

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	9
Diagrammverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	11
Abkürzungsverzeichnis	12
1. Einleitung	14
1.1 Orthopädische Erkrankungen des Pferdes	14
1.2 Vorkommen und Häufigkeit von Verletzungen der Band- und Sehnenstrukturen	14
1.2.1 Therapieoptionen für Sehnerkrankungen	16
1.3 Gelenkerkrankungen	19
1.3.1 Therapieoptionen für Gelenkerkrankungen	22
1.4 Knochenfrakturen	23
1.4.1. Therapieoptionen von Knochenfrakturen	24
1.5 Stammzellen für zellbasierte Therapieverfahren bei orthopädischen Erkrankungen	25
1.6 Nicht- steroidale Antiphlogistika	28
1.6.1. Arachidonsäurekaskade und Cyclooxygenase	29
1.7 Zielsetzung	31
2. Literaturübersicht: Untersuchungen zum Einfluss von NSAID auf Zellen in der Kultur	32
3. Eigene Untersuchungen	34
3.1. Materialliste	34
3.1.1. Knochenmark	34
3.1.2. Geräte	34
3.1.3. Verbrauchsmaterialien	34
3.1.4. Lösungen und Reagenzien Zellkultur	35
3.1.5. Reagenzien Färbung, Fixierung, Einbettung	35
3.1.6. Reagenzien PCR	36
3.1.7. Nichtsteroidale Antiphlogistika	36
3.1.8. Verwendete Medien	36
3.2. Material und Methode	38

3.3. Aufbereitung und Anzucht der eMSC	38
3.4. Methode der Kryokonservierung der eMSC	41
3.5. Verwendete Substanzen der NSAID	42
3.6. Zellkinetik mit NSAID- Zusätzen	42
3.6.1 Verwendete Konzentrationen der NSAID	43
3.7. Berechnung der Generationsverdopplungen und der Generationszeit	43
3.8. Vitalitäts- und Proliferationsassay	43
3.9. Untersuchung zur Zellmigration unter NSAID- Einfluss.....	45
3.10. Untersuchung der Pluripotenz der eMSC unter NSAID- Behandlung	46
3.10.1. Adipogene- und Osteogene Differenzierung	47
3.10.2. Induktion der chondrogenen Differenzierung.....	47
3.10.3. Medienwechsel während der Differenzierung.....	48
3.11. Zellaufbereitung für die histologische Untersuchung	48
3.12. Histologische Nachweisverfahren	48
3.12.1. Red Oil O Färbung mit anschließender Hämatoxin Gegenfärbung nach Mayer	48
3.12.2. Von Kossa Färbung.....	49
3.12.3. Alzianblaufärbung.....	49
3.13. Einbetten für die Elektronenmikroskopie.....	50
3.14. Elektronenmikroskopische Untersuchung von eMSC mit Phenylbutazonzugabe in verschiedenen Konzentrationen	51
3.15. Elektronenmikroskopische Untersuchung von eMSC mit chondrogenen Induktionsmedium und NSAID	51
3.16. Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	51
3.16.1. RNA Isolierung	51
3.16.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	53
3.16.3. DNase Verdau	53
3.16.4. Reverse Transkription (RT)	53
3.16.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) / RT-PCR.....	54
3.16.6. Elektrophoretische Auftrennung	56
3.17. Mikroskopie.....	57
3.17.1. Lichtmikroskop.....	57
3.17.2. Elektronenmikroskop	57
3.18. Statistische Analyse	57

4. Ergebnisse	58
4.1 Proliferationsverhalten und Morphologie von eMSC	58
4.2. Vitalitäts- und Proliferationsassay	58
4.2.1. WST- 1 Celecoxib	60
4.2.2. BrdU Celecoxib	61
4.2.3. WST- 1 Meloxicam	62
4.2.4. BrdU Meloxicam	63
4.2.5. WST- 1 Flunixin	64
4.2.6. BrdU Flunixin	65
4.2.7. WST- 1 Indomethacin	66
4.2.8. BrdU Indomethacin	67
4.2.9. WST- 1 Phenylbutazon	68
4.2.10. BrdU Phenylbutazon	69
4.3. Zellkinetik	70
4.3.1. Generationsver Dopplungszeit Kontrolle	70
4.3.2. Generationsver Dopplungszeit Celecoxib	71
4.3.3. Generationsver Dopplungszeit Meloxicam	72
4.3.4. Generationsver Dopplungszeit Flunixin	74
4.3.5. Generationsver Dopplungszeit Indomethacin	76
4.3.6. Generationsver Dopplungszeit Phenylbutazon	77
4.3.7. Kumulative Gesamtzellzahl Kontrolle	78
4.3.8. Kumulative Gesamtzellzahl Celecoxib	79
4.3.9. Kumulative Gesamtzellzahl Meloxicam	81
4.3.10. Kumulative Gesamtzellzahl Flunixin	82
4.3.11. Kumulative Gesamtzellzahl Indomethacin	84
4.3.12. Kumulative Gesamtzellzahl Phenylbutazon	86
4.4. Vitalbeobachtung des Wound- and- Healing- assay	87
4.5. Elektronenmikroskopische Untersuchung von eMSC unter Phenylbutazonzugabe in verschiedenen Konzentrationen	92
4.6. Untersuchung zur Pluripotenz der eMSC nach NSAID- Behandlung	99
4.6.1. Adipogenes Differenzierungspotential- Red Oil O Färbung	99
4.6.2. Osteogenes Differenzierungspotential- von Kossa- Färbung	100
4.6.2.1. Darstellung der Differenzierung mittels histologischer Färbungen	100

4.6.2.2. Darstellung der Differenzierung mittels molekularbiologischer Nachweismethode der osteogenen Differenzierung	103
4.6.3. Chondrogene Differenzierung	106
4.6.3.1. Darstellung der Differenzierung mittels histologischer Färbungen ..	106
4.6.3.2. Darstellung der Differenzierung mittels molekularbiologischer Nachweismethode der chondrogenen Differenzierung	108
5. Diskussion	115
5.1. Ziel der Arbeit.....	115
5.2. Kritik der Methode	116
5.3. Diskussion der Befunde	120
5.3.1. Vitalitäts- und Proliferationsassay.....	120
5.3.1.1 Vitalitätsassay	120
5.3.1.2 Proliferationsassay.....	121
5.3.2. Langzeituntersuchung von NSAID auf die Kinetik von eMSC	123
5.3.3. Ultrastrukturelle Untersuchung von eMSC mit Phenylbutazon	125
5.3.4. Migrationsfähigkeit der eMSC unter NSAID- Einfluss.....	125
5.3.5. Untersuchung der Pluripotenz unter Zugabe von NSAID	127
5.4. Ausblick.....	132
6. Zusammenfassung	133
7. Summary	135
Referenzliste.....	137
Danksagung	155
Erklärung:	156