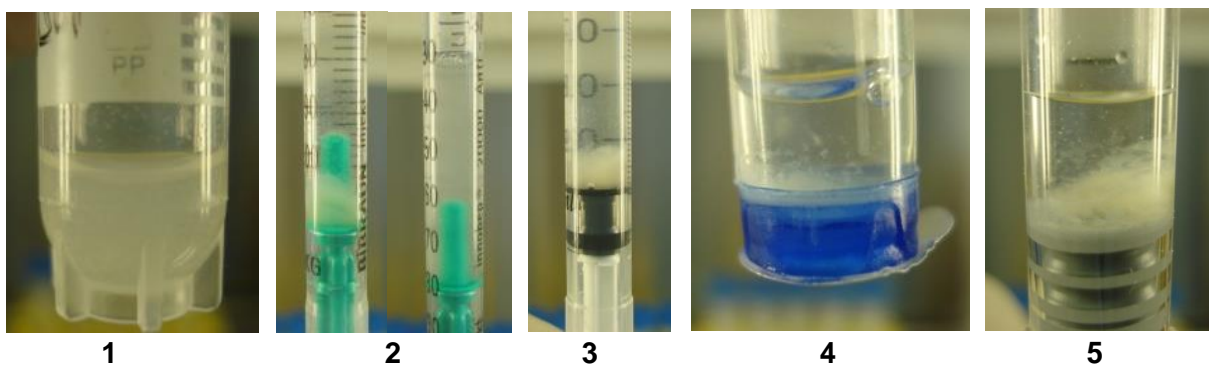


Abb. 13: Darstellung der verschiedenen Behälter (1–5) mit MSC nach 24 Stunden Inkubationszeit. Bei Behälter Nr. 2 ist der Zustand vor und nach dem Mischen angezeigt.

Tab. 18: Darstellung des Endvolumens in μl . In Klammern ist der Prozentanteil des Originalvolumens 500 μl (100 %) angezeigt (Information zu Abb. 12).

Endvolumen in μl	Behälter				
	1	2	3	4	5
Median	415,0 μl (83 %)	440 μl (88 %)	450 μl (90 %)	453 μl (91 %)	390 μl (78 %)
<i>IQR</i>	40	35	19	16	35

4.1.2 Evaluierung der Zellvitalität

4.1.2.1 Evaluierung der Zellvitalität durch Trypanblau-Färbung

Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde eine Senkung der Zellvitalität in allen Behältern nachgewiesen (Kontrollwert 76,83 %). Die höchste Zellvitalität wurde bei Inkubation in der Glasspritze mit Gummikolben (Behälter Nr. 4) erreicht (43,98 %), die geringste Zellvitalität mit 37,41 % dagegen in der Plastikspritze mit Plastikkolben (Behälter Nr. 2). Dabei konnte im Vergleich zwischen den verschiedenen Behältern und der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied der Zellvitalität festgestellt werden.

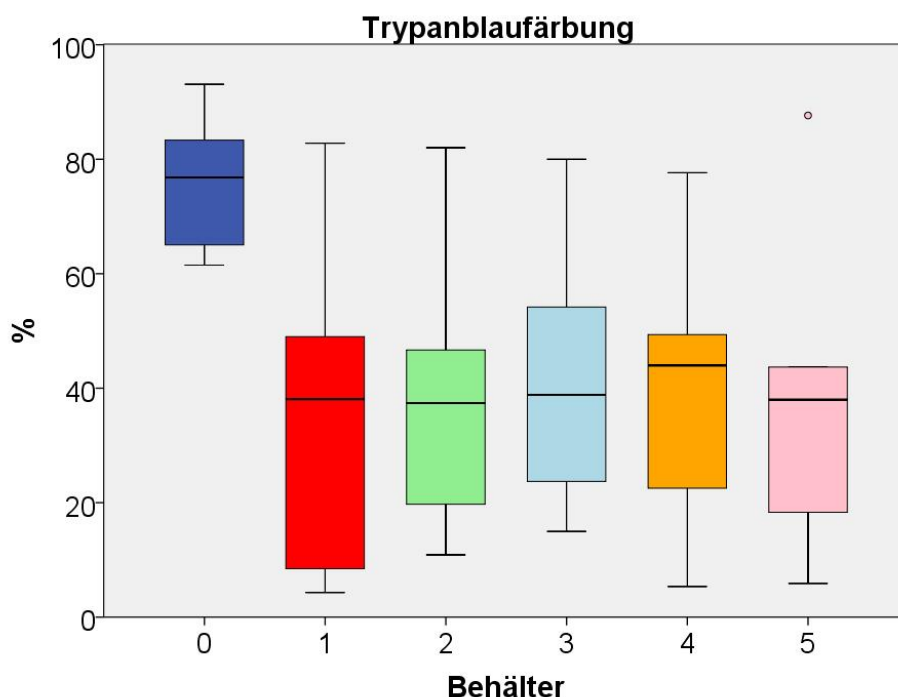


Abb. 14: Vergleich der Zellvitalität (in %) durch Trypanblau-Färbung nach 24 Stunden Inkubationszeit, wobei 0: Kontrollwert; 1: Kryoröhrchen; 2: Plastikspritze mit Plastikkolben; 3: Plastikspritze mit Gummikolben; 4: Glasspritze mit Gummikolben und 5: Cellseal™.

Tab. 19: Darstellung des Medianwertes sowie IQR der Zellvitalität der MSC nach 24 h Inkubationszeit. Die Werte sind in Prozent angezeigt, wobei 0: Kontrollwert; 1: Kryoröhrchen; 2: Plastikspritze mit Plastikkolben; 3: Plastikspritze mit Gummikolben; 4: Glasspritze mit Gummikolben und 5: Cellseal™ (Information zu Abb. 14).

Trypanblau-Färbung	Behälter					
	0	1	2	3	4	5
Median %	76,8 (100 %)	38,1 (49,6 %)	37,4 (48,7 %)	38,9 (50,7 %)	43,9 (57,2 %)	37,9 (49,4 %)
<i>IQR</i>	14,6	31,2	23,9	22,9	20,3	20,0

4.1.2.2 Evaluierung der Zellvitalität durch WST-1-Reagenztest

Bei einem photometrischen Vergleich der Bildung von Formazan in den verschiedenen Behältern und im Vergleich zu der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden. Nach 24 Stunden Inkubationszeit war im Vergleich zum Kontrollwert allerdings immer eine Verminderung der Formazanbildung in allen Behältern zu verzeichnen.

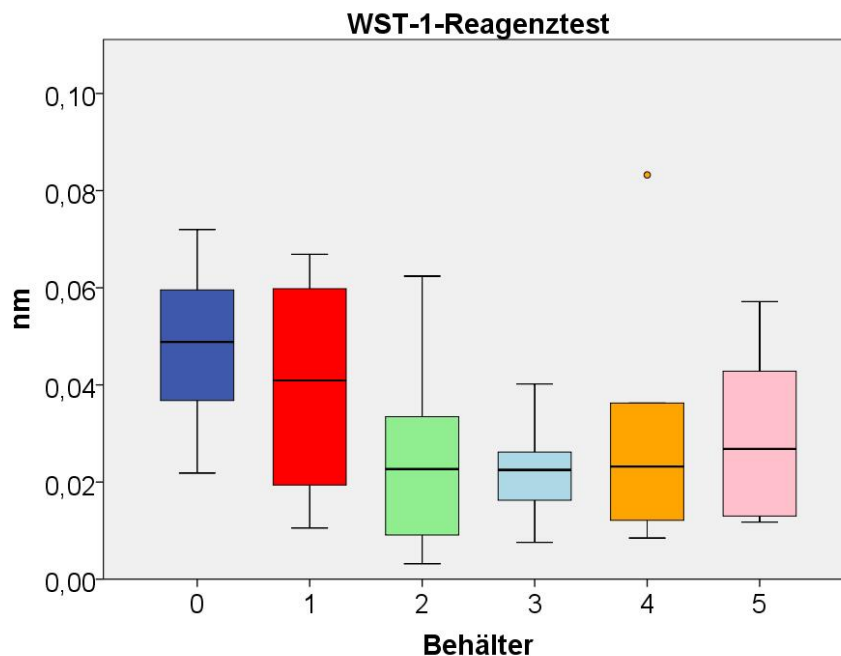


Abb.15: Vergleich der Zellvitalität (in nm) mithilfe eines WST-1-Reagenztests nach 24 h Inkubationszeit. Werte sind in Median (IQR) angezeigt, wobei 0: Kontrollwert; 1: Kryoröhrchen; 2: Plastikspritze mit Plastikkolben; 3: Plastikspritze mit Gummikolben; 4: Glasspritze mit Gummikolben und 5: Cellseal™.

Tab. 20: Darstellung der photometrischen Messung von Formazan mittels WST-1-Reagenztest. Diese Ergebnisse sind in nm angezeigt, wobei 0: Kontrollwert; 1: Kryoröhrchen; 2: Plastikspritze mit Plastikkolben; 3: Plastikspritze mit Gummikolben; 4: Glasspritze mit Gummikolben und 5: Cellseal™.

WST-1-Reagenztest	Behälter					
	0	1	2	3	4	5
Median	0,049	0,041	0,023	0,023	0,023	0,027
<i>IQR</i>	0,017	0,038	0,019	0,008	0,020	0,023

4.1.3 Proliferationsverhalten der MSC

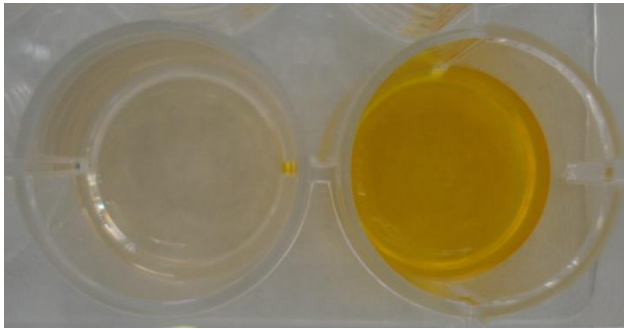


Abb. 16: Makroskopische Darstellung der Farbveränderung einer Kontrollprobe nach Inkubationszeit ohne MSC (links) zur Messung des Basalwertes von DMEM (high Glucose ohne Phenolrot) und WST-1-Reagenztest. Auf der rechten Seite ist die Farbveränderung aufgrund der Bildung von Formazan nach Inkubation mit MSC dargestellt (24-Well-Zellkulturplatte).

Die quantitative Analyse der kPV ergab keinen signifikanten Unterschied sowohl im Proliferationsvermögen zwischen den verschiedenen Behältern als auch im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Proliferationsrate der MSC blieb über den gesamten Versuchszeitraum in allen Behältern gleich (siehe Abbildung 17). Der Ausgangswert lag in allen Behältern über dem Kontrollwert.

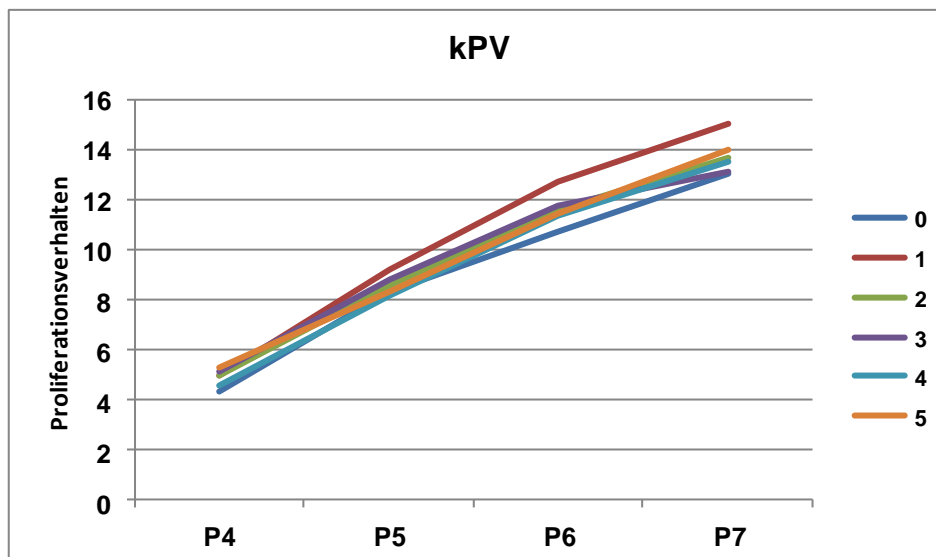


Abb. 17: Graphische Darstellung des Verlaufs der kPV von Versuchsbeginn bis Versuchsende.

Tab. 21: Ergebnisse der quantitativen Auswertung der kPV der MSC. Werte stehen für die Anzahl der kPV.

Passage		Behälter					
		0	1	2	3	4	5
P4	Median	4,325	4,942	4,957	5,136	4,547	5,330
	IQR	0,213	1,257	0,425	0,808	0,242	1,258
P5	Median	8,334	9,208	8,582	8,776	8,159	8,341
	IQR	0,745	0,789	0,638	0,741	1,402	1,153
P6	Median	10,694	12,664	11,598	11,708	11,367	11,410
	IQR	1,567	1,575	1,419	1,660	2,375	0,453
P7	Median	12,986	14,992	13,668	13,086	13,493	13,984
	IQR	1,730	1,716	1,697	1,723	2,793	1,517

4.1.4 Evaluierung des Differenzierungspotentials der MSC

4.1.4.1 Adipogene Differenzierung

Die semi-quantitative Auswertung der Oil Red O-gefärbten MSC ergab im Vergleich verschiedener Behälter sowie im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied im adipogenen Differenzierungspotential. Eine Differenzierung der MSC in die adipogene Richtung konnte bei allen Proben nachgewiesen werden. Einige Probanden erreichten in Abhängigkeit der Oil Red O-Färbung eine maximale Punktzahl von 2, jedoch lagen die Medianwerte bei 1,5 Punkten. Nach Induktion der MSC in die adipogene Richtung konnte eine morphologische Veränderung für alle Pferdeprobanden ausgemacht werden (Punktzahl 3 von 3). Eine repräsentative histologische Aufnahme der adipogenen Zelldifferenzierung ist in Abbildung 19 dargestellt.

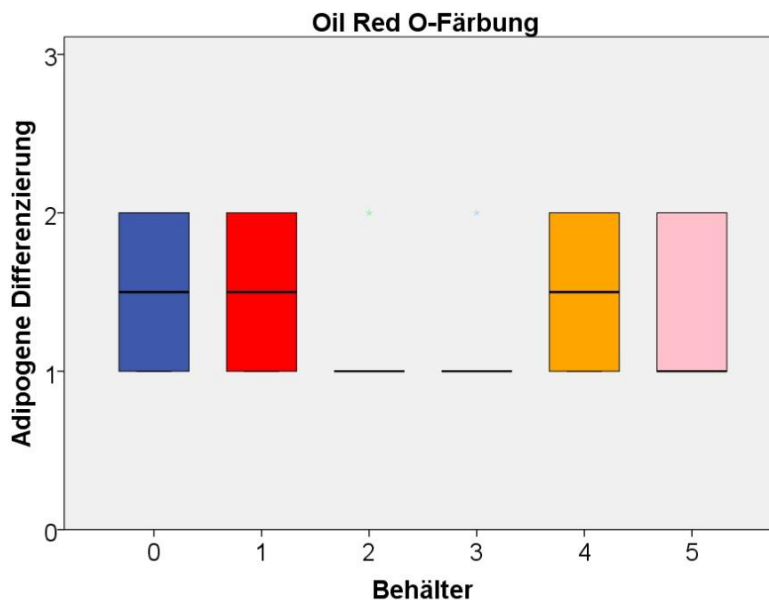


Abb. 18: Graphische Darstellung der qualitativen Auswertung der adipogen differenzierten MSC. Die Werte sind in Median (\pm IQR) angezeigt, wobei 0: Kontrollwert; 1: Kryoröhrchen; 2: Plastikspritze mit Plastikkolben; 3: Plastikspritze mit Gummikolben; 4: Glasspritze mit Gummikolben und 5: Cellseal™.

Tab. 22: Ergebnisse der qualitativen Auswertung der adipogen differenzierten MSC. (Information zu Abb. 18).

Adipogene Differenzierung		Behälter					
		0	1	2	3	4	5
Oil Red O-Färbung	Median	1,5/3	1,5/3	1/3	1/3	1,5/3	1/3
	IQR	1	1	0	0	1	0,75
Morphologie	Median	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	IQR	0	0	0	0	0	0

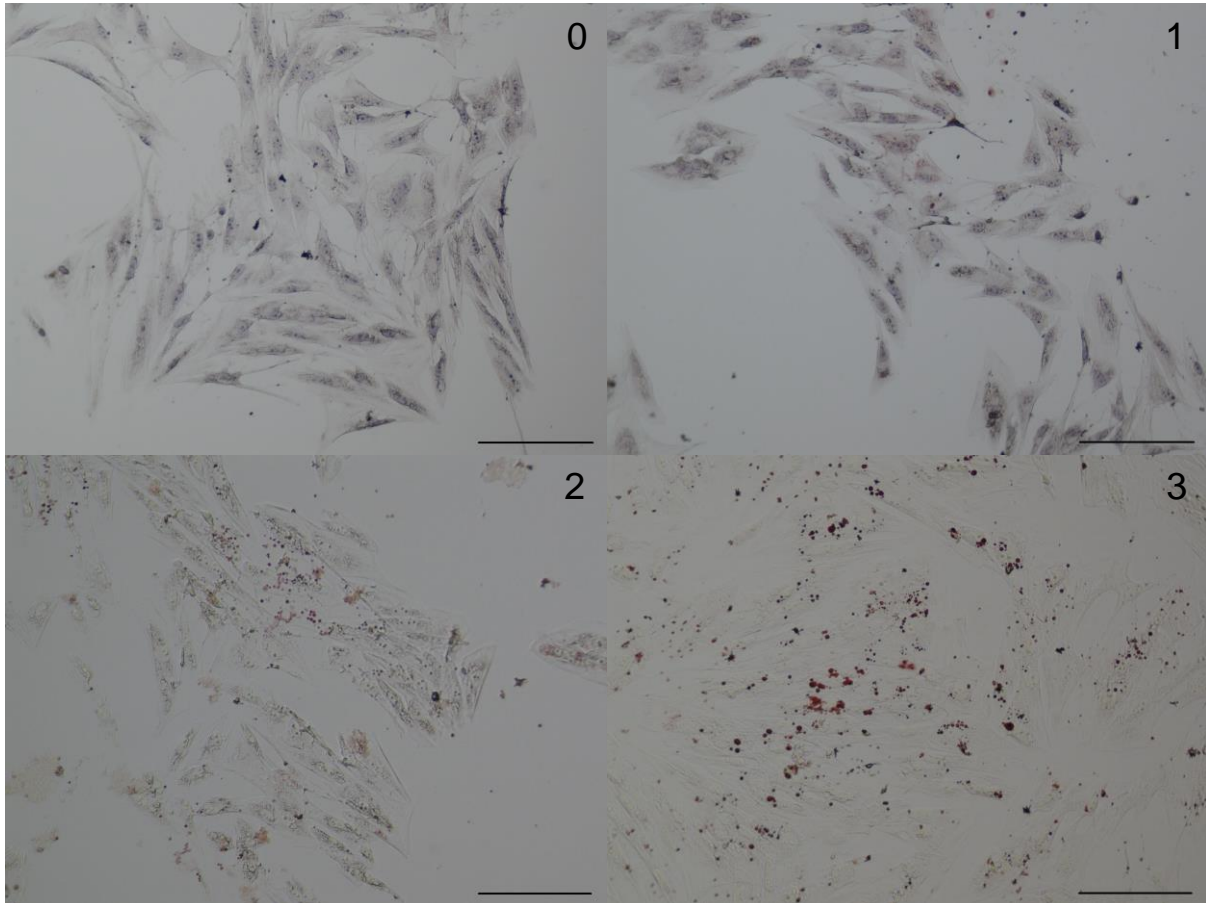


Abb. 19: Histologische Aufnahmen (20 X) nach adipogener Differenzierung von MSC im Grad 0 bis 3. Intrazellulär gelegene, rot angefärbte Lipidtröpfchen sprechen für die positive adipogene Differenzierung (Scale Bar 100 μ m).

4.1.4.2 Osteogene Differenzierung

A) Frühe Osteogenese

Die semi-quantitative Auswertung der AP-gefärbten Proben ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied im frühen osteogenen Differenzierungspotential beim Vergleich in verschiedenen Behältern und zur Kontrollgruppe. Eine Differenzierung der MSC in die osteogene Richtung konnte bei allen Probanden nachgewiesen werden (Tabelle 23). Eine repräsentative histologische Aufnahme ist in Abbildung 21 dargestellt.

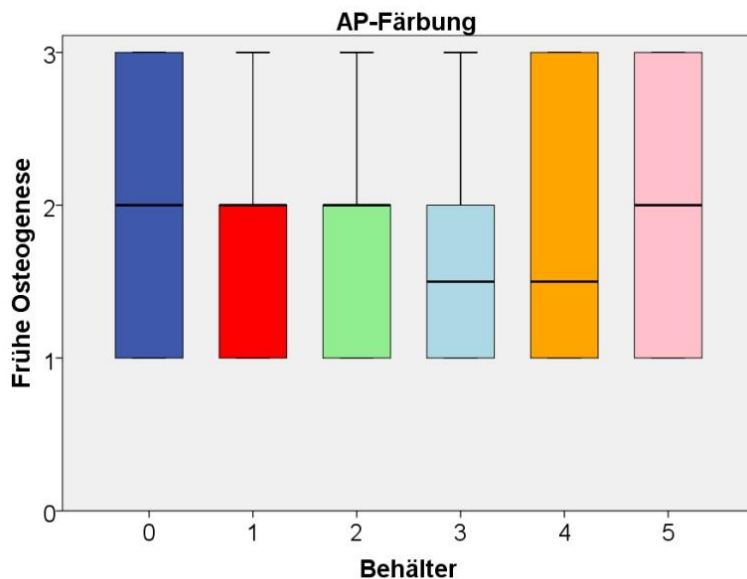


Abb. 20: Graphische Darstellung der Ergebnisse der frühen Osteogenese, wobei 0: Kontrollwert; 1: Kryoröhrchen; 2: Plastikspritze mit Plastikkolben; 3: Plastikspritze mit Gummikolben; 4: Glasspritze mit Gummikolben und 5: Cellseal™.

Tab. 23: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der frühen osteogenen Differenzierung der MSC (Information zu Abb. 20).

Frühe Osteogenese	Behälter					
	0	1	2	3	4	5
Median	2/3	2/3	2/3	1,5/2	1,5/2	2/3
IQR	1,5	0,75	0,75	1	1,75	1,5

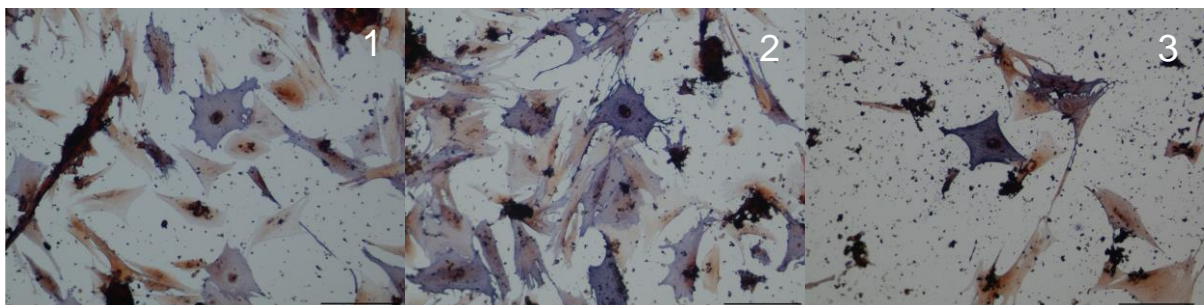


Abb. 21: Repräsentative histologische Aufnahmen (20 X) nach früher osteogener Differenzierung von MSC. Differenzierungsgrad 1, 2 und 3 sind angezeigt. Intrazellulär gelegene, blauviolett angefärbte AP-Granula sprechen für die positive frühe osteogene Differenzierung (Scale Bar 100 µm).

