

Aus der
Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**EINFLUSS DER EXTRAKORPORALEN STOSSWELLENTHERAPIE
AUF DIE DIFFERENZIERUNG VON MESENCHYMALEN
STAMMZELLEN**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
TOLGA GÖREN

aus Osterode
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD. Dr. med. Jörg Hausdorf

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Oliver Reich

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2019

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|--|-------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Grundlagen | 3 |
| 2.1. Mesenchymale Stammzellen (MSCs) | 3 |
| 2.1.1. Grundlagen | 3 |
| 2.1.2. Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen | 4 |
| 2.2. Wachstumsfaktoren: bFGF, VEGF und TGF- β 1 | 6 |
| 2.3. Pseudoarthrose | 7 |
| 2.4. Extrakorporale Stoßwellentherapie | 9 |
| 2.4.1. Historische Entwicklung | 9 |
| 2.4.2. Physikalische Grundlagen der extrakorporalen Stoßwellen | 9 |
| 2.4.3. Erzeugung der extrakorporalen Stoßwellen | 12 |
| 2.4.4. Wirkung extrakorporaler Stoßwellen im biologischen Gewebe | 14 |
| 3. Material und Methoden | 18 |
| 3.1. Zellkultur | 18 |
| 3.1.1. Festlegung der Zellzahl | 19 |
| 3.1.2. Behandlung des Zellkulturmediums | 19 |
| 3.1.3. Kultivierung der Zellen | 19 |
| 3.1.4. Einfrieren und Auftauen der Zelllinien | 20 |
| 3.1.5. RNA Isolation | 20 |

| | |
|---|----|
| 3.1.6. cDNA Synthese | 21 |
| 3.1.7. Real-time PCR (Quantitative PCR) | 21 |
| 3.1.8. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) | 22 |
| 3.1.9. Färbung nach von Kossa | 23 |
| 3.1.10. Statistische Analyse | 23 |
| 3.2. Gruppeneinteilung | 24 |
| 3.3. Stoßwellenbehandlung | 24 |
| 4. Ergebnisse | 26 |
| 4.1. Viabilität der Stammzellen nach ESWT | 26 |
| 4.2. V. Kossa-Färbung der Stammzellen nach ESWT | 26 |
| 4.3. Genexpression der Stammzellen nach ESWT mittels PCR | 28 |
| 4.3.1. Osteopontin-Expression der Stammzellen nach ESWT | 28 |
| 4.3.2. Cbfa 1-Expression der Stammzellen nach ESWT | 29 |
| 4.3.3. Collagen 1 α 2-Expression der Stammzellen nach ESWT | 30 |
| 4.3.4. Osteocalcin-Expression der Stammzellen nach ESWT | 31 |
| 4.3.5. Alkalische Phosphatase-Expression der Stammzellen nach ESWT | 32 |
| 4.4. Untersuchung der Wachstumsfaktoren mittels ELISA | 33 |
| 4.4.1. Nachweis von bFGF-Produktion mittels ELISA | 33 |
| 4.4.2. Nachweis von TGF- β 1-Produktion mittels ELISA | 35 |
| 4.4.3. Nachweis von VEGF-Produktion mittels ELISA | 37 |
| 5. Diskussion | 39 |
| 6. Zusammenfassung | 43 |
| 7. Literatur | 45 |

| | |
|---|----|
| 8. Anhang | 54 |
| 8.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien | 54 |
| 8.2. Chemikalien und Reagenzien | 58 |
| 8.3. Fertigkombinationen von Biochemikalien | 59 |
| 8.4. Medien | 60 |
| 8.5. Primer | 60 |
| 8.6. Duoset ELISA | 61 |
| 8.7. Computerprogramme | 61 |
| 8.8. Abkürzungsverzeichnis | 63 |
| 9. Lebenslauf | 64 |
| 10. Danksagung | 65 |

1. Einleitung

Seit Beginn der 80er Jahre wird die extrakorporale Stoßwellenlithotripsie (ESWL) zur Behandlung von Nierensteinen angewandt (Chaussy et al., 1982c). Bei tierexperimentellen Untersuchungen zur Evaluierung unerwünschter Nebenwirkungen der ESWL zeigten sich reproduzierbare Effekte am Os ilium, das in der Stoßwellenstrecke lag. Dabei handelte es sich um eine Knochenanlagerung (Graff J., 1989).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde über eine mögliche Stimulation der Knochenheilung mittels extrakorporaler Stoßwellen geforscht. Im folgenden konnte bei einigen Tiermodellen eine beschleunigte Frakturheilung beschrieben werden (Haupt et al., 1992a, Johannes et al., 1994a, Wang et al., 2001b). Andere Studien zeigten jedoch eine stoßwelleninduzierte Verzögerung der Osteogenese (Augat et al., 1995b, Forriol et al., 1994a, McCormack et al., 1996). Trotz der widersprüchlichen experimentellen Ergebnisse wurde die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) seit Beginn der 90er Jahre vereinzelt in der klinischen Behandlung von Frakturen mit verzögerter Heilung oder Pseudarthrosenbildung als eine Therapiealternative zur Operation eingesetzt (Beutler et al., 1999, Haupt, 1997, Heller and Niethard, 1998, Maier et al., 2002b, Rompe et al., 2001, Schaden et al., 2001, Tischer et al., 2002b, Valchanou and Michailov, 1991, Wang et al., 2001a). Die weiteren Einsatzgebiete der ESWT in der Orthopädie sind die Behandlung der Tendinosis calcarea der Schulter (Gerdesmeyer et al., 2003, Maier et al., 2000c), die Therapie der chronischen Epicondylitis humeri radialis (Maier et al., 2000a, Maier et al., 2001) und der plantaren Fasziitis (Maier et al., 2000d, Maier et al., 2000b).

Neben der klinischen Anwendung wurde der osteogenetische Effekt von Stoßwellen auf biologische Gewebe von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht (Graff J., 1988, Ikeda et al., 1999b, Johannes et al., 1994b, Maier et al., 2004a, Tischer et al., 2002a). Trotz dieser Studien konnten die genauen molekularen Wirkmechanismen nur ansatzweise geklärt werden (Maier et al., 2002a, Maier et al., 2003a, Takahashi et al., 2003).

In Zellkulturanalysen mit Osteoblasten und Fibroblasten konnten die ersten Hinweise auf zugrundeliegende Mechanismen gefunden werden. Durch die ESWT kam es zu einer vermehrten Expression von Knochenmatrixproteinen sowie Wachstumsfaktoren

(Hausdorf et al., 2011a, Kusnierczak et al., 2000a, Leung et al., 2004, Tam et al., 2005, Tamma et al., 2009, Wang et al., 2001d, Wang et al., 2002b).

Die Wirkung von Stoßwellen auf mesenchymale Stammzellen ist noch wenig untersucht. In diesem in vitro durchgeführten Versuch soll überprüft werden, ob die Applikation extrakorporaler Stoßwellen auf mesenchymale Stammzellen einen Einfluss auf deren Differenzierung und Funktion hat.

2. Grundlagen

2.1 Mesenchymale Stammzellen

2.1.1. Grundlagen

Mesenchymale Stammzellen sind multipotente Vorläuferzellen verschiedener mesenchymaler Gewebe, die sich in Knochengewebe, Knorpelgewebe (Bab et al., 1986) (Ohgushi et al., 1989), Fettgewebe (Bab et al., 1986, Bennett et al., 1991), Sehnen- (Young et al., 1998) und Muskelgewebe (Ferrari et al., 1998, Wakitani et al., 1995) differenzieren können.

Mesenchymale Stammzellen findet man im Knochenmark (Pittenger et al., 1999), im Periost (Nakahara et al., 1991), in der Synovialmembran (De et al., 2001), im Fettgewebe (Zuk et al., 2001), im Muskel (Bosch et al., 2000), in der Dermis (Young et al., 2001), im peripheren Blut (Zvaifler et al., 2000), in der Nabelschnur (Erices et al., 2000) und im trabekulären Knochen (Noth et al., 2002).

Es wurde von Owen (Owen, 1985) und Caplan et al. (Caplan, 1991) über die mesenchymale Stammzellen gesprochen, deren Hypothesen auf die Untersuchungen von Friedenstein (Friedenstein et al., 1968), Ashton (Ashton et al., 1980) und Bab (Bab et al., 1984) zum Differenzierungspotential von Knochenmarkszellen beruhen.

Das untenstehende Modell (Abb. 2.1) zeigt die Mesengenese von mesenchymalen Stammzellen (Caplan and Bruder, 2001):

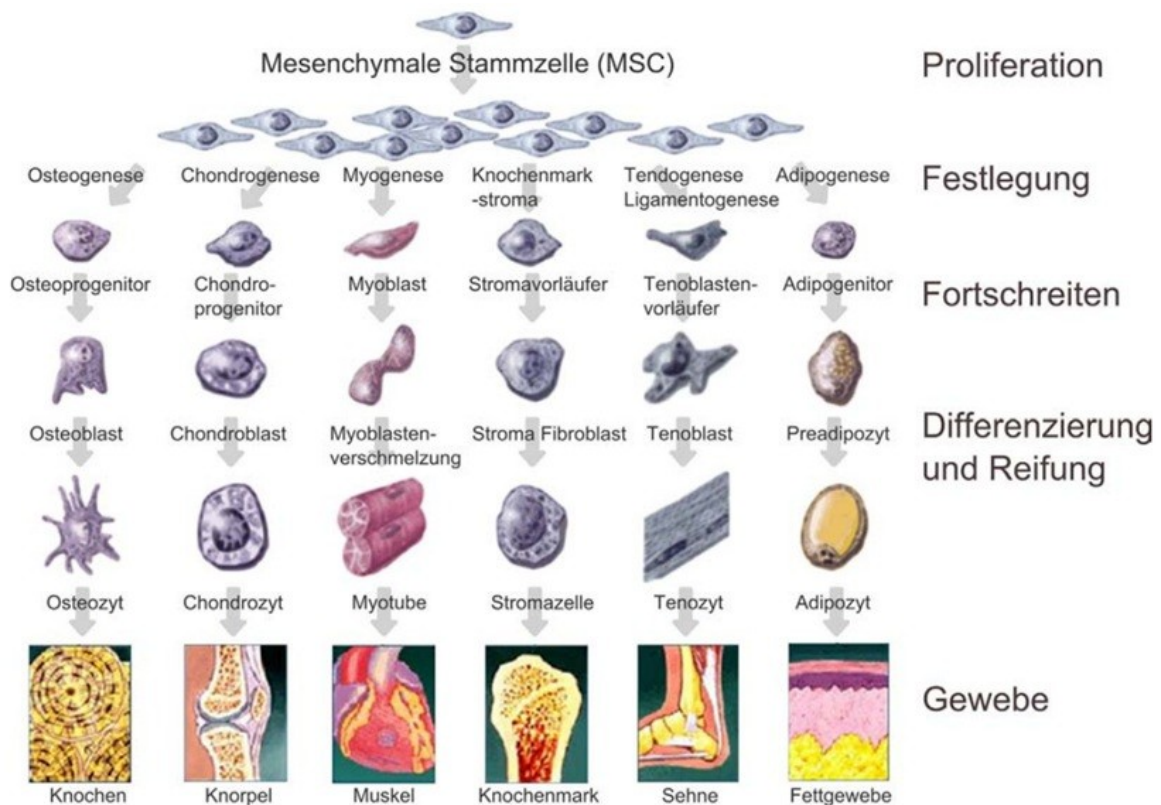


Abb. 2.1: Modell zur Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSC), Mesengnese (Caplan and Bruder 2001).

2.1.2. Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Die molekularen Mechanismen zur osteogenen Differenzierung und die Regulation durch Wachstumsfaktoren sind nach wie vor Gegenstand intensiver Forschungsaktivitäten.

Ausgehend von den multipotenten, potentiell hochproliferativen mesenchymalen Stammzellen entwickeln sich Zellen schrittweise über Osteoprogenitorzellen und Prä-Osteoblasten zu Osteoid produzierenden Osteoblasten, die in die verkalkende Interzellulärsubstanz eingeschlossen sind. Im letzten Schritt der Entwicklungskaskade entstehen die nicht mehr teilungsfähige Osteozyten (Abb 2.2)(Heng et al., 2004).

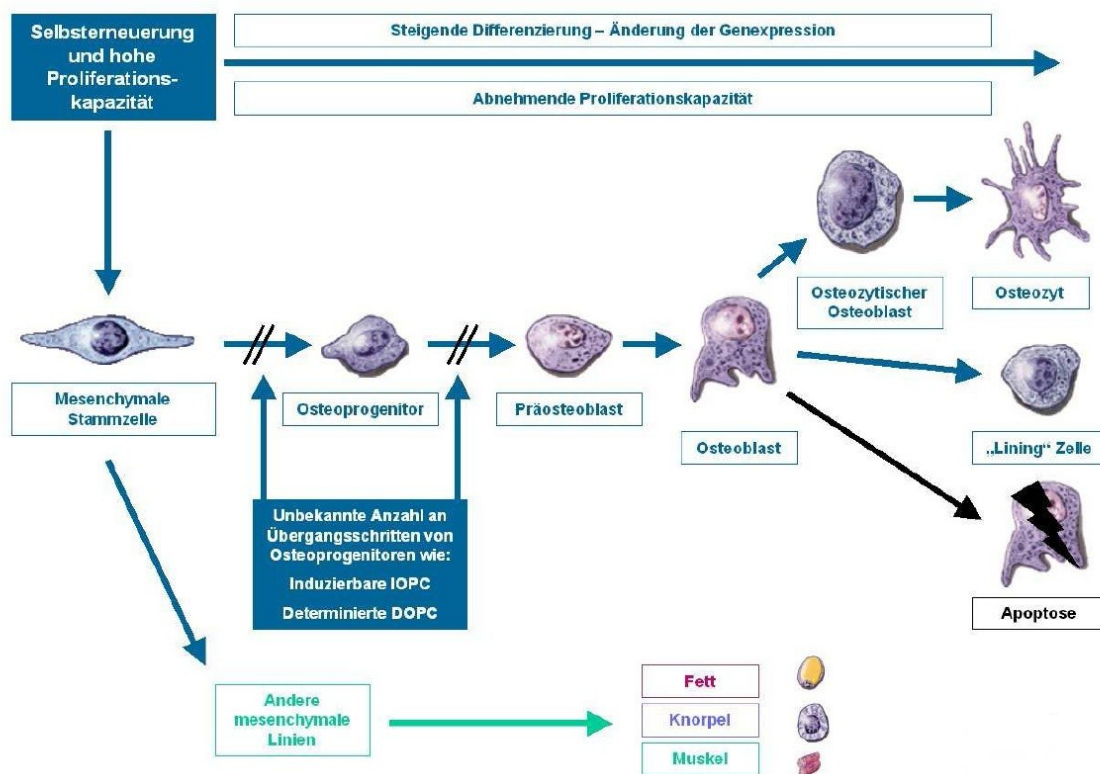


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Entwicklung der Osteoblastenlinie ausgehend von einer mesenchymalen Stammzelle (Aubin et al. 1996).

Während der osteogenen Differenzierung werden bei verschiedenen Schritten bestimmte Proteine exprimiert. Einen Überblick über die Differenzierungsschritte und die jeweils nachweisbaren Markerproteine gibt Tabelle 1:

| Markerproteine | MSZ | Osteoprogenitor | Präosteoblast | Osteoblast | Osteozyt | Referenz |
|----------------|-------|-----------------|---------------|-------------|-------------|---------------------------|
| ALP | | x (+) | x (++) | x (+++) | | (Bruder and Caplan, 1990) |
| Osteopontin | | | x (- → +) | x (- → +++) | x (- → +++) | (Mark et al., 1987) |
| Osteocalcin | | | | x (- → +++) | x (- → +++) | (Brockers et al. 1987) |
| Cbfa1 | x (+) | x (+) | x (+) | x (+) | x (++) | (Aubin et al. 02) |
| Kollagen1 | | x (+) | x (++) | x (++) | | (Aubin et al. 2002) |

Abb. 2.3: Darstellung der Expression typischer osteogener Marker im Verlauf der Differenzierung, basierend auf in vivo und in vitro Experimenten (Aubin et al. 2002). Heterogene Expression der Marker (von keine detektierbaren Expression bis sehr hoch).

2. 2. Wachstumsfaktoren: bFGF, VEGF und TGF- β 1

In dieser Studie wurden 3 Wachstumsfaktoren untersucht.

bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) wird von Osteoblasten, Chondroblasten und Fibroblasten gebildet. bFGF fördert unter anderen die Knorpelmatrix-Synthese und die Mitose von Osteoblasten. Die Studien zeigten ein Zeitprofil mit Anstieg von der bFGF-Produktion in allen Stadien der Knochenbruchheilung. (Nakajima et al., 2001, Solheim et al., 1995)

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) kommt in mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten und Chondrozyten vor. VEGF stimuliert die Endothelzellen zur Angiogenese in verschiedenen Geweben und führt auch zur autokrinen Stimulation der Osteoblasten zur Knochenmatrixsynthese. Die Studien zeigten ein Zeitprofil mit Anstieg von VEGF-Produktion innerhalb der ersten Stunden und der ersten Tage (Ferrara, 2004, Mayer et al., 2005a, Mayer et al., 2005b, Street et al., 2002, Weiss et al., 2005).

TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) wird von Thrombozyten, Entzündungszellen, Osteoblasten und Chondrozyten gebildet. TGF- β 1 spielt eine wichtige Rolle bei der Knochenmatrixproduktion durch Osteoblasten und Chondroblasten und bei deren Differenzierung und Migration. Es führt auch zur Stimulierung der Proliferation der mesenchymalen Stammzellen. Es wurde auch bewiesen, dass TGF- β 1 zur konzentrationsabhängigen Stimulation der VEGF-Produktion führt. Ein Anstieg von der TGF- β 1-Produktion kommt in früheren und auch in späteren Heilungsphasen vor (Bourque et al., 1993, Cho et al., 2002, Ferrara, 2004, Kanaan and Kanaan, 2006, Mayer et al., 2005b, Mayer et al., 2005a, Nakajima et al., 2001, Solheim et al., 1995, Steinbrech et al., 2000, Street et al., 2002, Weiss et al., 2005).

2. 3. Pseudarthrose

Unter Pseudarthrose versteht man eine länger als sechs (im amerikanischen Raum neun) Monate andauernde fehlende knöcherne Konsolidierung der Frakturfragmente (Weber und Czech 1973; Wirth 1992). Bei der Pseudarthrose zeigt der Knochen kaum eine Ausheilung ohne zusätzliche Therapie (Brashear, 1965); Beickert und Smieja 2001).

Es gibt verschiedene Faktoren, die eine Pseudoarthrose auslösen können. Diese Faktoren kann man in zwei großen Gruppen unterteilen: Mechanische und biologische Faktoren (Runkel and Rommens, 2000).

Die mechanischen Faktoren sind zum einen ein fehlender Knochenkontakt, der z.B. bei ausgeprägtem Defekt oder starker Dislokation zustande kommen kann. Zum anderen eine Instabilität, wodurch die Knochenbruchheilung aufgrund der hohen mechanischen Belastung nicht erfolgen kann (Runkel and Rommens 2000). Die mechanischen Faktoren führen zu einer hypertrophen Pseudarthrose (Brandner and Späth 2001).

Zu den biologischen Faktoren zählen v.a. die Beeinträchtigung der Blutzufuhr durch das Trauma oder durch eine iatrogen bedingte Störung der periostalen oder medullären Gefäßversorgung (Mayr et al., 2000). Auch andere biologische Faktoren wie Diabetes, Nikotunabusus etc. spielen als zusätzliche Faktoren eine Rolle bei der lokalen Minderperfusion, welche eine atrophe Pseudarthrose zur Folge haben. Ebenso führt eine Infektion im Frakturbereich zu einer Pseudarthrose (Brandner and Späth 2001).

Im klinischen Alltag wird die Pseudarthrose überwiegend nach ihrer radiologischen Kallusbildung klassifiziert. Wenn sich radiologisch eine überschießende Kallusbildung ohne Konsolidierung des Frakturspaltes zeigte, spricht man von einer hypertrophen Pseudarthrose. Da eine biologische Aktivität besteht, ahndelt es sich um eine vitale (reaktive) Pseudarthrose (Schwartzman et al., 1990).

Atrophe (inaktive) Pseudarthrosen entstehen durch die Avitalität der Knochenfragmente und zeigen eine insuffiziente Kallusbildung (Weber and Czech 1973). Die häufigste Ursache einer avitalen Pseudarthrose ist wie o.g. eine Störung der Perfusion im Frakturbereich.

In der Orthopädie und Unfallchirurgie stellt die Pseudarthrose bei der operativen und konservativen Frakturversorgung ein wichtiges Problem mit einer Häufigkeit von 5-10 % (Besch et al., 1994, Kuner et al., 1996) dar. Die atrophe Pseudarthrose hat hierbei den größten Anteil.

Die Therapie der ersten Wahl beim Vorliegen einer atrophen Pseudoarthrose ist bisher die Operation, die jedoch nur einen eingeschränkten Therapieerfolg zeigt (Cattaneo et al. 1993, Wiss and Stetson 1994, Rompe et al 1997). Heutzutage werden rekombinante Knochenwachstumsfaktoren oder körpereigene Wachstumsfaktoren (Platelet Rich Plasma) bei entsprechenden Risikofaktoren bereits bei der Erstoperation der Frakturversorgung (Govender et al. 2002) oder nach Ausbildung einer Pseudarthrose angewendet um die Knochenneubildung zu stimulieren (Friedlaender et al. 2001, Calori et al. 2008, Sanchez et al. 2009).

Die aufwendige Therapie mit langer Behandlungszeit und mäßigem Therapieerfolg stellt auch eine wichtige sozio-ökonomische Problematik dar. Diese unbefriedigende Situation soll durch neue Behandlungsmethoden verbessert werden. Hierzu gehört auch die ESWT. Ab den frühen neunziger Jahren wurde die Wirkung von ESWT auf die Knochenheilung intensiv erforscht. Die Resultate der Studien sind sehr vielfältig. Während einige Studien eine schnellere Heilung von Knochendefekten sogar mit erhöhter mechanischer Stabilität feststellen (Graff 1989; Ekkernkamp et al. 1992; Haupt et al. 1992; Ikeda et al. 1999, Wang et al. 2001(b)) konnten, zeigten andere Studien negative Ergebnisse mit Verzögerung der Heilung von frischen Frakturen und mit einer Verschlechterung der mechanischen Stabilität (Forriol et al. 1994; Augat et al. 1995). 2009 zeigte die Studie von Cacchio (2009), dass mit Stoßwellen behandelte Patienten gleich gute Ergebnisse bei der Ausheilung der Pseudarthrose zeigten, wie die, die eine chirurgische Therapie bekamen. Auch konnten die mit extrakorporalen Stoßwellen behandelten Patienten eine bessere klinische Scores erreichen.

2. 4. Extrakorporale Stoßwellentherapie

2.4.1. Historische Entwicklung

Forssmann et al. benutzte vor ungefähr 34 Jahren die extrakorporale Stoßwellentherapie bei der extrakorporalen Stoßwellenlithotripsie zur nicht invasiven Behandlung von Nephro- und Urolithiasis (Forssmann et al., 1977). 1980 wurde der erste Patient mit Nephrolithiasis erfolgreich mit extrakorporalen Stoßwellen behandelt (Chaussy et al., 1982b). Dank der weiterer Untersuchungen am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität wurde die extrakorporale Stoßwellenlithotripsie als Standardverfahren in die Urologie eingeführt (Chaussy et al., 1982a, Eisenberger and Chaussy, 1978, Schmiedt and Chaussy, 1984).

Graff et al. haben zum ersten Mal die Stoßwellenwirkung auf Stütz- und Bewegungsapparat untersucht. Aufgrund einer aufgefallener Auftreibung des Os ilium im Röntgenbild bei Patienten mit Urolithiasis nach Stoßwellenbehandlung haben die Autoren weitere Untersuchungen durchgeführt. Sie konnten eine primäre Osteozytenschädigung nachweisen, auf die eine Osteoblastenstimulation folgte (Graff et al. 1988).

In der Orthopädie wurde die extrakorporale Stoßwellentherapie bei der Therapie der verzögerten Frakturheilung (Valchanou and Michailov, 1991), der aseptischen Pseudarthrose (Valchanou and Michailov, 1991), der Epicondylitis humeri radialis (Rompe et al., 1996a), der plantaren Fasziitis (Rompe et al., 1996b) und der Tendinosis calcarea der Schulter (Rompe et al., 1995) eingesetzt.

2.4.2. Physikalische Grundlagen der extrakorporaler Stoßwellen

Extrakorporale Stoßwellen sind akustische Druckimpulse, die sich dreidimensional in Medien wie Gas, Flüssigkeit und Festkörpern ausbreiten. Ihr spezifischer Verlauf ist durch zwei Phasen gekennzeichnet. In kurzer Zeit steigt der Druck bis zu seinem Maximalwert, welcher in der ersten Phase von einem exponentiellen Abfall bis zum atmosphärischen Umgebungsdruck gefolgt wird. Die anschließende zweite Phase zeigt sich durch einen Druckabfall in den negativen Bereich, der am Ende wieder den

atmosphärischen Umgebungsdruck erreicht (Gerdesmeyer et al., 2002e, Maier et al., 1998a, Ogden et al., 2001b). Die Dauer einer vollständigen Stoßwelle beträgt nur wenige Mikrosekunden (μs) (Folberth et al., 1992) (Abb. 2.4).

Die durch verschiedene physikalische Eigenschaften charakterisierte Stoßwellen werden in Abbildung 2.4 dargestellt (Gerdesmeyer et al., 2002d, Maier et al., 1998b) :

- Postiver Spitzendruck (P_+): definiert als Differenz zwischen dem maximalen positiven Spitzendruck und Umgebungsdruck der Stoßwelle. P_+ erreicht die Werte zwischen 5 und 120 MPa.
- Negativer Spitzendruck (P_-): definiert als der maximale negative Spitzendruck in der zweiten Phase der Stoßwelle und erreicht Werte von circa 10% von P_+ .
- Anstiegszeit (T_r): definiert als das Zeitintervall, in dem der Druck von 10% von P_+ auf 90% von P_+ ansteigt. T_r kann innerhalb von 1-500 ns erfolgen.
- Pulsbreite (T_w): definiert als Zeitintervall, bei dem der Druck erstmals 50% von P_+ übersteigt und dem Zeitpunkt, bei dem der Druck (während des exponentiellen Druckabfalls in der ersten Phase der Stoßwelle) weniger als 50% von P_+ beträgt. Synonym wird T_w auch als „full-width-half-maximum“ (FWHM) bezeichnet. T_w beträgt zwischen 200 ns und 500 ns.

Die Werte von P_+ , P_- , T_r und T_w einer Stoßwelle hängen von der verwendeten Stoßwellenquelle ab (Krause 1997).

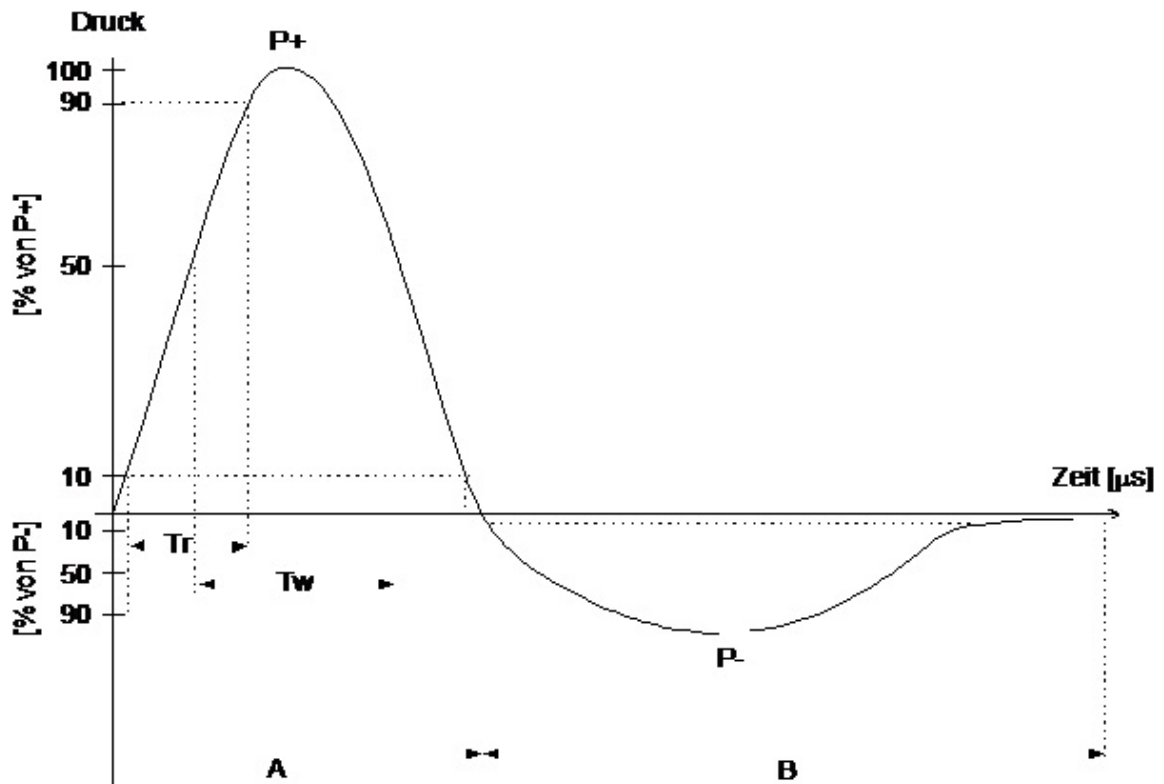


Abb. 2.4: Graphische Darstellung einer standardisierten Stosswelle (Gerdesmeyer et al. 2002). A: 1. Anteil der Stosswelle mit positivem Druck; B: 2. Anteil der Stosswelle mit negativem Druck; P_+ positiver Spitzendruck; P_- negativer Spitzendruck; T_r Anstiegszeit; T_w Pulsbreite; I_+ Standardzeitintervall zur Berechnung der sog. „positiven Energie“ der Stosswelle; I Standardzeitintervall zur Berechnung der sog. „totalen Energie“ der Stosswelle.

Bei Erzeugung der Stoßwellen werden diese auf eine Zielregion fokussiert, wodurch ein dreidimensionales Stoßwellenfeld entsteht. Ein wichtiger Parameter dieses Stoßwellenfeldes ist der Stoßwellenfokus, der charakteristischer Weise dreidimensional betrachtet eine zigarrenähnliche Gestalt besitzt. Zwischen dem Fokusbereich und den physikalischen Parametern bestehen komplexe Wechselwirkungen (Ueberle 1997; Wess et al. 1998). Die momentan angewendeten Stoßwellenquellen fokussieren die akustische Energie in kleinen Arealen, um einerseits die Wirkung innerhalb des Zielgebietes zu erhöhen und andererseits das angrenzende Gewebe zu schützen (Haake et al., 2001).

Mehrere Fokuszonon wurden von Ogden et al. in 2001 definiert:

- Der Stoßwellenfokus kann als derjenige Raum definiert werden, innerhalb dessen mindestens 50% des positiven Spitzendruckes (P_+) erreicht

werden (-6 dB Isobare). Der Fokus nimmt eine zigarrenähnliche Form an. „-6 dB-Isobare bezieht sich auf relative Messungen (Abb. 2.5)

- Der Stoßwellenfokus kann als derjenige Raum definiert werden, innerhalb dessen der Druck mindestens 5 MPa erreicht (5 MPa Isobare). 5 MPa-Isobare bezieht sich auf absolute Messungen.
- Der Stoßwellenfokus kann als derjenige Raum definiert werden, der den Stoßwellenfokus als räumliche Ausdehnung in Bezug auf seine Längsachse beschreibt und auf 5 mm begrenzt wird.

Der -6 dB-Fokus wurde in dieser Arbeit verwendet.

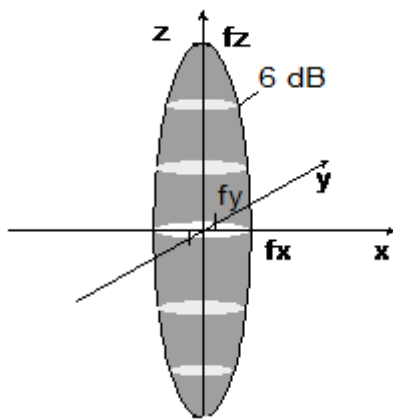


Abb. 2.5: Darstellung des -6 dB-Fokus der Stoßwellenquelle Dornier XL 1

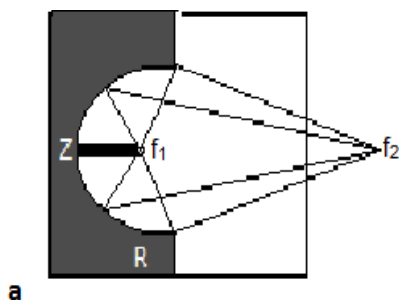
Um die applizierte Energie bei der Stoßwellentherapie zu quantifizieren, wird als physikalische Einheit die Energieflussdichte (EFD in mJ/mm^2) verwendet. Sie definiert die Stoßwellenenergie, die innerhalb von einem Quadratmillimeter im Stoßwellenfokus gemessen werden kann (Gerdesmeyer et al., 2002c, Maier et al., 1998c).

2.4.3. Erzeugung der extrakorporalen Stoßwellen

Durch verschiedene Methoden werden extrakorporale Stoßwellen zur klinischen Anwendung erzeugt (Krause 1997) (Ogden et al., 2001c). Alle diese Verfahren haben das gemeinsame Ziel akustische Druckimpulse zu erzeugen und zu fokussieren. Mit der Fokussierung wird erreicht, das Therapiegebiet zu begrenzen, um die Nebenwirkungen der Stoßwellen möglichst gering zu halten (Wess 2004).

