

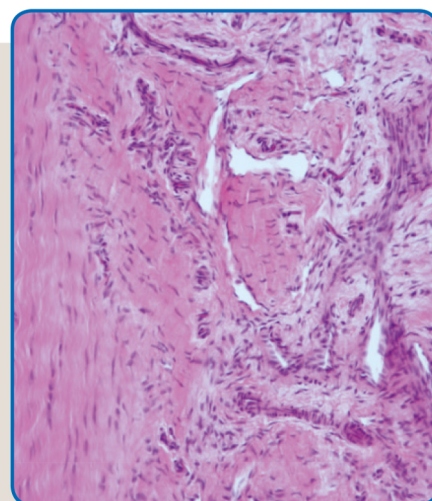
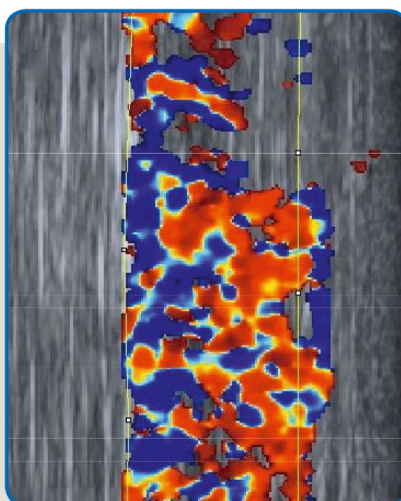
Wissenschaftliche Reihe der Klinik für Pferde

Herausgegeben von
Karsten Feige, Peter Stadler,
Harald Sieme, Bernhard Ohnesorge



Florian Geburek

Intraläsionale Therapie mit autologen mesenchymalen Stromazellen (MSCs) und Blutprodukten sowie Verlaufskontrollen bei Pferden mit Sehnenerkrankungen



STIFTUNG TIERÄRZTLICHE HOCHSCHULE HANNOVER

29



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Florian Geburek

**Intraläsionale Therapie mit autologen mesenchymalen Stromazellen (MSCs) und
Blutprodukten sowie Verlaufskontrollen bei Pferden mit Sehnenerkrankungen**



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2017

Zugl.: Hannover, TiHo., Habil., 2017

Titelbilder

Links:

Die Abbildung zeigt die ultraschallgestützte intraläsionale Injektion von autologem konditioniertem Serum (ACS) in die oberflächliche Beugesehne eines Pferdes (Quelle: Geburek)

Mitte:

Die Doppler-sonographische Darstellung eines Sehnenschadens entstammt der Publikation:

Conze, P., van Schie, H.T.M., van Weeren, R., Staszuk, C., Conrad, S., Skutella, T., Hopster, K., Rohn, K., Stadler, P., Geburek, F. Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions. *Regen. Med.* 2014, 9 (6): 743-757.

Rechts:

Die Abbildung eines histologischen Schnittpräparates eines Sehnenschadens wurde folgender Publikation entnommen:

Geburek, F., Roggel, F., van Schie, H. T. M., Beineke A., Estrada, R., Weber, K., Hellige, M., Rohn, K., Jagodzinski, M., Welke, B., Hurschler, C., Conrad, S., Skutella, T., van de Lest, C., van Weeren, R., Stadler, P. M. Effect of single intralesional treatment of surgically induced equine superficial digital flexor tendon core lesions with adipose-derived mesenchymal stromal cells (AT-MSCs) – a controlled experimental trial. *Stem Cell Res. Ther.* 2017, 5. Juni; 8 (1): 129.

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2017

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2017

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9641-0

eISBN 978-3-7369-8641-1



Aus der Klinik für Pferde
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

**Intraläsionale Therapie mit autologen mesenchymalen Stromazellen (MSCs) und
Blutprodukten sowie Verlaufskontrollen bei Pferden mit Sehnenerkrankungen**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der *Venia legendi*
an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

vorgelegt von
Dr. med. vet. Florian Geburek aus Hilden / Rhld.

Hannover 2016



Tag der nicht-öffentlichen wissenschaftlichen Aussprache: 4.7.2017



Meiner Familie gewidmet





Inhaltsverzeichnis	Seite
1	Vorwort.....1
2	Verzeichnis der verwendeten Publikationen.....3
3	Abkürzungsverzeichnis6
4	Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund8
4.1	Makroskopische Anatomie der oberflächlichen Beugesehne8
4.2	Feingewebliche Sehnenstruktur und biochemische Zusammensetzung8
4.2.1	Biomechanik der oberflächlichen Beugesehne9
4.3	Klassifizierung von Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne des Pferdes und Tendopathie-Modelle 10
4.4	Sehnenheilung..... 11
4.5	Formen der Sehnenbehandlung 12
4.6	Ausgewählte biologische Produkte mit regenerativem Potential und deren Effekte auf Sehnerkrankungen 12
4.6.1	Kultivierte mesenchymale Stromazellen aus Knochenmark (BM-MSCs)..... 13
4.6.2	Kultivierte mesenchymale Stromazellen aus Fettgewebe (AT-MSCs)..... 16
4.6.3	Thrombozytenkonzentrate 17
4.6.4	Autologes konditioniertes Serum (ACS) 18
4.7	Methoden zur Verlaufskontrolle von Sehnerkrankungen 18
4.7.1	Klinische Untersuchung 18
4.7.2	B-mode Sonographie..... 19
4.7.3	Ultrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC) 19
4.7.4	Farb-Doppler-Sonographie 20
4.7.5	Magnetresonanztomographie 21
4.7.6	Feinnadelbiopsie und Histologie, Immunhistologie 21
4.7.7	Nachverfolgung implantierter MSCs (cell tracking) 22
5	Konzept und Zielsetzung 24
6	Ergebnisse und Diskussion..... 25
6.1	Optimierung der Knochenmarkentnahme aus dem Brustbein zur Herstellung von kultivierten BM-MSCs (Publikationen 3, 4; Anhang 13.3, 13.4) 25



6.2	Lagerungsstabilität von Thrombozytenkonzentraten (Publikation 5, Anhang 13.5)	27
6.3	Klinische Untersuchung, Bildgebung und Biopsie als Verfahren zur Nachverfolgung von Tendopathien bei lebenden Pferden (Publikationen 6, 7, 8, 9, 10; Anhang 13.6, 13.7, 13.8, 13.9, 13.10).....	28
6.3.1	Klinische Untersuchung.....	28
6.3.2	B-mode Ultrasonographie.....	29
6.3.3	Ultrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC)	29
6.3.4	Farb-Doppler Untersuchung	30
6.3.5	Feinnadel-Sehnenbiopsie und Histologie	31
6.4	Wirkung einer einmaligen intraläsionalen Injektion kultivierter mesenchymaler Stromazellen aus Fettgewebe (AT-MSCs) auf die Heilung von chirurgisch erzeugten Läsionen der equinen oberflächlichen Beugesehne.	31
6.4.1	Verbleib von AT-MSCs nach intraläsionaler Injektion (Publikation 6, Anhang 13.6).....	31
6.4.2	Effekte von AT-MSCs auf klinische, ultrasonographische, histologische, biochemische und biomechanische Parameter der Sehnenheilung (Publikation 7, Anhang 13.7)	33
6.4.3	Effekte von AT-MSCs auf die Perfusion und Neovaskularisation (Publikation 8, Anhang 13.8).....	34
6.5	Effekte einer einmaligen intraläsionalen Injektion von autologem konditioniertem Serum (ACS) auf den Heilungsverlauf natürlich entstandener Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne (Publikation 9, Anhang 13.9)	34
6.6	Effekte einer einmaligen intraläsionalen Injektion von thrombozytenreichem Plasma (PRP) auf den Heilungsverlauf natürlich entstandener Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne (Publikation 10, Anhang 13.10)	36
7	Studienübergreifende Diskussion.....	38
7.1	Optimierung der Brustbeinpunktion zur Gewinnung von BM-MSCs	38
7.2	Lagerungsstabilität von Thrombozytenkonzentraten	39
7.3	Methoden der Verlaufskontrolle von Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne	40
7.4	Effekte von autologen AT-MSCs und Blutprodukten auf equine Sehnenenerkrankungen.....	44
7.4.1	Studiendesign: Gruppengrößen, Probandenzahlen, Kontrollgruppen.....	44
7.4.2	Effekte während der akuten Entzündungs- und Proliferationsphase: Entzündungsmodulierender Effekt, „homing“ / „engraftment“, Neovaskularisation und Perfusion	46
7.4.3	Remodellierungsphase: Auswirkung auf Gewebeeigenschaften am Ende der Beobachtungsperiode, regenerativer Effekt.....	49



7.4.4	Funktionalität	51
7.5	Ausblick	53
8	Zusammenfassung	55
9	Summary	59
10	Literaturverzeichnis	62
11	Darstellung des eigenen Anteils an den Publikationen	80
12	Danksagung	84
13	Anhang	85
13.1	Publikation 1	85
13.2	Publikation 2	97
13.3	Publikation 3	115
13.4	Publikation 4	125
13.5	Publikation 5	137
13.6	Publikation 6	147
13.7	Publikation 7	161
13.8	Publikation 8	185
13.9	Publikation 9	201
13.10	Publikation 10	217





1 Vorwort

Erkrankungen der oberflächlichen Beugesehne und anderer Sehnen- und Bandstrukturen haben eine hohe Inzidenz und Prävalenz bei Pferden verschiedener Nutzungsrichtungen (Williams et al. 2001, Dyson 2004). Trotz zahlreicher Therapieansätze ist die Rekonvaleszenz mit ca. 9-18 Monaten zeitintensiv (Avella and Smith 2012), und es werden Rezidivraten von ca. 40-80% (Dowling et al. 2000, Dyson 2004) beschrieben. Seit ca. 15 Jahren sind potentiell regenerative Substrate in den Fokus der intraläsionalen Therapie von Sehnenkrankungen bei Pferden gerückt. Unter anderem wurden mesenchymale Stromazellen (MSCs) aus Knochenmark (Smith et al. 2003) und Fettgewebe sowie autologe Blutprodukte wie z.B. thrombozytenreiches Plasma (PRP) (Arguelles et al. 2008) und autologes konditioniertes Serum zur Sehnenbehandlung eingesetzt (Weinberger 2008, Textor 2011). Auf der Basis unkontrollierter Fallserien ergaben sich bei Rennpferden Hinweise auf eine gegenüber vorangegangenen Literaturangaben verringerte Rezidivrate nach der Behandlung von Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne (OBS) mit mesenchymalen Stromazellen aus Knochenmark (BM-MSCs) (Smith et al. 2003). In einer kontrollierten tierexperimentellen Untersuchung an chirurgisch erzeugten Läsionen der OBS wurden ausgeprägte Effekte einer einmaligen Injektion von thrombozytenreichem Plasma (PRP) auf die Sehnenheilung nachgewiesen (Bosch et al. 2010).

Bei der Konzeption der vorliegenden Arbeit ergaben sich deshalb aus den bis dato in der Literatur vorhandenen Ergebnissen mehrere Fragestellungen (Smith et al. 2014). Einerseits waren hinsichtlich der Bereitstellung von geeigneten Substraten zur Sehnenbehandlung die Optimierung der Gewinnung von Knochenmark und BM-MSCs sowie die Frage nach der Lagerungsstabilität von Thrombozytenkonzentraten von Interesse. Darüber hinaus bestand Bedarf an einer prospektiv durchgeführten kontrollierten Untersuchung zur Wirkung von mesenchymalen Stromazellen aus Fettgewebe (AT-MSCs) auf Sehnenkrankungen, sowie zum Effekt von PRP auf natürlich entstandene Tendopathien. Nicht zuletzt fehlten kontrollierte Beobachtungen an Pferden zum Einsatz von autologem konditioniertem Serum (ACS), das eine vielversprechende Wirkung bislang nur in einer tierexperimentellen Untersuchung an Rattensehnen gezeigt hatte (Majewski et al. 2009).

Eine grundlegende Herausforderung bei der Überprüfung des Behandlungserfolges von intraläsional verabreichten Substraten ist wie bei jeder anderen Form der Sehnentherapie eine angemessene Verlaufskontrolle. Zu den etablierten und unter Praxisbedingungen gut anwendbaren Verfahren gehören von jeher die klinische Untersuchung (Schmidt 1989), eingeschränkt auch die Röntgenuntersuchung und seit den 1980er Jahren die B-mode Sonographie (Rantanen 1982). Die Farb-Doppler-Sonographie wurde nach ihrer Einführung auch zur Beurteilung der Sehnenperfusion eingesetzt und lieferte wertvolle Hinweise auf den Verlauf der Sehnenheilung (Ohberg et al. 2001). Zu den Untersuchungsmethoden mit hoher Aussagekraft zählt die Feinnadel-Sehnenbiopsie mit anschließender histologischer Untersuchung, die zunächst beim Menschen (Movin et al. 1997) und später beim Pferd (Wagels et al. 2001) etabliert wurde. In den letztvergangenen Jahren wurden innovative, nicht-invasive Verfahren mit einer gegenüber den etablierten Verfahren höheren Sensitivität entwickelt bzw. vermehrt bei Pferden angewendet. Dazu zählen die ultrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC) (van Schie et al. 2003) sowie die Magnetresonanztomographie (MRT) (Kotani et al. 2000), die beim Pferd derzeit noch einen relativ hohen Aufwand erfordert und deshalb bei klinischen und experimentellen Untersuchungen an



den Sehnen im Mittelfußbereich seltener zum Einsatz gelangt (Kasashima et al. 2002, Schramme et al. 2010).

Die vorliegende Habilitationsschrift umfasst Untersuchungen zur Gewinnung von BM-MSCs und Thrombozytenkonzentraten für die Sehnenbehandlung, kontrollierte experimentelle und klinische Untersuchungen zur Wirkung von AT-MSCs und Blutprodukten (PRP, ACS) auf Tendopathien sowie Konzepte zur systematischen Nachverfolgung von Tendopathien mit mehreren etablierten und neueren Verfahren.



2 Verzeichnis der verwendeten Publikationen

Die Publikationen sind nicht chronologisch, sondern in einer für das Gesamtergebnis der Arbeit sinnvollen Reihenfolge aufgelistet.

Publikation 1 (Anhang 13.1)

Geburek, F., Stadler, P.

Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Terminologie, Herstellung, biologisches Potential und *In-vitro*-Effekte.

Tierärztl. Praxis Ausg. G Grosstiere Nutztiere 2011, 39 (6): 373-383. (IF 0,283)

Publikation 2 (Anhang 13.2)

Geburek, F., Stadler, P.

Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Ergebnisse der Behandlung mit Stammzellen, Blutprodukten, Gerüstsubstanzen und Wachstumsfaktoren – eine Literaturübersicht und Metaanalyse.

Pferdeheilkunde 2011, 27 (6): 609-625. (IF 0,235)

Publikation 3 (Anhang 13.3)

Eydt, C., Schröck, C.* , **Geburek, F.***, Rohn, K., Staszuk, C.†, Pfarrer, C.†

Three-Dimensional Anatomy of the Equine Sternum.

Anat. Histol. Embryol. 2014, 44 (2): 99-106. Erstmals online publiziert am 9. April 2014. (IF 0,672)

*†Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit

Publikation 4 (Anhang 13.4)

Eydt, C., **Geburek, F.***, Schröck, C.* , Hambruch, N., Rohn, K., Pfarrer, C.†; Staszuk, C.†

Sternal bone marrow derived equine multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): Investigations considering the sampling site and the use of different culture media.

Vet. Med. Sci. 2016, 20. Juni; 2 (3): 200-210.

*†Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit



Publikation 5 (Anhang 13.5)

Hauschild, G.*, **Geburek, F***. Gosheger, G., Eveslage, M., Serrano, D., Streitbürger, A., Johannlükens, S., Menzel, D., Mischke, R.

Short term storage stability at room temperature of two different platelet-rich plasma preparations from equine donors and potential impact on growth factor concentrations.

BMC Vet. Res. 2017, 5. Jan.; 13 (1): 7. (IF 2016: 1,750)

*Geteilte Erstautorenschaft / Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit

Publikation 6 (Anhang 13.6)

Geburek, F., Mundle K., Conrad, S., Hellige, M., Walliser, U., van Schie, H.T.M., van Weeren, R., Skutella, T., Stadler, P.

Tracking of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells with *in vivo* magnetic resonance imaging and histology after intralesional treatment of artificial equine tendon lesions – a pilot study.

Stem Cell Res. Ther. 2016, 1. Feb.; 7: 21. (IF 2015: 4,504)

Publikation 7 (Anhang 13.7)

Geburek, F.*, Roggel, F. *, van Schie, H. T. M., Beineke A., Estrada, R., Weber, K., Hellige, M., Rohn, K., Jagodzinski, M., Welke, B., Hurschler, C., Conrad, S., Skutella, T., van de Lest, C., van Weeren, R., Stadler, P. M.

Effect of single intralesional treatment of surgically induced equine superficial digital flexor tendon core lesions with adipose-derived mesenchymal stromal cells (AT-MSCs) – a controlled experimental trial.

Stem Cell Res. Ther. 2017, 5. Juni; 8 (1): 129. (IF 2016: 4,211)

*Geteilte Erstautorenschaft / Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit

Publikation 8 (Anhang 13.8)

Conze, P., van Schie, H.T.M., van Weeren, R., Staszyc, C., Conrad, S., Skutella, T., Hopster, K., Rohn, K., Stadler, P., **Geburek, F.**

Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions.

Regen. Med. 2014, 9 (6): 743-757. (IF 2,786)

**Publikation 9** (Anhang 13.9)**Geburek, F.**, Lietzau, M., Beineke, A., Rohn, K., Stadler, P.M.

Effect of a single injection of autologous conditioned serum (ACS) on tendon healing in equine naturally occurring tendinopathies.

Stem Cell Res. Ther. 2015, 26. Juni; 6 (1): 126. (IF 4,504)

Publikation 10 (Anhang 13.10)**Geburek, F.**, Gaus, M., van Schie, H.T.M., Rohn, K., Stadler, P.M.

Effect of intralesional platelet-rich plasma (PRP) treatment on clinical and ultrasonographic parameters in equine naturally occurring superficial digital flexor tendinopathies – a randomized prospective controlled clinical trial.

BMC Vet. Res. 2016, 7. Sep., 12 (1): 191. (IF 2015: 1,643)



3 Abkürzungsverzeichnis

ABM	acellular bone marrow
ACS	autologous conditioned serum (autologes konditioniertes Serum)
ACP®	autologous conditioned plasma® (autologes konditioniertes Plasma)
ADNC	adiopose derived nucleated cells
AT	adipose tissue (Fettgewebe)
B-mode	brightness mode
BM	bone marrow (Knochenmark)
BMMNCs	bone marrow mononuclear cells (mononukleäre Zellen aus Knochenmark)
COMP	cartilage oligometric matrix protein
CT	Computertomographie
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ES	echogenicity score (Echogenitäts-Score)
ESC	embryonal-ähnliche Stammzelle
EZM	extrazelluläre Matrix
FAS	fibre alignment score (Faserbündel Parallelitäts-Score)
GAG	Glykosaminoglykan
GFP	green fluorescent protein (grünes fluoreszierendes Protein)
HLys	Hydroxylysin
HP	Hydroxylysylpyridinolin
Hyp	Hydroxyprolin
i.a.	im Allgemeinen
i.e.S.	im engeren Sinn
IGF-1	insulin-like growth factor- 1
IL	Interleukin
LP	Lysylpyridinolin



MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	mesenchymale stromale Zelle / Mesenchymale Stammzelle
OBS	oberflächliche Beugesehne
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF-BB	platelet-derived growth factor BB
PRP	platelet-rich plasma
Ra	Rezeptor-Antagonist
mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
s.o.	siehe oben
SPIO	superparamagnetic iron oxide (superparamagnetisches Eisenoxid)
SVF	stromale vaskuläre Fraktion (stromal vascular fraction)
T-CSA	total cross-sectional area (Summe von Sehnenquerschnittsflächen)
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1
u.a.	und andere(n) / unter anderem
UTC	ultrasound tissue characterization (ultrasonographische Gewebecharakterisierung)
VEGF	vascular endothelial growth factor



4 Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund

4.1 Makroskopische Anatomie der oberflächlichen Beugesehne

Der oberflächliche Zehenbeuger, *Musculus flexor digitorum [digitalis] superficialis*, ist beim Pferd stark sehnig durchsetzt. Sein Ursprung befindet sich an der kaudalen Kante des *Epicondylus lateralis* des *Humerus*, und er geht oberhalb des Karpus in seine kräftige Sehne, die oberflächliche Beugesehne (OBS) über. Proximal des Karpus erhält diese ein medial am Radius entspringendes Unterstützungsband. Sie zieht dann medio-palmar mit der tiefen Beugesehne durch die Karpalbeugesehnenscheide und verläuft am palmaren Aspekt des Mittelfußes. Im distalen Viertel des Mittelfusses bildet sie eine ringartige Manschette, die *Manica flexoria*, um die tiefe Beugesehne und zieht dann innerhalb der Fesselbeugesehnenscheide palmar über das Fesselgelenk. In der Fesselbeuge teilt sich die OBS in zwei Schenkel, die medial und lateral an der Kronbeinlehne und mit je einem schwächeren Ast am seitlichen distalen Ende des Fesselbeines ansetzen (Seiferle and Frewein 1992).

4.2 Feingewebliche Sehnenstruktur und biochemische Zusammensetzung

Die gesamte Sehne ist von einer lockeren Bindegewebsschicht, dem *Paratendineum* (auch *Paratenon*) überzogen, das als Verschiebeschicht gegenüber umliegendem Gewebe wirkt. Die Sehne selbst ist von einer straffen Sehnenhaut, dem *Epitendineum* (auch *Peritendineum externum*, *Epitenon*), eingehüllt. Diese Schicht enthält Leitungsbahnen (Blut- und Lymphgefäße, Nerven) zur Versorgung der Sehne und setzt sich als *Peritendineum* (auch *Peritendineum internum*, *Endotenon*) in die Tiefe der Sehne fort und bedeckt dort Tertiärbündel. Das *Endotendineum* (auch *Peritendineum internum*, *Endotenon*) trennt die Primärbündel voneinander und fasst sie zu Sekundärbündeln zusammen. Die Bezeichnung der einzelnen trennenden Schichten ist in der Literatur nicht einheitlich gegliedert (Angaben in Klammern) (Zschabitz 2005). In der 5. Auflage der *Nomina anatomica veterinaria* wird lediglich das *Peritendineum* gelistet (www.wava-amav.org/Downloads/nav_2012.pdf; aufgerufen am 19.10.2016). Blutgefäße treten 1.) am muskulotendinösen Übergang und am Sehnenansatz am Knochen 2.) über das *Peritendineum* und 3.) über die *Vincula* bzw. das *Mesotendineum* im Bereich von Sehnenscheiden in die Sehne ein (Kraus-Hansen et al. 1992).

Sehnen bestehen nur zu einem kleinen Anteil aus Zellen und einer großen Menge an extrazellulärer Matrix (EZM), die aus dichtgedrängten, hierarchisch gegliederten Kollagenfilamenten zusammengesetzt ist. Zwischen den Faserstrukturen befindet sich wiederum eine hydrophile, proteoglykanreiche Matrix. Der wesentliche Bestandteil der EZM ist Kollagen, das 60-85% der Trockenmasse von Sehnen ausmacht. Gesunde Sehnen bestehen im Wesentlichen aus Kollagentyp I (95%) (Williams et al. 1980), während Kollagen vom Typ III nur 3% des gesamten Kollagengehaltes ausmacht. Hinzu kommen geringe Mengen anderer Kollagentypen (Riley 2004).

Der grundlegende strukturelle Baustein von Kollagen ist Tropokollagen. Ein Kollagenfilament (auch Kollagenmikrofibrille) besteht aus 5 miteinander verflochtenen Tropokollagen-Molekülen. Die Kollagenfilamente bilden hierarchisch geordnete strukturelle Einheiten mit zunehmendem Durchmesser: Kollagenfibrillen, Kollagenfasern, Primärbündel (Sub-Faszikel), Sekundärbündel (Faszikel), Tertiärbündel und schließlich die Sehne (Kastelic et al. 1978). Im nicht-gespannten Zustand weisen die Faszikel eine leichte Wellenform (crimp) auf, die für die Elastizität der Sehne bei leichter Belastung sorgt (Wilmink et al. 1992). Quervernetzungen („cross-links“) zwischen und innerhalb von Kollagenfibrillen erfolgen ent-



weder durch enzymatisch via Glykosylierung erzeugte Modifikationen wie Hydroxylysylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) oder durch nicht-enzymatische Glykation (z.B. Pentosidin). Zur ersten Gruppe gehören als Vorstufen auch Lysin und Hydroxylysin (HLys). Sie werden zu Aldehyden hydroxyliert, die kovalente Querverbindungen bilden (Eyre et al. 1984, Bailey et al. 1998). Hydroxyprolin (Hyp) hingegen stabilisiert die Tripelhelix durch stereoelektrische Effekte und trägt so insbesondere zur thermischen Stabilität von Kollagen bei (Shoulders and Raines 2009). Querverbindungen tragen zusammenfassend in hohem Maße zur Stabilisierung der Kollagenfibrillen und zu den biomechanischen Eigenschaften der Sehne bei (Tsuzaki et al. 1993, Thorpe et al. 2010).

Neben Kollagen sind Wasser und Proteoglykane wesentliche Bestandteile von Sehnen. Proteoglykane bestehen aus einem Protein, an das sulfatierte Glykosaminoglykane (GAGe) als Seitenketten angeheftet sind. Die GAGe binden Wasser und verleihen der Sehne gemeinsam mit dem Kollagen viskoelastische Eigenschaften (Goodship et al. 1994). Proteoglykane besitzen zudem Einflüsse auf die Fibrillogenese und die Architektur der Sehnenmatrix (Iozzo 1998), sodass sie sich indirekt auf die Zugfestigkeit von Sehnen auswirken (Garg et al. 1989).

Ungefähr 90-95% der in Sehnen nachweisbaren Zellen sind fibroblastenähnliche Zellen. Sie werden als Tenoblasten (ovoide bis spindelförmige Morphologie) bzw. Tenozyten (abgeflachtes Erscheinungsbild) bezeichnet und produzieren bzw. regulieren die EZM (Kannus 2000). Tenozyten weisen eine geringere metabolische Aktivität als Tenoblasten auf und ändern ihre Gestalt und Apoptose- sowie Proliferationsrate in Abhängigkeit von ihrer Produktion extrazellulärer Matrix (Chuen et al. 2004).

4.2.1 Biomechanik der oberflächlichen Beugesehne

Während der Stützbeinphase treten in equinen Beugesehnen Zugkräfte auf, die dem Doppelten des Körpergewichtes entsprechen können. Während der frühen Stützbeinphase nehmen die Beugesehnen große Mengen kinetischer Energie auf und speichern sie als potentielle Energie. Sie wird in der späten Stützbeinphase wieder abgegeben und erleichtert das Abstemmen. Die OBS wirkt wie eine Sprungfeder und nützt so der Energieersparnis; der zugehörige Muskelbauch trägt zur Kompensation von Spannungsdifferenzen bei (Batson et al. 2003).

Die Zugfestigkeit, d.h. das Verhältnis zwischen Spannung (stress) und Dehnung / Verlängerung (strain) einer Sehne kann graphisch in einer Spannungs-Dehnungs-Kurve dargestellt werden, die in 5 typische Abschnitte unterteilt wird (Brinckmann et al. 2000, Avella and Smith 2012):

I. Zunächst kommt es zu einer Streckung der Wellenform (crimp), die zu einer Verlängerung der Sehne um ca. 3 % führt (Evans and Barbenel 1975).

II. Danach entsteht durch Gleitvorgänge zwischen den Tropokollagenmolekülen eine linear ansteigende Deformation der Sehne. Falls die Dehnung der Sehne 4-5 % nicht überschreitet, verhält sie sich elastisch und ihre Längenänderungen sind vollständig reversibel. Die Steigung des nahezu linearen Abschnitts der Kurve stellt den Elastizitätsmodul (EM) der Sehne dar ($EM = \Delta \text{Spannung} / \Delta \text{Dehnung}$; Einheit: Megapascal oder Newton/mm²).

III. Stärkere Dehnungen der Sehne (bis zu 8%) führen zu einer Abscherung der Quervernetzungen zwischen den Kollagenfibrillen. Dies führt zu einer plastischen Deformation und zu mikroskopisch nachweisbaren Schäden (Mikrorupturen).

IV. Bei weiterer Erhöhung der Dehnung reißen größere Faserbündel und es kommt zu makroskopisch erkennbaren Schäden.



V. Eine Totalruptur der Sehne entsteht bei erwachsenen Warmblutpferden bei einer Dehnung um ca. 12-21% (Riemersma and Schamhardt 1985). Die zugehörige Spannung wird als Reißspannung (stress at failure, ultimate stress; Einheit: Megapascal oder Newton/mm²), die dazu erforderliche Kraft als Reißkraft (maximum load to failure; Einheit: Newton) bezeichnet.

Im Rahmen tierexperimenteller Untersuchungen können die biomechanischen Eigenschaften ganzer Sehnen oder explantierter Sehnenstreifen mit Materialprüfmaschinen ermittelt werden. Ihre Darstellung erfolgt vielfach in Form der Parameter Steifigkeit (Quotient aus Zunahme der Kraft und Zunahme der Längenänderung; Einheit: Newton/m) (Brinckmann et al. 2000), Elastizitätsmodul, maximale Reißkraft, Reißspannung (Crevier-Denoix et al. 1997, Majewski et al. 2009, Schnabel et al. 2009, Bosch et al. 2010, Smith et al. 2013).

4.3 Klassifizierung von Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne des Pferdes und Tendopathie-Modelle

In der vorliegenden Arbeit werden gedeckte Sehnenerkrankungen der OBS von Pferden behandelt, die durch Überbelastung oder im Einzelfall durch stumpfes transkutanes Trauma entstanden sind. Davon abzugrenzen sind Verwundungen von Sehnen mit Eröffnung der äußeren Haut. Gedeckte Sehnenerkrankungen nach Überbelastung können durch ein einmaliges starkes Überschreiten der Grenzlast entstehen (Avella and Smith 2012). Eine weitere und häufigere Ätiologie besteht darin, dass Alterung und repetitive Überbelastung zu subklinischen Mikroläsionen und schleichend zu einem Missverhältnis zwischen Untergang der extrazellulären Sehnenmatrix und zellulären Reparaturmechanismen führen. Dieser als Degeneration bezeichnete Prozess hat eine Schwächung der Sehne ohne Anzeichen von Entzündung zur Folge und mündet erst zuletzt in einer Exazerbation mit deutlichen klinischen Anzeichen einer Tendopathie, zumeist in Folge eines mechanisch belastenden Ereignisses (Birch et al. 1998). Die Abgrenzung beider Tendopathie-Formen ist im Einzelfall nicht immer möglich. Insbesondere bei Rennpferden hat die letztgenannte Sehnenpathologie eine hohe Prävalenz (Kasashima et al. 2004), und sie kommt auch bei Pferden anderer Nutzungsrichtungen regelmäßig vor (Dyson 2011).

Um typische degenerative Sehnenschäden im Tierexperiment zu simulieren, wurden verschiedene Schädigungsmodelle entwickelt (Lui et al. 2011). Am Pferd als Versuchstier werden zumeist das so genannte Kollagenase-Modell (Silver et al. 1983, Dahlgren et al. 2002) und chirurgische Modelle eingesetzt, die auf der Exzision eines Sehnensegmentes basieren (Watkins et al. 1985, van Schie et al. 2009). Beim Kollagenase-Modell wird eine definierte Menge Kollagenase in die Sehnen injiziert, die zu einem schwer standardisierbaren enzymatischen Einschmelzen von Teilen der Sehne und einer starken akuten Entzündungsreaktion führt (Williams et al. 1984). Um die degenerative Komponente equiner Tendopathien und den typischen Kompartiment-Charakter einer Kernläsion der OBS besser zu simulieren, wurde ein chirurgisches Sehnenmodell entwickelt (Little and Schramme 2006, Schramme et al. 2010), bei dem ein Zottenresektor bzw. eine Rosenkopfräse aus der Gelenkchirurgie nach Inzision von Haut, *Peri-* und *Epitendineum* in das Zentrum der Sehne, dann in Längsrichtung proximal vorgeschoben und schließlich aktiviert wird. Der Zugang zum Sehnenkern wird chirurgisch verschlossen. Das Modell lässt sich gut standardisieren und führt zumeist mit einer zeitlichen Verzögerung zu Tendopathien moderater Ausprägung, die Kernläsionen ähneln (Schramme et al. 2010).



4.4 Sehnenheilung

Die Sehnenheilung folgt grundsätzlich denselben Phasen der Wundheilung, die bei den meisten anderen Gewebetypen unterschieden werden können: 1.) Phase der akuten Entzündung, 2. Proliferationsphase und 3.) Remodellierungsphase (Jann and Stashak 2008).

Die Phase der akuten Entzündung beginnt unmittelbar nach der Schädigung und dauert je nach Stärke des Traumas ungefähr 1-2 Wochen an. Klinisch ist diese Phase durch die Zeichen der Entzündung (vermehrte Wärme, Druckempfindlichkeit, Schwellung und Lahmheit) charakterisiert. Der Sehnenquerschnitt nimmt zu, es kommt zur Einwanderung von Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten, und Makrophagen (Watkins et al. 1985). Die Aktivität endogener Kollagenasen und Proteasen führt in den ersten Wochen nach dem Insult zu einer Vergrößerung des Sehnen Schadens über das Ausmaß des ursprünglichen mechanisch bedingten Substanzverlustes hinaus (van Schie et al. 2009). Es kommt zu einer Zunahme der metabolischen Aktivität von Tenozyten und unmittelbar zu einer erhöhten Expression von Kollagentyp I und -III (Silver et al. 1983, Dahlgren et al. 2005). Zunächst ist kein erhöhter Spiegel des Wachstumsfaktors insulin-like growth factor-1 (IGF-1) nachweisbar, jedoch kommt es schnell zu einer erhöhten Expression von TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) (Dahlgren et al. 2005).

Die Vorgänge, die der Proliferationsphase, die auch als Reparaturphase bezeichnet wird (Jann and Stashak 2008), zugeordnet werden, beginnen bereits wenige Tage nach der Schädigung und können mehrere Wochen bis Monate andauern (Sharma and Maffulli 2006). Es kommt zur Gefäßsprossung und Einwanderung von Fibroblasten, die z.B. aus der Sehnen Scheide (extrinsische Heilung) oder aus dem *Endotendineum* (intrinsische Heilung) stammen können. Die von den longitudinal ausgerichteten, anatomischen Gefäßen ausgehende Neovaskularisation geht mit einer erhöhten Expression des vascular endothelial growth factor (VEGF) im Bereich des Granulationsgewebes einher (Bidder et al. 2000). Die Menge verschiedener Kollagentypen variiert bei natürlich entstandenen Sehnenläsionen individuell relativ stark (Sharma and Maffulli 2006). Die Kollagentyp III Synthese ist nach experimentellen Untersuchungen zwischen der 3. und 6. Woche nach dem Trauma am stärksten ausgeprägt (Silver et al. 1983, Dahlgren et al. 2005). Die Expression des Kollagentyp I ist für mindestens 6 Monate erhöht (Dahlgren et al. 2005). Die Fibroblasten haben zunächst für 1-2 Wochen eine eher rundliche Zellkernmorphologie („Tenoblasten“). Die Zellzahl nimmt im weiteren Verlauf zu und die Kerne nehmen eine eher abgeflachte, spindelförmige Morphologie an („Tenozyten“) (Chuen et al. 2004). Informationen zum Gehalt an Wachstumsfaktoren in equinen Sehnenläsionen sind für die Proliferationsphase lückenhaft dokumentiert. Die IGF-1 Expression ist in der Proliferationsphase am höchsten (Dahlgren et al. 2005), wohingegen die Expression des Wachstumsfaktors PDGF-A und -B bei experimentell mittels Kollagenase induzierten Sehnen Schäden in der Proliferationsphase nicht ansteigt (Donnelly et al. 2006).

Die Remodellierungsphase beginnt etwa 6-8 Wochen nach dem Trauma, dauert bis zu ca. 12 Monate oder länger an und wird von einigen Autoren in die Konsolidierungs- (ca. 6-10 Wochen) und Reifungsphase (> 10 Wochen) unterteilt (Docheva et al. 2015). Fibröses Bindegewebe dominiert den Bereich des Sehnen Schadens, die Vaskularisation nimmt tendenziell ab, die Kollagenfibrillen orientieren sich zunehmend in Zugrichtung und der Gehalt an Kollagentyp I nimmt zu (Williams et al. 1984, Watkins et al. 1985). Die Kerne der Tenozyten haben weiterhin eine eher spindelförmige Morphologie (Dahlgren et al. 2005). Das histologische Erscheinungsbild natürlich entstandener chronischer Sehnen Schäden (mehrere Monate bis Jahre) variiert stark (Crevier-Denoix et al. 1997). Es kommt in der Reifungsphase zur Organisation der Kollagenfibrillen zu Faserbündeln. Die ursprünglichen Kollagenfibrillen mit großem Durchmesser werden nicht wiederhergestellt (Frank et al. 1997, Caniglia et al. 2012). Das Narbenge-



webe erlangt seine ursprünglichen biomechanischen Eigenschaften auch nach Abschluss der Sehnenheilung nicht zurück und bleibt weniger elastisch als intaktes Sehnengewebe (Crevier-Denoix et al. 1997). Dies erklärt die hohen Rezidivraten nach equinen Sehnenerkrankungen. Immunhistochemisch wurde ein persistent hoher Gehalt an Kollagentyp III bis zu 14 Monate nach Sehnenschädigung im Kollagenase-Modell nachgewiesen und als Ursache für die ungünstigeren biomechanischen Eigenschaften interpretiert (Williams et al. 1980, Williams et al. 1984).

4.5 Formen der Sehnenbehandlung

Grundsätzlich kann zwischen 1.) physikalischen und orthopädischen Maßnahmen (z.B. Applikation von Kälte oder Wärme, Immobilisation durch Verbände, kontrollierte Bewegung, Hufbeschläge, Stoßwellen- und Laserbehandlung), 2.) chirurgischer Therapie (z.B. Sehnen-„Splitting“, Desmotomie des Unterstützungsbandes der oberflächlichen Beugesehne, Implantate), 3.) medikamentöser Behandlung (z.B. systemisch, äußerlich) sowie 4.) intraläsionaler Therapie (herkömmliche Pharmaka, biologische Produkte) unterschieden werden (Dowling et al. 2000). Es besteht zum einen Einigkeit darüber, dass bei der Auswahl der angemessenen Behandlungsformen das Stadium der Sehnenheilung zu berücksichtigen ist. Zum anderen setzt sich die Sehnentherapie idealerweise aus mehreren der genannten Therapieansätze zusammen (Dowling et al. 2000, Bosch et al. 2010). Im Kontext der nachweisorientierten Medizin („evidence based medicine“) variiert der Grad der wissenschaftlichen Evidenz hinsichtlich der Beeinflussung von Sehnenheilung durch die einzelnen Therapieansätze stark (Smith et al. 2014). Kontrollierte Bewegung hat einen stimulierenden Effekt auf die Sehnenheilung (Gillis 1997) und gilt deshalb stets als fester Bestandteil des Therapiekonzeptes (Avella and Smith 2012), wenngleich nur wenige Untersuchungen vorliegen, in denen die Wirkung alleiniger kontrollierter Bewegung auf klinische Parameter systematisch untersucht wurde (Sawdon et al. 1996, Gillis 1997).

4.6 Ausgewählte biologische Produkte mit regenerativem Potential und deren Effekte auf Sehnenerkrankungen

Der Wissensstand zu den für die intraläsionale Injektion genutzten biologischen Produkten mit regenerativem Potential ist in Publikation 1 (Anhang 13.1) zusammengefasst. Ergebnisse aus der Literatur zur Behandlung von experimentell erzeugten und natürlich entstandenen Sehnen- und Bandschäden bei Pferden werden in Publikation 2 (Anhang 13.2) in Form einer Metaanalyse dargestellt. Teile der nachfolgenden Übersicht sind diesen Publikationen entnommen bzw. lehnen sich daran an. Aufgrund des schnell zunehmenden Wissensstandes werden neuere Ergebnisse aus der Literatur ergänzt. In der nachstehenden Übersicht werden Zellsubstrate und Blutprodukte berücksichtigt, die für die vorliegende Arbeit von direkter Relevanz sind und während der Durchführung eine größere Rolle im klinischen und wissenschaftlichen Bereich spielten. Darüber hinaus wurden und werden derzeit zahlreiche weitere Zellsubstrate aus unterschiedlichen Gewebequellen, Aufbereitungen aus Blut, rekombinant hergestellte Wachstumsfaktoren und andere Substanzen mit regenerativem Potential zur Sehnentherapie bei Pferden ungeprüft oder nach vorläufigen vielversprechenden Ergebnissen klinisch eingesetzt oder systematisch wissenschaftlich untersucht.



4.6.1 Kultivierte mesenchymale Stromazellen aus Knochenmark (BM-MSCs)

Knochenmark wurde als Quelle für mesenchymale Stromazellen bei Pferden bislang am intensivsten untersucht (Kasashima et al. 2011). Es wird zumeist aus dem Brustbein oder Hüfthöcker aspiriert und lässt sich auch aus dem Humerus oder der Tibia gewinnen. Die Zahl der mononukleären Zellen und MSCs, die aus Sternalmark gewonnen werden kann, ist bei jüngeren Pferden (Alter 2-7 Jahre) im Vergleich zu Knochenmark aus dem Hüfthöcker etwa gleich groß (Adams et al. 2013). Auch das Differenzierungspotential und die Expression sehnenassoziierter Marker wie Kollagentyp I, Scleraxis und Tenascin unterscheiden sich bei jungen Pferden (2-5 Jahre) nicht zwischen den Entnahmestellen (Lombana et al. 2015), während Knochenmark aus dem Brustbein bei Pferden mittleren Alters (13 Jahre) eine höhere Zellausbeute ermöglicht (Delling et al. 2012). Eine andere Untersuchung weist darauf hin, dass aus Hüfthöckeraspiraten gewonnene BM-MSCs möglicherweise schneller proliferieren (Kisiday et al. 2013). Im Hüfthöcker kann es bei älteren Pferden zu einer Fettansammlung kommen (Russell et al. 1994), das gewonnene Volumen ist geringer und die Brustbeinpunktion ist einfacher und schneller durchführbar (Kisiday et al. 2013), sodass sie regelmäßig zur Gewinnung von Knochenmark für die Herstellung von Zellsubstraten genutzt wird. Grundsätzlich gilt das Vorgehen als etabliert und wenig komplikationsbehaftet (Durando et al. 2006, Kasashima et al. 2011). Als leichtere Komplikationen werden in der Literatur Nachblutungen, Schwellungen, entzündliche Reaktionen und Infektionen beschrieben. Neben mehreren anekdotenhaften Berichten von plötzlichen Todesfällen nach Brustbeinpunktion wurden einzelne schwerwiegende Zwischenfälle dargelegt. Dazu gehören eine unbeabsichtigte Brusthöhlenpunktion (Berggren 1981), eine Punktion des linken Ventrikels (Jacobs et al. 1983) und ein Fall von Pneumopericard (Durando et al. 2006) sowie ein nicht näher beschriebener Fall von kardialer Punktion (Kasashima et al. 2011). Bei der Punktion am allgemeinanästhesierten Pferd wurden vorübergehende Herzrhythymien (ventrikuläre Tachykardien mit Fibrillation) ohne Spätfolgen beschrieben, die nur bei der Punktion der 6. Sternebra auftraten (Ishihara et al. 2013).

Üblicherweise werden ca. 2 x 10-20 ml Knochenmarkaspirat in heparinisierte Spritzen aspiriert. Native Knochenmarkaspirate von Pferden enthalten hämatopoetische Stammzellen, aus denen im Rahmen der Blutbildung mehrere Zelllinien entstehen. Demgemäß sind Myeloblasten, Promyelozyten, Neutrophile (Myelozyten, Metamyelozyten, stabkernige und segmentkernige Granulozyten), Eosinophile, Basophile, Erythroblasten sowie Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten und Makrophagen in equinem Knochenmark nachweisbar (Latimer and Andreasen 2002, Lewandowski et al. 2012). Zudem liegen Thrombozyten und deren Vorläufer (Megakaryozyten) in nativem Knochenmark vor (McCarrel and Fortier 2009), und es lassen sich aus ihm mesenchymale Stromazellen isolieren und kultivieren (s.u.) (Friedenstein et al. 1974, Ishihara et al. 2013).

Ursprünglich kamen native Knochenmarkaspirate zur Behandlung von Fesselträgererkrankungen zum Einsatz (Herthel 2001). Der niedrige Gehalt dieses Substrates an mononukleären Zellen, insbesondere MSCs und der möglicherweise nachteilige Effekt darin enthaltener Knochensplitter sowie die z.T. verwendeten großen Volumina führten zu kontroversen Diskussionen hinsichtlich dieser Therapieform, wenngleich sie nach wie vor Anwendung findet (Russell et al. 2016).

Durch Dichtegradientenzentrifugation oder andere kommerziell erhältliche Systeme können aus Knochenmark Konzentrate von mononukleären Zellen hergestellt werden (bone marrow mononuclear cells, BMMNCs; bone marrow aspirate concentrate, BMAC). Diese Konzentrate enthalten bei Pferden in Abhängigkeit von der Methodik eine 5 - 19-fache Konzentration von mononukleären Zellen gegenüber nativem Knochenmark (Ishihara et al. 2013). Der Anteil der MSCs an den mononukleären Zellen beträgt bei Pferden in konzentriertem Knochenmarkaspirat ca. 0.0023 - 0.024 %. Die Schwankungen um eine



Zehnerpotenz hängen vermutlich von zahlreichen individuellen und methodischen Faktoren ab (Vidal et al. 2006, Ishihara et al. 2013). Da Knochenmarkkonzentrate bereits nach wenigen Stunden für die Behandlung zur Verfügung stehen und einen gegenüber Knochenmark höheren Anteil an MSCs aufweisen, wurde die Wirkung mononukleärer Zellen aus Knochenmark in mehreren Studien sowohl an experimentell induzierten OBS Läsionen (Barreira et al. 2008, Crovace et al. 2010) als auch an natürlich entstandenen Erkrankungen der OBS und des Fesselträgers bei Sportpferden überprüft (Torricelli et al. 2011). In der letztgenannten unkontrollierten Fallserie von 13 Pferden wurden die mononukleären Zellen aus Knochenmark für die Behandlung zusätzlich mit PRP kombiniert. Die Autoren stellten eine Verbesserung des Lahmheitsgrades fest, 11 von 13 Pferden wurden wieder im Sport eingesetzt. In einer der tierexperimentellen Untersuchungen am Kollagenase-Modell (6 Pferde) mit Biopsieentnahme an Tag 48 nach Erzeugung der Schäden wurde eine Verbesserung einzelner histologischer und immunhistologischer Parameter festgestellt. Die Aussagekraft dieser Untersuchungen im Hinblick auf die Bedeutung des verwendeten Zellsubstrates ist begrenzt. In der zweiten tierexperimentellen Untersuchung am Kollagenase-Modell (6 Pferde) wurde die Wirkung von mononukleären Zellen aus Knochenmark u.a. einer Placebo-Injektion mit Kochsalzlösung gegenübergestellt. Dabei zeigte sich 21 Wochen nach der Behandlung in der Prüfgruppe mit immunhistochemischen Methoden eine höhere Expression von cartilage oligomeric matrix protein (COMP) und Kollagentyp I bei niedriger Kollagentyp III Expression (Crovace et al. 2010).

Zusätzlich kann durch Zentrifugation von gerinnungsgehemmten Knochenmarksaspiraten, ein plasmaartiger Überstand gewonnen werden (acellular bone marrow, ABM), der Wachstumsfaktoren enthält (Smith et al. 2006, Schnabel et al. 2007) und zur Resuspension von kultivierten MSCs eingesetzt wird (Godwin et al. 2012).

Wenn eine alleinige Therapie mit MSCs angestrebt wird, muss dieser Zelltyp aufgrund seiner geringen Konzentration in Knochenmarksaspiraten expandiert werden. Dazu werden die durch Zentrifugation von Knochenmark gewonnenen mononukleären Zellen nach einigen Aufbereitungsschritten in Kulturgefäße aus Kunststoff überführt, um das Vermögen der darin enthaltenen MSCs zur Plastikadhärenz zu nutzen. Die hämatopoetischen Zellen, die sich nicht anheften, werden nach wenigen Tagen ausgewaschen. Nach einer Kulturdauer von ca. 2-4 Wochen sind die MSCs in hoher Konzentration (mehrere Millionen) für die Therapie verfügbar (Fortier et al. 1998).

Alternativ können die durch Zentrifugation gewonnenen mononukleären Zellen nach Überführung in ein Kulturmedium mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung einer Polysaccharid Lösung (Ficoll®) oder einer kolloidalen Suspension von Silikat-Partikeln (Percoll™) von der Fraktion der Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und unreifen myeloischen Vorläuferzellen getrennt werden. Es schließt sich nach weiteren Aufbereitungsschritten ebenfalls eine Kultur der MSC-angereicherten mononukleären Zellen zur Expansion der MSCs in Kulturgefäßen aus Kunststoff an (Bourzac et al. 2010).

Smith et al. beschrieben 2003 erstmals die Aufbereitung von MSCs aus Knochenmark bei Pferden und deren mit Knochenmarküberstand kombinierten Einsatz zur Behandlung von natürlich entstandenen Tendopathien der OBS (Smith et al. 2003). Hinsichtlich der Behandlung natürlicher Tendopathien und Desmopathien mit MSCs aus Knochenmark liegen inzwischen klinische Erfahrungen an einer großen Anzahl von Pferden vor (Pacini et al. 2007, Fortier and Smith 2008, Burk and Brehm 2011, Godwin et al. 2012). Insbesondere die Untersuchungsergebnisse nach Behandlung einer Population von Rennpferden in Großbritannien (Arbeitsgruppe Prof. R.K.W. Smith, London) wurden in den letzten Jahren wiederholt ausgewertet (Fortier and Smith 2008, Smith 2008, Godwin et al. 2012). In einer frühen Auswertung betrug die Rezidivrate nach Applikation von MSC aus Knochenmark in OBS-Schäden bei



Flach- und Hürdenrennen (zusammengefasst) ein Jahr nach Behandlung 19% (24% bei Berücksichtigung beider Vordergliedmaßen). Bei denjenigen Pferden, die wieder voll trainiert werden konnten, lag die Rezidivrate mehr als 1 Jahr nach der Rückkehr in den Sport bei 27% (34% bei Berücksichtigung beider Vordergliedmaßen) (Smith 2008). Über einen Beobachtungszeitraum von mehr als 2 Jahren vollständiger sportlicher Nutzung wird die Rezidivrate in dieser Population mit insgesamt 27-32% angegeben (bis zu 41% bei Berücksichtigung der kontralateralen Gliedmaße). Für Flachrennpferde betrug die Rezidivrate nach dieser Zeitspanne 50%, für Hürdenrennpferde 25,7% (Smith 2008, Godwin et al. 2012). Dieses Ergebnis wird einer Rezidivrate nach herkömmlichen Behandlungsformen (kontrollierte Bewegung und/oder intraläsionale Behandlung mit Hyaluronsäure, Behandlung mit polysulfatierten Glykosaminoglykanen) von 67% (Flachrennen) bzw. 56% (Hürdenrennen) gegenübergestellt, die sich ebenfalls auf einen Beobachtungszeitraum von mehr als 2 Jahren und eine vergleichbare Pferdepopulation bezieht (Dyson 2004). Für Hürdenrennpferde ergibt sich daraus gegenüber der Vergleichsuntersuchung eine signifikant geringere Rezidivrate, nicht jedoch für Flachrennpferde. Eine andere Kasuistik mit 109 stammzellbehandelten OBS von Pferden anderer Nutzungsrichtungen zeigte mehr als zwei Jahre nach Behandlung eine Rezidivrate von 13% (20% bei Berücksichtigung der kontralateralen Gliedmaße) (Smith 2008), die einer Rezidivrate für diese Nutzungsrichtungen nach nicht-regenerativer Therapie von 23-43% gegenübersteht (Dyson 2004).

Parallel dazu wurde die kombinierte Wirkung von BM-MSCs und Knochenmarküberstand auf Tendopathien in mehreren tierexperimentellen Untersuchungen am Kollagenase-Modell bei Pferden untersucht (Schnabel et al. 2009, Crovace et al. 2010). Dabei zeigte sich gegenüber Placebo-behandelten Kontrollsehnen in einer Untersuchung ebenso wie nach Therapie mit mononukleären Zellen aus Knochenmark (s.o.) eine höhere Expression von COMP und Kollagentyp I bei geringer Kollagentyp III Expression (Crovace et al. 2010), während sich diese Parameter in einer andere Studie nicht zwischen Prüf- und Kontrollgruppe unterschieden und auch keine Unterschiede bei der biomechanischen Testung feststellbar waren (Schnabel et al. 2009). In beiden Untersuchungen wurde ein verbessertes histologisches Erscheinungsbild der Sehnen nachgewiesen. In einer weiteren Untersuchung, die am chirurgischen Sehnenmodell durchgeführt wurde und bei der die Wirkung der BM-MSCs auf die Ultrastruktur der Sehnen im Mittelpunkt stand, wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe, die in dieser Studie mit Knochenmarküberstand behandelt wurde, keine Verbesserung nachgewiesen.

Vor dem Hintergrund der erfolgversprechenden Ergebnisse nach BM-MSC-Behandlung natürlich entstandener OBS Läsionen wurde erstmals eine kontrollierte, randomisierte experimentelle Untersuchung an Pferden mit natürlich entstandenen Tendopathien der OBS zur Wirkung von BM-MSCs und Knochenmarküberstand im Vergleich zu Kochsalzlösung durchgeführt, um insbesondere die Auswirkungen der Behandlung auf die Gewebeeigenschaften zu untersuchen (Smith et al. 2013). Das experimentelle Studiendesign an 12 Pferden mit fortgeschrittenen spontanen Sehnenschäden einschließlich postmortaler Untersuchungen nach 6 Monaten stellt ein Alleinstellungsmerkmal dieser Untersuchung dar. Es zeigte sich, dass die Sehnen der Prüfgruppe ein besseres histologisches Erscheinungsbild (Score) und bei der biomechanischen Testung eine geringere strukturelle Steifigkeit, jedoch keine Verbesserung des Elastizitätsmoduls aufwiesen. Der Zell- und DNA-Gehalt, die Durchsetzung mit Gefäßen, der Wasseranteil sowie der Glykosamin-, MMP-13- und GAG-Gehalt waren nach Behandlung mit BM-MSC plus Knochenmarküberstand geringer als in Sehnen der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse wurden als Ausdruck einer Annäherung an strukturelle und funktionelle Eigenschaften von nicht erkranktem Sehnengewebe durch die Therapie mit BM-MSCs interpretiert.



4.6.2 Kultivierte mesenchymale Stromazellen aus Fettgewebe (AT-MSCs)

Fettgewebe ist reich an kernhaltigen Zellen und relativ leicht durch eine kurze Hautinzision oder Liposuktion unter Lokalanästhesie aus der Unterhaut z. B. im Bereich der Schweifwurzel zu gewinnen (Nixon et al. 2008). Entnommen werden ca. 2–50 g Unterhautfettgewebe. Für die Aufbereitung wurden verschiedene Protokolle beschrieben. So kann z.B. durch Andauung, d. h. Entfernung von Gerüstsubstanz mittels Kollagenase und nachfolgende Zentrifugation bereits innerhalb weniger Stunden ein injizierbares Substrat entstehen, das reich an kernhaltigen Zellen (adipose derived nucleated cells, ADNCs) wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, Perizyten, glatten Muskelzellen, Makrophagen und mesenchymalen Stromazellen ist und als stromale vaskuläre Fraktion (SVF) bezeichnet wird (Zuk et al. 2001). Unklarheit besteht darüber, welche dieser Zellen sich stimulierend auf die Sehnenheilung auswirken, wobei gesichert ist, dass neben den MSCs auch Perizyten *in vitro* multipotent sind (Koch et al. 2008). Equine MSCs aus Fettgewebe (AT-MSCs; synonyme Ad-MSCs, ASCs) können sich unter geeigneten Bedingungen unter anderem in Knochen, Fett und Knorpel differenzieren (Vidal et al. 2007). Für die Differenzierung von AT-MSCs zu Tenozyten sind mechanische Stimuli von Bedeutung (Burk et al. 2016). Durch Nutzung der Plastikadhärenz von MSCs lassen sich diese z.B. nach Verbringen der stromalen vaskulären Fraktion in Kulturgefäße aus Kunststoff von den anderen Zelltypen trennen und innerhalb von ca. 21–30 Tagen durch Kultivierung vermehren. Alternativ kann das Fettgewebe auch ohne enzymatische Aufbereitung in Kultur gebracht werden (Explantat-Technik) (Lee et al. 2011, Gittel et al. 2013). Fettgewebe weist im Vergleich zu Knochenmark eine höhere Dichte an MSCs auf, und diese zeigen im Vergleich zu BM-MSCs eine deutlich höhere Proliferations- und Migrationsrate (Burk et al. 2013) sowie eine vorteilhaftere Genexpression von Bestandteilen der extrazellulären Matrix von Sehnen wie den Kollagentypen I, III und Decorin (Burk et al. 2014).

Zur Wirkung von kultivierten AT-MSCs auf Tendopathien bei Pferden waren in der Literatur zum Zeitpunkt der Konzeption dieser Arbeit nur wenige Daten verfügbar. In einer unkontrollierten Fallserie waren 14 von 16 Pferden, deren Sehnenbeschäden mit expandierten allogenen AT-MSCs in Verbindung mit PRP behandelt worden waren, wieder ihrer ursprünglichen Verwendung zugeführt wurden (Del Bue et al. 2008).

In einer Untersuchung am Kollagenase-Modell wurden OBS Läsionen von Pferden 30 Tage nach Induktion des Schadens intraläsional mit kultivierten AT-MSCs, die in autologem Serum resuspendiert wurden, behandelt oder sie blieben unbehandelt (intraindividuelle Kontrolle). Nach Aufteilung in 2 Gruppen wurden bei 4 Pferden 60 Tage nach Induktion des Schadens Sehnenbiopsate gewonnen, bei 4 Pferden erfolgte die Biopsie 60 und 150 Tage nach Induktion. Klinische und ultrasonographische Untersuchungsbefunde unterschieden sich zwischen der mit Zellen und Placebo behandelten Seite nicht. Die histologische Untersuchung zeigte in den Biopsaten der MSC-Serum behandelten Sehnen u.a. eine verbesserte Anordnung der Sehnenfasern, eine reduzierte Infiltration mit Entzündungszellen und eine erhöhte Expression von Kollagentyp I mit einem erhöhten Kollagen I/III Verhältnis. Die vorhandenen Entzündungszellen waren vermehrt perivaskulär angeordnet und die Neovaskularisation war verstärkt (Carvalho et al. 2011).

In einer aktuellen Untersuchung zur Wirkung kultivierter AT-MSCs aus Fettgewebe auf Kollagenase-induzierte Achilles-Sehnen-Tendopathien bei Ratten zeigten die zellbehandelten Sehnen 4 und 12 Wochen nach der Therapie ein geringeres Ausmaß der Sehnen Degeneration und nach 12 Wochen ein geringeres Kollagentyp III/I Verhältnis. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass AT-MSCs möglicherweise auch zur Beschleunigung einer verbesserten Sehnenheilung beitragen könnten (Oshita et al. 2016). Dies wird durch eine tierexperimentelle Untersuchung an Kaninchen relativiert, in der die unbe-



handelte Durchtrennung von Achilles-Sehnen über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen mit dem Effekt einer Sehnennaht und einer Behandlung mit AT-MSCs verglichen wurde. Im Vergleich zum Effekt der Sehnennaht kam es sowohl nach AT-MSC-Behandlung als auch beim Verzicht auf eine Behandlung zu einer Reduktion der Entzündungserscheinungen und zu einer verbesserten Organisation der Kollagenfasern innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Es lagen am Ende der Untersuchung keine Unterschiede zwischen den Gruppen vor (Vieira et al. 2014).

4.6.3 Thrombozytenkonzentrate

Alpha-Granula von Thrombozyten enthalten hohe Konzentrationen von Wachstumsfaktoren (z.B. transforming growth factor- β , TGF- β ; platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB; insulin-like growth factor-1, IGF-1; vascular endothelial growth factor, VEGF u.a.). Diese Faktoren besitzen jeweils eine Bedeutung im Rahmen der Wund- und Sehnenheilung und wirken synergistisch (Docheva et al. 2015). Sie werden bei der Exposition gegenüber Kollagen oder Thrombin aus den Thrombozyten freigesetzt. Durch (Doppel-) Zentrifugation oder Schwerkräftfiltration von gerinnungsgehemmtem Blut können Thrombozytenkonzentrate wie z.B. thrombozytenreiches Plasma (PRP) für die therapeutische Anwendung hergestellt werden. Sie enthalten im Vergleich zu nativem Vollblut je nach Herstellungsverfahren unterschiedliche Konzentrationen von Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten (Schwerkräftfiltration). Für die Herstellung stehen zahlreiche kommerziell erhältliche Systeme und einfache Methoden unter Verwendung von Blutröhrchen zur Verfügung. Die Konzentration der genannten Zellen und Wachstumsfaktoren variiert je nach Herstellungsverfahren (Hessel et al. 2015) und wird auch durch individuelle Eigenschaften (Alter, Pferderasse, Geschlecht) (Giraldo et al. 2013) sowie durch Pharmaka wie z.B. nicht-steroidale Entzündungshemmer (Rinnovati et al. 2016) beeinflusst. Die Optimierung dieser Einflussgrößen ist aktueller Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen (Amable et al. 2013, Boswell et al. 2014).

In verschiedenen experimentellen Untersuchungen wurde gezeigt, dass PRP die Proliferation von Tenozyten (Mazzocca et al. 2012), die Synthese von Kollagen und Sehnenmatrix anregt (Smith et al. 2006, Schnabel et al. 2007) und die Vaskularisation von Narbengewebe fördert (Bosch et al. 2011). In einer kontrollierten Kurzzeituntersuchung am Kollagenase-Modell wurde bei Pferden nach intraläsionaler PRP-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kochsalzlösung) 36 Tage nach der Therapie histologisch in Sehnenbiopsien eine verbesserte Anordnung der Kollagenfasern und Verteilung der Fibrozyten nachgewiesen, andere histologische Parameter und die Anzahl der Blutgefäßanschnitte variierte hingegen zwischen den Gruppen nicht (Maia et al. 2009). In einer tierexperimentellen Arbeit an Pferden, bei der ein chirurgisches Sehnenmodell genutzt wurde, zeigte eine PRP-Behandlung gegenüber der Behandlung mit Kochsalzlösung über einen Zeitraum von 6 Monaten positive Effekte auf die Sehnenheilung und sogar auf die biomechanischen Eigenschaften des Ersatzgewebes (Bosch et al. 2010). Thrombozytenkonzentrate werden deshalb häufig zur Behandlung von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden eingesetzt. Inzwischen zeigen kontrollierte Untersuchungen zur Wirkung einer PRP-Behandlung bei Erkrankungen des Fesselträgerkörpers und -schenkels, dass kurzfristige positive Effekte auf die Rennleistung langfristig keinen Bestand haben (Waselau et al. 2008, Garrett et al. 2013). In humanmedizinischen Studien wird die Effektivität von PRP-Behandlungen kontrovers gesehen: Während mehrere unkontrollierte Untersuchungen einen positiven Effekt auf die Gliedmaßenfunktion und die Schmerzhaftigkeit bei Tendopathien der Achilles- und Patellarsehne verzeichnen (Monto 2012, Charouset et al. 2014), ergab eine kontrollierte randomisierte Doppel-Blindstudie an Patienten mit Tendopathien der Achillessehnen keine Überlegenheit der PRP- gegenüber einer Kochsalzinjektion (de



Vos et al. 2010). Die wachsende Zahl von Publikationen unterschiedlicher Evidenz zur Behandlung von Sehnen, Band- und anderen orthopädischen Erkrankungen wurde in einem Übersichtsartikel systematisch ausgewertet (Brossi et al. 2015). Vor der Planung der vorliegenden Studie waren neben wenigen unkontrollierten Fallserien (Arguelles et al. 2008) keine Placebo-kontrollierten Untersuchungen zur Wirkung eines PRP-Produktes bei natürlich entstandenen Tendopathien der OBS von Pferden verfügbar.

4.6.4 Autologes konditioniertes Serum (ACS)

Autologes konditioniertes Serum wird durch Exposition von Vollblut gegenüber Glaskugeln in kommerziell erhältlichen Systemen hergestellt. Durch dieses Verfahren wurde zunächst bei Menschen eine erhöhte Abgabe von entzündungshemmenden Zytokinen wie Interleukin (IL)-4, IL-10 und IL-1 Rezeptorantagonist (Ra) durch Monozyten in das Serum nachgewiesen (Meijer et al. 2003). In einer jüngeren Untersuchung wurde gezeigt, dass aus Pferdeblut hergestelltes ACS ebenfalls einen erhöhten Gehalt an IL-1Ra und IL-10 und zudem hohe Konzentrationen an Wachstumsfaktoren wie insulin-like growth factor-1 (IGF-1) und transforming growth factor- β (TGF- β) aufweist (Hraha et al. 2011). Der Gehalt an Zytokinen und Wachstumsfaktoren variiert in Abhängigkeit vom Donor und vom verwendeten Herstellungssystem (Dahlgren and Harvey 2008, Hraha et al. 2011). Studien an Pferden haben sich zunächst auf den durch IL-1Ra vermittelten entzündungshemmenden Effekt bei der Behandlung der Osteoarthritis fokussiert (Frisbie et al. 2007). Zur Behandlung von Tendopathien sind jedoch die genannten Wachstumsfaktoren ebenfalls von Bedeutung (Sharma and Maffulli 2005). Entsprechend wurde in einer kontrollierten Untersuchung des Effektes von ACS auf Sehnenkrankungen an einem chirurgischen Sehnenmodell bei Ratten eine verbesserte histologische Struktur, ein erhöhter Kollagentyp I Gehalt und eine beschleunigte Abheilung der ACS behandelten Sehnen nachgewiesen, wenngleich sich die biomechanisch getestete Reißkraft nicht von unbehandelten Sehnen unterschied (Majewski et al. 2009). In einer Folgeuntersuchung dieser Arbeitsgruppe wurde am selben Modell nachgewiesen, dass die Behandlung mit ACS zu einer verstärkten Expression verschiedener Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β 1) mit Ausnahme von VEGF innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 8 Wochen nach Durchtrennung von Rattensehnen führte, und es wurde ein parakriner Effekt dieses Substrates postuliert (Heisterbach et al. 2012).

Anekdotenhaften Berichten zufolge wird ACS regelmäßig *in praxi* zur Behandlung von Tendopathien eingesetzt (Weinberger 2008, Textor 2011). Eine kontrollierte Untersuchung an natürlich erkrankten Pferden war zum Zeitpunkt der Konzeption dieser Arbeit nicht verfügbar (Smith et al. 2014).

4.7 Methoden zur Verlaufskontrolle von Sehnenkrankungen

4.7.1 Klinische Untersuchung

Die klinische Untersuchung von Pferden mit Sehnenkrankungen im Mittelfußbereich stellt das älteste Verfahren dar und basiert im Rahmen einer Untersuchung des Bewegungsapparates auf der Bestimmung des Lahmheitsgrades sowie der Adspektion und sorgfältigen Palpation an der belasteten und an der aufgehobenen, leicht gebeugten Gliedmaße. Die Temperatur der Hautoberfläche kann mit dem Handrücken erfasst werden und gilt als früher Indikator einer Tendopathie (Schmidt 1989, Jorgensen et al. 2011). Durch die Palpation wird zum einen, in Verbindung mit der Adspektion, die Umfangsvermehrung der Sehne und der Unterhaut bestimmt. Diese entstehen sowohl bei akuten Tendopathien als auch bei chronisch degenerativen Sehnenkrankungen. Die Schwellungen werden entsprechend entweder



überwiegend durch Flüssigkeitseinlagerungen oder durch Vernarbungen und Unterhautfibrosen hervorgerufen. Zum anderen wird durch die Palpation die Druckempfindlichkeit der Sehne überprüft. Sie erfordert Übung und Einfühlungsvermögen, eine seitenvergleichende Palpation ist empfehlenswert (Baxter and Stashak 2011, Jorgensen et al. 2011). Die Druckempfindlichkeit gilt als zuverlässiges und frühes Anzeichen einer Tendopathie, das noch vor Entstehung einer Lahmheit erfassbar ist (Bertone 2011). Allerdings wird die palpatorische Erfassung von Rezidiven geringen Ausmaßes bei chronisch verdickten Sehnen erschwert. Provokationsproben wie Beuge- und Streckproben werden im Einzelfall durchgeführt. Nicht bei allen Pferden mit Tendopathien ist eine Lahmheit feststellbar. Der Grad der Lahmheit kann jedoch im akuten Stadium hoch sein und soll positiv mit dem Ausmaß des Sehnen Schadens (Jorgensen et al. 2011) oder eher mit dem Grad der Entzündung als mit der Größe des Schadens korrelieren (Avella and Smith 2012). Der Lahmheitsgrad nimmt im weiteren Verlauf üblicherweise ab und die Lahmheit verschwindet meistens zunächst. Sie kann bei Belastung wieder in Erscheinung treten (Avella and Smith 2012).

4.7.2 B-mode Sonographie

Seit den 1980er Jahren ist die Echtzeit-B-mode Sonographie zur Diagnostik (Rantanen 1982, Rantanen et al. 1985) und Nachverfolgung von natürlichen (Reef et al. 1988, Genovese et al. 1997, Reef et al. 1997) und experimentellen (Gaughan et al. 1991) Tendopathien in der Pferdeorthopädie fest verankert. Die Technik ist nicht invasiv, auch unter Praxisbedingungen verhältnismäßig einfach anwendbar und hat seit ihrer Einführung eine starke Weiterentwicklung hinsichtlich der Bildqualität und Benutzerfreundlichkeit erfahren. Es werden üblicherweise 7,5 -18 MHz Linearsonden verwendet. Neben der subjektiven oder computergestützten Graustufenanalyse von Längs- und Querschnittsbildern erfolgt die Auswertung der Befunde anhand von Messungen (z.B. gesamter Sehnenquerschnitt, Querschnitt des Defektes) (Gillis et al. 1995) oder der Anwendung von semiquantitativen Bewertungsschemata (z.B. Echogenitäts-Score, Faserbündelparallelitäts-Score) (Genovese et al. 1990, Genovese et al. 1997, Reef et al. 1997). Dazu wird der palmare Mittelfuß in 7 Zonen eingeteilt (Genovese et al. 1986, Rantanen et al. 2003) oder der Abstand zwischen dem *Os carpi accessorium* und der Ultraschallsonde bestimmt (Redding 2011). Es sollte möglichst eine vergleichende Untersuchung der kontralateralen Sehne erfolgen, da bei ca. 30% der OBS-Tendopathien subklinische degenerative Veränderungen der Gegenseite zu finden sind (Avella et al. 2009). Histologische Untersuchungen zeigen, dass die Korrelation der Graustufenanalyse mit der tatsächlichen Sehnenintegrität begrenzt ist (Nicoll et al. 1992, Tsukiyama et al. 1996, van Schie et al. 2000) und mit fortschreitender Fibrosierung der Läsion abnimmt (Crass et al. 1992). Die Genauigkeit der verwendeten Scores ist z.T. unzureichend mit histologischen Korrelaten validiert (Genovese et al. 1990). Die B-mode Sonographie unterliegt einer Untersucherabhängigkeit (Pickersgill et al. 2001), und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist begrenzt (van Schie et al. 1999), sodass der diagnostische Wert des Verfahrens in den letzten Jahren in Frage gestellt wurde (Crass et al. 1992, van Schie et al. 1999, Karlin et al. 2011).

4.7.3 Ultrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC)

Die ultrasonographische Gewebecharakterisierung (ultrasonographic tissue characterization, UTC; Fa. utc-imaging, Stein, Niederlande) basiert auf der B-mode Ultrasonographie: Eine 7-12 MHz Ultraschall-Linearsonde ist an einer motorgetriebenen Einheit befestigt, mit deren Hilfe die Sonde mit kontinuierlicher Geschwindigkeit in orthogonaler Position zum Sehnenpaket über eine rechteckige Vorlaufstrecke



gleitet, die in einem Rahmen ebenfalls an der motorgetriebenen Einheit befestigt ist und dem hinteren Aspekt des Mittelfußes anliegt. Bei diesem Scan-Vorgang über eine Strecke von 12 cm Länge werden im Abstand von 0,2 mm transversale Schnittbilder der Sehne erzeugt. Die Ultraschall-Rohdaten werden per Kabel an einen Laptop-Computer geschickt. Mit Hilfe einer Software wird daraus ein 3-dimensionaler Datenblock erzeugt, aus dem dann auch longitudinale und koronale Schnittbilder abzuleiten sind. Mit Hilfe der vom Hersteller entwickelten UTC-Algorithmen wird die Kontinuität der Echos, d.h. die Stabilität der Echotextur über konsekutive, virtuell „gestapelte“ transversale Ultraschallbilder in 4 Kategorien unterteilt: Typ I-Echos werden von intakten, parallel verlaufenden sekundären Kollagenfaserbündeln, so genannten Faszikeln, erzeugt (grün markiert); Typ II-Echos werden von unterbrochenen, umfangsvermehrten und wellenförmigen sekundären Kollagenfaserbündeln generiert (blau); Typ III-Echos korrelieren mit kleinen Fibrillen (rot) und Typ IV-Echos mit amorpher Gewebematrix und Flüssigkeit (schwarz). Die Echotypen I und II sind „strukturbezogene Echos“, die von Strukturen mit einer Größe oberhalb der axialen Auflösung ($\varnothing > 0,35$ mm bei 12 MHz Schallfrequenz) erzeugt werden, während die Echotypen III und IV durch Strukturen unterhalb der axialen Auflösung ($\varnothing < 0,35$ mm bei 12 MHz Schallfrequenz) entstehen und somit als „interferierende Echos“ gelten (<http://utcimaging.com>; aufgerufen am 18.10.2016). Es besteht eine systematisch untersuchte Korrelation der Echotypen mit feingeweblichen Eigenschaften der Sehne (van Schie et al. 2001). Die wesentlichen Vorteile der UTC-Technik gegenüber der B-mode Ultrasonographie bestehen in einer höheren Sensitivität, besseren Wiederholbarkeit und Untersucherunabhängigkeit (van Schie et al. 2000, van Schie et al. 2001). Ein Nachteil der UTC-Technik zum jetzigen Zeitpunkt ist, dass sie beim Pferd im Wesentlichen zur Untersuchung der oberflächlichen Beugesehne im Mittelfußbereich etabliert ist, wenngleich die Untersuchung des Fesselträgers beschrieben wurde. Die Untersuchung erfordert eine tiefe Sedierung. (<http://utcimaging.com>; aufgerufen am 18.10.2016).

4.7.4 Farb-Doppler-Sonographie

Die medizinische Doppler Ultrasonographie basiert darauf, dass es zu einer Änderung der Frequenz von Schallwellen kommt, wenn sie von sich bewegenden roten Blutzellen reflektiert werden (Doppler-Effekt). Diese Änderung wird von der Ultraschallsonde erfasst und im Gerät ausgewertet. Bei der Farbkodierten-Doppler (kurz: Farb-Doppler) Sonographie wird die Richtung des Blutflusses im Verhältnis zur Position der Sonde farblich kodiert wiedergegeben. Durch Abstufungen der Farbtöne erfolgt zudem eine Darstellung der Geschwindigkeit des Blutstromes. Das Farb-Doppler Bild wird am Gerät über der Ebene des B-mode Bildes angeordnet, sodass eine sonoanatomische Orientierung möglich ist (Reef 1998). Bei der Power-Doppler Sonographie handelt es sich um eine Modifikation, bei der die Energie der Blutbewegung dargestellt wird und die zu einer höheren Sensitivität bei der Darstellung geringer Blutflussraten führt. Die Technik wird weniger stark als die Farb-Doppler Technik durch den Untersuchungswinkel beeinflusst (Reef 1998).

Die Farb-Doppler Sonographie wurde zur Erfassung der Blutperfusion und der Vaskularisation von Sehnen an lebenden Individuen genutzt (Ohberg et al. 2001). An der humanen Patellarsehne zeigt das Verfahren eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität. Die Vaskularisation nicht erkrankter Sehnen ist schwach ausgeprägt und mit Hilfe dieses Verfahrens nicht zuverlässig nachweisbar (Weinberg et al. 1998). Die Technik ist hingegen gut geeignet, um Hinweise auf den Verlauf der Neovaskularisation im Rahmen der Sehnenheilung bei Pferden zu erlangen (Kristoffersen et al. 2005, Bosch et al. 2011, Murata et al. 2012).



4.7.5 Magnetresonanztomographie

Magnetresonanztomographie (MRT) beruht auf dem Prinzip der Kernspinresonanz. Atomkerne im untersuchten Gewebe werden durch magnetische Felder zu bestimmten Bewegungen angeregt, sodass bis zum Abklingen der Bewegung ein messbares Signal in Form einer Wechsellspannung entsteht (Bolas 2011). In der Humanmedizin kommt der MRT-Untersuchung bei Tendopathien aufgrund ihrer einfachen Anwendbarkeit und ihres hohen diagnostischen Wertes bei degenerativen Erkrankungen der Achillessehne eine mindestens so große Bedeutung zu wie der Ultrasonographie (Docking et al. 2015). Zur Anwendung beim Pferd stehen inzwischen zahlreiche Niederfeldgeräte (Magnetfeldstärke bis zu 0,3 Tesla) für den Einsatz am stehenden, tief sedierte Pferd in privaten und universitären Kliniken zur Verfügung, die zumeist eine Feldstärke von 0,28 Tesla aufweisen (Werpy 2011). Der Einsatz zur Untersuchung von Tendopathien der Sehnen am Mittelfuß beschränkt sich aufgrund der guten Zugänglichkeit dieser Region für die B-mode Sonographie derzeit meist noch auf postmortale und tierexperimentelle Untersuchungen (Crass et al. 1992, Schramme et al. 2010, Karlin et al. 2011). Magnetresonanztomographische Untersuchungen werden deshalb häufiger zur Diagnostik von Erkrankungen der Sehnen und Bänder im distalen Zehenbereich und des Fesselträgerursprunges vorgenommen. Aufgrund der begrenzten Auflösung von Niederfeldgeräten sind diese für komplexere Fragestellungen und Verlaufskontrollen weniger geeignet. Für die Pferdeorthopädie stehen jedoch zur Zeit nur einzelne Hochfeldgeräte (z.B. 1,5 T, 3 T) in spezialisierten Einrichtungen zur Verfügung. Mit diesen Geräten können hochauflösende Bilder erzeugt werden, die jedoch eine Allgemeinanästhesie erforderlich machen (Leece 2011). Aus wissenschaftlicher Sicht bietet die MRT-Untersuchung die Möglichkeit, den Verbleib von MSCs, die mit Eisen-Nanopartikeln markiert wurden, *in vitro* (Bourzac et al. 2014) oder nach Injektion am lebenden Pferd nachzuverfolgen (Burk et al. 2016) (s.u.). Zusammenfassend ist insbesondere die Hochfeld-Magnetresonanztomographie ein Diagnostikum mit hoher Aussagekraft, das aufgrund des Aufwandes und der Verfügbarkeit bei Tendopathien des Mittelfußes von Pferden im klinischen und wissenschaftlichen Bereich bislang weniger intensiv genutzt wird.

4.7.6 Feinnadelbiopsie und Histologie, Immunhistologie

Um dem Bedürfnis nachzugehen, eine direkte Beurteilung der feingeweblichen Sehnenintegrität am lebenden Individuum mit einer vertretbaren Belastung vorzunehmen, wurden die Feinnadelbiopsie als Diagnostikum von Tendopathien zunächst in der Humanmedizin (Movin et al. 1997, Movin et al. 1997) und später auch in der Pferdeorthopädie eingeführt (Wagels et al. 2001). Sie stellt eine Weiterentwicklung von invasiveren Exzisions- oder Stanzbiopsien dar (Webbon 1982, Carvalho et al. 2013), bietet jedoch ebenso die Möglichkeit einer histologischen sowie elektronenmikroskopischen Aufarbeitung von Gewebeproben und ist gut verträglich (Buck et al. 2002). Das Volumen der Gewebeproben und die Wiederholbarkeit der Technik sind naturgemäß begrenzt. Die Aussagekraft bezieht sich auf einen kleinen Bereich der untersuchten Sehne. Eine Beeinflussung der Sehnenheilung durch das Verfahren *per se* ist nicht auszuschließen (Henninger et al. 1992).

Die histologische Sehnenintegrität wird üblicherweise zunächst an mit Hämalaun und Eosin gefärbten Schnittpräparaten, die im Verlauf der Sehnenachse angefertigt wurden, beurteilt. Dies erfolgt anhand von Scores, die z.B. folgende Parameter berücksichtigen: Zellkernmorphologie der Tenozyten, Variationen hinsichtlich der Zellverteilung, Faserparallelität, Vaskularisation (Astrom and Rausing 1995, Movin et al. 1997, Bosch et al. 2010). Zum Teil werden zusätzlich Infiltrationen mit Entzündungszellen, Einblutungen und andere Kriterien erfasst (Nixon et al. 2008). Durch Graduierung dieser Parameter und eine



Befunderhebung in einer definierten Anzahl zufällig ausgewählter mikroskopischer Gesichtsfelder sowie idealerweise die Einbindung mehrerer unabhängiger Untersucher wird eine weitreichende Objektivierung der histologischen Beurteilung angestrebt. Zur weiterführenden Diagnostik werden Spezialfärbungen (Masson-Trichrom, Pikrosirius-Rot) (Nixon et al. 2008, Estrada et al. 2014) und immunhistochemische Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen der EZM wie z.B. Kollagentypen I, III, COMP u.a. (Nixon et al. 2008, Crovace et al. 2010) oder zur Darstellung von Gefäßanschnitten (v.-Willebrand-Faktor / Faktor VIII) verwendet (Bosch et al. 2011). Die Auswertung der Immunreaktion erfolgt zumeist semiquantitativ anhand von Scores (Nixon et al. 2008, Crovace et al. 2010).

Zusätzlich kann die Expression der kollagentyp-spezifischen mRNS in Fibroblasten und Tenoblasten an Schnittpräparaten durch *in situ* Hybridisierung ermittelt werden (Dahlgren et al. 2005). Die quantitative real-time PCR wiederum ermöglicht im Rahmen der molekularen Analyse einer homogenisierten Gewebeprobe die genaue Bestimmung des Gehaltes an kollagentyp-spezifischer mRNS und somit eine indirekte Quantifizierung von z.B. Kollagentypen (Dahlgren et al. 2005).

Immunhistochemische Techniken sind geeignet, die Verteilung von Proteinen der Sehnenmatrix in Gewebeschnitten zu bestimmen. Das Ergebnis wird durch zahlreiche Faktoren wie Gewebefixierung und -verarbeitung, Art der Primärantikörper etc. beeinflusst (Ramos-Vara 2005). Molekularbiologische Methoden hingegen ermöglichen eine genaue Quantifizierung der Genexpression von Proteinen und weisen eine hohe Sensitivität und gute Reproduzierbarkeit auf (Orlando et al. 1998, Bustin 2000).

4.7.7 Nachverfolgung implantierter MSCs (cell tracking)

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse klinischer und tierexperimenteller Untersuchungen zur Behandlung von Tendopathien mit MSCs rückte die Frage nach den Wirkweisen dieses Zelltyps und damit nach dem Verbleib der Zellen nach der Injektion in den Mittelpunkt (Guest et al. 2008). Die Nachverfolgung von MSCs (cell tracking) erfolgt idealerweise nicht durch eine einzelne Methode, da alle Methoden Stärken und Nachteile mit sich bringen. Das cell tracking basiert auf der Markierung der Zellen nach ihrer Kultur und vor der Injektion, sodass eine Detektion der MSCs entweder nicht invasiv am lebenden Pferd mit geeigneten bildgebenden Techniken oder mit feingeweblichen Verfahren am Gewebepreparat erfolgen kann. Der geeignete Zeitraum der Detektion kann je nach Verfahren variieren. Als nicht invasives Verfahren steht die Markierung der MSCs mit einem Radiopharmakon und anschließender nuklearmedizinischer Detektion (Szintigraphie) über einen begrenzten Zeitraum (ca. 24 Std.) zur Verfügung (Sole et al. 2012). Alternativ kann eine Markierung mit Nanokristallen (quantum dots) erfolgen, die unempfindlich gegenüber metabolischen Einflüssen sind und nur minimale zytotoxische Effekte aufweisen (Collins et al. 2012). Zudem steht eine Markierung mit superparamagnetischen Eisenoxid (SPIO)-Partikeln, die mittels Magnetresonanztomographie (MRT) (s.o.) insbesondere in T2* gewichteten Sequenzen nachweisbar sind, zur Verfügung (Scharf et al. 2015). Dieses Markierungsverfahren bietet den Vorteil, dass es mit der histologischen Detektion von Eisen mit einer Spezialfärbung (Preußisch Blau) kombiniert werden kann (Jülke et al. 2015). Andere, komplexere Verfahren erfordern eine gentechnische Markierung der Zellen z.B. mit einem lentiviralen Plasmid (Transfektion mit Reporter gen), das z.B. für das grüne fluoreszierende Protein (GFP) kodiert, welches wiederum mit verschiedenen Techniken (fluoreszenzmikroskopisch, immunhistochemisch, mittels Immunfluoreszenz) am Präparat nachgewiesen werden kann (Guest et al. 2008, Guest et al. 2010). Die „Autofluoreszenz“ von Kollagen und Zellmetaboliten kann die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung erschweren.

Zum Zeitpunkt der Konzeption dieser Arbeit waren in der Literatur zwei Pilotstudien verfügbar, die erste Einblicke über den Verbleib von BM-MSCs und embryonal-ähnlichen Stammzellen (ESCs) nach Implan-



tation in equine Sehnen gaben. Nach 10 Tagen wurden noch 5% der BM-MSCs nachgewiesen, während ESCs bis zu 90 Tage lang detektierbar waren (Guest et al. 2010). Studien zum Verbleib von AT-MSCs nach intratendinöser Injektion beim Pferd fehlten, sodass dazu eine eigene Langzeituntersuchung erfolgte (Publikation 6, Anhang 13.6). In einer danach publizierten Langzeit-Untersuchung einer anderen Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass markierte AT-MSCs mittels MRT und histologisch bis zu 24 Wochen im Bereich der Sehnenläsion und sogar in kontralateralen Sehnenläsionen nachgewiesen werden können (Burk et al. 2016).

5 Konzept und Zielsetzung

Folgende Ziele standen im Mittelpunkt der Arbeit:

- Optimierung der Knochenmarkentnahme und der BM-MSC-Ausbeute aus dem equinen Brustbein
- Überprüfung der kurzfristigen Lagerungsfähigkeit und des Wachstumsfaktorengehaltes von autologen Thrombozytenkonzentraten
- Charakterisierung des diagnostischen Wertes etablierter und neuer Methoden bei der Verlaufskontrolle von Erkrankungen der oberflächlichen Beugesehne. Berücksichtigt wurden dabei die klinische Untersuchung und die B-mode Sonographie sowie die Farb-Doppler-Sonographie, die Utrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC), die Feinnadelbiopsie, die histologische Untersuchung sowie mehrere Methoden zur Nachverfolgung des Verbleibs von MSCs (cell tracking).
- Überprüfung des Effektes autologer AT-MSCs auf chirurgisch erzeugte Läsionen der oberflächlichen Beugesehne. Dazu wurden die Utrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC) und Doppler-Sonographie sowie finale histologische, biochemische und biomechanische Untersuchungen eingesetzt.
- Überprüfung des Effektes von autologem konditioniertem Serum auf natürlich entstandene Läsionen der oberflächlichen Beugesehne. Ein besonderer Aspekt war die feingewebliche Verlaufskontrolle durch Gewinnung sequentieller Feinnadelbioptate.
- Überprüfung des Effektes eines autologen thrombozytenreichen Plasmaproduktes auf natürlich entstandene Läsionen der oberflächlichen Beugesehne. Hierzu wurde neben der B-mode Sonographie die Utrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC) verwendet.



6 Ergebnisse und Diskussion

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden teilweise die Zusammenfassungen der Publikationen 3-10 wiedergegeben (Anhang 13.3 - 13.10).

6.1 Optimierung der Knochenmarkentnahme aus dem Brustbein zur Herstellung von kultivierten BM-MSCs (Publikationen 3, 4; Anhang 13.3, 13.4)

Eydt, C., Schröck, C.*, **Geburek, F.***, Rohn, K., Staszuk, C.†, Pfarrer, C†. Three-Dimensional Anatomy of the Equine Sternum. *Anat. Histol. Embryol.* 2014, 44 (2): 99-106. Erstmals online publiziert am 9. April 2014.

*†Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit

Zur sicheren und reproduzierbaren Knochenmarksaspiration aus dem equinen Brustbein, z.B. für die Herstellung von potentiell regenerativen Produkten für die Sehnenbehandlung, ist eine zuverlässige anatomische Beschreibung unerlässlich, insbesondere um das Risiko von Fehlpunktionen mit lebensbedrohlichen Konsequenzen zu minimieren. In der anatomischen Literatur variieren die Angaben zur Struktur und Anzahl der *Sternebrae* bei Pferden jedoch erheblich. Isolierte Brustbeine von Pferden unterschiedlichen Alters wurden mittels Computertomographie (CT) und einzelne *Sternebrae* mittels Mikro-CT untersucht. Die Dimensionen der *Sternebrae* wurde anhand der gewonnenen Daten nach multiplanarer Rekonstruktion mit Hilfe des Programmes AMIRA (version 5.2.0; Visage Imaging GmbH, Berlin) bestimmt. Es lag bei allen Pferden eine einheitliche Anordnung von 7 *Sternebrae* vor, wobei jeweils die 6. und 7. *Sternebra* fusioniert waren. Die kranialen Brustbeinsegmente (*Sternebrae* 1-3) waren seitlich abgeflacht, wohingegen die kaudalen (*Sternebrae* 6 und 7) dorso-ventral abgeflacht waren. Im Gegensatz dazu waren die *Sternebrae* 4 und 5 kugelförmig. Das Zentrum der *Sternebrae* bestand aus einem radioluzenten, grobmaschigen Netz aus mineralisierten Knochen trabekeln. Die Peripherie der einzelnen *Sternebrae* war aus röntgendichtem Geflechtknochen zusammengesetzt, der von einer Knochenrinde (*Substantia corticalis*) mit einer Dicke von < 1 mm umgeben war. Die Brustbeinsegmente 3, 4 und 5 wiesen ein signifikant höheres Volumen als die anderen *Sternebrae* auf ($p < 0,05$). Die *Sternebrae* 6 und 7 besaßen die geringste dorso-ventrale Ausdehnung. Es lag eine positive Korrelation zwischen den Dimensionen der *Sternebrae* und dem Alter der Pferde, hingegen keine Korrelation mit dem Körpergewicht der Pferde vor.

Fazit: Die Untersuchung lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Brustbein bei Warmblutpferden einheitlich aus 7 Segmenten besteht und das Volumen der *Sternebrae* mit dem Alter der Pferde zunimmt. Die 4. und 5. *Sternebra* erscheinen aufgrund ihrer Kugelform, ihres hohen Volumens, der wenig prominenten *Crista sterni* am ventralen Aspekt dieses Brustbeinabschnittes und der guten Zugänglichkeit am stehenden Pferd unter Klinikbedingungen am besten für die Punktion geeignet. Dieses Ergebnis diente als Grundlage für die Untersuchung der optimalen BM-MSC Ausbeute aus Aspiraten dieser *Sternebrae*, die in Publikation 4 (Anhang 13.4) dargestellt ist.



Eydt, C., **Geburek, F.***, Schröck, C.*, Hambruch, N., Rohn, K., Pfarrer, C.†, Staszuk, C.† Sternal bone marrow derived equine multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): Investigations considering the sampling site and the use of different culture media. *Vet. Med. Sci.* 2016, 20 Jun; 2 (3): 200-210.

*†Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit

Um die Gewinnung von MSCs aus Knochenmarksaspiraten zu optimieren, wurde in einer vergleichenden Studie an Warmblutpferden (Alter 2-28 Jahre, Körpergewicht 480-640 kg) in Allgemeinanästhesie Knochenmark in einer Tiefe von 10 mm und 30 mm dorsal der ventralen Kontur der *Sternebrae* 4 und 5 durch Aspiration entnommen. Dazu wurden die Medianebene und die kranio-kaudale Ausdehnung der *Sternebrae* mittels Ultraschall lokalisiert und in der Haut markiert. Im Zentrum der jeweiligen *Sternebra* wurde der Abstand zwischen der Hautoberfläche und der ventralen Knochenoberfläche des Sternums ultrasonographisch bestimmt. Nach einer zentralen Stichinzision des Weichgewebes wurde die Knochenmarkpunktionskanüle (Jamshidi-Nadel) bis zum Auftreten eines deutlichen Widerstandes vorgeschoben und die Ebene der Hautoberfläche auf der Kanüle markiert. Zusätzlich wurde die beabsichtigte Gesamtpunktionstiefe durch Addition einer Strecke von 10 mm (6 Pferde) bzw. 30 mm (6 Pferde) auf der Kanüle markiert und die Kanüle entsprechend tief in die Brustbeinsegmente eingeführt. Pro Gruppe wurden bei jeweils 3 Pferden 5 ml Knochenmark aus *Sternebra* 4 und 10 ml aus *Sternebra* 5 gewonnen, bei den verbleibenden Pferden wurden 10 ml Knochenmark aus *Sternebra* 4 und 5 ml aus *Sternebra* 5 entnommen. Die Tiefe der Knochenpunktion wurde postmortal mittels CT überprüft. Die aus den unterschiedlichen Knochenmarksaspiraten isolierten MSCs wurden unter Zugabe von fetalem Kälberserum, standardisiertem Pferdeserum und autologem Pferdeserum kultiviert. Die Kapazität zur Selbsterneuerung (koloniebildende Einheiten) sowie die Migrations- und Proliferationskapazität (scratch-assay) der MSCs wurden in Abhängigkeit von den Kulturmedien verglichen.

Der ultrasonographisch ermittelte durchschnittliche Abstand zwischen Hautoberfläche und Brustbein betrug für die 4. *Sternebra* $26,4 \pm 6,4$ mm und für die 5. *Sternebra* $29,6 \pm 7,8$ mm. Die durch klinische Messung und Markierung auf der Kanüle geplante Punktionstiefe der Brustbeinsegmente war für die 4. *Sternebra* deutlich ($9,0 \pm 5,5$ mm) und für die 5. *Sternebra* minimal ($2,9 \pm 2,0$ mm) größer als die mittels CT bestimmte. Die durch CT ermittelte ventrale Knorpelschicht der *Sternebra* 4 war deutlich dicker ($12,0 \pm 5,0$ mm) als die der *Sternebra* 5 ($6,6 \pm 2,3$ mm). Der Punktionskanal in den Brustbeinsegmenten wich geringgradig von einem zur Ventralfläche orthogonalen Verlauf ab. Die geometrische Mitte der *Sternebra* 4 und 5 lag bei $32,2 \pm 3,3$ mm bzw. $27,3 \pm 3,7$ mm.

Eine Knochenmarksaspiration aus *Sternebra* 4 war in einer geplanten Tiefe von 10 mm in den meisten Fällen nicht erfolgreich, während sie in derselben Tiefe in *Sternebra* 5 regelmäßig Knochenmark lieferte. Aus den *Sternebrae* 4 und 5 gewonnenes Knochenmark ermöglichte unabhängig von den gewählten Punktionstiefen eine erfolgreiche Isolierung und Kultur von MSCs. Die Selbsterneuerungskapazität war bei Zugabe von standardisiertem Pferdeserum signifikant geringer als bei fetalem Kälberserum. Hinsichtlich der anderen Parameter unterschied sich der Effekt der Kulturmedien nicht. Bei zwei Proben war die Zellkultur in Gegenwart von autologem Serum nicht erfolgreich.

Fazit: Die Ultrasonographie ermöglicht eine gute Abschätzung der Dicke des Weichgewebes (Haut, Muskulatur), die das kaudale Brustbein überlagert, und die Festlegung einer Punktionsstelle im Zentrum der ventralen *Sternebra*-Oberfläche. Nach Durchdringen des Weichgewebes mit der Knochenmarkpunktionskanüle kann die Punktionstiefe am 5. Brustbeinsegment durch Messung und Markierung auf der Kanüle angemessen genau geplant werden. Bei der 4. *Sternebra* kommt es mit dieser Messme-



thode hingegen zu einer Verringerung der geplanten Punktionstiefe des knöchernen Anteils, da der deutlich dickere Knorpelüberzug die Kanüle aufgrund seines partiell knochenähnlichen Widerstandes verfrüht abbremst. Ultrasonographische Dickenmessungen der Knorpelschicht ermöglichen keine sichere Aussage über den Widerstand des Knorpels bei der Punktion. Das Abweichen von der orthogonalen Punktionsrichtung hat einen wesentlichen Einfluss auf die Punktionstiefe. Die Untersuchung zeigt, dass bei beiden *Sternebrae* eine geringe Penetrationstiefe des Brustbeines von ca. 10 mm zur MSC-Gewinnung ausreichend ist, wenngleich eine Tiefe von ca. 30 mm bei gleicher Sicherheit zuverlässiger ausreichende Knochenmarksvolumina liefert. Die 5. Sternebra ist aufgrund ihrer Kugelform und einer dünnen ventralen Knorpeloberfläche am besten für die Gewinnung von Knochenmark zur MSC Aufbereitung geeignet. Die Kultur und Expansion von MSCs war bei Nutzung von fetalem Kälberserum am effektivsten. Die Berücksichtigung dieser Ergebnisse trägt dazu bei, Brustbeinpunktionen zu vereinfachen, ihre Komplikationsrisiken zu senken und eine hohe Zellausbeute zu erzielen.

6.2 Lagerungsstabilität von Thrombozytenkonzentraten (Publikation 5, Anhang 13.5)

Hauschild, G.*, Geburek, F.*, Gosheger, G., Eveslage, M., Serrano, D., Streitbürger, A., Johannlückens, S., Menzel, D., Mischke, R. Short term storage stability at room temperature of two different platelet-rich plasma preparations from equine donors and potential impact on growth factor concentrations. *BMC Vet. Res.* 2017, 5. Jan.; 13 (1): 7.

*Geteilte Erstautorenschaft / Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit

Trotz des häufigen Einsatzes von thrombozytenreichem Plasma (PRP) in der Pferdeorthopädie, z.B. zur Behandlung von Tendopathien, ist das Wissen um die Bedeutung verschiedener Aufbereitungsverfahren und Anwendungsprotokolle bisher begrenzt. Im Hinblick auf eine möglichst flexible Anwendung von PRP ist dessen Lagerungsstabilität von Interesse. Ziel der Untersuchung war es, am equinen Modell die Lagerungsstabilität der Wachstumsfaktoren platelet derived growth factor BB (PDGF-BB) und transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) einerseits in einem einfach zentrifugierten („softspin“) leukozytenarmen Plasmaprodukt (autologous conditioned plasma, ACP®) und andererseits in einem gravitationsfiltrierten leukozytenreichen Thrombozytenkonzentrat (equine-platelet enhancement therapy, E-PET) über einen Zeitraum von 6 Stunden zu bestimmen und mögliche Einflussfaktoren auf die finale Wachstumsfaktorenkonzentration herauszuarbeiten.

Die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum bei beiden PRP Aufbereitungen stabil. Der Mittelwert betrug beim System E-PET für PDGF-BB 3569 pg/ml und war signifikant höher ($p = 0,03$) als beim ACP®. In diesem Substrat lag der Gehalt an PDGF-BB bei 1276 pg/ml und an TGF- β 1 bei 5086 pg/ml. Die Höhe des TGF- β 1-Gehaltes war im Thrombozytenkonzentrat *ad modum* E-PET aus vermutlich technischen Gründen zumeist unter der Nachweisgrenze und unterlag starken Schwankungen zwischen den Probanden, sodass diese Daten nicht ausgewertet wurden. Es bestand kein signifikanter Einfluss des Gehaltes an Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten im Vollblut der Probanden auf den Wachstumsfaktorengehalt in den Thrombozytenkonzentraten beider Herstellungsarten (Korrelationen nach Pearson). Im ACP® lag keine signifikante Abhängigkeit zwischen der Anzahl von Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten in der Präparation und dem Wachstumsfaktorengehalt vor. Eine Ausnahme bildete TGF- β 1, das eine starke positive Korrelation mit dem Leukozytengehalt im ACP® aufwies. Der PDGF-BB Gehalt des E-PET Konzentrates wies eine



starke positive Korrelation mit dem Gehalt an Thrombozyten und eine starke negative Korrelation mit den Leukozytenzahlen sowie keine Korrelation mit der Anzahl an Erythrozyten im Endprodukt auf.

Fazit: Die Thrombozytenkonzentrate *ad modum* E-PET und ACP® können bei Raumtemperatur mindestens 6 Stunden lang aufbewahrt werden, ohne dass es zu einem Abfall des Wachstumsfaktorengehaltes kommt. Der Wachstumsfaktorengehalt von Thrombozytenkonzentraten weist je nach Herstellungsverfahren deutliche Unterschiede auf. Ein einheitliches Muster von Abhängigkeiten zwischen den Produktkomponenten und den gemessenen Wachstumsfaktorkonzentrationen lässt sich vor dem Hintergrund dieser Studie nicht darstellen. Weitere standardisierte Untersuchungen sind erforderlich, um eindeutige Einflussgrößen auf die zu erreichenden Konzentrationen der Wachstumsfaktoren zu bestimmen.

6.3 Klinische Untersuchung, Bildgebung und Biopsie als Verfahren zur Nachverfolgung von Tendopathien bei lebenden Pferden (Publikationen 6, 7, 8, 9, 10; Anhang 13.6, 13.7, 13.8, 13.9, 13.10)

6.3.1 Klinische Untersuchung

Die Klinische Untersuchung von Tendopathien wurde zur Verlaufskontrolle von chirurgisch erzeugten Tendopathien (Publikation 7, Anhang 13.7) sowie natürlich entstandenen Läsionen der OBS (Publikation 9, Anhang 13.9; Publikation 10, Anhang 13.10) angewendet. Sie beinhaltete die visuelle Bestimmung des Lahmheitsgrades sowie die palpatorische Einschätzung der Hautoberflächenwärme im Bereich der OBS sowie der Druckempfindlichkeit und Umfangsvermehrung dieser Struktur. Es wurden etablierte Bewertungsschemata (Scores) verwendet (Schmidt 1989, Edinger 2010). Die Anwendbarkeit der Verfahren war für einen geübten Untersucher gut. Insgesamt kam es bei den natürlich erkrankten Pferden bis zu ca. 12 Wochen nach Diagnosestellung zu einer starken Reduktion der klinischen Entzündungsanzeichen. Bis dahin ermöglichte das Verfahren die Bestimmung unterschiedlicher Verläufe innerhalb der Gruppen. Danach war der diagnostische Wert geringer einzuschätzen. In einer Studie (Publikation 9, Anhang 13.9) nahm die klinisch ermittelte Umfangsvermehrung der OBS-Region ab, während sich der ultrasonographisch bestimmten Gesamtquerschnitt (T-CSA) der OBS nicht änderte. Dies weist auf eine Abnahme der Unterhautschwellung hin, da diese zwar bei der klinischen Untersuchung zwangsläufig mit erfasst wird, während sie bei der Sehnenquerschnittsmessung üblicherweise unberücksichtigt bleibt (Genovese et al. 1990).

Fazit: Die klinische Untersuchung bleibt trotz Verfügbarkeit von sensitiveren Verfahren (computerunterstützte Ganganalyse, Sehnenquerschnittsmessungen auf Basis bildgebender Verfahren, Messung des Mittelfußumfanges, Thermographie) ein einfach anwendbarer grundlegender Bestandteil der Untersuchung von Pferden mit Tendopathien. Der diagnostische Wert der klinischen Untersuchung ist zu Beginn der Sehnenerkrankung hoch. Die Palpation kann aufgrund ihrer Miterfassung des peritendinösen Gewebes insbesondere nach der Bestimmung des eigentlichen Sehnenquerschnittes mit bildgebenden Verfahren zur Einschätzung von Unterhautschwellungen herangezogen werden. Die klinische Untersuchung erlaubt nur begrenzte Rückschlüsse auf die Dauer und die Art des Sehnenschadens (zentral, diffus, randständig). Das Verfahren spielt für die langfristige Nachverfolgung und die Einschätzung von Rezidiven eine Rolle.



6.3.2 B-mode Ultrasonographie

Die B-mode Ultrasonographie wurde in einer tierexperimentellen Untersuchung (Publikation 7, Anhang 13.7) und in zwei Untersuchungen an natürlich erkrankten Patienten (Publikation 9, Anhang 13.9; Publikation 10, Anhang 13.10) angewendet. Anhand der Echotextur der Querschnittsbilder erfolgte bei den natürlich entstandenen Läsionen eine Einteilung der Sehnenschäden in diffuse, randständige sowie zentrale Läsionen (Kernläsionen). In allen Studien wurden in 7 Untersuchungsebenen u.a. etablierte Querschnittsmessungen der oberflächlichen Beugesehne (total cross sectional area, T-CSA) vorgenommen und etablierte Scores wie der Echogenitäts-Score (total echogenicity score, TES) sowie der Faserbündelparallelitäts-Score (total fibre alignment score, TFAS) genutzt.

Die Anwendbarkeit der Technik war gut. Die Einteilung der Sehnenschäden in Läsionstypen war in den meisten Fällen einfach. Die Querschnittsmessungen waren unter Inkaufnahme geringgradiger Unschärfen beim Umfahren der Sehne gut durchführbar, wenngleich kleine Unterschiede bei der Auswahl der Untersuchungsebenen zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten das Ergebnis beeinflussen können. Dieser Effekt wurde durch Summierung der Querschnittsflächen in den einzelnen Untersuchungsebenen abgeschwächt. Die Aussagekraft der Sehnenquerschnittsvermessung über den Verlauf der Sehnenerkrankung war in allen Untersuchungen gering. Die Vermessung der Sehnenschäden war nur eingeschränkt, d.h. bei klar demarkierten zentralen oder peripheren Läsionen möglich, trug dann aber zur Einschätzung des Heilungsverlaufes bei (Publikation 9, Anhang 13.9). Die angewendeten Scores zur Bestimmung der Faserbündelparallelität und der Echogenität unterlagen im Einzelfall einer erhöhten subjektiven Einschätzung. Dies traf insbesondere bei diffusen und stark ausgedehnten Schäden mit unterschiedlicher Echotextur zu einem Untersuchungszeitpunkt innerhalb des Sehnenschadens zu. Die Charakterisierung chirurgisch erzeugter Kernläsionen schwacher Ausprägung war mittels B-mode Ultrasonographie relativ ungenau, wobei der Faserbündelparallelitäts-Score einen höheren diagnostischen Wert als der Echogenitäts-Score aufwies. Es lag eine relativ starke Streuung der Score-Werte vor (Publikation 7, Anhang 13.7).

Fazit: Die tatsächliche Analyse der Sehnenintegrität ist mittels B-mode Sonographie nur eingeschränkt und indirekt möglich. Etablierte Scores stellen den Untersucher vor Entscheidungsschwierigkeiten. Querschnittsmessungen liefern ein präziseres Ergebnis, wenn die zu umfahrende Struktur klar demarkiert ist. Obwohl die Läsionstypen nur eingeschränkt Rückschlüsse auf das Alter und die Genese der Tendopathien zulassen, ermöglicht dieses Verfahren die Einordnung der eigenen Untersuchungsergebnisse in die Literaturangaben. Die B-mode Ultrasonographie ist zur Nachverfolgung dezent ausgeprägter chirurgisch erzeugter Läsionen wenig geeignet. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, die Ergebnisse mit einer sensitiveren Untersuchungstechnik abzugleichen.

6.3.3 Ultrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC)

Die ultrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC) kam in zwei tierexperimentellen Untersuchungen (Publikation 6, Anhang 13.6; Publikation 7, Anhang 13.7) am chirurgischen Sehnenmodell und in einer Untersuchung an natürlich erkrankten Patienten (Publikation 10, Anhang 13.10) zum Einsatz. Das Verfahren war unter Inkaufnahme einer Einarbeitung in die Technik und eines erhöhten Zeitaufwandes mit protrahierter Sedierung der Pferde gut anwendbar. In der tierexperimentellen Untersuchung mit UTC-basierter Verlaufskontrolle (Publikation 7, Anhang 13.7) waren die Sehnenschäden dezent ausgeprägt. Das Verfahren zeigte sehr gute Korrelationen verschiedener Messungen eines Untersu-



chers am selben Ultraschall-Scan (intra-observer reliability) sowie eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei der Bildanalyse durch 3 verschiedene Untersucher (inter-observer reliability). Durch Anpassung der Analysemethoden, d.h. durch Nutzung eines kreisrunden Analysewerkzeuges, das auf Querschnittsbildern in den Bereich des Sehnenschadens platziert wurde, war der prozentuale Anteil der 4 verschiedenen Echotypen im Bereich der Sehndefekte im zeitlichen Verlauf gut darstellbar. In der Untersuchung an natürlich erkrankten Patienten (Publikation 10, Anhang 13.10) wurde das Verfahren lediglich zu 3 Untersuchungszeitpunkten angewendet. Aufgrund einer naturgemäß heterogenen Echotextur der Sehnen in dieser Studie wurde eine Gruppierung der Echotypen I und II bzw. III und IV in „nicht-strukturbezogene Echos“ und „strukturbezogene Echos“ vorgenommen. Dadurch war ein unterschiedlicher Heilungsverlauf zwischen den Gruppen ablesbar.

Fazit: Der diagnostische Wert der UTC Untersuchung ist im Rahmen von Verlaufsuntersuchungen aufgrund der guten Reproduzierbarkeit und der Unterscheidbarkeit verschiedener Gewebetypen auch bei gering ausgeprägten Sehnenschäden hoch und übertraf in den durchgeführten Untersuchungen den der B-mode Ultrasonographie. Das Verfahren sollte in kontrollierten Untersuchungen an natürlich erkrankten Patienten mit Tendopathien während des Heilungsverlaufes trotz des etwas höheren Aufwandes hochfrequenter eingesetzt werden.

6.3.4 Farb-Doppler Untersuchung

Die Doppler Untersuchung wurde in einer tierexperimentellen Untersuchung verwendet (Publikation 8, Anhang 13.8), um die Entwicklung der Neovaskularisation als wichtiges Charakteristikum der Sehnenheilung zu überprüfen. Die Untersuchungstechnik wurde dahingehend weiterentwickelt und standardisiert, dass der Läsionsbereich der Sehne bei longitudinaler Anschallposition in einer definierten Entlastungsposition der Gliedmaße (Karpus ca. 80° gebeugt) mit der Ultraschallsonde von lateral über palmar nach medial im Doppler-Modus untersucht wurde. Dadurch wurde eine bewegte Bildsequenz (Loop) generiert. Nach Abschluss der Studie wurde daraus eine definierte Anzahl von Standbildern, die sich um den Bereich des stärksten Doppler-Signals scharen, für jeden Untersuchungszeitpunkt ausgewählt. Die Berechnung des Anteils mit positivem Doppler-Signal am Gesamtbild erfolgte mit einem frei verfügbaren digitalen Bildverarbeitungsprogramm. Das Verfahren war nach Einarbeitung gut anwendbar, die Auswertung des digitalen Bildmaterials war zeitaufwendig. Unmittelbar nach dem letzten Untersuchungszeitpunkt wurden die Pferde eingeschläfert, und es erfolgte eine histologische und immunhistologische Untersuchung (v.-Willebrand-Faktor) der Sehnen mit Quantifizierung aller Gefäßanschnitte durch Auszählung. Der Anteil von positivem Doppler-Signal am Gesamtbild zum letzten Untersuchungszeitpunkt korrelierte nicht mit der Anzahl der histologisch nachgewiesenen Gefäße. Dies weist grundsätzlich auf eine größere Sensitivität der feingeweblichen Untersuchung gegenüber der Doppler-Sonographie hin. Allerdings ist einerseits je nach Untersuchungsverfahren die Unterscheidung zwischen Blut- und Lymphgefäßen bei der Bestimmung des Grades der Neovaskularisation histologisch nicht immer sicher möglich. Andererseits unterliegt die Doppler-sonographische Bestimmung der Sehnenperfusion möglicherweise äußeren Einflüssen wie der Umgebungstemperatur und Position der Gliedmaße bei der Untersuchung.

Fazit: Im Vergleich zu vorangegangenen Studien konnte die Intensität des Doppler-Signales durch die Weiterentwicklung des Untersuchungsverfahrens stärker objektiviert und noch präziser erfasst werden. Die Untersuchungstechnik ist gut für die nicht-invasive Einschätzung der Perfusion von Tendopathien



geeignet. Die Ergebnisse können mit invasiveren Untersuchungsverfahren mit der feingeweblich nachweisbaren Anzahl von Blutgefäßen abgeglichen werden. Bei der Interpretation sind die spezifischen Besonderheiten der Untersuchungsverfahren zu berücksichtigen.

6.3.5 Feinnadel-Sehnenbiopsie und Histologie

Die Feinnadel-Sehnenbiopsie wurde in einer Studie an natürlich entstandenen Tendopathien (Publikation 9, Anhang 13.9) je nach Temperament und Kooperationsbereitschaft des Pferdes unter der Wirkung einer Oberlippenstrickbremse, in Sedierung oder durch Ruhigstellung mit beiden Maßnahmen angewendet. Die Pferde tolerierten die Maßnahme bei 78% der 51 durchgeführten Biopsie-Entnahmen ohne oder mit minimaler Abwehrreaktion, bei 18% der Biopsien wurde eine geringgradige und bei 4% eine mittelgradige Schmerzreaktion beobachtet. Eine starke Schmerzreaktion kam nicht vor (Lietzau 2014, unveröffentlichte Daten).

Bei den meisten Biopsieentnahmen trat an der Entnahmestelle keine (25%) oder eine geringgradige (59%) Blutung auf. Mittelgradige Blutungen entstanden bei 16% der Maßnahmen. Hochgradige Blutungen kamen nicht vor. Die Biopsieentnahme wurde durch die überwiegende Zahl der Tierbesitzer zunächst kritisch gesehen, nach Erläuterung der aus vorangegangenen Untersuchungen resultierenden guten Verträglichkeit jedoch akzeptiert (Wagels et al. 2001, Buck et al. 2002).

Vier von 51 Biopstaten waren für eine histologische Beurteilung der Sehne nicht verwertbar, da sie nur Haut und Unterhautgewebe enthielten. Beim immunhistochemischen Nachweis der Kollagentypen I und III wurde eine computergestützte morphometrische Auswertung der mit dem Chromogen markierten Anschnittfläche des Präparates vorgenommen, um die Auswertung zu objektivieren.

Fazit: Die Feinnadel-Sehnenbiopsie stellt ein wertvolles Diagnostikum dar, da sie grundsätzlich eine direkte Beurteilung der feingeweblichen Sehnenstruktur und sogar eine immunhistochemische Quantifizierung der Expression von Kollagentyp I und -III erlaubt. Auf Basis aktueller Literaturrecherchen handelt es sich um die erste Studie, in der die wiederholte Feinnadel-Sehnenbiopsie zur Verlaufskontrolle der Sehnenheilung über einen Zeitraum von 24 Wochen bei Pferden angewendet wurde. Das gewonnene Gewebevolumen ist jedoch gering, sodass die Anwendung weiterführender, z.B. molekularbiologischer Untersuchungen nicht ohne weiteres möglich ist. Eine Vorauswahl mit bildgebenden Verfahren ist erforderlich, um ein für den Sehnen Schaden repräsentatives Ergebnis zu erhalten. Die Wiederholbarkeit des Verfahrens ist begrenzt.

6.4 Wirkung einer einmaligen intraläsionalen Injektion kultivierter mesenchymaler Stromazellen aus Fettgewebe (AT-MSCs) auf die Heilung von chirurgisch erzeugten Läsionen der equinen oberflächlichen Beugesehne.

6.4.1 Verbleib von AT-MSCs nach intraläsionaler Injektion (Publikation 6, Anhang 13.6)

Geburek, F., Mundle K., Conrad, S., Hellige, M., Walliser, U., van Schie, H.T.M., van Weeren, R., Skutella, T., Stadler, P. Tracking of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells with *in vivo* magnetic resonance imaging and histology after intralesional treatment of artificial equine tendon lesions - a pilot study. *Stem Cell Res. Ther.* 2016, 1. Feb.; 7: 21.



Es herrscht Uneinigkeit darüber, welche Bedeutung MSCs nach der intraläsionalen Injektion im Rahmen der Sehnenheilung zukommt, denn Angaben zum Verbleib kultivierter AT-MSCs nach intraläsionaler Injektion in equine Sehnenläsionen waren zum Zeitpunkt der Studienplanung in der Literatur nur sehr begrenzt verfügbar. Das Ziel der Pilotstudie war es deshalb, den Verbleib von AT-MSCs nach Injektion in chirurgisch erzeugte Tendopathien der OBS zu verfolgen. Bei 4 Pferden (1-4 Jahre) wurde die oberflächliche Beugesehne jeweils einer Vordergliedmaße mit 10×10^6 autologen AT-MSCs behandelt, die zuvor durch ein lentivirales Plasmid mit grünem fluoreszierendem Protein (GFP) und bei 3 Pferden zusätzlich mit superparamagnetischen Eisenoxid (SPIO)-Partikeln markiert worden waren. Der Tierversuch wurde beim Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) angezeigt und dort registriert (Aktenzeichen 33.9-42502-04-08/1622). Niederfeld MRT Untersuchungen (0,27 Tesla) zum Nachweis der SPIO-Partikel erfolgten bei 2 Pferden im Stehen an den Tagen 6 und 33 bzw. 2, 18, 47, 62 nach der Behandlung. Die Pferde wurden gestaffelt 3, 5, 7 und 9 Wochen nach der Behandlung eingeschläfert. Die Sehnenläsionen wurden bei allen Pferden histologisch nach Preußisch-Blau Färbung sowie fluoreszenzmikroskopisch, mittels Immunfluoreszenz und immunhistochemisch nach Verwendung von anti-GFP Antikörpern untersucht.

Mit SPIO-Partikeln markierte AT-MSCs waren bei jeder MRT Untersuchung in T2*- und T1 gewichteten Sequenzen bis zum Ende der Beobachtungszeit von 9 Wochen im Läsionsbereich und in der Unterhaut detektierbar. Im Rahmen der postmortalen Untersuchungen an Gewebeproben waren im Bereich der Läsionen mit GFP und SPIO Partikeln markierte Zellen mit allen Modalitäten in großer Zahl nachweisbar.

