

**Untersuchung von mesenchymalen Stromazellen entnommen aus
narkotisierten und euthanasierten Pferden**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Carmen Schröck

Aus dem "Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie"

Betreuer: Prof. Dr. Carsten Staszky

**Untersuchung von mesenchymalen Stromazellen entnommen aus
narkotisierten und euthanasierten Pferden**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Carmen Schröck

Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Carsten Staszyk

Prof. Dr. Michael Röcken

Tag der Disputation: 15.02.2017

Meiner Familie und meinem Markus

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	1
2	Einleitung und Fragestellung.....	4
2.1	Frage- und Aufgabenstellung.....	5
3	Literatur	6
3.1	Definition von mesenchymalen Stromazellen (MSC)	6
3.2	Einsatz von MSC in Forschung und Praxis.....	7
3.2.1	MSC in der Pferdemedizin	8
3.2.2	MSC in der Kleintiermedizin.....	9
3.2.3	MSC in der Humanmedizin	10
3.3	Gewinnung und Aufbereitung von MSC.....	13
3.3.1	MSC aus dem Knochenmark (KM-MSC).....	13
3.3.2	MSC aus dem Fettgewebe (A-MSC)	14
3.3.3	MSC aus dem peripheren Blut (PB-MSC).....	14
3.3.4	MSC aus dem Nabelschnurblut (UCB-MSC).....	15
3.3.5	MSC aus Nabelschnurgewebe (UCG-MSC) und Amnionflüssigkeit (AF-MSC)	15
3.4	Allgemeine Charakterisierung von MSC.....	16
3.5	Immunologische Charakterisierung von MSC.....	17
4	Material und Methoden	19
4.1	Material	19
4.1.1	Pferde	19
4.1.2	Substanzen	21

4.1.3	Geräte.....	30
4.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	31
4.1.5	Software.....	32
4.2	Methoden.....	32
4.2.1	Isolation und Anzucht von KM-MSC nach KM-Entnahme aus narkotisierten Pferden.....	32
4.2.2	Isolation und Anzucht von KM-MSC nach Entnahme von euthanasierten Pferden.....	33
4.2.3	Test von potenziellen Antikörpern zur Immunophenotypisierung von equinen KM-MSC.....	33
4.2.4	Test von neu hergestellten Antikörpern.....	34
4.2.5	Durchflusszytometrische Analyse zur Immunophenotypisierung.....	34
4.2.6	Auswahl der Gates zur Fluoreszenzanalyse.....	35
4.2.7	Modifizierter Proliferations-Versuch	35
4.2.8	Differenzierungen.....	39
4.3	Auswertung.....	40
4.3.1	Isolation und Anzucht.....	40
4.3.2	Zusammenstellung eines Marker-Panels zur Immunophenotypisierung equiner MSC.....	40
4.3.3	Durchflusszytometrische Analyse	40
4.3.4	Proliferationsversuch.....	41
4.3.5	Differenzierungen.....	42
4.4	Statistik	43
4.4.1	Durchflusszytometrische Marker-Analyse.....	43
4.4.2	Modifizierter Proliferationsversuch.....	43

5	Ergebnisse	44
5.1	Isolation und Anzucht von MSC aus KM	44
5.2	Marker-Panel für die Immunophenotypisierung equiner MSC	44
5.3	Test der neu hergestellten Antikörper	49
5.4	Immunophenotypische Charakterisierung von nar-MSC und eut-MSC	50
5.5	Proliferationseigenschaften von nar-MSC und eut-MSC	51
5.6	Differenzierungen von nar-MSC und eut-MSC	54
6	Diskussion	57
6.1	Auswahl des Untersuchungsmaterials	57
6.2	Anatomische Beschreibung und Nomenklatur des equinen Sternums	57
6.3	Optimierte Entnahmetechnik zur Gewinnung von Knochenmark aus dem equinen Sternum	58
6.4	Entnahme und Anzucht von MSC	61
6.5	Allogene Verwendung von MSC	62
6.6	Oberflächenmarkerprofil equiner MSC	64
6.7	Immunologisch relevante Oberflächenmarker	66
6.8	Risiken von MSC	67
6.9	Proliferationsfähigkeit von MSC in-vitro	67
6.10	Ausblick	69
7	Zusammenfassung	71
8	Summary	73
9	Anhang	74
9.1	Verzeichnis der Tabellen	74

9.2 Publikationen und Vorträge.....	80
10 Danksagung	81
11 Erklärung	83
12 Literaturverzeichnis	84

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
adM	Medium zur adipogenen Differenzierung
AK	Antikörper
A-MSC	mesenchymale Stromazellen aus dem Fettgewebe
AF-MSC	mesenchymale Stromazellen aus der Amnionflüssigkeit
CD	cluster of differentiation
CT	Computertomograph
ca.	circa
cdM	Medium zur chondrogenen Differenzierung
eMSC	equine mesenchymale Stromazellen
etc.	et cetera
eut-MSC	mesenchymale Stromazellen von euthanasierten Pferden
FBS	fetales bovines Serum
HSC	hämatopoetische Stromazellen
IK	Isotypkontrolle
KM	Knochenmark
μ-CT	Mikro-Computertomograph
MNC	mononukleäre Zellen
MSC	mesenchymale Stromazellen
MSR	menschliche embryonale Nieren-Zellen (293-Zelllinie, patentiert)
nar-MSC	mesenchymale Stromazellen von narkotisierten Pferden

odM	Medium zur osteogenen Differenzierung
PB-MSC	mesenchymale Stromazellen aus dem peripheren Blut
PM	Proliferationsmedium
P-AK	Primärantikörper
PrP	thrombozytenreiches Plasma
S-AK	Sekundärantikörper
Tab.	Tabelle
UCB-MSC	mesenchymale Stromazellen aus dem umbilikalen Blut
UCG-MSC	mesenchymale Stromazellen aus dem umbilikalen Gewebe
vgl.	vergleiche
WP	Waschpuffer

Maßeinheiten

cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
g	Maßeinheit für die Beschleunigung
h	Stunden
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mM	Millimol
Mio.	Millionen
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mm ²	Quadratmillimeter

2 Einleitung und Fragestellung

In Deutschland bieten inzwischen mehr als 15 Pferdekliniken eine „Stammzelltherapie“ für Sehnen- und Banddefekte an. Um in diesem Zusammenhang eine wissenschaftlich korrekte Nomenklatur zu verwenden, wird vielfach empfohlen, den Begriff „Stammzellen“ zu vermeiden und durch den Begriff „mesenchymale Stromazellen“ (MSC) zu ersetzen. In der Veterinärmedizin gibt es für den Begriff der „Stammzelle“ keine eindeutige Definition. Er wird sowohl für embryonale, als auch für hämatopoetische, sowie für mesenchymale Stammzellen benutzt. Letztere können gleichzeitig aus verschiedenen Geweben stammen. Um in der Nomenklatur eindeutig zu bleiben, wird im Folgenden von „mesenchymalen Stromazellen“ anstatt von „Stammzellen“ gesprochen.

Die Entnahme- und Anzuchtmethoden für die Stromazellen, sowie die verwendeten Injektionsmedien und -verfahren variieren in den verschiedenen Pferdekliniken unter anderem stark in ihrer Invasivität. Die Vielfältigkeit reicht von der Knochenmarkentnahme aus verschiedenen Tiefen unterschiedlicher Sternebrae oder auch aus dem Tuber coxae bis hin zur Gewinnung von mesenchymalen Stromazellen aus Fettgewebe. Auch gibt es sehr verschiedene Protokolle zur Isolierung, sowie zur Anzucht und zur Vorbereitung der Zellen zur Applikation. Die Methoden reichen von der direkten Applikation von frisch gewonnenem Knochenmark (KM) bis hin zur Isolation und Anzucht der MSC über einige Wochen. Die Applikation der MSC variiert von einer Suspension in sterilem Nährmedium bis hin zur Kombination mit anderen Produkten wie beispielsweise PrP („platelet rich plasma“). Es gibt folglich eine Vielzahl unterschiedlicher Behandlungsweisen, die denselben Namen tragen: „Stammzelltherapie“. Durch diese Unterschiede sind auch Therapieerfolge schwierig zu vergleichen. Für die Pferdemedizin sind eine Standardisierung der Methoden sowie eine einheitliche Definition von MSC für eine Vergleichbarkeit der Therapieergebnisse und Optimierung der sogenannten „Stammzelltherapie“ dringend erforderlich.

An diesen Bedarf knüpft die vorliegende Arbeit an, die Hinweise zur optimierten Entnahme und Anzucht von MSC gibt und erstmals die Stammzellenmerkmale von MSC, die sowohl aus narkotisierten Pferden als auch aus euthanasierten Pferden gewonnen wurden, miteinander vergleicht.

2.1 Frage- und Aufgabenstellung

In konsekutiver Weise wurden folgende Forschungsfragen /-aufgaben bearbeitet:

- 1.) Etablierung einer standardisierten Methodik zur Isolierung, Identifizierung und Aufbereitung von equinen, mesenchymalen Stromazellen (eMSC) aus dem sternalen Knochenmark
- 2.) Können vitale eMSC von euthanasierten Pferden gewonnen werden?
- 3.) Bestehen Unterschiede zwischen eMSC von narkotisierten und von euthanasierten Pferden?
- 4.) Besitzen eMSC immunologische Eigenschaften, die sie für eine potenzielle allogene Applikation qualifizieren?

3 Literatur

3.1 Definition von mesenchymalen Stromazellen (MSC)

Die Begriffe mesenchymale Stromazelle, mesenchymale Stammzelle, multipotente mesenchymale Stammzelle, mesenchymale Vorläuferzelle und Gewebsvorläuferzelle werden in der Literatur synonym verwendet. Stets sind Zellen gemeint, die embryologisch aus dem Mesoderm hervorgegangen sind und im adulten Organismus immer noch in einem undifferenzierten Zellstatus vorliegen. Sie besitzen die Potenz, sich in vitro in verschiedene Abkömmlinge des Mesoderms zu differenzieren (z.B. Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten, Myoblasten, etc.), weshalb sie als multipotent bezeichnet werden. Dieses Differenzierungspotenzial ist eine von vielen sogenannten Stammzeleigenschaften. Allerdings fehlt bisher der Beleg dafür, dass diese Zellen auch in vivo zur Entwicklung von Organen oder Geweben beitragen, wenn sie in eine sich entwickelnde Blastozyste injiziert werden (Ratajczak et al., 2008). Daher wird empfohlen für entsprechende Zellen den Begriff mesenchymale Stromazellen zu verwenden, auch wenn vor allem im englischsprachigen Raum oft von „stem cells“ gesprochen wird (Ratajczak et al., 2008). Die „International Society for Cellular Therapy“ hat im Jahr 2006 ein Minimum an Kriterien veröffentlicht, die für humane Zellen gelten, um diese als mesenchymale Stromazellen zu bezeichnen. Dabei ist der Begriff der mesenchymalen Stromazelle als nomenklatorisch korrekte Bezeichnung für die beschriebenen Zellen geprägt worden (Dominici et al., 2006). Demgemäß wird im Folgenden stets der Begriff mesenchymale Stromazelle (MSC) verwendet, um entsprechende equine Zellen zu beschreiben.

MSC können aus verschiedenen Geweben gewonnen werden. Die häufigsten Methoden sind die Gewinnung aus Knochenmark, Fettgewebe, Nabelschnurblut, Nabelschnurgewebe oder aus peripherem Blut (Burk et al., 2013). Nach der oben genannten Definition der „International Society for Cellular Therapy“ sind MSC multipotente, nachweisbar adipogen, chondrogen und osteogen differenzierbare Zellen, die in-vitro plastikadherent und unter Standardbedingungen kultivierbar und proliferationsfähig sind (Dominici et al., 2006). Außerdem werden MSC über die Expression (Positivmarker) oder fehlende Expression (Negativmarker) bestimmter Oberflächenmoleküle definiert. Als Positivmarker für humane MSC gelten CD105, CD73 und CD90 und als Negativmarker CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a

oder CD19 und MHCII. Erfüllen humane Zellen alle genannten Kriterien, so kann man sie als MSC bezeichnen (Dominici et al., 2006). In der Veterinärmedizin ist bisher keine eigene dementsprechende Definition für MSC vorhanden.

Zu unterscheiden sind MSC von ebenfalls im Knochenmark vorkommenden hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Diese dienen dem Körper als Reservoir für die Entwicklung von Blutzellen. Bei der Entnahme von MSC aus dem Knochenmark werden automatisch auch HSC mit entnommen. Diese Zellen sind allerdings nicht plastikadherent und können in der Kultur daher leicht von den MSC getrennt werden. Begrifflich sind MSC außerdem von embryonalen Stammzellen abzugrenzen. Diese können sich über die Multipotenz der mesenchymalen Stromazellen hinaus noch omnipotent zu Zellen aller Keimblätter differenzieren und theoretisch einen vollständigen Organismus bilden. Embryonale Stammzellen werden aus Frühembryonen gewonnen, welche dabei verbraucht werden, weshalb die Forschung an embryonalen Stammzellen moralisch und ethisch umstritten ist (Ach et al., 2006). MSC hingegen können intra vitam von adulten Tieren gewonnen werden.

In der regenerativen Medizin werden MSC zur Therapie eines großen Spektrums unterschiedlicher Krankheiten, wie beispielsweise Sehnen- oder Bandläsionen, Herzerkrankungen oder Wundheilungsstörungen erforscht und zum Teil bereits eingesetzt.

3.2 Einsatz von MSC in Forschung und Praxis

Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin gewinnen MSC immer mehr an Bedeutung. Vor allem im letzten Jahrzehnt wurden sie zunehmend Gegenstand der Forschung. Es werden große Hoffnungen in die Applikation von MSC als neue regenerative Therapiemethode gesetzt. Dabei geht es vor allem um die Behandlung orthopädischer Erkrankungen wie Band- oder Sehnenläsionen (Heckmann, 2007; Frisbie und Smith, 2010; Renzi et al., 2013) und im experimentellen Stadium auch um Knorpelregeneration (Hegewald, 2006; Murdoch et al., 2007). Außerhalb der Orthopädie werden MSC unter anderem eingesetzt, um Wundheilungen zu verbessern (Iacono et al., 2012b; Kim et al., 2013) und um Herz- (Atsma et al., 2007; Narita und Suzuki, 2015) und Rückenmarkserkrankungen gezielt und erfolgsversprechend zu behandeln (Zhilai et al., 2016). Die Forschungs- und Einsatzgebiete von MSC sind somit außerordentlich weitreichend. Es wird

grundsätzlich erwartet, dass die zellbiologischen Eigenschaften der MSC (Differenzierungspotential, Proliferationsfähigkeit) während einer MSC-Therapie zum Tragen kommen und im erkrankten Gewebe eine vollständige, funktionelle Regeneration herbeiführen. Bisherige, konservative Therapien verfehlen eine gewebliche Regeneration zumeist und führen stattdessen lediglich zu einer Reparatur. Das erkrankte Gewebe wird dabei nicht erneuert, sondern lediglich durch ein funktionell defizitäres Ersatzgewebe, z.B. Narbengewebe, ersetzt.

3.2.1 MSC in der Pferdemedizin

Ein inzwischen routinierter Einsatz von MSC in der Pferdemedizin findet im Bereich der Therapie von Sehnenläsionen statt. Weltweit arbeiten Wissenschaftler an der methodischen Optimierung dieser Therapie, beispielsweise: Oliveira (Brasilien) (Oliveira et al., 2008), Renzi (Italien) (Renzi et al., 2013), Schnabel (USA) (Schnabel et al., 2009), Smith (Großbritannien) (Smith, 2008), Broeckx (Belgien) (Broeckx, 2012) und Brehm (Deutschland) (Brehm, 2008), um nur einige wenige zu nennen. Große Studien, wie beispielsweise von Brehm et al. 2008 an 120 Sportpferden aus verschiedenen Disziplinen verifizieren den Erfolg der Stammzelltherapie auf diesem Gebiet. Je nach Disziplin konnten 70 – 80 % der behandelten Pferde mit Sehnenläsionen nach der Therapie wieder voll im Sport eingesetzt werden (Brehm, 2008). Auch eine Studie von Smith 2008 an 145 Rennpferden mit Sehnenläsionen zeigt eine deutlich geringere Rückfallrate bei MSC behandelten Tieren (18%) im Vergleich zu Tieren, die konservativ behandelt wurden (56%) (Smith, 2008). Frisbie et al. 2010 berichten ebenfalls von geringeren Rückfallraten nach Applikation von MSC in Sehnenläsionen im Vergleich zu konservativen Therapien (Frisbie und Smith, 2010). Um grundsätzliche Wirkmechanismen von MSC aufzuklären, haben jüngst Geburek et al. durch GFP-tracking gezeigt, dass intraläsional in Sehnen applizierte MSC auch tatsächlich funktionell in das Gewebe eingebaut werden (Geburek et al., 2016b). Schnabel et al. kamen nach einem In-Vivo-Experiment mit Kollagenase-induzierten Sehnendefekten acht Wochen nach der Behandlung zu einer signifikant verbesserten Sehnenbewertung bei Pferden, die mit MSC therapiert wurden, als bei der Kontrollgruppe, denen PBS appliziert wurde. Die Sehnenbewertung wurde verblindet durchgeführt und es gingen Charakteristika wie Tenozytenform und -dichte, freie Blutungen, Neovaskularisation, Linearität und Uniformität der Kollagenfibrillen darin ein (Schnabel et al., 2009). Auch im In-Vivo-Experiment von

Smith et al. konnte sechs Monate nach einer Behandlung mit MSC eine signifikante Verbesserung der Sehnen im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der isotonische Kochsalzlösung appliziert wurde, festgestellt werden. Die mit MSC behandelten Sehnen zeigten Verbesserungen in der Normalisierung von biomechanischen, morphologischen und kompositionellen Parametern (Smith et al., 2013).

Neben Studien wie diesen zur homologen Transplantation von in-vitro vermehrten Zellen (Brehm, 2008; Smith, 2008; Frisbie und Smith, 2010), wurden auch bereits erste Studien zur allogenen Transplantation veröffentlicht: Bei insgesamt 96 therapierten Pferden wurden in zwei Studien keine Abwehrreaktionen auf das körperfremde Transplantationsmaterial beobachtet (Iacono et al., 2012b; Lange-Consiglio et al., 2013).

Einer der zukunftsweisenden Forschungsschwerpunkte für den Einsatz von MSC ist die In-Vitro-Produktion von Geweben zur Transplantation, das sogenannte „Tissue-Engineering“. Ziel ist unter anderem die Entwicklung einer Therapie von Knorpeldefekten, bspw. bei Arthrosen oder Osteochondrosen (Hegewald, 2006; Yu et al., 2015). Das Pferd stellt dabei auch das beste Modell zur Übertragung der Ergebnisse auf die Humanmedizin dar (McIlwraith et al., 2011). In einer Studie von McIlwraith 2011 konnte durch die intraartikuläre Injektion von MSC und Hyaluronsäure zur Therapie von chondralen Defekten an medialen Femurkondylen ein mechanisch festeres regeneriertes Gewebe und makroskopisch ein größeres repariertes Areal im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur mit Hyaluronsäure behandelt wurde, erreicht werden (McIlwraith et al., 2011).

Zur Behandlung von Sehnenläsionen ist die Therapie mit MSC in der Pferdemedizin bereits etabliert. Zur Behandlung von Knorpeldefekten gibt es experimentelle Ansätze mit einer vielversprechenden Zukunft für diese und weitere Einsatzbereiche (Frisbie und Smith, 2010; McIlwraith et al., 2011).

3.2.2 MSC in der Kleintiermedizin

Auch in der Kleintiermedizin werden mesenchymale Stromazellen bereits zu verschiedenen Therapiezielen eingesetzt. Narita et Suzuki haben 2015 beispielsweise in ihrem Rückblick präklinische und klinische Studien zur Therapie von Herzerkrankungen zusammengefasst, in denen sowohl autologe als auch allogene Transplantationen von MSC bei Mäusen, Ratten, Schweinen, Schafen und Hunden untersucht wurden (Narita und Suzuki, 2015). Außerdem werden in diesem

Review die immunsuppressiven Eigenschaften von MSC und die dadurch mögliche allogene Transplantation herausgestellt (Narita und Suzuki, 2015). Kim et al. 2013 beschreiben den Einsatz von MSC bei Hunden zur Wundheilung. Sie berichten von einer gesteigerten Kollagensynthese, Zellproliferation und Angiogenese und damit von einer schnelleren Wundheilung nach intradermaler Injektion allogener MSC bei Hautdefekten (Kim et al., 2013). Analog zur Pferdemedizin wird jüngst die Forschung zum Einsatz von MSC bei Gelenkerkrankungen auch bei Hunden forciert. Beispielsweise zeigen Yun et al. vielversprechende Erfolge in der Forschung zum Einsatz von MSC bei Osteoarthritis. Auch beschreiben Yun et al. einen synergistischen Effekt von MSC und Platelet-rich-Plasma (PrP) bei einer Kombinationstherapie (Yun et al., 2016).

Ein weiterer potenzieller Einsatzbereich für MSC in der Kleintiermedizin ist die Behandlung von Rückenmarksverletzungen. Penha et al. beobachteten bei drei von vier Hunden, deren Krankheitszustände über eine Zeit von 18 Monaten nach einer Transplantation von autologen KM-MSC verfolgt wurden, eine signifikante klinische Verbesserung und Bewegungsfähigkeit (Penha et al., 2014).

Die Einsatz- und Forschungsbereiche von MSC in der Kleintier- und Pferdemedizin überschneiden sich im Bereich der orthopädischen Erkrankungen und der Wundheilungsförderung, ergänzen sich aber auch zu einem breiteren Wissenschaftsspektrum, da beispielsweise die Stammzelltherapie bei Herz- und Rückenmarkserkrankungen in der Pferdemedizin noch keine Rolle spielt.

3.2.3 MSC in der Humanmedizin

Es gibt viele Studien zur Untersuchung der Eigenschaften humaner MSC. Besonders beachtenswert ist hier die Veröffentlichung von Dominici et al., in der eine allgemeingültige Definition für humane MSC vorgeschlagen wird (Dominici et al., 2006). Demnach zeigen MSC eine fibroblastenähnliche Morphologie, sind plastikadhärent, proliferativ und exprimieren die Positivmarker CD105, CD73 und CD90, während die Negativmarker CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und MHCII von MSC nicht exprimiert werden. Über diese Kriterien hinausgehende wichtige Eigenschaften für Therapie Zwecke sind die immunmodulatorischen Fähigkeiten von MSC mit ihrer Potenz, pro-inflammatorische Immunreaktionen zu unterdrücken (Kim et al., 2015). Nach Gilbert et al. ist die Zusammenarbeit mit Wissenschaftlern aus verschiedenen Bereichen, z.B.

Ingenieuren, Physikern, Biologen, Chemikern und Statistikern nötig, um die Mikroumgebung der Stromazellen (auch „Stammzell-Nische“ genannt) und ihren Einfluss auf die Stromazellen zu erforschen. Die Stammzell-Nische zu verstehen (wie sie die Bestimmung der Stammzellen reguliert und wie sie sich mit dem Alter, mit Verletzungen und Erkrankungen verändert), brächte große Fortschritte für regenerative Therapiemethoden in der Medizin (Gilbert und Blau, 2011).

