

Stoßwelleninduzierte Mechanotransduktion bei humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs)

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

Yvonne Delhasse

Aus „Institut für Veterinär -Anatomie, Histologie und –Embryologie der Justus -
Liebig - Universität Gießen“
Betreuer: Prof. Dr. Dr. Arnhold

und

„Deutsche Sporthochschule Köln- Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin -
Abteilung Molekulare und Zelluläre Sportmedizin“
Betreuer: Prof. Dr. Bloch

Stoßwelleninduzierte Mechanotransduktion bei humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs)

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

Eingereicht von
Yvonne Delhasse
Tierärztin aus Köln

Gießen (2011)

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

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

**Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold
Prof. Dr. Wilhelm Bloch**

Tag der Disputation:

21.10.2011

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Köln, den 8. Juni 2011

Yvonne Delhasse

Danksagung

In dieser Danksagung wollte ich einem Menschen besonders danken, der mich nicht nur fachlich während der letzten drei Jahre begleitet hat, sondern der mir ein sehr guter Freund geworden ist. Einem Menschen dessen größte Leidenschaft und Passion die Wissenschaft war und der mir die letzten Wochen bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr gefehlt hat. Einem Menschen dem ich soviel zu verdanken habe und mit dem mich eine tiefe Freundschaft verbunden hat. Einen Menschen der mich im Herzen immer begleiten wird, Dr. Helmut Neuland.

Ein weiterer Mensch, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, ist meine Mama Gisela, einem Menschen der mich bedingungslos liebt und mir in schwierigen Situationen zur Seite stand. Einem Menschen der mit Güte und Liebe nicht zu überbieten ist und der mir die Kraft für meinen Lebensweg gibt. Meinem Freund Olli möchte ich für seine Geduld und seine Liebe danken und hoffe ich kann ihm die Liebe und Kraft zurückgeben, die er mir in dieser Zeit, zuteil hat werden lassen. Meiner Oma Mim danke ich für Ihre Lebensweisheit und ihr positives Gemüt, dass mir immer wieder ein Vorbild ist und mich immer wieder daran erinnert, dass das Leben ein Geschenk ist und wir jeden Tag genießen sollten. Meinem Stiefvater Peter danke ich für seine Unterstützung und das er hinter mir steht und dafür das er in unser Leben getreten ist.

Einen besonderen Dank möchte ich an die Firmen Storz Medical AG, Richard Wolf GmbH und Elektro Medical System GmbH für die Bereitstellung der Geräte, der finanziellen Unterstützung meiner Arbeit, sowie der Ermöglichung der Teilnahme und der Präsentation meiner Daten an den internationalen Kongressen der ISMST in Toronto, Antibes und Sorrento richten. Des Weiteren möchte ich besonders Herrn Prof. Dr. Bloch und Herrn Prof. Dr. Dr. Arnhold für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung bedanken. Einen weiteren Dank gilt der liebevollen Einarbeitung ins Labor von Dr. Caroline Steingen und Anika Voß sowie Dr. Annette Schmidt, die mich in meiner Anfangszeit begleitete. Zum Abschluss möchte ich mich ganz herzlich bei dem Team der Orthopädischen Klinik (Dreifaltigkeitskrankenhaus) in Köln, für die nette Zusammenarbeit, die vielen Hüftköpfe und für den Spitznamen der „Knochenjägerin“ bedanken.

Für meine liebe Mama Gisela

„Die Vorbedingung für alles wirkliche Wissen ist ein präzises Unterscheidungsvermögen für die Grenze zwischen dem, was man wirklich weiß, und dem, was man bloß meint.“

