

## **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 Sehnenerkrankungen .....	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 Hämatoxilin 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. Generationsverdopplungszeit Kontrolle.....	70
4.3.2. Generationsverdopplungszeit Celecoxib .....	71
4.3.3. Generationsverdopplungszeit Meloxicam.....	72
4.3.4. Generationsverdopplungszeit Flunixin.....	74
4.3.5. Generationsverdopplungszeit Indomethacin .....	76
4.3.6. Generationsverdopplungszeit 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