Fazit: Niederfeld MRT Untersuchungen am stehenden Pferd haben das Potential, den Verbleib von SPIO-markierten AT-MSCs nachzuverfolgen. Lichtmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie, Immunfluoreszenz und Immunhistochemie sind effektive Methoden zum Nachweis markierter AT-MSCs in Gewebeproben von chirurgisch erzeugten OBS-Läsionen. Verschiedene Untersuchungsverfahren liefern übereinstimmend Hinweise darauf, dass eine intraläsionale Injektion von 10×10^6 AT-MSCs in chirurgisch erzeugte Sehnenläsionen zur Präsenz einer hohen Anzahl dieser Zellen in einem Zeitraum von bis zu 9 Wochen nach der Applikation führt. Die frühe Integration der injizierten AT-MSCs in die heilende Sehnenläsion ist wahrscheinlich ein entscheidender Mechanismus dieser Therapieform. Bei zukünftigen Untersuchungen sollte eine quantitative Bestimmung der feingeweblich und bildgebend erfassten Zellmarkierungen erfolgen. Es sollte eine Injektionstechnik ausgewählt werden, bei der ein Rückfluss des Zellsubstrates in die Unterhaut vermieden wird. Die *in vivo* Niederfeld MRT-Untersuchung ist als nicht-invasives Verfahren potentiell geeignet, um die Integration („homing“, „engraftment“) von AT-MSCs auch an Pferden mit natürlich entstandenen Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne zu überprüfen. Aus dieser vielversprechenden Pilotstudie ergaben sich Fragen nach den mittel- bis langfristigen Einflüssen einer AT-MSC-Behandlung auf klinische, bildgebende sowie biochemische und biomechanische Parameter der Sehnenheilung.



6.4.2 Effekte von AT-MSCs auf klinische, ultrasonographische, histologische, biochemische und biomechanische Parameter der Sehnenheilung (Publikation 7, Anhang 13.7)

Geburek, F.*, Roggel, F.* , van Schie, H. T. M., Beineke A., Estrada, R., Weber, K., Hellige, M., Rohn, K., Jagodzinski, M., Welke, B., Hurschler, C., Conrad, S., Skutella, T., van de Lest, C., van Weeren, R., Stadler, P. M. Effect of single intralésional treatment of surgically induced equine superficial digital flexor tendon core lesions with adipose-derived mesenchymal stromal cells (AT-MSCs) – a controlled experimental trial. *Stem Cell Res. Ther.* 2017, 5. Juni; 8 (1): 129.

*Geteilte Erstautorenschaft / Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit

Ziel der Untersuchung war die Prüfung des Einflusses einer einmaligen Injektion von autologen AT-MSCs auf den Heilungsverlauf chirurgisch erzeugter Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne und auf die Qualität des gebildeten Ersatzgewebes. Bei neun Pferden ohne vorberichtliche klinische und ultrasonographische Hinweise auf Tendopathien wurden chirurgische Läsionen der oberflächlichen Beugesehne beider Vordergliedmaßen gesetzt (Modell nach Schramme et al., 2010). Zwei Wochen danach wurden 10×10^6 autologe AT-MSCs, suspendiert in autologem inaktiviertem Serum (AT-MSC-Serum), oder es wurde nur autologes inaktiviertes Serum randomisiert unter Ultraschallkontrolle intralésional injiziert. Alle Pferde wurden einem kontrollierten Bewegungsprogramm unterzogen und regelmäßig klinisch, mittels B-mode Ultrasonographie sowie mit UTC untersucht und nach 24 Wochen eingeschläfert. Der Tierversuch wurde beim Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) angezeigt und dort registriert (Aktenzeichen 33.9-42502-04-08/1622). Nach Entnahme von geeignetem Probenmaterial aus den Sehnenläsionen sowie von makroskopisch unverändertem Gewebe proximal der Läsionen schlossen sich lichtmikroskopische Untersuchungen an mit Hämaulaun und Eosin gefärbten Paraffinschnitten unter Verwendung des Scores nach Aström u. Rausing (1995) sowie biochemische Untersuchungen und biomechanische Testungen an.

Die AT-MSC-Behandlung beeinflusste die klinische und ultrasonographische überprüfte Sehnenheilung nicht substantiell und nachhaltig. Nach 22 Wochen lag kein signifikanter Unterschied zwischen den histologischen, biochemischen und biomechanischen Eigenschaften des Reparaturgewebes in den verschiedenen behandelten Sehnen vor. Im Vergleich zu makroskopisch unverändertem Sehnenngewebe unterschied sich der Gehalt des an der Quervernetzung von Kollagen beteiligten Moleküls Hydroxylsypyrindinolin („cross-link“) nach AT-MSC-Serum-Behandlung nicht, während er im Läsionsgewebe nach alleiniger Serum-Behandlung signifikant geringer war. Die durchschnittliche Bruchspannung („stress at failure“) und der Elastizitätsmodul waren im Vergleich zu makroskopisch unverändertem Sehnenngewebe nach AT-MSC-Serum Therapie signifikant geringer (Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.05$).

Fazit: Eine einmalige intralésionale Injektion von kultivierten AT-MSCs, die in autologem inaktiviertem Serum suspendiert wurden, führt bei chirurgisch erzeugten OBS-Läsionen im Vergleich zu einer alleinigen Injektion von autologem inaktiviertem Serum in einem Beobachtungszeitraum von 22 Wochen nicht zu einer Beschleunigung der Abheilung und nicht zu einer nachhaltigen Verbesserung der Qualität des Ersatzgewebes. Die AT-MSC-Behandlung hat möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Quervernetzung („cross-linking“) von Kollagen und damit theoretisch auf die biomechanischen Eigenschaften von Narbengewebe, das sich noch in der Remodellierungsphase befindet. Kontrollierte Langzeituntersuchungen an Pferden mit natürlich entstandenen Tendopathien sind erforderlich, um diese Effekte einzuordnen und zu überprüfen. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Neovaskularisation von Seh-



nenschäden im Rahmen der Sehnenheilung erschien eine detaillierte Untersuchung dieses Phänomens am gleichen Untersuchungsgut sinnvoll.

6.4.3 Effekte von AT-MSCs auf die Perfusion und Neovaskularisation (Publikation 8, Anhang 13.8)

Conze, P., van Schie, H.T.M., van Weeren, R., Staszuk, C., Conrad, S., Skutella, T., Hopster, K., Rohn, K., Stadler, P., **Geburek, F.** Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions. *Regen. Med.* 2014, 9 (6): 743-757.

Ziel der Studie war es zu überprüfen, ob eine einmalige intraläsionale Behandlung von Sehnenläsionen mit AT-MSCs die Perfusion und Neovaskularisation während der Sehnenheilung beeinflusst. Bei 9 Pferden wurden standardisiert chirurgische Läsionen an den oberflächlichen Beugesehnen beider Vordergliedmaßen erzeugt. Der Tierversuch wurde beim Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) angezeigt und dort registriert (Aktenzeichen 33.9-42502-04-08/1622). Nach 2 Wochen wurden sie randomisiert mit 10×10^6 AT-MSCs oder autologem inaktiviertem Serum behandelt (Es handelte sich um dasselbe Probandengut wie in Publikation 7, Anhang 13.7). Im weiteren Verlauf erfolgten in regelmäßigen Abständen Farb-Doppler Untersuchungen. Zwei Wochen nach intraläsionaler Injektion der AT-MSCs war das Farb-Doppler-Signal signifikant ausgedehnter als bei den mit autologem Serum behandelten Kontrollsehnen. Histologische Untersuchungen der Sehnen 22 Wochen nach der Behandlung zeigten, dass die Anzahl aller Gefäßanschnitte in den AT-MSC behandelten Sehnen in mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Präparaten und nach immunhistochemischem Nachweis der gefäßassoziierten Expression des v.-Willebrand-Faktor (Faktor VIII) signifikant größer war als in den mit Serum behandelten Kontrollen. Bei einer Differenzierung zwischen kleinen und großen Gefäßanschnitten lag immunhistologisch (Faktor VIII) in der AT-MSC Gruppe ein signifikant höherer Anteil an großen Gefäßen als in der Serum-Gruppe vor, die Anzahl kleiner Gefäße unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Das Verhältnis zwischen kleinen und großen Blutgefäßen war nach AT-MSC-Behandlung signifikant größer als nach Injektion von Serum.

Fazit: Eine einmalige Injektion von AT-MSCs führt in der frühen Proliferationsphase der Sehnenheilung zu einer erhöhten Perfusion und in der späten Proliferations- und frühen Remodellierungsphase zu einer erhöhten Neovaskularisation von chirurgisch erzeugten Sehnenläsionen. Eine verstärkte Durchblutung von Sehnen lässt die Schlussfolgerung einer verbesserten Sehnenheilung in den frühen Phasen des Abheilungsprozesses zu. Die mittels Doppler-Ultrasonographie festgestellte Perfusionsintensität der Sehne korreliert nicht notwendigerweise mit der Anzahl der histologisch und immunhistochemisch nachgewiesenen Gefäßanschnitte. Eine über den Beobachtungszeitraum hinausreichende, langfristig erhöhte Vaskularisation von Ersatzgewebe wird im Heilungsprozess von Tendopathien eher kritisch gesehen.

6.5 Effekte einer einmaligen intraläsionalen Injektion von autologem konditioniertem Serum (ACS) auf den Heilungsverlauf natürlich entstandener Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne (Publikation 9, Anhang 13.9)

Geburek, F., Lietzau, M., Beineke, A., Rohn, K., Stadler, P.M. Effect of a single injection of autologous conditioned serum (ACS) on tendon healing in equine naturally occurring tendinopathies. *Stem Cell Res. Ther.* 2015, Jun 26; 6 (1): 126.



Autologes konditioniertes Serum wird *in praxi* regelmäßig zur Behandlung von Tendopathien und Bandenerkrankungen bei Pferden eingesetzt (Weinberger 2008, Textor 2011). Grundlage dafür bilden der Gehalt des Substrates an entzündungshemmenden und -modulierenden Zytokinen wie z.B. IL-1Ra und an Wachstumsfaktoren wie z.B. IGF-1 (Hraha et al. 2011) und die Hinweise auf positive Beeinflussung von Gelenkerkrankungen (Frisbie et al. 2007). Zum Effekt von ACS auf Sehnenläsionen von Pferden war in der Literatur keine kontrollierte Untersuchung zu finden. Deshalb sollte in einer Studie überprüft werden, welche Wirkung eine einmalige intraläsionale Injektion von ACS in natürlich entstandene und vorberichtlich bis zu 2 Wochen lang bestehende OBS-Schäden auf klinische, ultrasonographische und feingewebliche Parameter hat. Der Tierversuch wurde beim Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) angezeigt und dort registriert (Aktenzeichen 33.9-42502-05-09A652); alle Tierbesitzer erklärten sich mit dem Studiendesign einverstanden. Fünfzehn Pferde mit 17 natürlich entstandenen Tendopathien (Vorderhand) wurden klinisch und mittels B-mode Ultraschall untersucht. Das durchschnittliche Alter der Pferde lag bei 8,46 Jahren (2-19 Jahre). Bei der Erstuntersuchung wurden insgesamt 7 zentrale, 5 randständige und 5 diffuse OBS-Läsionen festgestellt. Die erkrankten Sehnen wurden zufällig einer ACS-behandelten Gruppe, die eine einmalige ACS Injektion erhielt (n = 10), und einer Kontrollgruppe zugeordnet (n = 7), die unbehandelt blieb oder eine einmalige intraläsionale Injektion mit Kochsalzlösung erhielt. Alle Pferde wurden einem standardisierten Bewegungsprogramm unterzogen und 9 Mal in regelmäßigen Abständen bis zum Tag 190 nach Therapie klinisch und mittels Ultraschall nachuntersucht. An den Tagen 0, 36 und 190 wurden Feinnadelbiopate aus den Beugesehnen entnommen und pathohistologisch sowie immunhistochemisch hinsichtlich der Expression der Kollagentypen I und III untersucht. Die klinischen Untersuchungsparameter unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt zwischen den Gruppen. Der Lahmheitsgrad sank in der mit ACS behandelten Gruppe innerhalb der ersten 10 Tage nach der Behandlung signifikant ab ($p = 0.046$), während der Lahmheitsgrad der Gliedmaßen, die als Kontrolle dienten, bis zum Tag 36 signifikant abnahm ($p = 0.021$). Die Umfangsvermehrung der Sehne nahm zwischen Tag 50 und 78 nach ACS-Therapie signifikant ab ($p = 0.005$), während sie sich bei den Kontrolltieren statistisch nicht änderte. Ultrasonographisch (B-mode) war der Anteil der Läsion an der Sehnenquerschnittsfläche in der ACS-Gruppe zu den Untersuchungszeitpunkten 78 und 106 Tage nach Behandlung signifikant geringer ($p < 0.05$) und die Echogenität der Läsionen war signifikant höher ($p < 0.05$) als bei den Kontrollsehnen. Die histologischen Untersuchungen zeigten bei den ACS behandelten Sehnen in der Feinnadelbiopsie an Tag 36 eine spindelförmigere Morphologie der Zellkerne als in der Kontrollgruppe. Immunhistochemische Untersuchungen der Biopate lieferten Hinweise auf einen Anstieg der Kollagentyp I Expression zwischen Tag 36 und Tag 190 nach ACS-Injektion.

Fazit: Die Untersuchung liefert Hinweise darauf, dass eine einmalige Injektion von autologem konditioniertem Serum in natürlich entstandene Läsionen der OBS zu einer frühen Lahmheitsreduktion und zur Verbesserung ultrasonographischer Parameter während der Proliferations- und frühen Remodellierungsphase beiträgt. Autologes konditioniertes Serum führt möglicherweise zu einer reduzierten Proliferation von Tenozyten 5 Wochen nach Behandlung und zu einem Anstieg der Kollagentyp I Expression in der Remodellierungsphase, die Ausdruck einer gesteigerten Differenzierung von Sehnenzellen sein könnte. Bei zukünftigen Untersuchungen sollte überprüft werden, ob es durch frühere und häufigere Injektionen von ACS zu einer Verstärkung der beobachteten Effekte kommt.



6.6 Effekte einer einmaligen intraläsionalen Injektion von thrombozytenreichem Plasma (PRP) auf den Heilungsverlauf natürlich entstandener Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne (Publikation 10, Anhang 13.10)

Geburek, F., Gaus, M., van Schie, H.T.M., Rohn, K., Stadler, P.M. Effect of intralésional platelet-rich plasma (PRP) treatment on clinical and ultrasonographic parameters in equine naturally occurring superficial digital flexor tendinopathies – a randomized prospective controlled clinical trial. *BMC Vet. Res.* 2016, 7. Sep., 12 (1): 191.

Aufgrund des hohen Gehaltes an Wachstumsfaktoren wird der Effekt von thrombozytenreichem Plasma und anderen Thrombozytenkonzentraten auf Sehnerkrankungen intensiv im Rahmen von experimentellen und klinischen Studien bei Menschen und Tieren mit teilweise kontroversen Ergebnissen untersucht. So wurde z.B. nach der Behandlung chronischer Tendopathien der menschlichen Achilles-Sehne mit PRP in einer Placebo-kontrollierten Doppel-Blindstudie kein überlegener Effekt einer einmaligen PRP-Injektion nachgewiesen (de Vos et al. 2010). In einer tierexperimentellen Untersuchung am chirurgischen Sehnenmodell (OBS) bei Pferden wurde nach PRP-Behandlung neben besseren histologischen und biochemischen Parametern, einem erhöhten Kollagen- und Glykosaminoglykangehalt auch ein höherer Elastizitätsmodul und eine Überlegenheit bei der maximalen biomechanischen Belastbarkeit der Sehnen im Vergleich zur Placebo-Behandlung gezeigt. Zudem werden Thrombozytenkonzentrate im klinischen Alltag regelmäßig zur Behandlung von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden eingesetzt. Daraus ergab sich die Notwendigkeit zur Durchführung einer in der Literatur nicht verfügbaren kontrollierten, randomisierten Untersuchung zur Wirkung von PRP auf natürlich entstandene Tendopathien bei Pferden.

Ziel der Studie war es, den Effekt einer einmaligen intraläsionalen Behandlung von vorberichtlich bis zu 8 Wochen lang bestehenden OBS-Läsionen auf klinische und ultrasonographische Parameter zu untersuchen. Der Tierversuch wurde beim Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) angezeigt und dort registriert (Aktenzeichen Az. 33.9-42502-05-12A230); alle Tierbesitzer erklärten sich mit dem Studiendesign einverstanden. Zwanzig Pferde (Alter 4-21 Jahre, \varnothing 8,46) mit einer bis zu 8 Wochen bestehenden gedeckten Tendopathie der oberflächlichen Beugesehne einer Vordergliedmaße wurden klinisch und ultrasonographisch untersucht. Es wurden insgesamt 3 zentrale, 11 randständige und 6 diffuse OBS-Läsionen festgestellt. Alle Pferde wurden zufällig einer PRP-Gruppe (n = 10) oder einer Kontrollgruppe (n = 10) zugeteilt. Sehnen der PRP-Gruppe wurden im Bereich der maximalen Ausdehnung des Sehnen Schadens an Tag 0 intraläsional unter Ultraschallkontrolle mit autologem PRP (Osteokin[®], Fa. Orthogen, Düsseldorf) behandelt. Sehnen der Kontrollgruppe erhielten eine äquivalente Behandlung mit steriler Kochsalzlösung. Alle Pferde wurden dem gleichen kontrollierten Bewegungsregime unterzogen und klinisch, mittels B-mode Sonographie (5 x in regelmäßigen Abständen) und mittels ultrasonographischer Gewebecharakterisierung, UTC (Tag 0, Woche 12 und Woche 24 nach Behandlung) untersucht. Die langfristige Entwicklung der Pferde 12 und 24 Monate nach der Behandlung wurde durch telefonische Tierbesitzerbefragungen ermittelt

Die klinischen Untersuchungsparameter unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt zwischen den Gruppen. Der Lahmheitsgrad nahm in der PRP behandelten Gruppe bis zur 8. Woche und in der Kontrollgruppe bis zur Woche 12 nach Behandlung signifikant ab. Nach 6 Monaten waren noch zwei Pferde in der PRP-Gruppe und eines in der Kontrollgruppe lahm. Der Grad der Hautoberflächenwärme sank nach PRP-Behandlung bis zur 4. Woche und nach Placebo-Injektion bis zur 8. Woche signifikant ab. Mittels B-mode Ultrasonographie ergaben sich hinsichtlich der Querschnittsflächen der Sehnen zu keinem



Zeitpunkt Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Echogenität der Läsionen (durchschnittlicher Echogenitäts-Score, ES) und der Anteil paralleler Echos (Faserbündel-Parallelitäts-Score, FAS) waren während des gesamten Untersuchungszeitraumes signifikant oder tendenziell geringer als in der Kontrollgruppe. Die ultrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC) zeigte, dass Echotypen, die unorganisierte Gewebematrix abbilden (Typ III und IV), in der PRP-Gruppe kontinuierlich über den Beobachtungszeitraum abnahmen. Der Anteil von Typ II-Echos, die noch nicht in Zugrichtung ausgerichtete diskontinuierliche Faszikel wiedergeben, war 24 Wochen nach PRP-Behandlung signifikant höher als nach Placebo-Behandlung. Dies ging mit einer signifikanten Zunahme des Echo-Typs I und mit einer signifikanten Verringerung des Echo-Typs III zwischen Woche 12 und 24 einher, die nur in der PRP-Gruppe beobachtet wurden. Daraus lässt die schlussfolgern, dass es nach PRP-Behandlung zu einer Umwandlung von Gewebe, das mit dem Echo-Typ III belegt ist, in Echo-Typ II Gewebe gekommen ist. Achtzig Prozent der PRP-behandelten Pferde erreichten nach 12 Monaten ihr vorheriges Leistungs-niveau, verglichen mit 50% in der Kontrollgruppe. Nach 24 Monaten lag das Verhältnis bei 60% bzw. 50%, bezogen auf die Anzahl der zu Beginn behandelten Pferde.

Fazit: Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung liefern Hinweise darauf, dass eine einmalige intraläsionale PRP-Behandlung von natürlich entstandenen Läsionen der OBS mit einer vorberichtlichen Dauer von bis zu 8 Wochen im Vergleich mit einer Placebo-Behandlung zu einer früheren Reduktion der Lahmheit führt. Injektionen mit PRP tragen im Zeitrahmen des Umbaues der fibrillären Sehnenmatrix zu Faszikeln zu einer nur mittels UTC nachweisbaren verbesserten Organisation des Ersatzgewebes bei, während die Remodellierung 6 Monate nach Behandlung noch nicht abgeschlossen ist. Nach einer einmaligen PRP-Injektion erreichen nach 12 Monaten mehr Pferde ihr vorheriges Leistungsniveau als nach Placebo-Behandlung. In weiteren Untersuchungen sollte eine frühere Behandlung angestrebt werden, um die beobachteten Effekte zu verstärken. Eine häufigere Untersuchung mittels UTC wäre sinnvoll.

7 Studienübergreifende Diskussion

7.1 Optimierung der Brustbeinpunktion zur Gewinnung von BM-MSCs

Knochenmark wurde bereits in den ersten Fallserien zur Wirkung von MSCs auf equine Tendopathien als Ausgangsgewebe genutzt (Smith et al. 2003). Das Brustbein ist beim Pferd nach wie vor ein häufig zur Knochenmarkentnahme genutzter anatomischer Bereich (Kasashima et al. 2011). Die eigenen Untersuchungen zeigen eine größere Einheitlichkeit der Anatomie des Sternums bei Pferden, als ältere Literaturangaben vermuten ließen (Nickel et al. 1992). Es erscheint sinnvoll, die Segmente des equinen Sternum einheitlich in kranio-kaudaler Richtung mit 1-7 zu nummerieren, da die aus der Humanmedizin übernommene deskriptive Bezeichnung *Manubrium* für das erste, kranial gelegene Brustbeinsegment morphologisch bei Pferden nicht angemessen ist. Zwangsläufig trägt dies auch zur Vereinheitlichung der in der Literatur bislang z.T. variierenden Angaben zur Eignung von Brustbeinsegmenten für die Punktion bei. In diesem Kontext ist bemerkenswert, dass die beiden kaudal gelegenen *Sternebrae* 6 und 7 bei den untersuchten Warmblutpferden stets fusioniert waren. Dadurch können diese Segmente insbesondere ohne vorherige ultrasonographische Kontrolle versehentlich als eine einzige *Sternebra* angesprochen werden und z.B. unbeabsichtigte Punktionen einer weniger geeigneten *Sternebra* oder außerhalb des *Sternum* erfolgen (Durando et al. 2006). Die transkutane Ultrasonographie ermöglicht eine gute Ansprache und Abgrenzung der Brustbeinsegmente sowohl in kranio-kaudaler Richtung als auch in Bezug auf die Ermittlung der Mittellinie und der Punktionstiefe bis zum knöchernen Anteil (Desevaux et al. 2000) und trägt so in hohem Maße zur Vermeidung von Fehlpunktionen bei (Publikationen 3, 4) (Kasashima et al. 2011).

Die eigenen Untersuchungen bestätigen (Kasashima et al. 2011) erstmals auf Basis computertomographischer Untersuchungen die beste Eignung der *Sternebrae* 4 und 5 für die Brustbeinpunktion aufgrund ihrer Kugelform und ihres großen Volumen (Publikation 3). Bei weiterer Differenzierung (Publikation 4) wurde mittels Ultraschall und CT an der 4. eine im Vergleich zur 5. *Sternebra* durchschnittlich deutlich dickere Knorpelschicht nachgewiesen, die trotz sorgfältiger Punktionsplanung aufgrund ihrer teilweise knochenähnlichen Konsistenz zu einer bis zu ca. 1 cm geringeren Punktionstiefe als vorgesehen führte. Eine Unterschätzung der mit zunehmendem Alter abnehmenden Dicke der ventralen Knorpelschicht wird die in der Literatur in einem dokumentierten Fall von Pneumopericard nach Brustbeinpunktion als möglicher Grund für eine Fehleinschätzung der Punktionstiefe aufgeführt (Durando et al. 2006). Dies unterstreicht einerseits die große Bedeutung einer prae-interventionellen Einschätzung der Knorpeldicke mittels Ultraschall im klinischen Bereich und belegt, dass die 5. *Sternebra* aufgrund ihres geringen ventralen Knorpelüberzuges bei erwachsenen Warmblutpferden eine präzisere Steuerung der gewünschten Punktionstiefe ermöglicht. Es bestätigte sich zudem, dass ein Abweichen von der zur Ventralfläche des Brustbeines orthogonalen Stichrichtung tendenziell zu Verringerungen der geplanten Stichkanallänge im Knochen führt.

Eine intraosseäre Punktionstiefe der 5. *Sternebra* zwischen 10 und 30 mm lieferte zuverlässig ausreichende Knochenmarksvolumina für die Kultur von BM-MSCs (Publikation 4), wobei eine Tiefe von ca. 10 mm diesbezüglich keine Nachteile mit sich brachte und deshalb als ausreichend angesehen werden kann. Aufgrund einer durchschnittlichen geometrischen Mitte der *Sternebra* 5 von $27,3 \pm 3,7$ mm und einer durchschnittlichen maximalen Dicke von ca. 52 mm bei Warmblutpferden ist eine Punktionstiefe von 30 mm unkritisch und bietet auch bei Abweichungen von dieser Tiefe noch ausreichende Sicherheit. Die in der Literatur für Vollblutpferde angegebenen durchschnittlichen Dicken der *Sternebrae* 4 und



5 in der Medianlinie liegen mit 6,2 mm bzw. 4,8 mm (Kasashima et al. 2011) leicht unter den eigenen Ergebnissen (Warmblutpferde), sodass bei leichteren Großpferden eine maximale Punktionstiefe des *Sternum* von 1-2 cm empfohlen wird (Kasashima et al. 2011).

Das Auftreten iatrogenen kardialer Arrhythmien wurde bei Knochenmarkaspirationen aus den *Sternebrae* 4 und 5 nicht beobachtet. In einer anderen tierexperimentellen Untersuchung an Pferden wurde dieses Phänomen bei Aspirationen in Allgemeinanästhesie aus der 6. *Sternebra*, die in der eigenen Untersuchung nicht punktiert wurde, regelmäßig und signifikant häufiger als bei der Punktion des 3., 4. und 5. Brustbeinsegmentes festgestellt. Die Autoren schließen das Auftreten von Arrhythmien als mögliche Ursache für anekdotenhafte Berichte über plötzliche Todesfälle bei der Brustbeinpunktion an stehenden Pferden nicht aus (Ishihara et al. 2013). Dies weist neben den morphologischen Vorteilen ebenfalls auf eine bessere Eignung der 5. *Sternebra* für die Knochenmarkaspiration hin.

7.2 Lagerungsstabilität von Thrombozytenkonzentraten

Thrombozytenkonzentrate wie z.B. thrombozytenreiches Plasma (platelet-rich plasma, PRP) werden aufgrund der relativ einfachen und günstigen Herstellungsverfahren häufiger als kultivierte MSCs bei regenerativen Therapieansätzen verwendet. Es liegen jedoch nur begrenzte Informationen zu den Unterschieden zwischen Herstellungsverfahren von Thrombozytenkonzentraten (Hessel et al. 2015) und zu anderen Einflussfaktoren (Giraldo et al. 2013) auf ihre Zusammensetzung sowie ihrer Lagerungsstabilität vor. Die Thrombozytenkonzentrate *ad modum* E-PET und ACP® können bei Raumtemperatur mindestens 6 Stunden lang aufbewahrt werden, ohne dass es zu einem Abfall des Wachstumsfaktorengehaltes kommt (Publikation 4). Dies steht im Einklang mit den wenigen Literaturangaben zur Lagerungsstabilität von Thrombozytenkonzentraten und darin enthaltener Wachstumsfaktoren (Anitua et al. 2015), widerspricht jedoch einigen Empfehlungen zur sofortigen Anwendung von PRP nach seiner Herstellung (Engebretsen et al. 2010). Eine mehrstündige Lagerungsstabilität vereinfacht die Anwendung in der kurativen Praxis und im klinischen Umfeld, nicht zuletzt vor dem Hintergrund einer zeitversetzten prae- oder intra-operativen Herstellung.

Das Vollblut zur Herstellung der Thrombozytenkonzentrate wurde in der eigenen Untersuchung in Allgemeinanästhesie gewonnen, um die Bedeutung dieser im Klinikbereich relevanten Ausgangsvoraussetzung bei der PRP-Herstellung zu beleuchten. Der Gehalt des Vollblutes an Thrombozyten und Leukozyten sowie Erythrozyten war erwartungsgemäß signifikant geringer als in Vollblut stehender, nicht-sedierter Pferde (Kullmann et al. 2014), jedoch befanden sich die Zellgehalte noch im Referenzbereich, sodass die Bedeutung der Zellreduktion als wenig bedeutsam eingestuft wurde.

Die durchschnittliche Thrombozytenkonzentration lag beim System E-PET 2,7-fach über der des Vollblutes und war damit deutlich geringer als in vorangegangenen Studien, in denen eine 3,2-3,69-fache Konzentration gegenüber Vollblut beschrieben wird (Textor et al. 2013, Hessel et al. 2015). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass der Gehalt an PDGF-BB trotzdem ähnlich hoch war (Textor et al. 2013). Als möglicher Einflussfaktor auf den Thrombozytengehalt kommt die Gewinnung des Vollblutes in Allgemeinanästhesie in Betracht. Es konnte jedoch keine überzeugende Abhängigkeit zwischen den Thrombozytenggehalten im Vollblut (Narkose) einerseits und der Thrombozytenzahl bzw. dem PDGF-BB Gehalt im Konzentrat *ad modum* E-PET andererseits festgestellt werden, sodass ein Einfluss der Allgemeinanästhesie auf den Wachstumsfaktorengehalt fraglich bleibt und zusätzlich individuelle Faktoren in Betracht gezogen werden müssen. Der Thrombozyten-, Leukozyten- und Erythrozytengehalt im Vollblut korrelierte nicht mit dem Wachstumsfaktorengehalt in den untersuchten Thrombozytenkonzentraten. Hinsichtlich der Thrombozyten steht dies im Einklang mit vorherigen Beobachtungen an Menschen



(Zimmermann et al. 2001, Weibrich et al. 2002). Es wird vermutet, dass andere biologische Faktoren den individuellen Wachstumsfaktorengehalt (mit-) beeinflussen können (Weibrich et al. 2002). Im Gegensatz dazu wurde in einer Untersuchung an Pferdeblut, aus dem mit verschiedenen Methoden Thrombozytenkonzentrate hergestellt wurden, eine positive Korrelation zwischen dem Thrombozytengehalt im Vollblut und dem Gehalt an TGF- β 1 in den Endprodukten festgestellt, obwohl einzelne Proben Abweichungen davon aufwiesen (Sutter et al. 2004).

Im ACP® wurde außer einer positiven Korrelation der weißen Blutzellen mit der TGF- β 1 Konzentration, die mit vorangegangenen Untersuchungen übereinstimmt (Sutter et al. 2004), kein Einfluss der Thrombozyten-, Leukozyten- und Erythrozytenzahl auf den Wachstumsfaktorengehalt festgestellt. Der PDGF-BB Gehalt des Thrombozytenkonzentrates E-PET korrelierte hingegen positiv mit seinem Thrombozyten- und negativ mit dem Leukozytengehalt, jedoch nicht mit dem Erythrozytengehalt. Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass das Herstellungsverfahren einen Einfluss auf die Korrelation zwischen Zellzahlen im Endprodukt und seinem Wachstumsfaktorengehalt haben könnten (Sutter et al. 2004).

Der Zell- und Wachstumsfaktorengehalt der untersuchten Thrombozytenkonzentrate unterlag interindividuellen Schwankungen, die insbesondere beim System E-PET stark ausgeprägt waren. Ursächlich ist neben individuellen Einflüssen wie Tieralter, Rasse, Geschlecht (Giraldo et al. 2013) auch das Herstellungsverfahren zu berücksichtigen (Textor et al. 2011). Der beim System E-PET erforderliche Rückspülprozess aus dem Filter könnte in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein. Weitere mögliche Einflussfaktoren sind vielfältig (Sutter et al. 2004, Textor et al. 2011) und erfordern zusätzliche standardisierte Untersuchungen. Es erscheint sinnvoll, die Lagerungsstabilität und Einflussfaktoren auf den Wachstumsfaktorengehalt für weitere häufig eingesetzte Systeme individuell zu überprüfen.

Die TGF- β 1 Konzentrationen im E-PET Konzentrat waren aus technischen Gründen zumeist unter der Nachweisgrenze, sodass für diesen Parameter keine Ergebnisse erarbeitet werden konnten. Die Bildung bräunlicher Präzipitate im ELISA-Kit legen die Vermutung eines Einflusses des im Gegensatz zu zentrifugationsbasierten Thrombozytenkonzentraten relativ hohen Gehaltes an Erythrozyten im E-PET Endprodukt nahe.

7.3 Methoden der Verlaufskontrolle von Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne

Die klinische Untersuchung war unter Nutzung etablierter Scores in der vorliegenden Arbeit gut durchführbar. Durch den in den eigenen Arbeiten erfolgten Abgleich der klinischen Umfangsvermehrung der palmaren Mittelfußregion mit den Sehnenquerschnittsmessungen auf der Basis von B-mode Ultraschallbildern (Publikationen 6, 9, 10) ergaben sich in einer Untersuchung (Publikation 9) Hinweise auf eine abnehmende klinische Schwellung bei gleichbleibender ultrasonographischer Umfangsvermehrung (T-CSA) der OBS. Diese Diskrepanz kann daraus resultieren, dass bei der klinischen Untersuchung auch die Unterhautschwellung mit einbezogen wird, während bei den Vermessungen am Ultraschallbild nur die Sehne umfahren wird. Eine geringere Sensitivität der klinischen Untersuchung muss ebenfalls in Betracht gezogen werden. Vor diesem Hintergrund hätten auch andere Parameter durch sensitivere Verfahren wie Thermographie (Turner 1991), Messung des Mittelfußumfanges (Boehart et al. 2010) und computerunterstützte Ganganalyse ergänzt bzw. ersetzt werden können. Diese Verfahren standen nicht zur Verfügung, und ihre Verwendung hätte wahrscheinlich keinen entscheidenden Einfluss auf das Gesamtergebnis gehabt.

Zusammenfassend ist die klinische Untersuchung ein einfach anwendbarer grundlegender Bestandteil der Untersuchung von Pferden mit Tendopathien. Das Verfahren erlaubt nur begrenzte Rückschlüsse



auf die Dauer und die Art des Sehnenschadens (Jorgensen et al. 2011). Bei Verlaufsuntersuchungen natürlicher Tendopathien besitzt die klinische Untersuchung in den ersten ca. 12 Wochen nach Diagnosestellung einen hohen diagnostischen Wert (Publikationen 9, 10). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Tendopathien seit mindestens 2 (Publikation 9) bzw. 8 Wochen (Publikation 10) bestanden hatten. Die Druckdolenz erwies sich in einer der Untersuchungen am chirurgischen Sehnenmodell (Publikation 7) als wenig reproduzierbar. Als möglicher Grund wird die relativ enge zeitliche Taktung der Untersuchungen und eine damit verbundene Sensibilisierung der Probanden angegeben (Roggel 2013). Zudem ist es nicht auszuschließen, dass bei der Palpation an der aufgehobenen Gliedmaße die Schmerzhaftigkeit des Sehnenschadens der kontralateralen Seite durch die Mehrbelastung zunimmt (Jorgensen et al. 2011).

Die B-mode Ultrasonographie war gut durchführbar und mit den verfügbaren Geräten wurden in allen Untersuchungen Bilder von guter bis sehr guter Qualität erzeugt. Wenngleich die B-mode Ultrasonographie ein Standardverfahren zur Diagnostik von Tendopathien darstellt, war die tatsächliche Wiedergabe der Sehnenintegrität mittels B-mode Sonographie nur eingeschränkt und indirekt möglich (van Schie et al. 1999). Etablierte Scores (FAS, ES) stellten die Untersucher vor Entscheidungsschwierigkeiten. Querschnittsmessungen lieferten ein verlässlicheres Ergebnis, weil die zu umfahrende OBS zumeist gut demarkiert war. Der Wert von Sehnenquerschnittsmessungen war jedoch in der vorliegenden Arbeit zur Verlaufskontrolle subakuter natürlicher Sehnenerkrankungen eher gering (Publikationen 9, 10). In der Literatur werden sie zur Früherkennung von Tendopathien empfohlen (Jorgensen et al. 2011). Die Querschnittsmessungen waren dementsprechend im zeitlichen Verlauf der ersten 4 Wochen nach chirurgischer Erzeugung von Tendopathien aussagekräftiger (Publikation 7). In der tierexperimentellen Untersuchung mit Verlaufskontrolle fiel die Abgrenzung der Läsion von ihrer Umgebung, insbesondere zu Beginn und zum Ende der Untersuchung aufgrund der relativ geringen Größe der Läsionen schwer (Roggel 2013), sodass auf Vermessungen der Querschnittsfläche der Schäden, die zur Berechnung des Anteils der Läsion am Sehnenquerschnitt genutzt werden kann (Publikation 9) (Rantanen et al. 2003), verzichtet wurde. Obwohl die Zuordnung zu Läsionstypen (zentrale, diffuse, randständige Läsion) nur eingeschränkt Rückschlüsse auf das Alter und die Genese der Tendopathien zulassen (Tipton et al. 2013), ermöglicht dieses Verfahren die Einordnung der eigenen Untersuchungsergebnisse in die Literaturangaben. Es zeigte sich zusammenfassend, dass die B-mode Ultrasonographie insbesondere zur Nachverfolgung diffuser natürlicher und dezent ausgeprägter chirurgisch erzeugter Läsionen wenig geeignet ist. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, die Ergebnisse mit einer sensitiveren Untersuchungstechnik abzugleichen.

Der diagnostische Wert der UTC Untersuchung war im Rahmen von Verlaufsuntersuchungen aufgrund der guten Reproduzierbarkeit und der Unterscheidbarkeit verschiedener Gewebetypen auch bei gering ausgeprägten chirurgisch erzeugten Sehnenschäden (Publikation 7) und bei natürlich entstandenen und demgemäß heterogenen chronischen Tendopathien (Publikation 10) hoch und übertraf in Übereinstimmung mit Literaturangaben den der B-mode Ultrasonographie (van Schie et al. 2001). Im Gegensatz zu vorangegangenen Arbeiten, in denen die Echotypen im Bereich des gesamten Sehnenquerschnittes erfasst wurden (Bosch et al. 2011, Cadby et al. 2013), erwies sich dieses Vorgehen aufgrund der relativ dezenten Sehnenschäden in der tierexperimentellen Arbeit (Publikation 7) als ungeeignet, sodass stattdessen ein verschiebbares kreisförmiges Analysewerkzeug digital in bzw. um die Läsionen gelegt wurde (Roggel 2013). Die Echotypen innerhalb des Kreises wurden zur Analyse herangezogen. Dieses Vorgehen stellt eine neue Variante bei der Auswertung von UTC-Daten dar und lieferte für alle Echotypen zeitliche Verläufe, die gut interpretierbar waren und eine gute Einordnung der Befunde in die Litera-



turendergebnisse ermöglichten. Aufgrund der im Vergleich zur B-mode Ultrasonographie aufwendigeren Vorgehensweise (Einarbeitung, tiefe Sedierung der Pferde, Wiederholung von Scans bei Bewegungsartefakten) erfolgte in der Untersuchung am natürlich erkrankten Patienten (Publikation 10) lediglich eine Untersuchung zu drei Zeitpunkten, die trotzdem - insbesondere am Ende des Beobachtungszeitraumes - einen genaueren Einblick in die Entwicklung der Sehnenintegrität lieferte als der B-mode Ultraschall. Obwohl die Streuung der Werte durch die Einbeziehung unterschiedlicher Läsionstypen und -größen bei beiden Modalitäten relativ groß war, lieferte der B-mode Ultraschall insbesondere beim Echogenitäts-Score ein deutlich weniger aussagekräftiges Ergebnis als die UTC-Untersuchung. Die Gruppierung der Echotypen in „strukturbezogene“ (Echotypen I, II) und „nicht-strukturbezogene“ (Echotypen I, II) trug zur Veranschaulichung der UTC-Ergebnisse bei. Das UTC-Verfahren sollte in kontrollierten Untersuchungen an natürlich erkrankten Patienten mit Tendopathien während des Heilungsverlaufes trotz des etwas höheren Aufwandes hochfrequenter eingesetzt werden.

Im Rahmen der Farb-Doppler Ultrasonographie chirurgisch erzeugter Sehnenläsionen konnte die Intensität des Doppler-Signales durch die computergestützte Analyse mehrerer systematisch aus einer bewegten Sequenz ausgewählter Bilder objektiviert und präzise erfasst werden. Dies stellt im Vergleich zu vorangegangenen Studien, in denen lediglich semiquantitative Auswertungen (Scores) der Dopplersonographischen Befunde vorgenommen wurden (Ohberg et al. 2001, Bosch et al. 2011, Carvalho et al. 2013), eine Weiterentwicklung des Untersuchungsverfahrens dar. Die Untersuchungstechnik war gut für die nicht-invasive Einschätzung der Perfusion von künstlichen Tendopathien geeignet, sodass sie sich auch für zukünftige Untersuchungen bei Pferden mit natürlichen Tendopathien anbietet. Die histologische Einschätzung der Vaskularisation der OBS kann entweder semiquantitativ an Präparaten erfolgen (Publikation 7) (Astrom and Rausing 1995, Nixon et al. 2008, Bosch et al. 2010), oder es wird eine präzise Auszählung aller Gefäßanschnitte des gesamten Schnittpräparates vorgenommen (Publikation 8). Es zeigte sich in den eigenen Untersuchungen, in denen beide Techniken an denselben Präparaten zum Einsatz kamen, dass das letztgenannte Verfahren zu einem präziseren Ergebnis führt und es deshalb für zukünftige Untersuchungen empfehlenswert ist. Die Ergänzung durch die gut durchführbare immunhistochemische Darstellung der Expression von Faktor VIII erleichtert die Auszählung der Gefäßanschnitte (Publikation 8), die wiederum einer semiquantitativen Bewertung (Bosch et al. 2011, Carvalho et al. 2013) vorzuziehen ist. Eine Differenzierung zwischen Blut- und Lymphgefäßen erfolgt vorzugsweise nach morphologischen Kriterien.

In der vorliegenden Arbeit korrelierte das Farb-Doppler Signal im Gruppenvergleich nicht mit der Anzahl der Gefäßanschnitte, deren Bestimmung durch den Verzicht auf Biopsien einmalig am Ende des Beobachtungszeitraumes erfolgte (Publikation 8). Die Farb-Doppler Technik dient der bildlichen Darstellung der Perfusion, während mit der histologischen Technik das Ausmaß der (Neo-) Vaskularisation wiedergegeben wird. Theoretisch ist zwar von einer positiven Korrelation beider Phänomene auszugehen, jedoch weist die histologische Technik, die als Goldstandard gilt, möglicherweise eine höhere Sensitivität als die Farb-Doppler Technik auf, weil auch Blutgefäße mit kleinem Durchmesser zumindest dann zuverlässiger erfasst werden, wenn die Gefäße ausgezählt werden. Hinzu kommen technische Grenzen des Doppler-Verfahrens wie die Abhängigkeit des Verfahrens vom Anschallwinkel (Winkelabhängigkeit). Die Power-Doppler Technik (amplitudenkodierter Farb-Doppler) stellt ein alternatives Verfahren zur Darstellung der Sehnenperfusion dar (Carvalho et al. 2013), das die Energie des Blutstromes und nicht wie das Farb-Doppler Prinzip seine Geschwindigkeit und Richtung erfasst und deshalb auch zur Perfusion kleiner Blutgefäße besser geeignet ist (Richards et al. 2005).



Auf Basis aktueller Literaturrecherchen handelt es sich um die erste Studie, in der die wiederholte Feinnadel-Sehnenbiopsie zur Verlaufskontrolle der Sehnenheilung über einen Zeitraum von 24 Wochen bei Pferden angewendet wurde (Publikation 9). Das Verfahren wurde von den Probanden gut bis sehr gut toleriert. Die Feinnadel-Sehnenbiopsie stellt ein wertvolles Diagnostikum dar, da sie grundsätzlich eine direkte Beurteilung der feingeweblichen Sehnenstruktur, die dafür als Goldstandard gilt (Dyson et al. 2015), und sogar eine immunhistochemische Quantifizierung der Expression von Kollagentyp I und -III erlaubt (Publikation 9), die bislang an Feinnadelbiopsaten noch nicht beschrieben wurde. Eine Vorauswahl des zu biopsierenden Bereiches mit bildgebenden Verfahren ist erforderlich, um ein für den Sehnen Schaden repräsentatives Ergebnis zu erhalten. Trotzdem bleibt die Spezifität der Feinnadelbiopsie aufgrund ihres relativ geringen Volumens begrenzt. Daraus resultiert auch, dass die Anwendung weiterführender, z.B. molekularbiologischer Untersuchungen nicht ohne weiteres möglich ist. Die Wiederholbarkeit des Verfahrens ist begrenzt. Die Entwicklung sensitiver, nicht invasiver Verfahren (UTC, MRT) rückt die Bedeutung von Sehnenbiopsien wieder in den Hintergrund.

Die histologische Untersuchung erfolgte in den relevanten Studien der vorliegenden Arbeit (Publikationen 7, 9) unter Zuhilfenahme des Scores nach (Astrom and Rausing 1995), um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit einer vorangegangenen tierexperimentellen Studie zur Wirkung von PRP herzustellen. Die Faktoren „Einblutung“, „Infiltrate von Entzündungszellen“, die in Scores von anderen Arbeitsgruppen zusätzlich in den Gesamtscore eingebunden wurden (Nixon et al. 2008, Carvalho et al. 2013), fanden demgemäß in den eigenen Arbeiten keine gesonderte Berücksichtigung. Es ist dadurch nicht von einer bedeutenden Auswirkung auf das Gesamtergebnis auszugehen, denn die Sehnen wurden erst 24 Wochen nach der Schädigung untersucht, und das verwendete Modell geht, wie natürlich entstandene degenerative Schäden, nur mit einer geringen Zunahme von Entzündungszellen einher. Ebenso wurden keine polarisationsmikroskopischen Untersuchungen zur Bestimmung der wiederkehrenden Wellenform (crimp) vorgenommen (Patterson-Kane et al. 1997), weil die Aussagekraft dieses Parameters bezogen auf die Kürze des Beobachtungszeitraumes von 24 Wochen zu gering erschien. Die mittels Varianzkomponentenanalyse überprüfte Übereinstimmung zweier unabhängiger Untersucher, die in beiden Studien für die Auswertung der Präparate herangezogen wurden, war jeweils für alle Parameter des Gesamtscores sehr gut.

Die immunhistochemische Darstellung der Expression der Kollagentypen I und III in Pferdesehnen ist ein etabliertes Verfahren (Williams et al. 1980, Dahlgren et al. 2005, Nixon et al. 2008), das in der vorliegenden Arbeit (Publikation 9) erstmals an Feinnadelbiopsien der OBS vorgenommen wurde. Eine Quantifizierung der exprimierten Kollagentypen mit immunhistochemischen Methoden gilt als relativ ungenau (Patterson-Kane and Firth 2009). Eine mögliche Ursache dafür ist, dass die Auswertung der Präparate bislang vorwiegend mit semiquantitativen Methoden erfolgte (Williams et al. 1980, Nixon et al. 2008). In der eigenen Untersuchung wurde die Immunreaktion morphometrisch bzw. densitometrisch nach Festlegung eines Schwellenwertes mit Hilfe einer Analysesoftware ausgewertet. Dies stellt eine Weiterentwicklung des Verfahrens dar, die von der Auswertung immunhistochemisch aufbereiteter Präparate anderer Gewebetypen (Ulrich et al. 2006) auf die Sehne übertragen wurde. Die Quantifizierung der diffus-flächigen Pigmentierung dieser Präparate wird dennoch durch mehrere Einflüsse begrenzt, die durch die Methodik der Immunhistochemie begründet sind (Ramos-Vara 2005). Aufgrund der geringen Gewebemenge war eine zusätzliche oder alternative Quantifizierung der mRNA Transkription verschiedener Kollagentypen durch quantitative real-time PCR nicht möglich (Majewski et al. 2009, Jacobson et al. 2015).



7.4 Effekte von autologen AT-MSCs und Blutprodukten auf equine Sehnerkrankungen

7.4.1 Studiendesign: Gruppengrößen, Probandenzahlen, Kontrollgruppen

Grundsätzlich ergeben sich bei der Prüfung von Therapieansätzen zur Behandlung von Sehnerkrankungen bei Pferden folgende Herausforderungen:

- Tierexperimentelle Untersuchungen ermöglichen neben einer relativ hohen Homogenität der Sehenschäden und klinischen sowie bildgebenden Verlaufskontrollen auch ausführliche post-mortale Untersuchungen einschließlich biomechanischer Testungen, die eine hohe Aussagekraft besitzen. Nachteile sind begrenzte Möglichkeiten der Simulation typischer degenerativer und anderer Tendopathieformen durch alle bisherigen „Sehnenmodelle“, der hohe logistische und finanzielle Aufwand und nicht zuletzt ethische Aspekte. Die Anzahl der Probanden beschränkt sich deshalb vielfach auf ein vertretbares Minimum.
- Untersuchungen an natürlich erkrankten Patienten bieten den großen Vorteil realistischer klinischer Bedingungen und die Möglichkeit zu klinischen und bildgebenden Verlaufsuntersuchungen. Von Nachteil ist zumeist eine Heterogenität des Patientengutes und der Tendopathien hinsichtlich Ausprägung und Dauer, im Einzelfall die Compliance der Tierbesitzer und Grenzen in der Überwachung des kontrollierten Bewegungsregimes. Aufwendige feingewebliche Untersuchungen und biomechanische Testungen sind üblicherweise nicht möglich, außer wenn erkrankte Tiere gezielt für eine experimentelle Untersuchung aufgekauft werden können (Smith et al. 2013). In jedem Fall ist die Anzahl der Probanden begrenzt und eine angemessene Stichprobengröße wird nicht erreicht (Smith and McIlwraith 2012).

Bei der Konzeption der Kontrollgruppe ergeben sich weitere Hürden: Da die Eigenschaften von Sehnen u.a. durch das Alter des Individuums und seine Nutzung beeinflusst werden, erscheint es grundsätzlich sinnvoll eine intraindividuelle Kontrolle vorzunehmen, d.h. die korrespondierenden Sehnen der kontralateralen Seite desselben Individuums heranzuziehen. Dies ist bei tierexperimentellen Untersuchungen unter der Voraussetzung einer vertretbaren Schmerzbelastung der Tiere an den oberflächlichen Beuge-sehnen der Vordergliedmaßen durchführbar (Publikationen 7, 8). Eine zusätzliche Einbeziehung der Hintergliedmaßen ist ethisch diskutabel und erschwert aufgrund von Unterschieden die Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Estrada et al. 2014). Bei klinischen Untersuchungen an natürlich erkrankten Patienten aus individuellem Besitz liegen zwar ebenfalls vielfach bilateral Tendopathien vor, die unterschiedlich behandelt werden könnten (Publikation 9), jedoch ist dieses Vorgehen zumeist aufgrund des heterogenen Schadensbildes und der Kooperationsbereitschaft der Tierbesitzer nicht stringent umsetzbar, so dass eine interindividuelle Kontrolle in Kauf genommen werden muss (Publikation 10) und trotz Variationen in einem vertretbaren Zeitrahmen zum Ergebnis führt.

Da mehrere Untersuchungen übereinstimmend zu dem Ergebnis kommen, dass kontrollierte Bewegung einen positiven Effekt auf die Sehnenheilung hat (Gillis 1997, Dowling et al. 2000, Aspenberg 2007), liegt es nahe, Pferde der Prüf- und Kontrollgruppe – wie in allen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erfolgt – dem gleichen kontrollierten Bewegungsregime zu unterziehen. Auch dabei ergeben sich in der praktischen Umsetzung Schwierigkeiten, die u.a. aus der Kooperationsbereitschaft der Tierbesitzer, dem Temperament der Pferde und den äußeren Umständen (Witterung, Bodenbeschaffenheit) resultieren. Hinsichtlich der intraläsionalen Behandlung der Kontrollsehnen sind grundsätzlich mehrere Konzepte denkbar:



- Der Verzicht auf eine intraläsionale Behandlung der Kontrollgruppe (Carvalho et al. 2011) ist grundsätzlich von Interesse, um zu ergründen, ob die intraläsionale Therapie sich vom Effekt kontrollierter Bewegung abhebt. Dieses Vorgehen führt jedoch dazu, dass der alleinige Effekt der Punktion des Sehnen Schadens („dry needling“) (Dabareiner et al. 2000, Avella and Smith 2012) nicht beurteilbar ist.
- Die Punktion der Sehnen Schäden ohne Injektion einer Kontrollsubstanz lässt die potentielle Wirkung des injizierten Flüssigkeitsvolumens unberücksichtigt.
- Die Punktion mit Verabreichung einer Kontrollsubstanz simuliert sowohl den Effekt der Punktion als auch des injizierten Flüssigkeitsvolumens (Carvalho et al. 2013).

Daraus ergibt sich, dass der letztgenannte Ansatz zur Prüfung der Wirkung eines injizierten Substrates am besten geeignet scheint. Er wurde in allen kontrollierten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit Sehneninjektionen verfolgt (Publikationen 7, 8, 9, 10). Optimal wäre eine zweite, lediglich kontrolliert bewegte Kontrollgruppe ohne jegliche intraläsionale Therapie. Das Konzept einer Prüf- und zweier Kontrollgruppen wurde bei der Planung der ersten Studie an natürlichen Sehnen Schäden (Publikation 9) angestrebt, konnte jedoch nicht mit ausreichender Fallzahl verwirklicht werden, da die Tierbesitzer bei Pferden, die randomisiert der Kontrollgruppe zugeteilt worden waren, der alleinigen kontrollierten Bewegung den Vorzug gegenüber der Injektion eines Placebos gaben.

Auch die Auswahl der Kontrollsubstanz stellt eine Herausforderung dar. Während die Wahl steriler physiologischer Kochsalzlösung bei den untersuchten Blutprodukten naheliegend war (Publikationen 9, 10), wurde zur Kontrolle des Effektes kultivierter AT-MSCs autologes inaktiviertes Serum verwendet (Publikationen 7, 8), da dieses Medium auch zur Suspension der Zellen in der Prüfgruppe eingesetzt wurde und die Studie darauf abzielte, den Effekt der AT-MSCs und nicht ihrer Kombination mit Serum zu untersuchen. In diesem Kontext stellt sich aufgrund der geringen Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich ultrasonographischer, biochemischer und biomechanischer Parameter (Publikation 7) die Frage, inwieweit die Kontrollsubstanz, d.h. das hitzeinaktivierte autologe Serum, den Heilungsverlauf beeinflusste. In anderen Arbeiten wurden die AT-MSCs ebenfalls in autologem, jedoch frischem Serum suspendiert, während die Kontrollgruppe keine Behandlung erfuhr (Carvalho et al. 2011). Es wurde also streng genommen die Wirkung der Kombination aus AT-MSCs und Serum überprüft, die sich u.a. in einer verbesserten Organisation der Sehnenfasern und einem verbesserten Kollagentyp I Gehalt ausdrückte. Dies weist im Kontext der eigenen Ergebnisse auf eine potentielle Bedeutung des Serums hin. Auch ein Studiendesign, bei dem in der Prüfgruppe eine Suspension von AT-MSCs in einem Thrombozytenkonzentrat vorgenommen wird, erschwert die Einschätzung der therapeutischen Wirkung der AT-MSCs i.e.S., wenn in der Prüfgruppe phosphatgepufferte Kochsalzlösung Verwendung findet (Carvalho et al. 2013). Diese Ergebnisse sind unabhängig von anderen konzeptionellen Unterschieden nur bedingt mit den eigenen vergleichbar.

In mehreren kontrollierten Studien, in denen BM-MSCs zum Einsatz kamen (Smith and Webbon 2005, Caniglia et al. 2012, Godwin et al. 2012, Smith et al. 2013), wurde Knochenmarküberstand aufgrund seiner anabolen Wirkung auf Zellen (Smith et al. 2006, Schnabel et al. 2008) als Suspensionsmedium für die MSCs eingesetzt. In einer tierexperimentellen Untersuchung am chirurgischen Sehnenmodell wurde Knochenmarküberstand konsequenterweise auch als Kontrollsubstanz verwendet (Caniglia et al. 2012), und es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen, sodass auch entweder eine



potentiell therapeutische Wirkung von Knochenmarküberstand als Suspensionsmedium für BM-MSCs zum Tragen kommt oder in der Prüf- und Kontrollgruppe keine Wirkung auf die Sehnenheilung eintrat. Nach intraläsionaler Applikation von MSCs wurde zudem tierexperimentell eine frühe Reduktion der Zellzahl am Injektionsort (Guest et al. 2010), verbunden mit dem Nachweis von MSCs in der Blutbahn (Carvalho et al. 2014) und sogar in kontralateralen Sehnenläsionen (Burk et al. 2016) festgestellt, sodass eine therapeutische Beeinflussung der Gegenseite bei intraläsionaler Injektion von MSCs und intraindividuelle Kontrolle nicht ausgeschlossen ist. Theoretisch kann dieser Effekt in der eigenen Untersuchung (Publikation 7) zu den geringen Unterschieden zwischen den Gruppen beigetragen haben, da eine intraindividuelle Kontrolle vorgenommen wurde.

7.4.2 Effekte während der akuten Entzündungs- und Proliferationsphase: Entzündungsmodulierender Effekt, „homing“ / „engraftment“, Neovaskularisation und Perfusion

Mesenchymalen Stromazellen wird ein entzündungsmodulierender Effekt zugeschrieben (Carvalho et al. 2011, Duffy et al. 2011, Schu et al. 2012). Eine konstante Verbesserung klinischer Entzündungsparameter (z.B. Schwellung) sowie eine ultrasonographische erfassbare Reduktion der Flüssigkeitsmenge (UTC: Echotyp IV) als Ausdruck der Abnahme akuter Entzündung in den Sehnenläsionen wurde in der eigenen Untersuchung am chirurgischen Sehnenmodell nach AT-MSC Applikation nicht nachgewiesen. Dies steht teilweise im Widerspruch zu Beobachtungen am Kollagenase-Sehnenmodell mit Injektion von AT-MSCs, suspendiert in Thrombozytenlysate (Carvalho et al. 2013). Mögliche Gründe sind neben Einflüssen des Sehnenmodells und des Thrombozytenlysates vielfältig und beinhalten neben den o.g. Faktoren einen zu frühen oder zu späten Injektionszeitpunkt, eine nicht-optimale Zelldosis oder die Wahl des Ausgangssubstrates Fettgewebe. Das genutzte chirurgische Sehnenmodell ist zwar gut standardisierbar, spiegelt jedoch eher die degenerative Komponente typischer natürlicher Tendopathien mit ihrem zentralen „Kompartiment“ wider und führte zudem in der eigenen Untersuchung (Publikationen 7, 8) lediglich zu Schäden moderater Ausdehnung mit stärkster Ausprägung ca. 5 Wochen nach der Erzeugung. Das Kollagenase-Modell hingegen ist schlecht standardisierbar und impliziert ausgedehnte Schäden mit einer deutlichen entzündlichen Komponente. Der Injektionszeitpunkt (2 Wochen nach Läsionserzeugung) konnte aufgrund des Studiendesigns auf die langsame Ausdehnung der Läsionen abgestimmt werden (Publikationen 7, 8) und hätte rückblickend vermutlich noch weiter hinausgezögert werden und bei ausgedehnteren Sehnenläsionen wiederum tendenziell früher angesetzt werden müssen, um einen entzündungsmodulierenden Effekt zu erzielen. Dies steht im Gegensatz zum klinischen Alltag: Natürlich entstandene Tendopathien wurden in einer Untersuchung erst ca. 46-54 Tage nach Diagnosestellung mit BM-MSCs behandelt (Godwin et al. 2012). Die Zelldosis von ca. 10×10^6 MSCs wurde aufgrund vorangegangener Untersuchungen gewählt (Godwin et al. 2012, Carvalho et al. 2013, Smith et al. 2013), Titrationsuntersuchungen zur optimalen Zelldosis fehlen jedoch.

Mehrere Untersuchungen liefern Hinweise auf eine gute Eignung von Fettgewebe für die Kultur von MSCs. Neben der guten Verfügbarkeit des Ausgangsgewebes zeigen AT-MSCs gegenüber MSCs aus Knochenmark eine größere Proliferationsrate (Ranera et al. 2012, Burk et al. 2013, Barberini et al. 2014) und eine höhere Expressionsrate von Kollagentyp I und sehnenassoziierten Markern wie Tenascin-C und Scleraxis (Burk et al. 2014).

Eindeutig wurde gezeigt, dass die AT-MSC-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 2 Wochen zu einer erhöhten Perfusion der Sehnen führte, denn das Farb-Doppler-Signal war nach AT-MSC-Injektion signifikant stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe (Publikation 8). Die Neovaskularisation beginnt



bereits innerhalb der ersten Woche nach Läsionsentstehung, d.h. in der späten Entzündungs- und frühen Proliferationsphase (Patterson-Kane and Firth 2009), und wird als entscheidender Faktor der Sehnenheilung angesehen, da sie die extrinsische Heilung und den Zu- und Abtransport von Zellen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen sicherstellt (Fenwick et al. 2002). Die durch die AT-MSCs induzierte vermehrte Perfusion wurde deshalb als Indikator für eine verbesserte Sehnenheilung interpretiert.

Nach einer einmaligen Injektion von 10×10^6 AT-MSCs in chirurgisch erzeugte Sehnenläsionen ergaben sich im Beobachtungszeitraum von bis zu 9 Wochen (Proliferationsphase) mittels MRT und mehrerer histomorphologischer Untersuchungsverfahren übereinstimmend Hinweise auf den Verbleib einer hohen Anzahl dieser Zellen im Bereich der Applikation (Publikation 6). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine frühe Integration der injizierten AT-MSCs in die heilende Sehnenläsion ein entscheidender Mechanismus dieser Therapieform ist (Sohni and Verfaillie 2013), der für AT-MSCs erstmals über einen Zeitraum von 9 Wochen und unter Nutzung von Niederfeld-MRT am stehenden Pferd nachgewiesen wurde. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte danach tierexperimentell mit vergleichbaren Methoden, dass markierte MSCs aus Fettgewebe sogar bis zu 24 Wochen in equinen OBS-Schäden nachweisbar sind (Burk et al. 2016). Die verwendeten Markierungsverfahren (Markierung mit Eisenpartikeln, GFP) lassen nur eine bedingte Aussage darüber zu, wie lange die Zellen nach einer möglichen Integration („homing“, „engraftment“) in das Sehngewebe überleben und sich teilen und ob es zu einem Gewebersatz (Veronesi et al. 2016) kommt oder parakrine Effekte überwiegen (Hofer and Tuan 2016).

Mittels MRT zeigte sich, dass die zur Zellmarkierung eingesetzten Eisenpartikel im Bereich der Injektionsstellen auch in der Umgebung der Sehnen nachweisbar waren (Publikation 6). Dies wurde als Ausdruck eines möglichen Rückflusses von Zellsubstrat in die Unterhaut während des Injektionsvorganges, der an der belasteten Gliedmaße ausgeführt wurde, interpretiert, wenngleich sich dabei kein deutlicher Gegendruck aufgebaut hatte. Grundsätzlich stehen neben der intraläsionalen Injektion auch die regionale Perfusion und die systemische intravenöse Injektion (Becerra et al. 2013, Sole et al. 2013) als Applikationsverfahren zur Verfügung, wobei die intraläsionale Injektion zu einer höheren lokalen MSC Konzentration führt und deshalb nach aktuellem Kenntnisstand die beste Methode darstellt (Sole et al. 2013, Burk et al. 2016). Dabei sind wiederum Injektionen an der belasteten Gliedmaße (Sehne unter Spannung) oder am aufgehobenen Fuß (Sehne entlastet) sowie Punktionen im Faserverlauf der Sehne oder quer zur Sehnenachse zu unterscheiden. Die ultrasonographische Kontrolle der Punktionskanüle und eine präzise intraläsionale Injektion sind an der belasteten Gliedmaße leichter möglich, sodass dieses Verfahren in allen Studien der vorliegenden Arbeit gewählt wurde. Dieses Vorgehen führt möglicherweise jedoch zu einer Beschädigung intakter Sehnenfasern beim Verschieben der Kanüle in einen zentralen Sehnen Schaden. Diese „Stichkanäle“ sind teilweise langfristig als hypoechogene Bänder sonographisch nachweisbar (Publikation 7). Ihre Bedeutung für den Heilungsprozess ist unklar: Einerseits kommt es zu einem erkennbaren Verlust zumindest von Teilen des Injektates in die Umgebung der Sehne (Publikation 6) (Scharf et al. 2015). Dies zieht möglicherweise eine Zubildung von Gewebe (z.B. Unterhautfibrose) außerhalb der Sehne nach sich (Publikation 9). Andererseits wird die Einwanderung von lokalen Vorläuferzellen aus dem Bereich des *Peritendineum* erleichtert (Garner et al. 1989, Clegg et al. 2007, Kol et al. 2013). Zusammenfassend sollte das Injektionsverfahren so ausgewählt werden, dass Reflux des Zellsubstrates in die Unterhaut vermieden wird, um die applizierte Zellmenge im Sehnen Defekt zu konzentrieren und peritendinöse Reaktionen (Fibrosen, Adhäsionen, Schwellungen) zu begrenzen. Dabei sollte idealerweise auch das Injektionsvolumen auf die Größe des Defektes abgestimmt werden.



Bei zukünftigen Untersuchungen sollte eine Quantifizierung der histologisch und bildgebend erfassten Zellmarkierungen vorgenommen werden (Guest et al. 2010), um auch für AT-MSCs die Bedeutung der verwendeten Zelldosis zu beleuchten und um zu überprüfen, in welchem Umfang Zellen über das Blut- bzw. Lymphgefäßsystem in andere Bereiche des Körpers, wie z.B. kontralaterale Sehnenschäden, gelangen und sich dort festsetzen (Burk et al. 2016).

Methodisch zeigte sich, dass Lichtmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie, Immunfluoreszenz und Immunhistochemie effektive Methoden zum Nachweis markierter AT-MSCs in chirurgisch erzeugten OBS-Läsionen sind. *In vivo* Niederfeld MRT-Untersuchungen haben das Potential, als nicht-invasives Verfahren genutzt zu werden, um die Integration von AT-MSCs auch an Pferden mit natürlich entstandenen Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne zu überprüfen (Berner et al. 2016).

Eine einmalige Injektion von autologem konditioniertem Serum in natürlich entstandene Läsionen der OBS trägt zu einer frühen Lahmheitsreduktion bei. Obwohl die klinisch ermittelte Schwellung im palmaren Mittelfußbereich zunächst nicht in gleichem Maße zurückging, kam es nach ca. 7 Wochen (Ende der Proliferationsphase) zu einem signifikanten Abfall auch dieses Parameters nur in der Prüfgruppe (Publikation 9). Dies könnte durch eine entzündungshemmende Wirkung, die dem autologen konditionierten Serum aufgrund seines Gehaltes an Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist bereits bei der Behandlung von Arthropathien zugeschrieben wurde (Frisbie et al. 2007), beeinflusst worden sein, wenngleich die Wirkung nicht zu Gruppenunterschieden i.e.S. führte. Die Beobachtung, dass der mittels Ultraschall bestimmte Sehnenquerschnitt in beiden Gruppen im Untersuchungszeitraum gleich blieb, lässt den Rückschluss zu, dass sich die ACS-Injektionen eher positiv auf die Rückbildung der Unterhaut- als der Sehnenanschwellung ausgewirkt haben.

Im Vergleich zur Entwicklung der Kontrollsehnen trug die ACS-Injektion auch zur Verbesserung ultrasonographischer Parameter während der Proliferations- und frühen Remodellierungsphase bei: Es zeigte sich insbesondere eine Verringerung des Ausmaßes und eine höhere Echogenität der Läsionen. Jüngere Untersuchungen lieferten Hinweise auf einen erhöhten Gehalt von ACS an den Wachstumsfaktoren wie IGF-1 und TGF- β (Hraha et al. 2011), deren Effekt neben dem entzündungshemmenden Einfluss des ACS möglicherweise zur Bildung eines echoreichen fibrillären Ersatzgewebes beitrug. Nach experimentell erzeugten Sehnenläsionen ist z.B. der Gehalt an endogenem IGF-1 zunächst gering (Dahlgren et al. 2005). Auf dieser Grundlage ist die Verzögerung der o.g. Effekte im Verhältnis zum Zeitpunkt der Injektion möglicherweise durch auto- oder parakrine Wirkungen des ACS auf die endogene Expression von Wachstumsfaktoren zu erklären (Heisterbach et al. 2012).

Die intraläsionale Behandlung mit autologem konditioniertem Serum führte ca. 5 Wochen (späte Proliferationsphase) nach der Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikant abgeflachteren Morphologie der Tenozystenkerne, die als Ausdruck einer reduzierten Proliferationsrate bewertet wurde. Daraus kann möglicherweise eine reduzierte Produktion des unelastischen Kollagentyp III, dessen Gehalt nach Ergebnissen experimenteller Untersuchungen zunächst zwischen der 3. und 6. Woche nach der Sehnenschädigung am größten ist (Silver et al. 1983, Dahlgren et al. 2005), abgeleitet werden. Immunhistochemisch ergaben sich jedoch keine Unterschiede hinsichtlich der Expression von Kollagentyp III. Dies ist möglicherweise auf die starke Schwankung des Gehaltes verschiedener Kollagentypen bei natürlich entstandenen Sehnenläsionen zurückzuführen (Sodersten et al. 2013).

Eine einmalige intraläsionale PRP-Behandlung (System Osteokin[®], Fa. Orthogen) von natürlich entstandenen Läsionen der OBS mit einer vorberichtlichen Dauer von bis zu 8 Wochen führt im Vergleich mit einer Placebo-Behandlung zu einer früheren Reduktion des Lahmheitsgrades und zu einer früheren Reduktion des Score-Werte für die Hautoberflächenwärme in der akuten Entzündungs- und Proliferati-



onsphase (Publikation 10). PRP wurde eine entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben (El-Sharkawy et al. 2007, Bosch et al. 2010, Mazzocca et al. 2013), die zu dieser Entwicklung beigetragen haben könnte und sich auch in reduzierten Schmerz-Scores nach Tendopathie-Behandlungen mit PRP in der Humanmedizin widerspiegelt (Mishra and Pavelko 2006). Der Grad der Druckempfindlichkeit, ein weiteres Kardinalsymptom der Entzündung, sank hingegen bei sonst ähnlichem Kurvenverlauf früher bei den Kontrolltieren als bei den PRP behandelten Pferden ab. Ursächlich begünstigt die Einbeziehung unterschiedlicher Läsionstypen hohe interindividuelle Schwankungen der Score-Werte. Insgesamt ist zu betonen, dass zu keinem Zeitpunkt unmittelbare Gruppenunterschiede vorlagen.

Bei beiden untersuchten Blutprodukten ergibt sich als Schlussfolgerung zur Wirkung in der akuten Entzündungs- und in der Remodellierungsphase, dass eine frühere Behandlung möglicherweise vorteilhafter gewesen wäre, um die beobachteten Effekte, die insgesamt eher schwach ausgeprägt waren, zu verstärken. Im selben Kontext ist auch eine Wiederholung der Behandlung in Erwägung zu ziehen.

7.4.3 Remodellierungsphase: Auswirkung auf Gewebeeigenschaften am Ende der Beobachtungsperiode, regenerativer Effekt

Neben sequentiellen klinischen und ultrasonographischen Untersuchungen über den gesamten Beobachtungszeitraum lieferten terminale histologische, biochemische und biomechanische Untersuchungen von Sehngewebe 22 Wochen nach AT-MSC-Behandlung keinen sicheren Anhaltspunkt für eine Überlegenheit dieser Behandlung gegenüber einer alleinigen Behandlung mit inaktiviertem Serum. In beiden Gruppen zeigte die histologische Textur in Verbindung mit einem hohen DNA und Glykosaminoglykangehalt eine hohe metabolische Aktivität des Narbengewebes, die darauf hinweist, dass unter den untersuchten Voraussetzungen die Remodellierungsphase 6 Monate nach der Therapie noch andauert und die Sehnenheilung noch nicht abgeschlossen ist. Es ergaben sich keine Hinweise auf eine Wiederherstellung der ursprünglichen Gewebestruktur. Hinsichtlich der untersuchten biochemischen Parameter zeigte sich im Vergleich zu einer zweiten Kontrollgruppe, bestehend aus makroskopisch unverändertem Sehngewebe, als einzige Auffälligkeit, dass die AT-MSC-Behandlung möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Quervernetzung („cross-linking“) von Kollagen in der Remodellierungsphase hat. Im Vergleich zu einer anderen kontrollierten tierexperimentellen Untersuchung zur Wirkung von MSCs aus Knochenmark, die an Pferden mit natürlich entstandenen Tendopathien überprüft wurde und somit eine Ausnahme darstellt (Smith et al. 2013), waren die Effekte der AT-MSC-Therapie deutlich schwächer ausgeprägt. Dies trifft in noch höherem Maße auf den Vergleich mit einer tierexperimentellen Untersuchung zu, bei der chirurgisch mit demselben Verfahren wie in der eigenen Untersuchung erzeugte Tendopathien mit dem Thrombozytenkonzentrat PRP behandelt wurden (Bosch et al. 2010).

Die mittels Farb-Doppler darstellbare Perfusion unterschied sich 22 Wochen nach der AT-MSC-Behandlung nicht mehr von der Kontrollgruppe, wenngleich zu diesem Zeitpunkt die Anzahl von histologisch und immunhistochemisch nachgewiesenen Blutgefäßanschnitten bei den AT-MSC behandelten Sehnen signifikant größer war, sodass von einer erhöhten Vaskularisation des Ersatzgewebes nach dieser Behandlungsform auszugehen ist (Publikation 8). In einer der wenigen anderen tierexperimentellen Untersuchungen zur Behandlung von equinen Sehenschäden mit AT-MSCs zeigten sich zum Ende des Untersuchungszeitraumes von ca. 16 Wochen weder immunhistologisch (Faktor VIII) noch mittels Power-Doppler Unterschiede zur Placebo-behandelten Kontrollgruppe (Carvalho et al. 2013). Unterschiede im Studiendesign (Kollagenase-Modell, Suspension der AT-MSCs in Thrombozytenlysat, Beobachtungszeitraum, u.a.) erschweren den Vergleich der Ergebnisse beider Studien. Davon unabhän-



gig stellt die in der eigenen Untersuchung erstmals etablierte histologische Untersuchungstechnik, bei der innerhalb eines Präparates alle Gefäßanschnitte ausgezählt wurden, zudem ein präziseres Verfahren als die semiquantitative Bewertung der Vaskularisation dar.

In Verbindung mit anderen Untersuchungsmodalitäten (UTC, andere histologische Parameter) zeigte sich, dass die Sehnenheilung in der eigenen Untersuchung nach 22 Wochen noch nicht abgeschlossen war, sodass die Bewertung der Vaskularisierung kein Langzeitergebnis darstellt. An der erkrankten Achilles-Sehne des Menschen wird eine langfristig erhöhte Vaskularisation kritisch gesehen, da sie typischerweise mit chronischem Schmerz einhergeht (Ohberg et al. 2001). Pferden zeigen zumeist keine oder geringe Anzeichen für chronischen Sehnenschmerz (Richardson et al. 2007), sodass eine mittelfristig erhöhte Vaskularisation eher als Ausdruck einer verbesserten Versorgung mit Zellen und Wachstumsfaktoren während der akuten Entzündungs- und Proliferationsphase der Sehnenheilung interpretiert wird (Fenwick et al. 2002, Bosch et al. 2011). Bei natürlich entstandenen, chronischen Tendopathien ist die Perfusion der Sehnenschäden in der Remodellierungsphase eher rückläufig (Murata et al. 2012), aber gegenüber nicht erkrankten Sehnen von Kontrollpferden erhöht (Kristoffersen et al. 2005). Eine aktuelle Untersuchung untermauert das Potential von Fettgewebe bzw. assoziierten MSCs zur Angiogenese (Ceserani et al. 2016), sodass die Anregung der Vaskularisation durch die intratendinöse Behandlung mit AT-MSCs insgesamt schlüssig ist.

Klinische und die meisten ultrasonographischen Parameter unterschieden sich nach 25 Wochen nicht zwischen ACS-behandelten und Kontrollsehnen. Auffällig war, dass die mittels B-mode Ultraschall bestimmte Läsionsgröße am vorletzten Untersuchungstermin (ca. 23 Wochen) nach ACS-Behandlung statistisch signifikant kleiner war. Dies steht im Einklang mit einer erhöhten Echogenität der Läsionen 11 und 15 Wochen nach ACS-Therapie und deutet auf einen geringeren Anteil an Flüssigkeit in den ACS behandelten Sehnenschäden in der Remodellierungsphase hin. Unter Berücksichtigung des heterogenen Untersuchungsgutes wäre eine mindestens dreimalige Untersuchung mit der sensitiveren UTC Technik (Publikation 10) auch bei dieser Studie hilfreich gewesen, um die Echotextur besser zu charakterisieren, jedoch stand die Technik während der ACS Studie nicht zur Verfügung.

Die intraläsionale Behandlung mit autologem konditioniertem Serum führte in der Remodellierungsphase zu einer gesteigerten Differenzierung von Sehnenzellen, die sich durch eine erhöhte Kollagentyp I Expression äußert. Auffallend war ein am Ende des Beobachtungszeitraumes (6 Monate) gegenüber der 5. Woche nur nach ACS-Behandlung signifikant höherer Gehalt an immunhistochemisch nachgewiesenem Kollagentyp I. Der Gehalt an Kollagentyp III zeigte über 6 Monate eine abnehmende statistische Tendenz. Wenngleich sich diese Verläufe nicht in einem Unterschied zwischen den Gruppen widerspiegelte, weisen sie auf eine vorteilhaftere Entwicklung der Qualität des Reparaturgewebes nach ACS-Behandlung hin (Silver et al. 1983, Dahlgren et al. 2005), denn ein hoher Kollagentyp I Gehalt korreliert im Idealfall mit günstigen biomechanischen Eigenschaften von Sehnen wie einer besseren Elastizität (Williams et al. 1984, Watkins et al. 1985), wenngleich dies in einer tierexperimentellen Untersuchung an Achilles-Sehnen von Ratten trotz eines molekularbiologisch aufgezeigten hohen Kollagentyp I Gehaltes nach ACS-Therapie nur bedingt (schnellere Verbesserung der Sehnensteifigkeit nach ACS- als nach Placebo-Behandlung) zutrifft (Majewski et al. 2009). Zur weiterführenden Untermauerung des Ergebnisses der eigenen Untersuchung waren biomechanische Testungen aufgrund des Studiendesigns nicht möglich. Die molekularbiologische Bestimmung der Kollagentypen hätte größere Biopate erfordert und wäre somit invasiver gewesen.

Zusammenfassend ergeben sich Hinweise auf eine Verbesserung der Qualität des Ersatzgewebes durch die ACS-Behandlung in der Remodellierungsphase. Aufgrund fehlender Unterschiede im unmittel-



telbaren Gruppenvergleich am Ende der Untersuchung, erwies sich als hilfreich zusätzlich eine vergleichenden Betrachtung des Heilungsverlaufes innerhalb der jeweiligen Gruppen bei der Auswertung heranzuziehen.

Einmalige Injektionen mit PRP trugen nach 6 Monaten, während des Umbaus der fibrillären Matrix zu Faszikeln zu einer mittels ultrasonographischer Gewebecharakterisierung nachweisbaren Verbesserung der strukturellen Organisation des Ersatzgewebes bei. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse, dass die Remodellierung 6 Monate nach der Behandlung noch nicht abgeschlossen ist. Im Gegensatz zu einer tierexperimentellen Untersuchung zur PRP-Wirkung am chirurgischen Sehnenmodell (Bosch et al. 2010) sind die Effekte im Rahmen der eigenen Studie deutlich schwächer ausgeprägt, und es zeigt sich insbesondere noch keine Erhöhung des Anteils der erwünschten vollständig parallelen Faserbündel (Echotyp I) gegenüber der Kontrollgruppe am Ende des vergleichbar langen Untersuchungszeitraumes von ca. 6 Monaten. Dies weist einerseits auf grundsätzliche Diskrepanzen im Heilungsverlauf zwischen dem von Bosch et al. verwendeten chirurgischen Modell (Bosch et al. 2010) und natürlich entstandenen Sehnenläsionen, wie in den eigenen Untersuchungen überprüft (Publikation 10) hin. Bei genauer Betrachtung fällt zudem der deutlich frühere Behandlungszeitpunkt der experimentellen Läsionen ins Gewicht, der potentiell nicht nur den frühen Verlauf, sondern auch das Ergebnis in der Remodellierungsphase beeinflusst.

7.4.4 Funktionalität

Eines der wichtigsten Erfolgskriterien der Sehnenbehandlung ist die Funktionalität und somit einerseits die Gliedmaßenfunktion und langfristig insbesondere die Rezidivfreiheit (Thorpe et al. 2010). Diese Parameter spiegeln sich in den biomechanischen Eigenschaften des Ersatzgewebes wider (Crevier-Denoix et al. 1997), die sich in tierexperimentellen Untersuchungen am Ende des Beobachtungszeitraumes z.B. an Sehnenexplantaten biomechanisch testen lässt (Schnabel et al. 2009, Bosch et al. 2010, Smith et al. 2013). Nach Behandlung mit AT-MSCs in Serum unterschieden sich die biomechanischen Eigenschaften der Sehnenproben aus den Läsionen 22 Wochen später nicht von der Kontrollgruppe (Publikation 7). In einer anderen Untersuchung, in der dasselbe chirurgische Modell verwendet wurde, waren die biomechanischen Eigenschaften von PRP behandeltem Sehngewebe gegenüber der Behandlung mit steriler Kochsalzlösung im unmittelbaren Vergleich besser (Bosch et al. 2010). Mögliche Gründe für die Diskrepanz zwischen den Untersuchungen sind vielfältig und können z.B. in der geringeren Ausprägung der Sehnenschäden in der eigenen Untersuchung, im Behandlungszeitpunkt und im Therapeutikum selbst zu suchen sein. Während in einer tierexperimentellen Untersuchung zur Wirkung von BM-MSCs am Kollagenase-Modell ebenfalls kein Unterschied zwischen Prüf- und Kontrollgruppe nachweisbar war (Schnabel et al. 2009), wurde hingegen in einer tierexperimentellen Untersuchung an Pferden mit natürlichen Sehnenschäden nach BM-MS-Behandlung eine geringere Steifigkeit der Sehnen als bei den Kontrolltieren nachgewiesen (Smith et al. 2013). Diese verdeutlicht die Grenzen der Vergleichbarkeit von Sehnenmodellen mit natürlichen Tendopathien. Biomechanische Untersuchungen zu AT-MS- behandelten Sehnen liegen nach unserer Kenntnis nicht vor. Die Einbeziehung einer dritten Gruppe (makroskopisch unverändertes Sehngewebe desselben Individuums) erwies sich als sinnvoll, um auch mögliche dezente Effekte der AT-MS- Behandlung herauszuarbeiten (unterschiedlicher Gehalt der Lokalisationen an Hydroxylsilylpyridinolin).

Bei Pferden mit natürlich entstandenen Tendopathien ist zunächst der Rückgang der akuten Lahmheit ein Erfolgskriterium. Der im Vergleich zur Kontrollgruppe schnellere Rückgang des Lahmheitsgrades nach ACS sowie auch nach PRP-Behandlung liefert Hinweise auf eine positive Beeinflussung der Funk-



tionalität als Kardinalsymptom der Entzündung durch diese Blutprodukte (Publikationen 9, 10) und war in der ACS-Studie noch stärker ausgeprägt: Der durchschnittliche Lahmheitsgrad ging 11 Tage nach ACS- und 8 Wochen nach PRP-Behandlung signifikant zurück. Das Studiendesign beider Untersuchungen ähnelt sich nicht zuletzt durch Einbeziehung natürlich entstandener Tendopathien. Die vorberichtliche Dauer der Tendopathien lag jedoch in der ACS-Studie bei bis zu 14 Tagen und in der PRP-Untersuchung bei bis zu 8 Wochen. Dies liefert Hinweise darauf, dass eine frühzeitigere Behandlung im Hinblick auf die frühe Verbesserung der Funktionalität vorzuziehen ist.

Langfristig wird die Funktionalität nur in geringerem Umfang durch persistierende Lahmheit, sondern in erster Linie durch Erreichen des beabsichtigten Leistungsniveaus und insbesondere durch die Rezidivrate zum Ausdruck gebracht (Patterson-Kane and Firth 2009). Naturgemäß ist die Sammlung von Daten zu diesen Parametern bei Pferden aus individuellem Besitz herausfordernd, sodass dieses wichtige Element bei zahlreichen Fallserien fehlt (Künneke et al. 2008, Torricelli et al. 2011). Alle lahmen Pferde, die mit ACS behandelt worden waren, sowie alle Kontrollpferde zeigten bereits ca. 5 Wochen nach der Therapie bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes keine Lahmheit mehr (Publikation 9). Nach PRP bzw. Placebo-Behandlung waren am Ende des Untersuchungszeitraumes nur noch insgesamt 3 von ursprünglich 11 Studienpferden lahm (Publikation 10). Auch unter Berücksichtigung der Lahmheitsfreiheit aller Pferde 6 Monate nach chirurgischer Induktion von Tendopathien (Publikation 7) bestätigt sich, dass chronisch persistierender Schmerz bei equinen Tendopathien der OBS (Richardson et al. 2007) im Gegensatz zur Achilles-Tendopathie des Menschen (Alfredson et al. 2003, Divani et al. 2010) wenig in Erscheinung tritt. Die Sensitivität der klinischen Bestimmung des Lahmheitsgrades ist insbesondere bei bilateralen Tendopathien begrenzt und hätte durch den Einsatz von computergestützter Ganganalyse (Sensorsysteme, Druckmessplatten, Laufband) verbessert werden können. Diese Verfahren konnten aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit oder des hohen Aufwandes bei den eigenen Untersuchungen nicht genutzt werden.

5 von 8 Pferden (63%), deren Sehnen mit ACS behandelt worden waren, wurden zum Zeitpunkt der Besitzerbefragung 2-4 Jahre nach der Behandlung auf dem vorherigen oder einem höheren Leistungsniveau genutzt (Publikation 9). Aufgrund der geringen Fallzahlen und der gleichzeitigen Nutzung zweier Pferde mit bilateralen Tendopathien in der Prüf- und Kontrollgruppe war ein statistischer Gruppenvergleich der langfristigen Funktionalität in dieser Untersuchung nicht sinnvoll. Trotzdem bilden die Daten eine wertvolle Orientierungshilfe, da in der Literatur bislang gar keine Daten zur langfristigen Entwicklung der Nutzbarkeit von Pferden mit ACS behandelten Tendopathien vorlagen.

Nach einer einmaligen PRP-Injektion erreichten 12 Monate nach Behandlung mehr Pferde (8/10) ihr vorheriges oder ein höheres Leistungsniveau als nach Placebo-Behandlung (5/10) (Publikation 10). Aufgrund der geringen Fallzahl waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Beim Vergleich mit Literaturangaben zu alleiniger Behandlung mit kontrollierter Bewegung zeigt sich, dass ca. 73% (11/15) der Galopprennpferde (Flach- und Hürdenrennen) innerhalb von 24 Monaten wieder im Sport auf dem ursprünglichen Leistungsniveau genutzt wurden, die Rezidivrate lag jedoch bei diesen Pferden bei ca. 55 % (6/11 Pferden).

Dennoch weisen die Ergebnisse im Einklang mit Ergebnissen anderer Untersucher an Versuchspferden (Bosch et al. 2010) auf das Potential der PRP-Behandlung hin, die biomechanischen Eigenschaften des Narbengewebes mittel- bis langfristig positiv zu beeinflussen. 24 Monate nach der Behandlung war jedoch der Anteil der Pferde, die auf einem gleichbleibenden oder höheren Leistungsniveau genutzt werden konnten, in der eigenen Studie (Publikation 10) bei den behandelten Pferden und bei der Kontrollgruppe ungefähr gleich. Dies korreliert mit einer klinischen Untersuchung zu Fesselträgerkörper-



schäden bei Trabrennpferden, bei denen die Rennleistungen im dritten Jahr nach der Behandlung abnahmen (Waselau et al. 2008) sowie mit einer aktuellen Untersuchung an Galopprennpferden, in der die Behandlung von OBS-Läsionen mit PRP im Vergleich zu alleiniger kontrollierter Bewegung in Bezug auf die Rennleistung nach der Rekonvaleszenz (durchschnittlich 552 Tage) nicht überlegen war (Witte et al. 2016).

Theoretisch hätte durch Verlängerung des Beobachtungszeitraumes und Ausdehnung des Bewegungsregimes und somit der Belastung auch in der tierexperimentellen Untersuchung zur AT-MSC Wirkung (Publikationen 7) eine Aussage über den Parameter Rezidivrate getroffen werden können, jedoch ist dies in tierexperimentellen Untersuchungen aufgrund des hohen Aufwandes unüblich und wurde aus ethischen Gründen als unangemessen erachtet. Hier wäre eine Langzeitstudie an natürlich erkrankten Sportpferden von hohem Interesse.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten, dass die hohen Erwartungen, die zunächst an die Therapie mit potentiell regenerativen Blut- und Zellsubstraten gestellt wurden, in der bisherigen Form bei einmaliger Behandlung nur bedingt gerechtfertigt sind (Witte et al. 2016). Sowohl die experimentellen Untersuchungen als auch die Studien an Pferden mit natürlichen Sehnenschäden geben Hinweise auf Wirkungen, die die Sehnenheilung positiv beeinflussen. Diese waren jedoch im Hinblick auf den klinischen Verlauf relativ schwach ausgeprägt.

7.5 Ausblick

Bevor die untersuchten Therapiekonzepte uneingeschränkt den Vorzug gegenüber dem Konzept alleiniger kontrollierter Bewegung erhalten können (Witte et al. 2016), sollten weiterführende Untersuchungsergebnisse zu Verfügung stehen:

Bei der Herstellung autologer Substrate aus Blut zur Sehnenbehandlung ergibt sich zum einen die Notwendigkeit, den Gehalt an Zellen und Wachstumsfaktoren in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren zu erfassen. Dabei sollten auch individuelle Faktoren wie Pferdetyp, Alter, Geschlecht einbezogen werden. Langfristig wäre ein Behandlungsprotokoll für Tendopathien der OBS anzustreben, bei dem die Art der Sehnenläsion und andere individuelle Faktoren sowie die Zusammensetzung des Thrombozytenkonzentrates Berücksichtigung finden. In Bezug auf unterschiedliche Quellen für mesenchymale Stromazellen sollte der therapeutische Effekt von BM-MSCs und AT-MSCs auf natürliche Tendopathien von Pferden direkt *in vivo* verglichen werden.

Hinsichtlich der Wirkung der untersuchten Substrate auf Tendopathien bei lebenden Pferden ergibt sich aus der vorgelegten Arbeit folgendes: Es erscheint sinnvoll, die Wirkung autologer AT-MSCs in einer kontrollierten Untersuchung an natürlich erkrankten Patienten zu überprüfen. Der Effekt autologer Thrombozytenkonzentrate (PRP) auf die Sehnenheilung sollte zu einem früheren Erkrankungsstadium, d.h. wenige Tage nach Entstehung klinischer Erscheinungen, aber noch innerhalb der akuten Entzündungsphase an natürlich erkrankten Patienten kontrolliert überprüft werden. Basierend auf den eigenen Ergebnissen erscheint es sinnvoll, die Wirkung wiederholter Injektionen von autologen Blutprodukten wie PRP und ACS zu überprüfen bzw. mit einmaligen Injektionen zu vergleichen. In einem weiteren Schritt könnten Kombinationen verschiedener Substrate, z.B. AT-MSCs und Thrombozytenlysat kontrolliert untersucht werden.

In zukünftigen kontrollierten Verlaufsuntersuchungen zur Wirkung potentiell regenerativer Substrate an natürlich entstandenen Tendopathien sollten die Pferde hochfrequenter mit der sensitiven und nicht invasiven UTC-Technik untersucht werden. Außerdem müssen weitere Langzeituntersuchungen zur



Ermittlung der Rezidivraten bei Sportpferden innerhalb von 2 Jahren nach der Therapie mit regenerativen Präparaten erfolgen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beziehen sich auf die OBS des Pferdes. Von Interesse sind in zukünftigen Untersuchungen die Effekte der untersuchten Substrate bzw. ihrer Modifikationen auf andere Sehnen- und Bandstrukturen, wie z.B. die klinisch relevanten Abschnitte des equinen Fesselträgers (*M. interosseus medius*), die Seitenbänder des Hufgelenkes und die tiefe Beugesehne.



8 Zusammenfassung

Sehnenerkrankungen der oberflächlichen Beugesehne kommen bei Pferden häufig vor und sind zu meist degenerativer Natur. Aufgrund der langsamen Sehnenheilung und der hohen Rezidivrate besteht ein hohes Interesse daran, die Heilung zu beschleunigen und die Qualität des Ersatzgewebes zu verbessern. Zahlreiche bisher angewendete Verfahren wie die intratendinöse Applikation einer Vielzahl von Therapeutika und chirurgische Ansätze liefern ein unbefriedigendes Ergebnis. Kontrollierte Bewegung mit sukzessive gesteigerten Intervallen gilt als etablierte und effektive Therapieform. Seit ca. 15 Jahren sind bei der Sehnenbehandlung im Pferdebereich potentiell regenerative Therapieverfahren, die auf der Applikation von zumeist autologen Blutprodukten (z.B. thrombozytenreichem Plasma, PRP) und zellreichen Substraten (z.B. mesenchymalen Stromazellen, MSCs) aus Knochenmark und Fettgewebe basieren, in den Fokus der Forschung und klinischen Anwendung gerückt.

Ziel der vorliegenden Habilitationsarbeit war es, verschiedene aktuelle Therapieansätze aus dem Formenkreis der regenerativen Medizin in Bezug auf ihre Bedeutung bei der intraläsionalen Therapie equiner Sehnenerkrankungen näher zu untersuchen. Dabei wurden insbesondere Substrate und Anwendungen berücksichtigt, zu denen während der Konzeption der Untersuchungen keine oder wenige Daten in der Literatur verfügbar waren. Die Ziele der vorliegenden Arbeit gliedern sich in drei Bereiche: 1.) Zunächst sollte untersucht werden, wie sich die Knochenmarkentnahme und die Ausbeute an MSCs aus Knochenmark aus dem equinen Brustbein optimieren lässt und welche Bedeutung die kurzfristige Lagerung von autologen Thrombozytenkonzentraten im Hinblick auf ihren Zell- und Wachstumsfaktorengehalt besitzt. 2.) Das zweite Ziel der Arbeit war die Charakterisierung des diagnostischen Wertes etablierter und neuer Methoden bei der Verlaufskontrolle von Erkrankungen der oberflächlichen Beugesehne. Dazu wurden die klinische Untersuchung und die B-mode- sowie die Farb-Doppler-Sonographie, die Ultrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC), die Feinnadelbiopsie, die histologische Untersuchung sowie mehrere Methoden zur Nachverfolgung des Verbleibs von markierten MSCs („cell tracking“) angewendet (Niederfeld Magnetresonanztomographie am stehenden Pferd, postmortale Licht- und Fluoreszenzmikroskopie, Immunfluoreszenz) 3.) Den dritten Aspekt und Schwerpunkt der Arbeit bildeten zwei tierexperimentelle Untersuchungen und zwei kontrollierte Untersuchungen an Pferden mit natürlichen Sehnenschäden. Dazu wurden die Effekte autologer MSCs aus Fettgewebe (adipose tissue, AT) auf chirurgisch erzeugte Läsionen der oberflächlichen Beugesehne überprüft. Dabei kamen die Ultrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC) und Farb-Doppler-Sonographie sowie finale histologische, biochemische und biomechanische Untersuchungen zum Einsatz. Zudem wurden die Effekte von autologem konditioniertem Serum und eines autologen thrombozytenreichen Plasma produktes auf natürlich entstandene Läsionen der oberflächlichen Beugesehne überprüft. Besondere Aspekte waren die feingewebliche Verlaufskontrolle durch Gewinnung sequentieller Feinnadelbiopate bzw. der Einsatz der UTC-Technik, um die Sehnenheilung im zeitlichen Verlauf zu überwachen.

Die an Brustbeinen vorgenommenen Untersuchungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass das *Sternum* bei Warmblutpferden einheitlich aus 7 Segmenten besteht und das Volumen der *Sternebrae* mit dem Alter der Pferde zunimmt. Die 4. und 5. *Sternebra* erscheinen aufgrund ihrer Kugelform, ihres hohen Volumens, der wenig prominenten *Crista sterni* am ventralen Aspekt dieses Brustbeinabschnittes und der guten Zugänglichkeit am stehenden Pferd am besten für die Punktion geeignet. Die Ultrasonographie ermöglichte eine gute Abschätzung der Dicke des Weichgewebes, die das kaudale Brustbein überlagert, und die Festlegung geeigneter Punktionsstellen. Die gewünschte Eindringtiefe der Kno-



chenmarkpunktionskanüle in das *Sternum* kann durch Messungen am 5. besser als am 4. Brustbeinsegment vorherbestimmt werden. Die Untersuchung zeigte, dass bei beiden *Sternebrae* eine geringe Penetrationstiefe des Brustbeines von ca. 10 mm zur MSC-Gewinnung ausreichend ist, wenngleich eine Tiefe von ca. 30 mm bei gleicher Sicherheit zuverlässiger ausreichende Knochenmarksvolumina liefert. Zusammenfassend zeigte sich, dass die 5. *Sternebra* am besten für die Gewinnung von Knochenmark zur MSC Aufbereitung geeignet ist. Die Kultur und Expansion von MSCs war bei Nutzung von fetalem Kälberserum im Vergleich zu standardisiertem Pferdserum und autologem Serum am effektivsten.

Im Rahmen der Untersuchung zweier *in praxi* gebräuchlicher Thrombozytenkonzentrate zeigte sich, dass die Zubereitungen *ad modum* E-PET (Equine Platelet Enhancement Therapy) und ACP® (Autologous Conditioned Plasma) bei Raumtemperatur mindestens 6 Stunden lang aufbewahrt werden können, ohne dass es zu einem Abfall des Wachstumsfaktorengehaltes kommt. Der Wachstumsfaktorengehalt von Thrombozytenkonzentraten weist je nach Herstellungsverfahren deutliche Unterschiede auf. Ein einheitliches Muster von Abhängigkeiten zwischen den Komponenten der Konzentrate und den gemessenen Wachstumsfaktorkonzentrationen lässt sich vor dem Hintergrund der eigenen Untersuchung nicht darstellen.

Die klinische Untersuchung hatte zu Beginn der Sehnenerkrankung einen hohen diagnostischen Wert und bleibt ein einfach anwendbarer grundlegender Bestandteil der Untersuchung von Pferden mit Tendopathien. Mittels B-mode Sonographie war die tatsächliche Analyse der Sehnenintegrität nur eingeschränkt und indirekt möglich. Etablierte Scores stellten den Untersucher vor Entscheidungsschwierigkeiten. Querschnittsmessungen lieferten ein präziseres Ergebnis, wenn die zu umfahrende Struktur klar demarkiert war. Das Verfahren ermöglicht die Einordnung der eigenen Untersuchungsergebnisse in die Literaturangaben. Die B-mode Ultrasonographie erwies sich zur Nachverfolgung dezent ausgeprägter chirurgisch erzeugter Läsionen als wenig geeignet. Der diagnostische Wert der UTC Untersuchung war im Rahmen von Verlaufsuntersuchungen aufgrund der guten Reproduzierbarkeit und der Unterscheidbarkeit verschiedener Gewebetypen auch bei gering ausgeprägten Sehnenschäden hoch. Im Vergleich zu vorangegangenen Studien konnte bei der Doppler-sonographischen Untersuchung der Sehnen die Intensität des Doppler-Signales durch die Weiterentwicklung des Untersuchungsverfahrens stärker objektiviert und noch präziser erfasst werden. Die Untersuchungstechnik war gut für die nicht-invasive Einschätzung der Perfusion von Tendopathien geeignet. Die Ergebnisse können mit der feingeweblich nachweisbaren Anzahl von Blutgefäßen abgeglichen werden.

Es handelt sich um die erste Studie, in der die wiederholte Feinnadel-Sehnenbiopsie zur Verlaufskontrolle der Sehnenheilung über einen Zeitraum von 24 Wochen bei Pferden angewendet wurde. Die Feinnadel-Sehnenbiopsie stellt ein wertvolles Diagnostikum dar, da sie grundsätzlich eine direkte Beurteilung der feingeweblichen Sehnenstruktur und sogar eine Quantifizierung der immunhistochemisch dargestellten Expression der Kollagentypen I und III erlaubt, die in der vorliegenden Arbeit computergestützt mittels Densiometrie vorgenommen wurde.

Nach einer einmaligen intraläsionalen Behandlung chirurgisch erzeugter Sehnenläsionen mit 10×10^6 autologen AT-MSCs lieferten alle angewendeten Untersuchungsverfahren übereinstimmend Hinweise auf die Präsenz einer hohen Anzahl dieser Zellen im Bereich der Läsionen in einem Zeitraum von bis zu 9 Wochen nach der Applikation. Die frühe Integration („homing“, „engraftment“) der injizierten AT-MSCs in die heilende Sehnenläsion ist wahrscheinlich ein entscheidender Mechanismus dieser Therapieform. *In vivo* Niederfeld MRT-Untersuchungen haben das Potential, als nicht-invasives Verfahren genutzt zu werden, um die Integration von AT-MSCs auch an Pferden mit natürlich entstandenen Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne zu überprüfen.



Eine einmalige intraläsionale Injektion von 10×10^6 kultivierten AT-MSCs, die in autologem inaktiviertem Serum suspendiert wurden, führte bei chirurgisch erzeugten OBS-Läsionen im Vergleich zu einer alleinigen Injektion von autologem inaktiviertem Serum in einem Beobachtungszeitraum von 22 Wochen nicht zu einer Beschleunigung der Abheilung und nicht zu einer nachhaltigen Verbesserung der Qualität des Ersatzgewebes. Die AT-MSC-Behandlung hat möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Quervernetzung („cross-linking“) von Kollagen und damit theoretisch auf die biomechanischen Eigenschaften von Narbengewebe, das sich noch in der Remodellierungsphase befindet, wenngleich die biomechanische Testung keine Unterschiede zwischen der Prüf- und Kontrollgruppe ergab. In der frühen Proliferationsphase der Sehnenheilung kam es nach AT-MSC-Behandlung zu einer erhöhten Perfusion (Doppler-Sonographie) und in der späten Proliferations- und frühen Remodellierungsphase zu einer erhöhten Neovaskularisation (Histologie) der chirurgisch erzeugten Sehnenläsionen. Eine verstärkte Durchblutung von Sehnen legt die Schlussfolgerung einer verbesserten Sehnenheilung in den frühen Phasen des Abheilungsprozesses nahe. Die mittels Doppler-Ultrasonographie festgestellte Perfusionsintensität der Sehne korrelierte am Ende des Untersuchungszeitraumes nicht mit der Anzahl der histologisch und immunhistochemisch (Faktor VIII) nachgewiesenen Gefäßanschnitte.

Eine kontrollierte Untersuchung an Pferden mit natürlich entstandenen OBS-Läsionen lieferte Hinweise darauf, dass eine einmalige Injektion von autologem konditioniertem Serum zu einer frühen Lahmheitsreduktion und zur Verbesserung B-mode ultrasonographischer Parameter während der Proliferations- und frühen Remodellierungsphase beiträgt. Die Auswertung sequentieller Feinnadelbiopate zeigte, dass ACS möglicherweise zu einer reduzierten Proliferation von Tenozyten 5 Wochen nach Behandlung und zu einem Anstieg der Kollagentyp I Expression in der Remodellierungsphase führt, die Ausdruck einer gesteigerten Differenzierung von Sehnenzellen sein könnte.

Die Ergebnisse einer randomisierten Placebo-kontrollierten Untersuchung zeigten, dass eine einmalige intraläsionale PRP-Behandlung von natürlich entstandenen Läsionen der OBS im Vergleich mit einer Placebo-Behandlung zu einer früheren Reduktion der Lahmheit führt. Die ultrasonographische Gewebekarakterisierung machte deutlich, dass Injektionen mit PRP im Zeitrahmen des Umbaus der fibrillären Sehnenmatrix zu Faszikeln zu einer verbesserten Organisation des Ersatzgewebes beiträgt, während die Remodellierung am Ende des Beobachtungszeitraumes noch nicht abgeschlossen war. Nach einer einmaligen PRP-Injektion erreichten innerhalb von 12 Monaten mehr Pferde ihr vorheriges Leistungsniveau als nach Placebo-Behandlung.

Die Berücksichtigung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit trägt dazu bei, Brustbeinpunktionen zu vereinfachen, ihre Komplikationsrisiken zu senken und eine hohe Ausbeute an MSCs aus Knochenmark zu erzielen. Weitere standardisierte Untersuchungen sind erforderlich, um eindeutige Einflussgrößen auf die zu erreichenden Konzentrationen der Wachstumsfaktoren in Thrombozytenkonzentraten zu bestimmen.

Die Betrachtung des diagnostischen Wertes der angewendeten etablierten und neuen Methoden zur Verlaufskontrolle von equinen Sehnenkrankungen zeigte, dass grundsätzlich eine multimodale Aufarbeitung sinnvoll ist, um einen schlüssigen Gesamteindruck vom Heilungsverlauf zu erhalten. Die Einbindung einfach anwendbarer aber weniger sensitiver Verfahren ermöglicht es, einen Bezug zwischen wissenschaftlichen Untersuchungen und der klinischen Anwendung herzustellen. Der diagnostische Wert der UTC-Untersuchung war höher als der der B-mode Ultrasonographie. Eine häufigere Untersuchung im Rahmen von Verlaufskontrollen wäre demnach auch bei Pferden mit natürlichen Sehnenkrankungen sinnvoll.



Die erstmals im Rahmen einer kontrollierten Studie am chirurgischen Sehnenmodell untersuchte Wirkung einer einmaligen intraläsionalen Therapie mit AT-MSCs, bestand im Wesentlichen aus einer deutlichen Anregung der Sehnenperfusion und -vaskularisation. In Folgeuntersuchungen sollte überprüft werden, wie sich der Effekt bei Anwendung dieses Zelltyps an natürlich erkrankten Patienten und bei Änderungen der Zelldosis und des Behandlungsintervalles darstellt. Erstmals werden mit dieser Arbeit zwei kontrollierte Untersuchungen zum Effekt der Blutprodukte ACS und PRP auf natürlich entstandene Tendopathien vorgelegt. Beide Substrate zeigten schwache Effekte auf klinische und ultrasonographische Parameter. Bei zukünftigen Untersuchungen sollte überprüft werden, ob es durch frühere und häufigere Injektionen der untersuchten Blutprodukte zu einer Verstärkung der beobachteten Effekte kommt.



9 Summary

Tendinopathies of the superficial digital flexor tendon (SDFT) have a high incidence and in most cases a degenerative etiology in horses. Due to the slow process of tendon healing and high recurrence rate of tendinopathies there is great interest in strategies to accelerate healing and to improve the quality of the repair tissue. Numerous procedures such as intratendinous application of various therapeutics and surgical approaches do not lead to a satisfactory outcome. Controlled exercise with gradually increasing training intervals is regarded as an established and effective treatment. For approximately 15 years research and clinical application in equine surgery have focused on regenerative strategies for the treatment of tendon disease, mostly based on the injection of autologous blood products (e.g. platelet-rich plasma, PRP) and other cell-based substrates (e.g. mesenchymal stromal cells, MSCs) from bone marrow and adipose tissue.

The aim of the current habilitation thesis was to evaluate the potential value of different novel approaches from the field of regenerative medicine for intralesional therapy of equine tendinopathies. For this purpose substrates and application techniques were considered for which only limited data were available in veterinary medicine. The aim of the thesis was divided into three parts: (i) First, protocols for bone marrow aspiration and to increase the yield of bone marrow derived MSCs (BM-MSCs) from the equine sternum were optimized. In addition, the influence of short-term storage of autologous platelet concentrates on cell numbers and growth factor content was investigated. (ii) The second aim was to characterize the diagnostic value of established and new diagnostic modalities for the follow-up of tendinopathies of the SDFT. To achieve this, clinical examination, B-mode- and colour Doppler ultrasonography, ultrasound tissue characterization (UTC), fine needle biopsy including histology and several cell tracking methods to detect labelled MSCs (in vivo magnetic resonance imaging and post mortem light microscopy, fluorescence microscopy, immunofluorescence, immunohistochemistry) were applied. (iii) The third aspect and main focus of the thesis were two experimental trials using a tendon disease model and two controlled clinical trials in horses with naturally occurring tendon disease. The effects of autologous adipose tissue (AT) derived MSCs on surgically induced SDFT lesions were tested. B-mode- and colour Doppler ultrasonography, UTC, as well as post mortem histology, biochemistry and biomechanical testing were employed. The effects of autologous conditioned serum (ACS) and autologous platelet-rich plasma (PRP) on naturally occurring lesions of the SDFT were investigated. Special emphasis was given to histology and immunohistology using sequential fine needle biopsies and UTC technology, respectively, to monitor tendon healing over time.

Results revealed that the sternum in warmblood horses is consistently composed of 7 segments and that the volume of the sternebrae increases with age. The 4th and 5th sternebrae seem to be most suitable for bone marrow aspiration due to their cuboidal shape, large volume, non-prominent crista sterni and good accessibility in the standing horse. Ultrasonography allowed an adequate estimation of the soft tissue thickness overlying the caudal sternum and determination of appropriate puncture sites. The intended puncture depth of the bone marrow aspiration cannula into the sternum can be pre-determined easier for the 5th than for the 4th sternebra. It was shown that in both sternebrae a lower puncture depth of 10 mm is sufficient to harvest bone marrow for MSC culture. Using a depth of 30 mm for bone marrow aspiration increased the reliability to obtain aspirates with an adequate volume. In summary the 5th sternebra is most suitable for bone marrow aspiration. Culture and expansion of MSCs was most effective using fetal calf serum compared to standardized horse serum and autologous serum.



An evaluation of two frequently used platelet concentrates revealed that preparations ad modum E-PET (equine platelet enhancement therapy) und ACP® (autologous conditioned plasma) can be stored at room temperature over at least 6 hours without loss of growth factor content. Depending on the preparation method used, the growth factor content of platelet concentrates showed significant variations. A general correlation between cellular components of the platelet concentrates and their growth factor contents was not found.

The clinical examination had a high diagnostic value during early phases of tendon disease and remains a basic component of the examination of equine tendinopathies. B-mode ultrasonography only allowed for a limited and indirect analysis of the tendon integrity. Established scores confronted the examiner with decision problems. Cross sectional area measurements led to more precise results provided that the contour of the circumscribed structure was clearly delineated. This methodology allows comparisons between the own research results and published data. B-mode ultrasonography was of limited value to monitor less extensive surgically induced tendon lesions. The diagnostic value of UTC was considered high for follow-up examinations even in subtle artificial tendon lesions due to the high repeatability of this modality and its ability to discriminate between tissue types. Compared to previous studies the intensity of the Doppler-signal was further objectified and recorded more precisely through improvements of the examination procedure. The technology was suitable for non-invasive monitoring of tendon perfusion. Results can be compared to the number of blood vessels determined by histology. For the first time, the present study investigated repeated fine needle biopsies for the monitoring of tendon healing over a 24 week period in horses. Needle tendon biopsies proved to be a valuable diagnostic tool, allowing direct judgement of tendon histology and quantification of collagen types I and III expression by immunohistochemistry and densitometry.

All diagnostic modalities revealed that a single intralesional treatment of surgically induced tendon lesions with 10×10^6 labelled AT-MSCs led to prominent cell accumulation in and near tendon lesions within a 9 week period. The results provide indications that early integration (homing, engraftment) of AT-MSCs into healing tendon tissue is an essential pathway after intralesional administration. In vivo low-field MRI is a non-invasive diagnostic tool having the potential to track the integration of AT-MSCs also in horses with naturally occurring tendinopathies of the SDFT.

A single intralesional injection of 10×10^6 cultured AT-MSCs suspended in autologous inactivated serum into surgically induced SDFT lesions neither led to accelerated healing nor to a substantial improvement of the repair tissue quality over an observation period of 22 weeks compared to autologous inactivated serum alone. Treatment with AT-MSCs might have a positive influence on collagen cross-linking and thereby on biomechanical properties of remodeling scar tissue, however biomechanical testing revealed no significant differences between the verum group and controls. AT-MSC treatment of surgically induced tendon lesions led to an increased perfusion (colour Doppler ultrasonography) in the early proliferation phase of tendon healing and stimulated neovascularization (histology) in the late proliferation and early remodeling phase. An increase in tendon perfusion gives rise to the conclusion that tendon repair is improved after treatment during early phases of healing. The intensity of tendon perfusion as determined by colour Doppler ultrasonography did not correlate with vessel numbers (histology and factor VIII-immunohistochemistry).

A controlled clinical trial in horses with natural SDFT lesions showed that a single injection of ACS contributes to an early reduction of lameness scores and to an improvement of B-mode ultrasonographic parameters during the proliferation- and early remodeling phase. The evaluation of sequential fine needle biopsies revealed that ACS might decrease the proliferation of tenocytes 5 weeks after treatment



and increase their differentiation characterized by elevated collagen type I expression in the remodeling phase.

Results of a randomized placebo-controlled trial revealed that single intralesional treatment of naturally occurring SDFT lesions with PRP leads to an earlier improvement of lameness compared to saline treatment. UTC showed that injections with PRP contribute to an improved organization of scar tissue after 6 months while remodeling still continues. After a single PRP injection more horses reached their previous level of performance within 12 months than after placebo-treatment.

Conclusively, results of the current thesis contribute to an improved protocol for bone marrow aspiration from the equine sternum with reduced complication rates and increased yield of MSCs. Future studies are necessary to standardize platelet concentrate preparations and to identify factors influencing the cytokine content of the final product. Evaluation of the diagnostic value of established and new methods applied for follow-up examinations of equine tendon disease showed that a multimodal approach is useful to monitor the healing process. The use of easy-to-apply but less sensitive modalities such as B-mode ultrasonography enables the comparison of data obtained from scientific studies and clinical applications. UTC-technology was proved to have a higher diagnostic value than B-mode ultrasonography and should be applied more frequently in future studies for follow-up investigations of natural tendon disease. A single intralesional treatment with AT-MSCs, which was evaluated for the first time in a surgical model of tendinopathy mainly demonstrated effects on tendon perfusion and vascularization. In consecutive studies, the therapeutic effect of AT-MSCs should be tested in equine patients with naturally occurring tendon disease. Modifications of cells, cell dose and treatment interval should be considered. For the first time, two controlled studies on effects of the blood products ACS and PRP on naturally occurring tendinopathies in horses are presented. Both substrates showed mild effects on clinical signs and ultrasonographic parameters. Thus, future studies are needed to improve these protocols, e.g. by an earlier and more frequent injection of blood products.



10 Literaturverzeichnis

- Adams, M. K., L. R. Goodrich, S. Rao, F. Olea-Popelka, N. Phillips, J. D. Kisiday, C. W. McIlwraith (2013). Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: are there differences? *Equine Vet J* 45(3): 372-375.
- Alfredson, H., L. Ohberg, S. Forsgren (2003). Is vasculo-neural ingrowth the cause of pain in chronic Achilles tendinosis? An investigation using ultrasonography and colour Doppler, immunohistochemistry, and diagnostic injections. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 11(5): 334-338.
- Amable, P. R., R. B. Carias, M. V. Teixeira, I. da Cruz Pacheco, R. J. Correa do Amaral, J. M. Granjeiro, R. Borojevic (2013). Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther* 4(3): 67.
- Anitua, E., M. de la Fuente, A. Riestra, J. Merayo-Llodes, F. Muruzabal, G. Orive (2015). Preservation of Biological Activity of Plasma and Platelet-Derived Eye Drops After Their Different Time and Temperature Conditions of Storage. *Cornea* 34(9): 1144-1148.
- Arguelles, D., J. U. Carmona, F. Climent, E. Munoz, M. Prades (2008). Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Vet Rec* 162(7): 208-211.
- Aspenberg, P. (2007). Stimulation of tendon repair: mechanical loading, GDFs and platelets. A mini-review. *Int Orthop* 31(6): 783-789.
- Astrom, M. and A. Rausing (1995). Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. *Clin Orthop Relat Res* Jul(316): 151-164.
- Avella, C. S., E. R. Ely, K. L. Verheyen, J. S. Price, J. L. Wood, R. K. Smith (2009). Ultrasonographic assessment of the superficial digital flexor tendons of National Hunt racehorses in training over two racing seasons. *Equine Vet J* 41(5): 449-454.
- Avella, C. S. and R. K. W. Smith (2012). Diagnosis and management of tendon and ligament disorders. In: J. A. Auer and J. A. Stick (eds.) *Equine Surgery*. 4th ed., Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA: 1157-1179.
- Bailey, A. J., R. G. Paul, L. Knott (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev* 106(1-2): 1-56.
- Barberini, D. J., N. P. Freitas, M. S. Magnoni, L. Maia, A. J. Listoni, M. C. Heckler, M. J. Sudano, M. A. Golim, F. da Cruz Landim-Alvarenga, R. M. Amorim (2014). Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res Ther* 5(1): 25.
- Barreira, A. P. B., A. L. Alves, M. E. Salto, R. L. Arnorint, A. Kohayagawa, B. C. Menarim, L. S. Mota (2008). Autologous implant of bone marrow mononuclear cells as treatment of induced equine tendinitis. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 6(1): 46-54.