Die aktuellen Verfahren zur Erzeugung der extrakorporaler Stoßwellen werden im Folgenden dargestellt:

- Elektrohydraulisches Prinzip: Dieses Verfahren beruht auf der Funkentladung einer Elektrode unter Wasser, wodurch Plasmablasen entstehen. Durch diese Plasmablasen wird das umgebende Wasser komprimiert und es kommt zur Erzeugung der Stoßwellen, die über einen elliptischen Spiegel gebündelt und im Brennpunkt fokussiert werden (Abb. 2.6a).
- Elektromagnetisches Prinzip: Dieses Verfahren beruht auf mittels einer elektromagnetische Spule induzierte Wirbelströme, welche zu einer explosionsartigen Auslenkung einer kupferhaltigen Membran führt. Diese Membran komprimiert das umgebende, flüssige Medium. Die dadurch entstandene Stoßwelle wird mit einer akkustischen Linse fokussiert (Abb 2.6b).
- Piezoelektrisches Prinzip: Hierbei wird die Stoßwelle durch die pulsformige Bestromung der einzelnen in einer Kugelschale ausgelegten Piezokristalle erzeugt. Die einzelnen Druckwellen werden aufgrund der Anordnung der Kristalle in einem Fokus gebündelt (Abb 2.6c).
- Ballistisches Prinzip: Bei diesem Verfahren wird die Stoßwelle durch ein sich in einem Lauf befindliches Projektil erzeugt, welches mittels Pressluft sehr stark beschleunigt wird und auf einen Applikator trifft. Von diesem Applikator wird der Energieimpuls in das Gewebe fortgeleitet. Die Spitze des Applikators ist der Fokus, von dem aus sich die Druckwelle radiär in das Gewebe ausbreitet. Bei diesem Verfahren ist keine Fokussierung des Stoßwellenfeldes im Gewebe möglich. Der Druck und die Energiedichte nehmen mit zunehmender Eindringtiefe in das Gewebe ab (Abb 2.6d).



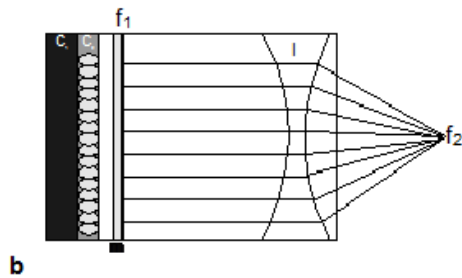
3.a: Elektrohydraulische Stoßwellenquelle:

Z: Zündkerze

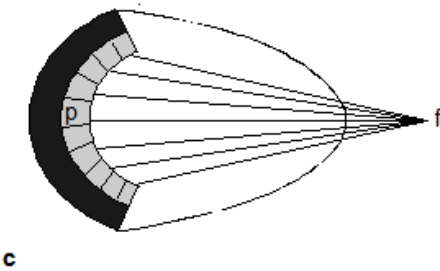
R: Reflektor

f₁: 1. Fokuspunkt

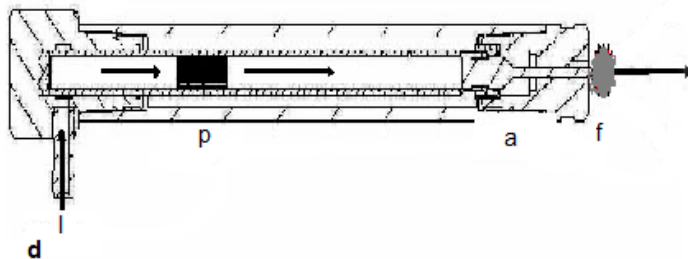
f₂: 2. Fokuspunkt



3.b: Elektromagnetische Stoßwellenquelle:
 C₁: Kondensator
 C₂: Spule
 l: Linse
 f₁: 1. Fokuspunkt
 f₂: 2. Fokuspunkt



3.c: Elektromagnetische Stoßwellenquelle:
 p: Piezokristalle
 f: Fokuspunkt



3.d: Ballistische Stoßwellenquelle:
 l: Druckluft
 p: Projektil
 a: Applikator
 f: Fokuspunkt

Abb. 2.6: Schematische Darstellung der verschiedenen Prinzipien der Stoßwellenquellen (eigene Darstellung in Anlehnung an Gerdesmeyer et al. 2002)

Für die vorliegende Arbeit wurden die Stoßwellen durch eine elektrohydraulische Stoßwellenquelle (Typ XL 1, Dornier Medizintechnik, Wessling, Deutschland) erzeugt. Die Funkentladung erfolgte in einem mit entionisiertem Wasser gefüllten Becken. Die Zielregion wurde mit zwei zueinander rechtwinklig angeordneter Laserstrahlen markiert.

2.4.4. Wirkung extrakorporaler Stoßwellen im biologischen Gewebe

Die biologische Wirkung der extrakorporalen Stoßwellen erfolgt unabhängig von der Erzeugerquelle durch einen direkten Effekt an den Grenzflächen und einen indirekten Effekt der Kavitation (Gerdesmeyer et al., 2002b, Howard and Sturtevant,

1997, Ogden et al., 2001a). Extrakorporale Stoßwellen haben hauptsächlich eine mechanische Wirkung. Die thermischen und chemischen Effekte spielen eine untergeordnete Rolle.

Die direkte Wirkung der extrakorporalen Stoßwellen findet an den Grenzflächen von Medien verschiedener akustischer Dichte (Impedanz) statt. Durch Reflexion, Brechung und Beugung wird kinetische Energie an den Grenzschichten freigesetzt. Je größer der Impedanzunterschied zwischen zwei Geweben, desto mehr mechanische Energie wird an der Grenzfläche erzeugt. Es ist auch entscheidend auf welcher Seite das Gewebe mit der größeren Impedanz liegt. Trifft eine Druckwelle auf ein Medium mit höher Impedanz (Knochen) so wird der größte Teil an akustischer Energie in dieses Medium (Knochen) fortgeleitet (Ueberle, 1997). Die Schallwellen werden an dieser Grenzfläche weniger reflektiert. Tritt auf der abgewandten Seite des Knochens, also aus einem Gewebe mit hoher Impedanz, die Stoßwelle in ein Gewebe mit niedriger Impedanz (z.B. Muskel) wird die akustische Energie zum größten Teil in das Gewebe mit hoher Impedanz zurück reflektiert und kumuliert mit den nachfolgenden späten Anteilen der Stoßwelle. Aus diesem Grund finden sich die meisten der stoßwellenindizierten mechanischen Wirkung auf der Stoßwellen abgewandten Seite (Gerdsmeyer et al., 2002a).

Der indirekte Effekt der extrakorporalen Stoßwellen entsteht durch Kavitation. Durch das Entstehen eines unter dem Umgebungsdruck liegenden Druckes in einer Flüssigkeit treten gasgefüllte Blasen auf, welche in der zweiten Phase der Stoßwelle unter dem Einfluß negativer Druckgradienten vorkommen. Nach der Normalisierung der Druckverhältnisse nach der Stoßwellenpassage kollabieren diese Blasen. Aus diesem Kollaps entstehenden Flüssigkeitströme (sog. Jetstreams), diese führen zur Freisetzung kinetischer Energie an Grenzflächen zweier unterschiedlicher Impedanzen (Gerdsmeyer et al., 2002f, Ueberle, 1997).

Wirkung auf Knochen

Erstmals wurde von Graff die Wirkung von Stoßwellen auf den Knochen am Os ilium untersucht, welches sich bei der Nierensteinzertrümmung im Behandlungsbereich befand. Seine Arbeitsgruppe konnte eine primäre Osteozytenschädigung und Knochenmarksnekrosen feststellen. Am 14. Tag nach der Stoßwellentherapie wurde eine erhöhte Osteoblastenaktivität nachgewiesen (Graff J, 1988, Graff J., 1989).

Die In vivo Experimente von Delius et al. 1995 und Ikeda et al. 1999 zeigten eine kortikale Knochenneubildung nach der Stoßwellentherapie. Die Studie von Tischer et al. 2002 bewies auch Knochenneubildungen außerhalb des Fokusbereiches der Stoßwelle. Die Arbeitsgruppe von Maier et al. 2004 zeigte eine erhöhte Knochenneubildung am intakten Knochen mit der Erhöhung der Energieflussdichte. Allerdings konnte der genaue molekulare Wirkungsmechanismus der extrakorporalen Stoßwellen noch nicht geklärt werden. Es wurde das Entstehen von Mikrofrakturen (Ikeda et al., 1999a), eine regionale Knochenblutungszunahme und Zunahme des Knochenstoffwechsels (Maier et al., 2004b) und auch eine erhöhte Ausschüttung der Substanz P (Goto et al., 1998) (Maier et al., 2003b) diskutiert.

Die Ergebnisse von Studien, die die Wirkung von Stoßwellen auf die Knochenheilung untersucht haben, waren sehr widersprüchlich. Einige Autoren beobachtete eine Verzögerung (Forriol et al., 1994b), andere Autoren eine Beschleunigung der Knochenheilung (Haupt et al., 1992b). Einige Autoren konnten gar keine Unterschiede zwischen behandelten oder unbehandelten Tieren feststellen (Augat et al., 1995a).

In einer weiteren Studie zeigten Chen et al. eine gesteigerte Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Osteoblasten und Chondrozyten nach einmaliger Stoßwellenbehandlung mit einer Energieflussdichte von $0,26 \text{ mJ/mm}^2$ (Chen et al., 2004c).

Wirkung auf Knorpelgewebe

Die Arbeitsgruppe von Väterlein untersuchte die lateralen Femurkondylen von Kaninchen nach Stoßwellentherapie und konnten keine pathologischen Veränderungen feststellen (Väterlein et al., 2000).

Wirkung auf Zellkulturen

Viele unterschiedliche Studien zeigten bei Osteoblastenzellkulturen nach Stoßwellentherapie mit hoher Energieflussdichte eine Abnahme der Viabilität, wobei Stoßwellen mit niedriger Energieflussdichte eine osteoblastäre Stimulation zeigten (Anstieg der alkalischen Phosphatase, vermehrte Osteocalcinproduktion), (Kusnierczak et al., 2000b, Martini et al., 2003).

Wang et al. konnten eine erhöhte Rate osteoblastischer Differenzierung mit einer Aktivierung der Ras-Kaskade und mit folgender vermehrter Expression des

osteogenen Transkriptionsfaktors *cbfa-1* feststellen, welches mit einer erhöhten Produktion des Wachstumsfaktors TGF- β 1 assoziiert war (Wang et al., 2001c, Wang et al., 2002a).

Es konnte außerdem gezeigt werden, daß durch die ESWT verschiedene „mitogen-activated protein-kinases“ (MAPK) aktiviert werden. Die „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) und die „p38 Kinase“ spielen eine wichtige Rolle bei Wachstum und Differenzierung von Osteoblasten, welche eine ESWT-induzierte Knochenbildung in Gang setzen (Chen et al., 2004a).

Die Rolle von TGF- β 1 bei der Knochenneubildung wurde bestätigt sowie eine vermehrte Produktion von VEGF-A im Bereich der ESWT gezeigt, wodurch es zu einer vermehrten Angiogenese kommt (Chen et al., 2004b).

Es wurde eine erhöhte Expression von FGF-2 und TGF- β 1 bei Fibroblasten und Osteoblasten nach ESWT festgestellt (Hausdorf et al., 2011b).

In einer Studien an Chondrozyten wurde eine dosisabhängige Zerstörung der Chondrozyten nach extrakorporaler Stoßwellentherapie gezeigt (Renz and Rupp, 2009).

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

Für diese Arbeit wurde humane mesenchymale Stammzellen (Lonza Walkersville, Inc., Maryland, USA) verwendet.

Die humane mesenchymale Stammzellen sind multipotente, potentiell hochproliferative Zellen und befinden sich im humanen Knochenmark. Die Zellen haben das Potential sich in Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten, Fibrozyten und Adipozyten zu differenzieren.

Dass es sich bei den verwendeten Zellen um mesenchymale Stammzellen handelt, wurde durch die Firma durch die Differenzierung in Richtung der chondrogenen, osteogenen und adipogenen Zelllinie nachgewiesen.

Allgemeine Bemerkungen

Um die notwendigen sterilen Bedingungen für die mesenchymale Stammzellen sicherzustellen, wurden die Zellkulturen unter einer Sicherheitswerkbank bearbeitet. Die verwendeten Medien und Lösungen wurde im Wasserbad bei 37°C erwärmt.

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Inkubator (CO₂ Inkubator - Binder, Deutschland).

Um die Zellpellets zu erzeugen, wurden die Zellsuspensionen für 5 min bei 1500 rpm und einer Temperatur von 20°C zentrifugiert.

3.1.1. Festlegung der Zellzahl

Die Zahl der Zellen wurde mittels einer Neubauer Zählkammer (Improved, Assistent, Deutschland; 0,100 mm, Tiefe Depth, 0,0025 mm²) festgelegt. Das resuspendierte Zellpellet wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Weil die intakten Zellen für den Farbstoff nicht durchlässig sind, konnten die intakten Zellen mittels Lichtmikroskop bestimmt werden. Die Zellzahl/ml wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{4} \times Vf \times 10^4$$

Vf= Verdünnungsfaktor= 2

3.1.2. Behandlung des Zellkulturmediums

Der Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte alle 3 Tage. Nach der Entfernung des gebrauchten Zellkulturmediums wurde die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die weitere Inkubation der Zellen erfolgte nach der Zugabe des ungebrauchten Zellkulturmediums.

3.1.3. Kultivierung der Zellen

Für die Zellpassage wurde eine Zellkonfluenz von ca. 80% erreicht. Nach dem Waschen der Zellen einmalig mit sterilem PBS wurde Trypsin/EDTA (1%) hingeführt. Die Zellen wurden 10 Minuten im Brutschrank inkubiert und danach lösten sie sich von der Kulturflasche. Dabei verloren die Zellen die Verbindung voneinander.

Die Kontrolle dieses Prozesses erfolgte mit einem Lichtmikroskop. Nach Zentrifugieren der Suspension wurde das Zellpellet zur weiteren Kultivierung in erneuten Kulturflaschen (175 cm²) aufgenommen. Dabei ergab die Zellzahl zwischen 1x10⁵ und 1,5x10⁶ Zellen.

3.1.4. Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Die Resuspension der Zellen erfolgte in 1,5 ml Einfriermedium (70% Zellkulturmedium, 20% FCS und 10% DMSO). Danach wurden die Zellen in Kryoröhrchen aufbewahrt. Die Entstehung von Kristallen während des Prozesses wurde durch DMSO vorgebeugt. Danach erfolgte Einfrieren der Zellen bei -80°C im Gefrierschrank (HERA freez (Heraeus, Thermo Elektron Korporation Deutschland)).

Zur erneuten Kultivierung wurden die eingefrorene Zellsuspensionen aus dem Gefrierschrank genommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut.

Durch die Verdünnung mit neuem Zellkulturmedium wurde die zytotoxische Wirkung des DMSO verhindert. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert und das dadurch entstandene Zellpellet wurde wieder mit PBS behandelt und in Zellkulturmedium abgegeben. Anschließend wurden die „triple“ Zellkulturflaschen (500cm²) mit Zellen von einer Anzahl von bis zu 1x10⁶/Kulturflasche besiedelt werden.

3.1.5. RNA Isolation

Zur RNA-Isolation wurden die humane mesenchmale Stammzellen der 5. Passage verwendet. Zur Auflösung der Zellen erfolgte durch Lysispuffer und danach wurden die Zellen bei -80°C aufbewahrt.

Die RNA-Isolierung für die Genexpressionsanalyse erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Niederlande) laut Herstelleranleitung. Mittels eines „Shredders“ (Qiagen, Niederlande) wurden grobe Partikel abgetrennt und das Lysat homogenisiert.

Die RNA wurde mit 70%igem Ethanol behandelt, mit „RPE“ und „RW1“ gepuffert. Die noch erhältliche DNA wurde mit Dnase verdaut.

Die Verdünnung der photometrisch bestimmte RNA-Konzentration erfolgte im Verhältnis 1:25. Die Konzentration der optischen Dichte (OD) wurde bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Die Abschätzung der Reinheit der RNA wurde durch die Bildung des Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Quotient über den Wert 1,6 blieb.

3.1.6. cDNA Synthese

1 µg RNA wurde zur cDNA-Synthese nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung mit dem „Reverse Transcription System“ (Fi. Promega, Mannheim) behandelt. Zu diesem Prozess wurde der „Mastermix“ und einem „Thermocycler“ (Fi Biorad, München) benutzt.

Die erstellten cDNA Transkripte wurden bis bei -20°C eingefroren und aufbewahrt.

3.1.7. Real-time PCR (Quantitative PCR)

Die Quantifizierung von mRNA aus Zellen und zum Vergleichen der Genexpression der einzelnen Gruppen erfolgte für die Strukturproteine Kollagen Typ I (alpha 2), Osteocalcin, Osteopontin, cbfa1 und alkalische Phosphatase mittels einer real-time PCR. Für dieses Prozess wurden Primersets (Fi. Search LC, Heidelberg), die Primer, Standard Stabilisatoren, Standards und eine positive Kontrolle enthielten, verwendet. Zur Detektion der Fluoreszenz wurde der Farbstoff Sybr Green I verwendet.

Als Berechnungsgrundlage der Effizienz eines jeden Laufes dienten jeweils 3 Standardverdünnungen (10^0 - 10^{-2}) die je doppelt angesetzt wurden. Um die Vergleichbarkeit einzelner Experimente sicherzustellen wurde ein Effizienzunterschied der einzelnen Läufe von 0,05 akzeptiert. Zur Durchführung der real-time PCR wurde das Gerät LightCycler 2.0 System (Fi. Roche, Mannheim) verwendet. Das verwendete Programm folgte nachstehenden Parametern (Baron, 2007):

| Schritt | Dauer | Temperatur | Zyklen |
|----------------|--------|------------|--------|
| Denaturierung | 10 min | 95°C | 1 |
| Amplifikation | 10 sec | 95°C | 35 |
| | 10 sec | 68°C | |
| | 16 sec | 72°C | |
| Schmelzkurven- | 0 min | 95°C | |
| Analyse | 10 min | 58°C | 1 |
| | 0 min | 95°C | |
| Kühlen | 30 min | 40°C | 1 |

Jeder Lauf wurde mit einer negativen Kontrolle durchgeführt.