Konfuzius, Gespräche Lunyü

Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) verfügen über ein hohes therapeutisches Potential und werden deshalb im Bereich der Transplantationsmedizin eingesetzt. Der therapeutische Erfolg ist jedoch durch die geringe Anzahl von MSCs, die ihr Zielgebiet erreichen limitiert (Hofmann, et al., 2005). Einer direkten Applikation ins Zielgewebe, stehen die Erkenntnisse von Breitbach et al. entgegen, die am Herzen Ossifikationsprozesse nach intrakardialer MSC-Transplantation zeigen konnten (Breitbach, et al., 2007). Eine Effizienzsteigerung der Therapie könnte über die Verbesserung der Migration von MSCs erfolgen. Dieser Ansatz soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Da MSCs eine hohe Sensitivität für mechanische Stimuli zeigen (Friedl, et al., 2007), soll untersucht werden, ob sich das Migrationsverhalten von MSCs mit fokussierter Stoßwelle (SW) und/oder Druckwelle (DW) *in vitro* beeinflussen lässt. Voraussetzung dafür ist die Etablierung eines instrumentellen Versuchsaufbaus, der reproduzierbare und vergleichbare SW/DW-Beschallung von MSCs *in vitro* gewährleistet. Im Fokus stehen dabei die physikalischen Anforderungen des Versuchsaufbaus, die biologischen Ansprüche der Zellen sowie der physiologischen Aspekte der Mechanotransduktion *in vitro*. Der Hauptfokus der Arbeit liegt in der Untersuchung der Wirkung von SW und DW auf zellbiologische Prozesse, am Beispiel von MSCs. Es sollen dosiswirkungsspezifische und zeitabhängige Veränderungen der Zellen in Hinblick auf Mechanotransduktion untersucht werden. Das Hauptaugenmerk der Arbeit soll dabei auf der Untersuchung der Veränderung des Aktinzytoskeletts und dem Migrationsverhalten liegen. Für die Untersuchungen wurden piezoelektrisch- und elektromagnetisch generierte SW und ballistische DW (radiale Stoßwelle) eingesetzt und deren zellbiologischen Effekte, zeit- und dosisabhängig verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass sich MSCs signifikant über SW und DW in ihren zellbiologischen Prozessen beeinflussen lassen. Es konnten zeitabhängige dosiswirkungsbeziehungen festgestellt werden. Diese konnten die zellphysiologischen Vorgänge in verschiedene Richtungen beeinflussen. Die Ergebnisse wurden kumulativ von allen Beschallungsparametern (Energiedichte, Gesamtimpulsanzahl und Frequenz) mit beeinflusst. Die Vergleiche der einzelnen SW-DW-Applikationen ergaben Unterschiede, sowohl in der Breite des Wirkspektrums, als auch im Maß der Effizienz. Des Weiteren ergaben sich bei der Untersuchung der Seneszenz signifikante Erhöhungen bei DW-Applikation, welche bei den untersuchten SW ausblieb. Es kam bei SW-DW-Behandlungen, im Vergleich zu den unbeschallten Kontrollen, zu signifikanten Veränderungen des F-Aktinzytoskeletts und der Migration. Ebenfalls zeigten sich signifikante Veränderungen in der Kinese, sowie der Proliferations- und Apoptoserate von MSCs. Die gezielte Vorbehandlung mit SW/DW kann somit das Migrationsverhalten von MSCs *in vitro* beeinflussen. Die klinische Relevanz der Arbeit liegt in der möglichen Vorbehandlung von MSCs vor Reimplantation, welches mittels weiterer Untersuchungen, wie Kokultivierungsexperimente und Tierversuchsmodellen, überprüft werden müsste.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) have a high therapeutic potential and are therefore used in the field of transplantation medicine. The therapeutic success is limited by the small number of MSCs reaching their target area (Hofmann, et al., 2005). The findings of Breitbach et al., which showed heart ossification processes after intracardiac MSCs transplantation (Breitbach, et al., 2007), discourage a direct application to the target tissue. On the other hand, enhancing MSCs migration may increase the efficiency of the therapy. This approach will be investigated hereby. Given that MSCs display a high sensitivity to mechanical stimuli (Friedl, et al., 2007), we shall examine whether MSCs migration behaviour *in vitro* can be influenced with focused shock waves (SW) and / or pressure waves (PW). To that end, it will be necessary to establish an instrument experimental setup that guarantees the reproducible and comparable SW / PW-sonication of *in vitro* MSCs. Special attention should be placed on the physical requirements of the experimental setup, the cell biological constraints, and the physiological aspects of the *in vitro* mechanical transduction. The main focus of this work is to study the effects of SW and PW on cellular processes, using MSCs as an example. In particular, we shall examine any time-dependent and dose-level specific cell changes induced by mechanical transduction. In this study, we shall primarily concentrate on the analysis of actin cytoskeleton and migratory behaviour changes. Piezoelectric and electro-magnetically generated SW and ballistic PW (radial shock wave) were used in this study, comparing their time and dose-dependent cell biological effects. Amongst our findings, we uncovered that the presence SW and PW has a significant influence on the cell biological processes of the MSCs. Therefore, we managed to establish time-dependent dose-level relationships. These could influence the cell physiological processes in different directions. The results were cumulatively influenced by all acoustic parameters (energy density, total pulse number, and frequency). The comparisons of the individual SW-PW applications showed differences in the activity spectrum width as well as in the degree of efficiency observed. Furthermore, senescence investigations evidenced material increases upon PW application, which were not observed under SW. SW-PW treatments showed significant changes in the f-actin cytoskeleton and migration behaviour compared with non-sonicated treatments. Moreover, significant changes were observed in the kinesis, proliferation, and apoptosis of MSCs. Therefore, the targeted pre-treatment with SW / PW influences the migration behaviour of *in vitro* MSCs. The clinical relevance of this work lies in the possible pre-treatment of MSCs before re-implantation, which should be reviewed through further investigations including animal studies and co-cultivation experiments.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	01
1.1. Stoß- und Druckwellen.....	01
1.1.1. Geschichte der Stoßwelle in der Medizin.....	01
1.1.2. Wirkungen von Stoßwelle.....	04
1.1.3. Zellbiologische Erkenntnisse über Stoßwelle/ <i>in vitro</i>	05
1.2. Erkenntnisse über Mechanotransduktion.....	08
1.2.1. Mechanotransduktion.....	08
1.2.2. Biologische Relevanz der Mechanotransduktion.....	08
1.2.3. Mechanotransduktion im zellbiologischen Kontext	10
1.2.3.1. Mechanorezeption und – transduktion.....	10
1.3. Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs)	16
1.3.1. Charakterisierung humaner mesenchymaler Stammzellen	16
1.3.2. Therapeutische Anwendung mesenchymaler Stammzellen.....	18
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	20
2. Material und Methoden.....	23
2.1. Stoß- /Druckwellenapplikation (SW-/DW-Applikation).....	23
2.1.1. Stoß- /Druckwellen.....	23
2.1.2. Fokussierte Stoßwellenapplikation bei MSCs (<i>in vitro</i>).....	25
2.1.3. Kavitationsblasen.....	26
2.1.4. Generierung der fokussierten Stoßwelle.....	26
2.1.4.1. Das Piezoelektrisches Prinzip.....	27
2.1.4.2. Das Elektromagnetisches Prinzip.....	28
2.1.5. Radiale Stoßwellenapplikation bei MSCs (<i>in vitro</i>).....	28
2.1.6. Unterschied von Druck- und Stoßwelle	31
2.1.7. Versuchsaufbau der <i>in vitro</i> Beschallung.....	31
2.1.8. Methoden zur Intensitätenbestimmung der <i>in vitro</i> Beschallung.....	33
2.2. Zellkultur.....	34
2.2.1. Humane Mesenchymale Stammzellen (hMSCs).....	34
2.2.1.1. Isolierung von humanen MSCs.....	34
2.2.1.2. Kultivierung von MSCs.....	37
2.2.2. Fibroblasten (J23T3).....	37
2.2.2.1. Kultivierung von Fibroblasten.....	37