B) Späte Osteogenese

Die semi-quantitative Auswertung der Alizarinrot-gefärbten MSC-Proben ergab keinen signifikanten Unterschied im späten osteogenen Differenzierungspotential beim Vergleich der verschiedenen Behälter und der Kontrollgruppe. Eine optimale Differenzierung der MSC in die osteogene Richtung konnte bei allen Proben nachgewiesen werden (Tabelle 24). Repräsentative histologische Aufnahmen sind in Abbildung 23 dargestellt.

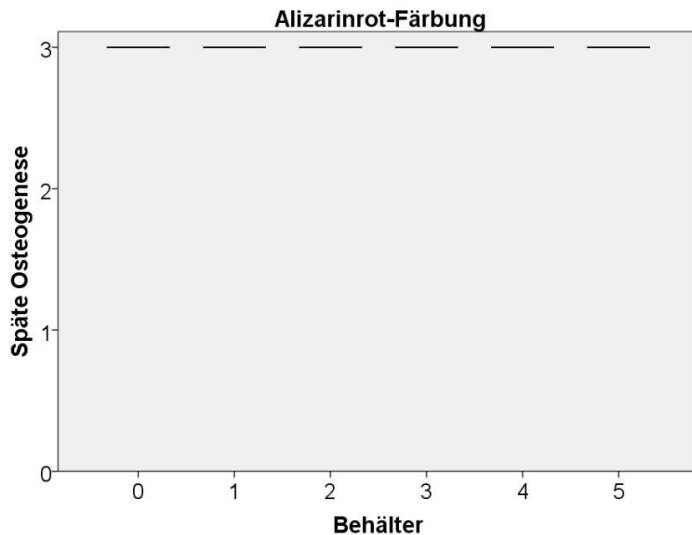


Abb. 22: Darstellung der qualitativen Auswertung der späten osteogen differenzierten MSC, wobei 0: Kontrollwert; 1: Kryoröhrchen; 2: Plastikspritze mit Plastikkolben; 3: Plastikspritze mit Gummikolben; 4: Glasspritze mit Gummikolben und 5: Cellseal™.

Tab. 24: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der späten osteogenen Differenzierung.

Späte Osteogenese	Behälter					
	0	1	2	3	4	5
Median	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
IQR	0	0	0	0	0	0

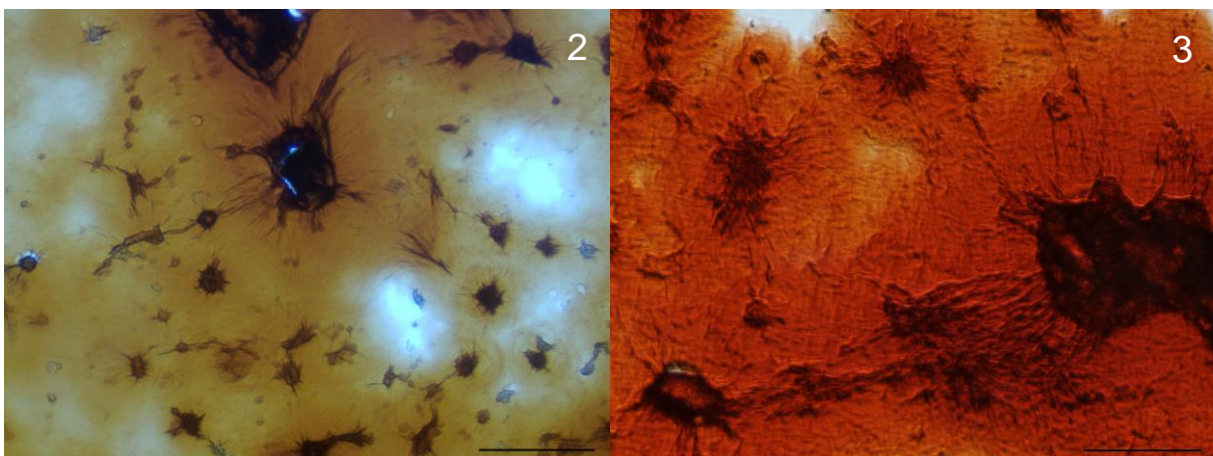


Abb. 23: Repräsentative histologische Aufnahmen (20 X) nach später osteogener Differenzierung von MSC. Differenzierungsgrad 2 und 3 sind angezeigt. Extrazellulär gelegene, rot angefärbte Kalziumdepots sprechen für die positive späte osteogene Differenzierung (Scale Bar 100 µm).

4.1.4.3 Chondrogene Differenzierung

A) Safranin O/Fast Green-Färbung (Bern-Score)

Die semi-quantitative Auswertung der Safranin O/Fast Green-gefärbten MSC-Proben (Neosynthese maturer Proteoglykane) ergab eine ähnliche Verminderung des chondrogenen Differenzierungspotentials in allen Behältern. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen ($p \leq 0,05$). Repräsentative histologische Aufnahmen für die Konditionsbedingungen sind in Abbildung 25 dargestellt.

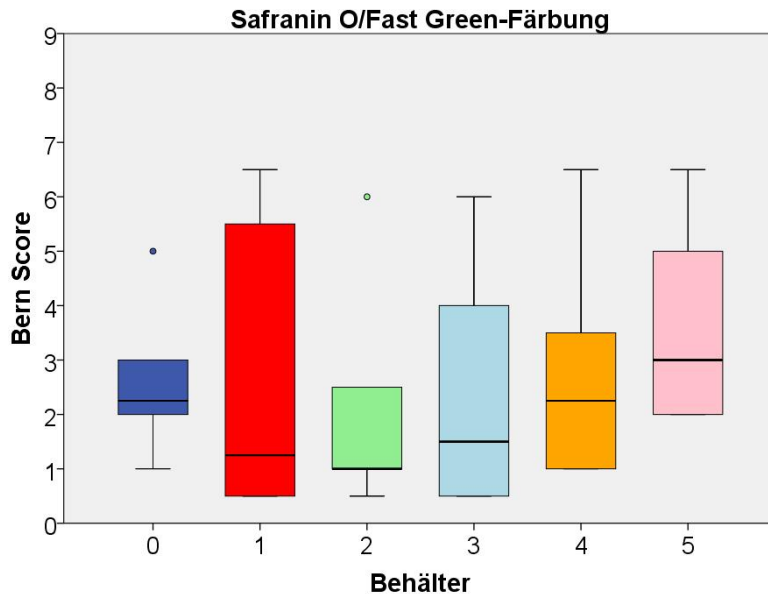


Abb. 24: Graphische Darstellung der Ergebnisse nach Bern Score, wobei 0: Kontrollwert; 1: Kryoröhrchen; 2: Plastikspritze mit Plastikkolben; 3: Plastikspritze mit Gummikolben; 4: Glasspritze mit Gummikolben und 5: Cellseal™.

Tab. 25: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der chondrogen differenzierten MSC-Pellets nach Bern-Score (Information zu Abb. 24).

Safranin O-Färbung	Behälter					
	0	1	2	3	4	5
Median	2,5/9	1,25/9	1/9	1,5/9	2,25/9	3/9
IQR	0,88	4,13	1,13	3,13	2,5	2,75

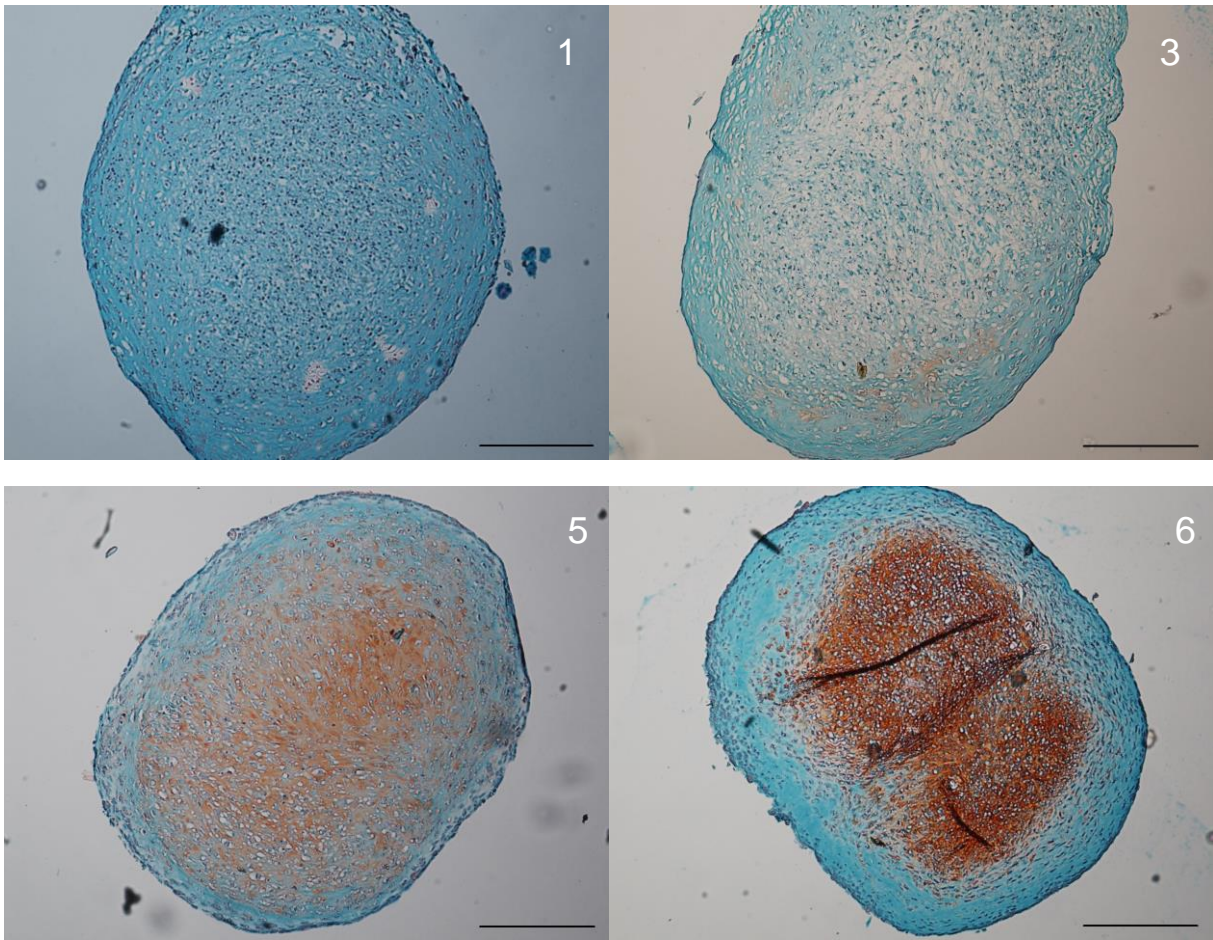


Abb. 25: Repräsentative histologische Aufnahmen (10 X) nach chondrogener Differenzierung von MSC-Pellets im Grad 1, 3, 5 und 6. Rotorange angefärbte Glykosaminoglykane und grün angefärbte Kollagene sprechen für die positive chondrogene Differenzierung (Scale Bar 200 μm).

B) Alcianblau-Färbung

Die semi-quantitative Auswertung der Alcianblau-gefärbten MSC-Proben ergab keine signifikanten Unterschiede im chondrogenen Differenzierungspotential zwischen den verschiedenen Behältern und zur Kontrollgruppe. Eine Differenzierung der MSC in die chondrogene Richtung (Präsenz von immaturren Proteoglykanen) konnte bei allen Proben nachgewiesen werden (Tabelle 26).

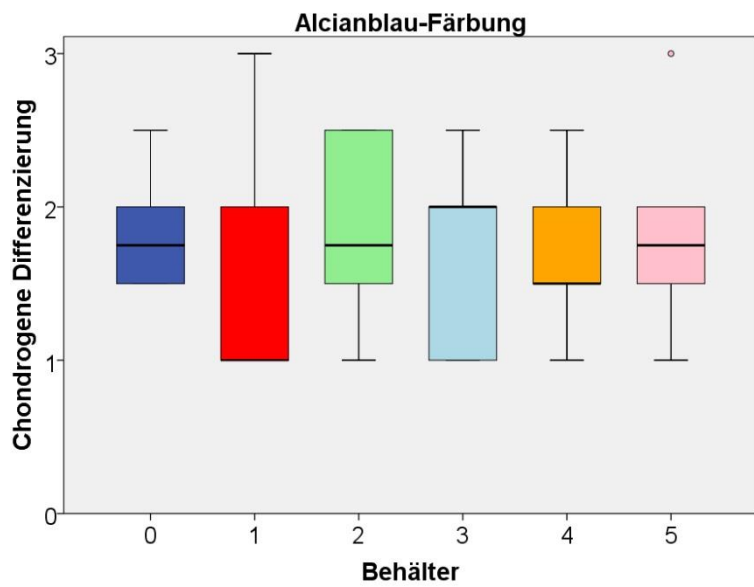


Abb. 26: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Alcianblau-Färbung, wobei 0: Kontrollwert; 1: Kryoröhrchen; 2: Plastikspritze mit Plastikkolben; 3: Plastikspritze mit Gummikolben; 4: Glasspritze mit Gummikolben und 5: Cellseal™.

Tab. 26: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der chondrogenen Differenzierung, Alcianblau-gefärbte MSC (Information zu Abb. 26).

Alcianblau-Färbung	Behälter					
	0	1	2	3	4	5
Median	1,75/3	1/3	1,75/3	2/3	1,5/3	1,75/3
IQR	0,5	0,75	0,88	0,75	0,38	0,5

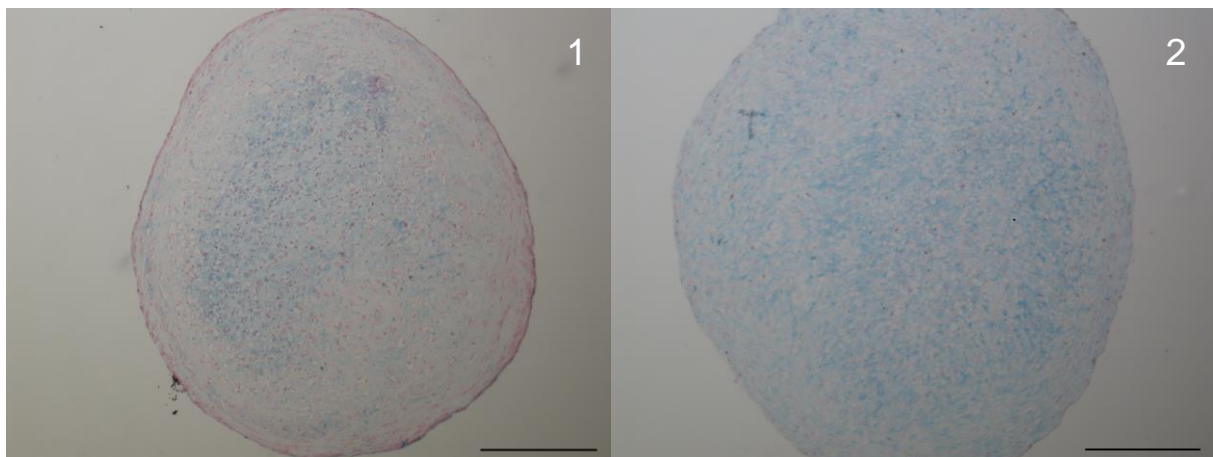


Abb. 27: Repräsentative histologische Aufnahmen (10 X) nach chondrogener Differenzierung von MSC im Pelletmodell im Grad 1 und 2. Türkisblau angefärbte Pellets sprechen für das Vorhandensein von immaturren Proteoglykanen (Scale Bar 200 µm).

C) Masson-Trichrom-Färbung

Die semi-quantitative Auswertung der Masson-Trichrom-gefärbten MSC ergab keine signifikanten Unterschiede im chondrogenen Differenzierungspotential zwischen den verschiedenen Behältern und der Kontrollgruppe. Eine Differenzierung der MSC in die chondrogene Richtung (Präsenz von Kollagenen) konnte bei allen Proben nachgewiesen werden.

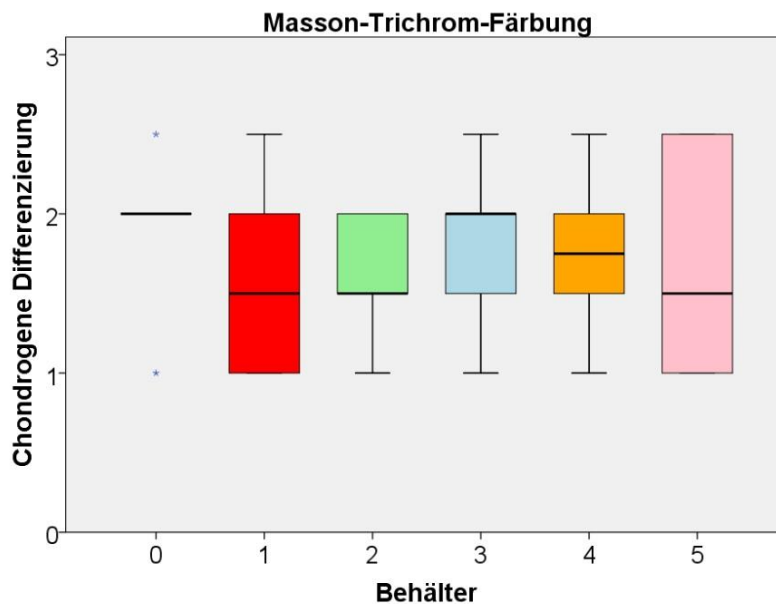


Abb. 28: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Masson-Trichrom-Färbung, wobei 0: Kontrollwert; 1: Kryoröhrchen; 2: Plastikspritze mit Plastikkolben; 3: Plastikspritze mit Gummikolben; 4: Glasspritze mit Gummikolben und 5: Cellseal™.

Tab. 27: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der chondrogenen Differenzierung, Masson-Trichrom-gefärbte MSC (Information zu Abb. 28).

Masson-Trichrom-Färbung	Behälter					
	0	1	2	3	4	5
Median	2/3	1,5/3	1,5/3	2/3	1,75/3	1,5/3
IQR	0	1	0,5	0,5	0,5	1,38

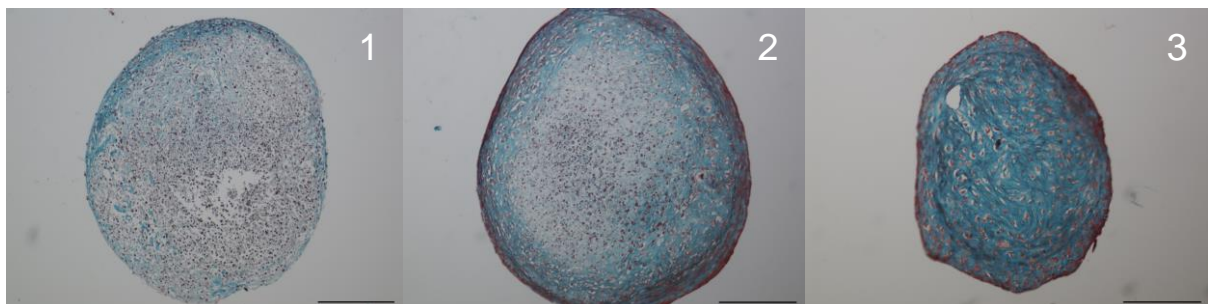


Abb. 29: Repräsentative histologische Aufnahmen (10 X) nach chondrogener Differenzierung von MSC-Pellets im Grad 1, 2 und 3. Grün angefärbte Kollagene sprechen für die positive chondrogene Differenzierung, Masson-Trichrom-Färbung (Scale Bar 200 µm).

4.2 Teil 2: Medium, Temperatur und Zeit

4.2.1 Evaluierung der Zellvitalität

4.2.1.1 Evaluierung der Zellvitalität durch Trypanblau-Färbung

Es wurde im Vergleich zum Kontrollwert eine Senkung der Zellvitalität in allen Bedingungen nachgewiesen (Kontrollwert 75,31 %). Die höchste Zellvitalität wurde im positiven Temperaturbereich nach 24 Stunden bei KMÜ erreicht, die niedrigste dagegen bei PBS. Die Tendenz zeigt einerseits, dass der Faktor Zeit die Zellvitalität der MSC beeinflusst, und andererseits, dass 4 °C besser als RT geeignet sind. Ein deutlicher Unterschied wurde also im negativen Bereich zwischen KMÜ (Kondition 17 bis 20), Plasma (Kondition 21 bis 24) und Cryostor (Kondition 25 bis 28) beobachtet. Trotz dieser deutlichen Veränderung der Zellvitalität wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (ebenso wenig im Vergleich zur Kontrollgruppe). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

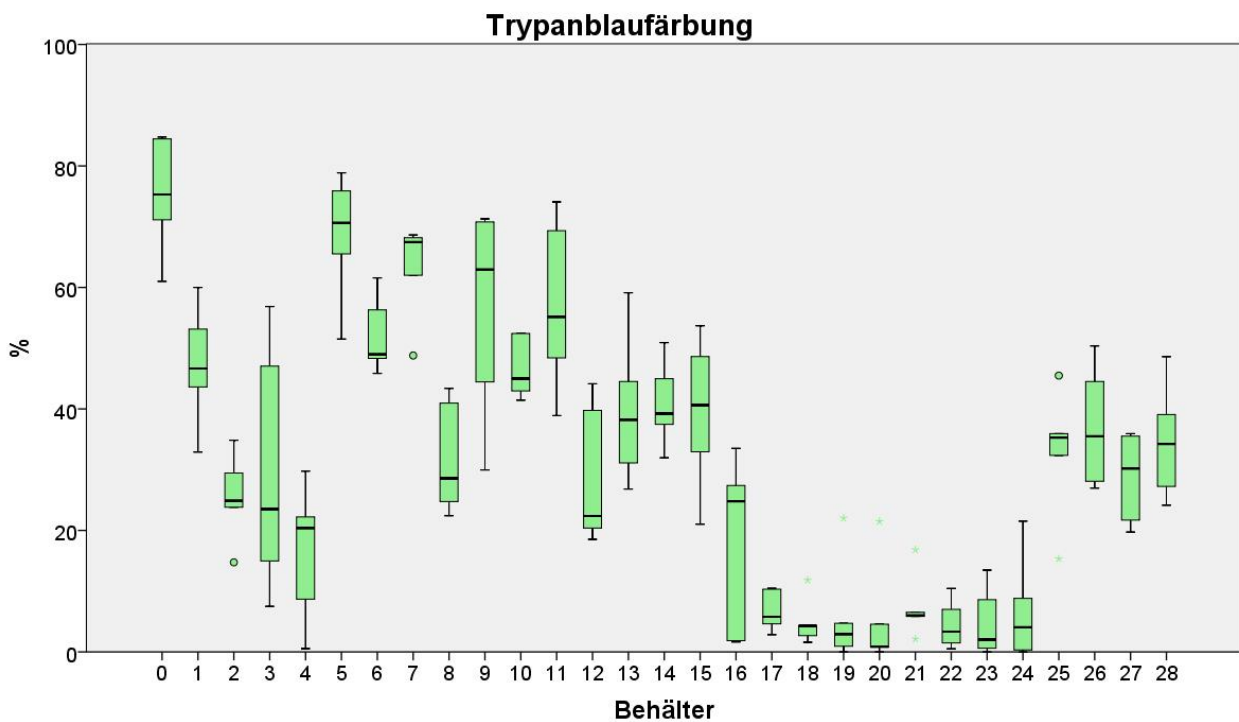


Abb. 30: Graphische Darstellung der Zellvitalität nach Evaluierung verschiedener Beziehungen zwischen Zeit und Temperatur des Mediums. Eine Liste der ausgewählten Bedingungen ist auf Seite 37 zu finden.

Tab. 28: Darstellung des Medianwertes sowie IQR der MSC-Zellvitalität (in %) nach Evaluierung unter verschiedenen Bedingungen hinsichtlich Medium, Temperatur und Zeit (Information zu Abb. 30).

