

Qualitativer Vergleich autologer konditionierter Sera aus Knochenmark und Blut von Pferden

Christiane Ionita¹, Antonia Troillet¹, Walter Brehm¹, Karsten Winter² und Jean-Claude Ionita¹

¹ Chirurgische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Deutschland

² Translationszentrum für Regenerative Medizin, Universität Leipzig, Deutschland

Zusammenfassung: Autologes konditioniertes Serum (Autologous Conditioned Serum, ACS) ist ein orthobiologisches Produkt, welches aus patienteneigenem Blut gewonnen und in der Pferdepraxis häufig zur Therapie von Osteoarthritis verwendet wird. Die von den Blutzellen freigesetzten, enthaltenen Zellmediatoren bestimmen seine anabole und anti-katabole Wirkung. Auch das rote Knochenmark ist reich an Zellen, die ebenfalls eine große Menge an Wachstumsfaktoren und anderer Mediatoren enthalten, sodass es möglicherweise auch als Ausgangssubstrat zur Herstellung von ACS verwendet werden kann. Das Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob (1) Knochenmark grundsätzlich als Substrat zur Herstellung von ACS verwendet werden kann und (2) ob eine höhere Zytokinanreicherung im Knochenmark-ACS als im Blut-ACS erreicht werden kann. Für die erste Zielsetzung wurde Knochenmark von 12 erwachsenen Warmblutpferden entnommen und verarbeitet, um Knochenmarküberstand (KMÜ) und Knochenmark-ACS (KM-ACS) zu gewinnen. Das KM-ACS wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Kits produziert. Ein Teil des KMÜ wurde mit einem Detergenz versehen (LysKMÜ), um den Inhalt der Zellen freizusetzen. Die Konzentrationen an insulin-like growth factor-1 (IGF-1), platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), transformig growth factor-1 (TGF- β_1) und Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra) wurden mittels ELISA-Kits gemessen und zwischen den drei Endpräparaten verglichen. Für die zweite Zielstellung der Studie wurde von 10 dieser Pferde Blutproben zeitgleich zur KM Entnahme gewonnen, um Blut-ACS herzustellen. Die Konzentrationen der vier benannten Zellmediatoren wurden mittels ELISA bestimmt und zwischen Blut- und KM-ACS verglichen. Die medianen IGF-1-Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Ergebnissen. Die mittleren PDGF-BB-Konzentrationen waren im LysKM und im KM-ACS signifikant höher als im KMÜ. Die höchste mittlere TGF- β_1 -Konzentration wurde im KM-ACS gemessen und war signifikant höher als die Konzentration im KMÜ. Die medianen IL-1Ra-Konzentrationen im KM-ACS und im LysKMÜ waren signifikant höher als die im KMÜ. Blut-ACS zeigte eine signifikant höhere mediane IGF-1 und mittlere PDGF-BB-Konzentration als KM-ACS. Die mittlere TGF- β_1 - und mediane IL-1Ra Konzentration unterschieden sich nicht signifikant zwischen Blut- und KM-ACS. Nach dem Koagulations- und Inkubationsprozess konnten ähnliche Werte im KM-ACS wie im LysKMÜ nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von IL-1Ra, zeigte Knochenmark-ACS im direkten Vergleich allerdings tiefere Zytokin-Konzentrationen als Blut-ACS. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse scheint die invasivere Entnahme von Knochenmark zur Herstellung von KM-ACS nicht gerechtfertigt. Da zusätzliche hier nicht untersuchte Zytokine in höheren Konzentrationen in KM-ACS vorhanden sein könnten, sind allerdings weitere In vitro-Studien nötig, um genauere Schlussfolgerungen zu ziehen. Auch In vivo-Studien sollten durchgeführt werden, um die klinische Bedeutung dieser Ergebnisse zu beurteilen, da eine höhere Konzentration der Zytokine nicht zwangsläufig eine bessere Wirksamkeit des Produktes bedeuten muss.

Schlüsselwörter: Knochenmark, Wachstumsfaktoren, Zytokine, IL-1Ra, autologes konditioniertes Serum, regenerative Blutprodukte, Pferd

Qualitative comparison between equine bone marrow- and blood-derived autologous conditioned serum

Autologous conditioned serum (ACS) is an orthobiological preparation that is obtained from the patient's own blood after an incubation period and commonly used for the treatment of osteoarthritis in the equine practice. The anti-catabolic and anabolic effects of the product are determined by the blood cell-derived (such as PDGF-BB, TGF- β_1 and IL-1Ra, mainly originating from platelets and leucocytes) and plasma-derived (such as IGF-1, mainly originating from the liver) mediators contained in the serum. The anti-inflammatory molecule IL-1Ra, being primarily produced by leucocytes in blood, is of particular interest, since it inhibits the catabolic effect of IL-1 which plays a central role in the development and progression of osteoarthritis. Red bone marrow contains different cell types, such as megakaryocytes, thrombocytes, leucocytes and progenitor cells which are rich sources of growth factors and other cytokines, as well. Thus, bone marrow could potentially be used as a substrate for the preparation of ACS. The aims of this study were therefore to determine if (1) bone marrow is a possible substrate for ACS production and (2) whether bone marrow-derived ACS contains higher cytokine concentrations than the respective blood-derived ACS. For the first objective of this study, bone marrow was harvested from 12 adult Warmblood horses and processed to obtain bone marrow supernatant (KMÜ) and bone marrow ACS (KM-ACS). A commercial device was used to produce KM-ACS. A small fraction of KMÜ was used for cytological analysis, performed with an automated cell counter. One half of the remaining volume of the KMÜ was treated with a detergent (LysKMÜ) to induce cell lysis and the subsequent release of their content, whereas the rest of the volume remained untreated. The respective IGF-1, PDGF-BB, TGF- β_1 and IL-1Ra concentrations were measured with ELISA-Kits and compared between the three different preparations. For the second part of this study, venous blood was drawn concomitantly to bone marrow aspiration from 10 horses included in the first part. Blood-derived ACS (Blut-ACS) and KM-ACS were simultaneously produced. The concentrations of the four afore-mentioned cell mediators were determined in KM-ACS and Blut-ACS, and compared between the two products. In the first part of the study, the median IGF-1 concentrations did not differ significantly between the products. The mean values of PDGF-BB in LysKMÜ and KM-ACS were significantly higher than in KMÜ. The highest mean TGF- β_1 concentration was measured in KM-ACS and was significantly higher than the value in KMÜ. The median IL-1Ra concentrations in KM-ACS and Lys-KMÜ were significantly higher than in KMÜ. In part 2, Blut-ACS showed a significantly higher median IGF-1 and mean PDGF-BB concentration than KM-ACS. Mean TGF- β_1 and median IL-1Ra concentration did not show significant differences between the two products. According to the results of this study, bone marrow can be used as a substrate to produce ACS, since all four cytokines were enriched compared to non-processed bone marrow supernatant (KMÜ). However, only IL-1Ra concentration was higher in bone marrow-derived ACS (KM-ACS) than in blood-derived ACS (Blut-ACS) and the three other mediators were more elevated in Blut-ACS. Therefore, the use of bone marrow cannot be recommended for the production of ACS, because of the more invasive aspiration technique. On the other side, since other cytokines, which are potentially also playing a role in tissue repair, may be present in higher concentrations in bone marrow-derived ACS, further in vitro-studies are needed to obtain more information. Moreover, in vivo-studies are needed to assess the clinical meaning of these in vitro-results, because higher cytokine concentrations do not necessarily imply a better clinical effect.

Keywords: Bone marrow, growth factors, cytokines, IL-1Ra, autologous conditioned serum, regenerative blood products, equine

Zitation: Ionita C., Troillet A., Brehm W., Winter K., Ionita J.-C. (2016) Qualitativer Vergleich autologer konditionierter Sera aus Knochenmark und Blut von Pferden. *Pferdeheilkunde* 32, 623-633

Korrespondenz: Dr. Jean-Claude Ionita, Chirurgische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, An den Tierkliniken 21, 04103 Leipzig, Deutschland; E-Mail: ionita@vetmed.uni-leipzig.de