Neben dem Einsatz von MSC in der Orthopädie werden in der Humanmedizin viele weitere Anwendungsmöglichkeiten von MSC diskutiert. Beispielsweise sehen Atsma et al. auch ein großes Potential in MSC zur Therapie von Herzerkrankungen, speziell von Ischämien des Myokardiums (Atsma et al., 2007). Für humanmedizinische Forschung werden vielfach Tiermodelle verwendet, bzw. werden Erkenntnisse aus der tiermedizinischen Forschung in die Humanmedizin transferiert. Üblich sind präklinische Versuche an Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schweinen, Schafen und Hunden (Narita und Suzuki, 2015). Aber auch das Pferd stellt ein gutes Tiermodell für humanmedizinische Forschungen dar (McIlwraith et al., 2011). Insbesondere werden orthopädische Anwendungsmöglichkeiten für MSC im Großtiermodell „Pferd“ getestet und entsprechende Ergebnisse dann in Hinblick auf Anwendungsmöglichkeiten im Menschen analysiert. Dabei geht es zumeist um die tierarteigenen MSC, die autolog oder allogene verabreicht werden. Bemerkenswerterweise werden auch xenogene MSC mit Erfolg eingesetzt. So zeigen Stavely et al. wie humane adulte KM-MSCs enteritische Neuropathien in Meerschweinchen mit akuter Kolitis dämpfen (Stavely et al., 2015). Ebenfalls im artübergreifenden Xenotransplantations-Versuch beschreiben Suenaga et al., wie humane MSC in künstliche Schädeldachdefekte in Ratten implantiert wurden und die behandelten Knochen eine signifikant bessere Heilung zeigten als die jeweilige Kontrollseite (Suenaga et al., 2015). Es werden erste erfolgreiche In-Vitro-Versuche beschrieben, aus MSC ganze Gewebe zu züchten, die später zur Transplantation genutzt werden sollen. Solche Ansätze werden unter dem Begriff „Tissue Engineering“ zusammengefasst. So beschreiben zum Beispiel Murdoch et al. die effiziente Differenzierung humaner KM-MSCs zu funktionell belastbarem Knorpelgewebe, sodass innerhalb von 14 Tagen eine flexible, durchsichtige Scheibe aus $0,5 \times 10^6$ knorpeltypischen Zellen gezüchtet werden kann (Murdoch et al., 2007).

Erste In-Vivo-Versuche zeigen vielversprechende Perspektiven für den Einsatz von MSC in der Humanmedizin. Chang et al. transplantierten bei neun Frühgeborenen mit hohem Risiko für bronchopulmonäre Dysplasie allogene humane MSC aus Nabelschnurblut intratracheal. Der Behandlungserfolg wurde im Hinblick auf eine regelrechte Ausbildung der bronchopulmonären Strukturen sowie im Hinblick auf die Menge von Entzündungsfaktoren im trachealen Aspirat bewertet. Demnach beeinflussten die applizierten MSC das Krankheitsgeschehen positiv. Die Autoren bewerten die Methode als sicher und praktikabel. (Chang et al., 2014). Katagiri et al. zeigen an einem ersten In-Vivo-Versuch an einem humanen Patienten die erfolgreiche Anregung des Knochenwachstums vor einer Zahn-Implantation durch die Applikation von Medium, das die Zell-Sekretionen von humanen KM-MSC enthält (Katagiri et al., 2016).

Über das pathologische Potenzial von MSC ist bisher wenig bekannt. Neben dem regenerativen Potenzial wird in der Humanmedizin auch das pathologische Potenzial von verschiedenen Stammzellen erforscht. So gibt es einige Studien, die von der Gefahr der neoplastischen Entartung, sprich der Entstehung einer Krebserkrankung nach einer Stammzelltransplantation berichten (Alison, 2009). In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um die Auswirkungen der Transplantation von embryonalen Stammzellen. Erdö et al. berichten beispielsweise von denselben embryonalen Stammzellen einer Maus, die im Rattengehirn einen Defekt reparierten, aber in einem anderen Mäusegehirn einen Tumor bildeten (Erdo et al., 2003). Yadirgi et al. beschreiben, dass adulte neuronale Stammzellen und Gehirntumorzellen ähnliche Eigenschaften besitzen und beide Zellarten Marker für neuronale Stammzellen (u.a. Sox2, Nestin und CD133) exprimieren. Es ist möglich, dass Gehirntumorzellen aus adulten neuronalen Stammzellen entstehen, es ist aber auch möglich, dass Gehirntumorzellen stammzellähnliche Eigenschaften besitzen, ohne direkt aus adulten neuronalen Stammzellen entstanden zu sein (Yadirgi und Marino, 2009). Gilbert und Blau beschreiben ein Potenzial zur Teratombildung bei embryonalen und auch bei induzierten pluripotenten Stammzellen. Die ebenfalls untersuchten adulten Stammzellen werden in diesem Zusammenhang nicht erwähnt (Gilbert und Blau, 2011). Es gibt bisher noch keine Veröffentlichungen zum Tumorpotenzial equiner MSC. Folglich sind interessante Fragen wie „von welchen Faktoren ist eine Tumorgenese aus transplantierten MSC abhängig?“, „wieviel Zeit braucht eine

Tumorgenese nach einer Zelltransplantation“, „sind die transplantierten MSC, oder vielleicht die injizierten Medien für die Tumorgenese verantwortlich?“, noch nicht beantwortet.

3.3 Gewinnung und Aufbereitung von MSC

3.3.1 MSC aus dem Knochenmark (KM-MSK)

Prinzipiell kann Knochenmark aus jedem markhaltigen Knochen gewonnen werden. Prädestiniert zur Knochenmarkgewinnung am lebenden Pferd sind zum einen das Tuber coxae des Os ilium und zum Anderen das Sternum mit seinen verschiedenen Sternebrae (Goodrich et al., 2008). Die isolierbare Zellzahl ist aus den Aspiraten aus dem Os ilium nicht immer ausreichend, um eine Zellkultur anzulegen (Goodrich et al., 2008). Die Sternalpunktion stellt eine sichere Methode zur Gewinnung von kultivierbaren MSC dar (Kasashima et al., 2011). Von den sieben Sternebrae des Pferdes eignen sich aufgrund ihrer sphärischen Geometrie besonders die Sternebrae 4 und 5 zur Knochenmarkaspiration, wohingegen weiter kraniale oder kaudale Sternebrae morphologisch schwieriger punktierbar sind und ein größeres Risiko für akzidentielle Thorako- und Perikardiozentesen darstellen (Eydt et al., 2014). Verschiedene Veröffentlichungen zur Sternalpunktion am lebenden Pferd stimmen im Procedere zur Knochenmarkgewinnung grundlegend überein. So beschreiben z.B. Goodrich et al., Kasashima et al. und Bourzac et al., dass das Pferd im Stehen sediert und der Punktionsbereich mit einer Lokalanästhesie analgesiert wird (Goodrich et al., 2008; Bourzac et al., 2010; Kasashima et al., 2011). Anschließend wird der Punktionsbereich aseptisch vorbereitet und eine Stichinzision durch die Haut mit einer Skalpellklinge vorgenommen. Durch diese Stichinzision wird eine Jamshidi-Nadel vorgeschoben und maximal 2 – 3 cm tief (Goodrich et al., 2008; Kasashima et al., 2011) ins Sternum eingeführt. In einer heparinisierten Spritze werden zwischen 5 und 20 ml KM aspiriert. Für die Isolation von MSC aus dem KM gibt es verschiedene Protokolle. Bourzac et al. vergleichen zwei Lösungsmittel (Percoll und Ficoll) mit einem klassischen Protokoll (ohne Lösungsmittel) für die Dichtegradientenzentrifugation. Laut dieser Studie kann mit Percoll die größte Ausbeute an MSC erreicht werden (Bourzac et al., 2010). Nach der Gewinnung der mononukleären Zellen (MNC) werden diese unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert und nach regelmäßigem Mediumswechsel bleiben aus den MNC nur

die plastikadhärenten MSC in der Kultur und proliferieren. Bei Konfluenz der Zellen (80 – 90 %) sind mögliche weitere Schritte: das Passagieren der Zellen zur weiteren Vermehrung, die Kryokonservierung der Zellen zum späteren Gebrauch, oder die Verwendung der Zellen zur Therapie (Colleoni et al., 2009).

3.3.2 MSC aus dem Fettgewebe (A-MSC)

Die Methodik der Gewinnung von MSC aus Fettgewebe wird unter anderem von Vidal et al. (Vidal et al., 2007) beschrieben (vgl. Braun et al., 2010, Screven et al., 2014, Frisbie und Smith, 2010). Das subkutane Fettgewebe wird aus der Region der Glutealmuskulatur entnommen. Dazu werden die Pferde sediert, unter aseptischen Bedingungen und Lokalanästhesie werden zwei 10 – 15 cm lange, L-förmig angeordnete, Hautinzision vorgenommen und mit Hilfe einer Skalpellklinge werden ca. 15 ml Fettgewebe superfaszial des M. gluteus superficialis entnommen. Die aus adipogenen Zellen zu gewinnenden mesenchymalen Stromazellen (A-MSC) werden umgehend isoliert. Dazu wird das Fettgewebe im entsprechend gleichen Volumen PBS gewaschen, um eine Trennung in 2 Phasen zu erreichen. Die obere Phase besteht nachfolgend aus zerkleinertem und gewaschenem Fettgewebe und die flüssige Phase darunter aus einer Zellsuspension in PBS. Diese flüssige Phase wird entfernt. Das Fettgewebe wird für 50 min in einer Verdauungslösung digestiert, anschließend zentrifugiert, erneut zerkleinert, gemischt und zentrifugiert, sodass ein Zellpellet entsteht, das die kernhaltigen Zellen aus dem Fettgewebe und damit auch die A-MSC enthält (Vidal et al., 2007).

3.3.3 MSC aus dem peripheren Blut (PB-MSC)

Als eine der ersten beschrieben Spaas et al. 2013 (Spaas et al., 2013) die Gewinnung von eMSC aus peripherem Blut. Demnach werden dem Pferd 10 ml peripheren Bluts in ein EDTA- Blutröhrchen hinein entnommen und bei 4 °C, innerhalb von 4 Stunden, zum Labor transportiert. Das Blut wird abzentrifugiert, der Buffy coat abpipettiert und mit PBS verdünnt. Durch Dichtegradientenzentrifugation werden anschließend die MNC isoliert, mehrfach gewaschen und ausgesät. Die Kultivierung erfolgt mit DMEM, das mit 30 % FBS (im Standard-Kultivierungsmedium sind 10 % FBS enthalten), Antibiotika, Fungiziden und zusätzlich Dexamethason supplementiert ist. Das Medium wird zweimal wöchentlich gewechselt, bis eine

Konfluenz von 70 % erreicht ist. Die weitere Kultivierung nach dem ersten Passagieren erfolgt ohne den Zusatz von Dexamethason (Spaas et al., 2013).

3.3.4 MSC aus dem Nabelschnurblut (UCB-MSC)

Die Gewinnung von MSC aus Nabelschnurblut erfolgt ähnlich wie die aus peripherem Blut. De Schauwer et al. beschrieben 2013 (Schauwer et al., 2013), dass das Blut vor dem spontanen Reißen der Nabelschnur direkt nach der Niederkunft des Fohlens zu entnehmen ist. Dazu wird die Nabelschnur nahe der Vulva der Mutterstute abgeklemmt, desinfiziert und anschließend einmalig punktiert. Das Blut wird durch die Gravitationskraft in einen sterilen Standard-Blutspendebeutel (350 ml), benetzt mit einer Antikoagulans, hinein laufen gelassen. Die Probe wird innerhalb von 15 Stunden nach der Entnahme nach demselben Schema aufbereitet wie zur Gewinnung von MSC aus peripherem Blut.

3.3.5 MSC aus Nabelschnurgewebe (UCG-MSC) und Amnionflüssigkeit (AF-MSC)

Die Methoden werden in einer Veröffentlichung von Lovati et al. (Lovati et al., 2011) beschrieben: Zur Gewinnung von MSC aus dem Nabelschnurgewebe muss direkt nach der Geburt des Fohlens die Nabelschnur am distalen und proximalen Ende zwischen Plazenta und Fohlennabel abgebunden und abgesetzt werden. Anschließend wird der isolierte Teil der Nabelschnur dreimal in PBS, versetzt mit Chlorhexidin und Isopropanol, zur Desinfektion gewaschen und in eine antibiotische und antimykotische Lösung gelegt. Zum Transport wird die Nabelschnur bei einer Temperatur von 4 °C verwahrt und innerhalb von 8 Stunden weiter bearbeitet. Zur Isolation der MSC wird das Nabelschnurgewebe in 1 – 2 mm² kleine Stücke geschnitten und mithilfe einer Kollagenase im Medium über Nacht im Inkubator digestiert. Die digestierte Lösung wird durch ein 80 µm Zellsieb gefiltert und anschließend zentrifugiert. Das Zellpellet wird zweimal in PBS gewaschen und die Zellen anschließend wie üblich ausgesät. Die Reinigung von nicht-adherenten Zellen und damit die Herstellung einer reinen Kultur von UCG-MSC passiert durch die ersten Medienwechsel (Lovati et al., 2011).

Zur Gewinnung von MSC aus Amnionflüssigkeit werden während der Geburt, beim Vorwölben der Amnionblase aus der Vulva, bevor die Amnionblase spontan

rupturiert, ca. 60 ml Amnionflüssigkeit mittels Punktion aspiriert. Die Amnionflüssigkeit wird bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung innerhalb der nächsten 8 Stunden verwahrt. Die Isolation der MSC aus der gewonnenen Amnionflüssigkeit erfolgt durch Zentrifugation, mehrfaches Waschen des Zellpellets in PBS und Aussäen der Zellen in Standard-Proliferationsmedium. Mit den Medienwechseln alle 2 - 3 Tage werden alle nicht adherenten Zellen entfernt und eine reine Kultur von AF-MSC hergestellt (Lovati et al., 2011).

3.4 Allgemeine Charakterisierung von MSC

Bis heute ist nicht umfassend geklärt, inwieweit MSC aus verschiedenen Quellen dieselben Eigenschaften besitzen, bzw. sich unterscheiden. Die potenziellen Unterschiede zwischen Zellen, die beispielsweise aus dem Knochenmark, Fettgewebe, Nabelschnurblut oder peripherem Blut gewonnen wurden, bedingen die Frage, welche Zellen sich eventuell am besten für bestimmte Therapiezwecke eignen. Daher besteht die Notwendigkeit für ein System, nach welchem die Zellen miteinander verglichen und eventuell auch selektiert werden können. In der Humanmedizin gibt es dafür die bereits beschriebene Definition von Dominici et al., die sowohl in-vitro Wachstums- und Differenzierungseigenschaften als auch Oberflächenmarkerprofile berücksichtigt (Dominici et al., 2006). Eine solche Definition für MSC ist in der Veterinärmedizin nicht vorhanden. Vergleichbar zur humanmedizinischen Definition, können in der Veterinärmedizin die in-vitro Wachstumseigenschaften (Plastikadhärenz, Proliferationsfähigkeit) und das Differenzierungspotenzial der Zellen bestimmt werden. Da die untersuchten MSC aus allen verschiedenen Entnahmeorten im Körper diese Eigenschaften besitzen (Fortier, 2005), eignet sich der bloße Nachweis dieser Eigenschaften nicht, um Unterschiede zwischen MSC aus verschiedenen Lokalisationen zu detektieren. Weiterführende Charakterisierungen von MSC zielen auf spezielle Markerproteine auf der Zelloberfläche der MSC ab, sogenannte „cluster of differentiation“ (CD). Diese CD-Moleküle können mittels spezieller Antikörper (AK) detektiert werden. Die Problematik der Definition equiner MSC besteht allerdings darin, dass die meisten AK für die genannten Oberflächenmoleküle zur Phenotypisierung der Zellen nur für humane Zellen entwickelt und verifiziert sind. Bisher ist kein pferdespezifisches Marker-Panel für equine MSC auf dem Markt verfügbar. Allerdings gibt es eine Reihe von Arbeiten, die zur Zusammenstellung eines solchen Panels beitragen und Anteile

der von Dominici et al. genannten Marker beinhalten, oder das Spektrum der Positiv- und Negativmarker erweitern (Burk et al., 2013; Paebst et al., 2014; Schnabel et al., 2014). Zur Entwicklung eines Marker-Panels für eMSC leistet auch diese Arbeit einen Beitrag.

3.5 Immunologische Charakterisierung von MSC

Bei der Verwendung autologer MSC zur Therapie ist kein Risiko immunologischer Abwehrreaktionen zu erwarten (Smith, 2008). Die Gewinnung autologer MSC birgt allerdings Risiken und Nachteile in Hinblick auf die sichere und zeitnahe Bereitstellung zur Therapie geeigneter MSC-Produkte. Außerdem birgt die Gewinnungsmethode von MSC aus Knochenmark (KM-MSC) das Risiko einer thorakalen oder kardialen Punktion (Jacobs et al., 1983; Durando et al., 2006). Des Weiteren dauert die Stammzellaufbereitung und Anzucht der autologen Zellen bis hin zum injizierbaren Produkt bis zu fünf Wochen (Brems und Jebe, 2008). Dementsprechend wird als Alternative zur Therapie mit autologen MSC die Applikation von allogenen MSC vorgeschlagen. Die Erforschung allogener MSC wird sowohl in der Humanmedizin (Alison und Caplan, 2009; Heng et al., 2009) als auch in der Pferdemedizin (Watts et al., 2011; Iacono et al., 2012b; Lange-Consiglio et al., 2013) in den letzten Jahren vorangetrieben. Bereits durchgeführte experimentelle Studien zur allogenen Transplantation von MSC zur Behandlung von equinen Sehnenschäden und anderen orthopädischen Erkrankungen brachten Ergebnisse ohne signifikante Abstoßungsreaktionen (Carrade und Borjesson, 2013; Lange-Consiglio et al., 2013). Eine mögliche Erklärung dafür erbringen mehrere Studien, die die Abwesenheit von MHCII-Molekülen auf MSC zeigen (Alison und Caplan, 2009; Heng et al., 2009; Spaas et al., 2013). Von MHCII-Molekülen ist bekannt, dass sie mit Immunreaktionen assoziiert sind und damit einen entscheidenden Faktor für die Initiation von Abstoßungsreaktionen darstellen. Ein weiteres immunologisch wichtiges Molekül ist MHCI. Rafei et al. beschreibt, dass eine Hochregulation von MHCI auf MSC zu einem Verlust ihrer immunsuppressiven Eigenschaften führt (Rafei et al., 2009). Allgemein beschreiben Krampera et al., dass MSC einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf T-Zell-Reaktionen gegen Alloantigene ausüben und damit einen Organismus vor Graft-Versus-Host-Reaktionen bewahren können (Krampera, 2002). Die Untersuchungen in dieser Arbeit beinhalten die Expression der

immunologischen Marker MHC I und MHC II auf eMSC. Dies gilt dem Ziel, weitere Informationen für eine mögliche allogene Verwendung der Zellen zu erhalten.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Pferde

Fünf Warmblutpferde im Besitz der Tierärztlichen Hochschule Hannover wurden aus anderen Gründen als für diese Studie in der Pferdeklinik der Tierärztlichen Hochschule Hannover narkotisiert und darauf folgend euthanasiert. Von diesen Pferden wurden im narkotisierten Zustand Knochenmarksproben entnommen. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Tierärztlichen Hochschule Hannover und der zuständigen deutschen Landesbehörde (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 33.9-42502-04-11/0572) genehmigt. Vier Warmblutpferde wurden aus anderen Gründen als für diese Studie in der Pferdeklinik der JLU Gießen narkotisiert und darauf folgend euthanasiert. Von diesen Pferden wurden nach der Euthanasie Knochenmarksproben für diese Studie entnommen.

Pferde mit früheren Knochenmarkpunktionen wurden aus der Studie ausgeschlossen. Es wurde besonderer Wert darauf gelegt, KM von Spendertieren aus einer großen Altersspanne zu erhalten (vgl. Tab. 1).

Pferd	KM-Aspirat	euthanasiert/ narkotisiert	Geschlecht	Alter	Grund für Euthanasie
1	1	eut	Wallach	28 Jahre	Kolik
2	2	nar	Wallach	28 Jahre	Alters- schwäche
3	3	eut	Stute	23 Jahre	Kolik
4	4	nar	Stute	22 Jahre	Lahmheit
5	5	eut	Wallach	12 Jahre	Kolik
6	6	nar	Stute	16 Jahre	Lahmheit
7	7	eut	Wallach	7 Jahre	Lahmheit
8	8	nar	Stute	3 Jahre	unbekannt
9a	9	eut	Stute	2 Wochen verfrüht	Sepsis
9b	10	nar	Stute	2 Wochen verfrüht	Sepsis

Tab. 1: Daten der Spendertiere.

4.1.2 Substanzen

In den Versuchen verwendete Substanzen werden tabellarisch aufgeführt:

<i>Knochenmarksgewinnung und Zellisolierung</i>	
Substanz	Hersteller
Xylazin (Xylavet® 20 mg/ml)	CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland
Ketamin (Narketan® 100 mg/ml)	Vétoquinol GmbH, Ravensburg, Deutschland
Midazolam (Midazolam® 5 mg/ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Isofluran CP®	CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland
Heparin-Natrium „Multi“ 10.000 IE/ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Easycoll®	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
0,05 % Trypsin-EDTA (1x), gibco®	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylazin (Proxylaz®)	bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland
Ketamin (Ketamin 10 %®)	
Diazepam 10 mg®	Rotexmedica, Trittau, Deutschland
T61®	Intervet, Unterschleißheim, Deutschland

Tab. 2: Zur Knochenmarksgewinnung und Zellisolierung verwendete Substanzen.

Durchflusszytometrische Analyse			
Substanz			Hersteller
donor horse serum, heat inactivated			PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
DPBS (1x), gibco®			life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waschpuffer (WP)			
99,4 %	99 %	DPBS (1x), gibco®	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
	1 %	BSA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
0,1 %	10 %	NaN ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
	90 %	DPBS (1x), gibco®	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
0,5 %	Ziegenserum		Hausproduktion, Institut für Veterinäranatomie, -histologie und -embryologie, Gießen, Deutschland

Tab. 3: Zur durchflusszytometrischen Analyse verwendete Substanzen.

Verwendete Antikörper zur Durchflusszytometrie	
Marker	Hersteller
CD11a/CD18 (CVS9; MCA1081GA)	AbD Serotec, Bio-Rad Laboratories Inc, Puchheim, Deutschland
CD13 (WM15; 560998)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD14 (M5E2; 555397)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD14 (HCD14; 325607)	Biolegend Inc., San Diego, USA
CD29 (MAR4; 557332)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD34 (Test-AK)	mfd Diagnostics GmbH, Wendelsheim, Deutschland
CD34 (AC136; 130-081-002)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD34 (ICO115;sc-7324)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA
CD44 (IM7; 553131)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD45 (2D1; 345808)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD45 (30-F11; 103107)	Biolegend Inc., San Diego, USA
CD49e (MFR5; 103810)	Biolegend Inc., San Diego, USA
CD73 (Test-AK)	mfd Diagnostics GmbH, Wendelsheim, Deutschland
CD73 (TY/23; 561545)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD79a (HM47; 555934)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD79a (F11-172; 133105)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD90 (Test-AK)	mfd Diagnostics GmbH, Wendelsheim, Deutschland
CD90 (5E10; 555593)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD105 (Test-AK)	mfd Diagnostics GmbH, Wendelsheim, Deutschland
CD105 (SN6; MCA1557T)	AbD Serotec, Bio-Rad Laboratories Inc, Puchheim, Deutschland
CD105 (MJ7/18; 120413)	Biolegend Inc., San Diego, USA
CD105 (P3D1)	University of Iowa, USA
CD105 (SN6h; C1105C01)	DCS Diagnostic systems, Hamburg,

	Deutschland
CD117 (104D2; 332785)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD133 (13A4; 17-1331)	eBioscience Inc, San Diego, USA
CD140a (APA5; 135907)	Biolegend Inc., San Diego, USA
CD140b (28D4; 558820)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD146 (P1H12; 561013)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
HLA-DR (G46-6; 560944)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
MHCI (CVS22; MCA1086GA)	AbD Serotec, Bio-Rad Laboratories Inc, Puchheim, Deutschland
MHCII (CVS20; MCA1085GA)	AbD Serotec, Bio-Rad Laboratories Inc, Puchheim, Deutschland
Sca-1 (D7; 108111)	Biolegend Inc., San Diego, USA

Tab. 4: Zur durchflusszytometrischen Analyse verwendete Antikörper.