- Batson, E. L., R. J. Paramour, T. J. Smith, H. L. Birch, J. C. Patterson-Kane, A. E. Goodship (2003). Are the material properties and matrix composition of equine flexor and extensor tendons determined by their functions? *Equine Vet J* 35(3): 314-318.
- Baxter, G. M. and T. S. Stashak (2011). Examination for lameness – history visual exam, palpation, and manipulation. In: G. M. Baxter (ed.) *Adams and Stashak's Lameness in Horses*. 6th ed., Wiley-Blackwell, Chichester, UK: 109-150.
- Becerra, P., M. A. Valdes Vazquez, J. Dudhia, A. R. Fiske-Jackson, F. Neves, N. G. Hartman, R. K. Smith (2013). Distribution of injected technetium(99m)-labeled mesenchymal stem cells in horses with naturally occurring tendinopathy. *J Orthop Res* 31(7): 1096-1102.
- Berggren, P. C. (1981). Aplastic anemia in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 179(12): 1400-1402.
- Berner, D., W. Brehm, K. Gerlach, C. Gittel, J. Offhaus, F. Paebst, D. Scharner, J. Burk (2016). Longitudinal Cell Tracking and Simultaneous Monitoring of Tissue Regeneration after Cell Treatment of Natural Tendon Disease by Low-Field Magnetic Resonance Imaging. *Stem Cells Int* Vol. 2016: Article ID 1207190. doi:10.1155/2016/1207190 Erstmals online publiziert am 10. Jan. 2016.
- Bertone, A. L. (2011). The metacarpus and metatarsus. In: G. M. Baxter (ed.) *Adams and Stashak's Lameness in Horses*. 6th ed., Wiley-Blackwell, Chichester, UK: 621-659.
- Bidder, M., D. A. Towler, R. H. Gelberman, M. I. Boyer (2000). Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor at the repair site of healing canine flexor tendon. *J Orthop Res* 18(2): 247-252.
- Birch, H. L., A. J. Bailey, A. E. Goodship (1998). Macroscopic 'degeneration' of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. *Equine Vet J* 30(6): 534-539.
- Boehart, S., G. Arndt, B. Carstanjen (2010). Ultrasonographic morphometric measurements of digital flexor tendons and ligaments of the palmar metacarpal region in Haflinger horses. *Anat Histol Embryol* 39(4): 366-375.
- Bolas, N. (2011). Basic MRI Principles. In: R. C. Murray (ed.) *Equine MRI*. Wiley-Blackwell, Chichester, UK: 3-37.
- Bosch, G., M. Moleman, A. Barneveld, P. R. van Weeren, H. T. van Schie (2011). The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand J Med Sci Sports* 21(4): 554-561.
- Bosch, G., P. Rene van Weeren, A. Barneveld, H. T. van Schie (2011). Computerised analysis of standardised ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons following treatment with intratendinous platelet rich plasma or placebo. *Vet J* 187(1): 92-98.
- Bosch, G., H. T. van Schie, M. W. de Groot, J. A. Cadby, C. H. van de Lest, A. Barneveld, P. R. van Weeren (2010). Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core



- lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. *J Orthop Res* 28(2): 211-217.
- Boswell, S. G., L. V. Schnabel, H. O. Mohammed, E. A. Sundman, T. Minas, L. A. Fortier (2014). Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am J Sports Med* 42(1): 42-49.
- Bourzac, C., L. C. Smith, P. Vincent, G. Beauchamp, J. P. Lavoie, S. Laverty (2010). Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet J* 42(6): 519-527.
- Bourzac, C. A., J. B. Koenig, K. A. Link, S. G. Nykamp, T. G. Koch (2014). Evaluation of ultrasmall superparamagnetic iron oxide contrast agent labeling of equine cord blood and bone marrow mesenchymal stromal cells. *Am J Vet Res* 75(11): 1010-1017.
- Brinckmann, P., W. Frobin, G. Leivseth (2000). *Orthopädische Biomechanik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Brossi, P. M., J. J. Moreira, T. S. Machado, R. Y. Baccarin (2015). Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Vet Res* 11: 98.
- Buck, C., W. Drommer, R. Wagels, P. Stadler (2002). Scanning electron microscopy examination of tendon biopsies in healthy horses and patients with different stages of tendon healing. *Pferdeheilkunde* 18(6): 521-528.
- Burk, J., D. Berner, W. Brehm, A. Hillmann, C. Horstmeier, C. Josten, F. Paebst, G. Rossi, S. Schubert, A. B. Ahrberg (2016). Long-Term Cell Tracking following Local Injection of Mesenchymal Stromal Cells in the Equine Model of Induced Tendon Disease. *Cell Transplant*. doi: 10.3727/096368916X692104 Erstmals online publiziert am 7. Jul. 2016.
- Burk, J. and W. Brehm (2011). Stem cell therapy of tendon injuries – clinical outcome in 98 cases. *Pferdeheilkunde* 27(2): 153-161.
- Burk, J., C. Gittel, S. Heller, B. Pfeiffer, F. Paebst, A. B. Ahrberg, W. Brehm (2014). Gene expression of tendon markers in mesenchymal stromal cells derived from different sources. *BMC Res Notes* 7: 826.
- Burk, J., A. Plenge, W. Brehm, S. Heller, B. Pfeiffer, C. Kasper (2016). Induction of Tenogenic Differentiation Mediated by Extracellular Tendon Matrix and Short-Term Cyclic Stretching. *Stem Cells Int* Vol. 2016: Article ID 7342379. doi: 10.1155/2016/7342379 Erstmals online publiziert am 18. Aug. 2016.
- Burk, J., I. Ribitsch, C. Gittel, H. Juelke, C. Kasper, C. Staszky, W. Brehm (2013). Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet J* 195(1): 98-106.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25(2): 169-193.



- Cadby, J. A., F. David, C. van de Lest, G. Bosch, P. R. van Weeren, J. G. Snedeker, H. T. van Schie (2013). Further characterisation of an experimental model of tendinopathy in the horse. *Equine Vet J* 45(5): 642-648.
- Caniglia, C. J., M. C. Schramme, R. K. Smith (2012). The effect of intralesional injection of bone marrow derived mesenchymal stem cells and bone marrow supernatant on collagen fibril size in a surgical model of equine superficial digital flexor tendonitis. *Equine Vet J* 44(5): 587-593.
- Carvalho, A. D., A. L. G. Alves, P. G. G. de Oliveira, L. E. C. Alvarez, R. L. Amorim, C. A. Hussni, E. Deffune (2011). Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *Journal of Equine Veterinary Science* 31(1): 26-34.
- Carvalho, A. D., P. R. Badial, L. E. C. Alvarez, A. L. M. Yamada, A. S. Borges, E. Deffune, C. A. Hussni, A. L. G. Alves (2013). Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: a randomized controlled trial. *Stem Cell Research & Therapy* 4(85).
- Carvalho, A. M., A. L. Yamada, M. A. Golim, L. E. Alvarez, C. A. Hussni, A. L. Alves (2014). Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. *Equine Vet J* 46(5): 635-638.
- Ceserani, V., A. Ferri, A. Berenzi, A. Benetti, E. Ciusani, L. Pascucci, C. Bazzucchi, V. Cocce, A. Bonomi, A. Pessina, E. Ghezzi, O. Zeira, P. Ceccarelli, S. Versari, C. Tremolada, G. Alessandri (2016). Angiogenic and anti-inflammatory properties of micro-fragmented fat tissue and its derived mesenchymal stromal cells. *Vasc Cell* 8: 3.
- Charousset, C., A. Zaoui, L. Bellaiche, B. Bouyer (2014). Are multiple platelet-rich plasma injections useful for treatment of chronic patellar tendinopathy in athletes? a prospective study. *Am J Sports Med* 42(4): 906-911.
- Chuen, F. S., C. Y. Chuk, W. Y. Ping, W. W. Nar, H. L. Kim, C. K. Ming (2004). Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. *J Histochem Cytochem* 52(9): 1151-1157.
- Clegg, P. D., S. Strassburg, R. K. Smith (2007). Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. *Int J Exp Pathol* 88(4): 227-235.
- Collins, M. C., P. R. Gunst, W. E. Cascio, A. P. Kypson, B. J. Muller-Borer (2012). Labeling and imaging mesenchymal stem cells with quantum dots. *Methods Mol Biol* 906: 199-210.
- Crass, J. R., R. L. Genovese, J. A. Render, E. M. Bellon (1992). Magnetic-Resonance, Ultrasound and Histopathologic Correlation of Acute and Healing Equine Tendon Injuries. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 33(4): 206-216.
- Crevier-Denoix, N., C. Collobert, P. Pourcelot, J. M. Denoix, M. Sanaa, D. Geiger, N. Bernard, X. Ribot, C. Bortolussi, B. Bousseau (1997). Mechanical properties of pathological equine superficial digital flexor tendons. *Equine Vet J Suppl*(23): 23-26.
- Crovace, A., L. Lacitignola, G. Rossi, E. Francioso (2010). Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. *Vet Med Int* 2010: 250978.



- Dabareiner, R. M., G. K. Carter, M. K. Chaffin (2000). How to perform ultrasound guided-tendon splitting and intralesional tendon injections in the standing horse. In: Proceedings of the 46rd Annual Convention of the AAEP, San Antonio, Texas: 176-179.
- Dahlgren, L. A. and S. C. Harvey (2008). Effect of autologous conditioned serum on the metabolism of normal tendon explants. In: Proceedings of the 54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society; March 2-5. Rosemont, IL, USA. Poster No. 770.
- Dahlgren, L. A., H. O. Mohammed, A. J. Nixon (2005). Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. *J Orthop Res* 23(1): 84-92.
- Dahlgren, L. A., M. C. van der Meulen, J. E. Bertram, G. S. Starrak, A. J. Nixon (2002). Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res* 20(5): 910-919.
- de Vos, R. J., A. Weir, H. T. van Schie, S. M. Bierma-Zeinstra, J. A. Verhaar, H. Weinans and J. L. Tol (2010). Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA* 303(2): 144-149.
- Del Bue, M., S. Ricco, R. Ramoni, V. Conti, G. Gnudi, S. Grolli (2008). Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Veterinary Research Communications* 32: S51-S55.
- Delling, U., K. Lindner, I. Ribitsch, H. Jülke, W. Brehm (2012). Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Can J Vet Res* 76(1): 52-56.
- Desevaux, C., S. Laverty and B. Doize (2000). Sternal bone biopsy in standing horses. *Vet Surg* 29(4): 303-308.
- Divani, K., O. Chan, N. Padhiar, R. Twycross-Lewis, N. Maffulli, T. Crisp, D. Morrissey (2010). Site of maximum neovascularisation correlates with the site of pain in recalcitrant mid-tendon Achilles tendinopathy. *Man Ther* 15(5): 463-468.
- Docheva, D., S. A. Muller, M. Majewski, C. H. Evans (2015). Biologics for tendon repair. *Adv Drug Deliv Rev* 84: 222-239.
- Docking, S. I., C. C. Ooi, D. Connell (2015). Tendinopathy: Is Imaging Telling Us the Entire Story? *J Orthop Sports Phys Ther* 45(11): 842-852.
- Donnelly, B. P., A. J. Nixon, J. L. Haupt, L. A. Dahlgren (2006). Nucleotide structure of equine platelet-derived growth factor-A and -B and expression in horses with induced acute tendinitis. *Am J Vet Res* 67(7): 1218-1225.
- Dowling, B. A., A. J. Dart, D. R. Hodgson, R. K. Smith (2000). Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Vet J* 32(5): 369-378.
- Duffy, M. M., T. Ritter, R. Ceredig, M. D. Griffin (2011). Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther* 2(4): 34.



- Durando, M. M., L. Zarucco, T. P. Schaer, M. Ross, V. B. Reef (2006). Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine Veterinary Education* 18(2): 75-79.
- Dyson, S., R. Murray, M. J. Pinilla (2015). Proximal suspensory desmopathy in hindlimbs: A correlative clinical, ultrasonographic, gross post mortem and histological study. *Equine Vet J*. doi: 10.1111/evj.12563. Erstmals publiziert am 10. Feb. 2016
- Dyson, S. J. (2004). Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet J* 36(5): 415-419.
- Dyson, S. J. (2011). Superficial digital flexor tendonitis in event horses, show Jumpers, dressage horses and pleasure horses. In: M. W. Ross and S. J. Dyson (eds.) *Diagnosis and Management of Lameness in the Horses*. 2nd ed., Elsevier, Saunders, St. Louis, Missouri, USA: 721-726.
- Edinger, J. (2010). Orthopädische Untersuchung der Gliedmaßen und der Wirbelsäule. In: H. Wissdorf, H. Gerhards, B. Huskamp and E. Deegen (Hrsg.) *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes*. 2. Aufl., M. u. H. Schaper, Hannover: S. 890-926.
- El-Sharkawy, H., A. Kantarci, J. Deady, H. Hasturk, H. Liu, M. Alshahat, T. E. Van Dyke (2007). Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol* 78(4): 661-669.
- Engelbrechtsen, L., K. Steffen, J. Alsousou, E. Anitua, N. Bachl, R. Devilee, P. Everts, B. Hamilton, J. Huard, P. Jenoure, F. Kelberine, E. Kon, N. Maffulli, G. Matheson, O. Mei-Dan, J. Menetrey, M. Philippon, P. Randelli, P. Schamasch, M. Schweltnus, A. Vernece, G. Verrall (2010). IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *Br J Sports Med* 44(15): 1072-1081.
- Estrada, R. J., P. R. Van Weeren, C. H. A. Van de Lest, J. Boere, M. Reyes, J. C. Ionita, M. Estrada, C. J. Lischer (2014). Comparison of healing in forelimb and hindlimb surgically induced core lesions of the equine superficial digital flexor tendon. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 27(5): 358-365.
- Estrada, R. J., R. van Weeren, C. H. A. van de Lest, J. Boere, M. Reyes, J. C. Ionita, M. Estrada, C. J. Lischer (2014). Effects of Autologous Conditioned Plasma (R) (ACP) on the healing of surgically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendon. *Pferdeheilkunde* 30(6): 633-642.
- Evans, J. H. and J. C. Barbenel (1975). Structural and mechanical properties of tendon related to function. *Equine Vet J* 7(1): 1-8.
- Eyre, D. R., M. A. Paz, P. M. Gallop (1984). Cross-Linking in Collagen and Elastin. *Annual Review of Biochemistry* 53: 717-748.
- Fenwick, S. A., B. L. Hazleman, G. P. Riley (2002). The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res* 4(4): 252-260.
- Fortier, L. A., A. J. Nixon, J. Williams, C. S. Cable (1998). Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 59(9): 1182-1187.



- Fortier, L. A. and R. K. Smith (2008). Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 24(1): 191-201.
- Frank, C., D. McDonald, N. Shrive (1997). Collagen fibril diameters in the rabbit medial collateral ligament scar: a longer term assessment. *Connect Tissue Res* 36(3): 261-269.
- Friedenstein, A. J., U. F. Deriglasova, N. N. Kulagina, A. F. Panasuk, S. F. Rudakowa, E. A. Luria, I. A. Ruadkow (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2(2): 83-92.
- Frisbie, D. D., C. E. Kawcak, N. M. Werpy, R. D. Park, C. W. McIlwraith (2007). Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res* 68(3): 290-296.
- Garg, A. K., R. A. Berg, F. H. Silver, H. G. Garg (1989). Effect of proteoglycans on type I collagen fibre formation. *Biomaterials* 10(6): 413-419.
- Garner, W. L., J. A. McDonald, M. Koo, C. Kuhn, 3rd, P. M. Weeks (1989). Identification of the collagen-producing cells in healing flexor tendons. *Plast Reconstr Surg* 83(5): 875-879.
- Garrett, K. S., L. R. Bramlage, D. L. Spike-Pierce, N. D. Cohen (2013). Injection of platelet- and leukocyte-rich plasma at the junction of the proximal sesamoid bone and the suspensory ligament branch for treatment of yearling Thoroughbreds with proximal sesamoid bone inflammation and associated suspensory ligament branch desmitis. *J Am Vet Med Assoc* 243(1): 120-125.
- Gaughan, E. M., A. J. Nixon, L. P. Krook, A. E. Yeager, K. A. Mann, H. Mohammed, D. L. Bartel (1991). Effects of sodium hyaluronate on tendon healing and adhesion formation in horses. *Am J Vet Res* 52(5): 764-773.
- Genovese, R., K. Longo, B. Berthold, J. Jorgenson (1997). Quantitative Sonographic Assessment in the Clinical Management of Superficial Digital Flexor Injuries in Thoroughbred Racehorses. In: *Proceedings of the 43rd Annual Convention of the AAEP, Phoenix, Arizona*: 285-290.
- Genovese, R. L., N. W. Rantanen, M. L. Hauser, B. S. Simpson (1986). Diagnostic ultrasonography of equine limbs. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2(1): 145-226.
- Genovese, R. L., N. W. Rantanen, B. S. Simpson, D. M. Simpson (1990). Clinical experience with quantitative analysis of superficial digital flexor tendon injuries in Thoroughbred and Standardbred racehorses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 6(1): 129-145.
- Gillis, C., N. Sharkey, S. M. Stover, R. R. Pool, D. M. Meagher, N. Willits (1995). Ultrasonography as a method to determine tendon cross-sectional area. *Am J Vet Res* 56(10): 1270-1274.
- Gillis, C. L. (1997). Rehabilitation of Tendon and Ligament Injuries. In: *Proceedings of the 43rd Annual Convention of the AAEP, Phoenix, Arizona*: 306-309.
- Giraldo, C. E., C. Lopez, M. E. Alvarez, I. J. Samudio, M. Prades, J. U. Carmona (2013). Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet Res* 9: 29.



- Gittel, C., W. Brehm, J. Burk, H. Juelke, C. Staszky, I. Ribitsch (2013). Isolation of equine multipotent mesenchymal stromal cells by enzymatic tissue digestion or explant technique: comparison of cellular properties. *BMC Vet Res* 9: 221.
- Godwin, E. E., N. J. Young, J. Dudhia, I. C. Beamish, R. K. Smith (2012). 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* 44(1): 25-32.
- Goodship, A. E., H. L. Birch, A. M. Wilson (1994). The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *Vet Clin North Am Equine Pract* 10(2): 323-349.
- Guest, D. J., M. R. Smith, W. R. Allen (2008). Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Vet J* 40(2): 178-181.
- Guest, D. J., M. R. Smith, W. R. Allen (2010). Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J* 42(7): 636-642.
- Heisterbach, P. E., A. Todorov, R. Fluckiger, C. H. Evans, M. Majewski (2012). Effect of BMP-12, TGF-beta1 and autologous conditioned serum on growth factor expression in Achilles tendon healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20(10): 1907-1914.
- Henninger, R. W., R. W. Bramlage, M. Bailey, A. L. Bertone, S. E. Weisbrode (1992). Effects of Tendon Splitting on Experimentally-Induced Acute Equine Tendinitis. *Vet Comp Orthop Traumatol* 1(1): 5-13.
- Herthel, D. (2001). Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components. In: *Proceedings of the 47th Annual Convention of the AAEP, San Diego, California*: 319-321.
- Hessel, L. N., G. Bosch, P. R. van Weeren, J. C. Ionita (2015). Equine autologous platelet concentrates: A comparative study between different available systems. *Equine Vet J* 47(3): 319-325.
- Hofer, H. R. and R. S. Tuan (2016). Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Res Ther* 7(1): 131.
- Hraha, T. H., K. M. Doremus, C. W. McIlwraith, D. D. Frisbie (2011). Autologous conditioned serum: the comparative cytokine profiles of two commercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood. *Equine Vet J* 43(5): 516-521.
- Iozzo, R. V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67: 609-652.
- Ishihara, A., H. J. Helbig, R. B. Sanchez-Hodge, M. L. Wellman, M. D. Landrigan, A. L. Bertone (2013). Performance of a gravitational marrow separator, multidirectional bone marrow aspiration needle, and repeated bone marrow collections on the production of concentrated bone marrow and separation of mesenchymal stem cells in horses. *Am J Vet Res* 74(6): 854-863.



- Jacobs, R. M., G. J. Kociba, W. W. Ruoff (1983). Monoclonal gammopathy in a horse with defective hemostasis. *Vet Pathol* 20(5): 643-647.
- Jacobson, E., A. J. Dart, T. Mondori, N. Horadogoda, L. B. Jeffcott, C. B. Little, M. M. Smith (2015). Focal experimental injury leads to widespread gene expression and histologic changes in equine flexor tendons. *PLoS One* 10(4): e0122220.
- Jann, H. and T. S. Stashak (2008). Tendon and Paratendon Lacerations. In: T. S. Stashak and C. L. Theoret (eds.) *Equine Wound Management*. 2nd ed., Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA: 489-508.
- Jorgensen, J. S., R. L. Genovese, M. W. Ross (2011). Superficial digital flexor tendonitis in racehorses. In: M. W. Ross and S. J. Dyson (eds.) *Diagnosis and Management of Lameness in the Horses*. 2nd ed., Elsevier, Saunders, St. Louis, Missouri, USA: 706-715.
- Jülke, H., C. Veit, I. Ribitsch, W. Brehm, E. Ludewig, U. Delling (2015). Comparative Labeling of Equine and Ovine Multipotent Stromal Cells With Superparamagnetic Iron Oxide Particles for Magnetic Resonance Imaging In Vitro. *Cell Transplant* 24(6): 1111-1125.
- Kannus, P. (2000). Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 10(6): 312-320.
- Karlin, W. M., A. A. Stewart, S. S. Durgam, J. F. Naughton, K. J. O'Dell-Anderson, M. C. Stewart (2011). Evaluation of experimentally induced injury to the superficial digital flexor tendon in horses by use of low-field magnetic resonance imaging and ultrasonography. *Am J Vet Res* 72(6): 791-798.
- Kasashima, Y., A. Kuwano, Y. Katayama, Y. Taura, T. Yoshihara (2002). Magnetic resonance imaging application to live horse for diagnosis of tendinitis. *J Vet Med Sci* 64(7): 577-582.
- Kasashima, Y., T. Takahashi, R. K. Smith, A. E. Goodship, A. Kuwano, T. Ueno, S. Hirano (2004). Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine Vet J* 36(4): 346-350.
- Kasashima, Y., T. Ueno, A. Tomita, A. E. Goodship, R. K. Smith (2011). Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet J* 43(3): 288-294.
- Kastelic, J., A. Galeski, E. Baer (1978). The multicomposite structure of tendon. *Connect Tissue Res* 6(1): 11-23.
- Kisiday, J. D., L. R. Goodrich, C. W. McIlwraith, D. D. Frisbie (2013). Effects of equine bone marrow aspirate volume on isolation, proliferation, and differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 74(5): 801-807.
- Koch, T. G., L. C. Berg, D. H. Betts (2008). Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can Vet J* 49(10): 1009-1017.
- Kol, A., N. J. Walker, L. D. Galuppo, K. C. Clark, S. Buerchler, A. Bernanke, D. L. Borjesson (2013). Autologous point-of-care cellular therapies variably induce equine mesenchymal stem cell migration, proliferation and cytokine expression. *Equine Vet J* 45(2): 193-198.



- Kotani, H., Y. Taura, A. Sakai, T. Tsuka, Y. Kageyama, M. Nakaichi (2000). Antemortem evaluation for magnetic resonance imaging of the equine flexor tendon. *J Vet Med Sci* 62(1): 81-84.
- Kraus-Hansen, A. E., G. E. Fackelman, C. Becker, R. M. Williams, F. S. Pipers (1992). Preliminary studies on the vascular anatomy of the equine superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J* 24(1): 46-51.
- Kristoffersen, M., L. Ohberg, C. Johnston, H. Alfredson (2005). Neovascularisation in chronic tendon injuries detected with colour Doppler ultrasound in horse and man: implications for research and treatment. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 13(6): 505-508.
- Kullmann, A., M. Sanz, G. T. Fosgate, M. N. Saulez, P. C. Page, E. Rioja (2014). Effects of xylazine, romifidine, or detomidine on hematology, biochemistry, and splenic thickness in healthy horses. *Can Vet J* 55(4): 334-340.
- Künneke, A., H. Jaugstetter, P. Heyers (2008). Bone marrow-autologous conditioned plasma (BM-ACP) beim Pferd – erste klinische Erfahrungen einer neuen, autologen Therapieform bei der Behandlung von Sehnenerkrankungen des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 24(4): 519-523.
- Latimer, K. S. and C. B. Andreasen (2002). Bone Marrow. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse*. R. L. Cowell and R. D. Tyler. St. Louis, Missouri, Mosby: 217-226.
- Lee, D. H., S. D. Joo, S. B. Han, J. Im, S. H. Lee, C. H. Sonn, K. M. Lee (2011). Isolation and expansion of synovial CD34(-)CD44(+)CD90(+) mesenchymal stem cells: comparison of an enzymatic method and a direct explant technique. *Connect Tissue Res* 52(3): 226-234.
- Leece, E. (2011). High-field MRI in horses: practicalities and image acquisition. In: R. C. Murray (ed.) *Equine MRI*. Wiley-Blackwell, Chichester, UK: 39-74.
- Lewandowski, K., M. M. Kowalik, R. Pawlaczyk, J. Rogowski, A. Hellmann (2012). Microscopic examination of bone marrow aspirate in healthy adults – comparison of two techniques of slide preparation. *Int J Lab Hematol* 34(3): 254-261.
- Lietzau, M. (2014). Therapie von natürlich vorkommenden Sehnenerkrankungen beim Pferd mit autologem konditioniertem Serum (irap®). Hannover, Tierärztl. Hochsch., unveröffentlichte Diss.
- Little, D. and M. C. Schramme (2006). Ultrasonographic and MRI evaluation of a novel tendonitis model in the horse. *Vet Surg* 35(6): E15.
- Lombana, K. G., L. R. Goodrich, J. N. Phillips, J. D. Kisiday, A. Ruple-Czerniak, C. W. McIlwraith (2015). An Investigation of Equine Mesenchymal Stem Cell Characteristics from Different Harvest Sites: More Similar Than Not. *Front Vet Sci* 2: 67.
- Lui, P. P., N. Maffulli, C. Rolf, R. K. Smith (2011). What are the validated animal models for tendinopathy? *Scand J Med Sci Sports* 21(1): 3-17.
- Maia, L., M. V. de Souza, J. I. Ribeiro, A. C. de Oliveira, G. E. S. Alves, L. D. Benjamin, Y. F. R. S. Silva, B. M. Zandim, J. D. L. Moreira (2009). Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Induced



- Tendinopathy in Horses: Histologic Evaluation. *Journal of Equine Veterinary Science* 29(8): 618-626.
- Majewski, M., P. E. Ochsner, F. Liu, R. Fluckiger, C. H. Evans (2009). Accelerated healing of the rat Achilles tendon in response to autologous conditioned serum. *Am J Sports Med* 37(11): 2117-2125.
- Mazzocca, A. D., M. B. McCarthy, D. M. Chowanec, E. M. Dugdale, D. Hansen, M. P. Cote, J. P. Bradley, A. A. Romeo, R. A. Arciero, K. Beitzel (2012). The positive effects of different platelet-rich plasma methods on human muscle, bone, and tendon cells. *Am J Sports Med* 40(8): 1742-1749.
- Mazzocca, A. D., M. B. McCarthy, J. Intravia, K. Beitzel, J. Apostolakos, M. P. Cote, J. Bradley, R. A. Arciero (2013). An in vitro evaluation of the anti-inflammatory effects of platelet-rich plasma, ketorolac, and methylprednisolone. *Arthroscopy* 29(4): 675-683.
- McCarrel, T. and L. Fortier (2009). Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res* 27(8): 1033-1042.
- Meijer, H., J. Reinecke, C. Becker, G. Tholen, P. Wehling (2003). The production of anti-inflammatory cytokines in whole blood by physico-chemical induction. *Inflamm Res* 52(10): 404-407.
- Mishra, A. and T. Pavelko (2006). Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med* 34(11): 1774-1778.
- Monto, R. R. (2012). Platelet rich plasma treatment for chronic Achilles tendinosis. *Foot Ankle Int* 33(5): 379-385.
- Movin, T., A. Gad, F. P. Reinholt, C. Rolf (1997). Tendon pathology in long-standing achillodynia. Biopsy findings in 40 patients. *Acta Orthop Scand* 68(2): 170-175.
- Movin, T., P. Guntner, A. Gad, C. Rolf (1997). Ultrasonography-guided percutaneous core biopsy in Achilles tendon disorder. *Scand J Med Sci Sports* 7(4): 244-248.
- Murata, D., K. Misumi, M. Fujiki (2012). A preliminary study of diagnostic color Doppler ultrasonography in equine superficial digital flexor tendonitis. *J Vet Med Sci* 74(12): 1639-1642.
- Nickel, R., A. Schummer, K.-H. Wille, H. Wilkens (1992). Passiver Bewegungsapparat, Skelettsystem. In: R. Nickel, A. Schummer, E. H. Seiferle (Hrsg.) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band I. 6. Aufl., Paul Parey, Berlin und Hamburg: S. 15-272.
- Nicoll, R. G., A. K. Wood, T. L. Rothwell (1992). Ultrasonographical and pathological studies of equine superficial digital flexor tendons; initial observations, including tissue characterisation by analysis of image grey scale, in a thoroughbred gelding. *Equine Vet J* 24(4): 318-320.
- Nixon, A. J., L. A. Dahlgren, J. L. Haupt, A. E. Yeager, D. L. Ward (2008). Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am J Vet Res* 69(7): 928-937.



- Ohberg, L., R. Lorentzon, H. Alfredson (2001). Neovascularisation in Achilles tendons with painful tendinosis but not in normal tendons: an ultrasonographic investigation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 9(4): 233-238.
- Orlando, C., P. Pinzani, M. Pazzagli (1998). Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 36(5): 255-269.
- Oshita, T., M. Tobita, S. Tajima, H. Mizuno (2016). Adipose-Derived Stem Cells Improve Collagenase-Induced Tendinopathy in a Rat Model. *Am J Sports Med* 44(8): 1983-1989.
- Pacini, S., S. Spinabella, L. Trombi, R. Fazzi, S. Galimberti, F. Dini, F. Carlucci, M. Petrini (2007). Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng* 13(12): 2949-2955.
- Patterson-Kane, J. C. and E. C. Firth (2009). The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. *Vet J* 181(2): 79-89.
- Patterson-Kane, J. C., D. A. Parry, H. L. Birch, A. E. Goodship, E. C. Firth (1997). An age-related study of morphology and cross-link composition of collagen fibrils in the digital flexor tendons of young thoroughbred horses. *Connect Tissue Res* 36(3): 253-260.
- Pickersgill, C. H., C. M. Marr, S. W. Reid (2001). Repeatability of diagnostic ultrasonography in the assessment of the equine superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J* 33(1): 33-37.
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42(4): 405-426.
- Ranera, B., L. Ordovas, J. Lyahyai, M. L. Bernal, F. Fernandes, A. R. Remacha, A. Romero, F. J. Vazquez, R. Osta, C. Cons, L. Varona, P. Zaragoza, I. Martin-Burriel, C. Rodellar (2012). Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Vet J* 44(1): 33-42.
- Rantanen, N. W. (1982). The use of diagnostic ultrasound in limb disorders of the horse: A preliminary report. *J Equine Vet Sci* 2(2): 62-64.
- Rantanen, N. W., M. L. Hauser, R. L. Genovese (1985). Superficial digital flexor tendinitis; diagnosis using real-time ultrasound imaging. *J Equine Vet Sci* 5(2): 115-119.
- Rantanen, N. W., J. S. Jorgensen, R. L. Genovese (2003). Ultrasonographic evaluation of the equine limb: technique. In: M. W. Ross and S. J. Dyson (eds.) *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA: 166-188.
- Redding, W. R. (2011). Ultrasound. In: G. M. Baxter (ed.) *Adams and Stashak's Lameness in Horses*. 6th ed., Wiley-Blackwell, Chichester, UK: 338-376.
- Reef, V. B. (1998). Physics and Instrumentation. In: V. B. Reef (ed.) *Equine Diagnostic Ultrasound*. W.B. Saunders, Philadelphia, USA: 1-23.
- Reef, V. B., R. L. Genovese, W. M. Davis (1997). Initial long-term results of horses with superficial flexor tendinitis treated with intralesional beta-aminopropionitrile fumarate. In: *Proceedings of the 43rd Annual Convention of the AAEP*, Phoenix, Arizona: 301-305.



- Reef, V. B., B. B. Martin, A. Elser (1988). Types of tendon and ligament injuries detected with diagnostic ultrasound: description and follow-up. In: Proceedings of the 34th Annual Convention of the AAEP: 245-247.
- Richards, P. J., T. Win, P. W. Jones (2005). The distribution of microvascular response in Achilles tendonopathy assessed by colour and power Doppler. *Skeletal Radiol* 34(6): 336-342.
- Richardson, L. E., J. Dudhia, P. D. Clegg, R. Smith (2007). Stem cells in veterinary medicine-attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol* 25(9): 409-416.
- Riemersma, D. J. and H. C. Schamhardt (1985). In vitro mechanical properties of equine tendons in relation to cross-sectional area and collagen content. *Res Vet Sci* 39(3): 263-270.
- Riley, G. (2004). The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology (Oxford)* 43(2): 131-142.
- Rinnovati, R., N. Romagnoli, F. Gentilini, C. Lambertini, A. Spadari (2016). The influence of environmental variables on platelet concentration in horse platelet-rich plasma. *Acta Vet Scand* 58(1): 45.
- Roggel, F. (2013). Ultrasonographische und histologische Untersuchungen von künstlich erzeugten und mit kultivierten mesenchymalen stromalen Zellen aus Fettgewebe (AT-MSCs) behandelten Läsionen der oberflächlichen Beugesehne bei Pferden. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Russell, J. W., T. M. Russell, J. R. Vasey, M. S. Hall (2016). Autologous bone marrow aspirate for treatment of superficial digital flexor tendonitis in 105 racehorses. *Vet Rec* 179(3): 69.
- Russell, K. F., D. C. Sellon, C. B. Grindem (1994). Bone marrow in horses: Indications, sample handling, and complications. *Comp cont Educ pract Vet* 16: 1359-1365.
- Sawdon, H., J. V. Yovich, T. Booth (1996). Superficial digital flexor tendonitis in racehorses: Long term follow up of conservatively managed cases. *Aust Vet J* 14(1): 21-25.
- Scharf, A., S. Holmes, M. Thoresen, J. Mumaw, A. Stumpf, J. Peroni (2015). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a means to track mesenchymal stem cells in a large animal model of tendon injury. *Contrast Media Mol Imaging* 10(5): 388-397.
- Schmidt, H. (1989). Die Behandlung akuter und chronischer Sehnenerkrankungen beim Pferd mit hochmolekularer Hyaluronsäure. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Schnabel, L. V., M. E. Lynch, M. C. van der Meulen, A. E. Yeager, M. A. Kornatowski, A. J. Nixon (2009). Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 27(10): 1392-1398.
- Schnabel, L. V., H. O. Mohammed, B. J. Miller, W. G. McDermott, M. S. Jacobson, K. S. Santangelo, L. A. Fortier (2007). Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 25(2): 230-240.



- Schnabel, L. V., H. O. Sonea, M. S. Jacobson, L. A. Fortier (2008). Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explant cultures. *Equine Vet J* 40(3): 260-265.
- Schramme, M., S. Hunter, N. Campbell, A. Blikslager, R. Smith (2010). A surgical tendonitis model in horses: Technique, clinical, ultrasonographic and histological characterisation. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 23(4): 231-239.
- Schramme, M., Z. Kerekes, S. Hunter, R. Labens (2010). MR imaging features of surgically induced core lesions in the equine superficial digital flexor tendon. *Vet Radiol Ultrasound* 51(3): 280-287.
- Schu, S., M. Nosov, L. O'Flynn, G. Shaw, O. Treacy, F. Barry, M. Murphy, T. O'Brien, T. Ritter (2012). Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 16(9): 2094-2103.
- Seiferle, E. und J. Frewein (1992). Aktiver Bewegungsapparat, Muskelsystem, Myologia. In: R. Nickel, A. Schummer, E. H. Seiferle (Hrsg.) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band I. 6. Aufl., Paul Parey, Berlin und Hamburg: S. 479-492.
- Sharma, P. and N. Maffulli (2005). Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 87(1): 187-202.
- Sharma, P. and N. Maffulli (2006). Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6(2): 181-190.
- Shoulders, M. D. and R. T. Raines (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 78: 929-958.
- Silver, I. A., P. N. Brown, A. E. Goodship, L. E. Lanyon, K. G. McCullagh, G. C. Perry, I. F. Williams (1983). A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine Vet J Suppl Jul*(1): 1-43.
- Smith, R. K. W. (2008). Stem cell therapy for tendon and ligament injuries in the horse – technique and outcome. *Pferdeheilkunde* 24(4): 513-518.
- Smith, R. K., M. Korda, G. W. Blunn, A. E. Goodship (2003). Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J* 35(1): 99-102.
- Smith, R. K. and C. W. McIlwraith (2012). Consensus on equine tendon disease: building on the 2007 Havemeyer symposium. *Equine Vet J* 44(1): 2-6.
- Smith, R., W. McIlwraith, R. Schweizer, K. Kadler, J. Cook, B. Caterson, S., Dakin, D. Heinegård, H. Screen, S. Stover, N. Crevier-Denoix, P. Clegg, M. Collins, C. Little, D. Frisbie, M. Kjaer, R. van Weeren, N. Werpy, J.M. Denoix, A. Carr, A. Goldberg, L. Bramlage, M. Smith, A. Nixon (2014). Advances in the understanding of tendinopathies: a report on the Second Havemeyer Workshop on equine tendon disease. *Equine Vet J*. Jan;46(1): 4-9.



- Smith, J. J., M. W. Ross, R. K. Smith (2006). Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. *Vet Comp Orthop Traumatol* 19(1): 43-47.
- Smith, R. K. and P. M. Webbon (2005). Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? *Br J Sports Med* 39(9): 582-584.
- Smith, R. K., N. J. Werling, S. G. Dakin, R. Alam, A. E. Goodship, J. Dudhia (2013). Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *PLoS One* 8(9): e75697.
- Sodersten, F., K. Hultenby, D. Heinegard, C. Johnston, S. Ekman (2013). Immunolocalization of collagens (I and III) and cartilage oligomeric matrix protein in the normal and injured equine superficial digital flexor tendon. *Connect Tissue Res* 54(1): 62-69.
- Sohni, A. and C. M. Verfaillie (2013). Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int* Vol. 2013: Article ID 130763. doi: 10.1155/2013/130763.
- Sole, A., M. Spriet, L. D. Galuppo, K. A. Padgett, D. L. Borjesson, E. R. Wisner, R. J. Brosnan, M. A. Vidal (2012). Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using (99m) Tc-HMPAO. *Equine Vet J* 44(5): 594-599.
- Sole, A., M. Spriet, K. A. Padgett, B. Vaughan, L. D. Galuppo, D. L. Borjesson, E. R. Wisner, M. A. Vidal (2013). Distribution and persistence of technetium-99 hexamethyl propylene amine oxime-labelled bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced tendon lesions after intratendinous injection and regional perfusion of the equine distal limb. *Equine Vet J* 45(6): 726-731.
- Sutter, W. W., A. J. Kaneps, A. L. Bertone (2004). Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *Am J Vet Res* 65(7): 924-930.
- Textor, J. (2011). Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *Vet Clin North Am Equine Pract* 27(2): 275-298.
- Textor, J. A., J. W. Norris, F. Tablin (2011). Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. *Am J Vet Res* 72(2): 271-278.
- Textor, J. A., N. H. Willits, F. Tablin (2013). Synovial fluid growth factor and cytokine concentrations after intra-articular injection of a platelet-rich product in horses. *Vet J* 198(1): 217-223.
- Thorpe, C. T., P. D. Clegg, H. L. Birch (2010). A review of tendon injury: why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? *Equine Vet J* 42(2): 174-180.
- Thorpe, C. T., R. J. Stark, A. E. Goodship, H. L. Birch (2010). Mechanical properties of the equine superficial digital flexor tendon relate to specific collagen cross-link levels. *Equine Vet J Suppl*(38): 538-543.



- Tipton, T. E., C. S. Ray, D. R. Hand (2013). Superficial digital flexor tendonitis in cutting horses: 19 cases (2007-2011). *J Am Vet Med Assoc* 243(8): 1162-1165.
- Toricelli, P., M. Fini, G. Filardo, M. Tschon, M. Pischedda, A. Pacorini, E. Kon, R. Giardino (2011). Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *Int Orthop* 35(10): 1569-1576.
- Tsukiyama, K., J. A. Acorda, H. Yamada (1996). Evaluation of superficial digital flexor tendinitis in racing horses through gray scale histogram analysis of tendon ultrasonograms. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 37(1): 46-50.
- Tsuzaki, M., M. Yamauchi, A. J. Banes (1993). Tendon collagens: extracellular matrix composition in shear stress and tensile components of flexor tendons. *Connect Tissue Res* 29(2): 141-152.
- Turner, T. A. (1991). Thermography as an aid to the clinical lameness evaluation. *Vet Clin North Am Equine Pract* 7(2): 311-338.
- Ulrich, R., W. Baumgartner, I. Gerhauser, F. Seeliger, V. Haist, U. Deschl, S. Alldinger (2006). MMP-12, MMP-3, and TIMP-1 are markedly upregulated in chronic demyelinating theiler murine encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(8): 783-793.
- van Schie, H. T., E. M. Bakker, W. Cherdchutham, A. M. Jonker, C. H. van de Lest, P. R. van Weeren (2009). Monitoring of the repair process of surgically created lesions in equine superficial digital flexor tendons by use of computerized ultrasonography. *Am J Vet Res* 70(1): 37-48.
- van Schie, H. T., E. M. Bakker, A. M. Jonker, P. R. van Weeren (2000). Ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of gray level statistics. *Am J Vet Res* 61(2): 210-219.
- van Schie, H. T., E. M. Bakker, A. M. Jonker, P. R. van Weeren (2001). Efficacy of computerized discrimination between structure-related and non-structure-related echoes in ultrasonographic images for the quantitative evaluation of the structural integrity of superficial digital flexor tendons in horses. *Am J Vet Res* 62(7): 1159-1166.
- van Schie, H. T., E. M. Bakker, A. M. Jonker, P. R. van Weeren (2003). Computerized ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of stability quantification of echo patterns in contiguous transverse ultrasonographic images. *Am J Vet Res* 64(3): 366-375.
- van Schie, J. T., E. M. Bakker, P. R. van Weeren (1999). Ultrasonographic evaluation of equine tendons: a quantitative in vitro study of the effects of amplifier gain level, transducer-tilt, and transducer-displacement. *Vet Radiol Ultrasound* 40(2): 151-160.
- Veronesi, F., F. Salamanna, M. Tschon, M. Maglio, N. Nicoli Aldini, M. Fini (2016). Mesenchymal stem cells for tendon healing: what is on the horizon? *J Tissue Eng Regen Med*. doi: 10.1002/term.2209. Erstmals online publiziert am 6. Sep. 2016



- Vidal, M. A., G. E. Kilroy, J. R. Johnson, M. J. Lopez, R. M. Moore, J. M. Gimble (2006). Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Vet Surg* 35(7): 601-610.
- Vidal, M. A., G. E. Kilroy, M. J. Lopez, J. R. Johnson, R. M. Moore, J. M. Gimble (2007). Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg* 36(7): 613-622.
- Vieira, M. H., R. J. Oliveira, L. P. Eca, I. S. Pereira, L. C. Hermeto, R. Matuo, W. S. Fernandes, R. A. Silva, A. C. Antonioli (2014). Therapeutic potential of mesenchymal stem cells to treat Achilles tendon injuries. *Genet Mol Res* 13(4): 10434-10449.
- Wagels, R., K. Rühmann, P. Stadler, W. Drommer (2001). Feinnadelbiopsie aus den Beugesehnen des Pferdes. *Tierärztl Prax Ausg G* 29(4): 199-205.
- Waselau, M., W. W. Sutter, R. L. Genovese, A. L. Bertone (2008). Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc* 232(10): 1515-1520.
- Watkins, J. P., J. A. Auer, S. J. Morgan, S. Gay (1985). Healing of surgically created defects in the equine superficial digital flexor tendon: effects of pulsing electromagnetic field therapy on collagen-type transformation and tissue morphologic reorganization. *Am J Vet Res* 46(10): 2097-2103.
- Webbon, P. M. (1982). Preliminary-Study of Tendon Biopsy in the Horse. *Equine Vet J* 18(5): 383-387.
- Weibrich, G., W. K. Kleis, G. Hafner, W. E. Hitzler (2002). Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 30(2): 97-102.
- Weinberg, E. P., M. J. Adams, G. M. Hollenberg (1998). Color Doppler sonography of patellar tendinosis. *Am J Roentgenol* 171(3): 743-744.
- Weinberger, T. (2008). Regenerative Therapiemöglichkeiten beim Pferd – eine Übersicht. *Pferde Spiegel* 11(3): 116-119.
- Werpy, N. (2011). Low-field MRI in horses: practicalities and image acquisition. In: R. C. Murray. *Equine MRI*. Wiley-Blackwell, Chichester, UK: 75-99.
- Williams, I. F., A. Heaton, K. G. McCullagh (1980). Cell morphology and collagen types in equine tendon scar. *Res Vet Sci* 28(3): 302-310.
- Williams, I. F., K. G. McCullagh, A. E. Goodship, I. A. Silver (1984). Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. *Res Vet Sci* 36(3): 326-338.
- Williams, I. F., K. G. McCullagh, I. A. Silver (1984). The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. *Connect Tissue Res* 12(3-4): 211-227.
- Williams, R. B., L. S. Harkins, C. J. Hammond, J. L. Wood (2001). Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996, 1997 and 1998. *Equine Vet J* 33(5): 478-486.



- Wilmink, J., A. M. Wilson, A. E. Goodship (1992). Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibres in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses. *Res Vet Sci* 53(3): 354-359.
- Witte, S., C. Dedman, F. Harriss, G. Kelly, Y. M. Chang, T. H. Witte (2016). Comparison of treatment outcomes for superficial digital flexor tendonitis in National Hunt racehorses. *Vet J* 216: 157-163.
- Zimmermann, R., R. Jakubietz, M. Jakubietz, E. Strasser, A. Schlegel, J. Wiltfang, R. Eckstein (2001). Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 41(10): 1217-1224.
- Zschäbitz, A. (2005). Anatomie und Verhalten von Sehnen und Bändern. *Orthopäde* 34(6): 516-525.
- Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz, M. H. Hedrick (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7(2): 211-228.

11 Darstellung des eigenen Anteils an den Publikationen

Mehrere Teilaspekte der Arbeit sind als Dissertationsthemen von verschiedenen Wissenschaftlern/-innen gemeinsam bearbeitet und publiziert worden und stellen die Grundlage dieser Habilitationsschrift dar.

Publikation 1

Geburek, F., Stadler, P. Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Terminologie, Herstellung, biologisches Potential und *In-vitro*-Effekte. *Tierärztl. Praxis Ausg. G Gross-tiere Nutztiere* 2011, 39 (6): 373-383.

Konzept:	Geburek
Durchführung, Auswertung:	Geburek
Diskussion, Beratung:	Geburek, Stadler
Erstellen des Manuskriptes:	Geburek, Stadler
Korrespondierender Autor:	Geburek

Publikation 2

Geburek, F., Stadler, P. Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Ergebnisse der Behandlung mit Stammzellen, Blutprodukten, Gerüstsubstanzen und Wachstumsfaktoren – eine Literaturübersicht und Metaanalyse. *Pferdeheilkunde* 2011, 27 (6): 609-625.

Konzept:	Geburek
Durchführung, Auswertung:	Geburek
Diskussion, Beratung:	Geburek, Stadler
Erstellen des Manuskriptes:	Geburek, Stadler
Korrespondierender Autor:	Geburek

Publikation 3

Eydt, C., Schröck, C.*, **Geburek, F.***, Rohn, K., Staszuk, C.†, Pfarrer, C†. Three-Dimensional Anatomy of the Equine Sternum. *Anat. Histol. Embryol.* 2014, 44 (2): 99-106. Erstmals online publiziert am 9. April 2014.

*†Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit

Konzept, Versuchsplanung:	Staszuk, Geburek, Pfarrer
Experimentelle Durchführung, Auswertung:	Eydt, Geburek, Schröck, Rohn
Diskussion, Beratung:	Eydt, Geburek, Schröck, Staszuk, Pfarrer
Erstellen des Manuskriptes:	Eydt, Geburek, Staszuk, Pfarrer
Korrespondierender Autor:	Eydt



Publikation 4

Eydt, C., **Geburek, F.***, Schröck, C.*, Hambruch, N., Rohn, K., Pfarrer, C.†; Staszzyk, C.† Sternal bone marrow derived equine multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): Investigations considering the sampling site and the use of different culture media. *Vet. Med. Sci.* 2016, 20. Juni; 2 (3): 200-210.

*†Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit

Konzept, Versuchsplanung:	Eydt, Geburek, Schröck, Pfarrer, Staszzyk
Experimentelle Durchführung, Auswertung:	Eydt, Geburek, Schröck, Hambruch, Rohn, Staszzyk
Diskussion, Beratung:	Eydt, Geburek, Schröck, Rohn, Pfarrer, Staszzyk
Manuskript:	Eydt, Geburek, Schröck, Staszzyk
Korrespondierender Autor:	Staszzyk

Publikation 5

Hauschild, G.*, **Geburek, F.***, Gosheger, G., Eveslage, M., Serrano, D., Streitbürger, A., Johannlückens, S., Menzel, D., Mischke, R. Short term storage stability at room temperature of two different platelet-rich plasma preparations from equine donors and potential impact on growth factor concentrations. *BMC Vet. Res.* 2017, 5. Jan.; 13 (1): 7.

*Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit / geteilte Erstautorenschaft

Konzept, Versuchsplanung:	Hauschild, Geburek, Menzel, Mischke
Experimentelle Durchführung, Auswertung:	Geburek, Hauschild, Johannlückens, Menzel, Eveslage, Mischke
Diskussion, Beratung:	Hauschild, Geburek, Gosheger, Serrano, Streitbürger, Mischke
Erstellen des Manuskriptes:	Hauschild, Geburek, Mischke
Korrespondierender Autor:	Hauschild

Publikation 6

Geburek, F., Mundle K., Conrad, S., Hellige, M., Walliser, U., van Schie, H.T.M., van Weeren, R., Skutella, T., Stadler, P. Tracking of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells with *in vivo* magnetic resonance imaging and histology after intralesional treatment of artificial equine tendon lesions – a pilot study. *Stem Cell Res. Ther.* 2016, 1. Feb.; 7: 21

Konzept, Versuchsplanung:	Geburek, van Schie, van Weeren, Conrad, Skutella, Walliser, Stadler
Experimentelle Durchführung, Auswertung:	Mundle, Geburek, Conrad, Hellige,
Diskussion, Beratung:	Geburek, Conrad, van Schie
Erstellen des Manuskriptes:	Geburek, van Weeren, van Schie
Korrespondierender Autor:	Geburek



Publikation 7

Geburek, F.*, Roggel, F. *, van Schie, H. T. M., Beineke A., Estrada, R., Weber, K., Hellige, M., Rohn, K., Jagodzinski, M., Welke, B., Hirschler, C., Conrad, S., Skutella, T., van de Lest, C., van Weeren, R., Stadler, P. M. Effect of single intralesional treatment of surgically induced equine superficial digital flexor tendon core lesions with adipose-derived mesenchymal stromal cells (AT-MSCs) – a controlled experimental trial. *Stem Cell Res. Ther.* 2017, 5. Juni; 8 (1): 129.

*Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit / geteilte Erstautorenschaft

Konzept, Versuchsplanung:	Geburek, van Schie, van Weeren, Skutella, Stadler
Experimentelle Durchführung, Auswertung:	Geburek, Roggel, Estrada, Weber, Hellige, Rohn, Welke, Conrad, van Schie
Diskussion, Beratung:	Geburek, Roggel, van Weeren, van Schie, Beineke, Jagodzinski, Hirschler, Skutella, van de Lest, Stadler
Erstellen des Manuskriptes:	Geburek, Roggel, van Weeren, Stadler
Korrespondierender Autor:	Geburek

Publikation 8

Conze, P., van Schie, H.T.M., van Weeren, R., Staszuk, C., Conrad, S., Skutella, T., Hopster, K., Rohn, K., Stadler, P., **Geburek, F.** Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions. *Regen. Med.* 2014, 9 (6): 743-757.

Konzept, Versuchsplanung:	Geburek, van Schie, van Weeren, Conrad, Skutella, Staszuk, Stadler
Experimentelle Durchführung, Auswertung:	Geburek, Conze, Conrad, van Schie
Diskussion, Beratung:	Geburek, van Weeren, Staszuk
Erstellen des Manuskriptes:	Conze, Geburek, van Weeren
Korrespondierender Autor:	Geburek



Publikation 9

Geburek, F., Lietzau, M., Beineke, A., Rohn, K., Stadler, P.M. Effect of a single injection of autologous conditioned serum (ACS) on tendon healing in equine naturally occurring tendinopathies. *Stem Cell Res. Ther.* 2015, 26. Juni; 6 (1): 126.

Konzept, Versuchsplanung:	Geburek, Stadler
Experimentelle Durchführung, Auswertung:	Lietzau, Geburek, Beineke, Rohn
Diskussion, Beratung:	Geburek, Lietzau, Beineke, Stadler
Erstellen des Manuskriptes:	Geburek, Beineke, Lietzau
Korrespondierender Autor:	Geburek

Publikation 10

Geburek, F., Gaus, M., van Schie, H.T.M., Rohn, K., Stadler, P.M. Effect of intralesional platelet-rich plasma (PRP) treatment on clinical and ultrasonographic parameters in equine naturally occurring superficial digital flexor tendinopathies – a randomized prospective controlled clinical trial. *BMC Vet. Res.* 2016, 7. Sep., 12 (1): 191.

Konzept, Versuchsplanung:	Geburek, Stadler
Experimentelle Durchführung, Auswertung:	Gaus, Geburek, Rohn, van Schie
Diskussion, Beratung:	Geburek, Gaus, van Schie, Stadler
Erstellen des Manuskriptes:	Geburek, van Schie
Korrespondierender Autor:	Geburek



12 Danksagung

Meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Peter Stadler spreche ich an dieser Stelle meinen großen Dank für die konstruktive Begleitung der vorliegenden Arbeit und die fachlichen Anregungen sowie für die Anleitung zum kritischen wissenschaftlichen Arbeiten aus. Herrn Prof. Dr. Karsten Feige gilt mein Dank dafür, dass er als Leiter der Klinik für Pferde die Anfertigung der Studien ermöglicht und in jeder Hinsicht unterstützt hat. Herrn Prof. Dr. Bernhard Ohnesorge danke ich für seine Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten zu Beginn meines beruflichen Weges, für ungezählte Fachgespräche zwischendurch und die Anregungen bei sonstigen Herausforderungen des Lebens. Herrn Prof. Dr. Harald Sieme sage ich Dank für die ermunternden Gespräche und für die unkomplizierte fachliche Unterstützung im klinischen Alltag. Allen Herren danke ich für ihren Rat sowie für ihre Geduld und Nachsicht in schwierigen Situationen.

Den Doktorandinnen und Doktoranden Maren Lietzau, Dr. Florian Roggel, Kathrin Weber, geb. Mundle, Dr. Carina Eydt und Dr. Moritz Gaus danke ich für ihre engagierte Mitarbeit bei den Projekten dieser Arbeit.

Allen externen Kooperationspartnern bei den einzelnen Projekten gilt mein Dank für ihre Beiträge, für zahlreiche inspirierende fachliche Diskussionen und für ihre Hilfe. Besonders nennen möchte ich die Herren Prof. Dr. Hans T. M. van Schie, Prof. Dr. René van Weeren, Prof. Dr. Andreas Beineke, PD Dr. Gregor Hauschild, Prof. Dr. Carsten Staszuk, Prof. Dr. Michael Jagodzinski, Dr. Bastian Welke, PD Dr. Christof Hurschler, Dr. Ulrich Walliser, Prof. Dr. Thomas Skutella und Frau Sabine Conrad.

Allen ehemaligen und gegenwärtigen Kolleginnen und Kollegen aus der Klinik für Pferde, die mich und die vorliegende Arbeit in den vergangenen Jahren direkt oder indirekt unterstützt haben, danke ich dafür. Stellvertretend nennen möchte ich Dr. Maren Hellige, PD Dr. Jessika Cavalleri, Dr. Astrid Bienert-Zeit, Ass. Prof. Dr. Klaus Hopster und Dr. Anna Rötting, PhD. Dr. Philipp Conze, Dr. Christof Reichert und Dr. Moritz Gaus haben mir in der Klinik immer wieder tatkräftig den Rücken freigehalten. Dafür gilt ihnen mein großer Dank.

Herrn Prof. Dr. Horst Wissdorf sage ich Dank für die Begleitung meines gesamten beruflichen Weges und für seine Förderung. Bei Herrn Prof. Dr. Albert Porth bedanke ich für die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes.

Meiner Ehefrau Dr. Christina Geburek danke ich herzlich für ihre uneingeschränkte Unterstützung meines beruflichen Weges und dieser Arbeit, für ihre Geduld und Liebe. Unseren Kindern danke ich für ihr allabendliches Interesse am Fortschritt des „Buches“ und vor allem für ihre Geduld, wenn mal wieder keine Zeit für das Baumhaus blieb. Danke für Eure Kreativität und Liebe.

Meinen Eltern gilt mein herzlicher Dank für ihre fortwährende, uneingeschränkte Unterstützung, für Ihren Optimismus und ihre positive Einstellung zu meinem Weg. Bei meinem Vater bedanke ich mich für seine sehr engagierte Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Elmar Stertenbrink und Dr. Kristian Sander bin ich dankbar für ihren Rat sowie für Ihre Freundschaft und Treue in den letzten Jahren. Sie haben die Geduld nicht verloren und waren da, wenn es wichtig war.



13 Anhang

13.1 Publikation 1

Geburek, F., Stadler, P. Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Terminologie, Herstellung, biologisches Potential und *In-vitro*-Effekte.

Tierärztl. Praxis Ausg. G Grosstiere Nutztiere 2011, 39 (6): 373-383.

Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden

Terminologie, Herstellung, biologisches Potenzial und In-vitro-Effekte

F. Geburek; P. Stadler

Klinik für Pferde, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Schlüsselwörter

Pferd, Sehne, Fesselträger, Stammzellen, PRP, ACS, ACP, UBM

Zusammenfassung

Herkömmliche Therapieansätze führen bei Pferden zu einer unbefriedigenden Sehnenheilung mit einer relativ hohen Rezidivrate. Deshalb werden seit einigen Jahren unter anderem in vitro und an Labortieren so genannte regenerative Therapieformen wissenschaftlich untersucht. Darunter wird der Einsatz von Substanzen verstanden, die idealerweise die Bildung eines Ersatzgewebes bewirken, das vergleichbare funktionelle Eigenschaften hat wie das Ursprungsgewebe und sich somit von minderwertigerem Narbengewebe abhebt. Derzeit ist eine Fülle verschiedener Substrate entweder kommerziell verfügbar oder mithilfe von „Kits“ unter Praxisbedingungen herstellbar. Es werden die wesentlichen Erkenntnisse zur Herstellung und zum regenerativen Potenzial von kernhaltigen Zellen bzw. Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe sowie der Blutprodukte PRP (thrombozytenreiches Plasma), ACP (autologes konditioniertes Plasma), ACS (autologes konditioniertes Serum) und der Gerüstsubstanz UBM (urinary bladder matrix) vorgestellt. Zuletzt wird das Potenzial einzelner Wachstumsfaktoren und der Gentherapie beleuchtet. Bisher wird angenommen, dass die Regeneration von Sehnen- und Bändergewebe durch ein komplexes Zusammenspiel aus Gerüstsubstanzen, Wachstumsfaktoren und Zellen begünstigt wird. Es sind bislang nur wenige Untersuchungen verfügbar, die einen Vergleich zwischen den genannten Substanzen erlauben. Untersuchungen zur Wirkung der Substrate an lebenden Pferden werden an anderer Stelle vorgestellt.

Key words

Horse, tendon, suspensory ligament, stem cell, PRP, ACS, ACP, UBM

Summary

Conventional treatments of equine tendon injuries lead to an unsatisfactory healing process that usually results in a relatively high recurrence rate. Therefore, in recent years so-called regenerative therapeutics were studied scientifically in vitro and in laboratory animals. These include substances that ideally lead to the formation of replacement tissue, which in contrast to the low quality scar, has similar functional properties as the original intact tendon. Currently, a plethora of different substrates is either commercially available or can be produced in practice with the help of kits. The current knowledge on the production and the regenerative potential of nucleated cells like stem cells from bone marrow and fat tissue, of the blood products PRP (platelet rich plasma), ACP (autologous conditioned plasma), ACS (autologous conditioned serum) and of the scaffold substance UBM (urinary bladder matrix) are presented. Finally, the potential of some growth factors and of gene therapy is considered. Currently, it is assumed that the regeneration of tendon tissue is promoted by a complex interaction of scaffolds, growth factors and cells. At present, only very few studies are available which allow a comparison between these substances. Studies on the effect of regenerative substrates on tendons in live horses are presented elsewhere.

Korrespondenzadresse

Dr. Florian Geburek, Dipl. ECVS
 Fachtierarzt für Pferde
 Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
 Klinik für Pferde
 Bünteweg 9
 30559 Hannover
 E-Mail: Florian.Geburek@tiho-hannover.de

Regenerative therapy for tendon and ligament disorders in horses.

Terminology, production, biologic potential and in vitro effects

Tierärztl Prax 2011; 39 (G): 373–383

Eingegangen: 3. Oktober 2010

Akzeptiert nach Revision: 9. Mai 2011

Einleitung

Aufgrund der langsamen Sehnenheilung (6–15 Monate) und der hohen Rezidivrate nach Sehnen- und Bandschäden beim Pferd besteht ein hohes Interesse daran, die Heilung zu beschleunigen und die Qualität des Ersatzgewebes zu verbessern. Bisher verfügbare

Therapieformen wie z. B. intratendinöse Injektionen einer Vielzahl von Therapeutika sowie chirurgische Maßnahmen sind zumeist unbefriedigend (27).

Sehnenerkrankungen entstehen zumeist eher durch degenerative Prozesse in der extrazellulären Matrix, die sich über einen längeren Zeitraum entwickeln, als aufgrund einer einzelnen Über-

Tierärztliche Praxis Großtiere 6/2011



belastung. Degeneration wird durch zunehmendes Alter, Vitalitätsverlust von Tenozyten und nicht zuletzt durch Apoptose, aber auch durch Mikroläsionen der Kollagenfibrillen sowie durch Hyperthermie und Hypoxie im Sehnenewebe begünstigt. Es kommt daraufhin zu einem erhöhten Umsatz der Sehnenmatrix („turn-over“), der letztendlich in einem Strukturverlust der Matrix und einer „Reparatur“ des Defekts durch unelastisches Narbengewebe mündet (77). Das Ziel regenerativer Therapieansätze besteht hingegen darin, dass die verletzten Sehnenbereiche durch ein Gewebe mit den strukturellen und biomechanischen Eigenschaften einer intakten Sehne („Regeneration“) ersetzt werden. Wachstumsfaktoren können bekanntermaßen die Vitalität von Zellen stimulieren, Stammzellen koordinieren Reparaturprozesse und differenzieren im Idealfall zu gewebetypischen Zellen aus. Theoretisch beinhaltet die ideale regenerative Therapie deshalb biologische Faktoren wie z. B. Wachstumsfaktoren, multipotente Zellen und Gerüstsubstanzen (32). Dem großen, nicht zuletzt auch kommerziellen Interesse am Einsatz regenerativer Therapieverfahren steht allerdings noch ein unterschiedlicher Wissensstand hinsichtlich des regenerativen Potenzials der einzelnen Substrate gegenüber. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse stützen sich überwiegend auf Untersuchungen in vitro, an Labortieren und nicht zuletzt an Pferden, wohingegen vergleichsweise wenige Forschungsergebnisse zum Einsatz bei Tendopathien von Menschen vorliegen.

Quellen

Die Datenbanken PubMed, Web of Science und die Internet-Suchmaschine Google wurden nach den Stichworten „Pferd“, „Sehne“ und „Knochenmark“, „Stammzellen“, „Knochenmarkspirat Konzentrat“, „thrombozytenreiches Plasma“, „autologes konditioniertes Serum“, „autologes konditioniertes Plasma“ (bzw. den entsprechenden Abkürzungen und englischen Stichworten) durchsucht.

Stammzellen

Merkmale von Stammzellen

Stammzellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie sich einerseits selbst erneuern und andererseits in verschiedene Zelltypen und Gewebe differenzieren können. Grundsätzlich wird zwischen embryonalen und nichtembryonalen Stammzellen, zu denen fetale, neonatale und adulte Stammzellen gehören, unterschieden. Zygote und Zellen sehr früher Embryonalstadien sind totipotent, d. h. sie können sich zu jeder Zelle im Körper, also auch zu Keimzellen, differenzieren. Embryonale Stammzellen sind pluripotent, können sich also zu Zelllinien aller drei Keimblätter entwickeln. Adulte Stammzellen lassen sich in epitheliale, neuronale, hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen einteilen.

Mesenchymale Stammzellen besitzen Multipotenz, d. h. sie können zu chondrogenen, osteogenen, myogenen, adipogenen

und tenogenen Zelllinien ausdifferenzieren, die embryologisch alle dem Mesoderm zuzuordnen sind. Zusätzlich verfügen sie in vitro über eine lange Lebensdauer, die Kapazität zu Selbsterneuerung und zu Gewebeersatz. Bislang gibt es keinen einzelnen, spezifischen molekularen oder genetischen Marker für Stammzellen. Es wurde deshalb der Begriff „multipotente mesenchymale stromale Zelle“ (MSC) geprägt. Darunter werden kernhaltige Zellen verstanden, die 1.) mehrere definierte Oberflächenmarker (CD-Moleküle) exprimieren und andere vorbestimmte Marker wiederum nicht exprimieren, 2.) über eine Differenzierungskapazität zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten verfügen sowie 3.) durch die Eigenschaft gekennzeichnet sind, sich an Plastikoberflächen anzuheften (Plastikadhärenz). Diese für MSCs vom Menschen festgelegte Immunphänotypisierung lässt sich allerdings nicht ohne Weiteres auf das Pferd übertragen, da nur ein geringer Prozentsatz der Antikörper gegen humane CD-Moleküle eine Kreuzreaktivität mit equinen CD-Molekülen besitzt. Derzeit wird an einer einheitlichen Festlegung eines Marker-Sets gearbeitet, das equine MSCs kennzeichnet (24).

Es sollte also zwischen echten „mesenchymalen Stammzellen“ und „multipotenten mesenchymalen stromalen Zellen“ unterschieden werden, da der Begriff „Stammzelle“ möglicherweise eine größere Potenz impliziert, als die Zellen tatsächlich besitzen. Das Akronym MSC ist unspezifisch und steht sowohl für „multipotente mesenchymale stromale Zelle“ als auch für „mesenchymale Stammzelle“. Die Differenzierung hat sich noch nicht generell in der Literatur durchgesetzt (44, 45), sodass im Folgenden der Begriff Stammzelle oder die Abkürzung MSC verwendet wird.

Rolle der Stammzellen und potenzielle Entstehung von Sehnenewebe

Die Funktion der intratendinös applizierten Stammzellen ist vielfältig: 1.) Sie produzieren bioaktive Faktoren (trophische Wirkung), 2.) supprimieren das lokale Immunsystem, 3.) unterdrücken die Entstehung von Fibrose, 4.) beschleunigen die Angiogenese, 5.) verhindern Apoptose, 6.) regen die Mitose an und 6.) stimulieren im Sinne eines Koordinators die Differenzierung von Vorläuferzellen aus dem Epi- und Paratendineum (13, 30, 76). Es ist 7.) zusätzlich belegt, dass sich equine Stammzellen unter bestimmten Bedingungen (z. B. nach Zugabe von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren) in vitro z. B. in Knochen-, Knorpel-, Sehnen-, Fett-, Muskel- und Bindegewebe im Sinne eines Gewebeersatzes differenzieren können, wobei sie wiederum Wachstumsfaktoren und Zytokine produzieren (1, 79, 80). Eindeutige Hinweise auf die Entstehung von Tenozyten aus equinen Stammzellen ergeben sich bislang nur in vitro und zwar für Stammzellen aus Knochenmark (68): Nachdem sie mit BMP-12 (bone morphogenic protein) stimuliert wurden, exprimierten sie die sehnenzellassozierten Marker Tenomodulin und Decorin. Für Stammzellen aus Fettgewebe steht der Nachweis noch aus. Für equine Stammzellen aus Nabelschnurblut und der Nabelschnur wurde die Differenzierung in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten in

vitro nachgewiesen (43). Ein Nachweis der Differenzierung in Tenozyten liegt bisher nicht vor.

Gewebequellen für Stammzellen beim Pferd

Embryonale Stammzellen (ES) aus equinen Blastozysten sind in vitro in der Lage, Gewebe aller drei Keimblätter zu erzeugen. Deshalb besteht bei der Anwendung von undifferenzierten ES in vivo theoretisch das Risiko einer Induktion von Teratomen, das kontrovers diskutiert wird (37, 38, 55). In einer tierexperimentellen Untersuchung an acht Pferden führte die intraläsionale Injektion von ES einer Zelllinie nach bis zu 90 Tagen allerdings nicht zur Entstehung von Teratomen (37). Für menschliche und murine ES ist eine Differenzierung in Tenozyten bereits nachgewiesen (55), sodass die Anwendung von equinen ES somit in Zukunft möglicherweise eine vielversprechende und risikoarme Alternative darstellt (55).

Nichtembryonale mesenchymale Stammzellen wurden bisher beim Pferd aus Knochenmark (1, 78), peripherem Blut (46), Fettgewebe von erwachsenen Individuen (79), Nabelschnurblut (43, 59) bzw. Wharton-Sulze (gallertiges Bindegewebe der Nabelschnur) (60), Sehngewebe (26, 71), Muskelgewebe (71) sowie aus dem Zahnhalteapparat (70) isoliert. Knochenmark und Fettgewebe haben derzeit als Quellen für Stammzellen die größte Bedeutung (34).

Bisher wurde zwar vorrangig mit autologen Stammzellen gearbeitet (32), aber Stammzellen werden grundsätzlich als immunprivilegiert und somit als hypoimmunogen angesehen (76). Die Applikation allogener Zellen erscheint deshalb und aufgrund theoretischer besserer Verfügbarkeit medizinisch zunächst geeignet zu sein. Detaillierte Untersuchungen in mehreren tierexperimentellen Untersuchungen an Pferden unterstützen diese Annahme (22, 36, 37). Dagegen beeinflussen autologe und allogene Stammzellen das Immunsystem anderen Untersuchungen zufolge entscheidend (30) und theoretisch ist eine Übertragung von Viren oder Prionen vorstellbar (45). Deshalb wird die Verwendung allogener Stammzellen derzeit noch nicht von allen Autoren als unbedenklich eingestuft (32, 45).

Stammzellhaltige Substrate

1. Native Knochenmarkaspirate

Knochenmark wird beim Pferd zumeist mit einer Jamshidi-Nadel aus dem Brustbein oder dem Hüfthöcker entnommen. Es wird vermutet, dass nach Behandlung des Fesselträgers mit autologen Knochenmarkaspiraten eine Verbesserung der ultrasonographischen Qualität des Ersatzgewebes erreicht wird (39), die auf den Gehalt an mesenchymalen Stammzellen und Wachstumsfaktoren im Blut-Knochenmark-Aspirat zurückzuführen ist. Der einfachen und schnellen Durchführung der Therapie steht das potenzielle Risiko einer Mineralisierung der Sehne gegenüber, das in praxi als gering eingestuft wird (32). Der niedrige Gehalt an Stammzellen in Knochenmarkaspiraten (s. u. „Vergleich der Stammzellquellen“)

(32) führte zu kontroversen Diskussionen über die Wirksamkeit. Dennoch wird eine synergistische Proliferation und Differenzierung von Stammzellen durch Wachstumsfaktoren mit daraus resultierenden kollagenproduzierenden Fibroblasten vermutet (45).

2. Durch Zentrifugation von Knochenmark hergestellte Substrate

2.1 Mononukleäre Zellen aus Knochenmark und azelluläres Knochenmark

Mit kommerziell erhältlichen Kits (BMAC[®], Biocoll[®]) können Konzentrate von mononukleären Zellen hergestellt werden. Es entsteht eine zellreiche Phase („bone marrow mononuclear cells“, BMMNCs; „bone marrow aspirate concentrate“, BMAC), die eine 12-fache Konzentration von mononukleären Zellen gegenüber nativem Knochenmark aufweisen kann (57). Knochenmarkaspirat-Konzentrat enthält lediglich einen geringen Prozentsatz an Stammzellen (z. B. 0,6–2,4% hämatopoetische Stammzellen bei Menschen) (47). Zusätzlich entsteht bei der Aufbereitung ein plasmaartiger Überstand aus azellulärem Knochenmark („acellular bone marrow“, ABM), der Wachstumsfaktoren beinhaltet (32, 65, 66).

Nach In-vitro-Untersuchungen ist den Wachstumsfaktoren im azellulären Überstand eine größere Bedeutung zuzumessen als den mononukleären Zellen (65, 66). In vitro wurde mit azellulärem Knochenmark (ABM) und mit thrombozytenreichem Plasma (PRP) an Fesselträgerproben je nach Konzentration ein Anstieg der Synthese von Gesamteiweiß und des sehnentypischen Matrixproteins „cartilage oligomeric matrix protein“ (COMP) festgestellt (66). Enzymatisch wirksame MMPs und inflammatorische Zytokine (z. B. IL-1 β) aus weißen Blutzellen und Thrombozyten im PRP könnten theoretisch auch katabole Effekte auf die extrazelluläre Matrix von Sehnen und Bandgewebe haben. Möglicherweise überwiegen jedoch die positiven Effekte der Leukozyten wie z. B. die Absonderung von antimikrobiell wirksamen Substanzen (Myeloperoxidasen) (29). Die Wirkung von ABM, PRP, Plasma und thrombozytenarmem Plasma (PPP) wurde konzentrationsabhängig an Zellkulturen von Fibrozyten aus Fesselträgern untersucht (65). Azelluläres Knochenmark führte in einer klinisch relevanten Konzentration von 100% zu einer stärkeren Expression von Decorin (kleines Proteoglykan, Bestandteil der extrazellulären Sehnenmatrix) und COMP als alle anderen genannten Substrate. Allerdings wurde bei ABM in einer Konzentration von 50% zusätzlich die Expression der katabol wirkenden Matrix-Metalloproteinase-13 beobachtet (65). An Präparaten aus der oberflächlichen Beugesehne hatten dagegen 100% konzentrierte PRP-Zubereitungen den stärksten anabolen Effekt auf die Entstehung von Sehnenmatrix (64). Dies spiegelt möglicherweise auch die bekanntermaßen unterschiedliche Zusammensetzung und Funktion des Fesselträgers und der oberflächlichen Beugesehne wider (6, 72).

2.2 Kultivierte Stammzellen aus Knochenmark

Üblicherweise werden mindestens 2 \times 20 ml Knochenmarkaspirat in ein heparinisierendes Gefäß aspiriert (67). Nach Zentrifugation



der Knochenmarkspirate werden Stammzellen aus Knochenmark aufgrund ihrer geringen Konzentration vor der Applikation zumeist für ca. 2–4 Wochen in Kultur gebracht (Angaben zu Zellzahlen siehe „Vergleich der Stammzellquellen“).

3. Kernhaltige Zellen und Stammzellen aus Fettgewebe

Fettgewebe ist reich an kernhaltigen Zellen und relativ leicht durch eine kurze Hautinzision oder Liposuktion aus der Unterhaut z. B. im Bereich der Schweifwurzel zu gewinnen (52). Entnommen werden ca. 2–50 g Unterhautfettgewebe. Durch Andauung, d. h. Entfernung von Gerüstsubstanz mittels Kollagenase und nachfolgende Zentrifugation kann bereits innerhalb weniger Stunden ein injizierbares Substrat entstehen, das reich an kernhaltigen Zellen wie z. B. Endothelzellen, Fibroblasten, Perizyten, glatten Muskelzellen, Makrophagen und Stammzellen ist (so genannte stromale vaskuläre Fraktion, SVF) (43). Unklarheit besteht darüber, welche dieser Zellen sich stimulierend auf die Sehnenheilung auswirken, wobei gesichert ist, dass Perizyten *in vitro* multipotent sind (44, 52). Equine Stammzellen aus Fettgewebe können sich unter geeigneten Bedingungen unter anderem in Knochen, Fett und Knorpel differenzieren (67, 76, 79). Alternativ lassen sich Stammzellen aus Fettgewebe innerhalb von 21–30 Tagen durch Kultivierung vermehren (20–22).

Vergleich der Stammzellquellen

Beim Vergleich von Knochenmark und Fettgewebe als Stammzellquellen herrscht hinsichtlich der Behandlung von Sehnen- und Banddefekten noch Unklarheit darüber, welches Ausgangsgewebe überlegen ist (34, 69).

Die optimale Zelldosis ist für keine Art von Stammzelle, Läsion und Spezies bekannt (9, 34, 45), Titrationsuntersuchungen fehlen. Es wird vermutet, dass grundsätzlich die Applikation einer möglichst hohen Anzahl Stammzellen (Größenordnung: mehrere Millionen) therapeutisch sinnvoll ist (34). Demgemäß werden für die klinische Anwendung Zelldosen von 1×10^6 (54), 6×10^6 (10) bzw. 10×10^6 bis 50×10^6 (61) oder sogar 1×10^7 (76) beschrieben.

Die Anzahl Stammzellen, die in der stromalen vaskulären Fraktion des Fettgewebes enthalten sind, beträgt ca. 1–4% aller kernhaltigen Zellen (20, 34). Unzentrifugierte Knochenmarkspirate enthalten hingegen lediglich 0,001–0,01% Stammzellen (32, 53). Ein Vorteil der aus dem Fettgewebe gewonnenen Stammzellen ist somit die schnelle Verfügbarkeit einer relativ hohen Zellzahl. Die Ausbeute an kultivierten Stammzellen variiert jedoch relativ stark; dies gilt insbesondere für Fettgewebe (15, 19).

Stammzellen aus Knochenmark können nach Inkaufnahme der genannten Kulturdauer wiederum in einer höheren Anzahl (s. o.) angewendet werden, als es bei nativen Zellen aus Fettgewebe der Fall ist (68). Daraus ergibt sich als weitere vielversprechende Alternative die Kultivierung von Stammzellen aus Fettgewebe, um die ohnehin höhere relative Anzahl weiter zu steigern (48). Die *In-vitro*-Proliferationsrate der Stammzellen aus Fettgewebe war in

Vergleichsuntersuchungen bis zu doppelt so hoch wie diejenige von Stammzellen aus Knochenmark (15, 16). Die Zugabe von „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) beschleunigt die Proliferationsrate bei beiden Stammzellquellen zusätzlich, wobei Stammzellen aus Fettgewebe besser auf diese Stimulation ansprechen (15). Unklar ist, ob die vorherige *In-vitro*-Kultivierung von Stammzellen eine negative Auswirkung auf das Differenzierungspotenzial *in vivo* haben könnte (17).

Nach mündlichen Mitteilungen (Dr. J. H. Swagemakers, Vortrag Burg Müggenhausen, Weilerswist, 2007) traten vereinzelt ungeklärte spontane Todesfälle nach Aspiration von Knochenmark aus dem Brustbein auf. In der Literatur wird von einem Fall mit Pneumoperikard nach dieser Maßnahme berichtet (25). Die Risikobehaftung der Entnahme von Unterhautfettgewebe wird in Bezug auf das Auftreten von Wundheilungsstörungen kontrovers diskutiert (20, 53, 61, 69). Zusammenfassend sind beide Techniken bei angemessener Ruhigstellung und Analgesie des Pferdes und ausreichender Expertise des Chirurgen mit einem geringen Risiko verbunden. In einer Untersuchung zum Vergleich der Stammzellquellen Nabelschnurblut und Wharton-Sulze wurde gezeigt, dass Letztgenannte eine höhere Ausbeute an Stammzellen lieferte, die sich zudem schneller und besser expandieren ließen. Das Risiko einer bakteriellen Kontamination des Stammzellprodukts wird bei diesem Ausgangsgewebe jedoch als relativ hoch angesehen (60).

Verbleib der Stammzellen nach der Applikation

Ob die therapeutisch eingesetzten Stammzellen *in vivo* tatsächlich als Vorläufer von Tenozyten fungieren und somit eine *De-novo*-Reparatur der geschädigten Sehnen erfolgt oder ob die Stammzellen bestimmte Faktoren produzieren, die die Heilung begünstigen (= parakriner Effekt), ist für das Pferd noch nicht abschließend geklärt (31, 44). Studien an menschlichen MSCs weisen darauf hin, dass Stammzellen eine nährnde, immunsuppressive und auch entzündungsmodulierende Wirkung haben und dass dieser Mechanismus möglicherweise wichtiger ist als die funktionelle Integration der Zellen in das behandelte Gewebe (5, 13). Dies würde bedeuten, dass die applizierten Stammzellen für kurze Zeit eine führende Rolle übernehmen und die Reparaturmechanismen des geschädigten Gewebes koordinieren. Weil Stammzellen möglicherweise die Funktion der T-Zellen hemmen, wird insbesondere ihre Wirkung bei Erkrankungen entzündlicher oder immunologischer Genese (Graft-versus-host-Reaktion) weiter zu erforschen sein. Falls eine echte funktionelle Integration der Stammzellen erfolgt, bleibt allerdings unklar, wie lange der Effekt der Stammzellen anhält (5, 45, 76).

Demgemäß besteht ein großes Interesse, Stammzellen zu markieren und ihren Verbleib zu verfolgen. So können Erkenntnisse über das Vermögen der Zellen, in bestimmte, z. B. geschädigte Geweberegionen zu migrieren und sich dort festzusetzen („homing“), gewonnen werden (63). Bei zwei Pferden wurden autologe bzw. allogene Stammzellen aus Knochenmark durch Transfektion mit dem Gen für das grüne fluoreszierende Protein (GFP)

markiert. Die meisten GFP-markierten Stammzellen verblieben nach 10 bzw. 34 Tagen in dem Bereich, in den sie injiziert worden waren, ein kleiner Teil war in der Umgebung nachweisbar (36). Allerdings kann es bei dieser Technik zu einer Fusion zwischen Stammzelle und somatischer Zelle kommen, sodass dann fälschlicherweise der Eindruck einer Integration der Stammzelle in das Gewebe entsteht. In einer tierexperimentellen Studie an acht Pferden wurde der Verbleib von embryonalen Stammzellen (ES) und MSCs aus Knochenmark in ähnlicher Weise (37) untersucht. Es zeigte sich, dass ES in hohen Konzentrationen über den gesamten Untersuchungszeitraum überlebten und im gesamten Bereich des Schadens nachweisbar waren, wohingegen die Überlebensrate von MSCs aus Knochenmark bereits nach 10 Tagen bei weniger als 5% lag und diese Zellen lediglich im Bereich der Injektionsstelle zu finden waren (37). Die Markierung von Stammzellen mit eisenoxidhaltigen Nanopartikeln erlaubt es, den Verbleib der applizierten Zellen in vivo mittels hochleistender Magnetresonanztomographie zu verfolgen (35). Die Anwendung dieses Verfahrens wurde nach Kenntnis der Autoren für die Pferdesehne bisher nicht publiziert.

Kombination von Stammzellen und Wachstumsfaktoren

In vitro beschleunigt die Zugabe von Thrombozytenlysat, das sehr reich an Wachstumsfaktoren ist (s. u.), sowohl die Proliferationsrate von equinen Tenozyten als auch die von Stammzellen aus Fettgewebe (21). Auf die Beschleunigung der Proliferationsrate von Stammzellen nach Zugabe von „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) wurde bereits verwiesen (15). Eine theoretisch vielversprechende, jedoch aufwendige und nach ersten Untersuchungen wenig effektive Nutzung von Stammzellen besteht darin, sie nach genetischer Veränderung (Transfektion) als Vektoren zu nutzen, die nach Verbringen in die Sehnen- oder Bandläsion nachhaltig spezifische therapeutisch wirksame Proteine und Wachstumsfaktoren exprimieren (s. u.) (63).

Behandlung mit Substraten aus Blut

Autologes Vollblut

Der Effekt von autologem Blut (ABI = autologous blood injection) wurde nach Injektion in normale Kniescheibenbänder von Ratten überprüft. Es zeigte sich eine Zunahme der Zugfestigkeit gegenüber der Kontrollgruppe (75). Zudem liegen Erkenntnisse zur Behandlung der humanen Epikondylitis (74) und zur Desmitis des Kniescheibenbandes (Patellarsehne) (40) mit autologem Blut vor. Im Gegensatz zum PRP ist der Anteil an Wachstumsfaktoren im Vollblut geringer, sodass häufiger konditionierte Blutprodukte zum Einsatz kommen.

Thrombozytenreiches Plasma

Thrombozytenreiches Plasma (= PRP, platelet-rich plasma) ist ein Ultrakonzentrat von Thrombozyten mit hohen Konzentrationen an Wachstumsfaktoren, wie z. B. transforming growth factor- β (TGF- β), platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor-1 (ILGF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), die bekanntermaßen eine Bedeutung beim Heilungsprozess von Sehnen- und Bandschäden haben (32). Thrombozytenreiches Plasma wird üblicherweise aus dem Eigenblut des Patienten hergestellt. Dazu werden zahlreiche kommerzielle Herstellungs-Kits angeboten. Beim Pferd kommen unter anderem die Systeme Osteokin[®] (Fa. Orthogen, Düsseldorf), SmartPRP[®] (Fa. Harvest Technologies GmbH, München), Acelere[®] fPRP (Fa. Vetcell, Cambridge, UK) zum Einsatz. Es sind zahlreiche Herstellungsvarianten beschrieben, die die Zusammensetzung und Qualität des PRP beeinflussen. Das Grundprinzip besteht in einer Doppelzentrifugation von zitratgehemmtem Blut. Nach der ersten Zentrifugation wird das Plasma (Überstand) vom Erythrozytensediment getrennt. Der dazwischen liegende leukozytenreiche „buffy-coat“ wird je nach Präferenz genutzt oder verworfen (58). Die Leukozyten können auch später vor der Anwendung durch einmaliges Einfrieren deaktiviert werden. Über das richtige Vorgehen besteht Uneinigkeit. Einerseits werden den Leukozyten z. B. antimikrobielle und andere Effekte zugeschrieben (29), andererseits liegen Erfahrungsberichte über unerwünscht starke Entzündungsreaktionen vor, wenn keine Deaktivierung der Leukozyten erfolgte (L. A. Fortier, PhD, mündliche Mitteilung zu unerwünschten Wirkungen nach PRP-Injektionen in Sehnenläsionen, Bonn, 2008). Das Plasma wird einer zweiten Zentrifugation unterzogen, sodass ein Thrombozytensediment (PRP) und ein Überstand aus thrombozytenarmem Plasma (platelet-poor plasma, PPP) entstehen. Durch Vermischen des Thrombozytenpellets mit einer geringen Menge PPP entsteht das anwendungsfertige Substrat. Lediglich das System Acelere fPRP (Fa. Vetcell) arbeitet mit einem Filtrationsprinzip, d. h. das gerinnungsgehemmte Blut fließt durch einen Filter, in dem die Thrombozyten festhaften und aus dem sie zuletzt ausgewaschen werden.

Die Wachstumsfaktoren im PRP werden z. B. nach gezielter Exposition gegenüber Thrombin und/oder Calciumchlorid bei der intraläsionalen Applikation (81), nach Einfrieren und Wiederauftauen (single freeze-thaw-cycle) oder allein durch Gewebekontakt, z. B. mit der Basalmembran geschädigter Zellen im erkrankten Gewebe, freigesetzt (32), wobei über das sinnvollste Vorgehen Unklarheit besteht.

(Zusammenfassend wird unter PRP in den meisten Fällen ein Konzentrat aus Thrombozyten verstanden, aus deren Alpha-Granula erst durch die oben genannten Auslöser ein Gemisch aus Wachstumsfaktoren freigesetzt wird. Abzugrenzen ist davon Thrombozytenlysat, das aus thrombozytenreichem Plasma durch Zerstörung der Zellmembran in einem Wasch- und Tiefkühlprozess gewonnen wird und große Mengen an Wachstumsfaktoren und chemotaktischen Komponenten enthält, die unmittelbar zur Verfügung stehen.)



Die Wachstumsfaktoren agieren synergistisch und regen die Infiltration eines Gewebedefekts mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen an. Zudem beschleunigen sie die Bildung von Fibrozyten, die Anlagerung von Gewebematrix und die Reepithelisierung. Das bei Kontakt des PRP mit dem geschädigten Gewebe entstehende Fibringerinnsel hält Wachstumsfaktoren vor Ort und dient als Gerüstsubstanz („scaffold“) für einwandernde Zellen (32, 81). Der Nachteil des PRP besteht theoretisch darin, dass es keine multipotenten Zellen enthält. Die Wachstumsfaktoren im PRP ziehen allerdings via Chemotaxis Vorläuferzellen aus dem Meso- und Paratendineum an (51). Wenngleich Wachstumsfaktoren, wie z. B. bestimmte Isoformen von TGF- β , einzeln eingesetzt zur Entstehung einer unerwünschten Fibrose führen können, scheint die im PRP vorliegende Mischung von Wachstumsfaktoren die Bildung eines unelastischen fibrösen Narbengewebes zu verhindern (9, 51).

In einer Studie an humanen juvenilen Tenozyten zeigte sich *in vitro*, dass nichtautologes PRP die Zellproliferation und Kollagenproduktion anregt sowie zu einer geringgradig erhöhten Expression von Sehnenmatrix-abbauenden Enzymen (MMP-1, -3) und endogenen Wachstumsfaktoren führt (23). Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die Anwendung bei Sehnenverletzungen eine Beschleunigung der katabolen Demarkation der Sehnenmatrix und eine beschleunigte Angiogenese und Bildung von fibrovaskulärem Ersatzgewebe bewirken könnte. In einer anderen Studie zeigten equine oberflächliche Beugesehnen, die *in vitro* reinem PRP ausgesetzt wurden, eine erhöhte Genexpression von COMP (cartilage oligomeric matrix protein). Es lag zudem ein gewünscht hohes Verhältnis von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III ohne gleichzeitige Erhöhung der katabolen Matrix-Metalloproteinasen 3 und 13 vor (64). Bei einem *In-vitro*-Vergleich der Wirkung von PRP, Plasma, PPP und azellulärem Knochenmark (ABM) auf equine Fesselträgerzellen war PRP allerdings dem ABM hinsichtlich der anregenden Wirkung auf die Expression von COMP unterlegen. Es handelt sich dabei um ein extrazelluläres Matrixprotein, das vermutlich während der Individualentwicklung die Fibrillogenese unterstützt und diese Rolle vermutlich auch bei der Sehnenheilung spielt (65). Thrombozytenlysat regt *in vitro* die Proliferation von equinen Stammzellen aus Fettgewebe und von equinen Tenozyten an (21, 22). PRP wird in der Humanmedizin regelmäßig zur Unterstützung der Band-, Sehnen-, Knochen- und Wundheilung eingesetzt (62).

Autologes konditioniertes Plasma (ACP)

Bei der Herstellung des autologen konditionierten Plasmas wird Blut in ein Kit überführt, das mit Zitrat gefüllt ist (Arthrex ACP[®], Fa. Arthrex GmbH, Karlsfeld). Danach erfolgt im Gegensatz zur Herstellung des PRP nur eine Zentrifugation mit anschließender Entnahme des überstehenden Plasmas vom Sediment der Erythrozyten je nach Präferenz mit oder ohne den leukozytenreichen „buffy coat“. Es wird vielfach als eine „abgeschwächte Form des PRP“ bezeichnet, mit einem lediglich 1,5- bis 2-mal höheren Gehalt an Thrombozyten gegenüber Vollblut erfüllt es allerdings nicht die

Kriterien für PRP im engeren Sinne. Der Thrombozytengehalt ist abhängig von der Rotationszahl und -dauer. In einer Untersuchung an Pferdeblut wurde gezeigt, dass eine Zentrifugation bei 1100 U/min für 5 Minuten zu einem hohen Gehalt an Thrombozyten bei gleichzeitig relativ niedriger Leukozytenzahl führt (41). (Diese Parameter erscheinen dann sinnvoll, wenn eine niedrige Leukozytenzahl angestrebt wird.)

Der Vorteil des ACP gegenüber PRP besteht nach Herstellerangaben in einer schnelleren Verfügbarkeit des Substrats und in geringeren Kosten. Gegenüber venösem Vollblut von Menschen verfügt ACP nach Herstellerangaben über eine 25-mal höhere Konzentration des Wachstumsfaktors PDGF-AB, eine 5- bis 11-mal höhere Konzentration der Wachstumsfaktoren EGF, VEGF, PDGF-BB und einen bis zu 5-mal höheren Gehalt an TGF- β 1 und TGF- β 2. Die Konzentration der genannten Wachstumsfaktoren gegenüber humanem Vollblut ist zum Teil mit der vergleichbar, die bei der Herstellung von humanem PRP erzielt wird (28). Diese Werte können allerdings aufgrund der unterschiedlichen Thrombozytengröße nicht per se auf das Pferd übertragen werden. Für Pferde wiederum liegen nach unserer Kenntnis für ACP in der Literatur lediglich Angaben über die Konzentration von PDGF-BB und TGF- β 2 vor, die mit humanspezifischen ELISA-Kits bestimmt wurden und bei einer Zentrifugationstechnik (1100 U/min, 5 Minuten) ca. vierfach bzw. ca. fünffach höher konzentriert als in Zitratplasma vorlagen (41). Grundsätzlich hängt der Gehalt an Wachstumsfaktoren wie im PRP nicht nur von der Thrombozytenkonzentration, sondern auch von der Art der Aufbereitung und Anwendung ab. So wird z. B. durch Hinzufügen eines Aktivators wie Thrombin die Degranulation beschleunigt (29).

Autologes konditioniertes Serum (= ACS)

Autologes konditioniertes Serum (ACS) wird mit kommerziell erhältlichen Kits (Orthokin[®], IRAP[®], Fa. Orthogen, Düsseldorf) hergestellt. Das Prinzip besteht darin, dass die Exposition von Eigenblut gegenüber Glaskügelchen (Oberflächenvergrößerung) im Rahmen einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C zu einer erhöhten Synthese und Abgabe von „antikatabolen“ Zytokinen (darunter IL-1Ra, IL-4, IL-10) durch Monozyten führt. Nach Zentrifugation wird der Serumüberstand, der das anzuwendende Substrat bildet, abgesaugt.

Einer der bedeutendsten Entzündungsmediatoren bei Osteoarthrose ist Interleukin-1. Der physiologisch vorkommende Hemmer des IL-1, der IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra) ist nachgewiesenermaßen bei Menschen, Pferden und anderen Spezies therapeutisch wirksam, sodass ACS bei Menschen unter der Bezeichnung Orthokin[®] (4) und bei Pferden unter dem Warenzeichen IRAP[®] (= Interleukin-Rezeptor-Antagonist-Protein) zur Behandlung von Arthropathien eingesetzt wird (33, 82). Nach einer tierexperimentellen Studie an Mäusen (83) wurde für den Menschen im Rahmen einer Pilotstudie nachgewiesen, dass die örtliche Applikation von ACS auch bei Muskelschäden von Sportlern zu einer beschleunigten Heilung führt (84). Bei der Muskelregenera-

tion spielen unter anderem die Faktoren FGF-2 und TGF- β 1 eine große Rolle, die in humanem ACS nachgewiesenermaßen in erhöhter Konzentration vorliegen. Die Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie verzichtet noch auf eine Empfehlung des Medikaments, so lange wissenschaftliche Daten zu eventuellen Spätfolgen fehlen (12).

Eine tierexperimentelle Untersuchung an Ratten wies nach, dass es auch bei der Entstehung von Tendopathien durch Überdehnung zu einer belastungsabhängigen Aufregulation und Expression von IL-1 β (und MMP-13) durch Tenozyten kommt (73). Vor diesem Hintergrund erscheint ein therapeutischer Einsatz von ACS bei Sehnenkrankungen dann sinnvoll, wenn es in hoher Konzentration IL-1Ra enthält. Zum Einsatz von ACS bei Sehnen-schäden liegt eine tierexperimentelle Studie an Ratten vor. Dabei wurde gezeigt, dass im Gegensatz zur Kontrollgruppe die Expression von Kollagen Typ I in behandelten Sehnen dreifach höher war als die Expression von Kollagen Typ III und dass der Gehalt an Kollagen Typ III in behandelten Sehnen dreifach geringer war als in den Kontrollsehnen. Die biomechanischen Parameter unterschieden sich jedoch nicht signifikant zwischen behandelten Sehnen und Kontrollsehnen (50).

Behandlung mit Gerüstsubstanzen

Gerüstsubstanzen („scaffolds“) sind Träger für Zellen und biologische Faktoren, die injizierbar oder nichtinjizierbar, einfach oder komplex zusammengesetzt sowie biologischen Ursprungs oder synthetisch hergestellt sein können. Die ideale (noch nicht verfügbare) Gerüstsubstanz bietet den am Heilungsverlauf beteiligten Zellen mechanischen Schutz, sie optimiert das Zellwachstum und wird im gleichen Maß abgebaut wie sich Ersatzgewebe aufbaut. Eine aus der Basalmembran und Tunica propria von Schweineharnblasen hergestellte Substanz (porcine urinary bladder matrix, UBM) wird als azelluläre biologische Gerüstsubstanz (Acell Vet[®], Fa. Acell, Columbia, Maryland, USA) zum Einsatz bei Pferden in Form von Puder, Granula, Gel und anderem angeboten. Nach Herstellerangaben gehören Sehnen- und Bandschäden zu den potenziellen Einsatzgebieten. Die Substanz wird nach Suspension in den Sehnen- oder Banddefekt injiziert. Sie soll die Neovaskularisation stimulieren und körpereigenen Zellen als Gerüstsubstanz dienen. Diese Wirkungen sind unbelegt. In vitro zeigt die UBM-basierte Gerüstsubstanz antibakterielle Wirkung (11). Bekannt ist, dass die Substanz eine starke Entzündungsreaktion mit Schmerzhaftigkeit und Ödemen provoziert, die sich zum Teil schwer beherrschen lässt (20, 49).

Behandlung mit einzelnen Wachstumsfaktoren und Genterapie

Die Bedeutung verschiedener Wachstumsfaktoren bei der Sehnen- und Bandheilung (z. B. IGF-1, PDGF, BMP 12, TGF- β , VEGF,

GDF-5, bFGF) wurde bereits weitreichend untersucht (51). Wachstumsfaktoren werden einerseits als Bestandteil von thrombozytenreichem Plasma oder autologem Serum in zum Teil variabler Zusammensetzung und unbekannter Konzentration angewendet (s. o.). Darüber hinaus können sie als rekombinante, aufgereinigte Proteine hergestellt und dann in definierter Konzentration als Einzelsubstanz in die Sehnen- oder Bandläsion appliziert werden. Für den klinischen Einsatz in der Humanmedizin wurde z. B. rekombinanter „platelet derived growth factor“ (rhPDGF-BB) entwickelt. Phasenweise war ein IGF-1-Substrat (Tendotrophin[®]) kommerziell verfügbar. In einer tierexperimentellen Untersuchung an Pferden zeigten sich nach intraläsionaler IGF-1-Applikation eine verstärkte Zellproliferation und ein erhöhter Kollagengehalt. Biomechanisch bestand allerdings eine Tendenz zu erhöhter Steifheit der behandelten Sehnen (18). Rekombinant hergestellte Wachstumsfaktoren sind derzeit nicht für die klinische Anwendung am Pferd zugelassen.

Um den Nachteil einer kurzen Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren in vivo auszugleichen, wurde der Ansatz entwickelt, mesenchymale Stammzellen nach genetischer Veränderung (Transfektion) spezifische therapeutisch wirksame Proteine und Wachstumsfaktoren exprimieren zu lassen (14). Viral transfizierte und nicht viral transfizierte MSCs können das Kandidatengen eine begrenzte, zum Teil allerdings relativ lange Zeit (bis zu ca. 6 Monate) exprimieren (76). In einer Untersuchung war der Zugewinn auf die strukturellen Eigenschaften von equinen oberflächlichen Beugesehnen durch die Expression von IGF-1 durch gentechnisch veränderte Stammzellen jedoch minimal (63). Zusammenfassend erweist sich das Verfahren weder hinsichtlich seiner Effektivität noch seiner biologischen Sicherheit als praxisreif (76).

Zusammenfassende Betrachtung

Grundsätzlich ist es hinsichtlich der Therapie mit regenerativem Potenzial hilfreich zu unterscheiden, in welcher Phase der Sehnenheilung die Behandlung erfolgt. Die dargestellten Untersuchungen an Labortieren und in vitro liefern dahingehend wertvolle theoretische Erkenntnisse, die nachfolgend kurz den Phasen der Sehnenheilung zugeordnet werden sollen.

Bereits in der akuten Entzündungsphase (ca. 1–2 Wochen nach dem Insult) erscheint die Verwendung von PRP sinnvoll. In einer tierexperimentellen Untersuchung an Pferden führte PRP, das 7 Tage nach Herstellung der Läsionen injiziert wurde, bereits nach 7 Tagen zu einer signifikanten Reduktion von zellreicher entzündlicher Flüssigkeit in der Sehne (8). Theoretisch ist auch der Einsatz des ACS in der akuten Entzündungsphase denkbar, wenn dessen Hauptwirkung, vermittelt durch den Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten, antientzündlicher Natur sein sollte, was bislang ungeklärt ist. Die antientzündliche Wirkung von Stammzellen wird ebenfalls noch kontrovers diskutiert, sodass diese Therapie bislang vornehmlich in der proliferativen Phase (ca. 4–45 Tage nach dem Insult, s. u.) zum Einsatz kommt. In jedem Fall ist eine potenziel-



le Interaktion von herkömmlichen antientzündlich wirkenden Substanzen mit z. B. Stammzellen zu beachten (2). Die große Bedeutung der proteolytischen Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) in der akuten Entzündungsphase, die zu einer Vergrößerung des Sehnenschadens in dieser Phase beiträgt, lässt theoretisch an den wohl dosierten therapeutischen Einsatz von MMP-Hemmern wie z. B. TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases) denken. Ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs kann entweder eine Fibrose oder Degradation von Sehnen- und Bändergewebe nach sich ziehen, sodass die mechanischen Eigenschaften einer heilenden Sehne durch die Zuführung von MMP-Inhibitoren definitiv beeinflusst werden (56). So konnte in einer Untersuchung an Rattensehnen gezeigt werden, dass die Breitspektrum-MMP-Inhibitoren Doxycyclin und Ilomastat eine Aktivierung von MMP-13 verhindern (3). Nicht zuletzt ergeben sich auch Hinweise darauf, dass die gezielte Ruhigstellung der erkrankten Sehne durch fixierende Gliedmaßenverbände (Cast) in der akuten Entzündungsphase effektiv sein könnte (7).

In der späten Entzündungsphase oder der frühen proliferativen Phase der Sehnenheilung scheint die Anwendung von Stammzellprodukten und von Wachstumsfaktoren bzw. von thrombozytenreichem Plasma sinnvoll, denn es soll in diesem Abschnitt der Sehnenheilung vorteilhafterweise eine Beschleunigung der Produktion und eine qualitative Verbesserung von extrazellulärer Matrix erfolgen. Dies kann durch Stimulation des Zellmetabolismus, der Zellvermehrung oder der Migration von Vorläuferzellen aus dem Para- oder Endotendineum zum Ort des Defekts erfolgen. Keiner der oben genannten synthetisch hergestellten Wachstumsfaktoren ist derzeit für die Anwendung am Pferd zugelassen, wohingegen PRP den Vorteil bietet, dass die Herstellung dieses Substrats vergleichsweise einfach ist und es zahlreiche Wachstumsfaktoren enthält: Während TGF- β je nach Subtyp und Konzentration die Kollagensynthese stimulieren (42) oder eine Fibrose beschleunigen kann (51), wurde dieser Effekt nach Applikation von PRP, das ebenfalls Isoformen des TGF- β enthält, in künstlich erzeugte Schäden der oberflächlichen Beugesehne bei Pferden nicht beobachtet (9). Es scheint also die angemessene Mischung verschiedener Wachstumsfaktoren wichtiger zu sein als die Wirkung eines einzelnen Faktors. Noch nicht vollstän-

dig aufgeklärt ist allerdings die Bedeutung der einzelnen Wachstumsfaktoren bei der Sehnenheilung und somit auch die ideale Konzentration von Thrombozyten bzw. Wachstumsfaktoren.

Während weitgehende Einigkeit darüber besteht, dass der Einsatz von Stammzellen bzw. stromalen Zellen einen regenerativen Effekt hat, ist die Art des vermuteten Effekts noch nicht vollständig geklärt. Es bleibt also noch offen, ob auch für mesenchymale stromale Zellen die Neuentstehung von Sehnen- und Bändergewebe und/oder ein parakriner Einfluss im Vordergrund steht. Untersuchungen dazu werden in erster Linie dadurch erschwert, dass kein einzelner optimaler Marker für equine Stammzellen verfügbar ist und die Morphologie der neugebildeten Zellen eine Unterscheidung zwischen unerwünschten Fibroblasten und erwünschten Tenozyten nicht ohne Weiteres ermöglicht (85).

Wenngleich also sowohl Stammzellen als auch Wachstumsfaktoren bzw. Blutprodukte in der Proliferationsphase relevant erscheinen, liegen bislang noch nicht für alle Substrate In-vitro-Untersuchungen vor, die einen Vergleich zwischen den Substanzen erlauben. Einzelne Untersuchungen weisen darauf hin, dass auch eine Kombination von Blutprodukten und Zellen sinnvoll sein könnte (21, 22).

In der Umbau- und Reifungsphase der Sehnenheilung (ab ca. 45 Tage nach dem Insult) sollte die Therapie auf eine verbesserte Ausrichtung der Kollagenfaserbündel entlang der Zugrichtung abzielen. Dies wird bekanntermaßen durch ein kontrolliertes und dosiert gesteigertes Bewegungsregime positiv beeinflusst. Die Bedeutung der alleinigen Anwendung regenerativer Therapeutika in dieser Phase bedarf noch der weiteren Klärung.

Aufgrund der teilweise wesentlichen morphologischen und funktionellen Unterschiede der Sehnen- und Bänderstrukturen am Fuß des Pferdes (72) sollte der Effekt bestimmter Therapien idealerweise für die einzelnen Strukturen getrennt überprüft werden. Derzeit verfügbare Ergebnisse von Untersuchungen an Zellkulturen (z. B. Zellen aus equinen Fesselträgern oder oberflächlichen Beugesehnen) bzw. an Labortieren (z. B. Achillessehnen von Ratten) müssen deshalb im Hinblick auf andere Sehnen- und Bändergewebestrukturen (z. B. tiefe Beugesehne, Unterstützungsbänder des Pferdes) und andere Spezies (Pferd) angemessen interpretiert werden.

Nicht zuletzt wird die Auswahl einer geeigneten erscheinenden Sehnen- und Bändertherapie vielfach durch wirtschaftliche Faktoren und die Art der Handhabbarkeit beeinflusst. So unterscheiden sich die Herstellungskosten bei Stammzell- und Blutprodukten zum Teil erheblich. Allein die zur Herstellung von PRP kommerziell verfügbaren Kits weisen im Einkauf eine erhebliche Preisdifferenz auf, die sich zum Teil in der Thrombozytenkonzentration des Endprodukts widerspiegelt. Der subjektive Eindruck eines derzeit häufigeren Einsatzes von ACP im Vergleich zum PRP unter Praxisbedingungen resultiert vermutlich nicht zuletzt auch aus der einfacheren und relativ kostengünstigeren Herstellbarkeit von sterilem Plasma (ACP).

Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Fazit für die Praxis

Die Regeneration von Sehnen- und Bändergewebe wird wahrscheinlich durch ein komplexes Zusammenspiel aus Gerüstsubstanzen, Wachstumsfaktoren und Zellen begünstigt. Obwohl noch nicht abschließend geklärt ist, welches Blut- oder Stammzellprodukt oder welche Kombination aus Zellen, Wachstumsfaktoren und Gerüstsubstanzen die Sehnen- und Bänderregeneration zu welchem Zeitpunkt, in welchen Konzentrationen und in welchem Zielgewebe am effektivsten beeinflusst, sind die Ergebnisse zahlreicher bisheriger Untersuchungen in Hinblick auf ein verbessertes Resultat sehr vielversprechend. An anderer Stelle sollen deshalb die Ergebnisse zur Anwendung von regenerativen Therapeutika an Sehnen und Bändern lebender Pferde vorgestellt werden.

Literatur

- Arnholt SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, Addicks K, Litzke LF. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2007; 68: 1095–1105.
- Arnholt S, Müller M, Raabe O, Addicks K, Wenisch S. Einfluss nichtsteroidaler Antiphlogistika auf equine mesenchymale Stammzellen *in vitro*. *Tierärztl Prax* 2010; 38 (G): 37–46.
- Arnoczky SR, Lavagnino M, Egerbacher M, Caballero O, Gardner K. Matrix Metalloproteinase Inhibitors Prevent a Decrease in the Mechanical Properties of Stress-Deprived Tendons. An *In Vitro* Experimental Study. *Am J Sports Med* 2007; 35: 763–769.
- Baltzer AWA, Moser C, Jansen SA, Krauspe R. Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage* 2009; 17: 152–160.
- Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells. A Novel Treatment Modality for Tissue Repair. *Hematopoietic Stem Cells VII: Ann N Y Acad Sci* 2009; 1176: 101–117.
- Birch HL, Worboys S, Eissa S, Jackson B, Strassburg S, Clegg PD. Matrix metabolism rate differs in functionally distinct tendons. *Matrix Biol* 2008; 27: 182–189.
- Bosch G. Towards a staged evidence based approach for the treatment of tendon injuries in the horse. [PhD Dissertation]. Utrecht, the Netherlands: Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, 2009.
- Bosch G, van Weeren PR, Barneveld A, van Schie HTM. Computerised analysis of standardised ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons after intratendinous platelet rich plasma or placebo. *Vet J* 2009; doi: 10.1016/j.tvjl.2009.10.014.
- Bosch G, van Schie HTM, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CHA, Barneveld A, van Weeren PR. Effects of Platelet-Rich Plasma on the Quality of Repair of Mechanically Induced Core Lesions in Equine Superficial Digital Flexor Tendons: A Placebo-Controlled Experimental Study. *J Orthop Res* 2010; 28 (2): 211–217.
- Brehm W. Erfahrungen mit der Stammzell-Therapie von Sehnenläsionen beim Pferd. In: *Vortragsband des BPT-Kongress 2008, Hannover, 13.-16. November*, BPT Akademie GmbH, Frankfurt, 2008; 20–26.
- Brennan EP, Reing J, Chew D, Myers-Irvin JM, Young EJ, Badylak SF. Antibacterial activity within degradation products of biological scaffolds composed of extracellular matrix. *Tissue Eng* 2006; 12: 1249–2955.
- Burmester GR, Grifka J. Neufassungen der Empfehlungen der Kommission Pharmakotherapie der DGRh. Stellungnahme zum Einsatz von Orthokin. *Z Rheumatol* 2007; 66: 83–84.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1076–1084.
- Colleoni S, Donofrio G, Lagutina I, Duchi R, Galli C, Lazzari G. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells* 2005; 7 (3): 154–166.
- Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, Mari G, Merlo B, Romagnoli N, Spadari A, Galli C, Lazzari G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Vet Res Commun* 2009; 33 (8): 811–821.
- Conrad S, Nufer F, Mundle K, Ihring J, Seid K, Walliser U, Skutella T. Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe des Pferdes – Isolation Expansion und Charakterisierung. In: *Vortragszusammenfassungen der XVIII. Tagung über Pferdekrankheiten im Rahmen der Equitana, Essen, 21.-22. März 2009*; wak Verlag GmbH, Gescher, 2009; 119.
- Crovace A, Lacitignola L, Rossi G, Francioso E. Histological and Immunohistochemical Evaluation of Autologous Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Bone Marrow Mononucleated Cells in Collagenase-Induced Tendinitis of Equine Superficial Digital Flexor Tendon. *Vet Med Int* 2010; in press. doi: 10.4061/2010/250978.
- Dahlgren LA, van der Meulen MCH, Bertram JEA, Starrak GS, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res* 2002; 20: 910–919.
- Dahlgren LA. Fat derived mesenchymal stem cells for equine tendon repair. *Regenerative Medicine* 2009; 4 (6), (Suppl. 2): S14.
- Dahlgren LA. Management of Tendon Injuries. In: *Current Therapy in Equine Medicine*, 6th ed. Robinson NE, Sprayberry KA, eds. St. Louis: Saunders, Elsevier 2009; 518–523.
- Del Bue M, Riccò S, Conti V, Merli E, Ramoni R, Grolli S. Platelet lysate promotes *in vitro* proliferation of equine mesenchymal stem cells and tenocytes. *Vet Res Commun* 2007; 31 (Suppl 1): 289–292.
- Del Bue M, Riccò S, Ramoni R, Conti V, Gnudi G, Grolli S. Equine adipose tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association *in vitro* and *in vivo*. *Vet Res Commun* 2008; 32 (Suppl 1): S51–S55.
- De Mos M, van der Windt AE, Jahr H, van Schie HT, Weinans H, Verhaar JA, van Osch GJ. Can platelet rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med* 2008; 36: 1171–1178.
- De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology* 2011; 75 (8): 1431–1443.
- Durando MM, Zarucco L, Schaer TP, Ross M, Reef VB. Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine Vet Educ* 2006; 18: 75–79.
- Durgam SS, Stewart AA, Caporali EH, Karlin WM, Stewart MC. Effect of tendon-derived progenitor cells on a collagenase-induced model of tendinitis in horses. *Regenerative Medicine* 2009; 4 (6), (Suppl. 2): S27.
- Dyson S. Medical management of superficial digital flexor tendinitis: a comparative study in 219 horses (1992–2000). *Equine Vet J* 2004; 36: 415–419.
- Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 1502–1508.
- Everts PAM, Hoffmann J, Weibrich G, Mahoney CB, Schönberger PAM, van Zundert A, Knape JTA. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfusion Medicine* 2006; 16; 363–368.
- Fibbe WE. Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1106: 272–278.
- Fortier LA. Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. *Vet Surg* 2005; 34: 415–423.
- Fortier LA, Smith RK. Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2008; 24: 191–201.
- Frisbie DD, Kawcak CE, Werpy NM, Park RD, McIlwraith CW. Clinical, biochemical and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res* 2007; 68: 290–296.
- Frisbie DD, Smith RKW. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopedics. *Equine Vet J* 2010; 42: 86–89.
- Grimm J, Kircher ME, Weissleder R. Cell tracking. Prinzipien und Anwendung. *Radiologie* 2007; 47: 25–33.
- Guest DD, Smith MR, Allen WR. Monitoring the fate of autologous and allogenic progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: Preliminary study. *Equine Vet J* 2008; 40: 178–181.
- Guest DJ, Smith MRW, Allen MR. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J* 2010; 42: 636–642.
- Guest D, Li X, Allen W. Establishing an equine embryonic stem cell line. *Regenerative Medicine* 2009; 4 (6) (Suppl. 2): S18.
- Herthel D. Clinical use of stem cells and marrow components to stimulate suspensory ligament regeneration. In: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. Ross MW, Dyson SJ, eds. Philadelphia: Saunders 2003; 673–674.
- James SL, Ali K, Pocock C, Robertson C, Walter J, Bell J, Connell D. Ultrasound guided dry needling and autologous blood injection for patellar tendinosis. *Br J Sports Med* 2007; 41: 518–521.
- Kissich C, Böttcher P, Gottschalk J, Brehm W, Ionita JC. Biochemische Eigenschaften des equinen Autologous Conditioned Plasma™. In: *Dtsch. Vet.*



- Med. Gesellsch (Hrsg.): 20. Arbeitstagung der Fachgruppe „Pferdekrankheiten“, Hannover, 29.2.-1.3.2010; Gießen: DVG-Service GmbH, 2010; 60.
42. Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, Lonaker T, Chang J. Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production. *J Hand Surg [Am]* 2002; 27: 615–620.
 43. Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD, Betts DH. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol* 2007; 7: 26.
 44. Koch TG, Berg LC, Betts DH. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can Vet J* 2008; 49: 1009–1017.
 45. Koch TG, Berg LC, Betts DH. Current and future regenerative medicine – principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can Vet J* 2009; 50: 155–665.
 46. Koerner J, Nestic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 1613–1619.
 47. Lawall H, Bramlage P, Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal. *Thromb Haemost* 2010; 103: 696–709.
 48. Leppänen M, Miettinen S, Mäkinen S, Wilpola P, Katiskalahti T, Heikkilä P, Tulamo RM. Management of equine tendon & ligament injuries with expanded autologous adipose derived mesenchymal stem cells: a clinical study. *Regenerative Medicine* 2009; 4 (6), (Suppl. 2): S21.
 49. Lutz S, Jahn W, Sill V, Pokar J, Jaek F, Brehm W. Vergleich der intraläsionalen Behandlung von Fesselträgerläsionen mit thrombozytenangereichertem Plasma (PRP) und xenogener, azellulärer Matrix (ACell®). In: Dtsch. Vet. Med. Gesellsch. (Hrsg.): 20. Arbeitstagung der Fachgruppe „Pferdekrankheiten“, Hannover, 29.2.-1.3.2010; Gießen: DVG-Service GmbH, 2010; 61.
 50. Majewski M, Ochsner P, Fangjun Liu, Flueckiger R, Evans C. Achilles tendon healing by autologous conditioned serum. Posterpräsentation im Rahmen des 9th Congress of the European Federation of National Associations of Orthopedics and Traumatology; Nizza, Frankreich, 29. Mai.-1. Juni 2008; Abstract P1283.
 51. Molloy T, Wang Y, Murrell GAC. The Roles of Growth Factors in Tendon and Ligament Healing. *Sports Med* 2003; 33 (5): 381–394.
 52. Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. Effect of adipose derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am J Vet Res* 2008; 69: 928–937.
 53. Oedayrajsingh Varma MJ, Breuls RGM, Schouten TE, Jurgens WJFM, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, van Milligen FJ. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev* 2007; 16: 91–104.
 54. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng* 2007; 13: 2949–2955.
 55. Paris DBBP, Stout TAE. Equine embryos and embryonic stem cells: Defining reliable markers of pluripotency. *Theriogenology* 2010; 74: 516–524.
 56. Pasternak B, Aspenberg P. Metalloproteinase and their inhibitors – diagnostic and therapeutic opportunities in orthopedics. *Acta Orthopaedica* 2009; 80: 693–703.
 57. Radcliffe CH, Fortier LA. Development of a patient-side construct for cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and platelet rich plasma composite grafts generated through simple centrifugation techniques. Proceedings of the ACVS Symposium, 5.-7.10. 2006; Washington DC, USA; *Vet Surg* 2006; 35 (6): E21–22.
 58. Ramirez JUC. Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse [PhD Dissertation]. Bellaterra, Spanien: Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Universitat Autònoma Barcelona; 2006.
 59. Reed SA, Johnson SE. Equine Umbilical Cord Blood Contains a Population of Stem Cells That Express Oct4 and Differentiate Into Mesodermal and Endodermal Cell Types. *J Cell Physiol* 2008; 215: 329–336.
 60. Ribitsch I, Burj J, Gittel C, Brehm W. Umbilical cord blood & umbilical cord matrix: a comparison of two potential mesenchymal stem cell sources. *Regenerative Medicine* 2009; 4 (6), (Suppl. 2): S24.
 61. Richardson LE, Duhia J, Clegg PD, Smith R. Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol* 2007; 25: 409–416.
 62. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I. Comparison of Surgically Repaired Achilles Tendon Tears Using Platelet-Rich Fibrin Matrices. *Am J Sports Med* 2007; 35: 245–251.
 63. Schnabel LV, Lynch ME, van der Meulen MC, Yeager AE, Kornatowski MA, Nixon AJ. Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 2009; 27 (10): 1392–1398.
 64. Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, Fortier LA. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 2007; 25: 230–240.
 65. Schnabel LV, Sonea HO, Jacobson MS, Fortier LA. Effects of platelet rich plasma (PRP) and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explant cultures. *Equine Vet J* 2008; 40: 260–265.
 66. Smith JJ, Ross MW, Smith RK. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2006; 19: 43–47.
 67. Smith RK. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil* 2008; 30: 1752–1758.
 68. Smith RKW. Principles of stem cell therapy in the horse – the science behind the technology. *Pferdeheilk* 2008; 24: 508–512.
 69. Smith RKW. Stem cell therapy for tendon and ligament injuries in the horse – technique and outcome. *Pferdeheilk* 2008; 24: 513–518.
 70. Staszyc C, Mensing N, Hambruch N, Häger JD, Pfarrer C, Gasse H. Equine periodontal ligament: a source of mesenchymal stem cells for regenerative therapies in the horse? *Regenerative Medicine* 2009; 4 (6), (Suppl. 2): S26.
 71. Stewart AA, Barrett JG, Byron CR, Yates AC, Durgam SS, Evans RB, Stewart MC. Comparison of equine tendon-, muscle- and bone marrow-derived cells cultured on tendon matrix. *Am J Vet Res* 2009; 70: 750–757.
 72. Souza MV, van Weeren PR, van Schie HTM, van de Lest CHA. Regional differences in biochemical, biomechanical and histomorphological characteristics of the equine suspensory ligament. *Equine Vet J* 2010; 42: 611–620.
 73. Sun HB, Yonghui L, Fung DT, Majeska RJ, Schaffler MB, Flatow EL. Coordinate Regulation of IL-1 β and MMP-13 in Rat Tendons Following Subrupture Fatigue Damage. *Clin Orthop Rel Res* 2008; 466: 1555–1561.
 74. Suresh SP, Ali KE, Jones H, Connell DA. Medial epicondylitis: is ultrasound guided autologous blood injection an effective treatment? *Br J Sports Med* 2006; 40: 935–939.
 75. Taylor MA, Norman TL, Clovis NB, Blaha JD. The response of rabbit patella tendons after autologous blood injection. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 25: 70–73.
 76. Taylor SE, Smith RK, Clegg PD. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J* 2007; 39: 172–180.
 77. Thorpe CT, Clegg PD, Birch HL. A review of tendon injury. Why is the equine superficial flexor tendon most at risk? *Equine Vet J* 2010; 42: 174–180.
 78. Vidal MA, Kilroy GE, Johnson JR, Lopez MJ, Moore RM, Gimble JM. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Vet Surg* 2006; 35: 601–610.
 79. Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg* 2007; 36: 613–622.
 80. Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol* 2009 Apr 22; 10: 29. doi: 10.1186/1471-2121-10-29.
 81. Waselau M, Sutter WW, Genovese RL, Bertone AL. Intralesional injection of platelet-rich-plasma followed by controlled exercise for treatment of mid-



- body suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232: 1515–1520.
82. Weinberger T. Klinische Erfahrungen mit der Anwendung von ACS/ORTHOKIN/IRAP beim Pferd. *Pferde Spiegel* 2008; 11: 111–115.
83. Wright-Carpenter T, Klein P, Schäferhoff P, Appell HJ, Mir LM, Wehling P. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: a pilot study on sportsmen with muscle strains. *Int J Sports Med* 2004; 25: 588–593.
84. Wright-Carpenter T, Opolon P, Appell HJ, Meijer H, Wehling P, Mir LM. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: animal experiments using a muscle contusion model. *Int J Sports Med* 2004; 25: 582–587.
85. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SI, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orth Res* 1998; 16: 406–413.