Einleitung

Zur Therapie von orthopädischen Erkrankungen beim Pferd werden häufig Orthobiologika eingesetzt, welche hauptsächlich aus patienteneigenem Blut, Knochenmark oder Fettgewebe gewonnen werden (Textor 2011, Smith et al. 2014). Bekannte Beispiele sind thrombozytenreiches Plasma, konditioniertes Serum, Thrombozytenlysate, konzentrierte Knochenmarkaspirate, Knochenmarküberstand und kultivierte Stammzellerzeugnisse (Smith et al. 2006, Backly et al. 2011, Geburek und Stadler 2011). Zusätzlich zu ihrem gewebergenerierenden Effekt haben diese autologen Therapeutika teilweise auch analgetische und entzündungshemmende Eigenschaften (Frisbie et al. 2007, Schnabel et al. 2008, McCarrel und Fortier 2009, Frisbie und Smith 2010, Wasterlain et al. 2012, Kol et al. 2013). Sowohl im Blut als auch im Knochenmark befinden sich viele verschiedene anabol und anti-katabol wirkende Zytokine, wie Wachstumsfaktoren (WF) und andere Peptide, die eine solche Wirkung ausüben können (Smith et al. 2006, Hraha et al. 2011, Boswell et al. 2012, Textor 2014). Ursprünglich befindet sich der größte Anteil dieser Botenstoffe intrazellulär, hauptsächlich in Thrombozyten und Leukozyten, aber ein gewisser Teil liegt extrazellulär in bioaktiver humoraler Form im Plasma von Blut und Knochenmark vor (Korf-Klingebiel et al. 2008, McCarrel und Fortier 2009, Soltan et al. 2009, Boswell et al. 2012, Ionita et al. 2016). Werden Thrombozyten und Leukozyten aktiviert, reagieren sie darauf mit der Freisetzung dieser Moleküle wodurch diese ihre Wirksamkeit entfalten können (Boswell et al. 2012, Textor 2014). Einige der wichtigsten Faktoren für die Wundheilung sind insulin-like growth factor-1 (IGF-1), platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) sowie transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) (Barrientos et al. 2008, Lyras et al. 2010). Ihr klinischer Effekt beruht auf den additiven chemotaktischen, proliferations-, migrations- und differenzierungsfördernden Eigenschaften, die sie auf umliegende und migrierende Zellen haben (Barrientos et al. 2008, Textor 2014). Das Ziel bei der Erzeugung verschiedener autologer biologischer Produkte ist es deshalb, diese Zytokine zu gewinnen, anzureichern und für eine lokale Applikation aufzubereiten, um hauptsächlich orthopädische Erkrankungen zu behandeln (Textor 2011, Boswell et al. 2012).

Autologes konditioniertes Serum (ACS) ist ein Produkt bei dem ein Koagulationsprozess durch Inkubation von venösem Vollblut mit Borosilikatkugeln eingeleitet wird, wodurch eine reichhaltige Kombination an Mediatoren aus den verschiedenen enthaltenen Zellen freigesetzt wird (Frisbie et al. 2007, Hraha et al. 2011). Charakteristisch für das ACS ist eine Anreicherung des entzündungshemmenden Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten (IL-1Ra), welcher unter anderem von verschiedenen Zelltypen aus dem Blut und Knochenmark synthetisiert und freigesetzt wird (Danis et al. 1995, Burger and Dayer 2000, Prockop und Oh 2012, Isoda et al. 2014). Da dieses Molekül die Wirkung des proinflammatorischen Interleukin-1 hemmt, wird das ACS besonders bei Osteo-

oarthritis therapeutisch eingesetzt (Wehling et al. 2007, Fox and Stephens 2010, Hraha et al. 2011). Die positive klinische Wirkung dieses Produktes konnte nach intraartikulärer Injektion bei Pferden mit experimentell induzierter Osteoarthritis in der Studie von Frisbie et al. (2007) nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass ACS anabol wirkende Zytokine, wie die drei oben genannten WF, anreichert (Wehling et al. 2007, Hraha et al. 2011, Fjordbakk et al. 2015, Ionita et al. 2016) und dadurch die Heilung natürlich entstandener Tendinopathien bei Pferden verbessern kann (Geburek et al. 2015).

Auch Knochenmark wird zur Herstellung autologer biologischer Therapeutika verwendet, da sich sein roter Anteil aus einer Mischung hämatopoetischer Vorläuferzellen, reifer Leukozyten und Thrombozyten (Grondin and Dewitt 2010), sowie pluripotenter mesenchymaler Stammzellen mit hohen Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeiten zusammensetzt (Owens et al. 2011). Viele dieser Zellen stellen eine Quelle für wundheilungsfördernde Zellmediatoren dar (Liu et al. 2006, Korf-Klingebiel et al. 2008, McCarrel und Fortier 2009, Soltan et al. 2009, Fortier et al. 2010, Prockop und Oh 2012). Um das heilungsfördernde Potential dieser Mischung ohne Zellexpansion zu nutzen, werden hauptsächlich drei verschiedene Methoden angewendet. Bei einer wird die ganze Zellfraktion oder ein Teil davon (die mononukleäre Zellen) aus dem Knochenmark nach Konzentration (bone marrow aspirate concentrate, BMAC) verwendet (Fortier et al. 2010, Ishihara et al. 2013, Chahla et al. 2016), bei der zweiten liegt der Fokus auf den Zellmediatoren aus dem Knochenmarksüberstand (KMÜ), der entweder Thrombozyten und Leukozyten enthält oder azellulär ist (Smith et al. 2006, Künneke et al. 2008, Schnabel et al., 2008), und die letzte nutzt das gesamte Knochenmarkaspirat ohne weitere Verarbeitung (Herthel 2001, Hall et al. 2013, Russell et al. 2016). Die Grenzen zwischen den unterschiedlichen Methoden lassen sich nicht immer klar ziehen.

Aufgrund seines Gehaltes an Leukozyten, Thrombozyten sowie verschiedenen Vorläuferzellen und mesenchymalen Stammzellen enthält das rote Knochenmark eventuell das Potential, größere Mengen wundheilungsfördernder WF und IL-1Ra für therapeutische Zwecke anzureichern als Blut. Somit könnte Knochenmark eine bessere Ausgangssubstanz zur Vorbereitung von ACS darstellen. Die Ziele dieser Studie waren es deswegen (1) zu untersuchen, ob eine signifikante Anreicherung der Zytokine IGF-1, PDGF-BB, TGF- β_1 und IL-1Ra im Knochenmark nach einer Inkubationsperiode stattfindet, um herauszufinden, ob Knochenmark sich als Substrat zur ACS Herstellung eignet, sowie (2) die Konzentrationen dieser Zytokine im Blut- und Knochenmark-ACS direkt zu vergleichen. Die Hypothesen waren, dass (1) Knochenmark ein mögliches Substrat zur Gewinnung von ACS ist und dass (2) im Knochenmark-ACS höhere Konzentrationen der untersuchten Zytokine als im Blut-ACS erreicht werden können.

Material und Methoden

Tiere

Die vorliegende Arbeit ist ein Teil eines größeren, vom Regierungspräsidium Leipzig, des Landes Sachsen genehmigten Forschungsprojekts (Tierversuchsanzeige V04/12), welches in zwei Studien untergliedert wurde. In die erste parallel verlaufende Studie (Studie A) wurden insgesamt 12 Pferde einbezogen, von denen zeitgleich Blutproben entnommen wurden, um drei verschiedene autologe Bluterzeugnisse (thrombozytenreiches Plasma, Thrombozytenlysat und ACS) herzustellen und zu vergleichen (Ergebnisse anderweitig publiziert; Ionita et al. 2016). Geplant war es gleichzeitig von allen diesen Tieren zusätzlich Knochenmark für die vorliegende Studie (Studie B) zu entnehmen und zu verarbeiten, um die Ergebnisse intraindividuell vergleichen zu können. Da es aber bei zwei Pferden nicht möglich war Blut und Knochenmark gleichzeitig zu gewinnen, wurden nur zehn Tiere sowohl in Studie A und Studie B einbezogen, um deren Blut-ACS und Knochenmark-ACS im zweiten Teil der vorliegenden Studie direkt vergleichen zu können. Um die geplante Anzahl an 12 Tieren im ersten Teil der vorliegenden Studie zu erreichen, wurden zwei Pferde zusätzlich herangezogen. Es handelte sich insgesamt um 12 Warmblüter mit ungestörtem Allgemeinbefinden und einem mittleren Alter von 13 ± 8 Jahren (2 Stuten, 10 Wallache).

Alle Pferde waren Eigentum des Instituts für Tierernährung der Universität Leipzig. Die Befunde der allgemeinen klinischen Untersuchungen und die Blutbildergebnisse der Pferde am Tag der Probenentnahme befanden sich im Normbereich. Alle Pferde wurden unter den gleichen Bedingungen in Einzelboxen der Chirurgischen Tierklinik der Universität Leipzig gehalten und hatten freien Zugang zu Heu und Wasser. Die Tiere erhielten für mindestens vier Wochen vor Beginn und während der Studie keine Medikamente.