Proliferationsversuch	
Marker	Hersteller
Cell Proliferation Dye eFluor [®] 670 (65-0840)	eBioscience, Frankfurt, Deutschland

Tab. 5: Im Proliferationsversuch verwendeter Proliferationsmarker.

Proliferations-Medium (PM)		
Substanz		Hersteller
88 %	DMEM (1x) 4,5 g/l D-Glucose gibco [®] + L-Glutamine + Pyruvate	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
1 %	MEM NEAA (100x) gibco [®]	
1 %	Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) gibco [®]	
10 %	fetal bovine serum gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Tab. 6: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der Zellen.

Osteogenes Differenzierungs-Medium (odM)		
Substanz		Hersteller
77,79 %	DMEM (1x) 4,5 g/l D-Glucose gibco® + L-Glutamine + Pyruvate	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
1 %	Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) gibco®	
10 %	fetal bovine serum gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
0,01 %	Dexamethasone, cell culture tested (0,1 µM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
10 %	β-Glycerolphosphate disodium salt hydrate (10 mM/ml in DMEM gelöst)	
1,2 %	L-Ascorbic acid 2-phosphate magnesium (0,06 mM/ml in DMEM gelöst)	

Tab. 7: Zusammensetzung des Mediums zur osteogenen Differenzierung der Zellen.

Chondrogenes Differenzierungs-Medium (cdM)		
Substanz		Hersteller
87,89 %	DMEM (1x) 4,5 g/l D-Glucose gibco® + L-Glutamine + Pyruvate	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
1 %	Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) gibco®	
0,01 %	Dexamethasone, cell culture tested (0,1 µM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
1 %	ITS Liquid Media Supplement (100x) (10 µg/ml)	
3,3 %	Pyruvic acid sodium, cell culture tested (0,9 mM/ml in DMEM gelöst)	
3,3 %	L-Ascorbic acid 2-phosphate magnesium (0,06 mM/ml in DMEM gelöst)	
3,5 %	L-Proline (USP/EP) (0,35 mM/ml)	
bei Gebrauch: 5 µl zu 495 µl cdM	Transforming growth factor-β1 Porcine PL	

Tab. 8: Zusammensetzung des Mediums zur chondrogenen Differenzierung der Zellen.

Adipogenes Differenzierungs-Medium (adM)		
Substanz		Hersteller
88,4 %	DMEM (1x) 4,5 g/l D-Glucose gibco® + L-Glutamine + Pyruvate	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
1 %	Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) gibco®	
10 %	fetal bovine serum gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
0,1 %	Dexamethasone, cell culture tested (0,1 µM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
0,5 %	ITS Liquid Media Supplement (100 x) (10 µg/ml)	
bei Gebrauch: 3,6 µl zu 500 µl adM	Indomethacin Crystalline (10 mg/ml in purem Ethanol gelöst)	
bei Gebrauch: 5,5 µl zu 500 µl adM	IBMX 3-Isobutyl-1- Methylxanthine (10 mg/ml in purem Ethanol gelöst)	

Tab. 9: Zusammensetzung des Mediums zur adipogenen Differenzierung der Zellen.

Fixation, Einbettung und Färbung der Zellen	
Substanz	Hersteller
Alcianblau 8 GS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aluminiumsulfatlösung 5%	Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co.
Aqua dest (aus Reinwasseranlage)	MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Bidest (aus Reinstwassersystem TKA Micro Pure)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (100%, 96%, 80%, 70%, 50%)	
Formaldehydlösung 35%	
Hämalaunlösung nach Meyer	
Kaisers Glyceringelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot	
Natriumcarbonat	
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Oil Red O solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraffin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pertex®	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Silver nitrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 10: Zur Fixation, Einbettung und Färbung verwendete Substanzen.

Transiente Transfektion	
Substanz	Hersteller
Opti-MEM® I	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Lipofactamine 2000 Reagent	
Natriumbutyrat	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Plasmid pcDNA3.1 – CD34 (Equus)	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Plasmid pcDNA3.1 – CD73 (Equus)	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Plasmid pcDNA3.1 – CD90 (Equus)	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Plasmid pcDNA3.1 – CD105 (Equus)	life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tab.11: Zur transienten Transfektion verwendete Substanzen.

4.1.3 Geräte

In den Versuchen verwendete Geräte werden tabellarisch aufgeführt:

Gerät	Hersteller
Accuri™ C6 Durchflusszytometer	BD, Heidelberg, Deutschland
Computer Dell Precision T1600	Dell GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Einbettssystem EG1150C	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Eppendorf centrifuge 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf centrifuge 5702R	
Eppendorf Easypet	
Eppendorf Pipetten Research	
Inkubator HeraCell™ 150i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Flowbench Hera safe™ EN12469:2000	
Mikroskop Leica DM75	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Motic AE 21	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom Leica RM2125RT	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Minishaker MS2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Paraffinschrank	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Wasserbad WB7	

Tab. 12: In den Versuchen verwendete Geräte.

4.1.4 Verbrauchsmaterialien

In den Versuchen verwendete Verbrauchsmaterialien werden tabellarisch aufgeführt:

Material	Hersteller
6-Well-Platten	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
24-Well-Platten	
96-Well-Platten	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Deckgläser	Thermo Scientific, Waltham, USA
Einbettkassetten	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Knochenmarkbiopsienadeln 13 G	Angiotech, Wyomissing, USA
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pasteurpipetten (Glas)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten (Plastik) 10 ml, 30 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	
Reagiergefäße schwarz 1,5 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Skalpellklingen, Figur 20	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ²	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Zellsiebe BD Falcon cell strainer 70 µm Nylon	BD, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50 ml	

Tab. 13: In den Versuchen verwendete Verbrauchsmaterialien.

4.1.5 Software

In der Arbeit verwendete Software wird tabellarisch aufgeführt:

Software	Hersteller
Axiovision image analysis	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
BD Accuri™ C6 Analysis Software	BD, Heidelberg, Deutschland
Statistik Programm BMDP6D	BMDP/Dynamic, Release 8.1, Dixon, 1993
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA

Tab. 14: In der Arbeit verwendete Software.

4.2 Methoden

4.2.1 Isolation und Anzucht von KM-MSC nach KM-Entnahme aus narkotisierten Pferden

Es wurde KM von vier Pferden in Allgemeinanästhesie gewonnen (Pferd Nr. 2, 4, 6, 8; Tab. 1). Die Pferde wurden mit Xylazin (1,1 mg / kg) sediert und mittels Ketamin (2,2 mg / kg) und Midazolam (0,1 mg / kg) in Allgemeinanästhesie abgelegt. Die Allgemeinanästhesie wurde durch eine Beatmung mit Isofluran in reinem Sauerstoff aufrechterhalten. Das Pferd Nr. 9 (vgl. Tab. 1) wurde narkotisiert wie für die euthanasierten Pferde beschrieben. Bei diesem Pferd wurde sowohl vor der Euthanasie (im narkotisierten Zustand) als auch innerhalb von 30 min nach der Euthanasie Knochenmark entnommen. Daher gibt es von diesem Pferd sowohl ein KM-Aspirat aus dem narkotisierten, als auch aus dem euthanasierten Pferd.

Die Knochenmarkaspirate (5 ml) wurden mithilfe von Knochenmarkbiosienadeln aus den Sternebrae 4 oder 5 unter Ultraschallkontrolle in zuvor heparinisierten Spritzen entnommen (Eydt et al., 2014). Anschließend wurden durch Dichtegradientenzentrifugation mithilfe von Easycoll die mononukleären Zellen isoliert. Die aus den 5 ml Aspirat gewonnenen Zellen wurden dann in zwei 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät, welche 5 ml Proliferationsmedium (PM) enthielten (vgl.

Tab. 6). Dieselbe Zusammensetzung des Mediums wurde bereits durch Mensing et al. 2011 als Standard-Medium zur Kultivierung von MSC beschrieben (Mensing et al., 2011). Nach dem Aussäen wurde das Medium das erste Mal nach 4 bis 24 Stunden gewechselt. Danach wurde alle 2 - 3 Tage ein Mediumswechsel vorgenommen, bis die Zellen eine Konfluenz von 70 - 80 % erreichten. Anschließend wurden die Zellen mithilfe von Trypsin von der Kulturflasche abgelöst und passagiert oder kryokonserviert. Alle Zellen, die für die Experimente verwendet wurden, befanden sich in den Passagen 1 - 3.

4.2.2 Isolation und Anzucht von KM-MSC nach Entnahme von euthanasierten Pferden

Vier weitere Pferde (Pferd Nr. 1, 3, 5, 7; Tab. 1) wurden aus anderen Gründen als für diese Studie euthanasiert. Dafür wurden die Pferde zuerst mit Xylazin (1,1 mg / kg) sediert und darauf folgend mit Ketamin (2,2 mg / kg) und Diazepam (0,1 mg / kg) narkotisiert. Anschließend wurden sie mit T61 euthanasiert. Innerhalb von 30 min nach der Euthanasie wurden 2 x 5 ml Knochenmarkaspirate gewonnen und wie oben beschrieben aufbereitet.

4.2.3 Test von potenziellen Antikörpern zur Immunphenotypisierung von equinen KM-MSC

Um ein möglichst breites Spektrum an Markern zu erhalten, die zur immunphenotypischen Charakterisierung equiner MSC genutzt werden können, wurde, basierend auf Angaben aus der Literatur und bekanntem Vorkommen von verschiedenen Oberflächenmolekülen auf Stammzellen, in Vorversuchen eine Reihe von kommerziell erhältlichen Markern auf ihre Reaktivität auf equinen Zellen getestet. Dazu gehörten Antikörper für folgende Oberflächenmoleküle: CD11a/CD18, CD13, CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD49e, CD73, CD79a, CD90, CD105, CD117, CD133, CD140a, CD140b, CD146, HLA-DR, MHCI, MHCII, Sca-1, mit denen teilweise Versuche mit mehreren Klonen verschiedener Hersteller durchgeführt wurden.

Aus den mit equinen Zellen kreuzreagierenden Antikörpern wurden die AK gegen CD11a/CD18, CD44, CD90, CD105, MHCI und MHCII (vgl. Tab. 17 im Anhang) als Marker-Panel zur immunphenotypischen Charakterisierung von MSC

zusammengestellt. Die Marker CD11a/CD18 und MHCII, die für MSC als Negativmarker verwendet wurden, wurden so ausgewählt, dass sie eine Abgrenzung von HSC ermöglichen. Durch den Test der Negativmarker auf equinen MNC (die sowohl MSC als auch HSC beinhalten) wurde ihre Spezies-Reaktivität mit equinen Zellen kontrolliert: Durchflusszytometrisch konnten positive Reaktionen der Marker für CD11a/CD18 und MHCII auf einem Anteil der MNC nachgewiesen werden.

4.2.4 Test von neu hergestellten Antikörpern

Für eine Reihe von CD-Molekülen, die üblicherweise für die Charakterisierung von Stammzellen genutzt werden (Dominici et al., 2006), konnten keine auf dem Markt verfügbaren AK mit Funktionalität auf Pferdezellen gefunden werden (siehe Kapitel 5.2). Daher wurden in Zusammenarbeit mit der Firma mfd Diagnostics GmbH in Wendelsheim, Deutschland, neue AK entwickelt. Diese Antikörper wurden auf mithilfe von Plasmiden transfizierten MSR-Zellen (293 MSR cell line, Catalog no. R795-07; Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) (Protokoll der Transfektion siehe Tab. 23 im Anhang), sowie auf equinen KM-MSK durchflusszytometrisch auf ihre Funktionalität getestet. Ziel war es, ein funktionsfähiges Panel von Antikörpern von einem Hersteller zur durchflusszytometrischen Immunophenotypisierung equiner Stromazellen zu entwickeln. Zum neu hergestellten Antikörperspektrum gehören AK für die Oberflächenmoleküle CD34, CD73, CD90 und CD105.

4.2.5 Durchflusszytometrische Analyse zur Immunophenotypisierung

Wie bereits beschrieben wurden in Vorversuchen kommerziell erhältliche potenzielle Positiv- und Negativmarker auf ihre Reaktivität mit eMSC hin untersucht. Aus dem durch die ISCT empfohlenen Panel zur Identifizierung humaner MSC konnten zwei Positivmarker (CD90, CD105) und ein Negativmarker (MHCII) mit Reaktivität auf eMSC gefunden werden. Zusätzlich wurden die Anwesenheit von CD44 und MHCI (weitere Positivmarker) sowie CD11a/CD18 (weiterer Negativmarker) untersucht.

Auf einer 96-Well-Platte wurden Zellsuspensionen mit mindestens 1×10^5 und höchstens 2×10^5 Zellen pro Probe verteilt. Die Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt. Alle verwendeten AK und die entsprechenden Konzentrationen sind Tab. 17 (im Anhang) zu entnehmen. Als Negativkontrollen wurden Zellen ohne AK-Markierung, Zellen nur mit S-AK und Isotypkontrollen (IK) gemessen. Als erster

Schritt wurden unspezifische Antikörperbindungen blockiert. Dazu wurden die Pferdezellen für 10 min bei Raumtemperatur in 10 % Pferdeserum (10 % donor horse serum + 90 % DPBS; Tab. 3) inkubiert. Ein weiteres Blockieren unspezifischer Bindungen folgte durch zweimaliges Waschen der Zellen (Resuspendieren der Zellpellets mit anschließendem Abzentrifugieren für 3 min bei 400 g und 4 °C und folgendem Ausschlagen des Überstandes) im Waschpuffer (WP), bestehend aus 98.5 % PBS, 1 % BSA (vgl. Tab. 3), 0.01 % NaN₃ (vgl. Tab. 3) und 0.5 % Serum aus der Herkunftsspezies des Sekundärantikörpers, hier Ziegenserum (vgl. Tab. 3). Als nächster Schritt wurde je nach Probe in den Wells der 96-Well-Platte der entsprechende Primärantikörper (P-AK) (vgl. Tab. 4) in entsprechender Verdünnung (vgl. Tab. 17 im Anhang), bzw. für die Negativkontrollen PBS, in die jeweiligen Wells pipettiert. Alle Antikörper aus Tab. 4, die nicht in Tabelle 17 aufgeführt sind, wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen von 1 : 25 bis 1 : 700 getestet. Es folgte eine Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur mit anschließendem erneut zweimaligem Waschen der Zellen im WP. Danach wurde im Dunkeln weitergearbeitet und dem Belegungsplan entsprechend der Sekundärantikörper (S-AK), bzw. PBS in die jeweiligen Wells pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimalig gewaschen und in reinem PBS zur Analyse im Durchflusszytometer resuspendiert und mit dem Accuri C6 Durchflusszytometer gemessen.

4.2.6 Auswahl der Gates zur Fluoreszenzanalyse

Vor der Messung wurden mithilfe des Viabilitätsmarkers 7-AAD (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland), dem Protokoll des Herstellers folgend, in einer Probe die toten Zellen markiert, sodass sie im Durchflusszytometer erkannt werden konnten. Bei der durchflusszytometrischen Messung wurde die Zellwolke der toten Zellen gemeinsam mit dem Zelldebris durch entsprechende Positionierung der Gates aus den auszuwertenden Analyse-Gates ausgeschlossen.

4.2.7 Modifizierter Proliferations-Versuch

Ähnlich wie man es vom Bakterienwachstum in Kulturen kennt, folgt auch das Wachstum von MSC-Kulturen keiner rein exponentiellen Kurve, sondern besitzt eine lag- (Anlauf-), log- (exponentielle) und stationäre Phase des Wachstums. Die mathematische Funktion, die dieser Wachstumskurve am nächsten kommt, ist die

logistische Regression. Um den verschiedenen Phasen des Zellwachstums gerecht zu werden, wurde ein Proliferationsversuch entwickelt, der mithilfe logistischer Regressionen ausgewertet werden kann. Es werden somit die verschiedenen Wachstumsphasen der Zellen berücksichtigt.

Der Versuch basiert auf Markierungseigenschaften des Proliferations-Markers eFluor 670 (Tab. 5). Dieser bindet zunächst an alle zellulären Proteine, welche primäre Amine enthalten. Nachfolgend wird er bei der Mitose gleichmäßig an die Tochterzellen verteilt (vgl. Abb. 1). Dies kann durch sukzessive Halbierungen der Fluoreszenzintensität gemessen werden. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur intrazellulären Menge des Markers eFluor 670.

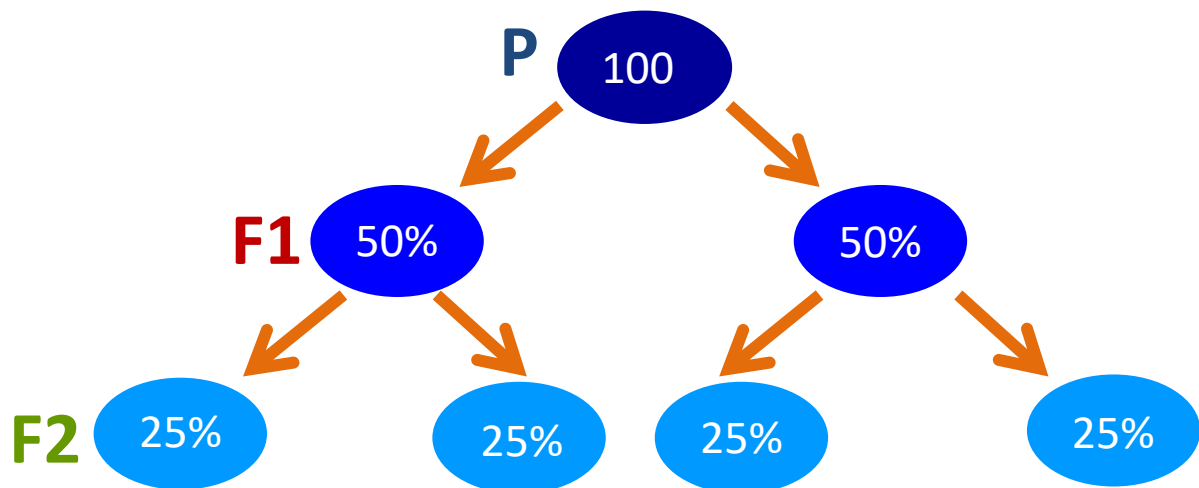


Abb. 1: Graphische Darstellung der Weitergabe des Markers eFluor670 über die Generationen: Parental (P), erste Filialgeneration (F1), zweite Filialgeneration (F2).

Um in der durchflusszytometrischen Analyse auswertbare Zellwolken zu erhalten wurde das Färbeprotokoll des Herstellers (für in Suspension wachsende Zellen) in folgenden Punkten an die speziellen Bedürfnisse adhärenter eMSC angepasst:

- Synchronisation des Zellzyklus
- Verdünnung des Proliferationsfarbstoffs 1:2000 anstatt 1:500
- Zellzahl 1.000 Zellen / cm² anstatt 4.000 Zellen / cm²

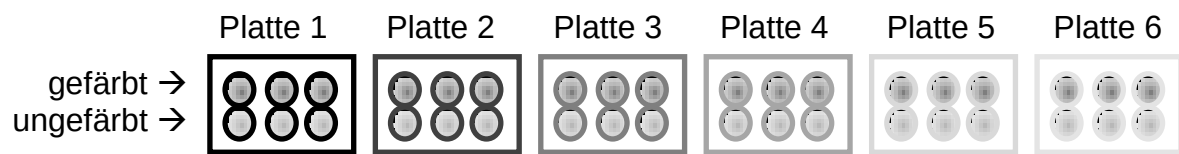
Die Zellen nehmen in den verschiedenen Phasen jedes Zellzyklus (bestehend aus G1, G0, S-Phase, G2-Phase und Mitose) eine unterschiedliche Menge des Markers

auf. Um eine gleichmäßige Färbung der Startpopulation zu erhalten, mussten daher die Zellzyklen synchronisiert werden. Durch Kühlen der Zellen kann man diese in die Ruhephase (G0) versetzen. Dazu wurden $3,5 \times 10^6$ KM-MSC in PM (vgl. Tab. 6) gelöst und bei 8 °C auf einem Minishaker (vgl. Tab. 12) bei 200 U / min verwahrt. Nach 12 Stunden wurde die Zellsuspension zweifach mit vorgewärmtem (37 °C) PBS (vgl. DPBS, Tab. 3) gewaschen und anschließend in 1,0 ml PBS resuspendiert. Die gewonnenen Zellsuspensionen wurden in zwei Portionen zu je 0,5 ml aufgeteilt. Eine Portion wurde sorgfältig in 0,5 ml eFluor670 (vgl. Tab. 5) (Verdünnung 1:2000) resuspendiert. Die andere Portion (Negativkontrolle) wurde in 0,5 ml reinem PBS resuspendiert. Beide Portionen wurden bei 37 °C für 10 min in Dunkelheit inkubiert. Dann wurde die Färbung durch Zugabe von 2,5 ml kaltem PM gestoppt und die Proben für 5 min in Dunkelheit auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in PM gewaschen und nachfolgend durchflusszytometrisch gezählt. Nach der Zählung wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^3 Zellen pro cm^2 auf 6-Well-Platten ausgesät.

Innerhalb der folgenden zehn Tage wurden die Zellen nach folgendem Schema zu sechs Zeitpunkten (einschließlich lag-, log- und stationärer Phase) sorgfältig abgelöst und durchflusszytometrisch analysiert. Die Messzeitpunkte waren über den Zeitraum von 10 Tagen verteilt. Alle Messungen lagen jeweils mindestens 24 Stunden auseinander (vgl. Schema 1).

Tag A: Färben und Ausplattieren

Zellen von Pferd x



Tag B: Ablösen und Messen der Platte 1

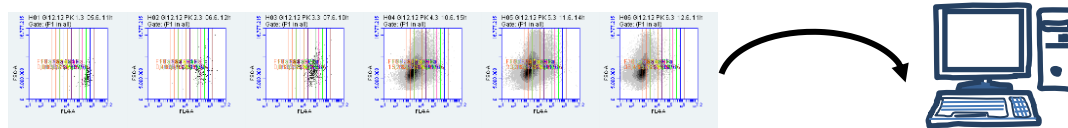


Tag C: Ablösen und Messen der Platte 2



Tage D, E, F, G: Ablösen und Messen der Platten 3, 4, 5 und 6

Tag H: Daten-Analyse der Daten von den 6 Messzeitpunkten



Schema 1: Schematische Darstellung des modifizierten Proliferations-Versuchs. Das dargestellte Protokoll wurde mit den Zellen jedes Pferdes einzeln durchgeführt. Es wurden von den Zellkulturen jedes Pferdes Proliferations-Daten von sechs Messzeitpunkten innerhalb von Zehn Tagen erhoben. Diese Daten zeigten, wie viele Zellen jeweils in der wievielten Generation zum Messzeitpunkt in der Kultur vorhanden waren.

Bei den Zellen jedes Pferdes wurden folglich zu jedem der sechs Messzeitpunkte sechs Messungen, insgesamt also 36 Messungen durchgeführt. Die einzelnen Messungen wurden aus den sechs Wells jeder Platte und somit im Dreifachansatz der gefärbten Probe mit Dreifachansatz der Negativkontrolle durchgeführt. Für die Wachstumskurven der gefärbten und der ungefärbten Zellen standen somit Daten aus jeweils $6 \times 3 = 18$ Messungen zur Verfügung.

4.2.8 Differenzierungen

Um den Kriterien der ISCT für MSCs (Dominici et al., 2006) gerecht zu werden, wurden exemplarisch an den Zellen des jüngsten und des ältesten Pferdes (Nr. 1, 2, 9a, 9b; Tab. 1) beider Gruppen (euthanasierter und narkotisierter Pferde) Differenzierungsprotokolle in Anlehnung an (Mensing et al., 2011) und (Arnhold et al., 2007) zur osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung durchgeführt.

