A photograph of two horses running in a field. The horse on the left is dark brown, and the horse on the right is white with brown spots. They are running towards the right, and the background is a bright, hazy landscape with trees.

EINFLUSS VON NICHT- STEROIDALEN ANTIPHLOGISTIKA
AUF DIE VITALITÄT, PROLIFERATION UND
DIFFERENZIERUNGSFÄHIGKEIT VON EQUINEN
MESENCHYMALEN STAMMZELLEN

MAIKE MÜLLER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

und

aus dem Institut I für Anatomie des Fachbereichs Humanmedizin
der Universität zu Köln

Betreuer: Prof. Dr. Dr. S. Arnhold

**Einfluss von nicht-steroidalen Antiphlogistika auf die Vitalität,
Proliferation und Differenzierungsfähigkeit von equinen
mesenchymalen Stammzellen**

INAUGURAL- DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von

Maike Müller

Tierärztin aus Köln

Giessen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. S. Arnhold

Prof. Dr. L.-F. Litzke

Tag der Disputation: 16.11.2009

Für Lars Eitner und meine Familie.

Ihr habt immer an mich geglaubt und mich unterstützt.

„Wirklich gute Freunde sind Menschen,
die uns ganz genau kennen,
und trotzdem zu uns halten“

Marie von Ebner-Eschenbach 1830-1916

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. 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

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „Anatomie einer normalen Sehne“, (Sharma et al. 2005), modifiziert ... 15

Abbildung 2: Anatomie der Sehnen im distalen Bereich einer Pferdegliedmaße, vorne (Smith et al. 2004), modifiziert. 19

Abbildung 3: Modell zur Differenzierung MSC, Mesengenese (Caplan 1994)..... 27

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Arachidonsäurezyklus 30

Abbildung 5: Schemazeichnung Adipogene- und Osteogene Differenzierung 47

Abbildung 6: Ultrastrukturelle Aufnahme von eMSC der Kontrollgruppe ohne DMSO-Zusatz..... 93

Abbildung 7: Ultrastrukturelle Aufnahme von eMSC der Kontrollgruppe mit 0,5 % DMSO- Zusatz..... 94

Abbildung 8: Ultrastrukturelle Aufnahme von eMSC mit 10 µMol Phenylbutazon 95

Abbildung 9: Ultrastrukturelle Aufnahme von eMSC mit 50 µMol Phenylbutazon 96

Abbildung 10: Ultrastrukturelle Aufnahme von eMSC mit 100µMol Phenylbutazon .. 97

Abbildung 11: Ultrastrukturelle Aufnahme von eMSC mit 500 µMol Phenylbutazon . 98

Abbildung 12: Red Oil O- Färbung, lichtmikroskopische Aufnahmen 100

Abbildung 13: von Kossa- Färbung, lichtmikroskopische Aufnahmen 102

Abbildung 14: Darstellung des Ergebnisses der RT- PCR 105

Abbildung 15: Alzianblaufärbung, lichtmikroskopische Aufnahmen..... 107

Abbildung 16: Darstellung des Ergebnisses der RT- PCR für die chondrogene Differenzierung; 109

Abbildung 17: Ultrastrukturelle Aufnahme von Kontrollzellen ohne (-) und mit (+) chondrogenem Differenzierungsmedium..... 111

Abbildung 18: Ultrastrukturelle Aufnahmen von Celecoxib- behandelten, chondrogen differenzierten eMSC..... 112

Abbildung 19: Ultrastrukturelle Aufnahmen von Meloxicam- behandelten, chondrogen differenzierten eMSC..... 112

Abbildung 20: Ultrastrukturelle Aufnahmen von Flunixin- behandelten, chondrogen differenzierten eMSC..... 113

Abbildung 21: Ultrastrukturelle Aufnahmen von Phenylbutazon- behandelten, chondrogen differenzierten eMSC 113

Abbildung 22: Ultrastrukturelle Aufnahmen von Indomethacin- behandelten, chondrogen differenzierten eMSC's. 114

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: WST- 1 Absorptionswerte, Celecoxib,..... 60

Diagramm 2: BrdU Absorptionswerte, Celecoxib..... 61

Diagramm 3: WST-1 Absorptionswerte, Meloxicam 62

Diagramm 5: WST- 1 Absorptionswerte, Flunixin 64

Diagramm 6: BrdU Absorptionswerte, Flunixin 65

Diagramm 9: WST- 1 Absorptionswerte, Phenylbutazon..... 68

Diagramm 10: BrdU Absorptionswerte, Phenylbutazon..... 69

Diagramm 11: Generationsverdopplungszeit (GVZ) für Celecoxib/ Langzeitkinetik . 72

Diagramm 12: GVZ für Meloxicam/ Langzeitkinetik..... 73

Diagramm 13: GVZ für Flunixin/ Langzeitkinetik..... 75

Diagramm 14: GVZ für Indomethacin/ Langzeitkinetik 76

Diagramm 15: GVZ für Phenylbutazon/ Langzeitkinetik 78

Diagramm 16: Regressionsgeraden der kumulativen Gesamtzellzahlen nach
Celecoxib-Behandlung 80

Diagramm 17: Regressionsgeraden der kumulativen Gesamtzellzahlen nach
Meloxicam-Behandlung 82

Diagramm 18: Regressionsgeraden der kumulativen Gesamtzellzahlen nach
Flunixin-Behandlung. Die oberste Linie stellt die Kontrollkurve dar. Dann folgen die
Kurven für 10 und 50 µMol. Darunter liegt die Kurve für 100 µMol..... 83

Diagramm 19: Regressionsgeraden der kumulativen Gesamtzellzahlen nach
Indomethacin- Behandlung..... 85

Diagramm 20: Regressionsgeraden der kumulativen Gesamtzellzahlen nach
Phenylbutazon-behandlung 87

Diagramm 21: Vitalbeobachtung unter Celecoxib- Einfluß, n=3 89

Diagramm 22: Vitalbeobachtung unter Meloxicam- Einfluß, n= 3..... 90

Diagramm 23: Vitalbeobachtung unter Phenylbutazon- Einfluß, n= 3 91

Diagramm 24: Flächenanteil der mit der von Kossa- Färbung angefarbten Zellareale
..... 103

Diagramm 25: Flächenanteil der mit der Alzianblau- Färbung angefarbten Areale 108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pharmakokinetik der NSAID 31

Tabelle 2: Wirkstoffkonzentrationen von NSAID in der Langzeitkinetik 43

Tabelle 3: Wirkstoffkonzentrationen von NSAID für den WST-1- und BrdU- Assay . 44

Tabelle 4: Verwendete Wirkstoffkonzentrationen in der Differenzierung 52

Tabelle 5: Liste der Primer für die PCR 54

Tabelle 6: Liste der Primersequenzen 56

Tabelle 7: Wirkstoffkonzentrationen für den WST-1- und BrdU- Assay 58

Tabelle 8: WST- 1 Absorptionswerte Celecoxib 60

Tabelle 9: BrdU Absorptionswerte, Celecoxib 61

Tabelle 10: WST- 1 Absorptionswerte Meloxicam 62

Tabelle 11: Brdu Absorptionswerte, Meloxicam..... 63

Tabelle 12: WST- 1 Absorptionswerte, Flunixin..... 64

Tabelle 13: BrdU Absorptionswerte, Flunixin..... 65

Tabelle 14: WST- 1 Absorptionswerte, Indomethacin..... 66

Tabelle 15: BrdU Absorptionswerte, Indomethacin..... 67

Tabelle 16: WST- 1 Absorptionswerte, Phenylbutazon 68

Tabelle 17: BrdU Absorptionswerte, Phenylbutazon 69

Tabelle 18: Verwendete Wirkstoffkonzentrationen in der Langzeitkinetik..... 70

Tabelle 19: Generationsverdopplungszeit Kontrolle 70

Tabelle 20: Generationsverdopplungszeit Celecoxib..... 71

Tabelle 21: Generationsverdopplungszeit (GVZ) Meloxicam..... 73

Tabelle 22: GVZ nach Flunixinbehandlung..... 74

Tabelle 23: GVZ nach Indomethacin-Behandlung 76

Tabelle 24: GVZ Phenylbutazon..... 77

Tabelle 25: Kumulative Gesamtzellzahl der Kontrollgruppe 78

Tabelle 26: Kumulative Gesamtzellzahl nach Celecoxib-Behandlung 79

Tabelle 27: Kumulative Gesamtzellzahl nach Meloxicam- Behandlung..... 81

Tabelle 28: Kumulative Gesamtzellzahl nach Flunixin- Behandlung 83

Tabelle 29: Kumulative Gesamtzellzahl nach Indomethacin- Behandlung 84

Tabelle 30: Kumulative Gesamtzellzahl nach Phenylbutazonbehandlung..... 86

Tabelle 31: Verwendete Konzentrationen im Wound- and- Healing- Assay 88

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest	destilliertes Wasser
Art.	Artikulation
BrdU	5- Bromo- 2'- desoxyuridin
bzw	beziehungsweise
bp	Basenpaar
ca	circa
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Fa.	Firma
et al.	et alter
EtOH	Ethanol
eMSC	equine mesenchymale Stammzellen
FCS	Fötale Kälberserum
g	Zentrifugalbeschleunigung in $g = 9,81m /s^2$
GVZ	Generationsverdopplungszeit
HCL	Salzsäure
KM	Knochenmark
l	Liter

M	Mol
mg	Miligramm
min	Minuten
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mM	Milimol
MSC	mesenchymale Stammzellen
NH ₂	Amminogruppe
nm	Nanometer
NSAID	nicht- steroidale Antiphlogistika
PBS	Phosphat buffered salin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Pikomol
P/S	Penicillin und Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
TBE	Tris- Borsäure- EDTA
U	Units
WST	wasserlösliches Tetrazoliumsalz
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µMol	Mikromol

1. Einleitung

1.1 Orthopädische Erkrankungen des Pferdes

Orthopädische Erkrankungen spielen eine große Rolle bei zeitlich begrenzten bis sogar dauerhaften Nutzungs- Ausfällen von Pferden. Betroffen sind Turnierpferde und Freizeitperde, ebenso Tiere aller Altersgruppen (Philipson et al. 1998; Rossdale et al. 1985; Wallin et al. 2000).

Bei den Erkrankungen des Bewegungsapparates stehen in erster Linie Sehnenverletzungen, Osteoarthrosen und Frakturen als Ursachen von Lahmheiten bei Freizeit- und Sportpferden im Vordergrund (Silver et al. 1983; Marr et al. 1993).

Diese Verletzungen sind Folgen eines stetigen biomechanischen Stresses, dem die Pferde im Rahmen des Trainings und Wettkampfes ausgesetzt sind. Meistens handelt es sich um verdeckte chronische Prozesse. Es werden immer wieder Mikrotraumen gesetzt, die keine ausreichende Regenerationszeit bekommen, sich so potenzieren und in ein akutes Geschehen übergehen. Betroffen sind Knochen, Bänder, Sehnen und Gelenke.

Eine genaue Kontrolle der betroffenen Strukturen im Anschluss an ein Training oder einen Wettkampf auf Schwellungen und vermehrte Wärme kann Anzeichen einer Überbelastung/ Fehlbelastung deutlich machen. Bereits eine geringere Trainingsintensität kann die Symptome lindern (Smith et al. 2007).

1.2 Vorkommen und Häufigkeit von Verletzungen der Band- und Sehnenstrukturen

Charakteristika von Sehnengewebe

Eine Sehne ist die Verbindungsstelle zwischen Muskel und Knochen, sie überträgt die Kraft der Muskulatur auf den Knochen. Sehnen gehören zu den Binde- und Stützgeweben, mit einer Matrix, in die 65- 80 % kollagene Faser und 2 % elastische Fasern eingelagert sind. Zwischen den Kollagenfasern, die sich in longitudinaler Achse in Zugrichtung ausrichten, liegen Reihen lang gestreckter Fibroblasten (Liebich 2003).

Die kleinste Einheit einer Sehne wird aus Fibrillen aufgebaut, die von Endotendineum umhüllt werden und das Primärbündel bilden, mehrere Primärbündel zusammen werden von Peritendineum umhüllt und bilden das Sekundärbündel und mehrere von Epitendineum umhüllte Sekundärbündel bilden ein Tertiärbündel (Abbildung 1).

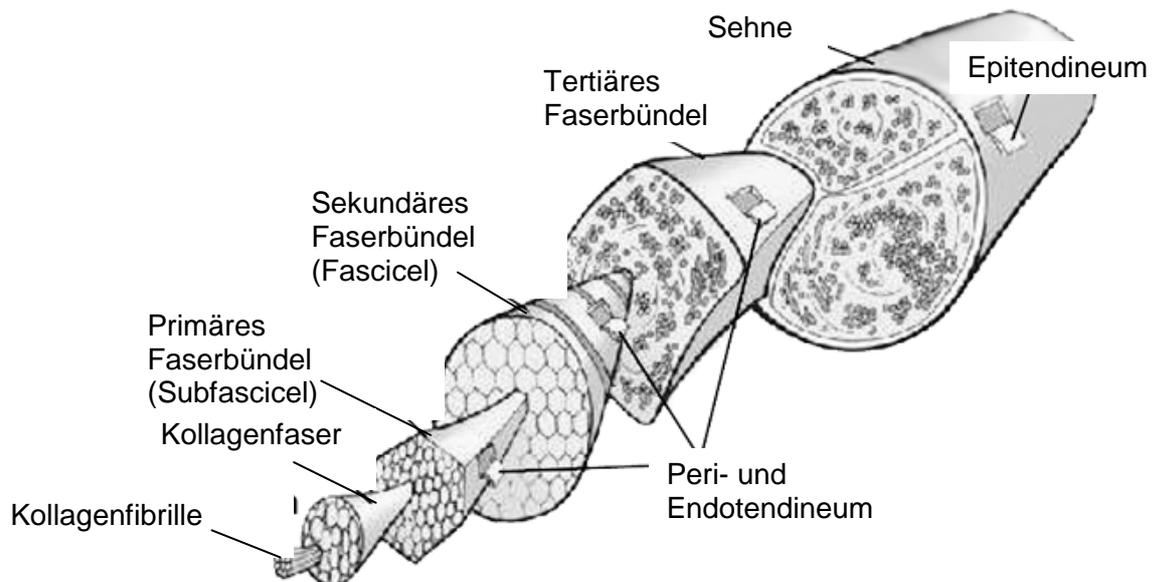


Abbildung 1: „Anatomie einer normalen Sehne“, (Sharma et al. 2005), modifiziert

Die Sehne ist ein bradytrophes Gewebe, sie deckt ihre Blutversorgung indirekt, zum einen über Gefäße in der Sehnen- Muskel- Verbindung und der Sehnen- Knochen- Verbindung und zum anderen über Gefäße in der Sehnenscheide und der Umgebung. Aus diesem Grund hat sie nur ein geringes Regenerationspotential. Sehnen haben einen 7,5 fachen geringeren Sauerstoffbedarf als Muskeln. Der geringe Sauerstoffbedarf ermöglicht langes Tragen von Lasten und lang anhaltende Anspannung ohne die Gefahr einer Sauerstoffunterversorgung oder von Nekrosen (Sharma et al. 2005).

Verletzungsarten des Band- und Sehnenapparates

Je nach Nutzungsart der Pferde treten verschiedene Arten von Band- und Sehnenverletzungen in unterschiedlicher Ausprägung auf.

Die Vordergliedmaßen sind häufiger betroffen als die Hintergliedmaßen, weil sie in der physikalischen Bewegung einer höheren Belastung ausgesetzt sind (Webbon 1977).

Bei Rennpferden machen die Sehnen- und Bandverletzungen sogar ein Drittel der Ursachen für Lahmheiten aus (Peloso et al.1994). Williams et al. (2001) geben an, dass die oberflächliche Beugesehne bei 46 % der Lahmheitsursachen beteiligt ist.

Die oberflächliche Beugesehne ist bei Sportpferden, vor allem bei steil gefesselten Rennpferden, besonders von Verletzungen betroffen, da diese am Ende der Stützbeinphase der höchsten Belastung ausgesetzt ist. Diese Läsionen der oberflächlichen Beugesehne finden sich meistens im mittleren Metacarpalbereich (Wilmink et al. 1992). Dabei sind zentrale Areale der Sehne stärker betroffen als periphere Areale (Webbon 1977; Pool et al. 1990; Marr et al. 1993; Birch et al. 1998). Zugpferde erleiden häufiger Läsionen an der tiefen Beugesehne (75%), weil die tiefe Beugesehne in der zweiten Hälfte der Stützbeinphase bei der kräftigen Abfußung deutlich stärker belastet wird als die oberflächliche Beugesehne (Sonnichsen 1975). Bei Trabern treten eher Tendopathien des Fesselträgers auf, dessen Hauptbelastung in der ersten Hälfte der Stützbeinphase liegt. In der zweiten Hälfte, während der Hyperextension der Zehe, nimmt der Zug auf den Fesselträger dann geringgradig ab (Fackelman 1973; Stashak 1989). Oft geht die Erkrankung des Fesselträgers mit Problemen der oberflächlichen Beugesehne einher, weil sich beide Strukturen in ihrer Funktion unterstützen. Als Ursache für klinisch erkennbare Sehnenschäden werden physikalische Faktoren wie Fehlstellungen, Fehlbelastungen, stumpfe Traumen und lokale Hyperthermie oder physiologische Faktoren, wie lokale Ischämie und Stoffwechselstörungen, angesehen (Stashak 1989; Dowling et al. 2000).

1.2.1 Therapieoptionen für Sehnenerkrankungen

Es gibt unterschiedliche konservative und chirurgische Therapieansätze, um die Sehnenheilung positiv zu beeinflussen, die Heilung zu verkürzen und die Qualität des Sehnengewebes zu erhalten.

Üblicherweise werden zuerst nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID) parenteral angewendet, um eine überschießende Entzündungsreaktion zu verhindern. Dagegen ist die lokale Verabreichung von Kortikosteroiden nicht zu empfehlen. Es ist eine dystrophische Verkalkung im Sehnengewebe zu erwarten (Stashak 1989; Webbon et al. 2002), sowie eine Auflösung der kollagenen Fibrillen, eine Reduzierung der Fibrozyten und eine Ausfällung der Glykosaminoglycane (Silbersiepe 1987).

Subkutane Schwellungen können mit einem Druckverband behandelt werden. Zur Ruhigstellung kann ein Gips- oder Fiberglasverband angelegt werden. Desweiteren wird in der Pferdepraxis die intratendinöse Injektion von Hyaluronsäure und Chondroitin- Polysulfat (Adequan®, nach Müller- Wolfahrt) vermehrt bei Tendopathien eingesetzt. Dadurch kann die Schmerzphase verkürzt, die Heilung und

die klinische Besserung beschleunigt werden (Schmidt et al. 1989; Crisman 1993). Die Hyaluronsäure veranlasst, zusätzlich zu einer antiinflammatorischen Wirkung, eine vermehrte Fibrillenbildung mit Aggregation der Kollagenmoleküle (Mohr 1987). Das Chondroitin- Polysulfat hemmt verschiedene, degenerativ aktive, katabole Enzyme, es stimuliert die Proteoglykan- und Kollagen- II- Synthese und reduziert die Produktion von Superoxidradikalen aus Makrophagen (Crisman 1993).

Die Implantation von Kohlenstofffasern in die erkrankte Sehne konnte sich nicht durchsetzen. Die Ergebnisse wurden unterschiedlich bewertet. Während einige Autoren von ermutigenden Kurzzeiterfolgen berichteten (Littlewood 1979; McCullagh et al 1983) wiesen andere Autoren auf die Nachteile (geringe Elastizität des neugebildeten Gewebes, Empfindlichkeit gegenüber Scherkräften, hohe Behandlungskosten) und auf die wenig erfolgreichen Behandlungsversuche hin (Pick 1986; Stashak 1989).

Erstaunlich gute Erfolge bei Erkrankungen des Bewegungsapparates werden durch die extrakorporale Stoßwellentherapie erzielt. Neuere Arbeiten aus der Humanmedizin konnten zeigen, dass extrakorporale Stoßwellen als mechanische Stressoren fungieren. Bei diesem als Mechanotransduktion bezeichneten Vorgang wirkt ein mechanischer Stressor auf ein Gewebe und induziert damit biochemische Veränderungen, die auf molekularer Ebene zur Veränderung der Genexpression der Zellen führen (Neuland et al. 2006). Es bilden sich neue Gefäße und Knochen wird umgebaut, was sich positiv auf Knochenheilungsstörungen und auf Verletzungen an Sehnenanheftungsstellen am Knochen auswirkt (Schnewlin et al. 2001). Schon nach einer Ruhigstellung von ca. zwei Wochen, kann vorsichtig mit leichter passiver Arbeit begonnen werden. Es ist von Vorteil frühzeitig mit der Arbeit zu beginnen, damit sich die Fibroblasten in Zugrichtung ausrichten können, um die Funktionalität des Gewebes wieder herzustellen (Yeung 1997).

Beim Sehnensplitting wird eine vollständige Längsinzision der Sehne durchgeführt, damit ein bestehendes Hämatom abfließen kann und die Regeneration durch einwachsende Gefäße beschleunigt wird (Asheim, 1964). Das Sehnensplitting wird in der Literatur aber ganz unterschiedlich bewertet. Webbon (1979) und Reiners et al. (2002) zeigten sehr gute Heilungserfolge auf. Einige andere Autoren gaben an, dass durch die Inzision keine beschleunigte Heilung erfolgte, sondern im Gegenteil, eine Heilungsverzögerung eintrat. Außerdem kann es zu einer entzündlichen Reaktion

des umgebenden Gewebes kommen (Pick, 1986; McCullagh, 1979; Silver, 1983; Stashak, 1989).

Jede Therapieform kann nur in Kombination mit einem streng einzuhaltenen, kontrollierten Bewegungsplan für das Pferd, Heilungserfolge erzielen (Dyson, 2004).

Eine neuere Therapieform der Sehnenläsion ist die Verwendung von autologen equinen mesenchymalen Stammzellen (eMSC) aus dem Knochenmarkstroma, insbesondere bei Verletzungen der oberflächlichen Beugesehne. Die eMSC werden entweder aus einem Knochenmarkaspirat aus dem Sternum oder dem Beckenknochen gewonnen und nach Anreicherung in einem Zellkulturlabor unter sonographischer Kontrolle direkt in den Defekt injiziert. Zwischen Gewinnung des Knochenmark-Aspirats und Reinjektion einer ausreichend großen Zellzahl vergehen durchschnittlich vier Wochen. In diesem Zeitraum bildet sich, physiologischerweise, ein fibrinöses Netzwerk im Defektbereich, welches den injizierten eMSC als Halte-, Stütz- und Ernährungsapparat dient (Awad et al. 1999, 2000; Smith et al. 2003).

Der Vorteil der Stammzelltherapie liegt darin, dass sich ein qualitativ hochwertiges Regenerationsgewebe, anstelle eines qualitativ minderwertigeren Reparationsgewebes, bildet. Dadurch wird die Gefahr eines Rezidives erheblich gemindert (Crovace 2007; Richardson 2007; Guest 2008; Smith 2003, 2005, 2008).

In diesem Zusammenhang ist es sehr wichtig zu wissen, wie sich die begleitende Applikation von NSAID auf die eMSC auswirken, da diese nach Bedarf therapiebegleitend verabreicht werden.

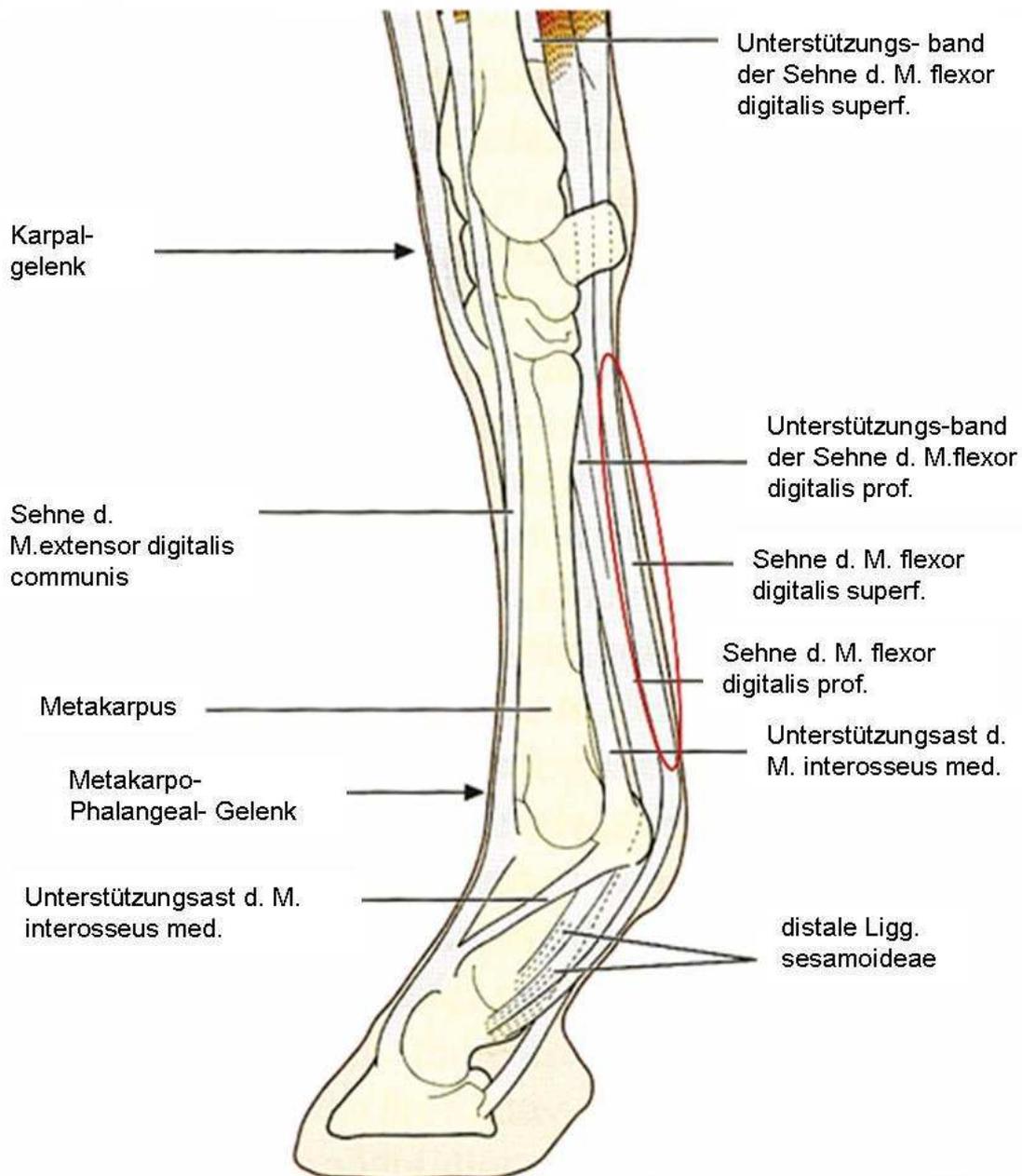


Abbildung 2: Anatomie der Sehnen im distalen Bereich einer Pferdegliedmaße, vorne (Smith et al. 2004), modifiziert.

Kreisförmige Markierung: Sehne des Muskulus flexor digitalis superficialis, am häufigsten bei Sehnenkrankungen betroffen.

1.3. Gelenkerkrankungen

Osteoarthrosen oder degenerative Gelenkerkrankungen sind chronische, entzündliche Erkrankungen in einem oder in mehreren Gelenken. Der hyaline Gelenkknorpel degeneriert und es kommt zu knöchernen Zubildungen

(Knochenzysten, Osteochondrosis dissecans, Frakturen). Die umgebenden Muskeln, Sehnen und Bänder sind in den Prozess involviert.

Charakteristika von Knorpelgewebe

Knorpel besteht aus Interzellulärsubstanz mit eingelagerten Zellen. Die Interzellulärsubstanz setzt sich aus Wasser, Proteoglykanen, Hyaluronsäure und Kollagenfibrillen zusammen. Die Zellen sind unreife Chondroblasten und reife Chondrozyten.

Knorpel hat eine feste Konsistenz und ist durch Krafteinwirkung begrenzt verformbar, erlangt aber bei Wegfall der Krafteinwirkung seine ursprüngliche Form zurück, was als druckelastisch bezeichnet wird.

Im Knorpelgewebe sind keine Blutgefäße vorhanden, es ist wie das Sehngewebe bradytroph. Der Knorpel muss über Diffusion aus der Umgebung ernährt werden. Dieser Umstand erklärt das sehr schlechte Regenerationspotential von Knorpelgewebe.

Es gibt drei verschiedene Knorpelarten, die man anhand ihrer Kollagenfaserzusammensetzung unterscheidet.

Hyaliner Knorpel ist sehr druckelastisch und besteht aus Kollagenfasern des Typs II, IX und XI. Man findet den hyalinen Knorpel in Gelenkflächenüberzügen, im Rippenknorpel, im Kehlkopfskelett und im Nasenseptum.

Elastischer Knorpel beinhaltet neben den Kollagenfasern noch zusätzlich elastische Fasern, die ihn leichter verformbar machen. Zum Beispiel die Ohrmuscheln, die Epiglottis und kleinste Bronchien bestehen aus elastischem Knorpel.

Faserknorpel ist zellärmer als die beiden anderen und besteht aus vielen Kollagenfasern vom Typ I. Aus Faserknorpel bestehen zum Beispiel die Zwischenwirbelscheiben und die Menisci des Kniegelenkes (Liebich et al. 2003).

Osteoarthrosen

Anhand ihrer Genese werden Osteoarthrosen in zwei Gruppen eingeteilt (Freeman 1975).

Die primäre Gruppe umfasst Erkrankungen die altersbedingt und ohne erkennbaren Grund auftreten.

In der sekundären Gruppe werden Erkrankungen mit bekannter Ursache zusammengefasst, z.B. starke Kräfteeinwirkung durch Traumata, oder induzierte Gelenkentzündung durch fehlerhafte Applikation von Kortikosteroiden (Jaffe 1972).

Die morphologischen Veränderungen sind in beiden Gruppen ähnlich (Nyack et al. 1983).

Das Gelenk ist in seiner Gesamtheit betroffen, also die Gelenkkapsel, Gelenkknorpel, subchondraler Knochen, Band- und Sehnenapparat sowie Muskulatur.

Es kommt zu einer Aufrauung der oberflächlichen Knorpelschicht, die anfänglich nur mikroskopisch sichtbar ist. Die Kollagenfibrillen ordnen sich parallel an (Clyne 1987). Daraus resultiert ein Verlust der Druckelastizität und der Festigkeit. In der Tiefe bilden sich Fissuren die bis zum subchondralen Knochen reichen können (Buschmann et al. 2000) und es kommt zu einem erhöhten Wassereinstrom in den Knorpel (Spahn et al. 2006).

Die Chondrozyten vergrößern sich und verlieren ihre Funktionsfähigkeit, sie lagern sich in Clustern zusammen. So eine Clusterbildung findet sich gehäuft an den Fissurrändern, weil die Diffusionsstrecke verkürzt ist und vermehrt Wasser in die Zellen gepresst wird (Fassbender 1983; Spahn et al. 2006). Die gesamte Knorpelarchitektur verändert sich, belastete Knorpelareale hypertrophieren und unbelastete Knorpelareale flachen ab. Es kommt zu Abspaltungen von Knorpelteilen in den freien Gelenkspalt bis hin zu einem kompletten Knorpelverlust mit Beteiligung von subchondralem Knochen (Moskowitz et al. 1987).

Die freien Knorpelfragmente werden im Gelenkspalt von Synovialmakrophagen (Typ A) phagozytiert. Die Synovialmakrophagen setzen Zytokine und Prostaglandine frei, welche zu einer Entzündung der Synovialis führen (Boniface et al. 1988). Durch die Entzündung bedingt kommt es zu einer vermehrten Zottenbildung, Fibrose der Subsynovialis, Zerstörung der Synovialbeschaffenheit und noch gesteigertem Knorpelabbau (Hewicker- Trautwein, 1999).

Häufig betroffen sind Gelenke mit geringer Beweglichkeit und hoher Gewichtslast, z.B. Art. intertarsale dist., Art. tarsometatarsale und Art. interphalangeus.

Die Diagnose wird mit Hilfe einer Lahmheitsuntersuchung, in Verbindung mit einer Leitungsanästhesie, gestellt. Lahmheiten bleiben, auch bei einer intraartikulären Schmerzausschaltung, bestehen, wenn subchondraler Knochen und periartikuläre Strukturen beteiligt sind.

Im Röntgenbild kann sich eine Verkleinerung des Gelenkspaltes zeigen. Allerdings entsteht bei der Auflösung von subchondralen Knochen ein vergrößerter Spalt und täuscht dann normale Größenverhältnisse vor.

1.3.1 Therapieoptionen für Gelenkerkrankungen

Die Ursache, die Schwere, bestehende Dauer der Erkrankung und der Verwendungszweck des Pferdes haben einen großen Einfluss auf die zu wählende Therapie. Es gibt die Möglichkeiten von konservativen oder von chirurgischen Therapien.

Zu den konservativen Möglichkeiten zählen Boxenruhe, Physiotherapie (Raker, 1962), regelmäßige Hufpflege, Hufkorrektur, bei Bedarf Spezialbeslag (z.B. eine Abrollhilfe bei Spat).

Medikamentös wird eine Langzeittherapie mit NSAID und bei sehr schweren Fällen eine intraartikuläre Injektion mit Steroiden angewendet (Short et al. 1978, Webbon et al. 2002).

Zur Vorsorge und zur Verhinderung des weiteren Voranschreitens der Knorpeldegeneration werden Hyaluronsäure und Glycosaminoglycane genutzt. (Yovich et al. 1987).

Zu den chirurgischen Möglichkeiten gehört das oberflächliche Abtragen der Knorpelfläche (Küretage), um eine intrinsische Heilung zu stimulieren (Johnson, 1986). Dieses Vorgehen wird aber sehr kontrovers diskutiert (Mitchell et al. 1976; Vachon et al. 1986).

Eine andere Methode ist die Transplantation von perichondralen oder periostalen Geweben zur Stimulierung von Knorpelgewebeproduktion. Die Spende kann autolog (Howard et al. 1994) oder allogenen gewonnen werden (Garrett, 1986).

Einen neueren Ansatz bietet das „tissue engineering“. Es werden autologe Knorpelzellen gewonnen und direkt in den Knorpeldefekt hinein appliziert (Barnewitz 2003; Litzke et al. 2004). Es wurden zwei Jahre nach der Injektion Biopsien aus den betroffenen Gelenken entnommen und es konnte eine Zellintegration und die Neubildung von hyalinem Knorpel in der Region des Defektes gezeigt werden.

Eine elegantere Methode wäre es die autologen Chondrozyten vor der Transplantation zu vermehren, um eine größere Anzahl an Zellen zu erhalten, die den Defekt besser auffüllen. Dieser Methode sind aber Grenzen gesetzt, weil es sehr schwierig und kostenintensiv ist, die Chondrozyten unter Kulturbedingungen zu

halten. In einer Monolayerkultur entdifferenzieren sie sehr schnell und werden zu Fibroblasten (Benya et al. 1982; Baltés, 2005; Vidal et al. 2006).

Außerdem ist die Entnahme von Chondrozyten zur autologen Spende für das Pferd mit einem gewissen Risiko behaftet.

Auch für die Therapie von Knorpeldefekten bei Osteoarthritis sind mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmarkstroma eine viel versprechende Alternative, weil die Nachteile der Chondrozytentransplantation umgangen werden. Sie können sehr leicht gewonnen und unter Kulturbedingungen um ein vielfaches vermehrt werden (Hegewald et al. 2004; Vidal et al. 2006; Arnhold et al. 2007).

1.4. Knochenfrakturen

Eine Fraktur ist der Verlust der strukturellen Einheit des Knochens.

Charakteristika von Knochengewebe

Knochengewebe besteht aus juvenilen Osteoblasten, die Knochen aufbauen, aus reifen Osteoblasten, die Osteozyten heißen und aus Osteoklasten, welche das Knochenmaterial wiederum abbauen, bzw. umbauen, so dass es zu ständigen Umbauprozessen kommt.

Die Zellen werden von einer Interzellulärsubstanz umgeben die hauptsächlich aus Kollagenfibrillen und aus Hydroxylapatit- Kristallen besteht. Knochen hat ein eigenes Blutgefäße- System. Die Knochenstruktur verändert sich laufend und ist ein Zusammenspiel von Hormonen, Ernährung, Bewegung und Sonneneinstrahlung (Liebich 2003).

Deshalb kann das Regenerationspotential von Knochengewebe als sehr gut bezeichnet werden.

Verletzungsarten von Knochengewebe

Es gibt verschiedene Frakturursachen: Zum einen wird der Knochen akut durch eine Krafteinwirkung, meist traumatisch, bis über seine Elastizitätsgrenze hinaus belastet. Des Weiteren gibt es noch Spontanfrakturen, die durch eine andauernde Überbelastung verursacht sein können, durch Knochenentzündungen, metabolische Störungen, tumoröses Geschehen oder Knochenzysten.

Der Knochen ist in seiner Funktion gestört, er kann nicht mehr stützen und tragen. Folgen sind Lahmheiten unterschiedlicher Ausprägungen. Wenn ein

gewichtstragender Knochen betroffen ist, kommt es zu einer hochgradigen Lahmheit mit ausgeprägter Schonhaltung; ist aber nur ein begrenztes Areal betroffen (Chip-Fraktur), zeigt sich nur eine geringgradige Lahmheit, die unter Belastung zunehmen kann.

1.4.1. Therapieoptionen von Knochenfrakturen

Da Pferde aufgrund ihres hohen Körpergewichtes nicht über einen längeren Zeitraum in einem liegenden Zustand therapiert werden können, ist es für die Therapie essentiell den Knochen soweit zu stabilisieren, dass er die Belastung im Stand toleriert.

Mit der Verwendung von Platten und Schrauben erreicht man schnell eine gute Stabilität, aber es besteht das Risiko eines Rezidivs nach Entfernung der Einsätze durch den plötzlichen Stabilitätsverlust und die Kavitäten der Schrauben im Knochen. Man benötigt deshalb eine schnelle und gute Durchbauung des Narbenbereiches.

Eine Osteomyelitis ist die Entzündung des Hohlraumes um das Knochenmark herum. Neben der Gabe von Antibiotika und NSAID wird das betroffene Knochenstück reseziert und der Defekt durch das Einsetzen eines autologen Knochenstückes aus dem Beckenkamm überbrückt. Es müssen zwei Operationen durchgeführt werden, eine zur Gewinnung des Transplantates und die eigentliche Operation zur Therapie.

Für eine Fraktur- oder eine Osteomyelitisbehandlung würde sich ein Stammzellimplantat aus MSC auf einem stabilen Gerüst als vorteilhaft erweisen, damit die Stabilität schnell wiederhergestellt ist und der Knochen ausreichend durchbaut wird.

Es gibt bereits einige Studien die diese Verfahren an Kaninchen untersucht haben (Cai et al. 2006; Caplan 2005; Farrell et al. 2006).

1.5. Stammzellen für zellbasierte Therapieverfahren bei orthopädischen Erkrankungen

Stammzellen lassen sich ihrem Ursprung nach unterscheiden. Man kann sie anhand ihres Wirtsgewebes einteilen in:

- früh embryonal
- spät embryonal / neonatal
- adult

Die Zellen früh embryonaler Stadien sind totipotent, d.h. sie können sich zu jeglicher Art von Gewebe entwickeln und sind fähig komplette Organismen zu bilden. Diese Fähigkeit behalten sie bis zum 8-Zell-Stadium. Nach Implantation der Blastozyste in die Uterusschleimhaut sind sie in der Lage zu einem vollständigen Individuum heranzuwachsen. Ein therapeutischer Einsatz von pluripotenten Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden können, ist mit einem großen Risiko verbunden, da diese Zellen tumurös entarten können, bzw. sich Teratome bilden können. Darüber hinaus können nur allogene embryonale Stammzellen verwendet werden, was die Gefahr einer immunologischen Unverträglichkeit in sich birgt (Thomson et al. 1998; Reubinoff et al. 2000; Erdö et al. 2003)

Im spät embryonalen bzw. neonatalen Stadium werden die Zellen zwar auch noch als pluripotent bezeichnet, allerdings ist ihre Differenzierungsfähigkeit eingeschränkt. Sie können nicht mehr zu einem kompletten Organismus heranwachsen und auch nicht mehr in jeden Zelltyp differenzieren. Neonatale Stammzellen werden z.B. aus dem Nabelschnurblut gewonnen (Engels et al. 2000).

Adulte Stammzellen werden als multipotent bezeichnet. Sie sind zwar immer noch in der Lage sich in verschiedene Richtungen zu differenzieren, haben aber den Grossteil Ihres Differenzierungspotentials eingebüßt.

Eine weitere Einteilung der adulten Zellen kann anhand des Gewebes durchgeführt werden, aus dem sie entnommen werden.

Sie können aus folgenden Geweben gewonnen werden:

- Blut = hämatopoetische Stammzellen
- Gehirn = neurale Stammzellen
- Knochenmark = mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen

Die Forschung an humanen embryonalen Stammzellen wird ethisch sehr kontrovers diskutiert, weil für ihre Gewinnung Embryonen genutzt werden müssen. Dagegen sind adulte Stammzellen, ethisch gesehen, problemlos zu isolieren und unterliegen keinen gesonderten Bestimmungen.

Als Vertreter der adulten Stammzellen gelten die MSC, die aus dem Knochenmarkstroma isoliert werden und in den letzten Jahren ein hohes Maß an wissenschaftlicher Aufmerksamkeit erregt haben. Sie können in einer relativ einfachen Prozedur aus den langen Röhrenknochen, den Beckenknochen oder aus einem Sternalpunktat im Zuge von chirurgischen Eingriffen gewonnen werden und anschließend unter Verwendung geeigneter Zellkulturprotokolle angereichert werden (Haynesworth et al. 1992; Krebsbach et al. 1999; Pittenger et al. 1999). Sie können innerhalb von 10 Wochen auf bis zu 20 - 50 Populationsverdopplungen expandiert werden (Devine 2002; Lee et al. 2003). Neben einer Differenzierung zu Knochen- und Knorpelzellen (Owen et al. 1988; Haynesworth et al. 1992), können sie auch in weitere Zelltypen wie Hepatozyten (Zhang et al. 2005), Endothelzellen (Shi et al. 1998), Herzmuskelzellen (Orlic et al. 2001) und Skelettmuskelzellen (Ferrari et al. 1998) differenzieren. Darüber hinaus ist auch die Differenzierung der MSC zu Astrozyten und Neuronen in vitro gezeigt worden (Woodbury et al. 2000; Sanchez-Ramos et al. 2000). Nach Transplantation in das normale (Kopen et al. 1999) oder ischämische Gehirn (Eglitis et al. 1997; Azizi et al. 1998; Arnhold et al. 2006) differenzieren sie zu Astrozyten.

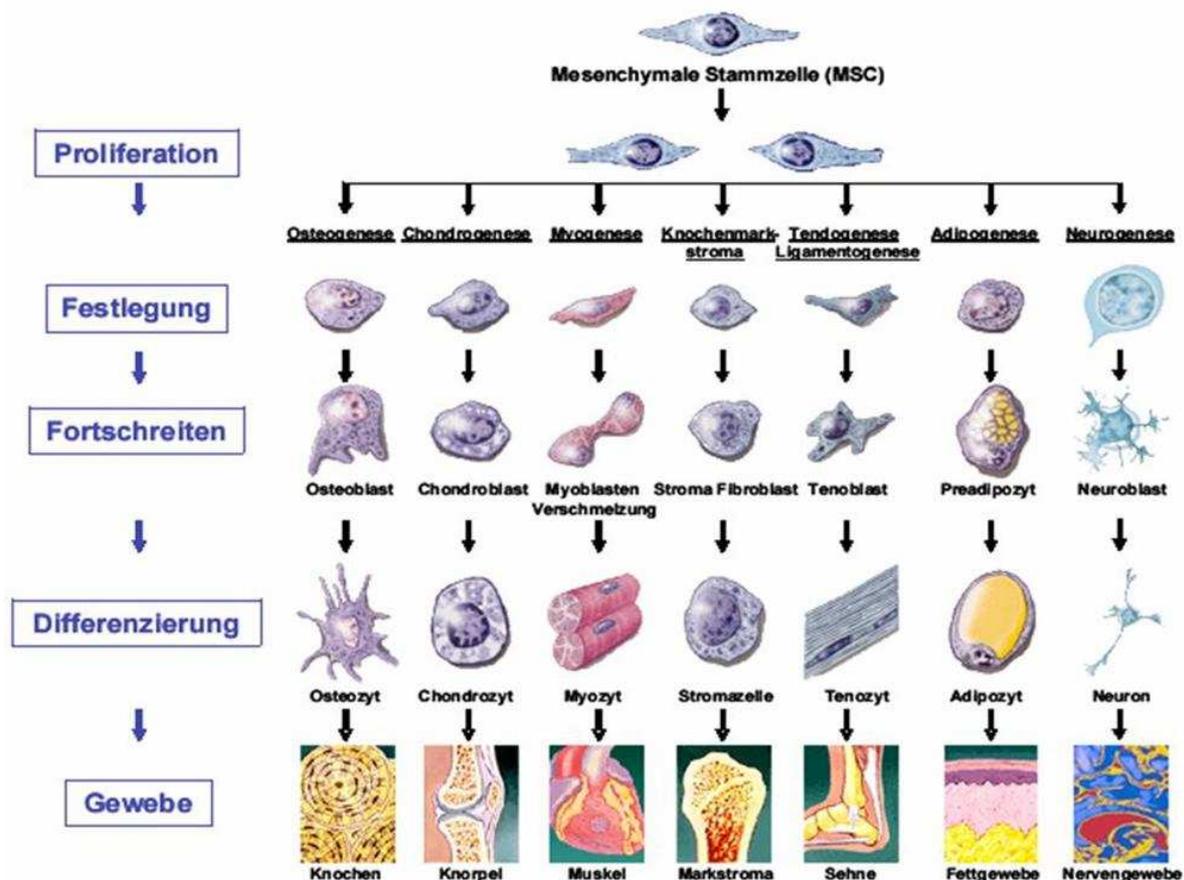


Abbildung 3: Modell zur Differenzierung MSC, Mesengenese (Caplan 1994).

