



Florian Roggel (Autor)

Ultrasonographische und histologische Untersuchungen von künstlich erzeugten und mit kultivierten mesenchymalen stromalen Zellen aus Fettgewebe (Adipose Tissue Mesenchymal Stromal Cells, AT-MSCs) behandelten Läsionen der oberflächlichen Beugesehne bei Pferden

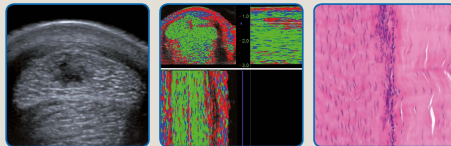
Wissenschaftliche Reihe
der Klinik für Pferde

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



Florian Roggel

Ultrasonographische und histologische Untersuchungen von künstlich erzeugten und mit kultivierten mesenchymalen stromalen Zellen aus Fettgewebe (Adipose Tissue Mesenchymal Stromal Cells, AT-MSCs) behandelten Läsionen der oberflächlichen Beugesehne bei Pferden



STIFTUNG TIERÄRZTLICHE HOCHSCHULE HANNOVER

6



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6394>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1 Einleitung

Tendopathien der oberflächlichen Beugesehne (OBS) stellen mit einer Inzidenz von bis zu 46 % aller Gliedmaßenverletzungen bei Rennpferden (WILLIAMS et al. 2001) eine der häufigsten Erkrankungen bei equinen Athleten dar. Da die natürliche Sehnenheilung zur Bildung von minderwertigem Narbengewebe führt und somit keine funktionelle Wiederherstellung gewährleistet (GOODSHIP et al. 1994), treten trotz langer Rekonvaleszenz von 6 bis 15 Monaten bei 23-67 % der Pferde Rezidive auf (DYSON 2004; O'MEARA et al. 2010). Dies führt häufig zur vorzeitigen Beendigung der sportlichen Karriere (WILLIAMS et al. 2001; LAM et al. 2007).

Aufgrund der langsamen Heilung und der unbefriedigenden Rezidivrate besteht ein großes Interesse, die Qualität des gebildeten Ersatzgewebes zu verbessern (GEBUREK u. STADLER 2011 b). In der Literatur sind zahlreiche physikalische, medikamentöse und chirurgische Therapieansätze beschrieben, die jedoch größtenteils nicht zu besseren Ergebnissen als die alleinige konservative Therapie mit Ruhigstellung und kontrollierter Bewegung führen (STRÖMBERG et al. 1974; SILVER et al. 1983; SHOEMAKER et al. 1991; FOLAND et al. 1992; GIBSON et al. 1997; REEF et al. 1997; GIBSON et al. 2002; DYSON 2004).

Aus diesem Grund sind in den letzten Jahren regenerative Therapiekonzepte mit körpereigenen Substraten in den Fokus von Wissenschaft und Praxis gerückt. Verschiedene Untersuchungen liefern Hinweise darauf, dass die Anwendung von autologen Blutprodukten, Gerüstsubstanzen und körpereigenen Zellsubstraten zu einer funktionellen und strukturellen Verbesserung des gebildeten Ersatzgewebes führt (GEBUREK u. STADLER 2011 a; GEBUREK u. STADLER 2011 b). Da es sich bei der Sehnenmatrix um ein relativ zellarmes Gewebe handelt und daher die regenerativen Fähigkeiten eingeschränkt sind (RICHARDSON et al. 2007), ist insbesondere die intraläsionale Applikation von multipotenten Zellen von großem Interesse. Sogenannte mesenchymale stromale Zellen (MSCs) kommen natürlicherweise in fast allen Geweben des Körpers in geringer Anzahl vor und sorgen dort für die ständige Selbsterneuerung und die Reparatur im Falle einer Verletzung (CAPLAN et al. 2005; DA SILVA MEIRELLES et al. 2006; CRISAN et al. 2008). Da MSCs aus vielen dieser Gewebe isoliert und kultiviert werden können, sich