4.2.8.1 osteogene/ chondrogene Differenzierung

Für die Differenzierungen wurden jeweils 3×10^5 Zellen in ein 15 ml Probengefäß mit vorgelegten 0,5 ml Differenzierungsmedium für osteogene (vgl. Tab. 7) oder chondrogene (vgl. Tab. 8) Differenzierung überführt und eine Minute mit 100 g zentrifugiert. Die daraus entstandenen Pellets wurden unter Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO₂) kultiviert. Negativkontrollen wurden in Proliferationsmedium anstatt Differenzierungsmedium kultiviert. Die Medien wurden alle 2 - 3 Tage gewechselt. Am Tag 14 wurden die Pellets entnommen, in 10-prozentigem Formalin fixiert und mithilfe eines Mikrotoms (vgl. Tab. 12) Paraffinschnitte angefertigt. Die osteogene Differenzierung wurde mittels Von-Kossa-Färbung (vgl. Tab. 20) durch den Nachweis von Mineralisierungen in den Zellen überprüft. Die chondrogene Differenzierung der Zellen wurde mittels Azianblau-Färbung (vgl. Tab. 21) durch den Nachweis saurer Polysaccharide überprüft.

4.2.8.2 Adipogene Differenzierung

Für die Differenzierung wurden auf 24-Well-Platten mit 0,5 ml Proliferationsmedium in jedem Well jeweils Zellen in einer Dichte von 2×10^4 Zellen pro cm² ausgesät. Das Medium wurde alle 2 - 3 Tage gewechselt, bis die Zellen eine Konfluenz von 70 % aufwiesen. Danach wurde das Proliferationsmedium gegen Medium zur adipogenen Differenzierung (adM) (vgl. Tab. 9) ausgetauscht. Es wurde weiterhin alle 2 - 3 Tage das Medium erneuert. Mindestens ein Well wurde als Negativkontrolle weiterhin mit Proliferationsmedium anstatt Differenzierungsmedium supplementiert. Am Tag 14 nach Supplementierung mit dem Differenzierungsmedium wurde das Vorhandensein von Fett-Einschlüssen in den Zellen durch eine Oil-Red-O-Färbung (vgl. Tab. 22) nachgewiesen.

4.3 Auswertung

4.3.1 Isolation und Anzucht

Die Isolation und Anzucht wurden als erfolgreich bewertet, wenn bei Befolgung des Protokolls zur Isolation von MSC aus KM eine Kultur mit plastikadhärenten, proliferativen, passagierfähigen Zellen mit fibroblastenähnlicher Morphologie hergestellt werden konnte.

4.3.2 Zusammenstellung eines Marker-Panels zur Immunphenotypisierung equiner MSC

Nach den Vorversuchen wurden alle getesteten Antikörper aus Tabelle 4 aufgrund Ihrer positiven oder negativen Ergebnisse der Reaktionsfähigkeit auf equinen MSC, bzw. MNC, in folgende Gruppen eingeteilt:

- nicht auf equinen Zellen reaktive AK
- auf equinen Zellen reaktive und auf MSC negative AK (Negativmarker)
- auf equinen Zellen reaktive und auf MSC positive AK (Positivmarker)

Alle als Negativ- oder Positivmarker kategorisierten AK wurden für die Folgeversuche zusammen als MSC-Marker-Panel zur immunphenotypischen Charakterisierung der Zellen genutzt.

4.3.3 Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mithilfe des Accuri C6[®] Durchflusszytometers durchgeführt. Es wurden jeweils mindestens 1×10^5 Zellen ausgewertet. Die Messungen wurden mithilfe der BD Accuri C6 Software[®] analysiert. Zuerst wurde im „density plot“ (= Darstellung der gemessenen Zellen als Wolken in messwert-dichte-abhängigen Grauabstufungen) ein „Gate“ (= Auswahlbereich aus einer Messung) um die Zellwolke gelegt und aller Debris (= Zellfragmente, Staubpartikel, etc.) ausgeschlossen. Die gatedeten Zellen wurden auf ihre Fluoreszenzintensität hin analysiert und die maximale Fluoreszenzintensität der IK als Grenze der Autofluoreszenz der Zellen markiert. Diese Grenze wurde zur Bewertung der Fluoreszenzintensität bei den markierten Zellen herangezogen. Alle Zellen, die im jeweiligen Fluoreszenzkanal FL2 (PE-Messung) oder FL4 (APC-Messung), eine höhere Fluoreszenz als die gesetzten Grenzwerte aufwiesen, wurden als positiv

bewertet. Bei jeder im Fluoreszenzkanal des verwendeten Markers positiven Zelle wurde die Bindung des Markers an die Zelle als erfolgreich bewertet und entsprechend gefolgert, dass die Zelle das Oberflächenmolekül, das markiert werden sollte, exprimierte.

4.3.4 Proliferationsversuch

Die gewonnenen Daten wurden mithilfe logistischer Regressionen mit dem Software Programm BMDP6D (BMDP/Dynamic, Release 8.1 (Dixon, 1993)) analysiert. Dabei wurden die Folgenden Parameter determiniert und zum Vergleich zwischen den verschiedenen Zell-Donoren herangezogen (vgl. Abb. 2):

- G, Grenzwert, beschreibt die maximale Zellzahl, die von 9,6 cm² Kulturschale zu gewinnen sind.
- G1, die Zeit bis die Zellzahl den halben Grenzwert erreicht hat.
- G2, die maximale Proliferationsgeschwindigkeit (Zellzahl / h).
- G3, die Zeit bis eine Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ erreicht ist.
- G4, die Zellzahl nach 150 Stunden Kultivierung.

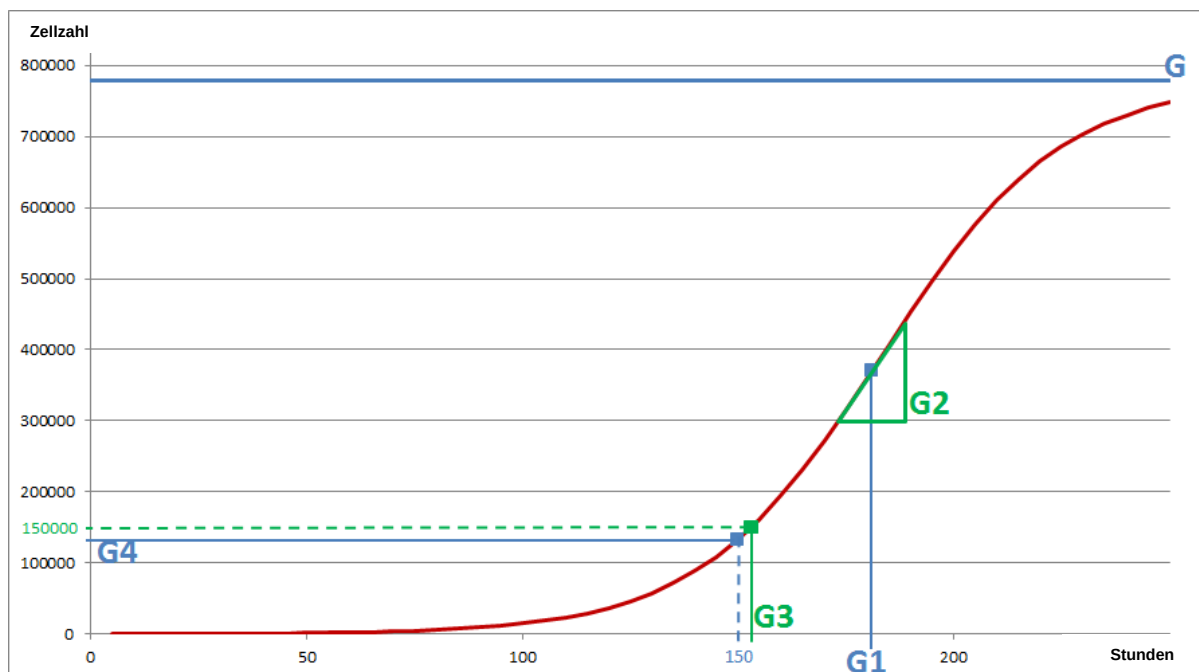


Abb. 2: Beispielhafte logistische Regression zur Darstellung des Grenzwertes (G), der Zeit zum Erreichen des halben Grenzwertes (G1), der maximalen Proliferationsgeschwindigkeit (G2), der Zeit bis eine Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ erreicht wird (G3) und der Zellzahl nach 150 h Kultivierung.

Um neben den Wachstumskurven auch Informationen zu erhalten, wie viele Zellen aus einer Population sich schnell oder langsam teilen, wurden die Messwerte der Messungen am Tag drei nach der ersten Messung genutzt: Hiermit wurde die Anzahl der Zellteilungen der Probandenzellen ermittelt, indem die Abnahme der Fluoreszenzintensität in Relation zur initialen Fluoreszenzintensität (erste Messung) gemessen wurde (vgl. Abb. 3).

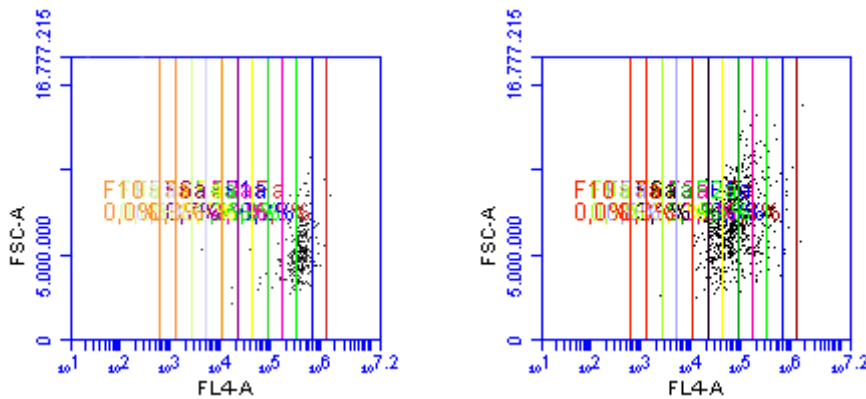


Abb. 3: Beispiel von zwei Messungen an Tag 1 (links) und Tag 3 (rechts). Senkrechte Linien begrenzen die Fluoreszenzbereiche gleicher Generationen von Zellen. An Tag 1 sind > 60 % der Zellen in derselben Generation (parentale Generation). An Tag 3 gibt es eine Streuung der deutlich vermehrten Anzahl von Zellen über verschiedene Generationen (P, F1, F2,...).

Diese Information wurde genutzt, um die Anzahl von Zellen, die innerhalb einer Population zu verschiedenen Zellgenerationen gehörten, zu ermitteln. Da die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs eFluor670 nach Herstellerangaben bis zur sechsten Generation stabil bleibt und danach abnimmt, wurden die Messungen bis zur sechsten Generation limitiert.

4.3.5 Differenzierungen

Zur Auswertung der Differenzierungs-Versuche wurden die fixierten und gefärbten Präparate (vgl. Tabellen 18 - 22 im Anhang) auf den Objektträgern lichtmikroskopisch mit einem Leica-Lichtmikroskop (vgl. Tab. 12) in 10-facher Vergrößerung analysiert.

Ein Bestandteil der osteogen differenzierten Zellen ist Kalzium. Die Von-Kossa-Färbung beruht auf einer Reduktion von Kalzifizierungen und Ersetzen dieser durch Silber-Ablagerungen, die sich im Präparat schwarz darstellen. Schwarze Verfärbungen wurden folglich als Nachweis der osteogenen Differenzierung bewertet.

Die Grundsubstanz von Knorpel, und damit von chondrogen differenzierten Zellen, ist ein saures sulfatreiches Proteoglykan. Die Alzianblau-Färbung färbt dieses blau. Die Zellkerne wurden zur besseren Identifizierung der einzelnen Zellen mit Kernechtrot gegengefärbt. Blaue Verfärbungen wurden folglich als Nachweis der chondrogenen Differenzierung bewertet.

Adipogen differenzierte Zellen beinhalten Fetttröpfchen aus Triglyzeriden. Durch die Oil-Red-O-Färbung werden Triglyzeride im Präparat rot dargestellt und können damit eindeutig lichtmikroskopisch identifiziert werden. Rote, tropfenförmige Verfärbungen innerhalb der Zellen wurden folglich als Nachweis der adipogenen Differenzierung bewertet.

4.4 Statistik

4.4.1 Durchflusszytometrische Marker-Analyse

Die Werte aus der durchflusszytometrischen Analyse der MSC aus den 10 Pferden wurden zum einen mithilfe der Accuri C6 Analysis Software als Histogramme mit der Fluoreszenzintensität auf der x-Achse und der Zellzahl auf der y-Achse dargestellt. Zum anderen wurden die Werte mithilfe des Programmes Microsoft Excel statistisch erfasst und in Box-Plots umgesetzt, sodass minimale und maximale Anteile der für die einzelnen Marker positiven Zellen, das 25er und das 75er Perzentil, sowie der Medianwert und der arithmetische Mittelwert dargestellt werden konnten. Statistiken von eut- und nar-MSC wurden nebeneinander gestellt.

4.4.2 Modifizierter Proliferationsversuch

Die errechneten Werte (G bis G4, vgl. Abb. 2) wurden mithilfe des Software Programms BMDP6D (BMDP/Dynamic, Release 8.1 (Dixon, 1993)) in einem gepaarten T-Tests (eut- und nar-MSC von Pferden ähnlichen Alters wurden dabei gepaart), einer Kovarianzanalyse und Korrelationsdiagrammen statistisch ausgewertet, um Unterschiede der beiden Gruppen von MSC von euthanasierten und narkotisierten Pferden herauszufinden und den potenziellen Einfluss des Alters des Zelldonors zu analysieren. Es wurde ein p-Level unter 0,05 als statistische Signifikanz angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Isolation und Anzucht von MSC aus KM

Es konnte von allen Pferden erfolgreich KM gewonnen werden. Die Isolation von Zellen und die Herstellung einer Kultur mit plastikadhärenten, proliferativen Zellen waren in allen Fällen erfolgreich. Alle Kulturen wuchsen innerhalb von 7 – 22 Tagen zu Populationen mit mindestens 2×10^5 Zellen heran. Die Zellen zeigten alle eine fibroblastenähnliche Morphologie.

5.2 Marker-Panel für die Immunphenotypisierung equiner MSC

Folgende Marker zeigten in den Vorversuchen keine Reaktivität auf equinen Zellen und konnten daher in folgenden Versuchen nicht zur Charakterisierung equiner MSC eingesetzt werden (Tab. 15):

Antikörper (Klon; Referenznummer des Herstellers)	Spezies-Reaktivität gemäß Herstellerangaben	Hersteller
CD13 (WM15; 560998)	Mensch	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD14 (M5E2; 555397)	Mensch, Affe, Hund	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD14 (HCD14; 325607)	Mensch	Biolegend Inc., San Diego, USA
CD29 (MAR4; 557332)	Affe	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD34 (AC136; 130-081-002)	Mensch	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD34 (ICO115;sc-7324)	Maus, Ratte, Mensch	Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA
CD45 (2D1; 345808)	Mensch	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD45 (30-F11; 103107)	Maus	Biolegend Inc., San Diego, USA
CD49e (MFR5; 103810)	Maus	Biolegend Inc., San Diego, USA
CD73 (TY/23; 561545)	Maus	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD79a (HM47; 555934)	Mensch, Maus	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD79a (F11-172; 133105)	Maus	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD105 (MJ7/18; 120413)	Maus	Biolegend Inc., San Diego, USA
CD105 (P3D1)	Mensch	University of Iowa, USA
CD105 (SN6h; C1105C01)	Mensch	DCS Diagnostic systems, Hamburg, Deutschland

CD117 (104D2; 332785)	Mensch	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD133 (13A4; 17-1331)	Hund, Maus	eBioscience Inc, San Diego, USA
CD140b (28D4; 558820)	Mensch	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD146 (P1H12; 561013)	Mensch	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
HLA-DR (G46-6; 560944)	Mensch, Affe, Hund	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Sca-1 (D7; 108111)	Maus	Biolegend Inc., San Diego, USA

Tab. 15: *Getestete Antikörper, die keine Reaktivität auf equinen Zellen zeigten.*

Diese AK haben in den Vorversuchen gezeigt, dass sie nicht zur immunophenotypischen Charakterisierung equiner MSC geeignet sind.

Eine prozentual auswertbare, positive Bindungsreaktion auf equinen Zellen zeigten die folgenden Marker (vgl. Tab. 16):

Antikörper (Klon, Referenznummer des Herstellers)	Spezies-Reaktivität gemäß Herstellerangaben	Hersteller
CD11a/CD18 (CVS9; MCA1081GA)	Pferd	AbD Serotec, Bio-Rad Laboratories Inc, Puchheim, Deutschland
CD44 (IM7; 553131)	Maus	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD90 (5E10; 555593)	Mensch, Affe, Schwein, Hund	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD105 (SN6; MCA1557T)	Mensch	AbD Serotec, Bio-Rad Laboratories Inc, Puchheim, Deutschland
CD140a (APA5; 135907)	Maus	Biolegend Inc., San Diego, USA
MHCI (CVS22; MCA1086GA)	Pferd	AbD Serotec, Bio-Rad Laboratories Inc, Puchheim, Deutschland
MHCII (CVS20; MCA1085GA)	Pferd, Mensch, Rind, Hund	AbD Serotec, Bio-Rad Laboratories Inc, Puchheim, Deutschland

Tab. 16: Getestete Antikörper, die eine Reaktivität auf equinen Zellen zeigten.

Die für die Charakterisierung als Stammzellen bedeutsamen Marker für CD11a/CD18, CD44, CD90, CD105, MHCI und MHCII konnten in den folgenden Versuchen als Marker-Panel aus Positiv- und Negativ-Markern zur Immunophenotypisierung equiner MSC eingesetzt werden. Die Ergebnisse der Bindungsreaktionen auf MSC im Vergleich zur IK sind in Abb. 4 in Histogrammen dargestellt.

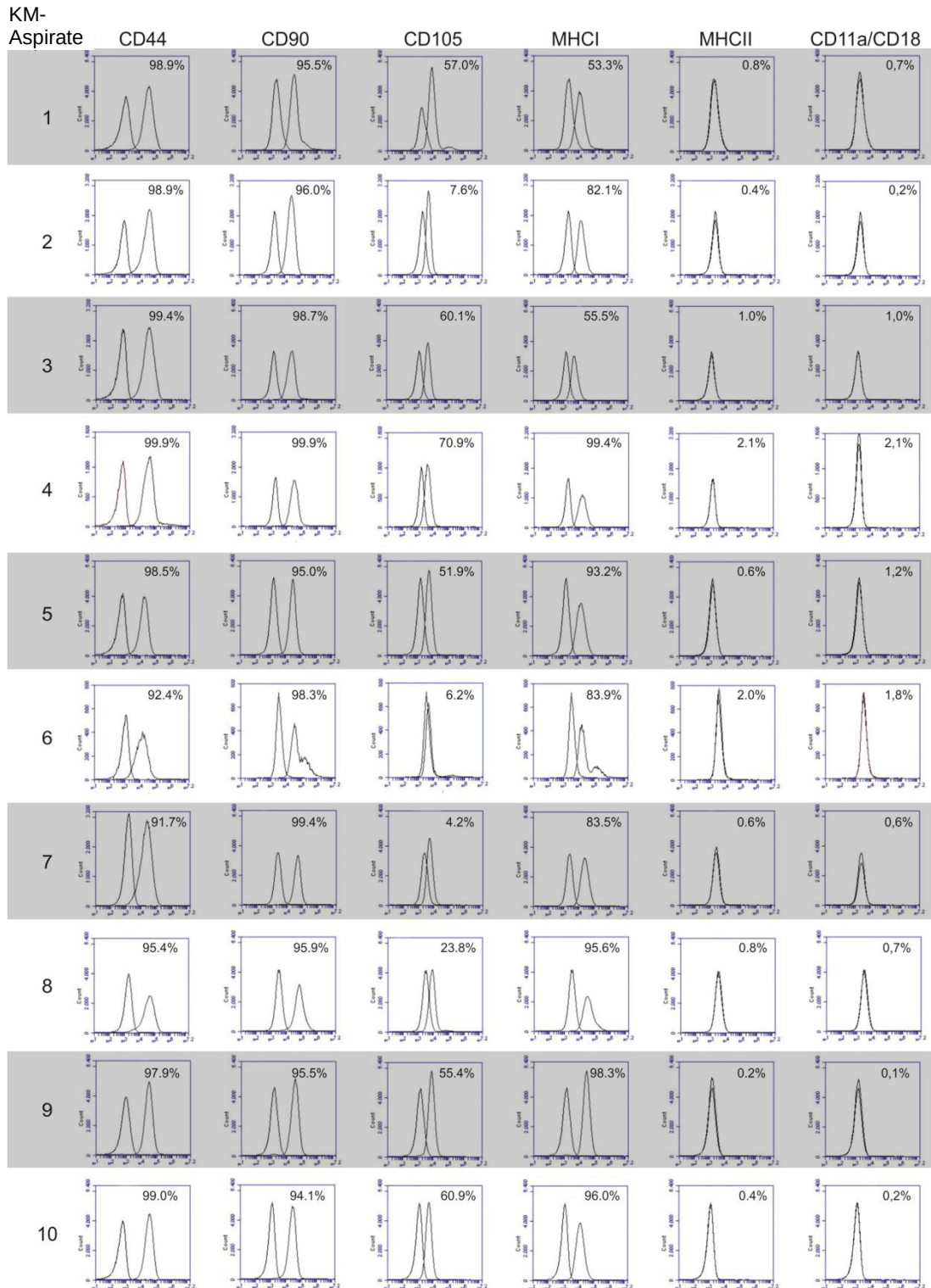


Abb. 4: Durchflusszytometrische Analyse. Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität auf der x-Achse und die Zellzahl auf der y-Achse. Nar-MSC und eut-MSC zeigen eine hohe Expression von CD44 und CD90. Die CD105 und MHC I Expressionen variieren stark. CD11a/CD18 und MHCII wurden nur von wenigen Zellen exprimiert. Die linken Spitzen repräsentieren die Isotyp-Kontrollfärbungen, die rechten die Antikörper- Färbungen mit der zugehörigen Prozentzahl an positiven Zellen (Die Prozentzahl gibt den Durchschnitt der Doppelmessungen an).

Die positive Bindung des Markers von CD140a zeigt das Vorhandensein des PDGF-Rezeptors auf ca. 60 % der getesteten Zellen (Daten nicht dargestellt).

5.3 Test der neu hergestellten Antikörper

Der von mfd diagnostics GmbH hergestellte CD90 Antikörper zeigte im direkten Vergleichs-Versuch eine ähnliche Bindungsaffinität an das CD-Molekül von equinen Zellen wie der kommerziell erhältliche CD90 Antikörper von BD Bioscience (vgl. Tab. 4). Dies bestätigte er sowohl im Versuch mit den transfizierten MSR-Zellen (vgl. Kapitel 4.2.4) (CD90 von mfd diagnostics 30,0 – 30,4 % positiv; CD90 von BD Bioscience 32,0 – 35,4 % positiv), als auch auf KM-MSC vom Pferd (CD90 von mfd diagnostics 82 – 83,2 % positiv; CD90 von BD Bioscience 89,0 – 89,6 % positiv).

Der von mfd diagnostics GmbH hergestellte CD105 Antikörper zeigte im direkten Vergleichs-Versuch eine höhere Bindungsaffinität an das CD-Molekül von equinen Zellen als der kommerziell erhältliche CD Antikörper von Abd Serotec (vgl. Tab. 4). Dies bestätigte der Antikörper sowohl im Versuch mit den transfizierten MSR-Zellen (CD105 von mfd diagnostics 46,4 – 48,9 % positiv; CD 105 von ABD Serotec 28,0 – 31,9 % positiv), als auch auf KM-MSC vom Pferd (CD105 von mfd diagnostics 58,2 – 58,7 % positiv; CD105 von ABD Serotec 1,2 – 1,3 % positiv).