Die nach jedem Experimentes verwendete Schmerzkurven analysierten die Reinheit die spezifische Amplifikationen zur Differenzierung der potenziellen Nebenprodukten. Zur Analyse der PCR-Daten wurde mit dem Programm „Roche Molecular Biochemicals Light cycler software version 3.5 nach der „fit point“ Methode verwendet. Die relative Quantifizierung des Zielgens erfolgte mithilfe des Housekeeping-Gens GAPDH, dessen Expression in der Zelle als konstant vorausgesetzt wird (Barber et al., 2005). Von jeder cDNA wurde als Referenzwert die Konzenration von GAPDH bestimmt und die cDNA-Konzentration darauf normiert (Kuhne and Oschmann, 2002). Die Expressionswerte wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2003 ausgewertet und graphisch dargestellt.

3.1.8. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung der Wachstumsfaktoren-Konzentrationen im Überstand der Zellkulturen erfolgte mittels ELISA für die Wachstumsfaktoren basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Transforming Growth Factor β (TGF β 1) nach dem Protokoll des Herstellers (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Der ELISA eignet sich durch seine hohe Sensitivität, um im Zellkulturüberstand die sehr geringen Konzentrationen der Proteine im Pikogramm-Bereich quantitativ nachweisen zu können. Dabei reagiert den zu messende Wachstumsfaktor in einer Antigen-Antikörper-Reaktion als Antigen mit einem monoklonalen Primärantikörper (capture antibody) der an einer Mikrotiterplatte anhaftet. Ein hinzugegebener, enzymgekoppelter Sekundärantikörper (detection antibody) bindet ebenfalls an den Wachstumsfaktor und katalysiert gleichzeitig eine Farbreaktion. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zu der Wachstumsfaktor-Konzentration und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Photometer bestimmt werden. Anhand einer Standardkurve wird die absolute Konzentration ermittelt.

3.1.9. Färbung nach von Kossa

Die Färbung nach von Kossa ist sowohl zur qualitativen Untersuchung der Mineralisation von Knochengewebe aber auch zum Nachweis von Mineralisation der Zellkulturen geeignet. Dabei werden die Kalziumionen in den Karbonaten und Phosphaten der anorganischen Interzellulärsubstanz gegen Silberionen ausgetauscht, welches anschließend zu metallischen Silber reduziert werden. Die kalkhaltigen Areale imponieren dann als schwarz-braune Knötchen.

Nach Abpipettieren des Mediums von der Kulturflasche wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen und 15 Minuten mit Methanol fixiert. Das Methanol wurde dann abpipettiert und anschließend wurde Aqua dest. für 20 Minuten abgegeben. Nachdem Aqua dest. abpipettiert wurde, wurden Kulturflaschen nun mit 5%iger Silbernitratlösung überschichtet und 40 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligen Spülen mit Aqua dest. folgte eine Zugabe von 1%iger Pyrogallussäure für 5 Minuten, welche für die Plasmafärbung nötig ist. Es schloss sich ein einmaliges Spülen mit Aqua dest. und die vierminütige Fixierung der Färberesultate mit 5%iger Natriumhydroxid (NaOH) an. Danach wurde mit Leitungswasser und Aqua dest. sorgfältig gewaschen. Abschließend folgte eine 10 minutige Kernfärbung mit Maygrünwaldlösung. Die Färbeergebnisse wurden fotografisch dokumentiert.

3.1.10. Statistische Analyse

Für jede Gruppe wurden der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) für alle Variablen berechnet. Die Gruppen wurden mittels ungepaartem t-Test verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software Graph Pad Prism Version 3.00 für Windows (Graph Pad Software, San Diego, USA).

3.2. Gruppeneinteilung

Die Gruppe 1 wurde mit 500 Impulsen bei 15 kV (entspricht einer Energieflußdichte von $0,5 \text{ mJ/mm}^2$), Gruppe 2 mit 500 Impulsen bei 25 kV (entspricht einer Energieflußdichte von $1,2 \text{ mJ/mm}^2$) und Gruppe 3 mit 0 Impulsen bei 0 kV der Stosswellenquelle XL1 der Firma Dornier MedTech (Wessling, Deutschland) behandelt.

Gruppen:

1. 15 kV, 500 Impulse
2. 25 kV, 500 Impulse
3. Kontrollgruppe, im Wasserbad mit 0 kV, 0 Impuls

3.3. Stoßwellenbehandlung

Die Zellen wurden unter Luftabschluß in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen in 3 ml Kunststoffröhrchen (Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland) gefüllt. Die Röhrchen wurden dann mittels eines Halters im Wasserbad (37° C , entgastes Wasser) der elektrohydraulischen Stoßwellenquelle XL 1 (Fa. Dornier MedTech, Wessling, Deutschland) positioniert. Die Feinjustierung im Fokus erfolgte mittels Laserpointer. Die Behandlungsgruppen erhielten 500 Impulse bei entweder 15 kV (entspricht einer Energieflußdichte von $0,5 \text{ mJ/mm}^2$) oder 25 kV (entspricht einer Energieflußdichte von $1,2 \text{ mJ/mm}^2$) angelegter Spannung und einer Frequenz von 3 Hz, die Kontrollgruppen wurden lediglich für den gleichen Zeitraum in das Wasserbad gehängt, aber nicht mit Stoßwellen behandelt. Nach der Stoßwellenbehandlung wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand als Sofortwert bei -20° C eingefroren und die Zellen mittels Trypan-Blau Färbung auf ihre Viabilität untersucht. Danach wurden von allen Gruppen jeweils 5×10^5 Zellen zur RNA-Isolierung verwendet und bei -80° C gelagert.

Weitere Zellkultivierung für ELISA: Die Zellen werden nach dreifachem Zellwaschen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen in 96-Loch-Platten (Fa. Nunc, Kamstrupvej, Dänemark) ausplattiert und die weitere Kultivierung erfolgte im Zellkulturmedium für

hMSC (AlphaMEM + 10% FCS). Nach 24h, 48h, 72h und 7d wurden die Überstände abpipettiert, bei -20°C tiefgefroren und die Zellen nach Trypsinierung gezählt.

Weitere Zellkultivierung für real-time-PCR: Nach dreifachem Zellwaschen werden die Zellen in verschiedener Dichte (5×10^5 Zellen für Tag 1; 3×10^5 Zellen für Tag 7 und 1×10^4 Zellen für Tag 21) in die Kulturflaschen (175 cm²; Fa. Nunc, Kamstrupvej, Dänemark) für die weitere Kultivierung im Zellkulturmedium für hMSC gegeben. Die Zellen werden direkt nach der Stoßwellenbehandlung, nach 1d, 7d und 21d nach Trypsinierung gezählt und diese jeweils von allen Gruppen 5×10^5 Zellen eine RNA-Isolierung durchgeführt und bei -80°C gelagert.

4. Ergebnisse

4.1. Viabilität der Stammzellen nach ESWT

Die Viabilität der Zellen nach Beschallung betrug im Mittel für die Gruppe 1 91,3%, für die Gruppe 2 83,3% und für die Kontrollgruppe (Gruppe 3) 97% (Abb. 4.1).

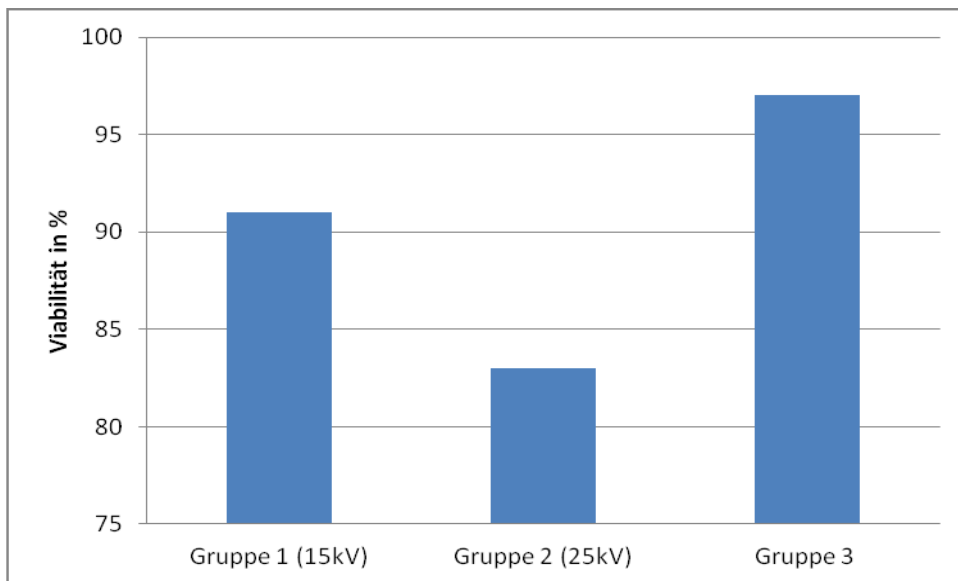


Abb. 4.1: Überlebensrate der mesenchymalen Stammzellen nach ESWT (Trypan-Blau Methode)

4.2. V. Kossa-Färbung der Stammzellen nach ESWT

Nach der Beschallung wurde ein Teil der mesenchymalen Stammzellen (1×10^4 Zellen) von jeweils 3 Gruppen in verschiedenen Kulturflaschen über 21 Tagen kultiviert. Nach 21 Tagen wurden bei den Zellen die v. Kossa-Färbung wie beschrieben durchgeführt, um eine Mineralisierung der behandelten Zellen festzustellen. Nach der Färbung wurden die Zellen in 20fach-Vergrößerung fotografiert (Abb. 4.2). Abbildung 4.2.b zeigte eine deutlichere Mineralisierung der Zellen der Gruppe 1 als Gruppe 2 und der Kontrollgruppe (Gruppe 3).

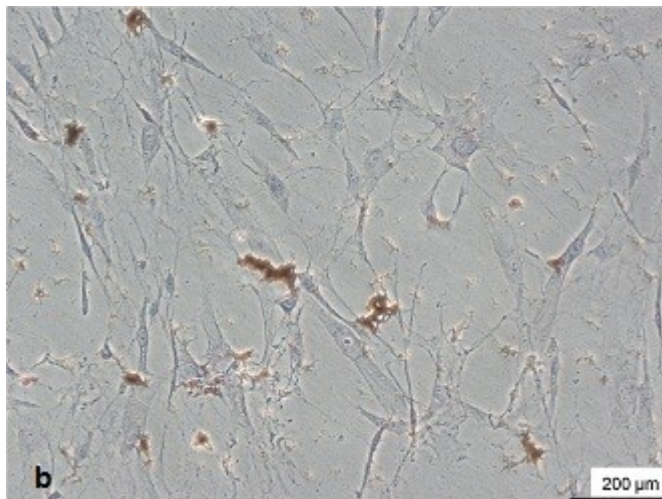
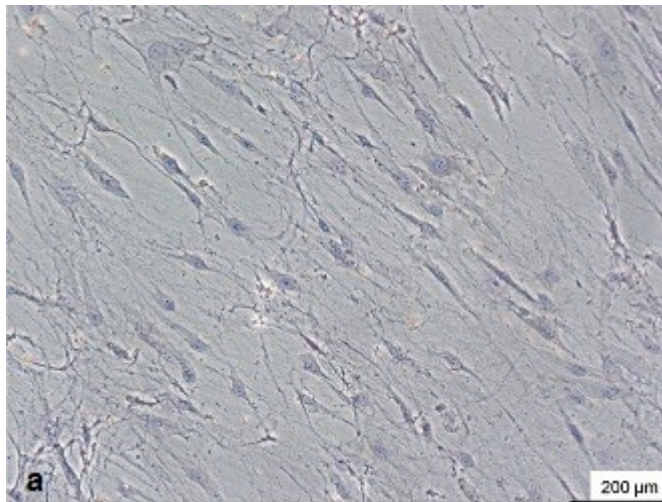


Abb. 4.2: Mesenchymale Stammzellen in der v. Kossa-Färbung; a: Kontrollgruppe (Gruppe 3), b: Gruppe 1, c: Gruppe 2

4.3. Genexpression der Stammzellen nach ESWT mittels RT-PCR

Berechnung der Gen-Expression über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die Messungen der Gen-Expression wurde direkt nach der Bestrahlung (Tag 0), 24h nach der Bestrahlung (Tag 1), 7 Tage nach der Bestrahlung (Tag 7), und 21 Tage nach der Bestrahlung durchgeführt (Tag 21).

Die untersuchte Gene sind Osteopontin, Osteocalcin, cbfa 1, Collagen 1alpha2 und alkalische Phosphatase.

Die Untersuchung der Auswirkung von extrakorporaler Stoßwellentherapie auf die Genexpression der untersuchten Gene erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der Betrachtung der Tage oder der Behandlungintensität. Beschrieben sind die Tendenzen, die sich aus den Abbildungen (s.u.) ergeben.

4.3.1. Osteopontin-Expression der Stammzellen nach ESWT

Die Zellen der Gruppe 1 und der Gruppe 2 zeigten eine deutliche erhöhte Osteopontin-Expression 24h nach der Bestrahlung gegenüber ihrer Kontrollgruppe und den anderen Zeitpunkten (Abb. 4).

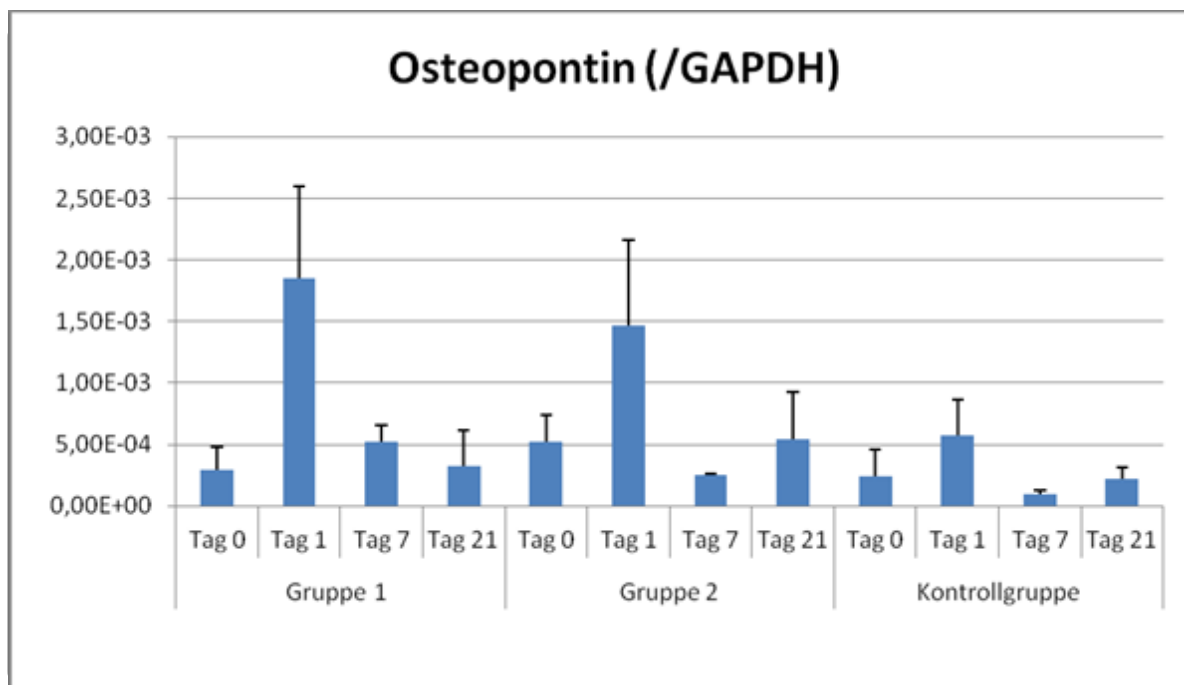


Abb. 4.3: Expression der Osteopontin-Gene bei den verschiedenen Gruppen an den Tagen 0, 1, 7 und 21.

4.3.2. cbfa 1-Expression der Stammzellen nach ESWT

Die Zellen der Gruppe 1 zeigten eine erhöhte Genexpression von cbfa 1 direkt nach der Bestrahlung und auch am 21. Tag.

Die Zellen der Gruppe 2 zeigten die gleiche Beobachtung der Genexpression, wobei die Genexpression direkt nach der Behandlung geringer und am 21. Tag höher als in Gruppe 1 zu sehen ist (Abb. 4.4).