Knochenmarkentnahme

Für die Knochenmarkgewinnung wurden die Pferde in einen Untersuchungsstand geführt und mit einer Kombination von 0,05 mg/kg Romifidin (Sedivet[®], Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland) und 0,04 mg/kg Butorphanol (Alvegesic[®], CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) intravenös sediert. Die Knochenmarkgewinnung und die entsprechende Vorbereitung wurden so durchgeführt wie in einer früheren Studie beschrieben (Kasashima et al. 2011). In Kürze: nach ultrasonographischer Lokalisierung der fünften Sternebra wurde das darüber liegende Hautareal geschoren, aseptisch vorbereitet und anschließend subkutan bis zum Periost mit insgesamt 12 ml Mepivacain (Scandicain[®] 2%, Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland) lokal anästhesiert. Nach einer Schnittinzision der Haut bis zum Knochen mit einer sterilen Skalpellklinge (Nr. 11, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) wurde eine 10 cm lange 11 G Knochenmarkspunktionskanüle (Walter Veterinärinstrumente e. K., Baruth, Deutschland) vorsichtig in die fünfte Sternebra eingeführt. Hierfür wurde wie von Kasashima et al. beschrieben der Zeigefinger 2 cm über der Haut an die Nadel angelegt und die Nadel lediglich soweit vorgeschoben, bis der Finger die Haut berührt um die Eindringtiefe zu kontrollieren. Zehn Milliliter Knochenmark wurden in je drei mit 1 ml Acid-Citrate-Dextrose A (ACD-A, noClot-400[™], Cytosol Laboratories, Braintree, USA) vorgefüllten 12 ml großen Poly-

propylen Spritzen (DEHP[™], Healthcare Products, Denver, USA) aufgezogen. Dies diente der Herstellung des Knochenmarksüberstands (KMÜ) und des lysierten Knochenmarksüberstands (LysKMÜ) (Foster et al. 2009, Amoczky et al. 2011). Nach leichter Umplatzierung der Knochenmarkspunktionskanüle in der gleichen Sternebra wurden weitere 10 ml Knochenmark in je zwei der kommerziell erhältlichen Orthokin[®] 10 ml Vet Spritzen (Orthogen Veterinary GmbH, Düsseldorf, Deutschland) zur Herstellung von Knochenmark-ACS (KM-ACS) aspiriert. Die Reihenfolge der Befüllung der Spritzen wurde von Tier zu Tier geändert, so dass Knochenmark bei sechs Pferden zuerst zur Herstellung von KMÜ (und LysKMÜ) und bei den anderen sechs Pferden zuerst für die Gewinnung von KM-ACS entnommen wurde, um zu gewährleisten, dass die Reihenfolge der Entnahme keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat.

Vorbereitung der drei verschiedenen Knochenmarkerzeugnisse

Das antikoagulierte Knochenmark aus den drei Polypropylen Spritzen wurde nach der Entnahme direkt in drei Polypropylenzentrifugationsröhrchen (12 ml, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) umgefüllt, die unmittelbar mit 189 g für fünf Minuten zentrifugiert (Rotofix 32A[®], Rotor 1324, Andreas Hettich, GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) wurden. Anschließend wurde deren Überstand inklusive Buffy Coat in eine 12 ml Polypropylenspritze aspiriert. Ein halber Milliliter des KMÜ wurde in eine 2 ml Polypropylenspritze transferiert und hämatologisch untersucht. Der übrige gewonnene KMÜ wurde gleichmäßig in zwei weitere 12 ml Polypropylenröhrchen aufgeteilt. Einem Teil wurde direkt ein nicht-ionisches Detergenz (Triton[™] X-100, Sigma, Saint Louis, USA) hinzugefügt, um eine 5%-ige finale Konzentration des Detergenz in der Probe zu erreichen (Burnouf et al. 2008). Ziel war eine Zellyse in dieser KMÜ Fraktion zu induzieren (LysKMÜ), damit die in den Zellen enthaltenen Wachstumsfaktoren freigesetzt werden. So konnte das intrinsische Gesamtpotential der Zytokine im KMÜ bestimmt werden. Nach 20 Minuten Einwirkzeit bei Raumtemperatur folgte eine weitere Zentrifugation bei 3000 g für 10 Minuten. Die andere nicht-lysierte Hälfte des KMÜ wurde in gleicher Weise zentrifugiert. Beide Erzeugnisse wurden nach der Zentrifugation jeweils in eine 12 ml Polypropylen Spritze separat aspiriert (ohne das Pellet auf dem Boden der Röhrchen mit einzubeziehen).

Die beiden Orthokin[®] 10 ml Vet-Spritzen wurden direkt nach der Knochenmark Entnahme zuerst für 8 Stunden bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert (Melag oHG, Berlin, Germany), bevor sie für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand (KM-ACS) in eine 12 ml Polypropylen Spritze aufgezogen.

Vorbereitung des Blut-ACS

Am Tag des Experiments wurde nach aseptischer lokaler Vorbereitung der Haut ein 14 G Venenkatheter (Vasofix[®], B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) in die linke Jugularvene der Pferde platziert. Zehn Minuten vor der Knochenmark Entnahme wurden hieraus 10 ml Vollblut in zwei Orthokin[®] Vet 10 ml Spritzen (Orthogen Veterinary GmbH, Düsseldorf, Deutschland) aspiriert und umgehend in einen Inkubator (Melag

oHG, Berlin, Deutschland) transferiert. Nach 8-stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die Proben für 10 Minuten bei 3000g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (Blut-ACS) in eine 12ml Polypropylen Spritze aufgezogen.

Kryokonservierung

Der Inhalt aller End-Spritzen (KMÜ, LysKMÜ, KM-ACS und Blut-ACS) wurde durch einen Spritzenaufsatzfilter (Millex® GP 0,22µm, Millipore, Tullagreen, Irland) filtriert und jeweils in vier Kryokonservierungsröhrchen (Cryotubes 2.0ml, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) gleichmäßig aufgeteilt. Alle Proben wurden bis zur Messung der Zytokinkonzentrationen bei -80°C gelagert.

Messung der humoralen Zytokinkonzentrationen

Jeweils ein Röhrchen wurde für die Messung eines einzelnen Zytokins eines Endproduktes benutzt. Für die Messung der TGF-β₁ und PDGF-BB-Konzentrationen, wurden kommerziell erhältliche kolorimetrische „Sandwich“ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kits (human TGF-β₁ QKit® bzw. human PDGF-BB Quantikine®, R&D, Minneapolis, USA) verwendet. Ein pferdespezifisches ELISA-Kit wurde für die Bestimmung der IL-1Ra-Konzentrationen genutzt (Equine IL-1Ra Duo Set®, R&D, Minneapolis, MN, USA). Die IGF-1-Konzentration wurde mit einem nicht-kommerziellen, für Pferde validierten ELISA des Veterinär-physiologisch-chemischen Institutes der Universität Leipzig bestimmt. Vor den eigentlichen Messungen wurde die Linearität der Kits geprüft, wie in der Studie von Kissich et al. (2012) beschrieben. Bei jeder Versuchsreihe wurde je ein Aliquot als Kontrollprobe eingesetzt. Für die Kontrollproben ließ sich bei drei Ansätzen keine Interassay-Varianz ableiten. Die Proben wurden nach Bedarf verdünnt und alle Messungen wurden doppelt durchgeführt.

Statistische Analyse

Die Daten wurden mit dem Programm SAS® 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, USA) für Windows® (Microsoft Inc., Redmond, USA) analysiert. Wenn sich die Zytokinkonzentration in einer Probe unter dem niedrigsten messbaren Wert des jeweiligen ELISA Kits befand, wurde dieser Probe der Wert der entsprechenden untersten Nachweisgrenze der respektiven Zytokinkonzentration des jeweiligen Kits zugeschrieben, um eine statistische Analyse zu ermöglichen. Deskriptive statistische Analyse und visuelle Inspektion der Daten im Grafik Format wurde zuerst durchgeführt, um über die folgenden statistischen Tests zu entscheiden.

Für den Vergleich zwischen den verschiedenen Knochenmark Erzeugnissen sowie zwischen KM-ACS und Blut-ACS, wurden die nicht-normal verteilten Daten vor der eigentlichen statistischen Analyse logarithmisch transformiert, um wenn möglich Normalität zu erreichen. In diesen Fällen sind die Daten mit Medianwert, Interquartilsabstand sowie 25% und 75% Quartilen in der deskriptiven Statistik angegeben. Bei den normalverteilten Originaldaten werden die Mittelwerte, Standardabweichungen sowie minimale und maximale Werte benannt. Für den Vergleich zwischen den Knochenmark Erzeugnissen

wurde für die transformierten sowie für die nicht-transformierten normal-verteilten Daten beim Erreichen einer normalen Verteilung eine Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen mit der Prozedur "Proc Mixed" von SAS® durchgeführt. Für die post-hoc paarweisen Vergleiche der entsprechenden Werte wurden gepaarte Tukey Tests verwendet. Wenn für ein Zytokin mehrere Werte unter der Nachweisgrenze lagen (bzw. bei Vorhandensein von Ausreißerwerten) wurde die Voraussetzung der ANOVA nicht erfüllt (keine Normalverteilung) und eine nicht-parametrische Methode (Wilcoxon-Test) ausgeführt. Im Fall des Vergleiches unterschiedlich verteilter Werte wurden die Vergleiche in der folgenden Reihenfolge durchgeführt: nicht-parametrische Verfahren, Vergleich von log-transformierten Werten und Analyse der Originalwerte.