Seit kurzer Zeit hat sich das Verfahren etabliert eMSC aus Knochenmarkspiraten zu isolieren und zu kultivieren, um sie bei Sehndefekten therapeutisch einzusetzen (Crovace 2007; Guest 2008; Richardson 2007; Smith 2003, 2005, 2008). Darüber hinaus gibt es Versuchsansätze die kultivierten eMSC bei weiteren Erkrankungen des Bewegungsapparates therapeutisch zu nutzen. Bei diesen Ansätzen handelt es sich hauptsächlich um die Bestrebung, die Knorpelregeneration bei Osteoarthrosen durch die chondrogene Differenzierung der MSC zu unterstützen (Fortier et al. 1998; Hegewald et al. 2004). Darüber hinaus besteht, wie bereits erwähnt, ein erhöhtes Interesse, MSC auch bei verzögerten Ossifikationen, im Rahmen von Frakturheilungen einzusetzen.

Auch in der Humanmedizin ist ein Einsatz von MSC teilweise erprobt. Diese Zellen wurden bereits in einer Versuchsstudie als „lebende Transplantate“ beim Menschen eingesetzt, welche unter ausgedehnten Defekten an den langen Röhrenknochen litten (Marcacci et al. 2007).

1.6. Nicht- steroidale Antiphlogistika

Vorläufer der NSAID sind die salicinhaltige Weidenrinde und andere verwandte Pflanzen, die schon seit über 2000 Jahren bei Fieber, Schmerzen und Entzündungen Anwendung finden.

1838 wurde zum ersten Mal aus Salicin Salicylsäure gewonnen. Seit 1899 wird synthetisch hergestellte Salicylsäure unter dem Namen Aspirin® vertrieben. Im 19. Jahrhundert kamen dann weitere Wirkstoffe, z.B. Phenylbutazon hinzu (Wagner et al. 2003).

Die Stoffgruppe wird als nicht- steroidal bezeichnet, um sie eindeutig von den steroidal Glukokortikoiden abzugrenzen (Frey et al. 2002).

Die NSAID werden in der Pferdemedizin häufig bei Erkrankungen des Bewegungsapparates und bei viszeralen Erkrankungen (z.B.: Kolik) eingesetzt. Insbesondere ist der Einsatz von NSAID zur Unterstützung der „Stammzelltherapie“ bei Sehndefekten zu nennen. Sie gewährleisten dabei eine gute Schmerzausschaltung und Entzündungshemmung. Allerdings ist ihr Einfluss auf Vitalität und Wachstum von eMSC derzeit völlig unbekannt. Darüber hinaus können NSAID, insbesondere bei längerfristiger Anwendung, unerwünschte Nebenwirkungen auslösen. Bei den verschiedenen Spezies sind Equiden empfindlicher als andere Tierarten. Bekannte Nebenwirkungen, besonders bei den klassischen NSAID, sind Ulcera im Magen- Darm- Trakt mit einhergehendem Protein- und Volumenverlust und eine herabgesetzte Nierendurchblutung mit daraus resultierender Ischämie und Nekrosen (Tobin et al. 1986; Lees et al. 1990; Toutain et al. 1994 und 2004).

Als Vertreter der klassischen NSAID wurden in der vorliegenden Arbeit Phenylbutazon und Flunixin, welche Anwendung in der Veterinärmedizin finden, eingesetzt. Um eine Vergleichbarkeit und Übertragungsmöglichkeit für den Menschen zu erhalten wurde noch Indomethacin in die Untersuchung mit einbezogen, welches ausschließlich in der Humanmedizin verwendet wird.

Bei den Cyclooxygenase- 2- selektiven- Wirkstoffen wurde als veterinärmedizinisch relevante Substanz Meloxicam und aus der Humanmedizin Celecoxib verwendet.

1.6.1. Arachidonsäurekaskade und Cyclooxygenase

Die NSAID greifen in die Arachidonsäurekaskade ein.

In der Arachidonsäurekaskade werden Prostaglandine durch die Cyclooxygenase (Cox), Leukotriene durch die Lipoxygenase und Epoxyeicosatetraensäure durch Cytochrom P450 Isoenzyme synthetisiert.

Entzündungs- und Schmerzprozesse im Körper werden hauptsächlich durch Prostaglandine vermittelt.

Die Arachidonsäure befindet sich frei zirkulierend im Plasma oder verestert gebunden in den Zellmembranen. Die Freisetzung erfolgt durch die Phospholipase A₂. Auslöser ist zum Beispiel ein traumatischer Stimulus. Die Arachidonsäure wird durch das Enzym Cox zu Prostaglandin H₂ transformiert, es ist ein Schlüsselenzym (Abbildung 4).

Die Cox liegt als Homodimer im endoplasmatischen Retikulum vor. Es gibt zwei Hauptvertreter, die Cox 1 und Cox 2. Die Cox 1, auch „House-keeping-gene“ genannt, wird konstitutiv im Körper produziert und beeinflusst viele physiologische Prozesse, z.B. die Aufrechterhaltung der schützenden Schleimschicht im Magen-Darm-Trakt und die Nierendurchblutung (Dubois 1998). Die Cox 2 findet man dagegen physiologisch nur im Gehirn, im Uterus und in der Niere. Hauptsächlich wird Cox 2 durch den Einfluss von z.B. Cytokinen (IL-1, TNF- α , IFN- γ), Mitogenen oder LPS induziert (Gualde et al. 2004) und ist deshalb mit Entzündungen und Traumata in Verbindung zu bringen (Zhang et al. 2002; Okada et al. 2003; Vane et al. 2003). Es wurde noch eine Cox 3 bei Ratten und Hunden entdeckt. Sie kommt in Verbindung mit einer Analgesie und einer Hypothermie, die durch Paracetamol verursacht wurden, vor (Botting et al. 2004; Kis et al. 2005). Das Prostaglandin H₂ wird durch gewebsspezifische Isomere zu weiteren Prostaglandinen, zu Thromboxanen und zu Prostazyklinen umgewandelt. Thromboxane werden aus aggregierten Blutplättchen freigesetzt und unterstützen die Blutgerinnung. Prostazykline verhindern in den Endothelzellen Plättchenaggregationen und tragen so zur Vermeidung einer Thrombusbildung bei.

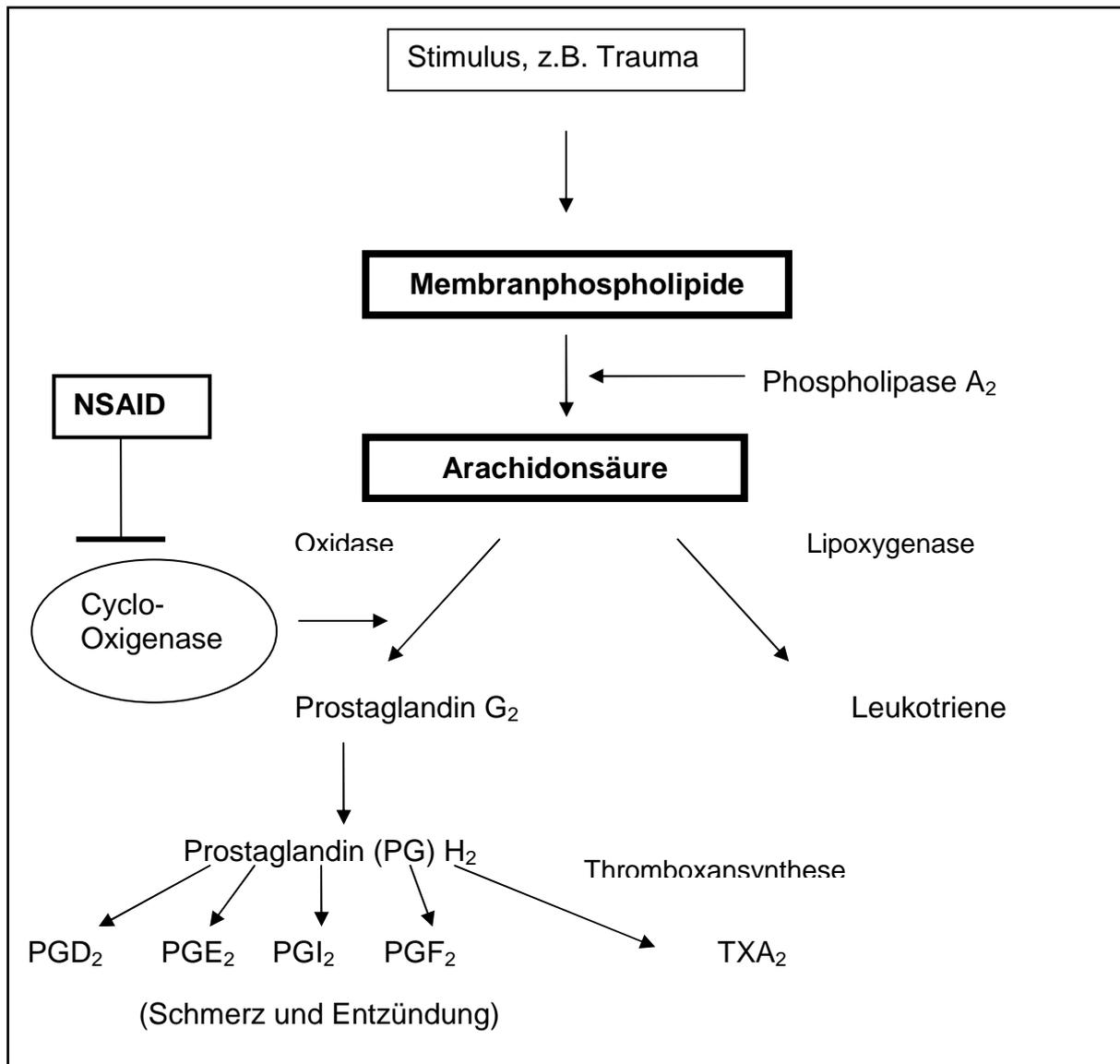


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Arachidonsäurezyklus

Die hier verwendeten NSAID zeigen alle eine Plasmaproteinbindung von über 90% und unterliegen einem entero- hepatischen Kreislauf. Die NSAID konzentrieren sich vermehrt in saurem Entzündungsexsudat.

Die Wirkstoffe zeigen unterschiedliche Affinitäten für die Cox-1 und Cox-2. Alle Substanzen hemmen eine oder beide Typen der Cyclooxygenasen und verhindern so die Metabolisierung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen. Es kommt nur zu einer geringen oder ganz ausbleibenden Schmerzenstehung und einem deutlich verminderten entzündlichen Prozess.

klassische NSAID				Cox- 2- Selektiv	
Substanz	Flunixin	Phenylbutazon	Indomethacin	Meloxicam	Celecoxib
Gruppe	Fenamin- säurederivat	Pyrazolon- derivat	Essigsäure- derivat	Oxicam- derivat	Coxib
Anwendungs- gebiet	Veterinär- Medizin	Veterinär- Medizin	Human- Medizin	Veterinär- / Human- Medizin	Human- Medizin
Angriffspunkt	starke Cox-1 Hemmung	starke Cox-1 Hemmung	starke Cox-1 Hemmung	schwach selektiv für Cox- 2	stark selektiv für Cox- 2

Tabelle 1: Pharmakokinetik der NSAID

1.7. Zielsetzung

In der Pferdepraxis wird die Stammzelltherapie zur Behandlung von Sehnendefekten immer häufiger eingesetzt. Die Tiere werden fast ausnahmslos mit NSAID vorbehandelt und auch nach der Reinjektion der eMSC wird nach Bedarf mit diesen Substanzen antiphlogistisch therapiert. Es ist unbekannt welche Auswirkung der Einsatz von NSAID auf die eMSC hat. Möglich ist eine Proliferationshemmung oder -steigerung, ein zelltoxischer Einfluss bis hin zu einem unveränderten Wachstums- und Differenzierungsverhalten. Im Falle eines toxischen Einflusses wäre die „Stammzelltherapie“ wirkungslos. Die reinjizierten Zellen würden absterben und das Gewebe zusätzlich belasten, anstelle zu einer Regeneration beizutragen.

Im Falle einer starken Proliferationssteigerung könnte es zu einer ausgeprägten Gewebszubildung kommen bis hin zu einer Entartung.

Für eine erfolgreiche Stammzelltherapie ist es dringend erforderlich, die Auswirkung des Ineinandergreifens der Stammzellinjektion mit der begleitenden Schmerztherapie zu kennen.

Die vorliegende Arbeit soll Aufschluss darüber geben, welchen Einfluss ein „NSAID-Milieu“ auf die eingebrachten eMSC im Pferd hat. Es wird untersucht, ob und in welchem Ausmaß die Medikamente die Vitalität, die Proliferation und die Differenzierungsfähigkeiten der eMSC in vitro beeinflussen.

2. Literaturübersicht: Untersuchungen zum Einfluss von NSAID auf Zellen in der Kultur

Die bisherigen Studien zum Einfluss von NSAID auf Zellen in der Zellkultur sind nicht direkt miteinander vergleichbar, weil viele unterschiedliche Parameter untersucht wurden. Es wurden verschiedene Zelltypen von unterschiedlichen Spezies verwendet, unterschiedliche Substanzen und Konzentrationen und unterschiedliche Inkubationszeiten zu Grunde gelegt. Hinsichtlich der einzelnen Fragestellungen und untersuchten Parameter bestehen deutliche Differenzen zwischen den einzelnen Studien.

Für die vorliegende Arbeit ist die Fragestellung interessant, wie die Auswirkungen von NSAID auf eMSC und von diesen abgeleiteten Chondrocyten und Osteoblasten aussehen. In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass NSAID einen negativen Einfluss auf Vitalität und Proliferation gezeigt haben und bei Osteoblasten Apoptose induzieren (Chang et al. 2006; Kellinsalmi et al. 2007). In niedrigen Dosierungen treten allerdings keine Unterschiede zu unbehandelten Kontrollen auf (Chang et al. 2006). Eine Arbeit, die sich mit der Wirkung von Diclofenac auf Osteoblasten befasste, zeigte, dass die negativen Auswirkungen nach einer gewissen Zeit reversibel sind und stark von der Dosis sowie der Häufigkeit der Applikation abhängen (Kaspar et al. 2005).

In einem Tiermodell zur verzögerten Frakturheilung unter NSAID- Einfluss wurde deutlich, dass die Verzögerungen nur in der frühen Heilungsphase zu beobachten waren und es nach etwa acht Wochen keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den behandelten Versuchsgruppen und den Kontrollgruppen gab (Brown 2004; Simon et al. 2002). Bei anderen Studien zeigten sich dagegen bleibende Benachteiligungen (Allen et al. 1980; Altman et al. 1995).

Bei Untersuchungen im Bezug auf die Wirkung von NSAID auf Chondrozyten gibt es sehr unterschiedliche Befunde. Eine Studie hat für Chondrozyten einen Proliferationsschub unter dem Einfluss von Diclofenac festgestellt (Baltes 2005), in anderen Arbeiten wurde noch zusätzlich Celecoxib, Indomethacin, Ketorolac und Piroxicam verwendet. Das Ergebnis ist, dass alle Substanzen, in therapeutischer Dosierung, einen negativen Einfluss auf die Chondrozytenproliferation haben (Chang et al. 2006; Nakamura et al. 2007).

MSC wurden bereits unter dem Einfluss von Celecoxib, Diclofenac, Indomethacin, Ketorolac und Piroxicam untersucht. Es wurden humane und murine MSC

verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Substanzen das Zellwachstum verzögern, aber keine toxischen Effekte auf die Zellen haben. Des Weiteren wurden MSC, unter Einfluss von NSAID, in die osteogene Richtung differenziert. Dabei wurde deutlich, dass Indomethacin und Piroxicam die osteogene Differenzierung in der frühen Phase negativ beeinflussen, während die restlichen Substanzen keinen Effekt zeigten (Chang et al. 2007).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Materialliste

3.1.1. Knochenmark

- Tierärztliche Klinik für Pferde in Telgte

3.1.2. Geräte

- Absaugpumpe „Vacuum gas pump“ VWR, Darmstadt
- CO₂- Inkubator HeraCell Heraeus Instruments, Hanau
- Digitalkamera DFC320 Leica, Solms
- Fluoreszenz- Mikroskop „Axiovert“ Zeiss, Koblenz
- Lichtmikroskop DMLB2 Leica, Solms
- Pipettierhilfe „accu-jet“ Brand, Wertheim
- Sicherheitswerkbank Hera Safe Typ HS 15 Heraeus Instruments, Hanau
- Vortexgerät „Reaxtop“ Heidolph, Kelheim
- Wasserbad Heraeus Instruments, Hanau
- Zentrifuge „Galaxy mini“ VWR, Darmstadt
- Zentrifuge „Labofuge 400“ Heraeus Instruments, Hanau

3.1.3. Verbrauchsmaterialien

- Einwegspritzen 2ml, 5ml, 10 ml Becton Dickinson, Franclin Lakes USA
- Eppendorf- Hütchen Sarstaedt, Nümbrecht
- Falcon Filter 70 µm Becton Dickinson, Franclin Lakes USA
- Glasplättchen 13 mm Durchmesser Marienfelde GmbH, Lauda- Königshoven
- Kanülen 16G, 18G, 20G Becton Dickinson, Franclin Lakes USA
- Kryoröhrchen Nunc, Nuaille F
- Multischalen 4 Well Nunc, Roskilde DK
- Objektträger VWR, Darmstadt
- Pasteurpipetten Brand, Wertheim
- Pipetten 50ml Greiner bio-one, Frickenhausen
- Pipettenspitzen 10µl, 200µl, 1000µl Sarstaedt, Nümbrecht
- PP- Röhrchen Cellstar® 15ml/ 50 ml Greiner Bio-one Frickenhausen
- Sterilfilter 0,2 µm Porendurchmesser Schleicher & Schuell, Dassel
- Stripetten Costar® Corning Incorporated, New York USA

- Zellkulturschalen 35 mm Falcon Becton Dickinson, Franklin Lakes USA
- Zellkulturschalen 60 mm Falcon Becton Dickinson, Franklin Lakes USA
- Zellkulturschalen 100 mm Falcon Becton Dickinson, Franklin Lakes USA

3.1.4. Lösungen und Reagenzien Zellkultur

- α - MEM PAA, Paschingen
- β - Glycerophosphat Sigma, Steinheim
- Accutase PAA, Paschingen
- Ascorbinsäure Sigma, Steinheim
- BrdU „Cell Proliferation ELISA, colorimetrisch“ Roche Diagnostics, Mannheim
- DMEM low glucose (Dulbeco's Modified Eagle Medium) Biowest, Nuaille F
- DMSO (Dimethylsulfoxid/ C_2H_6OS) Sigma, Steinheim
- fötales Kälberserum (FCS) Biowest, Nuaille F
- Fungizone Sigma, Steinheim
- ITS x100 Sigma, Steinheim
- L-Glutamine 200 mM 100x Invitrogen, Karlsruhe
- Phosphat buffered saline- Puffer (PBS) Biowest, Nuaille F
- Penicillin- Streptomycin 10.000 U/ml Invitrogen, Karlsruhe
- TGF- β 1 (Transforming Growth Factor) Sigma, Steinheim
- Trypanblau 0,4%- Lösung Flowlaboratories, McLean USA

3.1.5. Reagenzien Färbung, Fixierung, Einbettung

- Alzianblau Fluka/ Sigma, Steinheim
- Aqua Poly Mount Polyscience Inc., Warrington
- Bisbenzimid Hoechst Dye33342 Sigma, Steinheim
- Entellan Merck, Darmstadt
- Eosin Merck, Darmstadt
- Epon Fluka/ Sigma, Steinheim
- Essigsäure ($C_2H_4O_2$) Roth, Karlsruhe
- Formalin Roth, Karlsruhe
- Hämatoxylin Merck, Darmstadt
- HCL VWR, Darmstadt
- Kaiser- Gelatine Sigma, Steinheim
- Kernechtrot Merck, Darmstadt

- Methylenblau Merck, Darmstadt
- NaOH VWR, Darmstadt
- Paraffin "Paraplast plus" Kendall, Mansfield
- Paraformaldehyd ((CH₂O)_n) VWR, Darmstadt
- Red Oil O Sigma, Steinheim
- Silbernitrat Merck, Darmstadt

3.1.6. Reagenzien PCR

- 100 bp DNA Ladder Invitrogen, Karlsruhe
- Agarose LE Biozym, Hess. Oldendorf
- DNase I Invitrogen, Karlsruhe
- dNTP- Mix Invitrogen, Karlsruhe
- M- MLV Reverse Transcriptase + Puffer Invitrogen, Karlsruhe
- Oligo (dt) Invitrogen, Karlsruhe
- RNeasy mini kit Quiagen, Hilden
- Taq- Polymerase + Puffer Invitrogen, Karlsruhe
- Tris Borsäure EDTA (TBE) Merck, Darmstadt

3.1.7. Nichtsteroidale Antiphlogistika

- Celecoxib Pfizer, Karlsruhe
- Flunixin, Finadyne® Essex, München
- Indomethacin Sigma, Steinheim
- Meloxicam, Metacam® Boehringer Ingelheim, Ingelheim/ Rhein
- Phenylbutazon Sigma, Steinheim

3.1.8. Verwendete Medien

- Proliferationsmedium:
20 % fetales Kälberserum (FCS)
2 % Penicillin und Streptomycin (P/S)
1 % Glutamin
aufgefüllt mit Grundmedium α MEM

- Einfriermedium:
 - 30 % FCS
 - 5 % DMSO
 - aufgefüllt mit Grundmedium α - MEM

- Adipogenes Induktionsmedium
 - 15 % FCS
 - 1 % P/S
 - 1 % Glutamin
 - 0,5 % ITS x100
 - 0,1 % Dexamethason
 - aufgefüllt mit α MEM, bei Mediumwechsel wurden 1,073 μ l Indomethacin auf 500 μ l Medium direkt zu den Zellen gegeben

- Osteogenes Induktionsmedium
 - 15 % FCS
 - 6 % Ascorbinsäure 1mM
 - 1 % P/S
 - 1 % Glutamin
 - 1 % Glycerophosphat 1M
 - 0,01 % Dexamethason 1mM
 - aufgefüllt mit α MEM

- Chondrogenes Induktionsmedium
 - 5 % Ascorbinsäure 1mM
 - 1 % P/S
 - 1 % Glutamin
 - 1 % FCS
 - 0,005 % ITS x 100
 - aufgefüllt mit DMEM, bei Mediumwechsel wurden 5 μ l TGF- β 1 direkt zu den Zellen hinzu gegeben.

3.2. Material und Methode

Alle hier beschriebenen Arbeitsschritte und die Anzucht der Zellen fanden in einer Zellkultur der Sicherheitsstufe 1 statt. Es wurden nur sterile oder sterilisierte Materialien und Geräte verwendet. Der direkte Umgang mit den Zellen fand an einer Sicherheitswerkbank der Fa. Heraeus Instruments GmbH statt.

Die Zellen wurden in einem Heraeus „Hera-Cell“- Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.3. Aufbereitung und Anzucht der eMSC

Isolierung der eMSC aus dem Knochenmark (KM)

Die eMSC's wurden aus Sternalaspirat gewonnen. Die Entnahme erfolgt unter Sedation und Lokalanästhesie am stehenden Pferd.

Die Sedation wurde am stehenden Pferd mit Detomedin bei einer Dosierung von 20 µg/ kg Körpergewicht durchgeführt. Nachdem das Sternum im Bereich des 3.- 4. Interkostalraum sonographisch erfasst und markiert wurde, wurde die entsprechende Stelle rasiert und desinfiziert und somit auf den Eingriff vorbereitet. Das Operationsgebiet wurde mit 1- 2 ml Lidocain 2% lokal anästhesiert. Nachdem der Tierarzt mit einem Skalpell der Größe 11 einen ca. 0,5 cm großen Hautschnitt gesetzt hatte, führte er die Entnahmekanüle, 10 G der Firma Terumo, in den markierten Interkostalraum ein und entnahm damit das KM aus dem Sternum. Das frisch gewonnene KM wird sofort in ein Transportmedium überführt, gekühlt aufbewahrt und schnellstmöglich in ein Labor gebracht.

Zur Vorbeugung einer Infektion bekamen die Pferde 6,6 mg Gentamycin pro Kilogramm Körpergewicht und ein antiphlogistisch wirksames Analgetikum, 1,1 mg Flunixin pro Kilogramm Körpergewicht, beides i.v. injiziert.

Aufbereitung der isolierten eMSC

Die Weiterverarbeitung des Sternumaspirats sollte innerhalb von 24 Stunden nach der Entnahme stattfinden. Bis zu dem Zeitpunkt der Weiterverarbeitung wurden die Proben gekühlt gelagert.

Das Sternalaspirat wurde durch einen 70 µM Falcon Filter zu gleichen Teilen in zwei 50 ml PP- Röhrrchen Cellstar (PP- Röhrrchen) filtriert, um vorhandene Koagulate und größere Lipidtropfen abzutrennen.

Beide PP- Röhrrchen wurden mit kaltem 0,1 M PBS auf 50 ml aufgefüllt, um eine zu starke Temperaturschwankung zu vermeiden.

Die PP- Röhrrchen wurden 10 Minuten lang bei 169,3 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment jeweils mit PBS auf 50 ml aufgefüllt.

Darauf folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt mit 75,26 g für 5 Minuten.

Das Sediment wurde jeweils nach erneutem Absaugen des Überstandes in 1 ml Proliferationsmedium resuspendiert und zusammen mit weiteren 9 ml Proliferationsmedium in eine 100 mm Falcon Kunststoffschale gegeben.

Der Tag der Aufbereitung wird als Tag 0 bezeichnet.

Am Tag 2 wurden 10 ml Proliferationsmedium in die Kunststoffschale hinzu gegeben.

Am Tag 3 wurde der Überstand aus der Schale vorsichtig abgenommen und in eine neue 100 mm Schale (Falcon) gegeben, in die ursprüngliche Schale kamen 10 ml frisches Proliferationsmedium hinzu.

In den folgenden Tagen wurden die Proben vorsichtig mit PBS gewaschen, um Erythrocyten und andere hämatopoetische Blutzellen zu entfernen.

Nach zehn bis vierzehn Tagen konnten die Zellen zum ersten Mal passagiert werden.

Mediumwechsel

Da in den Zellen Stoffwechselprozesse ablaufen und sich Stoffwechselprodukte ansammeln, musste in regelmäßigen Abständen das Medium gewechselt werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt und frisches hinzu gegeben, um so Stoffwechsel- und toxische Abbauprodukte zu entfernen, und den Zellen neue Nährstoffe zu zuführen. Die Zeitabstände richteten sich nach den Schalengrößen und des darin enthaltenen Mediumvolumens.

Passage

Die Zellen wurden passagiert sobald sie eine Konfluenz von 80 % erreicht haben. Wenn eine Stammzellkultur eine höhere Dichte erreicht kann es zu einem

Ausdifferenzieren oder Ablösen der Zellen führen, sowie zu einer Verklumpung der Zellen.

Das Medium wurde abgesaugt und PBS zu den Zellen hinzu gegeben. Der Puffer bewirkte einen Ionenaustausch, der ein leichteres Ablösen der Zellen ermöglichte. Nach einer Minute wurde das PBS wieder abgesaugt und es folgte ein enzymatischer Verdauungsschritt, wozu Accutase, ein Enzymcocktail, zum Ablösen auf die Zellen appliziert wurde. Accutase hat den Vorteil, dass die Zellen sich leicht von ihrer Unterlage lösen, ohne weitere Schäden zu nehmen.

Damit die Accutase optimal wirken konnte, wurden die Zellen 3 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen unter mehrmaligen Spülen von der Schale gelöst und in ein 15 ml PP- Röhrchen mit 8 ml vorgelegtem Proliferationsmedium gegeben.

Das PP- Röhrchen wurde bei 75,26 g 5 Minuten lang zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das sichtbare Zellpellet im PP- Röhrchen belassen. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Proliferationsmedium resuspendiert um die Zellen zu vereinzeln.

Schließlich wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer- Zählkammer bestimmt und auf die Gesamtzellzahl in einem Milliliter hochgerechnet. Es wurden 500- 1500 Zellen pro cm² Fläche der Kulturschale ausgesät, je nachdem wie schnell eine 80% Konfluenz erreicht werden sollte. Anhand der Gesamtzellzahl wurde berechnet wieviel Mikroliter der Zellsuspension pro Kulturschale hinzu gesetzt wurden.

Die berechnete Menge Zellsuspension wurde mit dem Proliferationsmedium in eine Falconschale gegeben und unter kreisenden Bewegungen gleichmäßig in der Schale verteilt.

Zellkulturmedien

Proliferationsmedium:

Das Proliferationsmedium ist das Standardmedium für normale Kulturbedingungen. Es wurde für die Kontrollansätze und bei der Anzucht der Zellen unter Standardbedingungen verwendet.

Einfriermedium:

Das Einfriermedium wurde genutzt, um die Zellen schonend einzufrieren.

3.4. Methode der Kryokonservierung der eMSC

Das Einfrieren dient dazu, Zellen für einen möglichst langen Zeitraum zu konservieren. Der Ablauf erfolgte wie beim Passagieren der Zellen. Ab einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen von ihrer Schale enzymatisch abgelöst und anschließend wieder von diesem Enzymgemisch gereinigt. Vorbehandlung und weiteres Vorgehen wurden bereits bei dem Passagieren beschrieben. Schließlich wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (Fa. Nunc) überführt. Währenddessen wurde der Einfriercontainer Nalgene®, Cryo 1°C Freezing Container der Firma Nalge, vorgekühlt. Der Einfriercontainer besaß eine doppelte Wandung mit einer Isopropanolfüllung und ermöglichte so, Zellen oder Gewebe möglichst sanft einzufrieren, um einen besseren Gewebs- bzw. Zellerhalt zu gewährleisten. Die Temperatur in seinem Inneren sank konstant jede Minute um 1 Grad Celsius. Das Röhrchen wurde in dem Container für 1,5 - 2 Stunden in einen -80°C Gefrierschrank gestellt, um es danach in einen Tank mit flüssigem Stickstoff zu überführen. Der flüssige Stickstoff bietet bei -196°C eine lange, nahezu unbegrenzte Lagerungsmöglichkeit.

Vorgang des Auftauens:

Das Auftauen der Zellen sollte recht schnell durchgeführt werden. Das DMSO, welches in dem Einfriermedium enthalten ist, ist zwar ein gutes Zellprotektivum beim Einfrieren der Zellen, jedoch hat es zelltoxische Eigenschaften und wirkt als Induktor für Differenzierungen der Zellen, wenn es im erwärmten Zustand mit den Zellen in Berührung kommt.

Deshalb wurden die Zellen, sobald sie aus dem flüssigen Stickstoff entnommen wurden, so schnell wie möglich aufgetaut. Dies geschah im Wasserbad bei 37°C für ca. 2 Minuten. Danach konnte die Zellsuspension in ein Falconröhrchen, in dem 10 ml Proliferationsmedium vorgelegt waren, überführt werden. Das vorgelegte Medium sollte das Einfriermedium aus den Zellen auswaschen. Das Medium sollte kalt sein, damit sich der Temperaturunterschied nicht zu schnell ändert. Schließlich wurden die Zellen zentrifugiert, so dass ein Pellet entstand. Das geschah wieder in einem Zentrifugierschritt bei 75,26 g für 5 Minuten.

Der Medienüberstand wurde abgesaut und eine erneute Resuspension mit dem Proliferationsmedium durchgeführt. Die Zellen wurden nun wieder auf einer Schale

ausplattiert. Kreisende Bewegungen im Brutschrank garantierten eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Schale und sollten einer Verklumpung entgegenwirken.

3.5. Verwendete Substanzen der NSAID

Die NSAID Celecoxib, Indomethacin und Phenylbutazon waren pulverförmig und wurden unter Beachtung ihres Molekulargewichtes in DMSO gelöst, um eine Stammlösungen von definierter Molarität zu erhalten.

Die Celecoxib- Stammlösung betrug 10 mMol, die Indomethacin- und Phenylbutazon- Stammlösungen hatten eine Konzentration von 100 mMol.

Flunixin (Finadyne®) und Meloxicam (Metacam®) wurden in Form von fertigen Arzneimitteln angewendet und anteilig dem entsprechenden Medium zugesetzt. Dabei war zu beachten, dass Finadyne®, zusätzlich zu dem Wirkstoff Flunixin-Meglumin, noch Phenol, Hydroxymethansulfinsäure, Natriumsalz und Propylenglykol enthielt. Im Metacam® war neben dem Wirkstoff Meloxicam noch Ethanol enthalten.

Damit die Zellen einer immer identischen DMSO- Konzentration ausgesetzt waren, wurde das DMSO auch zu den NSAID in flüssiger Formulierung sowie zu den unbehandelten Kontrollzellen entsprechend hinzugefügt.

Es wurde nicht mehr als ein halbes Prozent DMSO verwendet, um toxische oder differenzierende Effekte zu vermeiden.

3.6 Zellkinetik mit NSAID- Zusätzen

Zur Beurteilung der Zellkinetik in einer Langzeituntersuchung unter dem Einfluss von NSAID wurden die Zellen mit einer definierten Zellzahl in einer immer gleich großen Kulturschale ausgesät und mit Erreichen einer 70- 80 % Konfluenz passagiert. Die Zellzahlen in den einzelnen Schalen wurde mit Hilfe der Neubauer- Zählkammer ermittelt. Im Anschluss wurden die Zellen wieder mit der definierten Zellzahl ausgesät. Die genaue Uhrzeit und Kulturdauer wurde dokumentiert. Dieser Zyklus wurde bis zur sechsten Passage fortgeführt.

3.6.1 Verwendete Konzentrationen der NSAID:

Celecoxib	Meloxicam	Indomethacin	Flunixin	Phenylbutazon
0,01µMol	0,01µMol		10µMol	10µMol
0,1 µMol	0,1 µMol	50 µMol	50 µMol	50 µMol
1 µMol	1 µMol	100µMol	100µMol	100µMol
10 µMol	10 µMol			500 µMol

Tabelle 2: Wirkstoffkonzentrationen von NSAID in der Langzeitkinetik

3.7. Berechnung der Generationsverdopplungen und der Generationszeit

Anhand der Auszählung der Zellen mit den verschiedenen NSAID und den verschiedenen Konzentrationen konnte die Generationsverdopplungszeit mit Hilfe der Formel zur Berechnung der Generationsverdopplungszeit bestimmt werden.

Die Generationsverdopplung wurde mit der Formel

$$n = (\log N - \log N_0) / \log 2$$

berechnet.

Die Generationszeit wurde mit der Formel: $t_G = t/n$ berechnet.

$n =$ Generationsverdopplung

$N =$ Zahl der Zellen

$N_0 =$ Zellzahl bei der Ausplattierung

$t_G =$ Generationszeit

$t =$ Kultivierungsdauer in h

Mithilfe der Generationsverdopplungszeit, der ausgesäten Zellzahl, der ermittelten Zellzahl und der Gesamtkultivierungsdauer in Tagen wurde die kumulative Gesamtzellzahl berechnet. Die kumulative Gesamtzellzahl gibt an, wie viele Zellen man erhalten hätte, wenn alle Zellen bis zur sechsten Passage weiter kultiviert worden wären.

3.8. Vitalitäts- und Proliferationsassay

Diese Untersuchungen wurden mit dem „Cell Proliferation Reagent WST-1“-Essay (Zellaktivität) und dem „Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“- Kit (Zellproliferation), beides Firma Roche (Mannheim) durchgeführt.

WST ist ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz (4-[3-(4iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5tetrazolio]-1,3- Benzol- Disulfonat).

Durch metabolisch aktive Zellen mit einem Succinat- Tetrazolium- Dehydrogenase System wurde das rote WST-1 enzymatisch zu dunklerem rot gefärbten Formazan umgesetzt, welches photometrisch mit einem ELISA- Reader detektiert werden konnte.

Dabei konnte das entstehende Formazan in ein direktes Verhältnis zu der Anzahl vitaler Zellen gesetzt werden.

BrdU (5- Bromo-2'- desoxyuridin) ist ein Analog zu Pyrimidin und wurde anstelle von Thymidin in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut.

Das BrdU reagierte mit dem später hinzugefügten Antikörper zu einem Produkt mit Farbumschlag. Die Absoptrionsrate dieses Farbumschlages korrelierte direkt mit der Anzahl proliferierender Zellen.

Die Untersuchungen zur Proliferation und zur Vitalität der Zellen wurden in einem Ansatz durchgeführt.

Die Zellen wurden in einer 96- well Microwellplatte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert.

Die NSAID wurden in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt, jeweils drei Wells für eine Konzentration als Wiederholung.

Celecoxib	Meloxicam	Indomethacin	Flunixin	Phenylbutazon
0,01µMol	0,01µMol	10µMol	10µMol	10µMol
0,1 µMol	0,1 µMol	50 µMol	50 µMol	50 µMol
1 µMol	1 µMol	100µMol	100µMol	100µMol
10 µMol	10 µMol	500 µMol	500 µMol	500 µMol
100 µMol	100 µMol			1000 µMol
200 µMol	200 µMol			

Tabelle 3: Wirkstoffkonzentrationen von NSAID für den WST-1- und BrdU- Assay

Zwei Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit wurde die BrdU- Lösung in einer Verdünnung von 1:1000 zu den Zellen hinzu gegeben.

Nach Ablauf der 24 Stunden Inkubationszeit kam das WST-Reagenz in einer Verdünnung von 1:10 (90 Minuten, 37°C im Brutschrank) hinzu, im Anschluss wurde die Microplatte im ELISA- Reader ausgelesen. Die Wellenlänge des Messfilters lag bei 450 nm und bei 655 nm für den Referenzfilter.

Im weiteren Vorgehen wurden die Zellen mit der Lösung FixDenat® (30 Minuten bei Raumtemperatur) denaturiert und fixiert, damit der anschließend hinzu gegebene Peroxidase- gekoppelte Antikörper das eingebaute BrdU erkennen konnte.

Mit dem BrdU bildete der Antikörper einen Immunkomplex. Im nächsten Schritt wurden die Zellen dreimal mit Puffer gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.

Nun wurde Tetramethylbenzidin hinzugefügt, welches die gebundene Peroxidase durch einen blauen Farbumschlag darstellte.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,5 molarer Schwefelsäure abgestoppt, was sich in einem gelben Farbumschlag widerspiegelte.

Das Ergebnis wurde im ELISA- Reader mit einem Messfilter von 450 nm Wellenlänge und einem Referenzfilter von 655 nm Wellenlänge ausgelesen.

3.9. Untersuchung zur Zellmigration unter NSAID- Einfluss

Zum Nachweis der Zellmigration wurde eine 60 mm Falconschale mit eMSC solange kultiviert (Proliferationsmedium) bis die Population eine Konfluenz von 80 – 90 % erreichte. War die gewünschte Zelldichte erreicht, wurde mit einer blauen Pipettenspitze mit einem Durchmesser von 0,09 cm ein Kratzer durch den konfluenten Zellrasen gezogen, so dass dieser lokal zerstört wurde. Mittels eines Vitalbeobachtungssystems (Zeiss) sollte gezeigt werden, dass die Zellen, um ihre Zell-Zell-Kontakte zu erneuern, von der einen zur gegenüberliegenden Seite migrierten.

Es wurden den Zellen die NSAID Meloxicam und Celecoxib in den Konzentrationen 10 -50 µMol und Phenylbutazon (100, 500, 750 µMol) hinzugefügt. Des Weiteren wurden mehrere Kontrolldurchgänge ohne NSAID- Zusatz durchgeführt.

3.10. Untersuchung der Pluripotenz der eMSC unter NSAID- Behandlung

Um die Pluripotenz der eMSC festzustellen, wurde das Differenzierungspotential der Zellen in Richtung Fett-, Knorpel- und Knochengewebe gezeigt. Dazu wurden die Zellen für die Fett- und Knochendifferenzierung nach der Passage auf sterile Deckgläschen in 4- Multiwell- Schalen (Firma Nunc, Roskilde) ausplattiert. Das Kultivieren auf den Glasplättchen diente dem späteren Herausnehmen der Zellen aus den Schalen, so dass sie nach den entsprechenden Nachweisverfahren problemlos auf einen Objektträger gelegt werden konnten und als Dauerpräparate zur Verfügung standen. Für die Chondrozytendifferenzierung mussten die Zellen in einer 3-D-Kultur differenzieren, dazu wurden 300.000 Zellen pro Falcon Röhrchen pipettiert. Bevor die Zellen in den Brutschrank kamen, wurden sie nochmals bei 75,26 g für 5 Minuten abzentrifugiert.

Für die Knorpeldifferenzierung mussten die Zellen für 3 Wochen in dem Differenzierungsmedium verbleiben, für die Knochen- und Fettdifferenzierung 10 Tage im entsprechenden Differenzierungsmedium. Die NSAID Celecoxib und Meloxicam wurden in den Konzentrationen 1 μMol , Flunixin und Phenylbutazon 10 μMol und Indomethacin 50 μMol hinzu gegeben. Es wurden diese Wirkstoffkonzentrationen für die Differenzierungen verwendet, weil sie den physiologischen Wirkstoffkonzentrationen im Pferdekörper bzw. menschlichen Körper (Celecoxib, Indomethacin) entsprechen (Toutain et al. 2004; Toutain et al. 1994; Tobin et al. 1986).

Nach der Kultivierung im entsprechenden Differenzierungsmedium wurden die Kulturen nach Ablauf der Versuchsdauer durch die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M PBS abgestoppt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe spezifischer Färbungen bzw. unter Verwendung molekularbiologischer Methoden.

3.10.1. Adipogene- und Osteogene Differenzierung

Für die adipogene und osteogene Differenzierung wurde das adipogene bzw. das osteogene Induktionsmedium eingesetzt.

2x 4er Well

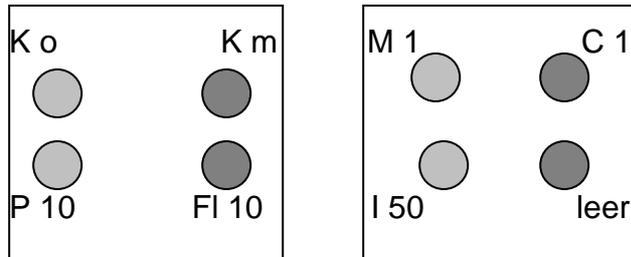


Abbildung 5: Schemazeichnung Adipogene- und Osteogene Differenzierung: 2 x 4 er Well

K o = unbehandelte Kontrolle mit Proliferationsmedium,

K m = unbehandelte Kontrolle mit Chondromedium / Adipozytenmedium,

P 10 = Osteo- / Adipogenes Medium mit Phenylbutazon 10 µMol,

FI 10= Osteo- / Adipogenes Medium mit Flunixin 10µMol,

M 1= Osteo- / Adipogenes Medium mit Meloxicam 1µMol,

C1= Osteo-/ Adipogenes Medium mit Celecoxib 1µMol,

I50= Osteo- / Adipogenes Medium mit Indomethacin 50 µMol

leer= keine Zellen enthalten

3.10.2. Induktion der chondrogenen Differenzierung

Für die Induktion der chondrogenen Differenzierung wurden jeweils 300.000 Zellen in 7 PP- Röhrcen (15 ml) überführt. Ein Röhrcen wurde vorab mit dem Proliferationsmedium, die übrigen 6 Röhrcen mit dem Induktionsmedium für die chondrogene Differenzierung befüllt. Von den 6 Röhrcen mit dem Induktionsmedium wurden in 5 Röhrcen NSAID hinzu gegeben. Die Gesamtmenge an Medium pro Röhrcen betrug 500 µl. Die NSAID Celecoxib und Meloxicam wurden in der Konzentration 1µMol, Flunixin und Phenylbutazon in der Konzentration 10 µMol und Indomethacin in der Konzentration 50 µMol hinzu gesetzt.

3.10.3. Medienwechsel während der Differenzierung

Der Medienwechsel erfolgte alle 2 Tage.

Die Medien wurden folgendermaßen vorbereitet:

Osteogenes Induktionsmedium: ohne weitere Adjuvantien

Chondrogenes Induktionsmedium: pro Falconröhrchen wurden 5 µl TGF-β direkt beim Mediumwechsel hinzu gegeben.