13.2 Publikation 2

Geburek, F., Stadler, P.

Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Ergebnisse der Behandlung mit Stammzellen, Blutprodukten, Gerüstsubstanzen und Wachstumsfaktoren – eine Literaturübersicht und Metaanalyse.

Pferdeheilkunde 2011, 27 (6): 609-625.

Pferdeheilkunde 27 (2011) 6 (November/Dezember) 609-625

Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Ergebnisse der Behandlung mit Stammzellen, Blutprodukten, Gerüstsubstanzen und Wachstumsfaktoren – eine Literaturübersicht und Metaanalyse

Florian Geburek und Peter Stadler

Klinik für Pferde, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Zusammenfassung

Herkömmliche Behandlungsansätze bei Sehnen- und Bänderkrankungen führen nach einer langen Heilungsphase zur Entstehung von funktionell minderwertigem Ersatzgewebe (Reparatur). Daraus resultiert eine relativ hohe Rezidivrate. Intraläsionalen Behandlungen mit Zellen, Blutprodukten, Gerüstsubstanzen und biologischen Faktoren wie z.B. Wachstumsfaktoren wird hingegen ein regenerativer Effekt zugeschrieben. In der vorliegenden Arbeit werden u.a. die wesentlichen Erkenntnisse zur Wirkung von mesenchymalen Stromazellen (MSCs) aus Knochenmark und Fettgewebe, von embryonalen Stammzellen (ESCs) sowie der Blutprodukte PRP (Thrombozytenreiches Plasma), ACP (autologes konditioniertes Plasma), ACS (autologes konditioniertes Serum) an lebenden Pferden vorgestellt und diskutiert. Es liegen bezogen auf das Pferd in der Literatur Untersuchungen mit folgenden Methoden vor: 1.) Klinische Fallserien, die über die Angabe einer Rezidivrate einen bedingten Vergleich zu Ergebnissen anderer Behandlungsformen erlauben. 2.) Tierexperimentelle kontrollierte Untersuchungen an künstlich erzeugten Sehnen- und Bandstrukturen, die vielfach detaillierte Ergebnisse zur feingeweblichen, biochemischen und biomechanischen Qualität des Ersatzgewebes liefern. 3.) Einzelne placebokontrollierte Untersuchungen an natürlich entstandenen Tendopathien, die zwar theoretisch den höchsten Grad der Evidenz aufweisen aber methodische Schwachstellen aufweisen. Unter anderem werden die Vorzüge und Nachteile der verschiedenen Therapeutika, ihre biologische Sicherheit, ihr Effekt im Hinblick auf die strukturellen und biomechanischen Eigenschaften der verschiedenen Sehnen- und Bandstrukturen sowie ihr Einfluss auf die Rezidivrate von Sehnen- und Bänderkrankungen und auf die Gebrauchsfähigkeit der Pferde dargestellt und diskutiert. Es zeigt sich ein Trend zur Überlegenheit von Substraten mit regenerativem Potential gegenüber anderen Behandlungsformen wenngleich noch unklar ist, welches Produkt bzw. welche Kombination von Substraten im Einzelfall am besten geeignet ist.

Schlüsselwörter: Pferd / Sehne / Band / Fesselträger / regenerative Medizin / Knochenmark / Fettgewebe / Stammzellen / MSC / PRP / ACP / ACS / IRAP

Regenerative therapy for tendon and ligament disorders in horses: results of treatment with stemcells, blood products, scaffolds and growth factors – review of the literature and meta analysis

Conventional treatments for tendon and ligament disorders give rise to functionally inferior repair tissue within a relatively long healing phase which results in a relatively high recurrence rate. There is however increasing evidence that intralésional treatments with cells, blood products, scaffolds and biological factors such as growth factors have a regenerative effect. In the present review the principal scientific findings on the clinical effects in living horses of, for example, bone-marrow-derived and adipose-tissue-derived mesenchymal stromal cells (MSCs), embryonic stem cells (ESCs) and blood products such as PRP (platelet rich plasma), ACP (autologous conditioned plasma) and ACS (autologous conditioned serum) are summarized and discussed. Relating to horses, several scientific investigations with different study designs can be found in the literature: 1) Clinical case series, which allow a limited comparison of different treatment methods on the basis of the resulting recurrence rate. 2) Experimental animal studies on controlled artificial tendon defects, which often provide detailed results on the histological, biochemical and biomechanical quality of repair tissue. 3) Single placebo-controlled studies of naturally occurring tendinopathies which should, at least theoretically, provide the highest degree of evidence, however show methodological weaknesses in many cases. Among other aspects, the advantages and disadvantages of the various substrates, their biological safety, their effect with regard to the structural and biomechanical properties of different tendons and ligaments and their effect on the recurrence rate of tendon and ligament disorders are described and discussed. There is increasing evidence that substrates with regenerative potential are superior to other, i.e. conventional, treatments although it is still not clear which product or combination of substrates is most appropriate in individual cases.

Keywords: horse / tendon / ligament / suspensory ligament / regenerative medicine / bone marrow / adipose tissue / stem cell / MSC / PRP / ACP / ACS / IRAP

Einleitung

Nach Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne (OBS) kehren nur ca. 40-60% der Pferde in den Sport zurück. Danach liegt die Rezidivrate, je nach Nutzungsrichtung, zwischen 23% und 67% (Rennpferde: 53-67%) (Dyson 2004,

O'Meara et al. 2011). Die intraläsionale Behandlung mit Hyaluronsäure oder polysulfatierten Glykosaminoglykanen (PSGAG) hat dabei im Vergleich zur Therapie mit kontrollierter Bewegung keine bessere therapeutische Wirkung (Dyson 2004).



Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Ergebnisse der Behandlung mit Stammzellen, Blutprodukten, Gerüstsubstanzen und Wachstumsfaktoren – eine Literaturübersicht und Metaanalyse

Die Heilung von Erkrankungen z.B. des Fesselträgers (FT) nimmt nach Literaturangaben je nach Lokalisation (Vorder-/Hinterhand), Dauer der Erkrankung (akut/chronisch) und Art der konventionellen Behandlung mindestens 3-9 Monate in Anspruch (Dyson und Genovese 2003). Chronische und rezidivierende Fesselträgererursprungserkrankungen an der Hinterhand haben nach Literaturangaben eine schlechte Prognose: Nur 14% der Pferde erreichten in einer Untersuchung nach 6 Monaten (systemische Gabe von PSGAG, orthopädischer Hufbeschlag, kontrollierte Bewegung) wieder ihr ursprüngliches Leistungsniveau (Dyson 1994). Diese Rate kann sich nach Stoßwellentherapie auf 41% verbessern (Crowe et al. 2004). Die Prognose von akuten Erkrankungen des Fesselträgerursprungs an der Vorderhand ist hingegen gut bis sehr gut. Ungefähr 90% der Pferde sind nach 3 Monaten (Boxenruhe, kontrollierter Bewegung) wieder voll einsetzbar (Personett et al. 1983, Dyson 2000). Zur Prognose von chronischen Erkrankungen des Fesselträgerursprungs ausschließlich an der Vorderhand sind uns keine Angaben aus der Literatur bekannt. Nach einer Untersuchung, in der die Lokalisation innerhalb des Fesselträgers unberücksichtigt blieb, erreichten 58% der Pferde mit FT-Erkrankungen an der Vorderhand ihr ursprüngliches Leistungsniveau, während 22% der Patienten mit FT-Schäden an der Hinterhand wieder entsprechend eingesetzt werden konnten (van den Belt et al. 1994). Bleibt die Lokalisation (Vorder-/Hinterhand) der Fesselträgerursprungsläsion unberücksichtigt, wird die Prognose hinsichtlich erfolgreicher Wiederaufnahme der ursprünglichen Nutzung (nach Boxenruhe und kontrollierter Bewegung) mit 66-86% wiedergegeben (Dyson 1994, Rijkenhuizen et al. 2007).

Zusammenfassend verläuft die Sehnen- und Bandheilung langsam (van Schie et al. 2009) und bisherige Behandlungsformen sind vielfach unbefriedigend (Dyson 2004), weil sie zur Entstehung eines funktionell minderwertigen Ersatzgewebes (Reparatur) (Dowling et al. 2000) mit einer hohen Rezidivrate führen (Thorpe et al. 2010). In den letzten Jahren wurden deshalb verschiedene Therapieansätze mit regenerativem Potential wie z.B. zellbasierte Substrate, Blutprodukte und Gerüstsubstanzen zur Behandlung von Sehnen- und Bänderkrankungen aufgrund von Untersuchungen in vitro, an Labortieren und am Menschen angewendet, denn diese Untersuchungen liefern Hinweise darauf, dass es zu einer Regeneration der geschädigten Struktur mit funktioneller und struktureller Verbesserung gegenüber fibrösem Narbengewebe kommen könnte (Geburek und Stadler 2011). Mehrere Arbeitsgruppen erforschen derzeit die Wirkung regenerativer Therapeutika auf Sehnen- und Bandläsionen an lebenden Pferden intensiv: In der Literatur sind zunehmend placebo-kontrollierte, verblindete tierexperimentelle Studien und sogar einzelne kontrollierte Untersuchungen an natürlich vorkommenden Tendopathien von Pferden verfügbar, die nachfolgend zusammengefasst und diskutiert werden. Die Ergebnisse wesentlicher Kasuistiken in Bezug auf die Erfolgs- und Rezidivrate sind in Tabelle 1 dargestellt.

Quellen

Die Datenbanken PubMed, Web of Science und die Internet Suchmaschine Google wurden nach den Stichworten „Pferd“, „Sehne“, „Fesselträger“ und „Knochenmark“, „Stammzellen“, „Knochenmarkspirat Konzentrat“, „thrombozytenreiches

Plasma“, „autologes konditioniertes Serum“, „IRAP“, „autologes konditioniertes Plasma“ (bzw. den entsprechenden Abkürzungen und englischen Stichworten) durchsucht.

Behandlung mit stammzellhaltigen Substraten und deren Nebenprodukten

Zur therapeutischen und experimentellen Behandlung von natürlich auftretenden Sehnen- und Bänderkrankungen werden beim Pferd derzeit in erster Linie mesenchymale stromale Zellen bzw. mesenchymale Stammzellen (Acronym für beide: MSCs) aus dem Knochenmark (Smith et al. 2003, Fortier und Smith 2008, Burk und Brehm 2010, Godwin et al. 2011), aus Fettgewebe (Richardson et al. 2007, Del Bue 2008, Nixon et al. 2008, Dahlgren 2009a, Leppänen et al. 2009a) und seltener aus Nabelschnurblut (Koch et al. 2007, Ribitsch et al. 2009) gewonnen. Die Zahl der experimentellen Untersuchungen zur Anwendung embryonaler Stammzellen bei Pferden nimmt zu (Guest und Allen 2009, Guest et al. 2010, Paris und Stout 2010).

Art der Applikation

Stammzellen aus Knochenmark werden meistens in einer geringen Menge des autologen Knochenmarküberstandes („bone marrow supernatant“, „Knochenmarkserum“) suspendiert, Stammzellen aus Fettgewebe werden z.B. in PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) aufgeschwemmt (Nixon et al. 2008). Die Injektion eines Volumens von ca. 0,6-3 ml in die Sehne erfolgt üblicherweise in Sedierung und unter Leitungs- und Lokalanästhesie im Bereich der Injektionsstelle. Die Punktion der Kernläsion kann am stehenden oder am aufgehobenen Fuß erfolgen und geschieht vorteilhafterweise unter sonographischer Kontrolle (sterile Bedingungen) entweder im Faserverlauf oder quer dazu. Üblicherweise werden für die zumeist einmalige Applikation Kanülen mit einer Durchmesser von 19-23 G verwendet (Smith 2008b, Dahlgren 2009b). Die Anzahl der Punktionen variiert (z.B. 1-4) und wird meist von der Größe der Läsion und vom Substrat abhängig gemacht (Godwin et al. 2011).

Zeitpunkt der Applikation von stammzellhaltigen Substraten

Der optimale Zeitpunkt für die Applikation von Substanzen mit regenerativem Potential orientiert sich idealerweise an der Art ihrer Wirkung (Bosch 2009), und er ist noch für keine Stammzellart, Läsion und Spezies bekannt (Koch et al. 2009). Pferde mit Tendopathien der OBS, die 83 Tage nach dem Insult mit Stammzellen behandelt wurden, zeigten Rezidive. Dagegen blieben Pferde, die 44 Tage nach dem Insult dieselbe Behandlung erhielten, rezidivlos. Es wurde vermutet, dass die später behandelten Sehnen zum Zeitpunkt der Behandlung bereits unelastisches Narbengewebe aufwiesen (Smith und Webbon 2005, Fortier und Smith 2008). In einer aktuellen Untersuchung zeigte sich, dass die durchschnittliche Dauer zwischen der Entstehung des Sehnenschadens und der Implantation von MSCs aus Knochenmark bei den Pferden ohne Rezidiv bei \bar{X} 46 Tagen und bei denjenigen, die ein Rezidiv entwickelten, bei \bar{X} 53.3 Tagen lag (Unterschied nicht signifikant). Nach Einteilung der Pferde in die Gruppen „Behandlung \leq 5 Wochen“, „Behandlung zwischen 6 und 8 Wochen“ und „Behandlung \geq 9 Wochen“ (jeweils nach Insult) stieg die Rezidivrate konti-



nuierlich von 20,8% über 24,1% bis auf 35% (Godwin et al. 2011). Wenngleich diese Unterschiede ebenfalls nicht signifikant waren, deuten auch diese Ergebnisse darauf hin, dass es mit zunehmender Dauer zu einer Zunahme unelastischen Narbengewebes in der Läsion kommt. Deshalb wird derzeit empfohlen, die Stammzellbehandlung nach der akuten Entzündungsphase (Dauer ca. bis Tag 10) und idealerweise vor der Entstehung von Narbengewebe (Reifungs- oder Umbauphase, ca. ab Tag 45), also innerhalb von 3-4 Wochen nach dem Insult in der Proliferationsphase vorzunehmen (Dahlgren 2009b). Bei Kultivierung von MSCs ist es nicht immer möglich, diese Zeitspanne einzuhalten.

Substrate aus Knochenmark

Behandlung natürlich entstandener Sehnen- und Bandschäden mit nativen Knochenmarksaspiraten

Zur Behandlung von Erkrankungen des FTs mit Knochenmarksaspiraten liegen unkontrollierte Fallsammlungen vor. Es wurden in einer Studie 5-30 ml Knochenmarksaspirat in den Bereich der Läsion platziert (67% Vordergliedmaße, 33% Hintergliedmaße). Von 24 Pferden waren nach 6 Monaten 75% wieder in vollem Training (Rosenbrock et al. 2004a). In einem Beitrag, der offenbar auf die selben Daten zurückgreift, wird eine Rezidivrate (Zeitraum 6-18 Monate nach Behandlung) von 4% angegeben (Rosenbrock et al. 2004b). In einer anderen Fallsammlung wurden von 100 Pferden 84 (19 Vordergliedmaßen, 81 Hintergliedmaßen) nach Behandlung mit Knochenmark nach 6 Monaten Rekonvaleszenz wieder in vollem Umfang genutzt und waren lahmheitsfrei (Herthel 2001, Herthel 2003). Lediglich 2 Pferde wiesen 2-3 Tage nach Behandlung eine lokal erhöhte Schmerzhaftigkeit auf. Fünfzehn Pferde wurden allerdings begleitend chirurgisch durch Fasziotomie bzw. Resektion des Retinaculum flexorum behandelt. Wissenschaftliche Studien von hoher Evidenz (kontrollierte und verblindete Studien) zur Applikation von nativem Knochenmark in Sehnen- und Bandschäden liegen nach Kenntnis der Autoren nicht vor.

Behandlung natürlich entstandener Sehnen- und Bandschäden mit azellulärem Knochenmark

Zum Einsatz von azellulärem Knochenmarküberstand liegt unter der Bezeichnung „autologes konditioniertes Plasma aus Knochenmark“ („bone marrow-autologous conditioned plasma“, BM-ACP) das mit dem ACP kit (Fa. Arthrex GmbH, Karlsfeld), hergestellt wird, ein Erfahrungsbericht an 28 Pferden vor. Dabei wurden Knochenmarksaspirate unter Zugabe von Zitrat zentrifugiert (siehe auch ACP) und der plasmaartige Überstand vornehmlich bei Pferden mit sonographisch diagnostizierten Desmopathien des Fesselträgerursprungs intraläsional injiziert. Bei ca. 67% der Patienten mit Desmopathie des Fesselträgerursprungs an der Vorderhand war nach maximal 3 Monaten keine Lahmheit mehr feststellbar, ca. 55 % der Patienten mit Desmopathie an der Hinterhand waren nach einer Zeit von maximal 3 Monaten ohne Lahmheit (Künneke et al. 2008). Eine Differenzierung nach Alter der Läsionen wurde in der Untersuchung zum BM-ACP nicht vorgenommen, auch fehlt eine Aussage über die Rezidivrate. Eine kontrollierte, verblindete Studie zum Einsatz von azellulärem Knochenmark ist für das Pferd nach unserer Kenntnis noch nicht verfügbar.

Nicht kultivierte mononukleäre Zellen aus Knochenmark (bone marrow mononucleated cells, BMMNCs)

Behandlung experimentell erzeugter Sehenschäden: Placebo-kontrollierte Studien

Zur Anwendung von BMMNCs bei equinen Sehnen- und Bandschäden liegen Erfahrungsberichte und einzelne placebokontrollierte tierexperimentelle Untersuchungen an der OBS (Kollagenase Modell) an 3 bzw. 6 Pferden vor (Crovace et al. 2007, Crovace et al. 2010). Gegenüber der Placebobehandlung wurden eine verbesserte Sehnenarchitektur, ein verbessertes Kollagen I/III Verhältnis sowie eine erhöhte Expression von COMP (Glykoprotein, das die extrazelluläre Matrix stabilisiert) nachgewiesen (Crovace et al. 2010). Eine Kontrolle hinsichtlich der Gliedmaßenfunktion bzw. der Rezidivrate erfolgte nicht. In einer weiteren Untersuchung an 6 Pferden wurden die Sehnenläsionen 12 Tage nach der Erzeugung mit BMMNCs behandelt oder blieben unbehandelt. Nach 48 Tagen mit kontrolliertem Bewegungsregime erfolgte die Entnahme von Sehnenbiopsien, deren feingewebliche Analyse in der Therapiegruppe Hinweise auf eine starke Infiltration mit Entzündungszellen, die Synthese von extrazellulärer Matrix, Reduktion von Bereichen mit nekrotischem Gewebe sowie eine geringfügig erhöhte zelluläre Proliferationsrate lieferte. Die Befunde werden als Anzeichen einer beschleunigten Sehnenheilung bewertet (Barreira et al. 2008). Behandlung natürlich entstandener Sehnen- u. Bandschäden Zur Behandlung von natürlich entstandener Sehnen- u. Bandschäden liegen nach unserer Kenntnis keine kontrollierten Studien vor.

Kultivierte MSCs aus Knochenmark (BM-MSCs)

Behandlung experimentell erzeugte Sehenschäden: Placebo-kontrollierte Studien

Nach einer Voruntersuchung an 3 Pferden (Crovace et al. 2008) wurden in einer Untersuchung an 6 Pferden Sehnenläsionen der OBS mit Kollagenase erzeugt und unverblindet mit expandierten, d.h. kultivierten MSCs aus Knochenmark in Fibrinkleber, frischen mononukleären Zellen aus Knochenmark in Fibrinkleber, nur mit Fibrinkleber oder nur mit einem Placebo behandelt (Crovace et al. 2010). Das Kollagen I/III Verhältnis, die Expression von COMP und die Sehnenarchitektur waren nach Behandlung mit beiden zellhaltigen Substraten (MSCs und BMMNCs) nach einer Beobachtungszeit von 21 Wochen gegenüber der Placebobehandlung besser (s.o.). In einer vergleichenden Untersuchung zur Wirkung von MSCs aus Knochenmark und IGF-I exprimierenden MSCs aus Knochenmark (s.u.) führte die Behandlung mit beiden Zelltypen zu einer Verbesserung des histologischen Scores (Schnebel et al. 2009). Eine ultrastrukturelle (transmissionselektronenmikroskopische) Untersuchung von Sehnen- u. Bandschäden nach mechanischer Schädigung und Behandlung mit BM-MSCs lieferte keine Unterschiede zur Kontrollgruppe in Bezug auf den Durchmesser der Kollagenfasern während der ersten 4 Monate des Heilungsprozesses (Schramme et al. 2011).

Behandlung natürlich entstandener Sehnen- u. Bandschäden: Erfolgskontrolle durch Ermittlung der Rezidivrate

Hinsichtlich der Behandlung von natürlich entstandenen Tendopathien und Desmopathien mit MSCs aus Knochenmark liegen klinische Erfahrungen an einer großen Anzahl von Pferden





Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Ergebnisse der Behandlung mit Stammzellen, Blutprodukten, Gerüstsubstanzen und Wachstumsfaktoren – eine Literaturübersicht und Metaanalyse

Tab. 1 Vergleich ausgewählter Studien zur Behandlung natürlich entstandener Sehnen u. Bandschäden bei Pferden ausschließlich mit kontrollierter Bewegung oder zu
Comparison of selected studies on the treatment of naturally occurring tendinopathies and desmopathies in horses treated with controlled exercise alone or ad

Behandelte Struktur	Substrat	Autoren	Anzahl Pferde	
OBS	Behandlung nur mit kontrollierter Bewegung	Dyson (2004)	15	
		Sawdon et al. (1996)	54	
		Sawdon et al. (1996)	52	
		Gillis (1997)	28	
	Kultivierte MSCs (Knochenmark)	Smith (2008b)	172	
Smith (2008b)		22		
Godwin et al. (2011)		113		
Pacini (2007)		11		
Burk und Brehm (2011)		19		
FT Ursprung	Behandlung nur mit kontrollierter Bewegung u. orthopädischem Hufbeschlagn	VO + HI: Dyson (2000)	29	
		VO: Personett (1983)	11	
		HI: Rijkenhuizen et al. (2007)**	18	
	BM-ACP	Künnecke et al. (2008)	28	
FT Körper	Kultivierte MSCs (Knochenmark)	Burk und Brehm (2011)	18	
		Behandlung nur mit kontrollierter Bewegung	keine Untersuchung	
		PRP	Waselau et al. (2008)	9
FT Schenkel	Kultivierte MSCs (Knochenmark)	Burk und Brehm (2011)	8	
		PRP (Filtrationsmethode)	Castelijns et al. (2011)	15
		Behandlung nur mit kontrollierter Bewegung	keine Untersuchung	
FT ohne Berücksichtigung d. Lokalisation	Behandlung nur mit kontrollierter Bewegung	Rijkenhuizen et al. (2007) **	101	
		Herthel (2001)*** Herthel (2003)	100 19 VO 81 HI	
	Native Knochenmarkspirate	Rosenbrock et al. (2004b) ****	24	
		Rosenbrock et al. (2004a)****	24	
	Kultivierte MSCs (Knochenmark)	Burk und Brehm (2011)	36	
	PRP (verschiedene Zubereitungen)	Lutz et al. (2010)	75	
	UBM	Lutz et al. (2010)	34	
OBS, TBS, USB, FT gemischt	Behandlung nur mit kontrollierter Bewegung	Burk und Brehm (2011)	58	
		Ferris (2009)	61	
	Dahlgren (2009)	ca. 1000		
	MSCs aus Fettgewebe	Leppänen et al. (2009a) (zumeist OBS u. FT)	31	
		Leppänen et al. (2009a) (zumeist OBS u. FT)	53	
OBS u. FT	Kombination aus BMMNCs u. PRP	Behandlung nur mit kontrollierter Bewegung	keine Untersuchung	
		Toricelli et al. (2011)	13	

BM-ACP = bone marrow autologous conditioned plasma; BMMNCs = bone marrow mononucleated cells (= kernhaltige Zellen aus Knochenmark); FT = Fesselträger; OBS = oberflächliche (= thrombozytenreiches Plasma); UBM = urinary bladder matrix; ursprügl. = ursprüngliches; Wo. = Wochen; k.A. = keine Angaben; * einschließlich kontralateraler Gliedmaße; ** Umfrage



F. Geburek und P. Stadler

sätzlich mit potentiell regenerativen Therapeutika
ditionally with potentially regenerative substrates

Nutzungsrichtungen	Prüfzeitraum (Monate)	Erfolgsmerkmal	Rate	Rezidivrate nach Behandlung
Galopprennpferde (Flach u. Hürdenrennen)	24 Mo.	Nutzung im Sport auf urspr. Niveau	11/15	54,5% (6/11)
Galopprennpferde	k.A.	Teilnahme an > 5 Rennen	66,6%	k.A.
Trabrennpferde	k.A.	Teilnahme an > 5 Rennen	52%	k.A.
Galopprennpferde	k.A.	Nutzung im Sport auf urspr. Niveau	71 %	k.A.
Galopprennpferde (Flach u. Hürdenrennen)	> 12 Mo.	Nutzung im Sport	k.A.	27% (34%*)
Galopprennpferde (Flach u. Hürdenrennen)	> 24 Mo.	Nutzung im Sport	k.A.	32% (41%*)
Galopprennpferde (Flach u. Hürdenrennen)	> 24 Mo.	Nutzung im Sport	111/113	27,4% (31/113)
Galopprennpferde	12 Mo.	Nutzung im Sport	9/11	k.A.
verschiedene	> 12 Mo.	Nutzung im Sport oder Volltraining ohne Rezidiv	84,2%	k.A.
verschiedene	> 3 Mo.	Nutzung in vollem Umfang	86%	k.A.
verschiedene	> 3 Mo.	Nutzung in vollem Umfang	91%	k.A.
verschiedene	> 12 Mo	gebrauchsfähig	72,2%	k.A.
verschiedene	3 Mo.	ohne Lahmheit	67% (VO), 54% (HI)	k.A.
verschiedene	> 12 Mo.	Nutzung im Sport oder Volltraining ohne Rezidiv	94%	k.A.
verschiedene	> 12 Mo.	Nutzung im Sport oder Volltraining ohne Rezidiv	71,4%	k.A.
Trabrennpferde	36 Mo.	Nutzung im Sport	100%	k.A.
verschiedene	> 12 Mo.	Nutzung im Sport oder Volltraining ohne Rezidiv	63%	k.A.
verschiedene	12-36 Mo.	ursprüngliches Leistungsniveau	5/11	k.A.
verschiedene	> 12 Mo.	gebrauchsfähig	66%	k.A.
verschiedene	6 Mo.	Nutzung in vollem Umfang ohne Lahmheit	84%	k.A.
Dressur- u. Springpferde	6-18 Mo.	Nutzung im Sport oder Volltraining	87,5%	4,2 %
verschiedene	6 Mo.	in vollen Training	75%	1/24
verschiedene	> 12 Mo.	Nutzung im Sport oder Volltraining ohne Rezidiv	83,3 %	k.A.
verschiedene	29 Wo.	ursprüngliches Leistungsniveau	42%	17%
verschiedene	42 Wo.	ursprüngliches Leistungsniveau	61%	18%
verschiedene	> 12 Mo.	Nutzung im Sport oder Volltraining ohne Rezidiv	84,5 %	13*% (7/58)
verschiedene	Ø 21 Mo.	nicht mehr lahm	85%	k.A.
Sportpferde	k.A.	ursprüngliches Leistungsniveau	78%	k.A.
zumeist Trabrennpferde	12 Mo.	wieder sportlich genutzt	85%	12%
zumeist Trabrennpferde	24 Mo.	wieder sportlich genutzt	60,4%	13,2%
Sportpferde	2-12 Mo.	Nutzung im Sport	84,6%	k.A.

Beugesehne; TBS = tiefe Beugesehne; USB = Unterstützungsband der tiefen Beugesehne; Mo. = Monate; VO = Vordergliedmaße; HI = Hintergliedmaße; PRP = platelet rich plasma; ***15 Pferde, zusätzlich durch Desmotomie/Fasziotomie behandelt, keine Differenzierung zwischen VO u. HI; ****Keine Differenzierung des Ergebnisses zwischen VO u. HI



vor (z.B. $n > 500$: Fortier und Smith 2008, $n=120$: Brehm 2008, $n = 98$: Burk und Brehm 2011, $n = 105$: Godwin et al. 2011). Insbesondere die Untersuchungsergebnisse nach Behandlung einer Population von Rennpferden in Großbritannien wurden in den letzten Jahren wiederholt ausgewertet und mit z.T. abweichenden Werten publiziert, so dass von Überschneidungen hinsichtlich der Patientenzahlen auszugehen ist (Fortier und Smith 2008, Smith 2008b, Godwin et al. 2011). In einer frühen Auswertung betrug die Rezidivrate nach Applikation von MSC aus Knochenmark in Schäden der OBS bei 172 Rennpferden (Flach- und Hürdenrennen zusammengefasst) ein Jahr nach Behandlung 19% (24% bei Berücksichtigung beider Vordergliedmaßen). Für diejenigen Pferde, die wieder voll trainiert werden konnten, lag die Rezidivrate mehr als 1 Jahr nach Rückkehr in den Sport bei 27% (34% bei Berücksichtigung beider Vordergliedmaßen) (Smith 2008b). Über einen Beobachtungszeitraum von mehr als 2 Jahren vollständiger sportlicher Nutzung wird die Rezidivrate in dieser Population je nach Publikation mit insgesamt 27,4-32% angegeben (bis zu 41% bei Berücksichtigung der kontralateralen Gliedmaße) angegeben. Für Flachrennpferde betrug die Rezidivrate nach dieser Zeitspanne 50%, für Hürdenrennpferde 25,7% (Smith 2008b, Godwin et al. 2011). Dieses Ergebnis wird einer Rezidivrate nach herkömmlichen Behandlungsformen (kontrollierte Bewegung und/oder intraläsionale Behandlung mit Hyaluronsäure, Behandlung mit PSGAG) von 67% (Flachrennen) bzw. 56% (Hürdenrennen) gegenübergestellt, die sich ebenfalls auf einen Beobachtungszeitraum von mehr als 2 Jahren und eine vergleichbare Pferdepopulation bezieht (Dyson 2004). Für Hürdenrennpferde ergibt sich daraus gegenüber der Vergleichsuntersuchung eine signifikant geringere Rezidivrate, nicht jedoch für Flachrennpferde. Eine andere Kasuistik mit 109 stammzellbehandelten OBS von Pferden anderer Nutzungsrichtungen zeigte mehr als zwei Jahre nach Behandlung eine Rezidivrate von 13% (20% bei Berücksichtigung der kontralateralen Gliedmaße) (Smith 2008b), die einer Rezidivrate für diese Nutzungsrichtungen nach nicht-regenerativer Therapie von 23-43% gegenübersteht (Dyson 2004). Eine multizentrische Untersuchung an 61 Pferden, bei denen Schäden der OBS, der tiefen Beugesehne (TBS) sowie des FTs mit Stammzellen aus Knochenmark behandelt wurden, zeigte, dass bei 86% der Pferde nach einer durchschnittlichen Zeit von 21 Monaten die Gliedmaßenfunktion wiederhergestellt werden konnte (Ferris et al. 2009). Detailliertere Angaben liegen nicht vor. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine andere multizentrische Untersuchung an 98 Patienten, in der ebenfalls zumeist Erkrankungen der OBS und des FTs behandelt wurden (Burk und Brehm 2011): Für 58 Pferde liegen Langzeitergebnisse vor: von diesen Pferden wurden 84,5% nach mindestens 12 Monaten wieder im vollen Umfang und ohne Rezidiv genutzt. In dieser Untersuchung erfolgt eine wichtige Differenzierung der Behandlungsergebnisse in Bezug auf Erkrankungen der OBS und des FTs sowie seine einzelnen Abschnitte (Tab. 1). Auffallend ist bei der Auswertung der Fesselträgererkrankungen, dass die Autoren keine nennenswerten Unterschiede des Behandlungserfolges in Hinblick darauf, ob es sich um eine Vorder- oder Hintergliedmaße handelte, feststellten.

Behandlung natürlich entstandener Sehnenbeschäden
Plazebo-kontrollierte Studien

Pacini et al. (2007) behandelten spontan aufgetretene Tendopathien der OBS bei 11 italienischen Rennpferden mit Stamm-

zellen aus Knochenmark. Neun dieser Pferde kehrten in den Rennsport zurück und blieben 2 Jahre lang rezidivfrei, die Anordnung der Faserbündel war sonographisch bei den Pferden in der Therapiegruppe besser als bei denen der Kontrollgruppe. Bei allen 15 Kontrollpferden kam es innerhalb von 4-12 Monaten zu einem Rezidiv. Smith et al. (2009) behandelten natürlich entstandene Läsionen der OBS bei 4 Rennpferden mit 1×10^7 Stammzellen aus Knochenmark, suspendiert in Knochenmarküberstand und bei 4 Kontrollpferden mit Kochsalzlösung. Nach einem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten wurden alle Pferde eingeschläfert. Es zeigten sich bei den mit Stammzellen behandelten Sehnen im Vergleich zu den mit Kochsalzlösung behandelten Sehnen u.a. eine höhere Elastizität, ein kleinerer Querschnitt (geringere Schwellung) und bessere histologische Parameter (Score).

Kernhaltige Zellen (ADNCs) und mesenchymale stromale Zellen (AT-MSCs) aus Fettgewebe

Behandlung experimentell erzeugter Sehnenbeschäden:
Plazebo-kontrollierte Studien

In einer kontrollierten Studie an 8 Versuchspferden wurde mittels Kollagenase eine Tendinitis der OBS einer Vordergliedmaße erzeugt (Nixon et al. 2008). Vier dieser Pferde wurden intraläsional mit aus Fettgewebe gewonnenen kernhaltigen Zellen behandelt. Nach 6 Wochen wurden die Pferde eingeschläfert. Mittels herkömmlichem Ultraschall ließ sich kein Unterschied zwischen den mit Zellen bzw. mit Plazebo behandelten Sehnen nachweisen. Histologisch lagen bei den mit Zellen behandelten Sehnen jedoch eine verbesserte Architektur der Sehnenfasern, eine Reduktion der Entzündungszellen und des Gehalts an Kollagen Typ III vor. Zudem waren histologisch die Dichte der Sehnenfasern und ihre Parallelität verbessert. Die Genexpression von COMP war nach Behandlung mit kernhaltigen Zellen im Vergleich zur Plazebobehandlung signifikant erhöht, die Genexpression von Kollagen Typ I und III war allerdings bei beiden Gruppen ähnlich. Zusammenfassend waren biochemische und molekulare Unterschiede zwischen Behandlungsgruppen weniger deutlich ausgeprägt, aber die Sehnenarchitektur war bei den Sehnen, die mit dem Zellsupstrat behandelt worden waren, deutlich hochwertiger. Eine Aussage über die langfristige Heilung und die Rezidivrate war nicht möglich war.

In einer weiteren Untersuchung an 8 Versuchspferden (Kollagenase-Modell) wurde jeweils eine OBS der Vorderhand mit 30 Tage nach Induktion des Schadens intraläsional mit kultivierten AT-MSCs, die in autologem Serum resuspendiert wurden, bzw. mit einem Plazebo behandelt (intraindividuelle Kontrolle). Nach Aufteilung in 2 Gruppen wurden bei 4 Pferden 60 Tage nach Induktion des Schadens Sehnenbiopsate gewonnen, bei 4 Pferden erfolgte die Biopsie 60 und 150 Tage nach Induktion. Klinische und ultrasonographische Untersuchungsbefunde unterschieden sich zwischen der zell- und plazebobehandelten Seite nicht. Die feingewebliche Untersuchung zeigte jedoch in den Biopsaten der zellbehandelten Sehnen zusammenfassend u.a. eine verbesserte Anordnung der Sehnenfasern, ein reduziertes Infiltrat mit Entzündungszellen, eine erhöhte Expression von Kollagen Typ I mit einem erhöhten Kollagen I/III Verhältnis. Die vorhandenen Entzündungszellen waren vermehrt perivaskulär angeordnet und die Neovaskularisation war verstärkt (Carvalho et al. 2011).



Behandlung natürlich entstandener Sehnenläsionen: Erfolgskontrolle durch Ermittlung der Rennleistung bzw. der Rezidivrate

Über die Behandlung von Sehenschäden mit MSCs aus Fettgewebe liegt ein Erfahrungsbericht über ca. 1000 Pferde vor. Von diesen Pferden sollen 78% das Leistungsniveau, das vor der Erkrankung bestand, erreicht haben. Von den Rennpferden in dieser Fallsammlung nahmen 69% nach der Rekonvaleszenz an mindestens einem Rennen teil (Dahlgren 2009a). In einer klinischen Studie an 58 Pferden (zumeist Trabern) wurden 18 Pferde mit Schäden der OBS und 40 Pferde mit Erkrankungen des FTs mit MSCs aus Fettgewebe behandelt. Nach einem Jahr waren 85% der Pferde wieder im sportlichen Einsatz, die Rezidivrate betrug ohne Berücksichtigung von Sehenschäden an der kontralateralen Gliedmaße 12,1% (Leppänen et al. 2009a). Nach 18-24 Monaten verblieben noch 60% der Pferde im Sport, die Rezidivrate lag zu diesem Zeitpunkt bei 13%, die Durchschnittliche Zahl an Starts nach der Rekonvaleszenz betrug 12 (Leppänen et al. 2009b). In einer Studie an 16 Pferden, die mit einer Kombination aus expandierten allogenen AT-MSCs und aktiviertem PRP behandelt wurden, konnten 14 Tiere wieder ihrer ursprünglichen Verwendung zugeführt werden, die Beobachtungszeit betrug mindestens 6 Monate (Del Bue et al. 2008).

Stammzellen aus Sehngewebe

Behandlung experimentell erzeugter Sehnenläsionen: Placebo-kontrollierte Studie

In einer Untersuchung an 8 Pferden wurden mittels Kollagenase erzeugte Läsionen der OBS mit autogenen Vorläuferzellen aus Sehngewebe des seitlichen Zehenstreckers (*M. extensor digitalis lateralis*) behandelt. Zwar ließ sich innerhalb von 21 Tagen eine ausreichende Anzahl von Zellen für die Behandlung aus dem Sehngewebe erzeugen, die biochemische und molekularbiologische Untersuchung lieferte allerdings keinen sicheren Anhaltspunkt für eine Überlegenheit der zellbasierten Therapie gegenüber dem Placebo. Eine Funktionskontrolle erfolgte nicht (Durgam et al. 2009).

Embryonale und embryonal-ähnliche Stammzellen (ESCs)

Behandlung experimentell erzeugter Sehnenläsionen: Placebo-kontrollierte Studie

In einer Untersuchung an 8 Vollblutstuten wurden Schäden der OBS (Kollagenase Modell) mit embryonal-ähnlichen Stammzellen einer kommerziell verfügbaren Zelllinie intraläsional behandelt und die Pferde nach 8 Wochen eingeschläfert (Watts et al. 2011). Es wurde kein Unterschied zur Placebobehandlung hinsichtlich sehnenmatrixspezifischer Genexpression, Proteoglykan- und Kollagengehalt sowie DNA festgestellt. Die Sehnenarchitektur, das Ausmaß des Sehenschadens und die Ausrichtung der Faserbündel waren gegenüber der Placebobehandlung allerdings signifikant verbessert. Die Beobachtungszeit in dieser Studie war relativ kurz, es erfolgte keine Überprüfung biomechanischer Kriterien und keine intraindividuelle Kontrolle. Als Grund für die relativ geringe Überlebensrate der Zellen wird die Tatsache vermutet, dass es sich um männliche ESCs handelte, die weiblichen Individuen

appliziert wurden. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen tierexperimentellen Untersuchung an 8 Vollblutwallachen mit mechanisch induzierten Tendopathien der OBS nachgewiesen, dass eine hohe Zahl von allogenen ESCs über bis zu 90 Tage im Bereich der Läsion überlebte und sogar Migrationsbewegungen der Zellen zu anderen Bereichen des Schadens erfolgten (Guest et al. 2010).

Direkte Vergleichsuntersuchungen zur Wirkung von Stammzellen verschiedener Herkunft

Aufgrund einer placebokontrollierten Studie an Pferdesehnen (Kollagenase Modell) ergeben sich Hinweise darauf, dass kultivierte Stammzellen aus dem Knochenmark eine vergleichbare Wirkung auf die Sehnenregeneration haben wie nicht-kultivierte mononukleäre Zellen aus Knochenmark (BMMNCs) (Crovace et al. 2010). Direkte Vergleichsuntersuchungen der Wirkung von nicht-kultivierten und kultivierten Stammzellen aus Fettgewebe bzw. von Stammzellen aus Fettgewebe und Stammzellen aus Knochenmark auf die Sehnenheilung liegen nach Kenntnis der Autoren nicht vor. Eine Vergleichsuntersuchung zwischen ESCs und MSCs zeigte, dass ESCs hinsichtlich ihrer Überlebensrate und ihres Migrationsverhaltens im Sehenschaden gegenüber MSCs überlegen sind (Guest et al. 2010).

Potentielle Nebenwirkungen nach der Anwendung von Stammzellen

Nach Behandlung von ca. 700 Pferden wurden nach Injektion von autologen Stammzellen aus Knochenmark in einem Beobachtungszeitraum von ca. 5 Jahren mit Ausnahme von sonographisch nachweisbaren Stichkanälen keine unerwünschten Effekte, wie z.B. Tumorwachstum, beobachtet (Smith et al. 2003, Fortier und Smith 2008, Godwin et al. 2011). Es wurde lediglich bei einem Pferd eine subkutane Mineralisierung festgestellt, die sich jedoch nicht bis in die Sehne erstreckte (Smith 2008b). Ungefähr 6% der behandelten Pferde zeigten in einer anderen Untersuchung eine transiente Schwellung im Injektionsbereich, die ohne Auswirkung auf den Heilungserfolg blieb (Burk und Brehm 2011). Die Komplikationsrate nach Anwendung von Stammzellen aus Fettgewebe liegt nach Angaben eines kommerziellen Anbieters bei 0,43%. Es wird darauf verwiesen, dass die meisten Komplikationen harmloser und vorübergehender Natur gewesen seien (Dahlgren 2009b). Nach Behandlung mit allogenen AT-MSCs beschreiben andere Autoren ein geringgradiges lokales Ödem und phasenweise eine Zunahme der Schmerzhaftigkeit am 2. Tag nach Injektion bei 50% der Tiere (Del Bue et al. 2008). Auch nach Anwendung allogener MSCs aus Knochenmark (Guest et al. 2008: 2 Pferde) und ESCs (Guest et al. 2010: 8 Pferde, Beobachtungszeit 12 Wochen; Watts et al. 2011: 7 Pferde, Beobachtungszeit 8 Wochen) wurden bisher weder immunologische Komplikationen noch ein Tumorwachstum beschrieben. Adulte MSCs aus Knochenmark haben zwar einerseits eine vorteilhafte immun-suppressive Wirkung, aber das theoretische Potential allogener Zellen, unerwünschte Immunreaktionen auszulösen, ist noch nicht vollständig geklärt und wird kontrovers diskutiert (Fibbe 2007, Koch et al. 2008, Bernardo et al. 2009, Paris und Stout 2010). So wurde vermutet, dass ein spontanes Absterben größerer Zellmengen nach Applikation die Heilung hemmen oder sogar eine Entzündungsreaktion hervorrufen



Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Ergebnisse der Behandlung mit Stammzellen, Blutprodukten, Gerüstsubstanzen und Wachstumsfaktoren – eine Literaturübersicht und Metaanalyse

könnte (Koch et al. 2008). Die potentielle Übertragung von bakteriellen Infektionen durch Stammzellen wird für die Verwendung von Grundgewebe der Nabelschnur (Wharton-Sulze) diskutiert (Ribitsch et al. 2009).

Je nach Applikationstechnik (aufgehobener Fuß, stehende Gliedmaße; transversale/longitudinale Punktion der Sehne) sind Stichkanäle in unterschiedlichem Maße langfristig ultrasonographisch nachweisbar (Smith 2008a, Fortier und Smith 2008). In einer Untersuchung mit ESCs waren Stichkanäle bei allen Kontrolltieren, jedoch nur bei 2/4 behandelten Tieren nachweisbar (Watts et al. 2011)

Interaktion zwischen mesenchymalen Stammzellen und Medikamenten

Zur Wechselwirkungen zwischen Stammzellen und anderen Medikamenten sind für lebende Pferde in der Literatur wenige Daten verfügbar. Da die meisten equinen Patienten mit Sehnen- und Bandläsionen im Rahmen der akuten Entzündungsphase mit nicht steroidalen antiinflammatorischen Medikamenten behandelt werden, wurde die Wechselwirkung von Flunixin, Phenylbutazon und Meloxicam mit mesenchymalen Stammzellen in vitro untersucht (Arnhold et al. 2010). In den üblicherweise therapeutisch eingesetzten Konzentrationen konnte ausschließlich Flunixin eine Verminderung der Proliferationsrate der Stammzellen induzieren, so dass eine Vorbehandlung mit Flunixin eher ungeeignet erscheint.

Behandlung mit Substraten aus Blut

Autologes Vollblut

Publizierte Studien zur Anwendung von autologem Vollblut bei Sehnen- und Bandschäden von Pferden liegen nach unserem Kenntnisstand nicht vor.

Thrombozytenreiches Plasma

Behandlung experimentell erzeugter Sehnen- und Bandschäden: Placebo-kontrollierte Studie

Eine kontrollierte tierexperimentelle Untersuchung an lebenden Pferden, bei denen chirurgisch Sehnen- und Bandschäden erzeugt worden waren, zeigte gegenüber der Kontrollgruppe, dass die mit PRP behandelten Sehnen 4 Monate nach Behandlung, eine bessere Ausrichtung der Kollagenfasern, Anzeichen einer höheren metabolischen Aktivität und bemerkenswerterweise ein höheres Elastizitätsmodul sowie eine höhere mechanische Widerstandskraft aufwiesen (Bosch et al. 2010).

Behandlung natürlich entstandener Sehnen- u. Bandschäden: Erfolgskontrolle durch Ermittlung der Rennleistung bzw. Rekonvaleszenzzeit

Zur Anwendung des PRP bei spontan entstandenen Schäden der OBS und der TBS des Pferdes fehlen derzeit nach unserem Kenntnisstand kontrollierte Studien. Es ist allerdings eine randomisierte klinische Studie an 9 Trabrennpferden verfügbar, bei denen spontan aufgetretene einseitige Läsionen des Fesselträgerkörpers mit PRP behandelt wurden (Waselau et al.

2008). Die Pferde erhielten 14 Tage Boxenruhe und wurden danach einem kontrollierten Bewegungsprogramm unterzogen. Als Kontrollgruppe dienten Traber mit unbekanntem orthopädischem Gesundheitsstatus, die unter Zuhilfenahme einer Datenbank auf Grundlage von Alter, Geschlecht und Rennleistung den Pferden der Prüfgruppe zugeordnet wurden. Alle 9 erkrankten Pferde wurden wieder erfolgreich im Trabrennsport eingesetzt und nahmen mindestens 2 Jahre an Rennen teil. Die Zeitspanne bis zur Rückkehr betrug durchschnittlich 8 Monate (26-68 Wochen). Im Vergleich zu den Kontrollpferden gewannen die Probanden signifikant geringere Preisgelder pro Start im ersten Jahr nach der Rehabilitation und wiesen im dritten Jahr nach der Rückkehr in den Sport signifikant weniger Starts auf. Allerdings bleibt der Einfluss des kontrollierten Bewegungsprogramms unbekannt, da eine Kontrollgruppe bestehend aus Pferden mit unbehandelten Fesselträgerkörperschäden fehlt.

In einer Fallsammlung mit 5 Pferden mit Erkrankungen der oberflächlichen Beugesehne und des Fesselträgers konnten alle Pferde nach dreimaliger intraläsionaler Injektionsbehandlung mit PRP nach 4,5 Monaten (OBS), 2 Monaten (FT Ursprung vorn) und 6 Monaten (FT hinten) erfolgreich und ohne Rezidiv auf ihrem ursprünglichen Leistungsniveau genutzt werden (Carmona Ramirez 2006, Argüelles et al. 2008). Eine vergleichende Feldstudie zum klinischen Effekt nach Behandlung von Fesselträgerläsionen mit verschiedenen PRP Formulierungen und ACell® (Lutz et al. 2009) zeigte für PRP eine kürzere Rekonvaleszenzzeit bei einer geringeren Rate von Pferden, die wieder ihr ursprüngliches Leistungsniveau erreichten (s.u.; Tab. 1). In einer aktuellen Untersuchung wurden bei 11 Pferden ausschließlich Läsionen der Fesselträgerschenkel intraläsional behandelt. Während zwar bei 10 Pferden die Läsionen ultrasonographisch nicht mehr nachweisbar waren, erreichten lediglich 5 Pferde nach 1-3 Jahren ihr ursprüngliches Leistungsniveau (Castelijns et al. 2011).

Autologes konditioniertes Plasma (ACP)

Zur Anwendung von ACP bei Sehnen- und Bänderkrankungen von Pferden liegen anekdotenhafte Erfahrungsberichte bzw. Fallsammlungen vor (Ionita und Brehm 2008, Rindermann et al. 2010). In einer Untersuchung an 7 Pferden verschiedener Nutzungsrichtungen wurden zumeist Läsionen der oberflächlichen Beugesehne einmalig mit einer Menge von 2-4 ml ACP intraläsional behandelt. Alle Pferde wurden wieder in vollem Umfang genutzt oder waren im Training und keines entwickelte (auf Grundlage von Befragungen) nach einer Zeit von 10-13 Monaten ein Rezidiv (Rindermann et al. 2010). Kontrollierte Studien fehlen nach unserem Kenntnisstand bislang.

Autologes konditioniertes Serum (ACS)

Das Substrat wird u.a. aufgrund der Ergebnisse einer tierexperimentellen Untersuchung an Ratten (Majewski et al. 2009) zur intraläsionalen Behandlung von Tendopathien bei Pferden eingesetzt. Es liegen dazu bislang lediglich Erfahrungsberichte zu unkontrollierten Behandlungen vor. Unerwünschte Reaktionen wurden dabei nicht beobachtet (Weinberger 2008, Ionita und Brehm 2008, Textor 2011). Eine systematische Überprüfung des Effektes an natürlich vorkommenden Tendopathien des Pferdes steht noch aus.



Behandlung mit Kombinationen aus Zellsubstraten und Blutprodukten

Kombination von BMMNCs und PRP

Zur Behandlung natürlich entstandener chronischer (2-12 Monate) Erkrankungen der OBS (n=4) und des FTs (n=13) mit nicht-kultivierten kernhaltigen Zellen aus Knochenmark (BMMNCs) und PRP liegt eine Fallserie an Sportpferden vor, die 2-12 Monate nach intraläsionaler Behandlung wieder auf ihrem ursprünglichen Leistungsniveau eingesetzt werden konnten (Torricelli et al. 2011). Auffallend war in dieser Untersuchung, dass eine positive Korrelation der Heilungsdauer mit der Thrombozytenkonzentration im PRP vorlag: Ein signifikant schnellerer Wiedereinsatz im Sport wurde nach $\bar{O} 2,8 \pm 0,4$ Mo. erzielt, wenn mehr als $750 \times 10^3 / \mu\text{l}$ Thrombozyten enthalten waren. Bei niedrigeren Konzentrationen wurde eine Zeitspanne von $\bar{O} 7,9 \pm 0,4$ Mo. festgestellt. Es konnte allerdings keine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an Wachstumsfaktoren und dem klinischen Erfolg (Dauer bis zum Wiedereinsatz) festgestellt werden. Kontrollierte Untersuchungen zu dieser Kombinationsbehandlung fehlen nach unserer Kenntnis bislang.

Kombination von AT-MSCs und Thrombozytenlysat

In einer Untersuchung zur Kombinationsbehandlung mit allogenen MSCs aus Fettgewebe und aktiviertem PRP (Thrombozytenlysat) konnten 14 von 16 Pferden mit Sehnenkrankungen nach intraläsionaler Injektion wieder genutzt werden (Del Bue et al. 2008). Detailliertere Angaben und kontrollierte Untersuchungen fehlen bislang.

Behandlung mit Gerüstsubstanzen

Behandlung natürlich entstandener Sehnen- u. Bandschäden
Zum Einsatz von Gerüstsubstanzen bei equinen Sehnen- und Bandschäden liegen bislang nur Erfahrungsberichte und keine kontrollierten klinischen Studien vor (Badylak et al. 2004, Koch et al. 2009, Lutz et al. 2010). In einer Untersuchung wurden ca. 86% von 107 Sportpferden nach Behandlung von Sehnen- und Fesselträgerschäden mit einer kommerziell erhältlichen Gerüstsubstanz, die aus Harnblasen von Schweinen hergestellt wird (urinary bladder matrix, UBM), nach 12 Monaten wieder auf ihrem ursprünglichen Leistungsniveau eingesetzt (Mitchell 2006). In einer vergleichenden Feldstudie wurden 75 Pferde mit Erkrankungen des FTs mit PRP behandelt und 34 Patienten gegenübergestellt, deren FT mit ACell® behandelt wurde (Lutz et al. 2010). Von den mit PRP behandelten Pferden erreichten 42% bei einer durchschnittlichen Rekonvaleszenzzeit von 29 Wochen ihr ursprüngliches Leistungsniveau. Bei den mit ACell® behandelten Pferden lag der Prozentsatz bei 61%, die Zeitdauer bis zum Erreichen der vollen Belastbarkeit war mit 42 Wochen allerdings deutlich länger. In dieser Untersuchung wurden verschiedene PRP Zubereitungen verwendet, eine Kontrollgruppe mit unbehandelten Patienten wurde nicht untersucht. Nach Injektion von UBM entstehen vielfach starke Entzündungsreaktion mit Schmerzhaftigkeit und Ödemen, die z.T. schwer beherrschbar ist (Dahlgren 2009b).

Behandlung mit einzelnen Wachstumsfaktoren und Gentherapie

Behandlung experimentell erzeugter Sehnenbeschäden: Placebo-kontrollierte Studien

Die meisten Untersuchungen liegen zur Anwendung einzelner Wachstumsfaktoren liegen für den insulin-like growth factor-1 (IGF-1) vor. In einer kontrollierten Studie an 10 Pferden, bei denen mit Hilfe von Kollagenase Sehnendefekte erzeugt und danach mit IGF-1 behandelt wurden, zeigte sich eine geringere Schwellung der mit IGF-1 behandelten Sehnen. Zudem waren die mit IGF-1 behandelten Läsionen nach 3-4 Wochen sonographisch kleiner als diejenigen in der Kontrollgruppe. Die Zellproliferation und der Kollagengehalt waren gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Dahlgren et al. 2002). In einer anderen placebokontrollierten Studie an Pferden wurde der Effekt von gentechnisch veränderten Stammzellen, die IGF-1 exprimieren, mit dem von nicht gentechnisch veränderten Stammzellen aus Knochenmark auf kollagenaseinduzierte Sehnendefekte verglichen (Schnabel et al. 2009). Dabei zeigte sich, dass die Sehnen nach Behandlung mit beiden Stammzellpräparationen einen verbesserten Wert im histologischen Score gegenüber den placebobehandelten Sehnen aufwiesen. Die biomechanischen Eigenschaften der mit Stammzellen behandelten Sehnen wies einen Trend zur Überlegenheit durch verstärkte Zellproliferation und einen erhöhten Kollagengehalt gegenüber placebobehandelten Sehnen auf. Der Zugewinn durch die Expression von IGF-1 durch die Stammzellen war jedoch minimal (Schnabel et al. 2009), so dass das Verfahren hinsichtlich seiner Effektivität und seiner biologischen Sicherheit nicht praxisreif ist (Taylor et al. 2007).

Behandlung natürlich entstandener Sehnen- und Bandschäden

Die Anwendung einzelner rekombinant hergestellter Wachstumsfaktoren bei natürlich erkrankten Pferden hat bislang noch keine weite Verbreitung gefunden, nicht zuletzt deshalb, weil aufgereinigte Biofaktoren nur eingeschränkt für den klinischen Einsatz am Pferd verfügbar sind. Die intraläsionale Applikation von IGF-1 wird z.B. bei Rennpferden in Verbindung mit einer Durchtrennung des Unterstützungsbandes der OBS durchgeführt, um Rezidive zu vermeiden. Die Ergebnisse sollen nach Erfahrungsberichten vergleichbar mit denen nach konservativer Therapie bzw. intraläsionalen Injektionen von Betaaminopropionitrilfumarat (BAPN), polysulfatierten Glykosaminoglykanen (PSGAG) oder Hyaluronsäure sein (Fortier und Smith 2008). In einer Fallsammlung wurde bei 40 Galopprennpferden die oberflächliche Beugesehne intraläsional 4-5 x mit IGF-1 behandelt, 26 Pferde wurden zusätzlich einer Desmotomie des Unterstützungsbandes der oberflächlichen Beugesehne unterzogen. Lediglich 62% aller Pferde kehrten in den Rennsport zurück. Für 28 Pferde lagen Langzeitergebnisse vor. Bei ihnen lag die Rezidivrate einschließlich der Pferde, die eine Tendopathie an der kontralateralen Gliedmaße entwickelten, bei 46%. (Witte et al. 2011)

Eine weiterer Wachstumsfaktor, zu dem Informationen über die klinische Anwendung vorliegen, ist der transforming growth factor- $\alpha 1$ (TGF- $\alpha 1$). Sein Effekt wurde in einer Studie prospektiv an 10 Pferden mit Erkrankungen der OBS und an



Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Ergebnisse der Behandlung mit Stammzellen, Blutprodukten, Gerüstsubstanzen und Wachstumsfaktoren – eine Literaturübersicht und Metaanalyse

einem Pferd mit Erkrankung des FTs untersucht. Zwar wurden alle Pferde danach wieder auf ihrem ursprünglichen Leistungsniveau eingesetzt, allerdings kam es in 40% der Fälle zu einer Erkrankung der OBS der Gegenseite, und 60% der Pferde hatten eine anhaltende Schwellung der behandelten Sehne (Bathe 2002).

Diskussion und zusammenfassende, kritische Betrachtung

Biologische Sicherheit, Nebenwirkungen

Die biologische Sicherheit regenerativer Therapieformen scheint nach bisherigen Untersuchungen an lebenden Pferden zumeist hoch (Godwin et al. 2011). Wenngleich auch für die Verwendung allogener MSCs aus Knochenmark (Guest et al. 2008) und Fettgewebe (Del Bue et al. 2008) sowie allogener embryonaler und embryonal-ähnlicher Stammzellen (Guest et al. 2010, Watts et al. 2011) erste Untersuchungen an lebenden Pferden keine Hinweise auf immunologische bzw. tumoröse Komplikationen lieferten, liegen zur Verwendung allogener Zellen ebenso wie für die Genterapie (Schnabel et al. 2009, Taylor et al. 2007) noch keine Langzeitergebnisse an einer größeren Anzahl von Patienten vor. Ein möglicherweise erhöhtes Risiko bakterieller Kontaminationen von Zellen aus Nabelschnurblut (Ribitsch et al. 2009) könnte bei Verwendung allogener Zellen zusätzlich eine forensische Relevanz besitzen.

Geringgradige, lokale und beherrschbare Entzündungsreaktionen werden in geringem Umfang nach Applikation von MSCs beobachtet (Dahlgren 2009b, Burk und Brehm 2011) und können – möglicherweise in Abhängigkeit vom Leukozytengehalt – auch bei der Anwendung von Blutprodukten auftreten. So kann es z.B. nach eigenen Beobachtungen im Einzelfall nach der Behandlung mit ACP zur Entstehung von Unterhautödemen an der behandelten Gliedmaße kommen (Geburek und Stadler 2011).

Nach der Anwendung der Gerüstsubstanz UBM sind die Reaktionen offenbar besonders ausgeprägt und fallen negativ ins Gewicht (Dahlgren 2009b). Die Bedeutung von Stichkanälen, die vielfach auch langfristig sonographisch nachweisbar sind, auf den Heilungsverlauf, insbesondere wenn eine transversale Punktion an der stehenden Gliedmaße erfolgte, ist unklar. Eine Schwächung der Sehne ist vorstellbar, ebenso das Austreten des applizierten Substrats aus der Sehne durch Rückfluss. Andererseits ermöglicht diese Injektionstechnik eine sehr präzise Applikation des Substrats in eine Kernläsion und erleichtert eventuell eine Migration von ortsgelassenen Vorläuferzellen aus dem Peritendineum in den Sehnenschaden nach dem postulierten Prinzip des minimalinvasiven „Sehnensplittings“ (Dowling et al. 2000). Die Entnahme von Feinnadelbiopsien an der aufgehobenen Gliedmaße im Faserverlauf der Sehne hat klinisch keine nachteiligen Effekte auf die Heilung gezeigt (Wagels et al. 2001, Buck et al. 2002).

Einfluss des Pferdealters, der Nutzungsrichtung und der behandelten Sehnenstruktur

Das Pferdealter, die Nutzungsrichtung und somit vielfach der Pferdetypp haben einen Einfluss auf die Entstehung von Sehnen-

und Bandschäden (Kasashima et al. 2004) als auch auf deren Heilung (Dowling et al. 2000, Thorpe et al. 2010, Dyson 2004, Smith 2008b, Burk und Brehm 2011). So zeigte sich bei Flachrennpferden nach Behandlung mit kultivierten MSCs aus Knochenmark tendenziell eine deutlich höhere Rezidivrate als bei Hindernisrennpferden, wenngleich die Zahl behandelter Flachrennpferde deutlich geringer war (Godwin et al. 2011). Vielfach bleiben die o.g. Einflüsse jedoch unberücksichtigt (Del Bue et al. 2008, Ferris et al. 2009), so dass dadurch die Aussagekraft der Untersuchung herabgesetzt wird.

Regenerative Therapieansätze kamen in den vorgestellten Untersuchungen vorwiegend an der OBS und am FT, zu einem geringeren Anteil am Unterstützungsband der TBS und an der TBS zum Einsatz. In vielen Untersuchungen wurden die Ergebnisse in Bezug auf alle untersuchten Strukturen zusammengefasst, um kleine Gruppengrößen zu vermeiden (Tab. 1). Weitgehend unberücksichtigt bleiben bei dieser Vorgehensweise die strukturellen und funktionell-biomechanischen Unterschiede der verschiedenen Sehnen und Bänder (Kasashima et al. 2004, Birch et al. 2008, Souza et al. 2010), deren Erkrankungen mit unterschiedlichen Prognosen auch nach anderen Behandlungsformen behaftet sind (Dyson 1994, Dyson 2004, Rijkenhuizen et al. 2007). Bislang werden nur in einzelnen Untersuchungen die verschiedenen Abschnitte des Fesselträgers gesondert berücksichtigt (Mountford et al. 2006, Waselau et al. 2008, Castelijns et al. 2011). Unterschiedliche Heilungsverläufe von Sehnenerkrankungen an der Vorder- oder Hintergliedmaße sind insbesondere für den Fesselträger zu erwarten (Personett 1983, Dyson 1994, van den Belt et al. 1994, Dyson 2000).

Einfluss des Alters der Läsion

Die Sehnenheilung verläuft in verschiedenen Phasen und es gibt Hinweise darauf, dass einerseits der Zeitpunkt einer bestimmten Behandlung eine Auswirkung auf den Erfolg hat und andererseits nicht alle Therapieansätze in einer bestimmten Phase der Sehnenheilung gleich effektiv zu sein scheinen (Geburek und Stadler 2011). Unterschiede des Behandlungserfolgs bei akuten bzw. chronischen Tendopathien mit MSCs werden kontrovers diskutiert (Smith und Webbon 2005, Fortier und Smith 2008, Burk und Brehm 2011, Godwin et al. 2011). In einer großen Fallserie unterschied sich die durchschnittliche Dauer zwischen Entstehung des Sehnenschadens und Behandlung mit MSCs aus Knochenmark zwischen Pferden ohne Rezidiv (46 Tage) und mit Rezidiv (53,6 Tage) allerdings nur leicht und nicht signifikant (Godwin et al. 2011). In einem Fallbericht zur Behandlung eines chronischen FT-Schenkel Schadens mit MSCs aus Knochenmark zeigte nach erfolgreicher Rückkehr des Pferdes zur ursprünglichen Nutzung sogar noch eine Verbesserung histologischer Parameter gegenüber Kontrollgewebe (Mountford et al. 2006). Auch nach PRP Injektionen wird nicht nur in der akuten Entzündungsphase (Bosch et al. 2010), sondern auch bei chronischen Tendopathien z.T. ein positiver Effekt beschrieben (Waselau et al. 2008, Argüelles et al. 2008, Torricelli et al. 2011).

In praxi wird das Alter von natürlich entstandenen Läsionen meist nach vorberichtlichen Angaben ermittelt und danach zwischen akuten chronischen Sehnen- bzw. Bänderkrankungen unterschieden (Burk und Brehm 2011). Vielfach handelt es sich allerdings um Rezidive von subklinischen Schäden, so



dass das Alter der Läsion oft höher ist, als die vorberichtlich genannte Erkrankungsdauer. Eine möglichst zeitnahe Behandlung nach Diagnosestellung oder eine aufwendigere sonographische Gewebecharakterisierung mittels UTC (ultrasonographic tissue characterization) erscheint vor diesem Hintergrund sinnvoll (van Schie et al. 2009). Die Datenlage erlaubt derzeit noch keine abschließende Aussage darüber, welcher regenerative Therapieansatz in welcher Phase der Sehnenheilung, bei welcher Sehnen- oder Bandstruktur optimal ist (Koch et al. 2009).

Behandlungserfolg: Nutzbarkeit, Rezidivrate

Eine mögliche Überlegenheit regenerativer Therapeutika gegenüber anderen Behandlungsformen bei natürlich erkrankten lebenden Pferden ist trotz zahlreicher Voruntersuchungen und Kasuistiken (Smith 2008b, Burk und Brehm 2010, Godwin et al. 2011) wissenschaftlich hochwertig nur dann zu erfassen, wenn vergleichbare Kontrolltiere randomisiert behandelt werden. Die Zahl derartiger Untersuchungen ist allerdings gering (Pacini et al. 2007, Smith et al. 2009). Die Verwendung von Placebos an natürlich entstandenen Tendopathien ist gegenüber Tierbesitzern in praxi oft schwer vermittelbar. Placebokontrollierte Untersuchungen an natürlich entstandenen Sehnenläsionen führen theoretisch zu Ergebnissen höchster Evidenz, weisen allerdings meistens methodische Schwachpunkte auf (Pacini et al. 2007, Smith et al. 2009). In einer Untersuchung (Pacini et al. 2007) erfolgte die Behandlung von OBS Schäden weder in der Therapie- noch in der Kontrollgruppe randomisiert, sondern wurde nach Präferenz der Besitzer durchgeführt. Die Anzahl der injizierten Stammzellen variierte zwischen $0,6 \times 10^6$ und $31,2 \times 10^6$, es erfolgte lediglich eine sonographische, keine feingewebliche Kontrolle und die Altersverteilung war in der Therapie- und Behandlungsgruppe unterschiedlich. Zusätzlich wurden die Stammzellen in autologem Serum resuspendiert, so dass unklar bleibt, welches Substrat zur beobachteten Wirkung beigetragen hat.

Die placebokontrollierte Untersuchung zur Wirkung von MSCs aus Knochenmark auf Schäden der OBS bei insgesamt 8 Pferden von Smith et al. (2009) ist einerseits nur bedingt aussagekräftig, weil es sich um eine geringe Anzahl von Pferden handelte, das Alter der Tiere unerwähnt blieb, das Ausmaß der Sehnenläsionen variierte und die Rezidivrate nach Belastung nicht berücksichtigt wurde. Andererseits basiert die Untersuchung jedoch auf einem Konzept, das z.B. bei Erhöhung der Fallzahl Ergebnisse hoher Evidenz erwarten lässt. Wenngleich klare Parameter für eine erfolgreiche Regeneration von Sehnenewebe noch nicht festgelegt wurden, lag hier zumindest eine Annäherung der biomechanischen und histologischen Eigenschaften sowie der Zusammensetzung der behandelten Sehnen an nicht erkranktes Sehnenewebe vor.

Der Behandlungserfolg in Bezug auf die Zeitdauer bis zum Wiedereinsatz im Sport und die Rezidivrate (Rosenbrock et al. 2004b, Smith 2008b, Herthel 2001, Lutz et al. 2010, Burk und Brehm 2010, Godwin et al. 2011) wird oft an den Behandlungsergebnissen anderer Autoren gemessen (Dyson 2004, O'Meara et al. 2010). Dabei werden methodische Unterschiede wie z.B. fehlende Randomisierung, fehlende Verblindung, Kombination mit anderen, z.B. chirurgischen

Maßnahmen (Herthel 2001), vielfach nicht berücksichtigt. Die Einbeziehung eines Schadens der kontralateralen OBS nach Behandlung der ipsilateralen OBS bei der Berechnung der Erfolgs- bzw. Rezidivrate wird uneinheitlich gehandhabt (Dyson 2004, O'Meara et al. 2010). Selten ist ein Vergleich zu einer Behandlung ohne Medikation, lediglich durch Boxenruhe und kontrollierte Bewegung möglich (Tab. 1; Dyson 1991, Dyson 2004, Rijkenhuizen et al. 2007). Als Mindeststandard zur Evaluation des Behandlungserfolges wird gefordert, dass mit regenerativen Therapeutika behandelte Pferde anders behandelten Pferden gleichen Alters und gleicher Nutzung gegenübergestellt, alle Fälle gleichartig ultrasonographisch nachkontrolliert und einem vergleichbaren kontrollierten Bewegungsregime unterzogen werden (Fortier und Smith 2008). Diese Kriterien werden oft nur ansatzweise oder gar nicht berücksichtigt. Somit ist z.B. die wissenschaftliche Bedeutung der Studien von Rosenbrock et al. (2004a) und Rosenbrock (2004b) zum Erfolg der Behandlung von FTU-Schäden mit Knochenmarksaspiraten fraglich. Bei Rennpferden zeigte sich zudem, dass nach Rekonvaleszenz von OBS Erkrankungen die Auswertung von mindestens 5 Rennen erforderlich ist, um hinsichtlich der Rennleistung Unterschiede zu nicht erkrankten Kontrollpferden herausarbeiten zu können (O'Meara et al. 2010).

Ein Vergleich der einzelnen regenerativen Therapeutika hinsichtlich der Erfolgs- bzw. Rezidivrate ist derzeit nicht möglich. Dagegen scheinen z.B. MSCs aus Knochenmark zur Behandlung von Schäden der OBS gegenüber kontrollierter Behandlung oder anderen Behandlungsformen (Hyaluronsäure, PSGAG: Dyson 2004; IGF-I, Desmotomie des Unterstützungsbandes der OBS, Brennen (!): O'Meara et al. 2010) überlegen zu sein (Tab. 1; Smith 2008b, Burk und Brehm 2011, Godwin et al. 2011).

Obwohl nur einzelne detaillierte und differenzierte Angaben zu Behandlungserfolgen von Erkrankungen des Fesselträgers in Bezug auf das Alter der Läsion, die erkrankte Gliedmaße und insbesondere die erkrankte Lokalisation (FT Ursprung, -Körper, -Ansatz) vorliegen (Waselau et al. 2008, Castelijns et al. 2011), entsteht der Eindruck, dass die Behandlung mit MSCs aus Knochenmark (Burk und Brehm 2011) und nativen Knochenmarksaspiraten (Herthel 2001, Herthel 2003, Rosenbrock et al. 2004b) gegenüber einer Behandlung durch Boxenruhe mit kontrollierter Bewegung (Rijkenhuizen et al. 2007) und auch gegenüber einer Behandlung mit UBM und PRP überlegen ist (Lutz et al. 2011, Castelijns et al. 2011). Da jedoch für die verschiedenen regenerativen Therapeutika und die einzelnen anatomischen Abschnitte des Fesselträgers noch zu wenig detaillierte wissenschaftliche Daten verfügbar sind, erscheint eine weitergehende Bewertung verfrüht. Studien, die nicht zwischen Behandlungen des Fesselträgers und der OBS unterscheiden (Dahlgren 2009a, Leppänen et al. 2009a, Ferris et al. 2009), zeigen nach Behandlung mit MSCs aus Knochenmark und Fettgewebe in Bezug auf die Gebrauchsfähigkeit (ca. 60-85%) und die Rezidivrate (ca. 12-13%) nach 12-24 Monaten z.T. ähnliche Ergebnisse (Tab. 1). Insgesamt wird die Vergleichbarkeit verschiedener Studien hinsichtlich der Rezidivrate dadurch erschwert, dass die Berechnung dieses Parameters z.T. unterschiedlich vorgenommen wird: z.B. „Anteil der Pferde mit Rezidiv an der Gruppe aller behandelten Pferde“ (Leppänen et al. 2009a, Burk und Brehm 2011) oder



Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Ergebnisse der Behandlung mit Stammzellen, Blutprodukten, Gerüstsubstanzen und Wachstumsfaktoren – eine Literaturübersicht und Metaanalyse

„Anteil der Pferde mit Rezidiv an der Gruppe aller Pferde, die über einen definierten und kontrollierten Zeitraum sportlich genutzt wurden“ (Ferris et al. 2009, Godwin et al. 2011). Im letztgenannten Fall stellen sich die Rezidivraten vorteilhafter, d.h. geringer dar, da im ersten Fall z.B. auch Pferde, die bereits während es Antrainierens ausfielen, berücksichtigt werden.

Behandlungserfolg: strukturelle und biomechanische Verbesserung

Die Aussagekraft herkömmlicher Ultraschalluntersuchungen zur Überprüfung der Wirkung von Therapeutika auf die Sehnenstruktur ist begrenzt (van Schie et al. 2000, van Schie et al. 2009) und effektivere Verfahren wie z.B. Sehnenbiopsien einschließlich ultrastruktureller Untersuchungen (Wagels et al. 2001, Buck et al. 2001, Mountford et al. 2006, Barreira et al. 2008, Carvalho et al. 2011, Schramme et al. 2011), „ultrasonographic tissue characterization“, UTC (van Schie et al. 2009, Bosch et al. 2011) und MRT (Schramme et al. 2010) sind bislang nur eingeschränkt an natürlich erkrankten Patienten anwendbar bzw. verfügbar. Das Ausweichen auf tierexperimentelle Studien am Pferd (Dahlgren et al. 2002, Crovace et al. 2007, Nixon et al. 2008, Durgam et al. 2009, Schnabel et al. 2009, Guest et al. 2010, Bosch et al. 2010, Crovace et al. 2010, Watts et al. 2011, Carvalho et al. 2011) ermöglicht im Idealfall die Erzeugung einer reproduzierbaren und vergleichbaren Läsion, den Vergleich mit Kontrolltieren und eine ausführliche feingewebliche, biochemische und biomechanische Analyse der behandelten Sehnen und somit eine Aussage über die Effekte auf die Sehnenstruktur. Derartige Studien sind mit sehr hohen Kosten verbunden und erstrecken sich deshalb oft nur auf eine relativ kurze Beobachtungszeit zwischen 6 Wochen und 6 Monaten (Nixon et al. 2008, Guest et al. 2010, Schnabel et al. 2009, Watts et al. 2011, Bosch et al. 2010). Künstlich werden Sehnen-schäden beim Pferd z.B. durch die intratendinöse Injektion einer definierten Menge Kollagenase erzeugt (Pacini et al. 2007, Nixon et al. 2008, Schnabel et al. 2009, Watts et al. 2011, Carvalho et al. 2011 u.a.). Dabei entstehen Defekte, die nicht vorbehaltlos mit natürlich entstandenen Läsionen vergleichbar sind (van Schie et al. 2009). Zusätzlich muss die Tiergerechtigkeit bei diesem Verfahren in Frage gestellt werden, insbesondere weil die weniger schmerzhaft Erzeugung von Sehnen-schäden mit einer motorgetriebenen Fräse aus der Arthroskopie („burr“) möglich ist (Little und Schramme 2006, Guest et al. 2008, Schramme et al. 2009, Bosch et al. 2010, Guest et al. 2010, Schramme et al. 2011). Bei dieser Methode scheint neben der Verträglichkeit auch die Vergleichbarkeit der Schäden besser zu sein. Grundsätzlich muss bei Verwendung eines Krankheitsmodells damit gerechnet werden, dass die Ergebnisse nach Behandlung natürlich entstandener Läsionen schlechter ausfallen können, als dies aufgrund experimenteller Untersuchungen an der gleichen Sehne zu erwarten war (Beispiel Wachstumsfaktor IGF-1: Dahlgren et al. 2002, Witte et al. 2011).

Tierexperimentelle Untersuchungen sind in erster Linie geeignet, eine Aussage über die feingewebliche Struktur des Ersatzgewebes nach den verschiedenen Behandlungen zu treffen. So konnte gezeigt werden, dass die Sehnenarchitektur nach Behandlung mit kernhaltigen Zellen aus Fettgewebe (Nixon et

al. 2008), MSCs aus Knochenmark (Schnabel et al. 2009), frischen mononukleären Zellen aus Knochenmark (Crovace et al. 2010) und PRP (Bosch et al. 2010) im Vergleich zu einer Placebobehandlung verbessert wird. Eine Aussage über die Rezidivrate kann nach derartigen Untersuchungen aus methodischen Gründen allerdings nicht erfolgen.

Verschiedene Untersuchungen (keine direkte Vergleichsuntersuchung) liefern Hinweise darauf, dass die Sehnenarchitektur nach Applikation von embryonalen bzw. embryonal-ähnlichen Stammzellen (ESCs) (Guest et al. 2010, Watts et al. 2011) stärker verbessert wird als nach Injektion von mesenchymalen Stromal Zellen (MSCs) aus Knochenmark (Schnabel et al., 2009) oder kernhaltigen Zellen aus Fettgewebe (Nixon et al. 2008). Biomechanische Untersuchungen in vitro von behandeltem Sehnen-gewebe wären für tierexperimentelle Untersuchungen an Pferden von großer Bedeutung, werden allerdings nur in Einzelfällen vorgenommen (Schnabel et al. 2009, Bosch et al., 2010), vermutlich weil die Untersuchungszeiträume vielfach zu kurz sind (Nixon et al. 2008, Watts et al. 2011). Es zeigte sich beispielsweise 24 Wochen nach Behandlung eine Überlegenheit von mit PRP behandelten Sehnen gegenüber dem Placebo (Bosch et al. 2010). Deshalb muss das Fehlen eines signifikanten Unterschieds einer Behandlung mit MSCs aus Knochenmark bzw. IGF-I exprimierenden MSCs gegenüber der Placebobehandlung nach 8 Wochen (Schnabel et al. 2009) nicht zwingend bedeuten, dass diese Therapieform hinsichtlich der biomechanischen Belastbarkeit bei gleichlangem Beobachtungszeitraum der Behandlung mit PRP unterlegen ist.

Die Grenzen der Vergleichbarkeit verschiedener Studien untereinander sind zusammenfassend also auch bei Tierexperimenten in methodischen Varianten zu suchen. In diesem Zusammenhang ist nicht zuletzt von hoher Bedeutung, ob eine aussagekräftigere intraindividuelle (z.B. Bosch et al. 2010, Carvalho et al. 2011) oder eine weniger aussagekräftige interindividuelle Kontrolle (z.B. Nixon et al. 2008) gewählt wurde.

Behandlungserfolg: Dauer des Heilungsprozesses

Die Sehnen- und Bandheilung verläuft bei Pferden langsam (Dowling et al. 2000). Bislang konnte zwar noch nicht sicher belegt werden, dass Substrate mit regenerativem Potential die Sehnenheilung beschleunigen, aber verschiedene Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass dies in begrenztem Maß der Fall sein könnte (Lutz et al. 2010, Torricelli et al. 2011). So wurde aus den Ergebnissen einer Kasuistik geschlossen, dass der Thrombozytengehalt im PRP, das in Kombination mit BMMNCs angewendet wurde, die Heilungsphase bis zum Wiedereinsatz im Sport verkürzt hat (Torricelli et al. 2011). Dieser Aspekt lässt PRP geeigneter als ACP erscheinen, wobei kein direkter Vergleich verfügbar ist und die Kontrolle durch unbehandelte Pferde fehlt.

In einer anderen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit PRP zwar zu einem schnellen Wiedereinsatz führte, allerdings weniger Pferde ihr ursprüngliches Leistungsniveau erreichten als nach Behandlung mit UBM (Lutz et al. 2010; Tab. 1). Erfolgen allerdings Angaben von Zeitspannen bis zum Erreichen der vollen Leistung ohne die Angabe von Rezidivraten, bleibt unklar, ob wirklich eine nach-



haltige Beschleunigung der Heilung erfolgte (Künneke et al. 2008). Es sollte also zunächst eine Verbesserung der Sehnenstruktur angestrebt werden, auch wenn zusammenfassend nach Auswertung vorliegender Untersuchungen weiterhin eine relativ lange Rekonvaleszenzzeit in Kauf genommen werden muss (Godwin et al. 2011).

Optimales Substrat

Mehrere Substrate mit regenerativem Potential erscheinen in Untersuchungen an lebenden Pferden vielversprechend, und es wird eine zunehmende Zahl tierexperimenteller Vergleichsuntersuchungen verfügbar (Crovace et al. 2010, Guest et al. 2010, Schnabel et al. 2009), wobei nur wenige direkte Vergleichsuntersuchungen zu natürlich entstandenen Sehnen- und Bänderkrankungen vorliegen (Lutz et al. 2010).

Bei unkontrollierten Untersuchungen zu Kombinationen von Blut- und Zellsubstraten (Del Bue et al. 2008, Torricelli et al. 2011, Carvalho et al. 2011) oder von MSCs und Knochenmarküberstand (Brehm und Burk 2011, Fortier und Smith 2008) bzw. bei einer Plazebokontrolle mit autologem Serum (Pacini et al. 2007) bleibt der jeweilige Effekt der einzelnen Komponenten des injizierten Substrats bzw. der therapeutische Effekt des Placebos unklar. Die Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren bzw. Zellen wie sie z.B. im PRP oder in zentrifugierten Knochenmarksaspiraten vorliegt, scheint jedoch grundsätzlich vorteilhafter zu sein als die Behandlung mit einzelnen rekombinant hergestellten Wachstumsfaktoren (Bathe 2002, Dahlgren et al. 2002, Witte et al. 2011), zumal diese z.T. eine kurze Halbwertszeit haben (Smith et al. 2006). Zusammenfassend ist noch unbekannt, welches Blut- oder Stammzellprodukt oder welche Kombination aus Zellen, Wachstumsfaktoren und Gerüstsubstanzen die Sehnenheilung am effektivsten verbessert (Koch et al. 2009). Vielfach beeinflussen im klinischen Alltag ökonomische Zwänge, die unterschiedliche Handhabbarkeit verschiedener „Kits“ und Unterschiede der Logistik bei der Herstellung der einzelnen Therapeutika die Entscheidung. So besteht bei Verwendung von nicht kultivierten mononukleären Zellen aus Knochenmark bzw. ACP gegenüber kultivierten MSCs bzw. PRP ein Vorteil in der einfacheren und schnelleren Handhabbarkeit (Crovace et al. 2010, Künneke et al. 2008). Demgemäß korreliert die Häufigkeit der Anwendung bestimmter Substrate in praxi nicht zwingend positiv mit deren Effektivität. Zwar zeigte sich im Vergleich der Wirkung von kultivierten MSCs aus Knochenmark und den einfacher herstellbaren BMMNCs auf die Sehnenheilung kein Unterschied (Crovace et al. 2010), in Bezug auf zellhaltige Substrate aus Fettgewebe ergeben sich hingegen Hinweise, dass kultivierte AT-MSCs (Carvalho et al. 2011) den nicht kultivierten ADNCs (Nixon et al. 2008) in Bezug auf die Begünstigung des Kollagen I/III Verhältnisses überlegen sind.

Entscheidende Bedeutung kommt einem Vergleich zwischen den Erfolgsraten nach Applikation von regenerativen Therapeutika und nach ausschließlich kontrollierter Bewegung zu, die nachgewiesenermaßen einen positiven Effekt hat (Gillis et al. 1997, Sawdon et al. 1996). So wird bei Erkrankungen der OBS auch nach ausschließlich kontrollierter Bewegung mit 59-71% (Gillis et al. 1997, Sawdon et al. 1996) eine relativ hohe Erfolgsrate angegeben, die allerdings mit einer eben-

falls hohen Rezidivrate von 54% einhergeht (Dyson 2004). Dem stehen Erfolgsraten von bis zu 84% (Burk und Brehm 2011) und Langzeit Rezidivraten von 27,4 % (Godwin et al. 2011) bis zu 41% (Smith 2008b) z.B. für die Behandlung mit kultivierten MSCs aus Knochenmark gegenüber. Vor dem Hintergrund, dass akute FT-Ursprungserkrankungen an der Vorderhand nach ausschließlicher Behandlung mit kontrollierter Bewegung mit einer guten Prognose (90%) behaftet sind (Personett et al. 1983, Dyson 2000), ist beispielsweise eine Gebrauchsfähigkeit von 67% der Pferde nach Behandlung von FTU-Erkrankungen mit BM-ACP ohne Angabe der Rezidivrate von fraglicher Bedeutung (Künneke et al. 2008).

In der vorliegenden Literaturübersicht konnte gezeigt werden, dass sich der Trend zu einer Überlegenheit von Substraten mit regenerativem Potential gegenüber anderen Behandlungsformen und natürlicher Heilung aufgrund einer zunehmenden Zahl an Untersuchungen an lebenden Pferden bestätigt, wenngleich noch unklar ist, welches Produkt bzw. welche Kombination von Substraten im Einzelfall am besten geeignet ist. Zellen aus Sehngewebe scheinen nach den vorliegenden Untersuchungen wenig geeignet (Durgam et al. 2009). Für MSCs bzw. kernhaltige Zellen aus Knochenmark und Fettgewebe stehen noch Vergleichsuntersuchungen und die Klärung der Fragen aus, ob eine Kultivierung erforderlich ist (Nixon et al. 2008, Crovace et al. 2010) und ob allogene MSCs in praxi geeignet sind. Jüngere Untersuchungen liefern Hinweise darauf, dass embryonale Stammzellen (ESCs) aufgrund ihrer nachgewiesenen Pluripotenz möglicherweise in Zukunft eine zunehmende Bedeutung gewinnen werden (Guest et al. 2010, Watts et al. 2011).

Literatur

- Argüelles D., Carmona J. U., Climnet F., Munoz E. und Prades M. (2008) Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Vet. Rec.* 162, 208-211
- Arnhold S., Müller M., Raabe O., Addicks K. und Wenisch S. (2010) Einfluß nichtsteroidaler Antiphlogistika auf equine mesenchymale Stammzellen in vitro. *Tierärztl. Prax.* 38(G), 37-46
- Badylak S. F. (2004) Extracellular matrix as a scaffold for tissue engineering in veterinary medicine: Applications in soft tissue healing. *Clin. Tech. Equine Pract.* 3,173-181
- Barreira A. P. B., Alves A. L. G., Saito M. E., Amorim R. L., Kohayagawa A., Menarim B. C. und Mota L. S. (2008) Autologous Implant of Bone Marrow Mononuclear Cells as Treatment of Induced Equine Tendinitis. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 5, 46-54
- Bathe A. P. (2002) Tendon and ligament engineering-experiences with TGF- α . *Proceeding of the First World Orthopedic Veterinary Congress*, S. 46
- Birch H. L., Worboys S., Eissa S., Jackson B., Strassburg S. und Clegg P. D. (2008) Matrix metabolism rate differs in functionally distinct tendons. *Matrix Biol.* 27, 182-189
- Bosch G. (2009) Towards a staged evidence based approach for the treatment of tendon injuries in the horse. PhD Diss. Med. Vet Utrecht
- Bosch G., van Weeren P. R., Barneveld A. und van Schie H. T. M. (2011) Computerised analysis of standardised ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons after intratendinous platelet rich plasma or placebo. *Vet. J.* 187, 92-98
- Bosch G., van Schie H. T. M., de Groot M. W., Cadby J. A., van de Lest C. H. A., Barneveld A. und van Weeren P. R. (2010) Effects of Platelet-Rich Plasma on the Quality of Repair of Mechanically Induced Core Lesions in Equine Superficial Digital Flexor Tendons: A Placebo-Controlled Experimental Study. *J. Orthop. Res.* 28(2), 211-217



Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Ergebnisse der Behandlung mit Stammzellen, Blutprodukten, Gerüstsubstanzen und Wachstumsfaktoren – eine Literaturübersicht und Metaanalyse

- Brehm W. (2008) Erfahrungen mit der Stammzell-Therapie von Sehnenläsionen beim Pferd. In: Vortragsband des BPT - Kongress 2008, Hannover, 13.-16. November, BPT Akademie GmbH, Frankfurt, 2008, S.20-26
- Buck C., Drommer W., Wagels R. und Stadler P. (2002) Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Sehnenbiopaten gesunder Pferde und Patienten in unterschiedlichen Heilungsphasen einer Tendopathie. *Pferdeheilkunde* 18, 521-528
- Burk J. und Brehm W. (2011) Stammzellentherapie von Sehnenverletzungen – klinische Ergebnisse von 98 Fällen. *Pferdeheilkunde* 27,153-161
- Carmona Ramirez J. U. (2006) Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse. PhD Diss. Med. Vet. Barcelona
- Carvalho A. D. M., Alves A. L. G., de Oliveira P. G. G., Alvarez L. E. C., Amorim R. L., Hussni C. A. und Deffune E. (2011) Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *J. Equine vet. Sci.* 21, 26-34
- Castelijns G., Crawford A., Schaffer J., Ortolano G. A., Beauregard T. und Smith R. K. W. (2011) Evaluation of a filter-prepared platelet concentrate for the treatment of suspensory branch injuries in horses. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 5, 363-369
- Crovace A., Lacitignola L., De Siena R., Rossi G. und Francioso E. (2007) Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. *Vet. Res. Commun.* 31, Suppl 1, 281-283
- Crovace A., Lacitignola L., Rossi G. und Francioso E. (2010) Histological and Immunohistochemical Evaluation of Autologous Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Bone Marrow Mononucleated Cells in Collagenase-Induced Tendinitis of Equine Superficial Digital Flexor Tendon. *Veterinary Medicine International. Vet. Med. Int.* Article ID 250978, doi:10.4061/2010/250978, <http://www.hindawi.com/journals/vmi/2010/250978/>
- Crowe O. M., Dyson S. J., Wright I. M., Schramme M. C. und Smith R. K. W. (2004) Treatment of chronic or recurrent proximal suspensory desmitis using radial pressure wave therapy in the horse. *Equine vet. J.* 36, 313-316
- Dahlgren L. A., van der Meulen M. C. H., Bertram J. E. A., Starrak G. S. und Nixon A. J. (2002) Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J. Orthop. Res.* 20, 910-919
- Dahlgren L. A. (2009a) Fat derived mesenchymal stem cells for equine tendon repair. *Regenerative Medicine* 4(6), Suppl. 2, S14
- Dahlgren L. A. (2009b) Management of Tendon Injuries. In: *Current Therapy in Equine Medicine*. Robinson N.E., Sprayberry K.A., (Hrsg.), Saunders, Elsevier, St. Louis, USA, 6. Auflage, 518-523
- Del Bue M., Riccò S., Ramoni R., Conti V., Gnudi G. und Grolli S. (2008) Equine adipose tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Vet. Res. Commun.* 32, Suppl 1, S51-S55
- Dowling B. A., Dart A. J., Hodgson D. R. und Smith R. K. W. (2000) Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine vet. J.* 32, 369-378
- Durgam S. S., Stewart A. A., Caporali E. H., Karlin W. M. und Stewart M. C. (2009) Effect of tendon-derived progenitor cells on a collagenase-induced model of tendinitis in horses. *Regen. Med.* 4, Suppl. 2, S27
- Dyson S. (1994) Proximal suspensory desmitis in the hindlimb: 42 cases. *Br. vet. J.* 150, 279-291
- Dyson S. (2000) Proximal suspensory desmitis in the forelimb and hindlimb. *Proc. Am. Ass. Equine Practnrs.* 46, 137-142
- Dyson S. (2004) Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine vet. J.* 36, 415-419
- Dyson S. J. und Genovese R. L. (2003) The suspensory apparatus. In: *Diagnosis and Management of Lameness in Horses*. Ross M.W., Dyson S.J., (Hrsg.). Saunders, Philadelphia, USA, 1. Aufl., 654-666
- Ferris D. J., Frisbie D. D., Kisiday J. D., McIlwraith C. W., Hague B. A., Major M. D., Schneider R. K., Zubrod C. J., Watkins J. J., Kawcak C. E. und Goodrich L. R. (2009) Clinical follow-up of horses treated with bone marrow derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal lesions. *Proc. Am. Ass. equine Practnrs.* 55, 59-60
- Fibbe W. E. (2007) Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1106, 272-278
- Fortier L. A. und Smith R. K. (2008) Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 24, 191-201
- Geburek F. und Stadler P. (2010) Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden: Terminologie, Herstellung, biologisches Potential und In vitro-Effekte. angenommen zur Publikation in *Tierärztl. Prax.*
- Gillis C. L. (1997) Rehabilitation of tendon and ligament injuries. *Proc. Am. Ass. Equine Practnrs.* 43, 306-309
- Godwin E. E., Young N. J., Dudhia J., Beamish I. C. und Smith R. K. W. (2011) 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.* im Druck, doi: 10.1111/j.2042-3306.2011.00363.x
- Guest D. D., Smith M. R. und Allen W. R. (2008) Monitoring the fate of autologous and allogenic progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: Preliminary study. *Equine vet. J.* 40, 178-181
- Guest D., Li X. und Allen W. (2009) Establishing an equine embryonic stem cell line. *Regen. Med.* 4, Suppl. 2, S18
- Guest D. J., Smith M. R. W. und Allen W. R. (2010) Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine vet. J.* 42, 636-642
- Herthel D. J. (2001) Enhanced Suspensory Ligament Healing in 100 Horses by Stem Cells and other Bone Marrow Components. *Proc. Am. Ass. Equine Practnrs.* 47, 319-321
- Herthel D. (2003) Clinical use of stem cells and marrow components to stimulate suspensory ligament regeneration. In: *Diagnosis and management of lameness in the horse*. Ross M. W., Dyson S. J. (Hrsg.). Saunders, Philadelphia, USA, 673-674
- Ionita J. C. und Brehm W. (2008) Autologe Blutprodukte in der Regenerativen Therapie: ACS, PRP, ACP, Knochenmark. Vortragszusammenfassungen der Berliner Fortbildungstage 2008, 12.-14. Juni, Berlin, *Pferdeheilkunde* 24, 588-591
- Kasashima Y., Takahashi T., Smith R. K. W., Goodship A. E., Kuwano A., Ueno T. und Hirano S. (1999) Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine vet. J.* 36, 346-350
- Koch T. G., Heerkens T., Thomsen P. D. und Betts D. H. (2007) Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.* 7, 26, <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/7/26>
- Koch T. G., Berg L. C. und Betts D. H. (2008) Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can. Vet. J.* 49, 1009-1017
- Koch T. G., Berg L. C. und Betts D. H. (2009) Current and future regenerative medicine – principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can. Vet. J.* 50, 155-165
- Künneke A., Jaugstetter H. und Heyers P. (2008) Bone marrow-autologous conditioned plasma (BM-ACP) beim Pferd – erste klinische Erfahrungen einer neuen, autologen Therapieform bei der Behandlung von Sehnenkrankungen des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 24, 519-523
- Leppänen M., Miettinen S., Mäkinen S., Wilpola P., Katsialahti T., Heikkilä P. und Tulamo R. M. (2009a). Management of equine tendon & ligament injuries with expanded autologous adipose derived mesenchymal stem cells: a clinical study. *Regen. Med.* 4, Suppl. 2, S21
- Leppänen M., Heikkilä P., Katsialahti T. und Tulamo R. M. (2009b). Follow up of recovery of equine tendon & ligament injuries 18-24 months after treatment with enriched autologous adipose-derived mesenchymal stem cells: a clinical study. *Regen. Med.* 4, Suppl. 2, S21
- Little D. und Schramme M. C. (2006) Ultrasonographic and MRI evaluation of a novel tendonitis model in the horse. *Vet. Surg.* 35, E15
- Lutz S., Jahn W., Sill V., Pokar J., Jaek F. und Brehm W. (2010) Vergleich der intraläsionalen Behandlung von Fesselträgerläsionen mit thrombozytenangereichertem Plasma (PRP) und xenogener, azellulärer Matrix (ACell®). In: *Dtsch. Vet. Med. Gesellsch. (Hrsg.): 20. Arbeitstagung der Fachgruppe „Pferdekrankheiten“*, Hannover, 29.2.-1.3.2010; Gießen: DVG-Service GmbH, 2010, S. 61
- Majewski M., Ochsner P., Liu F., Flückiger R. und Evans C. H. (2009) Accelerated healing of the rat Achilles tendon in response to autologous conditioned serum. *Am. J. Sports Med.* 37, 2117 – 2125
- Mitchell R. D. (2006) Treatment of tendon and ligament injuries with UBM powder. *Proceedings of 9th International Conference of World Equine Veterinary Association, Marrakech, Marokko*, 22.-26. Januar 2006; S. 153-154



- Mountford D. R., Smith R. K. W. und Patterson-Kane J. C. (2006) Mesenchymal stem cell treatment of suspensory ligament branch desmitis: post mortem findings in a 10 year old Russian Warmblood gelding – a case report. *Pferdeheilkunde* 22, 559-563
- Nixon A. J., Dahlgren L. A., Haupt J. L., Yeager A. E. und Ward D. L. (2008) Effect of adipose derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am. J. vet. Res.* 69, 928-937
- O'Meara B., Bladon B., Parkin T. D., Fraser B. und Lischer C. J. (2010) An investigation of the relationship between race performance and superficial digital flexor tendonitis in the Thoroughbred racehorse. *Equine vet. J.* 42, 322-326
- Pacini S., Spinabella S., Trombi L., Fazzi R., Galimberti S., Dini F., Carlucci F. und Petrini M. (2007) Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.* 13, 2949-2955
- Paris D. B. P. und Stout T. A. E. (2010) Equine embryos and embryonic stem cells: Defining reliable markers of pluripotency. *Theriogenology* 74, 516-524
- Personett L., McAllister E. und Mansmann R. (1983) Proximal suspensory desmitis. *Mod. Vet. Pract.* 64, 541-545
- Ribitsch I., Burj J., Gittel C. und Brehm W. (2009) Umbilical cord blood & umbilical cord matrix: a comparison of two potential mesenchymal stem cell sources. *Regen. Med.* 4, Suppl. 2, S24
- Richardson L. E., Duhia J., Clegg P. D. und Smith R. (2007) Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol.* 25, 409-416
- Rindermann G., Cislakova M., Arndt G. und Carstanjen B. (2010) Autologous conditioned plasma as therapy of tendon and ligament lesions in seven horses. *J. Vet. Sci.* 11, 173-175
- Rijkenhuizen A. B. M., Gietemann I. V. und van der Reijnd C. M. (2007) Desmitis des Fesselträgers und Desmopathie des Fesselträgerstrangs an der Vorder- und Hintergliedmaße des Pferdes – eine retrospektive Studie über die Erfolge unterschiedlicher Behandlungen. *Pferdeheilkunde* 23, 357-365
- Rosenbrock A., Jacobi R., Pellmann R., Jaugstetter H. und Brehm W. (2004a) Der Einsatz der Übertragung autologen Knochenmarkes in der Pferdeorthopädie. In: Deegen E., Röcken M., Hrsg., Tagungsband der 18. Arbeitstagung der Fachgruppe „Pferdekrankheiten“; 4.-5.3.2004, Hannover, Deutschland. Gießen: DVG-Selbstverlag; S.105-108
- Rosenbrock A., Jacobi R., Jaugstetter H. und Brehm W. (2004b). Autologous bone marrow transplantation to stimulate suspensory ligament regeneration in 24 horses – A clinical case control study. 12. ESVOT Congress; 10.12.9.2004, München, S. 264-265
- Sawdon H., Yovich J. V. und Booth T. (1996) Superficial digital flexor tendonitis in racehorses: Long term follow up of conservatively managed horses. *Aus. vet. J.* 14, 21-25
- Schnabel L. V., Lynch M. E., van der Meulen M. C., Yeager A. E., Kornatowski M. A. und Nixon A. J. (2009) Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *J. Orthop. Res.* 27, 1392-1398
- Schramme M., Hunter S. und Campbell N. (2009) Ultrasonographic, MRI and histological evaluation of a new tendonitis model in the superficial digital flexor tendon of horses. *Regen. Med.* 4, Suppl. 2, S24
- Schramme M., Kerekes Z., Hunter S. und Labens R. (2010) MR imaging features of surgically induced core lesions in the equine superficial digital flexor tendon. *Vet. Radiol. Ultrasound* 51, 280-287
- Schramme M. C., Caniglia C. J. und Smith R. K. (2011) The effect of intralesional bone marrow derived mesenchymal stem cells on collagen fibril size in a surgical model of equine superficial digital flexor tendonitis. Proc. of the 20th Annual Scientific Meeting of the European College of Veterinary Surgeons, Ghent, July 7-9, 2011, 71
- Smith R. K. W., Korda M. und Blunn G. W. (2003) Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine vet. J.* 35, 99-102
- Smith R. K. und Webbon P. M. (2005) Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? *Br. J. Sports Med.* 39, 582-584
- Smith R. K. (2008a) Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil.* 30, 1752-1758
- Smith R. K. W. (2008b) Stem cell therapy for tendon and ligament injuries in the horse – technique and outcome. *Pferdeheilkunde* 24, 513-518
- Smith R., Young N., Dudhia J., Kasashima Y., Clegg P. und Goodship A. (2009) Effectiveness of bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells for naturally occurring tendinopathy in the horse. *Regen. Med.* 4, Suppl. 2, S25
- Souza M. V., van Weeren P. R., van Schie H. T. M. und van de Lest C. H. A. (2010) Regional differences in biochemical, biomechanical and histomorphological characteristics of the equine suspensory ligament. *Equine vet. J.* 42, 611-620
- Taylor S. E., Smith R. K. und Clegg P. D. (2007) Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine vet. J.* 39, 172-180
- Textor J. (2011) Autologous Biologic Treatment for Equine Musculoskeletal Injuries: Platelet Rich Plasma and IL-1 Receptor Antagonist Protein. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 27, 275-298
- Torricelli P., Fini M., Filardo G., Tschon M., Pischedda M., Pacorini A., Kon E. und Giardino R. (2011) Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *Int. Orthop.* 35, 1569-1576
- van den Belt A. J., Dik K. J. und Barneveld A. (1994) Ultrasonographic evaluation and long term follow-up of flexor tendonitis/desmitis in the metacarpal/metatarsal region in Dutch warmblood horses and standardbred racehorses. *Vet. Q.* 16, Suppl 2, S76-S80
- van Schie H. T. M., Backer E. M., Jonker A. M. und van Weeren P. R. (2000) Ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of grey level statistics. *Am. J. Vet. Res.* 61, 210-219
- van Schie H. T. M., Backer E. M., Cherdchutham W., Jonker A. M., van der Lest C. H. A. und van Weeren P. R. (2009) Monitoring of the repair process of surgically created lesions in equine superficial digital flexor tendons by use of computerized ultrasonography. *Am. J. Vet. Res.* 70, 37-48
- Wagels R., Rühmann K., Stadler P. und Drommer W. (2001) Feinna-delbiopsie aus den Beugesehnen des Pferdes. *Tierärztl. Prax.* 29(G), 199-205
- Waselau M., Sutter W. W., Genovese R. L. und Bertone A. L. (2008) Intralesional injection of platelet-rich-plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 232, 1515-1520
- Watts A. E., Yeager A. E., Kopyov O. V. und Nixon A. J. (2011) Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model. *Stem Cell Res. Ther.* 2, 4
- Weinberger T. (2008) Klinische Erfahrungen mit der Anwendung von ACS/ORTHOKIN/IRAP beim Pferd. *Pferde Spiegel.* 11, 111-115
- Witte T. H., Yeager A. E. und Nixon A. J. (2011) Intralesional injection of insulin-like growth factor-I for treatment of superficial digital flexor tendonitis in Thoroughbred racehorse: 40 cases (2000-2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 239, 992-997

Dr. Florian Geburek, Dipl. ECVS
 Fachtierarzt für Pferde
 Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
 Klinik für Pferde
 Bünteweg 9
 30559 Hannover
 florian.geburek@tiho-hannover.de





13.3 Publikation 3

Eydt, C., Schröck, C.* , **Geburek, F.***, Rohn, K., Staszky, C.†, Pfarrer, C.†

Three-Dimensional Anatomy of the Equine Sternum.

Anat. Histol. Embryol. 2014, 44 (2): 99-106. Erstmals online publiziert am 9. April 2014.

*†Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit



Three-Dimensional Anatomy of the Equine Sternum

C. Eydt^{1*}, C. Schröck², F. Geburek³, K. Rohn⁴, C. Staszky² and C. Pfarrer¹

Addresses of authors: ¹ Institute of Anatomy, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover, Germany;

² Institute of Veterinary-Anatomy, -Histology and -Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, Frankfurter Str. 98, D-35392 Giessen, Germany;

³ Equine Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Buenteweg 9, D-30559 Hannover, Germany;

⁴ Institute of Biometry and Information Processing, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Buenteweg 2, D-30559 Hannover, Germany

*Correspondence:

Tel.: +49 511 856 7471;

e-mail: carina.eydt@tiho-hannover.de

With 6 figures and 1 table

Received February 2014; accepted for publication February 2014

doi: 10.1111/ahe.12114

Carmen Schröck and Florian Geburek contributed equally to this work.

Carsten Staszky and Christiane Pfarrer contributed equally to this work.

Summary

The sternum is a frequently used anatomical site to obtain bone marrow for diagnostic and therapeutic purposes in equine medicine and surgery. For a safe and reproducible aspiration of sternal bone marrow, a reliable anatomical description of the sternum is mandatory. However, the anatomical literature provides very heterogeneous information concerning the structure and number of sternebrae. Isolated sterna (horses of different ages) underwent clinical computed tomography, and single sternebrae were scanned by microcomputed tomography. Data sets were analysed in detail, the dimensions of each sternebra were determined, and correlations to the age and weight were generated. A uniform arrangement of seven sternebrae within the equine sternum was obtained, whereas the 6th and 7th sternebrae were fused in all sterna. The cranial sternebrae (sternebrae 1–3) had a lentiform shape with flattened lateral sides, while the caudal sternebrae (6 and 7) were flattened dorso-ventrally. In contrast, sternebrae 4 and 5 were spherical. The single sternebrae were well demarcated to the chondral sternum and showed two different zones. The periphery consisted of radiodense woven tissue, while in the centre the radiodense tissue was loosely arranged and contained large cavities with radiolucent tissue. A thin lamina (substantia corticalis) of <1 mm was arranged around the peripheral zone. There was no correlation between the body weight and the dimensions of the sternebrae, but there was a positive correlation to the age of the horses. The obtained data provide a sufficient basis to establish a standard nomenclature of the equine sternum.

Introduction

According to the present literature, the equine sternum is composed of three segments: The praesternum (cranial), the mesosternum and the caudal xiphosternum (Schwarze, 1960; Kovács and Fehér, 1961; Loeffler, 1970; Nickel et al., 2004; Wissdorf et al., 2010). The praesternum consists of two parts: the bony manubrium sterni and the prominent cartilago manubrii, which possesses a ventrally convex contour in the horse (Nickel et al., 2004; König and Liebich, 2007; Wissdorf et al., 2010). The articular facets for the first pair of ribs are located at the

dorsal aspect of the cartilago manubrii (Nickel et al., 2004). The manubrium sterni is the portion, which is located cranially from the 2nd pair of ribs. The mesosternum (corpus sterni) is composed of bony elements (sternebrae) that are connected to each other by hyaline cartilage forming synchondroses sternales (Koch and Berg, 1992; Nickel et al., 2004). Ventrally, the cartilaginous mass forms a crest, crista sterni (Nickel et al., 2004; Wissdorf et al., 2010). The lateral sides of the corpus sterni possess incisurae costales for the articulation with corresponding ribs. It has been documented that in aged horses, the synchondroses sternales ossify and the



sternebrae fuse by synostoses (Schwarze, 1960; Koch and Berg, 1992; Nickel et al., 2004). However, no data exist concerning the number and/or position of ossifying synchondroses. The xiphosternum of the horse usually lacks a bony structure (Kovács and Fehér, 1961; Koch and Berg, 1992; Nickel et al., 2004; Wissdorf et al., 2010). It only consists of a cartilaginous structure (cartilago xiphoidea) and has a flat shape expanding laterally in a caudal direction (König and Liebich, 2007).

Although this gross anatomical description of the equine sternum is generally accepted, the anatomical literature provides very heterogeneous information concerning the number and the denomination of the individual sternebrae. Several authors determine six individual bony elements within the equine sternum. In accordance with the *Nomina Anatomica Veterinaria* (2012), the first bony element is referred to as manubrium sterni, and the bony elements 2–6 are referred to as sternebrae 1–5 (Schwarze, 1960; Loeffler, 1970; Koch and Berg, 1992; Nickel et al., 2004). Other authors identify one additional bony element and therefore divide the sternum into manubrium sterni and sternebrae 1–6 (Wissdorf et al., 2010). In a recent study, also seven bony elements were identified and referred to as sternebrae 1–7, omitting the term manubrium sterni (Kasashima et al., 2011).

In human anatomy, the term manubrium sterni is clearly defined by three criteria. First, the manubrium sterni is the most superior portion of the sternum and contains the most superior ossification centre (Ogden et al., 1979; Twietmeyer and McCracken, 2001; Platzer, 2009). Second, the human manubrium sterni is connected to the corpus sterni by fibrocartilage, called symphysis manubriosternalis (Benninghoff and Drenckhahn, 2008). Third, the human manubrium sterni has a distinct shape, which differs from the other osseous components of the sternum (Standring et al., 2005). Comparing the human sternum with the equine sternum, the question arises whether adapting terms from human anatomy describes the equine anatomy appropriately.

In modern equine surgery and medicine, the aspiration of sternal bone gains many attention. Sternal bone marrow is widely used as a source of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) to treat orthopaedic diseases (Smith et al., 2003; Fortier and Smith, 2008; Kasashima et al., 2011). A sternal puncture is also suitable for cancellous bone biopsy, which is used for autologous cancellous bone grafts (Richardson et al., 1986; Désévaux et al., 2000), or for diagnosis and prognosis of abnormalities of blood cells (Russell et al., 1994; Sellon, 2006).

The technical aspect of sternal bone marrow aspiration requires a distinct and detailed anatomical description of the equine sternum for at least two reasons. First, although the technique of bone marrow aspiration from

the sternum is a routine procedure, fatal thoracic and cardiac punctures (Jacobs et al., 1983) and a case of pneumopericardium (Durando et al., 2006) have been described. New data concerning the dimensions and the topographical relations of the individual sternebrae might help to identify the most suitable positions for sternal puncture and might help to avoid risks.

Second, to provide a clear and unambiguous description of surgical techniques related to the equine sternum, a revision and standardization of the anatomical nomenclature is mandatory. Therefore, this study investigated the gross anatomy and the morphometric characteristics of the equine sternum using modern imaging techniques such as clinical- and microcomputed tomography (cCT, μ CT) and morphometric analyses on computerized 3-D models.

Materials and Methods

Material

This study was approved by the Ethics Committee of the University of Veterinary Medicine, Foundation, Hannover, Germany, and by the responsible German federal state authority (Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, 33.9-42502-04-11/0572). Nineteen warmblood horses (aged 2–28 years, median 14.77) were euthanized for other reasons than for this study in the Equine Clinic of the University of Veterinary Medicine Hannover. Sterna were collected in the Institute of Anatomy at the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation. After removal, the sterna were deep frozen and stored until further use.

Creation of 3-D models

After being placed with its dorsal aspect facing to the table, each sternum was scanned helically using clinical computed tomography (BrillianceTM CT – Big Bore Oncology Scanner; Philips Medical Systems, Best, The Netherlands). The following parameters were applied: slice thickness, 3 mm; rotation time 1.5 s, helical pitch 0.813; table speed, 9 mm/s; X-ray tube potential, 140 kV; X-ray tube current \times exposure time, 500 mAs. For bony details, a series with an edge-enhancing filter was reconstructed (1024 image matrix). For evaluation, a longitudinal, a transverse and a coronal series with a slice thickness of 2 mm were generated using multiplanar reformatting: WC, 70 Hounsfield Units (HU); WW, 2400 HU.

By use of a μ CT-system (XTremeCT; Scanco Medical AG, Brüttisellen, Switzerland) with an isotropic spatial resolution of 82 μ m, single sternebrae were scanned.

The obtained Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM) data sets were imported to the

computer program AMIRA (version 5.2.0; Visage Imaging GmbH, Berlin, Germany). For each sternum, 500–1000 2-D cCT were created. Micro-CT data sets of individual sternbrae comprised about 1500 2-D μ CT images. On the basis of the material-specific grey scales (Hounsfield units), sternal bone, including medullary cavities, and sternal cartilage were identified and labelled in 2-D images (Fig. 1). Subsequently, three-dimensional models were calculated and visualized. Most structures were generated under visual control because of the limitation of automatic algorithms.

Measurements

The combined use of cCT-Data, μ CT-Data and 3-D models allowed multiple morphological analyses. Measurements were performed using cCT-data sets. Measurement accuracy was exemplarily checked in high-resolution μ CT-data sets.

Using 3-D models, the position and shape of individual sternbrae were determined. By means of multiplanar reconstructions, exact median, transversal and horizontal planes were visualized. Subsequently, the following measurements were conducted using a three-dimensional measuring tool in the program AMIRA:

- 1 cranio-caudal distance from sternbrae 1 to 7 (Fig. 1),
- 2 cranio-caudal distance of each sternbra (Fig. 1),
- 3 dorso-ventral distance of each sternbra (Fig. 1),
- 4 latero-lateral distance of each sternbra (Fig. 1).

The volumes (mm^3) of the sternbrae were determined with the module MaterialStatistics (AMIRA), which calculates

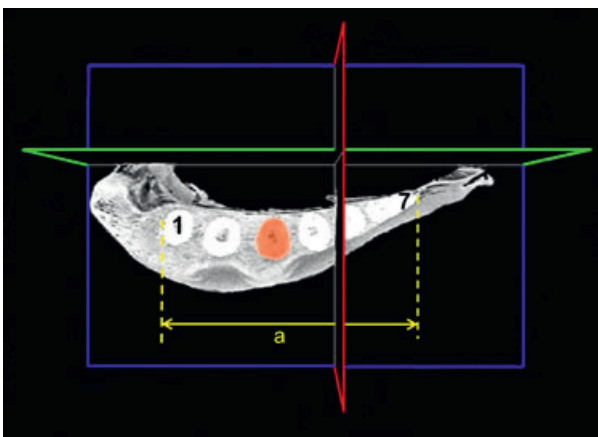


Fig. 1. Clinical CT image of an equine sternum, horse 15 (female, 16 years). Blue frame: sagittal plane; red frame: transversal plane; green frame: horizontal plane. Yellow, a: measurement of distance between sternbra 1 (1) and sternbra 7 (7). The cross-sectional areas of the individual sternbrae were marked to calculate their volumes, for example sternbra 3 (orange).

the volume of a selected region. The measurements were tested for significant correlations between the age/weight and the total volumes/centre volumes of the sternbrae.

Statistics

Differences between the distances of seven sternbrae and the volumes of 19 sterna from horses were calculated by one-way analysis of variance with repeated measurements and post hoc Tukey test, considering experiment-wise error rate. Normal distribution of model residuals was confirmed by the Kolmogorov–Smirnov test and visual assessment of qq-plots. Resulting *P*-values of $P < 0.05$ were regarded as statistically significant. All analyses were performed with the statistics program SAS (version 9.3; SAS Institute, Cary, NC, USA).

Results

cCT- images

The typical cartilaginous structures (Cartilago manubrii, Crista sterni, Cartilago xiphoidea) were visible and identified in all examined specimens. A uniform arrangement of seven bony elements was detected. In the following, these bony elements are referred to as sternbrae 1–7, omitting the term manubrium sterni. In most cases, the sternbrae were separated from each other by a cartilaginous mass. The most caudal sternbrae (6th and 7th) were fused in 18 of 19 sterna, only the youngest horse (2 years) showed an incomplete fusion. In 10 of 19 sterna (52.63%), sternbra 5 was fused with the 6th one. In horses older than 15 years, sternbrae 5, 6 and 7 were nearly completely fused, and the 1st and 2nd sternbrae were partly fused (Fig. 2).

The crista sterni is most prominent and radiodense at the ventral aspect of sternbrae 1–3. In contrast, the ventral aspect of sternbrae 4–7 is covered by much more radiolucent and thinner masses of cartilage (Figs 1–3).

3-D reconstructions elucidated the shape of the individual sternbrae. Sternbrae 1–3 were lentiform with flattened lateral sides, sternbrae 4 and 5 had a spherical shape, and sternbrae 6 and 7 were lentiform with flattened dorso-ventral sides (Fig. 3).

Each sternbra possessed a radiodense peripheral zone and a radiolucent centre (Fig. 4). These features were further analysed using high-resolution μ CT-data sets.

μ CT images

The total volume of the sternbrae consists of a meshwork of mineralized trabeculae resembling spongy bone. However, the mineralized trabeculae are aligned in a much

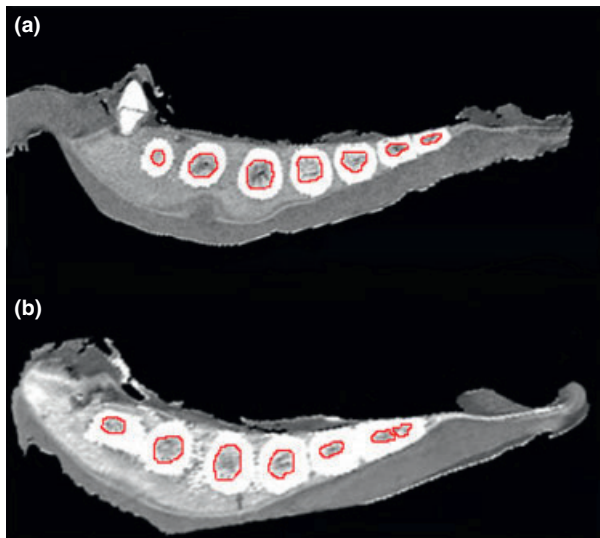


Fig. 2. Clinical CT images of sterna from two different horses. (a) Horse 19 (male, 2 years) and (b) Horse 5 (female, 24 years). Both sterna contain seven bony elements, that is, sternebrae 1–7. Sternebrae 6 and 7 are fused in both specimens. In the 24-year-old horse (b), sternebrae 1 and 2 as well as sternebrae 5 and 6 are partially fused. The centres of sternebrae 1–7 are outlined in red.