Beim Vergleich der Zytokinkonzentrationen zwischen Blut-ACS und KM-ACS wurden die schon parametrischen und die logarithmisch transformierten normalverteilten Daten mit T-Tests für gepaarte Proben verglichen. Wenn die logarithmisch transformierten Daten immer noch keine Normalität zeigten, wurden sie mit einem Wilcoxon Test für gepaarte Proben getestet. Im Falle des Vergleichs unterschiedlich verteilter Werte wurden auch hier die Vergleiche in der folgenden Reihenfolge durchgeführt: nicht-parametrische Verfahren, Vergleich von log-transformierten Werten und Analyse der Originalwerte.

Die statistischen Analysen wurden stets mit und ohne Einbezug der Ausreißerwerte durchgeführt, wodurch sich allerdings kein relevanter Einfluss auf die statistische Signifikanz ergab. Für alle Tests wurde die statistische Signifikanz auf $P < 0,05$ festgelegt. (* Produkte unterscheiden sich schwach signifikant ($P < 0,05$) voneinander; ** Produkte unterscheiden sich signifikant ($P < 0,01$) voneinander; *** Produkte unterscheiden sich hoch signifikant ($P < 0,005$) voneinander.)

Ergebnisse

Volumina

Für alle Erzeugnisse betrug das Ausgangsvolumen des Substrates 10 ml. Das größte Endvolumen von ca. 4 ml wies Blut-ACS auf, gefolgt von KMÜ (ca. 3,5ml) und KM-ACS (ca. 2,5 ml). Die mittlere Thrombozytenkonzentration im KMÜ war $46,8 (\pm 27,5) \times 10^9/l$ und die der Leukozyten war $13,7 (\pm 12,3) \times 10^9/l$.

Teil 1: Vergleich zwischen den Knochenmarkserzeugnissen

Die deskriptive Statistik der Zytokinkonzentrationen ist in der Tabelle 1 zusammengefasst. IGF-1: Die medianen IGF-1-Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Erzeugnissen (Abb. 1). PDGF-BB: Zwischen LysKMÜ und KM-ACS lag kein signifikanter Unterschied vor. Sowohl im LysKMÜ ($P = 0,007$) als auch im KM-ACS ($P = 0,019$) war die mittlere PDGF-BB-Konzentration signifikant höher als im KMÜ (Abb. 2). TGF-β₁: Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen LysKMÜ und KM-ACS. Die mittlere TGF-β₁-Konzentration im KM-ACS war signifikant höher als im KMÜ ($P = 0,013$) (Abb. 3). IL-1Ra: Die mediane IL-1Ra-Konzentration im KMÜ war signifikant niedriger als in den beiden anderen Erzeugnissen ($P < 0,005$) (Abb. 4).

Teil 2: Vergleich zwischen Blut ACS und Knochenmark ACS

Die deskriptive Statistik der Zytokinkonzentrationen beider Produkte ist in der Tabelle 2 zusammengefasst. Blut-ACS zeigte eine statistisch signifikant höhere mediane Konzentration

von IGF-1 ($P=0,007$; Abb. 5) und eine statistisch signifikant höhere mittlere Konzentration von PDGF-BB ($P=0,001$; Abb. 6) als KM-ACS. Die mittlere TGF- β_1 - und mediane IL-1Ra-Konzentration zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Blut- und KM-ACS (Abb. 7 und Abb. 8).

Tab. 1 Deskriptive Statistik der IGF-1, PDGF-BB, TGF- β_1 und IL-1Ra Konzentrationen in KMÜ, LysKMÜ und KM-ACS. Die Werte sind auf 2 Dezimalstellen nach dem Komma gerundet. ([°] Hier wurde (n) Probe (n) in der (denen) sich die jeweilige Zytokinkonzentration unter der Nachweisgrenze befand berücksichtigt; MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum)
Descriptive statistics of the IGF-1, PDGF-BB, TGF- β_1 and IL-1Ra concentrations in bone marrow supernatant (KMÜ), lysed bone marrow supernatant (LysKMÜ) and bone marrow-derived ACS (KM-ACS). Values are rounded to 2 decimals after the decimal point. ([°] including sample(s) in which the respective cytokine concentration was under the limit of detection; MW: mean value; SA: standard deviation; Min: minimum; Max: maximum; Interquartilsabstand: interquartile range).

		KMÜ	LysKMÜ	KM-ACS
IGF-1 (ng/ml)	n	12	12	12
	Median	44,5 [°]	63,5 [°]	59,8 [°]
	Interquartilsabstand	29,38	28,38	30,63
	25% Interquartile	35,38	50,75	49,75
	75% Interquartile	64,75	79,13	80,38
PDGF-BB (ng/ml)	n	12	12	12
	MW (\pm SA)	0,31 (\pm 0,56)	0,39 (\pm 0,19)	0,38 (\pm 0,2)
	Min/Max	0,0/2,0	0,1/0,7	0,1/0,7
TGF- β_1 (ng/ml)	n	12	12	12
	MW (\pm SA)	3,30 (\pm 1,68) [°]	4,65 (\pm 1,72) [°]	5,65 (\pm 2,24)
	Min/Max	1,2/5,7	1,2/8,0	2,2/9,8
IL-1Ra (ng/ml)	n	12	12	12
	Median	0,8 [°]	4,8 [°]	5,3
	Interquartilsabstand	0	6,59	19,35
	25% Interquartile	0,8	0,8	1,94
	75% Interquartile	0,8	7,39	21,29

Tab. 2 Deskriptive Statistik der IGF-1, PDGF-BB, TGF- β_1 und IL-1Ra-Konzentrationen im Blut-ACS und KM-ACS. ([°] Hier wurde(n) Probe(n) in der (denen) sich die jeweilige Zytokinkonzentration unter der Nachweisgrenze befand berücksichtigt; MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum)
Descriptive statistics of the IGF-1, PDGF-BB, TGF- β_1 and IL-1Ra concentrations in blood-derived ACS (Blut-ACS) and bone marrow-derived ACS (KM-ACS). Values are rounded to 2 decimals after the decimal point. ([°] including sample(s) in which the respective cytokine concentration was under the limit of detection; MW: mean value; SA: standard deviation; Min: minimum; Max: maximum; Interquartilsabstand: interquartile range)

		Blut-ACS	KM-ACS
IGF-1 (ng/ml)	n	10	10
	Median	85,75	59,75 [°]
	Interquartilsabstand	50,88	29,63
	25% Interquartile	64,0	47,5
	75% Interquartile	114,88	77,13
PDGF-BB (ng/ml)	n	10	10
	MW (\pm SA)	0,97 (\pm 0,26)	0,4 (\pm 0,21)
	Min/Max	0,69/1,49	0,13/0,72
TGF- β_1 (ng/ml)	n	10	10
	MW (\pm SA)	6,68 (\pm 1,47)	5,92 (\pm 2,32)
	Min/Max	5,14/9,19	2,21/9,77
IL-1Ra (ng/ml)	n	10	10
	Median	3,75	6,97
	Interquartilsabstand	14,56	25,55
	25% Interquartile	1,69	1,59
	75% Interquartile	16,25	27,14

Diskussion

Die Ziele der vorliegenden Studie waren, (1) herauszufinden, ob sich Knochenmark als Substrat zur Herstellung von ACS eignet und (2) Blut und Knochenmark als Ausgangssubstanzen zur Gewinnung von ACS gegenüberzustellen, indem der Gehalt an IGF-1, PDGF-BB, TGF- β_1 und IL-1Ra in den respektiven Endprodukten bestimmt und verglichen wurde. Die erzielten Ergebnisse sollten eine Aussage darüber ermöglichen, ob Knochenmark dem Blut als Ausgangssubstrat zur ACS-Erzeugung bezüglich der Anreicherung dieser vier wichtigen Zytokinen überlegen ist, bevor klinische Untersuchungen durchgeführt werden.

Die erste Hypothese dieser Arbeit konnte bestätigt werden, da die Inkubation von Knochenmark zur Anreicherung der Zytokine im KM-ACS geführt hat. Die zweite Hypothese konnte hingegen widerlegt werden, da kein Zytokin signifikant höhere Konzentrationen im KM-ACS als im Blut-ACS aufwies. Die Zytokinkonzentrationen wiesen zum Teil deutliche interindividuelle Unterschiede auf, wie es für autologe Blutprodukte typisch ist (Giraldo et al. 2013, Hessel et al. 2015, Ionita et al. 2016). Dies bestätigt, dass es sich bei Orthobiologika nicht um standardisierte Therapeutika handelt, was die Etablierung von Behandlungsprotokollen erschwert und somit keine zuverlässige individuelle Aussage über die enthaltenen Inhaltsstoffe bzw. deren Konzentrationen möglich ist.