Adipogenes Induktionsmedium: in jedes Well wurden 1,073 µl Indomethacin direkt beim Mediumwechsel hinzu gegeben.

3.11. Zellaufbereitung für die histologische Untersuchung

Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium vollständig von den Zellen abgesaugt, bevor dann ein Waschschrift mittels 0,1 M PBS-Lösung durchgeführt wurde. Die 4 % PFA in 0,1 M PBS wurde auf die Zellen gegeben und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Das Prinzip der Fixierung funktionierte so, dass die NH₂-Gruppen membranärer und zellulärer Proteine über die Aldehyde miteinander vernetzt wurden, und so die Zellen in ihrer Struktur erhalten blieben. Anschließend wurde das 4% PFA mittels drei aufeinander folgender Waschschrift, unter Verwendung von 0,1 M PBS, eliminiert und die Zellen in 0,1 M PBS der Histologie zugeführt.

Diese Art der Fixierung wurde bei den histologischen Färbemethoden für die adipogene (Red Oil), chondrogene (Alzianblau) und osteogene (von Kossa) Differenzierung angewendet.

3.12. Histologische Nachweisverfahren

3.12.1. Red Oil O Färbung mit anschließender Hämatoxin Gegenfärbung nach Mayer

Die Red-Oil- O- Färbung diente dem Nachweis von Neutralfetten.

Für die Färbung wurde zuerst die PBS-Lösung, in der die Zellen nach der Fixierung standen, abgesaugt. Die Zellen wurden mit Aqua dest. gespült. Danach wurde die Färbelösung appliziert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie 3 x mit Aqua dest. gewaschen. Nun erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxin nach Mayer. Dieser Farbstoff konnte 4 Minuten einwirken. Anschließend

wurde erneut mit Aqua dest. gespült und daran anknüpfend mit Leitungswasser für vier Minuten gebläut. Die Einbettung erfolgte in Glycerin-Gelatine.

Rezept zur Herstellung der gebrauchsfertigen Red Oil O- Lösung:

4 Teile Red Oil O

6 Teile Aqua dest.

3.12.2. Von Kossa Färbung

Zum morphologischen Kalknachweis

Die von Kossa Färbung, die zum Kalzifizierungsnachweis der mineralisierten Extrazellulärmatrix dient, induzierte eine schwarze Färbung des mineralisierten Knorpel und Knochengewebes durch Ausfällung von Ca^{2+} - Ionen durch Silbernitrat. Zellen und Weichgewebe stellten sich nach der Gegenfärbung mit Kernechtrot kontrastreich dar.

Nach der PFA- Fixierung wurde für 5 Minuten Aqua dest. auf die Zellen gegeben. Im nächsten Arbeitsschritt wurde eine 5 % Silbernitrat-Lösung appliziert und 30-60 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend 3 x mit Aqua dest. gewaschen. Zur Reduktion wurden die Zellen 5 Minuten mit einer Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung überschichtet, welche anschließend für 10 Minuten in ständig wechselndem Leitungswasser ausgewaschen wurde. Zur Darstellung der Zellen wurde eine Gegenfärbung mit einer Kernechtrot-Färbung durchgeführt, die 5 - 10 Minuten auf den Zellen verblieb. Ein finales Waschen mit Aqua dest. erfolgte, bevor die Zellen über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert wurden in der Reihenfolge 50%, 70%, 90% und 100% und mit Entellan® eingedeckt wurden.

Inhaltsstoffe der Färbelösung für die von Kossa Färbung:

5% Silbernitrat-Lösung

Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung

Kernechtrot-Färbung

3.12.3. Alzianblaufärbung

Anfärbung von sauren Mukopolysacchariden

Um das Ergebnis einer Knorpeldifferenzierung als positiv anzusehen, mussten saure Mukopolysaccharide nachgewiesen werden.

Die Alzianblaufärbung dient dem Nachweis saurer Mukopolysaccharide, wie sie bei Knorpelzellen vorkommen. Dazu wurden die Zellpellets nach der Differenzierung in Paraffin eingebettet, geschnitten und getrocknet.

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte für 20 Minuten in Alzianblau gefärbt. Eine anschließende Färbung in Kernechtrot sollte eine klare Kernfärbung ergeben.

Nach der Differenzierung wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Entellan® eingedeckt.

Alzianblau- Färbung:

Alzianblau

Eisessig

Aqua dest.

3.13. Einbetten für die Elektronenmikroskopie

Nach der Fixierung wurden die Zellen für 5 Minuten in 0,07 M CaCo-Puffer eingelegt. Anschließend wurden die Proben in einer 1 % Osmium-Lösung (in 0,07 M CaCo-Puffer) für 2 Stunden bei 4°C inkubiert, nach Ablauf der Zeit, sollten die Proben schwarz sein. Es wurde einmal für 10 min in 0,07 M CaCo-Puffer gewaschen und danach noch zweimal in 0,05 M Maleatpuffer und in diesem über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Der Maleatpuffer sorgte für einen besseren Zellerhalt. Am nächsten Tag wurde die Probe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Reihenfolge ist 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 3 x 100 % für jeweils 10 Minuten bei 4°C. Während der nächsten 10 Minuten wurde ein Gemisch aus 100 % EtOH und Propylenoxyd im Verhältnis 1:1 auf die Proben gegeben, danach folgte eine Verweildauer von 10 Minuten in reinem Propylenoxyd. Während beider Inkubationen standen die Proben im Kühlschrank bei 4°C. Die folgenden Schritte der Eponeinbettung benötigten Inkubationszeiten von je einer Stunde. In der ersten Stunde wurde eine Lösung aus Propylenoxyd und Epon im Verhältnis 1:1 verwendet, in der zweiten Stunde wurde eine Lösung Propylenoxyd und Epon im Verhältnis 1:3 auf die Proben gegeben. Über Nacht wurden die Proben in reines Epon gegeben.

Am darauf folgenden Tag wurden Beem-Kapseln mit Epon befüllt und die Chondropellets in die Spitzen der Beem-Kapseln gegeben. Bei den Zellen mit Phenylbutazonzugabe wurde das Epon in die konfluenten Falconschalen gegossen.

Eine Aushärtung des Kunststoffes erfolgte im Ofen bei 60°C für gut drei Tage. Nach dem Abkühlen konnten die in Kunststoff eingebetteten Proben geschnitten werden.

Für die Herstellung von 25 g Epon werden folgende Substanzen benötigt:

Epikot	11,56 g
Dodecanylbernsteinsäureanhydrid (DDSA)	7,13 g
Methylnodicanhydrid (MNA)	6,28 g
2,4,6-Triphenol (MMP-30)	0,38 g

3.14. Elektronenmikroskopische Untersuchung von eMSC mit Phenylbutazonzugabe in verschiedenen Konzentrationen

Es wurden eMSC in 60 mm Falconschalen ausgesät (1000 Zellen/ cm²) und exemplarisch mit Phenylbutazon in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 500 µMol versetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte eMSC mit und ohne DMSO- Zusatz. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer 80% Konfluenz kultiviert und im Anschluss für die elektronenmikroskopische Auswertung fixiert und eingebettet.

3.15. Elektronenmikroskopische Untersuchung von eMSC mit chondrogenen Induktionsmedium und NSAID

Die eMSC wurden nach dem chondrogenen Differenzierungsprotokoll behandelt und mit NSAID versetzt, Celecoxib und Meloxicam 1µMol, Flunixin und Phenylbutazon 10 µMol, Indomethacin 50 µMol. Die chondrogen differenzierten Zellpellets wurden für die elektronenmikroskopische Auswertung fixiert und eingebettet.

3.16. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

3.16.1. RNA Isolierung

Die behandelten Proben stammen aus einer chondrogenen Differenzierung und aus einer osteogenen Differenzierung die nach den bereits genannten Protokollen durchgeführt wurden.

Jeweils eine Probe in der chondrogenen und in der osteogenen Differenzierung wurde in Proliferationsmedium und jeweils eine Probe in chondrogenen Induktionsmedium bzw. in osteogenen Induktionsmedium inkubiert.

Zu jeweils fünf weiteren Proben wurden NSAID zu den chondrogenen und osteogenen Differenzierungsmedien hinzu gegeben.

Celecoxib	Meloxicam	Flunixin	Indomethacin	Phenylbutazon
1 µMol	1 µMol	10 µMol	50 µMol	10 µMol

Tabelle 4: Verwendete Wirkstoffkonzentrationen in der Differenzierung

NSAID- Konzentrationszugaben zu den chondrogenen und osteogenen Differenzierungsmedien.

Es wurden diese Wirkstoffkonzentrationen für die Differenzierungen verwendet, weil sie den physiologischen Wirkstoffkonzentrationen im Pferdekörper entsprechen (Tobin et al. 1986; Toutain et al. 1994; Toutain et al. 2004).

Es wurden sowohl die chondrogen kultivierten Proben als auch die Kontrollen im Kultivierungsmedium mit Hilfe der reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) analysiert. Zur Isolierung der Gesamt- RNA aus den eMSC wurde das RNeasy Mini Kit® der Firma Qiagen verwendet.

Vorbereitung der Zellen

Chondrogene Differenzierung:

Das Medium wurde von den chondrogen differenzierten Zellpellets abgesaugt und zum Ablösen der Zellen wurde Accutase appliziert. Mit einer Pipettenspitze wurde das Pellet durch häufiges und heftiges resuspendieren mechanisch und enzymatisch zerkleinert. Nach erfolgter Homogenisierung wurde die Accutase nach einer Zentrifugation bei 75,26 g für 5 Minuten abgesaugt. Das Pellet wurde zur weiteren Behandlung in ein Eppendorfröhrchen überführt. In diesem Zustand konnten die Proben bei - 80°C gelagert werden.

Osteogene Differenzierung:

Die Zellen wurden, wie beim bereits beschriebenen Passagevorgang, abgelöst. Der Accutaseüberstand wurde nach einem Zentrifugationsdurchgang (5 min, 75,26 g) abgesaugt. Die Zellen wurden als Pellet in ein Eppendorfröhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

Die weitere RNA- Gewinnung und Aufreinigung erfolgte nach dem Standardprotokoll der Firma Quiagen für das RNeasy Mini Kit®.

3.16.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 250 nm. Bei dieser Wellenlänge haben Nukleinsäuren in Lösung ihr Absorptionsmaximum. Die Konzentration der Lösung ist proportional zur gemessenen Extinktion und kann unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung berechnet werden, eine Extinktion von 1,0 entspricht 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Der Blankwert wurde als Nullwert verwendet.

3.16.3. DNase Verdau

DNase I ist ein Enzym, das in der Lage ist, einzel- und doppelsträngige DNA abzubauen, ohne die während der Reaktion vorhandene RNA zu schädigen. Zur Beseitigung von möglichen DNA- Kontaminationen in der isolierten Gesamt- RNA wurde daher ein DNase- Verdau durchgeführt. Nach dem Protokoll der Fa. Invitrogen wurden 2 µl Gesamt- RNA in 1x DNase I-Puffer mit 2 U DNase I (Invitrogen) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden anschließend 2 ml EDTA (25 mM) zugesetzt. Die RNA konnte dann direkt in die RT- Reaktion eingesetzt werden.

3.16.4. Reverse Transkription (RT)

Bei der RT wird aus RNA cDNA synthetisiert, die anschließend als Template für PCR's dienen soll. Die 2 µg mit DNase I verdaute Gesamt- RNA wurde zur Aufhebung von Sekundärstrukturen zunächst in einen Thermocycler für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe des RT- Mixes erfolgte bei 37°C im Thermocycler innerhalb einer Stunde die Synthese des komplementären DNA-Stranges durch das Enzym „Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase“ (M-MLV RT) (Invitrogen). Als Primer wurden Oligo- dt16- Primer (MWG) verwendet. Zur Inaktivierung des Enzyms und zur Denaturierung des RNA/ DNA-Doppelstranges wurde der RT- Ansatz anschließend für 5 Minuten bei 90°C erhitzt. Die erhaltene cDNA konnte dann sofort in die verschiedenen PCR- Experimente eingesetzt werden.

Zusammensetzung des RT-Mixes:

2 µg	RNA
10 µl	First- Standard Buffer (5x) (Invitrogen)
2,5 µl	dNTP- Mix 10mM (Invitrogen)
1 µl	Oligo dT 0,5µg/µl (Invitrogen)
2 µl	DTT 100mM (Invitrogen)
1 µl	M- MIV RT (Invitrogen)
ad 50 µl	auffüllen mit autoklaviertem Aqua bi dest.

3.16.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) / RT-PCR

Zum Nachweis der Transkripte und zur relativen Quantifizierung der Expression unterschiedlicher Gene wurde die PCR in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (Primus 96^{plus} MWG AG Biotech) nach dem unten angegebenen Programm angewendet. 4 µl des RT- Ansatzes (s. RT- Ansatz) wurden mit genspezifischen Primern (Sequenzen siehe Anhang) in die PCR eingesetzt. In einem Reaktionsansatz wurden gleichzeitig das gewünschte Zielgen und ein konstitutiv exprimiertes Gen, hier β - Actin, amplifiziert. Die Annealing- Temperatur wurde für jedes spezifische Primerpaar individuell verändert (Tabelle 5). Nach der Amplifikation wurden die Transkripte mit DNA- Probenpuffer (5 x) versetzt, in einem 2 % Agarose- Gel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid (Serva) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Zielgen- Primer	Konzentration	Annealing- Temperatur	Zyklen
β - Aktin – F/R	Je 25 pmol	54°C	34
Aggrecan –F/R	Je 25 pmol	54°C	34
Collagen- II- F/R	Je 25 pmol	58°C	34
Oct- 4 – F/R	Je 25 pmol	58 °C	34
Runx-2 – F/R	Je 15 pmol	58 °C	34

Tabelle 5: Liste der Primer für die PCR

PCR:

5 µl	cDNA
1,5 µl	Magnesium- Chlorid
1 µl	dNTP 10 mM
je 25 pmol	antisense/sense genspezifischer Primer
je 25 pmol	antisense/sense β-Actin Primer
0,2 µl	Taq-Polymerase (Invitrogen)
ad 50 µl	Aqua dest auffüllen

PCR-Programm im Thermocycler:

94°C	10 min
94°C	1 min
Annealing	45 sec
72°C	90 sec
72°C	10 min

DNA-Probenpuffer (5 x) :

25 mM	Tris / HCl (pH 7,0)
150 mM	EDTA
0,05 %	Bromphenolblau
25 %	Glycerin

Die folgenden Primer wurden spezifisch ausgesucht.

Bezeichnung	Strang	Sequenz (5'-3')	GenBank	Position	Fragment (bp)
eq- β - Aktin- F	sense	ATC CAC GAA ACT ACC TTC AAC	AF035774	821- 841	174
eq- β - Aktin- R	antisense	CGC AAT GAT CTT GAT CTT CAT C		973- 994	
eq- aggrecan- F	sense	ACA ACA ATG CCC AAG ACT AC	AF040637	110- 129	102
eq- aggrecan- R	antisense	GCC AGT TCT CAA ATT GCA AG		192- 201	
eq- coll- II- F	sense	TGA AAC TCT GCC ACC CTG AAT G	U62528	3762- 3782	175
eq- coll- II- R	antisense	TTG TCC TTG CTC TTG CTG CTC		3916- 3936	
eq- oct- 4- F	sense	GCA GAA CCT GAC CGA GTT A	DX010657	15- 123	202
eq- oct- 4- R	antisense	TTG CCT CTT ATT GCA GAA CC		136- 159	
eq- runx- 2- F	sense	CGA AAT GCC TCT GCT GTT AT	XM01502 519	703- 722	267
eq- runx- 2- R	antisense	CAT ACT GGG ATG AGG AAT GC		950- 969	

Tabelle 6: Liste der Primersequenzen

3.16.6. Elektrophoretische Auftrennung

Für die elektrophoretische Auftrennung, zur Visualisierung der PCR-Ergebnisse, musste ein Agarose-Gel (2% Agarose, gelöst in 1 x TBE) gegossen werden.

Nach Aushärtung des Gels wurden sowohl ein 100 Basenpaar (bp)- Marker als auch die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer der Firma Bio Rad „Sub-Cell GT“, gefüllt mit 1x TBE, gegeben und bei einer Spannung von 130 V für 45 Minuten betrieben. Nach der Auftrennung konnte das Gel in einem Transilluminator der Firma Biometra

„Bio Doc II“ ausgewertet werden. In diesem werden die Banden, sofern welche vorhanden sind, mit Hilfe von UV- Licht sichtbar gemacht. Mit dem dazugehörigen Computerprogramm der Firma Biometra konnten Bildaufnahmen von den Ergebnissen gemacht werden.

3.17. Mikroskopie

3.17.1. Lichtmikroskop

Die sich in Kultur befindenden Zellen wurden regelmäßig hinsichtlich ihrer Morphologie sowie ihres Proliferations- und Differenzierungsverhaltens untersucht. Diese Untersuchungen wurden an einem Inversmikroskop (Firma Zeiss, Oberkochen) durchgeführt.

An diesem Mikroskop erfolgten auch Vitalbeobachtungen, die mit einer Digitalkamera (Leica) aufgenommen wurden und mit der Software Leica DFC (Version 6) visualisiert wurden.

3.17.2. Elektronenmikroskop

Für die Elektronenmikroskopie wurden die in Epon eingebetteten Zellen mit Phenylbutazon, die Kontrolle ohne Phenylbutazon und die chondrogen differenzierten Zellpellets mit NSAID- Zusatz mit einem Diamantmesser an einem Reichert Ultramikrotom Ultracut R in 60 - 70 nm dicke Ultradünnschnitte geschnitten. Die Eponschnitte wurden nach Kontrastierung auf mit Formvar Folie beschichteten Kupfergrits aufgezogen. Die Untersuchung der Schnitte fand an einem Zeiss EM 902A statt.

3.18. Statistische Analyse

Für die statistische Analyse der Kurzzeit- und Langzeitkinetik, sowie der Ergebnisse der Differenzierungen wurde, in Absprache mit dem Institut für medizinische Statistik der Universität Köln, der Kruskal- Wallis- Test angewendet. Hinweise für signifikante Unterschiede wurden mit dem Mann- Whitney- U- Test überprüft.

Für die Fehlerwahrscheinlichkeit wurde p mit 5 % bestimmt.

Für die statistische Analyse wurde das Programm SPSS® der Firma SPSS (Chicago) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Proliferationsverhalten und Morphologie von eMSC

eMSC ließen sich gut aus Sternalpunktaten isolieren und vereinzeln. Einzelne Zellen wurden adhärent und proliferierten bereits fünf Tage nach dem Ausplattieren. 10- 14 Tage nach dem ersten Ausplattieren zeigten sich erste konfluente Kolonien und die Zellen mussten passagiert werden. Danach folgten dann regelmäßig einmal wöchentliche Passagen, um die Zellen auszudünnen. Man konnte die Zellen teilweise bis zur 14. Passage über einen Zeitraum von ca. 20 Wochen kultivieren.

In Kultur mit dem Proliferationsmedium zeigten die Zellen ein typisches spindelförmiges Aussehen und ein Wachstum mit spezifischer, gerichteter Anordnung.

4.2. Vitalitäts- und Proliferationsassay

Mit einem WST- 1- Assay wurde die Vitalität und mit einem BrdU- Assay wurde die Proliferation von eMSC unter Einfluss von NSAID ermittelt. Hierbei handelte es sich um eine Kurzzeitstudie, im Gegensatz zur Langzeituntersuchung der Kinetikstudie. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden in Gegenwart der NSAID kultiviert.

Die NSAID wurden in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen angewendet. Die Versuche mit jeder einzelnen Konzentration wurden sechsmal wiederholt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Kontrollansätze wurden 16fach wiederholt.

Die NSAID wurden in folgenden Konzentrationen angewendet:

Celecoxib	Meloxicam	Indomethacin	Flunixin	Phenylbutazon
0,01µMol	0,01µMol	10µMol	10µMol	10µMol
0,1 µMol	0,1 µMol	50 µMol	50 µMol	50 µMol
1 µMol	1 µMol	100µMol	100µMol	100µMol
10 µMol	10 µMol	500 µMol	500 µMol	500 µMol
100 µMol	100 µMol			1000 µMol
200 µMol	200 µMol			

Tabelle 7: Wirkstoffkonzentrationen für den WST- 1- und BrdU- Assay

Die Ergebnisse wurden in einem ELISA- Reader ausgelesen. Die Absorptionen der Kontrollen wurden gleich eins gesetzt und die Ergebnisse der eMSC mit den NSAID- Zugaben dementsprechend berechnet. Alle genannten Prozentangaben beziehen sich auf die Kontrolle.

4.2.1. WST- 1 Celecoxib

Signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollwerten und den einzelnen Konzentrationen zeigten sich bei den Konzentrationen 0,1 μMol , 100 μMol und 200 μMol . In der Konzentration von 0,1 μMol konnten 20 % höhere Absorptionswerte ermittelt werden als bei der Kontrolle. Bei 100 μMol lagen die Werte um 27% niedriger als bei der Kontrolle und bei 200 μMol konnte nur mit $0,03 \pm 0,02$ eine sehr geringe Absorption detektiert werden.

Die Konzentrationen 0,01 μMol , 1 μMol und 10 μMol unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 8 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 1 als Balkendiagramm dargestellt.

WST- 1	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1	0,11
Cox 0,01	1,03	0,18
Cox 0,1	1,2	0,27
Cox 1	1,09	0,28
Cox 10	0,98	0,19
Cox 100	0,73	0,11
Cox 200	0,03	0,02

Tabelle 8: WST- 1 Absorptionswerte Celecoxib

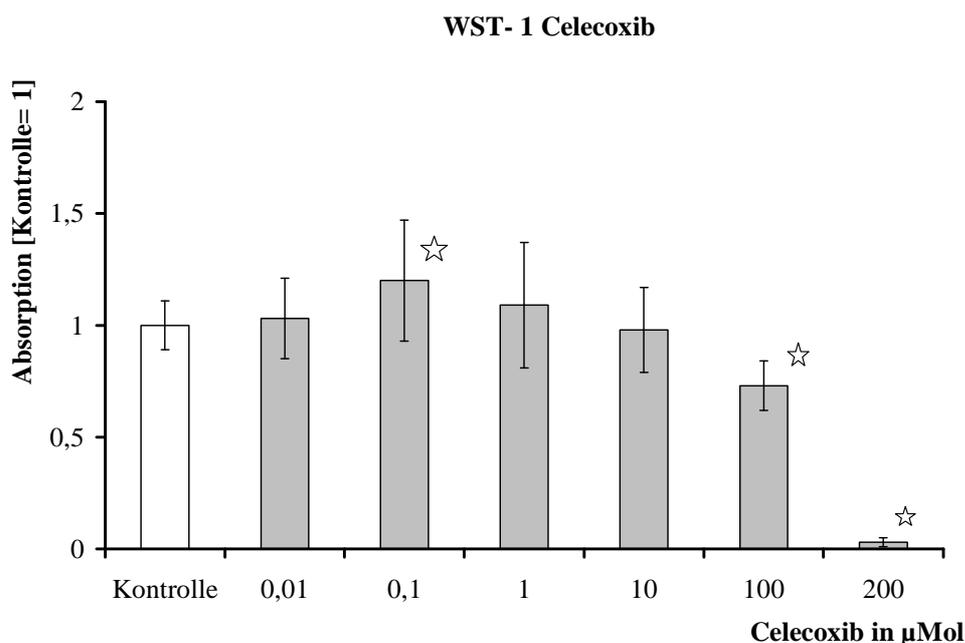


Diagramm 1: WST- 1 Absorptionswerte, Celecoxib,

☆ =Signifikante Unterschiede zu der Kontrolle

4.2.2. BrdU Celecoxib

Die Proliferation zeigte in den Konzentrationen 0,1 μMol , 1 μMol , 100 μMol und 200 μMol signifikante Unterschiede zu den Kontrollwerten. 0,1 μMol wies einen 35 % und 1 μMol einen 45 % höheren Absorptionswert auf als die Kontrolle. Die Konzentrationen 100 μMol und 200 μMol bewirkten 83% und 93% geringere Absorptionsraten als die Kontrollen. In der Konzentration von 10 μMol unterschied sich die Absorptionsrate nicht signifikant von der Kontrolle.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 9 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 2 als Balkendiagramm dargestellt.

BrdU	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1	0,23
Cox 0,01	1,19	0,27
Cox 0,1	1,35	0,22
Cox 1	1,45	0,19
Cox 10	1,18	0,2
Cox 100	0,03	0,17
Cox 200	0,01	0,007

Tabelle 9: BrdU Absorptionswerte, Celecoxib

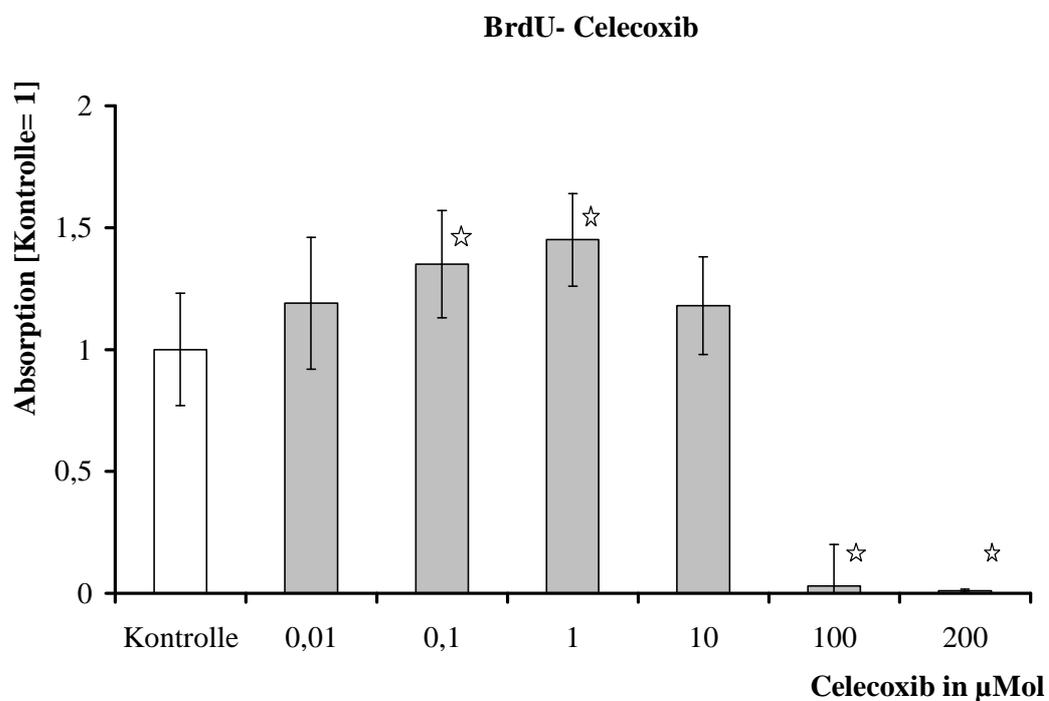


Diagramm 2: BrdU Absorptionswerte, Celecoxib

☆ = Signifikante Unterschiede zu der Kontrolle

4.2.3. WST- 1 Meloxicam

Bei den Vitalitätsnachweisen nach Meloxicambehandlung zeigten sich nur in den Konzentrationen 100 μMol und 200 μMol signifikante Unterschiede zu den Kontrollwerten. In der Konzentration von 100 μMol zeigte sich ein 81% niedrigerer und bei 200 μMol ein 87% niedrigerer Wert als bei der Kontrolle. Die Werte der Konzentrationen 0,01 μMol , 0,1 μMol , 1 μMol und 10 μMol unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 10 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 3 als Balkendiagramm dargestellt.

WST-1	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1	0,11
Melox 0,01	1,12	0,32
Melox 0,1	1,19	0,42
Melox 1	1,15	0,38
Melox 10	0,98	0,25
Melox 100	0,86	0,19
Melox 200	0,2	0,13

Tabelle 10: WST- 1 Absorptionswerte Meloxicam

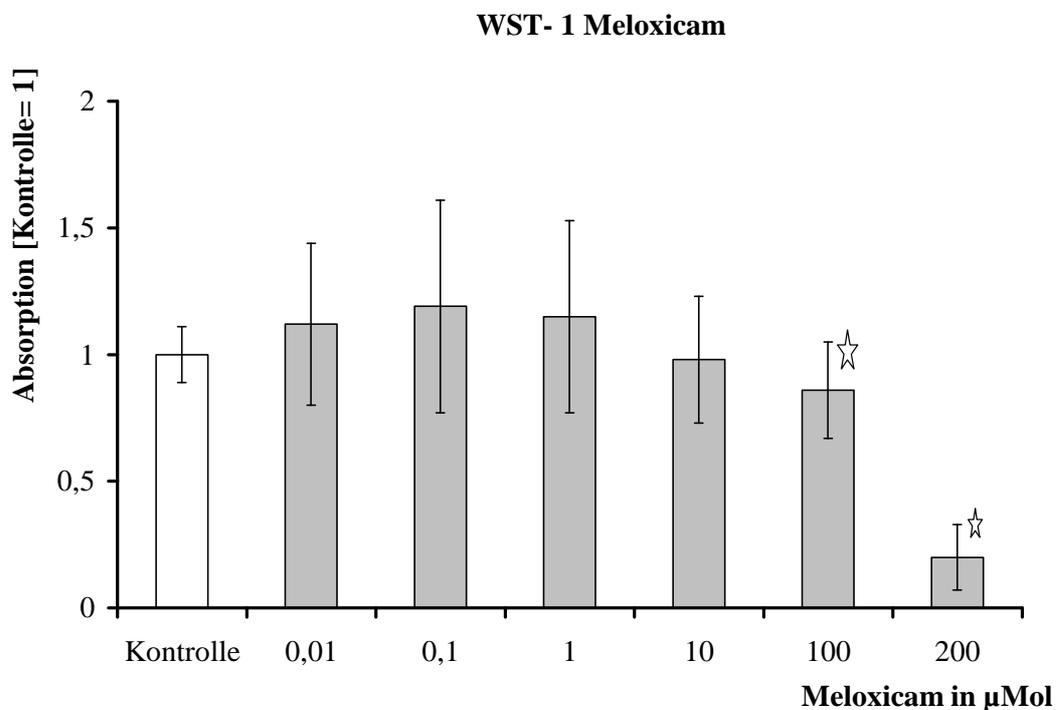


Diagramm 3: WST-1 Absorptionswerte, Meloxicam

☆ = Signifikante Unterschiede zu der Kontrolle

4.2.4. BrdU Meloxicam

Die Proliferation nach Meloxicambehandlung unterschied sich in allen Konzentrationen signifikant von der Kontrolle. Die Werte der Konzentrationen 0,01 μMol – 10 μMol lagen zwischen 23 und 35% über den Kontrollwerten. Bei 100 μMol lagen die Werte um 91% niedriger als bei der Kontrolle und bei 200 μMol konnte nur mit $0,02 \pm 0,02$ eine sehr geringe Absorption detektiert werden.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 11 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 4 als Balkendiagramm dargestellt.

BrdU	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1	0,23
Melox 0,01	1,62	0,35
Melox 0,1	1,52	0,35
Melox 1	1,52	0,25
Melox 10	1,51	0,34
Melox 100	0,09	0,04
Melox 200	0,02	0,02

Tabelle 11: Brdu Absorptionswerte, Meloxicam

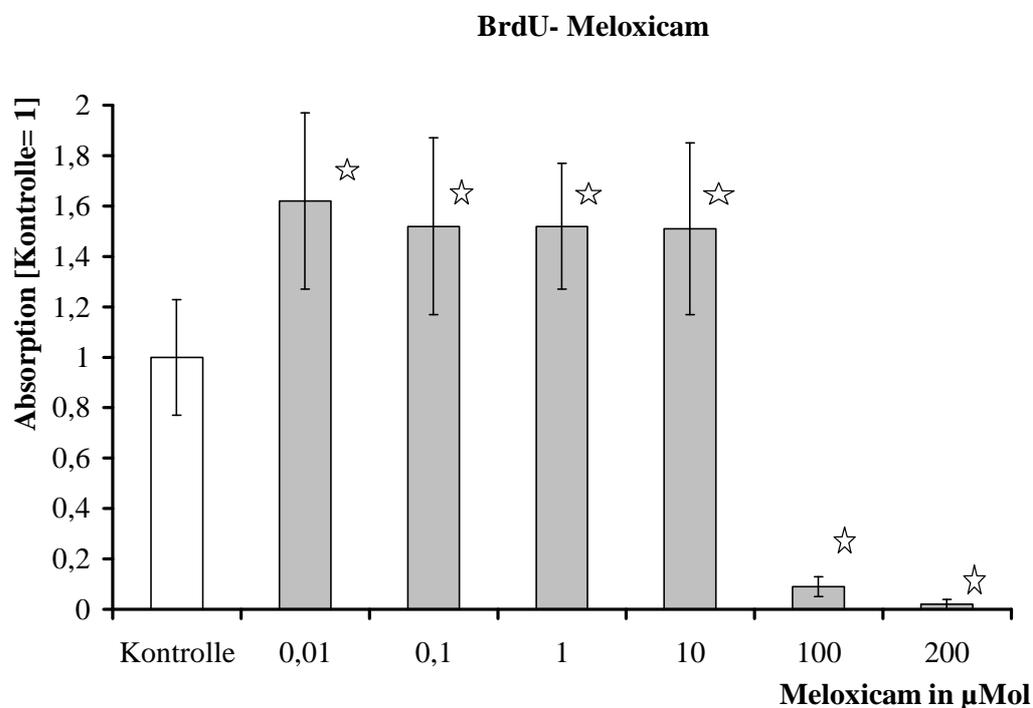


Diagramm 4: BrdU Absorptionswerte, Meloxicam

☆ = Signifikante Unterschiede zu der Kontrolle

4.2.5. WST- 1 Flunixin

Bei den Vitalitätsnachweisen nach Flunixinbehandlung unterschieden sich die Werte der Konzentrationen, bis auf 500 μMol , nicht signifikant von der Kontrolle.

Bei 500 μMol zeigte sich ein Wert der 20% niedriger ausfiel als die Kontrolle.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 12 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 5 als Balkendiagramm dargestellt.

WST- 1	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1	0,11
Flunixin 10	1,18	0,38
Flunixin 50	1,35	0,57
Flunixin 100	1,17	0,4
Flunixin 500	0,8	0,27

Tabelle 12: WST- 1 Absorptionwerte, Flunixin

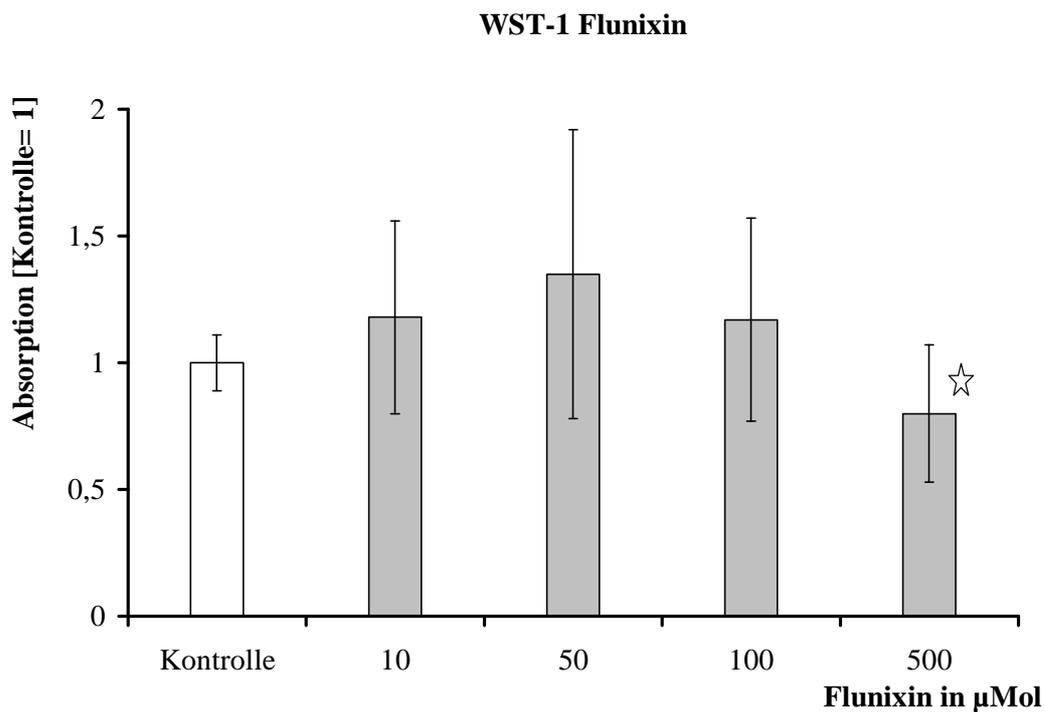


Diagramm 5: WST- 1 Absorptionwerte, Flunixin

☆ = Signifikanter Unterschied zu der Kontrolle

4.2.6. BrdU Flunixin

Die Proliferation nach Flunixinbehandlung zeigte bei den Werten der Konzentrationen 50 μMol und 500 μMol signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Kontrolle. Bei 50 μMol fielen die Absorptionswerte 31 % höher aus als bei der Kontrolle und bei 500 μMol fielen die Absorptionswerte 91 % niedriger aus als bei der Kontrolle.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 13 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 6 als Balkendiagramm dargestellt.

BrdU	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1	0,23
Flunixin 10	1,14	0,38
Flunixin 50	1,31	0,14
Flunixin 100	0,99	0,2
Flunixin 500	0,09	0,01

Tabelle 13: BrdU Absorptionswerte, Flunixin

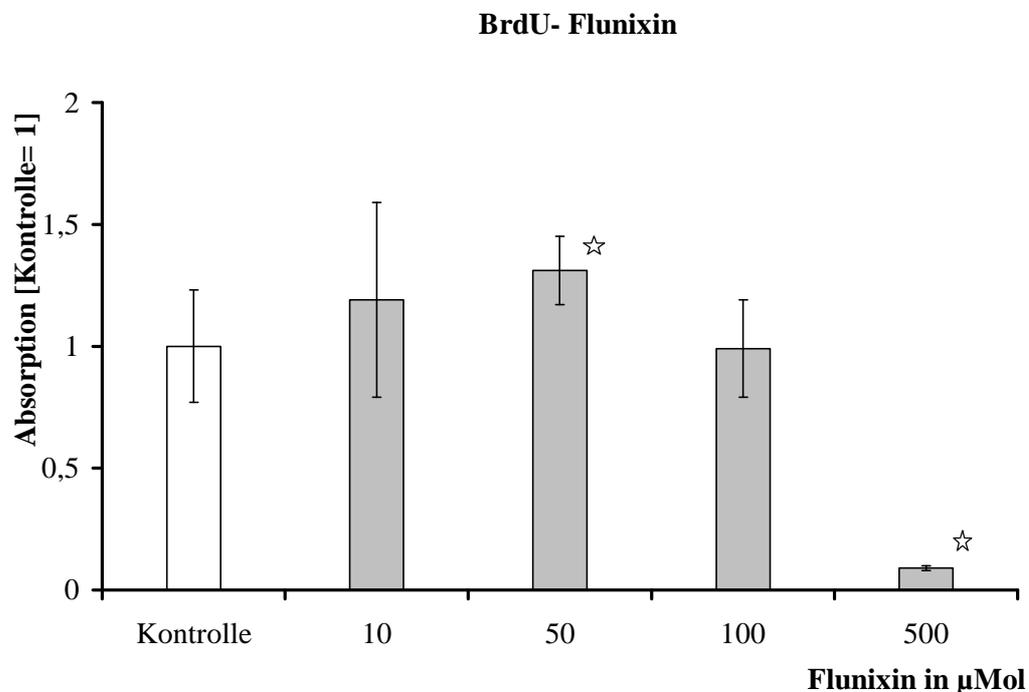


Diagramm 6: BrdU Absorptionswerte, Flunixin

☆ = Signifikante Unterschiede zu der Kontrolle

4.2.7. WST- 1 Indomethacin

Die Vitalitätsnachweise nach Indomethacinbehandlung unterschieden sich bei den Werten der Konzentrationen, bis auf 500 μMol , nicht signifikant von der Kontrolle.

Bei 500 μMol zeigte sich ein Wert der 42% niedriger ausfiel als die Kontrolle.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 14 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 7 als Balkendiagramm dargestellt.

WST	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1	0,11
Indomethacin 10	1,12	0,27
Indomethacin 50	0,96	0,27
Indomethacin 100	0,91	0,26
Indomethacin 500	0,58	0,29

Tabelle 14: WST- 1 Absorptionswerte, Indomethacin

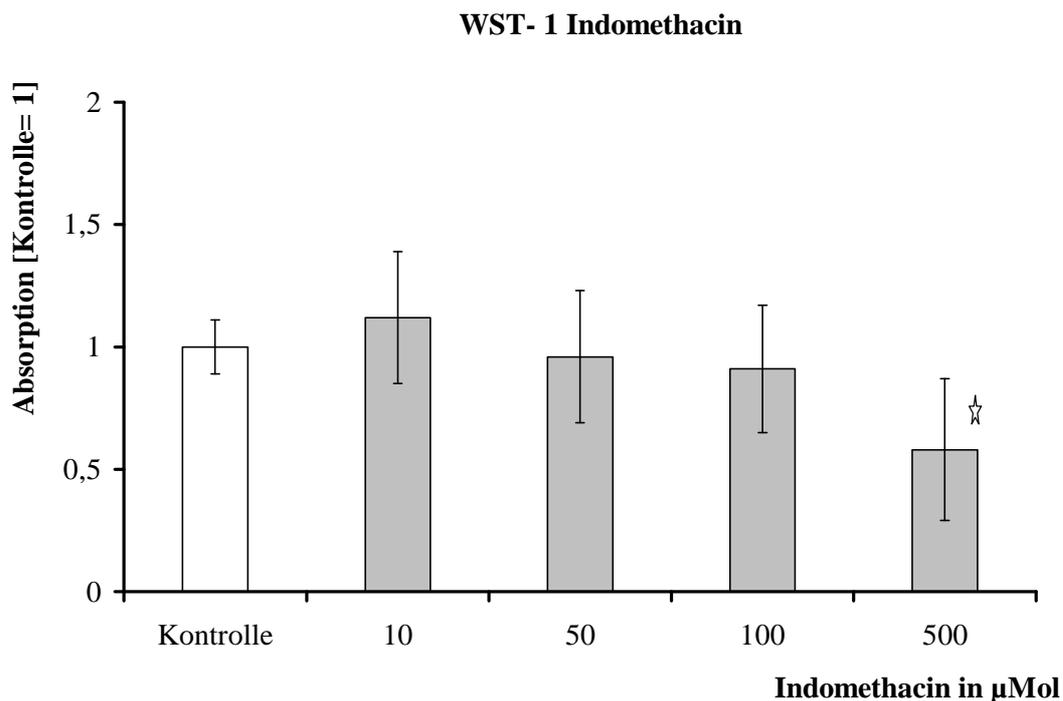


Diagramm 7: WST- 1 Absorptionswerte, Indomethacin

☆ = Signifikanter Unterschied zu der Kontrolle

4.2.8. BrdU Indomethacin

Die Proliferation nach Indomethacinbehandlung zeigte in den Konzentrationen 10µMol, 100 µMol und 500 µMol einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. Bei 10µMol zeigte sich ein 55% und bei 100 µMol ein 40 % höheren Wert als bei der Kontrolle. Bei 500 µMol konnte mit $0,02 \pm 0,02$ nur eine sehr geringe Absorption detektiert werden.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 15 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 8 als Balkendiagramm dargestellt.