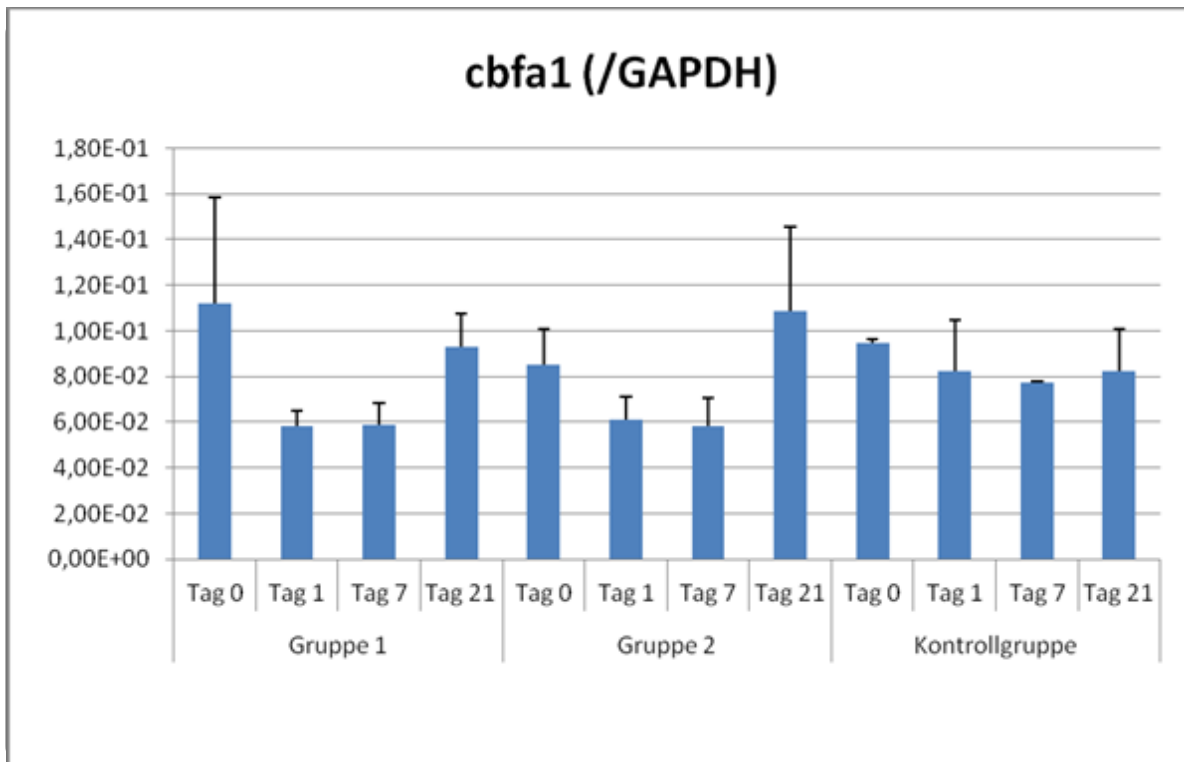


Abb. 4.4: Expression der cbfa 1-Gene bei den verschiedenen Gruppen an den Tagen 0, 1, 7 und 21.

4.3.3. Collagen 1alpha2-Expression der Stammzellen nach ESWT

Am 21. Tag zeigte sich eine erhöhte Gen-Expression von Collagen1alpha2 in Gruppe 1 und Gruppe 2. Die Zellen der Gruppe 2 zeigte eine gering erhöhte Genexpression gegenüber der Zellen der Gruppe 1 (Abb. 4.5).

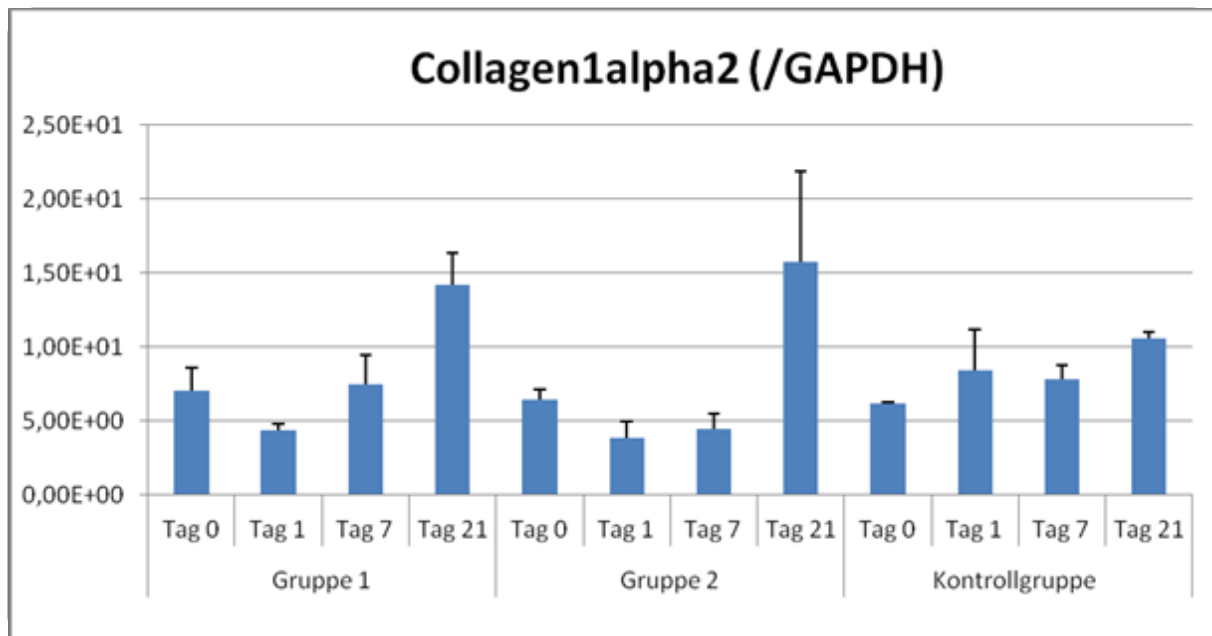


Abb. 4.5: Expression der Collagen1alpha2-Gene bei den verschiedenen Gruppen an den Tagen 0, 1, 7 und 21.

4.3.4. Osteocalcin-Expression der Stammzellen nach ESWT

Die Zellen der Gruppe 1 und 2 zeigten eine Erhöhung der Genexpression direkt nach der Bestrahlung, bei denen am ersten Tag ein Abfall und an den folgenden Tagen eine aufsteigende Tendenz der Genexpression beobachtet wurde. Zwischen der Gruppe 1 und Gruppe 2 ist eine weitgehend gleichmäßige Genexpression an allen Zeitpunkten zu sehen (Abb. 4.6).

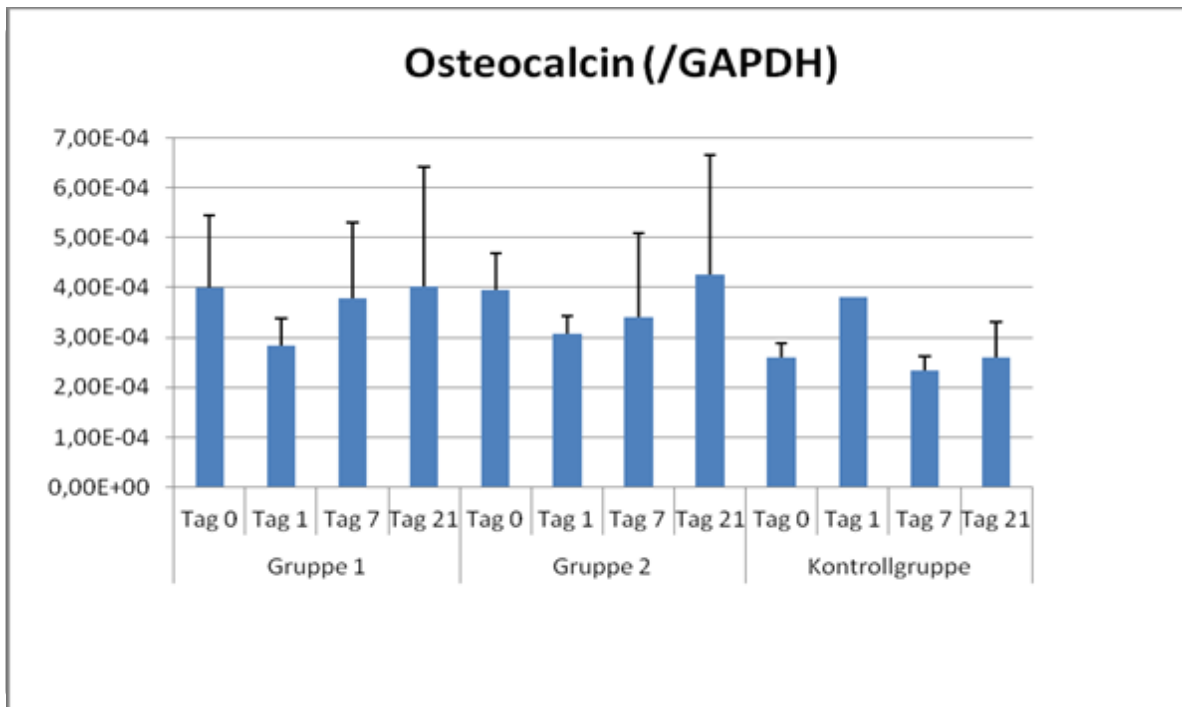


Abb. 4.6: Expression der Osteocalcin-Gene bei den verschiedenen Gruppen an den Tagen 0, 1, 7 und 21.

4.3.5. Alkalische Phosphatase-Expression der Stammzellen nach ESWT

Direkt nach der Behandlung zeigten die Zellen der Gruppe 1 und 2 eine erhöhte Genexpression der ALP. Die beiden Gruppen zeigten aber die höchste Genexpression am 21. Tag, wobei in der Gruppe 2 höhere ALP-Expression als in der Gruppe 1 beobachtet wurde (Abb. 4.7). Die Kontrollgruppe zeigte keine ALP-Aktivität.

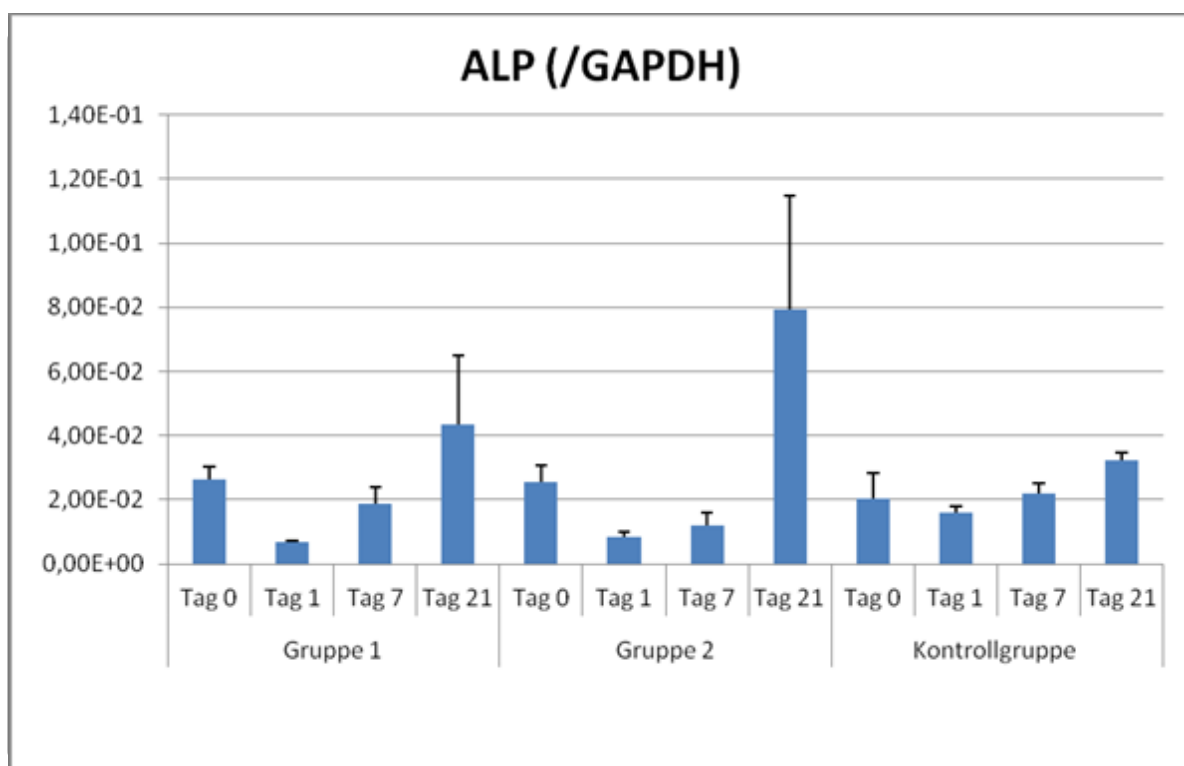


Abb. 4.7: Expression der ALP-Gene bei den verschiedenen Gruppen an den Tagen 0, 1, 7 und 21.

4.4. Untersuchung der Wachstumsfaktoren mittels ELISA

Die Bestimmung der Wachstumsfaktoren-Konzentrationen im Überstand der Kulturen erfolgte vor der Beschallung (prä) und 24h, 48h und 7d nach der ESWT mittels ELISA für die Wachstumsfaktoren basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) , Transforming Growth Factor β (TGF- β) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

4.4.1. Nachweis von bFGF-Produktion mittels ELISA

Die Abb. 4.8 zeigt den Verlauf der Konzentration von bFGF im Zellkultur-Überstand vor der ESWT bis 48h nach der ESWT. Ergänzend muss erwähnt werden, dass 7d nach der Beschallung keine bFGF-Produktion nachgewiesen werden konnte. In allen Gruppen steigt die Produktion der bFGF mit einem Maximum nach 24h gegenüber die Ausgangswerte (prä) und nach 48 h sinkt die Konzentration bereits wieder.

In der Gruppe 1 und 2 konnten signifikante Unterschiede von Konzentrationen nach 24h und 48h nach der ESWT gegenüber der Ausgangswerten festgestellt werden ($p < 0,05$). Der Unterschied nach 24h nach ESWT zwischen der Gruppe 2 und der Kontrollgruppe ist ebenfalls signifikant ($p < 0,05$).

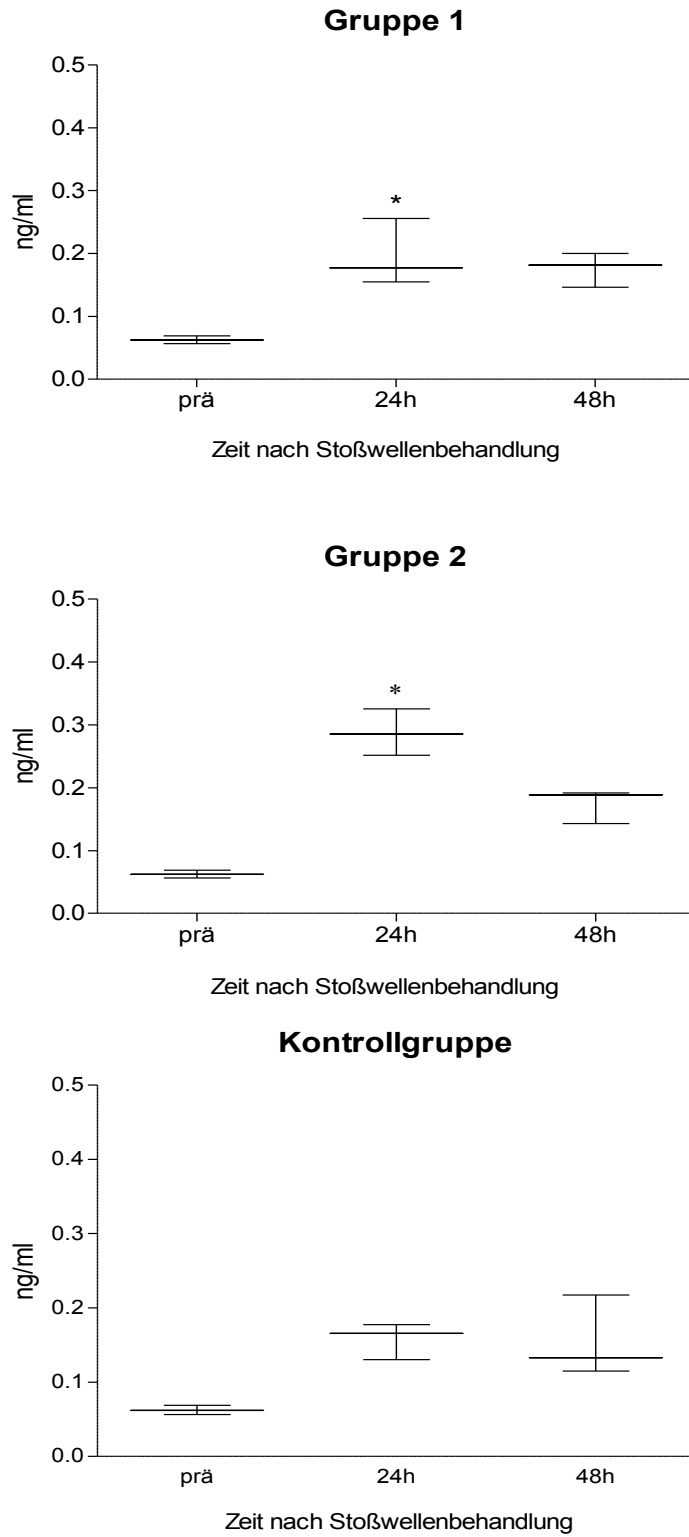


Abb. 4.8: bFGF Konzentrationen im Überstand der hMSCs (*= $p < 0,05$) (ELISA)

4.4.2. Nachweis von TGF- β 1-Produktion mittels ELISA

Die Abb. 4.9 zeigt den Verlauf der Konzentration von TGF- β 1 im Zellkultur-Überstand vor der ESWT bis 7d nach der ESWT. In allen Gruppen sieht man, dass die Produktion der TGF- β 1 bis 24h nach der Beschallung ansteigt, nach 48 h sich ihrem Ausgangswert nähert und dann am 7. Tag mit einem Maximum ansteigt.