2.3. Qualitätskontrollen	39
2.3.1. Morphologische Beurteilung der MSCs	39
2.3.2. Quantitative Bestimmung der Oberflächenmoleküle von MSCs mit Durchflusszytometrieanalyse/ FACS-Analyse.....	40
2.3.3. Untersuchung des Koloniebildungsverhaltens von MSCs mittels Colony forming units-Fibroblast-Assay/ CFU-Assay.....	41
2.3.4. Untersuchung der Plastizität von MSCs mittels Differenzierungs-Assay.....	42
2.3.4.1. Nachweis der Knochenzellendifferenzierung von MSCs (Osteogene Differenzierung).....	42
2.3.4.1.1. Osteogene Differenzierung von MSCs.....	42
2.3.4.1.2. Nachweis von Kalziumhydroxylapatit mittels von Kossa-Färbung /Kernechtrotfärbung.....	43
2.3.4.2. Nachweis der Knorpelzellendifferenzierung von MSCs (Chondrogene Differenzierung).....	43
2.3.4.2.1. Chondrogene Differenzierung von MSCs.....	43
2.3.4.2.2. RNA-Isolation aus MSCs.....	44
2.3.4.2.3. Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung.....	45
2.3.4.3. Nachweis der Fettzellendifferenzierung von MSCs (Adipogene Differenzierung).....	46
2.3.4.3.1. Adipogene Differenzierung von MSCs	46
2.3.4.3.2. Lipidvakuolennachweis mittels Oil Red O- Färbung	47
2.4. Vitalitätsassays.....	47
2.4.1. Schnellvitalitätstest mit Trypanblau.....	47
2.4.2. Vitalitätstest mit 7-Aminoactinomycin (7-AAD).....	48
2.5. Untersuchung des Zellwachstums (Wachstumsrate).....	49
2.6. Immunhistochemische Untersuchungen von MSCs.....	50
2.6.1. Untersuchung der Proliferation mit Ki-67.....	50
2.6.2. Untersuchung der Apoptose mit Caspase-3.....	51
2.6.3. Entwicklung der Proben mit Diaminobenzidine-(DAB).....	51
2.7. Nachweis von Zellalterungsprozessen (Seneszenz) mittels Beta-Galaktosidase- Färbung.....	52
2.8. Visualisierung des Aktinzytoskeletts von MSCs mittels Phalloidin-färbung.....	53
2.8.1. Untersuchung der Ausrichtung der F-Aktinfasern.....	54
2.8.2. Untersuchung der Depolymerisierung der F-Aktinfasern.....	54