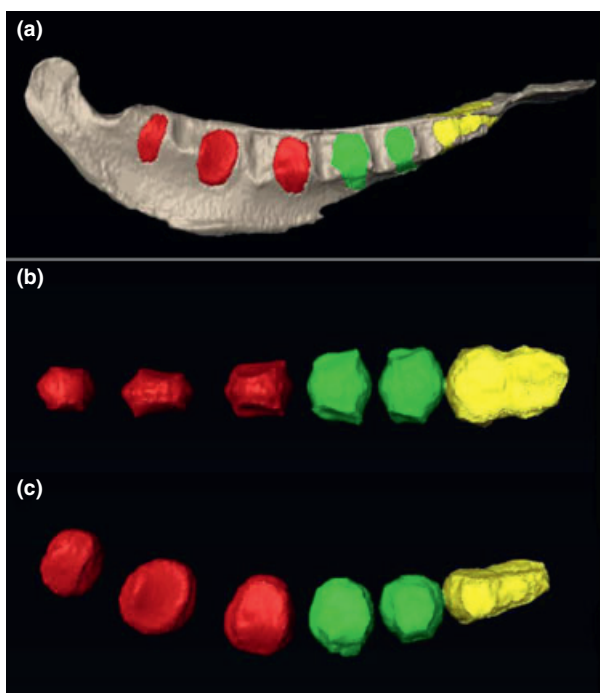


Fig. 3. (a) 3-D model of a sternum. The cartilaginous material is tinged in light grey. Incisurae costales are clearly visible. Red: sternebrae 1–3; green: sternebrae 4 and 5; yellow: sternebrae 6 and 7. (b) and (c) 3-D models of isolated sternebrae from (a). The shape of the individual sternebrae is visualized using a ventral view (b) and a lateral view (c).

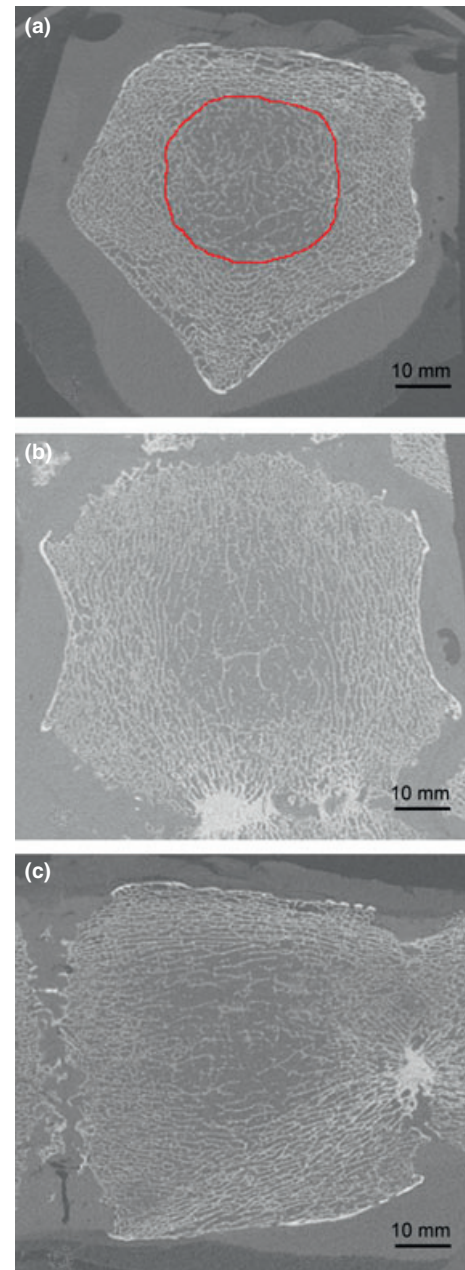


Fig. 4. Micro CT images of sternebra 5, horse 18 (female, 5 years). (a) Transversal plane, (b) horizontal plane, (c) sagittal plane. The sternebra is composed of a meshwork of mineralized trabeculae. Bony trabeculae are loosely aligned in a centre zone (a, red). A peripheral zone contains trabeculae in a much denser arrangement. Note, even the most peripheral outline of the sternebrae is not composed of a stratum compactum, but features a thin bony lamella.

denser arrangement in the periphery compared with the centre of the sternebra. These features reflect the radio-dense peripheral zone and the radiolucent centre described in the μ CT images. The most peripheral outline of the sternebrae is not composed of a stratum compactum, but

features a thin bony lamella (corresponding to a *substantia corticalis*) measuring <1 mm (Fig. 4).

Measurements of sterna and sternebrae

The distance from sternebrae 1–7 was calculated in every sternum, and an arithmetic mean length of 381.93 mm was generated (Table 1). There was no correlation between the body weight and the length of the sternum ($R^2 = 0.0542$). However, there was a low positive correlation between the age and the total length of the sternum ($R^2 = 0.2235$).

The volumes of the total sternebrae and their centres are shown in Fig. 5. The total volumes of sternebrae 4 and 5 are significantly larger than those of other sternebrae. The three most caudal sternebrae (sternebrae 5–7) possess very similar total volumes with no significant differences. There was no correlation between the weight of the horses and the total volume and centre volume ($R^2 = 0.0019$ – 0.1564). However, there was a positive correlation between the total volume of sternebrae 2–7 and the age ($R^2 = 0.1842$ – 0.4711) with sternebra 5 showing the largest positive correlation ($R^2 = 0.4711$). The volume of the centres of sternebrae 2, 3 and 7 showed a positive correlation to the age of the horses, too ($R^2 = 0.2353$ – 0.4353).

The measurement analyses of the median, transversal and horizontal planes are shown in Fig. 6. The dorso-ventral extension increases from sternebrae 1 to 3 and then decreases from sternebrae 4 to 7. Concomitantly, the

Table 1. Distances from sternebrae 1 to 7

Horse	Age (years)	Weight (kg)	Distance sternebrae 1–7 (mm)
1			345.50
2			369.30
3			406.00
4			354.00
5			404.30
6			362.20
7	18	640	401.60
8	28	570	393.10
9	15	550	413.00
10	18	544	406.80
11	22	640	366.00
12	9	477	365.42
13	22	586	403.40
14	15	565	359.00
15	16	653	387.00
16	17	630	398.80
17	5	617	395.80
18	5	540	350.50
19	2	591	360.20

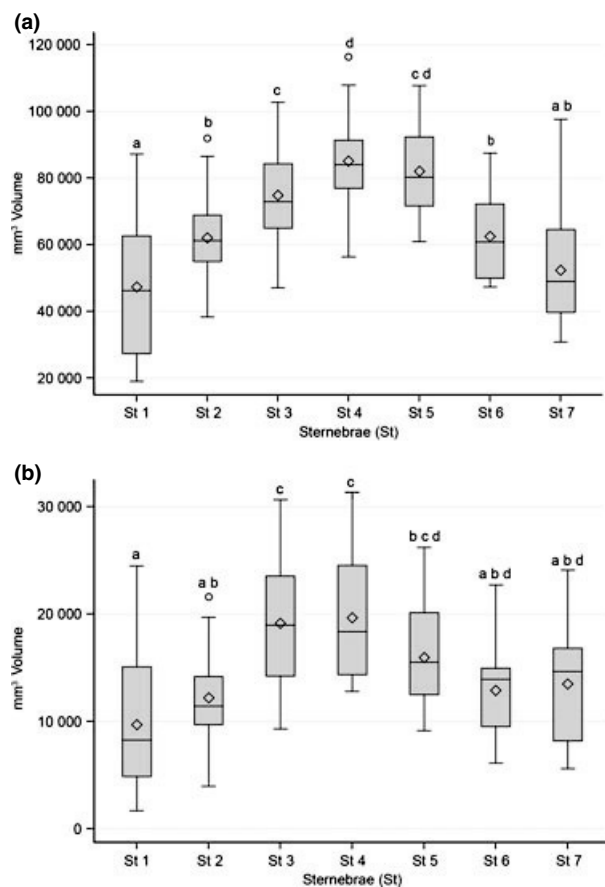


Fig. 5. Total volume (a) and centre volume (b) of sternebrae 1–7. The letters a–d indicate statistical significant differences. Circles: outliers, box: 25–75% quartile, line: median, rectangle: mean.

extension increases from sternebrae 1 to 7. Additionally, they become dorso-ventrally flattened caudally, which is depicted in the latero-lateral diagram (Fig. 6c). The cranio-caudal extension does not differ between the sternebrae. The shape of the sternebrae is best described by two geometric bodies. Sternebrae 1–3 resemble a latero-lateral biconvex lens, sternebrae 4 and 5 have a spherical shape, and sternebrae 6 and 7 resemble a dorso-ventral biconvex lens.

Discussion

The term *manubrium sterni* has been adopted from human anatomy to describe the most cranial ossified structure in the equine sternum. The origin of the term *manubrium sterni* (Latin: *manubrium* = hilt, handle) is attributed to the distinct quadrangular shape of the human most superior osseous structure in the sternum, which resembles a hilt of a Roman sword, *gladius* (Nickel et al., 2004). This particular shape is understood as an

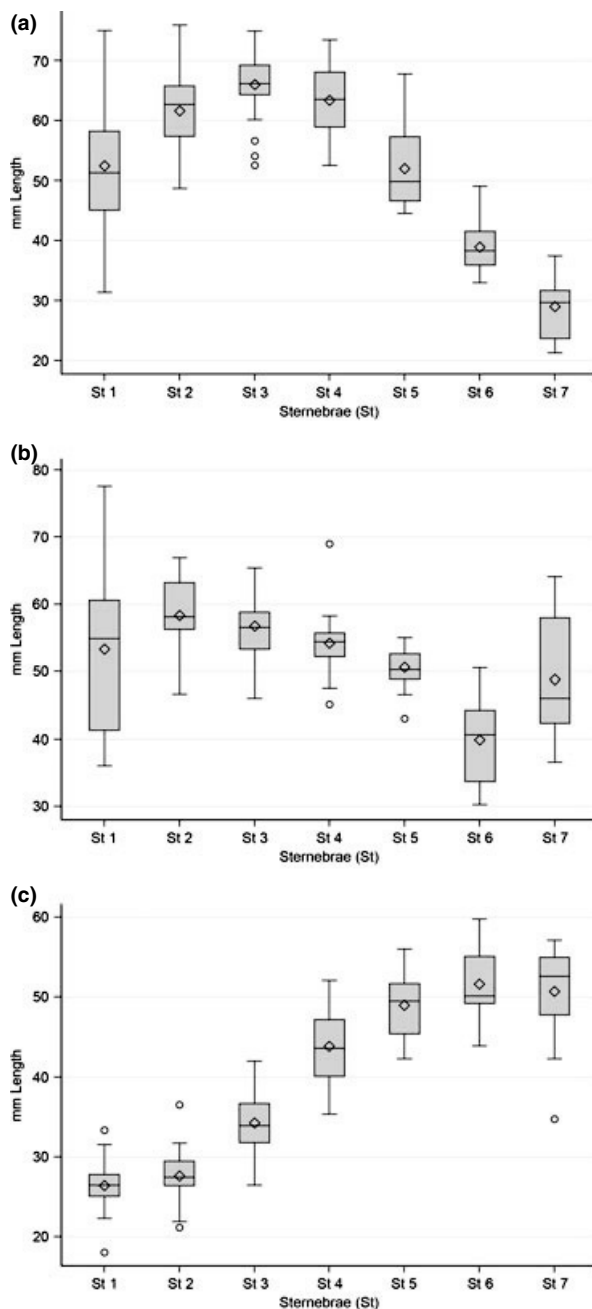


Fig. 6. Dorso-ventral (a), cranio-caudal (b) and latero-lateral (c) extensions of sternbrae 1–7. Circles: outliers, box: 25–75% quartile, line: median, rectangle: mean.

adaption to functional requirements. The broad superior part of the human manubrium sterni provides articular surfaces for the clavicles and the first pair of ribs. In inferior direction, the human manubrium sterni narrows to its junction with the corpus of the sternum, the symphysis manubriosternalis (Standring et al., 2005). The prominent shape distinguishes the human manubrium sterni

from all other osseous components of the human sternum and justifies its denomination. In contrast, the most cranial osseous structure in the equine sternum does not possess a distinct shape but is very similar to the next two following sternbrae. Furthermore, the most cranial osseous structure in the equine sternum does not provide articular surfaces for ribs, like the human manubrium sternum does. The first pair of ribs in horses articulates with the cartilago manubrii, and the second pair of ribs articulates with the first incisura costalis placed in between the first two osseous structures of the equine sternum. Regarding the differences in shape and topographical position, the equine most cranial osseous structure of the sternum seems not to be homologous with the human manubrium sterni. In horses, the most cranial ossified component of the sternum should be considered as the first of a row of similar sternbrae. Therefore, we recommend the use of the term sternbra 1 to name the most cranial osseous structure of the equine sternum in accordance with Kasashima et al. (2011). The simple adaption of the term manubrium sterni from human anatomy seems to be inappropriate. The following bony elements should be referred to as sternbra 2 to sternbra 7. Especially, the invasive technique of bone marrow aspiration from the equine sternum requires an exact and unambiguous methodical description to avoid fatal complications, for example penetration of the dorsal lamina of sternbrae. Therefore, the suggested nomenclature might contribute to avoiding heterogeneous and inconsistent descriptions of the equine sternum as present in the older literature.

Apart from a heterogeneous nomenclature, the number of bony elements has been determined controversially in the related literature. In contrast to previous reports describing the presence of either six or seven sternbrae (Schwarze, 1960; Loeffler, 1970; Koch and Berg, 1992; Nickel et al., 2004; Wissdorf et al., 2010), sterna in this study were consistently composed of seven separate sternbrae. Using cCT-scans, individual sternbrae were clearly distinguishable, also in cases of fusion of previously separated sternbrae. Fusion of sternbrae 6 and 7 frequently occurred in horses >2 years (Fig. 2). Such fused sternbrae might be misinterpreted as a singular sternbra based on the limitation of illustration facilities in former times. However, it should be emphasized that in the current study, only warmblood horses were examined. Therefore, it cannot be ruled out that there may be differences in other types of horses.

In recent years, the equine sternum has gained a great deal of attention as a reservoir for mesenchymal stromal cells, which are recommended to be used for orthopaedic injuries (Smith et al., 2003; Fortier and Smith, 2008; Kasashima et al., 2011). Furthermore, the sternum is a donor



site for autologous cancellous bone grafts frequently used in equine surgery (Richardson et al., 1986; Désévaux et al., 2000). For diagnostic and prognostic purposes, equine bone marrow analysis is conducted to obtain important information concerning quantitative or qualitative abnormalities of blood cells, such as unexplained prolonged anaemia, polycythaemia, pancytopenia, leucocytosis, thrombocytopenia or thrombocytosis (Russell et al., 1994; Sellon, 2006). Most authors recommend aspirating bone marrow from sternebrae 4, 5 or 6 (Désévaux et al., 2000; Goodrich et al., 2008; Kasashima et al., 2011; Kisiday et al., 2013). However, due to the use of different nomenclatures, it is not unambiguously clear which specific sternebra was punctured. Considering the risks of fatal punctures of the thoracic cavity, it has been suggested to limit the insertion depth of the puncture needle to 20 mm (Goodrich et al., 2008; Kasashima et al., 2011).

On the basis of the obtained morphometric results, sternebrae 4 and 5 appear to be most suitable for aspiration of bone marrow with minimized risks of complications for at least three reasons:

First, sternebrae 4 and 5 are the largest sternebrae according to their volume, which suggests a high yield of bone marrow aspirate.

Second, sternebrae 4 and 5 are spherically shaped and possess a dorso-ventral extension of at least 52 mm. These morphological features allow an appropriate range of movement when inserting the puncture needle, which reduces the risk of fatal transsternal penetrations of vital structures.

Third, the ventral aspect of the sternebrae 4 and 5 is not covered by a prominent crista sterni, which alleviates the surgical access by reducing the risk of lateral slipping of the puncture needle away from the median plane. Furthermore, the absence of a prominent crista sterni makes pre-operative ultrasonographic visualization of the ventral midline contour of sternebrae 4 and 5 easier.

For optimal positioning of the puncture needle, correct identification of the individual sternebrae is crucial. This may be achieved with the aid of anatomical landmarks like the olecranon tuber or the xiphoid process (Durando et al., 2006; Adams et al., 2012; Delling et al., 2012; Kisiday et al., 2013). However, to unambiguously identify an optimal puncture site targeting the centre of the sternebrae, direct visualization of the ventral outline of the sternebrae using ultrasound has been suggested (Désévaux et al., 2000; Smith et al., 2003; Arnhold et al., 2007; Kasashima et al., 2011).

Conclusion

The obtained results provide a basis for a revised and clear denomination of the bony elements of the equine

sternum. The morphometric data (shape and volume) suggest the use of sternebrae 4 and 5 for optimized bone marrow aspiration and minimized the risk of fatal side effects.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. M. Hellige for her support during cCT imaging, M. Kielhorn for her assistance during μ CT imaging, O. Stünkel for his excellent technical assistance and P. Schrock for her perfect support with AMIRA. The authors wish to thank Mrs. F. Sherwood-Brock for proofreading the manuscript. This work was supported by a grant from the Federal Ministry for Economic Affairs and Energy, AiF Project GmbH.

References

- Adams, M. K., L. R. Goodrich, S. Rao, F. Olea-Popelka, N. Phillips, J. D. Kisiday, and C. W. McIlwraith, 2012: Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: are there differences? *Equine Vet. J.* **45**, 372–375.
- Arnhold, S. J., I. Goletz, H. Klein, G. Stumpf, L. A. Beluche, C. Rohde, K. Addicks, and L. F. Litzke, 2007: Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* **68**, 1095–1105.
- Benninghoff, A., and D. Drenckhahn, 2008: *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Jena: Elsevier GmbH, Urban & Fischer.
- Delling, U., K. Lindner, I. Ribitsch, H. Jülke, and W. Brehm, 2012: Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Can. J. Vet. Res.* **76**, 52–56.
- Désévaux, C., S. Laverty, and B. Doizé, 2000: Sternal bone biopsy in standing horses. *Vet. Surg.* **29**, 303–308.
- Durando, M. M., L. Zarucco, T. P. Schaer, M. Ross, and V. B. Reef, 2006: Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine Vet. Educ.* **18**, 75–79.
- Fortier, L. A., and R. K. Smith, 2008: Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **24**, 191–201.
- Goodrich, L. R., D. D. Frisbie, and J. D. Kisiday, 2008: How to harvest bone marrow derived mesenchymal stem cells for expansion and injection. *AAEP Proc.* **54**, 252–257.
- Jacobs, R. M., G. J. Kociba, and W. W. Ruoff, 1983: Monoclonal gammopathy in a horse with defective hemostasis. *Vet. Pathol.* **20**, 643–647.
- Kasashima, Y., T. Ueno, A. Tomita, A. E. Goodship, and R. K. W. Smith, 2011: Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet. J.* **43**, 288–294.
- Kisiday, J. D., L. R. Goodrich, C. W. McIlwraith, and D. D. Frisbie, 2013: Effects of equine bone marrow aspirate vol-



- ume on isolation, proliferation, and differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* **74**, 801–807.
- Berg, R. in Koch, T., and R. Berg, 1992: *Lehrbuch der Veterinär-Anatomie, Band 1: Bewegungsapparat*. Jena: Fischer-Verlag.
- König, H. E., and H. G. Liebich, 2007: *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals: Textbook and Colour Atlas*. Stuttgart: Schattauer.
- Kovács, G., and G. Fehér, 1961: Deskriptiv- und röntgenanatomische Untersuchungen am Sternum von Haussäugetieren. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* **12**, 165–176.
- Loeffler, K. 1970: *Anatomie und Physiologie der Haustiere*. Stuttgart: Ulmer.
- Nickel, R., A. Schummer, K. H. Wille, and H. Wilkens (1992) in Nickel, R., A. Schummer, and E. Seiferle, 2004: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 1 Bewegungsapparat*. Stuttgart, Parey.
- Nomina Anatomia Veterinaria, 2012: International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. Published by the Editorial Committee of the World Association of Veterinary Anatomists (W.A.V.A.), Hannover, Columbia, Gent, Sapporo.
- Ogden, J. A., G. J. Conligue, M. L. Bronson, and P. S. Jensen, 1979: Radiology of postnatal skeletal development. II. The manubrium and sternum. *Skeletal Radiol.* **4**, 189–195.
- Platzer, W. 2009: *Color Atlas of Human Anatomy: Vol 1, Locomotor System*. Stuttgart: Thieme.
- Richardson, G. L., R. R. Pool, J. R. Pascoe, and J. D. Wheat, 1986: Autogenous cancellous bone grafts from the sternum in horses. *Vet. Surg.* **15**, 9–15.
- Russell, K., D. C. Sellon, and C. B. Grindem, 1994: Bone marrow in horses: Indications, sample handling, and complications. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* **16**, 1359–1365.
- Schwarze, E. 1960: *Kompodium der Veterinär-Anatomie: Einführung in die Veterinär-Anatomie, Band 1 Bewegungsapparat*. Jena: Fischer-Verlag.
- Sellon, D. C. 2006: How to sample a diagnostic bone marrow sample from the sternum of an adult horse. *AAEP Proc.* **52**, 621–625.
- Smith, R. K. W., M. Korda, G. W. Blunn, and A. E. Goodship, 2003: Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet. J.* **35**, 99–102.
- Standring, S., D. Johnson, and P. Shah 2005: *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. London: Elsevier.
- Twietmeyer, A., and T. McCracken, 2001: *Coloring Guide to Human Anatomy*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Wissdorf, H., H. Gerhards, B. Huskamp, and E. Deegen, 2010: *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes*. Hannover: Schaper.





13.4 Publikation 4

Eydt, C., **Geburek, F.***, Schröck, C.*, Hambruch, N., Rohn, K., Pfarrer, C.†; Staszuk, C.†

Sternal bone marrow derived equine multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): Investigations considering the sampling site and the use of different culture media.

Vet. Med. Sci. 2016, 20. Juni; 2 (3): 200-210.

*†Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit



Sternal bone marrow derived equine multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): investigations considering the sampling site and the use of different culture media

Carina Eydt*, **Florian Geburek[†]**, **Carmen Schröck[‡]**, **Nina Hambruch***, **Karl Rohn[§]**, **Christiane Pfarrer*** and **Carsten Staszuk[‡]**

*Institute of Anatomy, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, Hannover, D-30173, Germany, [†]Equine Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 9, Hannover, D-30559, Germany, [‡]Institute of Veterinary-Anatomy, -Histology and -Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, Frankfurter Str. 98, Giessen, D-35392, Germany and [§]Institute of Biometry and Information Processing, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 2, Hannover, D-30559, Germany

Abstract

Aspiration of equine sternal bone marrow is required for the cultivation of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) for regenerative therapies. For bone marrow aspiration as well as for MSC cultivation, there is a need to optimize techniques and protocols to enhance MSC harvest at minimized culture times. In a comparative study bone marrow aspirates from sternebra 4 and 5 were collected at two different positions within the sternebrae, either from 10 mm or from 30 mm dorsal from the ventral margin of the sternebrae. Accuracy of the puncture depth was confirmed by ultrasonography and computed tomography. Isolated MSCs were cultivated using media supplemented with three alternative sera, i.e. fetal calf serum, standardized horse serum and autologous serum. Due to morphological characteristics (spherical shape, only thin layer of hyaline cartilage at the ventral site, reliable bone marrow aspiration from only 10 mm intraosseous depth), sternebra 5 appeared most suitable for bone marrow aspiration. Cultivation and expansion of BM-MSCs was most efficient using fetal calf serum.

Keywords: Horse, sternum, multipotent stromal cells, bone marrow, serum.

Correspondence: Carsten Staszuk, Institute of Veterinary-Anatomy, -Histology and -Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, Frankfurter Str. 98, D-35392 Giessen, Germany. E-mail: carsten.staszuk@vetmed.uni-giessen.de

Introduction

Aspiration of equine sternal bone marrow is a surgical procedure conducted for various diagnostic and therapeutic purposes. For diagnostic purposes, equine bone marrow is analysed to characterize and further explain diagnose haematopoietic disorders and bone marrow-associated neoplastic conditions (Russell *et al.* 1994; Sellon 2006). For therapeutic purposes, sternal bone biopsies are successfully used for the production of autologous cancellous bone

grafts to repair large bony defects (Richardson *et al.* 1986; Désévaux *et al.* 2000). Meanwhile, sternal bone marrow is commonly used and well recognized as a source of MSCs for potentially regenerative therapies of musculoskeletal injuries (Smith *et al.* 2003, 2013, 2014; Fortier & Smith 2008; Goodrich *et al.* 2008; Smith 2008; Garvican *et al.* 2014). Bone marrow-derived MSCs appear to have the potential to produce actual tendon matrix rather than scar tissue which is by contrast associated with the normal pathway of tendon healing (Frank *et al.* 1997; Smith *et al.* 2003; Kajikawa *et al.* 2007). Although, the aspiration of bone marrow from the equine sternum is accepted as a safe method, fatal thoracic and cardiac

C. Pfarrer and C. Staszuk contributed equally to this work.
C. Schröck and F. Geburek contributed equally to this work.

© 2016 The Authors. *Veterinary Medicine and Science* Published by John Wiley & Sons Ltd.
Veterinary Medicine and Science (2016), ●●, pp. ●●–●●

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.



punctures (Jacobs *et al.* 1983) as well as a case of pneumopericardium (Durando *et al.* 2006) have been described. To avoid complications, a maximum ventro-dorsal insertion depth of the bone marrow aspiration cannula into the sternbrae of 30 mm has been recommended (Goodrich *et al.* 2008). Based on anatomical studies of sternbrae 4–6 the maximum tolerable insertion depth was adjusted to 10–20 mm (Kasashima *et al.* 2011). A recent investigation showed that sternbrae 4 and 5 are most suitable for bone marrow aspiration (Eydt *et al.* 2014). These sternbrae possess an almost spherical shape and a dorso-ventral extension of at least 52 mm. On the basis of these experimental data, an insertion depth in the median plane of even more than 30 mm is regarded as safe in warmblood horses (Eydt *et al.* 2014).

The process of cultivation of equine MSCs from bone marrow aspirates has been described in detail in the literature (Smith *et al.* 2003; Arnhold *et al.* 2007; Bourzac *et al.* 2010; Spaas *et al.* 2012). After bone marrow aspiration, it takes however between 3 and 6 weeks in culture to harvest a number of cultured MSCs being adequate for therapeutic purposes (Brems & Jebe 2008; Fortier & Smith 2008; Goodrich *et al.* 2008; Reed & Leahy 2013; Schnabel *et al.* 2013). Consequently, efforts were made to optimize the yield of MSCs by evaluating alternative aspiration techniques and different cell isolation protocols (Bourzac *et al.* 2010; Kasashima *et al.* 2011). In continuation of these studies, the quality of bone marrow aspirates obtained from different insertion depths were compared and the influence of different sera supplemented to the MSC culture medium was determined.

Materials and methods

Animals and bone marrow aspiration technique

Sternal bone marrow aspirates were collected from twelve horses receiving general anaesthesia. Subsequently, the animals were euthanized for reasons unrelated to this study. The horses (five geldings, seven mares, aged 2–28 years, body mass between

480 and 640 kg) had no history of previous bone marrow aspiration. All protocols were approved by the Animal Welfare Commissioner of the University of Veterinary Medicine Hannover in accordance with the German Animal Welfare Law (Lower Saxony State Office for Costumer Protection and Food Safety, 33.9-42502-04-11/0572). Blood was taken from each horse to extract autologous serum (AS). Horses were premedicated with 0.6–0.8 mg/kg xylazine (Xylazin 2%[®], CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany). Anaesthesia was induced by 0.05 mg/kg midazolam (Midazolam[®] B. Braun 5 mg/mL, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) and 2.2 mg/kg ketamine (Narketan[®], 100 mg/mL, Vétoquinol GmbH, Ravensburg, Germany). General anaesthesia was maintained with isoflurane (Isofluran CP[®], CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) in 100% oxygen. Mean arterial blood pressure was maintained at 70–80 mmHg. Horses were positioned in dorsal recumbency and the area of the sternum was clipped. After degreasing the skin with soap and alcohol, acoustic gel was applied and the sternum was examined ultrasonographically (Logiq E9, GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA) with a 5–9 MHz and a 9–15 MHz linear probe parallel and transverse to the longitudinal axis of the horse. In addition, longitudinal panoramic ultrasonograms of the caudal sternal region were produced, using the LOGIQ-view function of the ultrasound machine. The positions of the median plane of sternbrae 4 and 5 were determined using longitudinal and transverse probe positions (Fig. 1). Freeze frames of transverse B-mode ultrasonograms centred on the respective sternbra were stored (Fig. 1b). Subsequently, the distances from the skin surface to the continuous hyperechoic line representing the ventral margins of the sternbrae, as well as the distance between skin surface and hypoechoic zone (cartilage) ventral to the bony sternbrae (Fig. 1b, arrows) were measured on the ultrasonograms (Fig. 1b). Hypodermic injection-needles with a diameter of 22G were used to mark the positions of sternbrae 4 and 5, i.e. their cranio-caudal extensions and the median plane (Fig. 2). After a stab incision of the skin above, the centre of sternbrae 4 and 5 with a No. 11 scalpel blade (Helmut Zepf

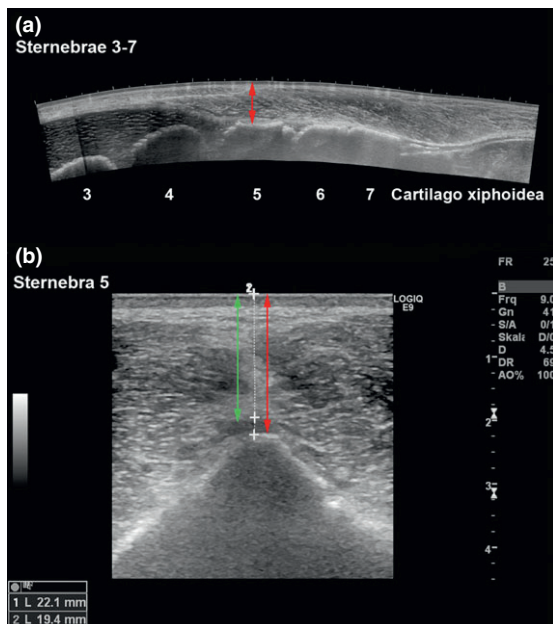


Fig. 1 Ultrasonograms of the equine sternum, horse 18 (Mare, 5 years). (a) Longitudinal panoramic image (LOGIQview function). The ventral bony margins of the sternebrae 3–7 are clearly visible. The red arrow indicates the distance between sternebrae 5 (ventral bony margin) and the skin. (b): Transverse B-mode image of sternebra 5. Skin-to-cartilage distance (green double arrow, 19.4 mm) and skin-to-bone distance (red double arrow, 22.1 mm).

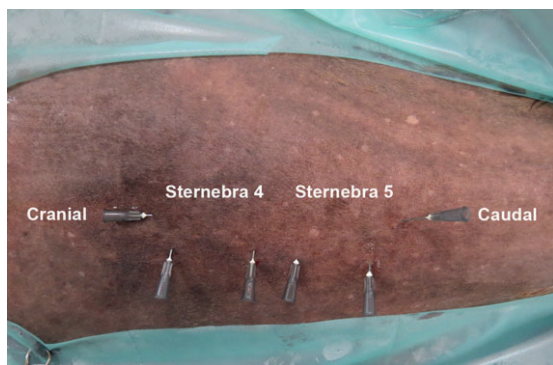


Fig. 2 Ventral view of the sternal region, horse 13 (mare, 23 years). The median plane of the sternum and the cranial and caudal borders of sternebrae 4 and 5 were identified by ultrasonography and marked with hypodermic needles.

Medizintechnik GmbH, Seitingen-Oberflacht, Germany), a Jamshidi needle (11 gauge \times 100 mm, Fa. Angiotech, Gainesville, FL, USA) was introduced through the stab incision until a resistance (ventral margin of the sternebra) was encountered. Then

the distance from the skin to the ventral margin of the sternebra was marked on the Jamshidi needle using a sterile marker pen (Kearing, Shanghai Kearing Stationary Co., Ltd.). Additionally, the Jamshidi needle was marked for an intended sternal insertion depth of 10 and 30 mm. Subsequently, the Jamshidi needle was introduced in the median plane of the respective sternebra with rotating movements. In each horse, bone marrow aspirates were taken from sternebrae 4 and 5 at an intraosseous insertion depth of either 10 mm (six horses) or 30 mm (six horses). In each group (10 mm insertion depth and 30 mm insertion depth), three horses were sampled, aspirating 5 mL bone marrow from sternebra 4 and 10 mL from sternebra 5; the remaining three horses were sampled, aspirating 10 mL bone marrow from sternebra 4 and 5 mL from sternebra 5. Then bone marrow was collected in a 20 mL syringe (filled with 0.1 mL/5 mL heparin; Heparin-calcium-12500-ratiopharm[®], 12500 I.U., Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) and transported in a refrigerated box to the laboratory. After surgery, horses were euthanized under general anaesthesia by intravenous injection of 70 mg/kg bodyweight pentobarbital.

Clinical computed tomography (cCT) and micro computed tomography (μ CT)

The sternum of each horse was removed after euthanasia at the ventral third of the costal cartilage using a reciprocating saw (EFA 61, EFA Schmid & Wezel GmbH & Co. KG, Maulbronn, Germany). By use of a clinical CT (BrillianceTM CT – Big Bore Oncology Scanner, Philips Medical Systems, Best, Netherlands) each sternum was scanned as described previously (Eydt *et al.* 2014). Additionally, μ CT images (XTremeCT, Scanco Medical AG, Brüttisellen, Switzerland) were generated to visualize the bony architecture of sternebrae 4 and 5 and the effects of the puncture procedure (Fig. 3).

Morphometric measurements were taken by using the computer program AMIRA (version 5.2.0, Visualization Sciences Group, Merignac Cedex, Frankreich) as described previously (Eydt *et al.*

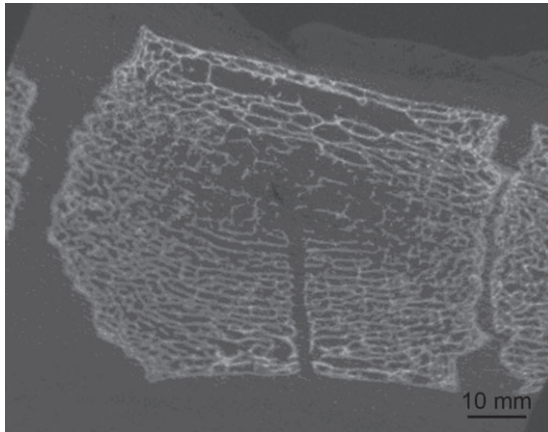


Fig. 3 Sternebra 5 after bone marrow aspiration. μ CT image, longitudinal plane. The puncture canal within the bony, trabecular meshwork is clearly visible. No damage or fractures of the bony trabeculae are evident.

2014). The following measurements were recorded (Fig. 4):

1. ventro-dorsal distance from the surface of the skin to the bony sternebra
2. thickness of the cartilage at the ventral margin of the sternebra
3. distance from the bony ventral margin to the centre of the sternebra
4. length of the puncture canal.

Isolation and culture of mononuclear cells (MNCs)

Bone marrow aspirates (sternebrae 4 or 5, 5 or 10 mL, from 10 or 30 mm sternal insertion depth) were transferred from the collecting syringes to sterile 50 mL plastic tubes (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany) and stored at 4°C for 24 h to allow sedimentation. After centrifugation (1000g, 15 min) the plasma layer was removed. Subsequently, the remaining cell-rich layer was divided into two portions and mixed with 10 mL culture medium (CM) containing 88% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, gibco[®], life technologies GmbH, Darmstadt, Germany), 1% penicillin-streptomycin (10 000 U/mL, gibco[®], life technologies GmbH, Darmstadt, Germany) and 1% MEM NEAA (MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 100x, gibco[®], life technologies GmbH, Darmstadt, Germany). The CM was supplemented with either 10% fetal calf serum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) or with 10% autologous serum (AS). Erythrocytes were removed using a cell strainer (70 μ m, BD Falcon[™], BD Bioscience, Durham, NC, USA). MNCs were isolated by density-gradient centrifugation using Easycoll[®] (Biochrom AG, Berlin, Germany, 1.086 g/mL) in a mixture of 1:1 by volume. After washing with phosphate-buffered

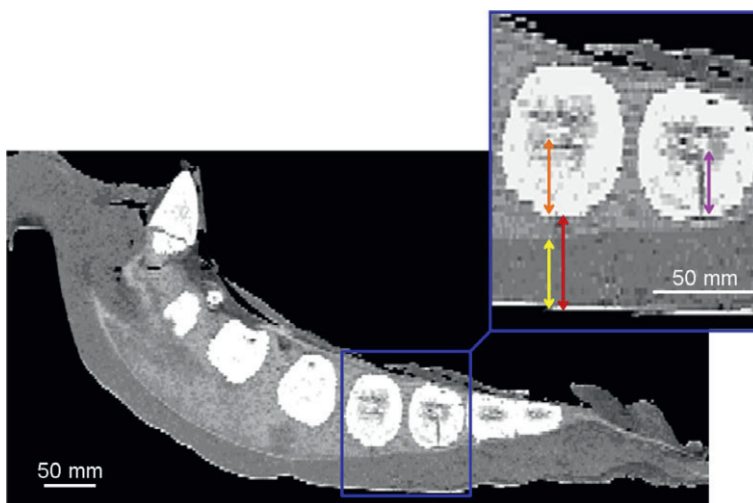


Fig. 4 Equine sternum, clinical CT images, resolution (1024 \times 1024 pixel), horse 7 (gelding, 3 years). For the CT scan, the sternum was placed ventral side up to prevent impression of the skin. Sternebrae 4 and 5 are enlarged (blue inset) to visualize performed measurement procedure. Orange arrow: distance from the bony ventral margin to the centre of the sternebra. Red arrow: Distance from skin to the bony margin of the sternebra. Yellow arrow: ventral-to-dorsal thickness of the cartilage at the ventral aspect of the sternebra. Purple arrow: length of the intraosseous puncture canal.

saline (PBS, gibco[®], life technologies GmbH, Darmstadt, Germany) and centrifugation at 250g for 5 min, cells were resuspended in CM. The cells were plated in 2500 mm² cell culture flasks and incubated at 37°C and 5% CO₂. Media were changed 24 h after seeding and then every second day until the cells achieved 80% confluence. Culture characteristics (size, shape and alignment of cells) were assessed by inverted light microscopy. The time until 80% confluence was reached was recorded and cells were trypsinized (0.05% Trypsin-EDTA (1x), gibco[®], life technologies GmbH, Darmstadt, Germany) and reseeded at different densities according to experiments described in the following. Therefore, FCS cultivated cells were divided into two parts. Cells were either further cultivated using 10% FCS or were cultivated using 10% standardized horse serum (SHS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). The content of SHS was gradually increased over two steps of medium change. Cells that were initially expanded using CM supplemented with 10% AS were further cultivated, using 10% AS.

Colony-forming unit (CFU) assay

CFU assays were performed at passage 2 in a 12 well cell culture plate (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). MSCs (supplemented with FCS, SHS or AS) were plated at 1, 2, 4 and 8 cells/100 mm². Culture medium was replaced every second day. After 14 days of culture, adherent cells were washed in PBS, fixed and stained with 1% cresyl violet in 100% methanol. Cell colonies containing more than 20 cells were counted. Calculation of the

CFU efficiency was performed according to the formula: CFU efficiency (%) = (counted CFU / cells originally seeded) × 100.

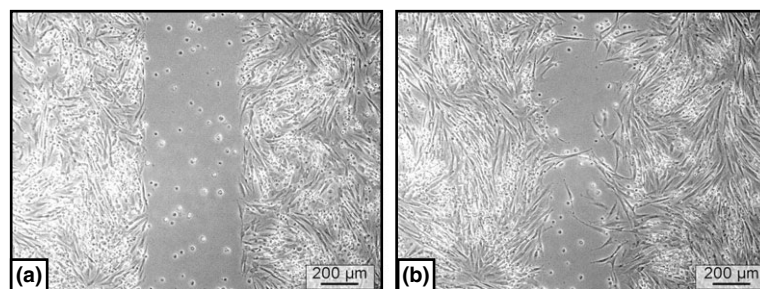
Scratch assay (Wound healing assay)

Scratch assays were performed at passage 2 in a 6-well cell culture plate (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) to which a sterile culture insert (ibidi GmbH, Martinsried, Germany) was added. A 500-µm thick wall separated each culture into two 70 µL cell culture reservoirs. MSCs (supplemented with FCS, SHS or AS) were plated at a density of 30 000 cells/70 µL well and cells were cultivated for 24 h at 37°C and 5% CO₂. Subsequently, the culture insert was removed creating a cell-free gap. Cells were further cultivated in a life cell imaging system (Cell Observer[®] Systems, Zeiss MicroImaging). Cell-migration and cell-proliferation was continuously recorded for 24 h with the computer program Axio Vision. Finally, the gap area overgrown by cells was determined using the picture processing software Photoshop (Adobe Photoshop, CS3; Fig. 5).

Statistics

Differences between FCS, AS and SHS were calculated by one-way analysis of variance with repeated measurements and post hoc Tukey test both in scratch-assay as well as in CFU assay. Resulting *P*-values of *P* < 0.05 were considered as statistically significant. All analyses were performed with the statistics program SAS (version 9.3; SAS Institute, Cary, NC, USA).

Fig. 5 Cultured equine bone marrow MSCs, scratch-assay. (a) A standardized gap was created. (b) After 24 h, a certain amount of the gap area was re-occupied by cells. The movement of the cells was recorded by a life cell imaging microscopy.





Results

Bone marrow aspiration

The ventral contour of each sternebra could be clearly detected during ultrasonography (Fig. 1), which allowed determination of the distance between the skin surface and the ventral bony margin of the sternebrae. The mean distance between skin and sternebra measured 26.4 ± 6.4 mm for sternebra 4 and 29.6 ± 7.8 mm for sternebra 5. The use of injection needles to indicate the positions of sternebrae 4 and 5 (Fig. 2) resulted in a correct positioning of the Jamshidi needle to aspirate bone marrow from a sternal insertion depth of 10 mm or 30 mm.

In both, sternebra 4 and sternebra 5, bone marrow aspiration was always feasible at a calculated sternal insertion depth of 30 mm. In sternebra 5, bone marrow aspiration was also feasible at a calculated sternal insertion depth of 10 mm. In sternebra 4, bone marrow aspiration from 10 mm insertion depth was successful in only 2 out of 12 cases.

Depth of the puncture canal

The skin-sternebra distances determined by measurements on cCT images were compared to ultrasonographic measurements. Distances determined by ultrasonography were constantly shorter, for sternebra 4 (6.3 ± 5.8 mm) and for sternebra 5 (8.9 ± 4.5 mm). The sternal insertion depth calculated during bone marrow aspiration and the actual insertion depth measured on cCT images differed constantly. For sternebra 4, the calculated insertion depth was in almost all cases underestimated by approximately 9.0 ± 5.5 mm. For sternebra 5, the calculated insertion depth was also constantly underestimated, but by approximately 2.9 ± 2.0 mm. The puncture canal deviated from an exact ventro-dorsal orientation in the median plane but was always placed within the sternebrae.

Measurements of sternebrae 4 and 5

The geometrical centres of the sternebrae were placed at 32.2 ± 3.3 mm (sternebra 4) and 27.3 ± 3.7 mm (sternebra 5) dorsal to the ventral

bony margin of the sternebrae. In each sternebra, a centre zone composed of thin and loosely arranged bony trabeculae was visible in μ CT images. This centre zone was always reached with the bone marrow aspiration canula when a 30 mm sternal insertion depth was intended (Fig. 3 and Fig. 4). The thickness of the ventral cartilage, measured on cCT images was 12.0 ± 5.0 mm (sternebra 4) and 6.6 ± 2.3 mm (sternebra 5). The μ CT images always showed a clearly defined puncture canal (Fig. 3). The bony trabeculae lining the puncture canal did not present any signs of fractures or damage. The same applied for the area surrounding the dorsal end of the puncture canal, which was the supposed area of bone marrow aspiration (Fig. 3).

Cultivation of MNCs obtained from sternal bone marrow aspirates

Regardless of the sampling site (sternebra 4 or 5), of the sampling technique (aspiration from 10 mm or 30 mm intraosseous depth) and of the aspirated volume of bone marrow (5 mL or 10 mL), from all bone marrow aspirates MNCs were successfully isolated by density gradient centrifugation. Subsequently cultured MNCs gave rise to plastic adherent cell colonies, with self-renewal capacities and fibroblast morphology (spindle shaped, homogenous size and parallel cell alignment). Mean culture time until 80% subconfluence for cell cultures supplemented with AS was 14 ± 5 days, cell cultures supplemented with FCS reached 80% subconfluence after 16 ± 6 days. In two cases, cultivation of cells in the presence of AS was not successful.

Colony-forming unit assays

Self-renewal capacity and therefore formation of new cell colonies was obtained in all experimental cell cultures independent from the supplemented serum (FCS, AS or SHS). Cells cultured in the presence of SHS possessed a significant lower self-renewal capacity ($66.3\% \pm 17.1\%$) compared to cells cultured in the presence of FCS ($99.4\% \pm 40.2\%$, $P < 0.0217$). There was no difference in self-renewal capacity between cells cultured

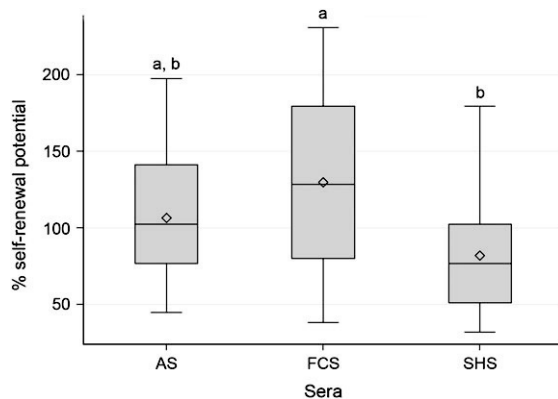


Fig. 6 Efficiency for self-renewal assessed by rate of colony formation in Colony-forming unit (CFU)-F assays (culture time 14 days, cresyl violet staining). Significant differences were denoted by a and b ($P < 0.0217$). Differences between cells cultured in SHS and FCS were statistically significant. Box: interquartile range (25%, 75%), horizontal line: median, rectangle: mean, whiskers: range (5%, 95%).

with FCS and AS and between cells cultured with AS and SHS (Fig. 6).

Scratch-assay

All cultures contained cells exhibiting the capacity for cell-migration, independent from the supplemented serum (FCS, AS or SHS). Migrating cells showed typical morphological characteristics, e.g. asymmetric cell shape with protrusion of lamellipodia. Actual cellular movement was clearly visualized by life cell imaging. Created gaps in the culture dishes became re-occupied by cells. This process was mainly facilitated by cell proliferation rather than by cell migration. 24 h after gap formation, cells cultured in FCS re-occupied $31.1\% \pm 12.8\%$ of the gap area. Cells cultured in AS re-occupied $27.5\% \pm 13.2\%$ and cultures supplemented with AS re-occupied $21.7\% \pm 5.7\%$. Statistical analyses did not reveal any significant difference, all $P > 0.05$ (Fig. 7).

Discussion

The anatomical characteristics of the equine sternum were evaluated with special regard to the procedure of sternal bone marrow aspiration by use of a Jamshidi needle set. Reported cases of failed sternal

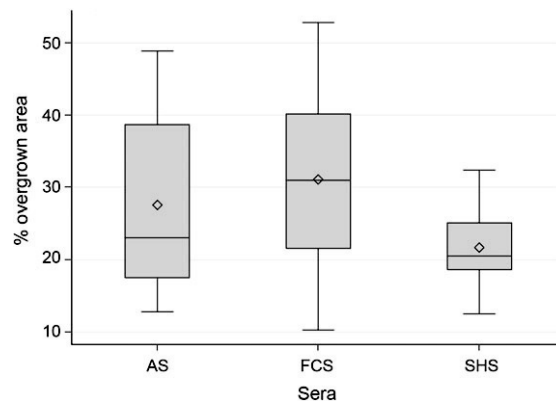


Fig. 7 Efficiency of cell migration and cell proliferation assessed by 24 h scratch assays (width of scratch: $500 \mu\text{m}$). No statistical differences between cells cultured in autologous serum (AS), FCS and SHS were detected, all $P > 0.05$. Box: interquartile range (25%, 75%), horizontal line: median, rectangle: mean, whiskers: range (5%, 95%).

punctures with fatal consequences demonstrated the potential risks that are associated with this method (Jacobs *et al.* 1983; Durando *et al.* 2006). Fatal inadvertent thoracocentesis results from a complete penetration of the sternum due to overestimated sizes of the sternbrae or due to improper direction of the instruments. In order to provide a morphological basis for a safe and efficient bone marrow aspiration technique, the dimensions, shapes and internal structures of the sternum and its sternbrae were examined in previous studies (Kasashima *et al.* 2011; Eydt *et al.* 2014). The data presented here provide additional information concerning the maximum harvest of MNCs by use of an optimal and safe puncture technique. Previous recommendations for a maximal puncture depth of 10–30 mm for sternbra 5 were not confirmed by our data. As, the ventro-dorsal dimension of sternbra 5 measures 52 ± 0.8 mm a deeper puncture than 30 mm into this sternbra does not increase the risk of thoracic puncture if performed perpendicularly to the ventral margin of the sternbra. However, there is no need to aspirate bone marrow from areas deeper than 10 mm. Moreover, bone marrow from sternbra 5 from 10 mm depth always contained a sufficient number of vital MNCs to produce proliferative MSC cultures *in vitro*. In contrast, bone marrow yield from sternbra 4 from 10 mm depth appeared to be insufficient



to produce MSC cultures. These differing results between sternebra 4 and 5 are likely due to a thicker coverage of cartilage at the ventral margin of sternebra 4 compared to a thin cartilage coverage at the ventral margin of sternebra 5. The thick cartilage layer at sternebra 4 may impede the correct determination of the distance between the skin and the bony part of the sternebra during ultrasonography. Moreover, it is more difficult to predict in advance, using ultrasonography, the point at which the needle encounters resistance and may occur before the bone of the sternebra. Nevertheless, bone marrow aspiration from 30 mm insertion depth appeared always as safe and successful in terms of MSC cultivation in both, sternebra 4 and 5.

The analysed μ CT data demonstrated that the insertion of the Jamshidi needle (10 or 30 mm) causes no significant destruction of the bony trabecular meshwork. This observation is consistent with results that demonstrated only minimal histological destruction of bony trabeculae after sternal bone marrow aspiration (Kasashima *et al.* 2011). However, although the bony structures remain largely intact after bone marrow aspiration it is unknown whether the microenvironment, relevant for the re-migration and homing of bone marrow stem cells, regenerates sufficiently.

The identification of the optimal puncture site for bone marrow aspiration differs considerably among various clinical descriptions. Some authors located the insertion site for the Jamshidi needle using particular anatomical landmarks: cartilage of the xyphoid (Richardson *et al.* 1986; Kisiday *et al.* 2013) or the olecranon tuber (Sellon 2006; Goodrich *et al.* 2008; Adams *et al.* 2012; Dellling *et al.* 2012) in combination with given distances, such as 90–100 mm cranial the cartilago xyphoidea or a hand caudal the olecranon tuber. In contrast, other authors recommend the identification of the sternebrae by ultrasonography as the safest method to determine the insertion site (Smith *et al.* 2003; Arnhold *et al.* 2007; Kasashima *et al.* 2011; Godwin *et al.* 2012). The latter recommendation has been supported by our results. Due to the spherical shape of sternebra 4 and 5 it is important to determine the exact position of the central aspect of the sternebrae to ensure an

optimal insertion of the aspiration needle. Significant deviations of the needle position from the centre of the sternebra increase the risk of fatal thoraco- and pericardiocentesis and hamper a sufficient harvest of bone marrow. In this investigation, ultrasonography was a reliable technique to identify the individual sternebrae and to determine distances between skin and ventral margin of the sternebrae with an acceptable accuracy. Differences between ultrasonographic and cCT measurements of the skin to bone distance may be explained by the fact that ultrasonography was performed after the sternebrae with overlying tissues had been isolated and frozen. Consequently potential explanations for the increased thickness during cCT may be (1) slight inevitable indentation of the body surface by the ultrasound probe, (2) increase in tissue thickness by contraction of muscles and skin after isolation of sterna, (3) distension of soft tissue by the process of freezing.

In terms of efficiency of *in vitro* cultivation and expansion of bone marrow derived MSCs, no difference was detected for bone marrow aspirates of 5 and 10 mL. This finding is in line with results presented by Kisiday *et al.* 2013. These authors detected similar numbers of MSCs between the first 5 mL of bone marrow aspirate and the second sequential 5 mL of aspirate, but both were significantly greater than the 50 mL fraction. As expected, bone marrow aspirates from sternebra 4 and sternebra 5 did not show differences concerning the efficiency of MSC cultivation. However, due to morphological characteristics sternebra 5 appears most suitable for bone marrow aspiration (as described above).

The cultivation of MSCs was successful with all used media (Cultivation medium supplemented with either FCS, AS or SHS). However, in two cases, cultivation of MSCs in presence of autologous serum failed. This unwanted outcome indicates the risks and disadvantages that are associated with the use of autologous serum. The quality of autologous serum in terms of the content of beneficial substances, e.g. growth factors, and in terms of the presence of potential pathogens is highly variable amongst individuals (Erickson *et al.* 1991; Nimura *et al.* 2008; Tekkatte *et al.* 2011). These general disadvantageous of autologous serum are reflected by several cell

culture experiments that demonstrated superior culture outcomes in the presence of FCS compared to AS (Kuznetsov *et al.* 2000; Nimura *et al.* 2008). Those observations are consistent with the results from our study. Although a generalization from our experimental setting is debatable, FCS appeared to be the most suitable serum for the *in vitro* culture and expansion of equine bone marrow derived MSCs. FCS was even superior compared to SHS, which was suggested to combine the advantageous of a standardized serum and of an allogenic serum (derived from same species). MSCs that were cultured in SHS for the experiments were initially isolated and expanded in the presence of FCS. Thus, the cells were gradually accustomed to SHS, a procedure which might have caused suboptimal culture conditions. Nevertheless, our results are confirmed by investigations on primary equine bronchial fibroblasts (Franke *et al.* 2014). Equine bronchial fibroblasts cultured in SHS had a longer confluence and doubling time and a limited proliferation rate compared to cells cultured in the presence of FCS. Although the cells investigated by Franke *et al.* (2014, equine bronchial fibroblasts) and the cells we used (equine bone marrow derived MSCs) are of different origin, both cell types are fibroblastic cells. While it has been shown that FCS promotes *in vitro* proliferation of equine fibroblastic cells (Franke *et al.* 2014), other cell types, such as neuronal cells, proliferate preferentially in media containing SHS (Franke *et al.* 2014). These findings suggest a complex interaction between particular serum components, independent from the donor species, and cell type specific requirements. To establish an optimal serum supplementation the cultured cell type and the intended cellular processes should be considered.

Conclusion

Sternebra 5 appears to be the most suitable site for the harvest of equine bone marrow. Localization of the puncture site by use of ultrasonography is recommended to minimize risks and to optimize bone marrow aspiration. An intraosseous puncture depth of only 10 mm guarantees harvest of bone marrow containing vital MNCs for *in vitro* cultivation and

expansion of equine bone marrow MSCs. Best MSCs culture characteristics were observed in the presence of culture medium supplemented with FCS.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Klaus Hopster, Dipl. ECVA, for performing general anaesthesia and Dr. Maren Hellige for her support during cCT imaging, Melanie Kielhorn for her assistance during μ CT imaging, Oliver Stünkel for his technical assistance, Dr. Patricia Schrock for her support with AMIRA and Dr. Anja Lang for her support with Photoshop. This work was supported by a grant from the Federal Ministry for Economic Affairs and Energy, AiF Project GmbH. The authors thank Mrs. F. Sherwood-Brock for proofreading the manuscript.

Source of funding

This work was supported by a grant from the Federal Ministry for Economic Affairs and Energy, AiF Project GmbH, KF2994201AJ2.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Contributions

CE designed the study, collected and processed the specimens, assembled and analyzed the data, drafted and wrote the manuscript. FG contributed to the study design, helped to collect the specimens and helped to evaluate the data. CSch contributed to the study design, helped to collect and process the specimens, contributed to data analysis and interpretation, helped with editing and revision of the manuscript. NH helped to process the specimens, contributed to data analysis and interpretation. KR contributed to data analysis. CP contributed to the study design, helped with the assembling and analysis of data, helped with editing and revision of the manuscript and obtained the funding. CSt contributed to the study design, helped with the collection



and processing of the specimens, helped with the assembling and analysis of data, helped with editing and revision of the manuscript and obtained the funding. All authors read and approved the final manuscript.

References

- Adams M.K., Goodrich L.R., Rao S., Olea-Popelka F., Phillips N., Kisiday J.D. & McIlwraith C.W. (2012) Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: are there differences?. *Equine Veterinary Journal* **45**, 372–375.
- Arnhold S.J., Goletz I., Klein H., Stumpf G., Beluche L.A., Rohde C. et al. (2007) Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research* **68**, 1095–1105.
- Bourzac C., Smith L.C., Vincent P., Beauchamp G., Lavoie J.-P. & Laverty S. (2010) Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Veterinary Journal* **42**, 519–527.
- Brems R., Jebe E.C. (2008) Comparison of treatments with autolog; cultured stem cells from adipose tissue or bone marrow. *WEVA Proceedings* 523.
- Delling U., Lindner K., Ribitsch I., Jülke H. & Brehm W. (2012) Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Canadian Journal of Veterinary Research= Revue Canadienne de Recherche Veterinaire* **76**, 52–56.
- Désévaux C., Laverty S. & Doizé B. (2000) Sternal bone biopsy in standing horses. *Veterinary Surgery* **29**, 303–308.
- Durando M.M., Zaruco L., Schaer T.P., Ross M. & Reef V.B. (2006) Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine Veterinary Education* **18**, 75–79.
- Erickson G.A., Bolin S.R. & Landgraf J.G. (1991) Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. *Developments in Biological Standardization* **75**, 173–175.
- Eydt C., Schröck C., Geburek F., Rohn K., Staszky C. & Pfarrer C. (2014) Three-dimensional anatomy of the equine sternum. *Anatomia Histologia and Embryologia* **44**, 99–106.
- Fortier L.A. & Smith R.K. (2008) Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *The Veterinary Clinics of North America Equine Practice* **24**, 191–201.
- Frank C., McDonald D. & Shrive N. (1997) Collagen fibril diameters in the rabbit medial collateral ligament scar: a longer term assessment. *Connective Tissue Research* **36**, 261–269.
- Franke J., Abs V., Zizzadoro C. & Abraham G. (2014) Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. *BMC Vet Res* **10**, 119. doi:10.1186/1746-6148-10-119.
- Garvican E.R., Dudhia J., Alves A.-L., Clements L.E., Du Plessis F. & Smith R.K.W. (2014) Mesenchymal stem cells modulate release of matrix proteins from tendon surfaces *in vitro*: a potential beneficial therapeutic effect. *Regenerative Medicine* **5**, 295–308.
- Godwin E.E., Young N.J., Dudhia J., Beamish C. & Smith R.K.W. (2012) Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal* **44**, 25–32.
- Goodrich L.R., Frisbie D.D. & Kisiday J.D. (2008) How to harvest bone marrow derived mesenchymal stem cells for expansion and injection. *AAEP Proceedings* **54**, 252–257.
- Jacobs R.M., Kociba G.J. & Ruoff W.W. (1983) Monoclonal gammopathy in a horse with defective hemostasis. *Veterinary Pathology* **20**, 643–647.
- Kajikawa Y., Morihara T., Watanabe N., Sakamoto H., Matsuda K., Konayashi M. et al. (2007) GFP chimeric models exhibited a biphasic pattern of mesenchymal cell invasion in tendon healing. *Journal of Cellular Physiology* **210**, 684–691.
- Kasashima Y., Ueno T., Tomita A., Goodship A.E. & Smith R.K.W. (2011) Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Veterinary Journal* **43**, 288–294.
- Kisiday J.D., Goodrich L.R., McIlwraith C.W. & Frisbie D.D. (2013) Effects of equine bone marrow aspirate volume on isolation, proliferation, and differentiation potential of mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research* **74**, 801–807.
- Kuznetsov S.A., Mankani M.H. & Robey P.G. (2000) Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and *in vivo* bone formation. *Transplantation* **70**, 1780–1787.
- Nimura A., Muneta T., Koga H., Mochizuki T., Suzuki K., Makino H. et al. (2008) Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis and Rheumatism* **58**, 501–510.
- Reed S. & Leahy E.R. (2013) Stem cell therapy in equine tendon injury. *Journal of Animal Science* **91**, 59–65.
- Richardson G.L., Pool R.R., Pascoeand J.R. & Wheat J.D. (1986) Autogenous cancellous bone grafts from the sternum in horses. *Veterinary Surgery* **15**, 9–15.



- Russell K., Sellon D.C. & Grindem C.B. (1994) Bone marrow in horses: indications, sample handling, and complications. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian (USA)* **16**, 1359–1365.
- Schnabel L., Fortier L.A., McIlwraith C.W. & Nobert K.M. (2013) Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when? *Veterinary Journal* **197**, 570–577.
- Sellon D.C. (2006) 2006: how to sample a diagnostic bone marrow sample from the sternum of an adult horse. *AAEP Proceedings* **52**, 621–625.
- Smith R.K. (2008) Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disability and Rehabilitation* **30**, 1752–1758.
- Smith R.K., Korda M., Blunn G.W. & Goodship A.E. (2003) Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Veterinary Journal* **35**, 99–102.
- Smith R.K., Werling N.J., Dakin G., Alam R., Goodship A.E. & Dudhia J. (2013) Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *PLoS ONE* **8**(9), e75697.
- Smith R.K., Garvican E.R. & Fortier L.A. (2014) The current “state of play” of regenerative medicine in horses: what the horse can tell the human. *Regenerative Medicine* **9**, 673–685.
- Spaas J.H., De Schauwer C., Cornillie P., Meyer E., Van Soom A., Van de Walle G.R. (2012) Culture and characterization of equine peripheral blood mesenchymal stromal cells. *The Veterinary Journal* **195**, 107–113.
- Tekkotte C., Gunasingh G.P., Cherian K.M., Sankaranarayanan K. (2011) Humanized stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells International* **2011**, 504723.



13.5 Publikation 5

Hauschild, G.* , **Geburek, F***. Gosheger, G., Eveslage, M., Serrano, D., Streitbürger, A., Johannlükens, S., Menzel, D., Mischke, R.

Short term storage stability at room temperature of two different platelet-rich plasma preparations from equine donors and potential impact on growth factor concentrations.

BMC Vet. Res. 2017, 5. Jan.; 13 (1): 7.

*Geteilte Erstautorenschaft / Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit




RESEARCH ARTICLE

Open Access



Short term storage stability at room temperature of two different platelet-rich plasma preparations from equine donors and potential impact on growth factor concentrations

Gregor Hauschild^{1*†} , Florian Geburek^{2†}, Georg Gosheger¹, Maria Eveslage⁴, Daniela Serrano¹, Arne Streitbürger¹, Sara Johannlüken², Dirk Menzel³ and Reinhard Mischke³

Abstract

Background: The increasing interest in platelet-rich plasma (PRP) based therapies is as yet accompanied by inconsistent information regarding nearly all aspects of handling and application. Among these storage stability of processed platelet-rich products may be the basis for a more flexible application mode. The objective of this study was (1) to estimate the storage stability of growth factors platelet derived growth factor BB (PDGF-BB) and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) in both, a single-step softspin centrifugation-based pure-PRP (P-PRP, ACP[®]), and a gravity filtration system-based leukocyte-rich-PRP (L-PRP, E-PET), over a six hours time span after preparation at room temperature and (2) to identify possible factors influencing these growth factor concentrations in an equine model.

Results: Growth factor concentrations remained stable over the entire investigation period in L-PRP as well as P-PRP preparations revealing a mean of 3569 pg/ml PDGF-BB for E-PET and means of 1276 pg/ml PDGF-BB and 5086 pg/ml TGF- β 1 for ACP[®]. Pearson correlations yielded no significant impact of whole blood platelet (PLT), white blood cell (WBC) and red blood cell (RBC) counts on resulting cytokine values. In case of ACP[®] no significant dependencies between PLT, WBC and RBC counts of the processed platelet-rich product and resulting cytokine content occurred with exception of TGF- β 1 concentrations showing a strong correlation with the WBC content. PDGF-BB content of E-PET preparations showed a strong positive correlation with PLT and a strong negative with WBC of these preparations but not with RBC.

Conclusions: L-PRP ad modum E-PET and P-PRP ad modum ACP[®] are applicable over at least a six hours time span at room temperature without loss of growth factor content. Based on the results of this study factors influencing the resulting growth factor concentrations still remain questionable. Additional studies implicating a further standardization of preparation protocols are necessary to identify consistent impact on cytokine content after PRP processing.

Keywords: Regenerative medicine, Platelet-rich plasma, Platelet-derived growth factor-BB, Transforming growth factor β 1, Storage time, Applicability

* Correspondence: Gregor.Hauschild@ukmuenster.de

†Equal contributors

¹Department of Orthopedics and Tumororthopedics, University Hospital of Muenster, Albert-Schweitzer-Campus 1, 48149 Muenster, Germany
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



Background

Platelet-rich plasma (PRP) – currently defined as a volume of the plasma fraction of autologous blood with concentrations of platelets above baseline values [1–3] – is being widely used as a factor-based approach in regenerative medicine. Since the late 1980s in fields including but not limited to cardiac surgery, wound care and plastic surgery, maxillofacial surgery and dentistry application of PRP-preparations has been evaluated and documented in numerous case-reports, clinical trials and experimental studies. In addition, over the last decade PRP-based therapies of musculoskeletal diseases, such as tendon and ligament lesions, muscle tears and muscle strain lesions [4], bone and cartilage lesions [5] as well as osteoarthritis [6], have been focus of special interest. Despite the large amount of data generated by experimental and clinical implementation of this approach in human and, to a lesser degree, in veterinary medicine, there is still a severe lack of evidence and consistency in all aspects, including preparation protocols, nomenclature, dynamics and kinetics of released growth factors and other cytokines, application protocols and others. With regard to human medicine literature challenges to be addressed include among others the complete characterization of the individual products and their released structures, determination of intra-individual impact on platelet-rich preparations' efficiency and the development of novel interactions with biomaterials to expand the range of application [7]. Engebretsen and colleagues emphasized in an IOC (International Olympic Committee) consensus paper [8] the paucity of high-level clinical trials on application of PRP in human sports medicine in addition to very limited basic science data on the influence of PRP on the inflammation and repair of connective tissue and skeletal muscle. This is underlined by a lack of current industry consensus concerning dosage protocols [8, 9]. The fact that each of a multitude of different preparation techniques and protocols leads to a product with different biological properties and potential application fields [10, 11] makes it very difficult for both clinicians and scientists to choose the appropriate handling during preparation and application in their specific entity [12]. Thus, usage of three different devices for processing buffy coat PRP after obtaining whole blood from human donors revealed significantly different platelet content ranging from 2.6 to 5.6 fold concentration compared to baseline values and significantly different growth factor levels [13]. With regard to veterinary literature platelet concentrations obtained from equine donors and following a buffy coat method protocol were 8.9 fold higher than baseline concentrations [14]. Compared to whole blood platelet concentrates obtained from equine donors and processed by a double centrifugation tube method contained 1,21 to

1,7 fold higher platelet concentrations [15]. However PRP obtained from canine donors and processed by a double centrifugation tube method revealed platelet concentrations up to 4.9 fold higher than baseline values [16]. As far as growth factor content of the completed PRP-preparation is considered, critical for the intended enhancement of wound healing and regenerative capacities at site of the lesion, final concentrations at time of application are of particular interest. Early preparation protocols - such as PRGF® (Endoret® BTL, San Antonio, Spain) – have been intended for immediate use or usage within 30 min, respectively [10, 17], while recent studies on the biological stability of growth factor concentrations of preparations following this same basic protocol reveal a post-preparation stability at room temperature for 72 h [18]. For the single spin protocol of ACP® (Autologous Conditioned Plasma, Arthrex Vet Systems, Frechen, Germany) for example the manufacturers' reference advises usage within 30 min after preparation if waiving the addition of an anticoagulant is intended and within 4 h if it is not [19] while in case of E-PET the manufacturer recommends usage within 60 min.

Based on these inconsistencies regarding procedures and handling, the objective of this study was (1) to estimate the storage stability of growth factors PDGF-BB (platelet-derived growth factor-BB) and TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) in both, a single-step softspin centrifugation-based pure-PRP (ACP®), and a gravity filtration system-based leukocyte-rich-PRP (E-PET, Equine Platelet Enhancement Therapy, Pall GmbH, Dreieich, Germany) over a six hours time span after preparation at room temperature and (2) to identify possible factors that may influence the resulting growth factor concentrations in an equine model.

Methods

Animal experiments were conducted under an ethics committee (Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety) approved protocol in accordance with German federal animal welfare legislation (Az 33.14-42502-04-14/1547), which is in compliance with the guidelines outlined in the NRC Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All animals were from the ownership of and housed at the Clinic for Horses of the University of Veterinary Medicine, Hannover, Foundation, Germany. All procedures associated with the experimental animals were performed in this same facility.

Test animals

Fifteen warm-blood horses (six mares, four stallions and five geldings) free from clinical signs of disease with a mean age of 8, 6 years (range: 2–22 years) were included



in this study. Initial CBC data of these were within equine reference ranges given by the central laboratory.

Study design

The study followed a prospective non-randomized protocol including two different PRP-processing systems (ACP[®], E-PET) and one control group (physiological sodium chloride solution, NaCl). All measurements were carried out in a blinded fashion. As part of a superordinated experimental animal study, whole blood samples were taken from 15 adult horses (1) standing, non-sedated and (2) the following day under general anaesthesia to be intended for complete blood count (CBC).

Under this latter condition whole blood samples of these same 15 horses were obtained to prepare 15 doses of autologous conditioned plasma ad modum ACP[®]. In addition whole blood samples from ten of these same 15 test animals were obtained to produce 10 doses of PRP ad modum E-PET. Five samples of sterile sodium chloride (NaCl) solution (B. Braun Melsungen AG, Germany) served as control. Being part of a superordinated experimental animal study the number of ACP[®] and E-PET preparations processed – and thereby the resulting ratio of 15 to 10 PRP doses – was due to the requirements of the overall design.

Following preparation of PRP preparations from each donor, and after control doses of NaCl had been obtained, an 0.5 ml aliquot of each of these was transferred into 2 ml Eppendorf tubes (Eppendorf Safe-Lock tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and immediately intended for CBC. Further 0.5 ml aliquots were transferred into 2 ml cryopreservation tubes (CryoPure Röhren, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany), containing 10 I.E. Heparin (ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) and stored at room temperature.

Immediately (T_0) after preparation or obtaining, respectively and after a storage period at room temperature of 1 (T_1), 5 (T_5), 30 (T_{30}), 60 (T_{60}), 180 (T_{180}) and 360 (T_{360}) minutes these samples were snap-frozen in liquid-nitrogen (Air Liquide Deutschland GmbH, Kornwestheim, Germany) at -196° Celsius ($^\circ\text{C}$) to fix the respective sample status at the different points of time.

After storage at below -80° Celsius the samples of both PRP protocols and control were thawed in a single modus in a water bath at 37°C followed by measurement of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) and TGF- β 1 concentrations using ELISA-kits (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN; USA).

Anaesthesia and medication

After premedication with either 0.5 mg/kg xylazine (Xylavet[®], CP-Pharma, Burgdorf, Germany, IV) or 3.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dexmedetomidine (Dexdomitor[®], Zoetis, Berlin,

Germany) all horses were anaesthetized with 0.05 mg/kg midazolam (Midazolam-ratiopharm[®] 15 mg/3 ml, ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) and 2.2 mg/kg ketamine (Narketan[®], CP-Pharma, Burgdorf, Germany, IV). Anaesthesia was maintained with isoflurane (Isofluran[®] CP, CP-Pharma, Burgdorf, Germany) in 100% oxygen in combination with a constant rate infusion of 1 mg/kg/h xylazine or 7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ dexmedetomidine. intravenous fluids (lactated Ringer's solution, Ringer-Laktat-Lösung[®], B. Braun Melsungen AG, Germany) were administered at a rate of 10 ml/kg/h. Following induction of anaesthesia and tracheal intubation, the horses were positioned in dorsal recumbency and ventilated immediately. For ventilation a pressure limited and pressure cycled large animal ventilator (Vet.-Tec. Model LAVC 2000 J.D. Medical Distributing Company Phoenix, Phoenix, AZ, USA) was used. Horses were ventilated using intermittent positive pressure ventilation (IPPV) with peak inspiratory pressure of 25 cm H_2O . Respiratory rate (f_R) was adjusted to maintain PaCO_2 between 40 and 45 mmHg.

PRP preparation

Notwithstanding the application description for preparation of PRP ad modum ACP[®] we performed centrifugation at 1500 rpm (352 G) for 5 min but decided to waive the use of any anticoagulant in accordance to the manufacturers' reference regarding usage of ACP[®] within 30 min after blood collection. All other preparation steps strictly followed the manufacturers' application description.

Preparation of PRP ad modum E-PET strictly followed the instructions provided by the manufacturer including usage of ACD-A (acid-citrate-dextrose solution) as anticoagulant and 8 ml of a proprietary Harvest Solution for recovery of the platelets. Neither ACP[®] nor E-PET preparations underwent activation after processing.

Complete blood count

Haematological analysis of fresh ACP[®], E-PET and NaCl (control) aliquots were carried out using the ADVIA 120 haematology system (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany).

Polypeptide growth factor analysis

Double determining of the concentrations of PDGF-BB and TGF- β 1 was performed by ELISA (Human PDGF-BB Quantikine[®] SixPak and Human TGF- β 1 Quantikine[®] SixPak, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturers' instructions.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SAS[®] software, version 9.4, for Windows (SAS Institute, Cary, NC, USA).



Both for comparison with baseline values and for comparison of ACP[®] and E-PET, tests for paired data were applied since ACP[®] and E-PET-measurements were derived from the same animals. For comparison of variance, the absolute deviation from the mean was calculated, and groups were then compared using tests for paired data. Groups were compared using the two-sided Student's t-test for normally distributed data and the two-sided Wilcoxon test for non-normal data. Data was defined as normally distributed if $-1 \leq \text{skewness} \leq 1$. Correlation was calculated with the Pearson correlation coefficient. PDGF-BB and TGF- β 1 each were measured twice using an ELISA-kit as described above. The mean of the two measurements was used for analyses. To assess reliability of these measurements, intraclass correlations were computed [ICC(2, 1), ICC (2, k)].

All inferential statistics were intended to be exploratory (hypotheses generating), not confirmatory, and were interpreted accordingly. Therefore, no adjustment for multiple testing was applied. The local significance level was set to 0.05. No formal power evaluation was performed due to the explorative character of the study.

Results

Complete blood count of whole blood

Regardless of the conditions of sampling all values proved to be within the reference range of each parameter, but CBC data revealed lower concentrations ($p = 0.0098$) for PLT when taken under general anaesthesia (mean (M): $121 \times 10^3 / \mu\text{l}$, 95% confidence interval (CI) ranging from 101 to $141 \times 10^3 / \mu\text{l}$) compared to samples obtained from standing, non-sedated horses (M: $146 \times 10^3 / \mu\text{l}$, CI: 116 to $170 \times 10^3 / \mu\text{l}$). This was also true for WBC ($p < 0.0001$; M: $5.73 \times 10^3 / \mu\text{l}$, CI: 4.57 to $6.88 \times 10^3 / \mu\text{l}$) and RBC ($p = 0.0027$; M: $7.16 \times 10^6 / \mu\text{l}$, CI: 6.68 to 7.63).

Complete blood count of ACP and E-PET preparations

Both preparation protocols resulted in a significant increase of PLT values as compared to CBC data of whole blood samples obtained under general anaesthesia which was also true for WBC counts detected in E-PET samples but not for WBC and RBC in ACP[®] and RBC in E-PET.

A mean of 204×10^3 thrombocytes / μl ($n = 8$, CI: 175 to 233) represented a 1.7 fold concentration of PLT in ACP[®] compared to whole blood concentrations under general anaesthesia ($p = 0.0002$) while for E-PET a 2.7 fold concentration of thrombocytes ($n = 9$, M: $327 \times 10^3 / \mu\text{l}$, CI: 184 to 471) could be detected ($p = 0.01$). This difference between the preparations proved to be not significant ($p = 1$, $n = 5$). With a mean of 0.57×10^3 cells / μl ($n = 8$, CI: 0.35 to 0.80) ACP[®] preparations reached 9.94% of the WBC count of whole blood taken under general anaesthesia. This was significantly different from WBC counts

in E-PET ($p < 0.0001$) which revealed a 2.1 fold concentration ($n = 9$, M: 12.12×10^3 cells / μl , CI: 10.42 to 13.82). This was also true for RBC counts with a mean of $0.04 \times 10^6 / \mu\text{l}$ ($n = 8$, CI: 0.03 to 0.06) in ACP[®] preparations representing 0.5% of baseline counts compared to E-PET preparations ($n = 5$, $p > 0.0062$) with a mean RBC count of $4.34 \times 10^6 / \mu\text{l}$ ($n = 9$, CI: 3.19 to 5.49) which proved to be 60% RBC counts in whole blood under general anaesthesia. The higher level of statistical dispersion in E-PET data for all three parameters (PLT, WBC and RBC) when compared to ACP[®] preparations was underlined by lower standard deviation values for the latter as given in Table 1.

Quality of growth factor analysis

Growth factor analysis via ELISA showed a high reliability for both single measurements as well as mean values calculated from double determinations. Double determined PDGF-BB values of all samples revealed an intraclass correlation of 94% with a mean difference between both measurements of 18.95 pg/ml ($n = 152$), demonstrating the accuracy of the protocol used. This was also applicable to TGF- β 1 values which revealed an intraclass correlation of 89% and a mean difference between both measurements of 195.94 pg/ml ($n = 104$).

Growth factor content in PRP preparations

Higher PDGF-BB concentrations resulted from E-PET protocols when compared to ACP[®]. With a mean of

Table 1 PLT, WBC and RBC concentrations (mean \pm SD) in donor source and processed PRP preparations taken from equine donors

	Wb	Wba / Baseline	ACP [®]	E-PET
PLT				
n	15	15	8	9
Mean ($10^3/\mu\text{l}$)	143.53	121.33	204.25	327.78
SD	49.27	35.35	34.87	186.93
PWba (%)	-	-	168.34	270.15
WBC				
n	15	15	8	9
Mean ($10^3/\mu\text{l}$)	8.87	5.73	0.57	12.12
SD	2.48	2.08	0.27	2.21
PWba (%)	-	-	9.94	211.52
RBC				
n	15	15	8	9
Mean ($10^6/\mu\text{l}$)	8.16	7.16	0.04	4.34
SD	1.19	0.86	0.02	1.49
PWba (%)	-	-	0.56	60.61

Wb whole blood, wba whole blood under general anaesthesia, PWba mean percentage of cells calculated against whole blood under general anaesthesia (Baseline), PLT platelets, WBC white blood cells, RBC red blood cells



3569 pg/ml (CI: 2342 to 4797) PDGF-BB concentrations of E-PET exceeded 2.8 fold the mean concentration detected in ACP[®] samples (M: 1276 pg/ml, CI: 1104 to 1449). The higher statistical dispersion of E-PET-generated PDGF-BB data proved to be significant ($p = 0.03$).

TGF- β 1 concentrations (M: 5086 pg / ml, CI: 4554 to 5619) found in ACP[®] were not comparable to concentrations reached using E-PET due to technical limitations of the utilized ELISA-kit in this specific setting (Table 2). Following the manufacturers' instructions, E-PET samples, based on equine whole blood, strongly produced red-brown colored precipitates. This phenomenon was limited to E-PET preparations and did not occur in any other setting of this study. The resulting values – with exception of six data sets from test animal 1 and three data sets from test animal 4 - did not achieve the limit of detection (1248 pg/ml). With regard to these limitations the authors decided to exclude the complete TGF- β 1 data calculated for E-PET preparations.

Growth factor content over storage period

Both protocols revealed stable PDGF-BB concentrations for a period of 360 min after preparation (Fig. 1). This was also true for TGF- β 1 concentrations in ACP[®] (Fig. 2) but could not be proven for E-PET preparations due to the technical limitations mentioned above.

Mean deviations from the baseline of PDGF-BB concentrations in ACP[®] (1276 pg/ml), calculated for the different points in time at which samples were taken, ranged from -49 to 97 pg/ml without being significant. On no account was the baseline standard deviation value (285 pg/ml) reached. Calculations for E-PET concentrations of PDGF-BB revealed mean deviations from baseline (3569 pg/ml) ranging from -296 to 76 pg/ml which proved not to be significant. In this respect, again standard deviation value of baseline measurements (1597 pg/ml) was not reached.

This was also true for TGF- β 1 content of ACP[®] preparations showing mean deviations from baseline between -234 and 33 pg/ml calculated for the different sampling time points. This range also did not reach the standard deviation of baseline measurements (922 pg/ml).

Table 2 Concentrations of growth factors PDGF-BB and TGF- β 1 (mean \pm SD) in PRP preparations

	N = 13 ACP [®]	N = 9 E-PET
PDGF-BB (pg/ml)	1276.74 (\pm 285.41)	3569.82 (\pm 1597.23)
TGF- β 1 (pg/ml)	5086.98 (922.03)	n.m.

PDGF-BB platelet derived growth factor -BB, TGF- β 1 transforming growth factor β 1, n.m. not measured

Control

CBC values as well as growth factor content of physiological sodium chloride solution (control group) did not reach the limit of detection.

CBC and growth factor concentrations in relation to whole blood source

There was minor to no indication that CBC values in PRP preparations corresponded to data from whole blood taken under general anaesthesia. PLT and WBC counts in ACP[®] showed no significant correlations while RBC counts revealed a negative correlation ($r = -0.84$) which we found to be significant ($p = 0.007$). This was also true for haemoglobin and packed cell volume. In case of E-PET preparations no correlation of PLT counts to thrombocyte concentrations in the donor sample could be detected ($r = -0.01$, $p = 0.96$) while RBC values showed a moderate positive correlation with the donor concentrations ($r = 0.68$, $p = 0.04$) with significant RBC count correlations.

No correlations between evaluated cytokine concentrations and PLT, WBC and RBC counts of donor samples could be detected for ACP[®] preparations. This was also true for PDGF-BB concentrations in E-Pet.

Growth factor concentrations in relation to CBC of PRP preparation

In ACP[®] preparations no significant correlation between PDGF-BB concentrations and PLT, WBC and RBC counts became obvious. No correlation could be detected for TGF- β 1 values with regard to PLT and RBC counts, but a strong relationship to WBC counts was detected ($r = 0.79$, $p = 0.01$).

In contrast, PDGF-BB concentrations in E-PET strongly correlated with PLT counts of these preparations ($r = 0.84$, $p = 0.009$) which was not true for RBC values. Furthermore, a strong negative correlation with WBC values could be detected ($r = -0.74$) which proved to be significant ($p = 0.03$) (Table 3).

Discussion

The current study aimed to report on the short term stability of PDGF-BB and TGF- β 1 in PRP processed from whole blood of equine donors. The findings revealed stable concentrations of growth factors in both, pure PRP following the ACP[®] protocol (a plasma based tube method) as well as – in case of PDGF-BB - in leukocyte-rich PRP resulting from E-PET protocols (a gravity filtration method) at room temperature over a period of at least six hours after processing. This is in line with recent findings by Anitua and colleagues [18] who stated growth factor stability in eye drops generated by the PRGF/Endoret[®] protocol at room temperature over a 72 h time span for a variety of different cytokines

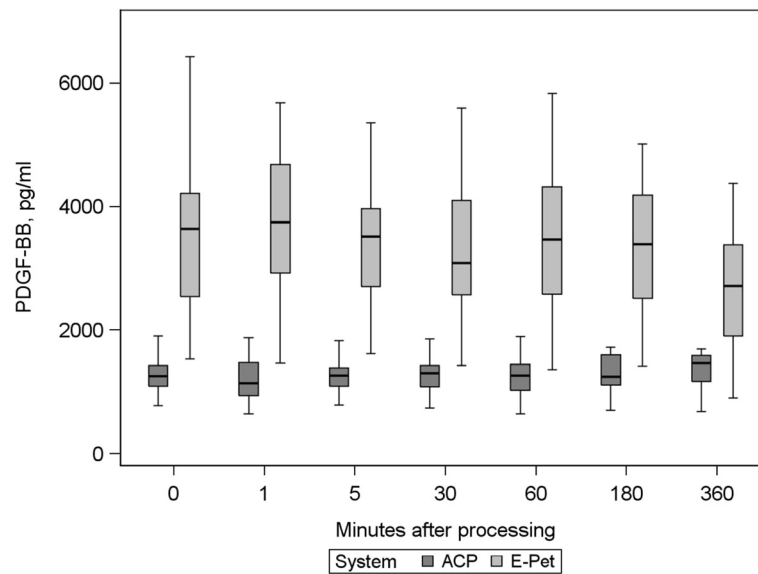


Fig. 1 PDGF-BB concentrations over time in ACP® and E-PET preparations

including PDGF-AB and TGF- β 1. However, our findings contradict other recommendations on PRP application which recommended applying immediately after processing [8]. It seems appropriate to address a wider range of protocols, compositions (i.e. composites with biomaterials and others) and conditions like application mode including activation and indication of PRP formulations to get a more precise impression of the individual kinetics of growth factors in a PRP setting. Thus, for example Kleinheinz and colleagues found an enhancement of VEGF₁₆₅ (vascular endothelial growth factor) half-life from 90 min for free VEGF₁₆₅ up to 48 h when

embedded into a collagen matrix [20]. Presuming different half-life data of growth factors in dependence on the respective preparation and setting it seems to be essential to estimate cytokine stability over time not only for the main classifications of liquid platelet-rich products (P-PRP, L-PRP) but also for each individual preparation protocol currently in use. This will enable the practitioner to more precisely plan the PRP-based therapeutic approach in different indications. Particularly, but not limited to perioperative application, the ability to use PRP over an extended time span after preparation provides more flexibility during the whole process from

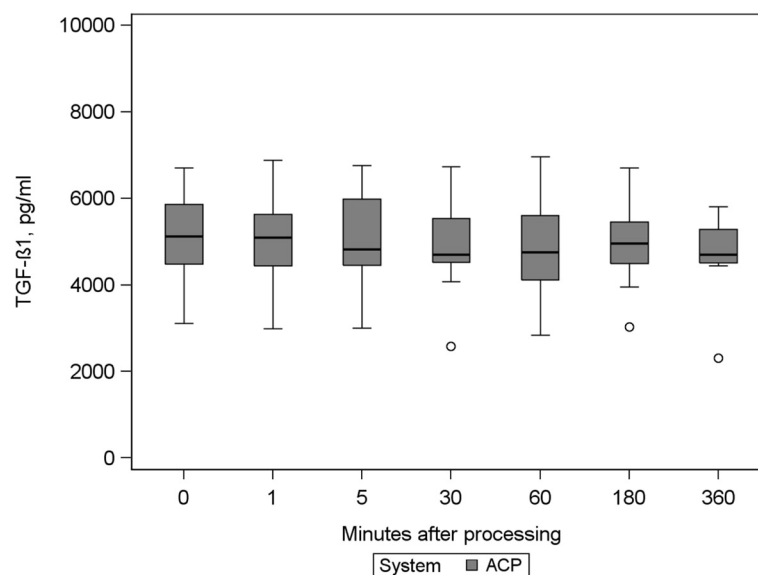


Fig. 2 TGF- β 1 concentrations at all measurement points in ACP® preparations

Table 3 Pearson correlation between growth factor content and CBC of PRP preparations

	PDGF-BB		TGF-β1
	ACP [®]	E-PET	ACP [®]
PLT	$r = 0.51$ ($p = 0.19$)	$r = 0.84$ ($p = 0.009$)	$r = -0.26$ ($p = 0.52$)
WBC	$r = 0.24$ ($p = 0.56$)	$r = -0.74$ ($p = 0.03$)	$r = 0.79$ ($p = 0.01$)
RBC	$r = 0.27$ ($p = 0.51$)	$r = 0.03$ ($p = 0.94$)	$r = -0.26$ ($p = 0.52$)

r: Pearson correlation coefficient, *p*: *p*-value (local significance level: 0.05)

blood sampling to final application by allowing a spatial and temporal separation of processing and application.

In this study whole blood samples for generating PRP were taken under general anaesthesia. This basic condition represents a typical setting in veterinary medicine due to a lack of patients' compliance during the subsequent application procedure. Especially in case of intraarticular application of PRP in small animal medicine this condition will help for example to avoid iatrogenic cartilage lesions caused by patient movement under application. It may also be considered for application in human as well as veterinary medicine if used in a surgical setting. PLT, WBC and RBC concentrations of these samples were significantly lower than CBC counts in standing, non-sedated horses but still proved to be within the range of normal (physiological) values as expected [21, 22]. Individual variations in CBC counts between horses were larger using the E-PET protocol and might have been influenced by age and gender [23]. Daily as well as temperature-associated variations of PRP preparations have also been described [24]. These factors were not considered in the current study design. However, the authors assume that the back-flushing step during preparation with the filter-based E-PET system is by contributed to individual variations.

As part of a broader study we chose two different types of PRP preparation protocols intended to generate a PRP containing low to none WBC content – pure PRP (P-PRP) - in case of ACP[®] and a leukocyte-rich PRP (L-PRP) following the E-PET protocol. This differentiation represents the current consensus on the classification of PRP preparations used in liquid form [25]. The former preparation system is well established in human and veterinary companion animal medicine while the latter was originally developed for the use in equids. Deviating from the manufacturers' recommendations for equine applications, ACP[®] was processed using higher relative centrifugation forces (rcf) during the single spin process for a maximum reduction of WBC counts. According to Kissich and colleagues [26] the ACP[®] preparation protocol recommended by the manufacturer for equine applications (rpm: 1100, rcf: 189 g, 5 min) revealed 1.5 fold increase in PLT counts to baseline coming along with a reduction of WBC concentrations to 11.9% of baseline

counts. A higher rcf protocol – which is also in accordance to current human application guidelines - (rpm: 1500, rcf: 352 g, 5 min) resulted in a 1.2 fold increase in PLT concentrations along with a reduction of WBC counts to 1.3% of baseline. Kissich and coworkers in their study took whole blood samples as source from standing, non-sedated horses. To come close to the definition of pure PRP we decided to use this latter spin-protocol. In accordance to the preparation protocols used by most of the practitioners - as experienced by the authors - no anticoagulant was used. This protocol resulted in a greater increase of PLT counts (1.7 fold) but only a slight decrease in WBC concentrations compared to the recommended procedure. With regard to this ACP[®] procedure, the impact of the anticoagulant on these findings should be negligible as waiving the anticoagulant is to be expected to rather impair physiological and structural integrity of platelets leading to reduced PLT counts [27]. However, this was not confirmed by this study. Inconsistencies in resulting CBC data is underlined by a study from Hessel and colleagues with CBC counts being different despite using same protocol as the Kissich group [28].

Along with a 2.1 fold increase in WBC counts from baseline the gravity filtration-based E-PET system revealed a 2.7 fold increase of PLT content when compared to the whole blood source when strictly following the manufacturers' recommendations including use of ACD-A (anticoagulant citrate dextrose solution A) as anticoagulant. The lack of significance of the difference in enrichment when compared to ACP[®] data is probably due to the small number of comparable samples ($n = 5$). However, mean PLT counts ($327.78 \times 10^3/\mu\text{l}$) markedly deviated from mean PLT concentrations ($533 \times 10^3/\mu\text{l}$) reached by Hessel and colleagues [28] as well as by Textor and colleagues ($650 \times 10^3/\mu\text{l}$) [29]. These two groups used the E-PET protocol but performed whole blood sampling from non-anaesthetized donors. Interestingly, despite these inconsistencies regarding the CBC data in the processed PRP formulations, mean PDGF-BB concentrations resulting from E-PET processing in our study (3569.82 pg/ml) approximately matched values reached in activated E-PET preparations by Textor and colleagues (mean: 3811 pg/ml). This underlines current discussions on the definition of optimal dose or concentration of platelets and growth factors in PRP which is agreed to be another important topic in PRP research at present [30, 31]. Variables influencing this phenomenon remain questionable. Considering a single freeze-thaw cycle prior to growth factor analysis as part of the design of the current study and the Hessel group, respectively, both preparations must be considered thermally activated at the time of ELISA processing. Early studies have shown that, with regard to PDGF, the freezing procedure itself does not impair the resulting measurable



cytokine concentrations [32]. Thus, sampling conditions of whole blood apparently remain the only difference in E-PET processing.

However, statistical correlations calculated revealed no impact of PLT counts in whole blood on the resulting thrombocyte content and PDGF-BB concentrations of L-PRP preparations ad modum E-PET. Furthermore, due to a lack of significance of correlations between RBC and WBC counts in the whole blood sample and the platelet-rich product as well as between these cell concentrations and resulting PDGF-BB values, a convincing impact of CBC counts of whole blood samples on resulting CBC counts and PDGF-BB content in this L-PRP preparation could not be shown. Consequently, we consider the differentiation of the donor condition in “standing, non-sedated” and “under general anaesthesia” not to be relevant with regard to resulting CBC counts and PDGF-BB content of this L-PRP protocol. If other anaesthetic protocols and resulting splenic RBC sequestration for example may have a significant impact on cell content and function of whole blood source [21, 22, 33] as well as on growth factor content of L-PRP preparations has to be subject to further studies.

In contrast to this, as expected, we found a strong correlation of resulting cytokine values with the E-PET preparations' PLT counts. However, these findings were accompanied by a significant negative correlation of WBC content of the processed platelet-rich product with resulting PDGF-BB concentrations. Due to the leukocytes' ability to produce new growth factors after an initial release [34], a positive correlation between PDGF-BB content and WBC counts should readily be anticipated, but could not be confirmed by our results. The identification of variables causing this negative dependency is beyond the design of this study.

In case of ACP[®] preparations, no impact of CBC counts of the donor sample on cytokine concentrations after processing was found. The strong negative correlation between RBC values of sample and preparation underlines the ability of this P-PRP protocol to nearly eliminate RBCs from the final preparation. Unlike the E-PET protocol, no reliable dependencies of resulting PDGF-BB concentrations from the preparations' CBC could be defined. This was also true for TGF- β 1 with the exception of WBC counts significantly influencing the resulting content as expected when considering leukocytes as a vital source of this cytokine [35].

Based on the results of this study defining an unambiguous pattern of dependencies between cytokine content of PRP preparations and CBC concentrations of the donor source is not possible. Even the strong correlation between PLT values of E-PET preparations and resulting PDGF-BB content is contradicted by the results of other investigators [28, 29] who plotted approximately similar

PDGF-BB concentrations coming from nearly two times higher PLT counts while applying this same protocol.

Conclusion

Both preparation protocols representing L-PRP and P-PRP revealed stable growth factor concentrations over at least a six hour time span at room temperature. With regard to the activation step by a freeze-thaw cycle prior to measurement—resulting in the release of all growth factors—this may be addressed as a stable growth factor potential over the time span considered. The correlations calculated in this study may indicate the absence of any impact of the respective preparations' PLT counts on resulting cytokine values in case of P-PRP preparations while for L-PRP a strong correlation occurred. Due to inconsistent patterns, these findings have to be addressed as tendencies. Additional studies implicating a further standardization of processing protocols are necessary to identify consistent impact on cytokine content after PRP processing.

Additional file

Additional file 1: Computer spreadsheet containing data from all studies. (XLSX 23 kb)

Abbreviations

ACD-A: Acid-citrate-dextrose solution; ACP[®]: Autologous conditioned plasma; CBC: Complete blood count; CI: Confidence interval; E-PET: Equine platelet enhancement therapy; IPPV: Intermittend positive pressure ventilation; L-PRP: Leukocyte-rich platelet-rich plasma; M: Mean (statistical); NaCl: Sodium chloride solution; NRC: National research council (US); PDGF-BB: Platelet-derived growth factor-BB; PLT: Platelets (thrombocytes); P-PRP: Pure platelet-rich plasma; PRP: Platelet-rich plasma; RBC: Red blood cells; rcf: Relative centrifugation force; rpm: Rounds per minute; TGF- β 1: Transforming growth factor- β 1; VEGF: Vascular endothelial growth factor; WBC: White blood cells

Acknowledgment

The Authors thank Dr. Klaus Hopster, Dipl. ECVA for performing general anaesthesia in all horses included in this study.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its Additional file 1.

Authors' contributions

GH conceived the conception and design of the study. FG made substantial contributions to conception and design. GH and FG contributed equally to acquisition, analyses and interpretation of data as well as to draft the manuscript and to give final approval of the version to be published. GG, DS and AS had been involved in critically revised the manuscript. ME carried out the statistical analysis and had been involved in drafting the manuscript. SJ participated in data acquisition and drafting the manuscript. DM performed the laboratory analysis and had contributed to the design of the study. RM made substantial contributions to the design of the study as well as to the interpretation of data and critically revised the manuscript. All authors have read, commented and final approved the manuscript.

Authors' information

Not applicable.

Competing interest and funding

The authors disclose any sponsorship or funding arrangements relating to their research and any possible conflicts of interest.

**Consent for publication**

Not applicable.

Ethics approval

Animal experiments were conducted under an ethics committee (Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety) approved protocol in accordance with German federal animal welfare legislation (Az 33.14-42502-04-14/1547), which is in compliance with the guidelines outlined in the NRC Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All animals were from the ownership of and housed at the Clinic for Horses of the University of Veterinary Medicine, Hannover, Foundation, Germany.

Author details

¹Department of Orthopedics and Tumororthopedics, University Hospital of Muenster, Albert-Schweitzer-Campus 1, 48149 Muenster, Germany. ²Clinic for Horses, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 9, 30559 Hanover, Germany. ³Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 9, 30559 Hannover, Germany. ⁴Institute of Biostatistics and Clinical Research, University of Muenster (WWU), Schmeddingstraße 56, 48149 Münster, Germany.

Received: 23 April 2016 Accepted: 9 December 2016

Published online: 05 January 2017

References

- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:638–46.
- Hall MP, Band PA, Meislin RJ, Jazrawi LM, Cardone DA. Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. *J Am Acad Orthop Surg.* 2009;17:602–8.
- Mautner K, Malanga GA, Smith J, Shiple B, Ibrahim V, Sampson S, Bowen JE. A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. *PM R.* 2015;7:553–9.
- Nguyen RT, Borg-Stein J, McInnis K. Applications of platelet-rich-plasma in musculoskeletal and sports medicine: an evidence-based approach. *PM R.* 2011;3:226–50.
- Hsu WK, Mishra A, Rodeo SR, Fu F, Terry MA, Randelli P, Canale ST, Kelly F. Platelet-rich plasma in orthopaedic applications: evidence-based recommendations for treatment. *J Am Acad Orthop Surg.* 2013;21:739–48.
- Zhu Y, Yuan M, Meng HY, Wang AY, Guo QY, Wang Y, Peng J. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21:1627–37.
- Anitua E, Sanchez M, Orive G, et al. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* 2007; 28:4551–60.
- Engelbrechtsen L, Steffen K, Alsousou J, Anitua E, Bachl N, Devilee R, Everts P, Hamilton B, Huard J, Jenouire P, Kelberine F, Kon E, Maffulli N, Matheson G, Mei-Dan O, Menetrey J, Philippon M, Randelli P, Schamasch P, Schwellnus M, Verneq A, Verall G. IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *Br J Sports Med.* 2010;44:1072–81.
- Griffin XL, Wallace D, Parsons N, Costa ML. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;7:CD009496. doi:10.1002/14651858.CD009496.pub2. Review.
- Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27:158–67.
- Sheth U, Simunovic N, Klein G, Fu F, Einhorn TA, Schemitsch E, Ayeni OR, Bhandari M. Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: a meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94:298–307.
- Cohn CS, Lockhart E, McCullough JJ. The use of autologous platelet-rich plasma in the orthopedic setting. *Transfusion.* 2015;55:1812–20.
- Everts PAM, Hoffmann J, Weibrich G, Mahoney CB, Schonberg JP, van Zundert A. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfus Med.* 2006;16(5):363–8.
- Wesley Sutter W, Kaneps AJ, Bertone AL. Comparison of hematologic values and transforming growth factor β and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *Am J Vet Res.* 2004;65(7):924–30.
- Arguelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Viñals L, Martínez P, Bach E, Prades M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Sci.* 2006;81:237–45.
- Perazzi A, Busetto R, Martinello T, et al. Description of a double centrifugation tube method for concentrating canine platelets. *BMC Vet Res.* 2013;9:146.
- Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:529–35.
- Anitua E, de la Fuente M, Riestra A, Merayo-Lloves J, Muruzábal F, Orive G. Preservation of biological activity of plasma and platelet-derived eye drops after their different time and temperature conditions of storage. *Cornea.* 2015;34:1144–8.
- Arthrex Vet Systems 2015; VL82-0005-DE_E
- Kleinheinz J, Jung S, Wermker K, Fischer C, Joos U. Release kinetics of VEGF₁₆₅ from a collagen matrix and structural matrix changes in a circulation model. *Head Face Med.* 2010;6:17–23.
- Yokota S, Hikasa Y, Shimura I, Kusunose S. Effects of imidazoline and nonimidazoline alpha-adrenergic agents, including xylazine, medetomidine, yohimbine, tolazoline, and atipamezole, on aggregation of bovine and equine platelets. *AJVR.* 2013;74:395–402.
- Kullmann A, Sanz M, Fosgate GT, Saulez MN, Page PC, Rioja E. Effects of xylazine, romifidine, or detomidine on hematology, biochemistry, and splenic thickness in healthy horses. *Can Vet J.* 2014;55:334–40.
- Giraldo CE, Lopez C, Alvarez M, Samudio IJ, Prades M, Carmona JU. Effects of breed, sex and age on cellular content of growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet Res.* 2013;9:29–39.
- Amable PR, Carias RBV, Teixeira MVT, da Cruz Pacheco I, Amaral RJF C d, Granjeiro JM, Borojevic R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4:67–80.
- Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (platelet-rich plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *MLTJ.* 2014;4:3–9.
- Kissich C, Gottschalk J, Lochmann G, Einspanier A, Böttcher P, Winter K, Brehm W, Ionita JC. Biochemische eigenschaften des equinen autologous conditioned plasma® (ACP). *Pferdeheilkunde.* 2012;28:258–67.
- Macey M, Azam U, McCarthy D, Webb L, Chapmann ES, Okrongly D, Zelmanovic D, Newland A. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosin, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system. *Clin Chem.* 2002;48:891–9.
- Hessel LN, Bosch G, van Weeren PR, Ionita JC. Equine autologous platelet concentrates: a comparative study between different available systems. *Equine Vet J.* 2015;47:319–25.
- Textor JA, Willits NH, Tablin F. Synovial fluid growth factor and cytokine concentrations after intra-articular injection of a platelet-rich product in horses. *Vet J.* 2013;198:217–23.
- Middleton KK, Barro V, Muller V, Terada S, Fu FH. Evaluation of the effects of platelet-rich plasma (PRP) therapy involved in the healing of sports-related soft tissue injuries. *IOWA Orthop J.* 2012;32:150–63.
- Mastrangelo AN, Vavken P, Fleming BC, Harrison SL, Murray MM. Reduced platelet concentration does not harm PRP effectiveness for ACL repair in a porcine in vivo model. *J Orthop Res.* 2011;29:1002–7.
- Sekido Y, Morishima Y, Ohya K. Activity of platelet-derived growth factor (PDGF) in platelet concentrates and cryopreserved platelets determined by PDGF bioassay. *Vox Sang.* 1987;52:27–30.
- Aydilek N, Ceylan C, ipek H, Gündoğdu Ü. Effects of xylazine-diazepam-ketamine and xylazine-tiletamine-zolazepam anesthesia on some coagulation parameters in horses. *Yü Vet Fak Derg.* 2007;18:55–8.
- Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Jimbo R, Barbé G, Del Corso M, Inchingolo F, Sammartino G. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? an evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) Gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13:1145–52.
- Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC. TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11:133–45.



13.6 Publikation 6

Geburek, F., Mundle K., Conrad, S., Hellige, M., Walliser, U., van Schie, H.T.M., van Weeren, R., Skutella, T., Stadler, P.

Tracking of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells with *in vivo* magnetic resonance imaging and histology after intralesional treatment of artificial equine tendon lesions – a pilot study.

Stem Cell Res. Ther. 2016, 1. Feb.; 7: 21.



RESEARCH

Open Access



Tracking of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells with *in vivo* magnetic resonance imaging and histology after intralesional treatment of artificial equine tendon lesions - a pilot study

Florian Geburek^{1*}, Kathrin Mundle², Sabine Conrad³, Maren Hellige¹, Ulrich Walliser², Hans T. M. van Schie⁴, René van Weeren⁴, Thomas Skutella⁵ and Peter M. Stadler¹

Abstract

Background: Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (AT-MSCs) are frequently used to treat equine tendinopathies. Up to now, knowledge about the fate of autologous AT-MSCs after intralesional injection into equine superficial digital flexor tendons (SDFTs) is very limited. The purpose of this study was to monitor the presence of intralesionally injected autologous AT-MSCs labelled with superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles and green fluorescent protein (GFP) over a staggered period of 3 to 9 weeks with standing magnetic resonance imaging (MRI) and histology.

Methods: Four adult warmblood horses received a unilateral injection of 10×10^6 autologous AT-MSCs into surgically created front-limb SDFT lesions. Administered AT-MSCs expressed lentivirally transduced reporter genes for GFP and were co-labelled with SPIO particles in three horses. The presence of AT-MSCs in SDFTs was evaluated by repeated examinations with standing low-field MRI in two horses and post-mortem in all horses with Prussian blue staining, fluorescence microscopy and with immunofluorescence and immunohistochemistry using anti-GFP antibodies at 3, 5, 7 and 9 weeks after treatment.

Results: AT-MSCs labelled with SPIO particles were detectable in treated SDFTs during each MRI in T2*- and T1-weighted sequences until the end of the observation period. Post-mortem examinations revealed that all treated tendons contained high numbers of SPIO- and GFP-labelled cells.

(Continued on next page)

* Correspondence: Florian.Geburek@tiho-hannover.de

¹Clinic for Horses, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 9, 30559 Hannover, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Geburek et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



(Continued from previous page)

Conclusions: Standing low-field MRI has the potential to track SPIO-labelled AT-MSCs successfully. Histology, fluorescence microscopy, immunofluorescence and immunohistochemistry are efficient tools to detect labelled AT-MSCs after intralesional injection into surgically created equine SDFT lesions. Intralesional injection of 10×10^6 AT-MSCs leads to the presence of high numbers of AT-MSCs in and around surgically created tendon lesions for up to 9 weeks. Integration of injected AT-MSCs into healing tendon tissue is an essential pathway after intralesional administration. Injection techniques have to be chosen deliberately to avoid reflux of the cell substrate injected. *In vivo* low-field MRI may be used as a non-invasive tool to monitor homing and engraftment of AT-MSCs in horses with tendinopathy of the SDFT.

Keywords: Horse, Superficial digital flexor tendon, Superparamagnetic iron oxide particles, SPIO, Prussian blue staining, Green fluorescent protein

Background

Injury of the superficial digital flexor tendon (SDFT) is common, especially in thoroughbred racehorses [1]. Therapy with adipose-derived nucleated cells and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (AT-MSCs) has shown promising results when treating both experimental tendonitis [2–5] and naturally occurring tendon and ligament injuries in horses [6, 7]. To further investigate the potential regenerative, immunomodulatory and inflammatory modulating effect of MSC therapy, knowledge of the distribution, kinetics and engraftment of the injected cells in the target tissue is of utmost interest [8]. Bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs) and embryonic-like stem cells (ESCs) have been traced after labelling with green fluorescent protein (GFP) and were detectable in the treated tendon for up to 90 days [9, 10]. Whereas estimated BM-MSC survival was less than 5 % after 10 days, ESC numbers were at a constant level for 90 days [10]. Compared with MSCs from other sources, AT-MSCs show expression of extracellular matrix proteins with the highest collagen 1A2-to-collagen 3A1 ratios. Moreover, AT-MSCs display the second highest expression of the tendon markers tenascin-C and scleraxis [11], suggesting that AT-MSCs may be of special benefit in the treatment of equine tendinopathy. However, knowledge about the fate of autologous AT-MSCs after intralesional injection into equine SDFTs is marginal. As recently revealed, AT-MSCs labelled with nanocrystals were detectable in peripheral blood for 72 h and 7 days after implantation as well as in SDFT tissue 7 days after intralesional injection in an equine collagenase tendonitis model [12].

Labelling with superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles is a technique to track MSCs assisted by magnetic resonance imaging (MRI) because of the strength of the signal change per unit of metal provided, particularly in T2*-weighted images [13]. By means of this technique, cells can be monitored non-invasively *in vivo* and at post-mortem histology by Prussian blue staining [14]. In contrast, GFP-based labelling techniques are dependent on tissue biopsies or even larger specimen, thus making euthanasia of the treated animal

necessary [10]. *In vitro* studies have shown that controlled labelling of MSCs with SPIO nanoparticles neither caused death of rabbit BM-MSCs nor inhibited their proliferation [15]. A recent equine study has provided evidence that viability did not differ between SPIO-labelled and unlabelled BM-MSCs and umbilical cord blood MSCs. However, doubling time increased in SPIO-labelled MSCs compared with unlabelled cells [16]. In a rodent study, SPIO nanoparticles could be tracked *in vivo* for up to 4 weeks after subcutaneous implantation [17]. At the same time, in a different rodent study investigating the presence of SPIO-labelled BM-MSCs at a tendon-to-bone interface for up to 7 days, a reliable tracing of labelled cells was impossible and this was due to the similar signal intensity of cells and tendon tissue on T2-weighted MRI images [18]. As recently pointed out in an equine cadaver study, SPIO-labelled BM-MSCs are detectable immediately after intralesional SDFT injection by using 1.5-Tesla MRI [16].

The present pilot study aimed at testing whether standing low-field MRI has the potential to monitor the fate of intralesionally injected AT-MSCs labelled with SPIO particles *in vivo* and at monitoring the presence of AT-MSCs that were co-labelled with GFP histologically for up to 9 weeks in a surgical model of equine tendinopathy.

Methods

Four warmblood horses (two stallions, one mare and one gelding) between 1 and 4 years old were objects of this study. Pre-existing tendon injury was excluded by clinical examination, B-mode ultrasonography and ultrasonographic tissue characterization (UTC) (UTC 2009; UTC Imaging, Stein, The Netherlands). The study was approved by the animal welfare officer of the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Germany, and the ethics committee of the responsible German federal state authority in accordance with the German Animal Welfare Law (Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, Az. 33.9-42502-04-08/1622).

Collection of subcutaneous fat, AT-MSC isolation, and culture

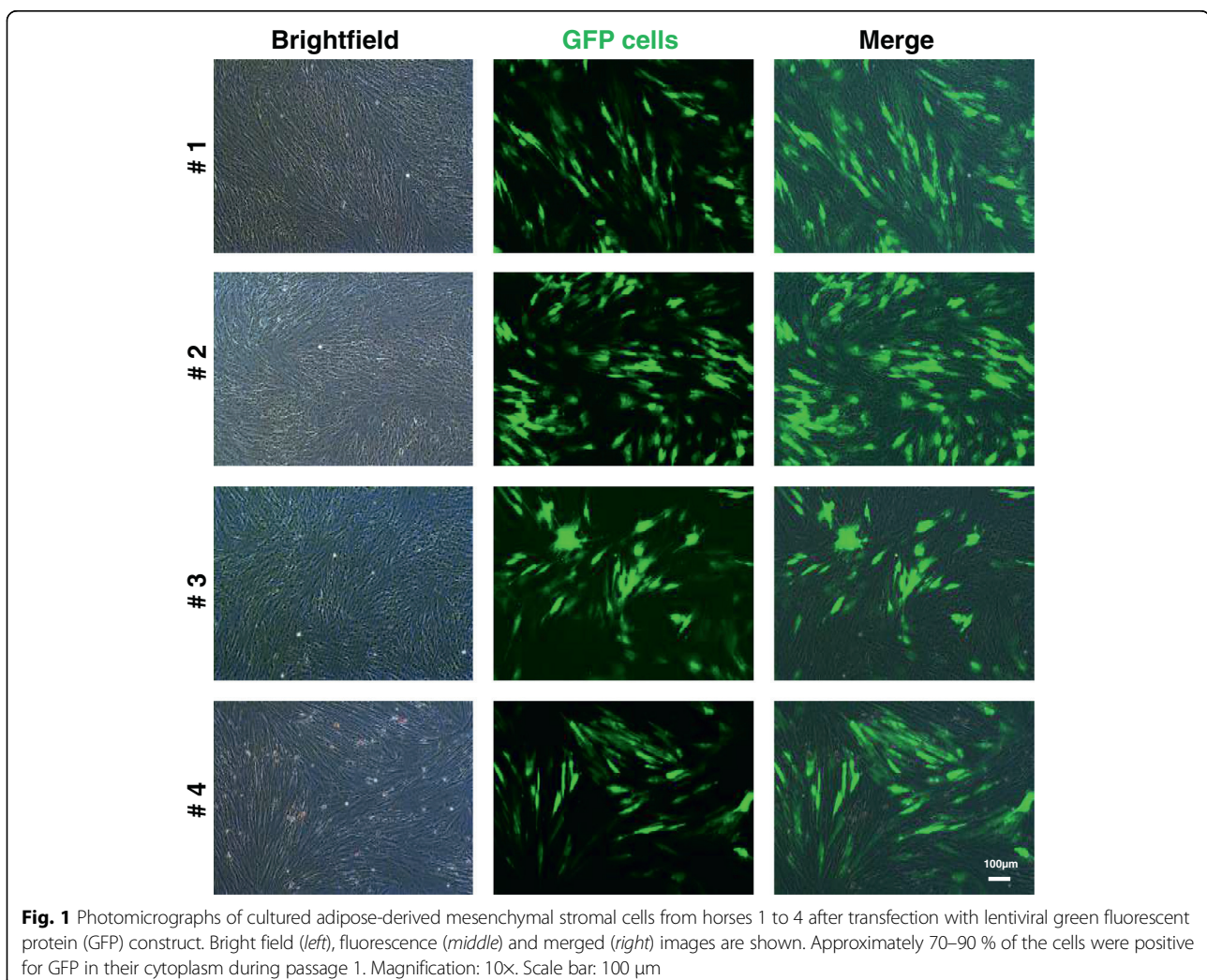
After sedation of the horses, approximately 1–2 g of subcutaneous fat was harvested from the left coccygeal region at the base of the tail 8 or 9 days prior to surgical creation of standardized SDFT lesions. AT-MSCs were isolated and cultured as described elsewhere [4]. They were defined by the presence of markers CD44, CD90, CD105 and CD117 and the absence of CD34 and CD45.

Labelling with lentiviral plasmid and superparamagnetic iron oxide particles

After the addition of 10 µg/ml polybrene, the cultured AT-MSCs of all horses were incubated with lentivirus particles with a copGFP (hUbiC Promoter) for 48 h. The efficacy of transfection was controlled by fluorescence microscopy during passage 1 (Fig. 1) and by flow cytometric analysis (Fig. 2) which was performed on a BD FACSCanto™ II with BD FACSDiva™ 8.0.1 software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). For excitation, the 488-nm laser line was used. Debris, dead or damaged

cells as well as cell aggregates were excluded from further analysis according to forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) properties (gate P1 and P2). For the detection of GFP fluorescence intensity, a combination of a 502 low-pass (LP) and 530/30 band-pass (BP) filter in front of the photomultiplier tube (PMT) detector (488-E) was employed. Detection sensitivity was set with a non-expressing control sample. The GFP-positive gate (P3) was set on the basis of the negative control population to include 0.0 % positive events. The mean efficacy of transfection was estimated to be 99 % after passage 0 (horse 2) and 63 %, 62 %, and 64 % after passage 2 (horses 1, 3 and 4) as determined by three analyses, respectively.

Additionally, AT-MSCs from horses 1, 2 and 4 were labelled by incubation with 45- to 60-nm SPIO particles coated with carboxydextran (Resovist™, SHU 555A; Schering AG, Berlin, Germany) in culture medium for 48 h at an SPIO concentration of 60 µg/ml Fe. Following the incubation, AT-MSCs were rinsed thrice with phosphate-buffered saline (PBS) solution. After harvest



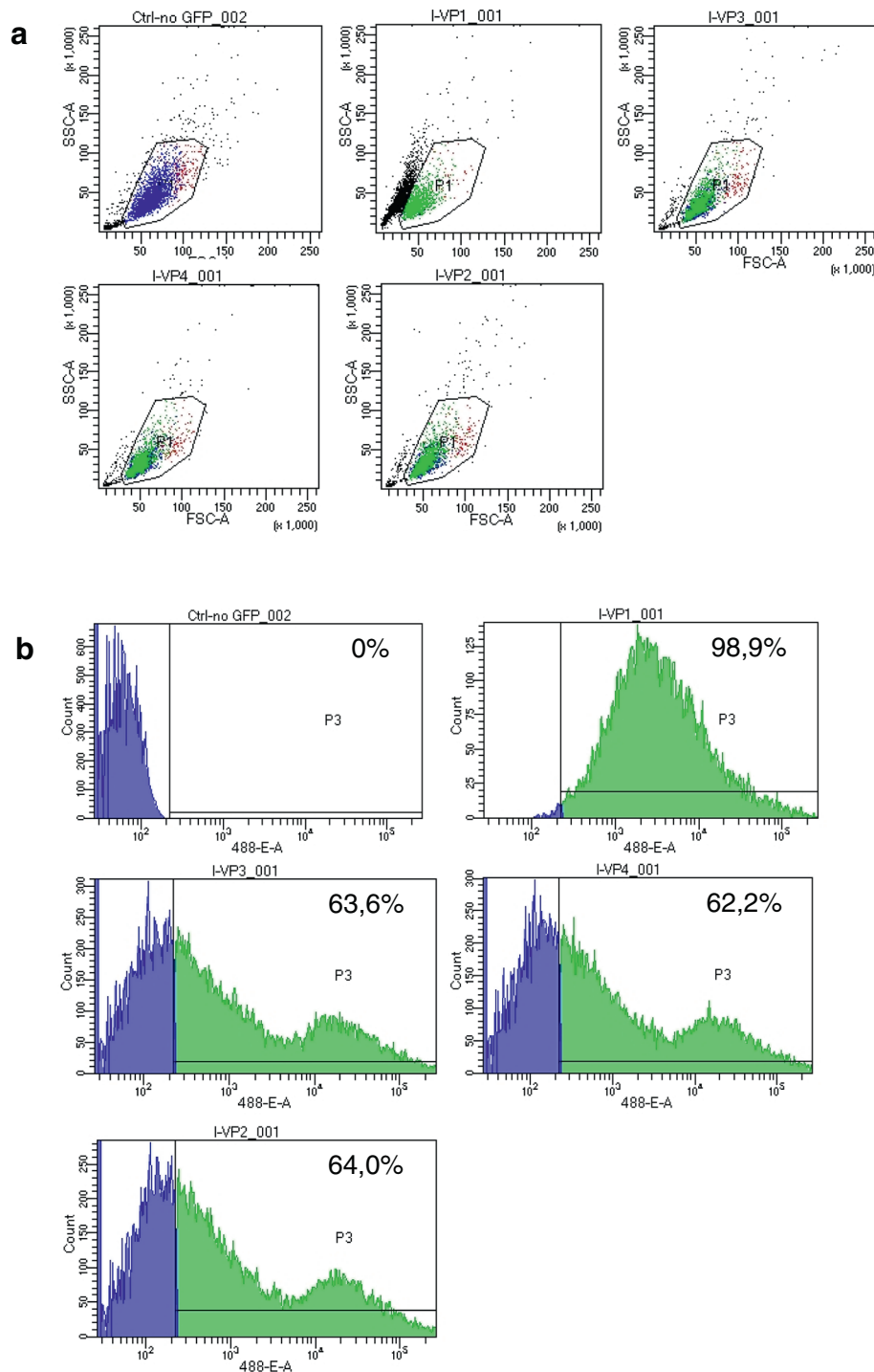


Fig. 2 Flow cytometric analysis of cultured AT-MSCs from horses 1 to 4 after transfection with lentiviral green fluorescent protein (GFP) construct. From left to right are **(a)** scatter plots and **(b)** histograms, including percentages showing the distribution of GFP-expressing cells in a non-expressing control sample (ctrl-no GFP) and in samples from horse 2 (I-VP1; passage 0) and horses 1, 3 and 4 (I-VP3, I-VP4 and I-VP2; passage 2) after a single analysis. Green indicates GFP-labelled AT-MSCs, and blue indicates non-labelled AT-MSCs. AT-MSC adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell, FSC-A forward scatter A, GFP green fluorescent protein, SSC-A side scatter A



of AT-MSCs from passage 0, the total number of cells was counted and the cell viability evaluated, followed by sample preparation of 10×10^6 AT-MSCs on ice for transplantation. Cells not needed for transplantation were cryopreserved for further experiments.