in verschiedene Zelllinien differenzieren können und daneben antientzündliche Wirkqualitäten zu besitzen scheinen, stellen MSCs einen besonderen Forschungsschwerpunkt dar (STEWART u. STEWART 2011). Die Implantation von körpereigenen MSCs in eine Sehnenläsion verfolgt einerseits das Ziel, durch die direkte Differenzierung in Sehnenzellen (Tendozyten) und Fibroblasten neue Kollagenfasern zu bilden und andererseits durch die Produktion von Signalmolekülen vorhandene Zellen zur Kollagensynthese anzuregen, um damit die Selbstheilung zu unterstützen (RICHARDSON et al. 2007). Hierbei steht derzeit die Anwendung von MSCs aus Knochenmark, Fettgewebe, Sehngewebe und Nabelschnurgewebe im Vordergrund (STEWART u. STEWART 2011), wobei die Gewinnung mit unterschiedlich hohem Aufwand und unterschiedlich hohen Risiken verbunden ist (SMITH et al. 2003; ARNHOLD et al. 2007; NIXON et al. 2008; BARTHOLOMEW et al. 2009; ALVES et al. 2011; TAYLOR u. CLEGG 2011; DURGAM et al. 2012).

Aufgrund ihrer einfachen und risikoarmen Gewinnung bei schneller Kultivierbarkeit werden mesenchymale stromale Zellen aus Fettgewebe (adipose tissue mesenchymal stromal cells, AT-MSCs) *in praxi* zur intraläsionalen Behandlung von Tendopathien mit vielversprechenden Beobachtungen eingesetzt (DAHLGREN 2009, LEPPÄNEN et al. 2009 a; LEPPÄNEN et al. 2009 b, MUNDLE et al. 2009). Bislang fehlen jedoch kontrollierte tierexperimentelle Arbeiten an standardisierten, chirurgisch erzeugten Sehnenläsionen, die notwendig sind, um den therapeutischen Wert einer derart invasiven und kostenaufwendigen Therapie zu untersuchen.

Vielfach scheiterte die objektive und quantitative Validierung neuer Therapieverfahren am Fehlen eines geeigneten nichtinvasiven Diagnostikums (BOSCH et al. 2009). Neben der klinisch-orthopädischen Untersuchung haben sich verschiedene bildgebende Untersuchungen, wie die B-Mode-Ultrasonographie, die ultrasonographische Gewebecharakterisierung (UTC-Technik) und die Magnetresonanztomographie (MRT), in der Pferdemedizin durchgesetzt.

Als bisherige Methode der Wahl zur Diagnostik von Tendopathien gilt seit den 1980er Jahren die Ultrasonographie (RANTANEN 1982). Ultraschallgeräte haben aufgrund ihres hohen Wertes bei der Diagnostik verschiedenster Weichteilerkrankungen, ihrer guten Transportierbarkeit und ihrer verhältnismäßig

geringen Anschaffungskosten eine weite Verbreitung in der Pferdepraxis gefunden. Die hohe Sensitivität in der orthopädischen Diagnostik beim Pferd ist durch zahlreiche Untersuchungen belegt (PHARR u. NYLAND 1984; SPAULDING 1984; STADTBÄUMER 1988; SPURLOCK et al. 1989 b). Die konventionelle B-Mode-Ultraschographie ist jedoch aufgrund des großen Einflusses des Untersuchers, des Schallkopfwinkels, der begrenzten Auflösung und der fehlenden axialen Information nicht zur quantitativen Analyse des Sehngewebes geeignet ist (VAN SCHIE 1999). Seit einigen Jahren ermöglicht die UTC-Untersuchung die quantitative Analyse der Sehnenintegrität. Mit Hilfe einer Untersuchungseinheit werden in kleinen Abständen ultrasonographische Querschnittsbilder der untersuchten Sehne aus einem konstanten Winkel aufgenommen, abgespeichert und anschließend mit Hilfe einer Software zu einem dreidimensionalen Block aus Ultraschallinformationen zusammengesetzt. Durch die Analyse der Grauwertstabilität über mehrere hintereinander liegende Querschnittsbilder hinweg können vier Echotypen unterschieden werden, die unterschiedlichen Graden der Sehnenintegrität entsprechen. Somit lassen sich sowohl die Phasen der Sehnenheilung als auch der Einfluss von Therapeutika nichtinvasiv untersuchen (BOSCH et al. 2009; VAN SCHIE et al. 2009; DAVID et al. 2011; DE JONGE et al. 2011; DE VOS et al. 2011). Da die UTC-Analyse mit Hilfe histologischer Untersuchungen etabliert wurde (VAN SCHIE et al. 2003), ist dem Verfahren eine ähnliche Aussagekraft wie die Biopatientnahme zur histologischen Diagnostik (WAGELS 2000; BUCK et al. 2002) beizumessen. Da jedoch widersprüchliche Informationen zum Einfluss wiederholter Biopsien auf den Heilungsverlauf vorliegen (DARABEINER et al. 2000), ist diese Technik zur Untersuchung neuer Therapieverfahren möglicherweise ungeeignet. *Post mortem* in einer derartigen tierexperimentellen Untersuchung durchgeführt, ermöglicht die histologische Untersuchung jedoch eine valide Beurteilung des Heilungserfolgs (ASTRÖM u. RAUSING 1995) und den Vergleich mit zuvor angewandten bildgebenden Modalitäten (BOSCH et al. 2009). In der vorliegenden kontrollierten tierexperimentellen Studie soll erstmalig die Wirkung von intraläsional applizierten autologen mesenchymalen Zellen aus Fettgewebe (AT-MSCs) auf chirurgisch erzeugte Sehnenläsionen untersucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Anatomie