Trypanblau-Färbung	Behälter										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Median	75,3	46,7	24,9	23,5	20,4	70,7	50,0	67,5	28,6	63,0	
<i>IQR</i>	(100 %)	(62,0 %)	(33,1 %)	(31,2 %)	(27,1 %)	(93,9 %)	(66,4 %)	(89,6 %)	(38,0 %)	(83,7 %)	
	11,0	9,5	5,6	32,1	13,5	8,4	6,3	4,7	13,2	23,4	
	Behälter										
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Median	45,0	55,3	22,4	38,2	39,2	40,6	24,8	5,8	4,3	3,0	
<i>IQR</i>	(59,8 %)	(73,4 %)	(29,8 %)	(50,7 %)	(52,1 %)	(53,9 %)	(32,9 %)	(7,7%)	(5,7%)	(4,0%)	
	8,0	18,7	15,4	11,1	6,1	14,7	20,0	5,7	1,7	3,8	
	Behälter										
	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
Median	0,9	6,0	3,3	2,0	4,1	35,3	35,5	30,2	34,2		
<i>IQR</i>	(1,2%)	(8,0%)	(4,4%)	(2,7%)	(5,5%)	(46,9%)	(47,2%)	(40,1%)	(45,4%)		
	3,8	0,7	5,5	8,0	8,5	3,6	16,4	13,8	11,9		

4.2.1.2 Evaluierung der Zellvitalität durch WST-1-Reagenztest

Durch den photometrischen Vergleich der Bildung von Formazan (nm) zeigten sich sehr ähnliche Ergebnisse wie bei der Trypanblau-Färbung. Die KMÜ-suspendierten MSC erreichten nach 24 Stunden bei 4 °C die höchste Zellvitalität (Behälter Nr. 5). Im positiven Temperaturbereich wurde die niedrigste Zellvitalität bei PBS erhalten, während KMÜ im Vergleich zu Plasma eine höhere Zellvitalität bedingte. Die Tendenz zeigt also, dass Temperatur und Zeit die Zellvitalität beeinflussen, wobei sich bei 4 °C und 24 Stunden die besten Bedingungen erstellten. Im negativen Bereich zeigte Cryostor die höchste Zellvitalität, wobei sich eine Zeit von 72 Stunden im Vergleich zu 48 Stunden positiver auswirkte. Kein signifikanter Unterschied wurde beobachtet ($p \leq 0,05$).

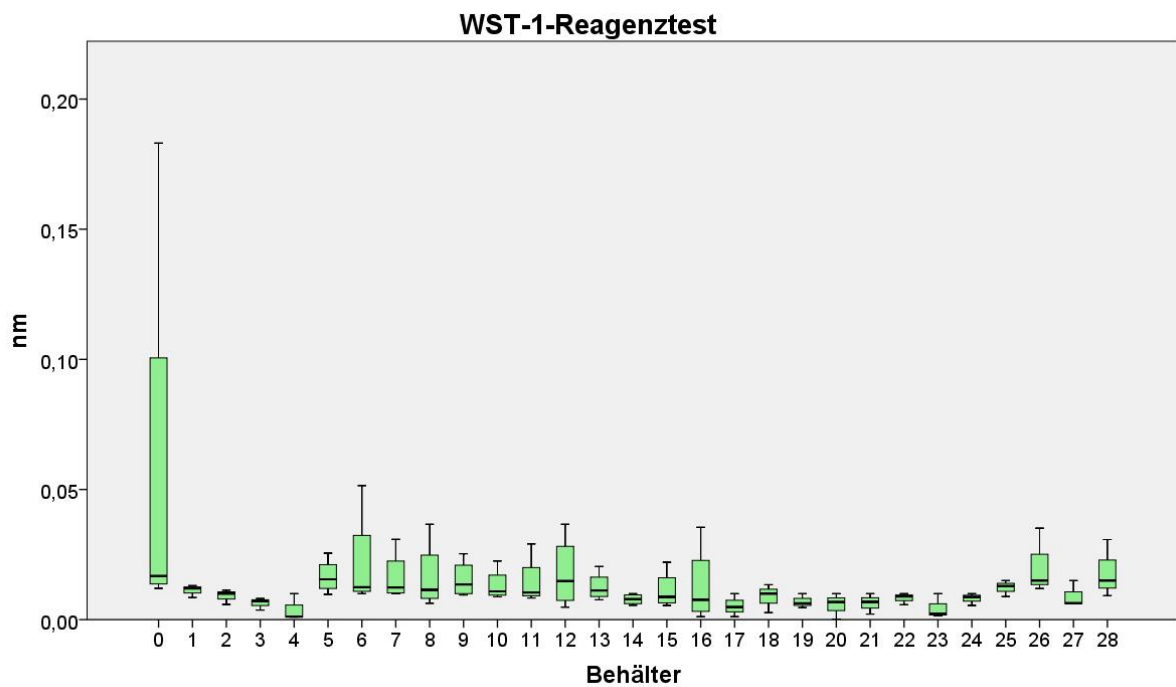


Abb. 31: Graphische Darstellung der Zellvitalität (nm) nach Evaluierung verschiedener Beziehungen zwischen Zeit und Temperatur des Mediums. Eine Liste der ausgewählten Bedingungen findet sich auf Seite 37.

Tab. 29: Darstellung des Medianwertes sowie IQR der MSC-Zellvitalität (nm) nach Evaluierung unter verschiedenen Bedingungen hinsichtlich Medium, Temperatur, Zeit (Information zu Abb. 31).

WST-1-Reagenz-test	Behälter										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Median	0,017	0,012	0,01	0,007	0,001	0,016	0,013	0,012	0,011	0,014	
IQR	0,045	0,002	0,003	0,002	0,005	0,006	0,012	0,008	0,01	0,08	
	Behälter										
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Median	0,011	0,010	0,015	0,011	0,008	0,009	0,008	0,005	0,01	0,006	
IQR	0,005	0,006	0,015	0,005	0,003	0,006	0,012	0,004	0,05	0,003	
	Behälter										
	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
Median	0,007	0,007	0,009	0,002	0,009	0,013	0,015	0,006	0,015		
IQR	0,005	0,004	0,002	0,004	0,002	0,003	0,012	0,004	0,011		

4.2.2 Proliferationsverhalten der MSC

Die quantitative Analyse der kPV ergab keinen signifikanten Unterschied im Proliferationsvermögen zwischen den verschiedenen Behältern und im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Proliferationsrate der MSC blieb über den gesamten Versuchszeitraum in allen Behältern gleich, außer bei der Bedingung Nr. 4 (PBS, RT, 24 h), unter der ein Ausstieg der kPV zu beobachten war. Der Ausgangswert lag in allen Behältern unter dem Kontrollwert. Diese Ergebnisse sind durch Abbildung 32 und Tabelle 30 dargestellt.

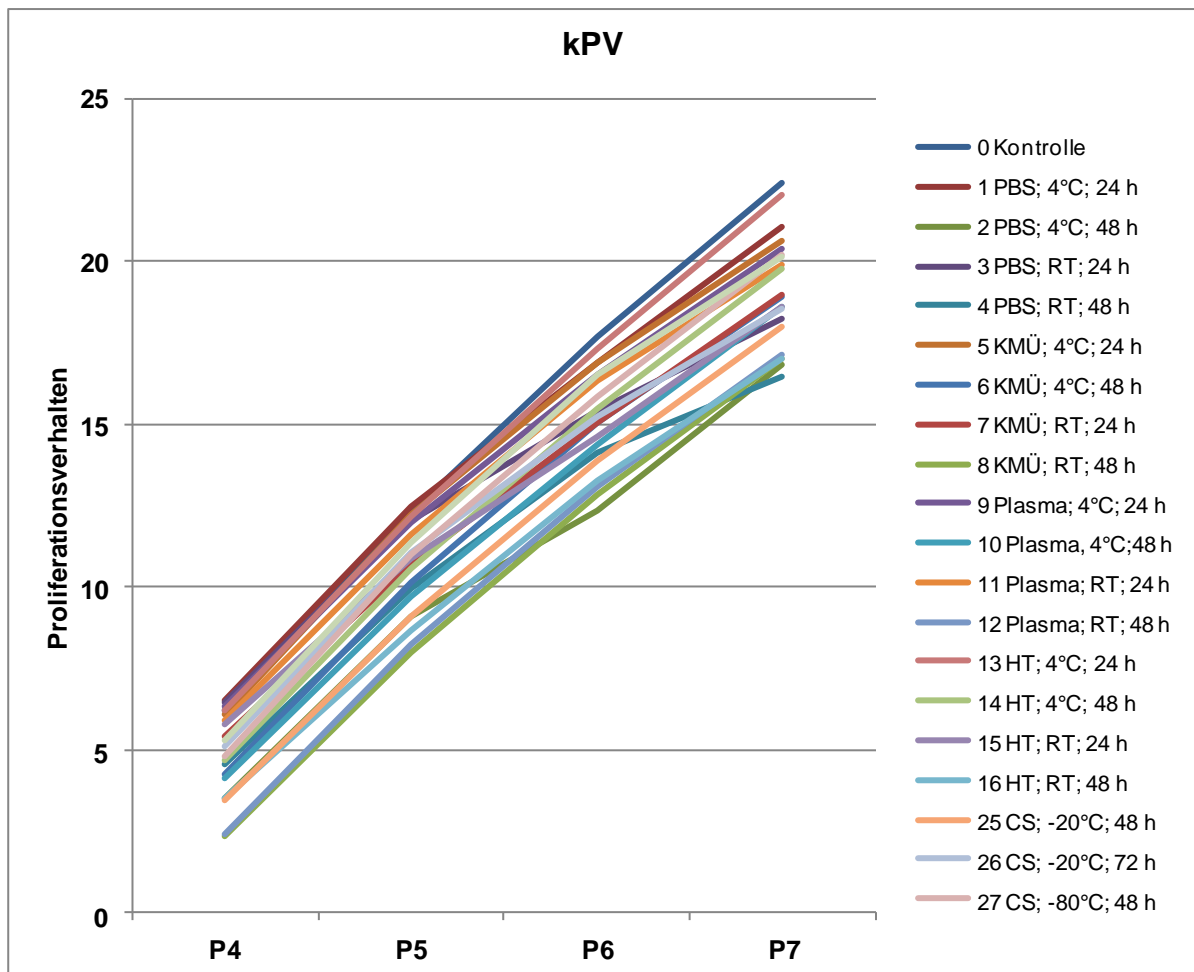


Abb. 32: Graphische Darstellung des Verlaufs der kPV von Versuchsbeginn bis Versuchsende. Die dargestellten Bedingungen sind an der rechten Seite der Grafik angezeigt.

Tab. 30: Ergebnisse der quantitativen Auswertung der kPV der MSC. Werte stehen für die Anzahl der kPV (Information zu Abb. 32).

Behälter		P4	P5	P6	P7
0	Median	6,248	12,293	17,681	22,394
	<i>IQR</i>	<i>0,552</i>	<i>0,612</i>	<i>1,352</i>	<i>2,353</i>
1	Median	6,546	12,496	16,857	21,065
	<i>IQR</i>	<i>0,2663</i>	<i>2,342</i>	<i>0,458</i>	<i>1,492</i>
2	Median	3,545	9,082	12,322	16,792
	<i>IQR</i>	<i>3,14</i>	<i>3,987</i>	<i>4,168</i>	<i>2,902</i>
3	Median	6,455	12,054	15,441	18,213
	<i>IQR</i>	<i>3,674</i>	<i>3,274</i>	<i>2,904</i>	<i>4,552</i>
4	Median	4,56	9,987	14,135	16,462
	<i>IQR</i>	<i>1,141</i>	<i>1,941</i>	<i>4,056</i>	<i>5,381</i>
5	Median	6,113	12,202	16,906	20,613
	<i>IQR</i>	<i>1,77</i>	<i>1,862</i>	<i>1,116</i>	<i>1,29</i>
6	Median	4,244	10,171	15,042	18,902
	<i>IQR</i>	<i>2,888</i>	<i>1,738</i>	<i>1,821</i>	<i>2,076</i>
7	Median	5,426	10,666	15,023	18,968
	<i>IQR</i>	<i>3,205</i>	<i>2,701</i>	<i>2,271</i>	<i>1,762</i>
8	Median	2,328	8,001	12,831	17,027
	<i>IQR</i>	<i>2,223</i>	<i>1,332</i>	<i>1,801</i>	<i>2,351</i>
9	Median	6,354	11,952	16,533	20,359
	<i>IQR</i>	<i>2,401</i>	<i>2,345</i>	<i>0,913</i>	<i>0,213</i>
10	Median	4,121	9,725	14,383	18,578
	<i>IQR</i>	<i>1,769</i>	<i>0,908</i>	<i>1,573</i>	<i>1,761</i>
11	Median	5,925	11,604	16,321	19,864
	<i>IQR</i>	<i>4,137</i>	<i>3,662</i>	<i>3,399</i>	<i>3,113</i>
12	Median	2,439	8,229	13,109	17,13
	<i>IQR</i>	<i>1,43</i>	<i>1,11</i>	<i>2,561</i>	<i>3,178</i>
13	Median	6,229	12,134	17,285	22,061
	<i>IQR</i>	<i>1,805</i>	<i>1,127</i>	<i>1,273</i>	<i>2,017</i>
14	Median	4,678	10,591	15,458	19,788
	<i>IQR</i>	<i>2,737</i>	<i>2,347</i>	<i>2,818</i>	<i>4,558</i>
15	Median	5,761	10,865	14,607	18,585
	<i>IQR</i>	<i>4,999</i>	<i>4,594</i>	<i>3,515</i>	<i>3,957</i>
16	Median	3,502	8,676	13,273	16,976
	<i>IQR</i>	<i>1,513</i>	<i>2,029</i>	<i>1,22</i>	<i>0,956</i>
25	Median	3,441	9,087	13,868	17,988
	<i>IQR</i>	<i>2,518</i>	<i>2,288</i>	<i>1,535</i>	<i>0,587</i>
26	Median	5,142	11,034	15,214	18,539
	<i>IQR</i>	<i>1,793</i>	<i>3,495</i>	<i>2,938</i>	<i>2,101</i>
27	Median	4,7982	10,992	15,853	20,19
	<i>IQR</i>	<i>1,795</i>	<i>0,806</i>	<i>2,095</i>	<i>5,795</i>
28	Median	5,320	11,371	16,545	20,121
	<i>IQR</i>	<i>1,067</i>	<i>2,028</i>	<i>1,031</i>	<i>2,221</i>

4.2.3 Evaluierung des Differenzierungspotentials der MSC

4.2.3.1 Adipogene Differenzierung

Die Auswertung der Oil Red O-gefärbten MSC ergab Medianwerte welche zwischen 1 und 2 von 3 lagen. MSC, die im negativen Temperaturbereich mit Cryostor suspendiert wurden, erhielten eine konstante Bewertung von 2 von 3. Keine signifikanten Unterschiede wurden festgestellt ($p \leq 0,05$). Die Zellmorphologie wurde für alle Bedingungen mit der maximalen Punktzahl bewertet. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Differenzierung der MSC in die adipogene Richtung bei allen Proben in unterschiedlichen Graden nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 33 und Tabelle 31 angezeigt.

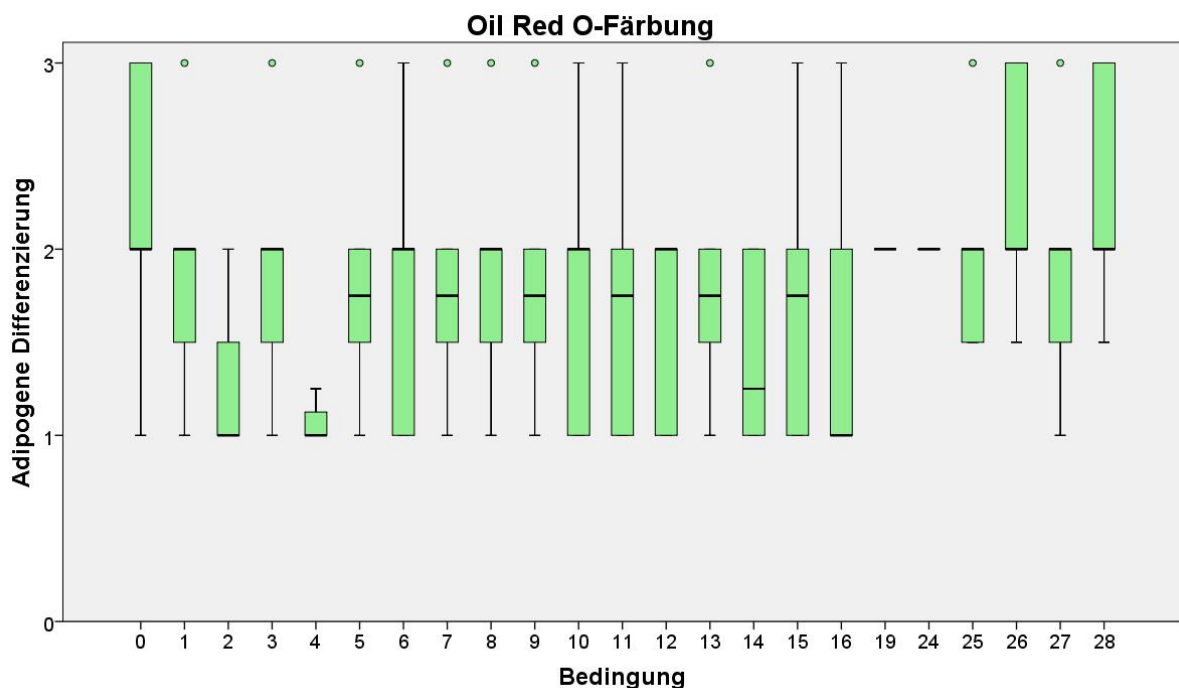


Abb. 33: Graphische Darstellung der qualitativen Auswertung der adipogen differenzierten MSC. Eine genaue Beschreibung der Bedingungen findet sich auf Seite 37.

Tab. 31: Ergebnisse der qualitativen Auswertung der adipogen differenzierten MSC (Information zu Abb. 33).

Adipogene Differenzierung		Bedingung										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Oil Red O-Färbung	Median	2/3	2/3	1/3	2/3	1/3	1,75/3	2/3	1,75/3	2/3	1,75/3	2/3
	IQR	0,75	0,5	0,25	0,5	0,13	0,5	0,75	0,5	0,38	0,5	0,75
Morphologie	Median	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	IQR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adipogene Differenzierung		Bedingung										
		11	12	13	14	15	16	17-24	25	26	27	28
Oil Red O-Färbung	Median	1,75/3	2/3	1,75/3	1,25/3	1,75/3	1/3	nicht evaluierbar	2/3	2/3	2/3	2/3
	IQR	0,88	1,0	0,5	0,88	0,88	1,0	nicht evaluierbar	0,5	1,0	0,5	1,0
Morphologie	Median	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	nicht evaluierbar	3/3	3/3	3/3	3/3
	IQR	0	0	0	0	0	0	nicht evaluierbar	0	0	0	0

4.2.3.2 Osteogene Differenzierung

A) Frühe Osteogenese

Die semi-quantitative Auswertung der frühen Osteogenese ergab keinen signifikanten Unterschied des Differenzierungspotentials der MSC nach deren Inkubation unter verschiedenen Bedingungen hinsichtlich Medium, Temperatur und Zeit ($p \leq 0,05$). Eine Differenzierung der MSC in die osteogene Richtung konnte bei allen Probanden nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind durch Abbildung 34 und Tabelle 32 dargestellt.

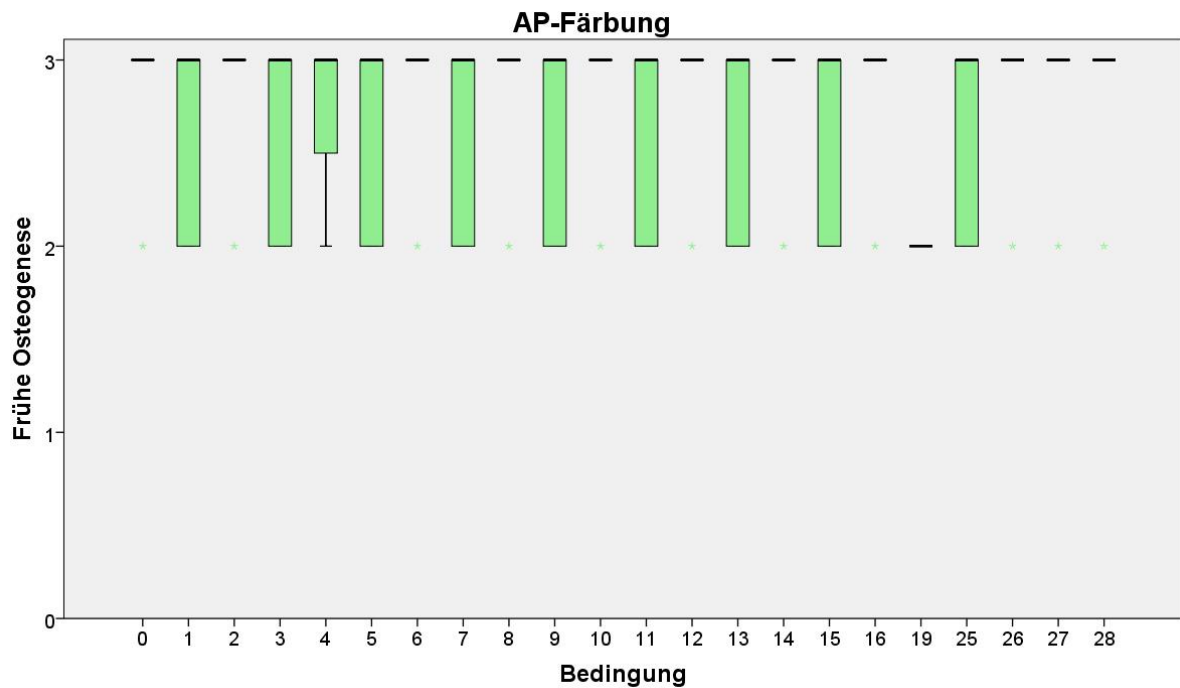


Abb. 34: Graphische Darstellung der Ergebnisse der frühen Osteogenese. Außer in Bedingung Nr. 19 wurde eine Differenzierung von 3/3 bei allen MSC erreicht.

Tab. 32: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der frühen osteogenen Differenzierung der MSC (Information zu Abb. 34).

Frühe Osteogenese	Bedingung										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Median	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
IQR	0	1,0	0	1,0	0,5	0,75	0	0,75	0	0,75	0
Frühe Osteogenese	Bedingung										
	11	12	13	14	15	16	17-24	25	26	27	28
Median	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	nicht evaluierbar	3/3	3/3	3/3	3/3
IQR	0,75	0	0,75	0	1,0	0		1,0	0	0	0

B) Späte Osteogenese

Die semi-quantitative Auswertung der Alizarinrot-gefärbten MSC-Proben ergab keinen signifikanten Unterschied im späten osteogenen Differenzierungspotential beim Vergleich der verschiedenen Bedingungen. Eine optimale Differenzierung der MSC in die osteogene Richtung konnte bei allen Proben nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35 und Tabelle 33).

