



1 Vorwort

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

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

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



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

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



2 Verzeichnis der verwendeten Publikationen

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

Publikation 1 (Anhang 13.1)

Geburek, F., Stadler, P.

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

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

Publikation 2 (Anhang 13.2)

Geburek, F., Stadler, P.

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

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

Publikation 3 (Anhang 13.3)

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

Three-Dimensional Anatomy of the Equine Sternum.

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

*†Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit

Publikation 4 (Anhang 13.4)

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

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

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

*†Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit



Publikation 5 (Anhang 13.5)

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

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

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

*Geteilte Erstautorenschaft / Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit

Publikation 6 (Anhang 13.6)

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

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

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

Publikation 7 (Anhang 13.7)

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

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

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

*Geteilte Erstautorenschaft / Autoren haben gleichwertigen Anteil an der Arbeit

Publikation 8 (Anhang 13.8)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3 Abkürzungsverzeichnis

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



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



4 Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund

4.1 Makroskopische Anatomie der oberflächlichen Beugesehne

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

4.2 Feingewebliche Sehnenstruktur und biochemische Zusammensetzung

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

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

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



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

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

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

4.2.1 Biomechanik der oberflächlichen Beugesehne

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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