Der von mfd diagnostics GmbH hergestellte CD73 Antikörper konnte aus Mangel an kommerziell verfügbaren Antikörpern nicht vergleichend untersucht werden. Im Versuch mit den transfizierten MSR-Zellen zeigte der eigentliche Positivmarker keine Reaktion. Im Versuch auf KM-MSC zeigte der Antikörper eine Bindungsaffinität von 94,8 - 97 %.

Der von mfd diagnostics GmbH hergestellte CD34 Antikörper konnte ebenfalls aus Mangel an kommerziell verfügbaren Antikörpern nicht vergleichend untersucht werden. Im Versuch mit den transfizierten MSR-Zellen zeigte er eine Bindungsaffinität von 24,9 – 25,5 %. Im Versuch auf KM-MSC zeigte der Negativmarker positive Reaktionen auf 4,0 – 6,0 % der untersuchten Zellen.

5.4 Immunophenotypische Charakterisierung von nar-MSK und eut-MSK

Alle MSK von narkotisierten Pferden (nar-MSK) und von euthanasierten (eut-MSK) Pferden präsentierten einen hohen Prozentsatz ($> 90\%$) von CD44 und CD90 positiven Zellen (vgl. Abb. 4 und 5). Der Prozentsatz von anderen allgemeinen Positivmarkern für MSK (MHCI, CD105) variierte stark zwischen den MSK-Populationen aus verschiedenen Pferden. MHCI wurde auf $91,4\% \pm 7,1$ der eut-MSK und auf $76,7\% \pm 19,1$ der nar-MSK exprimiert. CD105 wurde auf $33,9\% \pm 27,2$ der eut-MSK und auf $45,7\% \pm 20,9$ der nar-MSK exprimiert.

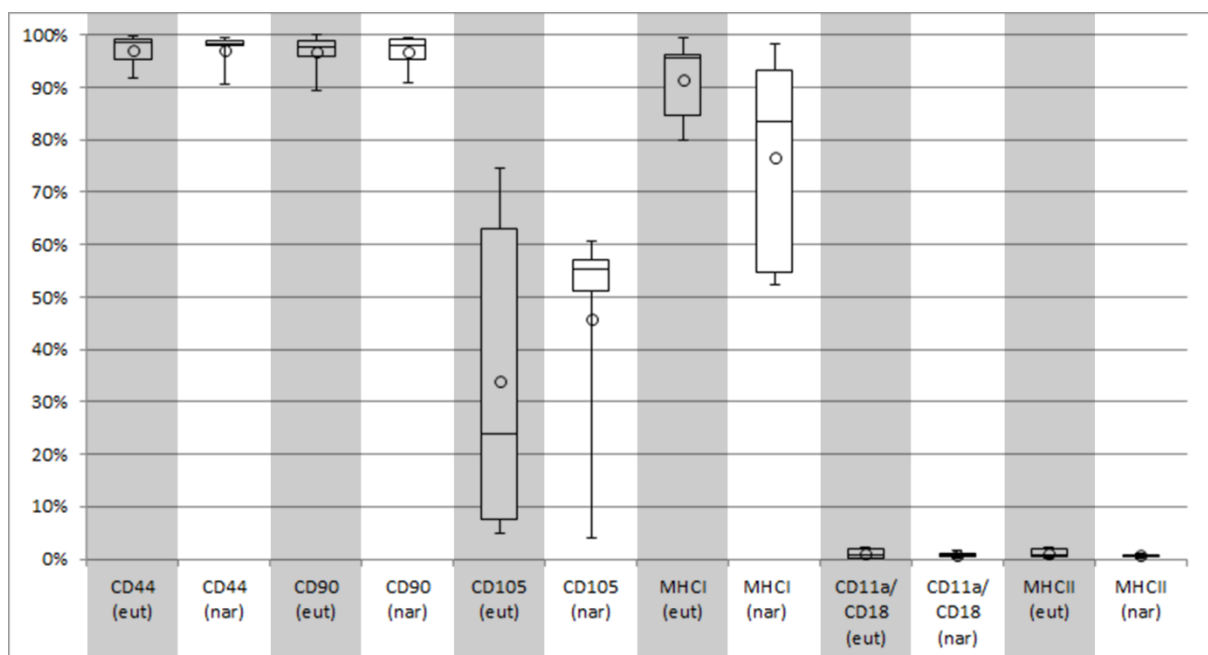


Abb. 5: Box Plots zeigen die prozentuale Verteilung der Anteile von KM-MSK von euthanasierten und narkotisierten Pferden, welche die jeweiligen Marker exprimieren. Die Boxen zeigen oben das 75er Perzentil, unten das 25er Perzentil, der Teilungsstrich dazwischen zeigt den Medianwert. Die Whisker repräsentieren Minimum und Maximum, die Kreise zeigen den arithmetischen Mittelwert an.

Keiner der detektierten Unterschiede zwischen eut- und nar-MSK war statistisch signifikant ($p > 0,05$). Die Expression der MSK Negativ-Marker CD11a/CD18 und MHCII war konstant niedrig mit $< 2,2\%$ bei allen nar- und eut-MSK.

Eine Kovarianzanalyse zeigte eine signifikante Korrelation ($p = 0,016$) zwischen dem Alter des Spenderpferdes und der Expression von MHCI. Die Prozentzahl der MHCI exprimierenden Zellen stieg mit jedem Jahr durchschnittlich um $1,5\%$ (vgl. Abb. 6).

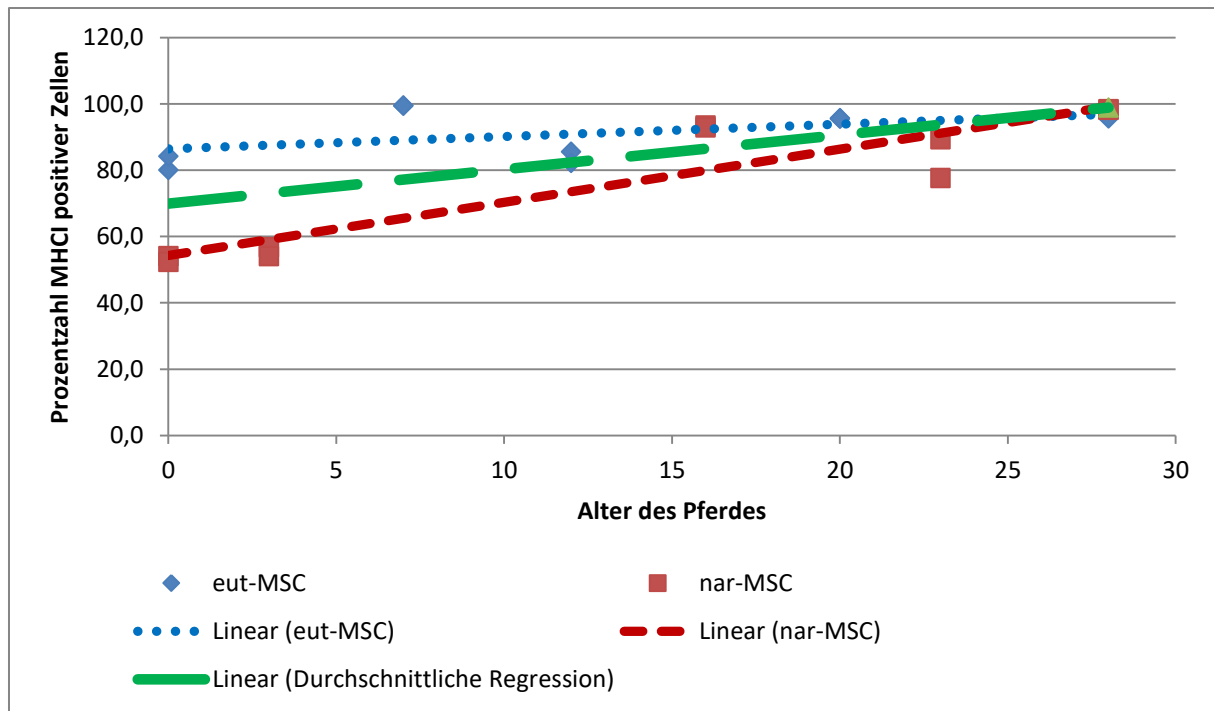


Abb. 6: Graphische Darstellung der Prozentzahl MHCII positiver Zellen der MSC in Abhängigkeit vom Alter des Spender-Pferdes. Die Rauten stellen die Daten der eut-MSC, die Quadrate die der nar-MSC dar. Die Unterschiede zwischen eut- und nar-MSC waren nicht signifikant. Die Prozentzahl MHCII positiver Zellen korrelierte signifikant mit dem Alter des Pferdes ($p = 0,016$). Im Durchschnitt beider Gruppen stieg die Prozentzahl MHCII positiver MSC mit jedem Jahr um 1,5 %.

Mit den weiteren Kovarianzanalysen konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Alter des Pferdes und der Prozentzahl positiver Zellen für die Marker (MHCII, CD11a/CD18, CD44, CD90, CD105) festgestellt werden.

5.5 Proliferationseigenschaften von nar-MSC und eut-MSC

Entsprechend den errechneten Zellgenerationen wurden die Zellen in vier Proliferationstypen unterteilt: Langsam proliferierende Zellen (1 und 2 weitere Generationen), moderat proliferierende Zellen (3 – 5 weitere Generationen), schnell proliferierende Zellen (> 5 weitere Generationen) und gar nicht proliferierende Zellen (0 weitere Generationen) (vgl. Abb. 7).

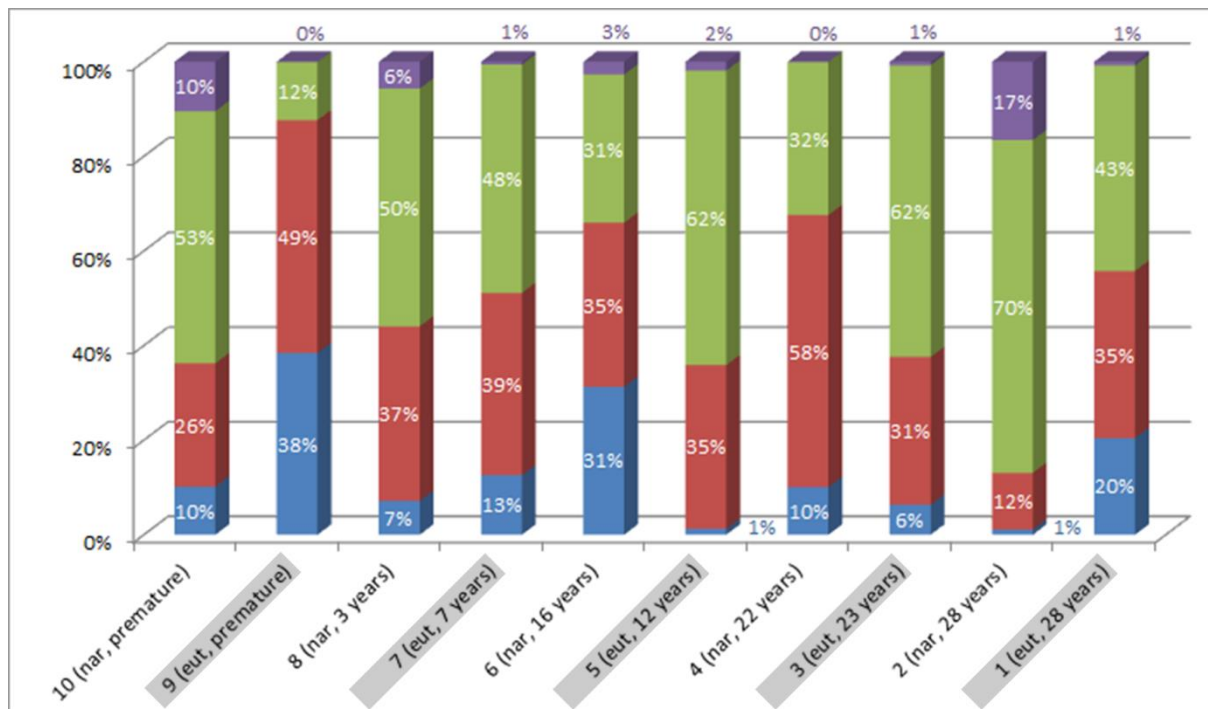


Abb. 7: Prozentzahl der schnell (violett), moderat (grün), langsam (rot) und gar nicht (blau) proliferierenden Zellen in wachsenden Kulturen von KM-Aspiraten Nr. 1 - 10. Darstellung der arithmetischen Mittel von Triplets.

Von 30 Zellkulturen (15 nar-MSCs, 15 eut-MSCs), enthielten 23 (12 nar-MSCs, 11 eut-MSCs) einen heterogenen Mix von allen Proliferationstypen. Bei 10 nar-MSCs und 11 eut-MSCs konnte die Mehrheit der Zellen dem moderaten Proliferations-Typ zugeordnet werden. Bei 5 nar-MSCs und 4 eut-MSCs war die Mehrheit der Zellen vom langsam proliferierenden Typ.

Alle eut-MSCs beinhalteten weniger als 2,1 % schnell proliferierende Zellen und alle nar-MSCs (außer Pferd 4) beinhalteten mehr als 2,4 % schnell proliferierende Zellen.

Korrelationsdiagramme zeigten, dass die maximale Proliferationsgeschwindigkeit (vgl. Parameter G2) mit dem steigenden Alter des Spenderpferdes sank (vgl. Abb. 8):

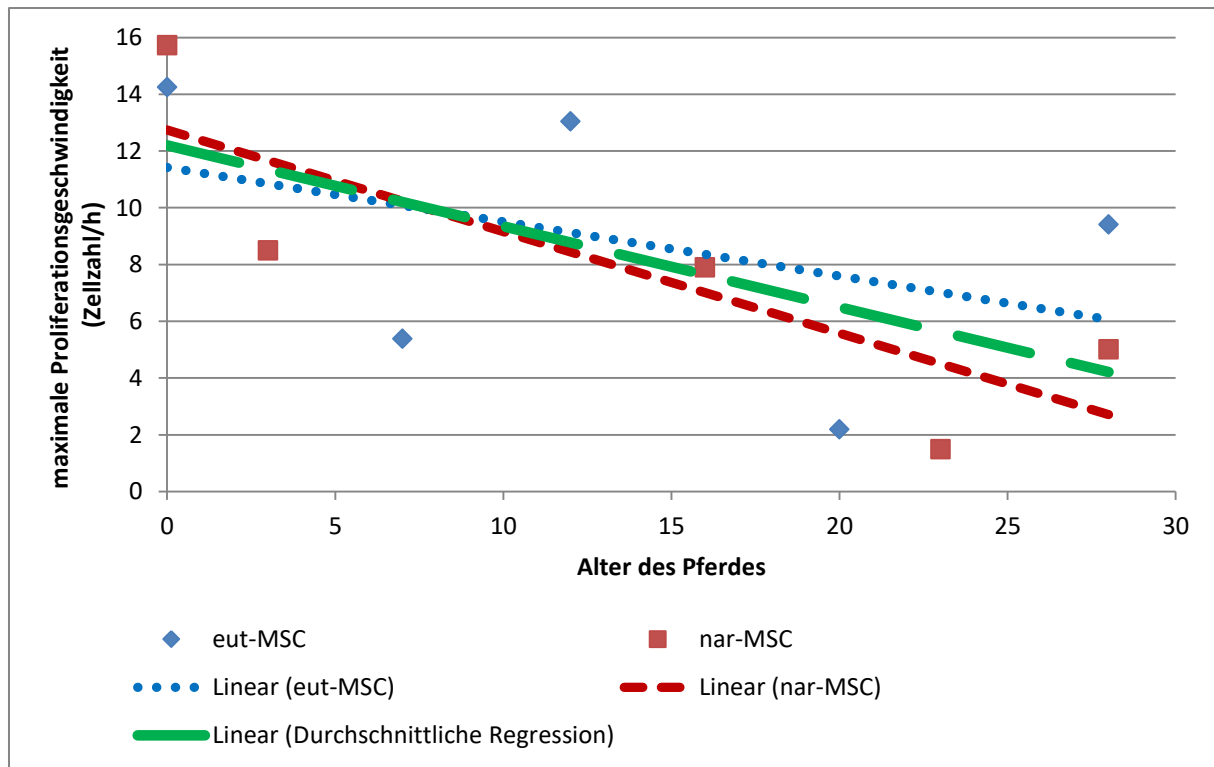


Abb. 8: Graphische Darstellung der maximalen Proliferationsgeschwindigkeit (Zellzahl/h) der MSC in Abhängigkeit vom Alter des Spender-Pferdes. Die Rauten stellen die Daten der eut-MSC, die Quadrate die der nar-MSC dar. Die Unterschiede zwischen eut- und nar-MSC waren nicht signifikant. Die maximale Proliferationsgeschwindigkeit korrelierte signifikant mit dem Alter des Pferdes ($p = 0,048$). Im Durchschnitt beider Gruppen sank die maximale Proliferationsgeschwindigkeit mit jedem Jahr um 2,3 %.

Bei keinem anderen untersuchten Parameter (G, G1, G3, G4) war eine signifikante Regelmäßigkeit der Proliferationseigenschaften in Abhängigkeit des Alters feststellbar. Stattdessen variierten die Parameter sehr individuell zwischen den verschiedenen Pferden.

Im Vergleich zwischen den zwei Gruppen (eut-MSC und nar-MSC) gab es keinen signifikanten Unterschied in der maximal erreichten Zellzahl in einer Kulturschale. Des Weiteren war die Zeit, bis die Zellzahl den halben Grenzwert erreicht hat nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen. Außerdem zeigten auch die maximale Proliferationsgeschwindigkeit, die Zeit bis eine Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ Zellen erreicht wurde, sowie Zellzahl nach 150 h Kultivierung keinen signifikanten Unterschied zwischen eut-MSC und nar-MSC. Zusammenfassend wurden bei allen untersuchten Parametern (G - G4) keine signifikanten Unterschiede zwischen nar-MSCs und eut-MSCs detektiert. Alle p-Werte waren $> 0,05$.

5.6 Differenzierungen von nar-MSC und eut-MSC

Die Fähigkeit zur osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung konnte bei allen untersuchten Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 9):

Bei den im osteogenen Differenzierungsmedium kultivierten Zellpellets konnten durch nachfolgende Von-Kossa-Färbung Kalziumablagerungen in der extrazellulären Matrix der Zellen nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle, die mit herkömmlichem PM kultiviert wurde, zeigte keine Kalziumablagerungen in der extrazellulären Matrix

Bei den im chondrogenen Differenzierungsmedium kultivierten Zellpellets konnten durch nachfolgende Alzianblau-Färbung Knorpelbestandteile in Form von Glycosaminoglykanen in der extrazellulären Matrix der Zellen nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle, die mit herkömmlichem PM kultiviert wurde, zeigte keine Glycosaminoglykane in der extrazellulären Matrix.

Bei den im adipogenen Differenzierungsmedium kultivierten Zellen konnten durch nachfolgende Oil-Red-O-Färbung Fettvakuolen innerhalb der Zellen nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle, die mit herkömmlichem PM kultiviert wurde, zeigte keine großen und deutlichen Fettvakuolen.

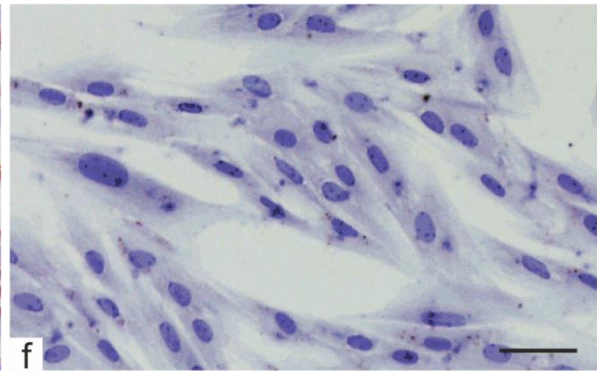
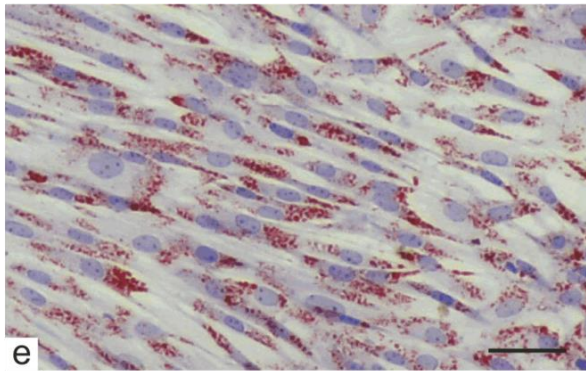
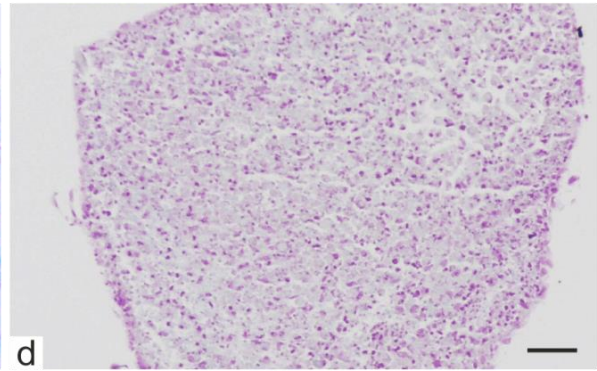
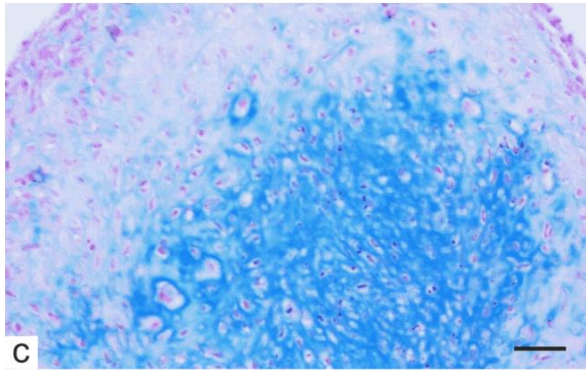
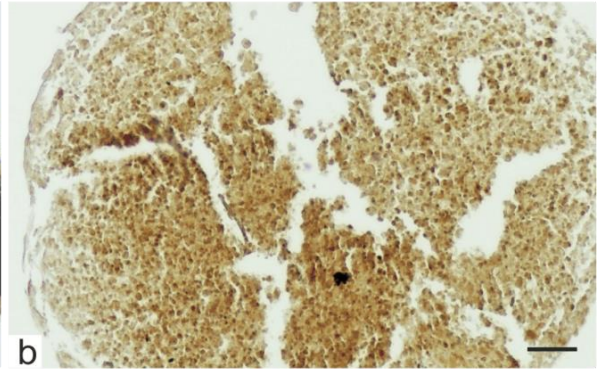
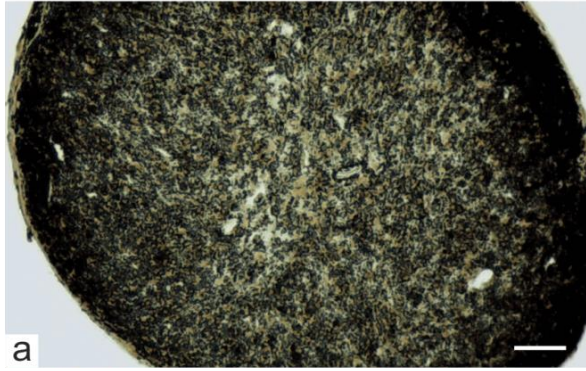


Abb. 9: Maßstab = 50 µm.

a) Equine KM-MSC nach osteogener Differenzierung in Pellet-Kultur. Histologisches Schnittpräparat, Von-Kossa-Färbung. Positive Färbereaktionen (schwarz) zeigen Mineralisierungen in der extrazellulären Matrix an und bestätigen eine osteogene Differenzierung der eKM-MSC.

b) Kontrollansatz zu a), ohne osteogenes Differenzierungsmedium. Keine positiven Färbereaktionen zeigen, dass keine Mineralisierungen in der extrazellulären Matrix stattgefunden haben. Die eKM-MSC des Kontrollansatzes haben sich somit nicht osteogen differenziert.

c) Equine KM-MSC nach chondrogener Differenzierung in Pellet-Kultur. Histologisches Schnittpräparat, Alzianblau-Färbung. Positive Färbereaktionen (blau) zeigen Glycosaminoglykane in der extrazellulären Matrix an und bestätigen chondrogene Differenzierung der eKM-MSC.

d) Kontrollansatz zu c), ohne chondrogenes Differenzierungsmedium. Keine positiven Färbereaktionen zeigen, dass kein Einbau von Glycosaminoglykanen in die extrazelluläre Matrix stattgefunden hat. Die eKM-MSC des Kontrollansatzes haben sich somit nicht chondrogen differenziert.

e) Equine KM-MSC nach adipogener Differenzierung in Kultur von ausplattierten Zellen. Histologisches Präparat, Oil-Red-O-Färbung. Positive Färbereaktionen (rot) zeigen intrazelluläre Fettvakuolen und bestätigen adipogene Differenzierung der eKM-MSC.

f) Kontrollansatz zu e), ohne adipogenes Differenzierungsmedium. Keine positiven Färbereaktionen zeigen, dass keine intrazelluläre Bildung von Fettvakuolen stattgefunden hat. Die eKM-MSC des Kontrollansatzes haben sich somit nicht adipogen differenziert.