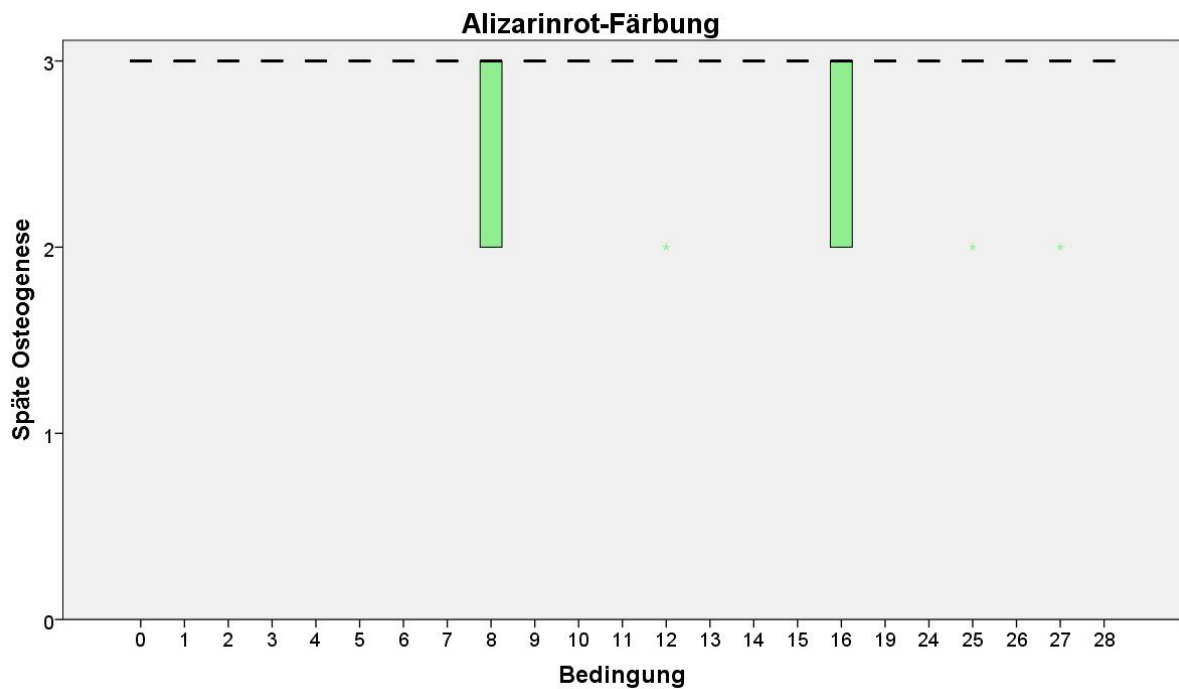


Abb. 35: Darstellung der qualitativen Auswertung der späten osteogen differenzierten MSC.

Tab. 33: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der späten osteogenen Differenzierung (Information zu Abb. 35).

Späte Osteogenese	Bedingung										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Median	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
IQR	0	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	0
Späte Osteogenese	Bedingung										
	11	12	13	14	15	16	17-24	25	26	27	28
Median	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	nicht evaluierbar	3/3	3/3	3/3	3/3
IQR	0	0	0	0	0	0,75		0	0	0	0

4.2.3.3 Chondrogene Differenzierung

A) Safranin O/Fast Green-Färbung (Bern-Score)

Die Auswertung des chondrogenen Differenzierungspotenzials der MSC durch Färbung mit Safranin O/Fast Green-Färbung (Neosynthese maturer Proteoglycane) ergab unterschiedliche Ergebnisse beim Vergleich innerhalb und außerhalb einer bestimmte Bedingung, wobei sich keine deutliche Tendenz gezeigt hat. Alle Werte befanden sich unter dem Kontrollwert und es wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen ($p \leq 0,05$). Diese Ergebnisse sind durch Abbildung 36 und Tabelle 34 dargestellt.

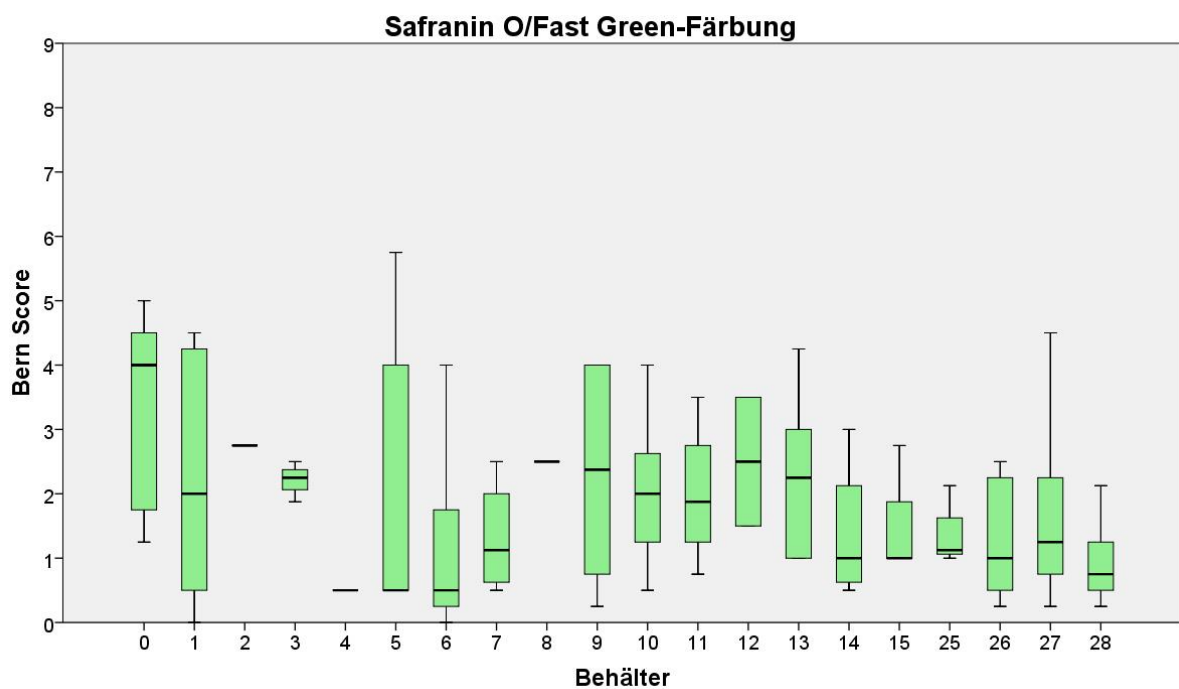


Abb. 36: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Bern-Scores.

Tab. 34: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der chondrogen differenzierten MSC-Pellets nach Bern-Score (Information zu Abb. 36).

Safranin O-Färbung	Bedingung										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Median	4/9	2/9	2,75/9	2,25/9	0,5/9	0,5/9	0,5/9	1,125/9	2,5/9	2,375/9	2/9
IQR	2,1	3,75	0	0,31	0	2,63	1,5	1,06	0	3,13	1,38
Safranin O-Färbung	Bedingung										
	11	12	13	14	15	16	17-24	25	26	27	28
Median	1,875/9	2,5/9	2,25/9	1/9	1/9	nicht evaluierbar	nicht evaluierbar	1,125/9	1/9	1,25/9	0,75/9
IQR	0,88	1,0	2,0	1,0	0,88			0,5	1,75	1,5	0,75

B) Alcianblau-Färbung

Die Auswertung der Alcianblau-gefärbten MSC-Proben zeigte ähnliche Ergebnisse wie beim Bewerten der Proben durch den Bern-Score. Alle Werte befanden sich unter dem Kontrollwert und es wurden keine signifikanten Unterschiede im chondrogenen Differenzierungspotential zwischen den verschiedenen Bedingungen und der Kontrollgruppe nachgewiesen ($p \leq 0,05$). Eine Differenzierung der MSC in die chondrogene Richtung (Präsenz immaturer Proteoglykane) konnte bei allen Proben nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind durch Abbildung 37 und Tabelle 35 dargestellt.

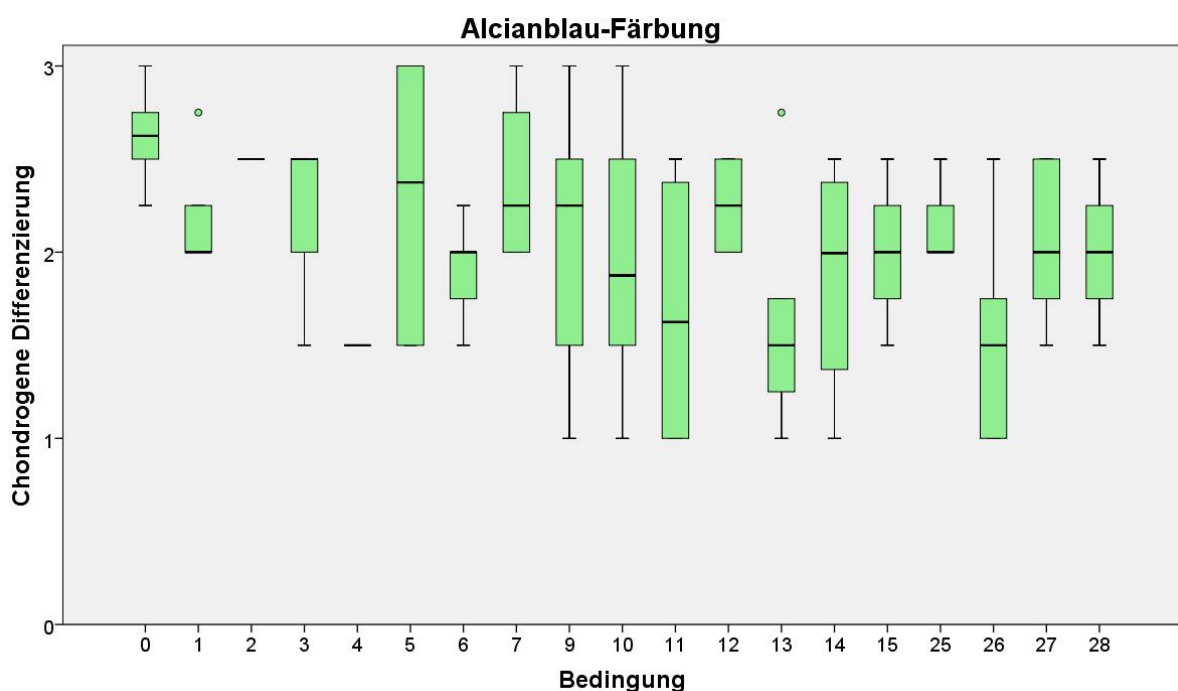


Abb. 37: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Alcianblau-Färbung.

Tab. 35: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der chondrogenen Differenzierung, Alcianblau-gefärbte MSC (Information zu Abb. 37).

Alcianblau-Färbung	Bedingung										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Median	2,625/3	2/3	2,5/3	2,5/3	1,5/3	2,375/3	2/3	2,25/3	nicht evaluierbar	2,25/3	1,875/3
IQR	0,25	0,25	0	0,5	0	1,188	0,25	0,625		0,75	0,81
Alcianblau-Färbung	Bedingung										
	11	12	13	14	15	16	17-24	25	26	27	
Median	1,625/3	2,25/3	1,5/3	1,995/3	2/3	nicht evaluierbar	nicht evaluierbar	2/3	1,5/3	2/3	2/3
IQR	1,31	0,25	0,5	0,76	0,5			0,25	0,75	0,75	0,5

C) Masson-Trichrom-Färbung

Die Auswertung der Masson-Trichrom-gefärbten MSC ergab keine signifikanten Unterschiede. Hierbei wurde kein signifikanter Unterschied im chondrogenen Differenzierungspotential zwischen den verschiedenen Bedingungen und der Kontrolle festgestellt. Eine Differenzierung der MSC in die chondrogene Richtung (Präsenz von Kollagenen) konnte bei allen Proben nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind durch Abbildung 38 und Tabelle 36 dargestellt.

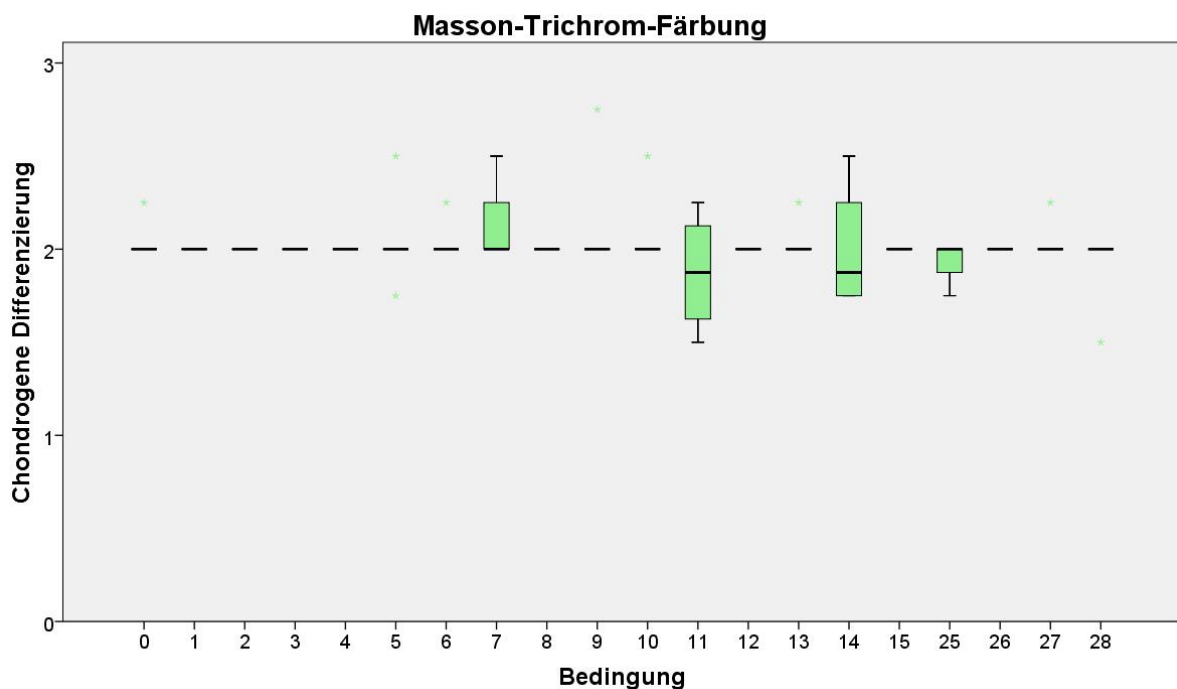


Abb. 38: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Masson-Trichrom-Färbung.

Tab. 36: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der chondrogenen Differenzierung, Masson-Trichrom-gefärbte MSC-Pellets (Information zu Abb. 38).

Masson-Trichrom-Färbung	Bedingung										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Median	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3
IQR	0	0	0	0	0	0	0	0,125	0	0	0
Masson-Trichrom-Färbung	Bedingung										
	11	12	13	14	15	16	17-24	25	26	27	28
Median	1,875/3	2/3	2/3	1,875/3	2/3	nicht evaluierbar	nicht evaluierbar	2/3	2/3	2/3	2/3
IQR	0,375	0	0	0,375	0	nicht evaluierbar	nicht evaluierbar	0,125	0	0	0

4.3 Teil 3: Zellkonzentration

4.3.1 Evaluierung der Zellvitalität

4.3.1.1 Evaluierung der Zellvitalität durch Trypanblau-Färbung

Der Vergleich der Zellvitalität (in %) durch Trypanblau-Färbung lieferte hinsichtlich der drei gewählten Zellkonzentrationen und den entsprechenden Kontrollgruppen keinen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). Trotzdem im Vergleich zu den Kontrollwerten (1 bis 3) eine Senkung der MSC-Zellvitalität bei den Behältern Nr. 4 bis Behälter Nr. 9 zu verzeichnen. Alle Kontrollwerte erhielten eine Zellvitalität von über 80 %, während die Bedingungen für den positiven (KMÜ) und negativen (Cryostor[®]) Temperaturbereich eine Zellvitalität von über 60 % zeigten. Ergebnisse zur Zellvitalität sind durch Abbildung 39 und Tabelle 37 dargestellt.

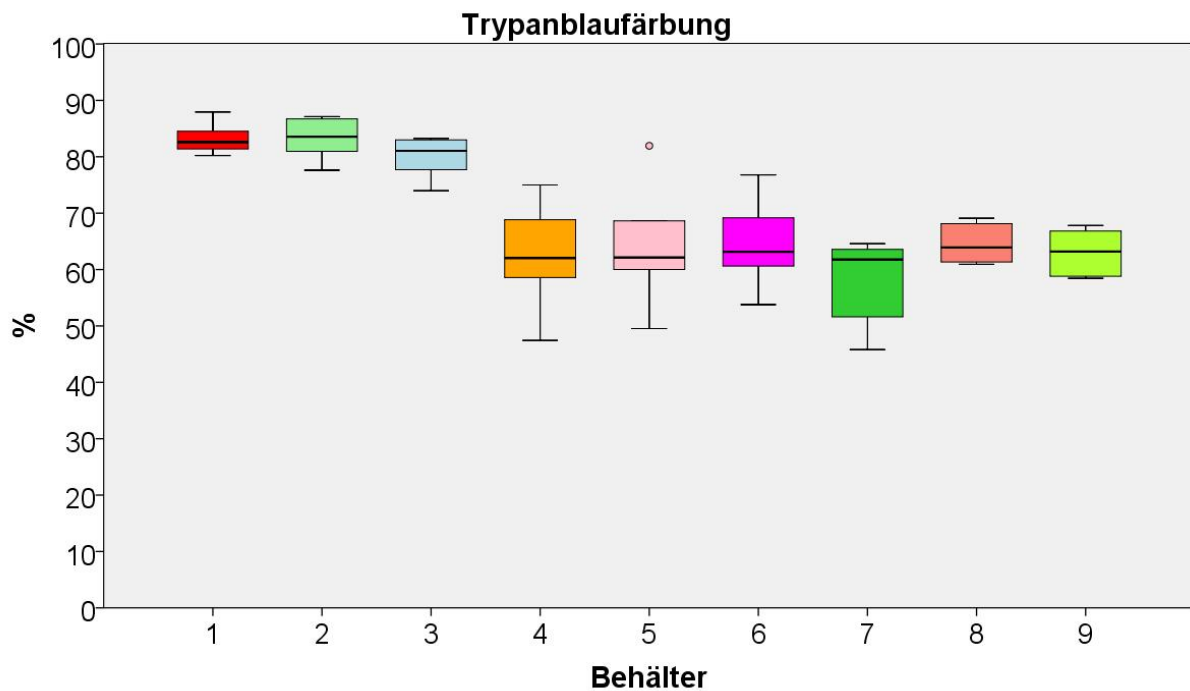


Abb. 39: Vergleich der Zellvitalität (%) der MSC in den nummerierten Behältern (Glasspritzen) von 1 bis 9 anhand der Evaluierung von drei verschiedener Zellkonzentrationen. Behälter 4 bis 6 sprechen für den positiver Bereich (4 °C) der KMÜ-suspendierten MSC nach 24 h Inkubationszeit und Behälter 7 bis 9 für den negativen Bereich (-20 °C) der Cryostor[®]-suspendierten MSC nach 72 h Inkubationszeit, wobei 1: (5×10^6 MSC); 2: (10×10^6 MSC); 3: (20×10^6 MSC); 4: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 5×10^6 MSC); 5: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 10×10^6 MSC); 6: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 20×10^6 MSC); 7: (Cryostor[®], 72 h, -20 °C, 5×10^6 MSC); 8: (Cryostor[®], 72 h, -20 °C, 10×10^6 MSC) und 9: (Cryostor[®], 72 h, -20 °C, 20×10^6 MSC).

Tab. 37: Darstellung des Medianwertes sowie IQR der MSC-Zellvitalität (in %) nach der Evaluierung verschiedener Zellkonzentrationen, (Information zu Abb. 39).

Trypanblau-Färbung	Behälter								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Median	82,6	83,56	81,04	62,03	62,13	63,16	61,77	63,93	63,19
IQR	2,9	4,4	4,8	8,8	7,2	7,3	9,7	6,2	7,0

4.3.1.2 Evaluierung der Zellvitalität durch WST-1-Reagenztest

Bei dem Vergleich der Zellvitalität (nm) durch den WST-1-Reagenztest konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei verschiedenen evaluierten Zellkonzentrationen und den drei Kontrollgruppen ausgemacht werden ($p \leq 0,05$). Trotzdem zeigte sich die Tendenz einer gleichmäßigen und sehr geringgradigen Verminderung des photometrischen Wertes bei der höchsten Zellkonzentration (15×10^6 MSC). Die Ergebnisse zur Zellvitalität (nm) sind durch Abbildung 40 und Tabelle 38 dargestellt.

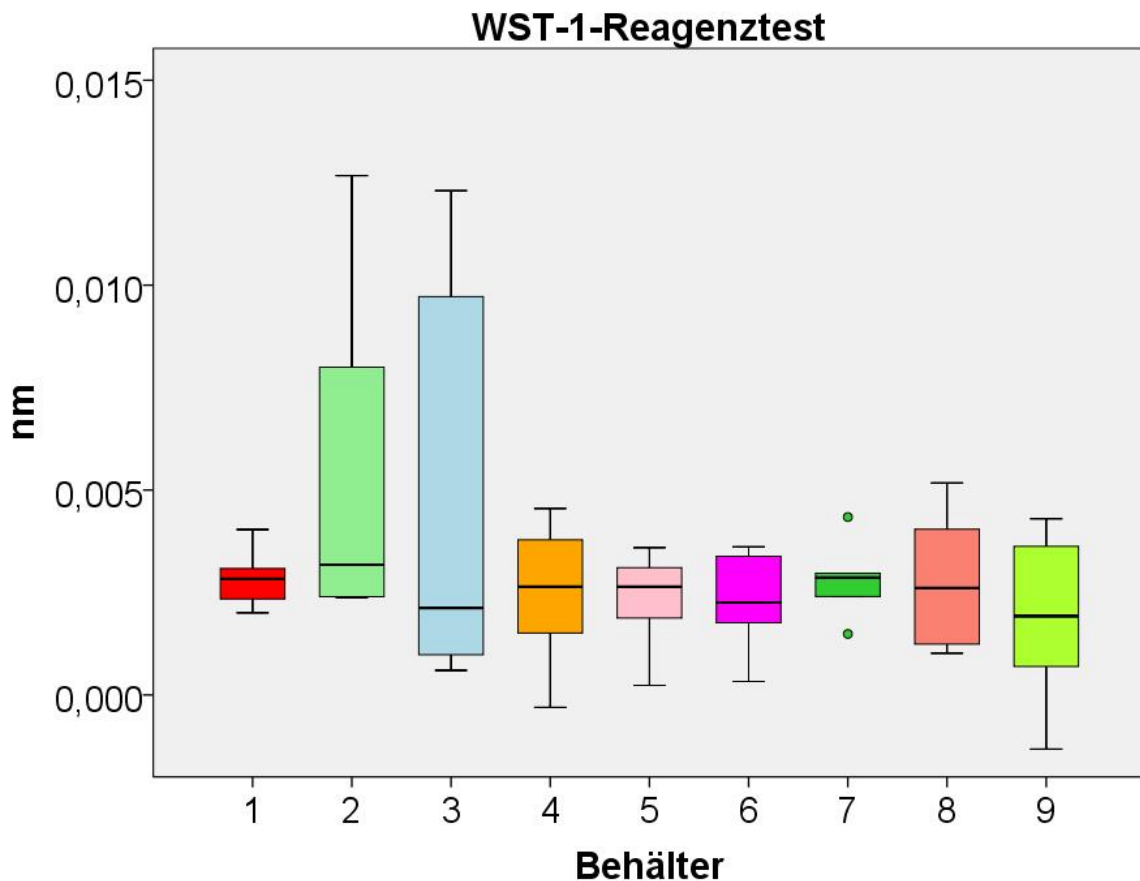


Abb. 40: Darstellung der photometrischen Messung von Formazan (nm) zur Evaluierung von drei verschiedenen Zellkonzentrationen, wobei 1: (5×10^6 MSC); 2: (10×10^6 MSC); 3: (20×10^6 MSC); 4: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 5×10^6 MSC); 5: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 10×10^6 MSC); 6: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 20×10^6 MSC); 7: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 5×10^6 MSC) 8: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 10×10^6 MSC) und 9: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 20×10^6 MSC).

Tab. 38: Darstellung des Medianwertes sowie IQR der MSC-Zellvitalität (nm) bei der Evaluierung von verschiedenen Zellkonzentrationen (Information zu Abb. 40).

WST-1-Reagenzest	Behälter								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Median	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002
IQR	0,0006	0,004	0,007	0,002	0,001	0,001	0,0004	0,002	0,003

4.3.2 Proliferationsverhalten der MSC

Beim Vergleich der quantitativen Analyse der kPV konnten weder hinsichtlich der Beziehung von Temperatur und Suspensionsmedium noch zwischen den ausgewählten Zellkonzentrationen signifikante Unterschiede des MSC-Proliferationsvermögens festgestellt werden. Die Proliferationsrate der MSC blieb über den gesamten Versuchszeitraum in allen Behältern sehr ähnlich. Trotzdem ist bei allen Bedingungen eine geringgradige Senkung der kPV ab P6 zu erkennen. Der Ausgangswert lag in allen Behältern unter dem Kontrollwert. Diese Ergebnisse sind durch Abbildung 41 und Tabelle 39 dargestellt.