Die TGF- β 1-Produktion 7d nach der ESWT in der Gruppe 1 zeigt einen signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppe 1 ($p < 0,05$) und im Gruppenvergleich gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

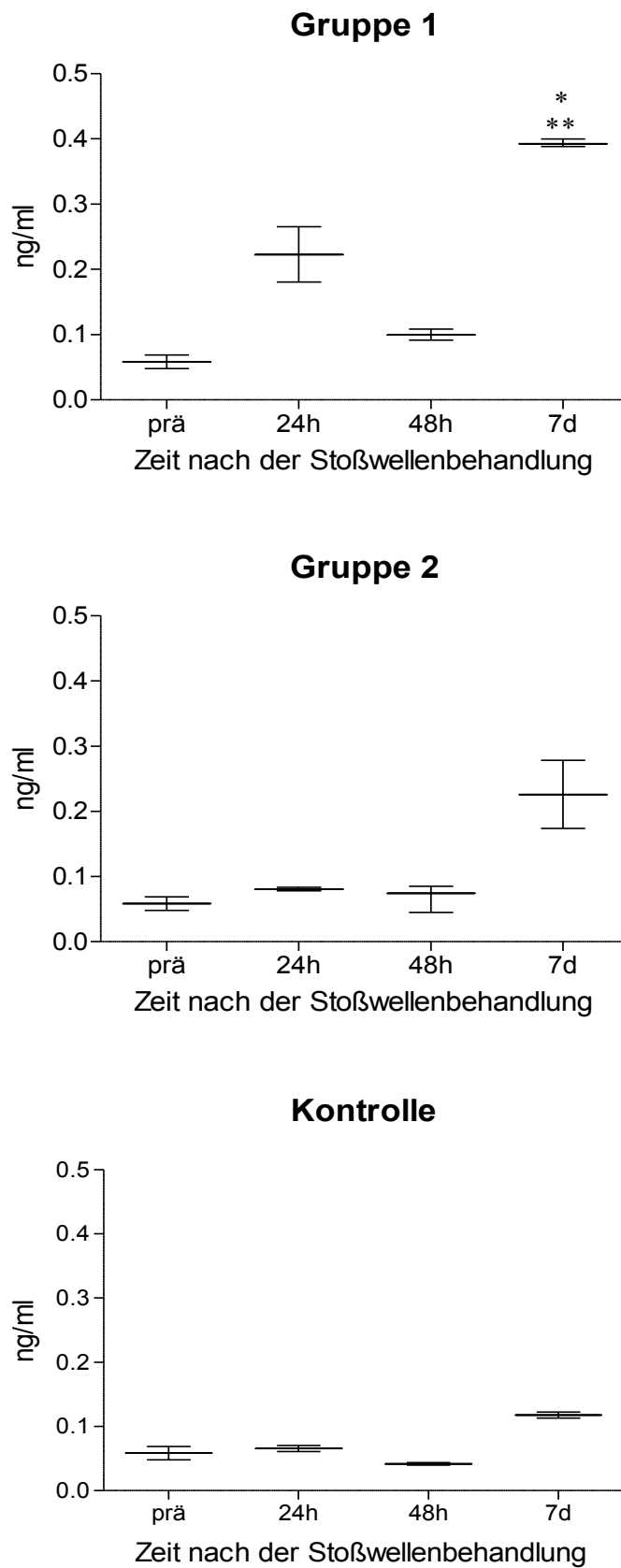


Abb. 4.9: TGF- β 1 Konzentrationen im Überstand der hMSCs (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$) (ELISA)

4.4.3. Nachweis von VEGF-Produktion mittels ELISA

Die Abb. 4.10 zeigt den Verlauf der Konzentration von VEGF im Zellkultur-Überstand von vor der ESWT bis 7d nach der ESWT. Es kam in allen drei Gruppen, auch in der Kontrollgruppe, zu einem kontinuierlichem Anstieg mit einer Ausnahme in der Gruppe 2 nach 48h nach der ESWT, wobei die Messung von VEGF das Konzentrationmaximum zeigt.

Alle Werte nach der ESWT in allen Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied gegenüber den Ausgangswerten ($p < 0,01$), sowie in der Gruppe 1 und 2 gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,01$). In der Gruppe 2 zeigen die Konzentrationen nach 48h und 7d einen signifikanten Unterschied gegenüber der Konzentration nach 24h nach der ESWT ($p < 0,01$). Die nach 24h gemessene Konzentration der Gruppe 1 zeigt im Gruppenvergleich ebenfalls einen signifikanten Unterschied zu diesem Zeitpunkt gegenüber der Gruppe 2 ($p < 0,05$).

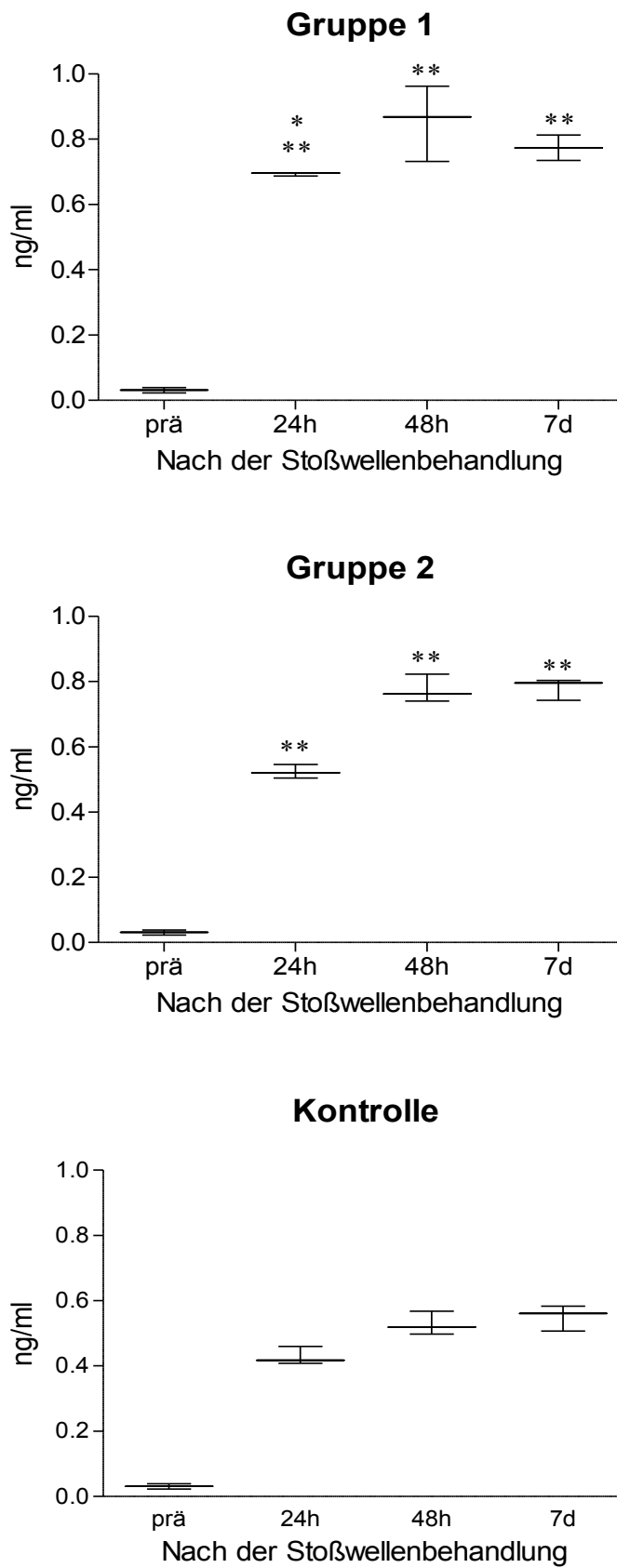


Abb. 4.10: VEGF Konzentrationen im Überstand der hMSCs (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$) (ELISA)

5. Diskussion

Wir konnten zeigen, dass humane mesenchymale Stammzellen auf eine Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen mit einer Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und einer geänderten Expression von Genen reagieren. Die osteogene Differenzierung konnte ohne den Zusatz osteoinduktiver Stimulanzen angeregt werden. Aufgrund der komplexen molekularen Prozesse können die physiologischen und pathophysiologischen Aspekte des Knochenstoffwechsels nur bedingt isoliert betrachtet werden. Die Verbesserung der Knochenheilung durch extrakorporale Stoßwellen ist bekannt und wurde bereits vor längerer Zeit in vielen verschiedenen Arbeiten untersucht (Valchanou und Michailov 1991, Haist et al. 1992, Schleberger und Senge 1992, Kaulesar Sukul et al. 1993 und Delius et al. 1995). Knochendefekte wurden daraufhin unabhängig von Stammzelltransplantationen mit extrakorporalen Stoßwellen behandelt, welche positive Ergebnisse der Knochenheilung bei Pseudarthrosen experimentell und klinisch (Wang et al. 2001, Bulut et al. 2006, Cacchio 2010), Osteonekrosen (Ma et al. 2007, Zhai et al. 2016) aber nicht sicher bei frischen Frakturen (Ikeda et al. 1999) zeigten.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen durch fokussierte Stoßwellen, welche zur Defektheilung knöcherner Pathologien beitragen könnten. Die Reaktion menschlicher Zellen ist im Vergleich zu tierischem Material besser auf eine humane in vivo Situation übertragbar. Im Bereich der tissue-engineering Forschung werden mesenchymale Stammzellen in der Hoffnung verwendet, um krankhaftes oder degeneriertes Eigenmaterial einerseits, Fremdmaterial andererseits zukünftig ersetzen zu können. Mesenchymale Stammzellen stellen nach einer langen Erprobungsphase heute eine vielversprechende Quelle für die Bildung komplexerer Gewebe dar. Die Forschung mit mesenchymalen Stammzellen stellt einen Schwerpunkt bei den chronisch-entzündlichen und degenerativen Knorpel- und Knochenkrankheiten dar, weil die Gewebeänderungen bei diesen Krankheiten medikamentös verlangsamt aber nicht aufgehalten werden können (Häupl et al. 2003). Humane mesenchymale Stammzellen sind im Vergleich zu differenzierten Zellen in ihrer Replikationsfähigkeit limitiert (Jaishanker et al. 2008) und dadurch entfremden sie sich weniger in ihren ursprünglichen Eigenschaften und bleiben charakteristisch. Es konnte in bisherigen Arbeiten eine Verbesserung der

Knochenheilung in atrophe Knochendefekte durch die Verwendung humaner mesenchymaler Stammzellen gezeigt werden (Funk et al. 2007). hMSCs sind aufgrund ihres Potentials zur osteogenen Differenzierung in großer Bedeutung für die Knochenneubildung (Bianco und Robey 2001). Wobei die Stammzellen am Stütz- und Bewegungsapparat generell auch in Chondrozyten, Adipozyten oder Fibroblasten differenzieren können (Barry and Murphy 2004). Spezifische Transkriptionsfaktoren regulieren die Differenzierung der hMSCs zu unterschiedlichen Zielgeweben. Cbfa 1 wird durch mesenchymale Zellen synthetisiert, welche zu Osteoblasten oder Chondrozyten differenzieren (Xiang et al. 2007). Es konnte bewiesen werden, dass Kollagen Typ1, Runx2, alkalische Phosphatase und Osteopontin durch hMSCs bei osteogener Differenzierung verstärkt exprimiert werden (Zhang et al. 2008). Bisher konnten hMSCs mittels Dexamethason oder Bone-morphogenic-Protein-2 (BMP-2) zur osteogenen Differenzierung angeregt werden (Koch et al. 2005).

Wie die hMSCs durch die extrakorporalen Stoßwellen auf molekularbiologischer Ebene beeinflusst werden, ist bisher unzureichend geklärt. In vorangegangenen Studien wurden vermehrt Veränderungen anderer, differenzierter Zelllinien wie Osteoblasten, Fibroblasten oder auch Endothelzellen untersucht (Hausdorf et al. 2011, Yahata 2016). In vorliegender Arbeit wurden bFGF, TGF- β 1 und VEGF als Wachstumsfaktoren und Osteopontin, Runx2 (Cbfa 1), Kollagen1alpha2, Osteocalcin und alkalische Phosphatase als Markergene der Knochenneubildung in vitro untersucht. In bisherigen Studien wurde gezeigt, dass mesenchymale Stammzellen durch extrakorporale Stoßwellentherapie zur vermehrten Freisetzung von Runx2, welches einen knochenspezifischen Transkriptionsfaktor darstellt, aktiviert werden können (Takashi et al. 2004). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Hyperpolarisierung der Zellmembran von immortalisierten Knochenmarkzellen durch extrakorporale Stoßwellen zur Ras-Aktivierung durchführt, welches die Expression von Runx2 zur Folge hat. In der gleichen Studie wurde auch der Negativ-Beweis geführt, dass Ras-negative Mutanten trotz Membran-Hyperpolarisation kein Runx2 oder kein Osteocalcin und damit keine Mineralisierung bilden (Wang et al. 2001(c)).

Der methodisch bedingte Zellverlust direkt nach ESWT entspricht den Daten der Literatur, wo die Viabilitätsraten von 70-95% angegeben werden (Johannes et al. 1994, Delius und Adams 1999, Wang FS et al. 2001). In vivo und klinisch kommt es

nicht zu diesen Zellverlusten, so dass die biologischen Effekte hier noch stärker sein dürften.

Die Kalzifikationen, die in den Zellen 21 Tage nach der Behandlung der mesenchymalen Stammzellen mit extrakorporaler Stoßwellen nachgewiesen werden konnten, sind ein typisches Merkmal von Osteoblasten und werden in undifferenzierten Stammzellen nicht gebildet (Mostafa et al. 2011). In der Literatur wurden verschiedene mechanische Belastungen untersucht, die mesenchymale Stammzellen in eine osteoblastische Zelllinie differenzieren können. Die zyklische Dehnung der Stammzellen verursachte eine vermehrte Expression von bFGF, Cbfa1 und ALP (Qi et al. 2009). Auch die Behandlung von mesenchymalen Stammzellen mit Scherkräften führte zu einer vermehrten Expression von osteoblastenspezifischen Markern wie Osteopontin und BMP-2 (Yourek et al. 2010). Der von den mesenchymalen Stammzellen gebildete VEGF und bFGF stellt bei der Differenzierung einen parakrinen Stimulationsweg dar, der die frühe Vasculogenese induziert (Kinnaird et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit ist die VEGF-Produktion der mesenchymalen Stammzellen nach ESWT intensitätsabhängig angestiegen. Dagegen war der Anstieg der bFGF-Produktion der mesenchymalen Stammzellen deutlich geringer als bei den Osteoblasten (Hausdorf et al. 2011). Eine mögliche Ursache kann dabei der autokrine Effekt von FGF bei mesenchymalen Stammzellen sein (Zaragosi et al. 2006).

In unserer Arbeit hatte die Expression der Osteoblasten-spezifischen Marker ALP und Kollagen 1 den Höhepunkt am 21. Tag nach ESWT. Ein weiterer Osteoblastenspezifischer Marker, Osteopontin, zeigte eine Aufregulierung bereits am 1. Tag nach der Behandlung mit Stoßwellen. Diese Resultate stimmen mit der Hypothese überein, dass die Behandlung der mesenchymalen Stammzellen initial zur Expression der osteoinduktiven Marker führt und erst im weiteren Verlauf die für die Knochensubstanzbildung notwendigen Proteine gebildet werden.

Als Schlussfolgerung aus der vorliegenden Studie und der Diskussion der vergleichbaren Studien lässt sich sagen, dass humane mesenchymale Stammzellen durch extrakorporale Stoßwellen zum einen zur Differenzierung in Richtung der osteoblastären Zelllinie angeregt werden. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Knochenwachstumsfaktoren und die Expression von Osteoblasten-spezifischen Markern auch in Stammzellen ausgelöst werden

kann. Darüber hinaus belegt diese Untersuchung die Hypothese, dass Knochenneubildung durch extrakorporale Stoßwellenbehandlung durchaus bei intakten Zellverbänden möglich sein kann und nicht auf das Setzen von morphologischen Schäden am Knochen angewiesen ist.

In der Zukunft könnten neben der direkten Behandlung von Knochenpathologien durch extrakorporale Stoßwellen am Patienten auch humane mesenchymale Stammzellen nach Entnahme *in vitro* in einer 3-dimensionalen Matrix mittels ESWT zur osteogenen Differenzierung angeregt werden, um dann wieder in Defekte eingesetzt zu werden. Somit könnte auf die Entnahme von z.B. Beckenkamm-Material mit entsprechender Morbidität und aber auch auf Fremdmaterial verzichtet werden.

6. Zusammenfassung

Die operative Therapie ist bis heute die Therapie der ersten Wahl bei der Knochenheilungsstörungen. Weil die unbefriedigenden Ergebnisse mit hohen Kosten und langen Leiden der Patienten bei dieser Therapie noch ein großes Problem in der Orthopädie darstellen, werden immer mehr alternative Therapien erforscht. Die extrakorporale Stoßwellentherapie könnte dabei als Therapiealternative in Frage kommen.