2.1.1 Allgemeines

Als Sehne wird in der Medizin der bindegewebige Anteil eines Muskels bezeichnet, der den Muskelbauch mit einem Knochen verbindet. Durch Sehnen wird die bei der Kontraktion des Muskelbauches erzeugte Kraft auf das Skelettsystem übertragen, wodurch über die Bewegung von Gelenken eine Fortbewegung ermöglicht wird (PSCHYREMBEL 1994).

Beim Pferd sind die Muskelbäuche im proximalen Abschnitt der Gliedmaße angeordnet, was die Ausbildung langer Sehnen im distalen Abschnitt zur Folge hat. Dies führt durch die Gewichtsreduktion im distalen Gliedmaßenbereich zu einer enormen Steigerung der Effizienz der Gliedmaßenbewegung, welche beim hochspezialisierten Bewegungstier Pferd von größter Bedeutung ist (SEIFERLE u. FREWEIN 1992).

Die Vordergliedmaße des Pferdes hat einen größeren Anteil des Körpergewichts zu tragen als die Hintergliedmaße und übernimmt die Funktion eines Auffanghebelwerks, ist jedoch gleichzeitig schwächer bemuskelt (SEIFERLE u. FREWEIN 1992). Durch die Hyperextension des Fesselgelenks tragen die palmar gelegenen Muskeln mit ihren Sehnen neben dem bandartigen *M. interosseus medius* einen erheblichen Anteil der Körperlast. Diese statisch beanspruchten Muskeln, wie unter anderem der *M. flexor digitalis superficialis*, sind sehnig durchsetzt (SEIFERLE u. FREWEIN 1992) und ermöglichen dem Pferd das Tragen der Körperlast fast ohne Muskularbeit (SEIFERLE u. FREWEIN 1992; WISSDORF et al. 2002).

2.1.2 Anatomie der oberflächlichen Beugesehne der Vordergliedmaße

Die Sehne des *M. flexor digitalis superficialis* wird als oberflächliche Beugesehne bezeichnet. Proximal des Karpus erhält sie ein Unterstützungsband und zieht palmar

zusammen mit der tiefen Beugesehne durch die Karpalbeugesehnenscheide unter dem *Retinaculum flexorum* hindurch (SEIFERLE u. FREWEIN 1992). Im gesamten Mittelfußbereich umfasst sie halbmondförmig palmar die tiefe Beugesehne und liegt direkt unter der Haut (WISSDORF et al. 2002). Im distalen Viertel umfasst sie die tiefe Beugesehne mit einer ringartigen Manschette, *Manica flexoria*, und zieht mit der tiefen Beugesehne durch die gemeinsame Fesselbeugesehnenscheide. In der Fesselbeuge spaltet sie sich in zwei Schenkel, zwischen denen die tiefe Beugesehne hindurch tritt, um lateral und medial an der Kronbeinlehne anzusetzen. Zwei schwächere Äste inserieren am distalen Teil des Fesselbeins (SEIFERLE u. FREWEIN 1992).

Der *M. flexor digitalis superficialis* beugt das Fessel- und das Krongelenk und ist als mehrgelenkiger Muskel an der Beugung des gesamten Vorderfußes mitbeteiligt. Aufgrund seiner Funktion wird er auch als Kronbeinbeuger bezeichnet (SEIFERLE u. FREWEIN 1992). Zudem ist er beim Durchtreten im Fesselgelenk am Tragen des Körpergewichts mitbeteiligt und wirkt als elastischer Energiespeicher (SEIFERLE u. FREWEIN 1992).