BrdU	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1	0,23
Indomethacin 10	1,55	0,41
Indomethacin 50	1,12	0,19
Indomethacin 100	1,40	0,32
Indomethacin 500	0,02	0,02

Tabelle 15: BrdU Absorptionswerte, Indomethacin

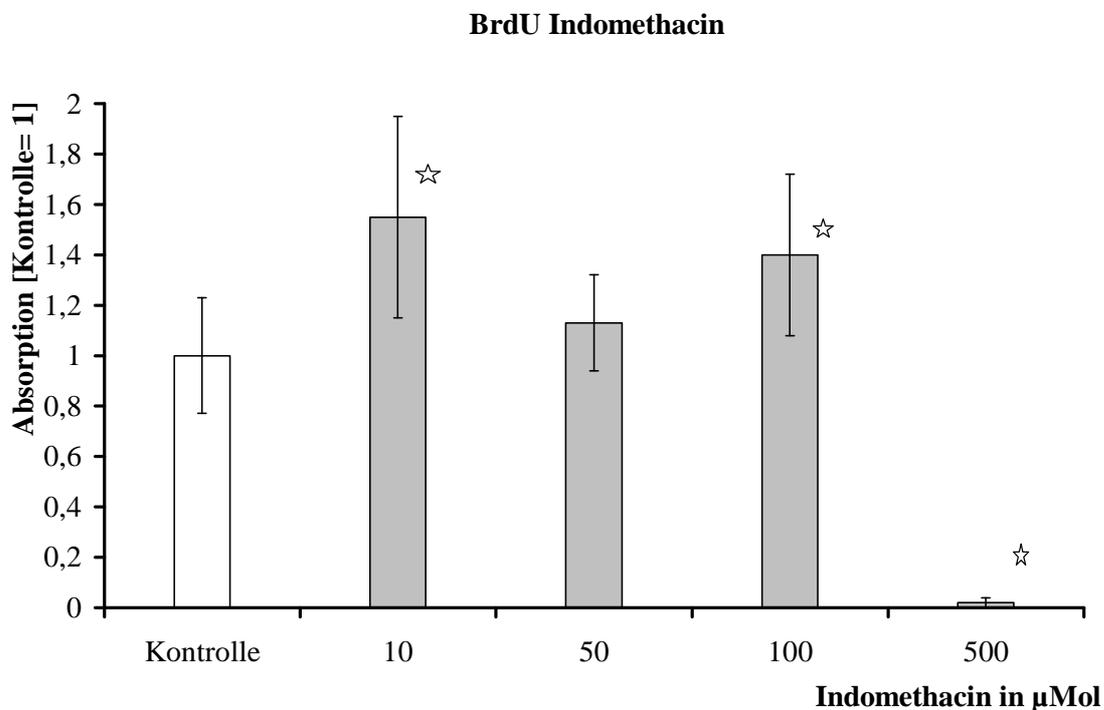


Diagramm 8: BrdU Absorptionswerte, Indomethacin

☆ = Signifikante Unterschiede zu der Kontrolle

4.2.9. WST- 1 Phenylbutazon

Bei den Vitalitätsnachweisen nach Phenylbutazonbehandlung zeigten sich bei den Werten der Konzentrationen 50 μMol und 1000 μMol signifikante Unterschiede zu der Kontrolle. Phenylbutazon war das einzige Medikament, bei dem alle behandelten Zellen niedrigere Absorptionen aufzeigten als die unbehandelten Kontrollzellen. Bei 50 μMol zeigte sich ein 24 %, bei 100 μMol ein 13 % und bei 1000 μMol ein 81 % niedrigerer Wert als bei der Kontrolle.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 16 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 9 als Balkendiagramm dargestellt.

WST	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1	0,11
Phenylbutazon 10	0,95	0,13
Phenylbutazon 50	0,76	0,14
Phenylbutazon 100	0,87	0,07
Phenylbutazon 500	0,88	0,18
Phenylbutazon 1000	0,19	0,05

Tabelle 16: WST- 1 Absorptionen, Phenylbutazon

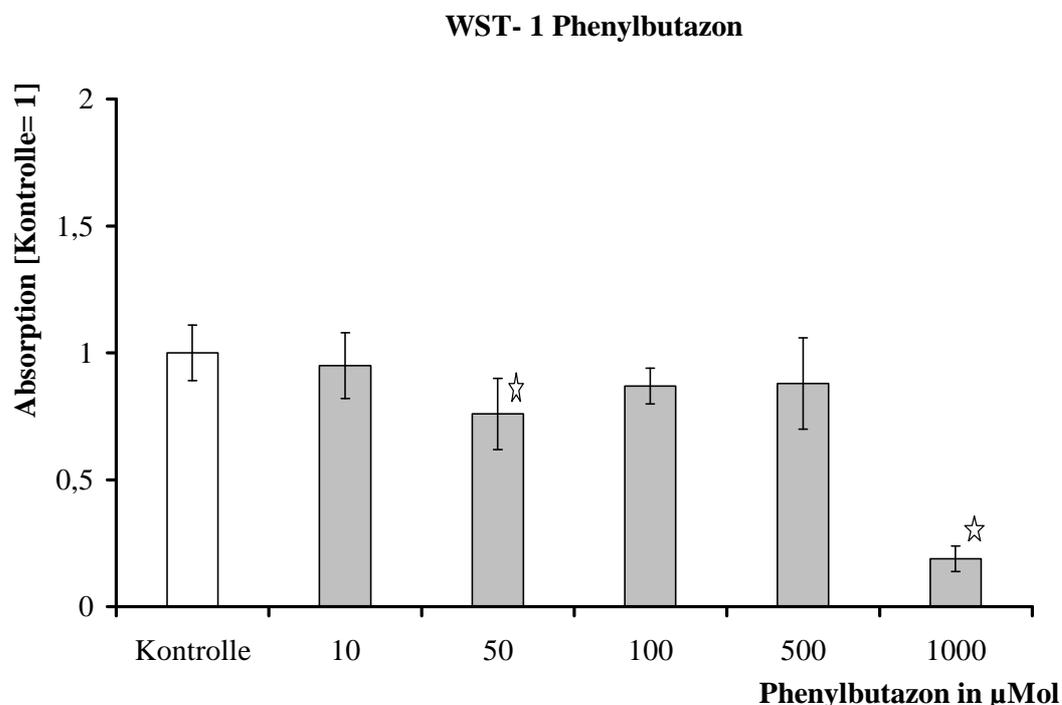


Diagramm 9: WST- 1 Absorptionen, Phenylbutazon

☆ = Signifikante Unterschiede zu der Kontrolle

4.2.10. BrdU Phenylbutazon

Die Proliferation nach Phenylbutazonbehandlung zeigte bei den Werten der Konzentrationen 10 μMol , 500 μMol und 1000 μMol signifikante Unterschiede zu der Kontrolle. Bei 10 μMol zeigte sich ein 54 % höheren Wert als bei der Kontrolle. Dagegen konnten bei 500 μMol $0,06 \pm 0,01$ und bei 1000 μMol mit $0,03 \pm 0,01$ nur sehr geringe Absorptionswerte detektiert werden.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 17 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 10 als Balkendiagramm dargestellt.

BrdU	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1	0,23
Phenylbutazon10	1,54	0,11
Phenylbutazon 50	1,22	0,36
Phenylbutazon 100	1,15	0,26
Phenylbutazon 500	0,06	0,01
Phenylbutazon 1000	0,03	0,01

Tabelle 17: BrdU Absorptionswerte, Phenylbutazon

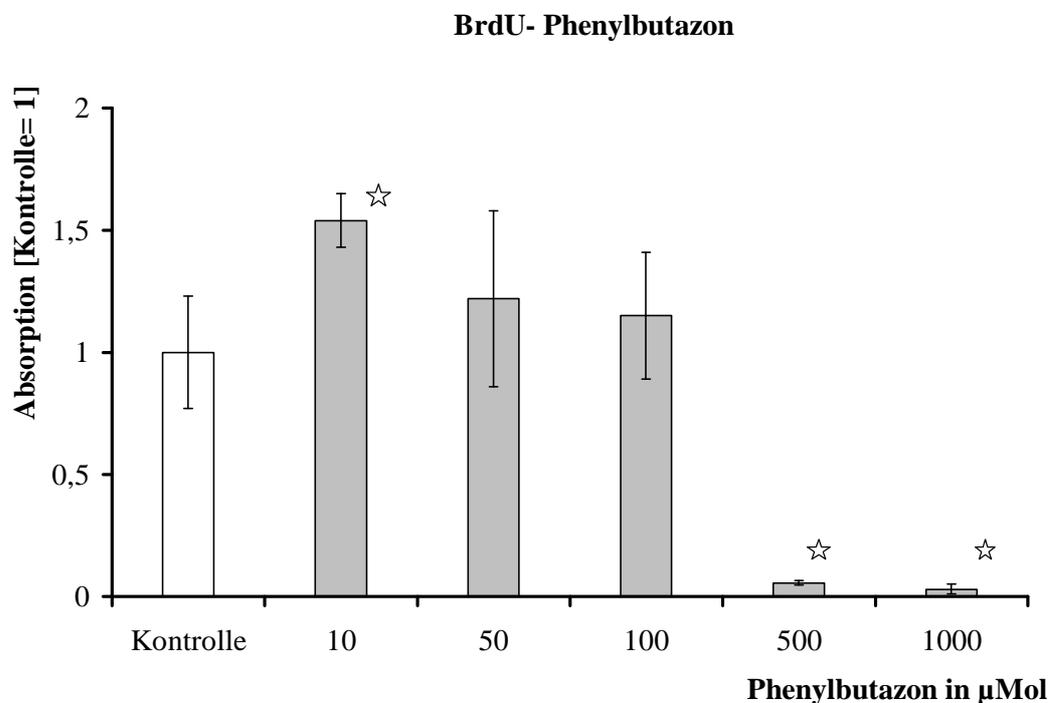


Diagramm 10: BrdU Absorptionswerte, Phenylbutazon

☆ = Signifikante Unterschiede zu der Kontrolle

4.3. Zellkinetik

Die eMSC wurden über einen Zeitraum von sechs Passagen in einer immer gleich bleibenden NSAID- Konzentration kultiviert und die Zellzahl bei jedem Passagevorgang ermittelt. Unter Berücksichtigung der Kultivierungsdauer, der eingesetzten Zellzahl und der ermittelten Zellzahl wurden die Generationsverdopplungszeit und die kumulative Gesamtzellzahl berechnet.

Die Generationsverdopplungszeit gab Auskunft darüber, wie viel Zeit eine Zelle, zwischen zwei Passagevorgängen, benötigte, um sich zu teilen. Die kumulative Gesamtzellzahl berücksichtigte dagegen die gesamte Kultivierungsdauer von sechs Wochen und berechnete fakultativ wie viele Zellen entstanden wären, wenn man alle Zellen weiter kultiviert hätte. Die Generationsverdopplungszeit war für die einzelnen Passagezeiten ein sensiblerer Parameter, aber die Gesamtdauer der Kultivierung wird nicht berücksichtigt, dafür wurde die kumulative Gesamtzellzahl verwendet.

Die eMSC wurden mit NSAID in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt und die Wirkstoffe wurden bei jedem Mediumwechsel frisch hinzu gegeben. Die verwendeten Konzentrationen werden in Tabelle 18 dargestellt.

Celecoxib	Meloxicam	Indomethacin	Flunixin	Phenylbutazon
0,01µMol	0,01µMol		10µMol	10µMol
0,1 µMol	0,1 µMol	50 µMol	50 µMol	50 µMol
1 µMol	1 µMol	100µMol	100µMol	100µMol
10 µMol	10 µMol			500 µMol

Tabelle 18: Verwendete Wirkstoffkonzentrationen in der Langzeitkinetik

4.3.1. Generationsverdopplungszeit Kontrolle

Die Generationsverdopplungszeit der Kontrolle blieb während der sechs Passagen konstant. Gemessen wurde die Zeit in Stunden. Die ermittelten Mittelwerte und Standardabweichungen werden in Tabelle 19 dargestellt.

Kontrolle						
Passage	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	27,5	26,2	26,2	28,8	30,7	28,2
Standardabweichung	3,1	3,6	3,9	2,7	3,4	4,1

Tabelle 19: Generationsverdopplungszeit Kontrolle

4.3.2. Generationsverdopplungszeit Celecoxib

Bei der Generationsverdopplungszeit zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den mit Celecoxib- behandelten eMSC. Auch zwischen den einzelnen Konzentrationen zeigten sich keine Differenzen.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 20 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 11 als Balkendiagramm dargestellt.

Kontrolle						
Passage	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	27,5	26,2	26,2	28,8	30,7	28,2
Standardabweichung	3,1	3,6	3,9	2,7	3,4	4,1
Celecoxib 0,01 µMol						
Mittelwert	28,3	27,6	25,1	29,2	35,1	36,7
Standardabweichung	4,7	3,4	2,9	2	1,1	1,5
Celecoxib 0,1 µMol						
Mittelwert	26,8	27,1	26,1	29,3	30,2	33,4
Standardabweichung	4,1	4,9	3,4	3,7	3,3	2,8
Celecoxib 1 µMol						
Mittelwert	25,4	26,3	26,9	27,8	29,7	32,6
Standardabweichung	3,5	3,5	4,7	2,1	1,7	0,4
Celecoxib 10 µMol						
Mittelwert	27,3	26,7	25,02	28	28,7	33,9
Standardabweichung	4,1	2	3,7	3,6	4,8	2,4

Tabelle 20: Generationsverdopplungszeit Celecoxib

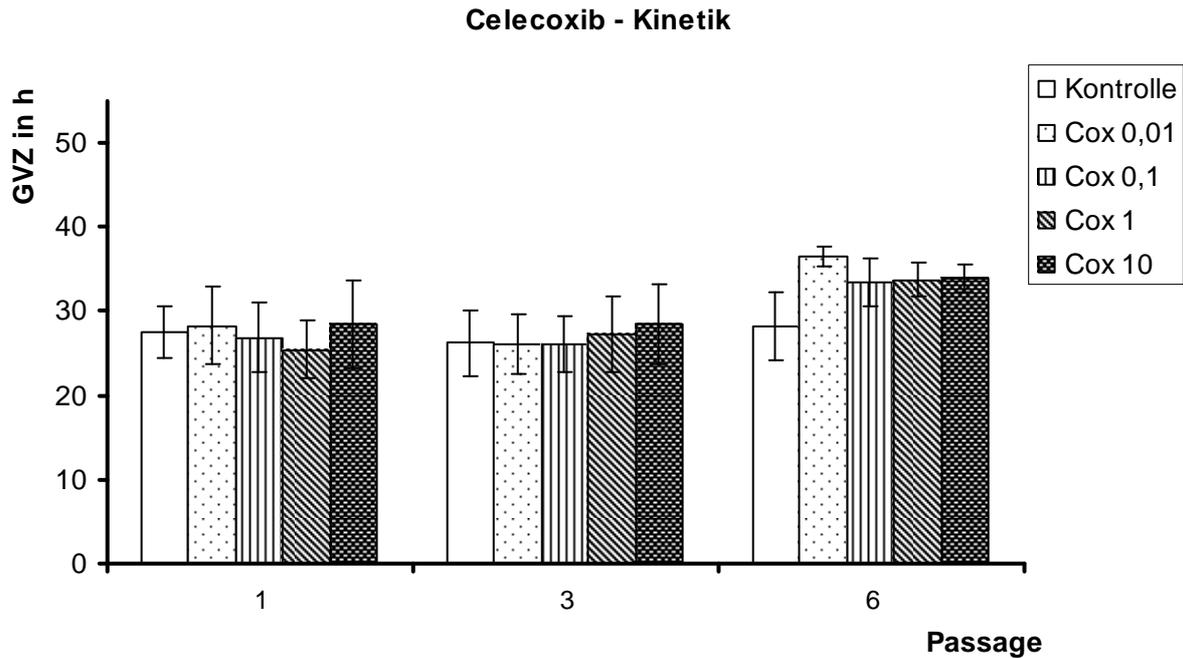


Diagramm 11: Generationsverdopplungszeit (GVZ) für Celecoxib/ Langzeitkinetik

4.3.3. Generationsverdopplungszeit Meloxicam

Die Generationsverdopplungszeit zeigte keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und den Meloxicam- behandelten eMSC. Auch zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen zeigten sich keine Abweichungen.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 21 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 12 als Balkendiagramm dargestellt.

Kontrolle						
Passage	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	27,5	26,2	26,2	28,8	30,7	28,2
Standardabweichung	3,1	3,6	3,9	2,7	3,4	4,1
Meloxicam 0,01 μMol						
Mittelwert	26,4	25,5	24,3	28,8	28,9	32
Standardabweichung	2	4,7	3,2	4,8	4,7	4
Meloxicam 0,1 μMol						
Mittelwert	26,5	24,8	25,6	24,6	32,5	34,7
Standardabweichung	2,1	4,6	2,6	2,3	3,3	1,1
Meloxicam 1 μMol						
Mittelwert	27,5	24,9	23,8	25,1	29,9	30,9
Standardabweichung	4,4	3,9	2,6	3,1	3,8	2,9
Meloxicam 10 μMol						
Mittelwert	25,3	24,3	26	29,7	31,8	29,8
Standardabweichung	1,8	3,7	2,5	2,8	3,9	0,4

Tabelle 21: Generationsverdopplungszeit (GVZ) Meloxicam

Meloxicam- Kinetik

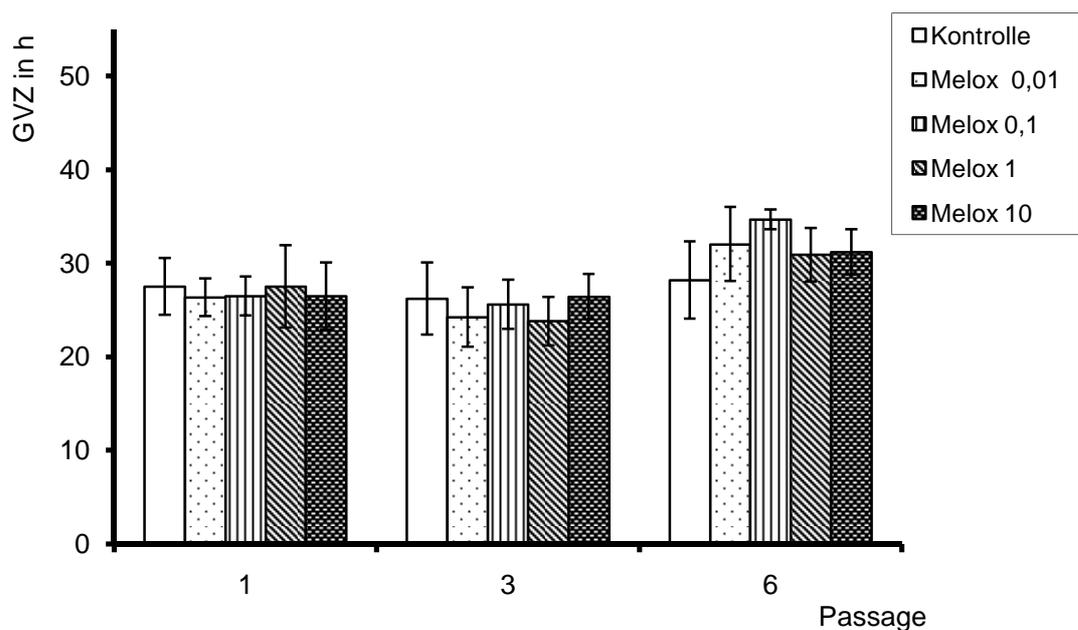


Diagramm 12: GVZ für Meloxicam/ Langzeitkinetik

4.3.4. Generationsverdopplungszeit Flunixin

Bei den eMSC die mit Flunixin behandelt wurden, zeigte sich, in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der Kontrolle. In der ersten Passage waren die Generationsverdopplungszeiten noch zwischen der Kontrolle und den verschiedenen Flunixinkonzentrationen ähnlich. Ab der dritten Passage zeigten sich signifikante Erhöhungen der Generationsverdopplungszeiten bei den Flunixin-behandelten eMSC die sich bis zur sechsten Passage noch deutlicher manifestierten.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 22 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 13 als Balkendiagramm dargestellt.

Kontrolle						
Passage	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	27,5	26,2	26,2	28,8	30,7	28,2
Standardabweichung	3,1	3,6	3,9	2,7	3,4	4,1
Flunixin 10 µMol						
Mittelwert	30,6	27,4	29,5	30,1	23,8	25,8
Standardabweichung	4,2	2,7	4	5,8	1,1	3,7
Flunixin 50 µMol						
Mittelwert	29,2	27,7	28,6	29,4	30,4	25,3
Standardabweichung	2,5	2,1	4,9	5,5	8,6	3,4
Flunixin 100 µMol						
Mittelwert	29,6	29,4	30,7	28,3	29,9	27,6
Standardabweichung	3,2	1,9	8,3	6,1	5,7	

Tabelle 22: GVZ nach Flunixinbehandlung

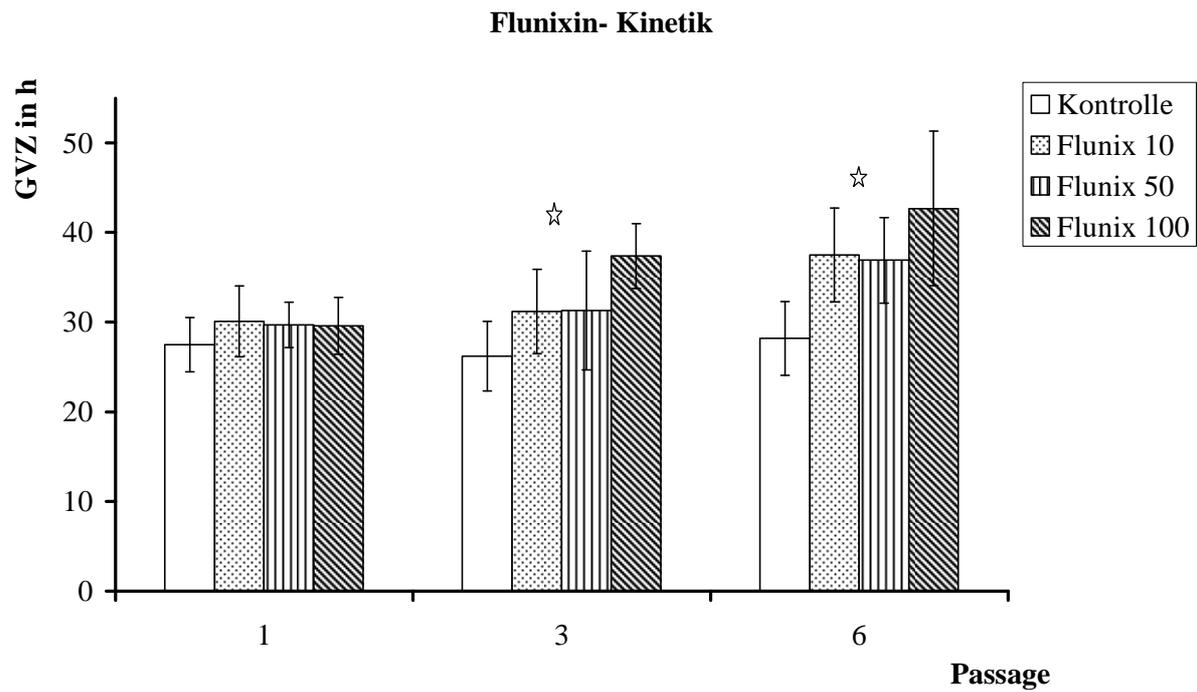


Diagramm 13: GVZ für Flunixin/ Langzeitkinetik

☆ = Signifikante Unterschiede zu der Kontrolle

4.3.5. Generationsverdopplungszeit Indomethacin

Die Generationsverdopplungszeit zeigte keine Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den Indomethacin-behandelten eMSC. Auch zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen zeigten sich keine Abweichungen.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 23 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 14 als Balkendiagramm dargestellt.

Kontrolle						
Passage	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	27,5	26,2	26,2	28,8	30,7	28,2
Standardabweichung	3,1	3,6	3,9	2,7	3,4	4,1
Indomethacin 50 μMol						
Mittelwert	27,7	23,9	25,8	30,4	28,8	33,2
Standardabweichung	3,4	3,3	1,8	2,8	7,4	2,4
Indomethacin 100μMol						
Mittelwert	28,7	26,8	28,4	26,5	30,1	34,1
Standardabweichung	3,7	5,7	2,1	0,2	1	2,4

Tabelle 23: GVZ nach Indomethacin-Behandlung

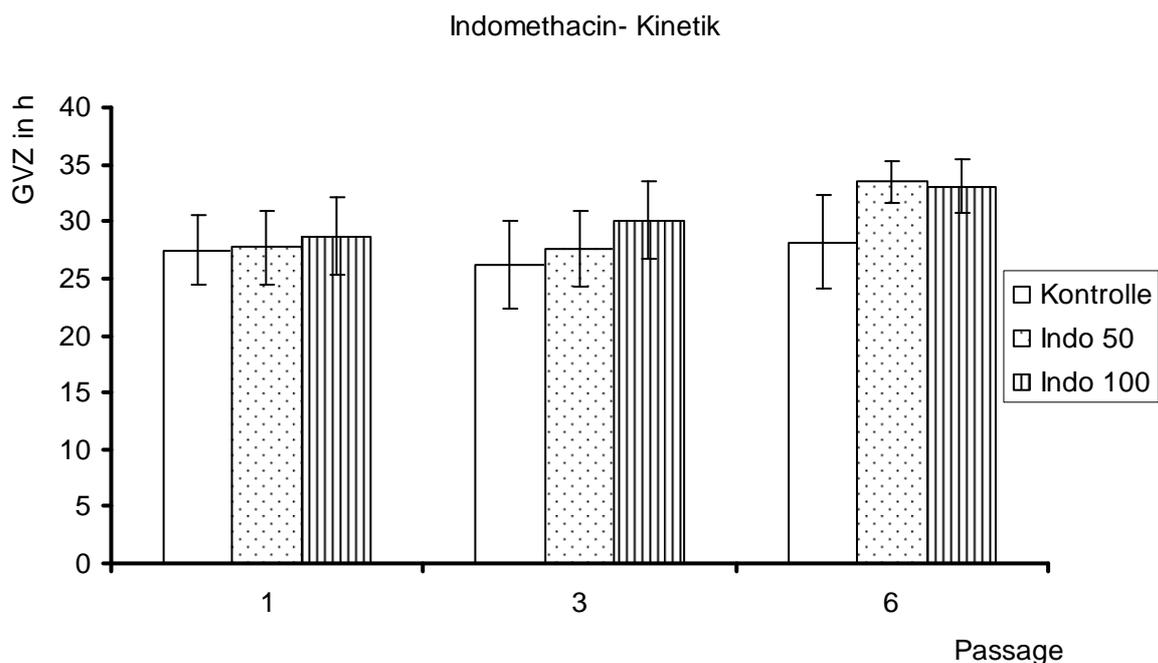


Diagramm 14: GVZ für Indomethacin/ Langzeitkinetik

4.3.6. Generationsverdopplungszeit Phenylbutazon

Bei der Generationsverdopplungszeit konnten keine Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den Phenylbutazon-behandelten eMSC ermittelt werden. Auch zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen zeigten sich keine Abweichungen hinsichtlich dieses Parameters.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 24 angegeben und die Mittelwerte werden in Diagramm 15 als Balkendiagramm dargestellt.

Kontrolle						
Passage	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	27,5	26,2	26,2	28,8	30,7	28,2
Standardabweichung	3,1	3,6	3,9	2,7	3,4	4,1
Phenylbutazon 10µMol						
Mittelwert	31,5	30	28	26,6	30. Mrz	32,1
Standardabweichung	4,3	6,9	4,6	2,5	5,9	6,4
Phenylbutazon 50µMol						
Mittelwert	30	27,2	28,3	24,1	32,1	34,8
Standardabweichung	3,1	3,6	6,2	1,6	1,1	
Phenylbutazon 100µMol						
Mittelwert	28,6	26,9	27,6	26,3	30,4	35,5
Standardabweichung	1,4	2,5	3,9	3	1,7	
Phenylbutazon 500µMol						
Mittelwert	29,6	27,3	25,1	23,6	29,6	31,2
Standardabweichung	2,1	1,4	4,4	0,8		3,3

Tabelle 24: GVZ Phenylbutazon

Phenylbutazon- Kinetik

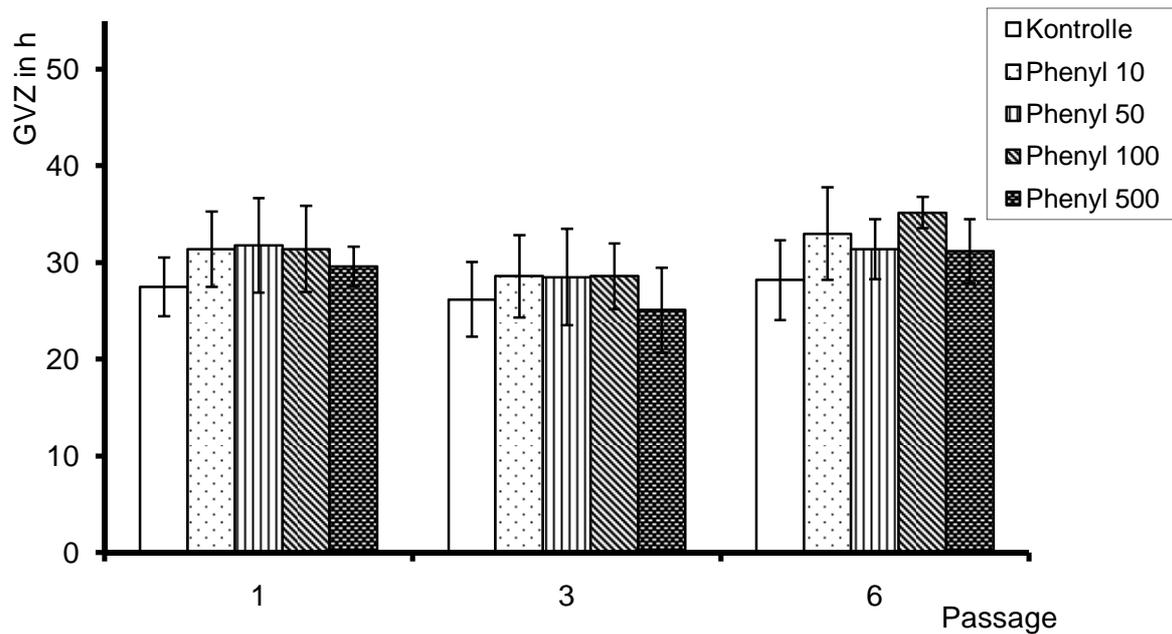


Diagramm 15: GVZ für Phenylbutazon/ Langzeitkinetik

4.3.7. Kumulative Gesamtzellzahl Kontrolle

Die kumulative Gesamtzellzahl stieg kontinuierlich an.

Die Kontrolle wurde als Richtgröße verwendet und jedes Medikament mit ihr verglichen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 25 angegeben.

Kontrolle						
Passage	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	4,6	254,6	10934,1	184274,235	7992254	126575769
Standardabweichung	1	60,1	2712	35981,3	1684679,2	30588300,3

Tabelle 25: Kumulative Gesamtzellzahl der Kontrollgruppe

4.3.8. Kumulative Gesamtzellzahl Celecoxib

Bei der Auswertung der kumulative Gesamtzellzahlen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den Celecoxib- behandelten Zellen. Bei der Ermittlung der kumulativen Gesamtzellzahl wurden unterschiedliche Aussaatzahlen und Kultivierungstage berücksichtigt.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 26 angegeben und die Regressionsgeraden werden in Diagramm 16 als Kurvendiagramm dargestellt.

Celecoxib 0,01 µMol						
Passage	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	2,4	43,5	653,6	8489,5	108211,3	841212,3
Standardabweichung	0,7	9,7	155	1439,1	16794,4	109050,3
Celecoxib 0,1 µMol						
Mittelwert	4	114,2	3380	4191,9	73020,5	738313,3
Standardabweichung	1,01	32,2	774	952,8	15265,2	134643,6
Celecoxib 1 µMol						
Mittelwert	5	319,6	19865,6	1580512,1	126154179	1523177,7
Standardabweichung	1,2	72,5	5249,2	379931,3	31878526,3	243052,4
Celecoxib 10 µMol						
Mittelwert	6,02	364,7	17217,6	8199,7	67890,5	529290,1
Standardabweichung	1,7	61,7	4581,9	1908,2	16760,7	79471,6

Tabelle 26: Kumulative Gesamtzellzahl nach Celecoxib-Behandlung

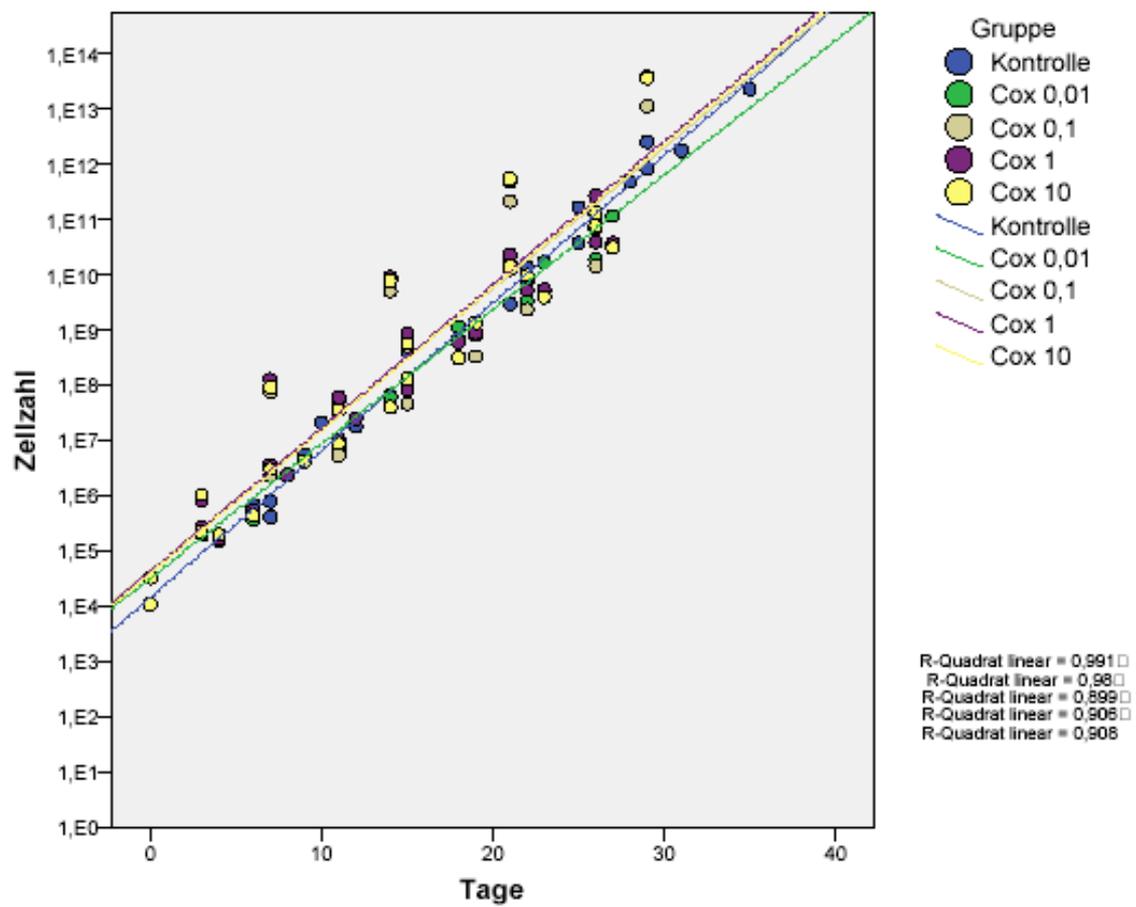


Diagramm 16: Regressionsgeraden der kumulativen Gesamtzellzahlen nach Celecoxib-Behandlung

4.3.9. Kumulative Gesamtzellzahl Meloxicam

Bei der Auswertung der kumulativen Gesamtzellzahlen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den Meloxicam- behandelten Zellen. Auch hier wurden unterschiedliche Aussaatzahlen und Kultivierungstage berücksichtigt.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 27 angegeben und die Regressionsgeraden werden in Diagramm 17 als Kurvendiagramm dargestellt.

Meloxicam 0,01 μMol						
Passage	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	4,2	142,7	2816,8	147158,6	78698,5	641030,1
Standardabweichung	0,8	40,4	649,6	39049,9	20518,1	143579,4
Meloxicam 0,1 μMol						
Mittelwert	4,04	131,9	2374,3	156190,7	94910	653126,3
Standardabweichung	0,7	37,5	482,2	30272,8	18977,7	150640,4
Meloxicam 1 μMol						
Mittelwert	4,7	153,8	3280,1	4900,4	97988,7	1187218,6
Standardabweichung	1,2	39,4	688,1	1091,5	23473,3	224167,4
Meloxicam 10 μMol						
Mittelwert	4	131	1034,4	7071,4	116860,5	1438688,1
Standardabweichung	0,9	32,3	198,2	2160,4	25818,2	255684

Tabelle 27: Kumulative Gesamtzellzahl nach Meloxicam- Behandlung

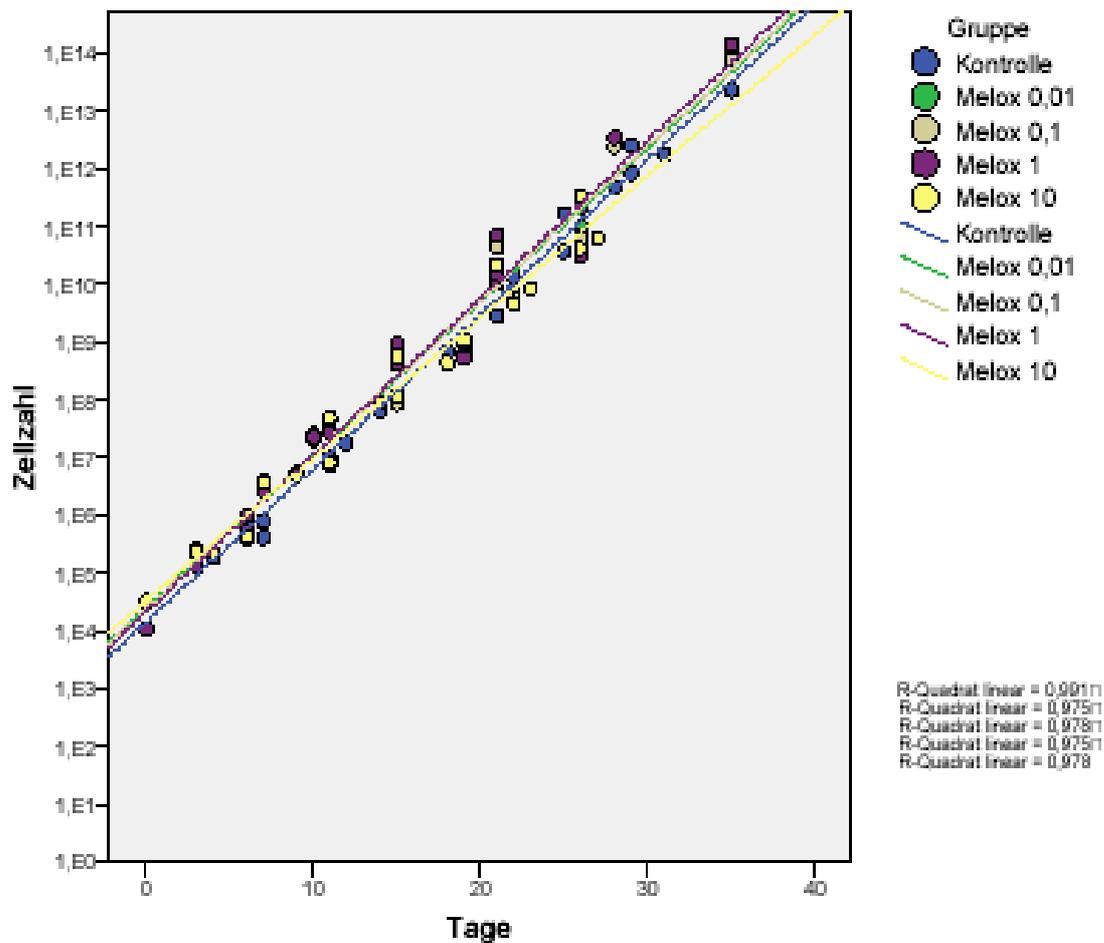


Diagramm 17: Regressionsgeraden der kumulativen Gesamtzellzahlen nach Meloxicam-Behandlung

4.3.10. Kumulative Gesamtzellzahl Flunixin

Die Auswertung der kumulativen Gesamtzellzahlen wies für Flunixin-behandelte eMSC geringere Gesamtzellzahlen auf, die allerdings konzentrations- und passageabhängig waren. In der ersten Passage konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellen in den verschiedenen Konzentrationen festgestellt werden. Ab der zweiten Passage wurde eine Tendenz deutlich, die sich in Abhängigkeit von den hohen Konzentrationen immer weiter herausbildete. Bis zum 40. Kulturtag wurde ein signifikanter Unterschied insbesondere zwischen den Kontrollwerten und nach Behandlung mit den Konzentrationen 50 μMol und 100 μMol deutlich.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 28 angegeben und die Regressionsgeraden werden in Diagramm 18 als Kurvendiagramm dargestellt.

Flunixin 10 µMol						
Passage	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	4,3	181,1	3579	48366,2	2010076,9	4447265,7
Standardabweichung	0,99	36,3	896,9	12277,5	566652,5	1064051,7
Flunixin 50 µMol						
Mittelwert	3,9	117,4	1859,8	17499,7	325372,9	3447994,6
Standardabweichung	0,7	23	579,9	5129	101379,7	790825
Flunixin 100 µMol						
Mittelwert	2,9	139,3	3403,7	43409,6	1502796,2	2254910,2
Standardabweichung	0,6	21,7	669,3	11113,6	389890,2	681021,1

Tabelle 28: Kumulative Gesamtzellzahl nach Flunixin- Behandlung

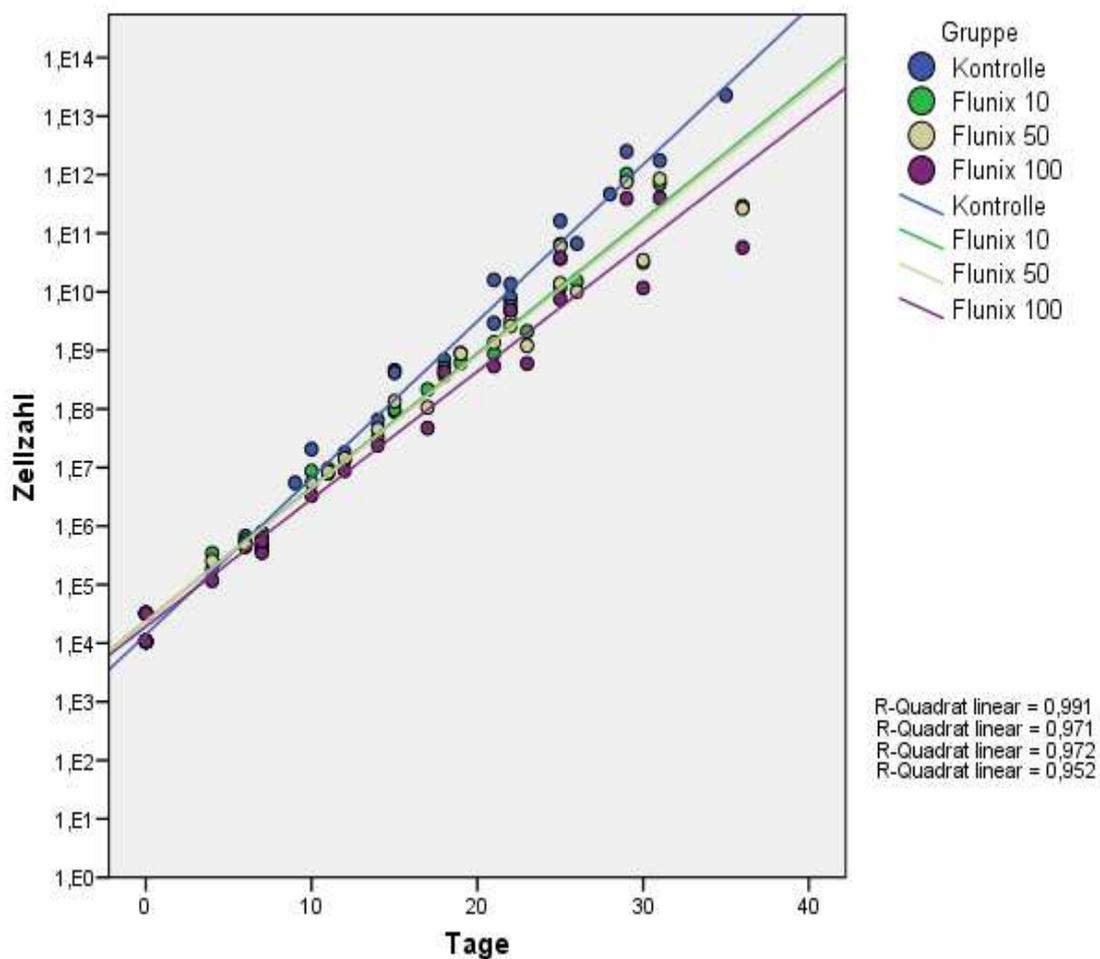


Diagramm 18: Regressionsgeraden der kumulativen Gesamtzellzahlen nach Flunixin-Behandlung. Die oberste Linie stellt die Kontrollkurve dar. Dann folgen die Kurven für 10 und 50 µMol. Darunter liegt die Kurve für 100 µMol.

4.3.11. Kumulative Gesamtzellzahl Indomethacin

Bei der Auswertung der kumulativen Gesamtzellzahlen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den Indomethacin-behandelten Zellen. Es wurden unterschiedliche Aussaatzahlen und Kultivierungstage berücksichtigt.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 29 angegeben und die Regressionsgeraden werden in Diagramm 19 als Kurvendiagramm dargestellt.