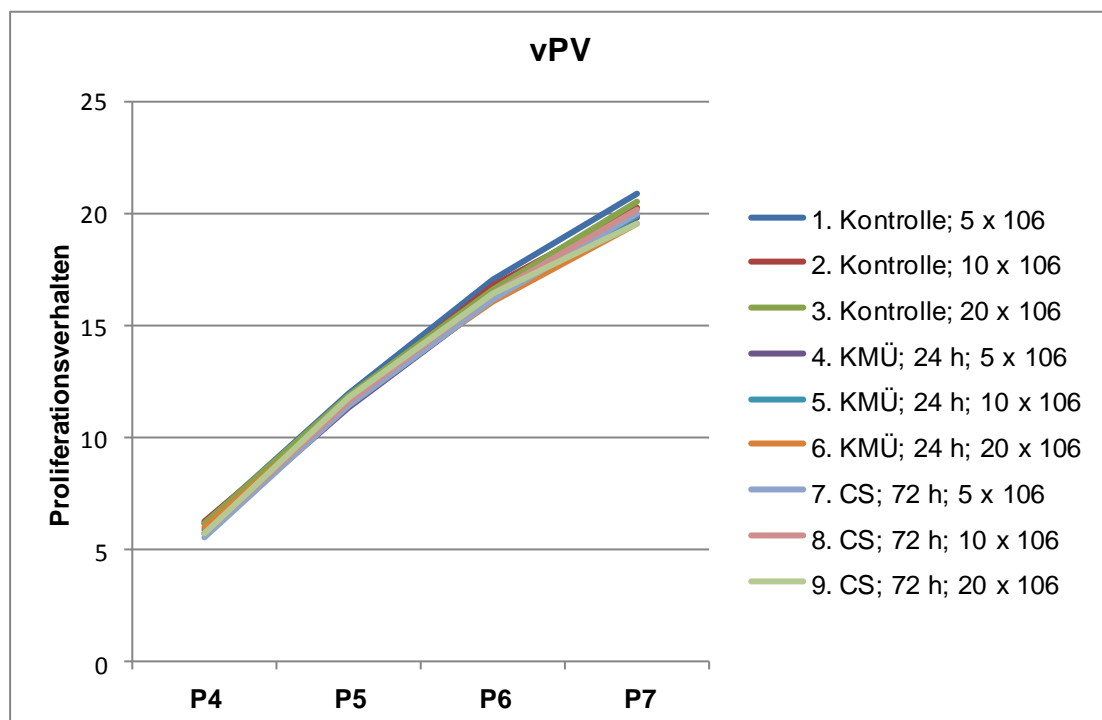


Abb. 41: Graphische Darstellung des Verlaufs der kPV von Versuchsbeginn bis Versuchsende.

Tab. 39: Ergebnisse der quantitativen Auswertung der kPV der MSC. Werte stehen für die Anzahl der kPV.

Behälter		P4	P5	P6	P7
1	Median	6,147	11,992	17,012	20,898
	IQR	0,164	0,251	0,463	1,104
2	Median	6,289	11,731	16,75	20,298
	IQR	0,325	0,182	0,826	1,056
3	Median	6,195	11,843	16,643	20,482
	IQR	0,206	0,687	0,522	0,808
4	Median	5,779	11,33	16,125	19,826
	IQR	0,355	0,479	0,699	0,28
5	Median	5,873	11,423	16,144	19,906
	IQR	0,764	0,538	1,215	0,942
6	Median	5,999	11,57237	16,093	19,53
	IQR	0,362	0,64	1,22	2,22
7	Median	5,580	11,47	16,153	19,948
	IQR	0,391	1,059	1,487	1,094
8	Median	5,774	11,615	16,422	20,124
	IQR	0,867	1,968	2,484	2,437
9	Median	5,764	11,752	16,434	19,562
	IQR	0,602	1,316	2,031	2,199

4.3.3 Evaluierung des Differenzierungspotentials der MSC

4.3.3.1 Adipogene Differenzierung

Die semi-quantitative Auswertung der Oil Red O-gefärbten MSC wurde bei allen Bedingungen gleichmäßig bewertet. Hierbei ließen sich alle MSC-Probanden mit der Punktzahl 2 von 3 bewerten. Es wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet. Bei allen Proben konnte jedoch eine Differenzierung der MSC in die adipogene Richtung nachgewiesen werden. Eine morphologische Veränderung nach Induktion der MSC in die adipogene Richtung war bei allen Bedingungen auszumachen (Punktzahl 3 von 3). Diese Ergebnisse sind durch Abbildung 42 und Tabelle 40 angezeigt.

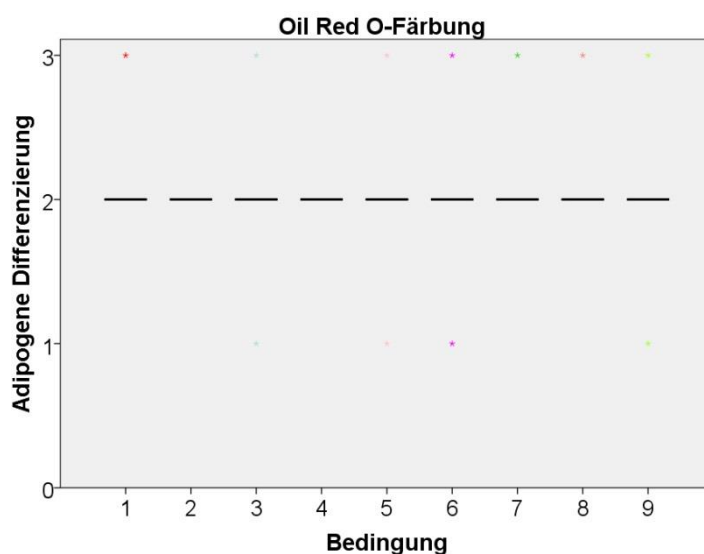


Abb. 42: Graphische Darstellung der qualitativen Auswertung der adipogen differenzierten MSC, wobei 1: (5×10^6 MSC); 2: (10×10^6 MSC); 3: (20×10^6 MSC); 4: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 5×10^6 MSC); 5: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 10×10^6 MSC); 6: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 20×10^6 MSC); 7: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 5×10^6 MSC) 8: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 10×10^6 MSC) und 9: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 20×10^6 MSC).

Tab.40: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der adipogen differenzierten MSC (Information zu Abb. 42).

Adipogene Differenzierung		Bedingung								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Oil Red O-Färbung	Median	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3
	IQR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morphologie	Median	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	IQR	0	0	0	0	0	0	0	0	0

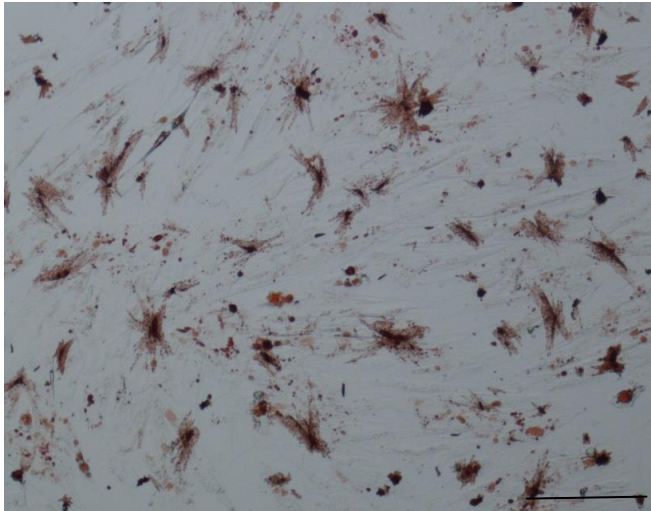


Abb. 43: Histologische Aufnahme (10 X) einer außergewöhnlichen adipogenen Differenzierung. Siehe die morphologische Veränderung der Zellen und die Oil Red O-gefärbten Lipidtröpfchen (Scale Bar 200 µm).

4.3.3.2 Osteogene Differenzierung

A) Frühe Osteogenese

Die semi-quantitative Auswertung der AP-gefärbten Proben ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied beim Vergleich verschiedener Zellkonzentrationen des frühen osteogenen Differenzierungspotentials der MSC. Eine Differenzierung der MSC in die osteogene Richtung konnte bei allen Probanden mit der Punktzahl 3 von 3 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind durch Abbildung 44 und Tabelle 41 dargestellt.

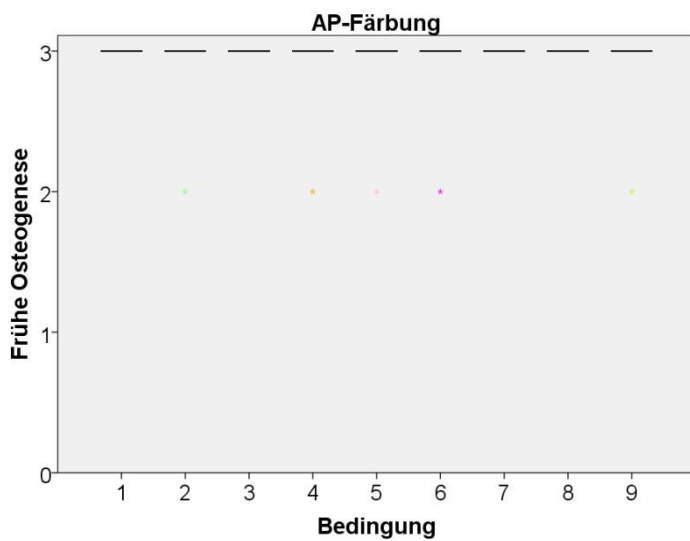


Abb. 44: Graphische Darstellung der Ergebnisse der frühen Osteogenese, wobei 1: (5×10^6 MSC); 2: (10×10^6 MSC); 3: (20×10^6 MSC); 4: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 5×10^6 MSC); 5: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 10×10^6 MSC); 6: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 20×10^6 MSC); 7: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 5×10^6 MSC); 8: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 10×10^6 MSC) und 9: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 20×10^6 MSC).

Tab.41: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der frühen Osteogenese (Informationen zu Abb. 44).

Frühe Osteogenese	Bedingung								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Median	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
IQR	0	0	0	0	0	0	0	0	0

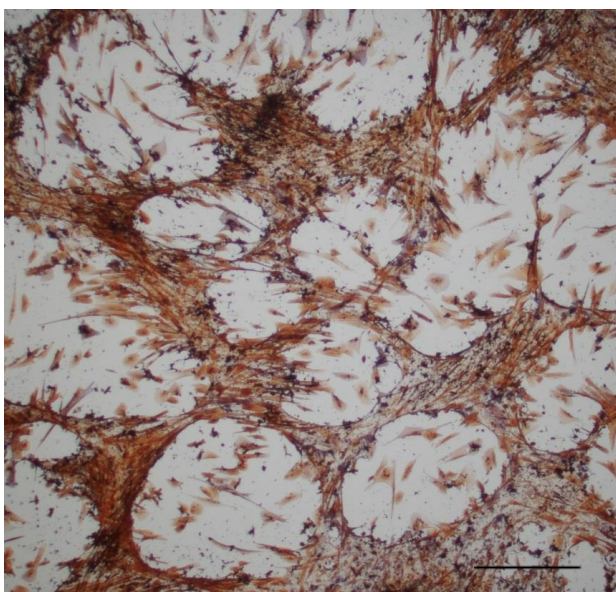


Abb. 45: Repräsentative histologische Aufnahme (4 X) nach früher osteogener Differenzierung von Pferde-MSC zur Darstellung der Anordnung der Zellen nach Induktion in Richtung Osteogenese (Scale Bar 400 µm).

B) Späte Osteogenese

Die semi-quantitative Auswertung der Alizarinrot-gefärbten MSC-Proben zum Nachweis des späten osteogenen Differenzierungspotentials der MSC ergab keinen signifikanten Unterschied. Eine ideale Differenzierung der MSC in die osteogene Richtung konnte bei allen Proben nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind durch Abbildung 46 und Tabelle 42 dargestellt.

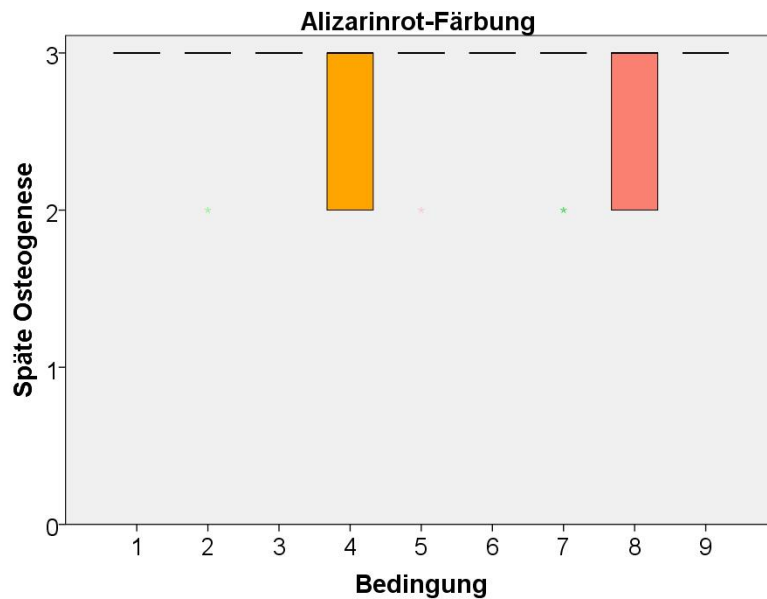


Abb. 46: Darstellung der qualitativen Auswertung der späten osteogen differenzierten MSC, wobei 1: (5×10^6 MSC); 2: (10×10^6 MSC); 3: (20×10^6 MSC); 4: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 5×10^6 MSC); 5: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 10×10^6 MSC); 6: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 20×10^6 MSC); 7: (Cryostor[®], 72 h, -20 °C, 5×10^6 MSC) 8: (Cryostor[®], 72 h, -20 °C, 10×10^6 MSC) und 9: (Cryostor[®], 72 h, -20 °C, 20×10^6 MSC).

Tab. 42: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der späten osteogenen Differenzierung (Informationen zu Abb. 46).

Späte Osteogenese	Bedingung								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Median	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
IQR	0	0	0	0,75	0	0	0	0,75	0

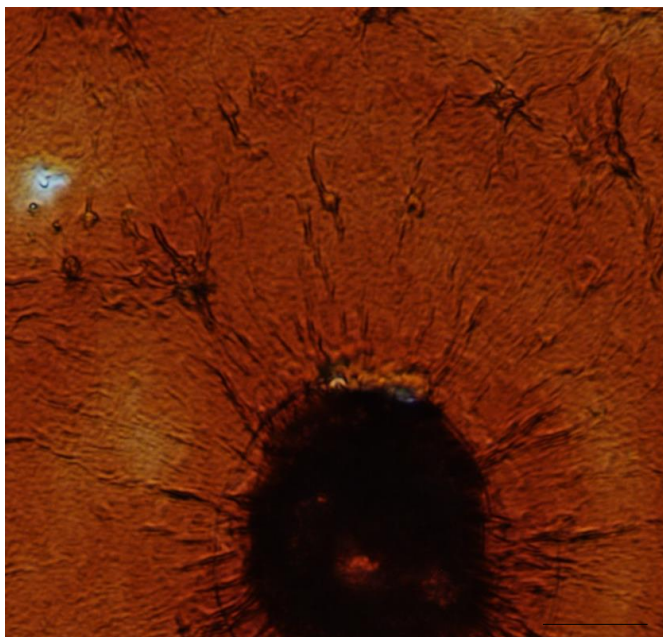


Abb. 47: Aufnahme (40 X) der rot angefärbten Kalziumdepots nach Auswertung der differenzierten MSC in Richtung später Osteogenese (Scale Bar 20 µm).

4.3.3.3 Chondrogene Differenzierung

A) Safranin O/Fast Green-Färbung (Bern-Score)

Bei der Auswertung der Neosynthese maturer Proteoglykane wurden keine deutlichen Unterschiede festgestellt, d. h. der Vergleich zwischen den verschiedenen Zellkonzentrationen zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$). Die Ergebnisse werden in Abbildung 48 und Tabelle 43 dargestellt.

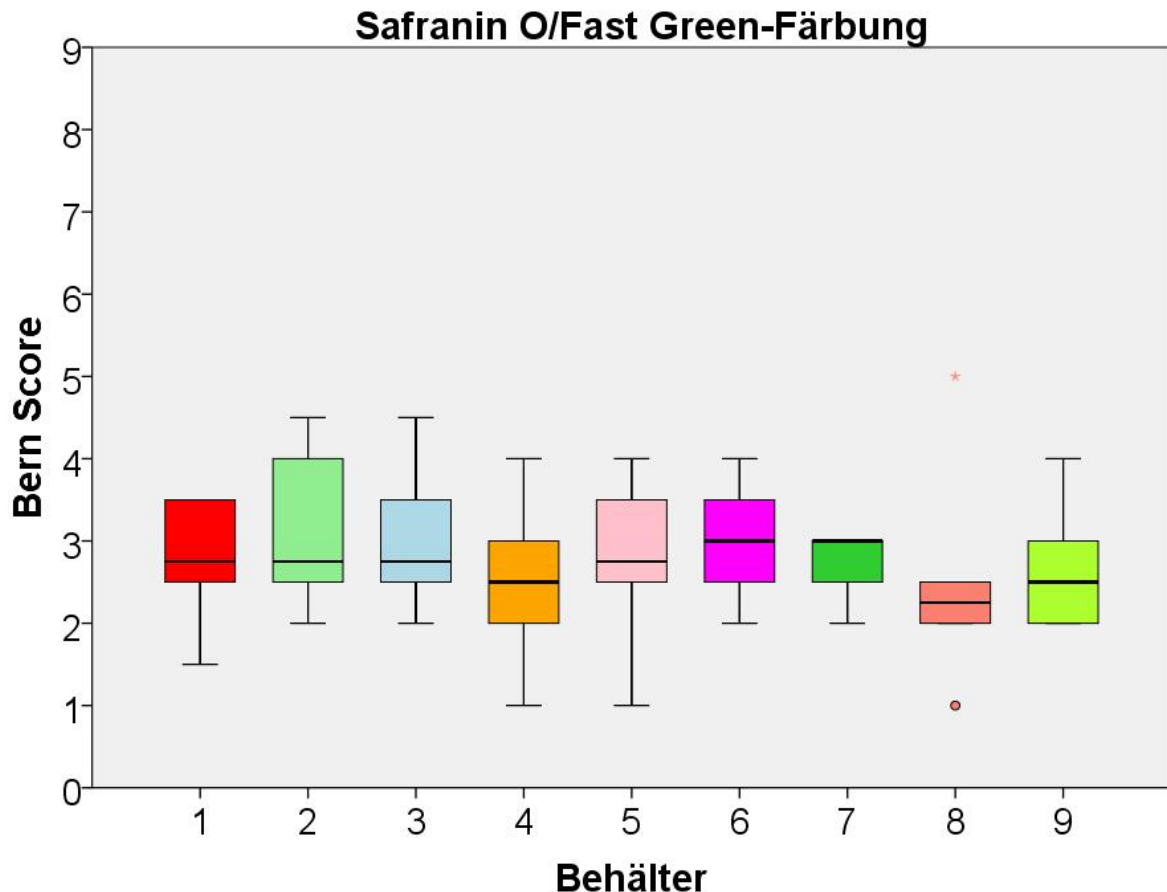


Abb. 1: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Bern-Scores, wobei 1: (5×10^6 MSC); 2: t (10×10^6 MSC); 3: t (20×10^6 MSC); 4: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 5×10^6 MSC); 5: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 10×10^6 MSC); 6: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 20×10^6 MSC); 7: (Cryostor[®], 72 h, -20 °C, 5×10^6 MSC) 8: (Cryostor[®], 72 h, -20 °C, 10×10^6 MSC) und 9: (Cryostor[®], 72 h, -20 °C, 20×10^6 MSC).

Tab. 43: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der chondrogen differenzierten MSC-Pellets nach Bern-Score (Informationen zu Abb. 48).

Safranin O-Färbung	Bedingung								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Median	2,75/9	2,75/9	2,75/9	2,5/9	2,75/9	3/9	3/9	2,5/9	2,875/9
IQR	0,88	1,25	0,88	1,0	0,88	0,75	0,38	0,5	0,75

B) Alcianblau-Färbung

Die semi-quantitative Auswertung der Alcianblau-gefärbten MSC-Proben ergab keine signifikanten Unterschiede im chondrogenen Differenzierungspotential zwischen den verschiedenen Behältern und Kontrollgruppen. Eine Differenzierung der MSC in die chondrogene Richtung (Präsenz immaturer Proteoglykanen) konnte bei allen Proben nachgewiesen werden. Trotzdem wurde eine geringgradige Verminderung dieses Potenzials bei Bedingung Nr. 4 beobachtet. Diese Information wird durch Abbildung 49 und Tabelle 44 dargestellt.

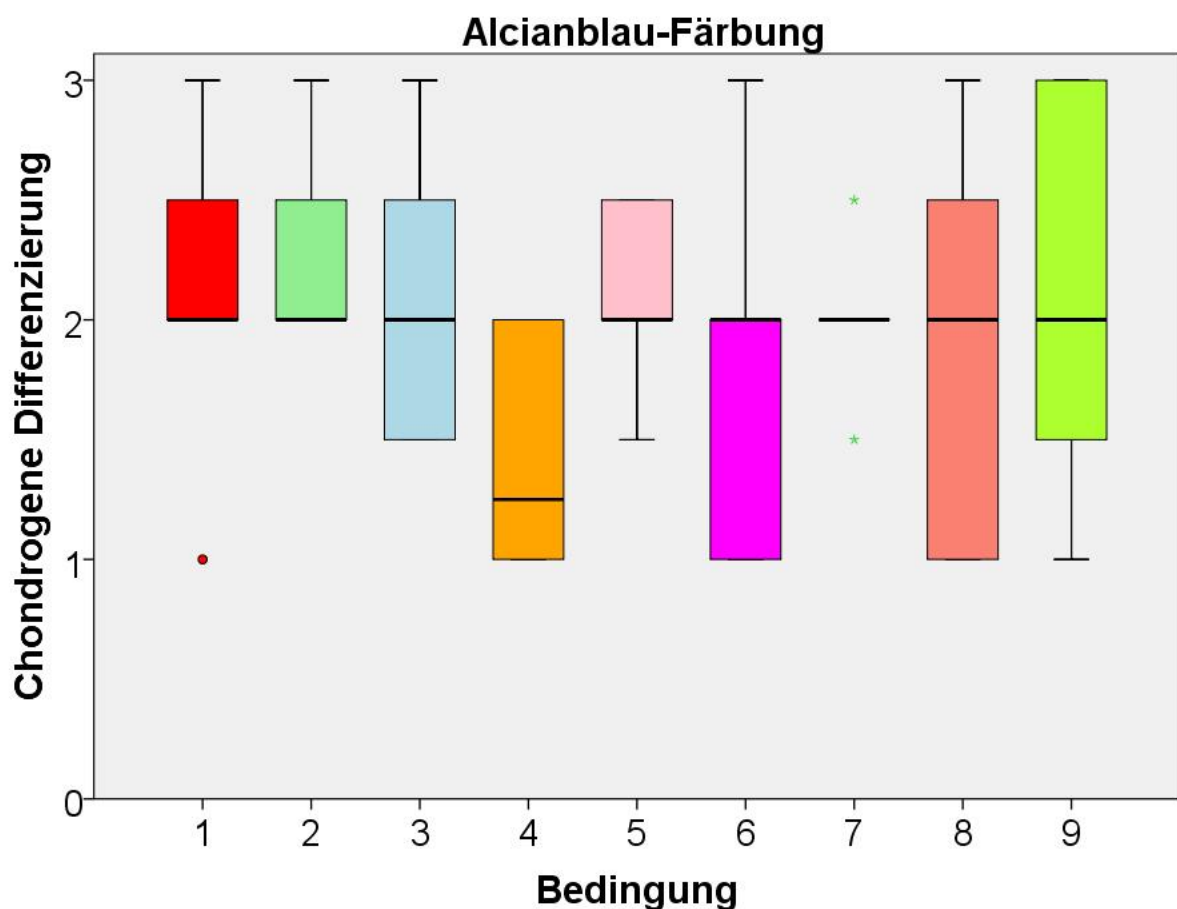


Abb. 49: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Alcianblau-Färbung, wobei 1: (5×10^6 MSC); 2: (10×10^6 MSC); 3: (20×10^6 MSC); 4: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 5×10^6 MSC); 5: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 10×10^6 MSC); 6: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 20×10^6 MSC); 7: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 5×10^6 MSC); 8: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 10×10^6 MSC) und 9: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 20×10^6 MSC).