2.2 Histologie der oberflächlichen Beugesehne

Sehnengewebe besteht zum größten Teil aus extrazellulärer Matrix mit einem hohen Wassergehalt und relativ wenigen Zellen. Diese extrazelluläre Matrix ist aus geformten Komponenten, bestehend hauptsächlich aus parallel angeordneten Kollagenfibrillen, und amorpher Grundsubstanz aufgebaut, die Proteoglycane und Glycoproteine enthält. Die Kollagenfasern werden netzartig von wenigen elastischen Fasern umhüllt sind und sind in einem hierarchischen System organisiert. Zwischen den Faserbündeln finden sich schmale und langgestreckte heterochromatinreiche Sehnenzellen (Tendozyten) (LIEBICH 2004).

Die kleinste hierarchische Einheit der Sehne ist das Primärbündel, das aus parallel verlaufenden Kollagenfibrillen zusammengesetzt ist und einen gleichmäßigen Durchmesser von 80-180 nm aufweist (FACKELMAN 1973). Die Primärbündel werden von Endotendineum umgeben. Mehrere Primärbündel werden vom

Peritendineum, welches als mögliche Quelle für pluripotente Zellen innerhalb der Sehne angesehen wird (GOODRICH 2011), zu makroskopisch sichtbaren Sekundärbündeln zusammengefasst. Das Peritendineum enthält neben Blut- und Lymphgefäßen sowie sensiblen Nervenfasern auch elastische Fasern. Die Gesamtheit aller Sekundärbündel bilden die Sehne, die von lockerem fibrösem Bindegewebe, dem Epitendineum, umgeben wird (Abb. 1).

Die Blutversorgung erfolgt über den Muskel, aus dem die Sehne hervorgeht, über die Insertion am Knochen, sowie durch intra- und extratendinöse Gefäße. Die extratendinöse Versorgung erfolgt über das Peritendineum und innerhalb von Sehnenscheiden über das Mesotendineum oder Vinculum.

Die Kollagenfibrillen in intakten Faserbündeln bestehen zu 95% aus Kollagen Typ I sowie einem geringen Anteil an Kollagen Typ III und IV (WILLIAMS et al. 1980). Kollagen Typ III befindet sich überwiegend im Endotendineum, der Gehalt nimmt mit dem Lebensalter zu. Fibrillen aus Typ III-Kollagen haben einen deutlich kleineren Faserdurchmesser als Typ I-Kollagenfibrillen (GOODSHIP 1994).

Die intakten Kollagenfasern sind in einer typischen Wellenstruktur angeordnet („crimp pattern“) (WILLIAMS et al. 1980), die mit zunehmendem Alter und stärker im Zentrum der Sehne abnimmt (PATTERSON-KANE et al. 1997 a).

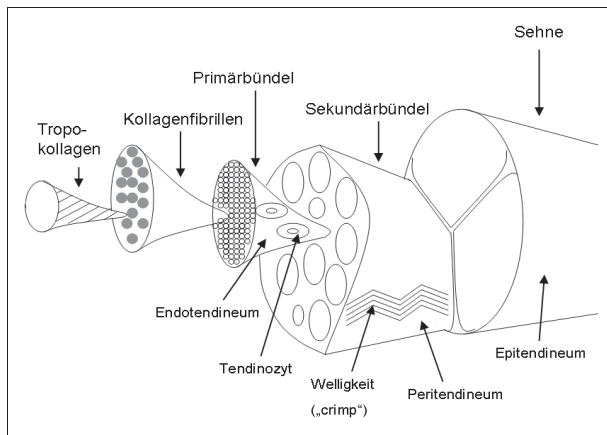


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Sehne (modifiziert nach KASTELIC et al. 1978 und LIEBICH 2010)