Creation of superficial digital flexor tendon lesions

Lesions were created in the SDFTs of both front limbs under general anaesthesia by using a technique previously described [19–21]. A short longitudinal incision was made axially at the palmar aspect of the metacarpus just proximal to the digital sheath. A conical obturator (\varnothing 3.5 mm) from an arthroscope was introduced through a stab incision into the center of the SDFT and advanced proximally for 7–8 cm while carefully avoiding penetration of the epitenon. The obturator was replaced by an arthroscopic burr (Small Joint Round Burr \varnothing 3.5 mm, 28204 FB; Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany), which was activated and slowly withdrawn within approximately 20 s. The incisions were closed in a simple interrupted pattern. The horses received meloxicam (0.6 mg/kg body weight (bwt) [orally]) the day of surgery and for two consecutive days.

Injection of labelled AT-MSCs

The tendon lesions were treated unilaterally with AT-MSCs at 1 week (horses 2 and 3) and at 3 weeks (horses 1 and 4) after surgery. Three horses (1, 2 and 4) received AT-MSCs labelled with SPIO particles. The horses were sedated by using detomidine hydrochlorid (0.02 mg/kg bwt [IV]) and butorphanol (0.04 mg/kg bwt [IV]). Additionally the medial and lateral palmar nerves were anaesthetized with 2 ml of 2 % mepivacaine hydrochlorid 2 cm distal to the carpometacarpal joint. Approximately 10×10^6 AT-MSCs suspended in 2 ml 0.9 % saline (total volume 3 ml) and divided into aliquots of 1.5 ml were injected into the SDFT lesions from lateral under ultrasonographic guidance by using a 23-G, 1-inch needle. Entrance of the needle was 3 and 5 cm proximal to the surgical scar. Following the implantation of the cells, the limbs were dressed with half-limb bandages for 16 days. The contralateral SDFT was treated with 3 ml of saline in the same manner.

Standing low-field magnetic resonance imaging

In two of the horses treated with SPIO-labelled AT-MSCs (2 and 4), sequential standing low-field MRI of the metacarpal regions was performed by using a clinical 0.27-Tesla open magnet (Hallmarq Veterinary Imaging, Guildford, Surrey, UK) and a fetlock radiofrequency coil. Front-limb SDFTs were scanned 6 and 33 days after the intralesional treatment in horse 2 and after 2, 18, 47 and 62 days in horse 4.

Initially the horses were sedated with romifidine (0.06 mg/kg bwt [IV]) and butorphanol (0.01 mg/kg bwt [IV]). The sedation was prolonged to effect with detomidine (0.01 mg/kg bwt [IV]). After positioning of the metacarpal regions in the isocenter of the magnet, the following MRI sequences and variables were applied: transverse gradient-echo T1-weighted, TR (relaxation time): 50 ms, TE (echo time): 8.0 ms, FA (flip angle): 50°, matrix size: 170 × 130, number of excitations: 1; transverse gradient-echo T2*-weighted, FA: 25°, matrix size: 170 × 126; number of excitations: 1; transverse STIR, TR: 2260 ms, TE: 22.0 ms, FA: 90°, matrix size: 168 × 168, number of excitations: 8. The field-of-view angle was 170 × 170 mm, the slice width was 5.0 mm and the gap width was 6.0 mm.

Follow-up

Following the creation of the lesions, the horses received box rest for 3 weeks. Thereafter they were exercised in accordance with a protocol adapted from Bosch et al. (2010) [21] until euthanasia: From week 4 to 6, they were walked for 10 min once a day on a treadmill. During week 7 to 9, walking was extended to 20 min once daily. After sedation with xylazine (0.4 mg/kg bwt [IV]) and levomethadone (0.05 mg/kg bwt [IV]) and induction of general anaesthesia with ketamine (3 mg/kg bwt [IV]) and midazolam (0.02 mg/kg bwt [IV]), horses were euthanized by using an overdose of pentobarbital (80 mg/kg bwt [IV]) at 3, 5, 7 and 9 weeks after injection of the cells, respectively.

Fluorescence microscopy and Prussian blue staining

The SDFTs were dissected immediately after death, and a tendon segment including the lesion was harvested from between 4 and 5 cm proximal to the surgical scar. These specimens were stored for 96 h in 4 % paraformaldehyde followed by 96 h in PBS. Thereafter they were snap-frozen in Tissue-Tek (Sakura, Alphen aan den Rijn, The Netherlands) at -180 °C. Transverse sections with a thickness of 10 μ m were cut with a cryostat and distended on histology slides. Sections were fixed with 4 % paraformaldehyde for 10 min, washed with PBS and stored at -80 °C after drying until required. Slices were examined under a fluorescence microscope (20× magnification). A set of frozen sections was stained with Prussian blue as described elsewhere (immunohistochemistry world) and examined with a light microscope (20× magnification).

Immunohistochemistry and immunofluorescence

The cell culture and frozen tissue sections were analysed immunohistochemically and with immunofluorescence to detect the GFP antigen. Incubations with the primary polyclonal antibody rabbit-Anti-CopGFP (Evrogen AB



513; Evrogen, Moscow, Russia) diluted at 1:1000 were carried out overnight at 4 °C. After incubation with the primary antibody, one set of sections was incubated with a biotinylated swine-anti-rabbit secondary antibody (E0431; Dako, Hamburg, Germany) at a dilution of 1:400 for 60 min at room temperature. Thereafter, the peroxidase streptavidin-biotin-complex (ABC) detection system (Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) was applied and slices were exposed to diaminobenzidine tetrachloride (DAB) substrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in accordance with the instructions of the manufacturer. A second set of sections was incubated with a secondary goat-anti-rabbit antibody Alexa 546 (Molecular Probes) at a dilution of 1:1000. Finally, the sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (D9542; Sigma-Aldrich) diluted at 1:2000. Cop-GFP transfected control cells functioned as positive controls. In the negative control sections, the primary antibody was omitted. During microscopy of all slices, the number of cells with a positive signal was estimated subjectively (low/moderate/high numbers).

Results

Creation of lesions

Horses 2 (left front) and 4 (both, right front > left front) developed a cellulitis. This was accompanied by the development of lameness, which started at 1 day after surgery and persisted for 5 days in horse 2. In horse 4, lameness started at 6 days after lesion creation and lasted for 2 days. Both horses received cefquinome for 7 days (1 mg/kg bwt [intramuscularly]).

Histology of AT-MSCs in cell culture

Labelled AT-MSCs could be successfully detected in cell culture with fluorescence microscopy (Figs. 1, 3) and with immunohistochemistry and immunofluorescence by using DAB and Alexa 546, respectively (Fig. 3).

Histological tracking of GFP-labelled AT-MSCs

With fluorescence microscopy (Fig. 4, 5) immunohistochemistry and immunofluorescence (Fig. 5), high numbers of AT-MSCs expressing GFP antigen were detected at and near the site of injection 3, 5, 7 and 9 weeks after intralesional injection in all horses. At visual inspection, there was a tendency of finding less labelled AT-MSCs with increasing time after implantation in sequential samples taken from different horses, respectively (Fig. 4). SPIO particles incorporated into AT-MSCs were detected by use of Prussian blue staining in horses 1, 2 and 4 (Fig. 6).

MRI tracking of SPIO-labelled AT-MSCs

In horse 4, areas with hypointense signal, representing a magnetic susceptibility artefact resulting from SPIO particles, surrounded by regions of increased signal intensity, were detectable on transverse T2*-weighted MRI images in and around the SDFT at days 2, 18, 47 and 62 after treatment (Fig. 7a). T1-weighted images also showed a negative contrast in the lesions and in their lateral periphery (Fig. 7c). Areas of signal void corresponded to the two sites of injection in both sequences. In horse 2, a corresponding finding was present at 6 and 33 days after treatment. As compared with the contralateral SDFT, areas of decreased signal intensity were

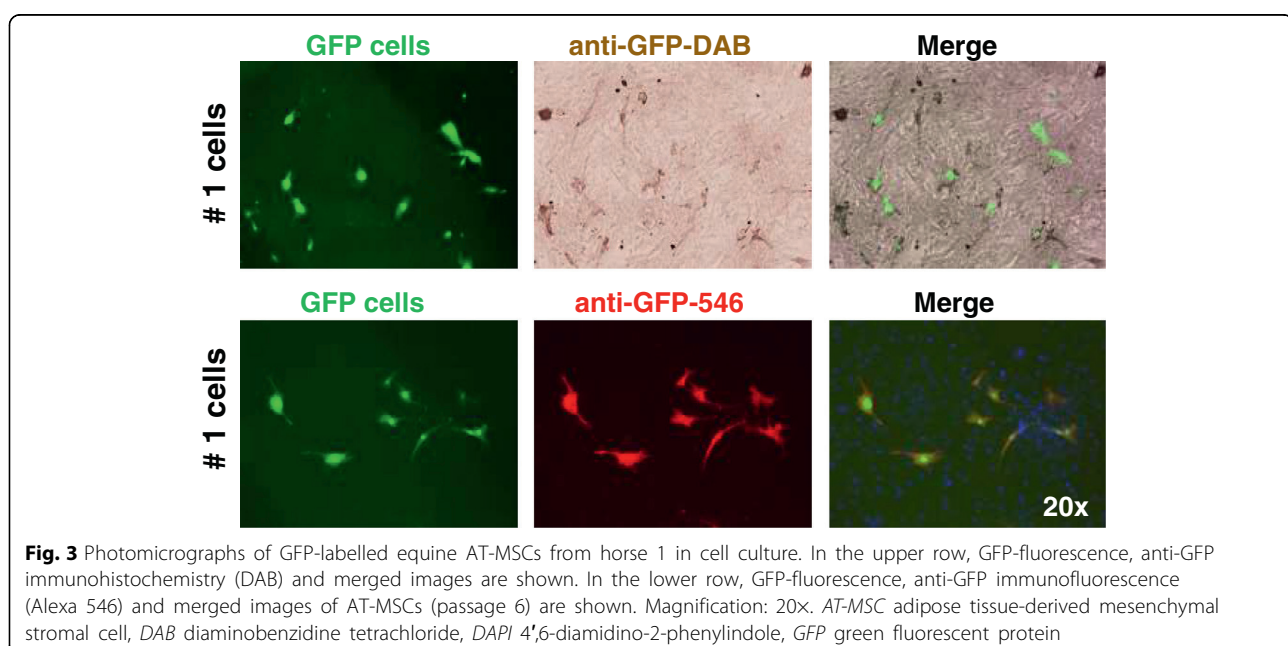
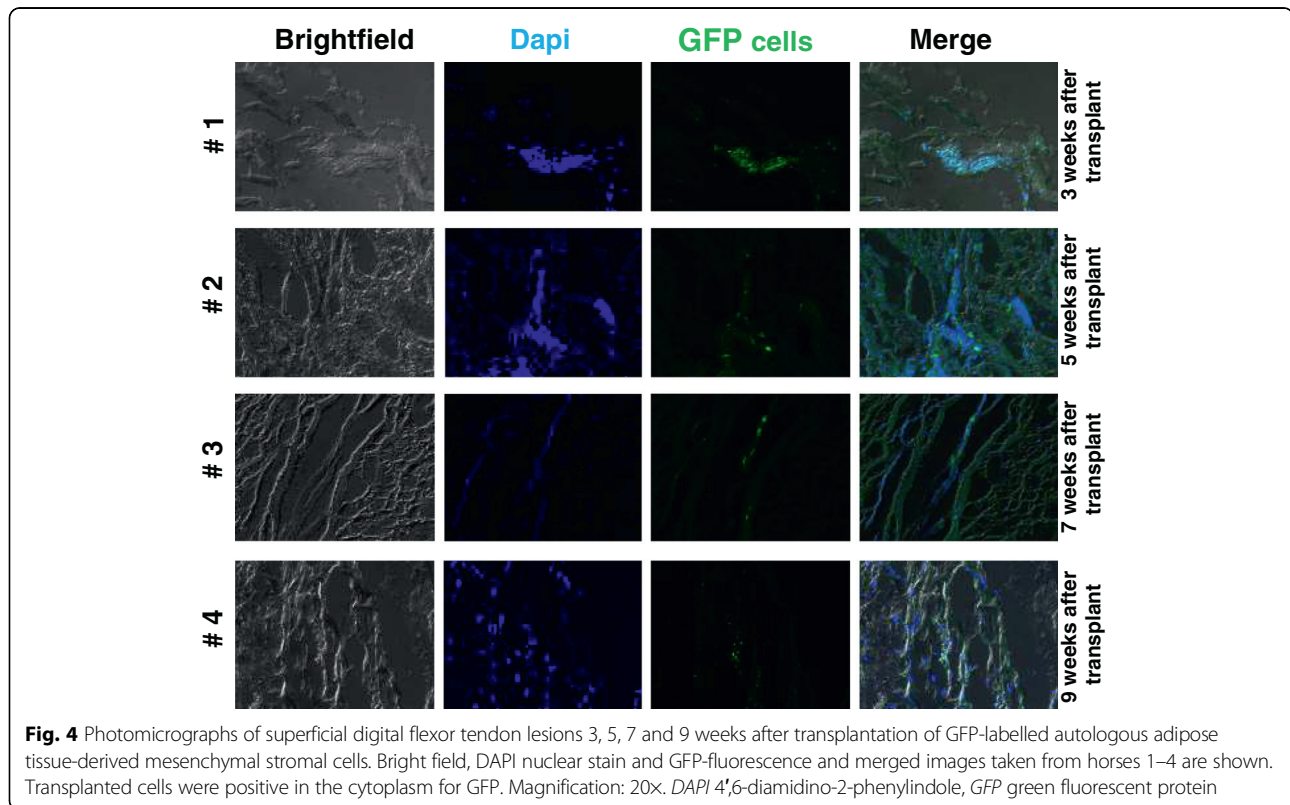


Fig. 3 Photomicrographs of GFP-labelled equine AT-MSCs from horse 1 in cell culture. In the upper row, GFP-fluorescence, anti-GFP immunohistochemistry (DAB) and merged images are shown. In the lower row, GFP-fluorescence, anti-GFP immunofluorescence (Alexa 546) and merged images of AT-MSCs (passage 6) are shown. Magnification: 20x. AT-MSC adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell, DAB diaminobenzidine tetrachloride, DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole, GFP green fluorescent protein



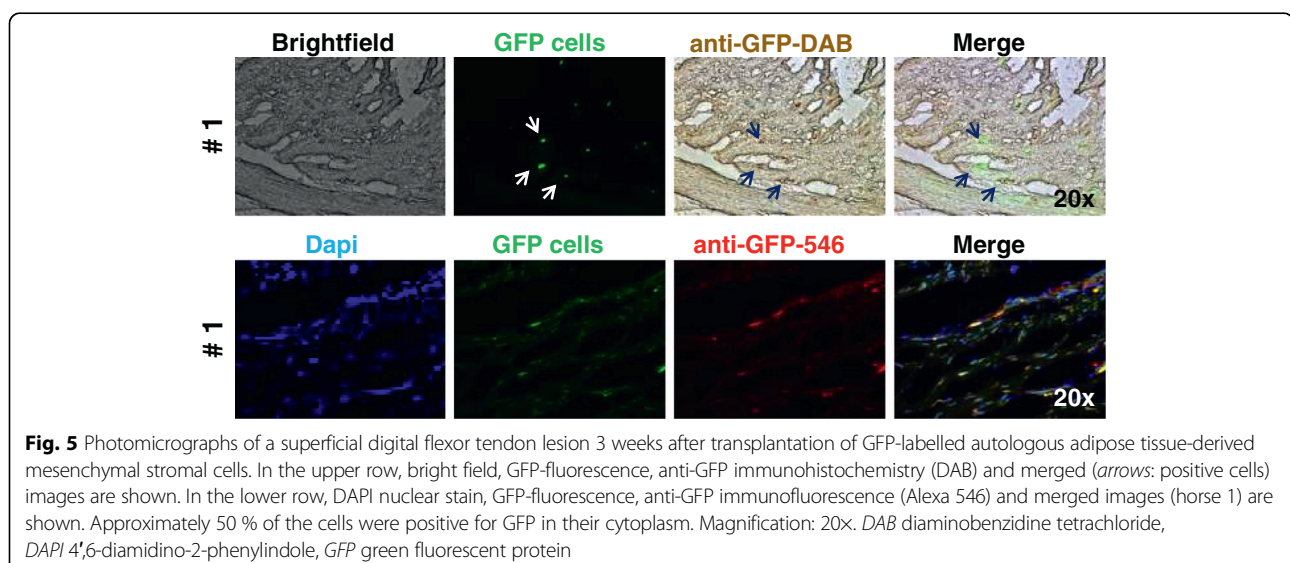
diffusely defined and markedly extended to the lateral subcutis in T2* and T1 sequences (Fig. 7).

Discussion

Main findings

The results of the present study show the potential of standing low-field MRI using T2*- and T1-weighted

sequences to track SPIO-labelled AT-MSCs *in vivo* over a period of at least 9 weeks. It is further shown that GFP-labelled AT-MSCs can be successfully detected in and near surgically induced equine SDFT lesions between 3 to 9 weeks after intralesional injection by using fluorescence microscopy, immunofluorescence, immunohistochemistry and Prussian blue staining.



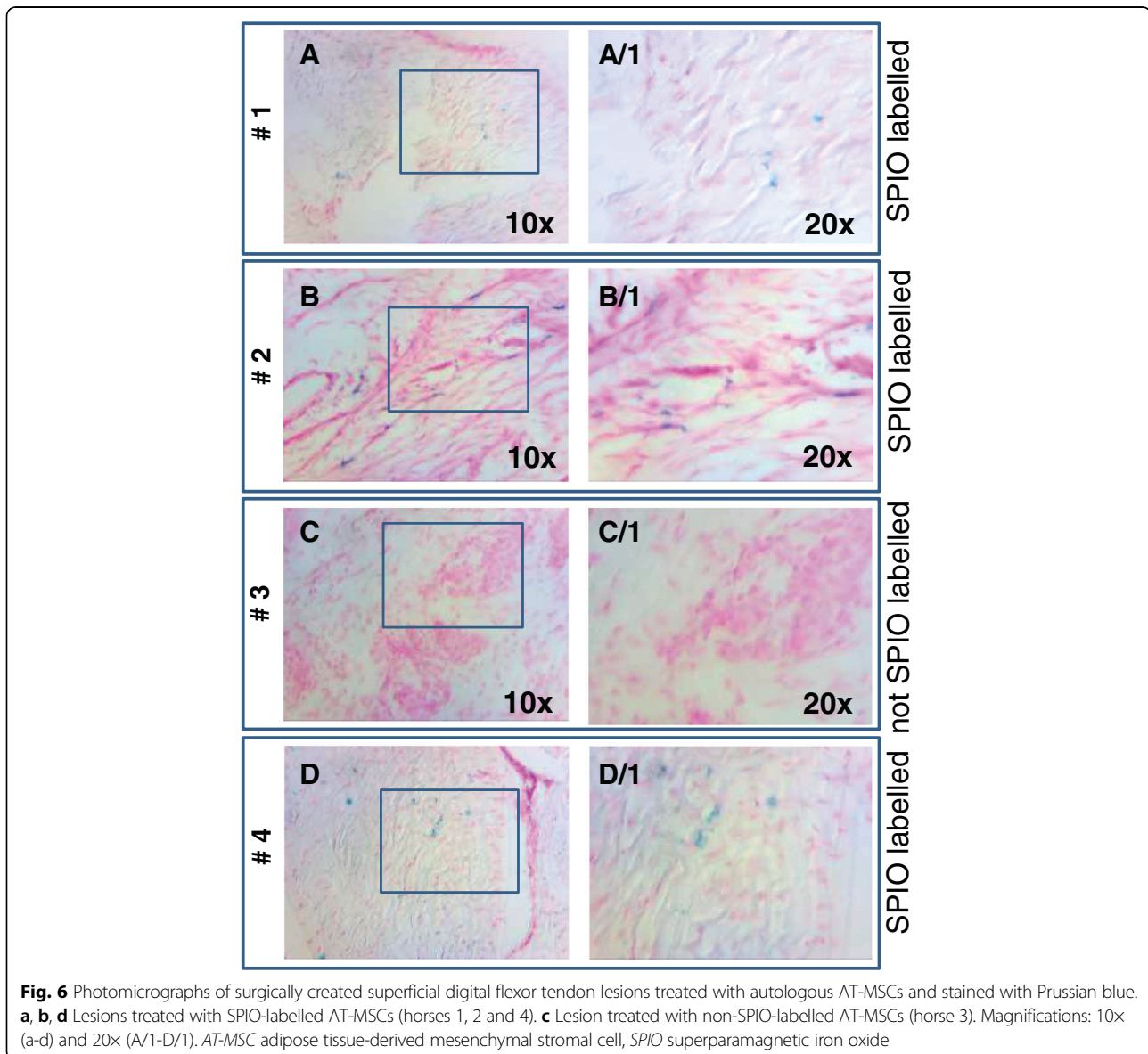


Fig. 6 Photomicrographs of surgically created superficial digital flexor tendon lesions treated with autologous AT-MSCs and stained with Prussian blue. **a, b, d** Lesions treated with SPIO-labelled AT-MSCs (horses 1, 2 and 4). **c** Lesion treated with non-SPIO-labelled AT-MSCs (horse 3). Magnifications: 10× (a-d) and 20× (A/1-D/1). AT-MSC adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell, SPIO superparamagnetic iron oxide

AT-MSCs versus MSCs from other sources

In a previous study, immunophenotyping of equine MSCs showed that MSCs from different sources vary in their expression of MSC-defining antigens [22], suggesting that a deliberate choice of the cell type is important for the treatment of tendinopathy. In the present study, AT-MSCs were used because comparative *in vitro* investigations on the potential suitability for the treatment of tendinopathy made obvious that AT-MSCs express extracellular matrix proteins and tendon markers at significant rates, suggesting an outstanding potential of adipose-derived MSCs for the treatment of tendinopathy [11].

Up to now, data about cellular homing of AT-MSCs were available for a period of merely 7 days after implantation of the cells, which had been labelled with quantum dots (nanocrystals) in a collagenase model of

equine tendinopathy [12]. Results of the present study prove the traceability of AT-MSCs labelled with GFP near the injection site for up to at least 9 weeks (62 days). By contrast, in a different study, the number of equine BM-MSCs decreased significantly after 10 days. At the same time, equine ESCs were constantly traceable in high numbers until 90 days after injection by using a labelling technique similar to the one in the present study [10]. These findings demonstrate the existence of differences between MSCs from different tissue sources and emphasize the necessity to research the fate of different types of equine MSCs separately, dose-dependently and for a period of time longer than in the present study.

The number of cells injected in the present study was relatively high and reflects current practice in equine orthopaedics. In contrast to the high numbers

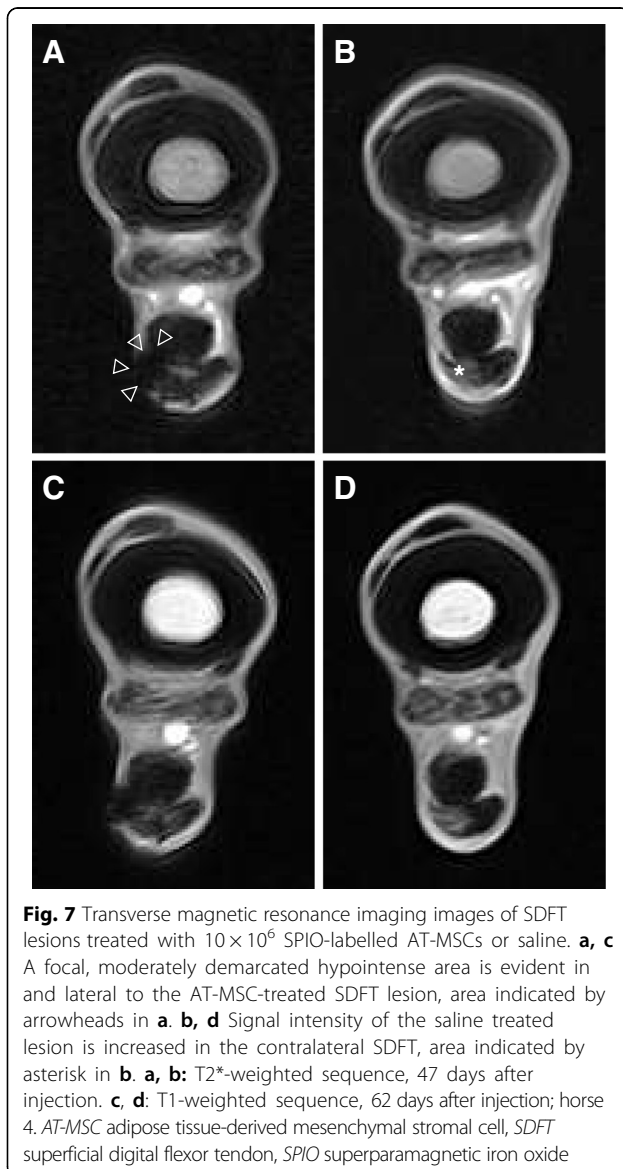


Fig. 7 Transverse magnetic resonance imaging images of SDFT lesions treated with 10×10^6 SPIO-labelled AT-MSCs or saline. **a, c** A focal, moderately demarcated hypointense area is evident in and lateral to the AT-MSC-treated SDFT lesion, area indicated by arrowheads in **a**. **b, d** Signal intensity of the saline treated lesion is increased in the contralateral SDFT, area indicated by asterisk in **b**. **a, b**: T2*-weighted sequence, 47 days after injection. **c, d**: T1-weighted sequence, 62 days after injection; horse 4. AT-MSC adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell, SDFT superficial digital flexor tendon, SPIO superparamagnetic iron oxide

of GFP-positive AT-MSCs after 9 weeks during the present investigation, consistent GFP expression of ovine BM-MSCs could be detected at day 7 but no longer at day 14 after injection of 0.5 and 1×10^6 cells in a recent ovine experimental tendinopathy study [23].

Relevance of finding

The tendency of finding fewer labelled AT-MSCs at visual inspection with increasing time after implantation in the sequential samples taken from different horses suggests a decrease of the cells over time. Nevertheless, high numbers of cells were still present in and near the lesion site for up to 9 weeks after treatment. It has been postulated that the beneficial effects of MSCs on tendon healing observed clinically [24] and experimentally [3] in studies may be the result of either *de novo* formation of

tendon-like tissue (i.e., a true regenerative effect via engraftment and differentiation) or through modulatory paracrine actions of the cells by the production of cytokines and growth factors [25]. From the findings of the present study, it can be concluded that cells remain at the lesion site for a sufficiently long period after AT-MSC treatment of equine tendinopathy and that both pathways are possible. This conclusion further supports the clinical use of MSCs in horses with centrally located tendinopathy of the SDFT and may be an explanatory factor for the clinical observation that stem cell therapy results in a significantly lower number of re-injuries than other treatments for tendinopathy in the horse [6, 7, 26].

Reliability of the techniques

The transfection rate of cultured MSCs with reporter genes expressing GFP was approximately 99 % in the cells used for injection, as shown by flow cytometric analysis during passage 0. Fluorescence microscopy during passage 1 and flow cytometric analysis during passage 2 showed that the percentage of transfected MSCs had a tendency to decrease during early passages. This finding agrees with previous observations and is potentially caused by transgene silencing caused by epigenetic downregulation of transgenes leading to mosaic expression patterns [27, 28]. However, lentiviral vectors encoding GFP have been shown to lack significant negative effects on survival and differentiation potential of MSCs *in vitro* [28]. The transfection of cultured MSCs with reporter genes expressing GFP was successful for tracking AT-MSCs up to 9 weeks after implantation, which proves the suitability of this technique for AT-MSCs implanted into tendon defects as previously described for BM-MSCs and ESCs [10]. The labelling of MSCs with GFP by viral transfection is an established method in experimental animal studies [23, 29, 30]. The detection of GFP under fluorescence microscopy might be impaired by natural fluorescence of cell metabolites and structural components such as collagen in tissue specimen [31]. This phenomenon referred to as “autofluorescence” did not impair interpretation in the present study significantly as verified by immunohistochemical staining and immunofluorescence of GFP-expressing cells using DAB and Alexa 546 and by counterstaining of cell nuclei with DAPI.

In the present study, SPIO-labelled AT-MSCs could be detected with MRI in the lesion and its lateral periphery up to 9 weeks after implantation. The presence of SPIO particles was proved successfully with Prussian blue staining of tendon tissue post-mortem. Labelling of MSCs with SPIO particles has been previously used to track MSCs successfully in laboratory rodents and sheep [23, 32, 33]; the procedure affects their viability to some extent but insignificantly, although their proliferative



capacity may be decreased [16, 17, 23, 32]. In a recent equine study, SPIO-labelled BM-MSCs could be successfully detected in cadaveric SDFTs by using 1.5-Tesla MRI [16]. The present study shows that SPIO labelling is also a practicable technique to track AT-MSCs injected in surgically created tendon lesions with 0.27-Tesla MRI in live horses in T2*-weighted sequences with the aid of the susceptibility artefact. Detection of SPIO particles was also successful in T1-weighted sequences, accepting a less distinct demarcation of the intact tendon tissue. The use of ultra-small SPIO particles might have increased the contrast in T1-weighted sequences. Alternative sequences, potentially appropriate to monitor SPIO-particles (e.g., 3DT1), were not available for the standing low-field MRI used in the present study. Angulation of the SDFTs relative to the magnetic field, using the magic angle effect, would probably have further improved MRI of SPIO particles [33]. Vaguely demarcated hypointense areas in the subcutis at the injection site helped to identify the sites of injection, especially in T1-weighted sequences. These signal voids are a potential sign of migration of the injected MSCs or of reflux of the cell suspension during or after injection. Although no resistance of the syringe plunger was encountered during injection, alternative injection techniques should be considered to avoid reflux from tendon lesions.

The present study proves that co-labelling of equine AT-MSCs with a lentiviral copGFP promotor and SPIO particles is feasible. Whether the procedure affects the biological activity of the cells (and, if so, to what extent) remains uncertain [23].

Alternative techniques to track MSCs are labelling with nanocrystals, which are resistant to metabolic degradation and have few cytotoxic effects [34, 35], and with technetium-99 hexamethyl propylene amine oxime, which allows detection of cells by nuclear scintigraphy but only for 24 h after administration [36]. Both techniques have been used successfully in experimentally induced equine tendon lesions [12, 37].

Cellulitis

Horses 2 and 4 developed mild cellulitis after surgical induction of the lesions, the former in the limb treated with SPIO-labelled AT-MSC, the latter in both limbs but predominantly in the control limb. This complication most likely can be attributed to the surgical procedure or the aftercare during the days after surgery (or both), as clinical signs started before injection of AT-MSCs. Metaphylactic treatment with antimicrobials might have decreased the risk. However, a deliberate choice was made not to do this as there is evidence that some antimicrobials have the potential to

influence tendon metabolism: oxytetracycline showed *in vitro* inhibition of suspensory ligament myofibroblast contractility [38], and oral doxycycline administration leads to inhibition of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) in rat tendons [39]. Cellulitis was restricted to the subcutaneous area and there were no indications that it extended into the created core lesion. Hence, no direct effect on migration behaviour of the cells could be expected. Nor are there indications that the cellulitis has hampered the modalities used in the present study to track implanted cells in any way.

Limitations

The present study's crucial limitation was that the number of labelled cells was not counted but determined semi-quantitatively in post-mortem specimen. The fact that in the present study 10×10^6 AT-MSCs were implanted but that Guest et al. [10] injected 1×10^6 BM-MSCs or ESCs might have influenced the results. This holds true also for the use of different models of tendinopathy in the present compared with other studies [10, 12]. Only a small number of horses were included in the present pilot study, and a staggered approach was chosen to monitor the presence of AT-MSCs over time. Therefore, the potential impact of inter-individual variations (e.g., age, gender and local infection) on the outcome cannot be determined on the basis of the present results. Tissue from the opposite front-limb SDFT was not examined histologically in the present study, but Carvalho et al. [12] could not detect AT-MSCs in the contralateral SDFT 7 days after intralesional injection of the ipsilateral SDFT. Histological tracking of MSCs in the regional lymph node (*Lnn. axillares superficiales*) using the techniques presented here should be included in future studies to further characterize AT-MSC distribution after injection. Another limitation is that the signal intensity change was not quantified objectively on MRI images. The loss of signal intensity may be objectified and a threshold may be established.

Conclusions

Conclusively, standing low-field MRI has the potential to track SPIO-labelled AT-MSCs in surgically induced SDFT lesions for up to 9 weeks *in vivo*, as demonstrated by the detection of large numbers of labelled cells with histology, immunofluorescence and immunohistochemistry in post-mortem specimen of the lesions. Injection techniques have to be chosen deliberately to avoid reflux of the cell substrate injected. In future dose-dependent controlled clinical trials, numbers of cells retrieved in the tendons should be quantified and horses should be monitored for a longer period of time.



Abbreviations

AT-MSC: Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell; BM-MSC: Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell; bwt: Body weight; DAB: Diaminobenzidine tetrachloride; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; ESC: Embryonic stem cell; FA: Flip angle; GFP: Green fluorescent protein; IV: Intravenously; MRI: Magnetic resonance imaging; MSC: Mesenchymal stromal cell; PBS: Phosphate-buffered saline; SDFT: superficial digital flexor tendon; SPIO: Superparamagnetic iron oxide; TE: Echo time; TR: Relaxation time.

Competing interests

HTMvS is the inventor of the ultrasonographic tissue characterization device. He has not given any financial support for this study and has no financial interests in relation to this study. The other authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

FG had the idea of performing the study, designed the study and co-ordinated it. He participated in the collection of clinical, ultrasonographic and histologic data and their analyses and contributed to the interpretation of MRI data and wrote and drafted the manuscript. KM collected the clinical, ultrasonographic, MRI and histologic data and participated in their analyses and revised the manuscript critically. SC performed culture and labelling of the AT-MSCs, contributed to interpretation of the histologic data and revised the manuscript critically. MH evaluated MRI data and revised the manuscript critically. UW contributed to the coordination of the study and to the interpretation of MRI data and revised the manuscript critically. HTMvS participated in the design and coordination of the study and revised the manuscript critically. RvW participated in the design and coordination of the study and revised the manuscript critically. TS instructed and supervised the histologic examinations and revised the manuscript critically. PMS participated in the design of the study, contributed to the analyses of the data and revised the manuscript critically. All authors read and approved the manuscript for publication.

Acknowledgements

The authors thank Drs. Astrid v. Velsen-Zerweck, Gerco Bosch and Florent David for their much appreciated help throughout the study period and Monika Langlotz, of ZMBH (Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg), Flow Cytometry & FACS Core Facility, for providing flow cytometric analyses.

Author details

¹Clinic for Horses, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 9, 30559 Hannover, Germany. ²Pferdeklinik Kirchheim, Nürtinger Straße 200, 73230 Kirchheim unter Teck, Germany. ³P.O. Box 1243, 72072 Tübingen, Germany. ⁴Department of Equine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Yalelaan 112, 3584 CM Utrecht, The Netherlands. ⁵Institute for Anatomy and Cell Biology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 307, 69120 Heidelberg, Germany.

Received: 27 August 2015 Revised: 16 December 2015

Accepted: 14 January 2016 Published online: 01 February 2016

References

- Smith R, Young N, Dudhia J, Kasashima Y, Clegg P, Goodship A. Effectiveness of bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells for naturally occurring tendinopathy in the horse. *Regen Med.* 2009;4 Suppl 2:S25.
- Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am J Vet Res.* 2008;69:928–37.
- Carvalho A de M, Badial PR, Alvarez LE, Yamada AL, Borges AS, Deffune E, et al. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: a randomized controlled trial. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4:85.
- Conze P, van Schie HT, Weeren RV, Staszyc C, Conrad S, Skutella T, et al. Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions. *Regen Med.* 2014;9:743–57.
- Carvalho AD, Alves ALG, de Oliveira PGG, Alvarez LEC, Amorim RL, Hussni CA, et al. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *J Equine Vet Sci.* 2011;31:26–34.
- Leppänen M, Heikkilä P, Katiskalahti T, Tulamo RM. Follow up of recovery of equine tendon & ligament injuries 18–24 months after treatment with enriched autologous adipose-derived mesenchymal stem cells: a clinical study. *Regen Med.* 2009;4:Suppl. 2. S21.
- Dahlgren LA. Fat derived mesenchymal stem cells for equine tendon repair. *Regen Med.* 2009;4:Suppl. 2. S14.
- Prockop DJ, Kota DJ, Bazhanov N, Reger RL. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). *J Cell Mol Med.* 2010;14:2190–9.
- Guest DJ, Smith MR, Allen WR. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Vet J.* 2008;40:178–81.
- Guest DJ, Smith MR, Allen WR. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J.* 2010;42:636–42.
- Burk J, Gittel C, Heller S, Pfeiffer B, Paebst F, Ahnberg AB, et al. Gene expression of tendon markers in mesenchymal stromal cells derived from different sources. *BMC Res Notes.* 2014;7:826.
- Carvalho AM, Yamada AL, Golim MA, Alvarez LE, Hussni CA, Alves AL. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. *Equine Vet J.* 2014;46:635–8.
- Wang YX, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol.* 2001;11:2319–31.
- Julke H, Veit C, Ribitsch I, Brehm W, Ludewig E, Delling U. Comparative Labeling of Equine and Ovine Multipotent Stromal Cells With Superparamagnetic Iron Oxide Particles for Magnetic Resonance Imaging In Vitro. *Cell Transplant.* 2015;24:1111–25.
- Wang HH, Wang YXJ, Leung KCF, Au DWT, Xuan SH, Chak CP, et al. Durable Mesenchymal Stem Cell Labelling by Using Polyhedral Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chem-Eur J.* 2009;15(45):12417–25.
- Bourzac CA, Koenig JB, Link KA, Nykamp SG, Koch TG. Evaluation of ultrasmall superparamagnetic iron oxide contrast agent labeling of equine cord blood and bone marrow mesenchymal stromal cells. *Am J Vet Res.* 2014;75:1010–7.
- Farrell E, Wielopolski P, Pavljasevic P, van Tiel S, Jahr H, Verhaar J, et al. Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;369:1076–81.
- Li YG, Wei JN, Lu J, Wu XT, Teng GJ. Labeling and tracing of bone marrow mesenchymal stem cells for tendon-to-bone tunnel healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19:2153–8.
- Little D, Schramme MC. Ultrasonographic and MRI evaluation of a novel tendonitis model in the horse. *Vet Surg.* 2006;35:E15.
- Schramme M, Hunter S, Campbell N, Blikslager A, Smith R. A surgical tendonitis model in horses: Technique, clinical, ultrasonographic and histological characterisation. *Vet Comp Orthopaed.* 2010;23:231–9.
- Bosch G, van Schie HT, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, et al. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. *J Orthop Res.* 2010;28:211–7.
- Paebst F, Piehler D, Brehm W, Heller S, Schroeck C, Tarnok A, et al. Comparative Immunophenotyping of Equine Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: An Approach Toward a Standardized Definition. *Cytom Part A.* 2014;85A:678–87.
- Scharf A, Holmes S, Thoresen M, Mumaw J, Stumpf A, Peroni J. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a means to track mesenchymal stem cells in a large animal model of tendon injury. *Contrast Media Mol Imaging.* 2015;10:388–97.
- Smith RK, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J. Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *PLoS One.* 2013;8:e75697.
- Caplan AL. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol.* 2009;217:318–24.
- Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith RK. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J.* 2012;44:25–32.
- Kaufman WL, Kocman I, Agrawal V, Rahn HP, Besser D, Gossen M. Homogeneity and persistence of transgene expression by omitting antibiotic selection in cell line isolation. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(17):e111.
- McGinley L, McMahon J, Strappe P, Barry F, Murphy M, O'Toole D, et al. Lentiviral vector mediated modification of mesenchymal stem cells & enhanced survival in an in vitro model of ischaemia. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2:12.



29. Czernik M, Fidanza A, Sardi M, Galli C, Brunetti D, Malatesta D, et al. Differentiation potential and GFP labeling of sheep bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2013;114:134–43.
30. Colosimo A, Curini V, Russo V, Mauro A, Bernabo N, Marchisio M, et al. Characterization, GFP gene Nucleofection, and allotransplantation in injured tendons of ovine amniotic fluid-derived stem cells. *Cell Transplant*. 2013;22:99–117.
31. Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histol Histopathol*. 2013;28:1109–16.
32. Wang L, Deng JX, Wang J, Xiang B, Yang TH, Gruwel M, et al. Superparamagnetic iron oxide does not affect the viability and function of adipose-derived stem cells, and superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging identifies viable cells. *Magn Reson Imaging*. 2009;27:108–19.
33. Yang Y, Zhang J, Qian Y, Dong S, Huang H, Boada FE, et al. Superparamagnetic iron oxide is suitable to label tendon stem cells and track them in vivo with MR imaging. *Ann Biomed Eng*. 2013;41:2109–19.
34. Collins MC, Gunst PR, Cascio WE, Kypson AP, Muller-Borer BJ. Labeling and imaging mesenchymal stem cells with quantum dots. *Methods Mol Biol*. 2012;906:199–210.
35. Muller-Borer BJ, Collins MC, Gunst PR, Cascio WE, Kypson AP. Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells. *J Nanobiotechnol*. 2007;5:9.
36. Sole A, Spriet M, Galuppo LD, Padgett KA, Borjesson DL, Wisner ER, et al. Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using (99 m) Tc-HMPAO. *Equine Vet J*. 2012;44:594–9.
37. Sole A, Spriet M, Padgett KA, Vaughan B, Galuppo LD, Borjesson DL, et al. Distribution and persistence of technetium-99 hexamethyl propylene amine oxime-labelled bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced tendon lesions after intratendinous injection and regional perfusion of the equine distal limb. *Equine Vet J*. 2013;45:726–31.
38. Amoczky SP, Lavagnino M, Gardner KL, Tian T, Vaupel ZM, Stick JA. In vitro effects of oxytetracycline on matrix metalloproteinase-1 mRNA expression and on collagen gel contraction by cultured myofibroblasts obtained from the accessory ligament of foals. *Am J Vet Res*. 2004;65:491–6.
39. Bedi A, Fox AJ, Kovacevic D, Deng XH, Warren RF, Rodeo SA. Doxycycline-mediated inhibition of matrix metalloproteinases improves healing after rotator cuff repair. *Am J Sports Med*. 2010;38:308–17.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit







13.7 Publikation 7

Geburek, F.*, Roggel, F.* , van Schie, H. T. M., Beineke A., Estrada, R., Weber, K., Hellige, M., Rohn, K., Jagodzinski, M., Welke, B., Hurschler, C., Conrad, S., Skutella, T., van de Lest, C., van Weeren, R., Stadler, P. M.

Effect of single intralesional treatment of surgically induced equine superficial digital flexor tendon core lesions with adipose-derived mesenchymal stromal cells (AT-MSCs) – a controlled experimental trial.

Stem Cell Res. Ther. 2017, 5. Juni; 8 (1): 129.

*Geteilte Erstautorenschaft / Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit




RESEARCH

Open Access



Effect of single intralesional treatment of surgically induced equine superficial digital flexor tendon core lesions with adipose-derived mesenchymal stromal cells: a controlled experimental trial

Florian Geburek^{1*†} , Florian Roggel^{1†}, Hans T. M. van Schie², Andreas Beineke³, Roberto Estrada², Kathrin Weber⁴, Maren Hellige¹, Karl Rohn⁵, Michael Jagodzinski⁶, Bastian Welke⁷, Christof Hurschler⁷, Sabine Conrad⁸, Thomas Skutella⁹, Chris van de Lest², René van Weeren² and Peter M. Stadler¹

Abstract

Background: Adipose tissue is a promising source of mesenchymal stromal cells (MSCs) for the treatment of tendon disease. The goal of this study was to assess the effect of a single intralesional implantation of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (AT-MSCs) on artificial lesions in equine superficial digital flexor tendons (SDFTs).

Methods: During this randomized, controlled, blinded experimental study, either autologous cultured AT-MSCs suspended in autologous inactivated serum (AT-MSC-serum) or autologous inactivated serum (serum) were injected intralesionally 2 weeks after surgical creation of centrally located SDFT lesions in both forelimbs of nine horses. Healing was assessed clinically and with ultrasound (standard B-mode and ultrasound tissue characterization) at regular intervals over 24 weeks. After euthanasia of the horses the SDFTs were examined histologically, biochemically and by means of biomechanical testing.

Results: AT-MSC implantation did not substantially influence clinical and ultrasonographic parameters. Histology, biochemical and biomechanical characteristics of the repair tissue did not differ significantly between treatment modalities after 24 weeks. Compared with macroscopically normal tendon tissue, the content of the mature collagen crosslink hydroxylslylpyridinoline did not differ after AT-MSC-serum treatment ($p = 0.074$) while it was significantly lower ($p = 0.027$) in lesions treated with serum alone. Stress at failure ($p = 0.048$) and the modulus of elasticity ($p = 0.001$) were significantly lower after AT-MSC-serum treatment than in normal tendon tissue.

Conclusions: The effect of a single intralesional injection of cultured AT-MSCs suspended in autologous inactivated serum was not superior to treatment of surgically created SDFT lesions with autologous inactivated serum alone in a surgical model of tendinopathy over an observation period of 22 weeks. AT-MSC treatment might have a positive influence on collagen crosslinking of remodelling scar tissue. Controlled long-term studies including naturally occurring tendinopathies are necessary to verify the effects of AT-MSCs on tendon disease.

Keywords: Horse, Ultrasonography, Ultrasound tissue characterization, Biomechanical testing, Histology, Biochemistry, MSC, mesenchymal stem cells, Tendon

* Correspondence: Florian.Geburek@tiho-hannover.de

†Equal contributors

¹Equine Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 9, 30559 Hannover, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



Background

Tendon injuries are common in both human [1–3] and equine [4–6] athletes. In horses, the superficial digital flexor tendon (SDFT), which is located at the palmar aspect of the limb, acts to store and release elastic energy and is subject to strains close to its functional limits [7, 8]. Due to gradual accumulation of degenerative damage during intensive training leading to partial rupture, this tendon is prone to failure, especially in racehorses [5]. Because of the high incidence, prolonged recovery period and high re-injury rate, a plethora of physical, medical and surgical interventions have been applied over the years to improve quality of the repair tissue; however, to date the ideal treatment concept has not been found [9–11]. Potentially regenerative therapies, in particular cell and blood-based substrates, have gained interest over the last decade [12]. The administration of multipotent cells, in particular autologous mesenchymal stromal cells (MSCs) [13], or totipotent embryonic stem cells (ESCs) [14, 15] into tendon defects is suggested to have direct and indirect influences on tendon healing. It is thus hypothesized that the injected cells may either differentiate into cells capable of synthesizing tendon matrix—that is, have a direct regenerative effect [16–20]—or act by a paracrine effect through the release of trophic mediators, growth factors and immunomodulatory, angiogenic as well as anti-apoptotic substances [21–26].

To date it is not clear which cell source is the ideal choice to enhance tendon regeneration [27]. Comparing different adipose tissue-based cell-rich substrates, adipose-derived nucleated cells (ADNCs) are, by contrast with adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (AT-MSCs), a mixture of different cell types. The advantage is that ADNCs are readily available within hours after tissue harvest without the demand of cost and time for culture. Multipotency has been proven for pericytes [28], which form a subset of the ADNCs. However, AT-MSC culture leads to a higher cell dose and theoretically to a greater effect [29]. To the knowledge of the authors, however, it is not clear which cell type contributes most to tendon healing [28, 30]. In an experimental equine collagenase model study ADNCs had a limited effect on tendon healing but led to histologically improved tendon organization and an increase in cartilage oligomeric matrix protein (COMP) expression [30].

The clinically most relevant sources of MSCs in equine orthopaedics are bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood [27, 31]. The advantages of adipose tissue over bone marrow are that it is widely available and easily accessible, and its MSC content is higher with a higher proliferation capacity of AT-MSCs [32] and a slower senescence than that of bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) [27, 33, 34]. Despite the lack of a definite

set of surface markers to characterize equine tenocytes, a recent study demonstrated that, compared with BM-MSCs, umbilical cord blood MSCs and AT-MSCs express collagen 1A2, collagen 3A1 and decorin at the highest levels with the highest collagen type 1A2:3A1 ratio [32]. AT-MSCs show high expressions of the tendon markers COMP and scleraxis [20, 32]. Furthermore, AT-MSCs have already been used with promising results to treat equine tendinopathies, as described in several uncontrolled case series [35–38]. In a controlled in-vivo experimental study, the implantation of AT-MSCs into collagenase-induced SDFT core lesions resulted in improved tendon fibre organization and decreased inflammatory infiltrate, as well as increased collagen type I gene expression compared with the control limbs, whereas no differences were seen in clinical parameters and with B-mode ultrasonography [39]. In another study from the same group using the collagenase-gel model of tendinopathy, intralesional treatment with AT-MSCs suspended in platelet concentrate prevented progression of SDFT lesions and resulted in better organization of collagen fibrils, less inflammation and increased vascularity [40]. However, the relevance of this model is questioned due to the strong acute inflammatory response after collagenase injection, which is unlike naturally occurring degenerative tendon lesions, and due to difficulties in standardization of lesions [41–44]. A recently introduced surgical model of centrally located SDFT (core) lesions is thought to mimic the characteristics of overuse tendinopathy more realistically [43, 45–47].

Since the 1980s, B-mode ultrasonography has been considered the gold standard for the diagnosis of tendinopathy [48, 49]. Because of its limitations, such as the lack of axial information, operator dependence, influence of ultrasound beam angle and limited resolution, however, the value of quantification of B-mode ultrasound images for the adequate assessment of repair is questioned [50, 51]. Ultrasound tissue characterization (UTC) is a new technique that was developed to analyse echo pattern stability on a computerized basis [52, 53]. Transverse ultrasound (US) images are captured at regular distances over the long axis of the tendon, and are reconstituted to a three-dimensional block of US information with the help of custom-designed software. Depending on the echo pattern stability over contiguous images, four different echo types can be discriminated with histo-morphology as a reference test [44, 52]. UTC has been shown a viable diagnostic tool to monitor experimental tendinopathies [44, 47, 54] and natural tendon disease [55, 56] in horses and is increasingly used for the assessment of (Achilles) tendon integrity in humans [57–59]. Histologic examination is still the gold standard to assess tendon healing [60] and commonly



yields the most important results at the end of terminal experimental studies when findings can be correlated to those from other examination modalities (e.g. diagnostic imaging) [30, 44, 45]. Another major component of experimental tendon studies should be biomechanical testing of tendon specimens to quantify functional properties of the repair tissue which are potentially representative for the resistance to strain in a clinical setting [45, 61, 62].

To our knowledge, the effect of AT-MSCs has not been tested experimentally in horses over a 6-month period using a controlled blinded, randomized study design with non-invasive monitoring and multimodal end-stage evaluation of the repair tissue. Therefore, the aim of this study was to assess whether a single intraligamentary implantation of AT-MSCs suspended in autologous inactivated serum into surgically created lesions leads to a reduction of inflammatory signs and improved ultrasonographic, biochemical, biomechanical and histologic characteristics compared with the application of autologous inactivated serum alone.

Methods

Horses

Nine horses (eight warmbloods, one trotter) aged 3–6 years (mean 4 years) with a mean bodyweight of 545 kg (range 498–607 kg) were included in this study. All horses were housed in boxes and fed hay and cereals. Prior to the study, none of the horses showed clinical and/or ultrasonographic (B-mode, UTC) signs of forelimb SDFT disorders.

Surgical creation of lesions and adipose tissue harvest

Core lesions were surgically created in the SDFTs of both forelimbs using the model introduced by Little and Schramme [63] and modified by Bosch et al. [45] and Schramme et al. [43]. All horses received meloxicam (0.6 mg/kg bwt (IV)) preoperatively and 2 days postoperatively. No perioperative antimicrobials were administered. A standard protocol for inhalation anaesthesia was used and the horses were positioned in lateral recumbency. After clipping and aseptic preparation, a 1.5-cm incision was made in the palmar midline, 2 cm proximal to the proximal end of the common digital flexor tendon sheath through the skin and the mesotendon into the tendon core. A 2.5-mm blunt conical obturator (Karl Storz, Tuttlingen, Germany) was inserted and guided proximally inside the tendon core under ultrasonographic guidance over a distance of 7 cm. Subsequently, a 3.5-mm burr (Abrador Burr 28200RN; Karl Storz) was inserted in the tunnel that had been created, activated and gradually pulled backwards over 20 seconds, while pressing the tendon against the tip of the burr. Care was taken not to damage the dorsal

epitenon. Epitenon incisions were sutured in a simple interrupted pattern with polyglactin 910 (Vicryl® 2-0 USP; Ethicon, Norderstedt, Germany), and skin incisions were closed in a vertical mattress pattern with polyamide (Dafilon® 2-0 USP; Braun Melsungen, Melsungen, Germany). Double-layer bandages were applied and changed every 1–2 days until intraligamentary injection.

During the same general anaesthesia, the right paraxial gluteal region was clipped and aseptically prepared. A 4-cm skin incision was made in the cranio-caudal direction and 20 g of adipose tissue was excised from the subcutis. The skin was sutured with a vertical mattress pattern with polyamide (Dafilon® 1 USP; Braun Melsungen).

Adipose tissue was stored in MSC medium containing 1 g/l Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) and 1% L-glutamine (DMEM with 25 mM HEPES, with L-glutamine; PAA Laboratories, Pasching, Austria), fetal bovine serum (PAA Laboratories) and 1% penicillin/streptomycin (Penicillin-Streptomycin 100; PAA Laboratories) at 5 °C and shipped to the laboratory overnight.

AT-MSC isolation and culture

Adipose tissue was mechanically separated using a scalpel blade and a tissue chopper. The tissue was digested with 0.05% type IV collagenase (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) and 0.025% protease (Dispase II; Sigma-Aldrich) at 37 °C for 30 min until it was neutralized by 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories). After centrifugation (200 × g, 10 min), the pellet was suspended in 10 ml of Hanks' buffer (HBSS 1× with Ca and Mg; PAA Laboratories), centrifuged again with the same settings, and the pellet containing the MSCs was suspended in MSC medium in 75-ml polypropylene flasks (T75 flask; BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) and cultured at 37 °C and 5% CO₂. The MSCs were selected by plastic adhesion. MSCs were transfected with recombinant lentivirus particles expressing sequences of the promoting region for transcription factor hUbiC (copGFP; System Biosciences, Mountain View, CA, USA) to be able to track the MSCs via autofluorescence, which was part of another study presented elsewhere.

After 95–100% confluence of cells was reached, the medium was removed and MSCs were washed once with PBS (Dulbecco's PBS without Ca and Mg; PAA Laboratories). Adherent cells were separated with 3 ml of Trypsin/EDTA solution (Trypsin/EDTA 1×; PAA Laboratories) for 5 min at 37 °C, which was checked by light microscopy. After neutralization with 6 ml of MSC medium, the suspension was transferred into a 15-ml polypropylene tube (Conical tubes 15 ml; BD Falcon), centrifuged (200 × g, 5 min) and the pellet suspended in 10 ml MSC medium. Cells were counted using a Neubauer counting chamber



(Zählkammer Neubauer; LO Laboroptik, Friedrichsdorf, Germany), and 10×10^6 MSCs were transferred into a new 15-ml polypropylene tube and washed with 10 ml of 1 g/l DMEM with 25 mM HEPES and 1% L-glutamine. After centrifugation, the pellet was suspended in 1 ml of autologous serum. The serum had been inactivated previously at 56 °C for 30 min. The MSC-serum suspension was transferred into a plastic tube (S-Monovette® 9 ml; Sarstedt, Nümbrecht, Germany), stored on ice, shipped overnight and kept at 4 °C until injection. AT-MSC culture and processing was performed as described previously [46].

Immunophenotyping of AT-MSCs by flow cytometric analysis

After isolation and expansion (passage 3) the AT-MSCs were incubated with monoclonal and polyclonal antibodies against CD14 (C2265-36; US Biological), CD29 (303015; Biozol), CD34 (555820; BD Pharmingen), CD44 (103005; Bio Legend), CD45 (555480; BD Pharmingen), CD90 (ab225; abcam) and CD117 (ab5616; Biozol) (Fig. 1). AT-MSCs stained only with secondary antibodies (ab150105 (abcam), DAB087583 and DAB087693 (Dianova)) were used as negative controls. Antibody binding was measured using flow cytometric analysis (BD FACSCanto™ II with BD FACSDiva™ 8.0.1 software).

Adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation of AT-MSCs

Differentiation of AT-MSCs was induced at passage 2 to adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages. For adipogenic differentiation, cells were seeded at a density of 2×10^4 cells/cm² in basal medium. After 24 hours, medium was switched to Adipogenic Induction Medium, consisting of DMEM High Glucose, supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 1 μM dexamethasone, 1 μM indomethacin, 500 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and 10 μg/ml human recombinant insulin. Medium was changed twice a week for 14 days. Lipid production being specific for adipocytes was made visible by Oil Red staining (Fig. 2).

To induce osteogenic differentiation, AT-MSCs were cultured in 24-well plates with DMEM Low Glucose with 10% FBS (MSC tested; Gibco), 1% L-glutamine (PAA Laboratories), 0.1 μM dexamethasone (Sigma Aldrich) and 1 mM β-glycerophosphate (Sigma Aldrich) for 4 weeks. Controls for osteogenic differentiation were treated under the same conditions without dexamethasone and β-glycerophosphate. The production of mineralized matrix produced by osteoblasts was made evident by alkaline phosphatase, Alizarin red and von Kossa staining (Fig. 3).

To demonstrate chondrogenic differentiation, the cells were trypsinized and 5×10^5 – 1×10^6 cells/ml were resuspended in DMEM High Glucose, 1% penicillin/streptomycin,

1% L-glutamine, 10% FBS, with 1× Insulin–Transferrin–Selenium (ITS) supplement, 1 mM sodium pyruvate, 100 nM dexamethasone, 40 μg/ml proline, 50 μg/ml l-ascorbic acid-2-phosphate and 10 ng/ml TGF-β1. Cells were centrifuged for 10 min at $200 \times g$ in 15-ml Falcon tubes. The tubes were incubated with filter tops in a rack at 37 °C and 5% CO₂. After 2–4 days the pellets condensed. The cells were further incubated in these tubes for 21 days. The medium was changed every 2–3 days. The production of proteoglycans being specific for cartilage was visualized with Toluidine Blue and Safranin-O staining (Fig. 4).

Intralesional treatment of tendons with AT-MSCs

Fourteen days after creation of the lesions, horses were sedated with detomidine hydrochloride (0.015 mg/kg bwt (IV)) and butorphanol (0.025 mg/kg bwt (IV)), the hair over the palmar metacarpal region was clipped, the skin was prepared aseptically and the Nn. palmares lateralis and medialis were anaesthetized with 2.5 ml of 2% mepivacaine solution.

The core lesion of one randomly assigned SDFT of each horse was injected with 10×10^6 AT-MSCs suspended in 1 ml of inactivated autologous serum, whereas the lesion in the contralateral SDFT was injected with 1 ml of inactivated autologous serum to serve as an intra-individual control. Randomization was carried out by flipping a coin and the operator was not blinded to the treatment modality.

Limbs were positioned manually to ensure equal weight bearing. For the ultrasound-guided intralesional injection, a 22-G needle was inserted from lateral at two sites (3 and 5 cm proximal to the surgical scar in the skin) and per site 0.5 ml of the inactivated serum containing AT-MSCs (AT-MSC-serum group) or inactivated serum alone (serum group) were injected intralesionally, respectively. Care was taken that the injection proceeded without resistance. A bandage was applied for 10 days and changed every second day.

Exercise programme

All horses were subject to a standardized hand-walking exercise programme as described previously by Bosch et al. [45] (Additional file 1) on firm flat ground mainly in straight lines. Horses were turned to the left and to the right equally often. Trotting exercise was carried out on a treadmill at 3.1 m/s.

Clinical and ultrasonographic examinations

A general clinical examination (body temperature, heart rate, respiratory rate, appetite, limb function and comfort level) was performed daily.

Preoperatively, prior to intralesional injection at 2 weeks after surgery, and 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, 21 and 24 weeks postoperatively, limbs were assessed clinically,

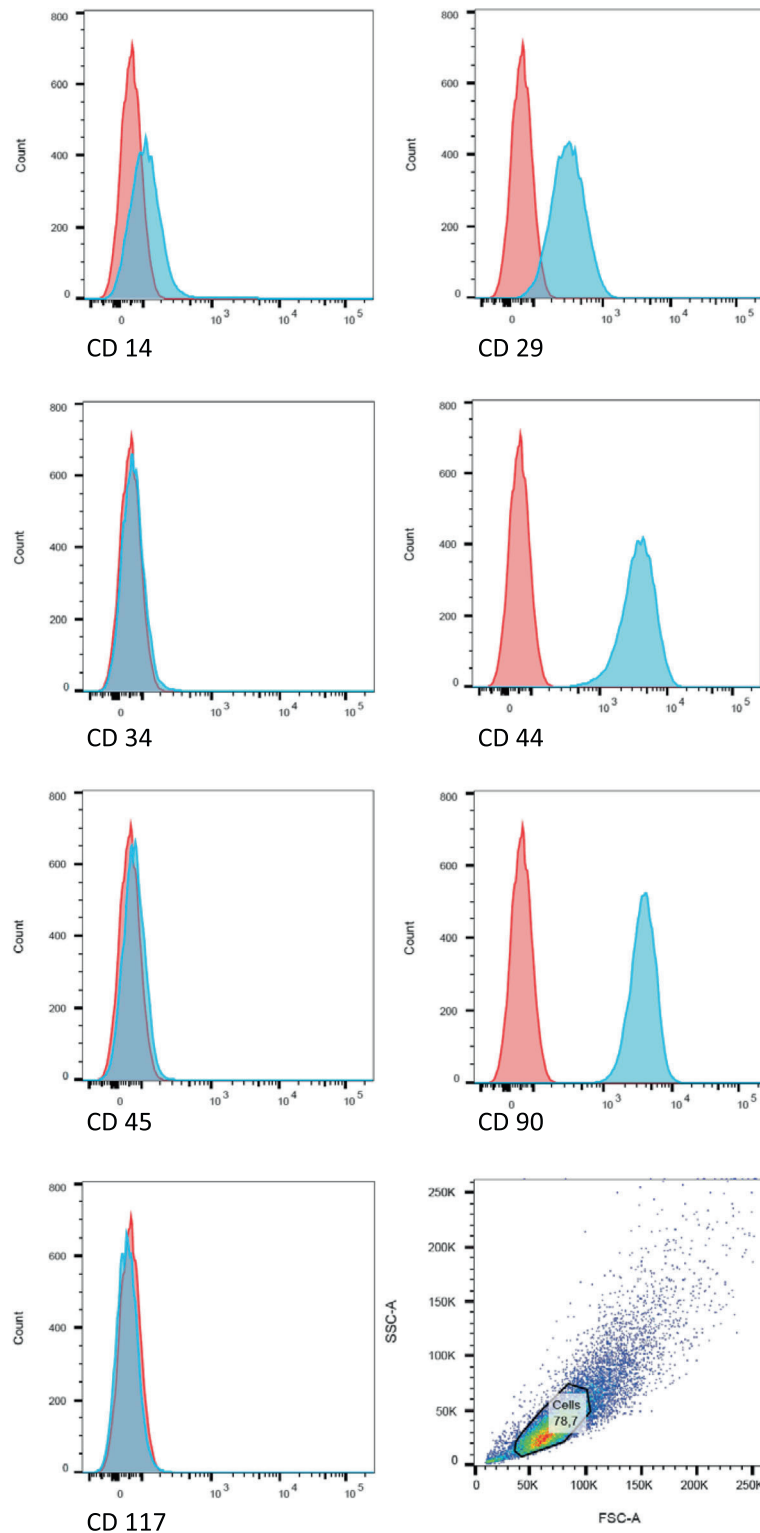


Fig. 1 Flow cytometric analysis of cultured AT-MSCs from a representative study horse. Histograms indicate the immunophenotype of AT-MSCs for CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD90 and CD117. Results are displayed for the distribution of immunostained (*green*) and unstained (*red*) AT-MSCs. All stained cells were positive for CD29, CD44 and CD90 while the signal for CD14 was weaker. No signal was detected for CD34, CD45 and CD117 (Colour figure online)

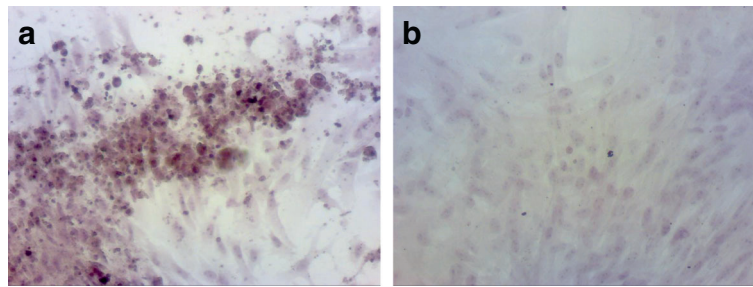


Fig. 2 Adipogenic differentiation of equine AT-MSCs from a representative study horse. Photomicrographs of AT-MSCs (passage 2) taken 28 days after induction of adipogenic differentiation (**a**). After Oil Red staining a high number of intracellular lipid-containing vesicles was detected compared with the control without differentiation medium (**b**) (Colour figure online)

via B-mode ultrasonography and with UTC. SDFT swelling was determined by palpation as an increase in diameter relative to normal tendon (0 = no increase, 1 = increase by factor 1.5; 2 = increase by factor 1.5–2; 3 = increase by more than factor 2) [56, 64, 65], skin temperature over the SDFT was assessed manually (0 = no abnormality; 1 = mild abnormality; 2 = moderate abnormality; 3 = severe abnormality) and surgical skin wounds and injection sites were inspected. Lameness was evaluated at walk during the first 18 weeks post surgery, and additionally at trot from weeks 19 to 24 by an experienced equine clinician being blinded to the treated limb (five-grade score) [66].

Prior to ultrasonographic examinations, horses were sedated with romifidine (0.04–0.08 mg/kg bwt (IV)) and butorphanol (0.02 mg/kg bwt (IV)), and the hair on the palmar aspect of the metacarpus was clipped and shaved. The skin was washed with soap and degreased with alcohol, and contact gel for ultrasound examination was applied copiously. B-mode ultrasound examination was carried out with a 6–15 MHz ultrasound probe (GE ML 6-15; GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA) connected to a Logiq E9 (GE Healthcare) using a standoff pad and constant settings (frequency 13 MHz, gain 52, depth 25 mm, single focal zone set at 15 mm depth). The palmar metacarpus was divided into examination zones from proximal to distal in the transverse (1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 3C) and longitudinal plane (1, 2, 3) as described earlier [67, 68]. Images were stored digitally and analysed with a DICOM workstation programme (easy-IMAGE®, easyVET®; IFS Informationssysteme, Hannover, Germany). The cross-sectional area (CSA) of the SDFT was determined on all transverse images. Values for each examination zone were added to calculate the total cross-sectional area (TCSA). Echogenicity and fibre alignment were graded semi-quantitatively on longitudinal images of each zone. Echogenicity was assigned a score of 0 (normoechoic), 1 (hypoechoic), 2 (mixed echogenicity) or 3 (anechoic) and fibre alignment was graded according to the estimated percentage of parallel fibre bundles in the

lesion: 0 (>75%), 1 (50–74%), 2 (25–49%) and 3 (<25%). Scores for all levels were summarized to calculate the total echo score (TES) and the total fibre alignment score (TFAS), respectively [68]. All measurements were performed by two experienced examiners blinded to treatment modalities (FR, MH). Values for TCSA and scores for TES and TFAS from both examiners were averaged.

For the UTC examination, a 10-MHz ultrasound probe (10 L5 Smartprobe; Terason Ultrasound, Teratech Corporation, Burlington, MA, USA) connected to a laptop computer (MacBook Pro® 17 inch; Apple, Cupertino, CA, USA) loaded with software for data acquisition and analysis (UTC™ Software V.1.0.1 2010; UTC Imaging, Stein, the Netherlands) was used. The probe was fixed in a motorized tracking device with built-in standoff pad (UTC-Tracker™; UTC Imaging). Settings (depth, gain, focal zone) were standardized, and all examinations were performed by the same operator (FG) with the horse bearing weight equally on both forelimbs. With the help of the tracking device, the probe moved automatically from proximal to distal at constant speed over a distance of 12 cm. Sampling of transverse images was conducted every 0.2 mm, including the surgical site as the reference point for the analysis. The compiled 600 transverse US images were reconstructed into a three-dimensional data block of US information and stored digitally until the end of the examination period. The stability of the echo pattern of corresponding pixels in contiguous transverse images was analysed (UTC2011° Analyser V1.0.1; UTC Imaging). The following echo types were discriminated: those generated by intact and fully aligned fascicles (echo type I, green), those generated by discontinuous and less aligned fascicles (echo type II, blue), those generated by a mainly fibrillary matrix with accumulation of collagen fibrils not (yet) organized into fascicles (echo type III, red) and those generated by an amorphous matrix and fluid (echo type IV, black). A 4-cm-long tendon segment from 2 to 6 cm proximal to the scar in the epitenon was selected for analysis by one examiner (FR), being blinded to the treatment modality. Within this segment, every fifth

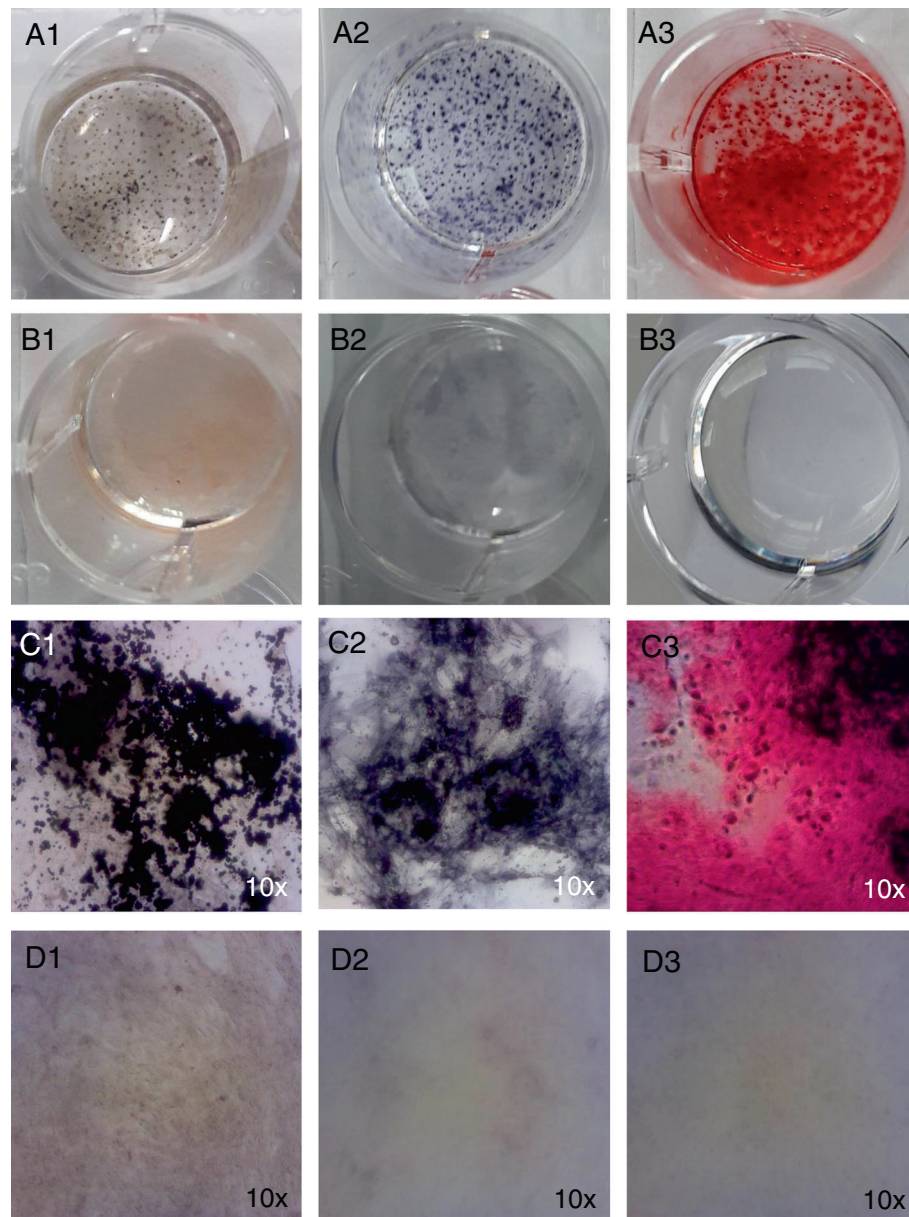


Fig. 3 Osteogenic differentiation of equine AT-MSCs from a representative study horse. Photomicrographs of AT-MSCs (passage 2) taken on day 28 after induction of osteogenic differentiation (A1–A3; C1–C3). By contrast to controls without differentiation medium (B1–B3; D1–D3), deposition of extracellular calcium was detected by alkaline phosphatase (A1, C1), von Kossa staining (A2, C2) and Alizarin red staining (A3, C3) (Colour figure online)

colour-coded transverse image (distance between images 1 mm) was used to place a circular cursor (\varnothing 5 mm) in or around the central core lesion, depending on its size. These contours were interpolated and ratios of echo types were analysed quantitatively as fractions of the determined volume. Mean values for the proportion of each echo type were calculated for all horses and for all time points. Ten scans obtained at different time points and from different horses were chosen randomly and analysed twice by the

same examiner to determine the intra-observer reliability and by three examiners to determine the inter-observer reliability.

Euthanasia and tissue harvest

Twenty-four weeks after creation of the lesion, all horses were sedated and anaesthesia was induced using a standard protocol. Thereafter, the horses were euthanized with pentobarbital (90 mg/kg bwt (IV)).

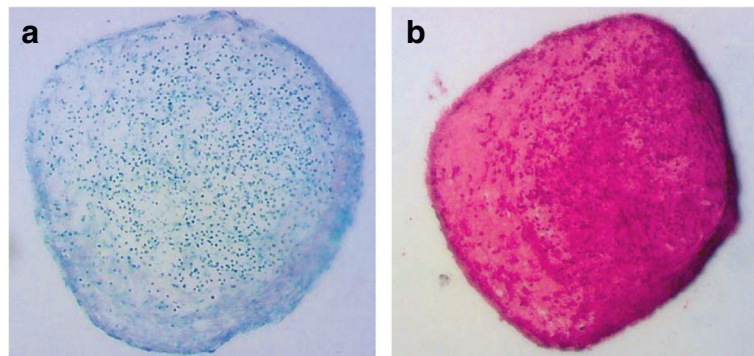


Fig. 4 Chondrogenic differentiation of equine AT-MSCs from a representative study horse. Photomicrographs of AT-MSCs (passage 2) taken on day 21 after induction of chondrogenic differentiation. The presence of glycosaminoglycans and collagen was detected by Toluidine Blue (**a**) and Safranin O (**b**) (Colour figure online)

Each SDFT was excised at the level of the carpus and the fetlock and the scar of the former surgical entrance to the tendon was identified. A transverse segment of 1 cm was harvested from the lateral half of the SDFT between 2 and 3 cm proximal to the entrance portal. The half-core of the lesion could easily be identified in this segment and was excised with a microtome blade and cut into three pieces that were snap frozen and stored at -80°C for biochemical analysis. Macroscopically normal reference tissue was harvested from an equivalent 1-cm-long segment taken between 12 and 13 cm proximal to the entrance portal; that is, in the proximal metacarpal region at least 5 cm away from the proximal end of the core lesion.

The medial halves of the SDFT segments 2–7 cm proximal and 13–18 cm proximal to the epitenon scar (macroscopically normal control tissue) were obtained for biomechanical testing and stored in PBS-soaked gauze at -20°C until analysis. The lateral half of the segment 4–6 cm proximal to the epitenon scar was collected for histological analysis, fixed in 4% paraformaldehyde for 7 days and stored in PBS at 4°C until embedding in paraffin. Later, 5- μm longitudinal slices of the core lesion including adjacent tissue were cut starting from the centre of the tendon and stained with haematoxylin and eosin (H&E).

Histologic examination

The centre of each tendon was independently judged by two observers blinded to horse and treatment (FG, FR). In total, five high-power fields (40 \times magnification) per section were examined with a light microscope (Leitz Laborlux 12; Leica, Wetzlar, Germany) using an established score [45, 60] (Additional file 2). Score values determined by each observer were calculated for each parameter before score values of both examiners were averaged.

Biochemical analysis

Glycosaminoglycans and DNA analysis

After lyophilization of tendon samples, the dry weight was determined and they were digested overnight at 60°C in 400 μl papain solution (2 mM cysteine, 1 U/ml papain, 50 mM NaH_2PO_4 and 2 mM EDTA, pH 6.5). A modified 1,9-dimethylmethylene blue (DMMB) dye binding assay was used to analyse the sulphated GAG concentration [45].

To a 20 μl sample, 10 μl of 3% (w/v) bovine serum albumin and 250 μl of reagent (46 μM DMMB, 40 mmol/l glycine and 42 mmol/l NaCl adjusted to pH 3.0 with HCl (hydrochloric acid)) were added, and the absorbency at 525 and 570 nm was measured after 30 min. The assay was standardized with shark chondroitin sulfate (1–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Quantification of total DNA was performed utilizing the reaction of fluorescent dye [69]. Briefly, 2 ml Hoechst 33258 (Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) fluorescent dye solution (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 10 mM Tris, 1 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA), 0.1 M NaCl pH 7.4) was added to an 80 μl sample and, immediately after mixing, fluorescence was measured using a LS-50B fluorimeter (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), with excitation at 352 nm and emission at 455 nm. Salmon sperm (0–20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was used as a standard. All results were expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight tendon.

Collagen and crosslink analysis

Tendon samples were hydrolysed (110°C , 18–20 h) in 600 μl of 6 M HCl for mass spectrometric determination after lyophilizing for 24 hours. Hydroxyproline (Hyp) was determined as a measure of total collagen content, and the amino acid lysine (Lys), hydroxylysine (HLys, a measure for the degree of lysine hydroxylation) and the pyridinoline crosslinks hydroxylysylpyridinoline (HP) and lysylpyridinoline (LP) as measures for the post-translational modifications of collagen. To the hydrolyzed tendon samples,

200 μ l of 2.4 mM homo-arginine was added after which the samples were vacuum-dried and dissolved in 20% acetonitrile containing 1.2 mM of tridecafluoroheptanoic acid. Samples were centrifuged at $13,000 \times g$ for 10 min. Supernatants were subjected to high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS), using a 4000 Q-TRAP mass spectrometer (MDS Sciex, Foster City, CA, USA) at a source temperature of 300 °C and a spray voltage of 4.5 kV. Amino acids were separated on a Synergi MAX-RP 80A column (250 \times 3 mm, 4 μ m; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) at a flow rate of 400 μ l/min, using a gradient from MilliQ® water to acetonitrile, both containing 1.2 mM of tridecafluoroheptanoic acid and 2.5 mM ammonium acetate. Amino acids were identified by MS in multiple reaction mode using the mass transitions 429.3/82.0 (HP), 413.3/84.0 (LP), 189.2/143.7 (homo-arginine), 147.2/130.2 (Lys), 163.2/128.1 (HLys) and 131.8/67.8 (Hyp). Data were related to the recovery of internal standard. Collagen content was calculated as follows:

$$\text{Collagen } (\mu\text{g}) = [\text{Hyp (pmol)} / 300] \times 0.3$$

where 300 is the number of Hyp residues in one collagen triple helix and 0.3 is deduced from the molecular weight of collagen (30,000 Da).

Biomechanical testing

Tendon specimens were thawed at room temperature for approximately 2 hours before trimming. Two strips of 2 \times 2 mm width and 50 mm length were cut from the visible lesion and a single strip was harvested from a tendon segment with macroscopically normal tissue (further proximal to the lesion site) from each tendon using a custom-designed cutting device [45, 70]. Specimens were marked and stored in PBS-soaked gauze at 4 °C and tested within 2 hours. Before testing, the exact CSA was measured at four locations along the length of the specimen using a laser device (Laser Micro Diameter LDM-110; Takikawa Engineering, Japan) and the average CSA was calculated. Strips were fixed in the loading device of a universal materials testing machine (Zwick 1445; Zwick, Germany) in a PBS bath and preconditioned with 3% strain at 1 Hertz for seven cycles. After that, specimens were loaded to failure with 0.5 mm/s. For each specimen, force (F) and displacement were recorded. The stress at failure (σ_{max}) was calculated as follows:

$$\sigma_{\text{max}} = F_{\text{max}} / \text{CSA} \text{ (N/mm}^2 \text{ = MPa)}$$

and the modulus of elasticity was derived from the linear part of the stress–strain curve [45, 61]. Results of the two specimens taken from macroscopically normal tissue (left and right SDFTs) were pooled in one group.

Statistical analysis

Clinical, B-mode ultrasound, UTC, histology and biochemistry data were analysed using SAS® 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The assumption of a normal distribution of quantitative parameters was examined using the Shapiro–Wilk test and visual assessment of distributions. In normally distributed samples, parametric methods were used: *t* test for paired observations and analysis of variance for calculation of variance components (intra-class correlation coefficient (ICC)). Otherwise, non-parametric tests (Kruskal–Wallis test and Wilcoxon two-sample test) were applied.

Data from biochemical testing, which were partly not normally distributed, were tested using the Wilcoxon signed-rank test (R version 3.0.2; The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The Kruskal–Wallis test was used to compare CSAs of specimens, stress at failure and modulus of elasticity among all three tested groups. Individual comparisons of the three groups (AT-MSC-serum, serum, macroscopically normal tissue) were performed using a Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction for multiple testing.

A significance level of $\alpha = 0.05$ was applied. Intra-observer and inter-observer repeatability of UTC measurements and histology scores were calculated using the ICC. A repeatability value > 0.75 was considered excellent, 0.75–0.4 as fair to good and < 0.4 as poor [71]. Proc NESTED and Proc VARCOM were used for calculation of the coefficient of variance.

Results

Lesion creation, adipose tissue harvest and intralesional treatment

Surgical creation of core lesions was successful in all limbs; the epitenon was not damaged inadvertently in any case. Harvest of adipose tissue, isolation and culture of AT-MSCs was carried out without complications. Immunophenotyping and trilineage differentiation of cultured cells showed typical characteristics of MSCs (Figs. 1, 2, 3 and 4) [72].

Intralesional injections were uneventful in all horses.

Clinical examination

No lameness was evident at walk until week 17 and at walk and trot from week 18 to 24. All horses developed an increase in skin temperature over the SDFT during the course of the experiment, without differences between the groups. Mild to moderate swelling of the palmar metacarpal region was palpable in both groups after induction of lesions. This swelling decreased markedly until 3 weeks and increased markedly again until week 8 after injection in all limbs. Scores for palpable swelling remained consistently high in the serum group, while they decreased continuously in the AT-MSC-serum group. This difference



was weakly significant ($p = 0.0497$) at 21 weeks after surgery. At the end of the observation period, palpable SDFT swelling was mild in all horses. Two horses developed cellulitis in the region of the surgical entrance, which healed without pharmaceutical intervention.

B-mode ultrasonography

All horses developed bilateral tendon core lesions with an ultrasonographic morphology similar to naturally occurring tendon disease. There were no significant differences in TCSA, TFAS (Fig. 5) and TES between the groups at any point in time. Mean TCSA increased markedly in both groups until 4 weeks and reached its maximum at 8 weeks after lesion induction (AT-MS-serum, 803 mm², serum, 793 mm²). TFAS increased similarly and peaked at week 5 after lesion induction (Fig. 5). TCSA and TFAS decreased again until week 10.

Ultrasound tissue characterization

Intra-class correlation for UTC measurements was excellent for intra-observer reliability (0.99) and inter-observer reliability (0.80–0.97 depending on echo type).

The development of echo type ratios within SDFT lesions over time is shown in Fig. 6. There was a strong decrease of structure-related echo types I and II until week 5 after lesion induction (Fig. 6a, b) and a concomitant increase of non-structure-related echo types III and IV in both groups (Fig. 6c, d), indicative for tissue damage, loss of structural organization and inflammatory response. Echo type III ratios indicating fibrillogenesis peaked between weeks 6 and 8 postoperatively in both groups. Echo type II ratios increased from weeks 6 to 18, which is indicative for a fibrillary matrix being organized into fascicles that are not yet aligned properly. The significantly higher ratio of echo type II in the AT-MS-

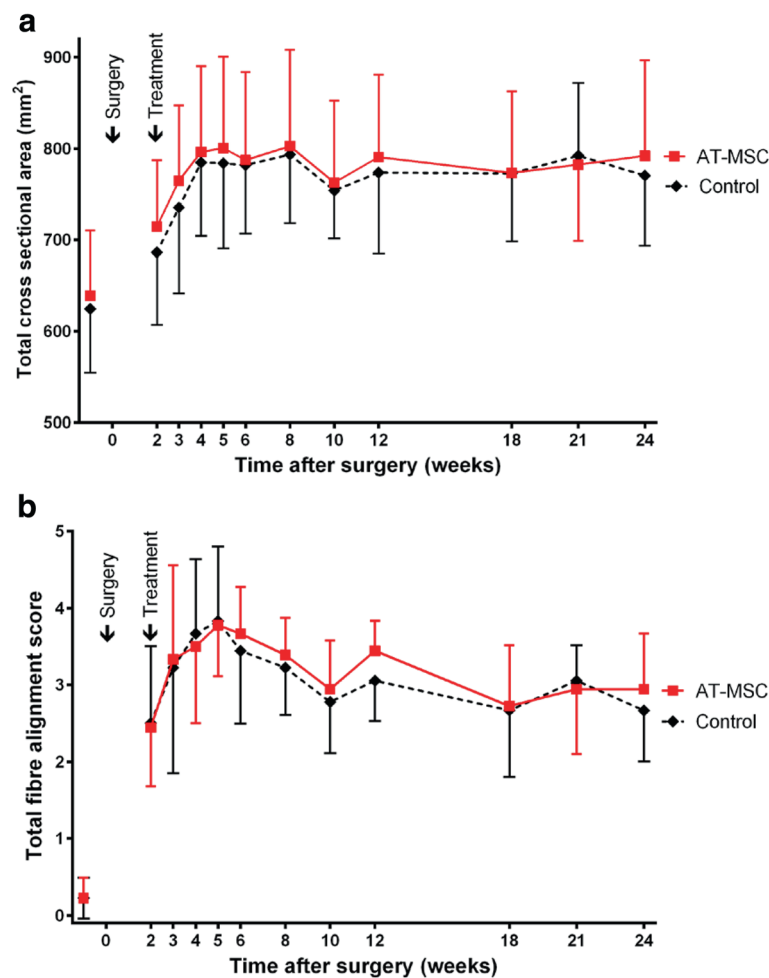
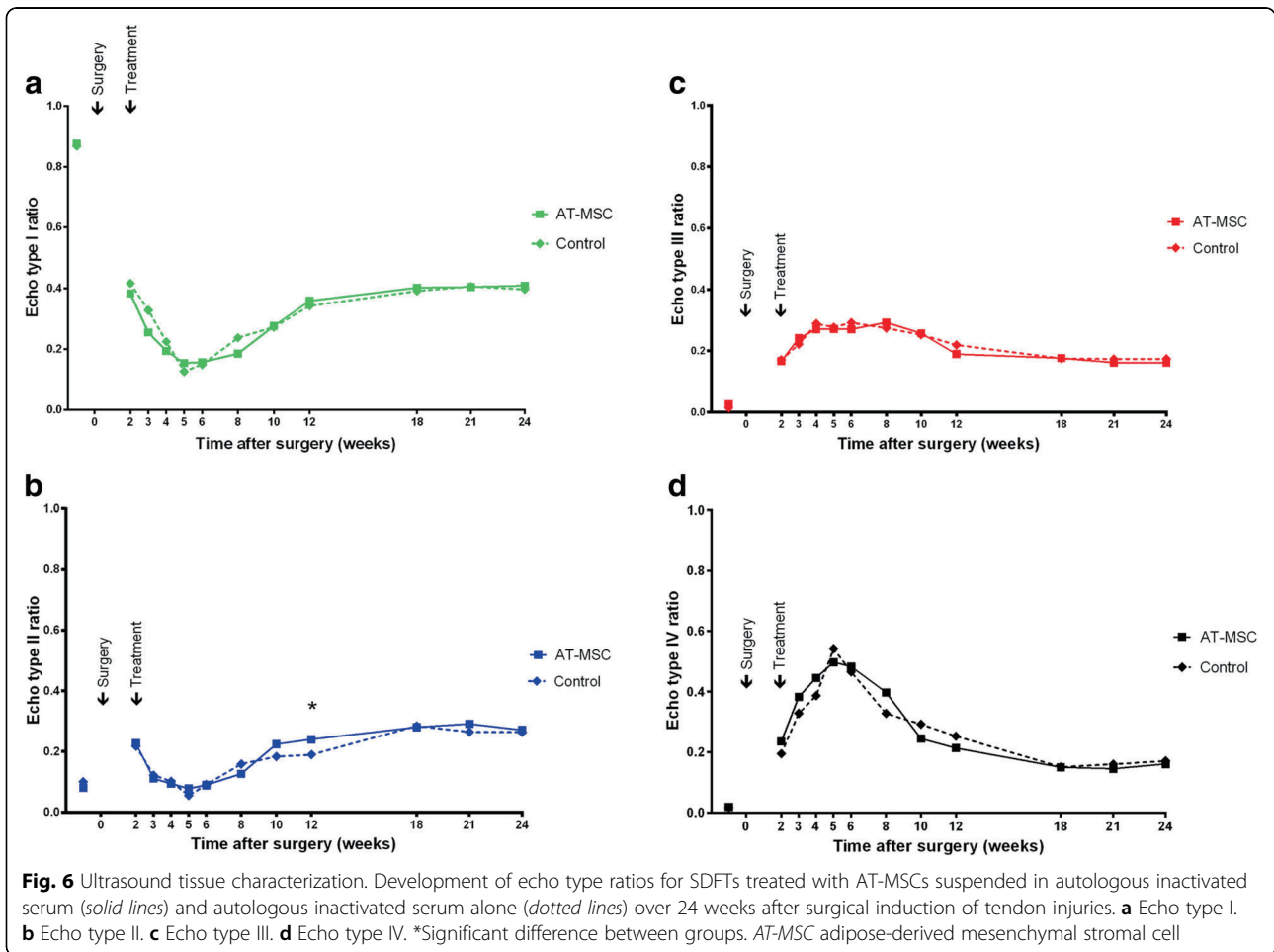


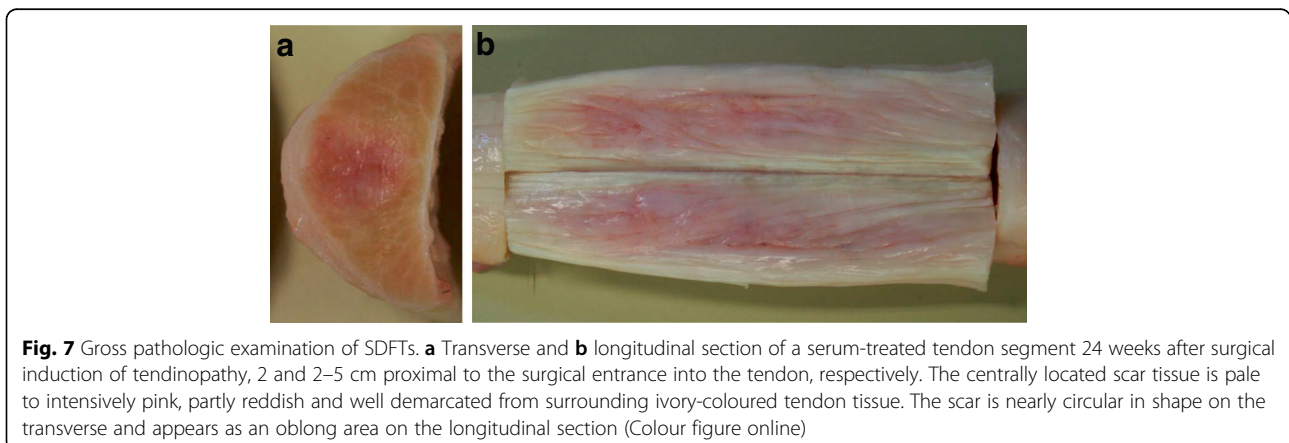
Fig. 5 B-mode ultrasonographic parameters. Development of ultrasonographic scores (mean \pm SD) of SDFTs treated with AT-MSCs suspended in autologous inactivated serum (solid lines) and autologous inactivated serum alone (dotted lines) over 24 weeks after surgical induction of tendon injuries. **a** TCSA. **b** TFAS. AT-MS adipose-derived mesenchymal stromal cell



serum group in week 12 post surgery ($p = 0.0326$) may be indicative for increased remodelling (Fig. 6b). Simultaneously there was an increase in echo type I ratios without any differences between the groups. From week 12 post surgery onwards, all echo type ratios did not change markedly until the end of the study.

Gross pathologic examination

At post-mortem gross examination, injection sites were still visible as two unilateral swellings of the lateral aspect of the tendon. Scar tissue was visible within the centre of the tendons as the core lesion (Fig. 7). Macroscopically, there were no differences visible between the groups.





DNA, GAG, collagen and crosslink content

The dry weight of samples from AT-MSC-serum-treated and from serum-treated tendon lesions as well as samples from macroscopically normal tissue from the same tendons did not differ significantly ($p > 0.05$). The contents of GAG, DNA, Hyp, total collagen, HP, LP and HLys did not differ between lesions from the AT-MSC-serum group and the serum group. Tendon lesions treated with AT-MSC-serum and those treated with serum alone contained both more GAG (AT-MSC-serum, $p = 0.0078$; serum, $p = 0.0039$) and DNA (AT-MSC-serum, $p = 0.0039$; serum, $p = 0.0039$) and less Hyp (AT-MSC-serum, $p = 0.0195$; serum, $p = 0.0078$) and total collagen (AT-MSC-serum, $p = 0.0195$; serum, $p = 0.0078$) than macroscopically normal tissue from the same tendons (Table 1). LP and HLys content was the same in tendon lesions treated with AT-MSC-serum and serum alone and in macroscopically normal tissue ($p > 0.05$). Tendons treated with AT-MSC-serum had the same HP content as tendons treated with serum alone ($p = 0.25$) and macroscopically normal tendon tissue ($p = 0.0742$). By contrast, normal tendon tissue contained more HP than tendon treated with autologous inactivated serum alone ($p = 0.0273$).

Histology

Intra-class correlation for histology scores was excellent for inter-observer reliability (0.77–0.97 depending on score/sub-score). The lesions could be identified clearly on all H&E-stained slices. Histology was indicative for an incomplete restoration of structural integrity and a high metabolic activity (Fig. 8). There were no significant ($p < 0.05$) differences between the AT-MSC-serum and serum groups alone with respect to total scores, scores for fibre arrangement, scores for metabolic activity and sub-scores for fibre structure, fibre alignment, morphology

of tenocyte nuclei, variations in cell density or vascularization. Scores for structural integrity and metabolic activity remained high after the 24-week observation period (Fig. 9).

Biomechanical testing

Cross-sectional areas of tendon strips were not significantly different between AT-MSC-serum-treated lesion tissue, serum-treated lesion tissue and macroscopically normal tendon tissue ($p = 0.11$). Stress at failure and modulus of elasticity did not differ between AT-MSC-serum-treated tendons and those treated with serum ($p = 1$) (Fig. 10). Compared with macroscopically normal tendon tissue, stress at failure and modulus of elasticity were significantly lower in AT-MSC-serum-treated lesion tissue ($p = 0.048$ and $p = 0.001$, respectively) as well as in serum-treated lesion tissue ($p = 0.004$ and $p = 0.002$, respectively).

Discussion

Standardized central lesions were successfully induced in the SDFT of horses and longitudinally followed using standard and more sophisticated monitoring techniques for 24 weeks before in-depth histological, biochemical and biomechanical tissue analysis.

The current study shows that a single treatment with 10×10^6 AT-MSCs suspended in inactivated autologous serum does not have a lasting effect on signs of inflammation and does not substantially improve ultrasonographic histologic, biochemical or biomechanical characteristics of surgically created SDFT core lesions over a 24-week period compared with inactivated autologous serum alone. However, the fact that the hydroxylysylpyridinoline (HP) content in the AT-MSC-serum treatment group is closer to the normal situation may potentially indicate improved collagen crosslinking.

Table 1 Biochemical parameters of SDFTs treated with AT-MSCs suspended in autologous inactivated serum (AT-MSC-serum) and autologous inactivated serum alone (serum) and macroscopically normal tendon tissue (normal) from the same tendons 22 weeks after treatment

Parameter	Group		
	AT-MSC-serum (n = 9)	Serum (n = 9)	Normal (n = 18)
DNA ($\mu\text{g}/\text{mg dwt}$)	3.91 ± 0.96^a	4.24 ± 1.31^a	1.99 ± 0.30^b
GAG ($\mu\text{g}/\text{mg dwt}$)	21.38 ± 11.44^a	26.80 ± 10.26^a	6.47 ± 1.16^b
Hyp (mg/mg dwt)	0.067 ± 0.001^a	0.062 ± 0.012^a	0.083 ± 0.009^b
Total collagen (mg/mg dwt)	0.510 ± 0.076^a	0.469 ± 0.093^a	0.635 ± 0.071^b
HP (mol/mol col)	0.196 ± 0.025^{ab}	0.184 ± 0.026^b	0.238 ± 0.040^a
LP (mol/mol col)	0.016 ± 0.005^a	0.017 ± 0.007^a	0.013 ± 0.005^a
HLys (mol/mol col)	6.90 ± 1.76^a	7.39 ± 2.37^a	7.38 ± 1.96^a

Values presented as mean \pm standard deviation

col collagen, dwt dry weight, GAG glycosaminoglycans, HLys Hydroxylysine, HP hydroxylysylpyridinoline, Hyp Hydroxyproline, LP lysylpyridinoline, AT-MSC adipose-derived mesenchymal stromal cell, SDFT superficial digital flexor tendon

^{a,b}Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatment groups

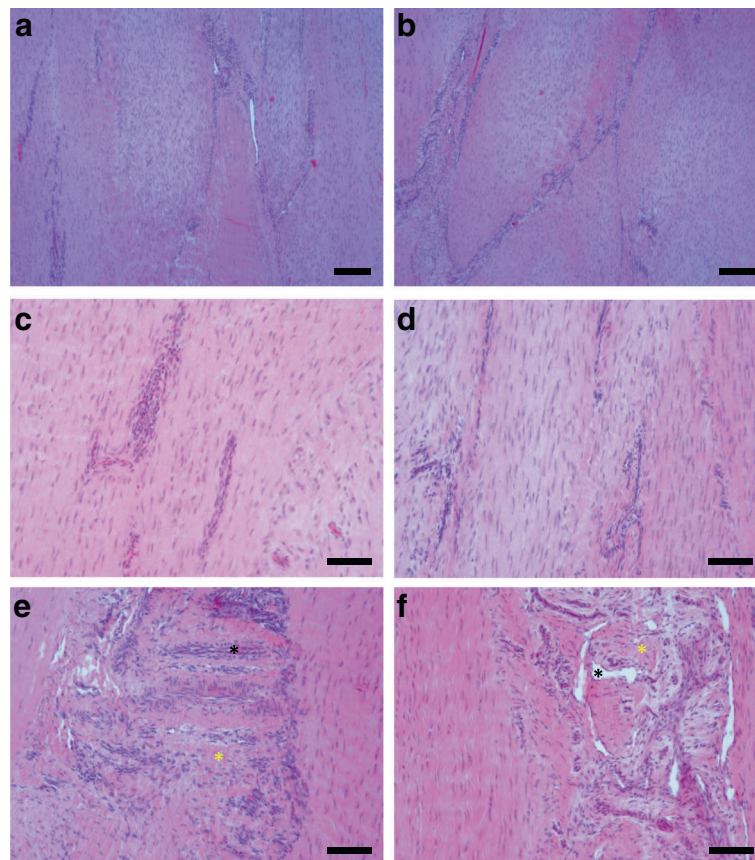


Fig. 8 Histology of surgically induced SDFT lesions 22 weeks after treatment. **a–f** Longitudinal specimens of tendon lesions treated with AT-MSCs suspended in autologous inactivated serum (**a, c, e**) and autologous inactivated serum alone (control; **b, d, f**) stained with H&E (**a, b**, scale bar = 200 μ m; **c, d, e, f**, scale bar = 100 μ m). Fibril arrangement was mostly unidirectional (**a–d**), with some cases showing large regions without any regular fibre arrangement (**e, f**; yellow asterisk) in both groups. Specimens showed variations in cell density (**a–d**) and regions with high cellularity and vascularization after both treatment modalities (**e, f**; black asterisks) (Colour figure online)

Hydroxylysine (HLys) is produced during a post-translational enzymatic modification process in tendon and is needed for the formation of the mature crosslinks HP and LP [73, 74]. Newly formed collagen within a lesion is less crosslinked than in mature tissue, which was most likely caused by enzymatic cleavage after the surgical trauma and the subsequent formation of more stable crosslinks during the remodelling phase resulting in repair tissue with higher tensile strength and stiffness [75].

The HP crosslink concentration per molecule of collagen in our study was the same in normal tissue as in AT-MSC-treated lesion tissue while lesion tissue treated with inactivated serum alone contained significantly less HP than macroscopically normal tissue. Despite the lack of significance between the AT-MSC-serum and serum groups this might be interpreted as a sign of superior crosslinking; that is, a better or more advanced repair after AT-MSC treatment.

The contents of lesion tissue in HLys and in LP as expressed per molecule of collagen were the same in tendon lesions treated with AT-MSC-serum and serum alone and in macroscopically normal tissue, showing that these post-translational modifications were by contrast not affected by creation of the lesions and the treatment modalities.

An increased GAG content of healing tendon lesions reflects a high tenocyte metabolism and an increased production of extracellular matrix. There is controversy about increased GAG content in tendon repair: on the one hand, degenerated tendon regions including fibrous scar tissue have been shown to contain higher concentrations of sulphated GAGs than normal tendons in humans and horses [76–78]. On the other hand, an increased GAG content as expressed per DNA has been interpreted as a sign of improved tendon healing in a recent equine study after intralesional platelet-rich plasma (PRP) treatment [45]. Interestingly, GAG contents of

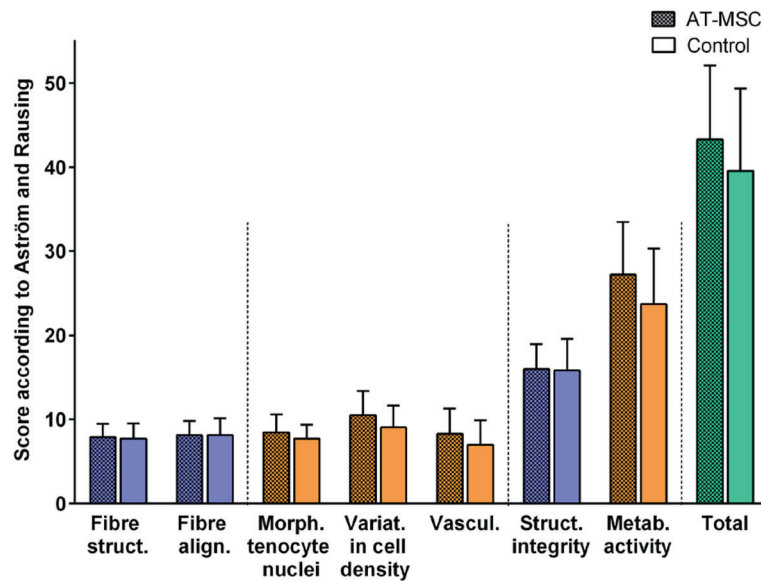


Fig. 9 Histomorphological scores (Aström and Rausing [60], modified by Bosch et al. [45]). Mean histomorphological scores (\pm SD) for surgically induced SDFT lesions treated with AT-MSCs suspended in autologous inactivated serum (AT-MSC) and with autologous inactivated serum alone (control) 22 weeks after treatment. Total scores (green) include values from sub-scores for fibre structure (*struct.*), fibre alignment (*align.*), morphology (*morph.*) of tenocyte nuclei, variations (*variat.*) in cell density in cell density and vascularization (*vascul.*). Scores for structural (*struct.*) integrity and metabolic (*metab.*) activity summarize values from sub-scores displayed in blue and red, respectively. Scores and sub-scores did not differ between treatment modalities ($p < 0.05$). AT-MSC adipose-derived mesenchymal stromal cell (Colour figure online)

saline-treated control tendons in the latter study and in another study testing a plasma product [79] were similar to the GAG content in both groups of the current study using the same surgical model of tendinopathy, respectively. This also corresponds well to findings in naturally injured SDFTs that were saline treated and contained significantly more GAG than corresponding BM-MSC-treated as well as untreated control tendons, which were

relatively uninjured [13]. In the current study, GAG contents in tendon lesions were higher than in normal SDFT tissue from more proximal regions of the injured tendons. These GAG contents in turn were very similar to those from mid-metacarpal SDFT tissue from mature horses in another study [80], suggesting that the proximal metacarpal region is suitable as a control to compare biochemical parameters of mid-metacarpal SDFTs

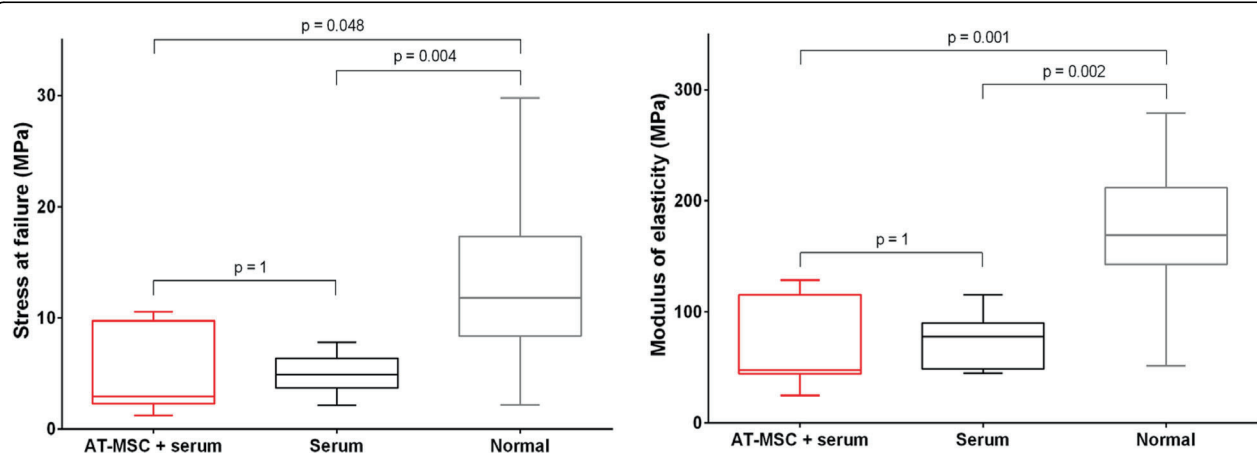


Fig. 10 Biomechanical parameters. Stress at failure and modulus of elasticity (measure of tensile stiffness of materials) of surgically induced SDFT lesion tissue treated with AT-MSCs suspended in autologous inactivated serum (AT-MSC + serum) and autologous inactivated serum alone (serum) 24 weeks after creation of lesions and 22 weeks after treatment. Macroscopically normal tendon tissue (normal) was harvested from a proximal segment of the same tendons. AT-MSC adipose-derived mesenchymal stromal cell

and that SDFTs did not reach normal GAG content after treatment at the end of the observation period in the current study [80, 81], which implies that the end stage of healing had not been reached.

In the current study, lesions treated with AT-MSCs had the same content in total collagen and Hyp as tendons treated with autologous inactivated serum alone. Although replacement of tenocytes with new ones resulting from tenogenic differentiation after engraftment of MSCs with consecutive production of extracellular matrix (e.g. collagen, GAG) is a potential mechanism of the therapy used [28], the findings do not support that this mechanism of action played a major role in the current study.

Collagen and Hyp contents, however, were significantly lower than in macroscopically normal tendon tissue which contained as much collagen as unaltered tissue in a previous study [82]. The finding that lesion tissue contains less collagen than normal tendon is in accordance with a previous study using the same model [47].

Collagen types could have been differentiated between the more elastic type I and type III in the current study. However, MSCs as well as autologous serum have the potential to influence the expression of these collagen types during tendon repair [32, 62, 65]. The time frame in which expression of the collagen type I to III ratio reaches its optimum during the remodelling phase has not been clearly defined [41], so it remains unclear whether differentiation of collagen types would have helped to show which treatment modality was more beneficial in the current study.

Collagen content correlates positively with the modulus of elasticity representing stiffness and with the stress at failure of the tendon strips in the current study, because both parameters were significantly lower in lesion tissue than in macroscopically normal tendon tissue. This is a typical characteristic of scar tissue with low maturity [61] and also proves that tendon healing was still ongoing at the terminal stage of the current experiment. It has to be concluded that AT-MSCs did not significantly influence the biomechanical properties in surgically created SDFT lesions 22 weeks after treatment, as did PRP in a similar model [45]. Stress at failure, one of the most important indicators for tensile strength of tendons [61], was significantly lower after AT-MSC-serum treatment and after treatment with serum alone than in macroscopically normal tendon tissue harvested from a proximal segment from the same tendons. Based on the knowledge that intact tendon tissue from the proximal metacarpal region normally has similar biomechanical properties as tissue from the mid-metacarpal region [83], this finding suggests that scar tissue has not regained its original strength 22 weeks after AT-MSC treatment. Findings from the present study show that it is beneficial to include macroscopically

normal tissue as a second control group during biomechanical testing as an intra-individual reference for normal tendon tissue which was not reported in similar studies previously [45, 79].

Biomechanical properties of the repair tissue are closely related to functionality [45, 61, 84], which becomes clinically manifest by the recurrence rate of natural tendon disease in horses and to a lesser extent by persisting lameness [41]. Horses in the present study did not show signs of lameness until the end of the study period, which is in accordance with the observation that, in contrast to human patients with Achilles tendinopathy, chronic tendon pain does not play a major role in horses [23]. However, the sensitivity of clinical examination alone is limited to monitoring lameness, especially in cases of bilateral tendon injury [3]. This could have been improved by using computerized gait analysis, but this was not available during the experiment. The study period and the exercise regimen could have been extended to determine the recurrence rate of tendinopathy, one of the most reliable parameters of long-term functionality. However, this was considered ethically unacceptable in an experimental study.

Swelling of SDFTs, another clinical parameter of inflammation, was less (weak significance) in AT-MSC-treated tendons than in control tendons only at a single time point (i.e. at 21 weeks after lesion induction). Because the ultrasonographically determined tendon cross-sectional area (TCSA) did not differ between groups at any time, the findings during palpation might be attributed to a decrease in subcutaneous swelling rather than in tendon diameter. Swelling was determined by palpation, a diagnostic modality which is subject to some inaccuracy, so it remains questionable whether AT-MSCs really influenced subcutaneous swelling during the remodelling phase (e.g. by reflux of the cell suspension during treatment).

In the current study, no significant reduction of clinical signs of inflammation and no reduction of fluid and/or cell accumulation during ultrasonography were recorded after injection of AT-MSC-serum during the acute inflammatory phase when compared with the effect of serum alone, which corroborates earlier in-vivo findings [39] - although an increased echogenicity of collagenase-induced SDFT lesions was seen after AT-MSC application in a later study from the same group [40]. Another experimental in-vivo study using the same surgical model as in the current study showed a significant reduction of fluid and cell accumulation by means of UTC early after intralesional treatment with PRP, which was interpreted as a reduction of inflammation [45]. The authors of the current study would have expected similar effects after AT-MSC injection, because these cells are known to exert anti-inflammatory effects



[85–87]: human AT-MSCs led to a reduced inflammatory response in synovial cells from patients with osteoarthritis by inhibition of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6 [85]. Recently it has been shown in a canine model of tendon transection that collagen sheets seeded with AT-MSCs promote an anti-inflammatory M2-type macrophage phenotype [87]. Immunomodulatory actions of MSCs are thought to be dose and time dependent [29], so that a higher MSC dose, implantation at an earlier or later time point after lesion creation or repeated injections might have led to different results. To the authors' knowledge, no experimental data exist concerning the ideal dose and timing of MSC implantation [28, 88]. On the one hand, it is hypothesized that there is a direct positive dose–effect relation [89]; on the other, experimental data show cytotoxic effects of high MSC doses [90]. In a rabbit experimental study, BM-MSC–collagen composites were used to repair patellar tendon defects and MSC concentrations of 4×10^6 and 8×10^6 cells/ml did not lead to additional biomechanical and histological improvement compared with 1×10^6 cells/ml [91]. In the current study, the cell dose of 10×10^6 AT-MSCs was based on recommendations from previous clinical and experimental trials [23, 39, 92]. The time of injection might have been too late to induce early anti-inflammatory effects, which were achieved with PRP injections as early as 7 days after lesion creation in the same model of tendinopathy [45]. Although the ideal point of time for MSC treatment is not known [28], it is hypothesized that tendons should be treated after the initial inflammatory phase and before fibrous tissue has formed [88]. Advised times range from 7 to 30 days between lesion creation and treatment with adipose tissue-derived cells has been described in experimental studies [30, 39, 40]. Using high numbers of pure MSCs for treatment, cell culture per se implies a delay of cell injection. In a large clinical study, horses treated <5 weeks after injury had a lower re-injury rate than horses treated later, but this difference was not significant [93].

In the current study the authors decided to postpone the MSC injection for another week, because lesions seemed to be less developed at ultrasonography 7 days after induction than in previous studies using the same model [43, 45, 47], which might be attributed to the use of a different burr during creation of the lesions, to confinement of the horses to box rest instead of exercising them after lesion induction, or to the model itself. The surgical model ideally creates a compartment similar to that typically seen in degenerative strain-induced tendon disease [43, 47]. Creating these lesions requires general anaesthesia, which is a disadvantage, but this model is better standardized and considered less painful for horses than induction of core lesions with collagenase, a model which rather reflects the inflammatory component

of tendinopathy. The response to these interventions in terms of the expansion of the lesion seems to be less pronounced in the surgical model [42, 43]. The inflammatory response in the current study was most prominent relatively late - that is, at 5 weeks after surgery and 3 weeks after cell injection, as shown by UTC (peak in echo type IV) - so that at this time potential anti-inflammatory effects ascribed to AT-MSCs [85–87] might already have been weaker than the endogenous inflammatory response. In other words, the AT-MSCs could possibly not exert their effect adequately in an environment of only mild to moderate inflammation at the time of injection. Interestingly, in another in-vivo study using a collagenase model, AT-MSCs which were implanted 30 days after lesion creation (i.e. approximately 2 weeks later than in the current study) led to decreased inflammatory cell infiltration as determined by histology of biopsies at 30 and 120 days after treatment [39]. This finding suggests that later AT-MSC implantation at the end of a pronounced inflammatory phase might be more efficient, but the significant differences between both experimental models of tendinopathy may also play a role here.

Depending on the mode of action of MSCs implanted into tendon lesions (i.e. paracrine effects versus de-novo synthesis of tendon tissue), a decline of MSC population over time during the inflammatory and proliferative phase may be an explanation for the lack of substantial differences between the AT-MSC and control groups. Death of the MSCs is a potential reason: in an equine surgical model of tendinopathy, less than 5% of BM-MSCs survived more than 10 days and only 0.02% survived over 90 days after implantation [14]. Allogeneic embryonic stem like cells (ESCs), by contrast, were detectable at a constant level over 90 days in the same study, which shows that development of stem cells from different sources may vary after implantation. High numbers of AT-MSCs could be detected with different modalities as long as 9 weeks after implantation into surgically created SDFT lesions [94]. Labelled AT-MSCs injected into experimentally induced equine tendon lesions were partly found to remain viable and integrated in the lesion tissue after 24 weeks, although numbers of cells decreased over time, and MSCs could even be detected in SDFT lesions of the contralateral limb [95]. Together with the observation that labelled cells were retrieved in the peritendinous tissue near the injection site [94, 95], this implies a potential effect of the MSC treatment on the contralateral defect and a loss of MSCs effectively available in the treated lesion. Both effects may have limited the effect of the treatment.

It would have been valuable to test in the current trial whether the therapy exerted an anti-apoptotic effect on tenocytes, an effect which has been attributed to AT-



MSCs [87]. However, to address this it would have been necessary to take tendon biopsies to perform immunostaining with markers for apoptotic cells during the inflammatory phase, given the duration of the study. This was discarded because of the potential impact of the procedure on tendon healing. Further, the attraction of precursor cells as another potential mechanism of AT-MSC therapy is more relevant during early phases of tendon healing. Even after harvesting of tendon biopsies, it would have been a challenge to estimate this effect merely via determination of the cellularity, because there is no precursor cell-specific marker.

For injection, cells must be suspended in a medium, which may consist of phosphate-buffered saline (PBS) [30] or autologous blood serum, the latter being considered a more adequate suspension medium by some authors [14, 96]. However, it was shown that autologous serum, cultivated in glass tubes at 37 °C for 24 hours, contains significant amounts of IL-1ra and IL-10 [97], which implies that serum alone might influence tendon healing [65]. Instead of fresh serum [39], thermally inactivated autologous serum was used in the present study and also injected into control group lesions. Alternatively, control lesions could have been left without puncture and treatment, but puncture alone has been shown to support drainage of early fluid accumulation and could theoretically guide peritendineal precursor cells into the lesion and thereby have a therapeutic effect [98, 99]. For the same reason, repeat biopsies were not used in the current study compared with previous studies [40]. Only two more control groups—one without any puncture, and one with puncture alone but without injection—could have ruled out these effects. However, a much larger study population would have been needed.