Tab. 8: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der chondrogenen Differenzierung, Alcianblau-gefärbte MSC (Information zu Abb. 49).

Alcianblau-Färbung	Bedingung								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Median	2/3	2/3	2/3	1,25/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3
IQR	0,38	0,38	0,75	0,88	0,38	0,75	0	1,13	1,13

C) Masson-Trichrom-Färbung

Die semi-quantitative Auswertung der Masson-Trichrom-gefärbten MSC ergab keine signifikanten Unterschiede im chondrogenen Differenzierungspotential zwischen den verschiedenen Zellkonzentrationen und der Kontrollgruppe ($p \leq 0,05$). Bedingung Nr. 4 (KMÜ, 4 °C, 5×10^6 MSC) lieferte die beste Kollagenbildung. Eine Differenzierung der MSC in die chondrogene Richtung (Präsenz von Kollagenen) konnte bei allen Proben nachgewiesen werden. Die Ergebnisse werden in der folgenden Grafik gezeigt.

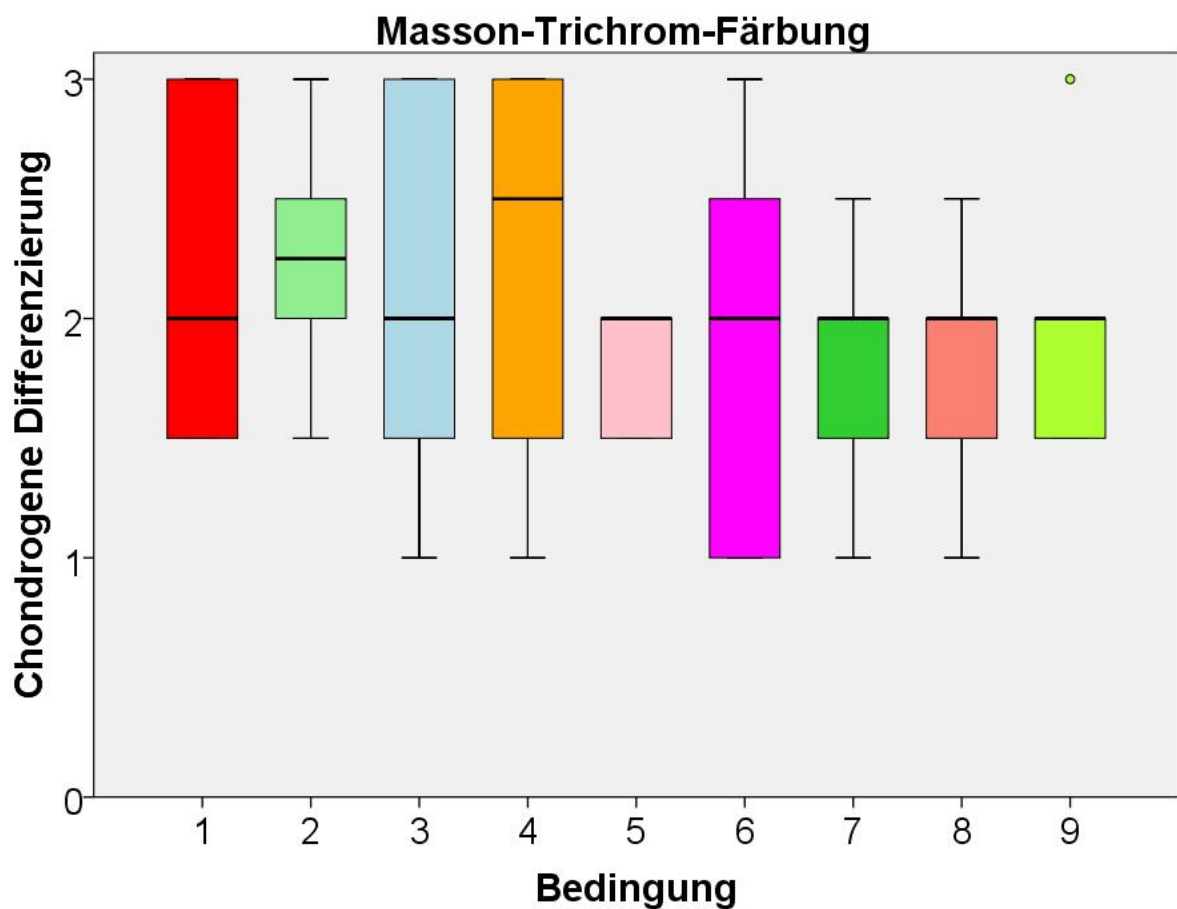


Abb. 50: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Masson-Trichrom-Färbung, wobei 1: (5×10^6 MSC); 2: (10×10^6 MSC); 3: (20×10^6 MSC); 4: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 5×10^6 MSC); 5: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 10×10^6 MSC); 6: (KMÜ, 24 h, 4 °C, 20×10^6 MSC); 7: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 5×10^6 MSC) 8: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 10×10^6 MSC) und 9: (Cryostor®, 72 h, -20 °C, 20×10^6 MSC).

Tab. 45: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der chondrogenen Differenzierung, Masson-Trichrom-gefärbte MSC (Information zu Abb. 50).

Masson-Trichrom-Färbung	Bedingung								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Median	2/3	2,25/3	2/3	2,5/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3
IQR	1,13	0,5	1,13	1,38	0,38	1,125	0,38	0,38	0,38

5 Diskussion

5.1 Zielsetzung der geplanten Durchführung

Ziel dieser Studie war die Evaluierung und Beurteilung des Einflusses von verschiedenen Transportbedingungen auf Vitalität und Charakteristika der equiner MSC (eMSC). Die Auswahl und Selektion der besten Ergebnisse aus jedem Teil der Studie erfolgte in drei verschiedenen Stufen, d. h. nach der Auswahl eines am besten geeigneten Behälters für den Versand von MSC zur therapeutischen Anwendung (Teil 1) wurden die besten Beziehungen zwischen Medium und Zeit im positiven und negativen Temperaturbereich gewonnen (Teil 2), um im dritten Teil der Studie den Einfluss von drei verschiedenen Zellkonzentrationen auf die selektierten Bedingungen im positiven und negativen Temperaturbereich evaluieren zu können. Aufgrund der Anzahl multipler Kombinationen von Faktoren, welche die Qualität der MSC beeinflussen können, wurde auf die Exklusionsmethode zurückgegriffen.

Alle Knochenmarkentnahmen erfolgten problemlos am stehenden gesunden sedierten Pferd und die geplante Menge an Knochenmarksaspirat (40 ml je Proband) konnte bei jedem Probanden erfolgreich gewonnen werden. Weder Komplikationen hinsichtlich der Punktionsstellen (Sternum) noch in Bezug auf den klinischen Allgemeinzustand des Pferdes nach der Sedierung wurden beobachtet.

Die Bearbeitung der Knochenmarksproben im Labor bzw. die Isolierung und das Anlegen der Zellkultur der Pferde-MNZ erfolgte komplikationslos.

Mithilfe der Vorversuche wurden alle Verfahren und Protokolle bzw. das Standardvorgehen für jeden Teil der Studie erfolgreich etabliert. Bei der Durchführung der Studie kam es weder zu Beeinträchtigungen in Bezug auf ihren Verlauf noch hinsichtlich ihrer Zielsetzung. Der Vergleich der verschiedenen Transportbedingungen von Pferde-MSC aus dem Knochenmark wurde erfolgreich durchgeführt und die geplanten Ziele der drei Studienteile konnten erreicht werden.

Das Ausbleiben eindeutiger Signifikanzen hat die Wahl der Bedingungen für die nächste Stufe zunächst erschwert, jedoch waren im ersten und zweiten Teil der Studie deutliche Tendenzen zu sehen, welche die Auswahl der Bedingungen schließlich möglich machten. Vermutlich wurden keine Signifikanzen beobachtet, weil die Anzahl an Wiederholungen jeder evaluierten Bedingung vergleichsweise gering war ($n = 6$) und/oder die Anpassung der Ergebnisse nach der Bonferroni-Methode sowie die relativ hohe Anzahl der verglichenen Transportbedingungen eine Eindeutigkeit erschwerten. Die Bonferroni-Korrektur ist auch von verschiedenen Autoren als eine vergleichsweise drastische Methode beschrieben worden (ARMSTRONG 2014, GARAMSZEGI 2006, NARUM 2006).

Im dritten Teil der Studie wurden alle Möglichkeiten der MSC-Bearbeitung ausgeschöpft, sodass die resultierenden finalen Ergebnisse zur Einstufung der MSC-Qualität nach

abgeschlossenem Transportvorgang extrapoliert werden konnten. Es wurde jedoch sowohl bei den Vorversuchen als auch während des weiteren Studienverlaufs ein wichtiger Faktor bemerkt, welcher die Vitalität der MSC beeinflussen kann. Sowohl durch die große Menge an MSC pro Probanden als auch vor allem wegen der hohen Anzahl verschiedener Verfahrensschritte zur Herstellung der Einzelbedingungen (Zentrifugation, Pipettieren, Zellen zählen, Anzahl der Zellkulturflaschen, etc.) zeigte sich im Vergleich zu einzeln bearbeiteten Knochenmarksproben und aufgetauten MSC (ohne extra Manipulation bzw. Laborarbeit), eine Verminderung der MSC-Vitalität. Als Konsequenz dieser Beobachtung könnte man die Vitalitätsergebnisse des letzten Teils der Studie aufgrund der extra Laborarbeit als eine „untere Grenze“ für eine echte klinische Behandlung einstufen.

Im Verlauf der Studie wurde bemerkt, dass sich die Proliferation der MSC innerhalb der Kultur je nach Proband ändern kann. Dies war bei einem der Pferdeprobanden der Fall, bei dem die Zeitdauer der MSC-Expansion kürzer war (interindividuelle Unterschiede).

5.2 Diskussion zum Material

Um eventuelle Einflüsse unterschiedlicher Chargennummern auf die Studienergebnisse zu vermeiden, wurde für die Durchführung dieser Studie darauf geachtet, dass alle Materialien wie Wirkstoffe und Chemikalien aus einer Charge des jeweiligen Herstellers in ausreichender Menge zur Verfügung standen. Die Geräte und die Arbeitsbank waren für die gesamte Studie dieselben und Verbrauchsgegenstände wurden vor Versuchsbeginn für den jeweiligen Teil der Studie gesichert. Materialien wie z. B. DMEM, die im Kühlschrank gelagert werden mussten, wurden vor Beginn des jeweiligen Teils der Studie ins Labor geliefert. Hier spielte das FBS für das Basis-Kulturmedium eine besondere Rolle, das für die Isolierung, Expansion und das Anlegen der Zellkultur der Pferde-MSK verwendet wurde. Zur Probe hat uns die Firma Sigma Aldrich drei verschiedene Chargennummern von FBS zur Verfügung gestellt. Alle drei Chargennummern wurden in Bezug auf Proliferation bzw. CPD in dreifachem Ansatz von aufgetauten Pferde-MSK ($n = 3$) bis p7 verglichen. Die FBS-Chargennummer, welche im Labor die höchsten CPD-Ergebnisse lieferte, wurde für die gesamte Studie verwendet. Das heißt, alle drei Teile der Studie wurden mit derselben FBS-Chargennummer durchgeführt.

5.3 Vorversuche

5.3.1 Inkubationsbedingungen

Für die Inkubation der Pferde-MSZ in den verschiedenen Untersuchungsbehältern war es zuerst notwendig, die MNZ unter verschiedenen Kombinationen von Inkubationsfaktoren zu testen, da die Zellvitalität nach der anfänglichen Lagerung der MNZ für 24 Stunden mit Basis-Kulturmedium ohne FBS (glukosearmes DMEM, 1 % Pen/Strep und 8,9 µg/ml Vitamin C) im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ und in feuchter Atmosphäre unzureichend für die Beurteilungspunkte des ersten Teils der Studie war (Diff., WST-1 und CPD). Im zweiten Versuch wurde eine ebenfalls unzureichende aber erhöhte Vitalität beobachtet, nachdem die Standardkonzentration von FBS (10 %) zum Basis-Kulturmedium gegeben wurde. Beim dritten Versuch wurde der prozentuale Anteil von FBS im Basis-Kulturmedium auf 20 % erhöht. Diese Änderung ergab eine weitere Erhöhung der Vitalität, die für die Beurteilungspunkte jedoch immer noch unzureichend war. Im letzten Versuch wurde nur der Faktor Temperatur (T°) geändert. Das heißt, die MNZ wurden in den verschiedenen Untersuchungsbehältern bei RT mit glukosearmem DMEM, 20 % FBS, 1 % Pen/Strep und 8,9 µg/ml Vitamin C gelagert und nach diesem Protokoll für den ersten Teil der Studie verwendet, da die Anzahl der lebenden Zellen nun ausreichend war. Da das Vorhandensein und die Konzentration von FBS sowie die Veränderung von T° offenbar die Vitalität der Pferde-MNZ beeinflussen, ergab sich die Frage, ob und in wie weit sich diese Beobachtungen im zweiten Teil der Studie nach der Nutzung von autologen Flüssigkeiten wie Plasma und KMÜ und nach der Exposition der MNZ in verschiedenen Temperaturen bestätigen würden. Aufgrund dieser frühen Beobachtungen konnte der Empfehlung von BRONZINI et al. (2012), den Versand von MSC für die klinische Anwendung mit PBS bei RT zu verschicken, widersprochen werden.

Aus methodischen Gründen wurde der Faktor Zeit in den Vorversuchen und im ersten Teil der Studie (24 h) nicht modifiziert, da die Vorbereitung der MNZ Zeit benötigt und die Untersuchung des Einflusses von Zeit auf die Versuchsergebnisse für den zweiten Teil der Studie vorgesehen war.

5.3.2 Sechster Behälter

In dieser Studie war ursprünglich ein sechster Behälter involviert, welcher jedoch verworfen wurde. Alle Behälter wurden zunächst auf Dichtheit geprüft, wobei ein Spritzenmodell, welches nur aus Glasmaterialien bestand, über keinen dichten Kolben verfügte und somit den Verlust der Suspension während des Transports verursacht hätte.

5.3.3 WST-1-Reagenztest

Vor Beginn der Studie wurde beurteilt, ob die MSC-Anzahl und die Zeit der Inkubation eine Rolle bei den photometrischen Ergebnissen spielen. Dafür wurden Pferde-MSC aus P₄ verwendet und sechs verschiedene Zellkonzentrationen (1000, 5000, 150.000, 300.000, 600.000 und 1,2 x 10⁶ MSC) nach zwei und vier Stunden Inkubationszeit evaluiert. Die MSC wurden in einer 0,5 %-igen WST-1-Reagenzlösung (mit phenolrotfreiem Medium) resuspendiert. Hier zeigten die photometrischen Messungen eine unmittelbare Wechselwirkung zwischen Zellkonzentration, Zeit und Zellvitalität der MSC und damit ein Phänomen, welches in den ersten beiden Teilen der Studie noch nicht aufgegriffen worden war.

5.3.4 Adipogene Differenzierung

Die Literatur beschreibt die Nutzung von Kaninchenserum zur Herstellung eines Mediums für die adipogene Differenzierung (DIASCRO et al. 1998, JANDEROVÁ et al. 2003, GITTEL et al. 2015, VIDAL et al. 2011). Ziel eines dahingehend gestarteten Vorversuchs war die Etablierung eines geeigneten Protokolls für die adipogene Differenzierung in Bezug auf alle drei Teile dieser Studie. Zudem wurde beurteilt, ob und welchen Einfluss die Zugabe von Kaninchenserum auf die adipogene Differenzierung von Pferde-MSC hat. Dafür wurden MSC aus P₄ verwendet und im Versuchsverlauf vier Protokolle untersucht, welche nachfolgend beschrieben sind.

Als erstes wurde ein Protokoll mit zwei verschiedenen Medien untersucht. Hier erfolgte die Entwicklung einer Zellkultur in vier Zyklen über jeweils drei Tage mit dem in dieser Studie verwendeten adipogenen Induktionsmedium (ohne Kaninchenserum), gefolgt von einem Tag mit Basiskulturmedium. Nach dem vierten Zyklus wurden die Zellen für weitere fünf Tage mit Basiskulturmedium inkubiert, bis die Auswertung am 21. Tag erfolgte. Bei diesem Protokoll zeigte sich eine geringgradige Differenzierung in die adipogene Richtung. Nach der Oil Red O-Färbung waren einige Lipidtropfen vorhanden, insbesondere an den Zellen, die sich am Rand der 24-Well-Kulturplatte befanden.

Beim zweiten Protokoll wurden die Zellen mit Basiskulturmedium und 15 % Kaninchenserum inkubiert. Aufgrund einer starken Proliferation wurde hier am vierten Tag der Kultur ein Umklappen des Zellteppichs mit nachfolgender Ausbildung eines Pellets beobachtet. Die Auswertung erfolgte am sechsten Tag und zeigte nur sehr weniger Lipide. Es waren wenige adhärenente und differenzierte Zellen vorhanden.

Beim dritten Protokoll wurde zum Induktionsmedium 15 % Kaninchenserum gegeben. Hier waren die Zellen bis zum dritten Tag vital, uniform fibroblastisch und homogen auf der 24-Well-Kulturplatte verteilt, jedoch verringerte sich ab dem vierten Tag die Vitalität und die Zellen waren nur noch am Rand der 24-Well-Kulturplatte vital, dort aber noch proliferierend. Bei der Auswertung am sechsten Tag zeigte sich eine gute Differenzierung mit vielen Lipidtropfen nach der Oil Red O-Färbung. Randständige Zellen waren besser differenziert, aber aufgrund der verringerten Vitalität am vierten Tag wurde das Protokoll wiederholt und die Auswertung diesmal für den dritten Tag angesetzt. Dieses Protokoll wurde beibehalten und mit alternativen Konzentrationen des Kaninchenserums getestet.

Somit wurde im vierten Protokoll das Kaninchenserum erneut in einer Konzentration von 15 % wie auch vergleichsweise in den Konzentrationen von 2 % und 5 % verwendet. Bei der Auswertung am dritten Tag zeigten sich hinsichtlich Morphologie und Oil Red O-Färbung mit 5 % Kaninchenserum die besten Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde dieses Protokoll für die Durchführung der Studie verwendet.

5.3.5 Chondrogene Differenzierung

Vor Beginn der Studie wurde die Differenzierung und histologische Auswertung von aufgetauten Pferden-MNZ in die chondrogene Richtung durch ein dreidimensionales Modell (Pellet-Modell) erfolgreich getestet. Während der Studie (Teil 1) zeigte sich beim ersten Probanden hinsichtlich aller fünf untersuchten Bedingungen (inklusive doppeltem Einsatz), dass die Erhaltung der MNZ-Pellets nicht möglich war. Nach der Zentrifugation der MNZ blieben während der ersten 24 Stunden Inkubationszeit alle MNZ wie erwartet am Boden der 15 ml-Zentrifugenröhrchen, nachdem diese aber zum ersten Mal nach Ende der Inkubationszeit geschüttelt wurden (Vortex), haben sich die Pellets, welche am Boden des Zentrifugenröhrchens lagen, ausgelöst. Daraufhin wurde den weiteren Pellets desselben Probanden mehr Zeit für die dreidimensionale Organisation der MNZ im Pellet-Modell gegeben, d. h. die weiteren Zentrifugenröhrchen wurden erst nach 48 und 72 Stunden zum ersten Mal geschüttelt. Trotzdem wurde das gleiche Phänomen beobachtet, Zudem waren die Pellets nach dieser Inkubationszeit nicht mehr deutlich zu identifizieren bzw. haben sich selbst (ohne Zentrifugation) ausgelöst. Wenn MNZ sofort nach der Zentrifugation inkubiert werden, organisieren sie sich zu einem stabilen Pellet, welches nach 24 Stunden sehr schwer auslösbar ist. Die Zentrifugation nach 24 Stunden erfolgt nur, um eine Adhäsion der Pellets an der Wand oder am Boden der Zentrifugenröhrchen zu vermeiden. Es ist bemerkenswert, dass dieses Phänomen eine direkte Beziehung zu Zellvitalität und Detritus hat. Nachdem die MNZ in den verschiedenen Behältern für 24 Stunden gelagert wurden, verringerte sich die Vitalität und die Menge an Detritus stieg unproportional an. Aufgrund

dieser Beobachtung ist zu vermuten, dass lebende Zellen für die chondrogene Differenzierung im dreidimensionalen Modell einen direkten Kontakt für die wechselseitige Assoziation ihrer Membranen benötigen. Diese Beobachtung ist bis jetzt in der Literatur nicht beschrieben. Sie machte es für alle Probanden und für alle drei Teile der Studie erforderlich, den Detritus nach Gewinnung der MNZ aus den Behältern von den MNZ zu trennen, bevor die Herstellung der Pellets erfolgen konnte. Da Zelladhäsion innerhalb einer Kultur eine der drei Hauptcharakteristika der MSC ist, wurden alle MNZ nach der Gewinnung aus den Behältern wieder in T₇₅-Kulturflaschen ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach dem Waschen mit PBS wurde der Überstand verworfen, um den Detritus zu entfernen und nur die adhärenzte MSC behalten zu können, welche als nächstes durch Trypsin ausgelöst bzw. erhalten wurden (Standardprotokoll für das Passagieren der Zellen). Erst nach dieser Maßnahme konnte die Pellet-Bildung der untersuchten Bedingungen erfolgen, was bedeutet, dass der Teil der Zellen, welcher für die chondrogene Differenzierung benutzt wurde, eine weitere Passage erhalten hat. Dennoch konnten die Ergebnisse der chondrogenen Differenzierung nach der Safranin O/Fast Green-Färbung (Bern-Score) nicht in allen Teilen der Studie mit der maximalen Punktzahl bewertet werden. Es ist fraglich, ob diese einmalige weitere Passage (inkl. Trypsin-Exposition) der MNZ eine Behinderung der chondrogenen Differenzierung bewirkt hat. Die Literatur beschreibt, dass die Behinderung bzw. der Verlust der Differenzierungsfähigkeit aufgrund von Seneszenz herbeigeführt wird (STEHE et al. 2006, WILEY et al. 2017). In diesem Fall gab es jedoch keine Hinweise auf Seneszenz. Zellen, welche in dieser Studie als Kontrolle dienten, haben auch diese weitere Passage erhalten.

5.3.6 Kryokonservierungsmedium in der Pferdereproduktionsmedizin

In der Reproduktionsmedizin sind standardisierte Protokolle etabliert, welche in einem Vorversuch zur Kontrolle der Vitalität von MSC extrahiert wurden. Das Ziel dieses Vorversuchs war es, das Standardeinfrierungsprotokoll für MSC (FBS + 10 % DMSO) mit verschiedenen originalen und modifizierten Samenverdünnern zu vergleichen und zu überprüfen, ob die besonderen Inhaltsstoffe eine Verbesserung der Vitalität der MSC zeigen würden (Equipro Cryoguard 1 Step mit Eigelb, Ref.13570/0410 und Equipro Cryoguard 1 Step ohne Eigelb Ref. 13570/0429). Von diesen Produkten wurden folgende Kryokonservierungsmedien angefertigt und geprüft: a) DMSO 10 % und FBS 90 % (Kontrolle), b) Cryoguard mit Eigelb, mit Glycerin, c) Cryoguard ohne Eigelb, mit Glycerin, d) Cryoguard ohne Eigelb, mit Glycerin, mit 90 % FBS und e) Cryoguard ohne Eigelb, mit Glycerin, mit 2 % FBS. Es wurden 4×10^6 MSC in 0,5 ml der genannten Kryokonservierungsmedien in Kryoröhrchen resuspendiert und die Herstellung erfolgte im 4er Ansatz. Nach dem Auftauen und einer Vitalitätsmessung der MSC wurde beobachtet,

dass die Kontrolle mit 10 % DMSO und 90 % FBS bei ca. 50 % bessere Ergebnisse als alle originalen und modifizierten Spermienversandmedien erzielte. Es ist sehr wichtig zu beachten, dass der Faktor "Reinheit" aufgrund des Vorhandenseins von Eigelb sehr stark beeinträchtigt ist und solche Produkte für eine Therapie absolut ungeeignet sind.