2.9.	Proteinchemische Methoden – Western Blot.....	54
2.9.1.	Herstellung der Zellextrakte	54
2.9.2.	Proteinbestimmung nach Lowry	55
2.9.3.	Separation der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	55
2.9.4.	Transfer der Proteine mittels Western Blot.....	55
2.9.5.	Immunfärbung der Proteine	56
2.10.	Bestimmung der Migrationsrate von MSCs im Boyden Chamber Assay	57
2.11.	Vitalmikroskopie/ Lebendzellanalyse.....	58
2.11.1.	Untersuchung der gerichteten Migration im Wundheilungsassay/Wound and Healing Assay	58
2.11.2.	Untersuchung der Zellbewegungen von MSCs mittels Zelltracking- Assay.....	59
2.12.	Statistische Analyse der Daten.....	60
3.	Ergebnisse.....	61
3.1.	Qualitätskontrolle der Zellkultur vor Beschallung.....	61
3.1.1.	Morphologische Beurteilung der hMSCs.....	62
3.1.2.	Durchflusszytometrieanalyse- FACS-Analyse der MSCs.....	62
3.1.3.	Differenzierungsassay.....	63
3.1.3.1.	Knochenzelldifferenzierung.....	64
3.1.3.2.	Knorpelzelldifferenzierung.....	65
3.1.3.3.	Fettzelldifferenzierung.....	66
3.2.	Funktional-technische Bestimmung der <i>in vitro</i> Beschallung.....	66
3.3.	<i>In vitro</i> - Beschallungsschemata.....	70
3.4.	Nachweis der Zellvitalität.....	71
3.5.	Untersuchung der Wachstumsrate.....	72
3.6.	Immunhistochemische Untersuchung.....	73
3.6.1.	Proliferationsnachweis mit Ki 67.....	74
3.6.2.	Apoptosenachweis mit Caspase-3.....	78
3.7.	Nachweis von Seneszenz mit Beta-Galaktosidase-Färbung.....	81
3.8.	Nachweis von Aktinzytoskelettveränderung mittels Phalloidin.....	83
3.9.	Nachweis von eNOS und Rac1/cdc42 mittels Western Blot.....	85
3.10.	Untersuchungen der Migration mittels Boyden Chamber Assay.....	91
3.11.	Untersuchungen der Migration mittels Wundheilungsassay.....	96
3.12.	Untersuchungen der Zellbewegungen mittels Zelltracking.....	99

4. Diskussion.....	102
4.1. Charakterisierung und Monitoring humaner MSCs	102
4.2. Zellabtrag und Adhäsion (Fokale Adhäsion).....	104
4.3. DW/SW-bedingte Veränderung des Aktin-Zytoskeletts.....	106
4.3.1. Formation des Aktinzytoskelett.....	106
4.3.2. Depolymerisierung des Aktinzytoskeletts.....	108
4.4. Untersuchung der Lokomotion von MSCs mittels Zelltracking.....	109
4.5. Migration von MSCs in Abhängigkeit der SW/DW-Behandlung und des F- Aktinzytoskeletts.....	110
4.5.1. Nachweis der Migration mittels Boyden Chamber Assay.....	110
4.5.2. Nachweis der Migration mittels Wundheilungsassay.....	112
4.6. Nachweis der Proliferation, Wachstum und Vitalität von MSCs.....	114
4.7. Nachweis der Apoptose von MSCs.....	116
4.8. Nachweis der Seneszenz von MSCs.....	119
4.9. Ergebnisse radiale DW versus fokussierte SW.....	120
4.10. Klinische Relevanz der vorliegenden Arbeit.....	121
4.11. Experimenteller Versuchsaufbau- Versuchsausrüstung und Applikationsschema.....	122
4.12. Ausblick.....	124
5. Anhang.....	127
5.1. Abbildungsverzeichnis.....	127
5.2. Abkürzungsverzeichnis.....	132
6. Literaturliste.....	134

1. Einleitung

1.1. Stoß- und Druckwellen

Unter Stoßwellen (SW) versteht man akustische Wellen, die in Luft oder Wasser durch explosionsartige Prozesse entstehen, so wie beispielsweise beim Naturphänomen eines Blitzes. Die entstandenen akustischen Wellen sind transiente Druck- oder Dichteschwankungen, die sich in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen spezifisch ausbreiten (Abb. 1). Sie werden daher auch als Druckwellen (DW) bezeichnet. Die Abgrenzungen von Druck- und Stoßwellen werden im Teil Material und Methoden ausführlicher besprochen, so dass an dieser Stelle darauf verzichtet wird.