Twelve weeks after surgery, the ratio of type II echoes representing discontinuous fascicles not yet aligned into lines of stress was significantly higher in AT-MSC-treated lesions than in control lesions, which might be indicative for a pro-aligning influence of implanted AT-MSCs on the early organization of tendon matrix into tendon bundles [44, 54], potentially mediated by direct or paracrine coordinating effects of AT-MSCs on fibroblasts. However, differences did not last until the end of the observation period, and no effects on the percentage of type I echoes (i.e. intact tendon tissue) were evident in the AT-MSC group, so it remains unclear whether the finding is biological reality or due to chance. Clinical relevance seems limited.

Ratios for type I echoes, representative for fully aligned tendon bundles, did not reach those for intact tendon tissue inside the core lesion in terminal UTC scans. This indicates that there was still no complete restoration of perfectly aligned tendon bundles after 24 weeks, as expected after this timeframe [82]. The

finding that ratios of all echo types only changed mildly in the current study after week 12 is different from that of Bosch et al. [45], who used a similar model of tendinopathy and found further improvement; that is, a more pronounced decrease of the echo type IV ratio and an increase of the echo type I ratio between weeks 12 and 24 after PRP treatment of surgically induced tendon lesions.

Results of histology, biochemical analyses and biomechanical testing, which were only performed post mortem 22 weeks after treatment, correlate well with the UTC findings observed previously [44, 45]. None of these diagnostic modalities showed differences between AT-MSC-serum-treated tendons and serum-treated controls. Compared with macroscopically normal SDFT tissue from the same horses there were significantly higher DNA and GAG contents, and lower Hyp and total collagen and HP contents. At the same time tenocyte nuclei were rounded, showing the more tenoblastic cell type, and cell density showed high local variations. Also, histologic scores for fibre structure and fibre alignment were increased in both groups. All of these findings are indicative for relatively high metabolic activity and ongoing tissue repair and remodelling at the end of the observation period (i.e. in the remodelling or maturation phase) [41]. It can be argued that to evaluate the end stage of tendon repair an observation period of 1 year would have been even more appropriate [82]. However, it had been shown previously that the phases of early remodelling or maturation when newly formed collagen type I fibres are organized into bundles and orientate themselves into lines of stress take place between approximately days 45 and 120 after lesion induction [100], and it is hardly conceivable that differences would have been noted at 1 year but not after 24 weeks.

In AT-MSC-treated lesions, no difference in vascularization was found histologically using a subjective five-point scale in this study. However, in a more detailed analysis reported elsewhere [46] in which all clearly identifiable vessels on the entire tissue section were counted in the same specimen, there was a significantly higher number of vessels in AT-MSC-treated versus control tendons. This finding, together with the increase in Doppler signal detected at 2 weeks post treatment [46], shows that the methodology used in the current study was obviously not sensitive enough to detect these relatively minor differences. In other equine experimental studies, an increase in Doppler signal could be detected at 6 weeks after implantation of AT-MSCs suspended in platelet concentrate into artificial SDFT lesions [40], whereas intralesional PRP injection led to an almost continuous increase in Doppler signal in another investigation [101]. Stimulation of angiogenesis by AT-MSCs was also postulated by several authors [22, 86] while others [90] showed endothelial cell



apoptosis and capillary degeneration after application of rat BM-MSCs *in vitro*. Neovascularization is of utmost importance to assure transportation of cells and growth factors towards and away from the lesion site during the inflammatory and proliferative phases of extrinsic tendon healing [41]. However, there is controversy about the effects of a prolonged increase in vascularity, which is discussed elsewhere [46, 60, 102, 103].

Conclusions

The effect of a single intralesional injection of cultured AT-MSCs suspended in autologous inactivated serum was not superior to the treatment of surgically created SDFT lesions with autologous inactivated serum alone in a surgical model of tendinopathy over an observation period of 22 weeks. AT-MSC treatment might have a positive influence on collagen crosslinking and therefore possibly on tensile stress resistance of remodelling scar tissue. Ultrasound tissue characterization (UTC) was a viable tool to monitor tendon healing non-invasively and the findings correlated well with results from end-stage histology, biochemistry and biomechanical testing, which proved that despite the onset of the remodelling phase, tendon healing was not completed after a period of 24 weeks. Randomized controlled long-term studies including naturally occurring tendinopathies are necessary to put the results of the current study into perspective before intralesional AT-MSC injection can be recommended (or rejected) as a viable option for the treatment of tendon disease.

Additional files

Additional file 1: Table presenting the gradually increasing exercise programme adapted from Bosch et al. [45] with permission. (DOCX 14 kb)

Additional file 2: Semi-quantitative four-point scale according to Aström and Rausing [60], modified by Bosch et al. [45]. (DOCX 15 kb)

Abbreviations

ADNC: Adipose-derived nucleated cell; AT: Adipose derived; BM: Bone marrow; COMP: Cartilage oligomeric matrix protein; CSA: Cross-sectional area; DICOM: Digital Imaging and Communications in Medicine; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; EDTA: Ethylenediaminetetraacetate; FBS: Fetal bovine serum; GAG: Glycosaminoglycan; H&E: Haematoxylin and eosin; HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; HLys: Hydroxylysine; HP: Hydroxylysylpyridinoline; Hyp: Hydroxyproline; ICC: Intraclass correlation coefficient; LP: Lysylpyridinoline; Lys: Lysine; MSC: Mesenchymal stromal cell; NaCl: Sodium chloride; SD: Standard deviation; SDFT: Superficial digital flexor tendon; TCSA: Total cross-sectional area; TES: Total echogenicity score; TFAS: Total fibre alignment score; UTC: Ultrasound tissue characterization

Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. Dr. Paul Becher, Dr. Astrid von Velsen-Zerweck, Dr. Philipp Conze, Mrs Petra Grünig, Mrs Lena Kaiser, Mr Christoph Meister and all grooms of the Equine Clinic of the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation for their much appreciated help throughout the study period. The authors are grateful to Dr. Klaus Hopster, Dipl. ECVA, for performing general anaesthesia in all horses included in this study and to

Dipl.-Ing. Michael Schwarze, Laboratory for Biomechanics and Biomaterials, Department of Orthopaedic Surgery, Hannover Medical School, for his support during statistical analysis of the biomechanical data. The authors thank Dr. Monika Langlotz, ZMBH Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, Flow Cytometry & FACS Core Facility, for providing flow cytometric analyses.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are available in the figshare repository (<https://figshare.com/s/abb27aea2694f60dffa3>).

Authors' contributions

FG had the idea of performing the study, designed and coordinated the study, performed the surgical interventions, participated in the collection of clinical, ultrasonographic, biomechanical and histologic data and their analyses, and wrote the manuscript. FR participated in the collection of clinical, ultrasonographic, histologic and biomechanical data, in their analyses and in writing the manuscript. HTMV participated in the design of the study, supervised the collection and analysis of ultrasonographic data and revised the manuscript critically. AB instructed and supervised the histologic examinations and revised the manuscript critically. RE performed the biochemical analyses and revised the manuscript critically. KW participated in the collection of clinical and ultrasonographic data and revised the manuscript critically. MH participated in the analysis of the ultrasonographic data and revised the manuscript critically. KR performed the statistical analysis and revised the manuscript critically. MJ contributed to the study design and revised the manuscript critically. BW contributed to the collection and analysis of biomechanical data and revised the manuscript critically. CH supervised the collection and analysis of biomechanical data and revised the manuscript critically. SC processed adipose tissue and cultured AT-MSCs. TS supervised processing of adipose tissue and AT-MSC culture, and revised the manuscript critically. CvdL supervised biochemical analyses and revised the manuscript critically. RvW participated in coordination of the study and revised the manuscript critically. PMS participated in the design of the study, contributed to the analyses of the data and revised the manuscript critically. All authors read and approved the manuscript for publication.

Authors' information

Results of the current study are part of the Dr. med. vet. thesis submitted by FR to the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Germany.

Competing interests

HTMV is the inventor of the UTC device. He has not given any financial support for this study and has no financial interests in relation to this study. No non-financial conflicts of interests exist for any of the authors.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval

The study was approved by the animal welfare officer of the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Germany and the ethics committee of the responsible German federal state authority in accordance with the German Animal Welfare Law (Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, reference number 33.9-42502-04-08/1622).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Equine Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 9, 30559 Hannover, Germany. ²Department of Equine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Yalelaan 112, 3584 CM Utrecht, The Netherlands. ³Institute for Pathology, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 17, 30559 Hannover, Germany. ⁴Pferdeklinik Kirchheim, Nürtinger Straße 200, 73230 Kirchheim unter Teck, Germany. ⁵Institute for Biometry, Epidemiology and Information Processing, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 2, 30559 Hannover, Germany. ⁶Department of Orthopedic Trauma, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Straße 1, 30625 Hannover, Germany. ⁷Laboratory for Biomechanics and Biomaterials, Department of Orthopaedic Surgery,



Hannover Medical School, Anna-von-Borries-Straße 1-7, 30625 Hannover, Germany. ⁸P.O. Box 1243, 72072 Tübingen, Germany. ⁹Institute for Anatomy and Cell Biology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 307, 69120 Heidelberg, Germany.

Received: 21 September 2016 Revised: 15 March 2017

Accepted: 26 April 2017 Published online: 05 June 2017

References

- Cassel M, Baur H, Hirschmuller A, Carlsohn A, Frohlich K, Mayer F. Prevalence of Achilles and patellar tendinopathy and their association to intratendinous changes in adolescent athletes. *Scand J Med Sci Sports*. 2015;25(3):e310–8.
- Maffulli N, Wong J. Rupture of the Achilles and patellar tendons. *Clin Sports Med*. 2003;22(4):761–76.
- Ross MW. Movement. In: Ross MW, Dyson SJ, editors. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 2nd ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2011. p. 64–80.
- O'Meara B, Bladon B, Parkin TD, Fraser B, Lischer CJ. An investigation of the relationship between race performance and superficial digital flexor tendonitis in the Thoroughbred racehorse. *Equine Vet J*. 2010;42(4):322–6.
- Williams RB, Harkins LS, Hammond CJ, Wood JL. Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996, 1997 and 1998. *Equine Vet J*. 2001;33(5):478–86.
- Lam KH, Parkin TD, Riggs CM, Morgan KL. Descriptive analysis of retirement of Thoroughbred racehorses due to tendon injuries at the Hong Kong Jockey Club (1992–2004). *Equine Vet J*. 2007;39(2):143–8.
- Riemersma DJ, Schamhardt HC. In vitro mechanical properties of equine tendons in relation to cross-sectional area and collagen content. *Res Vet Sci*. 1985;39(3):263–70.
- Stephens PR, Nunamaker DM, Butterweck DM. Application of a Hall-effect transducer for measurement of tendon strains in horses. *Am J Vet Res*. 1989;50(7):1089–95.
- Geburek F, Stadler P. Regenerative therapy for tendon and ligament disorders in horses. Terminology, production, biologic potential and in vitro effects. *Tieraerztl Prax G N*. 2011;39(6):373–83.
- Dyson SJ. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992–2000). *Equine Vet J*. 2004;36(5):415–9.
- Goodship AE, Birch HL, Wilson AM. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1994;10(2):323–49.
- Stewart MC, Stewart AA. Cell-based therapies in orthopedics. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2011;27(2):xiii–xiv.
- Smith RK, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J. Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *PLoS One*. 2013;8(9), e75697.
- Guest DJ, Smith MR, Allen WR. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J*. 2010;42(7):636–42.
- Watts AE, Yeager AE, Kopyov OV, Nixon AJ. Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(1):4.
- Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol*. 2009;10:29.
- Park A, Hogan MV, Kesturu GS, James R, Balian G, Chhabra AB. Adipose-derived mesenchymal stem cells treated with growth differentiation factor-5 express tendon-specific markers. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(9):2941–51.
- Lovati AB, Corradetti B, Cremonesi F, Bizzaro D, Consiglio AL. Tenogenic differentiation of equine mesenchymal progenitor cells under indirect coculture. *Int J Artif Organs*. 2012;35(11):996–1005.
- Tan SL, Ahmad RE, Ahmad TS, Merican AM, Abbas AA, Ng WM, Kamarul T. Effect of growth differentiation factor 5 on the proliferation and tenogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cells Tissues Organs*. 2012;196(4):325–38.
- Raabe O, Shell K, Fietz D, Freitag C, Ohrndorf A, Christ HJ, Wenisch S, Arnold S. Tenogenic differentiation of equine adipose-tissue-derived stem cells under the influence of tensile strain, growth differentiation factors and various oxygen tensions. *Cell Tissue Res*. 2013;352(3):509–21.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Claus S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292–8.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076–84.
- Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R. Stem cells in veterinary medicine—attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol*. 2007;25(9):409–16.
- Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009;217(2):318–24.
- Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(7):1751–61.
- Herrero C, Perez-Simon JA. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(5):425–30.
- Alves AG, Stewart AA, Dudhia J, Kasashima Y, Goodship AE, Smith RK. Cell-based therapies for tendon and ligament injuries. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2011;27(2):315–33.
- Koch TG, Berg LC, Betts DH. Current and future regenerative medicine—principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can Vet J*. 2009;50(2):155–65.
- Peroni JF, Borjesson DL. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2011;27(2):351–62.
- Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am J Vet Res*. 2008;69(7):928–37.
- Taylor SE, Clegg PD. Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2011;27(2):263–74.
- Burk J, Gittel C, Heller S, Pfeiffer B, Paebst F, Ahrberg AB, Brehm W. Gene expression of tendon markers in mesenchymal stromal cells derived from different sources. *BMC Res Notes*. 2014;7:826.
- Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg*. 2007;36(7):613–22.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294–301.
- Dahlgren LA. Fat derived mesenchymal stem cells for equine tendon repair. *Regen Med*. 2009;4(6 Suppl 2):S14.
- Leppänen M, Miettinen S, Mäkinen S, Wilpola P, Katskalahti T, Heikkilä P, Tulamo RM. Management of equine tendon & ligament injuries with expanded autologous adipose derived mesenchymal stem cells: a clinical study. *Regen Med*. 2009;4(6 Suppl 2):S21.
- Leppänen M, Heikkilä P, Katskalahti T, Tulamo RM. Follow up of recovery of equine tendon & ligament injuries 18–24 months after treatment with enriched autologous adipose-derived mesenchymal stem cells: a clinical study. *Regen Med*. 2009;4(6 Suppl 2):S21.
- Ricco S, Renzi S, Del Bue M, Conti V, Merli E, Ramoni R, Lucarelli E, Gnudi G, Ferrari M, Grolli S. Allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in combination with platelet rich plasma are safe and effective in the therapy of superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(1 Suppl):61–8.
- Carvalho AD, Alves ALG, de Oliveira PGG, Alvarez LEC, Amorim RL, Hussni CA, Deffune E. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *J Equine Vet Sci*. 2011;31(1):26–34.
- Carvalho AD, Badial PR, Alvarez LEC, Yamada ALM, Borges AS, Deffune E, Hussni CA, Alves ALG. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: a randomized controlled trial. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(85):1–13.
- Patterson-Kane JC, Firth EC. The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. *Vet J*. 2009;181(2):79–89.
- Lui PP, Maffulli N, Rolf C, Smith RK. What are the validated animal models for tendinopathy? *Scand J Med Sci Sports*. 2011;21(1):3–17.
- Schramme M, Hunter S, Campbell N, Blikslager A, Smith R. A surgical tendonitis model in horses: technique, clinical, ultrasonographic and histological characterisation. *Vet Comp Orthopaed*. 2010;23(4):231–9.
- van Schie HT, Bakker EM, Cherdchutham W, Jonker AM, van de Lest CH, van Weeren PR. Monitoring of the repair process of surgically created lesions in



- equine superficial digital flexor tendons by use of computerized ultrasonography. *Am J Vet Res.* 2009;70(1):37–48.
45. Bosch G, van Schie HT, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, van Weeren PR. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. *J Orthop Res.* 2010;28(2):211–7.
 46. Conze P, van Schie HT, Weeren RV, Staszky C, Conrad S, Skutella T, Hopster K, Rohn K, Stadler P, Geburek F. Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions. *Regen Med.* 2014;9(6):743–57.
 47. Cadby JA, David F, van de Lest C, Bosch G, van Weeren PR, Snedeker JG, van Schie HT. Further characterisation of an experimental model of tendinopathy in the horse. *Equine Vet J.* 2013;45(5):642–8.
 48. Rantanen NW. The use of diagnostic ultrasound in limb disorders of the horse: a preliminary report. *J Equine Vet Sci.* 1982;2(2):62–4.
 49. Reef VB. Musculoskeletal ultrasonography. In: Reef VB, editor. *Equine Diagnostic Ultrasound*. 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998. p. 39–186.
 50. van Schie JT, Bakker EM, van Weeren PR. Ultrasonographic evaluation of equine tendons: a quantitative in vitro study of the effects of amplifier gain level, transducer-tilt, and transducer-displacement. *Vet Radiol Ultrasound.* 1999;40(2):151–60.
 51. van Schie HT, Bakker EM, Jonker AM, van Weeren PR. Ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of gray level statistics. *Am J Vet Res.* 2000;61(2):210–9.
 52. van Schie HT, Bakker EM, Jonker AM, van Weeren PR. Computerized ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of stability quantification of echo patterns in contiguous transverse ultrasonographic images. *Am J Vet Res.* 2003;64(3):366–75.
 53. van Schie HT, Bakker EM, Jonker AM, van Weeren PR. Efficacy of computerized discrimination between structure-related and non-structure-related echoes in ultrasonographic images for the quantitative evaluation of the structural integrity of superficial digital flexor tendons in horses. *Am J Vet Res.* 2001;62(7):1159–66.
 54. Bosch G, Rene van Weeren P, Barneveld A, van Schie HT. Computerised analysis of standardised ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons following treatment with intratendinous platelet rich plasma or placebo. *Vet J.* 2011;187(1):92–8.
 55. Docking SI, Daffy J, van Schie HT, Cook JL. Tendon structure changes after maximal exercise in the Thoroughbred horse: use of ultrasound tissue characterisation to detect in vivo tendon response. *Vet J.* 2012;194(3):338–42.
 56. Geburek F, Gaus M, van Schie HT, Rohn K, Stadler PM. Effect of intralesional platelet-rich plasma (PRP) treatment on clinical and ultrasonographic parameters in equine naturally occurring superficial digital flexor tendinopathies—a randomized prospective controlled clinical trial. *BMC Vet Res.* 2016;12(1):191.
 57. Docking SI, Rosengarten SD, Cook J. Achilles tendon structure improves on UTC imaging over a 5-month pre-season in elite Australian football players. *Scand J Med Sci Sports.* 2016;26(5):557–63.
 58. de Jonge S, Rozenberg R, Vieyra B, Stam HJ, Aanstoot HJ, Weinans H, van Schie HT, Praet SF. Achilles tendons in people with type 2 diabetes show mildly compromised structure: an ultrasound tissue characterisation study. *Br J Sports Med.* 2015;49(15):995–9.
 59. de Vos RJ, Heijboer MP, Weinans H, Verhaar JA, van Schie JT. Tendon structure's lack of relation to clinical outcome after eccentric exercises in chronic midportion Achilles tendinopathy. *J Sport Rehabil.* 2012;21(1):34–43.
 60. Åström M, Rausing A. Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;(316):151–64. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=astrom+rausing+1995>.
 61. Crevier-Denoix N, Collobert C, Pourcelot P, Denoix JM, Sanaa M, Geiger D, Bernard N, Ribot X, Bortolussi C, Bousseau B. Mechanical properties of pathological equine superficial digital flexor tendons. *Equine Vet J Suppl.* 1997;23:23–6.
 62. Majewski M, Ochsner PE, Liu F, Fluckiger R, Evans CH. Accelerated healing of the rat Achilles tendon in response to autologous conditioned serum. *Am J Sports Med.* 2009;37(11):2117–25.
 63. Little D, Schramme MC. Ultrasonographic and MRI evaluation of a novel tendinitis model in the horse. *Vet Surg.* 2006;35(6), E15.
 64. Schmidt H. Die Behandlung akuter und chronischer Sehnenkrankungen beim Pferd mit hochmolekularer Hyaluronsäure. Dr. med. vet. thesis. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 1989.
 65. Geburek F, Lietzau M, Beineke A, Rohn K, Stadler PM. Effect of a single injection of autologous conditioned serum (ACS) on tendon healing in equine naturally occurring tendinopathies. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:126.
 66. Etinger J. Orthopädische Untersuchung der Gliedmaßen und der Wirbelsäule. In: Wissdorf H, Gerhards H, Huskamp B, Deegen E, editors. *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes*. Hannover: M. u. H. Schaper; 2010. p. 890–926.
 67. Genovese RL, Rantanen NW, Hauser ML, Simpson BS. Diagnostic ultrasonography of equine limbs. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1986;2(1):145–226.
 68. Rantanen NW, Jorgensen JS, Genovese RL. Ultrasonographic evaluation of the equine limb: technique. In: Ross MW, Dyson SJ, editors. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 1st ed. St. Louis: Elsevier; 2003. p. 166–88.
 69. Kim YJ, Sah RL, Doong JY, Grodzinsky AJ. Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. *Anal Biochem.* 1988;174(1):168–76.
 70. Dudhia J, Scott CM, Draper ER, Heinegard D, Pitsillides AA, Smith RK. Aging enhances a mechanically-induced reduction in tendon strength by an active process involving matrix metalloproteinase activity. *Aging Cell.* 2007; 6(4):547–56.
 71. Fleiss JL. The design and analysis of clinical experiments. New York: Wiley; 1986.
 72. Marx C, Silveira MD, Beyer NN. Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. *Stem Cells Dev.* 2015;24(7):803–13.
 73. Eyre D. Collagen cross-linking amino acids. *Methods Enzymol.* 1987;144:115–39.
 74. Last JA, Armstrong LG, Reiser KM. Biosynthesis of collagen crosslinks. *Int J Biochem.* 1990;22(6):559–64.
 75. Eyre DR, Koob TJ, Van Ness KP. Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1984;137(2):380–8.
 76. Fu SC, Chan KM, Rolf CG. Increased deposition of sulfated glycosaminoglycans in human patellar tendinopathy. *Clin J Sport Med.* 2007;17(2):129–34.
 77. Parkinson J, Samiric T, Ilic MZ, Cook J, Feller JA, Handley CJ. Change in proteoglycan metabolism is a characteristic of human patellar tendinopathy. *Arthritis Rheum.* 2010;62(10):3028–35.
 78. Birch HL, Bailey AJ, Goodship AE. Macroscopic 'degeneration' of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. *Equine Vet J.* 1998;30(6):534–9.
 79. Estrada RJ, van Weeren R, van de Lest CHA, Boere J, Reyes M, Ionita JC, Estrada M, Lischer CJ. Effects of Autologous Conditioned Plasma (R) (ACP) on the healing of surgically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendon. *Pferdeheilkunde.* 2014;30(6):633–42.
 80. Lin YL, Brama PA, Kiers GH, DeGroot J, van Weeren PR. Functional adaptation through changes in regional biochemical characteristics during maturation of equine superficial digital flexor tendons. *Am J Vet Res.* 2005; 66(9):1623–9.
 81. Batson EL, Paramour RJ, Smith TJ, Birch HL, Patterson-Kane JC, Goodship AE. Are the material properties and matrix composition of equine flexor and extensor tendons determined by their functions? *Equine Vet J.* 2003;35(3):314–8.
 82. Silver IA, Brown PN, Goodship AE, Lanyon LE, McCullagh KG, Perry GC, Williams IF. A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine Vet J Suppl.* 1983;(1):1–43. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9079042>.
 83. Crevier N, Pourcelot P, Denoix JM, Geiger D, Bortolussi C, Ribot X, Sanaa M. Segmental variations of in vitro mechanical properties in equine superficial digital flexor tendons. *Am J Vet Res.* 1996;57(8):1111–7.
 84. Caniglia CJ, Schramme MC, Smith RK. The effect of intralesional injection of bone marrow derived mesenchymal stem cells and bone marrow supernatant on collagen fibril size in a surgical model of equine superficial digital flexor tendonitis. *Equine Vet J.* 2012;44(5):587–93.
 85. Manfredini C, Maumus M, Gabusi E, Piacentini A, Fildaro G, Peyrafitte JA, Jorgensen C, Bourin P, Fleury-Cappellesso S, Facchini A, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. *Arthritis Rheum.* 2013;65(5):1271–81.
 86. Ceserani V, Ferri A, Berenzi A, Benetti A, Ciusani E, Pascucci L, Bazzucchi C, Cocce V, Bonomi A, Pessina A, et al. Angiogenic and anti-inflammatory properties of micro-fragmented fat tissue and its derived mesenchymal stromal cells. *Vascular Cell.* 2016;8:3.
 87. Shen H, Korpakakis I, Havlioglu N, Linderman SW, Sakiyama-Elbert SE, Erickson IE, Zarebinski T, Silva MJ, Gelberman RH, Thomopoulos S. The



- effect of mesenchymal stromal cell sheets on the inflammatory stage of flexor tendon healing. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):144.
88. Dahlgren LA. Management of tendon injuries. In: Robinson NE, Sprayberry KA, editors. *Current Therapy in Equine Medicine*. 6th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2009. p. 518–23.
 89. Frisbie DD, Smith RK. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Vet J.* 2010;42(1):86–9.
 90. Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood.* 2009;113(18):4197–205.
 91. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res.* 2003; 21(3):420–31.
 92. Taylor SE, Smith RK, Clegg PD. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J.* 2007; 39(2):172–80.
 93. Godwin EE, Young NJ, Duthia J, Beamish IC, Smith RK. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J.* 2012;44(1):25–32.
 94. Geburek F, Mundle K, Conrad S, Hellige M, Walliser U, van Schie HT, van Weeren R, Skutella T, Stadler PM. Tracking of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells with in vivo magnetic resonance imaging and histology after intralesional treatment of artificial equine tendon lesions—a pilot study. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:21.
 95. Burk J, Berner D, Brehm W, Hillmann A, Horstmeier C, Josten C, Paebst F, Rossi G, Schubert S, Ahrberg AB. Long-term cell tracking following local injection of mesenchymal stromal cells in the equine model of induced tendon disease. *Cell Transplant.* 2016;25(12):2199–211.
 96. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.* 2007;13(12):2949–55.
 97. Hraha TH, Doremus KM, McIlwraith CW, Frisbie DD. Autologous conditioned serum: the comparative cytokine profiles of two commercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood. *Equine Vet J.* 2011;43(5):516–21.
 98. Dabareiner RM, Carter GK, Chaffin MK. How to perform ultrasound guided-tendon splitting and intralesional tendon injections in the standing horse. In: 46th Annual Convention of the AAEP. Lexington: American Association of Equine Practitioners; November 26–29 2000.
 99. Avella CS, Smith RKW. Diagnosis and management of tendon and ligament disorders. In: Auer JA, Stick JA, editors. *Equine Surgery*. 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2011. p. 1157–79.
 100. Jann H, Stashak TS. Equine wound management. In: Stashak TS, Theoret CL, editors. *Equine Wound Management*. Ames: Wiley-Blackwell; 2008. p. 489–508.
 101. Bosch G, Moleman M, Barneveld A, van Weeren PR, van Schie HT. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand J Med Sci Sports.* 2011;21(4):554–61.
 102. Ohberg L, Lorentzon R, Alfredson H. Neovascularisation in Achilles tendons with painful tendinosis but not in normal tendons: an ultrasonographic investigation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2001;9(4):233–8.
 103. Kristoffersen M, Ohberg L, Johnston C, Alfredson H. Neovascularisation in chronic tendon injuries detected with colour Doppler ultrasound in horse and man: implications for research and treatment. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2005;13(6):505–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Gradually increasing exercise programme adapted from Bosch et al. 2010 [45]

Week after lesion induction	Walking (min / day)	Trot (min / day)
1 - 3	Box rest	Box rest
4 - 6	10	-
7 - 10	20	-
11 - 14	30	-
15 - 18	40	-
19 - 21	35	5
22 - 24	30	10

min = minutes



Semi-quantitative four point scale according to Aström and Rausing (1995) [60], modified by Bosch et al. (2010) [45]*Scale:*

0 = normal appearance, 1 = slightly abnormal, 2 = moderately abnormal, 3 = markedly abnormal

Features of sub-scores:

- Fibre structure (0 = linear, no interruption; 3 = short with early truncation)
- Fibre alignment (0 = regularly ordered, 3 = no pattern identified)
- Morphology of tenocyte nuclei (0 = flat; 3 = round)
- Variations in cell density (0 = uniform, 3 = high regional variation)
- Vascularization (0 = absent; 3 = high)

Scores:

- Fibre structure + Fibre alignment = structural integrity
- Morphology of tenocyte nuclei + variations in cell density + vascularization = metabolic activity



13.8 Publikation 8

Conze, P., van Schie, H.T.M., van Weeren, R., Staszuk, C., Conrad, S., Skutella, T., Hopster, K., Rohn, K., Stadler, P., **Geburek, F.**

Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions.

Regen. Med. 2014, 9 (6): 743-757.



Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions

Aims: To investigate whether autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AT-MSCs) treatment of tendon lesions increases neovascularization during tendon healing. **Materials & methods:** A standardized surgical model was used to create lesions in both front limb superficial digital flexor tendons (SDFTs) of nine horses. Either AT-MSCs or control substance was injected intralesionally 2 weeks post-surgery. Color Doppler ultrasonography of SDFTs was performed at regular intervals. Horses were euthanized 22 weeks post-treatment and SDFTs were harvested for histology. **Results:** The color Doppler ultrasonography signal was significantly more extensive at 2 weeks post-treatment and the number of vessels counted on histologic slides was significantly higher at 22 weeks post-treatment in AT-MSC-treated SDFTs. **Conclusion:** Our findings indicate that AT-MSC treatment has a beneficial effect on neovascularization of healing tendons.

Keywords: adipose tissue-derived • color Doppler ultrasonography • Factor VIII • mesenchymal stem cells • neovascularization • superficial digital flexor tendon • von Willebrand factor

Background

Injury of the superficial digital flexor tendon (SDFT) is a common, often career-ending condition in race and performance horses. The healing of tendons is time consuming and associated with high costs. Furthermore, reported re-injury rates are considerable, ranging from 16 to 53% [1,2]. The risk of re-injury seems to decline from flat racehorses to National Hunt horses, to event horses and, finally, to show jumpers [1], probably because of differences in maximal loading. The front limbs are more often involved than hind limbs [3,4].

One of the reasons for the high re-injury rate is the inferior quality of the repair tissue compared with normal tendon tissue [5,6]. The immature scar tissue gains strength during the remodeling phase of tendon healing, but also becomes stiffer, which compromises the ability of the tendon to act like a spring [7], thereby putting the healed tendon at risk of re-injury [8]. Reported durations for tendon

healing range between 9 and 14 months, or even 18 months or longer [2,5,6,9,10]. Various blood- and cell-based therapies have been proposed as intralesional treatment options to promote faster and qualitatively improved healing for tendon injuries. Among these, adipose-derived substrates, for example, adipose-derived nucleated cells and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AT-MSCs), have gained importance. Adipose tissue is easy to collect and the number of MSCs obtained compared with bone marrow can be up to 222-fold higher [11]. AT-MSCs may differentiate into multiple cell lines, increase expression of transcripts for bioactive proteins, and reduce the numbers of inflammatory cells [6,12–15]. *In vitro* differentiation of AT-MSCs toward the tenogenic lineage has shown the most promising results under the influence of tensile stimulation, supplementation of growth differentiation factor 5 or 7 and an oxygen tension of 21% [15]. Canine AT-MSCs co-cultured

Philipp Conze¹, Hans TM van Schie², René van Weeren³, Carsten Staszky⁴, Sabine Conrad⁵, Thomas Skutella⁶, Klaus Hopster¹, Karl Rohn⁷, Peter Stadler¹ & Florian Geburek^{*1}

¹Clinic for Horses, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Hannover, Bünteweg 9, 30559 Hannover, Germany

²Monash University, Frankston, Australia

³Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

⁴Faculty of Veterinary Medicine, Institute for Anatomy, Histology & Embryology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

⁵Institute for Anatomy, Eberhard Karls University, Tübingen, Germany

⁶Institute for Anatomy and Cell Biology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

⁷Department of Biometry, Epidemiology & Information Processing, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Hannover, Germany

*Author for correspondence: florian.geburek@tiho-hannover.de



with primary tenocytes increased the expression of tendon-specific transcripts, such as scleraxis, decorin, tenomodulin, collagen I and collagen III [12]. Intralésional AT-MSCs treatment in collagenase-induced tendinitis in horses led to more well-defined collagen fibers characterized by better organization and alignment, a more natural crimp angle, and less inflammatory infiltrates compared with untreated controls [16]. Intralésional administration of AT-MSCs suspended in platelet concentrate prevented SDFT lesion progression and resulted in better organization, less inflammation and increased vascularity in collagenase gel-induced tendon lesions [17]. Allogeneic AT-MSCs were applied in combination with platelet-rich plasma (PRP) in a clinical trial to treat 19 horses affected by acute or subacute SDFT lesions [18]. The authors found no adverse tissue reactions and no formation of abnormal tissue. The 24-month follow-up showed an 89.5% return to the previous level of competition. A rabbit Achilles tendon model revealed that the application of AT-MSCs mixed with PRP led to enhanced primary tendon healing and an increase in collagen type I, and VEGF and consecutive repair, in contrast to controls that were treated exclusively with PRP [19]. PRP alone has been used for treatment of SDFT lesions as well [20]. This autologous platelet concentrate is rich in various endogenous growth factors and, after treatment of artificially created SDFT lesions, an increase in blood flow detected by color Doppler ultrasonography (CDU) was noted in treated versus control limbs [20,21].

AT-MSCs have been used in a rat ischemic hind-limb model and markedly improved vascular supply [22]. Jeon *et al.* [23] found that human AT-MSCs stimulate tumor angiogenesis in an *in vivo* xenograft tumor model. Similarly, Beckermann *et al.* [24] saw stimulation of angiogenesis through MSCs by the secretion of VEGF in pancreatic carcinoma. Other studies showed that AT-MSCs secrete a number of angiogenic growth factors, such as HGF, VEGF, PGF, TGF- β , and angiopoietin 1 and 2 [23,25]. They also demonstrated that VEGF and HGF were secreted at bioactive levels.

Adequate healing, especially in the normally sparsely vascularized tendon tissue, demands sufficient blood supply in order to promote extrinsic healing mechanisms, facilitating the transportation of nutrients and inflammatory mediators, as well as enzymes, towards and away from the lesion site [26]. On the other hand, insufficient blood supply, caused by poorly vascularized scar tissue formed during tendon healing, might contribute to the recurrence of lesions [27]. Treatment of tendon lesions with AT-MSCs could, therefore, be a promising therapeutic choice. Areas of neovascularization in humans, as seen in some chronic tendon lesions, are classified as undesired by some authors who

incriminate vascular in-growth and the accompanying nerves as possible sources of pain [28–30]. However, persistent chronic pain is not a feature of chronic tendon lesions in the horse [31].

Blood flow and, thereby, vascularization in patients with tendinopathy can be detected via CDU [30]. CDU-based diagnosis achieved 92% sensitivity and 100% specificity in human patellar tendinosis [32]. Even though vascularization in healthy tendons is too sparse to be visualized effectively using CDU, neovascularization after tendon injury has been detected in humans and horses with this imaging modality [20,33]. Another possible tool for blood flow assessment is power Doppler ultrasonography (PDU). PDU was found to be superior to CDU in assessing blood flow in 66% of clinical cases, including renal, testicular, hepatic, pancreatic and penile vascularization [34]. Similarly, PDU was able to visualize more of the microvasculature than CDU in Achilles tendons of human patients presenting with pain or an Achilles mass [35]. By contrast, no superiority of PDU over CDU was demonstrated for the detection of low flow velocities in another study [36]. The main disadvantage of PDU is its inability to demonstrate flow direction or to allow velocity estimation. In addition, PDU did not allow diagnostic images to be obtained in uncooperative patients because of its extreme motion sensitivity [34].

Hematoxylin–eosin (HE) histology in combination with an immunohistochemical staining with antibodies against endothelial cell epitopes can be employed to detect the number of blood vessel cross-sections within a tissue sample. However, the differentiation between blood and lymphatic vessels is still a challenge, regardless of the type of staining. Factor VIII (von Willebrand factor) is a pro-cofactor in coagulation and can be found exclusively in intact and functional endothelial cells [37]. Thus, immunohistological staining against Factor VIII highlights all endothelial cells, in blood vessels as well as in lymphatic vessels. Lymphatic vessels, therefore, have to be distinguished from blood vessels by morphologic criteria. Compared with blood vessels, lymphatic vessels are lined by flattened endothelial cells in the presence or absence of lymphocytes and without the presence of erythrocytes. They are located in the stroma or adjacent to arteries and veins [38]. The hypothesis of this study was that AT-MSCs treatment of surgically induced SDFT tendon lesions increases the neovascularization during tendon healing compared with controls, and that this increase in vascularization would be detectable with CDU and immunohistology.

Materials & methods

Eight warmblood horses and one standardbred, with a mean age of 4 years (range 3–6 years) were used

for this study. These included two geldings and seven mares with a mean bodyweight (bwt) of 545 ± 34 kg. Neither lameness nor tendon injury were reported in their histories. Clinical lameness examination and ultrasonography of front-limb SDFTs at the beginning of the study revealed no lameness and no clinical or ultrasonographic signs of previous or present tendon disorder were present. The study was approved by the ethics committee of the German federal state authority responsible (Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, 33.9-42502-04-08/1622).

Surgical procedure

A standardized model developed by Little and Schramme [39] and modified by Bosch *et al.* [40] was used for the creation of the tendon lesions. The procedure was performed on both front limbs of each horse during anesthesia in lateral recumbency. After premedication with 0.03 mg/kg bwt intramuscularly acepromazine (Vetranquil®, CEVA Tiergesundheit, Düsseldorf, Germany), 0.8 mg/kg bwt intravenously (iv.) xylazine (Xylazin 2%, CP Pharma, Burgdorf) and 25 µg/kg bwt iv. butorphanol (Alvegesic®, Vet 10 mg/ml, CP Pharma, Burgdorf, Germany), anesthesia was induced with 2.2 mg/kg iv. ketamine (Narketan®, 100 mg/ml, Vétoquinol, Ravensburg, Germany) and 0.05 mg/kg iv. midazolam (Midazolam 15 mg/ml, Braun Melsungen, Germany) and maintained with isoflurane (Isofluran CP®, CP Pharma, Burgdorf, Germany) in 100% oxygen and a constant rate infusion of 0.8 mg/kg/h xylazine. Intravenous fluids (lactated Ringers solution; Ringer-Laktat-Lösung®, Braun Melsungen AG, Germany) were administered at a rate of 5 l/kg/h and dobutamine (Dobutamin-ratiopharm 250 mg/50 ml, Ratiopharm, Ulm, Germany) was given to maintain a mean arterial blood pressure of greater than 70 mmHg. After presurgical aseptic preparation, a 1.5 cm longitudinal incision through skin, meso- and peri-tenon was centered over the palmar aspect of the SDFT, about 2 cm proximal to the proximal recess of the common digital flexor tendon sheath. A blunt arthroscopic obturator (Ø 2.5 mm) was introduced and advanced proximally within the center of the SDFT for 7 cm under ultrasonographic guidance. The obturator was exchanged for an arthroscopic burr (Abrador Burr 28200RN, Ø 3.5 mm, Karl Storz, Tuttlingen, Germany), which was then activated and tilted alternately laterally and medially against the tendon tissue while being slowly retracted over approximately 20 s. Paratenon and skin were closed in a simple interrupted pattern with polyglactin 910 (Vicryl 2–0 USP, Ethicon®, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Germany) and with vertical mattress sutures and polyamide (Dafilon® 2–0 USP, Braun Melsungen, Melsun-

gen, Germany), respectively. A sterile dressing and a double layer of cotton bandage were applied. Bandage changes were performed every other day for 14 days. Skin sutures were removed on day 12 post-operatively. All horses received 0.6 mg/kg meloxicam (Metacam®, 20 mg/ml, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Ingelheim, Germany) once a day iv. pre-operatively and for 2 days post-operatively. All horses were kept on box rest for 3 weeks after surgery. Intralesional injection of AT-MSCs or the control substance was performed 14 days after surgery. All horses were subjected to a controlled exercise program, as used previously [40], from week 4 onwards (Table 1).

Adipose tissue harvesting & preparation of AT-MSCs

Subcutaneous adipose tissue was collected from the paraxial caudo-dorsal gluteal region simultaneously with SDFT lesion creation. A 4 cm, slightly curved skin incision was made in cranio-caudad direction. Approximately 20 g of subcutaneous adipose tissue was harvested using surgical forceps and curved Mayo scissors. The skin incision was closed with simple interrupted vertical mattress sutures using polyamide suture material (Dafilon® 1 USP, Braun Melsungen, Melsungen, Germany). If the surgical site did not yield enough subcutaneous adipose tissue, a second incision was made in the contralateral gluteal region. Sutures were removed 14 days post-operatively. Adipose tissue was stored in a medium consisting of 1 g/l DMEM, 25 mM 2-4-2-hydroxyethyl-1-piperazinyl-ethansulfonic acid, 1% L-glutamine (DMEM with 25 mM HEPES with L-glutamine, PAA Laboratories, Pasching, Austria), 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories) and 1% of penicillin–streptomycin (Penicillin–Streptomycin 100, PAA Laboratories), and maintained at 5°C. All specimens were sent chilled by overnight express to the BSL-1 laboratory of the Institute of Anatomy, University of Tübingen where the AT-MSCs were expanded. Cell pellets of 1×10^7 MSCs were suspended with 1 ml

Table 1. Exercise protocol.

Weeks before and after treatment	Walking (min/day)	Trot (min/day)
-1–1	–	–
2–4	10	–
5–8	20	–
9–12	30	–
13–16	40	–
17–19	35	5
20–22	30	10

Protocol adapted from [40].



of inactivated autologous serum and kept at 4°C on ice until injection. All techniques were performed as described elsewhere [41–43].

Intralesional injection of ATMSCs

A total of 14 days after SDFT lesion creation, the horses were sedated with 0.03 mg/kg *iv.* detomidine (Cepesedan®, CP Pharma, Burgdorf, Germany) and 0.01 mg/kg *iv.* butorphanol (Alvegesic®, Vet 10 mg/ml, CP Pharma). The lateral and medial palmar nerves were anaesthetized at the level of the proximal metacarpus using 5 ml mepivacain (Scandicain® 2%, AstraZeneca, Wedel, Germany). The lateral and palmar metacarpal regions of both front limbs were clipped and aseptically prepared. One front limb was randomly assigned to the intralesional treatment with AT-MSCs, the other front limb was treated with inactivated autologous serum as control. The clinician performing the injection (F Geburek) was blinded towards treatment and control limb. Half a milliliter of autologous inactivated serum containing 1×10^7 AT-MSCs or an equivalent volume of serum alone was injected from lateral into the center of the lesions, 3 and 5 cm proximal of the incisional scar, respectively. Injection was performed under ultrasound guidance (Logiq E9, GE Healthcare, WI, USA) with a 22G canula transverse to the long axis of the limb using a 6–15 MHz linear probe. Sterile dressings and bandages were applied for 10 days and changed every other day.

Ultrasound evaluation

CDU was performed on all limbs immediately before treatment (2 weeks post-surgery), weekly thereafter until week 4 post-treatment, and from then every other week until week 10. Additional examinations took place at 16, 19 and 22 weeks post-treatment (Figure 1). The ultrasound examinations were carried out by a senior clinician, experienced in ultrasonographic examinations (F Geburek), who was blinded towards the treatment side.

Horses were sedated with 0.04–0.08 mg/kg romifidine (Sedivet® 10 mg/ml, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Ingelheim, Germany) and 0.01 mg/kg butorphanol *iv.* for the CDU. Both front limbs were clipped and degreased with medical soap and alcohol on the palmar aspect of the metacarpal region. A thin layer of acoustic coupling gel was applied. Before performing the CDU, the maximal injury zone of the lesion was located with B-mode ultrasonography (Logiq E9, GE Healthcare) while the limb was weight-bearing, using a 6–15 MHz linear transducer (GE ml 6–15, GE Healthcare) with a standoff pad. In order to carry out the CDU, the hoof was placed in an Oxspring–(Hickman) block with the digit in slight

extension and the carpus flexed at an angle of 80–90° while the limb was held in position by an assistant from dorsal/cranial (Figure 2). Settings were set at 11.9 MHz Doppler frequency, 1.5 KHz pulse repetition frequency and Doppler gain just below random noise. The settings were saved and used for each ultrasound session. No standoff pad was used for the CDU and the probe was held in a longitudinal direction centered on the maximal injury zone with as little pressure as possible. All limbs were scanned continuously from lateral over palmar to medial. All recordings were saved as video clips on the ultrasound machine and on a separate hard drive. All video clips were evaluated after the end of the study by one examiner (P Conze), blinded towards horse, limb and treatment modality.

Harvesting of SDFTs

All horses were euthanized 24 weeks post-operatively. After sedation with acepromazine and xylazine, anesthesia was induced with midazolam and ketamine as described earlier. Thereafter, the horses received 70 mg/kg *iv.* pentobarbital (Release® 300 mg/ml, WDT, Garbsen, Germany). Both front limbs were exarticulated in the antebrachio-carpal joint and the SDFTs were harvested. A 5-cm long tendon segment was excised between 2 and 7 cm proximal to the surgical scar and then longitudinally sectioned into two halves. A 2-cm long segment from the lateral half of the SDFT was obtained between 4 and 6 cm proximal to the surgical scar for histologic examination and fixed immediately in 4% formaldehyde solution and stored at 4°C. A total of 7 days later, all samples were transferred into phosphate-buffered saline (PBS) and stored at 4°C for another 4 months. The remaining tissue was stored for further investigations described elsewhere.

Histology (HE staining)

Specimens were stained with HE within a Shandon Varistain 24–3 slide stainer (Varistain 24–3, Shandon, Frankfurt) after preparation of slides with 5 µm thickness in a standardized fashion. The slides were stored at room temperature in shaded cabinets. The observer (P Conze), blinded to horse, limb and treatment, examined the entire tissue sections mounted on the slides for evaluation. All clearly identifiable vessels of the tissue sections were counted. The sum of all vessels counted within each specimen was recorded.

Immunohistochemistry

A standardized protocol was used for immunohistochemical staining with Factor VIII, as described elsewhere [20]. In brief, the samples were dehydrated, cleared in xylene and embedded in paraffin. Longitudinal serial

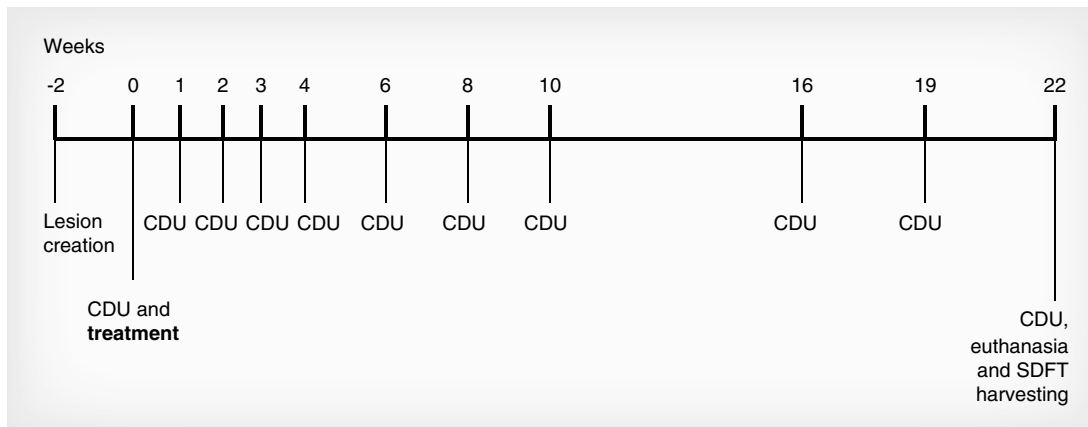


Figure 1. Time line of ultrasound evaluation.

CDU: Color Doppler ultrasonography; SDFT: Superficial digital flexor tendon.

sections of 5- μ m thickness were cut and mounted on microscope slides. These slides were dried overnight, deparaffinized, rehydrated in xylene, followed by a series of decreasing concentrations of alcohol (100%, 96%, 70% and H₂O) and incubated with 0.1% pronase for 30 min. Endogenous peroxidase activity was inhibited by incubation in 1% H₂O₂ in methanol for another 30 min. After treatment with normal goat serum (1:10 in PBS), all slides were incubated with a primary polyclonal rabbit antibody (1:250 in PBS) to von Willebrand factor (primary polyclonal rabbit anti-human von Willebrand factor antibody Dako A 0082/EFG/LGJ/01.03.03, Hamburg, Germany) overnight at 4°C. Incubation with a biotinylated secondary antibody (Vectastain Elite ABC Standard Kit-Peroxidase, PK-6100, Biologo, Kronshagen, Germany) for 30 min and an AEC substrate system (Peroxidase Substatkit, AEC AE002, Biologo, Kronshagen, Germany) for 30 min followed. Subsequently, the slides were mounted using Eukitt® quick-hardening mounting medium. All slides were rinsed thoroughly with PBS/Tween in between the steps. The evaluation was performed by one observer (P Conze), blinded to horse, limb and treatment. The entire tissue sections mounted to the slides were examined systematically. All visible vascular structures were counted and either assigned to the group of small vessels (capillaries and small arterioles/venules consisting of \leq five endothelial cells) or large vessels (large arterioles, arteries, venules, and veins consisting of >five endothelial cells) (Figure 3). Stained cells without recognizable vascular structure were also semi-quantitatively graded as present in small, moderate or large numbers.

Statistical analysis

All data were analyzed using the statistics program package SAS (Version 9.3, SAS Institute, Cary, NC, USA).

Model residuals were tested for normal distribution by the Kolmogorov–Smirnov test and visual assessment of Q–Q plots. The main model design was the comparisons of treated versus control tendons, each pair of the same horse at several time points. Geometric mean and standard error of geometric mean were calculated and shown graphically for descriptive statistics frequencies. Because of the right-skewed distribution of the CDU and immunohistochemical data (blood vessel numbers), data were transformed into their logarithmic form prior to calculation to meet the criteria of normal distribution. However, after calculation, which was carried out with the normally distributed logarithmic data, the results were retransformed into the original scale (geometric mean and standard error of geometric mean) for the diagramming of descriptive statistics. A two-way analysis of variance with repeated measurements in both effects with a *post-hoc* Dunnett's test for pairwise comparison of time points against the pre-injection status and pairwise comparison of treatment versus control by t-test for paired observations, stratified by time points, were calculated. The two-sided Fisher's exact test was used to compare the large to small vessel ratio between the treatment and control group. The chi-square test for proportion was calculated for the vascularity of the treatment group versus control group. The resulting p-values of $p \leq 0.05$ were regarded as statistically significant.

Results

CDU

For evaluation of CDU the region of highest color flow was chosen as the region of interest (ROI) (Figure 4). Freeze frames were produced of that ROI. The picture processing program Fiji-win32 [44] was utilized for further evaluation of the ultrasound images. A field of comparable size for analysis was marked by

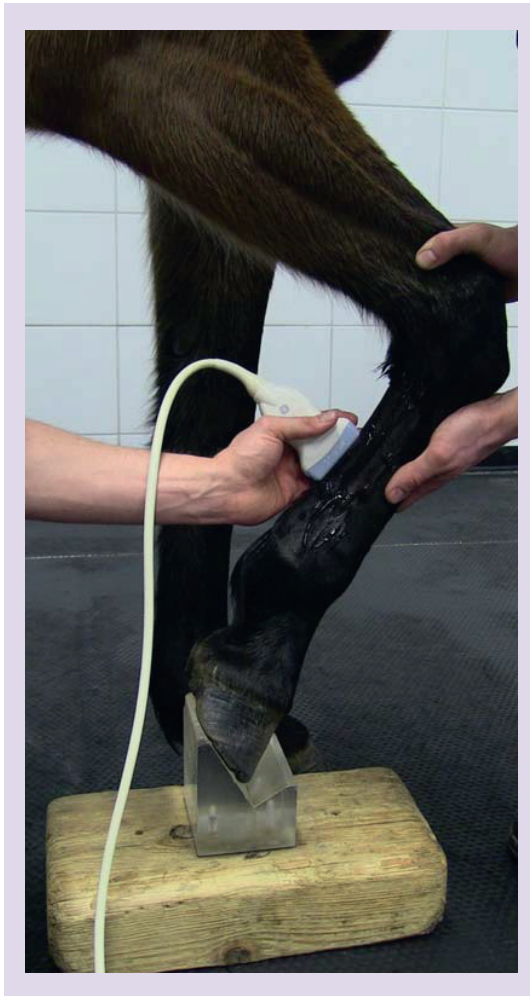


Figure 2. Positioning of the front limb during color Doppler ultrasound examination. The hoof is placed in an Oxspring–(Hickman) block with the digit in slight extension and the carpus flexed at an angle of 80–90° while the limb is held in position by an assistant from dorsal/cranial.

setting a rectangular ROI of defined length which was bordered by the dorsal and palmar paratenon of the SDFT. The color threshold was changed in this ROI, converting all colored pixels to black and all grey pixels to white (Figure 5). The exact percentage of black pixels was calculated, giving a definite number, exactly describing the area with a positive Doppler signal. Five consecutive freeze frames of the ROI displaying the highest color flow were chosen for each time point and their mean value was calculated. The calculation of the two-way analysis of variance shows significance in both treatment ($p = 0.048$) and time ($p < 0.0001$) without significant interaction ($p = 0.75$) between treatment and time points. An increase in blood flow was detected in AT-MSC-treated, as well as in control

substance-treated, lesions at all time points throughout the study period compared with the pre-injection status. The blood flow in AT-MSC-treated lesions was visually higher compared with controls at all but two time points (3 and 10 weeks). The difference at 2 weeks ($p = 0.03$) post-treatment (4 weeks post-surgery) was statistically significant. Blood flow increased in both groups until week 6 and then declined towards week 22 post-treatment slowly back to values approximately equal to those measured before the injection of AT-MSCs or the control substance (Figure 6). A significant difference was noted between the values at time point 0 and 2 weeks post-treatment within the group of AT-MSC-treated ($p = 0.0009$) and control limbs ($p = 0.005$).

HE histology

HE histology showed a significantly higher number of vessels in specimens of AT-MSC-treated SDFTs versus control substance-treated ones ($p < 0.0001$) at 22 weeks post-treatment (Figure 7). Altogether, 1248 vessel cross-sections were counted in AT-MSC-treated and 1026 vessel cross-sections were counted in control substance-treated tendons. Most vessels in both AT-MSC-treated and control substance-treated tendons were located in between connective tissue in intratendinous septa.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining for Factor VIII at 22 weeks post-treatment revealed a statistically significant higher total number of vessels ($p = 0.039$) in tendon specimens of the AT-MSC-treated limbs. Altogether, 2314 vessel cross-sections were counted in AT-MSC-treated and 1640 in control substance-treated tendons. When large and small vessels were evaluated separately, there was only a statistically significant difference in the large vessels, with a higher number in AT-MSC-treated tendons ($p = 0.011$) (Figure 7). Comparing the ratio of small to large vessels, there was a significantly higher proportion of large vessels in the AT-MSC-treated tendons ($p = 0.002$) with 29.3% of vessels being marked as large versus 24.9% of vessels being assigned to the large vessel group in placebo-treated limbs. When each of the nine horses was examined individually, three horses showed a significant difference in the percentage of large vessels compared with small vessels in their AT-MSC-treated limb versus their control substance-treated limb with p -values between 0.004 and 0.047. In one horse, there was only a tendency, and all other horses showed a similar large to small vessel ratio in AT-MSC- and placebo-treated tendons. Most vessels in AT-MSC- and placebo-treated tendons were located within connective tissue in intratendinous septa. Stained endothelial cells without recognizable vascular

structure were evident in both groups of tendons in equally moderate to high numbers.

Discussion

The results of the present study show a significantly higher blood flow on the CDU 2 weeks after treatment, that is, 4 weeks post-surgery, and higher numbers of vessels at post-mortem histology 22 weeks after the intralesional injection of AT-MSCs into SDFT lesions in contrast to controls. AT-MSCs are known to enhance the expression of various angiogenic factors, such as HGF, VEGF, PGF, TGF- β , Ang-1 and Ang-2 [23,25]. Furthermore, an increased blood flow in tendons 6 weeks after intralesional treatment of collagenase-induced SDFT lesions with AT-MSCs suspended in platelet concentrate was observed via power Doppler ultrasonography [17]. These findings suggested a potential positive effect of AT-MSCs treatment on neo-angiogenesis in equine tendon lesions. However, to the best of our knowledge, this effect has not yet

been verified for intralesional application of AT-MSCs suspended in inactivated serum in surgically induced SDFT lesions of living horses.

Neovascularization is an essential part of tendon healing, as it is for any injured tissue. Without sufficient blood supply to the injury zone there would be a lack of nutrients, mediators and growth factors; impairment of tendon healing would occur, especially in the naturally sparsely vascularized tendon [26,45].

During the inflammatory and proliferative phases of wound or tendon healing, that is, the first 45 days, neovascularization is of utmost importance to assure extrinsic healing mechanisms and transportation of nutrients towards and away from the lesion site [31,46,47]. Lesions in this study were caused by single macrotrauma, were of acute nature and blood perfusion peaked relatively early (2 weeks) after AT-MSC treatment, that is, during the proliferative phase (14–45 days) of tendon healing, when sufficient blood supply is highly important. Therefore, we regarded neovascularization as AT-MSC-

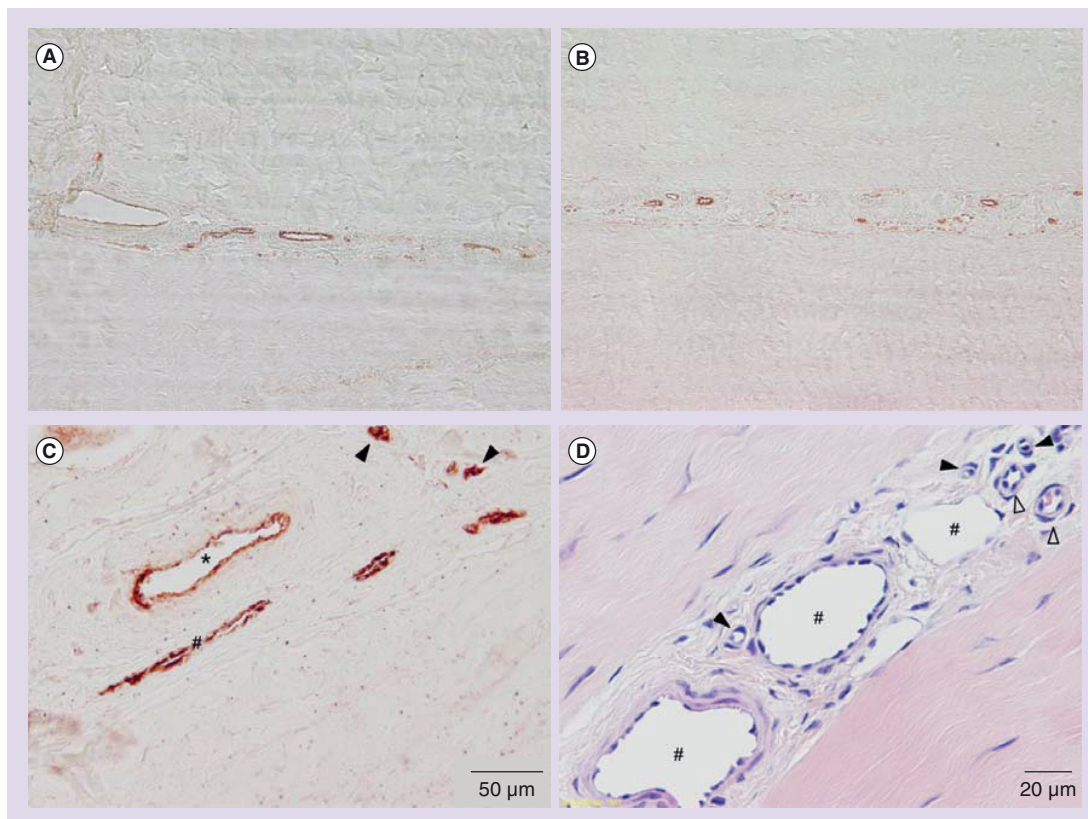


Figure 3. Immunohistochemical staining for Factor VIII and hematoxylin and eosin staining. Longitudinal sections of (A, C & D) an adipose tissue-derived mesenchymal stem cell treated and (B) control superficial digital flexor tendon at 22 weeks after intralesional injection; that is, 24 weeks after creation of lesions. Samples (A, B & D) were obtained from horse number 1; sample (C) was obtained from horse number 9. (A & B) Factor VIII (100x magnification); (C) Factor VIII, endothelial cells of blood vessels are indicated by brown color and arrowheads. Larger vessels are labeled with asterisk and hashtag (200x magnification); (D) hematoxylin and eosin; arteriole (open arrowhead), venule (hashtag) and capillaries (arrowhead; 400x magnification).

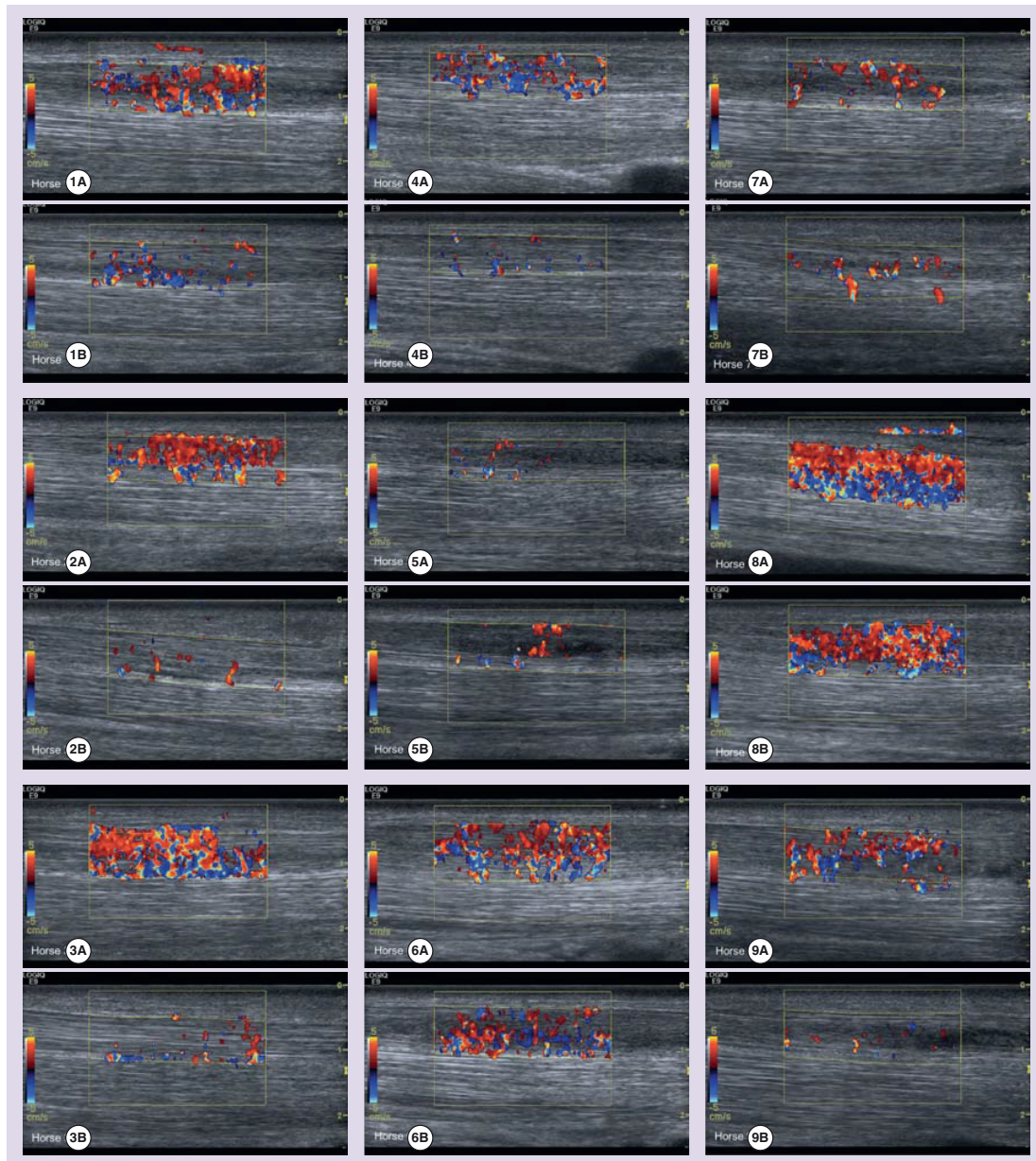


Figure 4. Evaluation of color Doppler ultrasonography. Color Doppler ultrasonography of (A) adipose tissue-derived mesenchymal stem cells-treated and (B) control superficial digital flexor tendons of all horses (1–9) at 2 weeks after intralesional injection (i.e., 4 weeks after creation of lesions).

induced and as an indicator of improved tendon healing in this study. Even though we cannot completely exclude the association of permanent vascular ingrowth with low grade discomfort during the early stages of tendon healing, the horses in this study did not show any signs of lameness, neither at walk until week 15 after lesion creation, nor at trot until the end of the observation period.

The model used for SDFT lesion creation in this study is standardized and was used in other equine

SDFT studies previously [39,40,48]. Since all the damaged tendon tissue and cell debris caused by the mechanical destruction with the arthroscopic burr was left in place, natural processes, such as matrix degrading inflammation and demarcation, were initiated, as occurring in naturally caused tendon lesions. However, development of hypercellularity and a strong inflammatory response that extends to the peritendinous tissues, which can be seen after collagenase injection, were avoided. Furthermore, in contrast to other models

causing tendon lesions by use of proteolytic enzymes, or by use of direct surgical damage, this standardized model created a compartment located centrally in the SDFT, mirroring the central core lesions seen in naturally encountered SDFT lesions [48,49]. Recently, the model used in the present study has been further characterized histologically, histochemically and biochemically, from which it was concluded that the model displayed the key features of the most common human and equine degenerative tendon disorders [49]. However, since it remains an artificial model, it does, of course, not absolutely reflect the naturally occurring pathophysiology in tendon lesion development. While most SDFT injuries tend to become manifest acutely, it is thought that they are preceded by degenerative changes caused by repetitive microtrauma, rather than one major insult [14,50]. This pathogenesis is hard, if not impossible, to mimic and standardize. Standardized procedures are essential for experimental trials, not only for reasons of reproducibility, but also for reduction in variation in research on the mechanisms of action and efficacy of new treatments.

CDU has previously been used in various studies in human and veterinary medicine for the detection of blood flow in a defined area of interest. Placing the hoof in an Oxspring–(Hickman) block for CDU examination with the digit in slight extension and the carpus flexed at an angle of 80–90° helped to increase the sensitivity of measurements by prevention of partial vessel occlusion, which could occur by keeping the leg in an weight-bearing position. In most of the studies evaluating blood flow by use of CDU in human and veterinary medicine, the intensity of the Doppler signal was determined semi-quantitatively aided by scoring systems [20,28,51–56].

We further objectified the intensity of the Doppler signal in this study by capturing freeze frames from loops and using picture-processing software. Since the 3D extent of the ROI could not be captured within one image, we used video sequences to store each CDU examination of the lesion sites. The Doppler signal was quantified in five consecutive freeze frames of each video sequence displaying the highest color flow to keep evaluation errors as minimal as possible.

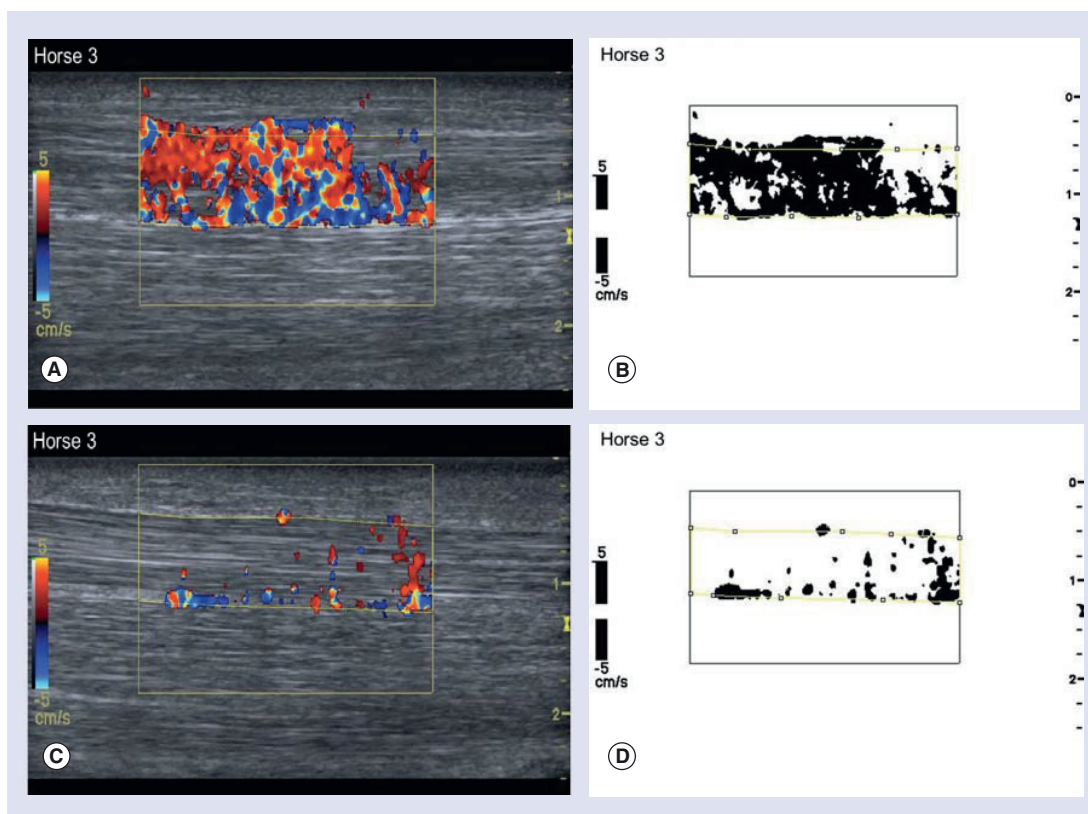


Figure 5. Analysis of ultrasonograms with the picture-processing program Fiji-win32. Longitudinal color Doppler ultrasonography of (A) adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-treated and (C) control superficial digital flexor tendons 2 weeks after intralesional injection (i.e., 4 weeks after creation of lesions). (B & D) show the regions of interest of (A & C) after change of color threshold, converting all colored pixels into black and all grey pixels into white.

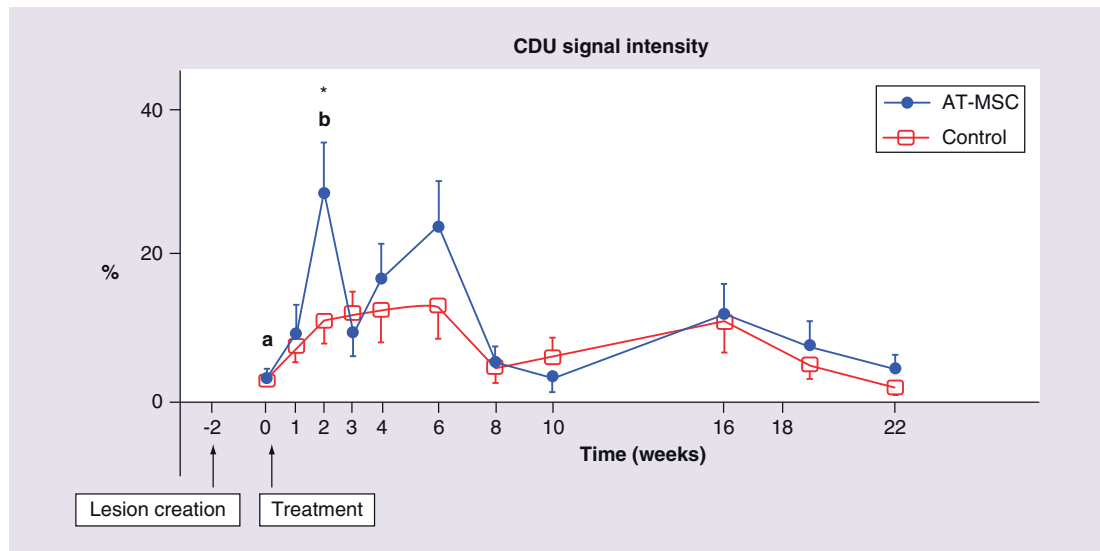


Figure 6. Color Doppler ultrasonography signal intensity. Geometric mean and standard error of geometric mean for the percent of coloured pixels picked up by CDU throughout the study period. The asterisk (*) marks a statistically significant difference between AT-MSC-treated and control substance-treated superficial digital flexor tendons (SDFT; $p = 0.03$). A statistically highly significant difference in AT-MSC-treated SDFTs between time point 0 (a) and 2 weeks post-treatment (b) was observed ($p = 0.0009$). There was also a statistically significant difference in the control substance-treated SDFTs between time point 0 (a) and 2 weeks post-treatment (b) ($p = 0.005$). AT-MSC: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell; CDU: Color Doppler ultrasonography.

Immunohistochemical staining for Factor VIII has been successfully used before for the detection of vascularization in various human tissues, as well as in canine cranial cruciate ligaments and equine tendons [17,20,57–59]. Even though Wang *et al.* [58] found the immunohistochemical staining for CD31 more sensitive than Factor VIII in a human tumor xenograft mice model, and Jones *et al.* [60] were able to stain the vessels in rabbit, human and equine tendons using this marker, we found it excessively more complicated to produce useful, evaluable histologic specimens with a CD31 marker since the tendon specimens tended to fold during the staining process and the staining itself was of poor quality. As all the slides in our study had a good or excellent staining quality after staining for Factor VIII and this same staining modality has been used in a comparable study by Bosch *et al.* [20], we decided to use immunohistochemical staining for Factor VIII in this study.

Factor VIII and CD31 do not exclusively stain the endothelial cells of blood vessels, but also more or less weakly endothelial cells of lymphatic vessels [37,57–64].

Examining multiple consecutive slices may seem more representative than using a single histologic tissue slice. However, considering that vessels will progress through the depth of the tissue, consecutive slices can be assumed to yield comparable vessel numbers. Therefore, we considered a thorough examination of one histologic slice of the tissue sample sufficient. Comparing

vessel numbers of immunohistochemically stained and HE-stained histology samples of treated and control tendons, more vessels were counted on slides stained for Factor VIII. This highlights the superiority of immunohistochemistry in depicting blood vessels and is not caused by an increase in accidentally counted lymphatic vessels, as morphologic differentiation on HE histology is more adequate than on immunohistochemically stained samples [59].

Based on the CDU examinations and end-stage HE histology and immunohistochemistry, this study shows a statistically significant increase of neovascularization in artificially created SDFT lesions after intralesional AT-MSCs injection. Although CDU represents the intensity of blood flow rather than the number of vessels, this blood flow will almost certainly occur through newly formed vessels, as most original vessels in the ROI were destroyed mechanically during the creation of the tendon lesions. A statistically significant increase of blood flow in AT-MSC-treated tendons was noted at 2 weeks post-treatment (i.e., 4 weeks post lesion creation). This is in the middle of the proliferative phase of tendon healing when angiogenesis is a highly important element of the healing process [46], as underlined by the fact that blood flow values in both AT-MSC-treated and in control tendons were significantly higher at 2 weeks than at baseline before treatment ($p < 0.001$ and $p = 0.005$ for AT-MSC-treated and control tendons, respectively). The decrease in

blood flow towards the end of the proliferative phase (day 45) was expected, considering the well-described decrease in blood vessel-rich granulation tissue during this phase of tendon healing [46,56]. This finding is in accordance with Carvalho *et al.* [17], who found a decrease in power Doppler signal 6 weeks after intralesional injection of collagenase-induced SDFT lesions within platelet concentrate-suspended AT-MSCs. The slight difference in time between the findings in that study and in ours might be attributable to the different lesion models and substrates used. CDU did not show any noteworthy difference between treatment groups at 22 weeks post-treatment even though immunohistochemical staining for Factor VIII and HE histology revealed a significantly higher number of blood vessels in AT-MSC-treated SDFTs compared with the ones treated with control substance. This finding is in

contrast to the results of Bosch *et al.* [20], who found higher blood flow in PRP-treated artificially created SDFT lesions throughout almost their whole study period and still at 22 weeks post-treatment, which was in line with their histological findings. Carvalho *et al.* [17] did not find significant differences with immunohistochemical staining for Factor VIII, but their blood flow measurements at 16 weeks post-treatment are in accordance with ours at 22 weeks. The discrepancy between theirs and our histological findings may be explained by the different evaluation systems used. Choosing five fields of view for each biopsy fragment rather than examining the whole slide, and using a four-point scoring system instead of using absolute vessel numbers might have influenced the results. Our findings may illustrate the higher sensitivity of histology in comparison to CDU, probably underlining the

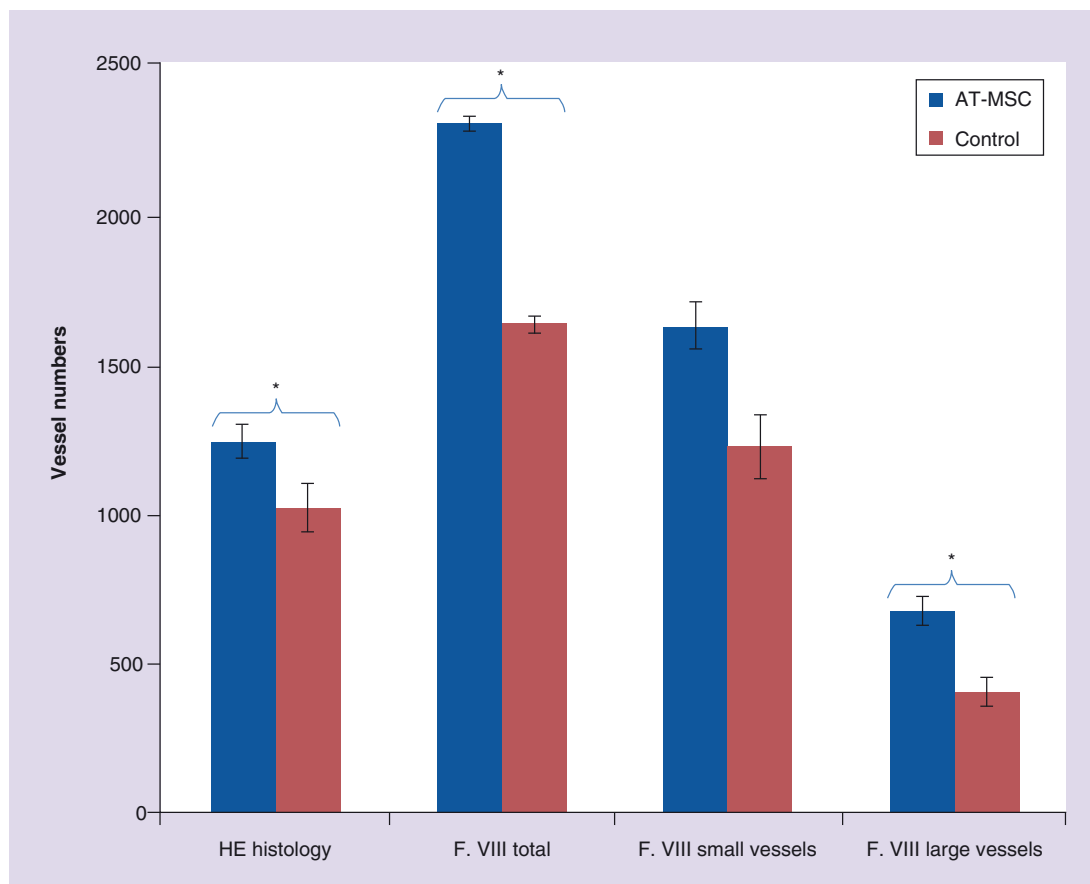


Figure 7. Hematoxylin and eosin histology and immunohistochemical staining for Factor VIII. Numbers of vessels (\pm standard deviation) counted for AT-MSC-treated and control substance-treated superficial digital flexor tendons (SDFTs) at 22 weeks post-treatment. Immunohistochemical staining for F. VIII and plain (HE) histology were used. Asterisks (*) mark statistically significant differences between AT-MSC-treated and control SDFTs for large vessels ($p = 0.01$) and total number of vessels ($p = 0.04$) after immunohistochemical staining for F. VIII and between total vessel numbers of AT-MSC-treated and control SDFTs evaluated with HE histology ($p < 0.0001$).

AT-MSC: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell; F. VIII: Factor VIII; HE: Hematoxylin and eosin.



limited diagnostic value of CDU in detecting blood flow in vessels smaller than a certain size. Since Factor VIII does not exclusively stain endothelial cells of blood vessels, but also endothelial cells of lymphatic vessels, we might have counted lymphatic vessels as well, even though exclusion of lymphatic structures by morphology was attempted [57,59]. By keeping strictly to the same method of differentiation between blood and lymphatic vessels, any counting error would have been the same for all tissue samples inspected and, therefore,

Executive summary

Rationale & hypothesis

- Injury of the superficial digital flexor tendon (SDFT) is a common, often career-ending condition in equine athletes. The healing of tendons is time consuming and associated with a high recurrence rate and high costs.
- The hypothesis of this study was that adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (AT-MSC) treatment of surgically induced SDFT lesions increases neovascularization during tendon healing compared with controls, and that this increase in vascularization would be detectable with color Doppler ultrasonography (CDU) and histology.

Materials & methods

- Nine non-lame adult horses without signs of tendinopathy were included. A standardized surgical model was used to create central lesions in both front limb SDFTs. Either AT-MSCs or control substance was injected intralesionally 14 days after surgery. CDU of SDFTs was performed at regular intervals. At 22 weeks post-treatment horses were euthanized and SDFTs were harvested for hematoxylin and eosin histology and for immunohistochemical detection of Factor VIII (von Willebrand factor).

Results

- CDU
 - CDU showed that the blood flow in AT-MSC-treated lesions was significantly higher compared with controls at 2 weeks ($p = 0.03$) post-treatment (i.e., 4 weeks after creation of lesions).
- Hematoxylin and eosin histology and immunohistochemistry
 - At 22 weeks post-treatment significantly higher numbers of vessels were counted in tendon specimens of AT-MSC-treated limbs using hematoxylin and eosin histology ($p < 0.0001$) and immunohistochemical staining for Factor VIII ($p = 0.039$).

Discussion

- CDU
 - The intensity of the Doppler signal was objectified by capturing five consecutive freeze frames displaying the highest color flow from video sequences stored during CDU. The picture processing program used for analysis proved to be a valuable tool to quantify the intensity of the Doppler signal.
- Histology
 - All slides in our study had a good or excellent staining quality after staining for Factor VIII and all endothelial cells were clearly depicted.
 - When comparing vessel numbers of immunohistochemically stained and hematoxylin and eosin-stained histology samples of treated and control tendons, more vessels were counted on slides stained for Factor VIII. This highlights the superiority of immunohistochemistry in depicting blood vessels.
- The findings of this study indicate a higher diagnostic value of histology in comparison to CDU, with regard to neovascularization, considering the non-significant difference of CDU signal intensity between treatment and control group at the end of the observation period. This underlines the limitations of CDU in detecting blood flow in vessels smaller than a certain size.

Conclusion

- Intralesional injection of AT-MSCs into artificially created equine SDFT lesions increased neovascularization during the proliferative phase of tendon healing in treated limbs compared with controls, and might therefore have a beneficial effect on tendon healing.

Future perspective

- Further investigations are warranted to elucidate why Doppler signal intensity was higher in AT-MSC-treated tendons only 2 weeks post-treatment although histology showed increased vascularity at the end of the observation period.
- Future research should investigate whether higher AT-MSC numbers, multiple injections at different time points or combinations of AT-MSCs with other blood- or cell-based substrates further increase neovascularization during the process of tendon healing.
- More work on the effects of AT-MSCs alone on the structural integrity and biochemical, as well as biomechanical, properties of healing tendons is needed before AT-MSCs can be advocated as evidence-based treatment for tendon lesions in the horse.



of no influence for the comparison. As histology in the clinical setting requires harvesting of (repeated) tendon biopsies, which may themselves influence the process of tendon healing [17], this method is highly impractical for the monitoring of the healing process and detection of neovascularization, and CDU, therefore, still seems to be a useful clinical tool.

Conclusion & future perspective

The ideal source of MSCs for treatment of equine tendinopathy is still a point of debate. To the authors knowledge no *in vivo* studies concentrating on the effect of cultured autologous AT-MSCs alone on neovascularization during tendon healing in a standardized surgical model have been published [16–18]. Additionally, in the present study an objective system to evaluate Doppler ultrasonograms was established by analyzing sequential images with the picture processing program Fiji-win32. In conclusion, intralesional injection of AT-MSCs into artificially created equine SDFT lesions increased neovascularization in treated limbs compared with control limbs at 2 weeks post-treatment of acute SDFT tendinopathies. As neovascularization is considered a crucial part of tendon healing during the inflammatory and proliferative phase, intralesional AT-MSCS treatment is, therefore, likely to have a beneficial effect on tendon healing.

Theoretically, higher AT-MSC numbers, or multiple injections at different time points during the tendon healing process, might further enhance neovascularization, but this needs experimental confirmation. Further investigations into the effects of AT-MSCs on neovascularization, structural integrity and biochemical as well as biomechanical properties of healing equine SDFTs are needed before these claims can be substantiated and before AT-MSCs can be advocated as evidence-based treatment for tendon lesions in the horse.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest; •• of considerable interest

- Dyson SJ. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992–2000). *Equine Vet. J.* 36(5), 415–419 (2004).
- O'Meara B, Bladon B, Parkin TDH, Fraser B, Lischer CJ. An investigation of the relationship between race performance and superficial digital flexor tendonitis in the thoroughbred racehorse. *Equine Vet. J.* 42(4), 322–326 (2010).
- Kasashima Y, Takahashi T, Smith RK *et al.* Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine Vet. J.* 36(4), 346–350 (2004).
- Williams RB, Harkins LS, Hammond CJ, Wood JL. Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996, 1997 and 1998. *Equine Vet. J.* 33(5), 478–486 (2001).
- Dowling BA, Dart AJ, Hodgson DR, Smith RK. Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Vet. J.* 32(5), 369–378 (2000).
- Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R. Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol.* 25(9), 409–416 (2007).
- Wilson AM, McGuigan MP, Su A, Van Den Bogert AJ. Horses damp the spring in their step. *Nature* 414(6866), 895–899 (2001).
- Smith RK, Webbon PM. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? *Br. J. Sports Med.* 39(9), 582–584 (2005).
- Avella CS, Smith KW. Diagnosis and management of tendon and ligament disorders. In: *Equine Surgery*. Auer JA, Stick JA (Eds). Elsevier Saunders, MO, USA, 1157–1179 (2012).
- Silver IA, Brown PN, Goodship AE *et al.* A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine Vet. J. Suppl.* 1, 1–43 (1983).
- Burk J, Ribitsch I, Gittel C *et al.* Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet. J.* 195(1), 98–106 (2013).
- Schneider PR, Buhmann C, Mobasheri A, Matis U, Shakibaei M. Three-dimensional high-density co-culture with primary tenocytes induces tenogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 29(9), 1351–1360 (2011).
- Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am. J. Vet. Res.* 69(7), 928–937 (2008).

Research Article Conze, van Schie, van Weeren *et al.*

- 14 Reed SA, Leahy ER. Growth and Development Symposium: stem cell therapy in equine tendon injury. *J. Anim. Sci.* 91(1), 59–65 (2013).
- 15 Raabe O, Shell K, Fietz D *et al.* Tenogenic differentiation of equine adipose-tissue-derived stem cells under the influence of tensile strain, growth differentiation factors and various oxygen tensions. *Cell Tissue Res.* 352(3), 509–521 (2013).
- 16 Carvalho AD, Alves ALG, De Oliveira PGG *et al.* Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *J. Equine Vet. Sci.* 31(1), 26–34 (2011).
- Describes the use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AT-MSCs) for the treatment of collagenase-induced superficial digital flexor tendon (SDFT) lesions in horses.
- 17 Carvalho AD, Badial PR, Alvarez LE *et al.* Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: a randomized controlled trial. *Stem Cell Res. Ther.* 4(4), 85 (2013).
- Describes the use of AT-MSCs in combination with a platelet concentrate for treatment of collagenase-induced SDFT lesions in horses.
- 18 Ricco S, Renzi S, Del Bue M *et al.* Allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in combination with platelet rich plasma are safe and effective in the therapy of superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 26(Suppl. 1), 61–68 (2013).
- 19 Uysal CA, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: biomechanical and immunohistochemical evaluation. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 65(12), 1712–1719 (2012).
- 20 Bosch G, Moleman M, Barneveld A, Van Weeren PR, Van Schie HT. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 21(4), 554–561 (2011).
- The study used color Doppler ultrasonography and immunohistochemical staining for Factor VIII and showed the positive effect of platelet-rich plasma treatment on neovascularization of surgically induced SDFT lesions.
- 21 Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant. Dent.* 10(4), 225–228 (2001).
- 22 Moon MH, Kim SY, Kim YJ *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol. Biochem.* 17(5–6), 279–290 (2006).
- 23 Jeon ES, Lee IH, Heo SC *et al.* Mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis in a murine xenograft model of A549 human adenocarcinoma through an LPA1 receptor-dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1801(11), 1205–1213 (2010).
- 24 Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A *et al.* VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br. J. Cancer* 99(4), 622–631 (2008).
- 25 Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J. Atheroscler. Thromb.* 13(2), 77–81 (2006).
- 26 Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res.* 4(4), 252–260 (2002).
- 27 Stromberg B. The normal and diseased superficial flexor tendon in race horses. A morphologic and physiologic investigation. *Acta Radiol. Suppl.* 305, 1–94 (1971).
- 28 Ohberg L, Alfredson H. Ultrasound guided sclerosis of neovessels in painful chronic Achilles tendinosis: pilot study of a new treatment. *Br. J. Sports Med.* 36(3), 173–175; discussion 176–177 (2002).
- 29 Alfredson H, Ohberg L, Forsgren S. Is vasculo-neural ingrowth the cause of pain in chronic Achilles tendinosis? An investigation using ultrasonography and colour Doppler, immunohistochemistry, and diagnostic injections. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 11(5), 334–338 (2003).
- 30 Ohberg L, Lorentzon R, Alfredson H. neovascularization in Achilles tendons with painful tendinosis but not in normal tendons: an ultrasonographic investigation. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 9(4), 233–238 (2001).
- 31 Patterson-Kane JC, Firth EC. The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. *Vet. J.* 181(2), 79–89 (2009).
- 32 Weinberg EP, Adams MJ, Hollenberg GM. Color Doppler sonography of patellar tendinosis. *Am. J. Roentgenol.* 171(3), 743–744 (1998).
- 33 Kristoffersen M, Ohberg L, Johnston C, Alfredson H. neovascularization in chronic tendon injuries detected with colour Doppler ultrasound in horse and man: implications for research and treatment. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 13(6), 505–508 (2005).
- 34 Hamper UM, Dejong MR, Caskey CI, Sheth S. Power Doppler imaging: clinical experience and correlation with color Doppler US and other imaging modalities. *Radiographics* 17(2), 499–513 (1997).
- 35 Richards PJ, Win T, Jones PW. The distribution of microvascular response in Achilles tendonopathy assessed by colour and power Doppler. *Skeletal Radiol.* 34(6), 336–342 (2005).
- 36 Turetschek K, Kollman C, Hittmair K, Nasel C, Wunderbaldinger P, Mostbeck GH. Power Doppler versus color Doppler us in the detection of low-flow – *in vitro* results. *Radiology* 197, 338–338 (1995).
- 37 Rosenberg JB, Greengard JS, Montgomery RR. Genetic induction of a releasable pool of factor VIII in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20(12), 2689–2695 (2000).
- 38 Kato T, Prevo R, Steers G *et al.* A quantitative analysis of lymphatic vessels in human breast cancer, based on LYVE-1 immunoreactivity. *Br. J. Cancer* 93(10), 1168–1174 (2005).
- 39 Little D, Schramme MC. Ultrasonographic and MRI evaluation of a novel tendonitis model in the horse. *Vet. Surg.* 35(6), E15 (2006).



- 40 Bosch G, Van Schie HT, De Groot MW *et al.* Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. *J. Orthop. Res.* 28(2), 211–217 (2010).
- 41 Nufer F. Isolierung, Identifizierung und therapeutische Verwendung von adulten mesenchymalen Stammzellen bei Sehnenverletzungen bei Pferden. *Faculty of Medicine of the Eberhard Karls University Tübingen, Germany*. Inaugural Dissertation, 126 (2012).
- Provides the data for MSC characterization, FACS analysis and multipotent differentiation of AT-MSCs, which were expanded in the same way as those used in the present study.
- 42 Braun J, Hack A, Weis-Klemm M *et al.* Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 71(10), 1228–1236 (2010).
- 43 Conrad S, Nufer F, Mundle K *et al.* [Mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue – isolation, expansion and characterization.] Presented at: *Vortragszusammenfassungen der XVIII. Tagung über Pferdekrankheiten im Rahmen der Equitana*, Essen, wak Verlag, Gescher, Germany, 119 (2009).
- 44 Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9(7), 676–682 (2012).
- 45 Richards HJ. Repair and healing of the divided digital flexor tendon. *Injury* 12(1), 1–12 (1980).
- 46 Jann H, Stashak TS. Tendon and paratendon lacerations. In: *Equine Wound Management*. Stashak TS, Theoret CL (Eds). Wiley-Blackwell, IA, USA, 489–508 (2008).
- 47 Van Schie HT, Bakker EM, Cherdchutham W, Jonker AM, Van De Lest CH, Van Weeren PR. Monitoring of the repair process of surgically created lesions in equine superficial digital flexor tendons by use of computerized ultrasonography. *Am. J. Vet. Res.* 70(1), 37–48 (2009).
- 48 Schramme M, Hunter S, Campbell N, Blikslager A, Smith R. A surgical tendonitis model in horses: technique, clinical, ultrasonographic and histological characterisation. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 23(4), 231–239 (2010).
- The surgical model for SDFT lesion creation that was used in the present study is discussed here in detail.
- 49 Cadby JA, David F, Van De Lest C *et al.* Further characterisation of an experimental model of tendinopathy in the horse. *Equine Vet. J.* 45(5), 642–648 (2013).
- 50 Goodship AE. The pathophysiology of flexor tendon injury in the horse. *Equine Vet. Educ.* 5(1), 23–29 (1993).
- 51 Peers KH, Brys PP, Lysens RJ. Correlation between power Doppler ultrasonography and clinical severity in Achilles tendinopathy. *Int. Orthop.* 27(3), 180–183 (2003).
- 52 Cook JL, Ptaznik R, Kiss ZS, Malliaras P, Morris ME, De Luca J. High reproducibility of patellar tendon vascularity assessed by colour Doppler ultrasonography: a reliable measurement tool for quantifying tendon pathology. *Br. J. Sports Med.* 39(10), 700–703 (2005).
- 53 Boesen MI, Boesen A, Koenig MJ, Bliddal H, Torp-Pedersen S. Ultrasonographic investigation of the Achilles tendon in elite badminton players using color Doppler. *Am. J. Sports Med.* 34(12), 2013–2021 (2006).
- 54 De Vos RJ, Weir A, Cobben LP, Tol JL. The value of power Doppler ultrasonography in Achilles tendinopathy: a prospective study. *Am. J. Sports Med.* 35(10), 1696–1701 (2007).
- 55 Sengkerij PM, De Vos RJ, Weir A, Van Weelde BJ, Tol JL. Interobserver reliability of neovascularization score using power Doppler ultrasonography in midportion achilles tendinopathy. *Am. J. Sports Med.* 37(8), 1627–1631 (2009).
- 56 Murata D, Misumi K, Fujiki M. A preliminary study of diagnostic color Doppler ultrasonography in equine superficial digital flexor tendonitis. *J. Vet. Med. Sci.* 74(12), 1639–1642 (2012).
- 57 Birner P, Obermair A, Schindl M, Kowalski H, Breitenecker G, Oberhuber G. Selective immunohistochemical staining of blood and lymphatic vessels reveals independent prognostic influence of blood and lymphatic vessel invasion in early-stage cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* 7(1), 93–97 (2001).
- 58 Wang D, Stockard CR, Harkins L *et al.* Immunohistochemistry in the evaluation of neovascularization in tumor xenografts. *Biotech. Histochem.* 83(3), 179–189 (2008).
- 59 Hayashi K, Bhandal J, Kim SY *et al.* Immunohistochemical and histomorphometric evaluation of vascular distribution in intact canine cranial cruciate ligament. *Vet. Surg.* 40(2), 192–197 (2011).
- 60 Jones M, Clayton E, Noel C, Ladhani K, Grobbelaar A. Immunohistochemical endothelial localisation – a novel method of vessel delineation in tendon tissue. *J. Immunol. Methods* 280(1–2), 175–181 (2003).
- 61 Norrby K, Ridell B. Tumour-type-specific capillary endothelial cell stainability in malignant B-cell lymphomas using antibodies against CD31, CD34 and factor VIII. *APMIS* 111(4), 483–489 (2003).
- 62 Sievers E. Sinusendothel-/Virgultumzellen in normalen und pathologisch veränderten menschlichen Lymphknoten. *Faculty of Medicine of the Philipps-Universität Marburg, Germany*, Inaugural Dissertation (2011).
- 63 Lin BT, Weiss LM, Battifora H. Intravascularly disseminated angiosarcoma: true neoplastic angioendotheliomatosis? Report of two cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 21(10), 1138–1143 (1997).
- 64 Falker S. Zur Expression des von Willebrand faktors (vWF), CD31, CD34, angiotensin-I-converting-enzymes (ACE), BMA 120 und D2–40 in humanen benignen und malignen Gefäßtumoren. *Faculty of Medicine of the Ruhr-University Bochum, Germany*, Inaugural Dissertation (2009).



13.9 Publikation 9

Geburek, F., Lietzau, M., Beineke, A., Rohn, K., Stadler, P.M.

Effect of a single injection of autologous conditioned serum (ACS) on tendon healing in equine naturally occurring tendinopathies.

Stem Cell Res. Ther. 2015, 26. Juni; 6 (1): 126.



RESEARCH

Open Access



Effect of a single injection of autologous conditioned serum (ACS) on tendon healing in equine naturally occurring tendinopathies

Florian Geburek^{1*}, Maren Lietzau¹, Andreas Beineke², Karl Rohn³ and Peter M. Stadler¹**Abstract**

Introduction: Autologous blood-derived biologicals, including autologous conditioned serum (ACS), are frequently used to treat tendinopathies in horses despite limited evidence for their efficacy. The purpose of this study was to describe the effect of a single intralesional injection of ACS in naturally occurring tendinopathies of the equine superficial digital flexor tendon (SDFT) on clinical, ultrasonographic, and histological parameters.

Methods: Fifteen horses with 17 naturally occurring tendinopathies of forelimb SDFTs were examined clinically and ultrasonographically (day 0). Injured tendons were randomly assigned to the ACS-treated group ($n = 10$) receiving a single intralesional ACS injection or included as controls ($n = 7$) which were either untreated or injected with saline on day 1. All horses participated in a gradually increasing exercise programme and were re-examined nine times at regular intervals until day 190. Needle biopsies were taken from the SDFTs on days 0, 36 and 190 and examined histologically and for the expression of collagen types I and III by immunohistochemistry.

Results: In ACS-treated limbs lameness decreased significantly until day 10 after treatment. Swelling (scores) of the SDFT region decreased within the ACS group between 50 and 78 days after treatment. Ultrasonographically, the percentage of the lesion in the tendon was significantly lower and the echogenicity of the lesion (total echo score) was significantly higher 78 and 106 days after intralesional ACS injection compared to controls. Histology revealed that, compared to controls, tenocyte nuclei were more spindle-shaped 36 days after ACS injection. Immunohistochemistry showed that collagen type I expression significantly increased between days 36 and 190 after ACS injection.

Conclusions: Single intralesional ACS injection of equine SDFTs with clinical signs of acute tendinopathy contributes to an early significant reduction of lameness and leads to temporary improvement of ultrasonographic parameters of repair tissue. Intralesional ACS treatment might decrease proliferation of tenocytes 5 weeks after treatment and increase their differentiation as demonstrated by elevated collagen type I expression in the remodelling phase. Potential enhancement of these effects by repeated injections should be tested in future controlled clinical investigations.

Keywords: Horse, Tendon, Ultrasonography, Biopsy, Histology, Collagen, Autologous conditioned serum, ACS, Irap[®]

Introduction

Tendinopathy of the superficial digital flexor tendon (SDFT) is a common injury in Thoroughbred racehorses and other horse breeds and is regarded as a career-limiting disease with a high recurrence rate [1]. Numerous treatment modalities have shown limited success in improving tendon repair [2]. Regenerative therapy aims to

restore structure and function after application of biocompatible materials, cells, and bioactive molecules [3, 4]. There is growing knowledge about the clinical effects of potentially regenerative substrates, e.g. mesenchymal stem cells (MSCs) [5, 6] and autologous blood products such as platelet rich plasma [7, 8] on equine tendinopathies. To date, however, ideal treatment strategies for naturally occurring tendinopathies have not been established [1, 2].

Autologous conditioned serum (ACS; synonyms Irap[®], Orthokine[®], Orthogen, Düsseldorf, Germany) is used for intralesional treatment of tendinopathy in horses but, to

* Correspondence: florian.geburek@tiho-hannover.de

¹Equine Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 9, 30559 Hannover, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Geburek et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



the best of our knowledge, its clinical effect is only documented anecdotally [8–10]. ACS is prepared by exposing whole blood samples to glass beads, which has been shown to stimulate the secretion of anti-inflammatory cytokines, including interleukin (IL)-4 and IL-10 and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in humans [11]. A recent investigation has shown that ACS from equine blood also contains high levels of IL-1Ra and IL-10 [12]. Equine studies have focused on the IL-1Ra-mediated anti-inflammatory effects of ACS [13]; however, in tendon healing, the high concentrations of growth factors such as insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and transforming growth factor-beta (TGF- β) may be equally or more important [14–16]. Blood samples from different horses and the use of different kits for the preparation of ACS may lead to differences in the cytokine and growth factor concentration in vitro [12, 17]. However, the relevance of these differences for the clinical effect is unknown.

ACS was originally described to improve muscle regeneration in a murine muscle contusion model [18] and to exhibit anti-inflammatory effects in an experimental model of carpal osteoarthritis in horses [13] and in a placebo-controlled clinical trial in humans with knee osteoarthritis [19].

The rationale for the use of ACS to treat equine tendinopathies is based on several findings: 1) It was shown in an experimental study that the expression of IL-1 β (and matrix metalloproteinase-13) is upregulated following overstrain injury of rat tendons, demonstrating that these molecules are important mediators in the pathogenesis of tendinopathy [15, 20]. 2) IL-1Ra protein and heterologous conditioned serum prepared with the irap[®] kit reduced the production of prostaglandin E₂ by stimulated cells derived from macroscopically normal SDFTs in vitro [21]. 3) Growth factors concentrated in ACS, e.g. IGF-1 and TGF- β , have the potential to attract resident precursor cells, e.g. MSCs and tenoblasts, and to increase cell proliferation during tendon healing [14, 15, 17]. Rat Achilles tendons exposed to ACS in an experimental study showed an enhanced expression of the Col1A1 gene, which led to an increased secretion of type I collagen and accelerated recovery of tendon stiffness and improved histologic maturity of the repair tissue [22]. It was shown in another rodent Achilles tendon transection model that ACS generally increases the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF), bone morphogenetic protein-12 and TGF- β 1 [16], representing growth factors important for the process of tendon regeneration [15].

The process of tendon healing is mainly divided into three phases which merge into each other. The acute inflammatory phase (<10–14 days) is characterized by phagocytosis and demarcation of injured tendon tissue. A fibroproliferative callus is formed during the proliferative phase (4–45 days), while collagen fibrils are organised

into tendon bundles during the remodelling or maturation phase (45–120 days; <3 months) [1, 23].

The aim of the present study was to support the hypothesis that a single intraslesional ACS injection into SDFT lesions 1) has a clinically detectable anti-inflammatory effect, 2) leads to improved B-mode ultrasonographic parameters and 3) improves the organization of repair tissue.

Materials and methods

Inclusion criteria for client-owned adult horses was a history of acute uni- or bilateral SDFT tendinopathy (tendon disorder) without cutaneous injury but with clinical signs of inflammation being reported to be present for up to 14 days prior to the presentation at the Equine Clinic of the University of Veterinary Medicine, Hannover, Foundation, or to collaborating veterinarians. Horses were only included if the clients agreed to the study design and tendons had not received intraslesional injections before. Injured limbs were randomly assigned to the group treated with ACS ($n = 10$) or to controls ($n = 7$). The study was carried out between 2009 and 2012 and approved by the animal welfare officer of the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Germany, and the ethics committee of the responsible German federal state authority in accordance with the German Animal Welfare Law (Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, Az. 33.9-42502-05-09A652).

Clinical examination

All horses were examined clinically on the day of first presentation (day 0). This examination included visual assessment of lameness (5 grade score) [24] and signs of inflammation which were scored semiquantitatively by palpation (skin surface temperature in the palmar metacarpal region and sensitivity of the SDFT to palpation: 0 = no abnormality, 1 = mild abnormality, 2 = moderate abnormality, and 3 = severe abnormality; swelling of the SDFT was determined by palpation as an increase in diameter relative to normal tendon: 0 = no increase, 1 = increase by factor 1.5; 2 = increase by factor 1.5 to 2; increase by more than factor 2 [25]).

B-mode ultrasonography

All injured tendons were examined with B-mode ultrasound on the day of first presentation (day 0) in a transverse and longitudinal fashion with a linear 5–7.5 MHz linear scanner (Logiq e, GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA), according to the seven zone designations as described previously [26, 27]. Images were stored digitally and analysed according to the following parameters to determine the degree- and time-related changes of the lesions: maximal injury zone (MIZ), type of lesion



determined on transverse images in the MIZ (core lesion = centrally located, focal hypo-/anechoic region; marginal lesion = peripherally located, focal hypo-/anechoic region; diffuse lesion = homogenous or heterogenous changes in echogenicity of the whole/most parts of the cross sectional area), summarized cross-sectional areas of the tendon (total cross-sectional area, T-CSA), summarized cross-sectional areas of the lesion (total lesion cross-sectional area, TL-CSA), and percentage of the lesion in the tendon [percent total lesion, %T-lesion = (TL-CSA / T-CSA) × 100]. Echogenicity and fibre alignment were graded semiquantitatively at each zone and the scores for all levels were summarized (total echo score, TES; total fibre alignment score, T-FAS). Echogenicity was assigned to 0 (normoechoic), 1 (hypoechoic), 2 (mixed echogenicity), and 3 (anechoic) [27, 28], and fibre alignment was graded according to the estimated percentage of parallel fibres in the lesion: 0 (>75 %), 1 (50–74 %), 2 (25–49 %), and 3 (<25 %) [27, 28]. Analyses of ultrasonograms were performed by one examiner (ML) blinded to the individual treatment modality.

Intralesional treatment, follow-up examinations and controlled exercise

Ten millilitres of autologous blood were collected by a single venipuncture of one jugular vein into an irap[®]-10 syringe system (Orthogen, Düsseldorf, Germany). Blood samples were incubated at 37 °C (range 6–9 hours). After centrifugation at 4,000 rotations per minute for 10 minutes (centrifuge: Universal 320, rotor: no. 1624, Hettich, Tuttlingen, Germany), serum was aseptically aspirated from the syringe and passed through a 0.22 µm syringe-driven filter unit (Millex-MP, Millipore Corporation, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland). Depending on the size of the lesion as determined ultrasonographically (TL-CSA), tendons allocated to the ACS group received a single intralesional injection of 1–3 ml through a 22G needle (diameter 0.7 mm, length 30 mm) into the SDFT defect (day 1). Control tendons either received a single injection of a placebo, i.e. 1–3 ml saline through a 22G needle (diameter 0.7 mm, length 30 mm) or were untreated in case the owner declined an intralesional application of saline. Horses were sedated for the intralesional injections with detomidine (0.01–0.03 mg/kg intravenously) and butorphanol (0.04–0.05 mg/kg intravenously), and the medial and lateral palmar nerves were anaesthetized 2 cm distal to the carpometacarpal joints with 2 ml of a 2 % mepivacaine solution. After aseptic preparation of the skin, superficial digital tendon lesions were injected under sonographic guidance at a single site from the lateral aspect of the tendon perpendicularly to its long axis directly into the most hypoechoic areas, i.e. the MIZ while the limb was weight-bearing. All horses participated in a gradually increasing exercise

programme as described previously [7]. The programme started the first day after the reported onset of SDFT tendinopathy. From week 25 to 27 horses were exercised for 25 minutes at a walk and for 15 minutes at a trot.

Horses were re-examined clinically and ultrasonographically at regular intervals for 27 weeks on days 11, 22, 36, 50, 78, 106, 134, 162, and 190. Thereafter horse owners were advised to gradually increase exercise on an individual basis until the previous level of performance was reached. Data concerning signs of acute tendon injury, the level of performance horses reached and the discipline they were used for were obtained by telephone inquiry with horse owners or trainers until the preparation of the manuscript.

Needle biopsies and histologic examinations

On days 0, 36 and 190, one needle biopsy was taken aseptically from each SDFT at its MIZ with a 20G automated biopsy needle (Biopsiepistole PlusSpeed™, Peter Pflugbeil GmbH, Zorneding, Germany), with the needle entering the MIZ of the SDFT from distal at a 45° angle while the carpus was flexed approximately 90° and the metacarpophalangeal joint was moderately extended [29]. Pain reaction and intensity of bleeding from the biopsy site were evaluated using an established score [29]. The MIZ was recorded as distance from the accessory carpal bone (cm) so that repeat biopsies were taken from the same anatomic area as the day 0 biopsy while avoiding previous biopsy sites. Limbs were protected with a distal limb bandage for 2 days after taking needle biopsies and after intralesional injections. All needle biopsies were fixed in 10 % formalin, paraffin-embedded, sectioned at a thickness of 1–2 µm, mounted on microscope slides, and stained with haematoxylin and eosin. A single histological slide of each biopsy was examined histologically according to a score described previously [7, 30]; findings were graded using a semiquantitative four-point scale (0 = normal appearance, 1 = slightly abnormal, 2 = moderately abnormal, and 3 = markedly abnormal) considering the following parameters: fibre structure (0 = linear, no interruption; 3 = short with early truncation), fibre alignment (0 = regularly ordered; 3 = no pattern identified), morphology of tenocyte nuclei (0 = flat; 3 = round), variations in cell density (0 = uniform; 3 = high regional variation), and vascularisation (0 = absent; 3 = high). Histological sections were independently scored by two observers blinded to horse and treatment modality (FG and ML). In total, five high power fields (40× magnification) per section were examined and scored. Mean averages of score values determined by each observer were calculated for each parameter (see above) before score values of both examiners were averaged.

Immunohistochemical analysis of paraffin-embedded tissue sections was used to determine the formation of



collagen type I and collagen type III. A commercially available mouse-anti-bovine antibody (NB600-450 anti-COL 1A1, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) and a rabbit-anti-bovine antibody (CL197P anti collagen type III alpha 1 chain, Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany) were applied as primary antibodies against collagen type I and collagen type III, respectively. Secondary biotinylated antibodies were obtained from relevant species allowing binding to the primary antibody. Colour production from the chromogen diaminobenzidine tetrachloride was catalysed by streptavidin-conjugated peroxidase (avidin-biotin-complex-method) [31]. Finally, the sections were counterstained with haematoxylin. Immunohistochemical cross-reactivity of antibodies with uninjured equine tendon tissue was tested prior to analysis of the needle biopsies. Positive control tissues included bovine aorta and bovine tendon for collagen type I antigen-specific antibodies and bovine skin for collagen type III antigen-specific antibodies. In negative control sections, primary antibodies were replaced by appropriately diluted Balb/c mouse ascites and rabbit serum, respectively.

Photomicrographs were taken from all immunostained slides (Color View II, 3.3 Megapixel CCD, Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany). Quantitative morphometric analysis of the immunoreaction was achieved by determination of the immunostained area using image analysis software (analySIS[®] 3.1, Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany). A threshold for a positive signal was defined and the percentage of positively immunostained area in the tissue section as a whole was calculated [32, 33].

Statistical analysis

Analysis of data was performed using SAS[™] Version 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The level of significance was set at $p < 0.05$. All values in the graphs are expressed as arithmetic mean values with standard error ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). The assumption of normality was tested using the Kolmogorov-Smirnov test and visual assessment of qq-plots of model residuals. In the case of rejection of normal distribution, distribution-free nonparametric methods were applied. Fisher's exact test was applied to test the differences between groups on each examination day with regard to the parameters of degree of lameness, swelling and skin surface temperature. To compare not-normally distributed parameters within a group between examination days, the permutation test for nonparametric analysis of repeated measurements with the Šidák post hoc test for multiple pairwise comparisons was used. The influence of groups and time points on ultrasonographic parameters (T-CSA, TL-CSA, %T-lesion, TES and T-FAS), histology scores and

percentages of positively immunostained areas were tested using a two-way analysis of variance for independent samples (groups) and repeated measurements (dependent time points, biopsies), followed by the Tukey post hoc test for multiple pairwise comparisons. The intraclass correlation coefficient was calculated by analysis of variance components to test inter-observer repeatability of histological scores.

Results

Description and history of horses, intralesional injections

Seventeen limbs of 15 horses between 2 and 19 years old (mean 8.46 years old) met the inclusion criteria. Ten of the limbs were included in the ACS-treated group (ACS group) and seven served as controls. Limbs allocated to the ACS group belonged to five Warmbloods (50 %), four Thoroughbreds (40 %) and one Arabian (10 %). The limbs of five Warmbloods (71.42 %), one Thoroughbred (14.28 %) and one Half-blood (14.28 %) were included as controls. Of these, one Thoroughbred and one Warmblood with bilateral SDFT lesions served for both groups (Table 1). The horses' history (i.e. high-speed exercise, increased age >12 years) was suggestive of tendinopathy to be strain-induced in at least 6 of 10 SDFTs (60 %) allocated to the ACS group and in at least 4 of 7 (57 %) control SDFTs. Two tendons had a definitive history of blunt external trauma. One was included in the ACS group and one served as control.

In total ten SDFTs were injected with ACS. Five control SDFTs were not treated and two control tendons received a single intralesional injection of saline.

Lameness

On day 0, the mean degree of lameness was 0.8 in the ACS group. In control limbs, the mean degree of lameness was 1.42 on day 0. One of the two horses with bilateral tendinopathy that served for the ACS group and as a control was not lame. The second one showed a unilateral front limb lameness (SDFT in the lame limb was treated with ACS). The mean degree of lameness did not differ between groups on any day of examination ($p > 0.05$). Regardless of treatment modality all horses became sound by day 36. Compared to day 0, lameness decreased significantly by day 11 ($p = 0.046$) within the ACS group and it decreased significantly by day 36 ($p = 0.021$) in limbs serving as controls (Fig. 1a).

Long-term follow-up

Recurrence of tendon injury was not reported in any horse after 2 to 4 years post-diagnosis. Of the eight horses with SDFTs being allocated to the ACS group, five horses (63 %), among these three racehorses, returned to their previous or a higher performance level, two horses (25 %) died of reasons unrelated to tendinopathy, and one

Table 1 Description, clinical history, diagnostic data, and treatment of 15 horses with 17 SDFT lesions

Horse number	Breed	Age (years)	Gender	For which purpose used	Reported duration of SDFT tendinopathy until initial examination (days)	Reported initiating event	Limb affected	Maximal injury zone	Lesion type	Treatment
ACS group										
2241/09	Thoroughbred	2	S	Racing	2	Training	RF	2b	Diffuse	ACS
2240/09	Thoroughbred	3	S	Racing	2–3	Training	RF	2b	Core	ACS
2489/09 ^a	Thoroughbred	4	M	Racing	7	Racing	RF	1b	Core	ACS
2539/09	Warmblood	3	S	Dressage	14	Blunt trauma	RF	2b	Marginal	ACS
1672/10	Arabian	17	G	Pleasure	14	Running free	RF	1b	Core	ACS
6264/10 ^b	Warmblood	8	G	Dressage	9	Unknown	RF	3a	Marginal	ACS
6335/10	Warmblood	10	G	Pleasure	10	Unknown	LF	2b	Diffuse	ACS
4793/10	Thoroughbred	3	S	Racing	7	Training	LF	2b	Core	ACS
6263/10	Warmblood	20	M	Pleasure	14	Stumbling at cross country ride	RF	1b	Core	ACS
2378/10	Warmblood	11	M	Pleasure	13	At ride	LF	2b	Diffuse	ACS
		Mean			8.1					
Controls										
2489/09 ^a	Thoroughbred	4	M	Racing	7	Racing	LF	1b	Diffuse	No
6264/10 ^b	Warmblood	8	G	Dressage	9	Unknown	LF	2a	Core	Saline
6111/10	Warmblood	5	M	Jumping	14	Kicking himself over the jump	RF	1b	Marginal	No
6265/10	Warmblood	5	M	Pleasure	7	Unknown	RF	1b	Marginal	Saline
6383/11	Warmblood	18	M	Pleasure	10	At cross country ride	LF	2a	Marginal	No
5461/11	Warmblood	14	G	Police horse	4	At gallop on beach	LF	2b	Diffuse	No
6384/11	Half-blood	8	G	Eventing	1	After eventing competition	LF	2a	Core	No
		Mean			8.86					

^{a, b}Horses had bilateral SDFT lesions and served for the ACS group and as control. ACS autologous conditioned serum (treated with single intralesional injection of autologous conditioned serum); G gelding, LF left front limb, M mare, RF right front limb, S stallion, Saline treated with single intralesional saline injection, SDFT superficial digital flexor tendon

horse (12 %) was retired due to osteoarthritis of interphalangeal joints after the observation period. One of the horses which was included in the ACS group and served as a control did not resume training and was retired as a broodmare; the second one performed as a dressage horse. Of the five horses with tendons serving only as control, four individuals (80 %) performed in their discipline at the previous or a higher level, and one horse (20 %) was lost to follow-up.

Signs of inflammation

No statistically significant differences between groups were observed during the entire observation period, including day 0, with regard to scores for swelling, skin surface temperature and sensitivity to palpation. Swelling scores of the SDFT region decreased significantly in the ACS group ($p = 0.005$) between day 50 (mean score 1.1)

and day 78 (mean score 0.7) and remained reduced until the end of the observation period (Fig. 1b). In controls, swelling scores did not decrease significantly during 27 weeks. Skin surface temperature and sensitivity to palpation scores decreased up to day 22 within both groups and remained at a low level until day 190.

B-mode ultrasonography

The horses included presented with core lesions (seven limbs), marginal lesions (five limbs) or diffuse lesions (five limbs) of the SDFT (Table 1). The MIZ of most lesions was located in zone 2b (41.17 % of limbs), followed by zone 1b (35.29 % of limbs), zone 2a (17.64 % of limbs) and zone 3a (5.88 % of limbs).