5.3.7 Die Auswirkung von Druck auf die Zellmembran

Die Integrität der Zellmembran kann sich aufgrund von hypertonen und hypotonen Lösungen drastisch verändern, was unter Umständen zum Tod der Zellen führt (EVANS ET AL. 1977). Ein teilweise ähnlich gelagertes physisches Phänomen kann aufgrund des Druckaufbaus beim Injektionsvorgang (z. B. einer MSC-Suspension oder eines Zellpräparates) mittels einer Spritze auftreten, wenn der Injektionsort nicht richtig getroffen wurde (z. B. bei intrakutanen Injektionen) oder aufgrund der kompakten Organisation des Gewebes der Widerstand beim Spritzen vergleichsweise groß ist. Besonders in diesen Fällen kann sich beim Injektionsvorgang ein gewisser Druck in der Spritze entwickeln, welcher unter Umständen die Zellmembran der MSC beschädigen könnte. Dieser Faktor könnte den Erfolg einer Therapie während der Applikation beeinflussen.

Im Rahmen eines Vorversuchs wurde daher die Vitalität der MSC durch Trypanblau-Färbung nach zwei verschiedenen Expositionszeiten von „positivem“ (bei der Injektion) und „negativem“ Druck (beim Rückzug des Spritzenkolbens) überprüft. Dafür wurden $2,5 \times 10^6$ MSC mit 450 μ l PBS resuspendiert und in 6-ml-Plastikspritzen mit Plastikkolben gefüllt (n = 2). Je nach Bedingung wurden die Kolben per Hand zwei ml vorwärts und zwei ml rückwärts bewegt und für 5 bzw. 20 Sekunden angehalten (Anzahl der Bedingungen pro Proband = 4). Hier zeigte sich die Tendenz, dass sowohl der Druck selbst als auch die Druckdauer die Vitalität der MSC beeinflussen kann, wobei der negative Druck für die evaluierte Zeit „zerstörender“ auf die Integrität der Zellmembran einwirkte als der positive Druck (Ergebnisse sind nicht angezeigt).

5.4 Diskussion der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur

5.4.1 Diskussion des ersten Teils der Studie

Bei der Auswertung nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde der Inhalt der Behälter 2, 3 und 4 (Spritzen) direkt in die Falkonröhrchen transferiert. Hier konnte bei den Behältern 2 und 3 im Gegensatz zum Behälter 4 beobachtet werden, dass es Veränderungen hinsichtlich der Festigkeit des Kolbens gab bzw. der Widerstand beim Spritzen nicht gleichmäßig war. Dieser Faktor muss beachtet werden, da der Widerstand des Kolbens beim Spritzen wichtig für die

Anwendung eines Spritzenpräparates ist und das System „Spritze“ nur funktioniert, wenn die Körper- und Kolbensilikonisierung homogen und richtig aufeinander abgestimmt sind (REUTER et al. 2012). Nach Information des Herstellers enthalten alle untersuchten Spritzenmodelle Silikonöl. Die hinsichtlich der Silikonierung verwendete Beschichtungstechnik und/oder die Wechselwirkung der Materialien könnten bei den Behältern 2 und 3 also unter Umständen zu besagten Veränderungen hinsichtlich der Kolbenfestigkeit geführt haben.

Bei Behälter 4 ist die Kolbenstange durch Drehen vom Kolben entfernbar, wodurch das Risiko von Suspensionsverlust während des Transports vermieden wird.

Insgesamt betrachtet, lieferten die Spritzenmodelle (Behälter Nummer 2, 3 und 4) im Vergleich zu den Behältern 1 und 5 die höheren Werte hinsichtlich des Endvolumens. Dabei erzielte Behälter 4 mit einem Endvolumen von 91 % das beste Ergebnis. Gleichzeitig wurde bei diesem Behälter der kleinste IQR festgestellt (16 µl).

Neben den bereits genannten Beobachtungen spielen bei der Bewertung der Behälter auch Faktoren wie Form, Funktionalität und Fassungsvermögen eine Rolle. Die Spritzenmodelle (Behälter 2, 3 und 4) ermöglichen den unkomplizierten und kontrollierten Ausgang der Flüssigkeit und haben überdies den Vorteil, vom Tierarzt direkt zur Applikation der MSC genutzt werden zu können. Falls die MSC dagegen in den Behältern 1 und/oder 5 geliefert wird, muss der Tierarzt den Inhalt erst in eine Spritze aufziehen – dieser Umstand musste daher bei der Evaluierung des Endvolumens für Behälter 1 und 5 berücksichtigt werden. Hier ist wichtig zu bemerken, dass nur Behälter 1 und 5 für die Lagerung von MSC entwickelt wurden, wogegen Spritzen grundsätzlich zur Anwendung gedacht sind. Behälter 1 lieferte ein besseres Endvolumen als Behälter 5, aber Kryoröhrchen können für die Transferierung des Inhalts in eine Spritze in der Regel nicht in einer sterilen, geschützten Umgebung geöffnet werden. Die Transferierung erhöht das Kontaminationsrisiko und begünstigt das Risiko des Verlusts durch Umfallen des Behälters (man sollte die Zellsuspension daher besser in z. B. zwei Kryoröhrchen aufteilen). Behälter 5 bietet dagegen ein geschlossenes und steriles Format, hat aber den Nachteil, dass aufgrund seines flachen, unteren Endes ein Teil der Flüssigkeit nicht entfernt werden kann und die zur Transferierung verwendete 18 G-Kanüle durch versehentliches Anstechen des Behälterbodens verstopft.

Hinsichtlich ihres Fassungsvermögens weisen die Behälter ebenfalls Unterschiede auf. Behälter Nr. 1 und 5 wurden für 2 ml entwickelt, während Behältern 2, 3 und 4 für 1 ml konzipiert sind (wobei Behälter Nr. 4 aber bis zu 2 ml fassen kann). Was im Behälter nicht mit flüssigem Inhalt gefüllt wird, ist mit Luft besetzt, d. h., die 500 µl Zellsuspension haben sich bei den Behältern 1 und 5 auf eine größere innere Oberfläche des Behälters verteilt und können in Ermangelung eines Kolbensystems, das die Flüssigkeit durch Druck von den Behälterwänden lösen könnte, nur mit vergleichsweise großen Verlusten aus den Behältern

transferiert werden. Auch in den Spritzenmodellen wurde zu Vergleichszwecken ein gewisser Anteil Luft belassen (50 %), wobei der Luftanteil in den Behältern 1 und 5 durch das größere Fassungsvermögen höher war (75 %). Weil nach den 24 Stunden Lagerungszeit eine Sedimentation der MSC zu sehen war, mussten alle Behälter nach Ende der Inkubationszeit leicht geschüttelt werden. Dabei konnte in den Behältern 1 und 5 eine größere Menge an Luftblasen bzw. Schaumbildung beobachtet werden, was wiederum einen zusätzlichen Verlust beim Transferieren zur Folge hatte. Der Einfluss des Vorhandenseins und der Konzentration von CO₂ und O₂ auf die Zellsuspension wurde in dieser Studie nicht näher untersucht.

Im ersten Teil der Studie war die Vitalität der MSC in Behälter 4 mit 43,9 % am höchsten. Hier lag der Kontrollwert nach der Zellbearbeitung (Pipettieren, Zentrifugieren u. a.) bei 76,8 %. Aufgrund der Zellbearbeitung und Lagerung ging fast ein Viertel der Vitalität der MSC verloren, was als Verlust der „Reinheit“ der Therapie interpretiert werden kann. Es muss erwähnt werden, dass aufgrund des Studiendesigns (große Anzahl von Untersuchungsbedingungen), für jeden Teil der Studie eine sehr hohe Anzahl von MSC notwendig war und sich dadurch die Zeiten der Verarbeitung pro Proband verlängerten, welche Einfluss auf die Vitalität haben. Andere Vergleiche unterschiedlicher Transportbehälter zur klinischen Anwendung von MSC sind dem Autor dieser Studie nicht bekannt.

5.4.2 Diskussion des zweiten Teils der Studie

In den Ergebnissen des zweiten Teils der Studie zeigte sich, dass die Temperatur während des Transports eine sehr wichtige Rolle spielt.

Zunächst wurde eine niedrige Vitalität der MSC im negativen Temperaturbereich beobachtet, insbesondere unter der Verwendung von biologischen Flüssigkeiten mit 10 % DMSO (KMÜ und Plasma). Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu anderen Studien, in denen eine höhere Vitalität zwischen 60 und 80 % nach 48 und 72 Stunden im negativen Temperaturbereich mit allogenen Serum inkl. 10 % DMSO beobachtet wurde (GARVICAN et al., 2014). Bemerkenswert ist eine weitere Studie (MITCHELL et al., 2015), in der kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde, nachdem die MSC in FBS und autologem sowie allogenen Serum resuspendiert wurden. Hier zeigte sich eine Vitalität zwischen 80 und 90 %. Unterschiedliche Protokolle und Methoden können diese Widersprüchlichkeit zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie erklären, wie zum Beispiel das Vorhandensein von Heparin in einer Konzentration von 10 % bei den Plasma- und Knochenmarkspalten oder die Abwesenheit von Koagulationsfaktoren bei Serumproben anderer Studien (MITCHELL et al., 2015). Weitere Faktoren wären die große Anzahl an Konditionen und das Verfahren des

Auftauens bei dieser Studie. Die Proben wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, was alltagspraktischen Bedingungen klinischer Tierärzte am besten entspricht. Allgemein wird ein schnelles Auftauen der MSC empfohlen, um eine Beschädigung der Zellmembran durch Eiskristallbildung zu verhindern (KATAYAMA et al. 1997, PHELAN 2007). Interessanterweise zeigen neuere Studien eine signifikante Verbesserung der Zellvitalität, wenn das Wasserbad im Vergleich zu 37 °C auf 70 °C temperiert war (NÖTHLING et al. 2007). Bei der Studie von MITCHEL et al. (2015) wurde ein eigenes Auftauverfahren etabliert, weil sich im Rahmen der Vorversuche eine Vitalität von weniger als 60 % bei Verwendung des Standardauftauprotokoll zeigte (Wasserbad bei 37 °C). Im Vergleich zu den Vorversuchen wurde während des Auftauprozesses PBS in die MSC-Suspension gegeben, um einen osmotischen Schock nach dem Auftauen zu verhindern und die Toxizität von DMSO zu verringern. Ein ähnliches Auftauprotokoll wurde von GARVICAN et al. (2014) verwendet, was die Vitalitätswerte von 60 bis 80 % erklären würde. Diese invasive Maßnahme ist aber keine mögliche Option in der klinischen Praxis, da praktische Tierärzte in der Regel keine geschützte Atmosphäre bzw. Arbeitsbank zur Verfügung haben. Das Auftauen der MSC erfolgt in der Praxis mitunter nicht einmal im Wasserbad, sondern mittels Körpertemperatur in der Hand, was hinsichtlich einer adäquaten Zellvitalität viel zu lange dauert. Ein zur vorliegenden Studie veröffentlichter Artikel stieß beispielsweise bei einem Reviewer auf Verwunderung, weil die Zellen nicht in der Hand, sondern im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut wurden.

Eine Verdünnung des Transportmediums nach dem Auftauen und vor der Messung der Vitalität wurde in dieser Studie nicht durchgeführt. Für diese Zwecke sollte ein geschlossenes, anwendungsbereites System entwickelt werden, um das Auftauen unter Laborbedingungen in der klinischen Praxis ohne Kontaminationsrisiko reproduzieren zu können. Hierfür wäre auch die Evaluierung des Auftauens bei höheren Temperaturen sehr empfehlenswert (NÖTHLING et al. 2007). Ein weiterer Unterschied zwischen den genannten und der vorliegenden Studie ist die Nutzung von Glasspritzen mit Gummikolben, welche im zweiten Teil der Studie für alle Untersuchungsbedingungen verwendet wurden.

Es ist möglich, dass in dieser Studie die Wahl der Transportbehälter Einfluss auf die Zellvitalität während des Einfrierprozesses hat. Im ersten Teil der Studie wurden die verschiedenen Behälter nur bei Raumtemperatur ausgewertet, wobei Glasspritzen mit Gummikolben und -stößeln die besten Ergebnisse erzielten und somit für das Einfrieren der MSC verwendet wurden. In der Regel folgt man im Labor dem Standardprotokoll für die Kryokonservierung und nutzt Kryoröhrchen um Zellen einzufrieren. Es ist möglich, dass sich in dieser Studie sowohl Materialien wie Glas und Gummi als auch die Handhabung der Spritze negativ auf die Lebensfähigkeit der MSC hinsichtlich der Prozesse des Einfrierens, Auftauens und der Lagerung auswirken können. Glasspritzen zeigten sich genauso stabil wie

Kryoröhrchen, als diese zwecks Testung einer drastischen Temperaturveränderung von -150 °C auf 37 °C und 60 °C erwärmt wurden.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Verwendung von DMSO als Kryokonservierungsmittel. DMSO wurde bei dieser Studie in einer Konzentration von 10 % in allen Versuchen im negativen Temperaturbereich verwendet, jedoch ist DMSO bei der Exposition der Zellen potenziell zytotoxisch, wenn diese wie bei der Herstellung der Zellsuspension noch flüssig oder gerade aufgetaut sind (weshalb nach dem Auftauen das Waschen der MSC notwendig ist). Unerwünschte und toxische Reaktionen bei mit DMSO-behandelten menschlichen Patienten wurden berichtet (THIRUMALA et al. 2013). Interessanterweise wurde auch berichtet, dass DMSO die MSC zu Zellen differenzieren kann, die koronalen oder neuronalen Zellen ähneln (WOODBURY et al. 2000).

Auf Basis der im negativen Temperaturbereich ausnahmslos geringen Zellvitalität des zweiten Teils dieser Studie kann man in Bezug auf ein optimales Versandmedium für gefrorene MSC keine definitive Schlussfolgerung formulieren. Die Ergebnisse dieser Studie haben nachgewiesen, dass die Nutzung von Cryostor™ für die Lagerung der MSC sehr zu empfehlen ist, aber eine eventuelle MSC-Behandlung, welche Cryostor™ enthält, nur mit Vorsicht durchgeführt werden sollte, da es bislang keine In-vivo-Kompatibilitätsstudie gibt (wie z. B. für den Fall einer intratendinösen oder intraartikulären Injektion beim Pferd). Eine Alternative wäre das Waschen der MSC bei Ankunft, wozu im Arbeitsfeld praktizierender Tierärzte bisher allerdings die nötigen Bedingungen fehlen. Hier sollte ebenfalls ein geschlossenes System zum Waschen der MSC nach gekühltem Versand entwickelt werden. In dieser Studie zeigte die Evaluierung der Vitalität gefrorener MSC nach 48 und 72 Stunden keine deutlichen Unterschiede, was sich in den Ergebnissen einer Studie von GARVICAN et al. (2014) bestätigte.

Für den gekühlten Versand der MSC stehen folgende Optionen zur Verfügung: Trockeneis hat eine Temperatur von -76 °C und es wird häufig für den Versand kommerzieller Laborprodukte in Styroporboxen verwendet und wäre auch hinsichtlich des Transportes gefrorener MSC eine Möglichkeit. Eine weitere Einfriervariante ist die Nutzung von flüssigem Stickstoff. Dafür benötigt man jedoch einen speziellen Behälter, dessen Transport nur von einer spezialisierten Firma durchgeführt werden kann, was die Versandkosten dementsprechend erhöhen würde. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie kann extrapoliert werden, dass eine konstante Kontrolle der Temperatur (inkl. Dokumentation des Temperaturverlaufs) während der gesamte Transportdauer zur Qualitätskontrolle der MSC sehr wichtig ist. Eine klinische Studie berichtet, dass den Versand von MSC gekühlt zwischen 4 °C und 10 °C mithilfe von Kühlakkus im Transportboxen erfolgte (GODWIN et al. 2012). Die Nutzung von Kühlakkus ermöglicht den Versand von Produkten gekühlt z. B. bei 4 °C und auch -20 °C , jedoch ist es fraglich, ob

bzw. wie lange diese Temperaturen mithilfe von Styroporboxen stabil gehalten werden können. In der vorliegenden Studie wurde beim Vergleich zwischen -20 °C und -80 °C kein Unterschied der Vitalität der MSC beobachtet.

In Bezug auf die Überlebensfähigkeit der MSC im positiven Temperaturbereich, zeigte diese Studie eine rückläufige Vitalität von nicht gefrorener MSC nach 24 und 48 Stunden, welche auch in anderen Studien beobachtet wurde (BRONZINI et al. 2012, MERCATI et al. 2014; GARVICAN et al., 2014). Interessanterweise untersuchten BRONZINI et al. (2012) innerhalb der ersten 24 Stunden mehrere Zeitpunkte, (nach 3, 6, 9, 12 und 24 h) und berichteten, dass innerhalb von 12 Stunden die Vitalität der Zellen erhalten blieb, wogegen nach 12 Stunden ein immer deutlicherer Rückgang der MSC-Vitalität zu verzeichnen war.

In Bezug auf die Auswirkungen von Temperaturen im positiven Bereich kommen MERCATI et al. (2014) zu dem Ergebnis, dass niedrige Temperaturen für die Vitalität der MSC von Vorteil seien. Im Vergleich zu dieser Beobachtung wurden allerdings auch widersprüchliche Ergebnisse berichtet. So verzeichneten BRONZINI et al. (2012) bei Raumtemperatur eine höhere Vitalität als bei 4 °C . In der vorliegenden Studie gab es keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich der Vitalität zwischen 4 °C und RT, es zeigte sich jedoch eine deutliche Tendenz zugunsten von 4 °C . Diese Beobachtung wurde auch bei der Untersuchung der Beziehungen von Transportmedium und Zeit im positiven Bereich bestätigt. Der gekühlte Transport von MSC wird auch in weiteren klinischen Studien beschrieben (BECERRA et al. 2013, DUDHIA et al. 2015), in denen die MNZ expandiert wurden und 10×10^6 MSC in autologe KMÜ resuspendiert und zur weiteren Bearbeitung (Labeling mit Technetium^{99m}) ins Labor versandt wurden. Bei beiden Studien wurde bei Ankunft im Labor und vor Markierung der Zellen mit Technetium^{99m} keine Kontrolle der Zellvitalität durchgeführt. In der ersten Studie gibt es zudem keine Erwähnung der Dauer des MSC-Transports (BECERRA et al. 2013), während in der zweiten Studie eine Versanddauer von weniger als 24 Stunden angegeben wurde (DUDHIA et al. 2015). In dieser Veröffentlichung wird darauf hingewiesen, dass die Rechte am Verfahren der klinischen Nutzung von KMÜ-resuspendierten mesenchymalen Stammzellen ReCellerate Inc. (USA) gehören und eine Nutzung im Vorfeld deren Autorisierung bedarf.

In Bezug auf MSC-Lagerung und -Transport im positiven Temperaturbereich beschreiben GARVICAN et al. (2014), dass die Überlebensfähigkeit der MSC geringer sei, wenn diese statt in NaCl und DMEM in allogenen biologischen Flüssigkeiten resuspendiert werden. Dies ist eine interessante Beobachtung, der die Ergebnisse der vorliegenden Studie nur zum Teil widersprechen können, da hier keine allogenen Produkte verwendet und keine signifikanten Unterschiede beobachtet wurden. Allerdings zeigte sich die Tendenz, dass die Nutzung von autologem KMÜ und Plasma im Vergleich zu PBS und dem kommerziellen Produkt Hypothermosol im positiven Bereich eine deutlich höhere Zellvitalität liefern kann. Dieses

Phänomen erklärt sich über eine mögliche Aktivierung des Komplements, sofern die MSC mit allogenen Produkten resuspendiert wurden. Bei der Verwendung autologer Produkte wäre dies nicht der Fall. Eine thermische Behandlung des Plasmas/BMS bei 56 °C für 30 Minuten kann die Aktivierung des Komplements behindern. Leider ist in der allogenen Studie von GARVICAN et al. (2014) keine Inaktivierung des Komplements beschrieben worden. Auf dem deutschen Markt stehen verschiedene Produkte (mit und ohne biologische Flüssigkeiten) für die Zellkultur zur Verfügung und beim Kauf kann man entscheiden, ob man diese thermische Behandlung selber durchführen möchte oder ob diese vom Hersteller durchgeführt werden soll. Die in der vorliegenden Studie für die Zellkultur verwendete Inaktivierung des Komplements des FBS wurde vom Hersteller durchgeführt.

Ein Vergleich der Expansion von Pferde-MSK in allogenen Plasma-Lysat und xenogenem Kulturmedium (FBS) zeigte keinen signifikanten Unterschied (SEO et al. 2013). Leider wird in der Publikation von SEO et al. (2013) nicht beschrieben, ob eine Inaktivierung des Komplements vorgenommen wurde. Ein anderer Vergleich der Vitalität von Pferde-MSK in zehn verschiedenen Transportmedien umfasste PBS und DMEM mit und ohne Zusatz von 20 % oder 80 % Pferdeserum (wahrscheinlich allogenen) oder 20 % oder 80 % FBS. Hier wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt und die Nutzung von PBS ohne deutliche Erklärung weiterempfohlen (BRONZINI et al., 2012). In der vorliegenden Studie wurde bereits in den Vorversuchen des ersten Teils DMEM mit 20 % FBS verwendet, da das Standardmedium für eine MSC-Kultur (10 % FBS) nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C nicht die notwendige Anzahl von MSC zur Differenzierung und Proliferation lieferte. Allerdings war das Ziel des ersten Teils ausschließlich der Vergleich der verschiedenen Behälter und im zweiten Teil der Studie wurde die Nutzung von FBS absichtlich vermieden. In einer weiteren Studie (MERCATI et al. 2014) wurde ebenfalls bewusst auf FBS verzichtet, um Fremdmaterialien zu vermeiden. In der Studie von SUNDIN et al. (2007) zeigte sich in diesem Zusammenhang, dass ein fremdes Material wie FBS xenogene Immunreaktionen verursachen und zusätzlich verantwortlich für das Risiko der Übertragung von Krankheitserregern wie Viren, Acteria und Prionen sein kann. Es ist von großer Bedeutung, dass der behandelte (und damit auch beschädigte) Injektionsort nach der MSC Behandlung möglichst unauffällig bleibt. Fremdkörper führen zur Verstärkung unerwünschter Reaktionen des Injektionsorts (PIGGOT et al. 2013). In diesem Zusammenhang wurden beim Pferd autologe, allogene und xenogene MSC intraartikulär injiziert und die geringste aber noch vorhandene Reaktion des Gelenkes wurde bei autologen MSC festgestellt. Die Nutzung von allogenen MSC, die sofort im Labor aufgetaut werden könnten, würde dagegen die Kulturzeit und die Zeit bis zur Therapie drastisch reduzieren. Allerdings gibt es bisher noch keine Studie, die die Verwendung autologer und allogener MSC in Bezug auf den Erfolg der Therapie verglichen hätte.