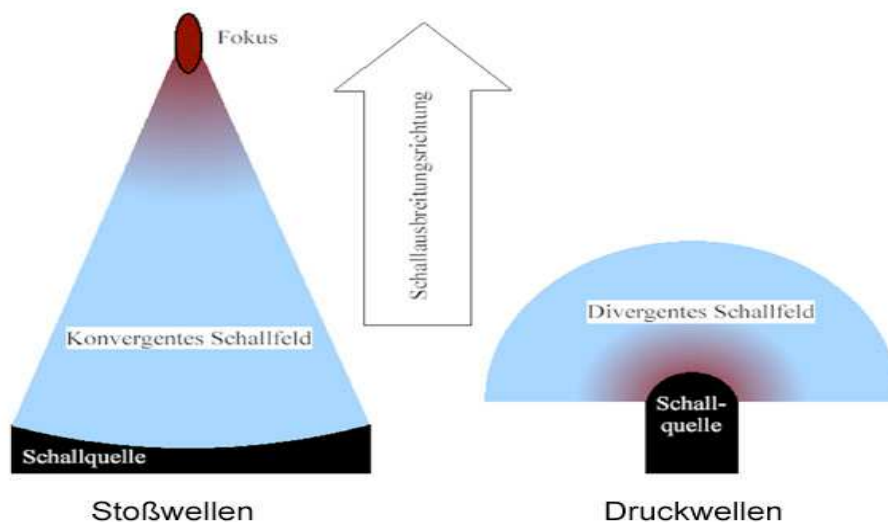


Abb.1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Schallausbreitung bei fokussierten (links) und unfokussierten (rechts) Systemen. Es zeigt sich bei Stoßwellen ein konvergentes, bei Druckwellen ein divergentes Schallfeld (Abbildung der Deutschsprachigen Internationalen Gesellschaft für Extrakorporale Stoßwellentherapie (DIGEST)- O. Wess).

1.1.1. Geschichte der Stoßwelle in der Medizin

In der Medizin werden Stosswellen bereits seit den 80er Jahren im Bereich der Lithotripsie als non-invasive Methode zur Bekämpfung von Harnsteinen (Bush, et al., 1986; Chaussy, et al., 1980; Chaussy and Schmiedt, 1983; 1984; Chaussy, et al., 1982; Chaussy, et al., 1984; Fuchs, et al., 1985; Schmeller, et al., 1984; Schmiedt and Chaussy, 1984; Wickham, et al., 1985) unter dem Begriff, Extrakorporale Stosswellenlithotripsie (ESWL), eingesetzt.

Die erste Behandlung wurde von Chaussy am 7.2.1980 in München durchgeführt. Im Jahre 1986 wurden von Kishimoto und Kollegen, die Nebenwirkungen der ESWL näher untersucht. Sie fanden signifikant gesteigerte Mengen von Hämolysen und Myolysen bei ESWL-Anwendung (Kishimoto, et al., 1986), ähnliche Ergebnisse hatte Di Silverio 1990 (Di Silverio, et al., 1990). Es konnten zwar kurzfristige pathologische Veränderungen der Nieren (Baumgartner, et al., 1987) festgestellt werden, Langzeitveränderungen blieben jedoch aus. Dosisabhängige Untersuchungen zeigten mögliche Nebenwirkungen in Form von periglobulärer und intratubulärer Fibrosen (Morris, et al., 1991). Es zeigten sich Korrelationen zwischen dem Alter der Patienten und dem Ausmaß der Schädigungen, (Knapp, et al., 1995). Die Behandlung von juvenilen Patienten mit ESWL wurde als unbedenklich eingestuft (Straub, et al.). Andere Arbeitsgruppen konnten überhaupt keine Schädigungen der Niere und deren Funktion unter ESWL nachweisen (Jung, et al., 1993). Bei der Untersuchung von Karnivoren zeigten sich dosisabhängige Nierenschädigungen nach ESWL beim Hund, (Abrahams, et al., 1988; Delius, et al., 1988; Newman, et al., 1987) und bei der Katze (Adams, et al., 2005). Weiterhin wurden im Bezug zu ESWL-Therapie Blutdruckanstiege (Lingeman, et al., 1990) und bakterielle Infektionen untersucht (Gasser and Frei, 1993; Kattan, et al., 1993; Muller-Mattheis, et al., 1991), wobei die Ergebnisse sehr kontrovers ausfielen. Bei weiblichen Ratten zeigte die Untersuchung der Ovarien nach ESWL keinerlei Pathologien auf (McCullough, et al., 1989). Im Jahre 1999 wurde die ESWL-Therapie als Methode der Wahl bei Renal- und Urethralsteinen festgelegt (Renner and Rassweiler, 1999). Aufgrund der guten Ergebnisse der ESWL im Bereich der Urolithiasis, wurden zeitnah (1985) ebenfalls Gallensteine (Brendel, 1986; Sauerbruch, et al., 1986), Pankreassteine (Delhaye, et al., 1992) und Speichelsteine (Iro, et al., 1992; Kater, et al., 1994) mit Stoßwellen behandelt. Erste Untersuchungen an Nierenkrebszellen begannen 1988 (Randazzo, et al., 1988). Das erste Patent für SW-Tumorbehandlung (Gehirntumor) wurde jedoch bereits 1947 von Frank Riber angemeldet. Der Einsatz von Stosswelle im Bereich des Bewegungsapparates begann 1987 von Karpman et al. (Karpman, et al., 1987) mit der Untersuchung der Wirkung von SW im Bereich der Hüftendoprothetik. Im Jahr 1991 wurde die SW erstmals erfolgreich im Bereich der verzögerten Wundheilung und der Behandlung von Pseudarthrosen eingesetzt (Schleberger and Senge, 1992).