2.3 Biomechanik der oberflächlichen Beugesehne

Neben der Beugung der Zehengelenke ist die Wirkung als elastischer Energiespeicher („Sprungfeder“) die wichtigste Funktion der oberflächlichen Beugesehne. Durch den *M. flexor digitalis superficialis* kann die Sehnenspannung während der Stützbeinphase der Belastung angepasst werden; bei Ermüdung ermöglicht das Unterstützungsband während der Stützphase eine Entspannung des Muskels (SEIFERLE u. FREWEIN 1992). Durch den hierarchischen Aufbau besitzt die oberflächliche Beugesehne viskoelastische Eigenschaften, die sich in ihrer Belastungs-Dehnungs-Kurve widerspiegeln. Bei nur geringer Belastung zeigt die Sehne zunächst eine unterproportionale Dehnung, da die Welligkeit („crimp pattern“) der Kollagenfibrillen verstreicht. Unter zunehmender Belastung zeigt sich eine fast lineare Dehnung. Bei weiter zunehmender Belastung erreicht sie ihre Dehnungsgrenze; jede weitere Belastung führt zu einer überproportionalen Verlängerung, da es zwischen den Kollagenfasern zur Ruptur kovalenter Quervernetzungen kommt und ein irreversibler Schaden entsteht (GOODSHIP et al. 1994) (Abb. 2).

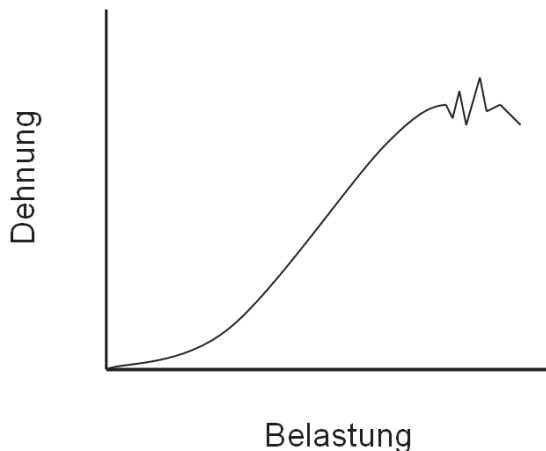


Abbildung 2: Belastungs-Dehnungs-Kurve der oberflächlichen Beugesehne (modifiziert nach GOODSHIP et al. 1994)

Dieser Schaden tritt bei einer Dehnung von 12 bis 20% auf (RIEMERSMA 1985). Die Untersuchungen von STEPHENS et al. (1989) zeigen, dass im Galopp Dehnungen von 11,5-16,6% auftreten. Daraus folgt, dass die oberflächliche Beugesehne bereits bei physiologischer Belastung eng an ihren mechanischen Grenzen arbeitet.

2.4 Erkrankungen der oberflächlichen Beugesehne

2.4.1 Definition

Für die Erkrankung von Sehnen werden in der Human- und Veterinärmedizin zahlreiche Begriffe und Bezeichnungen verwendet, die das Krankheitsbild vielfach nicht hinreichend erfassen (HUSKAMP u. NOWAK 1988): Tendopathie, Tendinitis, Tendinose, Sehnenkrankung, Sehnenentzündung und Sehnen Schaden werden oftmals synonym verwendet.

In der Humanmedizin wird der Begriff Tendopathie als Sammelbegriff für abakterielle Entzündungen der Sehnen (Tendinitis) beziehungsweise Sehnenscheiden (Tendovaginitis), in Ansatznähe (Enthesiopathie, synonym Insertionstendopathie) oder degenerative Veränderungen an Sehnenursprung und -ansätzen (Tendinosen) verwendet (PSCHYREMBEL 2011).

2.4.2 Ätiologie und Pathogenese

Sehnenkrankungen können in extrinsische und intrinsische Verletzungen eingeteilt werden (AVELLA u. SMITH, 2011).

Als prädisponierende Faktoren für intrinsische Sehnenverletzungen werden neben akuter und chronischer Überbelastung, Geschwindigkeit des Bewegungsablaufs, Muskelermüdung mit Inkoordination, harter oder tiefer Boden, hohes Gewicht von Pferd und Reiter, Beschlag und Fehlstellungen sowie Fehler bei der Aufzucht und im Training beschrieben (DAVIS u. SMITH 2003; GOODRICH 2011; AVELLA u. SMITH 2011).