6 Diskussion

6.1 Auswahl des Untersuchungsmaterials

Die Entscheidung, in dieser Arbeit MSC aus dem Knochenmark zu verwenden geschah im Wesentlichen aus zwei Gründen: Ein Reviewartikel von Frisbie und Smith von 2010 dokumentiert, dass KM-MSC im Vergleich zu MSC aus Fettgewebe überlegene Differenzierungspotentiale besitzen, um sich beispielsweise zu Knochen-, Sehnen-, Knorpel-, Band-, oder Muskelgewebe zu entwickeln (Frisbie und Smith, 2010). Des Weiteren ist die Aspiration von KM aus dem Sternum eine sichere Entnahmetechnik (Eydt et al., 2014), ohne sichtbare Narben zu hinterlassen. Dieser kosmetische Aspekt ist aus klinischer Sicht zwar wenig relevant, wird allerdings durchaus von Pferdebesitzern beachtet. Die KM-Entnahme wird inzwischen in vielen großen Kliniken routinemäßig am sedierten Pferd im Stehen durchgeführt und hat somit in Hinblick auf die Art der Sedierung / Analgesie keinen Nachteil mehr gegenüber der Gewinnung von Fettgewebe.

6.2 Anatomische Beschreibung und Nomenklatur des equinen Sternums

Eine Grundlage für die sichere und effektive Entnahme des Knochenmarks ist die Definition einer optimalen Punktionsstelle. Ebenso stellt eine eindeutige Nomenklatur der zu Grunde liegenden anatomischen Strukturen eine unbedingte Voraussetzung für die Erstellung optimaler Protokolle für die Knochenmarksaspiration aus dem equinen Sternum dar. In der Literatur findet man allerdings sehr unterschiedliche Angaben zur Nummerierung und Benennung der einzelnen Sternebrae (Schwarze, 1960; Loeffler, 1970; Koch und Berg, 1992; Nickel et al., 2004; Wissdorf et al., 2010; Kasashima et al., 2011). Im Computertomograph (CT) konnten in der Studie von Eydt et al. bei allen gescannten Sterna sieben ossale Körper (Sternebrae) unterschieden werden, wobei Sternebra sechs und sieben immer fusioniert waren, oder zumindest eine Fusion begonnen hatten (Eydt et al., 2014). Übernommen aus der Humanmedizin wird der am weitesten kranial gelegene ossale Körper in der pferdespezifischen Literatur bisher als Manubrium sterni bezeichnet. Allerdings ist es fraglich, ob diese Nomenklatur beim Pferd sinnvoll ist, da anders als beim Menschen, beim Pferd eine große förmliche und strukturelle Ähnlichkeit zu den folgenden

Sternebrae besteht (Eydt et al., 2014). Daher schließen sich Eydt et al. einem Vorschlag von Kasashima et al. an und vermeiden den Begriff Manubrium sterni beim Pferd, stattdessen werden die Sternebrae von kranial ausgehend fortlaufend durchnummeriert (Kasashima et al., 2011). Durch eine einheitliche Nomenklatur kann auch eine eindeutige Beschreibung der korrekten Punktion der Sternebrae bei der Knochenmarkentnahme gewährleistet werden.

Abgesehen von einer heterogenen Nomenklatur wurde auch die Anzahl der Sternebrae in der Literatur unterschiedlich angegeben (Schwarze, 1960; Loeffler, 1970; Koch und Berg, 1992; Nickel et al., 2004; Wissdorf et al., 2010). Entgegen der dortigen Beschreibung von sechs bis sieben Sternebrae konnten Eydt et al. durch die CT-Aufnahmen in ihrer Studie in allen Fällen klar sieben Sternebrae voneinander abgrenzen, wovon in vielen Fällen einzelne Sternebrae miteinander fusionierten. Dies zeigte sich regelmäßig ab einem Alter von zwei Jahren. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund geringerer Auflösungen früherer bildgebender Verfahren (Röntgen, CT) in der Vergangenheit fusionierte Sternebrae als ein Einzelnes gezählt wurden. Es kann nach der Studie von Eydt et al. (Warmblutpferde) aber nicht ausgeschlossen werden, dass individuelle, oder rassebedingte Varianten der Anatomie des equinen Sternums vorkommen (Eydt et al., 2014).

6.3 Optimierte Entnahmetechnik zur Gewinnung von Knochenmark aus dem equinen Sternum

Berichte von versehentlichen Thorakalpunktionen mit fatalen Folgen bei der Knochenmarkentnahme aus dem Sternum zeigen die Notwendigkeit der Kenntnis der genauen Anatomie und der Größenverhältnisse des Sternums, bzw. einzelner Sternebrae (Jacobs et al., 1983; Durando et al., 2006). Außerdem ist für eine sichere Knochenmarksentnahme eine optimale und risikominimierte Einstichtiefe sowie Lokalisierung und Richtung der Punktion essentiell. Eigene Vorversuche der Punktion des Tuber coxae als alternative KM-Quelle zum Sternum ergaben, dass es an dieser Stelle schwieriger ist, den optimalen Einstichwinkel und die richtige Einstichtiefe zu eruieren. Die Lateralfäche des zu punktierenden Tuber coxae ist kleiner als die Ventralfläche einer Sternebra. Durch die schlanke und geschwungene Gestalt des Os Ilium im Verlauf zum Tuber coxae ist der zu punktierende Körper schwieriger mittig zu treffen, als es bei einer nahezu kugeligen Gestalt wie bei den

Sternebrae der Fall ist. Delling et al. beschreiben zum einen, dass die Punktion des Tuber coxae einen tiefen, geraden Einstich mit der Erzeugung eines hohen Unterdrucks erfordert, um KM zu aspirieren. Zum anderen ist nach ihren Untersuchungen bei einem mittelalten Pferd (13 Jahre) die Ausbeute an MSC aus dem sternalen Aspirat signifikant größer als aus dem des Tuber coxae (Delling et al., 2012). Außerdem ist diese Stelle für die KM-Entnahme bei Turnierpferden (der Hauptklientel für Stammzelltherapien) aufgrund der entstehenden Narben im Bereich des Tuber coxae kosmetisch meist unerwünscht.

Während der vorliegenden Arbeit wurde in regem Austausch von Methoden und Ergebnissen an der Tierärztlichen Hochschule Hannover eine umfangreiche Studie von Eydt et al. (Eydt et al., 2016) durchgeführt, aus welcher viele Aspekte für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind und daher hier umfassend diskutiert werden. In den Versuchen von Eydt et al. wurde zum einen die maximal zu gewinnende Menge an MNC bei sicherer Entnahmetechnik aus dem Sternum ermittelt. Vorherige Untersuchungen, die eine maximale Einstichtiefe von 10 bis 30 mm für Sternebra 5 vorschlugen, konnten nicht bestätigt werden. Die ermittelte Größe des Sternebra 5 betrug $52 \pm 0,8$ mm im Durchmesser. Bei senkrechtem Einstich besteht somit auch bei tieferer Punktion als 30 mm noch keine Gefahr der Thorakalpunktion. Nichtsdestotrotz ist es nach den Untersuchungen von Eydt et al. (Eydt et al., 2016) nicht notwendig, tiefere Punktionen als 10 mm durchzuführen. Bei den Sternalpunktionen an Sternebra 5 mit einer Tiefe von 10 mm konnte in allen Fällen KM gewonnen werden. Außerdem konnte aus allen Aspiraten eine MSC-Kultur angelegt werden. Im Gegensatz dazu war die Ausbeute aus der Punktion der Sternebra 4 in einer Tiefe von 10 mm nur ungenügend, um MSC-Kulturen zu erhalten. Wahrscheinlich ist dieser Unterschied zwischen Sternebrae 4 und 5 auf die dickere Knorpelschicht am Ventralrand des Sternebrae 4 zurückzuführen, da diese die Beurteilung, wann der ossale Körper erreicht ist, sowohl beim Erfühlen des Penetrationswiderstandes als auch in der Ultraschallkontrolle erschwerte (Eydt et al., 2016). Schlussendlich waren aber alle Sternalpunktionen mit einer Einstichtiefe von 30 mm sowohl in Sternebra 4, als auch in Sternebra 5 sicher und erfolgreich in der Gewinnung von MSC (Eydt et al., 2016).

Zum anderen zeigten μ CT-Bilder der Sternebrae nach Punktion, wie auch schon Kasashima et. al. 2011 beschrieben haben, dass die Insertion mit der Jamshidi-

Nadel zu keinen signifikanten Zerstörungen am ossalen Trabekelwerk führt (Kasashima et al., 2011). Trotzdem ist nicht bekannt, ob es zu Veränderungen der Mikroumgebung im Sternum kommt und ob sich diese Umgebung ausreichend regeneriert (Eydt et al., 2016).

Für die optimale Lokalisation der Sternalpunktion findet man in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. Zum Beispiel werden Beschreibungen von 90 bis 100 mm kranial der Cartilago xyphoidea (Richardson et al., 1986; Kisiday et al., 2013) oder eine Handbreite kaudal des Tuber olecrani (Sellon, 2006; Goodrich et al., 2008; Delling et al., 2012; Adams et al., 2013) verfasst. Andere Autoren empfehlen die Identifikation der Sternebrae mittels Ultraschall, um die exakte Punktionsstelle zu ermitteln (Smith et al., 2003; Arnhold et al., 2007; Kasashima et al., 2011; Godwin et al., 2012). Ebenso empfehlen Eydt et al. in ihrer aktuellen Studie eine Ultraschalluntersuchung zur Bestimmung der Punktionsstelle (Eydt et al., 2016). Aufgrund ihrer kugelförmigen Gestalt sollte die exakte Punktionsstelle bei Sternebrae 4 und 5 mit Hilfe des Ultraschalls ermittelt und auf der Haut markiert werden, um eine optimale Insertion der Nadel zur Aspiration von Knochenmark zu gewährleisten. Anderenfalls steigt das Risiko von Thorakozentesen und Perikard-Punktionen und einer geringeren Ausbeute von MSC aus dem Aspirat (Eydt et al., 2016). Wir konnten durch Befolgung der Empfehlungen von Eydt et al. alle KM-Proben ohne Thorakal-, oder Perikardpunktionen gewinnen. Bei allen Aspirationsvorgängen konnte KM gewonnen werden, welches kultivierbare Zellen enthielt. Dementsprechend wurden die Befunde von Eydt et al. 2016 (Eydt et al., 2016) bestätigt.

Überraschenderweise konnten wir bis 30 Minuten nach Euthanasie noch Zellen mit der Fähigkeit, typische Stammzellmarker zu exprimieren, gewinnen. Diese Verwunderung relativiert sich bei Beachtung der Untersuchung von Ivanovic et al., in der beschrieben wird, dass Stammzellen in einer hypoxischen Umgebung problemlos zurechtkommen (Ivanovic, 2009). Ivanovic et al. stellen die Hypothese auf, dass die hypoxische Umgebung konservierend auf Stammzellen wirkt und eine frühzeitige Differenzierung verhindert (Ivanovic, 2009). Spencer et al. untersuchten im In-Vivo-Experiment den absoluten Sauerstoffpartialdruck im Knochenmark von Mäusen. Sie erhielten einen durchschnittlichen Wert von intravaskulär 20,4 mmHg. Der Wert sank extravaskulär auf durchschnittlich 13,3 mmHg. Die niedrigsten in-vivo gemessenen Werte im KM lagen bei 4,8 mmHg. Im Vergleich dazu lag der durchschnittliche

Sauerstoffpartialdruck intravaskulär im kompakten Knochen bei > 30 mmHg. Die Untersuchung stützt die These, dass trotz der hohen Vaskularisierung im KM auch in vivo eine hypoxische Umgebung vorliegt (Spencer et al., 2014). Die Zellen sind somit einer hypoxischen Umgebung angepasst, was eine hohe Überlebensrate auch 30 Minuten nach der Euthanasie erklärt.

6.4 Entnahme und Anzucht von MSC

Die Zusammenarbeit mit Eydt et al. erbrachte einige Informationen, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind und daher hier ausführlich diskutiert werden.

Die Ergebnisse der Studie von Eydt et al. zeigten, dass die Aspiration von 5 ml Knochenmark ausreichend ist, um MSC zur In-Vitro-Kultivierung zu gewinnen (Eydt et al., 2016). Ein Aspirat von 10 ml brachte keine signifikant größere Ausbeute an MSC. Damit geht die Studie konform mit Untersuchungen von Kisiday et al., die keine Vorteile von der Aspiration von 50 ml anstatt von 5 ml Knochenmark ermittelten (Kisiday et al., 2013). Des Weiteren hatte in der Studie von Eydt et al. die Auswahl von Sternebra 4 oder 5 keinen Einfluss auf die Kultivierungsfähigkeit der MSC (Eydt et al., 2016).

Die Experimente von Eydt et al. zeigten außerdem, dass alle verwendeten Nährmedien (supplementiert mit fetalem Kälberserum, autologem Serum oder standardisiertem Pferdeserum) den isolierten MSC zu einer proliferierenden Zellkultur heranzuwachsen verhalfen. In den Kulturen mit autologem Serum befanden sich immer einige morphologisch zu den undifferenzierten, spindelförmigen MSC abweichende Zellen. Dieses unerwartete Ergebnis resultierte eventuell aus der individuellen Variation in der Zusammensetzung der autologen Sera. Neben unterschiedlichen Konzentrationen von vorteilhaften oder differenzierungsfördernden Substanzen wie Wachstumsfaktoren, können in autologen Sera auch Pathogene enthalten sein (Nimura et al., 2008; Tekkatte et al., 2011). Die Hypothese, dass standardisiertes Pferdeserum den Vorteil der Speziesspezifität mit einer gesicherten Zusammensetzung von vorteilhaften Substanzen kombinieren könnte und damit dem fetalen Kälberserum überlegen wäre, konnte in der Studie von Eydt et al. (Eydt et al., 2016) nicht bestätigt werden. Nichtsdestotrotz deckten sich die Ergebnisse der Überlegenheit des Kälberserums mit denen von Franke et al. an primären equinen bronchialen Fibroblasten. In der Studie starben alle Zellen, die ohne Serumzusätze

im Medium kultiviert wurden. Zellkulturen mit FBS oder Pferdeserum als Zusatz proliferierten beide, wobei die Kulturen mit FBS eine schnellere Konfluenz und eine geringere Zellverdopplungszeit zeigten (Franke et al., 2014). Unsere Anzuchtbedingungen für die Zellen basieren auf den Erkenntnissen aus diesen Studien. So haben wir uns bei nar-MSK und eut-MSK für standardisierte und optimale Anzuchtbedingungen mit fetalem Kälberserum als Nährzusatz entschieden.

6.5 Allogene Verwendung von MSC

Die Verwendung allogener MSC zur Therapie bei Pferden brächte mehrere Vorteile: Erstens würde die lange Anzucht autologer MSC entfallen, sodass nach Diagnosestellung sofort therapiert werden könnte. Zweitens könnten dem erkrankten Pferd das Risiko und die Schmerzen der Entnahme der MSC erspart bleiben und drittens könnte eine Auswahl von erfahrungsgemäß besonders gut proliferierenden Zellen getroffen werden. Auch wenn die Risiken einer Fett- oder Knochenmarkentnahme beim Pferd inzwischen minimal sind (Kasashima et al., 2011; Eydt et al., 2014), bleibt der Umstand, dass eine Entnahme immer mit Stress und Schmerzen für das Pferd verbunden ist. Nicht zuletzt sollte auch beachtet werden, dass bei der Verwendung autologer MSC, diese von einem kranken Tier entnommen wurden, das oft bereits medikamentös vorbehandelt wurde, wodurch die Stromazellen potenziell beeinflusst sein können. Müller et al. beschreiben bei geringen Konzentrationen von verschiedenen, gängigen nichtsteroidalen Antiphlogistika im Nährmedium sogar positive Effekte auf die Proliferation von MSC in der Zellkultur. Allerdings gab es auch negative Effekte in Hinblick auf die Zellmortalität und Proliferation bei hohen Konzentrationen derselben Substanzen (Müller et al., 2011). In jüngster Zeit wurden erfolgreich MSC aus Rinderfeten nach der Schlachtung gewonnen. Diese zeigten proliferatives Verhalten, exprimierten ein Set aus typischen MSC-Markern und ließen sich in verschiedene Gewebsarten differenzieren (Cortes et al., 2013). Allerdings gibt es bisher keine Informationen zu potenziellen Unterschieden zwischen MSC entnommen aus Rinderfeten nach Schlachtung des Muttertieres und entnommen von lebenden Tieren. Wir haben gezeigt, dass MSC bis 30 Minuten nach der Euthanasie ebenso von eingeschlaferten Pferden gewonnen werden konnten. Wobei die maximale Zeitspanne, bis zu welchem Zeitraum nach der Euthanasie noch vitale Zellen gewonnen werden können, nicht Bestandteil der Studie war und noch zu ermitteln bleibt. Außerhalb

dieser Studie konnten bei einem Einzelversuch auch noch fünf Stunden nach der Euthanasie proliferative MSC, die – genau wie die in der Studie verwendeten MSC – das beschriebene Markerprofil aufwiesen, gewonnen werden. Unbeachtet blieb bisher allerdings der mögliche Einfluss der Wirkstoffe zur Euthanasie auf die MSC. Dementsprechend sollten In-Vitro-Versuche den Einfluss der Medikamente zur Euthanasie (Embutramid und Pentobarbital) auf MSC ermitteln, um die Materialquelle von euthanasierten Pferden für die Gewinnung von MSC besser bewerten zu können.

Auch wenn die Gewinnung von MSC von euthanasierten Pferden die Möglichkeit bietet, große Mengen an Zellen auf eine einfache Art und Weise zu erhalten, könnten potenzielle Unterschiede zu Zellen von lebenden Tieren die Verwendung zu Therapie Zwecken begrenzen. Daher wurden bei uns Parameter der Zellen verglichen, die als essentiell zum Einsatz für therapeutische Zwecke gelten. Besondere Aufmerksamkeit wurde hierbei den Voraussetzungen für eine allogene Applikation und den proliferativen Eigenschaften der Zellen gewidmet. Heng et al. beschreiben, dass humane embryonale Stammzellen ohne die Auslösung von Immunreaktionen allogene transplantiert werden können, da sie keine MHCII- und nur eine geringe Anzahl von MHCI-Molekülen exprimieren (Heng et al., 2009). Auch Schnabel et al. betonen, dass für eine allogene Transplantation von MSC beim Pferd nur Zellen ohne MHCII-Expression verwendet werden sollten (Schnabel et al., 2014). Eut-MS und nar-MS wurden in dieser Arbeit mithilfe von Oberflächenmarkern für MHCI und MHCII charakterisiert. Damit wird außerdem die Forderung von Iacono et al. nach einer Untersuchung equiner MSC auf ihre immunologischen Oberflächenmarker, um die Verwendung allogener MSC als Zellquelle beurteilen zu können, erfüllt (Iacono et al., 2012a). Equine MSC zeigen in dieser Hinsicht ähnliche Charakteristika wie humane embryonale Stammzellen: Der Oberflächenmarker MHCII war bei > 97,8 % der Zellen nicht präsent, MHCI wurde allerdings bei 57,6 % - 98,5 % der Zellen in verschiedenen Kulturansätzen registriert. Bei Untersuchungen von Schnabel et al. waren sogar > 95 % der KM-MS positiv für MHCI (Schnabel et al., 2014). Allerdings bleibt es umstritten, welche Rolle das Vorhandensein von MHCI auf MS spielt. Generell sind MHCI-Moleküle auf jeder kernhaltigen Zelle vorhanden. Dies lässt vermuten, dass sie mit unseren Markern nur nicht immer detektiert werden, oder die Expression intermittierend stattfindet. Im Kontrast zu unseren eigenen Untersuchungen beschreiben Schnabel et al., dass neben MHCI-, auch

MHCII-Moleküle auf vielen eMSC vorhanden sind. Der Anteil MHCII positiver Zellen schwankte in den Untersuchungen zwischen 0 und 98 %. Sie empfehlen daher, dass bei einer Transplantation die Haplotypen der MHC Moleküle auf den Zellen des Donors zu den Haplotypen der MHC-Moleküle des Rezipienten der Zellen passen sollten, um Immunreaktionen zu vermeiden (Schnabel et al., 2014).

Nichtdestotrotz sprechen bisherige Studien zur allogenen Applikation von MSC bei Pferden (Watts et al., 2011; Broeckx, 2012; Lange-Consiglio et al., 2013), sowie die Abwesenheit von MHCII-Molekülen auf MSC für die Überlegung, MSC allogen zu applizieren. Bemerkenswerterweise beschreiben Kim et al. sogar verbesserte Ergebnisse der Therapie von Hautwunden beim Hund durch die Verwendung von equinen KM-MSC (Kim et al., 2013). Diese festgestellte xenogene Verwendbarkeit von eMSC zeigt das große therapeutische Potenzial der Zellen und bestätigt erneut die Immuntoleranz von Empfängertieren gegenüber den transplantierten KM-MSC.

6.6 Oberflächenmarkerprofil equiner MSC

Das aus den Vorversuchen ermittelte Markerprofil (positive Marker: CD44, CD90, MHCI, CD105; negative Marker: CD11a/CD18, MHCII) bestätigt Studien zu eMSC aus verschiedenen Quellen (Burk et al., 2013; Spaas et al., 2013). Entgegen dem, was Spaas et al. bei vorangegangenen Studien kritisieren, wurde in der vorliegenden Arbeit auch bei allen Negativmarkern die Reaktion auf equinen Zellen überprüft (Spaas et al., 2013). Beispielsweise hatten Martinello et al. beschrieben, dass equine PB-MSC für die Marker von hämatopoetischen Stammzellen, CD34 und CD45, in der Durchflusszytometrie negativ seien (Martinello et al., 2010). Die verwendeten Antikörper waren allerdings beide zur Verwendung bei Mäusezellen konzipiert und Martinello et al. erbrachten keinen Nachweis, ob diese Antikörper überhaupt mit equinen Zellen kreuzreagieren können. Dementsprechend kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Marker aufgrund fehlender Kreuzreaktivität nicht reagierten anstatt die Abwesenheit von CD34 und CD45 auf den Zellen zu dokumentieren. Für die Detektion der Oberflächenantigene MHCI, CD11a/CD18 und MHCII sind inzwischen pferdespezifische Marker vorhanden und wurden für die Immunphenotypisierung in der vorliegenden Studie eingesetzt. Die verwendeten Marker für CD44 und CD90 sind zwar eigentlich nicht für die spezifische Detektion von Pferde-Antigenen hergestellt worden, zeigten aber schon in anderen Studien eine gute Kreuzreaktivität (Arnhold et al., 2007; Mensing et al., 2011; Burk et al.,

2013). Wie erwartet, zeigte ein hoher Prozentsatz (> 90 %) der analysierten KM-MSK Reaktionen mit den Markern CD44 und CD90.