Indomethacin 50 µMol						
Passage	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	3,7	94,3	579	4111	57069,3	580816,1
Standardabweichung	0,8	25,6	130	953,8	16549,3	89178,3
Indomethacin 100 µMol						
Mittelwert	3,7	44,6	383	4005,6	61945,4	657858,5
Standardabweichung	0,8	12,8	81	1153,1	11635,5	113161

Tabelle 29: Kumulative Gesamtzellzahl nach Indomethacin- Behandlung

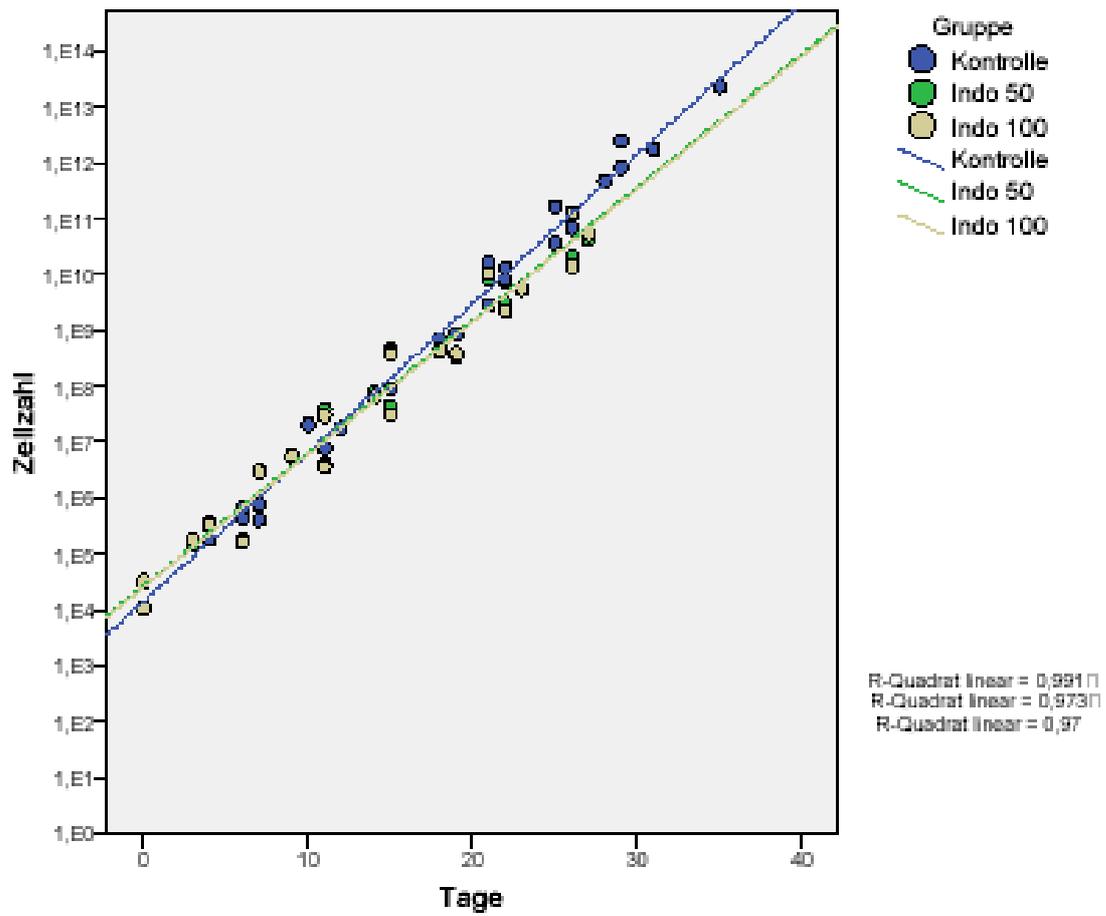


Diagramm 19: Regressionsgeraden der kumulativen Gesamtzellzahlen nach Indomethacin-Behandlung

4.3.12. Kumulative Gesamtzellzahl Phenylbutazon

Bei der Auswertung der kumulative Gesamtzellzahlen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den Phenylbutazon- behandelten Zellen. Auch hier wurden unterschiedliche Aussaatzahlen und Kultivierungstage berücksichtigt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 30 angegeben und die Regressionsgeraden werden in Diagramm 20 als Kurvendiagramm dargestellt.

Phenylbutazon 10 µMol						
Passage	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	3,9	164,2	7910,6	125997,7	5500359,8	3758970,8
Standardabweichung	0,9	50,5	1971,9	29575,1	1303549,6	1295903,7
Phenylbutazon 50 µMol						
Mittelwert	3	121,4	3439,1	40122,7	921918,2	3228301,5
Standardabweichung	0,8	28,3	947,9	11166,1	163001,1	642541,2
Phenylbutazon 100 µMol						
Mittelwert	4,1	185,1	5741,2	49161	1285955,2	1057010,7
Standardabweichung	1	32,6	1256,3	10643,1	191031,2	259900,1
Phenylbutazon 500 µMol						
Mittelwert	3,7	150,4	5051,3	50070,8	1167585,4	11115666,9
Standardabweichung	1	22,5	1389	6807,4	189604,2	2853283,5

Tabelle 30: Kumulative Gesamtzellzahl nach Phenylbutazonbehandlung

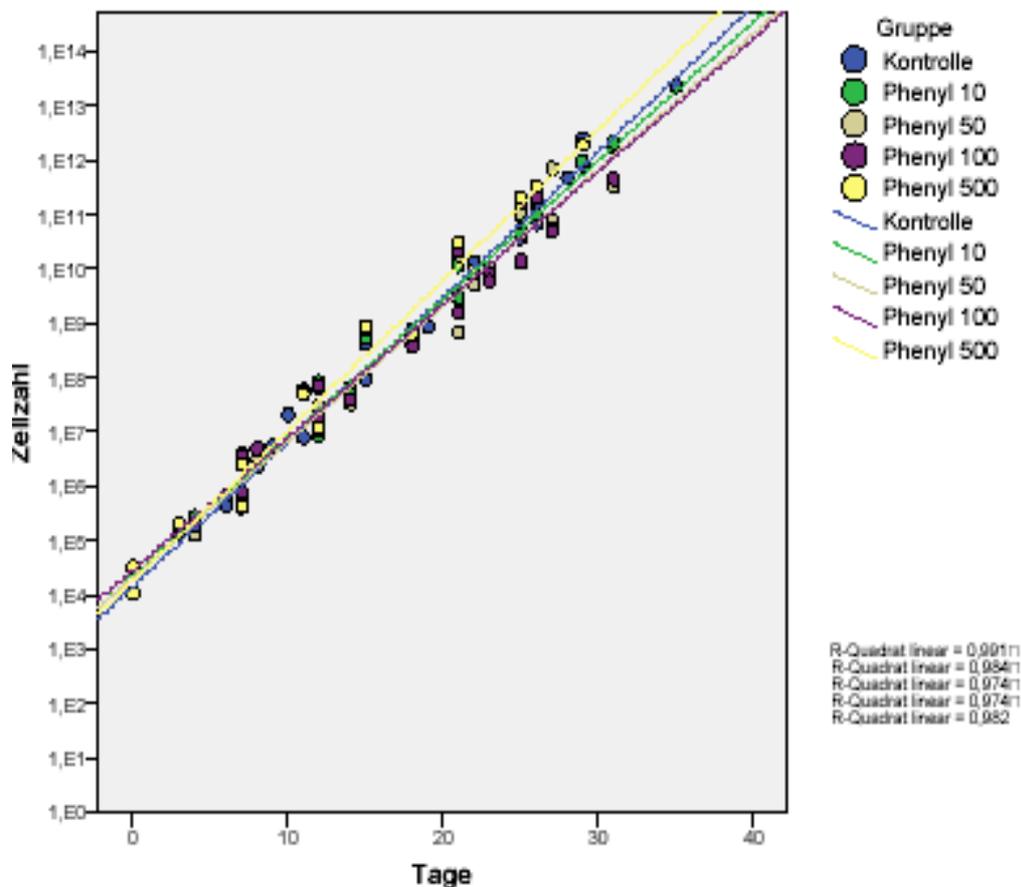


Diagramm 20: Regressionsgeraden der kumulativen Gesamtzellzahlen nach Phenylbutazon-behandlung

4.4. Vitalbeobachtung des Wound- and- Healing- assay

Um den Effekt der NSAID auf die Zellmigration zu untersuchen wurde in Gegenwart der NSAID Celecoxib, Meloxicam und Phenylbutazon ein Migrationsassay, der sogenannte „Wound- and- Healing- assay“, durchgeführt, bei dem die Konzentrationen der genannten NSAID schrittweise erhöht wurden, bis sich ein deutlicher Effekt im Vergleich zur Kontrolle zeigte.

Die eMSC wurden dazu in Zellkulturschalen mit normalem Wachstumsmedium bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Dann wurde mit einer blauen Pipettenspitze eine Zusammenhangstrennung des Zellrasens erzeugt. Diese Zusammenhangstrennung wurde in jedem Ansatz exakt in der gleichen Art und Weise angelegt. Das Medium wurde abgesaugt und durch frisches

Wachstumsmedium, mit der gewünschten Medikamentenkonzentration, ersetzt. Die Schale wurde mit Hilfe eines Life- Cell- Imaging Systems beobachtet und dazu in einer Vitalbeobachtungskammer, die auf einem Inversmikroskop montiert war, über 24 Stunden beobachtet. Mit Hilfe einer Digitalkamera wurden in festgelegten Zeitabständen Bilder angefertigt.

Folgende NSAID- Konzentrationen wurden verwendet:

Celecoxib	50 μ Mol	-----
Meloxicam	50 μ Mol	-----
Phenylbutazon	500 μ Mol	750 μ Mol

Tabelle 31: Verwendete Konzentrationen im Wound- and- Healing- Assay

Es wurden nur die Werte über die Anzahl der Zellen pro Fläche von den Konzentrationen dargestellt, bei denen gegenüber den Kontrollwerten deutliche Veränderungen hinsichtlich der Migrationsrate ermittelt werden konnten.

Der Einfluß von Celecoxib auf das Migrationsverhalten

In der Celecoxibkonzentration 50 μMol konnte aufgrund verminderter Flächenanteile ein deutlich langsames Migrationsverhalten als bei den unbehandelten Kontrollschalen ermittelt werden. Die Zellen wuchsen langsamer und weniger zahlreich in den Scratch hinein. (Diagramm 21)

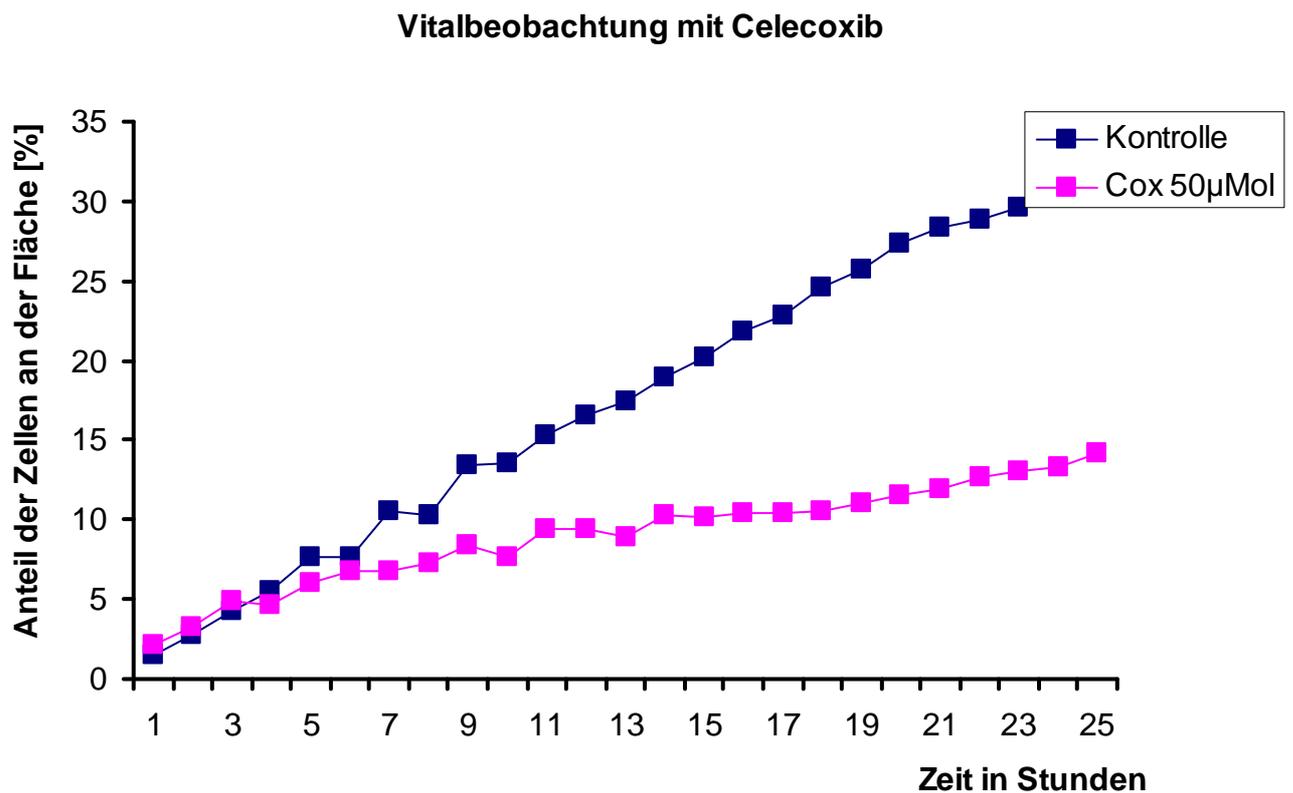


Diagramm 21: Vitalbeobachtung unter Celecoxib- Einfluß, n=3

Der Einfluß von Meloxicam auf das Migrationsverhalten

In der Konzentration 50 μMol zeigte sich, genauso wie bei Celecoxib 50 μMol , ein deutlich langsames Migrationsverhalten als in der Kontrollschale. Auch hier sind die Zellen langsamer und weniger zahlreich in den Scratch hinein gewandert, was dazu führt, dass der prozentuale Flächenanteil deutlich niedriger ist. (Diagramm 22)

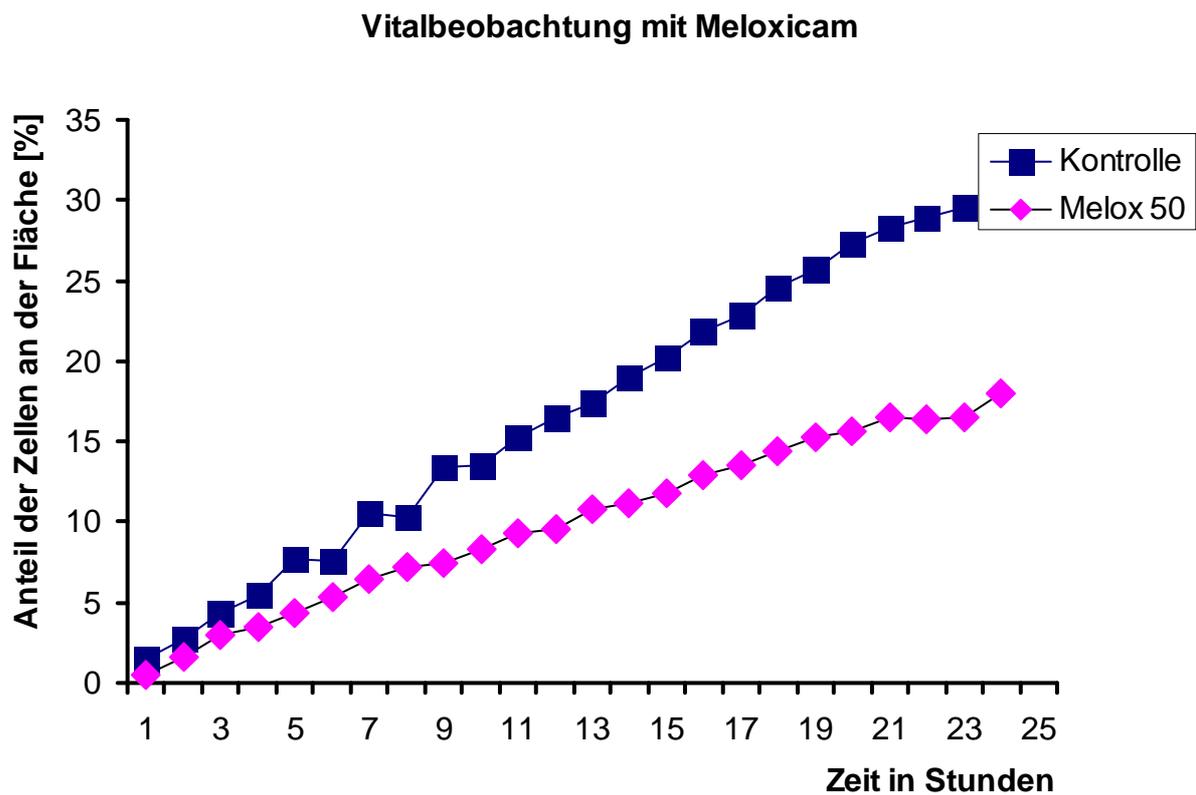


Diagramm 22: Vitalbeobachtung unter Meloxicam- Einfluß, n= 3

Der Einfluß von Phenylbutazon auf das Migrationsverhalten

Phenylbutazon zeigte in der Konzentration 500 μMol keine deutliche Abweichung von der Kontrolle wie Celecoxib und Meloxicam bei einer Konzentration von 50 μMol , deswegen wurde die Konzentration auf 750 μMol erhöht. Erst bei dieser Konzentration zeigte sich dann ein deutlich reduzierter Flächenanteil und damit eine deutlich verlangsamte Migrationsgeschwindigkeit (Diagramm 23).

Vitalbeobachtung mit Phenylbutazon

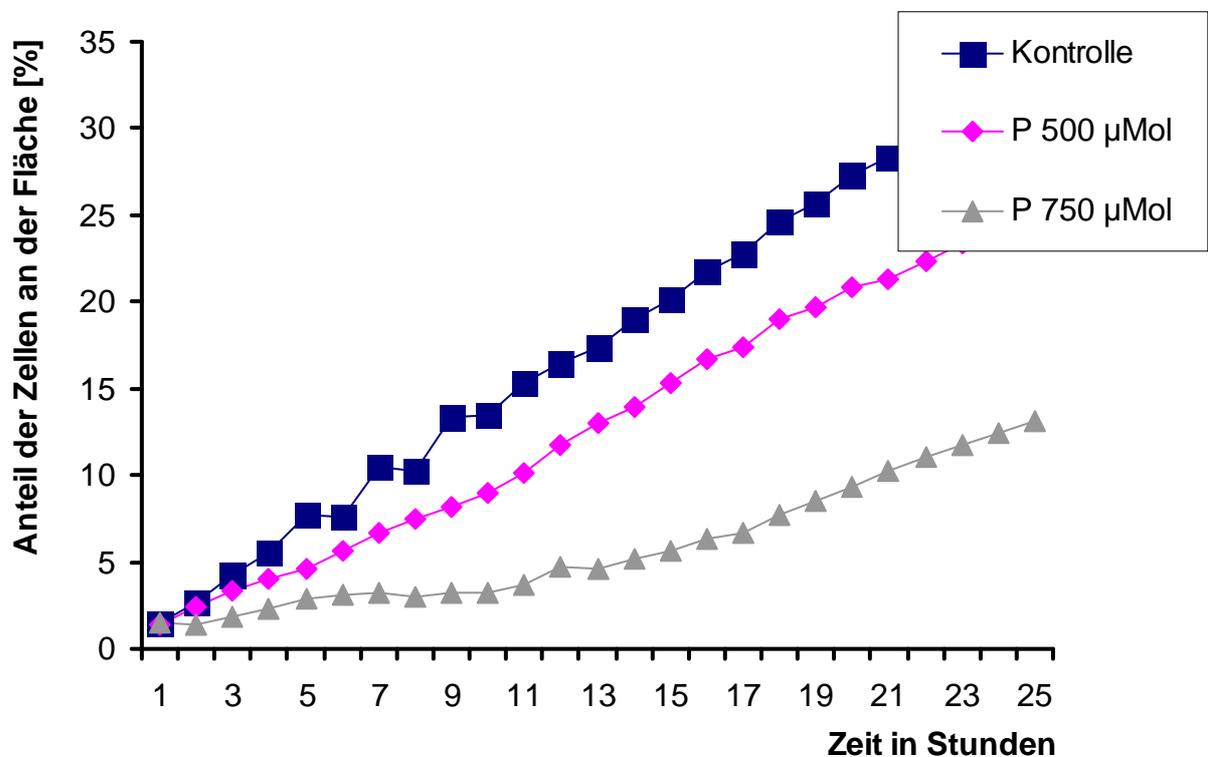


Diagramm 23: Vitalbeobachtung unter Phenylbutazon- Einfluß, n= 3

4.5. Elektronenmikroskopische Untersuchung von eMSC unter Phenylbutazonzugabe in verschiedenen Konzentrationen

Da es sich bei Phenylbutazon um ein NSAID handelt, das in der Pferdepraxis mit am häufigsten eingesetzt wird, wurden die eMSC exemplarisch mit Phenylbutazon in den Konzentrationen 10, 50, 100, 500 μMol behandelt und als Kontrollen dienten unbehandelte eMSC mit und ohne DMSO- Zusatz. Dabei betrug die DMSO-Konzentration immer 0,5 %.

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den DMSO- unbehandelten und den DMSO- behandelten Kontrollzellen.

Desweiteren zeigten sich keine Unterschiede zwischen den unbehandelten Kontrollzellen und den Phenylbutazon- behandelten Zellen. Die Zellmembranen und Kernmembranen, sowie die Zellorganellen waren auch nach Behandlung der Zellen mit Phenylbutazon gut erhalten (Abb. 6-11).

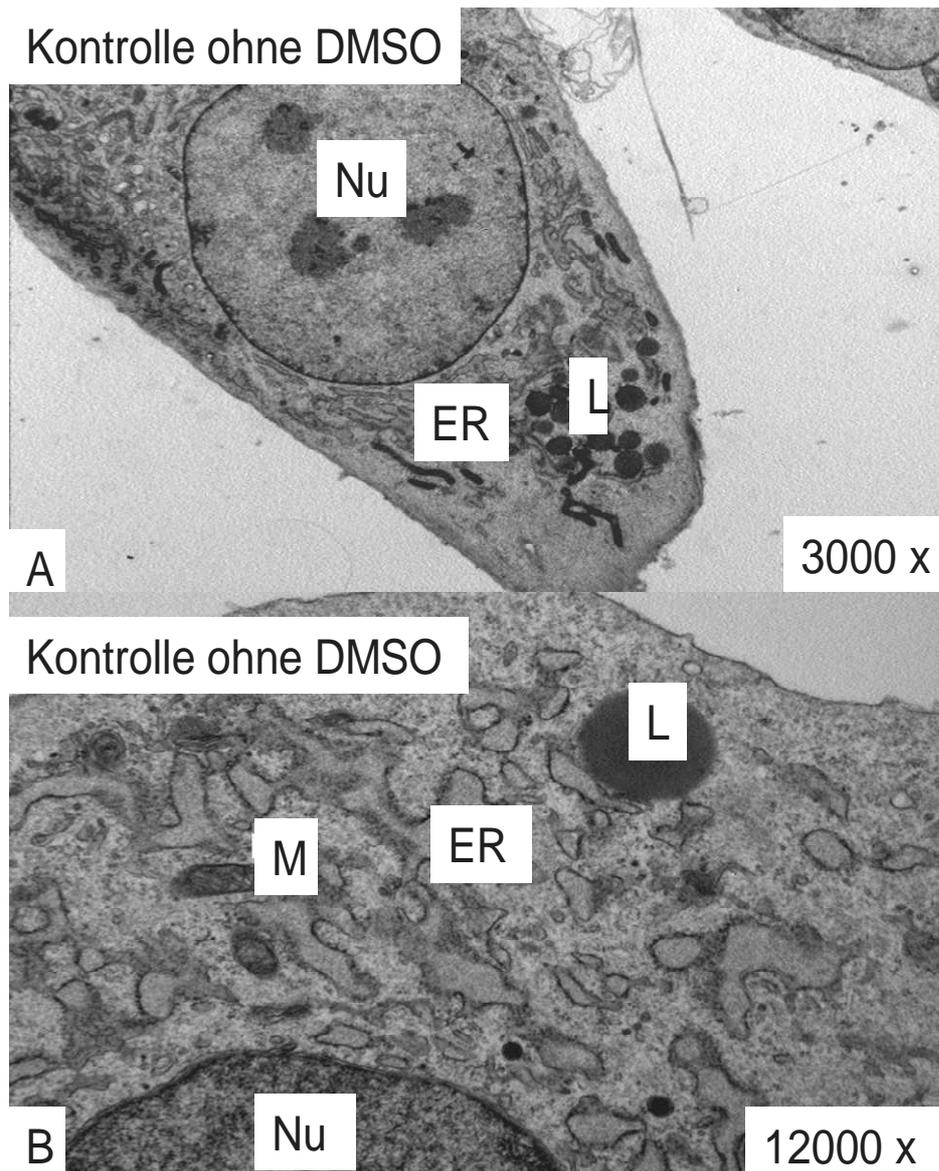


Abbildung 6: Ultrastrukturelle Aufnahme von eMSC der Kontrollgruppe ohne DMSO- Zusatz

A: Vergrößerung x 3000, ER: Endoplasmatisches Retikulum, L: Lipidtropfen, Nu: Nucleus

B: Vergrößerung x 12000, ER: Endoplasmatisches Retikulum, L: Lipidtropfen,

M: Mitochondrium, Nu: Nucleus

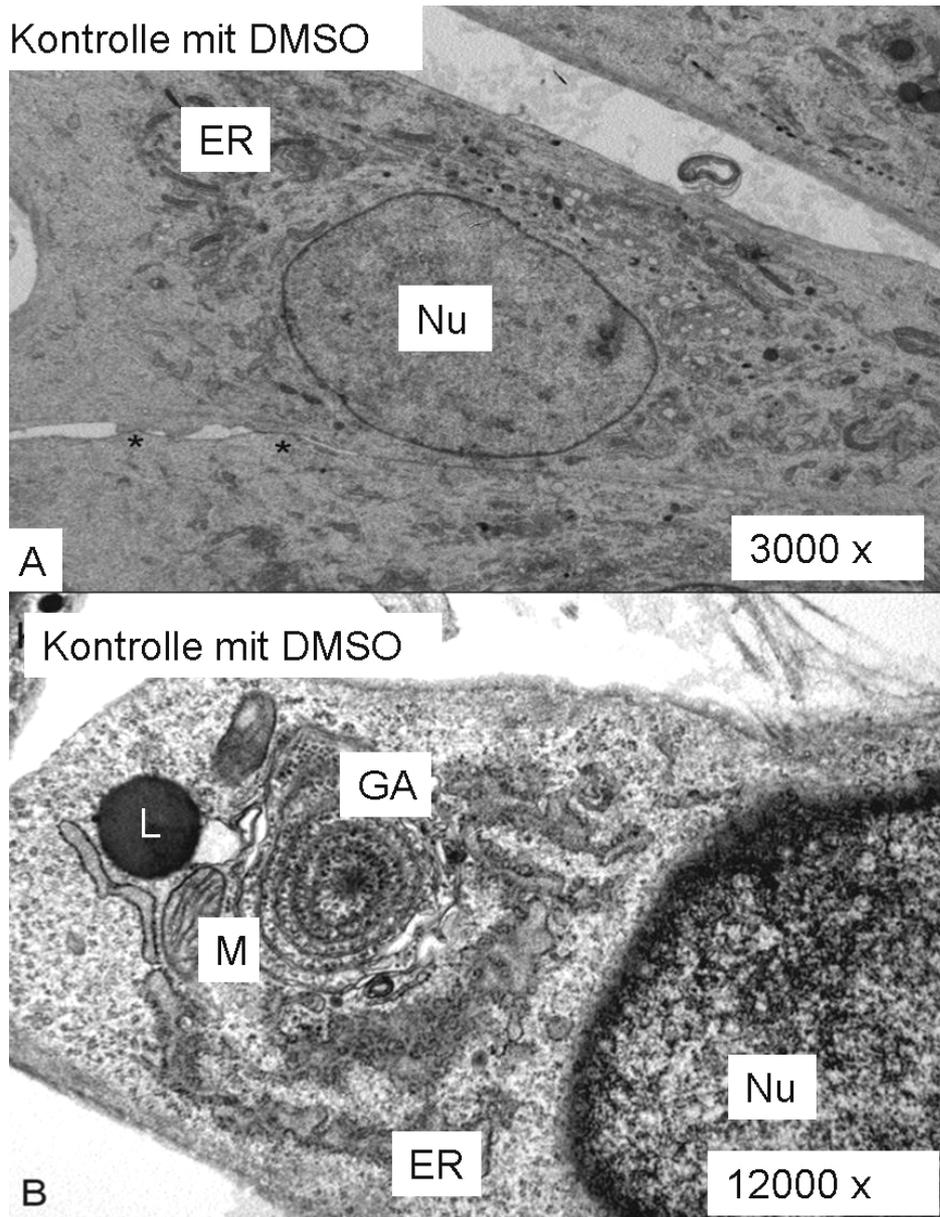


Abbildung 7: Ultrastrukturelle Aufnahme von eMSC der Kontrollgruppe mit 0,5 % DMSO-Zusatz

A: Vergrößerung x 3000, ER: endoplasmatisches Retikulum, Nu: Nucleus,

*: Zell- Zell- Kontakte

B: Vergrößerung x 12000, ER: Endoplasmatisches Retikulum, GA: Golgiapparat,

L: Lipidtropfen, M: Mitochondrium, Nu: Nucleus

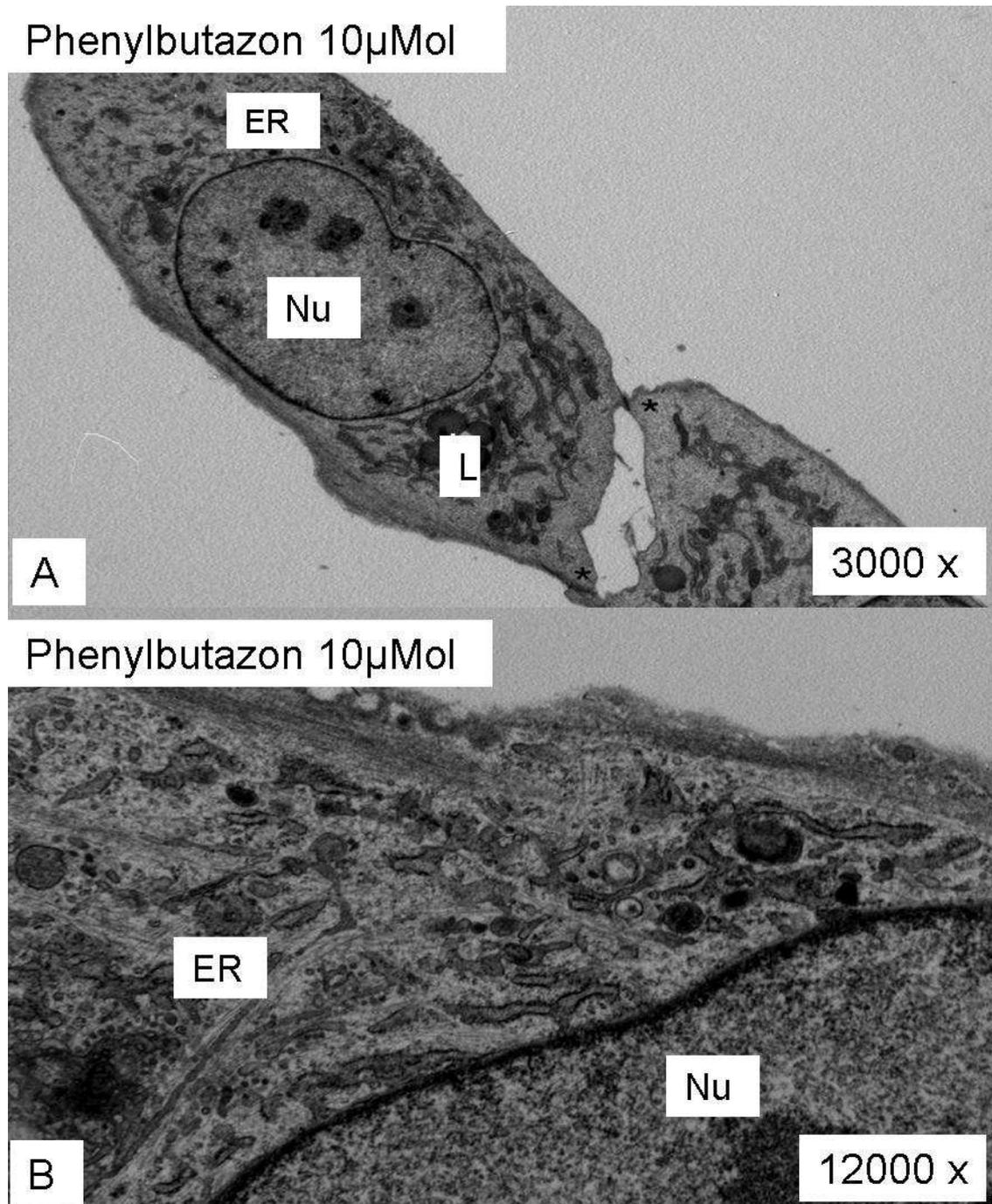


Abbildung 8: Ultrastrukturelle Aufnahme von eMSC mit 10 μ Mol Phenylbutazon

A: Vergrößerung x 3000, ER: Endoplasmatisches Retikulum, L: Lipidtropfen, Nu: Nucleus

*: Zell- Zell- Kontakte

B: Vergrößerung x 12000, ER: Endoplasmatisches Retikulum, Nu: Nucleus

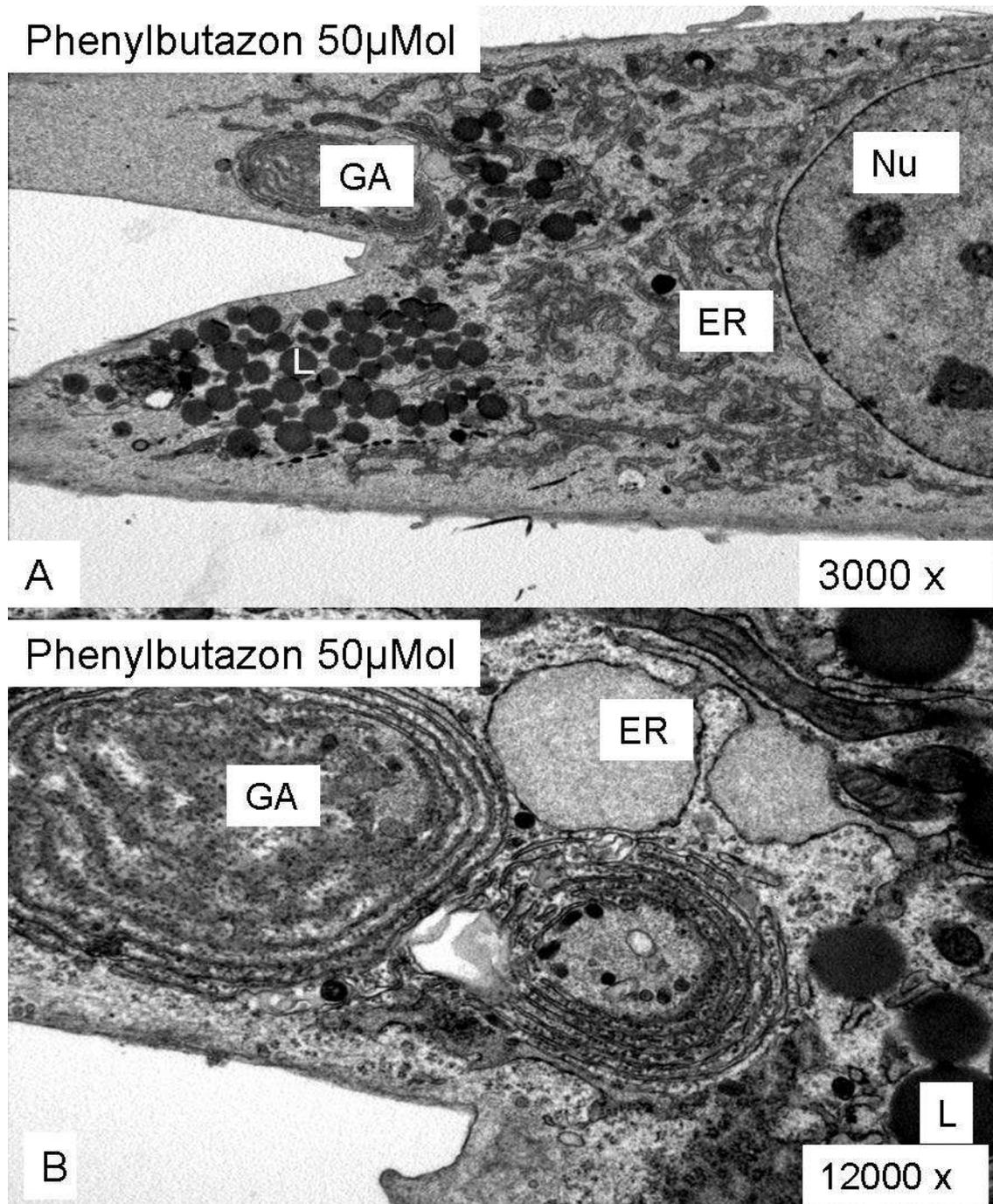


Abbildung 9: Ultrastrukturelle Aufnahme von eMSC mit 50 μ Mol Phenylbutazon

A: Vergrößerung x 3000, ER: Endoplasmatisches Retikulum, GA: Golgiapparat, Nu: Nucleus,
L: Lipidtropfen

B: Vergrößerung x 12000, ER: Endoplasmatisches Retikulum, GA: Golgiapparat,
L: Lipidtropfen

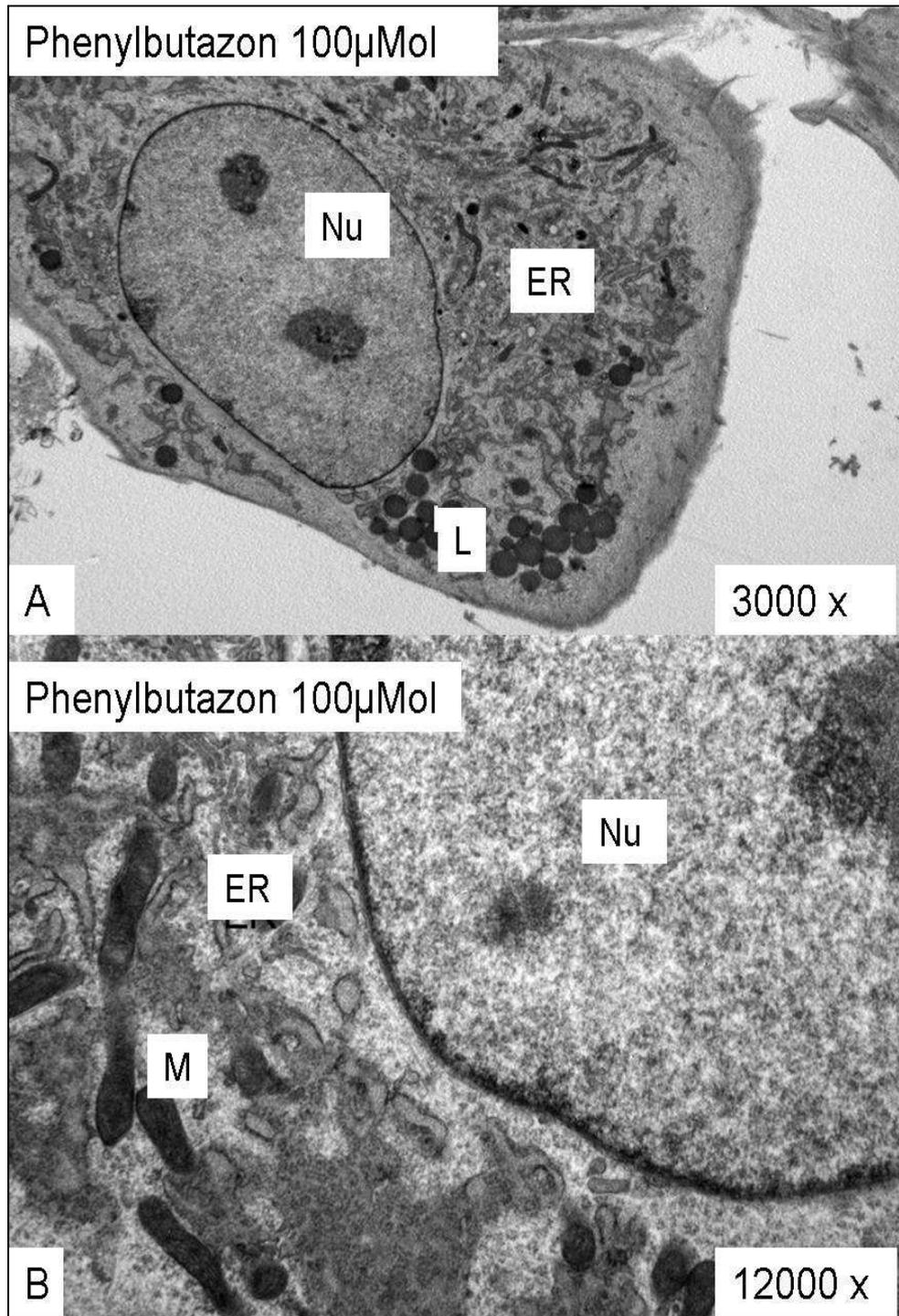


Abbildung 10: Ultrastrukturelle Aufnahme von eMSC mit 100μMol Phenylbutazon

A: Vergrößerung x 3000, ER: Endoplasmatisches Retikulum, L: Lipidtropfen, Nu: Nukleus

B: Vergrößerung x 12000, ER: Endoplasmatisches Retikulum, M: Mitochondrium,
Nu: Nukleus

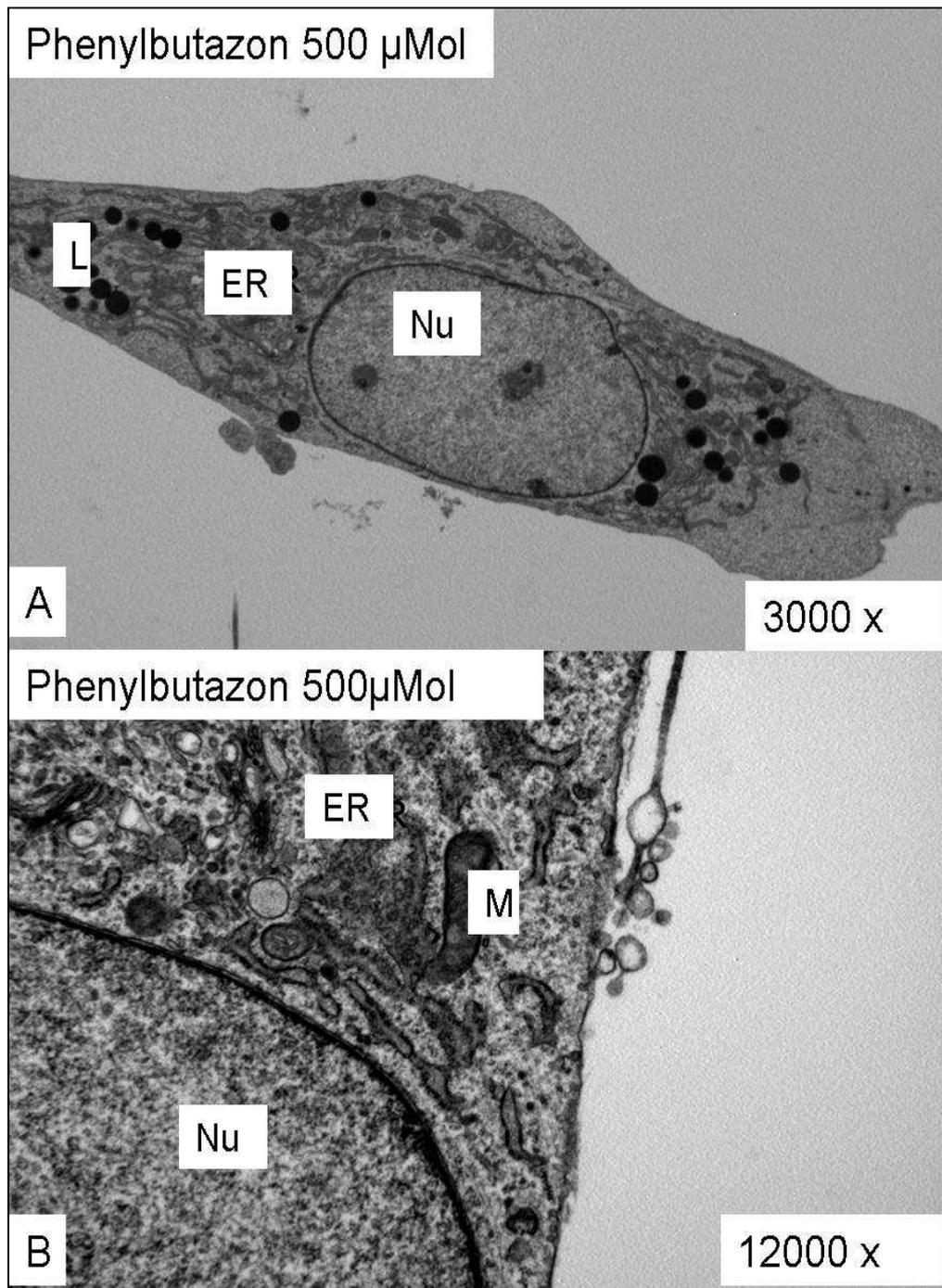


Abbildung 11: Ultrastrukturelle Aufnahme von eMSC mit 500 µMol Phenylbutazon

A: Vergrößerung x 3000, ER: Endoplasmatisches Retikulum, L: Lipidtropfen, Nu: Nucleus

B: Vergrößerung x 12000, ER: Endoplasmatisches Retikulum, M: Mitochondrium,

Nu: Nucleus

4.6. Untersuchung zur Pluripotenz der eMSC nach NSAID- Behandlung

Zum Nachweis der adipogenen-, osteogenen- und chondrogenen Differenzierungspotenz nach NSAID- Behandlung wurden die eMSC nach dem beschriebenen Protokoll behandelt und anschließend histologisch und molekularbiologisch ausgewertet.