Überbelastungsschäden an Sehnen und Bändern können durch einen einmaligen Insult, der eine Überdehnung der Fibrillen hervorruft, und durch repetitive Belastung, die zu einer Degeneration der zentralen Sehnenanteile mit Erhöhung des Glykosaminoglykan- (GAG) und Kollagen Typ III-Gehalts führt (BIRCH et al. 1998; SMITH et al. 1999), hervorgerufen werden. Letztere löst weder eine klinisch nachweisbare Entzündung noch reparative Prozesse aus, schwächt jedoch progressiv die Elastizität und Widerstandskraft des Sehngewebes (SMITH et al. 1999). Der klinischen Tendopathie geht somit oftmals eine Phase subklinischer Degeneration voraus. Bei *post mortem*-Untersuchungen klinisch unauffälliger Sehnen konnten geringgradige makroskopische und histologische Veränderungen (Vergrößerung der Sehnenquerschnittsfläche, Verfärbungen zentraler Sehnenanteile, Verlust der hierarchischen Anordnung, höherer Anteil an Faserbündeln kleinen Durchmessers) nachgewiesen werden (WEBBON 1977; SMITH et al. 1999). Zudem tritt eine Tendopathie häufig bilateral auf, wobei eine Gliedmaße stärker betroffen ist. Insbesondere dem Alterungsprozess und dem Training wird eine besondere Rolle zugesprochen.

Der genaue zur Degeneration führende Mechanismus ist unbekannt. Der enge Zusammenhang zwischen Degeneration und Belastung legt nahe, dass die absolute Anzahl an Belastungszyklen bei hoher Geschwindigkeit zum Fortschreiten beiträgt. In einer kontrollierten Studie wurde gezeigt, dass exzessive Bewegung die natürlicherweise auftretenden Degenerationsprozesse mit dem Alter beschleunigt, indem sich die Wellenstruktur („crimp pattern“) und die Kollagenfaserlänge regional im Zentrum der Sehne reduzieren (PATTERSON-KANE et al. 1997 a; PATTERSON-KANE et al. 1997 b; PATTERSON-KANE et al. 1998), was dazu führt, dass sich unter Belastung zunächst die Fasern im Sehnenkern begradigen. Dahingegen beeinflusst Bewegung im Fohlenalter die Qualität des Sehngewebes positiv (PATTERSON-KANE et al. 1997 b).

Der Energieverlust beim zyklischen Speichern und Abgeben von Bewegungsenergie führt zur Freisetzung von Wärme, die zu einer Erwärmung des Sehnenkerns auf bis

zu 45°C führt und somit Matrixproteine schädigen könnte (WILSON et al. 1994), was als Hypothese zur Entstehung der häufigen Kernläsionen („core lesions“) angesehen wird. Auch durch direkte Kraffteinwirkung während der Belastungsphase können Quervernetzungen und Matrixproteine beschädigt werden.

Die genaue Rolle der Sehnendurchblutung bei der Entstehung von Sehnenschäden ist noch immer unbekannt (AVELLA u. SMITH 2011). Unter maximaler Belastung kommt es durch mechanische Kompression zur Verringerung bis hin zur Unterbrechung der Blutversorgung und somit zur relativen Hypoxie und zur Ansammlung toxischer Stoffwechselprodukte. Darüber hinaus konnte in mikroangiographischen Studien nachgewiesen werden, dass besonders häufig von Sehnenschäden betroffene zentrale Bereiche der oberflächlichen Beugesehne schlechter vaskularisiert sind als übrige Anteile (STRÖMBERG 1980).

2.4.3 Sehnenheilung

Der Heilungsverlauf von Sehnen ist ein hochkomplexes Geschehen, in dem verschiedenste Gewebetypen mit unterschiedlichen Graden struktureller Integrität gleichzeitig an verschiedenen Orten synthetisiert und abgebaut werden (VAN SCHIE et al. 2004).

Der Heilungsverlauf kann grundsätzlich in drei sich überlappende Phasen eingeteilt werden. Die akute Entzündungsphase beginnt mit der Zerreißung von Sehnenfasern und dauert ein bis zwei Wochen. Sie wird durch die Steigerung der Durchblutung, intratendinöse Einblutung, Ödematisierung sowie Leukozyten- und Makrophageninfiltration charakterisiert. Der nekrotische Debris wird durch Phagozytose der Makrophagen und die freigesetzten proteolytischen Enzyme abgebaut, wobei jedoch auch relativ intakte umliegende Sehnenfasern geschädigt werden, was initial zu einer weiteren Vergrößerung des Defektes führt (AVELLA u. SMITH 2011).

Bereits wenige Tage nach der Verletzung beginnt die proliferative Phase, die etwa bis zum 45. Tag anhält. Durch starke Gefäßeinsprossung sowie die Einwanderung von Fibroblasten in das Fibringerinsel wird ein gefäßreiches Granulationsgewebe