Die durchgeführte Untersuchung ist eine zellexperimentelle Studie an humanen mesenchymalen Stammzellen. Die folgende Hypothese wurde untersucht:

Die Applikation extrakorporaler Stoßwellen führt in vitro zur osteogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen.

Die Zellproben wurden über die Firma Lonza bestellt. Die kultivierten Zellen wurden fokussiert mittels Stoßwellen mit jeweils 500 Impulsen bei 15 kV (entspricht einer Energieflußdichte von 0,5 mJ/mm²) und bei 25 kV (entspricht einer Energieflußdichte von 1,2 mJ/mm²) behandelt.

Die Viabilität der beiden Gruppen nach der ESWT wurde mit der Trypan-Blau Methode bestimmt.

Die Mineralisierung der beschallten Zellen wurden nach 21d mittels v. Kossa-Färbung erfasst.

Mittels real-time-PCR wurde Genexpression der osteoblasten-typischen Markern (Osteopontin, cbfa1, Kollagen1, Osteocalcin und ALP) direkt nach der ESWT, und 1d, 7d und 21d nach der ESWT untersucht.

Mittels ELISA wurde die Konzentration der Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF und TGF- β) 1d, 2d und 7d nach der ESWT ermittelt.

In unserer Studie konnte eine aufsteigende Tendenz der Differenzierung zu Osteoblasten v.a. bei Osteopontin, ALP, Kollagen1 gezeigt werden.

Ein signifikanter Anstieg der Knochenwachstumsfaktoren konnte gezeigt werden:

Bei bFGF konnten signifikante Unterschiede 24h und 48h nach der ESWT gegenüber des Ausgangswertes gezeigt werden. Die Gruppe 2 zeigte auch einen signifikanten Unterschied gegenüber die Kontrollgruppe.

Bei TGF- β zeigte die Gruppe 1 7d nach der ESWT einen signifikanten Unterschied gegenüber des Ausgangswertes und der Kontrollgruppe.

Bei VEGF konnten signifikante Ergebnisse 24h, 48h und 7d nach der ESWT in beiden Gruppen gegenüber des Ausgangswertes und der Kontrollgruppe gezeigt werden.

Eine eindeutige Aussage zur Überlegenheit zwischen der beiden Gruppen konnte nicht getroffen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass humane mesenchymale Stammzellen durch ESWT zur osteogenen Differenzierung angeregt werden können. Die in unserer Studie gewonnenen molekularbiologischen Erkenntnisse können einen Beitrag zur Grundlagenforschung leisten, welche auch als prognostische Parameter für den Therapieerfolg benutzt werden könnten, sowie zur Therapieüberwachung. In der Zukunft könnte die autologen Stammzelltransplantation mit einer ESWT kombiniert werden, um den Heilungsprozess bei der operativen Versorgung der Knochenheilungsstörungen zu verbessern sogar zu verkürzen.

7. Literatur

Literaturverzeichnis

1. Ashton B A, Allen T D, Howlett C R, Eaglesom C C, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. Clin Orthop Relat Res 1980;294-307.
2. Augat P, Claes L, Suger G. In vivo effect of shock-waves on the healing of fractured bone. Clin Biomech (Bristol , Avon) 1995b; (10): 374-378.
3. Augat P, Claes L, Suger G. In vivo effect of shock-waves on the healing of fractured bone. Clin Biomech (Bristol , Avon) 1995a; (10): 374-378.
4. Bab I, Ashton B A, Gazit D, Marx G, Williamson M C, Owen M E. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. J Cell Sci 1986; (84): 139-151.
5. Bab I, Howlett C R, Ashton B A, Owen M E. Ultrastructure of bone and cartilage formed in vivo in diffusion chambers. Clin Orthop Relat Res 1984;243-254.
6. Baron, Christiba Dorothea: Extrakorporale Stosswellentherapie bei atropher Pseudoarthrose: ein in-vivo Modell am Kaninchen. Dissertation, LMU München, Medizinische Fakultät (2007)
7. Bennett J H, Joyner C J, Triffitt J T, Owen M E. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. J Cell Sci 1991; (99 (Pt 1)): 131-139.
8. Besch L, Bielstein D, Schuckart M, Zenker W. [Analysis of 55 post-traumatic pseudarthroses after tibial fracture]. Zentralbl Chir 1994; (119): 702-705.
9. Beutler S, Regel G, Pape H C, Machtens S, Weinberg A M, Kremeike I, Jonas U, Tscherne H. [Extracorporeal shock wave therapy for delayed union of long bone fractures - preliminary results of a prospective cohort study]. Unfallchirurg 1999; (102): 839-847.
10. Bosch P, Musgrave D S, Lee J Y, Cummins J, Shuler T, Ghivizzani T C, Evans T, Robbins T D, Huard. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. J Orthop Res 2000; (18): 933-944.
11. Bourque W T, Gross M, Hall B K. Expression of four growth factors during fracture repair. Int J Dev Biol 1993; (37): 573-579.
12. Brashear H R. TREATMENT OF UNUNITED FRACTURES OF THE LONG BONES; DIAGNOSIS AND PREVENTION OF NON-UNION. J Bone Joint Surg Am 1965; (47): 174-178.
13. Bruder S P, Caplan A I. A monoclonal antibody against the surface of osteoblasts recognizes alkaline phosphatase isoenzymes in bone, liver, kidney, and intestine. Bone 1990; (11): 133-139.

14. Caplan A I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; (9): 641-650.
15. Caplan A I, Bruder S P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001; (7): 259-264.
16. Chaussy C, Schmiedt E, Jocham D, Brendel W, Forssmann B, Walther V. First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *J Urol* 1982a; (127): 417-420.
17. Chaussy C, Schmiedt E, Jocham D, Brendel W, Forssmann B, Walther V. First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *J Urol* 1982b; (127): 417-420.
18. Chaussy C, Schmiedt E, Jocham D, Brendel W, Forssmann B, Walther V. First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *J Urol* 1982c; (127): 417-420.
19. Chen Y J, Kuo Y R, Yang K D, Wang C J, Sheen Chen S M, Huang H C, Yang Y J, Yi-Chih S, Wang F S. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 kinase in shock wave-promoted bone formation of segmental defect in rats. *Bone* 2004a; (34): 466-477.
20. Chen Y J, Wurtz T, Wang C J, Kuo Y R, Yang K D, Huang H C, Wang F S. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J Orthop Res* 2004b; (22): 526-534.
21. Chen Y J, Wurtz T, Wang C J, Kuo Y R, Yang K D, Huang H C, Wang F S. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J Orthop Res* 2004c; (22): 526-534.
22. Cho T J, Gerstenfeld L C, Einhorn T A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002; (17): 513-520.
23. De B C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten F P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; (44): 1928-1942.
24. Eisenberger F, Chaussy C. Contact-free renal stone fragmentation with shock waves. *Urol Res* 1978; (6): 111.
25. Erices A, Conget P, Minguell J J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; (109): 235-242.
26. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; (25): 581-611.
27. Ferrari G, Cusella-De A G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; (279): 1528-1530.

28. Folberth W, Kohler G, Rohwedder A, Matura E. Pressure distribution and energy flow in the focal region of two different electromagnetic shock wave sources. *J Stone Dis* 1992; (4): 1-7.
29. Forriol F, Solchaga L, Moreno J L, Canadell J. The effect of shockwaves on mature and healing cortical bone. *Int Orthop* 1994b; (18): 325-329.
30. Forriol F, Solchaga L, Moreno J L, Canadell J. The effect of shockwaves on mature and healing cortical bone. *Int Orthop* 1994a; (18): 325-329.
31. Forssmann B, Hepp W, Chaussy C, Eisenberger F, Wanner K. [A method for no-contact destruction of kidney stones by means of shock waves (author's transl)]. *Biomed Tech (Berl)* 1977; (22): 164-168.
32. Friedenstein A J, Petrakova K V, Kurolesova A I, Frolova G P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; (6): 230-247.
33. Gerdesmeyer L, Maier M, Haake M, Schmitz C. [Physical-technical principles of extracorporeal shockwave therapy (ESWT)]. *Orthopade* 2002d; (31): 610-617.
34. Gerdesmeyer L, Maier M, Haake M, Schmitz C. [Physical-technical principles of extracorporeal shockwave therapy (ESWT)]. *Orthopade* 2002c; (31): 610-617.
35. Gerdesmeyer L, Maier M, Haake M, Schmitz C. [Physical-technical principles of extracorporeal shockwave therapy (ESWT)]. *Orthopade* 2002b; (31): 610-617.
36. Gerdesmeyer L, Maier M, Haake M, Schmitz C. [Physical-technical principles of extracorporeal shockwave therapy (ESWT)]. *Orthopade* 2002a; (31): 610-617.
37. Gerdesmeyer L, Maier M, Haake M, Schmitz C. [Physical-technical principles of extracorporeal shockwave therapy (ESWT)]. *Orthopade* 2002f; (31): 610-617.
38. Gerdesmeyer L, Maier M, Haake M, Schmitz C. [Physical-technical principles of extracorporeal shockwave therapy (ESWT)]. *Orthopade* 2002e; (31): 610-617.
39. Gerdesmeyer L, Wagenpfeil S, Haake M, Maier M, Loew M, Wortler K, Lampe R, Seil R, Handle G, Gassel S, Rompe J D. Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of chronic calcifying tendonitis of the rotator cuff: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; (290): 2573-2580.
40. Goto T, Yamaza T, Kido M A, Tanaka T. Light- and electron-microscopic study of the distribution of axons containing substance P and the localization of neurokinin-1 receptor in bone. *Cell Tissue Res* 1998; (293): 87-93.
41. Graff J P J R K D. Effect of High-Energy Shock-Waves on Bony Tissue. *J Urolog Res* 1988 1988; (16): 252.

42. Graff J. Die Wirkung hochenergetischer Stoßwellen auf Knochen und Weichteilgewebe. 1989.
Ref Type: Unpublished Work
43. Haake M, Deike B, Thon A, Schmitt J. [Value of exact focusing of extracorporeal shock waves (ESWT) in therapy of tendinitis calcarea. A prospective randomized study]. *Biomed Tech (Berl)* 2001; (46): 69-74.
44. Haupt G. Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases. *J Urol* 1997; (158): 4-11.
45. Haupt G, Haupt A, Ekkernkamp A, Gerety B, Chvapil M. Influence of shock waves on fracture healing. *Urology* 1992b; (39): 529-532.
46. Haupt G, Haupt A, Ekkernkamp A, Gerety B, Chvapil M. Influence of shock waves on fracture healing. *Urology* 1992a; (39): 529-532.
47. Hausdorf J, Sievers B, Schmitt-Sody M, Jansson V, Maier M, Mayer-Wagner S. Stimulation of bone growth factor synthesis in human osteoblasts and fibroblasts after extracorporeal shock wave application. *Arch Orthop Trauma Surg* 2011a; (131): 303-309.
48. Hausdorf J, Sievers B, Schmitt-Sody M, Jansson V, Maier M, Mayer-Wagner S. Stimulation of bone growth factor synthesis in human osteoblasts and fibroblasts after extracorporeal shock wave application. *Arch Orthop Trauma Surg* 2011b; (131): 303-309.
49. Heller K D, Niethard F U. [Using extracorporeal shockwave therapy in orthopedics--a meta-analysis]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1998; (136): 390-401.
50. Heng B C, Cao T, Stanton L W, Robson P, Olsen B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner Res* 2004; (19): 1379-1394.
51. Howard D, Sturtevant B. In vitro study of the mechanical effects of shock-wave lithotripsy. *Ultrasound Med Biol* 1997; (23): 1107-1122.
52. Ikeda K, Tomita K, Takayama K. Application of extracorporeal shock wave on bone: preliminary report. *J Trauma* 1999a; (47): 946-950.
53. Ikeda K, Tomita K, Takayama K. Application of extracorporeal shock wave on bone: preliminary report. *J Trauma* 1999b; (47): 946-950.
54. Johannes E J, Kaulesar Sukul D M, Matura E. High-energy shock waves for the treatment of nonunions: an experiment on dogs. *J Surg Res* 1994a; (57): 246-252.
55. Johannes E J, Kaulesar Sukul D M, Matura E. High-energy shock waves for the treatment of nonunions: an experiment on dogs. *J Surg Res* 1994b; (57): 246-252.

56. Kanaan R A, Kanaan L A. Transforming growth factor beta1, bone connection. *Med Sci Monit* 2006; (12): RA164-RA169.
57. Kuner E H, Berwarth H, Lucke S V. [Treatment principles in aseptic pseudarthrosis]. *Orthopade* 1996; (25): 394-404.
58. Kusnierczak D, Brocai D R, Vettel U, Loew M. [Effect of extracorporeal shockwave administration on biological behavior of bone cells in vitro]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2000b; (138): 29-33.
59. Kusnierczak D, Brocai D R, Vettel U, Loew M. [Effect of extracorporeal shockwave administration on biological behavior of bone cells in vitro]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2000a; (138): 29-33.
60. Leung K S, Cheung W H, Zhang C, Lee K M, Lo H K. Low intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic activity of human periosteal cells. *Clin Orthop Relat Res* 2004;253-259.
61. Maier M, Aeverbeck B, Milz S, Refior H J, Schmitz C. Substance P and prostaglandin E2 release after shock wave application to the rabbit femur. *Clin Orthop Relat Res* 2003b;237-245.
62. Maier M, Aeverbeck B, Milz S, Refior H J, Schmitz C. Substance P and prostaglandin E2 release after shock wave application to the rabbit femur. *Clin Orthop Relat Res* 2003a;237-245.
63. Maier M, Durr H R, Kohler S, Staupendahl D, Pfahler M, Refior H J. [Analgesic effect of low energy extracorporeal shock waves in tendinosis calcarea, epicondylitis humeri radialis and plantar fasciitis]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2000b; (138): 34-38.
64. Maier M, Durr H R, Kohler S, Staupendahl D, Pfahler M, Refior H J. [Analgesic effect of low energy extracorporeal shock waves in tendinosis calcarea, epicondylitis humeri radialis and plantar fasciitis]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2000a; (138): 34-38.
65. Maier M, Hausdorf J, Tischer T, Milz S, Weiler C, Refior H J, Schmitz C. [New bone formation by extracorporeal shock waves. Dependence of induction on energy flux density]. *Orthopade* 2004b; (33): 1401-1410.
66. Maier M, Hausdorf J, Tischer T, Milz S, Weiler C, Refior H J, Schmitz C. [New bone formation by extracorporeal shock waves. Dependence of induction on energy flux density]. *Orthopade* 2004a; (33): 1401-1410.
67. Maier M, Milz S, Tischer T, Munzing W, Manthey N, Stabler A, Holzknicht N, Weiler C, Nerlich A, Refior H J, Schmitz C. Influence of extracorporeal shock-wave application on normal bone in an animal model in vivo. Scintigraphy, MRI and histopathology. *J Bone Joint Surg Br* 2002a; (84): 592-599.
68. Maier M, Milz S, Wirtz D C, Rompe J D, Schmitz C. [Basic research of applying extracorporeal shockwaves on the musculoskeletal system. An assessment of current status]. *Orthopade* 2002b; (31): 667-677.

69. Maier M, Stabler A, Lienemann A, Kohler S, Feitenhansl A, Durr H R, Pfahler M, Refior H J. Shockwave application in calcifying tendinitis of the shoulder--prediction of outcome by imaging. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000c; (120): 493-498.
70. Maier M, Steinborn M, Schmitz C, Stabler A, Kohler S, Pfahler M, Durr H R, Refior H J. Extracorporeal shock wave application for chronic plantar fasciitis associated with heel spurs: prediction of outcome by magnetic resonance imaging. *J Rheumatol* 2000d; (27): 2455-2462.
71. Maier M, Steinborn M, Schmitz C, Stabler A, Kohler S, Veihelmann A, Pfahler M, Refior H J. Extracorporeal shock-wave therapy for chronic lateral tennis elbow--prediction of outcome by imaging. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001; (121): 379-384.
72. Maier M, Ueberle F, Rupprecht G. [Physical parameters of extracorporeal shock waves]. *Biomed Tech (Berl)* 1998c; (43): 269-274.
73. Maier M, Ueberle F, Rupprecht G. [Physical parameters of extracorporeal shock waves]. *Biomed Tech (Berl)* 1998b; (43): 269-274.
74. Maier M, Ueberle F, Rupprecht G. [Physical parameters of extracorporeal shock waves]. *Biomed Tech (Berl)* 1998a; (43): 269-274.
75. Mark M P, Prince C W, Oosawa T, Gay S, Bronckers A L, Butler W T. Immunohistochemical demonstration of a 44-KD phosphoprotein in developing rat bones. *J Histochem Cytochem* 1987; (35): 707-715.
76. Martini L, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, De P M, Schaden W, Giardino R. Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblastlike cells. *Clin Orthop Relat Res* 2003;269-280.
77. Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem* 2005a; (95): 827-839.
78. Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem* 2005b; (95): 827-839.
79. Mayr E, Frankel V, Ruter A. Ultrasound--an alternative healing method for nonunions? *Arch Orthop Trauma Surg* 2000; (120): 1-8.
80. McCormack D, Lane H, McElwain J. The osteogenic potential of extracorporeal shock wave therapy. an in-vivo study. *Ir J Med Sci* 1996; (165): 20-22.
81. Nakahara H, Goldberg V M, Caplan A I. Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res* 1991; (9): 465-476.