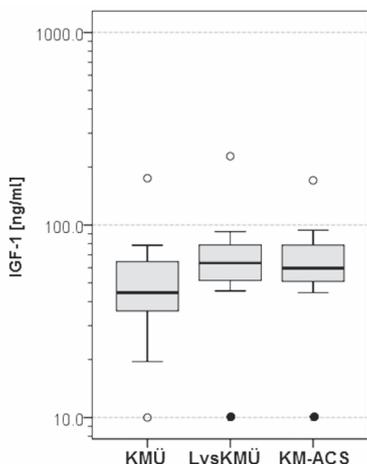


Abb. 1 Box Plots der logarithmisch transformierten IGF-1-Konzentrationen (ng/ml) in KMÜ, LysKMÜ und KM-ACS. (o Ausreißer; ● extremer Ausreißer)
 Box plots of the logarithmically transformed IGF-1 concentrations (ng/ml) in bone marrow supernatant (KMÜ), lysed bone marrow supernatant (LysKMÜ) and bone marrow-derived ACS (KM-ACS). (o outlier; ● extreme outlier)

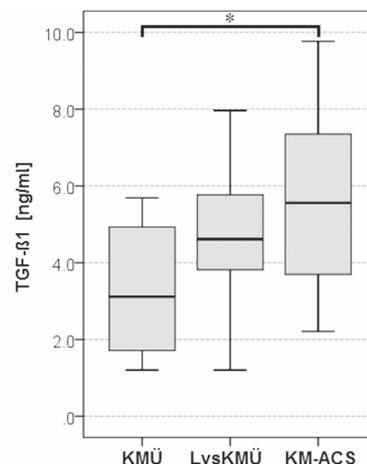


Abb. 3 Box Plots der TGF- β_1 -Konzentrationen (ng/ml) in KMÜ, LysKMÜ und KM-ACS. (* Produkte unterscheiden sich signifikant ($P < 0.05$) voneinander)
 Box plots of the TGF- β_1 concentrations (ng/ml) in bone marrow supernatant (KMÜ), lysed bone marrow supernatant (LysKMÜ) and bone marrow-derived ACS (KM-ACS). (*products differ significantly ($P < 0.05$) from each other)

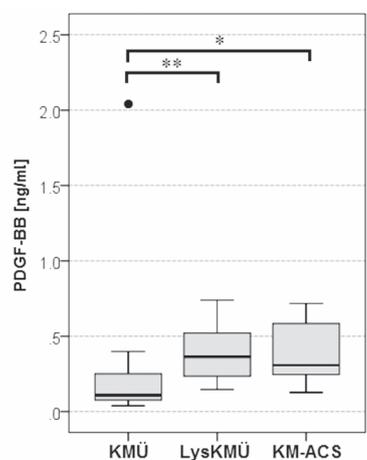


Abb. 2 Box Plots der PDGF-BB-Konzentrationen (ng/ml) in KMÜ, LysKMÜ und KM-ACS. (● extremer Ausreißer; * Produkte unterscheiden sich signifikant ($P < 0.05$) voneinander; ** Produkte unterscheiden sich signifikant ($P < 0.01$) voneinander)
 Box plots of the PDGF-BB concentrations (ng/ml) in bone marrow supernatant (KMÜ), lysed bone marrow supernatant (LysKMÜ) and bone marrow-derived ACS (KM-ACS). (● extreme outlier; * products differ significantly ($P < 0.05$) from each other; ** products differ significantly ($P < 0.01$) from each other)

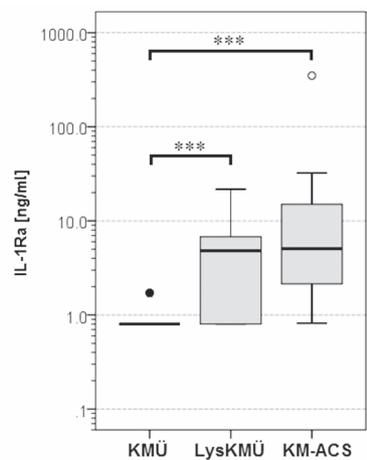


Abb. 4 Box Plots der logarithmisch transformierten IL-1Ra-Konzentrationen (ng/ml) in KMÜ, LysKMÜ und KM-ACS. (o Ausreißer; ● extremer Ausreißer; *** Produkte unterscheiden sich signifikant ($P < 0,005$) voneinander)
 Box plots of the logarithmically transformed IL-1Ra concentrations (ng/ml) in bone marrow supernatant (KMÜ), lysed bone marrow supernatant (LysKMÜ) and bone marrow-derived ACS (KM-ACS). (o outlier; ● extreme outlier; *** products differ significantly ($P < 0,005$) from each other)

Aufbereitung der Erzeugnisse

Da die Aufbereitung von KM-ACS eine Punktion des Sternums erforderte, war der Prozess deutlich invasiver und aufwendiger als die venöse Blutentnahme. Zwar stellt der Tuber coxae eine praktischere und risikoärmere Punktionsstelle als das Sternum zur Knochenmarkgewinnung dar, ist aber nur bei jungen Pferden empfehlenswert (Adams et al. 2013), da aus dem Os Ilium bei älteren Patienten ein geringerer Zellgehalt als aus dem Sternum gewonnen werden kann (Delling et al. 2012). Um zu tiefes Eindringen oder falsche Platzierung (welche zum Pneumothorax oder zu Verletzung kardialer Strukturen führen kann) zu verhindern, sollte die sternale Punktion außerdem ultraschallgestützt von einer erfahrenen Person durchgeführt werden (Kasashima et al. 2011). Für eine optimale Ausbeute an mesenchymalen Stromazellen wird in der

aktuellen Literatur die Entnahme an der fünften Sternebra in ca. 10mm Eindringtiefe in den Knochen empfohlen (Eyd et al. 2016). Leider wurde diese Literaturempfehlung erst nach der Durchführung der Versuche dieser Arbeit veröffentlicht. Da sich die hier durchgeführten Messungen aber auf die humoral enthaltenen Zytokine beziehen ist nicht zwingend eine Verminderung der Konzentrationen durch die gewählte Vorgehensweise zu erwarten. Das KM-ACS hätte jedoch vermutlich von einer größeren Zellpopulation profitiert, da diese während der Inkubation noch weitere Zytokine hätte freisetzen können.

Bei der Aspiration von Knochenmark gewinnt man abhängig von der Eindringtiefe zunächst eine relativ zellreiche Mischung, die mit zunehmendem Volumen eine abnehmende Zellularität aufweist, was durch „Verdünnung“ durch mitaspiertes Blut erklärt werden kann (Kasashima et al. 2011, Kisiday et al. 2013). Aus diesem Grund wurde die Entnahmereihenfolge der Knochenmarkproben zur Herstellung von KM-ACS und KMÜ von Pferd zu Pferd geändert. Der statistische

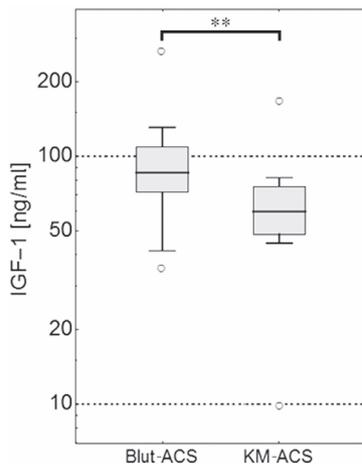


Abb. 5 Box Plots der logarithmisch transformierten IGF-1-Konzentrationen (ng/ml) in Blut-ACS und KM-ACS. (o Ausreißer; ** Produkte unterscheiden sich signifikant ($P < 0.01$) voneinander).

*Box plots of the logarithmically transformed IGF-1 concentrations (ng/ml) in blood-derived ACS (Blut-ACS) and bone marrow-derived ACS (KM-ACS). (o outlier; ** products differ significantly ($P < 0.01$) from each other)*

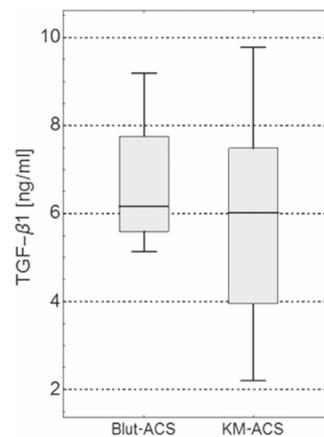


Abb. 7 Box Plots der TGF- β_1 -Konzentrationen (ng/ml) in Blut-ACS und KM-ACS

Box plots of the TGF- β_1 concentrations (ng/ml) in blood-derived ACS (Blut-ACS) and bone marrow-derived ACS (KM-ACS).

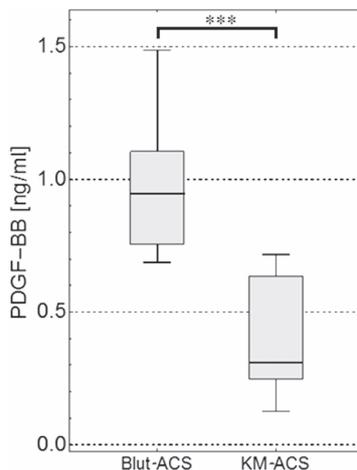


Abb. 6 Box Plots der PDGF-BB-Konzentrationen (ng/ml) in Blut-ACS und KM-ACS. (***) Produkte unterscheiden sich signifikant ($P < 0,005$) voneinander.