Ebenfalls gute Therapierfolge ließen sich bei der Behandlung von Tendinitis calcarea (kalzifizierende Tendinitis) der Schulter (erstmalig beschrieben von Dahmen- ESWT im knochennahen Weichteilbereich an der Schulter/ Extr Orthopaedica 1992) nachweisen (Gerdesmeyer, et al., 2003; Peters, et al., 2004; Schmitt, et al., 2001; Wang, et al., 2001; Wang, et al., 2003b). Im Hinblick auf das therapeutische Potential der SW-Behandlung auf Epicondylitis humeri radialis (Tennisellenbogen) (Haake, et al., 2002) und Epicondylitis humeri ulnaris (Golferellenbogen) zeigen sich kontroverse Ergebnisse (Buchbinder, et al., 2002; Haake, et al., 2002; Hammer, et al., 2000; Ko, et al., 2001; Rompe, et al., 1998; Wang and Chen, 2002). Ähnlich kontroverse Aussagen ergaben sich bei der Behandlung der Plantarfasciitis (Painful Heel), die von positiven Behandlungsergebnissen (Abt, et al., 2002; Chen, et al., 2001; Gerdesmeyer, et al., 2008; Ogden, et al., 2001a; Rompe, et al., 2002; Wang, et al., 2000; Weil, et al., 2002) bis zum Fazit der „Ineffektivität“ reichen (Haake, et al., 2003; Ham and Strayer, 2002; Waddington, 2003). Rompe und Moretti untersuchten die Plantarfasciitis bei Langstreckenläufern und erzielten positive Ergebnisse (Moretti, et al., 2006; Rompe, et al., 2003), andere schlussfolgerten zudem, dass eine positive Wirkung ausschließlich bei Läufern erzielt würde (Cole, et al., 2005). Furia und Kollegen hingegen sehen aufgrund ihrer Ergebnisse in der SW-Behandlung eine gute Therapieform bei Plantarfasciitis, unabhängig vom Aktivitätsgrad der Patienten (Furia, 2005). Im Zusammenhang mit der therapeutischen Wirkung, werden des Weiteren immer wieder Placeboeffekte diskutiert, die einen nicht zu unterschätzenden Faktor in der SW-Therapie einzunehmen scheinen (Waddington, 2003). Lohrer und Kollegen verglichen die Anwendung von radialer und fokussierter SW und konnten zeigen, dass bei über 50jährigen das Ansprechverhalten auf fokussierte SW signifikant der Behandlung mit radialer SW überlegen war (Lohrer, et al.). Weitere Untersuchungen der SW begannen 2004 im Bereich der Kardiologie an Schweinen und mittlerweile auch am Menschen, welche positive Effekte auf die Durchblutung und Verbesserung der Myokardfunktion zeigen konnte (Dumfarth, et al., 2008; Holfeld, et al., 2009; Jargin, 2009; Nishida, et al., 2004; Uwatoku, et al., 2007; Zimpfer, et al., 2009).

Die Einsatzgebiete der SW erweitern sich unaufhaltsam und reichen vom Einsatz in der Getherapie über eine Erhöhung der transienten Permeabilisierung der Zellen (Huemer, et al., 2005; Kodama, et al., 2002; Ohl and Ikin, 2003), über Analgesie (Rompe, et al., 1996), Wundheilung und Geweberegeneration (Kuo, et al., 2009; Schaden, et al., 2007; Wang, et al., 2003a), Behandlung von Induratio Penis Plastica (IPP) (Thiel, et al., 2000), Triggerpunkttherapie (Kuan, 2009), Stosswellenakupunktur (Daser 2005, Pilotstudien-Firma Storz Medical mit positivem Ergebnis), Antibakterieller Behandlung (Gerdesmeyer, et al., 2005; Horn, et al., 2009; Novak, et al., 2008), Osteomyelitis Behandlung (Gollwitzer, et al., 2009) bis zur Behandlung von Cellulite (Angehrn, et al., 2007; Christ, et al., 2008; Siems, et al., 2005) und zukünftig auch in der „kosmetischen“ Faltenbekämpfung. Die Deutschsprachige Internationale Gesellschaft für Extrakorporale Stoßwellentherapie (DIGEST) weist die SW in Ihren Leitlinien als Therapieform zur Behandlung von Achillessehnentendinopathien, Plantare Fasciitis mit/ohne Fersensporn, Trochanter Schmerzsyndrom, Tendinosis calcarea, radialer Epikondylopathie, Patellaspitzensyndrom, Pseudarthrose und verzögert heilende Knochenbrüche, Stressfrakturen, Aseptische Hüftkopfnekrosen, Osteochondrosis dissecans sowie Schmerzsyndrome der Skelettmuskulatur aus.