82. Nakajima F, Ogasawara A, Goto K, Moriya H, Ninomiya Y, Einhorn T A, Yamazaki M. Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblast growth factor. *J Orthop Res* 2001; (19): 935-944.
83. Noth U, Osyczka A M, Tuli R, Hickok N J, Danielson K G, Tuan R S. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 2002; (20): 1060-1069.
84. Ogden J A, Toth-Kischkat A, Schultheiss R. Principles of shock wave therapy. *Clin Orthop Relat Res* 2001c;8-17.
85. Ogden J A, Toth-Kischkat A, Schultheiss R. Principles of shock wave therapy. *Clin Orthop Relat Res* 2001b;8-17.
86. Ogden J A, Toth-Kischkat A, Schultheiss R. Principles of shock wave therapy. *Clin Orthop Relat Res* 2001a;8-17.
87. Ohgushi H, Goldberg V M, Caplan A I. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res* 1989; (7): 568-578.
88. Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. *Bone and Mineral Research* 1985;1-25.
89. Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D, Moorman M A, Simonetti D W, Craig S, Marshak D R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; (284): 143-147.
90. Renz H, Rupp S. Effects of shock waves on chondrocytes and their relevance in clinical practice. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009; (129): 641-647.
91. Rompe J D, Hopf C, Kullmer K, witzsch U, Nafe B. [Extracorporeal shockwave therapy of radiohumeral epicondylopathy-- an alternative treatment concept]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1996a; (134): 63-66.
92. Rompe J D, Hopf C, Nafe B, Burger R. Low-energy extracorporeal shock wave therapy for painful heel: a prospective controlled single-blind study. *Arch Orthop Trauma Surg* 1996b; (115): 75-79.
93. Rompe J D, Rosendahl T, Schollner C, Theis C. High-energy extracorporeal shock wave treatment of nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 2001;102-111.
94. Rompe J D, Rumler F, Hopf C, Nafe B, Heine J. Extracorporeal shock wave therapy for calcifying tendinitis of the shoulder. *Clin Orthop Relat Res* 1995;196-201.
95. Runkel M, Rommens P M. [Pseudoarthrosis]. *Unfallchirurg* 2000; (103): 51-63.
96. Schaden W, Fischer A, Sailer A. Extracorporeal shock wave therapy of nonunion or delayed osseous union. *Clin Orthop Relat Res* 2001;90-94.
97. Schmiedt E, Chaussy C. Extracorporeal shock-wave lithotripsy of kidney and ureteric stones. *Urol Int* 1984; (39): 193-198.

98. Schwartzman V, Choi S H, Schwartzman R. Tibial nonunions. Treatment tactics with the Ilizarov method. *Orthop Clin North Am* 1990; (21): 639-653.
99. Solheim E, Pinholt E M, Andersen R, Bang G, Sudmann E. Local delivery of indomethacin by a polyorthoester inhibits reossification of experimental bone defects. *J Biomed Mater Res* 1995; (29): 1141-1146.
100. Steinbrech D S, Mehrara B J, Rowe N M, Dudziak M E, Luchs J S, Saadeh P B, Gittes G K, Longaker M T. Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats. *Plast Reconstr Surg* 2000; (105): 2028-2038.
101. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale F V, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland J L, Daugherty A, van B N, Redmond H P, Carano R A, Filvaroff E H. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; (99): 9656-9661.
102. Takahashi N, Wada Y, Ohtori S, Saisu T, Moriya H. Application of shock waves to rat skin decreases calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in dorsal root ganglion neurons. *Auton Neurosci* 2003; (107): 81-84.
103. Tam K F, Cheung W H, Lee K M, Qin L, Leung K S. Delayed stimulatory effect of low-intensity shockwaves on human periosteal cells. *Clin Orthop Relat Res* 2005; (438): 260-265.
104. Tamma R, Dell'endice S, Notarnicola A, Moretti L, Patella S, Patella V, Zallone A, Moretti B. Extracorporeal shock waves stimulate osteoblast activities. *Ultrasound Med Biol* 2009; (35): 2093-2100.
105. Tischer T, Milz S, Anetzberger H, Muller P E, Wirtz D C, Schmitz C, Ueberle F, Maier M. [Extracorporeal shock waves induce ventral-periosteal new bone formation out of the focus zone--results of an in-vivo animal trial]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2002a; (140): 281-285.
106. Tischer T, Milz S, Anetzberger H, Muller P E, Wirtz D C, Schmitz C, Ueberle F, Maier M. [Extracorporeal shock waves induce ventral-periosteal new bone formation out of the focus zone--results of an in-vivo animal trial]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2002b; (140): 281-285.
107. Ueberle F. Shock wave technology. In Siebert W, Buch M *Extracorporeal shock waves in orthopaedics* 1997; (In Siebert W, Buch M *Extracorporeal shock waves in orthopaedics*.): 59-87.
108. Valchanou V D, Michailov P. High energy shock waves in the treatment of delayed and nonunion of fractures. *Int Orthop* 1991; (15): 181-184.
109. Wakitani S, Saito T, Caplan A I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995; (18): 1417-1426.

110. Wang C J, Chen H S, Chen C E, Yang K D. Treatment of nonunions of long bone fractures with shock waves. *Clin Orthop Relat Res* 2001a;95-101.
111. Wang C J, Huang H Y, Chen H H, Pai C H, Yang K D. Effect of shock wave therapy on acute fractures of the tibia: a study in a dog model. *Clin Orthop Relat Res* 2001b;112-118.
112. Wang F S, Wang C J, Huang H J, Chung H, Chen R F, Yang K D. Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001c; (287): 648-655.
113. Wang F S, Wang C J, Huang H J, Chung H, Chen R F, Yang K D. Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001d; (287): 648-655.
114. Wang F S, Yang K D, Chen R F, Wang C J, Sheen-Chen S M. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1. *J Bone Joint Surg Br* 2002a; (84): 457-461.
115. Wang F S, Yang K D, Chen R F, Wang C J, Sheen-Chen S M. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1. *J Bone Joint Surg Br* 2002b; (84): 457-461.
116. Weiss S, Zimmermann G, Baumgart R, Kasten P, Bidlingmaier M, Henle P. Systemic regulation of angiogenesis and matrix degradation in bone regeneration--distraction osteogenesis compared to rigid fracture healing. *Bone* 2005; (37): 781-790.
117. Young H E, Steele T A, Bray R A, Hudson J, Floyd J A, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas P A, Black A C, Jr. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 2001; (264): 51-62.
118. Young R G, Butler D L, Weber W, Caplan A I, Gordon S L, Fink D J. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998; (16): 406-413.
119. Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell J W, Katz A J, Benhaim P, Lorenz H P, Hedrick M H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; (7): 211-228.
120. Zvaifler N J, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards C J, Moss J, Burger J A, Maini R N. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; (2): 477-488.

8. Anhang

8.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|---|
| Alpha-MEM | Biochrom, Berlin, Deutschland |
| Autoklav | H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland |
| Bacillol AF | Bode Chemie, Hamburg, Deutschland |
| Brutschrank | Binder, Tuttlingen, Deutschland |
| Cryomold 15x15x5 mm | Sakura, Zoeterwoude, Niederlande |
| Deckgläser | Menzel, Braunschweig, Deutschland |
| Einbettförmchen | |
| Cryomold 25x20x5 mm | |
| ELISA Analysegerät „microplate reader“ | MWG Biotech, München, Deutschland |
| Erlenmeyer Kolben | Schott Duran, Wertheim, Deutschland |
| Gefrierschrank | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Gigasept R AF | Schülke&Mayr, Norderstedt, Deutschland |

Heizblock Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Kamerasystem Axio Cam MRc 5 Zeiss, München, Deutschland

Kryo-Röhrchen Nunc, Kamstrupvej, Dänemark

Kryo-Thermogefäss Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland

Laborhandschuhe puderfrei Größe M

Lichtmikroskop, Modell Axioskop 40 Zeiss, München, Deutschland

Lichtmikroskop, Modell Axiovert 40 CFL Zeiss, München, Deutschland

Light cycler Kapillaren 20 µl Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland

Light cycler Zentrifugenadapter Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland

| | |
|--------------------------|---|
| Light cycler, Modell 2.0 | Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland |
|--------------------------|---|

Elektrohydraulische Stosswellenquelle Dornier Medizintechnik, Wessling, Deutschland
XL1

Neubauer Zählkammer Karl Hecht Assistnet, Altnau, Schweiz

Objektträger Menzel, Braunschweig, Deutschland

| | |
|--|---|
| Photometer, Modell Gen Quant II | Pharmazia Biotech, Cambridge, England |
| Pipetierhilfe 0,2 µl-2 µl | |
| 1 µl-10 µl | |
| 2 µl-20 µl | |
| 20 µl-100 µl | |
| 50 µl-200 µl | |
| 100 µl-1000 µl | Gilson, Middleton, USA |
| Pipetierhilfe elektrisch, Typ accu-jetR pro) | Brand, Wertheim, Deutschland |
| Pipettenspitzen (10ml, 100 ml, 1000 ml) | Gilson, Middleton, USA |
| RNase freie Pipettenspitzen | G.Kisker, Steinfurt, Deutschland |
| RNase freies Wasser | Ambion, Kassel, Deutschland |
| Schüttler, Modell MTS4 | IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland |
| Serumpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10ml, 25 ml) | Corning incorporated, New York, USA |
| Standardgesichtsmasken | Mölnlycke health care, Göteborg, Schweden |
| sterile Einwegpinzetten | Angiokard Medizintechnik, Freiburg, Deutschland |
| sterile Handschuhe | Semperit, Wien, Österreich |
| sterile Petri Schalen | Nunc, Kamstrupvej, Dänemark |
| sterile Pinzette | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |

| | |
|---|---|
| sterile Schere | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Sterilwerkbank, Modell Hera safe | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Teströhrchen 1,5 ml | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Tischzentrifuge, Modell 5417R | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Tissue-Tek | Sakura, Zoeterwoude, Niederlande |
| Wägebapier 9x11,5 cm | Macherey Nagel, Düren, Deutschland |
| Wärmeplatte | Medax, Rendsburg, Deutschland |
| Wasserbad | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Wasserstrahlpumpe | Brand, Wertheim, Deutschland |
| 96 Well-Platten | Nunc, Kamstrupvej, Dänemark |
| Zell Filter 100 µm | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien |
| Zellkulturflaschen (25 cm ² , 175 cm ² , 500 cm ²) | Nunc, Kamstrupvej, Dänemark |
| Zentrifuge, Multifuge, Modell 1L-R | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Zentrifugenröhrchen 15 ml | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zentrifugenröhrchen 50 ml | Beckton Dickson Labware, Le point de Claix, Frankreich |

8.2. Chemikalien und Reagenzien

| | |
|---|--|
| DNA „loading dye“ (6x) | Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland |
| DNA Leiter 100 bp (0,1 µg/µl) | Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Ethanol (Oberflächendesinfektion) | Apotheke Universität München Innenstadt, München, Deutschland |
| Ethanol 70% | Apotheke Universität München Innenstadt, München, Deutschland |
| Ethanol 96 % | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Ethanol 96% | Apotheke Universität München Innenstadt, München, Deutschland |
| Fötales Kälberserum (FCS) | PAA Laboratories, Pasching, Österreich |
| Hämalaun n. Meyer Lösung | Apotheke Universität München Innenstadt, München, Deutschland |
| L-Glutamin 200mM | Biochrom, Berlin, Deutschland |
| Light cycler FastStart DNA Master _{PLUS} | Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland |

SYBR Green I

Maygrünwaldlösung

Methanol

2-Mercaptoethanol Sigma-Aldrich, Steinheim,
Deutschland

NaOH 5%

Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml Biochrom, Berlin, Deutschland

Phosphat-gepufferte-Salzlösung Biochrom-Seromed, Berlin,
(PBS) Deutschland

Pyrogalluslösung 1%

Rnase Inaktivierungsspray Ambion, Kassel, Deutschland
Sibernitratlösung 5%

TAE Puffer (10x) Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Trypan Blau 0,4% Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Trypsin/EDTA Lösung (10x) Biochrom, Berlin, Deutschland

Tween 20 Merck, Darmstadt, Deutschland

8.3. Fertigkombinationen von Biochemikalien

dNTP Set Fermentas, St. Leon-Rot,
Deutschland

| | |
|--|------------------------------------|
| Light cycler primer Set | Search LC, Heidelberg, Deutschland |
| Reverse Transkription System | Promega, Madison, USA |
| RNeasy Mini Kit | Quiagen, Hiden, Deutschland |
| ELISA DuoSet | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis Sample Kit | Roche, Mannheim, Deutschland |

8.4. Medien

Zellkulturmedium für hMSC:

- Alpha-MEM
- + 10% FCS
- + 60 IU/ml Penicillin/Streptomycin
- + 2mM L-Glutamin

Einfriermedium:

- 70% Zellkulturmedium für Alpha-MEM
- 20% FCS
- 10% DMSO

8.5. Primer

| Gen | Lot-Nummer | Firma |
|-------------|------------|-----------|
| Human GAPDH | 290409 | Search LC |

| | | |
|---|--------|-----------|
| Human KOLLAGEN 1 - APHA 2 | 271108 | Search LC |
| Human OSTEOCALCIN | 150509 | Search LC |
| Human OSTEOPONTIN | 150509 | Search LC |
| Human RUNX2 (CBFA 1) | 280109 | Search LC |
| Human ALP (alkalische Phosphatase) | 280109 | Search LC |

Tabelle 1: Primer für die relative Quantifizierung durch „real-time“ PCR

8.6. DuoSet ELISA

| Wachstumsfaktoren | Katalognummer | Firma |
|-------------------------|---------------|-------|
| Human VEGF | DY293B | R&D |
| Human bFGF | DY233 | R&D |
| Human TGF- β 1 | DY240 | R&D |

Tabelle 2: Wachstumsfaktoren für die ELISA

8.7. Computerprogramme

Microsoft Office:

Excel version 2007

Word version 2007

Powerpoint version 2007

Graph Pad Prism 3.0 u. 5.0

Roche Molecular Biochemicals Light
cycler software version 3.5

Reference Manager 11

Softmax Pro 4

8.8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung

ALP: alkalische Phosphotase

bFGF: basic fibroblast growth factor

cbfa1: core binding factor alpha 1 (Runx 2)

EBM- Level 1: Evidenzbasierte Medizin Level 1

EFD: Energieflussdichte

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ESWL: extrakorporale Stoßwellenlithotripsie

ESWT: extrakorporale Stoßwellentherapie

Et al. : et al.: Et alii / et aliae (lat.), „und andere“

Graf. : Grafik

hMSCs: humane mesenchymale Stammzellen

IGF 1: Insulin like growth factor 1

mJ : Millijoule

mm² : Quadratmillimeter

MPa: Megapascal

ns: Nanosekunden

rt-PCR: real time Polymerase chain reaction

sog.: so genannt

s.u. : siehe unten

TGF-β1: Transforming growth factor β1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

9. Lebenslauf

Tolga Gören

- 1990 - 1995 Grundschule, I.A. Örnekal Istanbul
- 1995 - 2002 Gymnasium, Cagaloglu Anadolu Lisesi Istanbul
- 2003 - 2010 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 06/2007 - Promotion bei Herrn Prof. Dr. med. Dipl. –Ing. V. Jansson, im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie
- 2010 - 2013 Assistenzarzt in der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie im Krankenhaus Barmherzige Brüder
(CA: Prof. Dr. med. W. Plötz)
- 9/13 – 9/14 Assistenzarzt in der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie am Klinikum Schwabing
(CA: Dr. med. Eduard F. J. Höcherl)
- 9/14 – 5/18 Assistenzarzt in der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie im Krankenhaus Barmherzige Brüder
(CA: Prof. Dr. med. W. Plötz)
- 05/18 - Facharzt in der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie im Krankenhaus Barmherzige Brüder
(CA: Prof. Dr. med. W. Plötz)

10. Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson, Direktor der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Überlassung des Themas.

PD. Dr. med. Jörg Hausdorf möchte ich für die umfassende Betreuung meiner Dissertation und seine Erstbegutachtung danken.

Ich danke ganz herzlich Dr. med. Susanne Mayer, Julia Redeker, Birte Sievers und Bärbel Schmitt für die gute Zusammenarbeit. Sie standen mir bei allen Fragen zur Verfügung.

Ich bedanke mich bei Herrn Gerhard Adams vom Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität (jetzt Walter-Brendel-Institut) für die wissenschaftliche Beratung und für die praktische Unterstützung.

Bei meiner Frau Sevilcan bedanke ich mich vor allem für die moralische Unterstützung und für ihr unendlich großes Verständnis.

Ganz besonderer Dank geht auch an meinen Eltern und meinem Bruder, die mich trotz allen Schwierigkeiten bei meinem Medizinstudium und bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Für Aufmunterung und Motivation danke ich auch meinen Freunden, v.a. Herrn Mustafa Alp Türkoglu.

Eidesstattliche Versicherung

Gören, Tolga

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**EINFLUSS DER EXTRAKORPORALEN STOSSWELLENTHERAPIE AUF DIE
DIFFERENZIERUNG VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

27.07.2020

Ort, Datum

Tolga Gören

Unterschrift Doktorandin/Doktorand