4.6.1. Adipogenes Differenzierungspotential- Red Oil O Färbung

Die Red Oil O Färbung stellt intrazelluläre Fettvakuolen leuchtend rot dar, wodurch das adipogene Differenzierungspotential der Zelle dokumentiert werden sollte. Das Zytoplasma stellt sich durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin bläulich dar. Die differenzierten Zellen sollten große, traubenförmige, leuchtend rote, Red Oil O positive Vakuolen, aufzeigen. In allen Zellen, mit und ohne Differenzierungsmedium, genauso wie mit und ohne NSAID-Zusatz, zeigten sich gleichmäßig, kleine, leuchtend rote, Red Oil O positive Vakuolen. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Ausbildung von Fettvakuolen per se sehr stark von der verwendeten Serumcharge abhängig ist.

In Abbildung 12 werden lichtmikroskopische Bilder der adipogen differenzierten und Red Oil O gefärbten Zellen dargestellt.

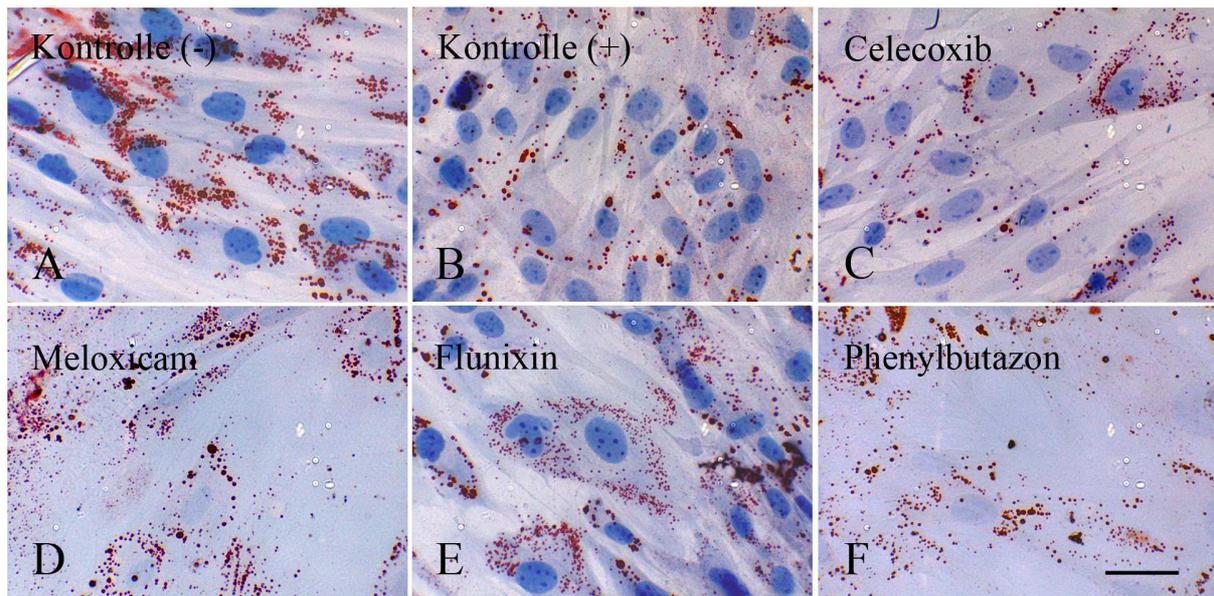


Abbildung 12: Red Oil O- Färbung, lichtmikroskopische Aufnahmen

A: unbehandelte Kontrolle ohne Differenzierungsmedium; **B:** unbehandelte Kontrolle mit Differenzierungsmedium; **C:** Celecoxib- behandelte Zellen (1µMol) mit Differenzierungsmedium; **D:** Meloxicam- behandelte Zellen (1µMol) mit Differenzierungsmedium; **E:** Flunixin- behandelte Zellen (10 µMol) mit Differenzierungsmedium; **F:** Phenylbutazon- behandelte Zellen (10µMol) mit Differenzierungsmedium;

Indomethacin- behandelte Zellen (50µMol) mit Differenzierungsmedium (nicht gezeigt)

43.6.2. Osteogenes Differenzierungspotential- von Kossa- Färbung

4.6.2.1. Darstellung der Differenzierung mittels histologischer Färbungen

Nach 10- tägiger Kultivierungsdauer der Zellen im osteogenem Medium konnten deutliche osteogene Differenzierungsanzeichen dargestellt werden. Mit Hilfe der von Kossa- Färbung wurde die kalzifizierte Extrazellulärmatrix dargestellt. Das mineralisierte Gewebe zeichnete sich durch eine deutliche Schwarzfärbung aus. Die Verteilung der schwarzen Präzipitate war keinesfalls homogen, sondern es konnten schwarze Cluster detektiert werden. Um das umgebende Weichteilgewebe darzustellen, wurden die Zellen mit Kernechtrot kontrastiert. Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der Negativ- Kontrolle mit normalem Wachstumsmedium und den Zellen mit osteogenem Differenzierungsmedium. Alle behandelten Zellen zeigten eine positive von Kossa- Färbung. Um Unterschiede zwischen den behandelten Zellen und der Positiv- Kontrolle mit osteogenem Differenzierungsmedium aber ohne NSAID- Zusatz heraus zu filtern, wurden die

Objektträger fotografiert und diese Fotos mit einem Graufilter belegt. Weil sich die kalzifizierten Herde schwarz darstellten, konnte der Flächenanteil mit den schwarzen Anteilen im Kontrast zu den rötlich gefärbten Zellen, welche mit dem Filter grau gefärbt wurden, berechnet werden. Es stellte sich heraus, dass die unbehandelte Postivkontrolle mit osteogenem Differenzierungsmedium prozentual die größte Kalzifizierungsfläche aufzeigte. Von den hier verwendeten NSAID konnte nach Phenylbutazon-Behandlung der größte Kalzifizierungsanteil dargestellt werden. Danach folgten Zellen, die mit Flunixin behandelt wurden. Nach Celecoxib und Meloxicam-Behandlung, die zur relativen neuen Wirkstoffgruppe der Cyclooxygenase-2-selektiven-Hemmer gehören, konnten die geringsten Kalzifizierungsanteile nachgewiesen und quantifiziert werden.

In Abbildung 13 werden lichtmikroskopische Bilder der osteogen differenzierten und von Kossa gefärbten Zellen dargestellt.

In Diagramm 24 werden die berechneten Kalzifizierungsanteile als Balkendiagramm dargestellt.

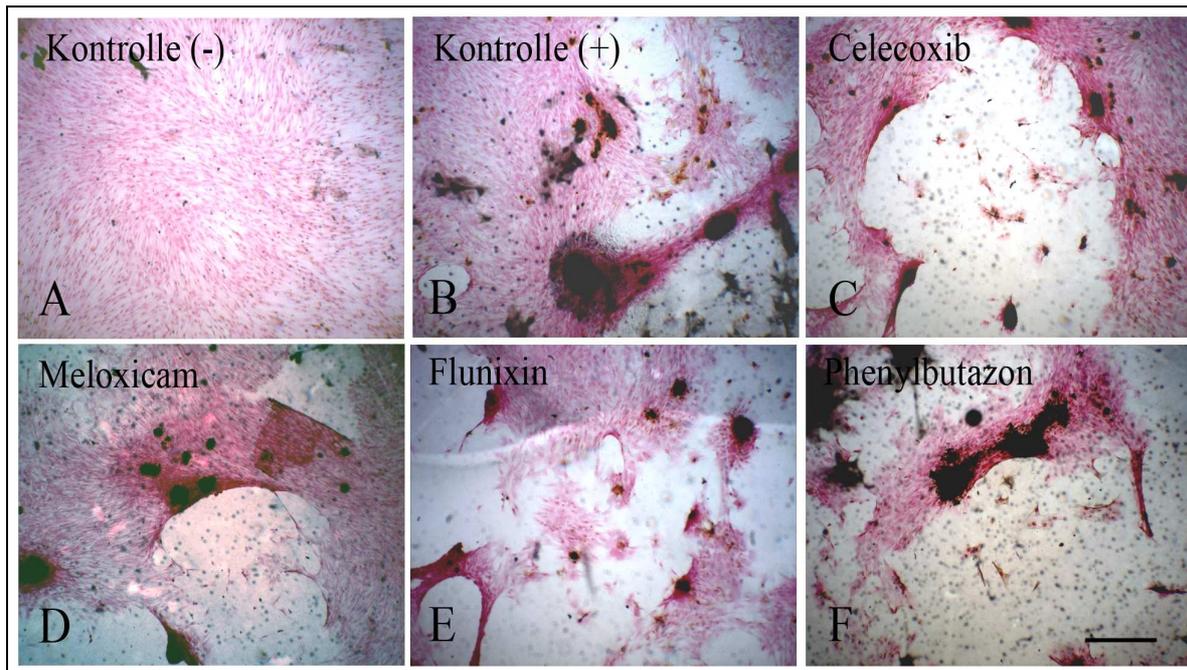


Abbildung 13: von Kossa- Färbung, lichtmikroskopische Aufnahmen

A: unbehandelte Kontrolle ohne Differenzierungsmedium; **B:** unbehandelte Kontrolle mit Differenzierungsmedium; **C:** Celecoxib- behandelte Zellen ($1\mu\text{Mol}$) mit Differenzierungsmedium; **D:** Meloxicam- behandelte Zellen ($1\mu\text{Mol}$) mit Differenzierungsmedium; **E:** Flunixin- behandelte Zellen ($10\mu\text{Mol}$) mit Differenzierungsmedium; **F:** Phenylbutazon- behandelte Zellen ($10\mu\text{Mol}$) mit Differenzierungsmedium;
 Indomethacin- behandelte Zellen ($50\mu\text{Mol}$) mit Differenzierungsmedium (nicht gezeigt)

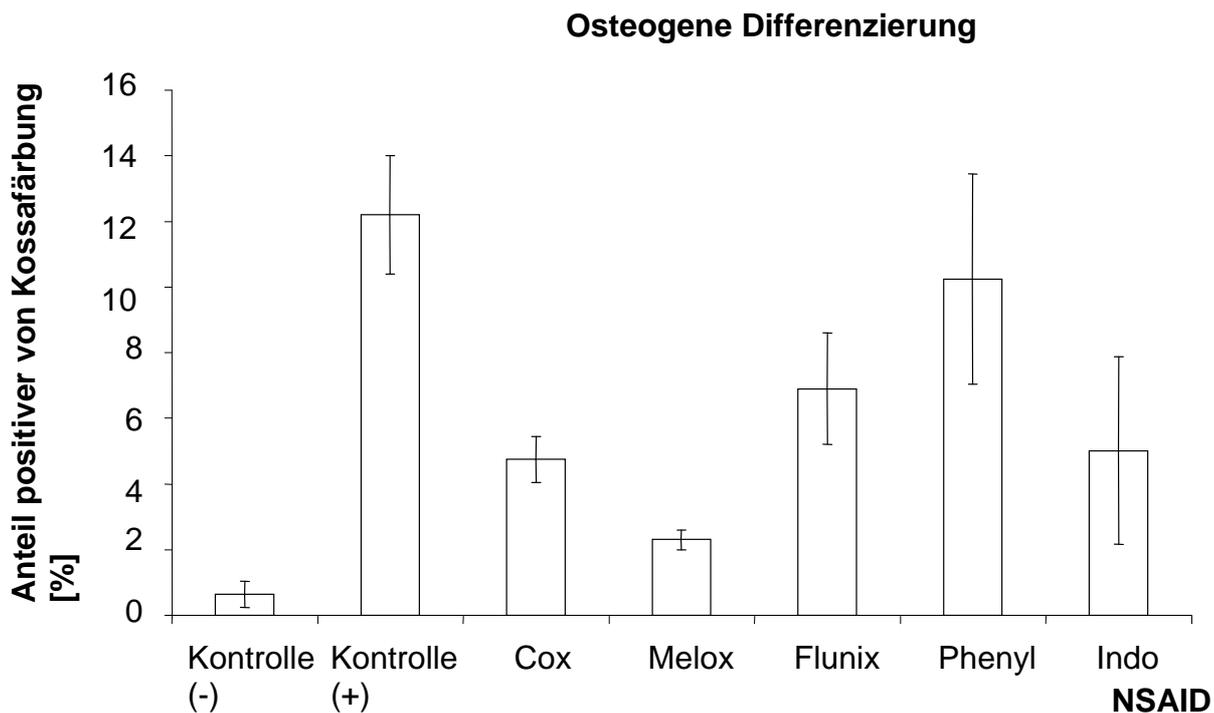


Diagramm 24: Flächenanteil der mit der von Kossa- Färbung angefärbten Zellareale (12 ausgezählte Gesichtsfelder für jede Substanz).

Kontrolle (-): unbehandelte Kontrolle ohne Differenzierungsmedium; **Kontrolle (+)**: unbehandelte Kontrolle mit Differenzierungsmedium; **Cox**: Celecoxib- behandelte (1 μ Mol) Zellen mit Differenzierungsmedium; **Melox**: Meloxicam- behandelte Zellen (1 μ Mol) mit Differenzierungsmedium; **Flunix**: Flunixin- behandelte Zellen (10 μ Mol) mit Differenzierungsmedium; **Phenyl**: Phenylbutazon- behandelte Zellen (10 μ Mol) mit Differenzierungsmedium; **Indo**: Indomethacin- behandelte Zellen (50 μ Mol) mit Differenzierungsmedium.

4.6.2.2. Darstellung der Differenzierung mittels molekularbiologischer Nachweismethode der osteogenen Differenzierung

Neben der histologischen Auswertung wurde eine RT- PCR zum Nachweis der osteogenen Differenzierung durchgeführt. Mit einem speziellen Marker wurde die Exprimierung des Gens Runx2 in allen mit NSAID- behandelten Osteodifferenzierungsansätzen qualitativ nachgewiesen.

β -Actin, das in allen Zellen konstitutiv exprimiert wurde, also sowohl in den Kontroll- als auch in den Differenzierungspopulationen, lief als House- Keeping- Gene mit. Wurden in beiden Populationen die Banden für β -Actin angezeigt, bewies dies, dass es sich um auswertbare Proben handelte, da β -Actin in allen Zellen exprimiert wurde.

Während in der Negativkontrolle kein Runx2 exprimiert wurde, konnte in allen Versuchsgruppen die Exprimierung von Runx2 als Marker für die osteogene Differenzierung nachgewiesen werden. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen der Positivkontrolle ohne NSAID- Behandlung und den NSAID- behandelten osteogen differenzierten Zellen ermittelt werden.

In Abbildung 14 werden die Bandenergebnisse von der RT-PCR der osteogenen Differenzierung dargestellt.

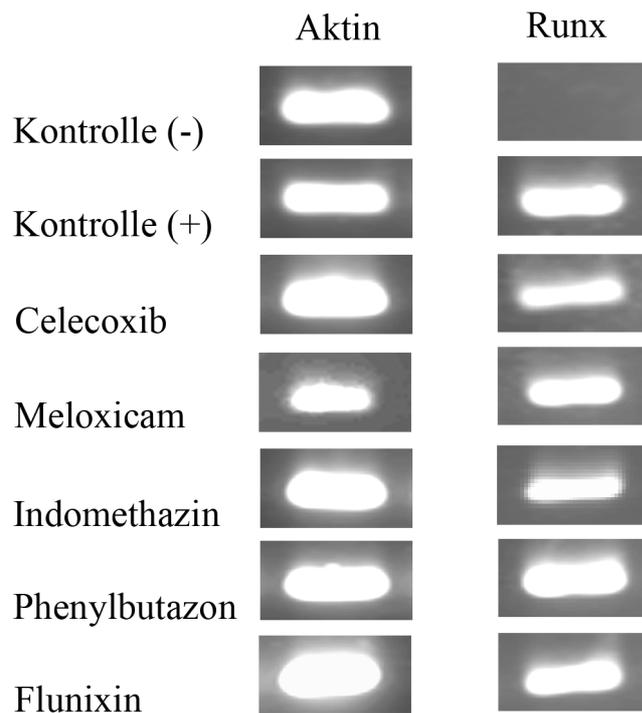


Abbildung 14: Darstellung des Ergebnisses der RT- PCR

Expression von Aktin als Housekeeping Gen zur Kontrolle, und Runx2, als osteogener Differenzierungsnachweis.

Kontrolle (-): unbehandelte Zellen ohne Differenzierungsmedium, die Aktinexpression ist deutlich, dagegen kann keine Runx2- Expression gezeigt werden. **Kontrolle (+):** unbehandelte Zellen mit Differenzierungsmedium, sowohl eine Aktin- als auch eine Runx2- Expression ist detektierbar. **Celecoxib:** Celecoxib- behandelte Zellen (1 μ Mol) mit Differenzierungsmedium, sowohl eine Aktin- als auch eine Runx2- Expression ist nachweisbar. **Meloxicam:** Meloxicam- behandelte Zellen (1 μ Mol) mit Differenzierungsmedium, sowohl eine Aktin- als auch eine Runx2- Expression ist darstellbar. **Indomethacin:** Indomethacin- behandelte Zellen (50 μ Mol) mit Differenzierungsmedium, sowohl eine Aktin- als auch eine Runx2- Expression ist nachweisbar. **Phenylbutazon:** Phenylbutazon- behandelte Zellen (10 μ Mol) mit Differenzierungsmedium, sowohl eine Aktin- als auch eine Runx2- Expression ist detektierbar. **Flunixin:** Flunixin- behandelte Zellen (10 μ Mol) mit Differenzierungsmedium, sowohl eine Aktin- als auch eine Runx2- Expression ist nachweisbar.

4.6.3. Chondrogene Differenzierung

4.6.3.1. Darstellung der Differenzierung mittels histologischer Färbungen

Die chondrogene Differenzierung der Zellen konnte sowohl histologisch, als auch molekularbiologisch dargestellt werden.

Der Versuchsaufbau bestand aus sieben verschiedenen Ansätzen. Es gab eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten eMSC, die mit normalem Proliferationsmedium als 3D-Kultur in einem Falconröhrchen kultiviert wurden.

Die Positivkontrolle bestand aus unbehandelten eMSC, die mit chondrogenem Differenzierungsmedium in einer 3D- Kultur kultiviert wurden. In den anderen fünf Versuchsgruppen wurden zu dem chondrogenen Induktionsmedium noch die NSAID Celecoxib (1 µMol), Meloxicam (1 µMol), Flunixin (10 µMol), Indomethacin (50 µMol) und Phenylbutazon (10 µMol) appliziert.

Am Ende der Kultivierungszeit konnten keine makroskopisch auffälligen Unterschiede zwischen den Pellets der einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden. Es gab auch keine Größenunterschiede.

Es wurde eine Alzianblaufärbung zur Anfärbung der sauren Mukopolysaccharide verwendet. Mit Kernechtrot wurde gegengefärbt, um die Zellkerne darzustellen.

Die chondrogen differenzierten Zellen zeigten blaugefärbte Areale, die sich zwischen den rotgefärbten Zellkernen befanden. Hierbei handelte es sich um die sauren Polysaccharide in der Extrazellularmatrix. In den Kontrollen wurde eine rosafarbende Grundfärbung mit blauen Arealen detektiert.

Die gefärbten Objektträger wurden fotografiert und über das Bildbearbeitungsprogramm image J® in schwarz- weiß- Bilder umgewandelt. Die Farben Blau und Rot stellten sich in unterschiedlichen Graustufen dar und über eine densitometrische Bestimmung konnten ihre Flächenanteile berechnet werden.

In der histologischen Auswertung zeigten sich in der Negativkontrolle Farbreaktionen auf saure Mukopolysaccharide. Eine positive Alzianblaufärbung konnte bei 56% Flächenanteilen detektiert werden. Die mit chondrogenem Differenzierungsmedium versetzten Zellen zeigten einen signifikant höheren Flächenanteil an positiver Blaufärbung als die Negativkontrolle (81 %).

Flunixin zeigte mit 98 % konstant den größten Flächenanteil an positiver Blaufärbung auf.

In Abbildung 15 werden lichtmikroskopische Bilder der chondrogen differenzierten und Alzianblau gefärbten Zellen dargestellt.

In Diagramm 25 werden die positiven blauen Flächenanteile als Balkendiagramm dargestellt.

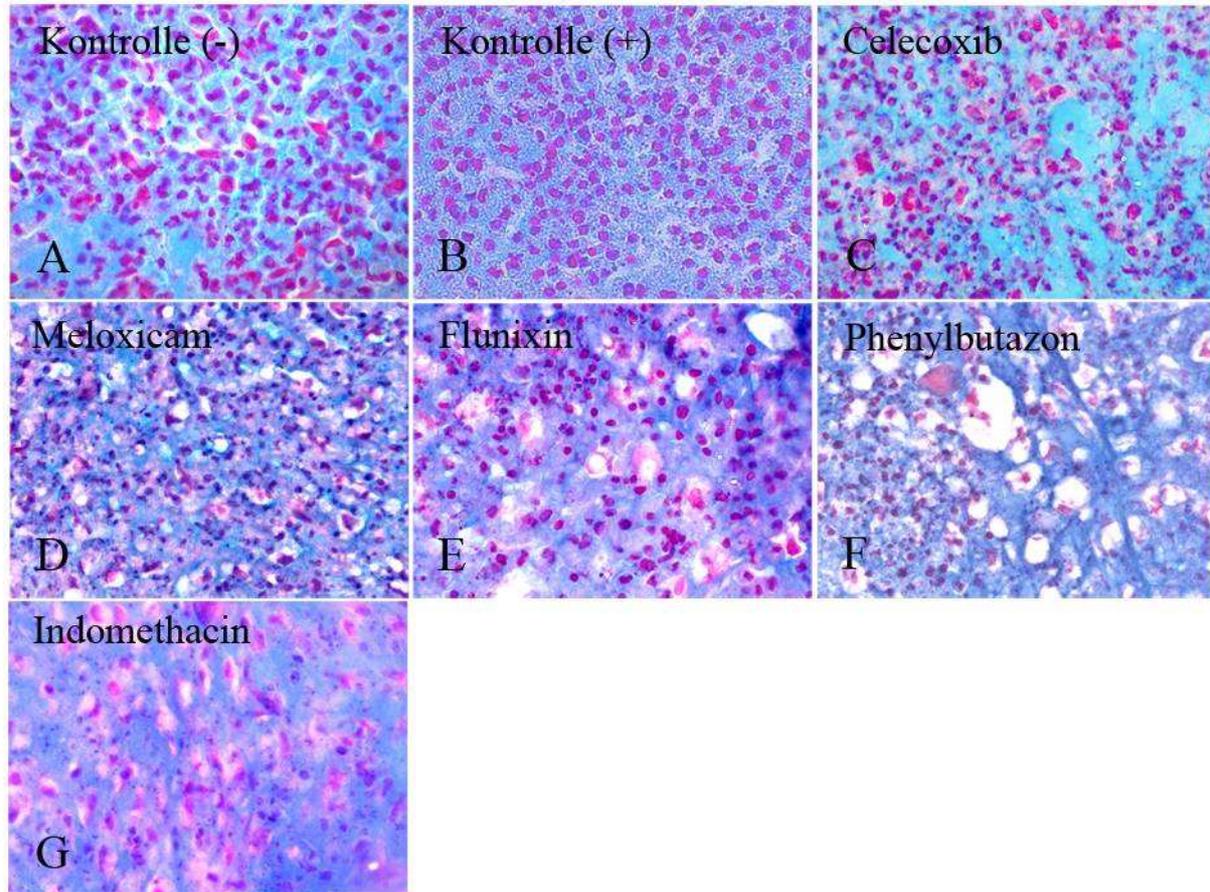


Abbildung 15: Alzianblaufärbung, lichtmikroskopische Aufnahmen

A: unbehandelte Kontrolle (-) ohne Differenzierungsmedium; **B:** unbehandelte Kontrolle (+) mit Differenzierungsmedium; **C:** Celecoxib-behandelte Zellen (1µMol) mit Differenzierungsmedium; **D:** Meloxicam-behandelte Zellen (1µMol) mit Differenzierungsmedium; **E:** Flunixin-behandelte Zellen (10µMol) mit Differenzierungsmedium; **F:** Phenylbutazon-behandelte Zellen (10µMol) mit Differenzierungsmedium; **G:** Indomethacin-behandelte Zellen (50µMol) mit Differenzierungsmedium

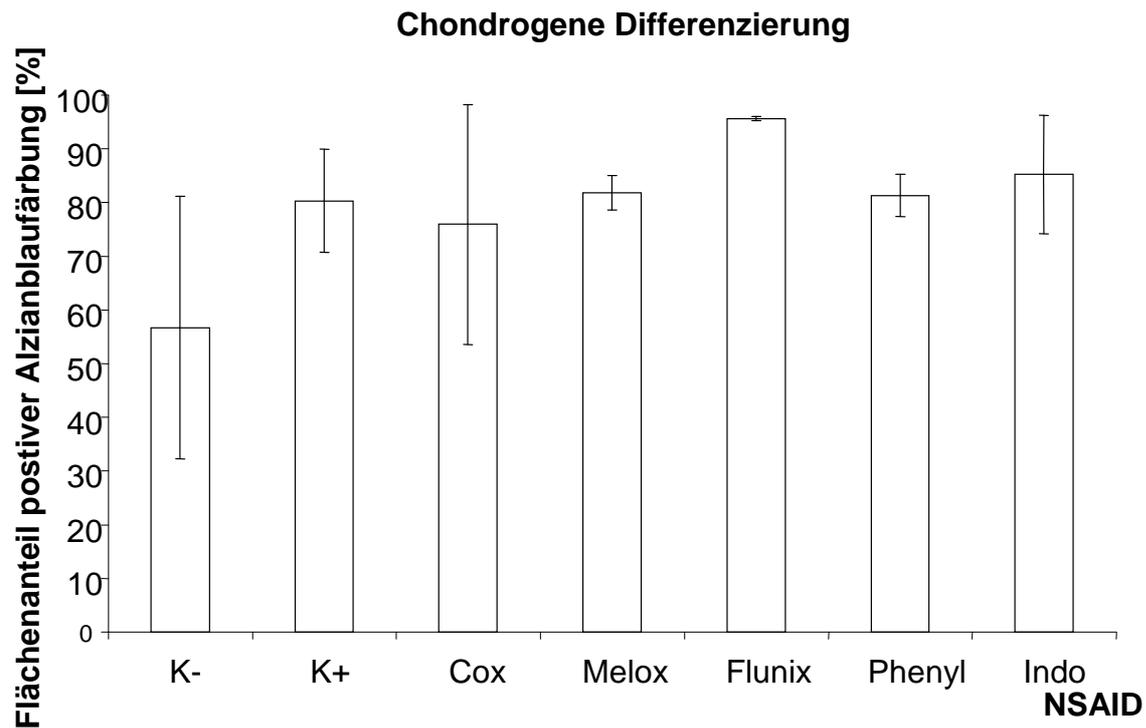


Diagramm 25: Flächenanteil der mit der Alzianblau- Färbung angefärbten Areale (12 ausgezählte Felder für jede Substanz).

K (-): unbehandelte Kontrolle ohne Differenzierungsmedium; **K (+)**: unbehandelte Kontrolle mit Differenzierungsmedium; **Cox**: Celecoxib- behandelte Zellen (1 μ Mol) mit Differenzierungsmedium; **Melox**: Meloxicam- behandelte Zellen (1 μ Mol) mit Differenzierungsmedium; **Flunix**: Flunixin- behandelte Zellen (10 μ Mol) mit Differenzierungsmedium; **Phenyl**: Phenylbutazon- behandelte Zellen (10 μ Mol) mit Differenzierungsmedium; **Indo**: Indomethacin- behandelte Zellen (50 μ Mol) mit Differenzierungsmedium.

4.6.3.2. Darstellung der Differenzierung mittels molekularbiologischer Nachweismethode der chondrogenen Differenzierung

Neben der histologischen Auswertung wurde mittels RT- PCR ebenfalls die chondrogene Differenzierung untersucht. Mit einem speziellen Marker wurde die Exprimierung der Gene Collagen II und Aggrecan in allen mit NSAID- behandelten Differenzierungsansätzen für die chondrogene Differenzierung qualitativ nachgewiesen. Interessanterweise konnten auch in der Negativkontrolle Aggrecan und Collagen II detektiert werden.

β -Actin, das in allen Zellen konstitutiv exprimiert wurde, also sowohl in den Kontroll- als auch in den Differenzierungspopulationen, wurde als House- Keeping- Gen

verwendet. Fanden sich in den beiden Populationen die Banden für β -Actin, bewies dies, dass es sich um auswertbare Proben handelte, da β -Actin in allen Zellen exprimiert wurde.

In Abbildung 16 werden die Ergebnisse der RT-PCR der chondrogen differenzierten Zellen als Banden dargestellt.

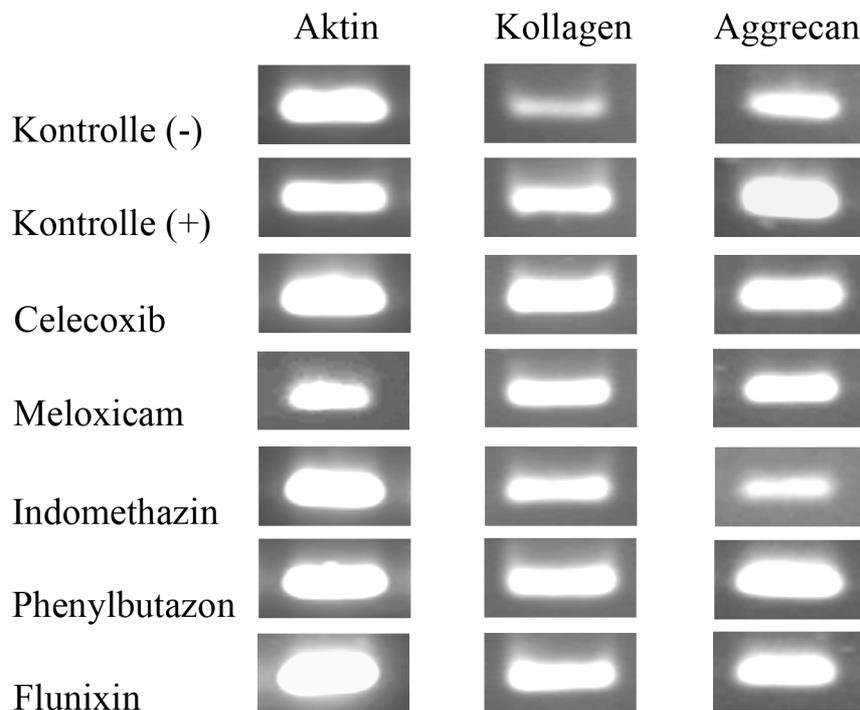


Abbildung 16: Darstellung des Ergebnisses der RT-PCR für die chondrogene Differenzierung;

Vorhandensein der Primer für β -Aktin, als Housekeeper, sowie die Primer für Kollagen und Aggrecan, als Differenzierungsnachweis. **Kontrolle (-)**: unbehandelte Zellen ohne Differenzierungsmedium, Aktin ist vorhanden, Kollagen und Aggrecan sind auch vorhanden, aber Kollagen scheint etwas schwächer ausgeprägt zu sein. **Kontrolle (+)**: unbehandelte Zellen mit Differenzierungsmedium, Aktin, Kollagen und Aggrecan sind nachweisbar. **Celecoxib**: Celecoxib-behandelte Zellen mit Differenzierungsmedium, Aktin, Kollagen und Aggrecan sind detektierbar. **Meloxicam**: Meloxicam-behandelte Zellen mit Differenzierungsmedium, Aktin, Kollagen und Aggrecan ließen sich darstellen. **Indomethacin**: Indomethacin-behandelte Zellen mit Differenzierungsmedium, Aktin und Kollagen sind gut nachweisbar, Aggrecan scheint nur schwach ausgeprägt zu sein. **Phenylbutazon**: Phenylbutazon-behandelte Zellen mit Differenzierungsmedium, Aktin, Kollagen und Aggrecan sind detektierbar. **Flunixin**: Flunixin-behandelte Zellen mit Differenzierungsmedium, Aktin, Kollagen und Aggrecan sind nachweisbar.

4.6.3.3. Ultrastrukturelle Untersuchung von chondrogen differenzierten MSC unter NSAID- Einfluß

Auf lichtmikroskopischer Ebene konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen detektiert werden, deshalb wurden die chondrogen differenzierten Zellen zusätzlich noch auf ultrastruktureller Ebene untersucht.

Die chondrogene Differenzierung wurde, wie bereits oben beschrieben, als 3D-Kultur über den Zeitraum von drei Wochen durchgeführt.

Es gab eine Negativkontrolle, kultiviert mit Wachstumsmedium, und eine Positivkontrolle, welche mit chondrogenen Induktionsmedium kultiviert wurde. Bei beiden Proben handelte es sich um eMSC ohne NSAID- Zusatz.

Die restlichen fünf Ansätze wurden jeweils mit den Medikamenten Celecoxib (1 µMol), Meloxicam (1 µMol), Flunixin (10 µMol), Indomethacin (50 µMol) und Phenylbutazon (10 µMol) versetzt. Dabei handelte es sich um mittlere Konzentrationen, wie sie auch therapeutisch eingesetzt werden.

Die Positivkontrolle unterschied sich erheblich von der Negativkontrolle. In der Positivkontrolle war ein besserer Zellerhalt gegeben und man erkannte deutlich organisierte Kollagenfaserbündel.

In der Negativkontrolle war kein ausgeprägter Zellerhalt gegeben und es ließen sich keine Kollagenfasern erkennen.

Im Vergleich zu der Positivkontrolle mit den verschiedenen Medikamentenzusätzen stellten sich zwischen den Positivkontrollen und den Medikamenten Celecoxib, Meloxicam, Flunixin und Phenylbutazon keine deutlichen Unterschiede dar. Es war ein guter Zellerhalt und deutliche kollagene Fasern zu erkennen. Allerdings kam es unter der Verwendung von Indomethacin zu deutlichen Zellschädigungen. In den behandelten Zellen konnten keine Zellorganellen dargestellt werden und es waren keine Zellmembranen erkennbar.

In den Abbildungen 17- 23 werden die elektronenmikroskopischen Bilder der chondrogen differenzierten eMSC dargestellt.

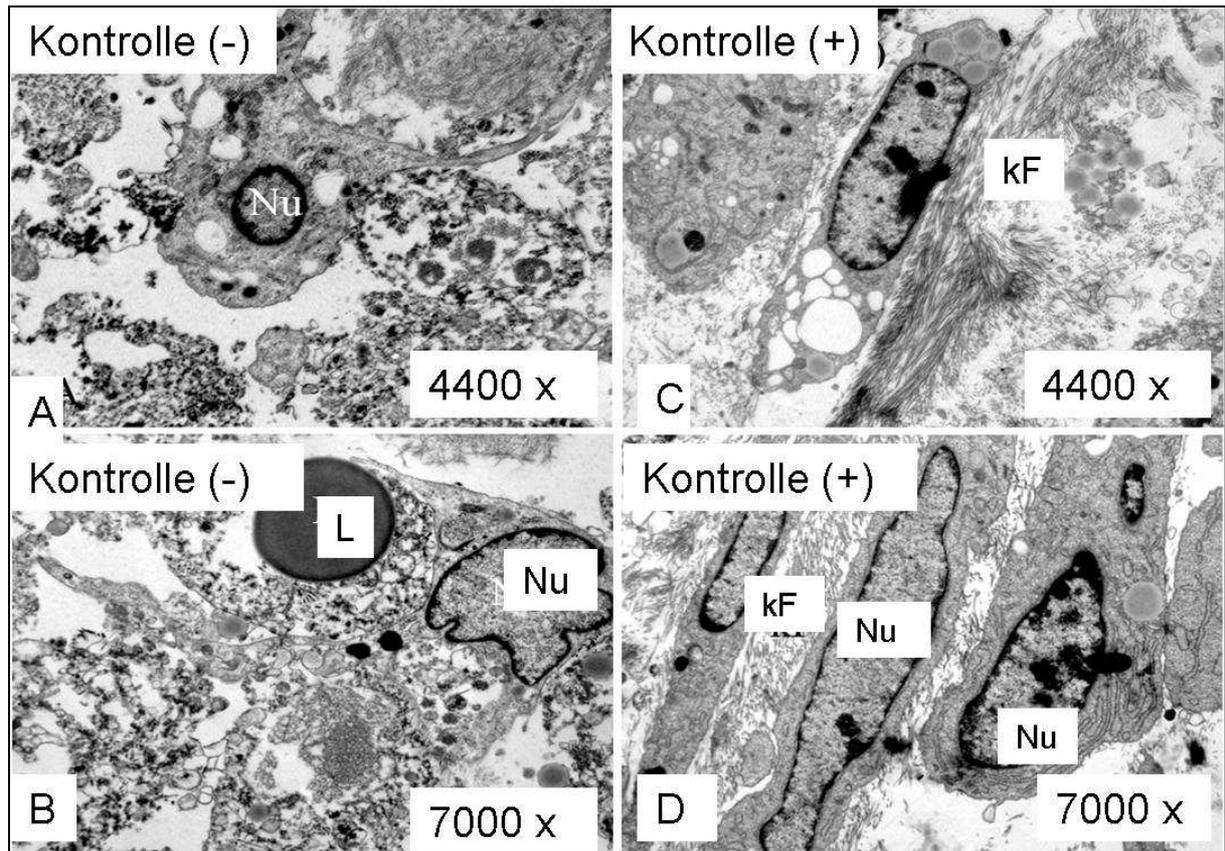


Abbildung 17: Ultrastrukturelle Aufnahme von Kontrollzellen ohne (-) und mit (+) chondrogenem Differenzierungsmedium

Kontrolle (-): unbehandelte Zellen ohne Differenzierungsmedium;

A: Vergrößerung x 4400, Nu: Nucleus

B: Vergrößerung x 7000, L: Lipidtropfen, Nu: Nucleus

Kontrolle (+): unbehandelte Zellen mit Differenzierungsmedium,

C: Vergrößerung x 4400, kF: kollagene Fasern

D: Vergrößerung x 7000, kF: kollagene Fasern, Nu: Nucleus

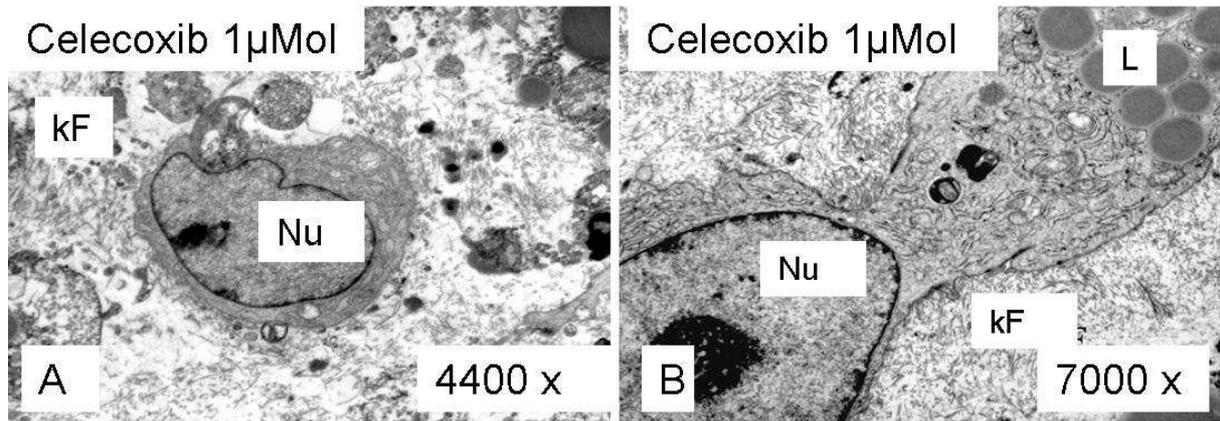


Abbildung 18: Ultrastrukturelle Aufnahmen von Celecoxib-behandelten, chondrogen differenzierten eMSC.

Es konnten keine Veränderungen gegenüber Zellen der Kontrollgruppe dargestellt werden.

A: Vergrößerung x 4400, kF: kollagene Fasern, Nu: Nucleus

B: Vergrößerung x 7000, kF: kollagene Fasern, L: Lipidtropfen, Nu: Nucleus

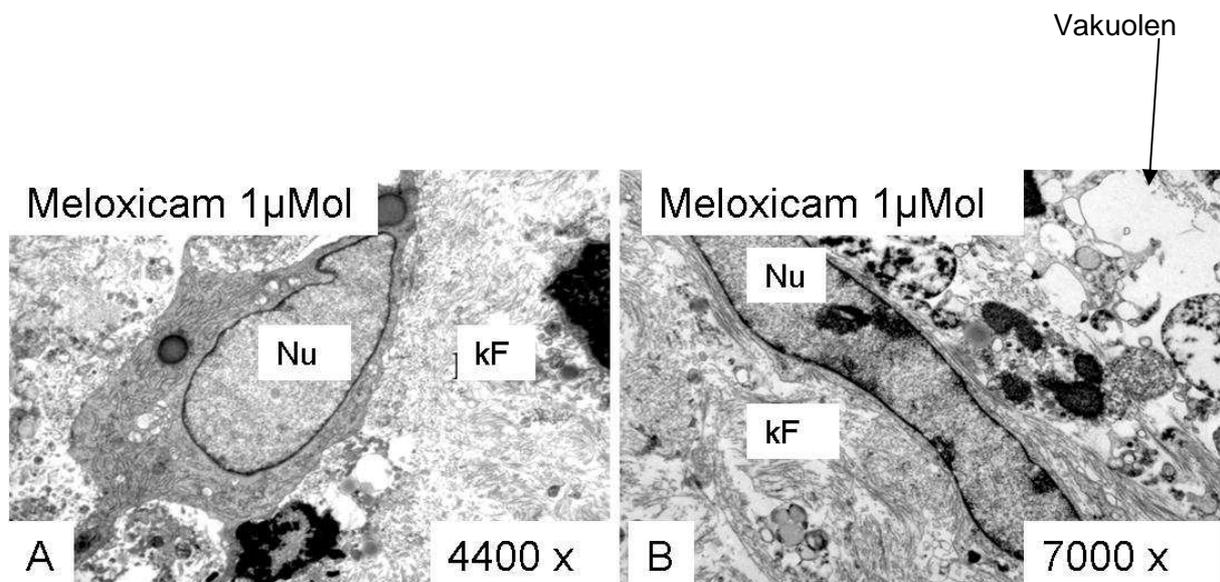


Abbildung 19: Ultrastrukturelle Aufnahmen von Meloxicam-behandelten, chondrogen differenzierten eMSC.

Es konnten keine Veränderungen gegenüber Zellen der Kontrollgruppe dargestellt werden.

A: Vergrößerung x 4400, kF: kollagene Fasern, Nu: Nucleus

B: Vergrößerung x 7000, kF: kollagene Fasern, Nu: Nucleus

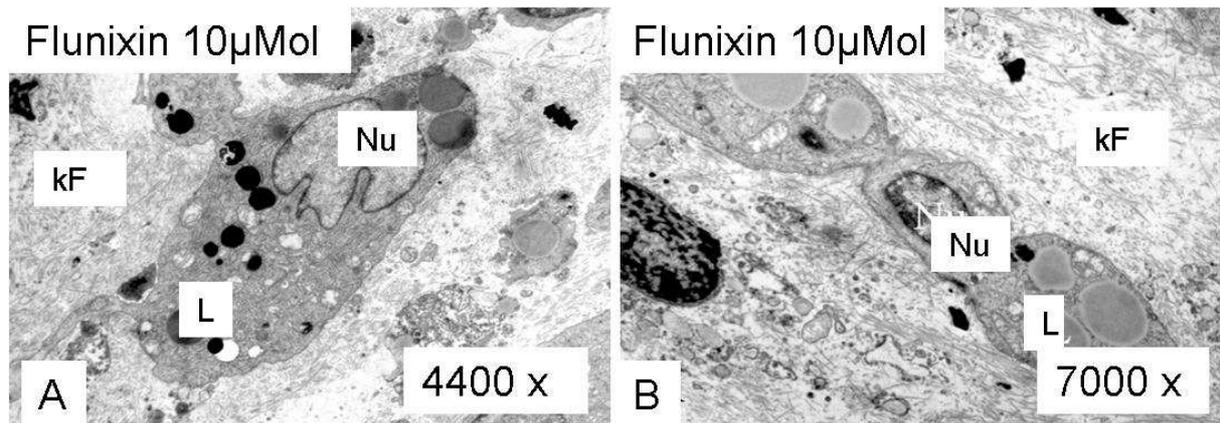


Abbildung 20: Ultrastrukturelle Aufnahmen von Flunixin-behandelten, chondrogen differenzierten eMSC

Es konnten keine Veränderungen gegenüber Zellen der Kontrollgruppe dargestellt werden.