1.1.2. Wirkungen von Stoßwelle

Die therapeutische Wirkung der SW konnte in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen werden und beschränkt nicht mehr ausschließlich auf die Behandlung der Urolithiasis. Durch die extrakorporale, non-invasive Applikation der SW, die positive Beeinflussung von morphologischen und physiologischen Prozessen, wird sie in einem weiten therapeutischen Spektrum eingesetzt. Das Minimum an unerwünschten Nebenwirkungen macht sie als instrumentelle Therapieform in vielen Bereichen sehr interessant. Die analgetischen Effekte der SW sind sehr bedeutungsvoll in der Behandlung von chronischen Schmerzzuständen. Die SW-induzierte Langzeitanalgesie zeigte statistisch signifikante Erniedrigungen der Ansprechbarkeit der Neurone auf Substanz P (Neuropeptid Substanz P) (Hausdorf, et al., 2008b). Es kam es zu einem selektiven Substanzverlust von unmyelinisierten Nervenfasern, so dass die Langzeitanalgetischen Effekte von SW zum Teil über eine Denervation zu erklären sind (Hausdorf, et al., 2008a).

Bei direkt applizierten Stoßwellen konnten auch von Wu und Kollegen reversible, segmentale Demyelinisierungen von Fasern festgestellt werden (Wu, et al., 2008). Murata (Murata, et al., 2006) untersuchte 2006 die Immunreaktivität von Neuronen auf ATF3 (activating transcription factor-3) und GAP-43 (growth-associated phosphoprotein-43), zwei Marker für Nervenverletzung. Die Immunreaktivität für ATF-3 bei den SW-behandelten Neurone stieg signifikant an, eine Verletzung der sensorischen Nervenfasern nach SW-Applikation konnte nachgewiesen werden. Im Bereich der Osteogenese zeigten SW osteogene Effekte (Qin, et al., ; Tam, et al., 2009), so konnte Takahashi et al. , eine Aktivierung der Genexpression zur Osteogenese nach SW-Behandlung nachweisen (Takahashi, et al., 2004). Die Beeinflussbarkeit von Periostzellen über SW in Abhängigkeit der Gesamtenergie wurden bereits 2005 von Tam und Kollegen (Tam, et al., 2005) untersucht. Wang zeigte, dass über die Superoxidvermittelte TGF- (Transforming Growth factor) beta1- Produktion bei mesenchymalen Stammzellen die Osteogenese über SW verbessert werden konnte (Wang, et al., 2004). Durch SW konnte ebenfalls die Rekrutierung knochenmarkständiger Vorläuferzellen beobachtet werden (Aicher, et al., 2006). Weitere Untersuchungen zur Wirkung der SW fanden 2004 am Herzen von Schweinen statt. Es konnten SW-bedingte Durchblutungssteigerungen und Verbesserungen der Myokardfunktion gezeigt werden (Nishida, et al., 2004). Ähnliche Ergebnisse hatte Uwatoku und Kollegen (Jargin, 2009; Uwatoku, et al., 2007). Im Jahre 2008 wurde nach SW-Applikation von Yan und Kollegen eine Erhöhung der NO-Synthase und VEGF (Vascular endothelial growth factor) festgestellt, die für die Blutgefäßbildung eine entscheidende Rolle spielen (Yan, et al., 2008), und Infarkte positiv beeinflussen kann .

1.1.3. Zellbiologische Erkenntnisse über Stoßwelle/ *in vitro*

Die zellbiologischen Effekte der SW erklären sich zum einen über die direkte Wirkung der SW am Ort des Impedanzsprungs und einer indirekten Wirkung über Kavitationseffekte in der Unterdruckphase (bei SW weniger bei DW) (Gerdesmeyer, et al., 2002; Ogden, et al., 2001b). Die zellbiologischen Effekte der SW-Behandlung auf Viabilität, Wachstum und Veränderungen der Zellmorphologie wurden bereits 1988 *in vitro* untersucht und festgestellt (Randazzo, et al., 1988).

Die Viabilität von Fibroblasten ist über SW beeinflussbar und ist abhängig von der applizierten Energiedichte sowie der Gesamtimpulsanzahl (Kaulsar Johannes, et al., 1994). Untersuchungen an Osteoblasten zeigen ebenfalls dosisabhängige (Energieflussdichte) Veränderungen der Viabilität, die Gesamtimpulsanzahl schien für die biologische Effekte jedoch weniger entscheidend zu sein (Martini, et al., 2003a; Martini, et al., 2003b). Untersuchungen der Ionenkanäle von Osteoblasten bei SW-Applikation, zeigten signifikante Veränderungen der Aktivität von Kalzium- und Kalium-Ionenkanäle, welche eine signifikante Erhöhung der Proliferation nach sich zog (Martini, et al., 2005). Elektrohydraulische und elektromagnetische SW unterschiedlicher Energiedichten, hatten unterschiedliche Effekte auf die Proliferation, wobei die elektromagnetische SW insgesamt stärkere Effekte zeigte (Martini, et al., 2006). Bei der vergleichenden Behandlung von Ovarien mit Piezoelektrischer und Elektrohydraulischer SW kam es ebenfalls zu unterschiedlichen Effekte auf die Viabilität (Smith, et al., 1992). Bei murinen Osteoblasten konnte eine verstärkte Osteogenese in Abhängigkeit der SW –Behandlung festgestellt werden, dabei wurden Proliferations-, Differenzierungsverhalten und die Produktion von Faktoren für die Osteoklastogenese beeinflusst (Tamma, et al., 2009). Die proapoptische und kontraproliferative Wirkung von SW an Tumorzellen wurden von Kato et al. untersucht (Kato, et al., 2000). Dosiswirkungsbeziehungen von SW auf Knochenzellen zeigten die stärksten Wirkungen bei Behandlungen mit geringeren Impulsgesamtanzahlen (Kusnierczak, et al., 2000). Bei *in vitro* Versuchen kam es zu hohen Zellverlusten von bis zu 85%, bei den verbleibenden Zellen waren nur 7% vital. Die Proliferation war im Vergleich zur Kontrolle auf 42% reduziert, dies normalisierte sich in den darauf folgenden Tagen (Gambihler, et al., 1990). Bei mit in Gelatine immobilisierten Zellen kam es zu stärkeren Zellverlusten im Vergleich zu selben Zellen in Suspension (Jones, et al., 1992). Junge und Kollegen konnten Zusammenhänge zwischen dem Zellabtrag und der Kavitation zeigen (Junge, et al., 2003). Untersuchungen zu Kavitation und schädigenden Effekten der SW wurde von Lifshitz und Kollegen näher untersucht. Bei entgasten Medien kam es dabei zu geringeren Schädigungen der Zellen und die Effekte waren maßgeblich von den entsprechenden Medien abhängig, mit denen geschallt wurde. Die Kavitation scheint nach diesen Ergebnissen entscheidend an den zellschädigenden Effekten beteiligt zu sein (Lifshitz, et al., 1997).