*Box plots of the PDGF-BB concentrations (ng/ml) in blood-derived ACS (Blut-ACS) and bone marrow-derived ACS (KM-ACS). (***) products differ significantly ($P < 0,005$) from each other.)*

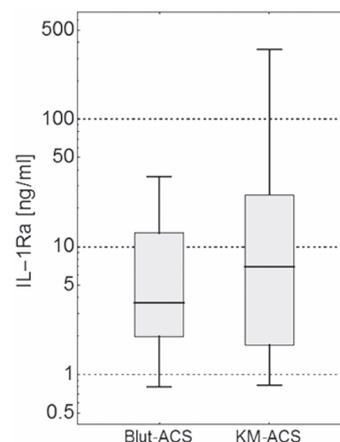


Abb. 8 Box Plots der logarithmisch transformierten IL-1Ra-Konzentrationen (ng/ml) in Blut-ACS und KM-ACS

Box plots of the logarithmically transformed IL-1Ra concentrations (ng/ml) in blood-derived ACS (Blut-ACS) and bone marrow-derived ACS (KM-ACS).

Vergleich zwischen den ersten und zweiten Aspiratfraktionen ergab für die hier entnommenen Knochenmarkvolumina allerdings keine signifikanten Unterschiede bezüglich deren Zytokinanreicherungsvermögen (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Bei der Aufbereitung des KMÜ kam es in den verwendeten Spritzen trotz der Nutzung von ACD-A zu spontaner Teilkoagulation in mehreren Proben. Deswegen waren einige Zellen und ein Teil der freigesetzten Zytokine vermutlich in Fibrinnetzen gefangen, sodass sie anschließend nicht im Plasma vorhanden und somit nicht messbar waren (Araki et al. 2012, Dohan Ehrenfest et al. 2012). Um dies zu verhindern sollte bei weiteren Untersuchungen ggf. proportional mehr ACD-A verwendet oder ein anderes Antikoagulans getestet werden. Für die Herstellung von KMÜ wurde das Plasma (mit Thrombozyten und Leukozyten) von der „roten“ Zellfraktion getrennt. Zytologische Vormessungen haben gezeigt, dass die hier verwendeten Zentrifugationsparameter die optimale Ausbeute der Leukozyten und Thrombozyten erbrachten. Bei der Verwendung anderer Zentrifugationseinstellungen sind vermutlich abweichende Zell- und somit besonders bei LysKMÜ auch entsprechend andere Zytokinkonzentrationen zu erwarten.

Allgemeiner Vergleich der drei Knochenmark-Erzeugnisse

Die Anreicherung der vier Zytokine konnte sowohl im LysKMÜ und im KM-ACS nachgewiesen werden. Die im KMÜ gemessenen Zytokine sind die, die schon in humoraler Form vorlagen, da die Zellen vor dem Einfrieren der Proben herausfiltriert wurden. Da das rote Knochenmark stark durchblutet wird, stammte ein Teil dieser Moleküle vermutlich aus dem Blutplasma (Kisiday et al. 2013) während ein anderer Anteil aus den Knochenmarkszellen freigesetzt wurde (Takahashi et al. 2006, Korf-Klingebiel et al. 2008, Soltan et al. 2009). Die Erhöhung der jeweiligen Zytokinkonzentrationen nach der detergenten Lyse des KMÜ erklärt sich dadurch, dass durch die Zerstörung der Thrombozyten und Leukozyten (und eventuell eines geringen Anteils anderer beinhaltenen Zellarten) im Überstand weitere zuvor intrazelluläre Zytokine frei werden (Burnouf et al. 2008, Ionita et al. 2016). Die Knochenmark-Inkubation zur Herstellung von KM-ACS induziert die Freisetzung von Mediatoren aus den enthaltenen Zellen und erklärt somit deren höhere Konzentrationen im KM-ACS verglichen mit dem KMÜ. Da für die Herstellung des ACS die gesamte Zellfraktion des Knochenmarks und nicht hauptsächlich die Leukozyten und Thrombozyten wie im LysKMÜ genutzt wurde, wurde vermutlich noch eine Vielzahl anderer nicht thrombozyten- bzw. leukozytenspezifischer Moleküle freigesetzt, die aus unterschiedlichen Zellarten stammen und weitere wundheilungsfördernde Eigenschaften aufweisen könnten. Diese wurden aber in dieser Studie nicht gemessen.

Das Endvolumen von KM-ACS war geringer als das von KMÜ, wodurch die Zytokine im KM-ACS stärker konzentriert wurden, was mitverantwortlich für die Zytokinanreicherung in diesem Präparat war (geringerer Verdünnungseffekt). Auf der anderen Seite war möglicherweise ein großer Teil der freigesetzten Mediatoren im Koagulat gefangen und stand somit für die Messung der humoralen Moleküle im Serum nicht zur Verfügung (Araki et al. 2012, Dohan Ehrenfest et al. 2012). Eine längere und stärkere Zentrifugation hätte eventuell eine ver-

besserte Freisetzung der Zytokine bewirkt. Grundsätzlich war das gewonnene Endvolumen des KM-ACS (ca. 2,5 ml), welches mit dem spezifischen kommerziellen System hergestellt wurde, relativ gering und somit eventuell für einige Indikationen wie zum Beispiel die Gelenksbehandlung beim Pferd nicht ausreichend (Weinberger 2008).

Vergleich der Zytokine in den Knochenmark-Erzeugnissen

IGF-1 ist ein plasmaspezifisches Molekül, welches hauptsächlich in der Leber produziert wird und von Thrombozyten z.B. durch Endozytose aufgenommen werden kann (Yakar et al. 2002, Anitua et al. 2004). Dies erklärt, wieso bereits im KMÜ eine relativ hohe Konzentration gemessen wurde und nur ein nicht-signifikanter Anstieg nach Lyse der Zellen im KMÜ bzw. nach Inkubation von Knochenmark verzeichnet wurde.

PDGF-BB ist vor allem thrombozytenspezifisch, weshalb es nach Thrombozytenlyse im LysKMÜ die höchste messbare Konzentration erreicht hat (Anitua et al. 2004, Textor 2014). Vor der Lyse der Zellen ist dieser Mediator nur in sehr geringer Menge im KMÜ nachweisbar, da er sich hier noch fast ausschließlich intrazellulär und nicht frei im Plasma befindet. Durch den Koagulationsprozess bei der KM-ACS Herstellung wird ebenfalls eine Freisetzung und damit ein Konzentrationsanstieg von PDGF-BB erreicht. Der extreme Ausreißerwert im KMÜ wurde in einer Probe gemessen, welche eine besonders starke spontane Koagulation zeigte, wodurch wahrscheinlich die enthaltenen Thrombozyten voraktiviert wurden.

Wie bei PDGF-BB ist im KMÜ eine humorale Basiskonzentration von TGF- β_1 messbar, die ebenfalls nach chemischer Lyse der enthaltenen Thrombozyten und Leukozyten steigt, jedoch nicht signifikant. TGF- β_1 wird allerdings nicht nur von diesen Zellen, sondern auch von anderen Zelltypen des Knochenmarks freigesetzt (Korf-Klingebiel et al. 2008, McCarrel und Fortier 2009, Soltan et al. 2009, Fortier et al. 2010). Da diese lediglich während der KM-ACS-Produktion anwesend waren, sind diese Zellen wahrscheinlich für die signifikant höhere TGF- β_1 -Konzentration in diesem Erzeugnis verantwortlich.

Wie erwartet, konnte IL-1Ra mit Ausnahme einer Probe im KMÜ nicht humoral nachgewiesen werden, da es ein intrazelluläres Molekül ist, welches normalerweise erst nach Stimulation hauptsächlich durch Monozyten im Blut in höheren Mengen synthetisiert und freigesetzt wird (Danis et al. 1995, Burger und Dayer 2000). Sowohl durch Lyse der Leukozyten im KMÜ wie auch durch die gerinnungsinduzierte Freisetzung kommt es zu einem hoch signifikanten Anstieg der Konzentration.