A: Vergrößerung x 4400, kF: kollagene Fasern, L: Lipidtropfen, Nu: Nucleus

B: Vergrößerung x 7000, kF: kollagene Fasern, L: Lipidtropfen, Nu: Nucleus

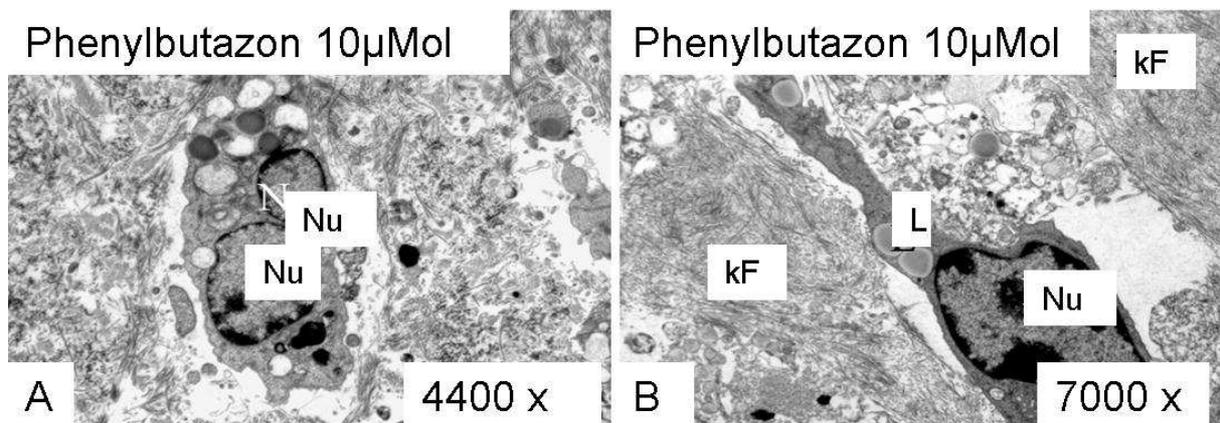


Abbildung 21: Ultrastrukturelle Aufnahmen von Phenylbutazon-behandelten, chondrogen differenzierten eMSC

Es konnten keine Veränderungen gegenüber Zellen der Kontrollgruppe dargestellt werden.

A: Vergrößerung x 4400, Nu: Nucleus

B: Vergrößerung x 7000, kF: kollagene Fasern, L: Lipidtropfen, Nu: Nucleus

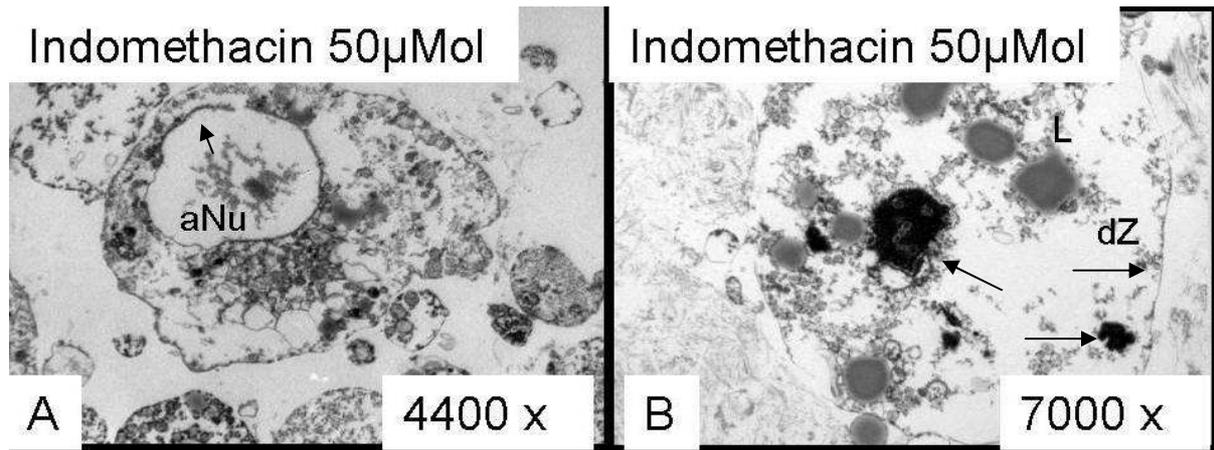


Abbildung 22: Ultrastrukturelle Aufnahmen von Indomethacin- behandelten, chondrogen differenzierten eMSC's.

Gegenüber der Kontrolle und den anderen NSAID-Gruppen sind deutliche Schädigungsmuster zu erkennen.

A: Vergrößerung x 4400, aNu: aufgelöster Nucleus mit Pfeil an der defekten Kernmembran

B: Vergrößerungx 7000, dZ: defekte Zellmembran mit Pfeil, L: Lipidtropfen, apoptotic bodies mit Pfeilen gekennzeichnet

5. Diskussion

5.1. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Einflüsse und Folgen von NSAID auf Vitalität, Proliferation und Differenzierungsfähigkeit von eMSC. Die eMSC wurden aus dem Sternalpunktat von Pferden gewonnen. Das Medium, das zur ersten Anreicherung genutzt werden sollte, stammte aus Voruntersuchungen mit humanen MSC (Klinz et al. 2005; Arnhold et al. 2006) in denen α MEM Basalmedium mit einem Serumanteil von 20% Kälberserum beschrieben wurde.

Der Einfluss von NSAID sollte zuerst anhand der Vitalität und der Proliferation der eMSC untersucht werden. Die Untersuchungen wurden in einem Kurzzeitansatz und in einem Langzeitansatz durchgeführt. In Kurzzeituntersuchungen mit einer Kultivierungszeit von lediglich 24 Stunden wurden mit Hilfe von photometrischen Untersuchungs- Kits die Proliferation (BrDU-Assay) und die Vitalität (WST-1 Assay) auf Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den behandelten Zellen beobachtet. In dem Langzeitansatz sollten die Zellen für 6 Wochen unter Zugabe von genau festgelegten NSAID-Konzentrationen in Kultur gehalten werden. Bei Passagevorgängen sollten eventuelle Unterschiede zwischen unbehandelten Kontrollzellen und den Zellen, die mit NSAID behandelt wurden, untersucht werden, unter Berücksichtigung der Passagezahl. Um negative Effekte im Bereich von hohen Konzentrationen Celecoxib, Meloxicam und Phenylbutazon deutlicher darzustellen wurden die Zellen in einem „wound- and- healing“- Assay über 24 Stunden mit einer Vitalkamera beobachtet. Desweiteren sollten die Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Zellen, exemplarisch, am Beispiel von Phenylbutazon, elektronenmikroskopisch dargestellt werden.

Die gewebetypischen Differenzierungen und Unterschiede mit und ohne NSAID-Zugabe sollten anschließend mit histologischen Färbeverfahren bei adipogener-, osteogener- und chondrogener Differenzierung und mittels PCR bei der chondrogenen- und bei der osteogenen Differenzierung nachgewiesen werden. Zusätzlich sollten die Veränderung in der chondrogenen Differenzierung mit NSAID-Zugaben auch mittels der Elektronenmikroskopie dargestellt werden.

5.2. Kritik der Methode

Der Versuchsaufbau sollte Aufschluss über die Auswirkungen von NSAID auf die Vitalität, Proliferation und Differenzierung von equinen mesenchymalen Stammzellen geben.

Dazu wurden die Zellen aus dem Sternalpunktat von Pferden entnommen (Fortier et al. 1998; Smith et al. 2003).

In der Literatur wurden auch andere Möglichkeiten der Stammzellgewinnung beschrieben, so bestand nicht nur die Möglichkeit, Stammzellen aus dem Sternalpunktat zu isolieren, sondern auch aus dem Fettgewebe, dem peripheren Blut (Koerner et al. 2005) und aus dem Beckenkamm. Allerdings, wie Koerner et al. (2005) beschrieben haben, ist die Kultivierung der Stammzellen aus dem peripheren Blut nicht so ergiebig wie es bei Zellen, die aus dem Sternalpunktat oder dem Beckenkamm (Tan et al. 2005; Mazzini et al. 2006; Risbud et al. 2006) extrahiert wurden, der Fall ist. Die Gewinnung der Zellen aus dem Fettgewebe (Kern et al. 2006; Moon et al. 2006; Timper et al. 2006) stellte sich ebenfalls schwierig dar, da sie sich aus diesem Gewebe nicht gut isolieren ließen. Aus dem Beckenkamm gewonnene Zellen ließen sich zwar gut isolieren und kultivieren, jedoch war ihre Gewinnung mit einem wesentlich größeren Aufwand verbunden, als dies bei der Gewinnung aus dem Sternalpunktat der Fall war (Tan et al. 2005; Risbud et al. 2006). Die Zellen müssten durch eine Operation mit Eröffnung des Beckenknochens und unter Verwendung einer Knochenstanze, aus diesem entnommen werden. Die Entnahme aus dem Sternum erfolgte mittels einer Entnahmekanüle aus den Sternalzwischenräumen. Aufgrund der vereinfachten Gewinnung, gegenüber der aus dem Beckenkamm, stammten die für diese Arbeit verwendeten Zellen, ausschließlich aus dem Sternalpunktat von Pferden.

Nach der Entnahme wurden die Zellen in einem Transportmedium im Verhältnis 1:1 innerhalb von 24 Stunden in das Labor transportiert, wodurch stets die gleichen Bedingungen für die zu behandelnden Zellen garantiert waren.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Standardmedium wie es in der Literatur beschrieben wurde (Klinz et al. 2005; Arnhold et al. 2006), bestehend aus α MEM, mit einem Zusatz von 20 % FCS. In anderen Arbeiten (Fortier et al. 1998; Lennon et al. 2001; Hegewald et al. 2004) wurde beschrieben, dass die Zellen in einem Medium aus DMEM und 10 % FCS kultiviert wurden. Im Gegensatz zu Hegewald et al. (2004), die alle 24 Stunden das Medium wechselten,

wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellen nur alle 3-4 Tage mit frischem Medium versorgt.

In einer aufwendigen Testreihe konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die NSAID erst in therapeutisch deutlich überhöhten Konzentrationen negative Auswirkungen auf die Kinetik der eMSC haben. Für die Beurteilung der Kinetik wurden verschiedene Parameter ausgewertet. Die eMSC zeigten mit und ohne NSAID-Zusatz in therapeutischen Dosierungen das gleiche morphologische Bild. Die Generationsverdopplungszeit zeigte keine Unterschiede zwischen den unbehandelten Kontrollzellen und den NSAID-behandelten Zellen. Die Berechnung der Generationsverdopplungszeit bezog sich immer nur auf einen Passagevorgang, sie berücksichtigte die Kultivierungszeit in Stunden, die ausgesäte Zellzahl und die gewonnene Zellzahl. Sie gab aber keinen Gesamtüberblick über die sechs Passagen. Um eine Aussage über die sechs Passagen im Zusammenhang treffen zu können ist die Berechnung der kumulativen Gesamtzellzahl besser geeignet. Die kumulative Gesamtzellzahl berücksichtigte die Kultivierungsdauer in Tagen, die ausgesäte Zellzahl und die gewonnene Zellzahl. Aus den Zellzahlen wurde berechnet wie viele Zellen entstanden wären, wenn man alle Zellen weiter kultiviert hätte. Es ist eine sensiblere Methode, die die Zellzahlen aufaddiert. Der direkte Vergleich mit anderen, veröffentlichten Arbeiten ist schwierig (Baltes 2005; Kaspar et al. 2005; Chang et al. 2006; Chang et al. 2007; Kellinsalmi et al. 2007; Nakamura et al. 2007), weil die verwendeten Zellarten, Wirkstoffarten und -konzentrationen, Einwirkzeiten und untersuchten Parameter voneinander abweichen. Keine der Arbeiten untersuchte die Langzeiteinflüsse über 6 Wochen oder sogar länger. Die Kurzzeituntersuchungen auf Vitalität und Proliferation mit den photometrischen Assays WST-1- und BrdU- haben deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den behandelten Zellen, aber auch zwischen den einzelnen Konzentrationen untereinander gezeigt. Die behandelten Zellen zeigten bis zu einer gewissen Konzentration gleiche oder höhere Vitalitäts- und Proliferationswerte wie die Kontrollen, in den hohen Wirkstoffkonzentrationen fallen die Werte dann plötzlich deutlich unter die Kontrollwerte ab. Das spricht dafür, dass die Zellen die Effekte der NSAID, wie Hemmung der Proliferationsrate oder zytotoxische Einflüsse, bis zu einer bestimmten Konzentration kompensieren konnten. Aber wenn diese Grenze überschritten wurde, trat sofort ein deutlicher negativer Effekt ein. Die Werte bei der BrdU-Messung mußten vorsichtig betrachtet werden, da der Teilungsprozess der

Zelle nach dem Einbau des Thymidin- Analogons noch einem weiteren Kontrollschritt unterliegt. Das mußte bei der Auswertung berücksichtigt werden. In der Elektronenmikroskopie wurde die Auswirkung auf die Zellmorphologie exemplarisch untersucht, was bisher noch niemand untersucht und veröffentlicht hat.

Ergänzend wurde die Zellmigration unter hohen NSAID- Konzentrationen für einige Medikamente exemplarisch untersucht.

Die Zellmigration im Monolayer konnte mittels eines Vitalbeobachtungssystems dargestellt werden. Einzelzellen wanderten aktiv in der Schale, um in Zell- Zell- Interaktion zu treten. Allerdings ist eine Messung der zurückgelegten Strecke der Zellen sehr aufwendig, da die Zellen in alle Richtungen zu den benachbarten Zellen wanderten. Es wurde daher eine Methode gewählt, bei der sichergestellt war, dass die Zellen zielgerichtet migrierten. Um das zu erreichen, wurde die so genannte „wound- and- healing“ Methode angewendet (Gao et al. 2004). Dabei wurde ein Zellmonolayer bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert, anschließend wurde dieser konfluente Zellrasen getrennt. Diese Zusammenhangstrennung, bei der mit einer Pipettenspitze eine gerade Linie in den Zellrasen geritzt wurde, ermöglichte die Beobachtung einer zielgerichteten Migration der Zellen zur gegenüberliegenden Seite des zellfreien Areals. Als Kontrollen dienten nicht behandelte Zellen. Es wurden so lange die Konzentrationen von Celecoxib, Meloxicam und Phenylbutazon erhöht bis sich ein deutlicher Effekt zwischen der Kontrolle und dem verwendeten Medikament zeigte. Diese Methode erwies sich als gut auswertbar und vergleichbar, da nach definierten Zeitspannen der Abstand zwischen den beiden Zellfronten und die Anzahl der eingewanderten Zellen erfasst werden konnte. Die Zellen migrierten nicht konstant in eine Richtung, sie konnten auch wieder zurück wandern. Außerdem wurden über die Flächenbestimmung auch die Zellen berücksichtigt die sich hinter der Zellfront nachschoben. Eine reine Abstandsmessung zwischen den Zellfronten würde diese Sachen nicht berücksichtigen, eine prozentuale Flächenbestimmung dagegen schon.

Im nächsten Schritt sollten die Zellen hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials unter NSAID- Einfluss untersucht werden. Dazu sollten die osteogene-, adipogene- und chondrogene Differenzierungskapazität ermittelt werden (Pittenger et al. 1999; Sittinger, 2004; Tondreau et al. 2005; Vidal et al. 2006, 2007). Um eine Differenzierung einzuleiten, mußten dem Kultivierungsmedium bestimmte

Wachstums/ Differenzierungsfaktoren hinzugefügt werden. Diese waren spezifisch für die jeweilige Differenzierungsrichtung.

Die adipogene Differenzierung erbrachte keine auswertbaren Ergebnisse, weil die Kontrollzellen ohne Differenzierungsmedium im gleichen Maße Fettvakuolen aufwiesen wie die differenzierten Zellen. Die Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung ist sehr stark von der verwendeten Serum- Charge abhängig (Arnhold et al. 2007), in anderen Arbeiten differenzierten die Zellen mit Differenzierungsmedium überhaupt nicht in die adipogene Richtung (Koerner et al. 2006; Reed et al. 2008). Dagegen funktionierten die chondrogene und die osteogene Differenzierungen sehr gut. Sie wurden beide über histologische Färbungen ausgewertet. Die Färbeergebnisse wurden optisch analysiert, indem die unterschiedlichen Farben in Graustufen umgewandelt und anschließend densitometrisch bestimmt wurden. Die Graustufen mussten manuell festgesetzt werden, was eine leichte Ungenauigkeit mit sich brachte. Aber da alle Proben auf diese Weise ausgewertet wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass der Fehler in allen Gruppen nahezu gleich und folglich zu vernachlässigen war. Zusätzlich wurde noch eine molekularbiologische Untersuchung in Form einer RT- PCR mit den Primern für Aggrecan und Kollagen II für die chondrogene Differenzierung und einem Primer für Runx2 für die osteogene Differenzierung durchgeführt. Als House- Keeping- Gene diente β - Aktin. Die Untersuchungen zum Differenzierungspotential der eMSC wurden grundsätzlich unter den gleichen Kulturbedingungen, wie bereits bei den Standardkulturbedingungen besprochen, durchgeführt. Das Differenzierungspotential der eMSC kann anhand unterschiedlicher Methoden nachgewiesen werden. Die Standardbedingungen sind bei allen Differenzierungsansätzen dieselben, es handelt sich immer um eine Kultivierung in feuchter Atmosphäre bei 37°C und einem CO₂- Gehalt von 5%. Für die Differenzierungen wurden Konzentrationen der Wirkstoffe verwendet, die dem klinischen Einsatzbereich sehr nahe kommen und die in den Kinetiken ein gutes Wachstumsverhalten zeigten. So wurde für jede Substanz eine spezifische Konzentration ausgewählt.

Zur Induktion der osteogenen Differenzierung wurde das Protokoll von Tondreau et al. (2005) gewählt, da hier Erfahrungen von MSC der Ratte und des Menschen aus dieser Arbeitsgruppe vorlagen.

Im Gegensatz dazu benutzen Andrades et al. (1999), Mizuno et al. (2000), Walsh et al. (2003) für eine osteogene Differenzierung andere Differenzierungsmedien.

Diese Medien unterschieden sich sowohl im FCS-Gehalt 0,5% bis 10% als auch in der Zusammensetzung der Induktionsfaktoren, bFGF, rHOP, rHBMB (Andrades et al. 1999); IGF-I (Walsh et al. 2003); Vitamin D3 und Parathyroidhormon (PTH) (Sammons et al. 2004) Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat (Tondreau et al. 2005).

Bei allen Differenzierungsansätzen der osteogenen Richtung ist Dexamethason als Supplement zugesetzt worden.

Zum Nachweis der Osteogenese diente die Mineralisation der Matrix, für deren Nachweis eine „von Kossa“- Färbung genutzt wurde. Die „von Kossa“- Färbung zum Kalzifizierungsnachweis ist eine anerkannte Nachweismethode der osteogenen Differenzierung (Andrades et al. 1999; Mizuno et al. 2000; Walsh et al. 2003). Bei der „von Kossa“- Färbung treten schwarz gefärbte Cluster deutlich hervor. Das sind die Kalzifizierungsprodukte, die im Zuge der osteogenen Differenzierung entstehen und durch das Silbernitrat in der Färbung stark hervorgehoben werden. Desweiteren wurde die osteogene Differenzierung anhand einer RT- PCR nachgewiesen.

Für die chondrogene Differenzierungsrichtung wurden gut ausgebildete Zell- Zell-Kontakte benötigt. Um eine solch starke Zell- Zell- Interaktion zu erreichen wurden die Zellen im 3- D- Pellet kultiviert (Johnstone et al. 1998; Fortier et al. 1998; Hegewald et al. 2004; Tondreau et al. 2005). Die Zellen wurde nach den Bedingungen wie sie bei Tondreau et al. (2005) geschildert sind kultiviert bzw. differenziert. Im Gegensatz zu Worster et al. (2001), die die Zellen im Monolayer kultivierten und histologisch auswerteten, konnte in dieser Arbeit eine chondrogene Differenzierung im Pellet nicht nur im Rahmen der histologischen Färbung unter Verwendung von Alzianblau sondern zusätzlich mittels RT- PCR nachgewiesen werden. Die RT- PCR wurde ergänzend angewandt, um eventuell bestehende Unterschiede zwischen der Genexpression einerseits und der Proteinexpression andererseits, nachzuweisen.

5.3. Diskussion der Befunde

5.3.1. Vitalitäts- und Proliferationsassay

5.3.1.1 Vitalitätsassay

Es wurde ein Kurzzeitansatz über 24 Stunden durchgeführt, indem mit Hilfe eines WST-1- bzw. eines BrdU- Assays die Vitalitäts- und Proliferationsfähigkeit untersucht

wurde. Darüber hinaus wurden zusätzlich die Zellkinetiken in einem Langzeitversuch über sechs Passagen ermittelt. In vergleichbaren Studien wurden die Zellen ausschließlich für 24 Stunden mit NSAID inkubiert. Um die Ergebnisse aus dieser Untersuchung mit anderen Studien vergleichen zu können, wurde hier ebenfalls ein Kurzzeitansatz durchgeführt. Die unbehandelten Kontrollzellen wurden als Richtwert verwendet und gleich 1 gesetzt. Die eMSC reagierten in dem Vitalitätsassay alle in einem, bis zu den mittleren Konzentrationen ansteigenden und danach abfallenden Verlauf. Allerdings zeigte sich in Gegenwart von Phenylbutazon ein anderes Bild. Die Konzentrationen 0,1 μMol bei Celecoxib und Meloxicam, 50 μMol bei Flunixin und 10 μMol bei Indomethacin erreichten die höchsten Absorptionswerte. Die folgenden nächsthöheren Werte lagen mit ihren Absorptionswerten im Bereich des Kontrollniveaus. Ab einer bestimmten Konzentrationsgrenze zeigten die Zellen einen Vitalitätsnachteil im Vergleich zu der Kontrolle und einen deutlichen Abfall in der Verlaufskurve. Bei dem Wirkstoff Phenylbutazon zeigte keine Konzentration einen höheren Absorptionswert als die Kontrolle. Bei den Konzentrationen 10, 100 und 500 μMol konnten keine deutlichen Differenzen zu der Kontrolle ermittelt werden. Bei einer Konzentration von 50 μMol konnten nur 76 % des Kontrollwertes erreicht werden. Für diese Abweichung gibt es keine direkte Erklärung, weil sich Phenylbutazon in der Langzeitkontrolle nicht von den anderen Wirkstoffen, bis auf Flunixin, unterschied. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die NSAID in bestimmten Konzentrationsbereichen einen eher vitalitätsfördernden Effekt auf die eMSC ausüben. Wurde allerdings ein kritischer Konzentrationsbereich überschritten, so drehte sich dieser Effekt in das Gegenteil um. In der Arbeit von Chang et al. (2007) wurde ein generell hemmender Effekt von NSAID auf die MSC festgestellt, der auch schon bei therapeutischen Dosierungen zu erkennen war.

Der Zellvitalitäts- fördernde Effekt konnte in der hier vorliegenden Studie allerdings in der Langzeitkinetik über sechs Wochen nicht beobachtet werden.

5.3.1.2 Proliferationsassay

Der Proliferationsassay gab Auskunft darüber wie viel DNA produziert wurde. Die Kontrolle wurde wieder als Richtwert genutzt und gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse mit den Wirkstoffen Celecoxib und Meloxicam unterschieden sich deutlich von dem Vitalitätsassay. Bei Celecoxib verschob sich der Peak zu der Konzentration 1 μMol

und betrug fast 50 % mehr als bei der Kontrolle, bis zu der Konzentration 10 μMol zeigten sich deutlich höhere Werte wie unter Kontrollbedingungen. Sehr auffällig war, dass ab den Konzentrationen 100 und 200 μMol fast keine Proliferationsfähigkeit mehr messbar war.

In Gegenwart des Wirkstoffes Meloxicam zeigte sich eine konstante Erhöhung der Proliferationsfähigkeit um 50 % bis zu der Konzentration von 10 μMol . Bei den Konzentrationen von 100 und 200 μMol fiel die Proliferationsrate deutlich ab und zeigte nur eine sehr geringe Aktivität.

Die Proliferationsaktivität steigerte sich unter der Zugabe von Flunixin geringer als bei den anderen Substanzen. Die Konzentration 50 μMol überragte die Kontrolle um 30 % und bildete hier einen Peak. Die Konzentrationen 10 und 100 μMol unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle, 500 μMol sank in seinem Wert dagegen wieder deutlich ab.

Indomethacin bewirkte deutlich erhöhte Proliferationswerte in den Konzentrationen 10 und 100 μMol , bis zu 50 % mehr als in den Kontrollgruppen. Die Konzentration 50 μMol blieb auf Kontrollniveau und 500 μMol zeigte wieder einen sehr deutlichen Verlust der Proliferationsfähigkeit.

Phenylbutazon erhöhte in der Konzentration 10 μMol die Proliferationsaktivität um 50%, die Konzentrationen 50 und 100 μMol wiesen auch höhere Werte wie die Kontrolle auf. Ebenso zeigte sich eine deutliche Aktivitätsabnahme in den hohen Konzentrationen 500 und 1000 μMol .

Diese teilweise sehr ausgeprägten Zunahmen müssten sich in der Langzeitkinetik durch deutlich erhöhte Zellzahlen darstellen. Es zeigten sich aber keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Antiphlogistika in den therapeutisch relevanten Dosierungen. Das Ergebnis des Proliferationsverhaltens gibt nicht die absolute Zahl der Zellteilungen wieder. Bei der Zelle wird, während der S- Phase, Bromodesoxyuridin anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. So ist es zum einen möglich, dass die Zellen sich, trotz DNA- Duplikation, doch nicht so häufig geteilt haben. Eine andere Erklärung wäre eine Vielkernigkeit, die sich aber lichtmikroskopisch nicht bestätigen ließ. Eine weitere Möglichkeit wäre eine erhöhte Apoptoserate der eMSC unter NSAID- Einfluss. Es konnten allerdings bei den Zellzählungen mittels der Toluidin- Blaufärbung keine Zunahme nicht-vitaler Zellen ermittelt werden, so dass auch eine erhöhte Apoptoserate als eher unwahrscheinlich gilt. In vergleichbaren Arbeiten zeigte nur Baltes (2005) eine erhöhte Proliferation an

humanen Chondrozyten unter Ibuprofeneinfluss, alle anderen Autoren zeigten eine verminderte Proliferationsrate, auch in therapeutisch relevanten Dosierungen und bei verschiedenen Zellarten (Ho et al. 1999; Evans et al. 2003; Chang et al. 2005; Wang et al. 2006; Chang et al. 2007; Nakamura et al. 2007). Eine Proliferationssteigerung, wie sie Baltes (2005) bei den humanen Chondrozyten mit Ibuprofen beobachtete, kann in einem gewissen Maße therapeutisch vorteilhaft sein, um so den Anteil der therapeutisch wirksamen Zellen vor Ort noch anzureichern. Es kann dabei allerdings eine Entartung der Zellen nicht ausgeschlossen werden, was für den Heilungserfolg mehr als kontraproduktiv wäre.

Eine erhöhte Apoptoserate, bedingt durch zytotoxische Effekte, entdeckten Chang et al. (2005) bei Osteoblastenkulturen von Ratten nach NSAID- Zugaben, Nakamura et al. (2007) konnten ein ähnliches Phänomen bei humanen Chondrozyten unter NSAID- Zugaben beobachten.

5.3.2. Langzeituntersuchung von NSAID auf die Kinetik von eMSC

Es wurde eine Kinetikstudie mit NSAID- Zusatz über einen Zeitrahmen von sechs Passagen ausgewählt, weil die eMSC unter Praxisbedingungen in den Sehnendefekt injiziert werden und idealerweise dort mehrere Wochen überleben sollen. In der Regel sind die Pferde, die für eine Stammzeltherapie vorgesehen sind, antiphlogistisch vorbehandelt und werden nach Bedarf therapiebegleitend antiphlogistisch behandelt (Smith et al. 2005, 2008). Das bedeutet, dass die Stammzellen in ein Empfängergewebe injiziert werden, in dem schon eine NSAID-Konzentration besteht. Aus diesem Grund wurden in den Versuchen die eMSC direkt beim Aussäen mit NSAID versetzt. Die Zellen wurden mit 500 Zellen/ cm² ausgesät. Im Vergleich zu den MSC anderer Spezies ist das eine verhältnismäßig geringe Menge, die darauf schließen lässt, dass die Zellen in der ihnen gebotenen Umgebung eine deutlich höhere Proliferation zeigen. In diversen Arbeiten wird berichtet, dass MSC mit einer Dichte von 1000- 6000 Zellen / cm² ausgesät werden (Hegewald et al. 2004; Klinz et al. 2005; Arnhold et al. 2006). Diese hohen Proliferationsraten wurden genutzt, um durch NSAID- Zusatz bedingte Veränderungen, z.B. bei Generationsverdopplungszeiten, deutlich aufzuzeigen. Die kumulativen Zellzahlen zeigten für die Wirkstoffe Celecoxib, Meloxicam, Indomethacin und Phenylbutazon keine Unterschiede zwischen den behandelten Zellen und den unbehandelten Kontrollzellen. Für den Wirkstoff Flunixin ließ sich

allerdings eine signifikant langsamere Zellproliferationsrate als für die Kontrollzellen beobachten. Die behandelten Zellen zeigten ab dem 20. Kultivierungstag, zwischen dritter und vierter Passage, eine konstant geringere Zellzahl, die sich bei fortschreitender Kultivierungsdauer weiter reduziert hat. Die Konzentrationen 10 und 50 μMol Flunixin erreichten noch etwas höhere kumulative Gesamtzellzahlen wie die Konzentration 500 μMol Flunixin. In der Literatur gibt es unterschiedliche Ergebnisse von NSAID- Zugaben auf verschiedene Zellen. Die Untersuchungen unterscheiden sich in den ausgewählten Zellarten, Wirkstoffen, Wirkstoffkonzentrationen und den Studiendurchführungen, was einen direkten Vergleich schwierig macht. Alle Arbeiten befassen sich nur mit kurzfristigen Effekten (24- 48 Stunden) oder es wurde das Zellwachstum über maximal zwei Passagen verfolgt. Es gibt keine vergleichbare Untersuchung, in der das Zellwachstum unter NSAID-Einfluss, wie in der hier vorgelegten Untersuchung, über einen Zeitraum äquivalent von 6 Passagen (ca. 6 Wochen) untersucht wurden. Baltés (2005) fand in ihrer Promotionsarbeit heraus, dass der Wirkstoff Ibuprofen bei humanen Chondrozyten einen Proliferationsanstieg verursacht. Die Zellen wurden über 13 Tage mit Ibuprofen kultiviert. Chang et al. (2007) versetzten humane und murine MSC mit und fanden heraus, dass die Proliferationsraten zwar zurückgingen, es sich aber keine cytotoxischen oder morphologischen Veränderungen zeigten. Die verminderte Proliferation konnte auch durch die Zugabe von Prostaglandin E1, E2 und F2 α nicht wieder erhöht werden. Das spricht dafür, dass der Wirkmechanismus der NSAID auf die MSC nicht Prostaglandin- abhängig ist. Bei den eMSC zeigte sich keine verminderte Proliferation nach NSAID- Zugabe. Es trat weder ein Wachstumseinbruch im Verlauf der unterschiedlichen Passagen noch in den hohen Konzentrationen der NSAID ein. Nur Flunixin bildete hier eine Ausnahme. Flunixin unterscheidet sich in seinem Wirkmechanismus aber nicht von den anderen nicht-selektiven NSAID, es ist ein starker Cyclooxygenase- I- Hemmer. Allerdings wurde Flunixin in einer flüssigen Form angewendet in der neben dem Wirkstoff Flunixin-Meglumin noch Phenol, Hydroxymethanolsulfinsäure- Natriumsalz und Propylenglykol enthalten ist. Es ist möglich, dass diese zusätzlichen Inhaltstoffe sich schädlich auf die Zellen auswirkten. Meloxicam wurde ebenfalls in einer flüssigen Formulierung angewendet, allerdings zeigten die eMSC unter diesen Bedingungen keine Proliferationsverluste. Die flüssige Formulierung beinhaltet neben dem

Wirkstoff Meloxicam nur noch Ethanol, das in der verwendeten Verdünnung offensichtlich keine schädlichen Auswirkungen auf die Zellen zeigte.

Da die Kultivierung von eMSC im Allgemeinen unkomplizierter abläuft und sich die Zellen als wesentlich robuster darstellen als humane oder murine MSC (Arnhold et al. 2007), kann davon ausgegangen werden, dass die schädigenden Einflüsse durch die NSAID ebenfalls geringer ausfallen als bei MSC anderer Spezies.

5.3.3. Ultrastrukturelle Untersuchung von eMSC mit Phenylbutazon

Im Elektronenmikroskop waren keine Unterschiede zwischen unbehandelten Kontrollzellen und den mit Phenylbutazon behandelten Zellen feststellbar. Ergänzend wurden Zellen hinzugenommen, die ohne den DMSO- Zusatz kultiviert wurden. Die Zellmembranen und Zellorganellen stellten sich in allen untersuchten Proben vital und funktionsfähig dar. So konnte durch die ultrastrukturelle Darstellung das Ergebnis aus der Langzeitkinetik bestätigt werden, dass die Zellen durch die Zugabe von NSAID in ihrer Vitalität und Proliferation nicht beeinträchtigt wurden. In der Literatur gibt es keinerlei vergleichbare elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zellen, die unter NSAID- Behandlung standen.

5.3.4. Migrationsfähigkeit der eMSC unter NSAID- Einfluss

Entscheidend für eine gute Gewebsheilung ist, dass die Zellen in dem Defekt, in den sie eingesetzt werden, nicht nur adhaerent werden und proliferieren, sondern auch den Defektbereich komplett besiedeln. Dazu ist die Zellmigration eine wichtige Voraussetzung. Die Migrationsfähigkeit von MSC wurde bereits an humanen MSC (Schmidt et al., 2005) sowie an equinen MSC nachgewiesen (Arnhold et al. 2007). Da der Aspekt der Migration in der Therapie nicht zu vernachlässigen ist, wurde das Migrationsverhalten unter dem Einfluß von verschiedenen NSAID untersucht. Der Versuchsaufbau entspricht in etwa dem, den Gao et al. (2004) in ihrer Arbeit verwendeten. So wurde durch einen konfluenten Zellrasen der eMSC ein Scratch gezogen und die Substanzen Celecoxib, Meloxicam und Phenylbutazon in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt.

Meloxicam wurde verwendet, weil es als selektiver Cyclooxygenase 2- Blocker häufig in der Veterinär- und der Humanmedizin eingesetzt wird. Desweiteren wurde noch Phenylbutazon untersucht, weil es als klassischer, nicht- selektiver Wirkstoff in der

Pferdeorthopädie schon sehr lange verwendet wird. Für die Vergleichsmöglichkeiten mit ähnlichen Arbeiten in der Literatur wurde Celecoxib, ein selektiver Cyclooxygenase- 2- Hemmer, ein Wirkstoff der ausschließlich in der Humanmedizin verwendet wurde, in die Untersuchung mit aufgenommen.

Der Scratch wurde über 24 Stunden vitalmikroskopisch analysiert. In dieser Zeit konnte beobachtet werden, dass die Zellen aktiv migrieren, bis die Zusammenhangstrennung wieder vollständig verschlossen ist. Da es sich hier nicht um ein Nachschieben der Zellen aus der Peripherie der Schale handelt, wird dadurch verdeutlicht, dass einzelne Zellen den Scratch vollkommen eigenständig durchwandern. Hierbei wird auch noch einmal sehr stark die Notwendigkeit einer Zell- Zell- Interaktion deutlich. Die Einzelzelle sendet suchende Fortsätze bzw. Pseudopodien aus, die versuchen schnellst möglich Zell- Zell- Kontakte wiederherzustellen. Die NSAID wurden in therapeutischen und in deutlich höheren Konzentrationen zu den eMSC hinzu gegeben. In den therapeutischen Dosierungen stellte sich sehr deutlich dar, dass die Zellen die NSAID gut vertragen und keinen Schaden an ihrer Migrationsfähigkeit induzieren. Im Rahmen der Stammzelltherapie zur Behandlung eines Sehnendefektes ist es essentiell wichtig, dass die Zellen eine uneingeschränkte Vitalität-, Proliferations- und Migrationsfähigkeit aufweisen. Im Gegensatz zu der Proliferationshemmung von humanen und murinen MSC durch NSAID- Zugaben (Chang et al. 2005) zeigten sich die equinen MSC unempfindlich gegenüber den NSAID. Sie verhielten sich in den therapeutischen Dosierungen genauso wie die Kontrollgruppen. Das war analog zu den Ergebnissen der Langzeitkinetik.

Die Konzentrationen der NSAID wurden deutlich erhöht, um eine eindeutige Reaktion im Vergleich mit der Kontrolle zu erhalten.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Dosierungen um ein vielfaches erhöht werden mussten, gegenüber physiologischerweise erreichbaren Konzentrationen, bis sich deutliche negative Auswirkungen zeigten.

So zeigten Celecoxib und Meloxicam ab einer Dosierung mit 50 μ Mol und Phenylbutazon ab 750 μ Mol einen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Die eMSC wanderten langsamer und weniger zahlreich in den Scratch ein.

5.3.5. Untersuchung der Pluripotenz unter Zugabe von NSAID

Die Pluripotenz der eMSC unter NSAID- Zugabe wurde anhand ihres adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierungspotentials ermittelt. Die genutzten Isolierungs-, Kultivierungs- und Differenzierungstechniken bestehen aus einer Kombination verschiedener bereits angewandter und modifizierter Techniken (Martin et al. 2002; Ringe et al. 2002; Bosnakovski et al. 2005, Vidal 2006, 2007). Die bereits in der Arbeitsgruppe erfolgreich angewandten Methoden, der gerichteten Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen in die verschiedenen Differenzierungsrichtungen Fett-, Knorpel- und Knochenzellen konnten ebenfalls erfolgreich für die Pferdezellen angewendet werden.

Die adipogene Differenzierung gestaltete sich schwierig, weil die Zellen bereits im undifferenzierten Stadium eine Ansammlung von Vakuolen aufwiesen, die sich zahlen- und größenmäßig auch nach Anwendung des adipogenen Differenzierungsmediums nicht veränderten. Arnhold et al (2007) zeigten, dass die adipogene Differenzierung von eMSC sehr stark von der verwendeten Serumcharge abhängig ist. Vidal et al. (2006) und Giovanni et al. (2008) benutzten für die adipogene Differenzierung von eMSC Kaninchenserum und erzielten damit gute Ergebnisse.

Die hier verwendete Serumcharge war zwar optimal für das Proliferationsverhalten, für die osteogenen und chondrogene Differenzierung der Zellen, aber nicht für die adipogene Differenzierung.

Der Erfolg der osteogenen Differenzierung wurde durch zwei Nachweismethoden überprüft. Diese bestand zum einen aus einem histologischen Nachweis unter Verwendung der von Kossa- Färbung (Böck, 1989) und zum anderen der Nachweis des osteogenen Primers Runx2 mittels der RT-PCR (Chang et al. 2007). Ein morphologisches Merkmal der osteogenen Differenzierung das bei anderen Spezies ebenfalls beobachtet werden konnte, ist, dass sie ihr fibroblastenähnliches Aussehen verlieren und ein kubisches Aussehen erlangen. Desweiteren bildeten sie Zellcluster aus, die sich mit Hilfe der von Kossa- Färbung deutlich anfärbten und an die Morphologie von Knochenbälkchen erinnerten Diese Eigenschaften der osteogen differenzierten Zellen konnten bei MSC der Ratten, von Rindern und des Menschen (Bruder et al. 1997; Mizuno et al. 2001; Bosnakovski et al. 2005), aber nicht bei den MSC von Katzen und Schafen beobachtet werden (Kon et al. 2000; Martin et al. 2002).

In der RT-PCR wurde als Hinweis für die osteogene Differenzierung die Expression des Gens Runx2 (oder auch core binding factor a1 (cbfa1) genannt) nachgewiesen (Chang et al. 2007). β - Actin wurde als House-keeping- Gene verwendet, da es in undifferenzierten und differenzierten Zellen exprimiert wird. Die Zugaben von NSAID haben bei der osteogenen Differenzierung zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt. Die Positivkontrolle mit Differenzierungsmedium und ohne NSAID- Zusatz wies die meisten und größten Mineralisationsherde auf. Dagegen waren die Mineralisationsherde bei den Proben mit NSAID- Zugaben zum Teil deutlich reduziert. Es gibt viele Studien in denen belegt ist, dass die NSAID einen negativen Effekt auf die Knochenheilung- und -formung in vivo haben (Engesaeter et al. 1992; Altman et al. 1995; Harder et al. 2003). Allerdings gibt es aber auch Arbeiten die belegen, dass es in der frühen Heilungsphase zu negativen Beeinträchtigungen durch NSAID kommt, die im weiteren Heilungsverlauf aber nicht weiter beobachtet werden konnten und nach sechs Wochen gab es keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen mit Frakturen, die unter NSAID- Zugabe verheilt sind und Gruppen mit Frakturen, die mit einem Placebo behandelt wurden (Simmon et al. 2002; Brown et al. 2004; Radi et al. 2005). Bei der Applikation von NSAID auf Osteoblastenkulturen wurden auch unterschiedliche Ergebnisse publiziert. Chang et al. (2007) versetzten humane und murine MSC mit NSAID und einem osteogenen Induktionsmedium. Sie fanden nur in der frühen Phase der osteogenen Differenzierung Abweichungen von den Kontrollzellen, im weiteren Verlauf waren keine Unterschiede mehr detektierbar. Chang et al. (2005) zeigten bei der Anwendung von NSAID auf Osteoblasten, dass die Zellen einen Proliferationseinbruch erlitten und degenerierten. Niki et al. (2007) versetzten Osteoblasten von Mäusen mit Celecoxib und beobachtete eine Wachstumshemmung. Sehr auffällig ist, dass Celecoxib und Meloxicam die wenigsten Anteile an Mineralisationsherden aufwiesen. In Vergleichsstudien zwischen klassischen Cox- Inhibitoren und Cox- 2- selektiven NSAID konnte nicht eindeutig festgestellt werden, ob es Unterschiede in der Wirkung der beiden Gruppen gibt (Radi et al. 2005).

In einer RT-PCR wurde der qualitative Nachweis erbracht, dass in allen Proben mit NSAID- Zusatz das Gen Runx2 exprimiert wurde. Chang et al. (2007) zeigte bereits auf, dass die NSAID keinen Einfluss auf die Expressierung von Runx2 in osteogen differenzierten MSC nehmen.

Also lag die Ursache der verminderten Osteogenese nicht an einer Beeinflussung der genetischen Codierung, sondern vermutlich an einer negativen Beeinflussung der differenzierten Zellen bzw. an einer Störung der Proteinexpression.

Der Nachweis einer chondrogenen Differenzierung konnte mit Hilfe zweier Methoden nachgewiesen werden. Zum einen wird die Differenzierung in dieser Arbeit sowohl histologisch (Worster et al. 2001) als auch mittels der RT-PCR (Bosnakovski et al. 2005) überprüft. Aggrecan ist als Proteoglykan ein Bestandteil der extrazellulären Knorpelmatrix und dient somit als ein spezifischer Knorpelmarker. Kollagen II gilt ebenfalls als spezifischer Knorpelmarker, weil es einen wesentlichen Bestandteil der Knorpelmatrix darstellt (90%) (Velikonja et al. 2001), welches sich mit anderen Kollagenen vernetzt, wie z.B. mit Kollagen IX und Kollagen XI. Der hyaline Knorpel besteht zu 90 % aus Kollagen II. Die RT-PCR wurde durchgeführt, um das qualitative Vorhandensein der entsprechenden Primer zu belegen. Wie bereits bei anderen Spezies demonstriert werden konnte, können die eMSC ebenfalls zu einer chondrogenen Differenzierung induziert werden. Dazu müssen die Zellen jedoch als 3- D- Pellet kultiviert werden. In der histologischen Auswertung, mit Alzianblau, werden die sauren Mukopolysaccharide der chondrogen differenzierten Zellen blau angefärbt. Ebenso ist der positive Nachweis der Transkripte für die Collagen II- und Aggrecan- Expression in der RT-PCR ein deutlicher Nachweis für die chondrogene Differenzierungskapazität (Bosnakovski et al. 2005). Somit konnte der Beweis einer chondrogenen Differenzierung eindeutig dargestellt werden. β - Actin kommt in beiden Populationen vor und dient der Überprüfung der eingesetzten Proben.

Die Negativkontrolle reagierte auch positiv auf die Alzianblaufärbung, was dafür spricht, dass alleine die Kultivierungsform im 3- D- Pellet zu einer gewissen chondrogenen Differenzierung führt. Zellen die als Monolayer kultiviert wurden, reagierten negativ auf die Alzianblaufärbung. Allerdings zeigte die Positivkontrolle (Zugabe von Differenzierungsmedium) einen deutlich größeren Flächenanteil an blaugefärbten Arealen als die Negativkontrolle (keine Differenzierungsfaktoren im Medium). Es gab allerdings keinen Unterschied bei der Ermittlung der Flächenprozentage zwischen den NSAID- behandelten, differenzierten Zellen und der Positivkontrolle. Chang et al. (2005) beobachteten negative Auswirkungen von NSAID auf Chondrocyten, die bei klassischen NSAID ausgeprägter waren als bei selektiven Cox- 2- Hemmern. Allerdings erfolgte die Kultivierung bei Chang et al.