Die Reaktionen mit dem Marker für MHCI schwankten zwar zwischen verschiedenen Pferden, lagen aber generell deutlich über 50 %. MHCI-Moleküle sind dazu da, aus dem Peptidgemisch, das beim intrazellulären Proteinabbau entsteht, ausgewählte Peptide an die Zelloberfläche zu transportieren. Der Mechanismus zur Auswahl der Peptide ist noch nicht ausreichend geklärt. An der Zelloberfläche werden diese Peptide in die MHCI-Moleküle integriert. Die MHC-Moleküle präsentieren 10^4 verschiedene Peptide. MHCI-Moleküle spielen eine wichtige Rolle bei Abwehrreaktionen, da das Immunsystem nur gegen diese 10^4 zelleigenen Peptide tolerant ist. Es gibt mehr als 100 MHCI-Moleküle auf jeder Zelle. Aus den 10^4 Peptiden wird auf jedem MHCI-Molekül eine unterschiedliche Kopienzahl der einzelnen Peptide integriert, wodurch eine große Variabilität zwischen den MHCI-Molekülen entsteht (Fallert-Müller, 1999). Die hohe Variabilität der MHCI-Moleküle kann auch die Bindungsaffinität zum Antikörper beeinflussen und damit die variable Detektion von MHCI auf eMSC erklären.

Wie durch bisherige Immunphenotypisierungen von eMSC zu erwarten war (Burk et al., 2013), gab es auch in unseren Untersuchungen keine Reaktion mit MHCII und CD11a/18. CD105 diente leider nicht als zuverlässiger Marker, da er sehr variabel auf den MSC exprimiert wurde, obwohl der Hersteller dem anti-humanen Marker eine Kreuzreaktivität zu Pferde-Antigenen bescheinigt. Wie auch schon Spaas et al. für MSC aus equinem peripherem Blut berichteten, eignet sich CD105 aufgrund seiner variablen Expression nicht als zuverlässiger Marker für equine MSC (Spaas et al., 2013). Da bisher nur von einem Hersteller ein pferdespezifischer Marker für CD105 kommerziell verfügbar ist, kann nicht sicher gesagt werden, ob die variable Detektion am verwendeten Antikörper liegt, oder am Molekül selbst.

Mit dem beschriebenen Marker-Panel konnten keine signifikanten immunphenotypischen Unterschiede zwischen MSC aus euthanasierten und aus narkotisierten Pferden ermittelt werden.

Beim Test des neu entwickelten Negativmarkers für CD34 von mfd Diagnostics zeigten ca. 5 % der Zellen positive Reaktionen auf diesen eigentlichen Negativmarker. Dies ist allerdings nicht überraschend, wenn man beachtet, dass auch andere Studien schon im PCR-Nachweis geringe Expressionen von CD34 auf MSC gefunden haben (Lange-Consiglio et al., 2012). Ginge man davon aus, dass

equine MSC und humane MSC dieselben CD-Moleküle exprimieren, so stellte der Marker trotzdem eine gute Möglichkeit zur Differenzierung beider Zelltypen dar, da humane HSC im Gegensatz zu den humanen MSC zu fast 100 % positiv für CD34 sind. Allerdings sind noch keine Untersuchungen zum Oberflächenmarker-Profil equiner HSC bekannt. Untersuchungen von HSC von Mäusen zeigen, dass diese negativ für CD34 sind. Es werden folglich dringend weitere Studien zur immunophenotypischen Charakterisierung equiner HSC benötigt, um hier sichere Aussagen tätigen zu können.

6.7 Immunologisch relevante Oberflächenmarker

Um MSC allogene verwenden zu können ist die Abwesenheit des Oberflächenmarkers MHCII obligatorisch (Heng et al., 2009; Rafei et al., 2009). Allerdings fanden Schnabel et al. 2014 zwischen 0,2 und 98,4 % positive MHCII-Expressionen auf equinen KM-MSC. Bei Verwendung des exakt gleichen Antikörpers wurden in unseren Experimenten allerdings keine MHCII Moleküle auf den von uns untersuchten eMSC nachgewiesen. Wahrscheinlich sind diese unterschiedlichen Ergebnisse dadurch bedingt, dass die Expression von Oberflächenantigenen von vielen Faktoren abhängig ist: Genetische Unterschiede, Qualität des KM-Aspirats, immunologische Faktoren wie die Variabilität integrierter Peptide in den MHC-Molekülen und die Kultivierungsbedingungen (Schnabel et al., 2014). Gleichzeitig können auch verschiedene Protokolle zur Durchflusszytometrie, oder verschiedene Antikörperchargen unterschiedliche Ergebnisse bedingen. Nichts desto trotz bleibt die genaue Rolle des MHCII innerhalb immunologischer Abwehrreaktionen noch unklar.

MHCI ist ein weiterer immunologisch wichtiger Marker. Eine Hochregulation von MHCI auf Mäuse-MSC führt Rafei et al. zufolge zu einem Verlust ihrer immunsuppressiven Eigenschaften (Rafei et al., 2009). Unsere Untersuchungen zeigten eine signifikant höhere Expression von MHCI mit steigendem Alter der Pferde, sodass eine Minimierung des Abstoßungsrisikos gegenüber allogenen MSC bei Verwendung der Zellen von jüngeren Pferden erwartet werden kann.

Abgesehen von der Expression von MHC-Molekülen ist zu diskutieren, ob beim Pferd – wie es auch bei Mäusen vermutet wird (Krampera, 2002) – andere zelluläre Mechanismen die Verträglichkeit von allogenen MSC beim Empfänger erhöhen. Krampera et al. schlussfolgern aus ihren Untersuchungen, dass MSC physikalisch T-

Zellen am Kontakt zu Antigen-Präsentierenden-Zellen hindern (Krampera, 2002). Die generell vorhandenen immunsuppressiven Eigenschaften allogener MSC wurden jüngst auch in Maus-Modellen bewiesen (Roemeling-van Rhijn et al., 2013; Li et al., 2014). Dies sind Erklärungsansätze für die bisher ohne Abstoßungsreaktionen erfolgreich durchgeführten allogenen Transplantationen von equinen MSC (Broeckx, 2012; Lange-Consiglio et al., 2013).

6.8 Risiken von MSC

Einige Wissenschaftler, wie beispielsweise Alison et al. machen zurecht auf ein Risiko aufmerksam, das von der Transplantation von Stammzellen im Allgemeinen ausgehen kann. Da die Zellen die Eigenschaft haben, stark proliferieren zu können, liegt der Verdacht nahe, dass Sie ein gewisses Tumorpotenzial besitzen. Alison et al. haben 16 Veröffentlichungen zusammengetragen, die sich mit der Rolle von gewebsspezifischen Stammzellen bei der Entstehung von Krankheiten, insbesondere von Tumorerkrankungen beschäftigen (Alison, 2009). Da die Stammzelltherapie eine noch junge Therapiemethode ist, bleiben Langzeitergebnisse noch abzuwarten. Haben diese in der Humanmedizin einen besonderen Stellenwert, so ist für die Tiermedizin festzuhalten, dass aufgrund der für gewöhnlich deutlich kürzeren Lebenserwartung unserer Haustiere das kanzerogene Potenzial von MSC wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielt. Des Weiteren handeln die Studien beispielsweise von Leber-, Nieren- oder Lungen-Zell-Transplantationen und keine hat sich mit der Transplantation mesenchymaler Stromazellen zur Therapie von orthopädischen Erkrankungen beschäftigt, worin das Haupteinsatzgebiet von Stammzelltherapien in der Tiermedizin liegt. Nichts desto trotz sollten Langzeitstudien über ein durchschnittliches Lebensalter der jeweiligen Tierart verfolgt werden, um Aufschluss über diese mögliche fatale Nebenwirkung zu geben.

6.9 Proliferationsfähigkeit von MSC in-vitro

Die Proliferationsfähigkeit in-vitro ist eine essentielle Eigenschaft für die Beurteilung von MSC (Dominici et al., 2006). Darüber hinaus vermutet man, dass die Proliferationskapazität in-vitro positiv mit der Regenerationsfähigkeit von MSC korreliert ist (Gilbert und Blau, 2011). Die am meisten verbreitete Methode zum Vergleich der Proliferationsfähigkeit von Zellen ist die Berechnung der Verdopplungszeit („doubling time“). Zur Berechnung geht man davon aus, dass eine

bestimmte Startpopulation in einem bestimmten Zeitraum exponentiellen Wachstums die danach ausgezählte Anzahl von Zellen erreicht hat (Vidal et al., 2007; Iacono et al., 2012a; Cortes et al., 2013). Beobachtungen zeigen allerdings, dass das Zellwachstum einer s-förmigen Wachstumskurve folgt, welche nur eine kurze exponentielle Phase aufweist. Die reine Zellverdopplungszeit beschreibt daher nur sehr vage das Wachstumsverhalten der Zellen. Eine bessere Beschreibung der Wachstumskurve erhält man mittels logistischer Regression, die auch häufig zur Beschreibung des Wachstums von Bakterienkulturen verwendet wird (Salter et al., 2000). Über die beiden Messzeitpunkte für die Berechnung der Verdopplungszeit hinaus haben wir die Daten von vier weiteren Messzeitpunkten berücksichtigt. Betrachtet man nur den üblichen Zellverdopplungszeit-Versuch, so bekommt man beispielsweise auch keine Informationen darüber, ob wenige Zellen sich besonders schnell teilen, während der Großteil der Population ruht, oder ob alle Zellen sich gleichmäßig und langsam teilen.

Um herauszufinden, inwiefern die Zellen einer Population ein unterschiedliches Proliferationsverhalten zeigen, verwendeten wir einen Proliferationsmarker, welcher für Versuche in der Durchflusszytometrie geeignet ist. Die ermittelten Daten zeigten Gruppen von sehr heterogen proliferierenden Zellen. Eine Selektion von besonders proliferationsfreudigen Zellen brächte sicherlich einen Mehrwert für die Wissenschaft und Therapie. Könnte man die Zellen beispielsweise ihrer Proliferationsfreudigkeit entsprechend durchflusszytometrisch durch „fluorescent-activated cell sorting“ sortieren und statische Zellen ausschließen, so erhielte man ein homogeneres Zellmaterial mit entsprechend großem Wachstumspotenzial. Allerdings muss für die Durchführung einer solchen Selektion noch zukünftige Forschungsarbeit geleistet werden. Dies wird erst mit verfügbaren Markern für schnell proliferierende Zellen mit einer sicheren Unterscheidung zu statischen Zellen möglich werden. Eine entsprechende Marker-Entwicklung könnte damit zu wissenschaftlichen Untersuchungen mit größerer Genauigkeit beitragen.

Die statistischen Auswertungen unserer Daten erbrachten keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf die Proliferationsrate zwischen Zellen aus narkotisierten und euthanasierten Pferden. Signifikanten Einfluss hatte hingegen das Alter des Donors: Das steigende Alter des Pferdes korrelierte negativ mit der maximalen Proliferationsgeschwindigkeit der gewonnenen Zellen. Das bedeutet: Je älter das Pferd war, dem Zellen entnommen wurden, desto langsamer proliferierten dessen

Zellen in der Kultur. Neben der Proliferationsgeschwindigkeit in-vitro könnten die MSC von jüngeren Pferden auch vorteilhaftere Regenerationspotenziale besitzen. Diese Vermutung basiert auf Studien, die das Verkürzen der Telomere und damit die Limitierung der regenerativen Fähigkeiten von humanen MSC mit steigendem Alter der Probanden feststellten (Baxter et al., 2004). Daher sollte das Alter des Pferdes bei der Selektion eines Donors berücksichtigt werden. Die eigenen Befunde sowie Daten aus der Literatur zu nicht equinen Spezies deuten an, dass therapeutisch nutzbringende Eigenschaften von MSC umso besser sind je jünger das Spendertier ist.

6.10 Ausblick

Die erarbeiteten Ergebnisse fördern neuartige Fragestellungen zu Tage und stellen eine wissenschaftliche und methodische Basis für weiterführende Studien dar. Zurückliegende Studien zeigen, dass die Applikation von „platelet rich plasma“ (PrP) zur Behandlung von Sehnendefekten als effektiv zu bewerten und bereits klinisch etabliert ist (Bosch et al., 2010; Araki et al., 2012; Brossi et al., 2015; Geburek et al., 2016a). Es ist zu erwähnen, dass Brossi et al. zu bedenken geben, dass neben den mehrheitlich festgestellten positiven Effekten von PrP einige der Studien ein hohes Risiko für eine Voreingenommenheit der Untersucher bergen (Brossi et al., 2015).

Mehrere Autoren beschreiben jüngst Versuche zur Kombination von MSC mit PrP. Broeckx et al. beschrieben einen positiven Einfluss von PrP auf Wachstum und Differenzierung von equinen MSC (Broeckx et al., 2014). Yun et al. konnten einen synergistischer Effekt von MSC aus Fettgewebe und PrP bei der Therapie von Osteoarthritis bei Hunden feststellen (Yun et al., 2016). Martinello et al. verglichen in einer Studie an Schafen, die Effekte von PB-MSC alleine und in Kombination mit PrP zur Behandlung von Beugesehnendefekten. Es wurde ein positiver Effekt der MSC auf die Heilung, allerdings kein Mehrwert durch die Kombination mit PrP festgestellt (Martinello et al., 2013). Es fehlen verlässliche, vergleichbare und standardisierte Versuche zur Beurteilung von Kombinationstherapien. Die beschriebenen Arbeiten hatten verschiedene Quellen für MSC und verschiedene Anwendungsgebiete der Therapeutika, des Weiteren wurde mit verschiedenen Spezies gearbeitet. Die multiplen Variablen zwischen den Studien können also durchaus eine Erklärung für die Unterschiede in den Ergebnissen sein.

Ein weiterer interessanter Aspekt für die möglicherweise therapeutisch erfolgreiche Kombination von MSC und PrP ist folgender: Die Präsenz von CD140a zählt nicht zu den üblichen Charakterisierungsmerkmalen von Stammzellen und wurde daher nicht mit in das Stammzellpanel integriert. Sie ist aber wissenschaftlich durchaus interessant. In den durchflusszytometrischen Versuchen konnte eine Expression des CD140a (auch bekannt als „platelet-derived growth factor receptor“), ein Rezeptor für Wachstumsfaktoren, die im PrP enthalten sind, auf den equinen KM-MSC nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt). Es liegt somit die Vermutung nahe, dass eine Beeinflussung der MSC durch PrP möglich ist.

7 Zusammenfassung

Die Punktion des Sternums stellt eine ergiebige, leicht durchführbare und die in den Kliniken am häufigsten genutzte Methode der Knochenmarksgewinnung dar. In der vorliegenden Arbeit wird neben der Anzucht von MSC aus KM von narkotisierten Pferden erstmals die erfolgreiche Isolation und Anzucht von MSC aus KM von euthanasierten Pferden beschrieben. Bis mindestens 30 Minuten nach der Euthanasie war es in allen Fällen möglich, Knochenmark mit vitalen MSC aus euthanasierten Pferden zu gewinnen. Für die Charakterisierung der MSC wurden kommerziell erhältliche Oberflächenmarker verwendet, mit denen eine Immunophenotypisierung mittels Durchflusszytometrie möglich war. Durch Vorversuche mit 28 vielversprechenden Antikörpern zur Immunophenotypisierung von Stammzellen, konnte ein Marker-Panel von vier Positiv- und zwei Negativmarkern mit Funktionalität auf eMSC zusammengestellt werden.

Des Weiteren wurde die Multipotenz der Zellen anhand von adipogener, chondrogener und osteogener Differenzierung nachgewiesen, sowie die Proliferationsfähigkeit unter Standardbedingungen gezeigt. Darüber hinaus wurde ein neuartiges Proliferationsassay etabliert, welches die Möglichkeit bietet, verschieden schnell proliferierende MSC-Populationen zu unterscheiden und damit den Weg zu einer Selektion besonders gut proliferierender Zellen bereitet.

Mit den angewandten Verfahren konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stammzeleigenschaften von MSC aus narkotisierten und aus euthanasierten Pferden ermittelt werden: Beide Gruppen ließen sich chondrogen, adipogen und osteogen differenzieren, zeigten sich plastikadherent und proliferativ und exprimierten das ausgewählte Oberflächenmarkerprofil: Sie zeigten positive Reaktionen für die Marker CD44, CD90, MHC I und CD105 und negative für CD11a/CD18 und MHC II. Aufgrund der Abwesenheit von MHC II auf den Zellen, liegt die Vermutung nahe, dass sie sich auch für eine allogene Transplantation eignen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind vielversprechend für die Etablierung der allogenen Stammzelltherapie mit MSC aus Knochenmark. Für den zukünftigen Einsatz in der Pferdemedizin bedarf es allerdings noch weiterer Studien, beispielsweise zum Einfluss der angewandten Pharmaka bei den euthanasierten Pferden auf die Qualität der MSC, und In-Vivo-Studien zur Verträglichkeit von allogenen MSC. Damit könnte der Weg bereitet werden, die allogene Stammzelltherapie zukünftig als sichere

Therapiemethoden im Bereich des Tissue Engineering in der Pferdemedizin etablieren zu können.

8 Summary

The puncture of the sternum is an effective, easy performable and the mainly used method in clinics to gain bone marrow. Beside the culturing from MSC from bone marrow of narcotized horses in this research study the successful isolation and culturing of MSC from bone marrow of euthanised horses is described for the first time. Up to 30 minutes after euthanasia it was possible in all cases to gain bone marrow containing vital MSC from euthanized horses. For the characterization of the MSC commercial available surface markers were used, which were suitable for immunophenotyping by flow cytometry. With pilot tests using 28 promising antibodies for the immunophenotypisation of stem cells, a marker panel of four positive- and two negative-markers with functionality on equine MSC could be assorted.

Furthermore the multipotency of the cells was demonstrated by adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiations and the ability for proliferation under standard conditions was shown. In addition a new proliferation assay was established, which gives the possibility to discriminate between MSC populations with different proliferation speeds and therefore pioneers a selection for especially good proliferating cells.

With the used technics no significant differences between the stem cell characteristics of MSC from narcotized or euthanized horses could be determined: Both groups showed the potential for chondrogenic, adipogenic and osteogenic differentiation, were plastic adherent and proliferative and expressed the selected surface marker profile: They showed positive reactions for the markers CD44, CD90, MHCI and CD105 and negative reactions for CD11a/CD18 and MHCII. Because of the absence of MHCII on the cells it seems likely to guess, that they are also suitable for allogeneic transplantations.

The results of this study are promising to establish the allogeneic stem cell therapy using MSC in horse therapy in future. But there is a need for further studies for example about the influence of the used drugs in the euthanized horses and the quality of the harvested MSC and in vivo studies for the compatibility of allogeneic MSC. With these researches the establishment of the allogeneic stem cell therapy as a prospectively safe practical technic of tissue engineering in horse medicine could be pioneered.

9 Anhang

9.1 Verzeichnis der Tabellen

Primäre Antikörper						Sekundäre Antikörper				
<u>Name</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Reaktivität</u>	<u>Klon</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Produkt</u>	<u>Fluoreszenz</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Reaktivität</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Produkt</u>
CD44	Rat IgG2b,k	Mouse	IM7	1:400 (1.25µg/ml)	BD 553131	APC	Goat Ig	Rat IgG	1:600 (0.33µg/ml)	BD 551019
CD90	Mouse IgG1,k	Human	5E10	1:400 (1.25µg/ml)	BD 555593	PE	Goat Ig	Mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA	1:800 (0.25µg/ml)	BD 550589
CD105	Mouse IgG1	Human	SN6	1:500 (2µg/ml)	AbD Serotec MCA 1557T					
MHCI	Mouse IgG2a	Horse	CVS2 2	1:200 (5µg/ml)	AbD Serotec MCA 1086GA					
MHCII	Mouse IgG1	Horse	CVS2 0	1:200 (5µg/ml)	AbD Serotec MCA 1085GA					
CD11a/ CD18	Mouse IgG1	Horse	CVS9	1:200 (5µg/ml)	AbD Serotec MCA 1081GA					
<u>Isotyp-kontrolle</u>	<u>korrespondierender Antikörper</u>			<u>Verdünnung</u>	<u>Produkt</u>	<u>Fluoreszenz</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Reaktivität</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Produkt</u>
Rat IgG2b,k	CD44			1:800 (1.25µg/ml)	Invitrogen 02-9288	APC	Goat Ig	Rat IgG	1:600 (0.33µg/ml)	BD 551019
Mouse IgG1	CD105, MHCII, CD11a/CD18			1:200 (5µg/ml)	Invitrogen 02-6100	PE	Goat Ig	Mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA	1:800 (0.25µg/ml)	BD 550589
Mouse IgG2a	MHCI			1:200 (5µg/ml)	Invitrogen 02-6200					

Tab. 17: Tabelle der als Marker-Panel für equine KM-MSC verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Fixierung, Einbetten und Aufblocken der Zellen im Differenzierungsversuch	
Handlungsschritt	Inkubation
Fixierung der Zellpellets in 4 % Formalin in Bidest (im 0,5 ml Reagiergefäß)	1 h
Formalin abnehmen und Ethanol (70 %) aufgeben	30 min
Ethanol (70 %) wechseln	30 min
Ethanol (70 %) abnehmen und Ethanol (90 %) aufgeben	1 h
Ethanol abnehmen und Xylol aufgeben	30 min
Xylol wechseln	30 min
Xylol abnehmen und flüssiges Paraffin auf die Zellen geben	Über Nacht bei 60 °C im Brutschrank
Umstellen in einen -20 °C Gefrierschrank	15 min
Pellet mit Paraffin mithilfe einer Skalpellklinge aus der Reagiergefäß-Spitze ausschneiden und im Bleiförmchen schmelzen (Arbeit am Einbettssystem)	Bis das Paraffin geschmolzen ist
Einbettkassette auf das Bleiförmchen legen und mit Paraffin auffüllen	
Blöckchen abkühlen lassen	Bis Paraffin ausgehärtet ist
Blöckchen aus Bleiförmchen herausnehmen	
Blöckchen im Mikrotom einspannen	
Anfertigung von Schnitten in einer Dicke von 5 - 7 µm.	
Auflegen der Schnitte auf Objektträger	Über Nacht bei 20 – 30 °C trocknen lassen

Tab. 18: Protokoll zur Fixierung, Einbettung, Aufblocken und Anfertigung histologischer Schnitte der Differenzierungs-Zell-Pellets (nach chondrogener oder osteogener Differenzierung der MSC). Die erstellten histologischen Schnitte können nachfolgend entparaffinisiert und entsprechend der Differenzierung mit der Von-Kossa-Färbung oder Alzianblau-Färbung gefärbt werden.

Entparaffinisierung der Schnitte	
Handlungsschritt	Inkubation
Xylol	3 x 5 min
Ethanol 100%	3 min
Ethanol 96%	3 min
Ethanol 80%	3 min
Ethanol 70%	3 min
Ethanol 50%	3 min
Aqua dest	3 min

Tab. 19: Protokoll zur Entparaffinisierung der histologischen Schnitte. Alle histologischen Schnitte wurden zuerst entparaffiniert und nachfolgend entweder nach Von-Kossa oder mittels Alzianblau dem Differenzierungsversuch entsprechend gefärbt.