The mean %T-lesion was 21.73 ± 7.16 in the ACS group and 18.51 ± 5.07 in controls on day 0. This parameter was significantly lower ($p < 0.05$) in the ACS

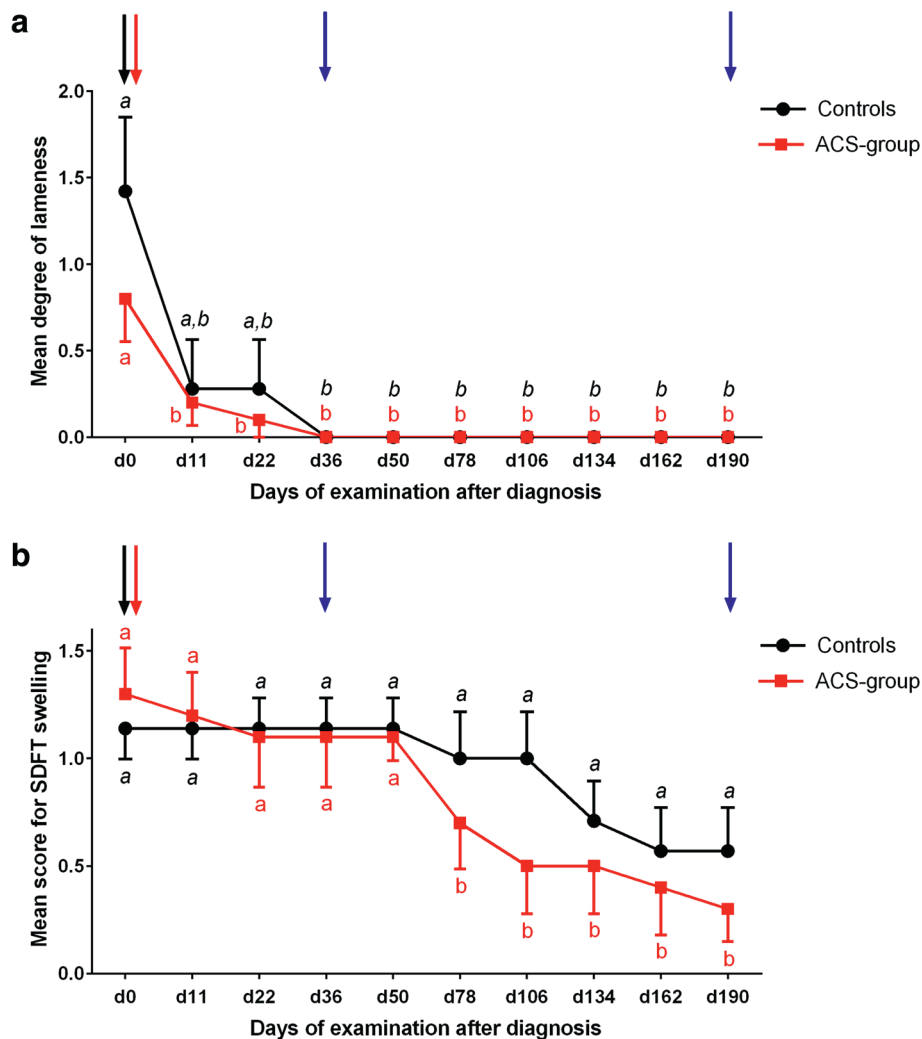


Fig. 1 Degree of lameness and palpable swelling of tendons. **a** Degree of lameness of control limbs and those treated with autologous conditioned serum (ACS) over time. **b** Scores for palpable swelling of ACS-treated and control superficial digital flexor tendons (SDFTs) over time. Mean \pm SE. Different letters (ACS *normal*, and control *italic*) indicate significant differences ($p < 0.05$) within treatment group. ACS-group, $n = 10$ limbs (SDFTs treated with a single injection of ACS); controls, $n = 7$ limbs (SDFTs treated with a single injection of control substance or left untreated). Black arrow day (d)0 – diagnosis, first tendon biopsy; red arrow d1 – intralesional injection of ACS/control substance; blue arrows d36/d190 – second/third tendon biopsy

group than in controls on days 78, 106 and 162 (Fig. 2a). TES were significantly lower in the ACS group versus controls on days 78 and 106 (Fig. 2b). There was no difference in T-CSA, TL-CSA (Fig. 2c) or T-FAS between the groups at any time point.

Mean %T-lesion showed a continuous decrease over time within the ACS group which was significant ($p = 0.02$) for the first time on day 78 compared to day 0. After this period, this parameter remained below the 10 % range. In control tendons, mean %T-lesion continuously remained on a similar elevated level ($p > 0.05$) throughout the entire observation period (Fig. 2a).

Compared to day 0, the mean TES decreased significantly on day 22 and again between days 22 and 78 in

the ACS group ($p < 0.05$), while in controls compared to day 0 the TES decreased significantly ($p < 0.05$) the first time on day 78 (Fig. 2b).

Mean T-CSA did not change significantly throughout the observation period in either group. Regarding the progression of TL-CSA within the ACS group over time, it was significantly lower ($p < 0.05$) from day 78 onwards until the end of the examination period compared to levels on day 0, while values from control tendons remained on a similar level from day 0 to 190 (Fig. 2c). Mean T-FAS decreased significantly between day 0 and day 78 ($p = 0.023$) within the ACS group; in controls this parameter decreased significantly on day 134 compared to day 0 ($p = 0.04$).

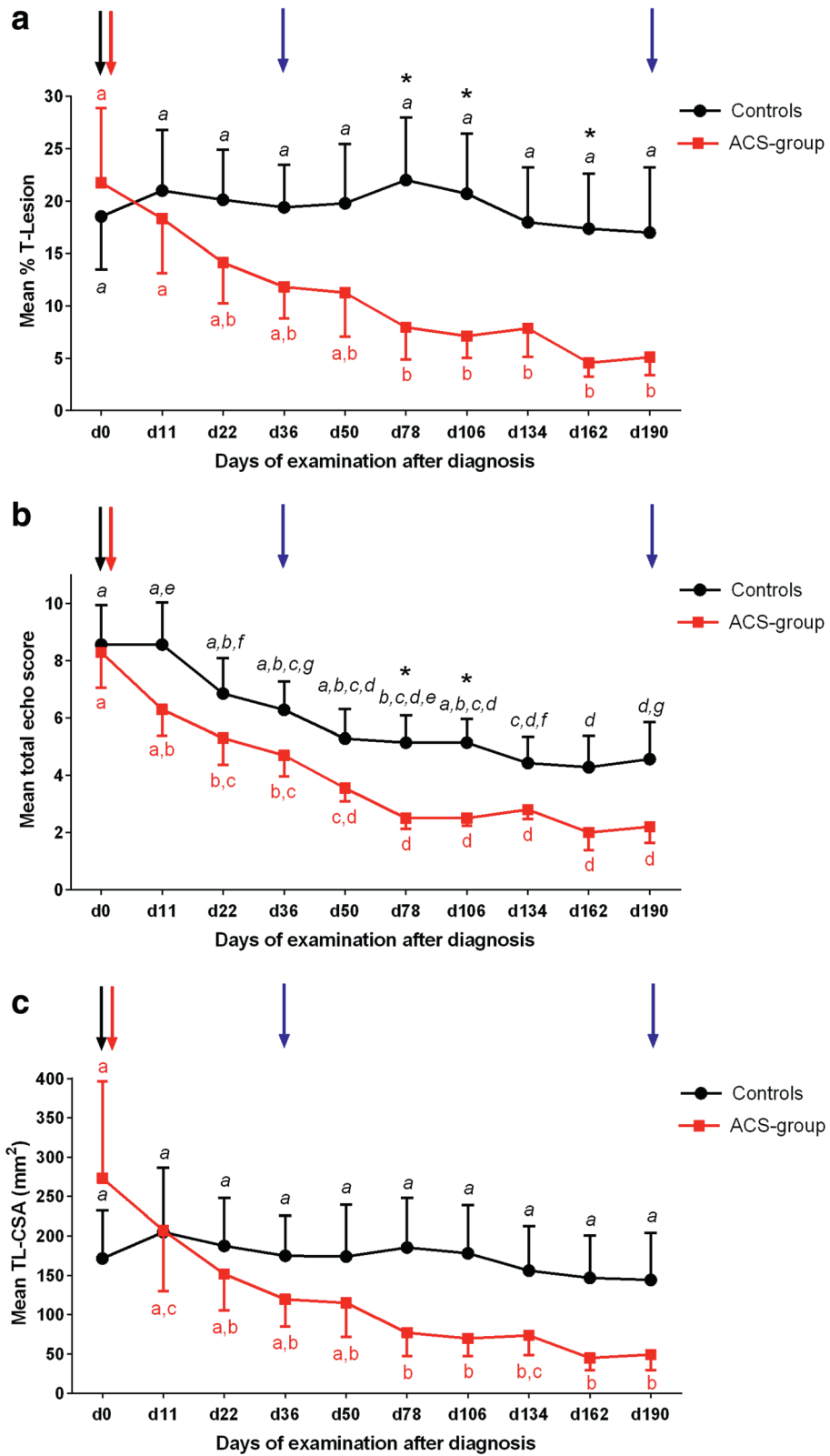


Fig. 2 (See legend on next page.)



(See figure on previous page.)

Fig. 2 Ultrasonographic measurements. **a** Percent total lesion (%T-Lesion) of autologous conditioned serum (ACS)-treated and control superficial digital flexor tendons (SDFTs) over time. **b** Total echo scores of ACS-treated and control SDFTs over time. **c** Total lesion cross-sectional area (TL-CSA) of ACS-treated and control SDFTs over time. Mean \pm SE. * $p < 0.05$, between groups. Different letters (ACS *normal*, and control *italic*) indicate significant differences ($p < 0.05$) within treatment group. ACS-group, $n = 10$ limbs (SDFTs treated with a single injection of ACS); controls, $n = 7$ limbs (SDFTs treated with a single injection of control substance or left untreated). *Black arrow* day (d)0 – diagnosis, first tendon biopsy; *red arrow* d1 – intralesional injection of ACS/control substance; *blue arrows* d36/d190 – second/third tendon biopsy

Needle biopsies and histology

A total of 51 needle biopsies were taken. Pain reaction was mild in 78.43 % of the procedures, mild to moderate in 17.64 % and moderate in 3.92 % of the cases. A moderate to severe or severe pain reaction was not observed. No bleeding was observed after taking biopsies in 25.49 % of the cases, mild bleeding occurred in 58.82 % and moderate bleeding in 15.68 % of cases. Severe bleeding was not observed.

Of 51 biopsies, 47 were available for tendon histology [7, 30]. Four biopsies from severely oedematous lesions were not evaluated due to limited tissue content. The intra-class correlation for inter-observer repeatability was 0.72 for fibre structure, 0.88 for fibre alignment, 0.84 for nuclei morphology and 0.92 for variations in cell density.

Scores for tenocyte nuclei morphology were significantly lower (i.e. cell nuclei more flattened; $p = 0.01$) in the ACS group (Fig. 3a) than in controls (Fig. 3b) on day 36 (Fig. 4a). Scores for cell density showed a tendency to be lower (i.e. more uniform) in the ACS group than in controls on day 36 ($p = 0.052$). Scores for fibre structure, fibre alignment (Fig. 4b), vascularisation, and subscores for structural integrity and metabolic activity did not show differences between the ACS group and controls at any time point.

With regard to development of fibre alignment during the healing of tendons treated with ACS, scores for this parameter were significantly lower (i.e. fibres were more regularly ordered; $p = 0.04$) in biopsies taken at the end of the observation period (day 190; Fig. 3d, Fig. 4b) than in those taken on day 0 (Fig. 3c, Fig. 4b). In control tendons, scores for fibre alignment (Fig. 4b), scores for morphology of tenocyte nuclei (Fig. 4a) and scores for cell density decreased significantly (i.e. tissue morphology improved; $p < 0.05$) between day 36 and day 190 biopsies.

There were no differences between the ACS group and controls with regard to collagen type I and collagen type III expression in biopsies taken on days 0, 36 and 190. Within the ACS group, the collagen type I content increased significantly ($p = 0.03$) between the biopsies taken on day 36 (Fig. 3e) and day 190 (Fig. 3f), while it remained at the same level ($p > 0.05$) in controls (Fig. 4c). The collagen type III content showed a tendency ($p = 0.056$) to decrease in the ACS group between samples taken on days 0 and 190.

Discussion

Results of the present study show that a single intralesional ACS injection into SDFT lesions leads to a temporary improvement of ultrasonographic parameters [27, 28]. Transient flattened morphology of tenocyte nuclei and an increased collagen type I expression in ACS-treated tendons over time are indicative of reduced proliferation and increased differentiation of this cell type, respectively [1, 34, 35]. The therapeutic effect of ACS treatment is also demonstrated by an earlier decrease in lameness as compared to controls [2].

The history of the horses was suggestive of strain-induced tendinopathy in the majority of tendons treated with either modality. However, it remains unclear whether the effects shown in the current study equally apply to tendinopathies related to other etiologies. Although the reported duration of tendinopathy of up to 2 weeks before first examination (day 0) referred to clinical signs in the present study, subclinical degeneration is known to precede obvious clinical symptoms of strain-induced tendinopathies, especially in equine athletes [36]. It cannot be excluded that at least some of the tendons on day 0 were not in the inflammatory, but in the early proliferative phase of tendon healing, although neither B-mode ultrasonography nor histology yielded clear evidence of potential chronicity of the tendinopathies. As an alternative, either more extensive tendon biopsies or ultrasonographic tissue characterization as a noninvasive diagnostic tool could have been used initially to further determine the age of the lesions [37, 38].

As tendon composition and biomechanical properties may vary significantly between horses [39] intraindividual controls (control = contralateral limb) are preferred in experimental settings [7]. For these reasons, both front limbs of two horses showing clinical signs of bilateral SDFT tendinopathy were included in the ACS group and as controls. Unfortunately, this could not be realised in more horses. Only two out of five clients who agreed to their horse or the respective limb being included as a control accepted an intralesional injection of these control tendons. Thus, the objective to create two separate control groups, one with the lesion left untreated and one with an intralesional saline injection, could not be achieved. Treatment modalities of control groups in clinical and experimental trials may be seen controversially. On the one hand, it is of interest to compare the

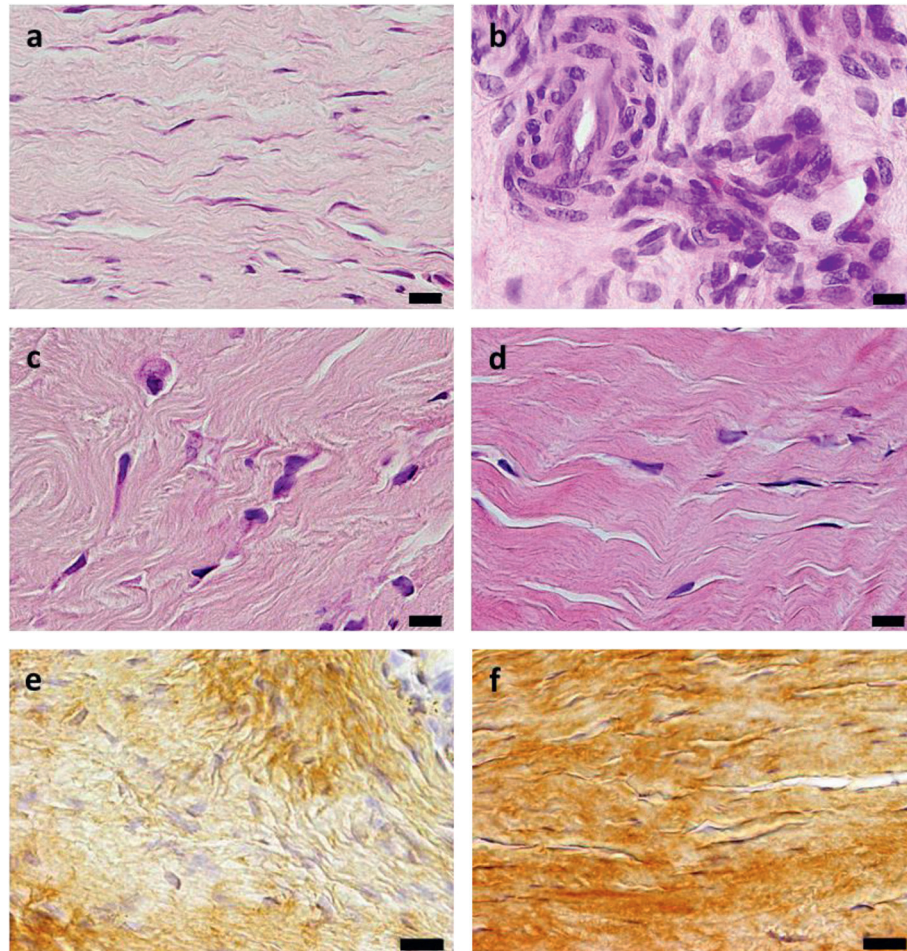


Fig. 3 Longitudinal sections of tendon biopsies from superficial digital flexor tendons with tendinopathy. **a–d** Histopathological specimens stained with haematoxylin & eosin using a 40x objective. Tendons of horses on day 36 after intralesional treatment with autologous conditioned serum (ACS) (horse no. 4793/10; **a**) and no treatment (control tendon, horse no. 6384/11; **b**). The number of round cell nuclei was higher in control tendons than in ACS-treated tendons 36 days after treatment. Scale bars = 10 μ m. Tendon of horse no. 2241/09 1 day before (day 0, **c**) and 190 days after (**d**) intralesional treatment with ACS. Alignment of collagen fibres improved significantly between day 0 and day 190 after ACS treatment. Scale bars = 10 μ m. Tendon of horse no. 2240/09 36 days (**e**) and 190 days (**f**) after intralesional treatment with ACS. Immunohistochemistry revealed a significant increase of collagen type I expression between day 36 and day 190 after ACS treatment. Scale bars = 20 μ m

effect of controlled exercise plus the effect of the substrate injected intralesionally with the effect of controlled exercise alone (= argument against intralesional injection of a control substance into control tendons). On the other hand, the mere puncture and needle decompression of acute tendon defects may have a therapeutic effect independent of the substrate injected [2]. Against that background, it seems preferable to treat control tendons with sham injections to demonstrate the effect of the substrate injected [5, 7] (ACS in the present case).

Tendon biopsies were used because clinical assessment of tendon healing and B-mode ultrasonography alone are limited with regard to sensitivity and reproducibility [40] and longitudinal needle biopsies were established in human [41, 42] and equine surgery [29, 43] as minimally invasive and well-tolerated techniques. They allow an

insight into tendon architecture as well as the immunohistochemical detection of, for example, collagen type I and III [44]. Disadvantages, however, are the potentially therapeutic, albeit unknown, effect of the biopsy process on tendon healing [2, 45], their limited reproducibility and the relatively small volume of tendon tissue harvested [29, 43].

Although mean degree of lameness did not differ between groups, this does not necessarily imply similar functional repair of the lesions, since SDFTs are generally more exposed to maximal load during heavy athletic activities than during trot, i.e. later during rehabilitation [46]. The observation that, compared to day 0, a significant decrease in lameness occurred earlier in the ACS group, i.e. until day 11, compared to the controls (day 36) may be influenced by effects attributed to ACS [8, 11, 13].

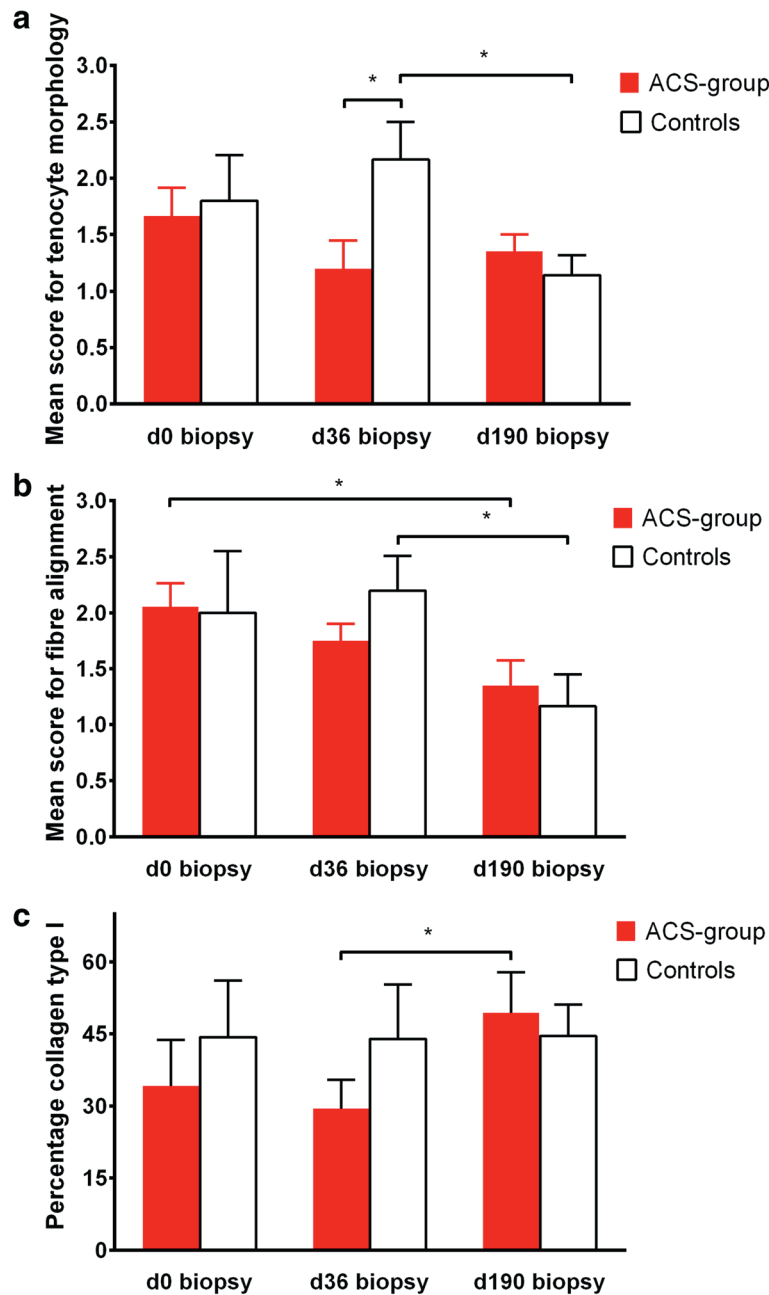


Fig. 4 Histologic scores and collagen type I content of superficial digital flexor tendons. **a** Histologic scores for morphology of tenocyte nuclei in tendon biopsies taken from autologous conditioned serum (ACS)-treated versus control superficial digital flexor tendons (SDFTs) at different time points during the examination period of 190 days. **b** Histologic scores for fibre alignment in tendon biopsies taken from ACS-treated versus control SDFTs at different time points during the examination period of 190 days. **c** Percentage of collagen type I content determined immunohistochemically in tendon biopsies taken from ACS-treated versus control SDFTs at different time points during the examination period of 190 days. Day (d)0 = day the diagnosis was made; d36/d190 = 36/190 days after tendinopathy was diagnosed. * $p < 0.05$. ACS group, $n = 10$ limbs (SDFTs treated with a single injection of ACS); controls, $n = 7$ limbs (SDFTs treated with a single injection of control substance or left untreated)

Detection of lameness in horses with bilateral SDFT lesions may be more challenging than detection of unilateral gait abnormality [47]. It cannot be excluded that the two horses with bilateral SDFT tendinopathy may have shown bilateral lameness or an additional contralateral

lameness, respectively, if diagnostic analgesia had been performed.

Clinical signs of inflammation were monitored using semiquantitative clinical score systems which may be subject to some inaccuracy. This could have been improved



by the use of computerized gait analysis, thermography [48] and measurements of the metacarpal circumference in combination with ultrasonography [49]. None of the inflammatory signs, including swelling, differed between groups, but palpable swelling decreased significantly within the ACS group between days 50 and 78 in contrast to controls. On the one hand this may be attributed to auto- and paracrine effects of ACS on endogenous growth factor expression, since in a rodent Achilles tendon transection model bFGF expression was enhanced but not before 8 weeks, i.e. delayed after ACS injection [16]. On the other hand controlled exercise exerted anti-inflammatory effects on tendons from both groups [50] which did not, however, lead to a significant decrease in swelling in controls.

The decrease of palpable swelling in the ACS group between days 50 and 78 correlates positively with the ultrasonographic finding that TL-CSA and %T-lesion decreased only in the ACS group between before treatment and day 78. T-CSA, however, remained unchanged throughout the entire observation period in both groups. This proves that the decrease in swelling in the ACS group rather reflects a decrease in cutaneous, subcutaneous and peritendinous swelling than an altered tendon thickness in the late proliferation and early remodelling phase (i.e. until around day 45). This may be due to a therapeutic effect of inadvertent reflux of small volumes of ACS into the subcutis during intralesional injection. Ultrasonographic measurements of extratendinous swelling are challenging and were not included in the present study, although they could have been helpful to further confirm findings of palpation. In contrast to the results of this study, rat Achilles tendons showed an increase in tendon thickness after ACS treatment compared to the control tendons [22]. However, comparability is limited since the rat tendons, in contrast to the present study, were sutured and received three treatments of ACS.

The present study shows that, compared to control tendons, a single intralesional injection of ACS leads to a significant reduction of %T-lesion and an increase in echogenicity (TES) 78 and 106 days after treatment. This finding corresponds to an earlier (until day 22) increase in TES and an earlier (until day 78) increase of the percentage in parallel orientated fibre bundles (T-FAS) in the ACS group compared to controls. These effects could be the result of stimulation of repair tissue, i.e. improved fibrillogenesis in the early proliferative phase of tendon healing (4–45 days after injury) [23, 28, 37] in which most horses were presented and treated. This may have been a consequence of the potential IL-1Ra-mediated anti-inflammatory action which is attributed to ACS by several authors [8, 11, 13], although IL-1Ra concentrations in ACS were not determined in the present study. Another potential pathway may be the supplementation of growth factors, such as IGF-1 and TGF- β ,

which are supposed to be increased in equine ACS [12, 16, 21]. IGF-1 is known to be decreased for approximately 2 weeks in experimentally induced tendinopathy and a beneficial bolstering effect of exogenous IGF-1 on low endogenous IGF-1 production during the early repair phase of tendinopathy has been hypothesized [34]. ACS has been shown to display significant effects on the endogenous expression of growth factors potentially via auto- and paracrine pathways [16]. It remains unclear why the significant differences between groups with regard to %T-lesion and TES were not consistent until the end of the observation period despite tendencies to significance. This may be attributed to a time-limited effect of ACS (see above). Ultrasonographic tissue characterization has been established in recent years as a more precise alternative to B-mode ultrasonography to monitor the process of tendon healing [37, 38], particularly if only a probe with a relatively low resolution is available as in the present study.

With regard to histologic scores, a difference between groups was seen at day 36. Here, cell nuclei were flattened in the ACS group compared to controls, which is suggestive of decreased tenocyte proliferation in the late proliferative phase (4–45 days) [1, 23, 34, 35] as a response to the ACS injection. In agreement with this, it has been shown that tendon fibroblasts with a spindle-shaped nucleus have reduced apoptotic and proliferative indices, as demonstrated in human patellar tendons [35]. A consequence might be a decreased cellular production of inelastic collagen type III, which has been described to peak between 3 to 6 weeks after injury in equine experimental studies [34, 51]. However, immunohistochemistry in the present study revealed no difference of collagen type III expression between groups which might be due to considerable variations of different types of collagen between individual lesions, as described for naturally developed lesions in horses [1, 44].

The more favourable development of collagen type I expression in the ACS group between days 36 and 190 indicates qualitative improvement [34, 51], such as increased tensile strength of the repair tissue in the remodelling or maturation phase (45–120 days) [36], which is potentially caused by the mechanisms mentioned, i.e. an IL-1Ra-mediated anti-inflammatory mechanism or the supplementation of growth factors, such as IGF-1 and TGF- β . Collagen type I was seen to be elevated for 6 months after injury in equine experimental studies [34]. This rather reflects the progress in control tendons of the present study and correlates with previous findings in naturally injured equine tendons [44]. In contrast to an experimental Achilles tendinopathy model using ACS-treated rats [22], no difference in collagen type I expression was detected between groups in the present study. However, rat Achilles tendons were



treated three times at 24-hour intervals with the first injection 24 hours after induction of the lesion, i.e. in the acute inflammatory phase of tendon healing. By contrast, tendons in the present study received only a single intralesional injection of ACS up to 14 days after the onset of clinical symptoms, i.e. mostly at the end of or even after the acute inflammatory phase. In the latter investigation, real-time quantitative polymerase chain reaction was used, which allows quantification of mRNA transcription of different collagen types, provided that enough tissue is available. Cytokines such as IL-1Ra and the growth factors IGF-1 and TGF- β have a short half-life and they may be degraded and consumed within a short time period after exogenous application [14–16]. Nevertheless, tendon healing may not only be enhanced by direct binding of cytokines and growth factors to cell surface receptors, but also due to indirect effects by stimulation of endogenous production of growth factors [13, 16, 52]. Therefore, the effect of ACS is potentially enhanced by several consecutive injections [22], as reported anecdotally to be common in equine practice and as recommended for the treatment of joint pathology [13]. A single ACS injection was chosen to determine the effect of a low dose as a basis for research because, to date, neither dose-dependent *in vivo* studies nor a consensus on the treatment protocol are available for blood products such as ACS. Another aim was to keep the number of factors influencing outcome, such as repeated needle puncture of tendons, as low as possible.

The increase in collagen I expression after ACS injection in an experimental rat study did not coincide with an improved maximum load to failure, despite leading to an improvement in tendon stiffness during biomechanical testing [22]. Although biomechanical testing is regarded as the method of choice, it could not be accomplished in the present study due to the inclusion of client-owned horses. In general, the degree of lameness and, to a limited extent, the echo pattern of the injured tendon reflect biomechanical properties. These parameters, however, did not significantly differ between groups in the present study at the end of the observation period. Due to the reduced group size, differences in long-term recurrence rate after return of the horses to full exercise could not be calculated statistically.

Conclusions

This clinical trial in horses with acute tendinopathies of the SDFT shows that a single intralesional ACS injection contributes to significant reduction of lameness within 10 days and to improvement of ultrasonographic parameters of repair tissue between 11 and 23 weeks after treatment. Intralesional ACS treatment potentially decreases proliferation of tenocytes 5 weeks after treatment and increases their differentiation, as demonstrated by

an elevated collagen type I expression in the remodelling phase. Repeated ACS injections should be considered to enhance positive effects. Future controlled long-term investigations should be performed in a larger number of horses to determine the effect on recurrence rate.

Abbreviations

%T-lesion: Percent total lesion; ACS: Autologous conditioned serum; bFGF: Basic fibroblast growth factor; IGF-1: Insulin-like growth factor-1; IL: Interleukin; IL-1Ra: Interleukin-1 receptor antagonist; MIZ: Maximal injury zone; MSC: Mesenchymal stem cell; SDFT: Superficial digital flexor tendon; T-CSA: Total cross-sectional area; TES: Total echo score; T-FAS: Total fibre alignment score; TGF- β : Transforming growth factor-beta; TL-CSA: Total lesion cross-sectional area.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

FG had the idea of performing the study, designed the study and co-ordinated it. He participated in the collection of clinical, ultrasonographic and histologic data and their analyses, and wrote the manuscript. ML collected the clinical, ultrasonographic and histologic data and participated in their analyses. AB instructed and supervised the histologic examinations and revised the manuscript critically. KR performed the statistical analysis. PMS participated in the design of the study, contributed to the analyses of the data and revised the manuscript critically. All authors read and approved the manuscript for publication.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Maren Hellige (Equine Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation), Dr Enno Allmers (Tierärztliche Klinik Isernhagen) and Dr Steffen Knorr (Tierarztpraxis Dr. Steffen Knorr, Goslar) for their support, and Mrs Bettina Buck as well as Mrs Petra Grünig (Institute for Pathology, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation) for their professional technical assistance.

Author details

¹Equine Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 9, 30559 Hannover, Germany. ²Institute for Pathology, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 17, 30559 Hannover, Germany. ³Institute for Biometry, Epidemiology and Information Processing, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 2, 30559 Hannover, Germany.

Received: 27 October 2014 Revised: 27 February 2015

Accepted: 11 June 2015 Published online: 26 June 2015

References

- Patterson-Kane JC, Firth EC. The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. *Vet J*. 2009;181:79–89.
- Avella CS, Smith RKW. Diagnosis and management of tendon and ligament disorders. In: Auer JA, Stick JA, editors. *Equine Surgery*. 4th ed. St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Saunders; 2011. p. 1157–79.
- Geburek F, Stadler P. Regenerative therapy for tendon and ligament disorders in horses. Terminology, production, biologic potential and *in vitro* effects. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere*. 2011;39:373–83.
- Lopez MJ, Jarazo J. State of the art: stem cells in equine regenerative medicine. *Equine Vet J*. 2015;47:145–54.
- Smith RK, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J. Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *PLoS One*. 2013;8, e75697.
- Carvalho AD, Badial PR, Alvarez LEC, Yamada ALM, Borges AS, Deffune E, et al. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: a randomized controlled trial. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4:85.
- Bosch G, van Schie HT, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, et al. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. *J Orthop Res*. 2010;28:211–7.



8. Textor J. Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2011;27:275–98.
9. Ionita JC, Brehm W. Autologe Blutprodukte in der Regenerativen Therapie: ACS, PRP, ACP, Knochenmark (Autologous blood products for regenerative therapies: ACS, PRP, ACP, bone marrow). In: Lauk HD, editor. *Pferdeheilkunde Forum 2008 - Berliner Fortbildungstage*. Berlin, Germany: Hippiafrika Verlag; 2008. p. 588–91.
10. Weinberger T. Regenerative Therapiemöglichkeiten beim Pferd - eine Übersicht (Regenerative treatment options in horses - an overview). *Pferde Spiegel.* 2008;11:116–9.
11. Meijer H, Reinecke J, Becker C, Tholen G, Wehling P. The production of anti-inflammatory cytokines in whole blood by physico-chemical induction. *Inflamm Res.* 2003;52:404–7.
12. Hraha TH, Doremus KM, McIlwraith CW, Frisbie DD. Autologous conditioned serum: the comparative cytokine profiles of two commercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood. *Equine Vet J.* 2011;43:516–21.
13. Frisbie DD, Kawcak CE, Werpy NM, Park RD, McIlwraith CW. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res.* 2007;68:290–6.
14. Dahlgren LA, van der Meulen MC, Bertram JE, Starrak GS, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res.* 2002;20:910–9.
15. Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 2003;33:381–94.
16. Heisterbach PE, Todorov A, Fluckiger R, Evans CH, Majewski M. Effect of BMP-12, TGF-beta1 and autologous conditioned serum on growth factor expression in Achilles tendon healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20:1907–14.
17. Dahlgren LA, Harvey SC. Effect of autologous conditioned serum on the metabolism of normal tendon explants. In: 54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society; March 2–5. Rosemont, IL, USA: Orthopaedic Research Society; 2008. Poster No. 770.
18. Wright-Carpenter T, Opolon P, Appell HJ, Meijer H, Wehling P, Mir LM. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: animal experiments using a muscle contusion model. *Int J Sports Med.* 2004;25:582–7.
19. Baltzer AW, Moser C, Jansen SA, Krauspe R. Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17:152–60.
20. Sun HB, Li Y, Fung DT, Majeska RJ, Schaffler MB, Flatow EL. Coordinate regulation of IL-1beta and MMP-13 in rat tendons following subrupture fatigue damage. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466:1555–61.
21. Dakin SG, Dudhia J, Smith RKW. Modulation of prostaglandin E₂ production in equine tendon cells. In: 49th British Equine Veterinary Association Congress; September 8–11. Newmarket, England: Equine Veterinary Journal, Ltd; 2010. p. 96.
22. Majewski M, Ochsner PE, Liu F, Fluckiger R, Evans CH. Accelerated healing of the rat Achilles tendon in response to autologous conditioned serum. *Am J Sports Med.* 2009;37:2117–25.
23. Jann H, Stashak TS. Tendon and Paratendon Lacerations. In: Stashak TS, Theoret CL, editors. *Equine Wound Management*. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2008. p. 489–508.
24. Edinger J. Orthopädische Untersuchung der Gliedmaßen und der Wirbelsäule (Orthopaedic examination of the limbs and the vertebral column). In: Wissdorf H, Gerhards H, Huskamp B, Deegen E, editors. *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes (Practical anatomy and propaedeutics of the horse)*. Hannover: M. u. H. Schaper; 2010. p. 890–926.
25. Schmidt H. Die Behandlung akuter und chronischer Sehnenkrankungen beim Pferd mit hochmolekularer Hyaluronsäure (The treatment of acute and chronic tendon injuries in the horse with high molecular weight hyaluronic acid). Dr. med. vet. thesis. Tierärztliche Hochschule Hannover: Hannover, Germany; 1989.
26. Genovese RL, Rantanen NW, Hauser ML, Simpson BS. Diagnostic ultrasonography of equine limbs. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1986;2:145–226.
27. Rantanen NW, Jorgensen JS, Genovese RL. Ultrasonographic evaluation of the equine limb: technique. In: Ross MW, Dyson SJ, editors. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 1st ed. St. Louis: Elsevier; 2003. p. 166–88.
28. Reef VB, Genovese RL, Davis WM. Initial long-term results of horses with superficial flexor tendinitis treated with intralesional beta-aminopropionitrile fumarate. In: 43rd Annual Convention of the AAEP; December 7–10. Lexington, KY, USA: American Association of Equine Practitioners; 1997. p. 301–5.
29. Wagels R, Ruhmann K, Stadler P, Drommer W. Percutaneous core biopsy of the flexor tendons in the horse. *Tierarztl Prax G N.* 2001;29:199–205.
30. Astrom M, Rausing A. Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;316:151–64.
31. Aldinger S, Wunschmann A, Baumgartner W, Voss C, Kremmer E. Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis. *Acta Neuropathol.* 1996;92:273–80.
32. Kummerfeld M, Seehusen F, Klein S, Ulrich R, Kreutzer R, Gerhauser I, et al. Periventricular demyelination and axonal pathology is associated with subependymal virus spread in a murine model for multiple sclerosis. *Intervirology.* 2012;55:401–16.
33. Ulrich R, Baumgartner W, Gerhauser I, Seeliger F, Haist V, Deschl U, et al. MMP-12, MMP-3, and TIMP-1 are markedly upregulated in chronic demyelinating theiler murine encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65:783–93.
34. Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. *J Orthop Res.* 2005;23:84–92.
35. Chuen FS, Chuk CY, Ping WY, Nar WW, Kim HL, Ming CK. Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. *J Histochem Cytochem.* 2004;52:1151–7.
36. Birch HL, Bailey AJ, Goodship AE. Macroscopic 'degeneration' of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. *Equine Vet J.* 1998;30:534–9.
37. van Schie HT, Bakker EM, Cherdchutham W, Jonker AM, van de Lest CH, van Weeren PR. Monitoring of the repair process of surgically created lesions in equine superficial digital flexor tendons by use of computerized ultrasonography. *Am J Vet Res.* 2009;70:37–48.
38. van Schie HT, Bakker EM, Jonker AM, van Weeren PR. Computerized ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of stability quantification of echo patterns in contiguous transverse ultrasonographic images. *Am J Vet Res.* 2003;64:366–75.
39. Kasashima Y, Takahashi T, Smith RK, Goodship AE, Kuwano A, Ueno T, et al. Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine Vet J.* 2004;36:346–50.
40. van Schie JT, Bakker EM, van Weeren PR. Ultrasonographic evaluation of equine tendons: a quantitative in vitro study of the effects of amplifier gain level, transducer-tilt, and transducer-displacement. *Vet Radiol Ultrasound.* 1999;40:151–60.
41. Movin T, Guntner P, Gad A, Rolf C. Ultrasonography-guided percutaneous core biopsy in Achilles tendon disorder. *Scand J Med Sci Sports.* 1997;7:244–8.
42. Movin T. Tendon tissue sampling. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10:368–71.
43. Buck C, Drommer W, Wagels R, Stadler P. Scanning electron microscopy examination of tendon biopsies in healthy horses and patients with different stages of tendon healing. *Pferdeheilkunde.* 2002;18:521–8.
44. Sodersten F, Hultenby K, Heinegard D, Johnston C, Ekman S. Immunolocalization of collagens (I and III) and cartilage oligomeric matrix protein in the normal and injured equine superficial digital flexor tendon. *Connect Tissue Res.* 2013;54:62–9.
45. Henninger RW, Bramlage RW, Bailey M, Bertone AL, Weisbrode SE. Effects of tendon splitting on experimentally-induced acute equine tendinitis. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 1992;1:5–13.
46. Meershoek LS, Lanovaz JL, Schamhardt HC, Clayton HM. Calculated forelimb flexor tendon forces in horses with experimentally induced superficial digital flexor tendinitis and the effects of application of heel wedges. *Am J Vet Res.* 2002;63:432–7.
47. Ross MW. Movement. In: Ross MW, Dyson SJ, editors. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 2nd ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2011. p. 64–80.
48. Turner TA. Thermography as an aid to the clinical lameness evaluation. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1991;7:311–38.
49. Boehart S, Arndt G, Carstanjen B. Ultrasonographic morphometric measurements of digital flexor tendons and ligaments of the palmar



metacarpal region in Haflinger horses. *Anat Histol Embryol.* 2010;39:366–75.

50. Gillis CL. Rehabilitation of Tendon and Ligament Injuries. In: 43rd Annual Convention of the AAEP; December 7–10. Lexington, KY, USA: American Association of Equine Practitioners; 1997. p. 306–9.
51. Silver IA, Brown PN, Goodship AE, Lanyon LE, McCullagh KG, Perry GC, et al. A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine Vet J Suppl.* 1983;1:1–43.
52. Nixon AJ, Saxer RA, Brower-Toland BD. Exogenous insulin-like growth factor-I stimulates an autoinductive IGF-I autocrine/paracrine response in chondrocytes. *J Orthop Res.* 2001;19:26–32.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit







13.10 Publikation 10

Geburek, F., Gaus, M., van Schie, H.T.M., Rohn, K., Stadler, P.M.

Effect of intralesional platelet-rich plasma (PRP) treatment on clinical and ultrasonographic parameters in equine naturally occurring superficial digital flexor tendinopathies – a randomized prospective controlled clinical trial.

BMC Vet. Res. 2016, 7. Sep., 12 (1): 191.



RESEARCH ARTICLE

Open Access



Effect of intralesional platelet-rich plasma (PRP) treatment on clinical and ultrasonographic parameters in equine naturally occurring superficial digital flexor tendinopathies – a randomized prospective controlled clinical trial

Florian Geburek^{1*} , Moritz Gaus¹, Hans T. M. van Schie², Karl Rohn³ and Peter M. Stadler¹

Abstract

Background: Regenerative and anti-inflammatory effects on tendinopathies have been attributed to blood-derived biologicals. To date the evidence for the efficacy of autologous platelet-rich plasma (PRP) treatment of naturally occurring equine tendinopathies is limited. The purpose of this placebo-controlled clinical trial was to describe the effect of a single treatment of equine superficial digital flexor tendon (SDFT) disease with PRP on clinical and ultrasonographic parameters. Twenty horses with naturally occurring tendinopathies of forelimb SDFTs were randomly assigned to the PRP-treated group ($n = 10$) or control group ($n = 10$) after clinical and ultrasonographic examination. The SDFTs received an intralesional treatment with autologous PRP or were injected with saline, respectively (day 0). All horses participated in a standardized exercise programme and were re-examined clinically, with B-mode ultrasonography (5 times at regular intervals) and ultrasound tissue characterization (week 12 and 24 after treatment) until week 24. Long-term performance was estimated via telephone inquiry.

Results: Compared to day 0, lameness decreased significantly by week 8 after treatment with PRP and by week 12 in the control group. Ultrasonographically there was no difference in the summarized cross sectional area between the groups at any time point. Ultrasound tissue characterization showed that echo types representing disorganized matrix decreased significantly throughout the observation period in the PRP-treated group. Echo type II, representing discontinuous fascicles, not yet aligned into lines of stress was significantly higher 24 weeks after PRP treatment. Eighty percent of the PRP treated horses reached their previous or a higher level of performance after 12 months compared to 50 % in the CG. After 24 months these proportions were 60 % and 50 %, respectively.

Conclusions: A single intralesional treatment with PRP up to 8 weeks after onset of clinical signs of tendinopathy contributes to an earlier reduction of lameness compared to saline treatment and to an advanced organization of repair tissue as the fibrillar matrix is getting organized into fascicles while remodelling continues. Long term, PRP treatment has the potential to increase the number of horses reaching their previous level of performance. Earlier treatment of tendinopathy with PRP should be considered to enhance these effects.

(Continued on next page)

* Correspondence: florian.geburek@tiho-hannover.de

¹Clinic for Horses, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 9, 30559 Hannover, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 The Author(s). **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



(Continued from previous page)

Keywords: Horse, Tendon, Lameness, Ultrasonography, B-mode, Ultrasound tissue characterization, UTC, Platelet-rich plasma, PRP

Abbreviations: ACD-A, Acid citrate dextrose-A; CG, Control group; DICOM, Digital imaging and communications in medicine; EDTA, Ethylenediaminetetraacetate; G, Gauge; IV, Intravenously; MIZ, Maximal injury zone; PDGF-BB, Platelet derived growth factor-BB; PPP, Platelet poor plasma; PRP, Platelet-rich plasma; PRPG, Platelet-rich plasma-treated group; SDFT, Superficial digital flexor tendon; SEM, Standard error of the mean; T-CSA, Total cross-sectional area; TES, Total echo score; T-FAS, Total fibre alignment score; TGC, Time gain compensation; TGF- β , Transforming growth factor- β ; US, Ultrasound; UTC, Ultrasound tissue characterization.

Background

Tendinopathy of the superficial digital flexor tendon (SDFT) is a common injury in Thoroughbred racehorses and other horse breeds [1, 2] and is regarded as a career-limiting disease [3]. Clinical injury is mostly strain induced and characterized by chronic degeneration after repetitive microtrauma in sport horses [3]. Tendinopathy may also be caused by a single external percutaneous trauma, such as a kick [4]. A plethora of substrates for intralesional injection with a potentially regenerative effect on tendinopathy are currently under investigation [5, 6]. Among these are platelet concentrates such as platelet-rich plasma (PRP) [7].

Concentrated platelets release numerous cytokines and growth factors, e.g. platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB), transforming growth factor- β (TGF- β) and vascular endothelial growth factor. These factors are known to exercise specific actions during tendon healing (for review see Docheva et al. 2015) [6, 8]. PDGF-BB, e.g. stimulates tendon healing depending on its concentration [9]. PRP has been shown to enhance tenocyte proliferation [10], collagen and matrix synthesis [11, 12] and to influence vascular density [13].

PRP has shown significant enhancing effects on tendon healing such as improved biomechanical properties in a surgical model of equine SDFT lesions [13, 14] and is increasingly used for intralesional treatment of tendinopathy and desmopathy in humans [15] and horses [16–19] in clinical practice. However, the efficacy of PRP treatment on tendinopathy is seen controversially in human studies: In a randomized controlled clinical trial on chronic human Achilles tendinopathy intralesional PRP treatment showed no beneficial effects compared to saline injection [20]. These results are supported by a further randomized controlled study demonstrating no differences in elasticity modulus of PRP- versus non-treated Achilles tendons [21]. In other clinical studies without control groups PRP treatment of chronic Achilles and patellar tendinopathy significantly improved symptoms and function [22, 23]. To the best of our knowledge the effect of a single intralesional treatment with autologous PRP on equine naturally occurring SDF

tendinopathy has not been documented in a prospective randomized placebo-controlled clinical study with long term follow-up in the literature to date (for review see Brossi et al. 2015) [18].

Autologous platelet concentrates are prepared by centrifugation or by gravitational cellular filtration [24]. Blood samples from different horses and the use of different non-standardised and commercial kits for the preparation of PRP lead to differences in the platelet, leucocyte and growth factor content [24]. Different breed, age and gender influences growth factor and cytokine release of platelets and leucocytes [25, 26]. The optimal platelet and leucocyte contents in PRP are a point of debate. Recent investigations have shown that a moderate increase in platelets seems to enhance equine tenocyte growth and collagen synthesis more effective than high platelet concentrations [27, 28]. High leucocyte counts in PRP were observed to enhance the inflammatory reaction in rabbit tendons [29].

The process of tendon healing is mainly divided into three phases which merge into each other: The acute inflammatory phase (<10–14 days) is characterized by phagocytosis of disrupted tendon tissue and demarcation of injured tendon tissue. A fibroproliferative callus is formed during the proliferative phase (4–45 days), while collagen fibrils are organised into tendon bundles during the phase remodelling (45–120 days; < 3 months) which may be divided into an consolidation (earlier) and maturation (later) phase [3, 30].

A critical parameter to determine the success of tendinopathy treatment is functionality, which can be characterized by lameness evaluation, long term recurrence rate [2, 31] and biomechanical testing [32]. To determine the quality of repair tissue tendon needle biopsies have been used successfully [33]. Ultrasound based modalities such as B-mode ultrasonography [34] and colour Doppler ultrasonography [13] have been established to monitor the process of tendon healing non-invasively. However, B-mode ultrasonography has several limitations, e.g. lack of axial information, operator-dependence, influence of ultrasound beam angle and limited resolution that impair its sensitivity [35, 36].



Ultrasound tissue characterization (UTC) is a new technique to quantify tendon integrity based on a computerized analysis of the stability of echo-patterns in contiguous US images [37, 38]. Based on the echo-pattern stability, 4 different echo types can be discriminated, with histo-morphology of tendon specimen as reference test [37, 39]. Ultrasound tissue characterization has been shown a viable diagnostic tool to monitor experimental tendinopathy in horses [39–42] and is increasingly used for the quantification of Achilles and patellar tendon integrity in humans [43, 44].

Aim of current study

The aim of the present study was to support the hypothesis that a single intralesional injection of autologous PRP into SDFT lesions up to 8 weeks after clinical onset (1) has a clinically detectable effect and (2) leads to improved ultrasonographic parameters (3) influences long term functionality.

Methods

Inclusion criteria for client-owned adult horses was an anamnesis of clinical signs of uni- or bilateral SDFT disease in front limbs for up to 8 weeks (56 days) prior to the presentation at the Equine Clinic of the University of Veterinary Medicine, Hannover, Foundation, or to collaborating veterinarians. Horses were only included if the clients agreed to the study design and tendons had not received intralesional injections before. Twenty horses with a mean age of 8.46 years (range: 4–21 years) and a mean body-weight of 548 kg (range: 398–644 kg) met the inclusion criteria (Table 1). Horses were randomly assigned to the group treated with PRP (PRPG, $n = 10$) or the control group (CG, $n = 10$). The PRPG comprised 7 Warmbloods (70 %), 1 Haflinger (10 %), 1 New Forest Pony (10 %) and one Pinto (10 %). Eight Warmbloods (80 %), 1 Andalusian (10 %) and 1 German Riding Pony (10 %) were included in the CG (Table 1). The study was carried out between 2012 and 2014.

Clinical examination

All horses were examined clinically on the day of first presentation (day 0). This examination included assessment of lameness (5 grade score) [45] and palpable signs of inflammation scored semi-quantitatively by palpation (skin surface temperature in the palmar metacarpal region, sensitivity of the SDFT to palpation: 0 = no abnormality, 1 = mild abnormality, 2 = moderate abnormality, and 3 = severe abnormality) [46]. All clinical examinations throughout the study were performed by the same person (M.G.).

B-mode ultrasonography

Horses were sedated with romifidine (0.04–0.08 mg/kg intravenously [IV]) and butorphanol (0.01 mg/kg [IV]).

Injured and contralateral SDFTs were examined by one examiner with B-mode ultrasound on day 0 in a transverse and longitudinal fashion with a linear 6–15 MHz linear scanner (Logiq E9, GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA) using a standoff (GE 12 L 2302652 Standoff, Veterinary Sales & Service Inc., Stuart, USA), according to the seven zone designations as previously described [47, 48]. Settings were 13 MHz, gain 52, depth 25 mm, focus position 15 mm. Images were stored digitally and analysed retrospectively with a DICOM workstation program (easyVET®, IFS Informationssysteme, Hannover, Germany) by one observer (M.G.) being unaware of the treatment modality. The following parameters were evaluated to determine the degree- and time-related changes of the lesions: maximal injury zone (MIZ), summarized cross sectional areas of tendon (total cross-sectional area, T-CSA). Echogenicity and fibre alignment were graded semiquantitatively at each zone and the scores for all levels were summarized (total echo score = TES, total fibre alignment score = T-FAS). Echogenicity was assigned to 0 (normoechoic), 1 (hypoechoic), 2 (mixed echogenicity), and 3 (anechoic), and fibre alignment was graded according to the estimated percentage of parallel fibres in the lesion: 0 (>75 %), 1 (50–74 %), 2 (25–49 %), and 3 (<25 %) [34, 48].

Ultrasound tissue characterization (UTC)

Injured SDFTs were scanned with the commercially available ultrasound tissue characterization (UTC) unit (UTC scan unit, configuration 2011, UTC Imaging B.V., 6171 GD Stein, Netherlands) on day 0. It consisted of 5–10 MHz linear transducer (LA T Transducer, Terason Ultrasound, Teratech Corporation, Burlington, USA) which was fixed in transverse position, perpendicular to the integrated stand-off, in a motorized tracking device (UTC scan unit, configuration 2011, Fa. UTC Imaging B.V., GD Stein, Netherlands) that moves the transducer automatically along the tendon. Within the UTC protocol the instrumental settings for the SDFT were selected which facilitated standard settings like persistence, depth, focal point, gain, TGC-curve, to be used for all scans. During scanning, transverse US images were captured at regular distances of 0.2 mm over a distance of 12 cm and stored real-time in a high-capacity laptop computer (MacBook Pro® 17", Apple, Cupertino, USA). Compilation of these images created a 3-D block of US information that was used for quantification of stability of contiguous echo-patterns. Based on the echo-pattern stability, 4 different echo-types were discriminated, with histo-morphology of tendon specimen as reference test: type I, generated by intact and fully aligned fascicles (secondary collagen bundles); type II, generated by discontinuous, waving, not (yet) aligned and/or swollen fascicles (secondary collagen bundles); type III, generated

**Table 1** Signalement, clinical history, diagnostic data and treatment of 20 horses with SDFT lesions

Horse number	Breed	Age (y)	Gender	Purpose used for	Reported duration of SDFT tendinopathy until initial exam (w)	Reported initiating event	Limb affected	Maximal injury zone (MIZ)	Lesion type
PRP-group									
1	Hannoverian	4	G	Dressage	2	Unknown	LF	2a, lat	Marginal
2	Hannoverian	8	M	Dressage	1	Training	LF	3a, palm	Marginal
3	Haflinger	21	G	Trained horse	2	Pasture turnout	LF	2b	Diffuse
4	Trakehner	5	S	Dressage	4	Pasture turnout	RF	3b, med	Marginal
5	Oldenburger	16	G	Police horse	2	Ride	RF	2b	Diffuse
6	Rhenish Warmblood	13	M	Dressage	2	Unknown	RF	3a	Core
7	Hannoverian	6	M	Dressage	2	Running free	LF	2b, palm	Marginal
8	New Forest Pony	13	G	Pleasure	3	Pasture turnout	LF	2b	Diffuse
9	Hannoverian	11	G	Eventing	8	Training	RF	3a	Core
10	Pinto	20	G	Pleasure	7	Unknown	LF	2b, lat	Marginal
		Ø 11.7							
Control group									
1	Oldenburger	9	M	Jumping	4	Jumping	LF	3a, lat	Marginal
2	Hannoverian	5	G	Dressage	6	Unknown	LF	3a, med	Marginal
3	Andalusian	18	M	Pleasure	3	Pasture turnout	LF	2b	Diffuse
4	Hannoverian	15	M	Dressage, jumping	2	Training	LF	2b, med	Marginal
5	German Riding Pony	9	M	Jumping	1	Jumping	LF	3a, lat	Marginal
6	Hannoverian	12	G	Police horse	2	Running free	RF	1b, lat	Marginal
7	Hannoverian	20	M	Pleasure	2	Unknown	RF	2a	diffuse
8	Rhenish Warmblood	7	G	Eventing	2	Training	LF	3a	Core
9	Hannoverian	10	G	Eventing	6	Jumping	LF	2b, lat	Marginal
10	Hannoverian	6	G	Pleasure	4	Unknown	RF	3a	Diffuse
		Ø 11.1							

SDFT superficial digital flexor tendon, w week(s), y years, S stallion, M mare, G gelding, LF left front, RF right front, PRP-group SDFT treated with intralesional injection of platelet-rich plasma, Control group SDFT treated with intralesional saline injection, lat lateral, med medial, palm palmar, Ø mean

by a mainly fibrillar matrix (collagen fibrils not/no yet organized into fascicles) and type IV, generated by a mainly amorphous matrix and/or fluid [37, 39].

Scanning for UTC was performed in standing, fully sedated horses while all limbs were weightbearing. As the UTC device allows to scan a metacarpal segment of approximately 12 cm, the device was applied to the metacarpal area in a way during the initial exam that the zone of maximal injury (MIZ) was centered in the middle of the standoff. The distance from the most prominent point of the accessory carpal bone to the proximally located edge of the standoff was measured and recorded to ensure that the same segment would be scanned during following UTC scans. Additionally this

point was marked in the horse's latero-palmar metacarpal haircoat with a shaving blade. A corresponding segment of the SDFT of the opposite front limb was scanned in the same manner.

With the help of the software, the stability of the echo pattern of corresponding pixels over 9 contiguous transverse images was analysed by UTC algorithms. Images were controlled for movement artifacts and repeated if necessary. Data sets were stored digitally on the computer until final analysis.

A single scan of each tendon was analyzed retrospectively with the analyzing-software (UTC2011® Analyser V1.0.1, Fa. UTC Imaging, 6171 GD Stein, The Netherlands) by one observer (M.G.) being blinded to



the treatment modality: A 6 cm long tendon segment was defined from 3 cm distally and proximally to the MIZ, respectively, on the colour coded longitudinal image produced during the first examination (day 0). Within this segment, the entire cross sectional area of the SDFT was analyzed using every 15th consecutive transverse image, i.e. every 3 mm. Ratios of echo types were analyzed quantitatively as fractions of the entire cross sectional area and mean values for the proportion of each type were calculated. The distance from the center of MIZ to the proximal end of the scan was measured to retrieve the MIZ and thereby the segment to be analyzed in control scans during the remaining examination period.

Preparation of PRP, Intralesional treatment, controlled exercise and follow-up examinations

Fiftyfour millilitres of autologous blood were collected by a single venipuncture of one jugular vein into a 60 ml syringe preloaded with 6 ml of the anticoagulant acid citrate dextrose (ACD-A). Approximately 5 ml of whole blood was aspirated into a tube containing EDTA (Vacuette®, Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Austria) for later cell counts. To ensure that the whole blood and anticoagulant homogenously mix, the syringe was inverted gently 4 times. The content was transferred aseptically into bag A of a commercially available PRP preparation system (Osteokine®, Orthogen, Düsseldorf, Germany). The bag system was inserted in a swingout bucket of a centrifuge (Universal 300®, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany) and a corresponding swingout bucket was filled with a counterweight. According to the manufacturer's instruction the first centrifugation step was performed at a relative centrifugation force of 900 g for 3 min. The plasma including the buffy coat was transferred via the connecting tube to bag B by gently rolling the bottom of bag A upwards with a clamp. After closing the ports between bag A and B the system was centrifugated for 10 min at a relative centrifugation force of 1470 g. The supernatant platelet poor plasma (PPP) was aspirated via the withdrawal port. The remaining pellet of platelets and residual erythrocytes was resuspended by reinjecting a volume of 3 ml of PPP into bag B. The resulting PRP was completely aspirated from bag B which led to a volume of 4 ml. An aliquot of 1 ml PRP was transferred to a tube containing EDTA (Vacuette®, Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Austria), while the remaining 3 ml were used for intralesional injection. Platelet- and leucocyte content was determined from whole blood and PRP with an automated cell counter (KX-21 N®, Sysmex, Norderstedt, Germany).

Horses were sedated for the intralesional injections with detomidine hydrochlorid (0.01–0.03 mg/kg [IV]) and butorphanol (0.04–0.05 mg/kg [IV]), and the medial

and lateral palmar nerves were anaesthetized 2 cm distal to the carpometacarpal joints with 2,5 ml of a 2 % mepivacain solution, respectively.

After aseptic preparation of the skin, superficial digital tendon lesions were injected under sonographic guidance from the lateral aspect of the tendon perpendicularly to its long axis directly into the most hypoechoic areas through a 22G (Ø 0.7 mm, 30 mm) canula (BD Microlance™ 3, Becton Dickinson S.A., Fraga, Huesca, Spain) while the limb was weight-bearing. SDFTs allocated to the PRPG received an intralesional treatment of 3 ml into the tendon defect (day 0). Tendons in the CG were injected intralesionally with 3 ml 0,9 % sterile saline solution (Isotone Kochsalzlösung 0,9 %, B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany). The volume of PRP or saline was equally distributed to 3 sites. The first injection was performed at the maximal injury zone. Further injection sites were 1–2 cm distally and proximally to the first injection. A padded distal limb bandage was applied and left in place during a period of 3 days box rest in all horses. The contralateral SDFT was not injected. All front hooves of all horses were shod with a closed horse shoe with a straight bar [49]. All horses participated in a gradually increasing exercise programme adapted from Bosch et al. [14]. Depending on the anamnesticly reported duration of clinical SDF tendinopathy of less than 4 weeks or 5–8 weeks, horses were either given box rest for another 4 weeks or commenced with handwalking for 10 min, respectively (Table 2). The horses were re-examined clinically and with B-mode ultrasonography at 4, 8, 12, 18 and 24 weeks after injection. Ultrasound tissue characterization was repeated 12 and 24 weeks after treatment.

All owners were asked about the performance of their horses via telephone inquiry 12 and 24 months after treatment according to the following categories: reached previous or higher level of performance; was ridden at a lower level of performance; was retired; died.

Statistical analysis

Analysis of data was performed using SAS® Version 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The level of significance

Table 2 Gradually increasing exercise programme adapted from Bosch et al. [14] and modified

Exercise/day	Period
Box rest	4 weeks
10 min walk	Weeks 5–8
20 min walk + 2 × 3 min trot	Weeks 9–12
30 min walk + 15 min trot	Weeks 13–15
30 min walk + 15 min trot + 3 × 1 min gallop	Weeks 16–18
35 min walk + 15 min trot + 3 × 5 min gallop	Weeks 19–24

min minutes



was set at $p < 0.05$. All values in the graphs are expressed as arithmetic mean values with standard error ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). The assumption of normality was tested using the Kolmogorov-Smirnov test and visual assessment of qq-plots of model residuals. In the case of rejection of normal distribution, distribution-free nonparametric methods were applied. Fisher's exact test was applied by evaluation of contingency tables to test the differences between groups (PRP-treated group and control group) on each examination day with regard to the parameters degree of lameness, sensitivity to palpation and skin surface temperature. To work out the differences of these parameters within a group between examination days, non-adjusted p-values were used provided that the global test was significant ($p < 0,05$) or showed a tendency to significance ($p = 0,05 - 1$). The influence of the groups and time points on the ultrasonographic parameters (T-CSA, T-FAS and TES) was tested using a two-way analysis of variance for independent samples (groups) and repeated measurements (time points), followed by the Tukey *post hoc* test for multiple pairwise comparisons. P-values were used in terms of comparison to assess differences of parameters between individual days of examination within a group and *vice versa*, and to determine the differences between the two groups on the respective examination day.

Results

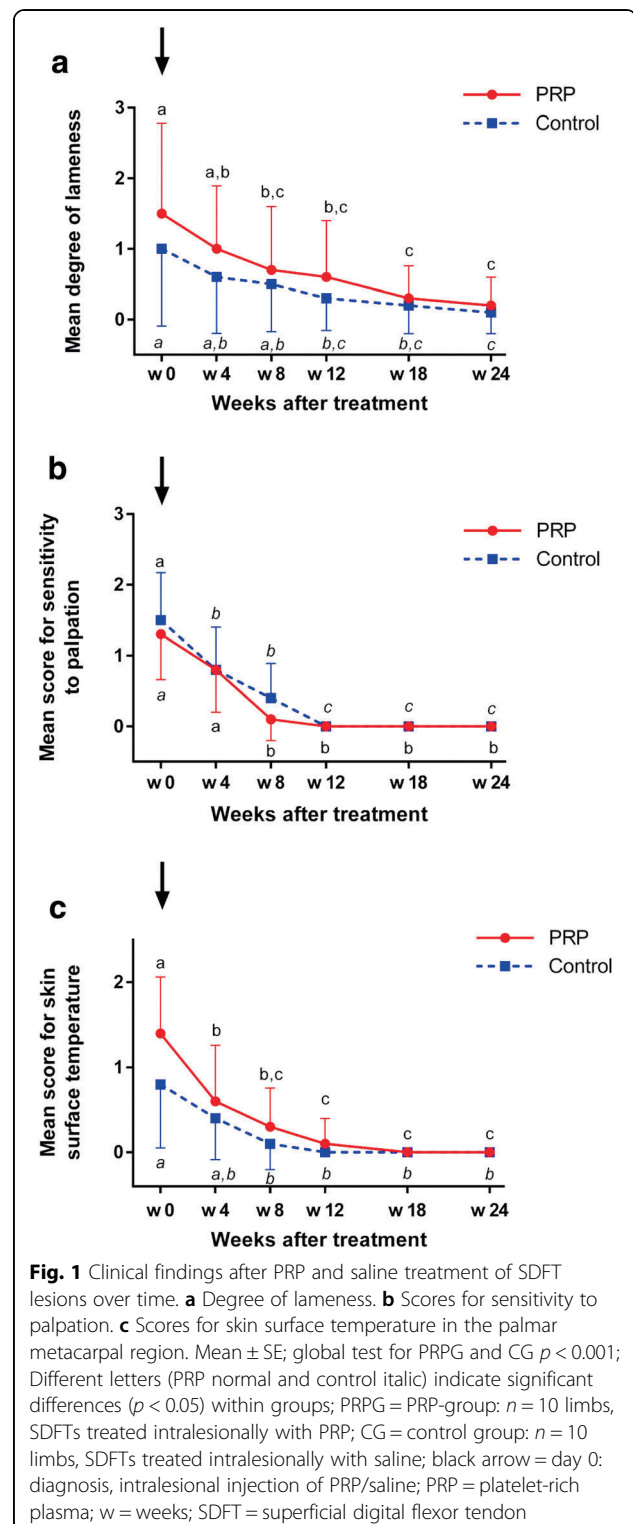
Clinical examination

Lameness

On day 0, 60 % ($n = 6$) of the horses included in the PRPG were lame. Fifty percent ($n = 5$) of the control horses showed a lameness. In all horses it was the lame limb where tendinopathy was diagnosed. After 24 weeks 2 horses in the PRPG were still lame and 1 horse in the CG was lame. The mean degree of lameness did not differ between groups on any day of examination. Compared to day 0 lameness decreased significantly by week 8 after treatment within the PRPG ($p = 0.011$) and it decreased significantly by week 12 in the CG ($p = 0.014$) (Fig. 1a).

Clinical signs of inflammation

No statistically significant differences between the two groups with regard to scores for sensitivity to palpation and skin surface temperature were observed on day 0 and during the entire observation period (Fig. 1b, c). Within the PRPG scores for sensitivity to palpation of the SDFTs decreased significantly for the first time between week 4 and week 8 ($p = 0.003$) and in the CG between day 0 and week 4 ($p = 0.02$). From week 12 until the end of the observation period no painful reaction could be elicited in all horses (Fig. 1b). Scores for skin surface temperature (Fig. 1c) decreased significantly between day 0 and week 4 ($p = 0.001$) in the PRPG. Within



the CG it took until week 8 that skin surface temperature decreased significantly ($p = 0.001$). From week 8 onwards scores for this parameter remained at a low level up to 24 weeks in both groups.



B-mode ultrasonography

The horses included were presented with core lesions (3 horses), marginal lesions (11 limbs) or diffuse lesions (6 limbs) of the SDFT (Table 1). Control horses no. 3 and 7 had ultrasonographic signs of scarring of the SDFT in the contralateral non-lame limb on day 0. The MIZ of most lesions was located in zones 2b and 3a (80 % of horses in PRPG and CG, respectively), followed by zone 2a (10 % of horses in PRPG and CG, respectively), and zones 1b (10 % of horses in PRPG) and 3b (10 % of horses CG), respectively). There was no difference in T-CSA between the groups at any time point (Fig. 2a). Compared to the contralateral SDFT, T-CSA was significantly higher in PRP treated and in control limbs than in the respective contralateral limbs during the whole observation period ($p < 0.05$). Within the PRP group T-CSA was significantly higher ($p = 0.024$) only in week 4 as compared to week 18 (Fig. 2a). TES was significantly higher in the PRPG than in the CG at weeks 4, 8, 12 and 24 ($p = 0.0397$, $p = 0.0069$, $p = 0.00297$, $p = 0.0424$) (Fig. 2b); and T-FAS was significantly higher in the PRPG than in the CG at weeks 4, 8 and 12 ($p = 0.0387$, $p = 0.0140$, $p = 0.0283$) (Fig. 2c). Regarding the progression of TES and T-FAS they decreased significantly between day 0 and week 12 in the PRPG (TES: $p = 0.002$; T-FAS: $p = 0.001$) and between day 0 and week 8 the CG (TES: $p < 0.001$, T-FAS: $p = 0.023$) (Fig. 2b, c).

Ultrasound tissue characterization

The percentages of echo types I, III, IV (Fig. 3a, c, d), combined types I + II and combined types III + IV (Fig. 4) did not differ between groups at any time point. The percentage of echo type II was significantly higher ($p = 0.0492$) in the PRPG than in the CG at the end of the observation period (Fig. 3b).

In the PRPG percentages of combined type I + II pixels representing fascicular structures increased significantly between week 12 and 24 ($p = 0.009$) (Fig. 4a). Combined types III + IV percentages representing disorganized matrix decreased significantly between day 0 and week 12 ($p < 0.001$) and again between weeks 12 and 24 ($p = 0.024$) in the PRPG (Fig. 4b). In the CG both, combined type I + II and combined type III + IV did not change throughout the observation period ($p > 0.05$) (Fig. 4).

In the CG echo type I, i.e. intact and fully aligned fascicles increased significantly between day 0 and week 12 ($p = 0.001$) and after PRP treatment between week 12 and 24 ($p = 0.012$) (Fig. 3a). Echo type III representing mainly fibrillary matrix decreased significantly in both groups between day 0 and week 12 ($p < 0.001$). It further decreased significantly between week 12 and 24 in the PRPG ($p = 0.006$) while it remained on the same level in the CG (Fig. 3c). The percentage of echo type IV, i.e. amorphous matrix/fluid decreased significantly between

day 0 and week 12 in the PRPG ($p < 0.001$). In the CG this type remained on the same level throughout the whole observation period (Fig. 3d).

Concentration of platelets and leucocytes

The mean number of platelets was $157.3 \pm 35.9 \times 10^3/\mu\text{l}$ in whole blood and $892.37 \pm 364.7 \times 10^3/\mu\text{l}$ in PRP. Leucocyte content was $7.8 \pm 1.5 \times 10^3/\mu\text{l}$ in whole blood and $14.1 \pm 7.0 \times 10^3/\mu\text{l}$ in PRP. Compared to whole blood platelets and leucocytes were concentrated significantly by factor 5.67 ($p = 0.0001$) and 1.81 ($p = 0.0139$), respectively in PRP.

Long-term follow-up

One horse allocated to the PRPG and one control horse developed recurrence of tendon injury in the treated limb within 2 years post diagnosis. One PRP treated horse developed tendinopathy in the SDFT of the contralateral front limb. Twelve months after treatment 80 % (8/10) of the horses allocated to the PRPG performed at the previous or at a higher level while this was the case in 50 % (5/10) of the control horses. Twenty-four months after treatment 60 % (6/10) were still ridden at the previous or higher level of performance in the PRPG while this was the case in 50 % (5/10) of the control horses. Horses that were ridden at a lower level of performance made up 10 % (1/10) of the PRP treated horses after 12 months and 20 % (2/10) after 24 months. In the CG 40 % (4/10) of the horses performed at a lower level after 12 months and 20 % (2/10) after 24 months. One horse included in the PRPG was retired within 12 months while one control horse was retired between 12 and 24 months after treatment. One PRP treated horse died of reasons unrelated to tendinopathy between 12 and 24 months and one control horse died within 12 months after treatment. Long term outcome did not differ significantly between groups.

Discussion

Results of this controlled clinical trial demonstrate that, compared to controls, single intralesional PRP treatment leads to an earlier reduction of the degree of lameness until week 8 and to an earlier decrease in palpable skin temperature of the SDFT region until week 4 after treatment. At 24 weeks after PRP treatment ultrasound tissue characterization showed a significantly higher percentage of type II echoes which, in combination with decrease of type III and IV, is indicative for advanced repair as the fibrillar matrix is getting organized into fascicles, although not yet aligned into lines of stress. Eighty percent of the PRP treated horses reached their previous or a higher level of performance after 12 months and 60 % continued to perform at this level after 24 months compared to 50 % in the CG at both time points.

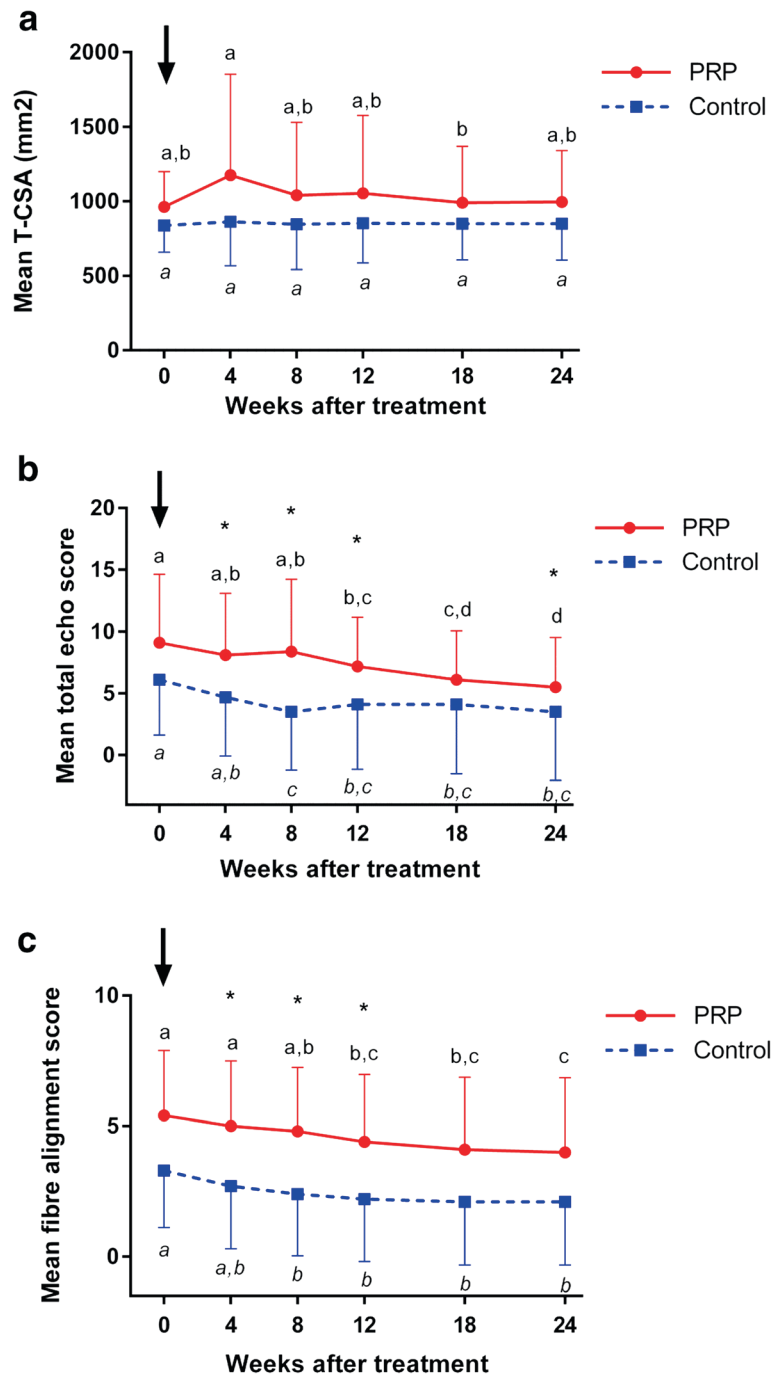


Fig. 2 B-mode ultrasonographic measurements. **a** Total cross sectional area of PRP- and saline treated SDFTs over time (global test: PRPG $p = 0.079$, CG $p = 0.999$). **b** Total echo scores of PRP- and saline treated SDFT lesions over time (global test: PRPG and CG $p < 0.001$). **c** Fiber alignment scores of PRP- and saline treated SDFT lesions over time (global test: PRPG and CG $p < 0.001$). Mean \pm SE; Values labelled with asterisk (*) differ significantly ($p < 0.05$) between groups. Different letters (PRP normal and control italic) indicate significant differences ($p < 0.05$) within groups; PRPG = PRP-group; $n = 10$ limbs, SDFTs treated intralesionally with PRP; CG = control group; $n = 10$ limbs, SDFTs treated intralesionally with saline; black arrow = day 0: diagnosis, intralesional injection of PRP/saline; PRP = platelet-rich plasma; FAS = fiber alignment score; SDFT = superficial digital flexor tendon; TCSA = total cross sectional area; TES = total echo score; w = weeks

Because of the generally limited availability of adequate patients for a controlled experimental study in a clinical setting, horses of different ages, breeds and

types of use were included in the current study. It is established that the potential for tendon healing is greater in younger horses [50] and that among others

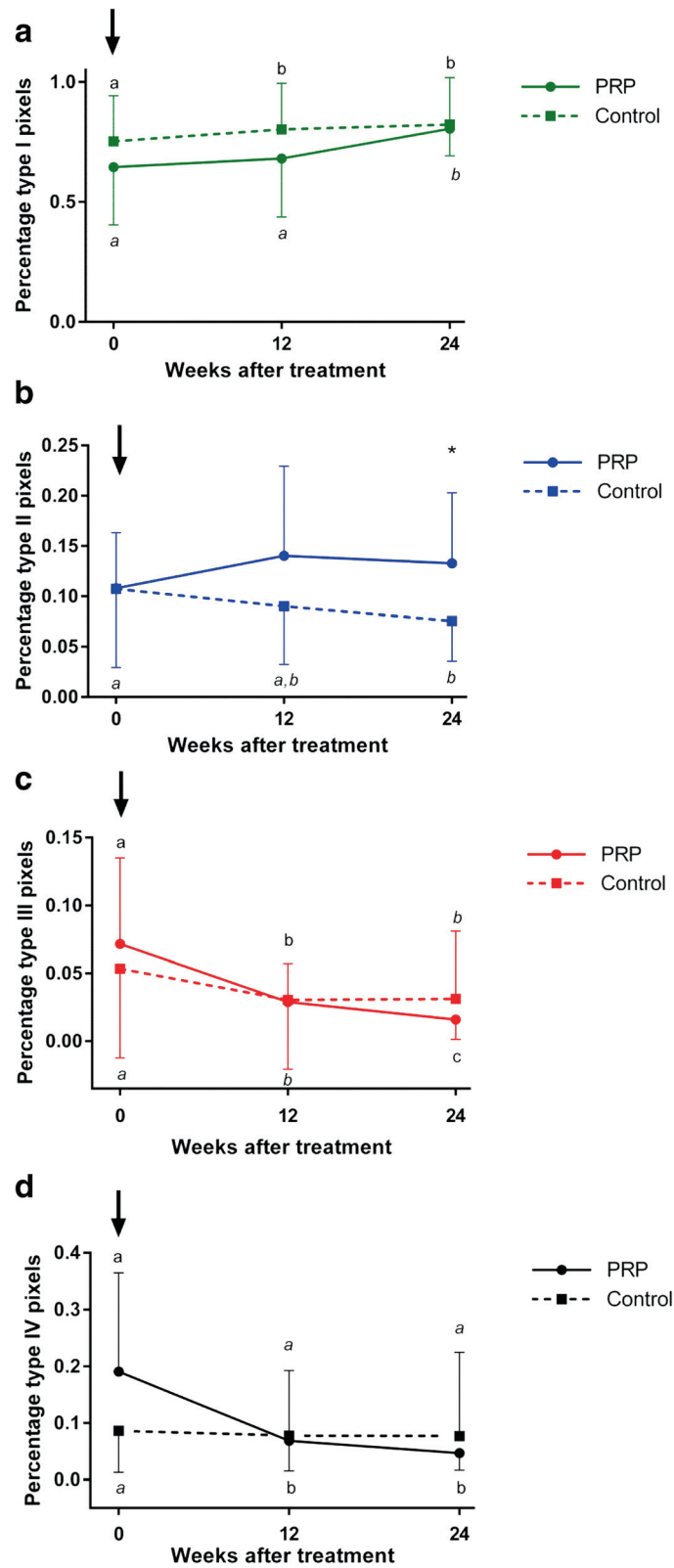


Fig. 3 (See legend on next page.)



(See figure on previous page.)

Fig. 3 Ultrasound tissue characterization: Proportion of echo-types I-IV. Proportion of echo types **a** I, **b** II, **c** III and **d** IV for PRP and saline treated SDFTs; PRP-group: solid lines; Control group: dotted lines; Mean \pm SE; Values labelled with asterisk (*) differ significantly ($p < 0.05$) between groups. Global tests: echo type I: PRPG $p = 0.099$, CG $p = 0.004$; echo type II: PRPG $p = 0.204$, CG $p = 0.057$; echo type III: PRPG $p < 0.001$, CG $p = 0.002$; echo type IV: PRPG $p < 0.001$, CG $p = 0.940$; Different letters (PRP normal and control italic) indicate significant differences ($p < 0.05$) within groups; PRPG = PRP-group: $n = 10$ limbs, SDFTs treated intralesionally with PRP; CG = control group: $n = 10$ limbs, SDFTs treated intralesionally with saline; PRP = platelet-rich plasma; SDFT = superficial digital flexor tendon; w = weeks

male gender and high body weight are risk factors for tendinopathy [51]. The CG contains more horses used for show jumping and eventing which generally implies a higher tendon load and a potentially higher risk for self-inflicted blunt trauma than the use as e.g. dressage horse [52]. This has a potential impact on the severity of tendon lesions and during the long term rehabilitation after 24 weeks.

Fiftyfive percent of the horses included in the current study had ultrasonographic signs of marginal/peripheral SDFT lesions which was considered as a high proportion compared to centrally located tendon lesions frequently

diagnosed in race- and performance horses [4]. The etiology of peripheral tendon lesions has not been investigated separately. However, it has been assumed that these lesions typically occur in show jumpers, dressage horses [52] and cutting horses [53]. They may be attributed to degeneration or blunt trauma, e.g. self-kicking with the ipsilateral hind hoof, or to excessive strain on the lateral aspect of the affected limbs [53]. By contrast centrally located ("core") lesions are the result of repetitive micro-injuries at high speed exercise and consecutive repair with insufficient tissue [3]. This lesion pattern was detected in only 3 horses in the current study

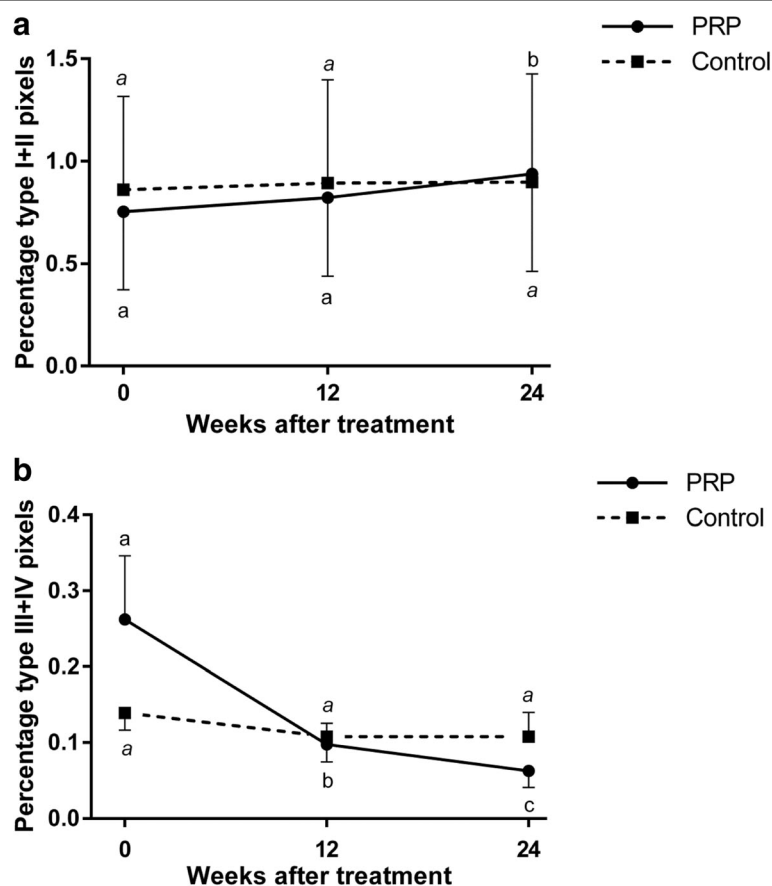


Fig. 4 Ultrasound tissue characterization: Proportion of combined echo-types (a) I + II and (b) III + IV. PRP-group: solid lines; Control group: dotted lines; Mean \pm SE; Global tests: combined echo type I + II: PRPG $p = 0.0826$, CG $p = 0.318$; combined echo type I + II: PRPG $p < 0.001$; CG $p = 0.362$; Different letters (PRP normal and control italic) indicate significant differences ($p < 0.05$) within groups; PRPG = PRP-group: $n = 10$ limbs, SDFTs treated intralesionally with PRP; CG = control group: $n = 10$ limbs, SDFTs treated intralesionally with saline; PRP = platelet-rich plasma; SDFT = superficial digital flexor tendon; w = weeks



population which predominantly consisted of warm-blood horses used for jumping and dressage purposes.

This might explain why the effect of a single PRP injection on several parameters of tendon healing study was less profound in the current than in the surgical model used by Bosch et al. (2010) [14] that mimics central core-lesions after single macro-trauma in young mature horses, thus no effects of underlying ageing and/or degeneration. A recent systematic literature review revealed that generally more experimental, especially *in vitro* PRP studies yield positive results than clinical trials do, which proves that experimental settings only imperfectly replicate conditions of natural tendon repair [18]. Although the number of peripheral tendon lesions was similar in both groups of the current study, different lesion patterns potentially respond differently to intralesional injections. Fluid might more easily reflux to the subcutis after injection into marginally compared to centrally located lesions as the former are only surrounded by the peritendineum at their peripheral aspect. At the same time larger tendon lesions generally have a worse prognosis for functional repair [54] and CSA of peripheral lesions is small in most cases. It has been shown that peripheral tendon lesions in cutting horses required a mean convalescent period of 4 months before horses returned to full exercise [53] which is shorter than the usual rehabilitation period for other SDFT injuries [2].

In the current study all tendon lesions were injected with the same volume of PRP or saline to avoid an impact of a variable volume on the outcome. This was practiced inconsistently in previous studies including injections of naturally occurring, i.e. non-standardized tendon or ligament lesions with variable dimensions [16, 55]. A volume of 3 ml was chosen based on encouraging results of an equine study using the same volume in an experimental model of SDFT tendinopathy [14]. Volumes used in previous case series mostly focusing on suspensory ligament desmopathy varied between 0.5 and 12 ml [16, 17, 19, 55]. The volume chosen in the current study seemed to be appropriate as no resistance of the syringe plunger occurred during injection of the SDFTs being slightly under tension in a weightbearing position.

The volumes of PRP and saline were evenly distributed to three injection sites in the current study. A comparable approach was chosen in a human study comparing the effect of PRP and saline on chronic Achilles tendinopathy [20]. Saline led to similar improvements of the tendon structure as PRP which might indicate that also multiple injections with tiny volumes of sterile saline at one single time-point may trigger a healing response.

The number of horses with owner consent for a controlled clinical trial is generally limited and the current study was conducted in an equine referral clinic where horses are usually presented within several weeks

after onset of clinical signs of tendinopathy. This led to the decision to include horses with a history of clinical signs of tendinopathy for up to 8 weeks. It had to be accepted that some tendons were most probably already in the late proliferative or even in the remodelling phase of tendon healing while most were in the late inflammatory and early proliferative phase. By contrast mechanically induced core lesions were treated as early as 1 week after creation of lesions, i.e. at the end of a well-defined acute inflammatory phase in the experiment by Bosch et al. (2011) [13]. There is evidence that timing of intralesional tendon treatment has a significant influence on outcome supported by a comparative experimental equine investigation showing that PRP treatment 7 days after SDFT lesion creation led to an earlier improvement of ultrasonographic parameters than treatment on day 14 [56]. It is known that growth factors from the α -granula of platelets such as PDGF and TGF- β have a positive influence during the inflammatory phase of tendon healing: [57–59]. In an experimental model of rat collateral ligament injury the effectiveness of PDGF dropped markedly if it was administered more than 24 h after injury [60]. This is in accordance with results after treatment of chronic human Achilles tendinopathy which showed no beneficial effects of PRP versus placebo treatment with sterile saline [20]. At the same time PRP injections have been reported to be beneficial in chronic human tendon disorders refractory to other treatment modalities in several uncontrolled clinical studies [23, 61]. During the proliferation and remodelling phase of tendon healing Vascular Endothelial Growth Factor, which is a major component of PRP, might play a role as promotor of angiogenesis [58].

Horses in the current study received a single PRP treatment. This decision was based on the finding that growth factor and cytokine release from platelets continues from their mRNA reserves for at least 7 days after activation [62] and on a significant and long-lasting effect of a single injection approach in an experimental equine tendinopathy study [14]. Another reason was the intention to investigate a low dose of PRP as a basis for further research in equine naturally occurring tendinopathies [33], because to date no dose dependent studies are available with regard to treatment of equine tendinopathies. The limited long term effect in the current study may have been influenced by the fact that most growth factors contained in PRP are *per se* short lived which probably contributed to a low concentration over time in the clinical setting chosen. In a study using a rodent experimental model it was also shown that a single injection of heterologous PRP immediately after Achilles tendon transection only had time-limited effects on tendon healing during the observation period of up to 6 weeks [63]. Results of another experimental study



in a rodent model of tendinosis suggested that a single intratendinous injection of PRP does not lead to a local and systemic increase in several cytokines and growth factors over the observation period of 25 days [64].

The adequate number of injections over time is also a point of debate in naturally occurring human tendinopathy: In a long term clinical trial in humans it was shown that a second early PRP injection does not rapidly improve clinical signs of tendinopathy in case of incomplete resolution after the first treatment [65]. However, it has been shown in a controlled human clinical trial that patients with chronic patellar tendinopathy receiving two injections of a leucocyte poor platelet concentrate (autologous conditioned plasma[®]) showed better improvement in outcomes when compared to a monoinjection [66]. Accordingly application of 3 consecutive PRP injections significantly improved clinical symptoms and function of human athletes with chronic patellar tendinopathy [22]. Summarily it cannot be excluded that more than one intralesional treatment might have enhanced the clinical effects observed in the current study.

Based on whole blood platelets and leucocytes were concentrated by a mean factor of 5.67 and 1.81, respectively in PRP in the current study. Compared to other PRP systems the bag system used in this study leads to an intermediate platelet and low leucocyte concentration [24]. By contrast platelets and leucocytes were enriched with factors 3.78 and 6, respectively, utilizing a different double centrifugation system in an equine surgical model of tendinopathy [14]. Among various other factors the different concentrations of platelets and leucocytes might have contributed to the differences in outcome between the latter and the current study.

Low platelet counts have been demonstrated to be inefficient in bone regeneration [67] and increasing platelet concentrations in a leucocyte reduced PRP preparation leads to delivery of more anabolic and less pro-inflammatory cytokines *in vitro* [28]. However, with increasing platelet concentrations the synthesis of collagen type I and III decreases suggesting a diminishing effect on tendon metabolism [28]. This observation corresponds to a dose dependent *in vitro* investigation showing that intermediate platelet concentrations, such as used in the current study, have stronger effects on tenocyte proliferation, migration and collagen production than highest concentrations [68].

While some beneficial effects such as anti-infectious properties [69], growth factor content [70] and promotion of chemotaxis, proliferation and differentiation of cells [71] have been attributed to leucocytes they also contribute to a greater acute inflammatory response [29, 72] and to the expression of catabolic factors, e.g. MMPs and IL-1, that may influence tendon healing negatively [27, 73, 74], so that a low leucocyte content seems to be

preferable to enhance anabolic effects during tendon healing.

In summary PRP characteristics vary significantly depending on the technique and preparation kit used for its production [24, 75] which has a significant impact on clinical outcome and makes comparison between clinical trials difficult [61]. The optimal platelet to leucocyte ratio for treatment of tendinopathy is unknown to date and most probably dependent on the stage of tendon healing [76].

Clinical parameters did not differ between the PRPG and controls at any time point which corresponds to the results of an equine PRP study using an experimental model of tendinopathy [14]. However, clinical signs of inflammation such as the degree of lameness and scores for skin surface temperature decreased earlier in the PRPG than in the CG which may be attributed to anti-inflammatory and analgesic effects of PRP [40, 77, 78]. This correlates well to reduced pain scores in humans after PRP treatment of tendinopathy [79, 80] and to uncontrolled observations in two horses that returned to competition level performance as soon as 4,5 months after PRP treatment of SDFT lesions [17]. However, mean scores for sensitivity to palpation decreased earlier in controls than in PRP treated tendons despite a similar curve progression in both groups. This is potentially attributed to a high interindividual variation of score values due to the inclusion of different lesion patterns. Established semi-quantitative clinical score systems were used to monitor clinical parameters in the current study. Accuracy could have been increased by the use of computerized gait analysis and thermography [81].

With regard to B-mode ultrasonography total cross sectional area (T-CSA) decreased significantly between week 4 and 18 after PRP treatment while it did not change throughout the observation period in the CG. Sensitivity of CSA is potentially low to detect minor changes as shown by routine ultrasound assessment of racehorses [82]. However, a delayed decrease of T-CSA after the inflammatory phase of tendon healing can be interpreted as a therapeutic effect of the PRP injection.

In contrast to controls, scores for echogenicity were significantly higher which implies a low echogenicity of the tendon lesions at 4, 8 and 12 weeks after PRP treatment and at week 24, i.e. at the end of the observation period. Similarly scores for fiber alignment were significantly higher in the PRPG than in the CG at 4, 8 and 12 weeks after treatment suggesting a lower degree of continuity of fibrous structures. A potential explanation for the differences between groups is that TES and FAS as determined by B-mode were higher in the PRP group from the beginning of the experiment onwards, as comparison of the different time points reveals a tendency to a significant difference ($p = 0.05-0.1$) for most of the



remaining time points. Consequently the intermittent significant difference between groups should be interpreted with caution. However, it cannot be excluded that PRP injection effectively induced a transient inflammatory response [29, 83] which might have contributed to a temporary decrease in echogenicity and in alignment of fibrous structures. This contrasts with results of an experimental equine study showing no differences at all for several B-mode parameters between SDFTs treated with a leucocyte poor single centrifugation plasma product and saline [84]. Although echogenicity and fiber alignment scoring using B-mode ultrasonograms are established tools in clinical settings, they have a limited sensitivity to adequately reflect tendon integrity [35]. Additionally lesion types included in the current study were heterogenous and the number of cases per group was relatively low. These factors made B-mode ultrasonography not the ideal modality to comparatively monitor especially subtle changes during the process of tendon repair in the current study. It could be proved that echogenicity and fibre alignment scores based on B-mode ultrasonograms do not correspond to the degree of echo continuity as determined by UTC implying a higher sensitivity of the latter technique [35, 37].

During ultrasound tissue characterization of PRPG tendons there was a significant drop in the proportion of non-structure related echo-type type IV representing a mainly amorphous matrix and/or free fluid between day 0 and week 12 while proportions for this echo type remained on the same level in the CG throughout 24 weeks. This phenomenon was previously observed in an experimental equine study after a single PRP injection and may be attributed to acute anti-inflammatory effects exerted by PRP [40, 77, 78].

The decreasing proportions of non-structure related echo types III and IV between day 0 and week 12 after PRP treatment in the current study rather resembles the course between week 4 and 12 after surgical induction of SDFT lesions without treatment [39] and the progression between week 5 and 18 after PRP treatment in another experimental equine study [40] and might therefore be an indicator for the chronicity of some tendon lesions included in the current study population. Hence, the delayed treatment up to 8 weeks after the onset of clinical signs might have contributed to a right-shift of the healing pattern as determined by UTC compared to experimental tendon lesions. However, more frequent UTC examinations between day 0 and week 12 would have been necessary to further prove this. This could not be realized due financial constraints and organisational reasons as all horses were client owned and horses have to be sedated for 30–60 min during UTC scanning.

Between week 12 and week 24 combined echo-types I and II (fascicular structures) increased significantly

within the PRPG. This resulted in a significantly higher percentage of echo type II being representative for the organization of a fibrillary matrix into fascicles that are still discontinuous and not yet aligned, thus still remodeling after 24 weeks in PRP treated compared to control tendons. An echo-type II ratio described for normal tendon tissue, i.e. approximately 0.18 [39], was almost reached. In combination with a significant decreases of summarized echo-types III and IV between week 12 and week 24 this indicates an advanced organization of fibrillar and amorphous matrix into fascicles that are less continuous, more swollen and not aligned yet. The latter interpretation is supported by a lack of significant differences between groups with regard to echo-type I proportions representing intact and fully aligned fascicles (secondary tendon bundles).

In contrast to the current study PRP treated SDFTs had a significantly lower percentage of echo type II than controls in a surgical tendon model at the end of the observation period of 24 weeks [40]. This indicates that in the Bosch et al. study, using a single macro-trauma, the PRP-treated tendons passed already the remodelling stage while during the experiment described in this manuscript the fascicles were still not aligned yet and still requiring remodelling. In general the higher proportion of echo-type II in the PRPG is an indicator of an active process of remodelling 24 weeks after treatment [40].

The proportion of echo type III being representative for mainly fibrillar matrix continued to decrease significantly between week 12 and 24 only in the PRPG. Comparison of the proportion of this echo type to others in the PRPG suggests that the decrease in echo type III is rather in favour of echo type I than in favour of echo type II between week 12 and 24 as could be expected from a previous study [39]. Main reason for this observation is that in our study there are only limited time-points for UTC scanning, missing some detailed information on stages of repair. Anyhow, this finding suggests a transformation from fibrillar components into intact and aligned tendon bundles during the remodelling phase after PRP treatment of naturally occurring tendinopathies.

All horses included in the current study underwent the same controlled exercise regimen as it is known that controlled exercise has a therapeutic effect on tendon healing [85]. The duration of the controlled exercise prescribed for the included horses started on the basis of the estimated duration of tendinopathy (<4 weeks or 5–8 weeks) to adequately address the potentially therapeutic effect of gradually increasing controlled exercise on the process of tendon healing in each individual. To avoid inadequate loading of the tendons immediately after treatment all horses were given 3 days box rest and the first actual exercise level was restricted to 10 min walk.



Similarly all horses were shod with a closed horse shoe with a straight bar because this type of shoeing has been described as adequate during rehabilitation in cases of SDFT tendinopathy [49]. Despite potential alternative approaches to decrease strain in the SDFT via orthopaedic shoeing [86] authors intended to assure that rehabilitation conditions including shoeing were as similar as possible for all horses which seemed to be achievable most consistently with the type of shoeing chosen.

Recurrence rate is one of the most critical parameters of long-term functionality after tendon injury [31]. Only 1 out of 10 horses in either group developed recurrence of tendinopathy in the treated limb within 24 months after treatment. This is a lower recurrence rate than that previously reported after conventional intralesional treatment of SDF tendinopathy in different types of performance horses [2]. However, it has to be considered that several previous equine tendon studies mainly included racehorses typically developing centrally located core lesions [3, 31] which probably have a different etiology than most of the tendon lesions in the current study [53]. Due to the relatively low number of horses included and different types of use, recurrence rate in the current study should be interpreted cautiously. Biomechanical testing using tendon explants is the gold standard to determine elasticity and strength of tendon tissue. Due to the inclusion of client owned horses it could not be performed in the current study.

The performance level which is another important indicator of functionality did not differ statistically between groups at 12 and 24 months after treatment. However, the current study revealed that 8 versus 5 horses reached their previous level of performance 12 months after PRP and saline treatment respectively. After another 12 months only 6 of the PRP treated and 5 control horses performed at their previous level. This finding reflects the results of a clinical study including racehorses with midbody suspensory ligament demopathies [16]. Horses treated with PRP had fewer starts than control horses delayed only during the third year after return to racing.

Conclusions

This controlled clinical trial shows that a single intralesional injection of PRP up to 8 weeks after onset of clinical signs of tendinopathy contributes to an earlier reduction of lameness compared to a single intralesional treatment with saline. Compared to controls fibrillar matrix in PRP treated tendons is getting organized into fascicles that are not aligned yet after six months which is a sign of advanced tendon repair while remodelling continues. PRP treatment has the potential to increase the number of horses reaching their previous or a higher level of performance after 12 months which is not

sustained after 24 months. Earlier treatment of tendinopathy with PRP should be considered to enhance these effects. Future controlled clinical studies should include higher numbers of horses.

Acknowledgements

We are grateful to all horse owners for their co-operation and to the veterinary staff of the Tierklinik Großmoor, Adelheidsdorf for their support. We thank Orthogen, Düsseldorf for providing ten Osteokine® sets free of charge.

Funding

No funding was obtained for this study.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are available in the figshare repository, <https://figshare.com/s/908fa4cad9e0ee828371>.

Authors' contributions

FG had the idea of performing the study, designed the study and coordinated it. He participated in the collection of clinical and ultrasonographic data and their analyses and wrote the manuscript. MG collected the clinical and ultrasonographic data and participated in their analyses and revised the manuscript critically. KR performed the statistical analysis and revised the manuscript critically. HTMV participated in the design of the study, assisted in the interpretation of the data and revised the manuscript critically. PS participated in the design of the study, contributed to the analyses of the data and revised the manuscript critically. All authors read and approved the manuscript for publication.

Authors' information

Results of the current study are part of the Dr. med. vet. thesis submitted by Moritz Gaus to the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Germany.

Competing interests

HTMV is the inventor of the UTC device. He has not given any financial support for this study and has no financial interests in relation to this study. No non-financial conflicts of interests exist for any of the authors.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the animal welfare officer of the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Germany, and the ethics committee of the responsible German federal state authority in accordance with the German Animal Welfare Law (Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, reference number 33.9-42502-05-12A230). Informed consent was obtained from all owners of the included animals.

Author details

¹Clinic for Horses, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 9, 30559 Hannover, Germany. ²Department of Equine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Yalelaan 112, 3584 CM Utrecht, Netherlands. ³Institute for Biometry, Epidemiology and Information Processing, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bünteweg 2, 30559 Hannover, Germany.

Received: 7 April 2016 Accepted: 1 September 2016

Published online: 07 September 2016

References

- Gibson KT, Snyder JR, Spier SJ. Ultrasonographic diagnosis of soft tissue injuries in horses competing at the Sydney 2000 Olympic Games. *Equine Vet Educ.* 2002;14(3):149–56.
- Dyson SJ. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992–2000). *Equine Vet J.* 2004;36(5):415–9.
- Patterson-Kane JC, Firth EC. The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. *Vet J.* 2009;181(2):79–89.



4. Avella CS, Smith RKW. Diagnosis and management of tendon and ligament disorders. In: Auer JA, Stick JA, editors. *Equine Surgery*. 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2011. p. 1157–79.
5. Geburek F, Stadler P. Regenerative Therapie von Sehnen- und Bänderkrankungen bei Pferden. Terminologie, Herstellung, biologisches Potential und *in vitro* Effekte. (Regenerative therapy for tendon and ligament disorders in horses. Terminology, production, biologic potential and *in vitro* effects). *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*. 2011;39(6):373–83.
6. Docheva D, Muller SA, Majewski M, Evans CH. Biologics for tendon repair. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;84:222–39. doi:10.1016/j.addr.2014.11.015.
7. Textor J. Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2011;27(2):275–98.
8. Kaux JF, Drion P, Croisier JL, Crielaard JM. Tendinopathies and platelet-rich plasma (PRP): from pre-clinical experiments to therapeutic use. *J Stem Cells Regen Med*. 2015;11(1):7–17.
9. Solchaga LA, Bendele A, Shah V, Snel LB, Kestler HK, Dines JS, et al. Comparison of the effect of intra-tendon applications of recombinant human platelet-derived growth factor-BB, platelet-rich plasma, steroids in a rat achilles tendon collagenase model. *J Orthop Res*. 2014;32(1):145–50.
10. Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowanec DM, Dugdale EM, Hansen D, Cote MP, et al. The positive effects of different platelet-rich plasma methods on human muscle, bone, and tendon cells. *Am J Sports Med*. 2012;40(8):1742–9.
11. Smith JJ, Ross MW, Smith RK. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts *in vitro*. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2006;19(1):43–7.
12. Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res*. 2007;25(2):230–40.
13. Bosch G, Moleman M, Barneveld A, van Weeren PR, van Schie HT. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand J Med Sci Sports*. 2011;21(4):554–61.
14. Bosch G, van Schie HT, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, et al. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. *J Orthop Res*. 2010;28(2):211–7.
15. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg (Br)*. 2009;91(8):987–96.
16. Waselau M, Sutter WW, Genovese RL, Bertone AL. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc*. 2008;232(10):1515–20.
17. Arguelles D, Carmona JU, Climent F, Munoz E, Prades M. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Vet Rec*. 2008;162(7):208–11.
18. Brossi PM, Moreira JJ, Machado TSL, Baccarin RYA. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Vet Res*. 2015;11.
19. Bazzano M, Piccione G, Giannetto C, Tosto F, Di Pietro S, Giudice E. Platelet Rich Plasma Intralesional Injection as Bedside Therapy for Tendinitis in Athletic Horse. *Acta Sci Vet*. 2013;41.
20. de Vos RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, Weinans H, et al. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *Jama*. 2010;303(2):144–9.
21. Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. *Am J Sports Med*. 2011;39(1):38–47.
22. Charoussat C, Zaoui A, Bellaiche L, Bouyer B. Are multiple platelet-rich plasma injections useful for treatment of chronic patellar tendinopathy in athletes? a prospective study. *Am J Sports Med*. 2014;42(4):906–11.
23. Monto RR. Platelet rich plasma treatment for chronic Achilles tendinosis. *Foot Ankle Int*. 2012;33(5):379–85.
24. Hessel LN, Bosch G, van Weeren PR, Ionita JC. Equine autologous platelet concentrates: A comparative study between different available systems. *Equine Vet J*. 2015;47(3):319–25.
25. Schnabel CL, Steinig P, Schuberth HJ, Koy M, Wagner B, Wittig B, et al. Influences of age and sex on leukocytes of healthy horses and their *ex vivo* cytokine release. *Vet Immunol Immunopathol*. 2015;165(1–2):64–74.
26. Giraldo CE, Lopez C, Alvarez ME, Samudio IJ, Prades M, Carmona JU. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet Res*. 2013;9:29.
27. McCarrel TM, Minas T, Fortier LA. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am*. 2012;94(19):e143(1–8).
28. Boswell SG, Schnabel LV, Mohammed HO, Sundman EA, Minas T, Fortier LA. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am J Sports Med*. 2014;42(1):42–9.
29. Dragoo JL, Braun HJ, Durham JL, Ridley BA, Odegaard JI, Luong R, et al. Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am J Sports Med*. 2012;40(6):1274–81.
30. Jann H, Stashak TS. Equine wound management. In: Stashak TS, Theoret CL, editors. *Equine Wound Management*. Ames: Wiley-Blackwell; 2008. p. 489–508.
31. O'Meara B, Bladon B, Parkin TD, Fraser B, Lischer CJ. An investigation of the relationship between race performance and superficial digital flexor tendonitis in the Thoroughbred racehorse. *Equine Vet J*. 2010;42(4):322–6.
32. Crevier-Denoix N, Collobert C, Pourcelot P, Denoix JM, Sanaa M, Geiger D, et al. Mechanical properties of pathological equine superficial digital flexor tendons. *Equine Vet J Suppl*. 1997;23:23–6.
33. Geburek F, Lietzau M, Beineke A, Rohn K, Stadler PM. Effect of a single injection of autologous conditioned serum (ACS) on tendon healing in equine naturally occurring tendinopathies. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:126.
34. Reef VB, Genovese RL, Davis WM. Initial long-term results of horses with superficial flexor tendinitis treated with intralesional beta-aminopropionitrile fumarate. 43rd Annual Convention of the AAEP. Phoenix, Arizona; 1997.
35. van Schie JT, Bakker EM, van Weeren PR. Ultrasonographic evaluation of equine tendons: a quantitative *in vitro* study of the effects of amplifier gain level, transducer-tilt, and transducer-displacement. *Vet Radiol Ultrasound*. 1999;40(2):151–60.
36. van Schie HT, Bakker EM, Jonker AM, van Weeren PR. Ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of gray level statistics. *Am J Vet Res*. 2000;61(2):210–9.
37. van Schie HT, Bakker EM, Jonker AM, van Weeren PR. Computerized ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of stability quantification of echo patterns in contiguous transverse ultrasonographic images. *Am J Vet Res*. 2003;64(3):366–75.
38. van Schie HT, Bakker EM, Jonker AM, van Weeren PR. Efficacy of computerized discrimination between structure-related and non-structure-related echoes in ultrasonographic images for the quantitative evaluation of the structural integrity of superficial digital flexor tendons in horses. *Am J Vet Res*. 2001;62(7):1159–66.
39. van Schie HT, Bakker EM, Cherdchutham W, Jonker AM, van de Lest CH, van Weeren PR. Monitoring of the repair process of surgically created lesions in equine superficial digital flexor tendons by use of computerized ultrasonography. *Am J Vet Res*. 2009;70(1):37–48.
40. Bosch G, Rene van Weeren P, Barneveld A, van Schie HT. Computerised analysis of standardised ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons following treatment with intratendinous platelet rich plasma or placebo. *Vet J*. 2011;187(1):92–8.
41. Docking SI, Daffy J, van Schie HT, Cook JL. Tendon structure changes after maximal exercise in the Thoroughbred horse: use of ultrasound tissue characterisation to detect *in vivo* tendon response. *Vet J*. 2012;194(3):338–42.
42. Cadby JA, David F, van de Lest C, Bosch G, van Weeren PR, Snedeker JG, et al. Further characterisation of an experimental model of tendinopathy in the horse. *Equine Vet J*. 2013;45(5):642–8.
43. van Schie HT, de Vos RJ, de Jonge S, Bakker EM, Heijboer MP, Verhaar JA, et al. Ultrasonographic tissue characterisation of human Achilles tendons: quantification of tendon structure through a novel non-invasive approach. *Br J Sports Med*. 2010;44(16):1153–9.



44. de Vos RJ, Weir A, Tol JL, Verhaar JA, Weinans H, van Schie HT. No effects of PRP on ultrasonographic tendon structure and neovascularisation in chronic midportion Achilles tendinopathy. *Br J Sports Med.* 2011;45(5):387–92.
45. Edinger J. Orthopädische Untersuchung der Gliedmaßen und der Wirbelsäule. In: Wissdorf H, Gerhards H, Huskamp B, Deegen E, editors. *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes.* Hannover: M. u. H. Schaper; 2010. p. 890–926.
46. Schmidt H. Die Behandlung akuter und chronischer Sehnenkrankungen beim Pferd mit hochmolekularer Hyaluronsäure (Dr. med. vet. thesis). Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 1989.
47. Genovese RL, Rantanen NW, Hauser ML, Simpson BS. Diagnostic ultrasonography of equine limbs. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1986;2(1):145–226.
48. Rantanen NW, Jorgensen JS, Genovese RL. Ultrasonographic evaluation of the equine limb: technique. In: Ross MW, Dyson SJ, editors. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse.* 1st ed. St. Louis: Elsevier; 2003. p. 166–88.
49. Höppner S. Orthopädische Beschläge bei Sehnenkrankungen. *Der praktische Tierarzt.* 2010;91(4):326–9.
50. Jorgensen JS, Genovese RL, Ross MW. Superficial digital flexor tendonitis in racehorses. In: Ross MW, Dyson SJ, editors. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horses.* 2nd ed. St. Louis: Elsevier, Saunders; 2011. p. 706–15.
51. Takahashi T, Kasashima Y, Ueno Y. Association between race history and risk of superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc.* 2004;225(1):90–3.
52. Dyson SJ. Superficial digital flexor tendonitis in event horses, show Jumpers, dressage horses and pleasure horses. In: Ross MW, Dyson SJ, editors. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horses.* 2nd ed. St. Louis: Elsevier, Saunders; 2011. p. 721–6.
53. Tipton TE, Ray CS, Hand DR. Superficial digital flexor tendonitis in cutting horses: 19 cases (2007–2011). *J Am Vet Med Assoc.* 2013;243(8):1162–5.
54. Marr CM, Love S, Boyd JS, McKellar Q. Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses. *Vet Rec.* 1993;132(19):476–9.
55. Castelijn G, Crawford A, Schaffer J, Ortolano GA, Beauregard T, Smith RK. Evaluation of a filter-prepared platelet concentrate for the treatment of suspensory branch injuries in horses. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2011;24(5):363–9.
56. Fonseca FA, Oliveira FTA, Rajao MD, Dumont CBS, Santos-Leonardo A, Lima EMM et al. Does time matter for platelet-rich plasma treatment of equine tendinitis? 23rd Scientific Meeting of the European College of Veterinary Surgeons. Copenhagen, Denmark; 2014
57. Kashiwagi K, Mochizuki Y, Yasunaga Y, Ishida O, Deie M, Ochi M. Effects of transforming growth factor-beta 1 on the early stages of healing of the Achilles tendon in a rat model. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2004;38(4):193–7.
58. Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 2003;33(5):381–94.
59. Thomopoulos S, Zaegel M, Das R, Harwood FL, Silva MJ, Amiel D, et al. PDGF-BB released in tendon repair using a novel delivery system promotes cell proliferation and collagen remodeling. *J Orthop Res.* 2007;25(10):1358–68.
60. Batten ML, Hansen JC, Dahners LE. Influence of dosage and timing of application of platelet-derived growth factor on early healing of the rat medial collateral ligament. *J Orthop Res.* 1996;14(5):736–41.
61. Filardo G, Kon E, Di Matteo B, Di Martino A, Tesei G, Pelotti P, et al. Platelet-rich plasma injections for the treatment of refractory Achilles tendinopathy: results at 4 years. *Blood Transfus.* 2014;12(4):533–40.
62. Senzel L, Gnatenko DV, Bahou WF. The platelet proteome. *Curr Opin Hematol.* 2009;16(5):329–33.
63. Parafioriti A, Armiraglio E, Del Bianco S, Tibalt E, Oliva F, Berardi AC. Single injection of platelet-rich plasma in a rat Achilles tendon tear model. *Muscles, Ligaments and Tendons J.* 2011;1(2):41–7.
64. Dallaudiere B, Louedec L, Lenet MP, Pesquer L, Blaise E, Perozziello A, et al. The molecular systemic and local effects of intra-tendinous injection of Platelet Rich Plasma in tendinosis: preliminary results on a rat model with ELISA method. *Muscles, Ligaments Tendons J.* 2015;5(2):99–105.
65. Dallaudiere B, Meyer P, Hummel V, Perozziello A, Peuchant A, Moreau-Durieux MH, et al. Efficacy of second intra-tendinous platelet-rich-plasma injection in case of incomplete response of the first injection: three-year follow up experience. *Diagn Interv Imaging.* 2013;94(9):871–7.
66. Zayni R, Thauinat M, Fayard JM, Hager JP, Carrillon Y, Clechet J, et al. Platelet-rich plasma as a treatment for chronic patellar tendinopathy: comparison of a single versus two consecutive injections. *Muscles, Ligaments Tendons J.* 2015;5(2):92–8.
67. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004;34(4):665–71.
68. Giusti I, D'Ascenzo S, Manco A, Di Stefano G, Di Francesco M, Rughetti A, et al. Platelet concentration in platelet-rich plasma affects tenocyte behavior *in vitro.* *Biomed Res Int.* 2014;2014:630870.
69. Lopez C, Carmona JU, Giraldo CE, Alvarez ME. Bacteriostatic effect of equine pure platelet-rich plasma and other blood products against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus.* An *in vitro* study. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2014;27(5):372–8.
70. Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC. TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11(1–2):133–45.
71. Wrotniak M, Bielecki T, Gazdzik TS. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. *Ortop Traumatol Rehabil.* 2007;9(3):227–38.
72. Wasterlain AS, Braun HJ, Harris AH, Kim HJ, Dragoo JL. The systemic effects of platelet-rich plasma injection. *Am J Sports Med.* 2013;41(1):186–93.
73. Pifer MA, Maerz T, Baker KC, Anderson K. Matrix metalloproteinase content and activity in low-platelet, low-leukocyte and high-platelet, high-leukocyte platelet rich plasma (PRP) and the biologic response to PRP by human ligament fibroblasts. *Am J Sports Med.* 2014;42(5):1211–8.
74. Zhou Y, Zhang J, Wu H, Hogan MV, Wang JH. The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells - implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):173.
75. Oh JH, Kim W, Park KU, Roh YH. Comparison of the Cellular Composition and Cytokine-Release Kinetics of Various Platelet-Rich Plasma Preparations. *Am J Sports Med.* 2015;43(12):3062–70.
76. Mautner K, Malanga GA, Smith J, Shiple B, Ibrahim V, Sampson S, et al. A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. *PM R.* 2015;7(4 Suppl):S53–9.
77. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, et al. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol.* 2007;78(4):661–9.
78. Mazzocca AD, McCarthy MB, Intravia J, Beitzel K, Apostolakis J, Cote MP, et al. An *in vitro* evaluation of the anti-inflammatory effects of platelet-rich plasma, ketorolac, and methylprednisolone. *Arthroscopy.* 2013;29(4):675–83.
79. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006;34(11):1774–8.
80. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Presti ML, Russo A, Bondi A, et al. Platelet-rich plasma: new clinical application: a pilot study for treatment of jumper's knee. *Injury.* 2009;40(6):598–603.
81. Turner TA. Thermography as an aid to the clinical lameness evaluation. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1991;7(2):311–38.
82. Avella CS, Ely ER, Verheyen KL, Price JS, Wood JL, Smith RK. Ultrasonographic assessment of the superficial digital flexor tendons of National Hunt racehorses in training over two racing seasons. *Equine Vet J.* 2009;41(5):449–54.
83. Textor JA, Tablin F. Intra-articular use of a platelet-rich product in normal horses: clinical signs and cytologic responses. *Vet Surg.* 2013;42(5):499–510.
84. Estrada RJ, van Weeren R, van de Lest CHA, Boere J, Reyes M, Ionita JC, et al. Effects of Autologous Conditioned Plasma® (ACP) on the healing of surgically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendon. *Pferdeheilkunde.* 2014;30(6):633–42.
85. Gillis CL. Rehabilitation of Tendon and Ligament Injuries. 43rd Annual Convention of the AAEP. Phoenix, Arizona; 1997
86. Lawson SE, Chateau H, Pourcelot P, Denoix JM, Crevier-Denoix N. Effect of toe and heel elevation on calculated tendon strains in the horse and the influence of the proximal interphalangeal joint. *J Anat.* 2007;210(5):583–91. doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00714.x.