In der vorliegenden Studie sind die Ergebnisse hinsichtlich der Differenzierungsfähigkeit der MSC kompatibel mit der Literatur (MERCATI et al. 2014). Die beste Differenzierungsfähigkeit der MSC zeigte sich bei der frühen und späten Osteogenese, gefolgt von den Ergebnissen der adipogenen Differenzierung. Hier wurde keine signifikante Verminderung der MSC-Differenzierungsfähigkeit festgestellt. Bei der chondrogenen Differenzierung ließ sich dagegen eine gleichmäßige Verminderung dieser Fähigkeit beobachten. Der Differenzierungsfähigkeit der MSC wurde von FERRIS et al. (2014) eine besondere Rolle bei der Behandlung von Pferden mit Osteoarthritis zugeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden mit einem Mikrotom mehrere Schnitte der chondrogenen Pellets für die drei dazugehörigen Färbungen angefertigt. Dabei waren innerhalb eines Pellets, häufig unterschiedliche Differenzierungsgrade zu beobachten.

5.4.3 Diskussion des dritten Teils der Studie

In der vorliegenden Studie wurden beim Vergleich der drei evaluierten Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Proliferation, Vitalität und Differenzierungsfähigkeit der MSC festgestellt.

5.4.4 Schlussfolgerungen

Die moderne Medizin konnte im Laufe der Zeit beachtliche Fortschritte machen, wobei viele Entwicklungen kontrovers diskutiert wurden. So machte beispielsweise CRUIKSHANK im Jahr 1776 erste Bemerkungen zur Nervenregeneration, konnte die dazugehörige Arbeit aufgrund des Ursprungs des regenerierenden Materials und der skeptischen Meinungen der Redakteure aber erst neun Jahre später veröffentlichen, nachdem bereits eine andere Studie ähnlichen Inhalts an die Öffentlichkeit gelangt war (OCHS 1977). In den letzten 25 Jahren wurde nahezu überall behauptet, dass die Regenerierung beschädigter Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) nicht möglich sei. Heutzutage ist diese Ansicht jedoch kaum mehr aufrechtzuerhalten. Die ersten Studien der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts zeigten, dass sich eine „undifferenzierte Zellpopulation“ des ZNS in verschiedene adulte neuronale Zelltypen differenzieren kann (GAGE 2000). Weitere Studien zeigten eine positive Wirkung der MSC-Therapie in beschädigtem Gewebe des Nervensystems (TETZLAFF et al. 2011, RICHARDSON et al. 2010, BOUCHERIE et al. 2009). Diese Entdeckung widersprach einem lange vorherrschenden Dogma und gab daher den entscheidenden Impuls zur Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten unter der Ägide der Regenerativen Medizin (JEFFERY 2012). Nur kurze Zeit später konnte das Verfahren der MSC-Therapie erfolgreich im Bereich

der Pferdemedizin etabliert werden. Das positive Ergebnis des ersten Einsatzes von MSC beim Pferd wurde als vielversprechende Behandlungsart für orthopädische Erkrankungen erkannt (SMITH et al. 2003), weshalb sich in Folge (und nicht ohne Kontroversen) die ersten Dienstleister im Bereich Stammzellisolierung etablierten (JEFFERY 2012). Zellbasierte Tiertherapien sind inzwischen seit Jahren und in vielen Ländern mit beständig steigender Nachfrage verfügbar und haben neben ihrem direkten Nutzen für die behandelten Tiere auch Einfluss auf die präklinische Entwicklung von Humanarzneimitteln. In Deutschland werden ebenfalls Zelltherapien für Tiere angeboten.

Bis heute sind viele Fragen unbeantwortet und noch viele Schritte nötig, um aus einem erfolgreichen Laboreingriff eine wirksame und nützliche klinische Therapie zu entwickeln. Dieser langwierige Prozess betrifft ebenfalls die Akzeptanz dieses neuartigen Therapieansatzes, der im Bereich der Veterinärmedizin leider nach wie vor nicht hinreichend elaboriert ist (JEFFERY 2012). So gibt es bis heute keine MSC-Studie, die alle nötigen Faktoren eines optimalen Studiendesigns wie Randomisierung, doppelte Verblindung und angemessen große Probandenzahl in sich vereint.

6 Zusammenfassung

Verfasser: Miguel Espina

Titel: „Optimierung der Transportbedingungen von mesenchymalen Stromazellen für die klinisch-therapeutische Anwendung am Pferd“

Institut/Klinik: Klinik für Pferde, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, Deutschland

Eingereicht im April 2018

Bibliografische Angaben: 92 Seiten, 50 Abbildungen, 45 Tabellen, 82 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Pferd, Mesenchymale Stromazellen (MSC), Transport, Vitalität

Einleitung: Mesenchymale Stromazellen (MSC) werden zunehmend für klinische Anwendungen bei Pferdepatienten eingesetzt. Für die MSC-Isolation und Expansion ist ein Laborschritt obligatorisch, danach werden die Zellen an den teilnehmenden Tierarzt zurückgesandt. Die Erhaltung der biologischen Eigenschaften von MSCs bzw. die Erhaltung der Qualität der MSCs ist für den Erfolg der Therapie während dieses Transports von größter Bedeutung.

Ziele der Untersuchung: Das Ziel der Studie war es, transportbezogene Parameter (Transportbehälter, Medien, Temperatur, Zeit, Zellkonzentration) zu vergleichen, die potenziell Einfluss auf die Eigenschaften der in Kultur expandierten MSC während des Transportes in Suspension haben können.

Material und Methoden: Diese Studie wurde in drei Teile geteilt, in welchen (I) fünf verschiedene Transportbehälter (Kryotube, zwei Arten von Plastikspritzen, Glasspritze, CellSeal), (II) sieben verschiedene Transportmedien, vier Temperaturen (4 °C gegen Raumtemperatur, - 20 °C vs. - 80 °C), zwei verschiedene Zeitrahmen (24 h gegen 48 h im positiven Temperaturbereich, 48 h gegen 72 h im negativen Temperaturbereich) und (III) drei MSC-Konzentrationen (5×10^6 , 10×10^6 , 20×10^6 MSC/ml) für den positiven und negativen Temperaturbereich verglichen wurden. Jeder Teil der Studie wurde unter Verwendung von Proben von sechs Pferden ($n = 6$) ausgewertet und Differenzierungsprotokolle (adipogene, osteogene und chondrogene) sowie Untersuchung der Vitalität und Proliferationsfähigkeit der MSC wurden für jeden Teil der Studie in doppeltem Einsatz bzw. verdoppelt bestimmt.

Die Ergebnisse wurden als Median und mittlerer Interquartilabstand (IQR) dargestellt ($p \leq 0,05$). Eine Anpassung des Signifikanzniveaus bei multiplen Vergleichen wurde mittels Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test.

Ergebnisse: In Teil I der Studie lieferten die Spritzenmodelle die höheren Werte hinsichtlich des Endvolumens und gleichzeitig erzielte die Glasspritze die beste Zellvitalität. Dieser Behälter wurde für die nachfolgenden Teile der Studie ausgewählt.

In Teil II der Studie wurde die höchste Zellebensfähigkeit mit autologen Knochenmarküberständen als Transportmedium bei 4 °C für 24 h beobachtet (70,6 % gegenüber der Kontrollgruppe 75,3 %). Im Gegensatz dazu war die Lebensfähigkeit für alle Gefrierprotokolle bei -20 °C oder -80 °C, insbesondere bei Knochenmarküberstand oder Plasma und DMSO, unannehmbar niedrig (< 40 %). In Teil III der Studie zeigten die untersuchte Zellkonzentrationen keinen Einfluss auf die ausgewerteten Parameter.

Diskussion: In dieser Studie wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt, möglicherweise war dies durch die hohe Anzahl von Transportbedingungen, welche gleichzeitig verglichen wurden, sowie die Anzahl der Stichproben (n=6) bedingt. Jedoch ergaben sich wichtige Hinweise zur Verbesserung des Transports der MSC für die klinisch-therapeutische Anwendung. Eine Einschränkung der chondrogenen Differenzierungsfähigkeit der MSC trat unter allen untersuchten Bedingungen auf.

Im Vergleich zu früheren Pferdestudien wurde eine niedrigere Lebensfähigkeit der MSC nach dem Auftauen beobachtet. Mögliche Ursachen können unterschiedliche Protokolle beim Einfrieren und Auftauen der MSC sowie die große Anzahl an gleichzeitig bearbeiteten Proben sein. Zukünftige Studien könnten die möglicherweise negativen Auswirkungen des Transports auf die chondrogene Differenzierung klären.

Schlussfolgerung: Trotz fehlender signifikanter Unterschiede ist eine deutliche Tendenz erkennbar, dass MSC aus dem Knochenmark schnellstmöglich bei 4 °C in autologem bzw. eigenem Knochenmark-Überstand aus dem Labor zum Patienten, in dem in dieser Studie untersuchten Glasspritzenmodell, zurückgesandt werden sollten.

7 Summary

Writer: Miguel Espina

Title: Evaluation of transport conditions for autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for therapeutic application in horses

Institute/Clinic: Department for horses, Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Germany

Submitted in April 2018

Bibliographic Information: 92 pages, 50 figures, 45 tables, 82 references

Keywords: Horse, Mesenchymal stromal cells (MSCs), Transport, Viability

Introduction: Mesenchymal stromal cells (MSCs) are increasingly used for clinical applications in equine patients. For MSC isolation and expansion, a laboratory step is mandatory, after which the cells are sent back to the attending veterinarian. Preserving the biological properties of MSCs (MSC Quality) during this transport is paramount.

Aim of the Study: The goal of the study was to compare transport-related parameters (transport container, media, temperature, time, cell concentration) that potentially influence characteristics of culture expanded equine MSCs.

Materials and Methods: This study was arranged in three parts comparing (I) five different transport containers (cryotube, two types of plastic syringes, glass syringe, CellSeal), (II) seven different transport media, four temperatures (4 °C vs. room temperature; -20 °C vs. -80 °C), two time frames (24 h vs. 48 h for the positive temperature range; 48 h vs. 72 h for the negative temperature range), and (III) three MSC concentrations (5 x 10⁶, 10 x 10⁶, 20 x 10⁶ MSC/ml) for the positive and negative temperature ranges. Each condition was evaluated using samples of six horses (n = 6). Differentiation protocols (trilineage differentiation capacity), cell viability and proliferation capacity were performed in duplicates.

The results were presented as median and mean interquartile range (IQR). p ≤ 0,05.

An adjustment of the significance level in multiple comparisons was performed by Bonferroni correction. The data were checked for normal distribution by means through Shaphiro-Wilk test.

Results: In part I of the study, the syringe models provided the higher end volume values, while the glass syringe provided the best cell viability. This container was selected for all subsequent evaluations. In part II of the study, the highest cell viability was observed using autologous bone marrow supernatant as transport medium at 4 °C for 24 h (70.6 % vs. control group 75.3 %). Contrary, viability was unacceptably low (< 40 %) for all freezing protocols at -20 °C or -80 °C, particularly with bone marrow supernatant or plasma and DMSO. In Part III of the study, the investigated cell concentrations did not influence the evaluated parameters.

Discussion: No significant differences were found in this study, possibly due to the high number of transport conditions that were simultaneously compared and the number of samples (n=6). However, important evidence was found to improve the delivery of MSC for clinical-therapeutic use. Chondrogenic differentiation showed a trend towards being decreased for all transport conditions, compared to control cells. A lower viability of MSC after thawing was observed compared to previous equine studies. Possible causes are differences in the freezing, but also in thawing protocols and the large number of samples processed simultaneously. Future studies could clarify the possibly negative effect of transport on chondrogenic differentiation.

Conclusion: Despite the lack of significant differences, the results showed a clear tendency that equine bone marrow-MSCs should be resuspended in autologous bone marrow supernatant at 4 °C and be returned as fast as possible from the laboratory to the patient in the glass syringe model selected in this study.

8 Literaturverzeichnis

- Armstrong RA. When to use the Bonferroni correction. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2014;34:502–508.
- Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum.* 2004;50:142–150.
- Baron F, Lechanteur C, Willems E, Bruck F, Baudoux E, Seidel L. Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16:838–847.
- Becerra P, Valdés VMA, Dudhia J, Fiske-Jackson, Andrew R, Neves F, Hartman, Neil G, Smith RKW. Distribution of injected technetium(99m)-labeled mesenchymal stem cells in horses with naturally occurring tendinopathy. *J Orthopaedic R.* 2013;31: 1096–1102.
- Schnorr B, Kressin M. *Embryologie der Haustiere.* 2013. 6. Auflage. Enke. Stuttgart.
- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica.* 1996;4:14–19.
- Boucherie C, Hermans E. Adult stem cell therapies for neurological disorders: benefits beyond neuronal replacement? *J Neuroscience Res.* 2009;87:1509–1521.
- Burk J, Delling U, Brehm W. Einsatz von Stammzellen in der Therapie von Lahmheiten beim Pferd. *Pferde Spiegel.* 2011;14:9–15.
- Bronzini I, Patruno M, Iacopetti, I, Martinello T. Influence of temperature, time and different media on mesenchymal stromal cells shipped for clinical application. *Vet J.* 2012;194:121–123.
- Diascro DDJR, Vogel RL, Johnson TE, Witherup KM, Pitzemberger SM, Rutledge SJ, Prescott DJ, Rodan GD, Schmidt A. High Fatty Acid Content in Rabbit Serum Is Responsible for the Differentiation of Osteoblasts Into Adipocyte-like Cells. *J Bone Miner Res.* 1998;13:96–106.
- Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 2001;7:259–264.
- Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;213:341–347.
- Garamszegi LZ. Comparing effect sizes across variables: generalization without the need for Bonferroni correction. *Behav Ecol.* 2006;17:682–687.
- Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2000;18:307-316.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3:301–313.
- Dahlgren LA. Fat-derived mesenchymal stem cells for equine tendon repair. *Regen Med.* 2009;4.

- Delling U, Lindner K, Ribitsch I, Jülke H, Brehm W. Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Can J Vet Res.* 2012;76:52-56.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315–317.
- Dudhia J, Becerra P, Valdés MA, Neves F, Hartman NG, Smith RK. In Vivo Imaging and Tracking of Technetium-99m Labeled Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Equine Tendinopathy. *J. Vis. Exp.* 2015;106.
- Dyson S, Murray R, Schramme M, Branch M. Lameness in 46 horses associated with deep digital flexor tendonitis in the digit: diagnosis confirmed with magnetic resonance imaging. *Equine Vet J.* 2003;35:681–690.
- Estrada R, Ramírez M, Estrada JM, Umaña ME. Implantación de células madre alogénicas de origen adiposo para el tratamiento de la habronemiasis cutánea. *Cienc Vet.* 2007;25:271–278.
- Fekete N, Rojewski M, Schmidtke-Schrezenmeier G, Schrezenmeier H. Mesenchymale Stromazellen und ihre klinische Anwendbarkeit. *Transfusionsmedizin.* 2012;2:17–27.
- Chen L, Chien-Wen; Corselli M, Park TS. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell.* 2008;3:301–313.
- Evans EA, Waugh R. Osmotic correction to elastic area compressibility measurements on red cell membrane. *Biophysical Journal.* 1977;20:307-313.
- European Medicines Agency EMA. Committee for Advanced Therapies CAT/571134/2009. Reflection Paper on stem cell-based medicinal products. 14 January 2011.
- Faltus T, Emmerich I, Brehm W. Zellbasierte Tiertherapien Arzneimittelrechtliche Einordnung, Straf- und berufsrechtliche Fallstricke. *Deutsches Tierärzteblatt.* 2015;10:1412–1419.
- Ferris DJ, Frisbie DD, Kisiday JD, McIlwraith CW, Hague BA, Major MD, Schneider RK, Zubrod CJ, Kawcak CE, Goodrich LR. Clinical outcome after intraarticular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Vet Surg.* 2014;43:255-265.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6:230-247.
- Geburek F, Stadler P. Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden. Terminologie, Herstellung, biologisches Potenzial und In-vitro-Effekte. *Tierärztliche Praxis.* 2011;39:373–383.
- Gerhardt A, McGraw NR, Schwartz DK, Bee JS, Carpenter JF, Randolph TW. Protein aggregation and particle formation in prefilled glass syringes. *J Pharm Sci.* 2014;103:1601–1612.
- Horwitz EM; Le Blanc K; Dominici M; Mueller I; Slaper-Cortenbach I; Marini FC. Clarification of the Nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7:393–395.
- Fortier LA, Travis AJ. Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2.

- Fubini SL, Erb HN, Freeman KP, Todhunter RJ. Prognostic Factors Affecting Survival of 507 Horses with Joint Disease: (1983 to 1990). *Can J Vet Res.* 1999;63:253–260.
- Gittel C, Burk J, Ribitsch I, Brehm W. Efficiency of adipogenic differentiation methods in mesenchymal stromal cells from diverse sources. *Regen Med.* 2015;6.
- Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith RKW. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J.* 2012;44:25-32.
- Grogan SP, Barbero A, Winkelmann V, Rieser F, Fitzsimmons JS, O'Driscoll S, Martin I, Mainil-Varlet P. *Tissue Eng.* 2006;12:2141-2149.
- Janderová L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR. Human Mesenchymal Stem Cells as an in Vitro Model for Human Adipogenesis. *Obes Res.* 2003;11:65–74.
- Jeffery ND. Is 'Stem Cell Therapy' Becoming 21st Century Snake Oil? *Vet Surg.* 2012;41:189–190.
- Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:817–827.
- Jones TS, Kaufmann A, Middaugh CR. Silicone Oil Induced Aggregation of Proteins. *J Pharm Sci.* 2005;94:918–927.
- Kasashima Y, Ueno T, Tomita A, Goodship AE, Smith RKW (2011): Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet J.* 2011;43:288–294.
- Katayama Y, Yano T, Bessho A, Deguchi S, Sunami K, Mahmut N, Shinagawa K, Omoto E, Makino S, Miyamoto T, Mizuno S, Fukuda T, Eto T, Fujisaki T, Ohno Y, Inaba S, Niho Y, Harada M. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:283-287.
- Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med.* 2004;200:123–135.
- Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001;28:1133-1140.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Moustapha, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet.* 2004;363:1439–1441.
- Gage FH. Mammalian Neural Stem Cells. *Science.* 2000;287:1433-1438.
- Garvican ER, Cree S, Bull L, Smith RKW, Dudhia J. Viability of equine mesenchymal stem cells during transport and implantation. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5:1–10.
- Gstraunthaler G, Lindl T. *Zell und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen.* Springer. 2013. 7 Aufl.

- Mercati F, Pascucci L, Curina G, Scocco P, Tardella FM, Dall'Aglio C, Marini C, Ceccarelli P. Evaluation of storage conditions on equine adipose tissue-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Veterinary J.* 2014;200:339-342.
- Mitchell A, Rivas KA, Smith III R, Watts AE. Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95% autologous serum and 5% DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95% and DMSO at 10 or 5. *Stem Stell Res Ther.* 2015;6:1-12.
- Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Isensee G, Lang P, Neunhoeffer F. Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;40:25–32.
- Narum, Shawn R. (2006): Beyond Bonferroni: Less conservative analyses for conservation genetics. *Conserv Genet.* 2006;7:783–787.
- Ngamwongsatit P, Banada PP, Panbangred W, Watanalai, Bhunia AK. (2008): WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J Microbiol methods.* 2008;73: 211–215.
- Nöthling JO, Dolieslager SMJ, Fillekes R, Colenbrander B. Thawing dog spermatozoa in just-boiled water: submersion time and effect on sperm quality compared to thawing in water at 70 degrees C. *Theriogenology.* 2007;68:530–537.
- Ochs S. The early history of nerve regeneration beginning with Cruikshank's observations in 1776. *Med Hist.* 1977;21:261–274.
- Pérez-Simon JA, López-Villar O, Andreu EJ, Rifón J, Muntion S, Diez CM. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial. *Haematologica.* 2001;96:1072–1076.
- Peskin AV, Winterbourn CC. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta.* 2000;293:157–166.
- Phelan MC. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Curr Protoc Cell Biol.* 2007;36.
- Pigott JH, Ishihara A, Wellman ML, Russell DS, Bertone AL. Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2013;26:453–460.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, Talano JM, Jacobsohn D, Broadwater G. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal™) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17:534–541.
- Reuter B, Petersen C. Syringe siliconization. *Techno Pharm.* 2012;2:238–244.
- Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R. Stem cells in veterinary medicine--attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol.* 2007; 25:409–416.

- Richardson RM, Singh A, Sun D, Fillmore HL, Dietrich DW, Bullock MR. Stem cell biology in traumatic brain injury: effects of injury and strategies for repair. *J Neurosurg*. 2010;112:1125–1138.
- Salingcarnboriboon R. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res*. 2003;287:289–300.
- Schauwer C, Piepers S, van de Walle GR, Demeyere K, Hoogewijs MK, Govaere JL, Raeckmans K, van Soom A, Meyer E. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry A*. 2012;81:312–323.
- Sellon DC. How to obtain a diagnostic bone marrow sample from the sternum of an adult horse. *AAEP Proceedings*. 2006;52:261–265.
- Seo JP, Tsuzuki N, Haneda S, Yamada K, Furuoka H, Tabata Y, Sasaki N. Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci*. 2013;95:693-698.
- Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion*. 2014;54:1418–1437.
- Smith RKW, 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.
- Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev*. 2006;5:91–116.
- Sundin M, Ringdén O, Sundberg B, Nava S, Götherström C, Le Blanc K. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*. 2007;92:1208-1215.
- Tan AS, Berridge MV. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J Immunol Methods*. 2000;238:59–68.
- Tetzlaff W, Okon EB, Karimi-Abdolrezaee S, Hill CE, Sparling JS, Plemel JR, Plunet WT, Tsai EC, Baptiste D, Smithson LJ, Kawaja MD, Fehlings MG, Kwon BK. A Systematic Review of Cellular Transplantation Therapies for Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. 2011;28:1611–1682.
- Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. 2013. Manufacturing and banking of mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13:673-691.
- Vidal MA, Lopez MJ. (2011): Adipogenic differentiation of adult equine mesenchymal stromal cells. *Methods Mol Biol*. 2011;702:61–75.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem cells*. 2004;22:1330–1337.
- WHO/CDS/CSR/LYO/2004.11: World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed. 2004.

- Wiley CD, Flynn JM, Morrissey C, Lebofsky R, Shuga J, Dong X. Analysis of individual cells identifies cell-to-cell variability following induction of cellular senescence. *Aging Cell*. 2017;1-8.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61:364-370.
- Zhou H, Guo M, Bian C, Sun Z, Yang Z, Zeng Y. Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: clinical report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:403–412.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-28.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Walter Brehm für die Überlassung des Themas der Promotion und die Betreuung der Arbeit recht herzlich bedanken.

Dr. Henriette Jülke, PD Dr. Uta Delling und Dr. Iris Ribitsch danke ich für ihre Unterstützung, Motivation und konstruktive Kritik, ohne die dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Bei Dr. Christin Veit bedanke ich mich für die vielen Lehrstunden im Labor und ihre Hilfsbereitschaft.

PD. Dr. Ingrid Vervuert danke ich für die Bereitstellung der Pferde für die Untersuchungen im LVG Oberholz.

Für die Nutzung der Räumlichkeiten des Veterinär-Anatomischen Instituts zur Herstellung der histologischen Präparate danke ich besonders Herrn Prof. Dr. Johannes Seeger. Außerdem gilt mein Dank Frau Gabriele Lindner für ihre Hilfe, Ihren Rat und die gute Laune bei der Arbeit im Labor.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Karsten Winter für die Unterstützung der statistischen Auswertung dieser Studie.

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Pferde, des TRM sowie der Forschungsgruppe OSCR bedanke ich mich für Ihre Hilfe, Unterstützung und die wundervolle Zusammenarbeit.

Ron Krämer und Kristin Locker danke ich für ihre konstante persönliche Hilfe und die vollständige Korrektur dieser Arbeit. Vielen Dank.

Für ihre Liebe und Unterstützung danke ich Familie Heiz, Helen, Xiaomi, Alex und Stephanie Nather sowie Claudio Villegas für seine Freundschaft.

Vielen Dank an meine Musikfreunde von „Mount Fuji“ in Deutschland und „Sahumerio“ in Chile für ihr Verständnis und ihre Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, meine Großeltern, meinen Bruder mit seiner Familie sowie meinem Onkel und meiner Tante in Chile, die immer für mich da waren und mich mit Rat und Tat unterstützt habe.

Vielen lieben Dank an Marie-Therese Bellinghausen und Negra.

Allen nicht namentlich genannten Freunden und Kollegen danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei Fragen und Problemen.