Von-Kossa-Färbung	
Frisch filtriertes Silbernitrat (5%) auf die Zellen geben	30 min bei Tageslicht
Farmers Reducer ansetzen	Lösung 1: 2g Natrium-Thiosulfat-Pentahydrat in 20 ml Bidest lösen. Lösung 2: 5 ml Formaldehydlösung (35 %) zu 15 ml Bidest geben und mischen. Für Farmers Reducer 20 ml von Lösung 1 und 1 ml von Lösung 2 mischen.
Silbernitrat absaugen (Spezial-Entsorgung)	
Waschen mit Bidest	3 x 3 min
Frisch filtrierte Natrium-Carbonat-Formaldehydlösung (5 %) auf die Zellen geben	5 min
Waschen mit Bidest	3 x 3 min
Frisch angesetzten Farmers Reducer auf die Zellen geben	30 sec
Waschen mit Bidest	3 x 3 min
Frisch filtriertes Kernechtrot auf die Zellen geben	3 - 5 min
Waschen mit Bidest	3 x 3 min
Eindeckeln mit Kaisergelatine und Deckgläsern	

Tab. 20: Protokoll der Von-Kossa-Färbung zum Nachweis osteogener Differenzierung. Als Ergebnis erhält man rot gefärbte Zellkerne, gelb-rotes Zytoplasma und dunkelbraune bis schwarze Kalziumeinlagerungen.

Alzianblau-Färbung	
Alzianblau-Lösung (0,5 g Alzianblau, 1 ml Eisessig, 100 ml Aqua dest) frisch filtrieren und aufgeben (Arbeit im Dunkeln)	30 min
Waschen mit Aqua dest	
Gegenfärbung mit Kernechtrot (frisch filtriert)	5 min
Ethanol 70%	10 sec
Ethanol 80%	10 sec
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 100%	3 x 2 min
Xylol	3 x 5 min
Eindeckeln mit Pertex und Deckgläsern	

Tab. 21: Protokoll der Alzianblau-Färbung zum Nachweis chondrogener Differenzierungen. Als Ergebnis erhält man rot gefärbte Zellkerne und cyanblaue Knorpelgrundsubstanz (saures Proteoglykan).

Oil-Red-O-Färbung	
Waschen der Zellen mit PBS	2 x 5 min
Fixierung der Zellen in 4% Formalin in Bidest	10 min bei Raumtemperatur
Waschen der Zellen mit Aqua dest.	3 x 5 min
Aufgeben von frisch filtrierter Oil-Red-O-Lösung	15 min im Dunkeln
Waschen der Zellen mit Aqua dest.	3 x 5 min
Vorsichtiges Herausnehmen der Glasplättchen mit den Zellen aus der 24-Well-Platte und Platzierung der Plättchen mit der Zellseite nach unten in Tropfen von Kaisergelatine auf Objektträgern	

Tab. 22: Protokoll der Oil-Red-O-Färbung zum Nachweis adipogener Differenzierungen. Als Ergebnis erhält man blau-violette Zellkerne, blass blau-violettes Zytoplasma und rot gefärbte Triglycerid-Vakuolen in den Zellen.

Transiente Transfektion	
4,5 Mio. Zellen in 25 cm ² Zellkulturflasche aussähen und 5 ml PM (ohne Penicillin-Streptomycin) darauf geben	für 24 h anwachsen lassen
Lösung 1: 10 µl Plasmid + 600 µl Optimem in ein Gefäß pipettieren und durch Pipettieren vermengen	
Lösung 2: 25 µl Lipofectamin + 600 µl Optimem in ein Gefäß pipettieren und durch Pipettieren vermengen	5 min stehen lassen
Lösung 3: Lösungen 1 + 2 in ein Gefäß pipettieren und durch Pipettieren vermengen	30 min stehen lassen
Lösung 3 zu den 5 ml PM auf die Zellen geben und Zellkulturflasche mehrfach schwenken	12 h im Brutschrank bei Standardbedingungen inkubieren
Medium in Zellkulturflasche zu PM (inklusive Penicillin-Streptomycin) wechseln	
Induktion mit 5 mM Natriumbutyrat	Dem Medium auf den Zellen zugeben und 5 h inkubieren
Mediumswechsel durchführen	
Anschließend Verwendung der Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse	

Tab. 23: *Protokoll der transienten Transfektion von MSR-Zellen mit Plasmiden zum nachfolgenden Test neu entwickelter Antikörper in der Durchflusszytometrie auf den transfizierten Zellen.*

9.2 Publikationen und Vorträge

- Anatomia, Histologia, Embryologia Journal Of Veterinary Medicine (akzeptiert: Februar 2014)
Three-Dimensional Anatomy of the Equine Sternum
C. Eydt, C. Schröck, F. Geburek, K. Rohn, C. Staszky, C. Pfarrer
DOI: 10.1111/ahe.12114
- Cytometry Part A (akzeptiert: Mai 2014)
Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: An approach towards a standardized definition
F. Päbst, D. Piehler, W. Brehm, S. Heller, C. Schröck, A. Tárnok, J. Burk
DOI: 10.1002/cyto.22491
- Veterinary Medicine and Science (akzeptiert: Mai 2016)
Sternal bone marrow derived equine multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): Investigations considering the sampling site and the use of different culture media
C. Eydt, F. Geburek, C. Schröck, N. Hambruch, K. Rohn, C. Pfarrer, C. Staszky
DOI: 10.1002/vms3.36

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden auf folgendem Fachkongress präsentiert:

- 7. YGVA (Young Generation of Veterinary Anatomists) Kongress, Leipzig, 17. – 20. Juli 2013
Establishment of a proliferation assay for equine mesenchymal stromal cells (MSC) by use of flow cytometry
C. Schröck, L. Kaiser, A. Pöschke and C. Staszky

10 Danksagung

Ich danke zuerst Carsten für die tolle Betreuung und Unterstützung während meiner ganzen Doktorandenzeit. Ich bekam einen guten Ansporn und hatte gleichzeitig viele Freiheiten in meiner Zeiteinteilung, was mir auch den Einstieg in die Praxis möglich machte. Du hast Dir für alle meine Probleme fachlicher und nicht fachlicher Art Zeit genommen und Verständnis gezeigt. Ich kann sagen, dass ich wenige Menschen kenne, die mir in meinem bisherigen Leben in wissenschaftlichem Ehrgeiz, Qualität eigener Lehre und Herz- und Menschlichkeit ein solches Vorbild waren.

Lena danke ich für ihre Hilfe bei allen Arbeiten im Labor und, ebenso wie meinen Mitdoktorandinnen und -doktoranden und allen Kolleginnen und Kollegen aus der AG Staszyk, für die schöne Zeit, die wir miteinander hatten.

Kerstin Fey, Katja Roscher und Kim danke ich für die Hilfe zur Probenaquirierung.

Carina gilt mein Dank für die wunderbare Zusammenarbeit und Aufrechterhaltung unserer Freundschaft auch über >300 km hinweg.

Der Aif danke ich für die finanzielle Unterstützung über die erste Zeit, auch wenn das Projekt mit mfd leider nicht zum erwünschten Abschluss kam.

Auch möchte ich nicht vergessen, Souel für die Vermittlung an Carsten vor inzwischen sage und schreibe 5 Jahren zu danken. Du schicktest mich ja eigentlich zu Carsten, weil ich mich so für Pferdezähne interessierte. Es kam zwar dann etwas anders, aber trotz eines abweichenden Promotionsthemas habe ich auch im Pferdezahnbereich einiges gelernt und das Interesse vertieft.

Zum Abschluss richte ich meinen größten und ganz besonderen Dank an meinen Markus: Du gibst mir zu jeder Zeit das Gefühl, geliebt zu werden, gibst mir Rückhalt und Ansporn, bringst viel Verständnis für meine Arbeit auf und eiferst mit mir einem gemeinsamen Traum für unsere Zukunft entgegen, für den sich jede Anstrengung lohnt. Es ist einfach großartig, dass ich Dich habe! Gleichwertig dazu möchte ich meiner Familie „Danke“ sagen: Danke Mama, Papa, Felicia und Rebecca für die psychologische Unterstützung. Danke, dass Ihr Euch auch nicht gescheut habt, nach Gießen, oder Günsteroode zu kommen, wenn ich Eure Hilfe brauchte. Danke, dass ihr den größten Anteil daran vollbracht habt, aus mir die Carmen zu machen, die ich

heute bin. Danke, dass ihr Euren Anteil dazu beiträgt, dass ich glücklich bin. Und Danke für die Ermöglichung meiner Nepalreise als Vorschusslorbeeren für diese Arbeit.

11 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Arbeit, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 16.11.2016

12 Literaturverzeichnis

Ach JS, Schöne-Seifert B, Siep L (2006): Totipotenz und Potentialität: Zum moralischen Status von Embryonen bei unterschiedlichen Varianten der Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen. Gutachten für das Kompetenznetzwerk Stammzellforschung NRW, Jahrbuch für Wissenschaft und Ethik, 261-321.

Adams MK, Goodrich LR, Rao S, Olea-Popelka F, Phillips N, Kisiday JD, McIlwraith CW (2013): Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: are there differences? Equine Veterinary Journal 45: 372-375.

Alison MR (2009): Stem cells in pathobiology and regenerative medicine. J. Pathol. 217: 141-143.

Alison MR, Caplan AI (2009): Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. J. Pathol. 217: 318-324.

Araki J, Jona M, Eto H, Aoi N, Kato H, Suga H, Doi K, Yatomi Y, Yoshimura K (2012): Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. Tissue Engineering Part C: Methods 18: 176-185.

Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, Addicks K, Litzke LF (2007): Isolation and charakterisation of bone-marrow derived equine mesenchymal stemmcells. AJVR. 10: 1095-1105.

Atsma DE, Fibbe WE, Rabelink TJ (2007): Opportunities and challenges for mesenchymal stem cell-mediated heart repair. Curr Opin Lipidol. 6: 645-649.

Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004): Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. Stem Cells: 675-682.

Bosch G, Schie HTM van, Groot MW de, Cadby JA, Lest CHA van de, Barneveld A, Weeren PR van (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. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society 28: 211-217.

Bourzac C, Smith LC, Vincent P, Beauchamp G, Lavoie J, Laverty S (2010): Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Veterinary Journal* 42: 519-527.

Braun J, Hack A, Weis-Klemm M, Conrad S, Tremel S, Kohler K, Walliser U, Skutella T, Aicher W (2010): Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose valuation of the osteogenic and chondrogen differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells fferentiation capacities of equine adipos tissue-derived mesenchymal stem cells. *AJVR* 71: 1228-1236.

Brehm W (2008): Equine mesenchymal stem cells for the treatment of tendinous lesions in the horse. IVIS; 10th International Congress of World Equine Veterinary Association, 2008 - Moscow, Russia.

Brems R, Jebe E (2008): Comparison of treatments with autolog; cultured stem cells from adipose tissue or bone marrow. IVIS; 10th International Congress of World Equine Veterinary Association, 2008 - Moscow, Russia.

Broeckx S (2012): Tenogenesis of equine peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: In vitro versus in vivo. *J Tissue Sci Eng* 11.

Broeckx S, Zimmerman M, Crocetti S, Suls M, Mariën T, Ferguson SJ, Chiers K, Duchateau L, Franco-Obregón A, Wuertz K, Spaas JH, Kerkis I (2014): Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PLoS ONE* 9: e85917.

Brossi PM, Moreira JJ, Machado TSL, Baccarin RYA (2015): Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC veterinary research* 11: 98.

Burk J, Badylak SF, Kelly J, Brehm W (2013): Equine cellular therapy-from stall to bench to bedside? *Cytometry* 83: 103-113.

Carrade DD, Borjesson DL (2013): Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comparative Medicine* 63: 207-217.

Chang YS, Ahn SY, Yoo HS, Sung SI, Choi SJ, Oh WI, Park WS (2014): Mesenchymal stem cells for bronchopulmonary dysplasia: phase 1 dose-escalation clinical trial. *The Journal of Pediatrics* 5: 966-972.

Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, Mari G, Merlo B, Romagnoli N, Spadari A, Galli C, Lazzari G (2009): 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* 33: 811-821.

Cortes Y, Ojeda M, Araya D, Dueñas F, Fernández MS, Peralta OA (2013): Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet Res* 9: 133.

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. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 76: 52-56.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.

Durando MM, Zarucco L, Schaer TP, Ross M, Reef VB (2006): Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine Vet. Educ.* 18: 75-79.

Erdo F, Buhle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Focking M, Kustermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann K, Trapp T (2003): Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23: 780-785.

Eydt C, Geburek F, Schröck C, Hambruch N, Rohn K, Pfarrer C, Staszyc C (2016): 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* 2: 200-210.

Eydt C, Schröck C, Geburek F, Rohn K, Staszyc C, Pfarrer C (2014): Three-dimensional anatomy of the equine sternum. *Anat. Histol. Embryol* 2: 99-106.

Fallert-Müller A Dr. (Hrsg.) (1999): Lexikon der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Fortier LA (2005): Stem Cells: classifications, controversies, and clinical applications. Veterinary Surgery 34: 415-423.

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 veterinary research 10: 119.

Frisbie D, Smith R (2010): Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. Equine Veterinary Journal 42: 86-89.

Geburek F, Gaus M, Schie HTM van, Rohn K, Stadler PM (2016a): 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 veterinary research 12: 191.

Geburek F, Mundle K, Conrad S, Hellige M, Walliser U, Schie HTM van, Weeren R van, Skutella T, Stadler PM (2016b): 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 7: 21.

Gilbert PM, Blau HM (2011): Engineering a stem cell house into a home. Stem Cell Res Ther 2: 3.

Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish C, Smith RKW (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: 25-32.

Goodrich LR, Frisbie DD, Kisiday JD (2008): How to harvest bone marrow derived mesenchymal stem cells for expansion and injection. Proceedings of the 54th annual convention of the american association of equine practitioners San Diego, CA, USA.

Heckmann L (2007): Gewebeersatz von Sehnen und Bändern: Untersuchungen zum Einfluss löslicher Faktoren und verschiedener Matrices auf humane multipotente mesenchymale Stromazellen. Ulm, Universität Ulm, Medizinische Fakultät, Dissertation.

Hegewald AA (2006): Chondrogenes Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen in hochdichten 3D-Kulturen und im bioresorbierbaren Polymer-Vlies. Berlin, Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Dissertation.

Heng TSP, Dudakov JA, Khong DMP, Chidgey AP, Boyd RL (2009): Stem cells meet immunity. J Mol Med 87: 1061-1069.

Iacono E, Brunori L, Pirrone A, Pagliaro PP, Ricci F, Tazzari PL, Merlo B (2012a): Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. Reproduction 143: 455-468.

Iacono E, Merlo B, Pirrone A, Antonelli C, Brunori L, Romagnoli N, Castagnetti C (2012b): Effects of mesenchymal stem cells isolated from amniotic fluid and platelet-rich plasma gel on severe decubitus ulcers in a septic neonatal foal. Research in Veterinary Science 93: 1439-1440.

Ivanovic Z (2009): Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. J. Cell. Physiol. 219: 271-275.

Jacobs RM, Kociba GJ, Ruoff WW (1983): Monoclonal Gammopathy in a horse with defective hemostasis. Veterinary Pathology 20: 643-647.

Kasashima Y, Ueno T, Tomita A, Goodship AE, Smith RKW (2011): Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. Equine Veterinary Journal 43: 288-294.

Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Hibi H (2016): First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. Head & face medicine 12: 5.

Kim J, Lee J, Lyoo YS, Jung D, Park H (2013): The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. Veterinary dermatology 24: 242-e53.

Kim S, Lee H, Jeon M, Yi T, Song SU (2015): Galectin-9 is involved in immunosuppression mediated by human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells. Immune network 15: 241-251.

Kisiday JD, Goodrich LR, McIlwraith CW, Frisbie DD (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.

Koch T, Berg R (1992): Lehrbuch der Veterinär-Anatomie. Band 1: Bewegungsapparat. Fischer Verlag, Jena.

Krampera M (2002): Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. Blood 101: 3722-3729.

Lange-Consiglio A, Corradetti B, Bizzaro D, Magatti M, Ressel L, Tassan S, Parolini O, Cremonesi F (2012): Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. Journal of tissue engineering and regenerative medicine 6: 622-635.

Lange-Consiglio A, Tassan S, Corradetti B, Meucci A, Perego R, Bizzaro D, Cremonesi F (2013): Investigating the efficacy of amnion-derived compared with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in equine tendon and ligament injuries. Cytotherapy 15: 1011-1020.

Li ZY, Wang CQ, Lu G, Pan XY, Xu KL (2014): Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on hematopoietic recovery and acute graft-versus-host disease in murine allogeneic umbilical cord blood transplantation model. Cell Biochem Biophys 70: 115-122.

Loeffler K (1970): Anatomie und Physiologie der Haustiere. Ulmer, Stuttgart.

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

Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Iacopetti I, Sampaolesi M, Mascarello F, Patruno M (2010): Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. tissue engineering 16: 771-81.

Martinello T, Bronzini I, Perazzi A, Testoni S, Benedictis GM de, Negro A, Caporale G, Mascarello F, Iacopetti I, Patruno M (2013): Effects of in vivo applications of peripheral blood-derived mesenchymal stromal cells (PB-MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) on experimentally injured deep digital flexor tendons of sheep. *J Orthop Res* 31: 306-314.

McIlwraith CW, Fortier LA, Frisbie DD, Nixon AJ (2011): Equine models of articular cartilage repair. *Cartilage* 2: 317-326.

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

Müller M, Raabe O, Addicks K, Wenisch S, Arnhold S (2011): Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on proliferation, differentiation and migration in equine mesenchymal stem cells. *Cell biology international* 35: 235-248.

Murdoch AD, Grady LM, Ablett MP, Katopodi T, Meadows RS, Hardingham TE (2007): Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage. *Stem Cells* 25: 2786-2796.

Narita T, Suzuki K (2015): Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Heart failure reviews* 20: 53-68.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E (2004): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band 1 Bewegungsapparat. Parey, Stuttgart.

Nimura A, Muneta T, Koga H, Mochizuki T, Suzuki K, Makino H, Umezawa A, Sekiya I (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.

Oliveira P, Alves A, Hussni C, Nicolette J, Machado V (2008): The use of autologous mesenchymal stem cells for the treatment of experimentally-induced equine tendinitis: clinical, ultrasonographic and power-doppler evaluation. *IVIS; 10th International Congress of World Equine Veterinary Association, 2008 - Moscow, Russia.*

Paebst F, Piehler D, Brehm W, Heller S, Schröck C, Tárnok A, Burk J (2014):

Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: an approach toward a standardized definition. *Cytometry Part A* 85A: 678-687.

Penha EM, Meira CS, Guimarães ET, Mendonça MVP, Gravely FA, Pinheiro

CMB, Pinheiro TMB, Barrouin-Melo SM, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MBP

(2014): Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. *Stem cells international* 2014: 437521.

Rafei M, Birman E, Forner K, Galipeau J (2009): Allogeneic mesenchymal stem

cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Ther* 17: 1799-1803.

Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Ratajczak J, Wysoczynski M, Kucia M (2008):

Very small embryonic like (VSEL) stem cells – characterization, developmental origin and biological significance. *Exp Hematol* 36: 742-751.

Renzi S, Riccò S, Dotti S, Sesso L, Grolli S, Cornali M, Carlin S, Patruno M,

Cinotti S, Ferrari M (2013): Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: A clinical report. *Research in Veterinary Science* 95: 272-277.

Richardson GL, Pool RR, Pascoe JR, Wheat JD (1986): Autogenous cancellous

bone grafts from the sternum in horses. *Vet Surgery* 15: 9-15.

Roemeling-van Rhijn M, Khairoun M, S Korevaar S, Liewers E, Leuning DG,

IJzermans JNM, Betjes MGH, Genver PG, van Kooten C, Fijter HJW de,

Rabelink TJ, Baan CC, Weimar W, Roelofs HHMJ, Reinders ME (2013): Human

bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells are immunosuppressive in vitro and in a humanized allograft rejection model. *J Stem Cell Res Ther*: 20780.

Salter M, Ratkowsky D, Ross T, McMeekin T (2000): Modelling the combined

temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. *International Journal of Food Microbiology* 61: 159-167.

Schauwer C de, van de Walle GR, Piepers S, Hoogewijs MK, Govaere JLJ, Meyer E, van Soom A (2013): Successful isolation of equine mesenchymal stromal cells from cryopreserved umbilical cord blood-derived mononuclear cell fractions. Equine Vet J 45: 518-522.

Schnabel LV, Lynch ME, van der Meulen MC, Yeager AE, Kornatowski MA, Nixon AJ (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.

Schnabel LV, Pezzanite LM, Antczak DF, Felipe MJ, Fortier LA (2014): Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. Stem Cell Res Ther 5: 13.

Schwarze E (1960): Kompendium der Veterinär-Anatomie: Einführung in die Veterinär-Anatomie. Band 1: Bewegungsapparat. Fischer Verlag, Jena.

Screven R, Kenyon E, Myers MJ, Yancy HF, Skasko M, Boxer L, Bigley EC, Borjesson DL, Zhu M (2014): Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. Veterinary immunology and immunopathology 161: 21-31.

Sellon DC (2006): How to obtain a diagnostic bone marrow sample from the sternum of an adult horse. AAEP Proceedings 52: 621-625.

Smith RK, Korda M, Blunn GW, Goodship AE (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: 99-102.

Smith RKW (2008): Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. Disabil Rehabil 30: 1752-1758.

Smith RKW, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J, Laird EG (2013): Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. PLoS ONE 8: e75697.

Spaas JH, Schauwer CD, Cornillie P, Meyer E, van Soom A, van de Walle GR (2013): Culture and characterisation of equine peripheral blood mesenchymal stromal cells. The Veterinary Journal 195: 107-113.

Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu J, Runnels JM, Zaher W, Mortensen LJ, Alt C, Turcotte R, Yusuf R, Cote D, Vinogradov SA, Scadden DT, Lin CP (2014): Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* 508: 269-273.

Stavely R, Robinson AM, Miller S, Boyd R, Sakkal S, Nurgali K (2015): Human adult stem cells derived from adipose tissue and bone marrow attenuate enteric neuropathy in the guinea-pig model of acute colitis. *Stem Cell Res Ther* 6: 747.

Suenaga H, Furukawa KS, Suzuki Y, Takato T, Ushida T (2015): Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. *Journal of materials science. Materials in medicine* 26: 254.

Tekkatte C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K (2011): "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem cells international* 2011: 504723.

Tienungoon S., Ratkowsky DA, McMeekin TA, Ross T (2000): Growth limits of *listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Applied And Environmental Microbiology*: 4979-4987.

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

Watts AE, Yeager AE, Kopyov OV, Nixon AJ (2011): Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model. *Stem Cell Res Ther* 2: 4.

Wissdorf H, Gerhards H, Huskamp B, Deegen E (2010): Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes. Schaper, Hannover.

Yadirgi G, Marino S (2009): Adult neural stem cells and their role in brain pathology. *The Journal of pathology* 217: 242-253.

Yu H, Adesida AB, Jomha NM (2015): Meniscus repair using mesenchymal stem cells - a comprehensive review. Stem cell research & therapy 6: 86.

Yun S, Ku S, Kwon Y (2016): Adipose-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma synergistically ameliorate the surgical-induced osteoarthritis in Beagle dogs. Journal of orthopaedic surgery and research 11: 9.

Zhilai Z, Biling M, Sujun Q, Chao D, Benchao S, Shuai H, Shun Y, Hui Z (2016): Preconditioning in lowered oxygen enhances the therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells in a rat model of spinal cord injury. Brain Research 1642: 426-35.