Vergleich von Blut und Knochenmark als Substrat für ACS-Produktion

Der direkte Vergleich der Substrate Blut und Knochenmark zur Herstellung von ACS bei 10 Pferden zeigte, dass das Blut im Falle von IGF-1 und PDGF-BB statistisch signifikant höhere Werte als Knochenmark erbringen konnte, trotz eines höheren Verdünnungseffekts im Blut-ACS als im KM-ACS (4,0 ml bzw. 2,5 ml aus den initialen 10 ml). Megakaryozyten stellen im Knochenmark die Hauptquelle von PDGF-BB dar (Anton-

ades 1991, Rendu und Brohard-Bohn 2001) und scheinen durch den Koagulationsprozess geringere Mengen dieses WF freizusetzen als deren Abkömmlinge, die Thrombozyten, im Blut-ACS. Möglicherweise lassen sich die Megakaryozyten aus dem Knochenmark durch die stattfindende Gerinnung im Röhrchen nicht (bzw. deutlich weniger als die Thrombozyten im Blut) aktivieren, weshalb die Konzentrationen von PDGF-BB (und zum Teil auch von IGF-1) im KM-ACS signifikant niedriger waren als im Blut-ACS. Eine kleine Menge des IGF-1 wird ebenfalls von Thrombozyten freigesetzt, aber wie bereits erwähnt, ist dieser WF vor allem ein plasmaspezifisches Molekül, was vermutlich eher für die höhere Konzentration im Blut-ACS verantwortlich ist. Außerdem zeigte das Knochenmark eine höhere Tendenz zur spontanen Koagulation als das Blut, weshalb möglicherweise ein größerer Anteil der freigesetzten WF im Koagulat des Knochenmarks gefangen blieb (Araki et al. 2012, Dohan Ehrenfest et al. 2012).

Die Konzentration von TGF- β_1 war im Blut-ACS nicht-signifikant höher als im KM-ACS. Dieser WF ist ebenfalls in relativ großen Mengen in Thrombozyten zu finden, sodass man auch hier eine signifikant höhere Konzentration im Blut-ACS, parallel zu TGF- β_1 und PDGF-BB, hätte erwarten können. Eine mögliche Ursache für die ähnlichen Konzentrationen von TGF- β_1 in Blut- und KM-ACS kann durch die Tatsache erklärt werden, dass auch Leukozyten und andere Zellen, welche sich im Knochenmark befinden diesen WF enthalten und während des Inkubationsprozess freisetzen (Liu et al. 2006).

IL-1Ra war das einzige Zytokin, welches im KM-ACS etwas höhere Konzentrationen als im Blut-ACS aufwies. Dies war allerdings statistisch nicht signifikant. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass, zusätzlich zu dem geringeren Verdünnungseffekt, das Knochenmark weitere Zellarten (neben Leukozyten/Monozyten) beinhaltet, die in der Lage sind dieses Molekül zu synthetisieren und freizusetzen (Prockop und Oh 2012, Isoda et al. 2014).

Limitierung dieser Studie

In der vorliegenden Studie wurden lediglich vier klinisch relevante Zytokine untersucht. Allerdings spielen bei der Gewebeheilung deutlich mehr Zellmediatoren und weitere Moleküle eine Rolle. Andere Zytokine, wie epidermal growth factor, fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor und connective tissue growth factor, die einen starken Einfluss auf die Gewebsregeneration haben, sind in der vorliegenden Studie nicht untersucht worden (Barrientos et al. 2008, Nurdan et al. 2008). Deswegen wäre es interessant in nachfolgenden Untersuchungen herauszufinden, ob bestimmte Zytokine sich vermehrt in KM-ACS anreichern lassen, um sie therapeutisch zu nutzen. Auch wenn in den vorgestellten Ergebnissen eine stärkere Anreicherung von drei der vier Zytokinen im Blut-ACS beobachtet wurde, bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass dieses Produkt eine bessere In vivo-Wirkung aufweist. Zusätzlich zieht eine größere Menge an Zellmediatoren nicht unbedingt eine verbesserte Geweberegeneration nach sich, so dass eine Überprüfung dieser Effekte in einer kontrollierten In vivo-Studie erfolgen müsste (Giusti et al. 2009). Für die Bestimmung der TGF- β_1 und PDGF-BB-Konzentrationen wurden humanspezifische ELISA-Kits verwendet, für die aber einerseits bereits in vorangegangenen Studien Kreuzreaktio-

nen mit Pferdeantikörpern nachgewiesen wurden (Sutter et al. 2004, Schnabel et al. 2008, Tablin et al. 2008) und andererseits von der Arbeitsgruppe der vorliegenden Studie ebenfalls für das Pferd validiert wurden (Kissich et al. 2012). Hervorzuheben ist, dass in der vorliegenden Arbeit ausschließlich In vitro-Messungen durchgeführt wurden, deren klinische Relevanz es noch in folgenden In vivo-Versuchen zu untersuchen gilt. Um eine statistische Analyse zu ermöglichen wurden Zytokine, welche nicht messbar waren mit dem niedrigsten messbaren Wert des jeweiligen ELISA-Kits gleichgesetzt, wie es auch in anderen Studien durchgeführt wurde (Ward und Fernandes 2000, Parkitny et al. 2013). Hierdurch entstanden keine negativen Auswirkungen auf die Interpretation der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass Knochenmark als Substrat zur Herstellung von ACS verwendet werden kann, wobei es außer für IL-1Ra eine geringere Anreicherung der hier bestimmten Zytokine als Blut-ACS zeigte. Somit bietet die invasivere und damit auch mit höheren Risiken verbundene Entnahme von Knochenmark eventuell keinen Vorteil gegenüber der Nutzung von Blut in diesem Zusammenhang. Weiterführende In vitro-Studien sind notwendig, um herauszufinden, ob zusätzliche wichtige anabole und anti-katabole Moleküle in KM-ACS angereichert werden können, um den höheren Aufwand und das größere Risiko zu rechtfertigen. Zu bedenken ist allerdings, dass nur In vivo-Versuche eine Aussage über die klinische Anwendbarkeit und den therapeutischen Nutzen von KM-ACS zulassen.

Finanzierung

Diese Studie wurde von den Firmen Orthogen GmbH und Curasan AG teilfinanziert.

Interessenkonflikt

Keiner der Autoren dieser Studie wurde für die Durchführung dieses Projektes bezahlt. Die Firmen hatten keinen Einfluss auf die Interpretation der Daten und auf das Manuskript dieser Arbeit.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich ganz herzlich bei Frau PD Dr. Ingrid Vervuert und bei Prof. Thomas Vahlenkamp und seinen Mitarbeitern für ihre wertvolle Unterstützung.

Literatur

- Adams M., Goodrich L., Rao S., Olea Popelka F., Phillips N., Kisiday J., McIlwraith C. (2013) Equine bone marrow derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: Are there differences? *Equine Vet. Jour.* 45, 372-375
- Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nурden P., Nурden A. T. (2004) Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 91, 4-15
- Antoniades H. (1991) 4-PDGF: a multifunctional growth factor, *Bailliere's Clin. Endocrinol. Metab.* 5, 595-613
- 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 Eng. Part C* 18, 176-185
- Amoczky S. P., Delos D., Rodeo S. A. (2011) What is platelet-rich plasma? *Oper. Techn. Sport. Med.* 19, 142-148
- Backly R. E., Ulivi V., Tonachini L., Cancedda R., Descalzi F., Mastrogiacomo M. (2011) Platelet lysate induces in vitro wound healing of human keratinocytes associated with a strong proinflammatory response. *Tissue Eng. Part A* 17, 1787-1800
- Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M. S., Brem H., Tomic Canic M. (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 16, 585-601
- Boswell S. G., Cole B. J., Sundman E. A., Karas V., Fortier L. A. (2012) Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 28, 429-439
- Burger D., Dayer J.-M. (2000) IL-1Ra. In: *Cytokine Reference*, Herausgeber: Oppenheim J. J., Feldmann M., Academic Press, London, 319-336
- Burnouf T., Tseng Y. H., Kuo Y. P., Su C. Y. (2008) Solvent/detergent treatment of platelet concentrates enhances the release of growth factors. *Transfusion* 48, 1090-1098
- Chahla J., Dean C. S., Moatshe G., Pascual-Garrido C., Cruz R. S., LaPrade R. F. (2016) Concentrated Bone Marrow Aspirate for the Treatment of Chondral Injuries and Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Outcomes. *Orthopaed. J. Sports. Med.* 4, Epub
- Danis V., Millington M., Hyland V., Grennan D. (1995) Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin. Exp. Immunol.* 99, 303-10
- 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. *Can. J. Vet. Res.* 76, 52-6
- Dohan Ehrenfest D., Bielecki T., Jimbo R., Barbe G., Del Corso M., Inchingolo F., Sammartino G. (2012) Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 1145-1152
- Eydt C., Geburek F., Schröck C., Hambruch N., Rohn K., Pfarrer C., Staszuk 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.* Epub
- Fjordbakk C., Johansen G., Løvås A., Oppegård K., Storset A. (2015) Surgical stress influences cytokine content in autologous conditioned serum. *Equine Vet. J.* 47, 212-217
- Fortier L. A., Potter H. G., Rickey E. J., Schnabel L. V., Foo L. F., Chong L. R., Stokol T., Cheatham J., Nixon A. J. (2010) Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *J. Bone Joint Surg.* 92, 1927-1937
- Foster T. E., Puskas B. L., Mandelbaum B. R., Gerhardt M. B., Rodeo S. A. (2009) Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am. J. Sports Med.* 37, 2259-2272
- Fox B. A., Stephens M. M. (2010) Treatment of knee osteoarthritis with Orthokine-derived autologous conditioned serum. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 6, 335-345
- Frisbie D., Smith R. (2010) Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Vet. J.* 42, 86-89
- Frisbie D., Kawcak C. E., Wierpy N. M., Park R. D., McIlwraith C. W. (2007) Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am. J. Vet. Res.* 68, 290-296
- Geburek F., Lietzau M., Beineke A., Rohn K., Stadler P. M. (2015) Effect of a single injection of autologous conditioned serum (ACS) on tendon healing in equine naturally occurring tendinopathies. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 126-140
- Geburek F., Stadler P. (2011) Regenerative therapy for tendon and ligament disorders in horses. Terminology, production, biologic potential and in vitro effects. *Tierärztl. Prax. Grosstiere Nutztiere* 39, 373-83