(2005) nur für 24 Stunden und nicht für drei Wochen. Eventuell handelt es sich nur um einen kurzzeitigen Effekt, der sich wieder ausgleicht, was sich ähnlich bei Versuchen zur osteogenen Differenzierung dargestellt hat (Chang et al. 2007).

Die Gene Collagen II und Aggrecan wurden in der Negativ-, in der Positivkontrolle und in allen fünf Versuchsgruppen detektiert. Das Vorhandensein in der Negativkontrolle ist deckungsgleich mit einer, wenn auch schwächeren, positiven Alzianblaufärbung. Der molekularbiologische Nachweis für Aggrecan und Kollagen II erfolgte allerdings nur qualitativ. Anhand der Intensität der Banden könnte allerdings spekuliert werden, dass die Expressionsrate in der Negativkontrolle erheblich geringer war, als in den anderen Proben.

In der elektronenmikroskopischen Auswertung dagegen ließen sich zwischen der Negativkontrolle und der Positivkontrolle deutliche Unterschiede feststellen. In der histologischen Auswertung äußerte sich das in einer geringer ausgeprägten Blaufärbung, als bei den Zellen, die chondrogen stimuliert wurden. Es scheinen sich saure Mukopolysaccharide zu bilden, die mit Alzianblau anfärbbar sind. Aber in den elektronenmikroskopischen Bildern lassen sich keine ausgeprägten Kollagenfasern und keine deutliche Extrazellulärmatrix detektieren. Die eMSC benötigen das chondrogene Induktionsmedium, um Kollagenfasern und Extrazellulärmatrix in großer Menge zu bilden. Es gibt in der Literatur keine Arbeiten die sich mit den chondrogen differenzierten MSC, unabhängig von welcher Spezies, in der Elektronenmikroskopie befassen.

Zwischen der Positivkontrolle und den Medikamentenansätzen mit Celecoxib, Meloxicam, Flunixin und Phenylbutazon ließen sich keine deutlichen Unterschiede feststellen, was dem Ergebnis der Alzianblaufärbung und dem molekularbiologischen Nachweis entspricht. Nur die Indomethacin-behandelten Zellen bildeten eine Ausnahme. Die Zellmembranen und die Zellorganellen waren nur noch als Reste zu identifizieren oder fehlten vollständig. Es konnten auch keine kollagenen Fasern detektiert werden. Indomethacin wurde als einziger Wirkstoff in einer Konzentration von 50 μMol angewendet, was der physiologisch erreichten Dosis beim Menschen entspricht (Oberbauer et al. 1993), die anderen vier Medikamente wurden mit 1 μMol für Celecoxib und Meloxicam, sowie mit 10 μMol für Flunixin und Phenylbutazon deutlich geringer dosiert (Tobin et al. 1986; Toutain et al. 1994; Jolly et al. 1995; Toutain et al. 2004). Daher könnte der schlechte ultrastrukturelle Erhalt der

chondrogen differenzierten Zellen auch mit der hohen Indomethacin- Dosierung zusammenhängen.

Für die vier anderen Substanzen kann man davon ausgehen, dass von den NSAID keine negativen Effekte auf die chondrogen differenzierten Zellen ausgehen.

Der Nachweis der Vitalität, Proliferation und Pluripotenz dieser Zellen unter Einfluss von NSAID ist von großer Bedeutung bei der späteren therapeutischen Implantation der Zellen in das Empfängergewebe. Der therapeutische Einsatz von eMSC wird bei Sehnendefekten bereits in der Praxis durchgeführt (Smith 2003, 2005; Guest, 2008). Die Pferde sind mit NSAID vorbehandelt und werden nach Implantation der eMSC in den Defekt bei Bedarf antiphlogistisch abgedeckt. Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die eMSC von den NSAID nicht beeinflusst werden. Die Substanzen Meloxicam und Phenylbutazon können für die begleitende Therapie empfohlen werden. Bei Flunixin wäre zu klären inwieweit die im Medikament Finadyne® enthaltenen Zusatzstoffe den Zellen schaden.

5.4. Ausblick

Nach erfolgreicher Kultivierung und Differenzierung in Fett-, Knochen- und Knorpelzellen sollte der nächste Schritt die Differenzierung der eMSC zu Sehnenzellen sein, da die eMSC derzeit hauptsächlich zur Regeneration von Sehngewebe eingesetzt werden. Hierfür gibt es bereits Protokolle, die diese Differenzierungsrichtung am Kaninchen belegen (Nirmalanandhan et al. 2007; Butler et al. 2008). Ein weiterer wichtiger Schritt in diese Richtung ist das Austesten der Wirkung von NSAID auf diese tenogen differenzierten eMSC. Haben die NSAID eventuell Auswirkungen auf die tenogene Differenzierung und wenn ja, welche Auswirkungen sind das? Sollte es Auswirkungen geben, dann muss das NSAID entsprechend für die Stammzelltherapie ausgewählt werden.

Desweiteren ist eine klinische Studie in Planung, bei der auch die Trägermaterialien in vivo getestet werden sollen. Es muss Aufschluss darüber erbracht werden, welches Trägermaterial für welche Anwendung in Frage kommt und wie diese einfach und kostengünstig, und vor allem verträglich für den Patienten, anzuwenden sind.

6. Zusammenfassung

Osteoarthritiden und Sehnenverletzungen sind häufige Gründe für eine erhöhte Morbidität und verminderte Leistungsfähigkeit bei Pferden und Kleintieren.

Aufgrund der langen Regenerationszeit, die das Gewebe für die Eigenregeneration benötigt, ist eine Auswahl an Therapiemöglichkeiten mit kürzerer Regenerationszeit und somit mit schnellerer Belastbarkeit der Strukturen unabdingbar.

Zu den mittlerweile gebräuchlichen Therapieansätzen, die sich von der konservativen Therapie bis hin zum Einsatz von Ersatzmaterialien beläuft, ist es eine interessante und vorteilhafte Alternative körpereigene Zellen aufzuarbeiten und diese in Form eines Transplantates in den Defekt einzubringen. Zu den möglichen, körpereigenen Zellen, gehören auch pluripotente MSC aus dem Knochenmark.

Die Gewinnung der eMSC ist, unter Praxisbedingungen, sowohl beim liegenden als auch beim stehenden Pferd durchführbar.

In einigen Praxen ist die Verwendung von autologen eMSC zur Therapie eines Sehnendefektes bereits standardmäßig im Angebotskatalog enthalten.

Im Rahmen dieser Therapie ist es üblich, die Pferde mit NSAID vorzubehandeln. Um herauszufinden, welche Folgen die Substanzen für die eMSC haben, wurden diese mit verschiedenen NSAID's kultiviert und die Effekte analysiert.

Nach Isolation der eMSC aus dem Knochenmark wurden die Zellen in einer Zellkultur aufgereinigt und expandiert. Mit Erreichen einer ausreichend großen Zellzahl wurden die Inkubationsversuche mit den NSAID durchgeführt. Die Zellen sollen nach ihrer Reimplantation noch begrenzt proliferieren und sich differenzieren können. Deshalb wurde, in Form einer Langzeitkinetik, untersucht, welchen Einfluss längerfristige NSAID- Zugaben auf die Vitalität und Proliferation der eMSC haben. Innerhalb von sechs Passagen konnten, bis auf eine Ausnahme, keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden. Ausschließlich eine Flunixinbehandlung verursachte einen Proliferationsrückgang und eine Reduktion der Zellzahlen. In Kurzeitkultivierungen von 24 Stunden wurde die Vitalität und Proliferation mit Hilfe von photometrischen Assays für die Zellvitalität (WST-1) und die Proliferation (BrdU) untersucht. Bei NSAID- Zugaben in therapeutisch relevanten Konzentrationen zeigten sich Steigerungen bis zu 50 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Es konnten allerdings keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Wirkstoffen festgestellt werden. Durch die Beurteilung des

Migrationsverhaltens wurden die Wirkstoffkonzentrationen ermittelt, die die Zellmigration deutlich hemmen. Es konnten, in den höheren Konzentrationen, eindeutig schädliche Einflüsse registriert werden. Elektronenmikroskopisch wurde beispielhaft die Morphologie von eMSC untersucht, die in Gegenwart von Phenylbutazon in unterschiedlichen Konzentrationen kultiviert wurden.

Es konnten auch ultrastrukturell keine morphologischen Schäden aufgezeigt werden. Bei der Beurteilung des Differenzierungspotentials unter NSAID- Einfluss war die Fettdifferenzierung nicht auswertbar, weil die undifferenzierten Zellen die gleiche Menge an Fettvakuolen aufwiesen wie die differenzierten Zellen. Die chondrogene und die osteogene Differenzierung zeigten unterschiedliche Ergebnisse unter NSAID- Zugaben. Die chondrogene Differenzierung unter NSAID- Einfluss unterschied sich nicht von der unbehandelten Positivkontrolle mit chondrogenem Induktionsmedium. In der osteogenen Differenzierung zeigten sich deutliche Alterationen zwischen den unbehandelten Positivkontrollen und den behandelten NSAID- Zellen, wobei es noch Unterschiede zwischen den einzelnen Wirkstoffgruppen gab. Die Zellen, die mit Cox- 2- selektiven Wirkstoffen behandelt wurden, zeigten das schlechteste Differenzierungsergebnis. Die klassischen, unselektiven Wirkstoffe zeigten etwas mehr differenzierte Bereiche und die besten Ergebnisse konnten in den unbehandelten Kontrollzellen erzielt werden. In der RT-PCR wurde die Primer Runx2, für die osteogene Differenzierung, und die Primer Aggrecan, sowie Collagen II, für die chondrogene Differenzierung, detektiert. In einem weiteren Schritt wurden die behandelten und unbehandelten Pellets der chondrogenen Differenzierung elektronenmikroskopisch untersucht. Die Substanzen unterschieden sich im Zellerhalt und der Bildung von kollagenen Fasern nicht von der unbehandelten Positivkontrolle mit dem chondrogenen Induktionsmedium, bis auf die Indomethacin- behandelte Probe. Die chondrogen differenzierten Zellen unter Indomethacinzugaben, zeigten ultrastrukturell nur noch Zellmembran- und Zellorganellreste, sowie fehlende kollagene Fasern.

7. Summary

Osteoarthritis and tendon lesions are frequent reasons for increased morbidity and reduced efficiency of horses and small animals. Because of the long regeneration time of the tissue an assortment of therapy options leading to shorter regeneration times and therefore a faster capacitance of the structure are indispensable.

For current therapy approaches leading from the conservative therapy to the application of alternative options it would be an interesting and advantageous alternative to expand autologous cells and to transplant them into the lesion site. Pluripotent MSC from the bone marrow belong to the relevant cells for autologous implantation strategies.

The preparation of MSC is possible from the lying or standing horse under veterinary practice conditions. In some veterinary practices the application of autologous MSC for the therapy of tendon lesions is already widely used as a standard treatment.

As one part of the therapy, affected horses commonly receive a pre-treatment with non steroidal anti inflammatory drugs (NSAID). In order to find out whether these substances have an effect on MSCs, cells were cultivated in the presence of different NSAID in order to analyse any negative side effects.

After isolation of the eMSC from the bone marrow the cells were purified and expanded in the cell culture. Because the cells should still be able to proliferate and differentiate at a moderate level after reimplantation into a recipient tissue for regeneration, the influence of a long-term NSAID application using different concentrations of the compounds was studied in regard to its effect on vitality and proliferation. With minor exceptions no difference between treated and untreated cells could be observed over six passages. However, Flunixin treatment lead to a significant decrease in cell proliferation and total cell number.

Vitality and proliferation were measured by short-term cultivation (24 hours) using the WST-1 and BrdU photometric assays. With the addition of therapeutically relevant concentrations of NSAID an increase in vitality and proliferation of about 50% was observed in comparison with untreated controls. There were no differences between the single additives.

The concentration of the additives which clearly blocked cell migration were estimated using a migration assay. Obvious damaging effects were detected only at higher, unphysiological, NSAID concentrations.

Electron-microscopical studies were carried out in order to look at the morphology of eMSC that were grown in the presence of Phenylbutazon at different concentrations. The results indicated that, using this compound, which is one major NSAID in equine medicine, also no morphological damages were apparent ultrastructurally.

Looking for effects on the cellular differentiation capacity for the chondrogenic and osteogenic cell differentiation the addition of NSAID showed different results.

The chondrogenic differentiation under NSAID influence showed no difference to the untreated positive control with the chondrogenic induction medium. The osteogenic differentiation clearly showed differences between the untreated positive controls and the NSAID-treated cells, with further differences between the single additive groups. Those cells that were treated with Cox-2 selective additives showed the worst differentiation result. The classical unselective additives showed more differentiated regions within the culture dish. The best results were achieved by the untreated controls. The estimation of the differentiation potential during NSAID treatment was not possible for the fat differentiation, as the undifferentiated cells showed the same amount of fat vacuoles like the differentiated cells.

Gene expression studies were carried out with RT-PCR for runx2 as osteogenic and aggrecan and collagen I as condrogenic markers. Furthermore, the treated and untreated cell pellets of the chondrogenic differentiation were investigated electron microscopically. In consideration of the cell structure and the formation of collagenous fibres the treated samples showed no difference to the untreated positive control which were grown in chondrogenic induction medium. However, the addition of Indomethacine resulted in an obvious damage of cells. Cells differentiated along the chondrogenic lineage ultrastructurally revealed lesions of the cell membrane and loss of organelles, as well as a lack of collagenous fibres.

In conclusion, this study shows that the NSAID have no obvious harmful effects on cell viability and proliferation of eMSC. However, for certain desired directions of differentiation the choice of the appropriate NSAID may have to be critically questioned. All together the presented data, however indicate, that NSAID are suitable for pre-treatment of horses with tendon lesions prior to reimplantation of autologous MSC.

Referenzliste

1. Allen, H L; Wase, A; Bear, W T: Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta orthopaedica Scandinavica* 51, 4 (1981): 595–600.
2. Altman, R D; Latta, L L; Keer, R; Renfree, K; Hornicek, F J; Banovac, K: Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats. *Journal of orthopaedic trauma* 9, 5 (1996): 392–400.
3. Andrades, J A; Han, B; Becerra, J; Sorgente, N; Hall, FL; Nimni, ME: A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Experimental cell research* 250, 2 (1999): 485–498
4. Arnhold, S; Goletz, I; Klein, H; Stumpf, G; Beluche, L; Rohde, C: Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research* 68, 10 (2007): 1095–1105.
5. Arnhold, S; Klein, H; Klinz, FJ; Absenger, Y; Schmidt, A; Schinköthe, T: Human bone marrow stroma cells display certain neural characteristics and integrate in the subventricular compartment after injection into the liquor system. *European journal of cell biology* 85, 6 (2006): 551–565.
6. Asheim, A: Surgical treatment of tendon injuries in the horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 145 (1964): 447–451.
7. Awad, H A; Butler, DL; Boivin, GP; Smith, FN; Malaviya, P; Huibregtse, B; Caplan, Al: Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue engineering* 5, 3 (1999): 267–277.
8. Awad, HA; Butler, DL; Harris, MT; Ibrahim, RE; Wu, Y; Young, RG: In vitro characterization of mesenchymal stem cell-seeded collagen scaffolds for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics. *Journal of biomedical materials research* 51, 2 (2000): 233–240.

9. Azizi, SA; Stokes, D; Augelli, BJ; DiGirolamo, C; Prockop, DJ: Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7 (1998): 3908–3913.
10. Baltes, Anette: Ibuprofen auf humanen Chondrozyten, Dissertation 2005, Universität Freiburg.
11. Barnewitz, D; Evers, A; Zimmermann, J; Wilke, I; Kaps, C; Sittinger, M: Tissue engineering: new treatment of cartilage alterations in degenerative joint diseases in horses- preliminary results of a long term study. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 116, 3 (2003): 157–161.
12. Benya, PD; Shaffer, JD: Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30, 1 (2003): 215–224.
13. Beretta, C; Garavaglia, G; Cavalli, M: COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: an in vitro analysis. *The official journal of the Italian Pharmacological Society* 52, 4 (2005): 302–306.
14. Berridge, MV; Herts, PM ; Tan, AS: Tetrazolium dyes as tools in cell biology. *New insights into their cellular reduction. Biotechnology Annual Review* 11 (2005): 127- 52
15. Birch, HL; Bailey, AJ; Goodship, AE: Macroscopic degeneration of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. *Equine veterinary journal* 30, 6 (1998): 534–539.
16. Böck P: *Romeis- Mikroskopische Technik*. 17. Aufl. München- Wien- Baltimore. Verlag Urban und Schwarzenberg (1989).
17. Boniface, RJ; Cain, PR; Evans, CH: Articular responses to purified cartilage proteoglycans. *Arthritis and rheumatism* 31, 2, (1988): 258–266.
18. Bosnakovski, D; Mizuno, M; Kim, G; Takagi, S; Okumura, M; Fujinaga, T: Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell and tissue research* 319, 2, (2005): 243–253.

19. Botting, R; Ayoub, S: COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 72, 2, (2005): 85–87.
20. Brown, KM; Saunders, MM; Kirsch, T; Donahue, HJ; Reid, JS: Effect of COX-2-specific inhibition on fracture-healing in the rat femur. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 86- A, 1, (2004):116–123.
21. Bruder, SP; Jaiswal, N; Haynesworth, SE: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of Cellular Biochemistry* 64, 2, (1997): 278–294.
22. Buschmann, MD; Maurer, AM; Berger, E; Perumbuli, P; Hunziker, EB: Ruthenium hexaammine trichloride chemography for aggrecan mapping in cartilage is a sensitive indicator of matrix degradation. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 48, 1, (2000): 81–88.
23. Butler, DL; Juncosa-Melvin, N; Boivin, GP; Galloway, MT; Shearn, JT; Gooch, C; Awad, H: Functional tissue engineering for tendon repair: A multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bioscaffolds, and mechanical stimulation. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 26, 1, (2008): 1–9.
24. Cai, X; Lin, Y; Ou, G; Luo, E; Man, Y; Yuan, Q; Gong, P: Ectopic osteogenesis and chondrogenesis of bone marrow stromal stem cells in alginate system. *Cell biology international* 31, 8, (2007): 776–783.
25. Caplan, AI: Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue engineering* 11, 7-8, (2005): 1198–1211.
26. Chang, JK; Li, CJ; Wu, SC; Yeh, CH; Chen, CH; Fu, YC: Effects of anti-inflammatory drugs on proliferation, cytotoxicity and osteogenesis in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochemical pharmacology* 74, 9, (2007): 1371–1382.
27. Chang, JK; Wang, GJ; Tsai, ST; Ho, ML: Nonsteroidal anti-inflammatory drug effects on osteoblastic cell cycle, cytotoxicity, and cell death. *Connective tissue research* 46, 4-

5, (2006): 200–210.

28. Chang, JK; Wu, SC; Wang, GJ; Cho, MH; Ho, ML: Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cell proliferation and death in cultured epiphyseal-articular chondrocytes of fetal rats. *Toxicology* 228, 2-3, (2006): 111–123.

29. Chen, YF; Jobanputra, P; Barton, P; Bryan, S; Fry-Smith, A; Harris, G; Taylor, RS: Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health technology assessment (Winchester, England)* 12, 11, (2008): 1–178.

30. Clemett, D; Goa, KL: Celecoxib: a review of its use in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acute pain. *Drugs* 59, 4, (2008): 957–980.

31. Clyne, MJ: Pathogenesis of degenerative joint disease. *Equine veterinary journal* 19, 1, (1987): 15–18.

32. Crisman MV, Furr MO; Ley WB: Evaluation of polysulphated glycosaminoglycan for the treatment of navicular disease. 39th annual convention proceeding (1993).

33. Crovace, A; Lacitignola, L; De Siena, R; Rossi, G; Francioso, E: Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. *Veterinary research communications* 31, 1, (2007): 281–283.

34. Devine, SM: Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic. *Journal of cellular biochemistry* 38, (2002): 73–79.

35. DiCesare, PE; Nimni, ME; Peng, L; Yazdi, M; Cheung, DT: Effects of indomethacin on demineralized bone-induced heterotopic ossification in the rat. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 9, 6, (1991): 855–861.

36. Dimmen, S; Nordsletten, L; Engebretsen, L; Steen, H; Madsen, JE: Negative effect of parecoxib on bone mineral during fracture healing in rats. *Acta orthopaedica* 79, 3, (2008): 438–444.

37. Dow SM, Wilson AM Goodship AE. Treatment of acute superficial digital flexor tendonjry horses with polysulphated glycosaminoglycan. *Veterinary Record* 1996; 139: 413-416.

38. Dowling, BA; Dart, AJ; Hodgson, DR; Smith, RK: Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine veterinary journal* 32, 5, (2000): 369–378.
39. Dubois, RN; Abramson, SB; Crofford, L; Gupta, RA; Simon, LS; Van De Putte, LB; Lipsky, PE: Cyclooxygenase in biology and disease. Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 12, 12, (1998): 1063–1073.
40. Dyson, S; Murray, R; Schramme, M; Branch, M: Lameness in 46 horses associated with deep digital flexor tendonitis in the digit: diagnosis confirmed with magnetic resonance imaging. *Equine veterinary journal* 35, 7, (2003): 681–690.
41. Eglitis, MA; Mezey, E: Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 8, (1997): 4080–4085.
42. Engels, E; Bedura- Lotter, G; Schicktanz, S: Neue Perspektiven der Transplantationsmedizin im interdisziplinären Dialog. *Nomos, Baden- Baden* (2000): 56-95
43. Engesaeter, LB; Sudmann, B; Sudmann, E: Fracture healing in rats inhibited by locally administered indomethacin. *Acta orthopaedica Scandinavica* 63, 3, (1992): 330–333.
44. Erdö F, Bürle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Föcking M, Küstermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, Trapp T: Host- dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 23, (2003): 780- 785
45. Evans, CE; Butcher, C: The influence on human osteoblasts in vitro of non-steroidal anti-inflammatory drugs which act on different cyclooxygenase enzymes. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 86, 3, (2004): 444–449.
46. Fackelman, GE: The nature of tendon damage and its repair. *Equine veterinary journal* 5, 4, (1973): 141–149.
47. Farrell, E; O'Brien, FJ; Doyle, P; Fischer, J; Yannas, I; Harley, BA: A collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes. *Tissue engineering* 12, 3, (2006): 459–468.

-
48. Fassbender, HG: Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Collagen and related research* 3, 2 (1983): 141–155.
49. Ferrari, G; Cusella-De Angelis, G; Coletta, M; Paolucci, E; Stornaiuolo, A; Cossu, G; Mavilio, F: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* (New York, N.Y.) 279, 5356, (1998) 1528–1530.
50. Forslund, C; Bylander, B; Aspenberg, P: Indomethacin and celecoxib improve tendon healing in rats. *Acta orthopaedica Scandinavica* 74, 4 (2003): 465–469.
51. Fortier, LA; Nixon, AJ; Williams, J; Cable, CS: Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research* 59, 9, (1998): 1182–1187.
52. Freeman, MA: The fatigue of cartilage in the pathogenesis of osteoarthritis. *Acta orthopaedica Scandinavica* 46, 3, (1975): 323–328.
53. Frey, HH; Löscher, W: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, 2. Auflage, Enke- Verlag, (2001): 328- 337
54. Gajraj, NM: The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on bone healing. *Regional anesthesia and pain medicine* 28, 5, (2003): 456–465.
55. Gao, CY; Stepp, MA; Fariss, R; Zelenka, P: Cdk5 regulates activation and localization of Src during corneal epithelial wound closure. *Journal of cell science* 117, 18 (2004): 4089-98.
56. Garret, JC: Treatment of osteochondral defects of the distal femur with fresh osteochondral autografts. *Journal Arthroscop and related surgery* 24 (1986): 222- 226.
57. Gerstenfeld, LC; Al-Ghawas, M; Alkhiary, YM; Cullinane, DM; Krall, EA; Fitch, JL: Selective and nonselective cyclooxygenase-2 inhibitors and experimental fracture-healing. Reversibility of effects after short-term treatment. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 89, 1, (2007): 114–125.
58. Gerstenfeld, LC; Thiede, M; Seibert, K; Mielke, C; Phippard, D; Svagr, B: Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 21, 4, (2003): 670–675.

-
59. Giovannini, S; Brehm, W; Mainil-Varlet, P; Nestic, D: Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation. Research in biological diversity* 76, 2, (2008): 118–129.
60. Gualde, N; Harizi, H: Prostanoids and their receptors that modulate dendritic cell-mediated immunity. *Immunology and cell biology*, 82, 4 (2004): 353–360.
61. Guest, DJ; Smith, MR; Allen, WR: Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine veterinary journal* 40, 2, (2008): 178–181.
62. Harder, AT.; An, YH: The mechanisms of the inhibitory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on bone healing: a concise review. *Journal of clinical pharmacology*, 43, 8, (2003): 807–815.
63. Haynesworth, SE; Goshima, J; Goldberg, VM; Caplan, AI: Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13, 1, (1992): 81–88.
64. Hegewald, AA; Ringe, J; Bartel, J; Krüger, I; Notter, M; Barnewitz, D: Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. *Tissue & cell* 36, 6, (2004): 431–438.
65. Hewicker-Trautwein, M; Carter, SD; Bennett, D; Kelly, DF: Immunocytochemical demonstration of lymphocyte subsets and MHC class II antigen expression in synovial membranes from dogs with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease. *Veterinary immunology and immunopathology* 67, 4, (1999): 341–357.
66. Ho, ML; Chang, JK; Wang, GJ: Antiinflammatory drug effects on bone repair and remodeling in rabbits. *Clinical orthopaedics and related research* 313, (1995): 270–278.
67. Hochberg, MC: COX-2 selective inhibitors in the treatment of arthritis: a rheumatologist perspective. *Current topics in medicinal chemistry* 5, 5, (2005): 443–448.
68. Howard, RD; McIlwraith, CW; Trotter, GW; Powers, BE; McFadden, PR; Harwood, FL; Amiel, D: Long-term fate and effects of exercise on sternal cartilage autografts used for repair of large osteochondral defects in horses. *American journal of veterinary research* 55, 8, (1994): 1158–1167.

69. Jaffe, HL: Metabolic, degenerative and inflammatory diseases of bones and joints. Lea und Fiebiger Verlag (1972), Philadelphia.
70. Johnson, LL: Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 2, 1 (1986): 54–69.
71. Johnstone, B; Hering, TM; Caplan, AI; Goldberg, VM; Yoo, JU: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research* 238, 1 (1998): 265–272.
72. Jolly, WT; Whittam, T; Jolly, AC; Firth EC: The dose- related effects of phenylbutazone and methylprednisolone acetate formulation (Depo- Medrol) on cultured explants of equine carpal articular cartilage. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 18, 6 (1995): 429-37
73. Kaspar, D; Hedrich, CM; Schmidt, C; Liedert, A; Claes, LE; Ignatius, AA: Diclofenac inhibits proliferation and matrix formation of osteoblast cells. *Der Unfallchirurg* 108, 1 (2005): 18- 24.
74. Keller, J; Bayer-Kristensen, I; Bak, B; Bünger, C; Kjaersgaard-Andersen, P; Lucht, U; Melsen, F: Indomethacin and bone remodeling. Effect on cortical bone after osteotomy in rabbits. *Acta orthopaedica Scandinavica* 60, 1 (1989): 119–121.
75. Kellinsalmi, M; Parikka, V; Risteli, J; Hentunen, T; Leskelä, HV; Lehtonen, S: Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates osteoclast and osteoblast differentiation and favours adipocyte formation in vitro. *European journal of pharmacology* 572, 2-3 (2007): 102–110.
76. Kern, S; Eichler, H; Stoeve, J; Klüter, H; Bieback, K: Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24, 5 (2006): 1294–1301.
77. Kis, B; Snipes, JA; Busija, DW: Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315, 1 (2005): 1–7.

-
78. Klinz, FJ; Schmidt, A; Schinköthe, T; Arnhold, S; Desai, B; Popken, F: Phospho-eNOS Ser-114 in human mesenchymal stem cells: constitutive phosphorylation, nuclear localization and upregulation during mitosis. *European journal of cell biology* 84, 10 (2005): 809–818.
79. Koerner, J; Nestic, D; Romero, JD; Brehm, W; Mainil-Varlet, P; Grogan, SP: Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24, 6 (2006): 1613–1619.
80. Kon, E; Muraglia, A; Corsi, A; Bianco, P; Marcacci, M; Martin, I: Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *Journal of biomedical materials research* 49, 3 (2000): 328–337.
81. Kopen, GC; Prockop, DJ; Phinney, DG: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 19 (1999): 10711–10716.
82. Krebsbach, PH; Kuznetsov, SA; Bianco, P; Robey, PG: Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Critical reviews in oral biology and medicine* 10, 2 (1999): 165–181.
83. Lee, HS; Huang, GT; Chiang, H; Chiou, LL; Chen, MH; Hsieh, CH; Jiang, CC: Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 21, 2 (2003): 190–199.
84. Lees, P; May, SA; White, D: Pharmacokinetics and dosage regimens of anti-inflammatory drugs. *Annals of veterinary research* 21 (1990): 73-78
85. Lennon, DP; Edmison, JM; Caplan, AI: Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Journal of cellular physiology* 187, 3 (2001): 345–355.
86. Liebich, HG: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 4. Auflage, (2003) Schattauer- Verlag, S. 81- 84.

-
87. Littlewood, HF: Treatment of sprained tendons in horses with carbon fibre implants. *The Veterinary record* 105, 10 (1979): 223–224.
88. Litzke, LF; Wagner, E; Baumgaertner, W; Hetzel, U; Josimović-Alasević, O; Libera, J: Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation. *Annals of biomedical engineering* 32, 1 (2004): 57–69.
89. Loewen, PS: Review of the selective COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib: focus on clinical aspects. *Canadian journal of emergency medical care* 4, 4 (2007): 268–275.
90. Marcacci, M; Kon, E; Moukhachev, V; Lavroukov, A; Kutepov, S; Quarto, R; Mastrogiacomo, M; Cancedda, R: Stem cell associated with macroporus bioceramics for long bone repair: 6- to 7- year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Engineering*, 13, 5 (2007): 947-955
91. Marr, CM; Love, S; Boyd, JS; McKellar, Q: Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses. *The Veterinary record* 132, 19 (1993): 476–479.
92. Martin, DR; Cox, NR; Hathcock, TL; Niemeyer, GP; Baker, HJ: Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Experimental hematology* 30, 8 (2002): 879–886.
93. Mazzini, L; Mareschi, K; Ferrero, I; Vassallo, E; Oliveri, G; Boccaletti, R: Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurological research* 28, 5 (2006): 523–526.
94. McCullagh, KG; Goodship, AE; Silver, IA: Tendon injuries and their treatment in the horse. *The Veterinary record* 105, 3 (1979): 54–57.
95. Mitchell, N; Shepard, N: The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 58, 2 (1976): 230–233.
96. Mizuno, M; Fujisawa, R; Kuboki, Y: The effect of carboxyl-terminal propeptide of type I collagen (c-propeptide) on collagen synthesis of preosteoblasts and osteoblasts. *Calcified tissue international* 67, 5 (2001): 391–399.

-
97. Mohr, W : Pathologie des Bandapparates. Sehnen, Sehnenscheiden, Faszien, Schleimbeutel. 19. Ausgabe, Springer- Verlag Berlin Heidelberg (1987).
98. Moon, MH; Kim, SY; Kim, YJ; Kim, SJ; Lee, JB; Bae, YC: Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cellular physiology and biochemistry* 17, 5-6 (2006): 279–290.
99. Moskowitz, RW; Goldberg, VM: Studies of osteophyte pathogenesis in experimentally induced osteoarthritis. *The Journal of rheumatology* 14, 2 (1987): 311–320.
100. Muir, D; Varon, S; Manthorpe, M: An Enzyme- Linked Immunosorbent Assay for Bromodeoxyuridine Incorporation Using Fixed Microcultures. *Analytical Biochemistry* 185 (1990): 377–382.
101. Murat, N; Hocaoglu, N; Karatosun, V; Yorukoglu, K; Gidener, S; Gunal, I: The effects of non-selective and cyclooxygenase-2-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs on heterotopic ossification in rats. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 11, 12 (2005): 449-51.
102. Nakamura, H; Masuko, K; Yudoh, K; Kato, T; Nishioka, K: Effects of celecoxib on human chondrocytes--enhanced production of chemokines. *Clinical and experimental rheumatology* 25, 1 (2007): 11–16.
103. Neuland, HG; Duchstein, HJ: Manifestationsmuster der extrakorporalen Stoßwellentherapie durch biologische Mechanotransduktion. *Orthopädische Praxis* 42 (2006): 230–235.
104. Niki, Y; Takaishi, H; Takito, J; Miyamoto, T; Kosaki, N; Matsumoto, H: Administration of cyclooxygenase-2 inhibitor reduces joint inflammation but exacerbates osteopenia in IL-1 alpha transgenic mice due to GM-CSF overproduction. *Journal of immunology* 179, 1 (2007): 639–646.
105. Nirmalanandhan, VS; Rao, M; Shearn, JT; Juncosa-Melvin, N; Gooch, C; Butler, DL: Effect of scaffold material, construct length and mechanical stimulation on the in vitro stiffness of the engineered tendon construct. *Journal of biomechanics* 41, 4 (2008): 822–828.

-
106. Nyack, B; Morgan, JP; Pool, R; Meagher, D: Osteochondrosis of the shoulder joint of the horse. *The Cornell veterinarian* 71, 2 (1981): 149–163.
107. Oberbauer R; Krivanek P; Turnheim K: Pharmakokinetics of indomethacin in the elderly. *Clinical Pharmacokinetics* 24 (1993): 428-434
108. Okada, Y; Pilbeam, C; Raisz, L; Tanaka, Y: Role of cyclooxygenase-2 in bone resorption. *Journal of Occupational health* 25, 2 (2003): 185–195.
109. Orlic, D; Kajstura, J; Chimenti, S; Limana, F; Jakoniuk, I; Quaini, F: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 18 (2001): 10344–10349.
110. Owen, M; Friedenstein, AJ: Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation symposium* 136 (1988): 42–60.
111. Peloso, JG; Mundy, GD; Cohen, ND: Prevalence of, and factors associated with, musculoskeletal racing injuries of thoroughbreds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 204, 4 (1994): 620–626.
112. Philipson, J; Brendow, E; Dalin, G; Wallin, L: Genetic aspects of diseases and lesions in horses. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetic Applied* 1998.
113. Pick, M: Diagnose und Therapie der häufigsten Erkrankungen des Sportpferdes. *Der Praktische Tierarzt* 2 (1986): 109–119.
114. Pittenger, MF; Mackay, AM; Beck, SC; Jaiswal, RK; Douglas, R; Mosca, JD: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York)* 284, 5411 (1999): 143–147.
115. Pool, RR; Meagher, DM: Pathologic findings and pathogenesis of racetrack injuries. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 6, 1 (1990): 1–30.
116. Radi, ZA; Khan, NK: Effects of cyclooxygenase inhibition on bone, tendon, and ligament healing. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society* 54, 9 (2005): 358–366.
117. Raker, CW: Surgical treatment of equine osteoarthritis and tenosynovitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 141 (1962): 1273–1275.

118. Reiners SR; Jann HW; Stein LE; Good JK; Clypool PL: An evaluation of two autologous tendon grafting techniques in ponies. *Veterinary Surgery* 31 (2002): 155-166
119. Reubnoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A: Embryonic stem cell lines from human blastocysts somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology* 18 (2000): 395- 404
120. Richardson, LE; Dudhia, J; Clegg, PD; Smith, R: Stem cells in veterinary medicine--attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends in biotechnology* 25, 9 (2007): 409–416.
121. Ringe, J; Kaps, C; Schmitt, B; Büscher, K; Bartel, J; Smolian, H: Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell and tissue research* 307, 3 (2002): 321–327.
122. Risbud, MV; Shapiro, IM; Guttapalli, A; Di Martino, A; Danielson, KG; Beiner, JM: Osteogenic potential of adult human stem cells of the lumbar vertebral body and the iliac crest. *Spine* 31, 1 (2006): 83–89.
123. Rossdale, PD; Hopes, R; Digby, NJ; Offord, K: Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *The Veterinary record* 116, 3 (1995): 66–69.
124. Sammons, J; Ahmed, N; El-Sheemy, M; Hassan, HT: The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D 3. *Stem cells and development* 13, 3 (2004): 273–280.
125. Sanchez-Ramos, J; Song, S; Cardozo-Pelaez, F; Hazzi, C; Stedeford, T; Willing, A: Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental neurology* 164, 2 (2000): 247–256.
126. Schneulin, M; Lischer, C: Extracorporeal shock wave therapy in veterinary medicine. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 143, 5 (2001): 227–232.
127. Seidenberg, AB; An, YH: Is there an inhibitory effect of COX-2 inhibitors on bone healing. *Pharmacological research* 50, 2 (2004): 151–156.
128. Sharma, P; Maffulli, N: Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *The*

Journal of bone and joint surgery. American volume 87, 1 (2005): 187–202.

129. Shi, Q; Rafii, S; Wu, MH; Wijelath, ES; Yu, C; Ishida, A: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92, 2 (1998): 362–367.

130. Short, CR; Beadle, RE: Pharmacology of antiarthritic drugs. *The Veterinary clinics of North America* 8, 3 (1978): 401–417.

131. Silbersiepe, E; Berger, E; Müller, H: Die Entzündung der Beugesehnen, Tendinitis. *Lehrbuch der speziellen Chirurgie für Tierärzte und Studierende*, 16. Auflage, Stuttgart, Enke- Verlag (1997).

132. Silver, IA; Brown, PN; Goodship, AE; Lanyon, LE; McCullagh, KG; Perry, GC; Williams, IF: A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine veterinary journal* 1 (1983): 1–43.

133. Simon, AM; Manigrasso, MB; O'Connor, JP: Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *Journal of bone and mineral research* 17, 6 (2002): 963–976.

134. Sittinger, M; Hutmacher, DW; Risbud, MV: Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Current opinion in biotechnology* 15, 5 (2004): 411–418.

135. Smith, RK; Korda, M; Blunn, GW; Goodship, AE: Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine veterinary journal* 35, 1 (2003): 99–102.

136. Smith, RKW; Webbon, PM: Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn. *British journal of sports medicine* 39, 9 (2005): 582–584.

137. Smith, RKW: Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disability and rehabilitation*, (2008) 1–7.

138. Sonnichsen, HV: Tendinitis of the horse. Definition, therapy and prognosis. *Tierärztliche Praxis* 3, 3 (1975): 315–322.

139. Spahn, G; Wittig, R: Biomechanical properties (compressive strength and compressive pressure at break) of hyaline cartilage under axial load. *Zentralblatt für*

Chirurgie 128, 1 (2003): 78–82.

140. Spahn, G; Mückley, T; Kahl, E; Hofmann, GO: Factors affecting the outcome of arthroscopy in medial-compartment osteoarthritis of the knee. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery* 22, 11 (2006): 1233–1240.

141. Stashak, TS: Management of lacerations and avulsion injuries of the foot and pastern region and hoof wall cracks. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 5, 1 (1989): 195–220.

142. Strömberg, B; Rejnö, S: Osteochondrosis in the horse. A clinical and radiologic investigation of osteochondritis dissecans of the knee and hock joint. *Acta radiologica* 358 (1978): 139–152.

143. Tan, KK; Tan, GH; Shamsul, BS; Chua, KH; Ng, MH; Ruszymah, BH: Bone graft substitute using hydroxyapatite scaffold seeded with tissue engineered autologous osteoprogenitor cells in spinal fusion: early result in a sheep model. *The Medical journal of Malaysia* 60, C, (2005): 53–58.

144. Timper, K; Seboek, D; Eberhardt, M; Linscheid, P; Christ-Crain, M; Keller, U: Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochemical and biophysical research communications* 341, 4 (2006): 1135–1140.

145. Thomson JA, Itskovitz- Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergel JJ, Marshol VS, Jones JM: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 (1998): 1145- 1147

146. Tobin, T; Chay, S; Kamerling, S; Woods, WE; Weckman, TJ; Blake, JW; Lees, P: Phenylbutazone in the horse: a review. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 9, 1 (1986): 1-25.

147. Tondreau, T; Lagneaux, L; Dejeneffe, M; Delforge, A; Massy, M; Mortier, C; Bron, D: Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytherapy* 6, 4 (2005): 372–379.

148. Toutain, PL; Autefage, A; Legrand, C; Alvinerie, M: Plasma concentrations and

therapeutic efficacy of phenylbutazone and flunixin meglumine in the horse: pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 17, 6 (1994): 459–469.

149. Toutain, PL; Cester, CC: Pharmacokinetic- pharmacodynamic relationships and dose response to meloxicam in horses with induced arthritis in the right carpal joint. *American journal of veterinary research* 65, 11 (2004): 1533-41.

150. Vachon, A; Bramlage, LR; Gabel, AA; Weisbrode, S: Evaluation of the repair process of cartilage defects of the equine third carpal bone with and without subchondral bone perforation. *American journal of veterinary research* 47, 12 (1986): 2637–2645.

151. Vane, JR; Botting, RM: The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis research* 110, 5-6 (2003): 255–258.

152. Velikonja, NK; Wozniak, G; Molicev, E; Kinezevic, M; Jeras, M: Protein synthesis of human articular chondrocytes cultured in vitro for autologous transplantation. *Pflugers Arch* 442, 6 (2001): 165-170

153. Vidal, MA; Kilroy, GE; Johnson, JR; Lopez, MJ; Moore, RM; Gimble, JM: Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Veterinary surgery* 35, 7, (2006): 601–610.

154. Vidal, MA; Kilroy, GE; Lopez, MJ; Johnson, JR; Moore, RM; Gimble, JM: Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary surgery* 36, 7 (2007): 613–622.

155. Vuolteenaho, K; Moilanen, T; Moilanen, E: Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 102, 1 (2008): 10–14.

156. Wagels, R: Die Biopsie der oberflächlichen und tiefen Beugesehne des Pferdes- Methodik und klinische Verlaufsuntersuchung. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover (2000).

157. Wagner, I; Biegert, C; Heide, C: Aktuelle Forschungsergebnisse zur Weidenrinde.

Pharmazeutische Zeitung 148 (2003): 1153- 1164

158. Wallin, L; Strandberg, E; Philipson, J; Dalin, G: Estimates of longevity and causes of culling and death in swedish warmblood and coldblood horses. *The veterinary record* 158, 12 (2000): 397- 10.

159. Walsh, S; Jefferiss, C M; Stewart, K; Beresford, JN: IGF-I does not affect the proliferation or early osteogenic differentiation of human marrow stromal cells. *Bone* 33, 1 (2003): 80–89.

160. Wang, Y; Chen,X; Zhu, W; Zhang, H; Hu, S; Cong, X: Growth inhibition of mesenchymal stem cells by aspirin: involvement of the WNT/beta-catenin signal pathway. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 33, 8 (2006): 696–701.

161. Webbon, PM: A post mortem study of equine digital flexor tendons. *Equine veterinary journal* 9, 2 (1977): 61–67.

162. Webbon, PM: The racing performance of horses with tendon lesions treated by percutaneous tendon splitting. *Equine veterinary journal* 11, 4 (1979): 264–265.

163. Williams, RB; Harkins, LS; Hammond, CJ; Wood,JL: Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British race courses from flat racing and National Hunt racing during 1996, 1997 and 1998. *Equine veterinary journal* 33, 5 (2003): 478- 86

164. Willmink, J; Wilson, AM; Goodship, AE: Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibres in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses. *Research in veterinary science* 53, 3 (1992): 354- 59

165. Woodbury, D; Schwarz, EJ; Prockop, DJ; Black, IB: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research* 61, 4 (2000): 64–370.

166. Worster, AA; Brower-Toland, BD; Fortier, LA; Bent, SJ; Williams, J; Nixon, AJ: Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *Journal of orthopaedic research* 19, 4 (2001): 738–749.

167. Worster, AA; Nixon, AJ; Brower-Toland, BD; Williams, J: Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal

stem cells. American journal of veterinary research 61, 9 (2001): 1003–1010.

168. Yovich, JV; Trotter, GW; McIlwraith, CW; Norrdin, RW: Effects of polysulfated glycosaminoglycan on chemical and physical defects in equine articular cartilage. American journal of veterinary research 48, 9 (1987): 1407- 1414.

169. Yoo, JU; Barthel, TS; Nishimura, K; Solchaga, L; Caplan, AI; Goldberg, VM; Johnstone, B: The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. The Journal of bone and joint surgery. American volume 80, 12 (1999): 1745–1757.

170. Zhang, X; Schwarz, EM; Young, DA; Puzas, JE; Rosier, RN; O'Keefe, RJ: Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. The Journal of clinical investigation 109, 11 (2002):1405–1415.

Danksagung

Die in dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. S. Arnhold von mir selbst mit freundlicher Unterstützung von Herrn C. Hoffmann, Frau E. Janssen und Frau J. Kozlowski durchgeführt worden.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. Klaus Nohroudi für die freundliche Unterstützung bei der Auswertung der Statistik.

Erklärung:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Köln, den 12.05.09



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5509-8



9 783835 195509