- Giraldo C. E., Lopez C., Alvarez M. E., Samudio I. J., Prades M., Carmona J. U. (2013) Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet. Res.* 9, 29-39
- Giusti L., Rughetti A., D'Ascenzo S., Millimaggi D., Pavan A., Dell'Orso L., Dolo V. (2009) Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells. *Transfusion* 49, 771-778
- Grondin T. M., Dewitt S. F. (2010) Normal hematology of the horse and donkey. In: Schalm's Veterinary Hematology, Herausgeber: Weiss D. J., Wardrop K. J., Iowa State Press, Ames, Iowa, USA, 6. Auflage, 821-828
- Hall M., Vasey J., Russell J., Russell T. (2013) Use of ultrasound guided autologous bone marrow transfer for treatment of suspensory ligament desmitis in 30 race horses (2003–2010). *Aust. Vet. J.* 91, 102-107
- Herthel D. J. (2001) Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components, In: AAEP 2001 Proceedings, 319-321
- Hessel L. N., Bosch G., van Weeren P. R., Ionita J. C. (2015) Equine autologous platelet concentrates: A comparative study between different available systems. *Equine V. J.* 47, 319-325
- Hraha T., Doremus K., McIlwraith C., Frisbie D. (2011) Autologous conditioned serum: the comparative cytokine profiles of two commercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood. *Equine V. J.* 43, 516-521
- Ionita C., Troillet A., Vahlenkamp T., Winter K., Brehm W., Ionita J.-C. (2016) Comparison of humoral insulin-like growth factor-1, platelet-derived growth factor-BB, transforming growth factor-1, and interleukin-1 receptor antagonist concentrations among equine autologous blood-derived preparations. *Am. J. Vet. Res.* 77, 898-905
- Ishihara A., Helbig H. J., Sanchez-Hodge R. B., Wellman M. L., Landrigan M. D., Bertone A. L. (2013) Performance of a gravitational marrow separator, multidirectional bone marrow aspiration needle, and repeated bone marrow collections on the production of concentrated bone marrow and separation of mesenchymal stem cells in horses. *Am. J. Vet. Res.* 74, 854-863
- Isoda K., Akita K., Isobe S., Niida T., Adachi T., Iwakura Y., Daida H. (2014) Interleukin-1 receptor antagonist originating from bone marrow-derived cells and non-bone marrow-derived cells helps to suppress arterial inflammation and reduce neointimal formation after injury. *J. Atheroscler. Thromb.* 21, 1208-1218
- Kasashima Y., Ueno T., Tomita A., Goodship A., Smith R. (2011) Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet. J.* 43, 288-294
- Kisiday J. D., Goodrich L. R., McIlwraith C. W., Frisbie D. D. (2013) Effects of equine bone marrow aspirate volume on isolation, proliferation, and differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 74, 801-807
- Kissich C., Gottschalk J., Lochmann G., Einspanier A., Böttcher P., Winter K., Brehm W., Ionita J.-C. (2012) Biochemische Eigenschaften des equinen Autologous Conditioned Plasma® (ACP). *Pferdeheilkunde* 28, 258-267
- Kol A., Walker N. J., Galuppo L. D., Clark K. C., Buerchler S., Bernanke A., Borjesson D. L. (2013) Autologous point-of-care cellular therapies variably induce equine mesenchymal stem cell migration, proliferation and cytokine expression. *Equine Vet. J.* 45, 193-198
- Korf-Klingebiel M., Kempf T., Sauer T., Brinkmann E., Fischer P., Meyer G.P., Ganser A., Drexler H., Wollert K. C. (2008) Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction. *Euro. Heart J.* 29, 2851-2858
- Künneke A., Jaugstetter H., Heyers P. (2008) Bone marrow-autologous conditioned plasma (BM-ACP) beim Pferd-erste klinische Erfahrungen einer neuen, autologen Therapieform bei der Behandlung von Sehnenkrankungen des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 24, 519-523
- Liu Y., Dulchavsky D. S., Gao X., Kwon D., Chopp M., Dulchavsky S., Gautam S. C. (2006) Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production. *J. Surg. Res.* 136, 336-341
- Lyras D., Kazakos K., Agrogiannis G., Verettas D., Kokka A., Kiziridis G., Chronopoulos E., Tryfonidis M. (2010) Experimental study of tendon healing early phase: is IGF-1 expression influenced by platelet rich plasma gel? *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* 96, 381-387
- McCarrel T., Fortier L. (2009) Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J. Orthop. Res.* 27, 1033-1042
- Nurden A. T., Nurden P., Sanchez M., Andia I., Anitua E. (2008) Platelets and wound healing. *Front. Biosci.* 13, 3532-3548
- Owens S. D., Burges J., Johns J. L., Carrade D. D., Galuppo L. D., Librach F., Borjesson D. L. (2011) Processing of equine bone marrow using the automated MarrowXpress System: RBC depletion, volume reduction, and mononuclear cell recovery. *Vet. Clin. Pathol.* 40, 444-449
- Parkitny L., McAuley J. H., Kelly P. J., Di Pietro F., Cameron B., Moseley G. L. (2013) Multiplex cytokine concentration measurement: how much do the medium and handling matter? *Mediators Inflamm.* Epub.
- Prockop D. J., Oh J. Y. (2012) Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol. Ther.* 20, 14-20
- Rendu F., Brohard-Bohn B. (2001) The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 12, 261-273
- Russell J. W., Russell T. M., Vasey J. R., Hall M. S. (2016) Autologous bone marrow aspirate for treatment of superficial digital flexor tendinitis in 105 racehorses. *Vet. Rec.* Epub.
- Schnabel L. V., Sonea H. O., Jacobson M. S., Fortier L. A. (2008) Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explant cultures. *Equine Vet. J.* 40, 260-265
- Smith J. J., Ross M. W., Smith R. K. (2006) Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 19, 43-47
- Smith R. K., Garvican E. R., Fortier L. A. (2014) The current state of play of regenerative medicine in horses: what the horse can tell the human. *Regen. Med.* 9, 673-685
- Soltan M., Smiler D., Choi J. H. (2009) *Bone marrow: orchestrated cells, cytokines, and growth factors for bone regeneration.* *Implant. Dent.* 18, 132-141
- Sutter W. W., Kaneps A. J., Bertone A. L. (2004) Comparison of hematologic values and transforming growth factor- and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *Am. J. Vet. Res.* 65, 924-930
- Tablin F., Walker N. J., Hogle S. E., Pratt S. M., Norris J. W. (2008) Assessment of platelet growth factors in supernatants from rehydrated freeze-dried equine platelets and their effects on fibroblasts in vitro. *Am. J. Vet. Res.* 69, 1512-1519
- Takahashi M., Li T.-S., Suzuki R., Kobayashi T., Ito H., Ikeda Y., Matsuzaki M., Hamano K. (2006) Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, 886-893
- Textor J. (2011) Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 27, 275-298
- Textor J. (2014) Platelet-rich plasma (PRP) as a therapeutic agent: platelet biology, growth factors and a review of the literature. In: *Platelet-rich plasma, regenerative medicine: sports medicine, orthopedic and recovery of musculoskeletal injuries.* Herausgeber: Lana J. F., Andrade Santana M. H., Dias Belangero W., Malheiros Luzo A. C., Springer, Berlin, 61-94
- Ward L., Fernandes G. (2000) Serum cytokine levels in autoimmune and non-autoimmune hyperthyroid states. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 65-69
- Wasterlain A. S., Braun H. J., Dragoo J. L. (2012) Contents and Formulations of Platelet-Rich Plasma. *Oper. Tech. Orthop.* 22, 33-42
- Wehling P., Moser C., Frisbie D., McIlwraith C. W., Kawcak C. E., Krauspe R., Reinecke J. A. (2007) Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic diseases. *BioDrugs* 21, 323-332
- Weinberger T. (2008) Klinische Erfahrungen mit der Anwendung von ACS/ORTHOKIN/IRAP beim Pferd. *Pferdespiegel* 3, 111-114
- Yakr S., Rosen C. J., Beamer W. G., Ackert-Bicknell C. L., Wu Y., Liu J.-L., Ooi G. T., Setser J., Frystyk J., Boisclair Y. R. (2002) Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J. Clin. Invest.* 110, 771-782