Genauere Betrachtungen der Kavitation und der Kavitationseffekte von SW in Abhängigkeit der Druckamplitude und Frequenz zeigten, dass Größe und Lebensspanne von Kavitationsblasen von der Druckamplitude, nicht jedoch von der applizierten Frequenz, beeinflussbar ist. Dagegen werden die Kavitationseffekte signifikant von der Frequenz beeinflusst. Die Druckamplitude hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Kavitationseffekte (Huber, et al., 1998). SW bewirken eine transiente Permeabilisierung (Sonoporation) der Zellen (Junge, et al., 2003) über die FITC- (Fluoresceinisothiocyanat) markiertes Dextran in die Zellen gelangen kann (Gambihler, et al., 1994). Die SW-Behandlung einer Tumorzellsuspension zeigte bei Endl und Kollegen jedoch keine Erhöhung der Permeabilisierung der Zellen (Endl, et al., 1995). Die Vergrößerung der Kavitationsblasen durch die instrumentelle Umstellung des Gerätes und Wahl der Pulskombination kann die Membranpermeabilität auf 91% erhöhen (Zhong, et al., 1999). Es konnte die intrazelluläre Passage von Substanzen mit einer Molekulargewicht von bis zu 2.000.000 über SW erreicht werden (Kodama, et al., 2002), die Transfektion mit Plasmiden über SW ist möglich (Schaaf, et al., 2003). Durch Erhöhung der SW-Stärke kommt es zu einer Erhöhung der Lyse von Erythrozyten (Lokhandwalla, et al., 2001), die Zellyse der Erythrozyten ist jedoch nicht nur durch Kavitation bedingt (Williams, et al., 1999). Die Untersuchungen von Chondrozyten in Suspension im Vergleich zu Chondrozyten im viskösen Alginat, zeigten eine signifikante Erhöhung der Sterberate von SW-Behandelten Zellen in Suspension im Vergleich zu denen in Alginat (Renz and Rupp, 2009). Unterschiedliche Typen maligner Zellen, zeigten in Suspension oder als Pellet unterschiedliche Reaktionen. Das Verhalten der Zellen änderte sich, je nachdem ob sich diese in Suspension befanden oder als Pellet. Ebenfalls zeigten sich unterschiedliche zellspezifische Sensitivitäten bezüglich der Beschallungsinterventionen (Smits, et al., 1991). Es kann bei *in vitro* Beschallungen von Zellen zu DNA-Doppelstrangbrüchen kommen, wenn die Behandlungsinterventionen den klinischen *in vivo* Behandlungsschemata entsprechen (Kochanski, et al., 2001). Um die Wirkweise der SW/DW besser zu verstehen, sind Erkenntnisse im Bereich der Mechanotransduktion unerlässlich auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

1.2. Erkenntnisse über Mechanotransduktion

1.2.1. Mechanotransduktion

Unter Mechanotransduktion versteht man die Übertragung und Umwandlung eines mechanischen Reizes auf ein Gewebe (Zellen und Extrazellulärmatrix) in eine biologische Antwort. Dabei unterscheidet man zwischen der Mechanorezeption, also die Aufnahme des physiologischen Reizes durch mechanoresponsive Elemente, die anschließende Umwandlung in ein chemisches Signal, dem so genannten „Biochemical Coupling“ und der intrazellulären Weiterleitung des Signals, der Transmission. Am Ende steht die zelluläre Antwort, wie beispielsweise das Proliferations- oder Migrationverhalten der Zelle (Abb.2).

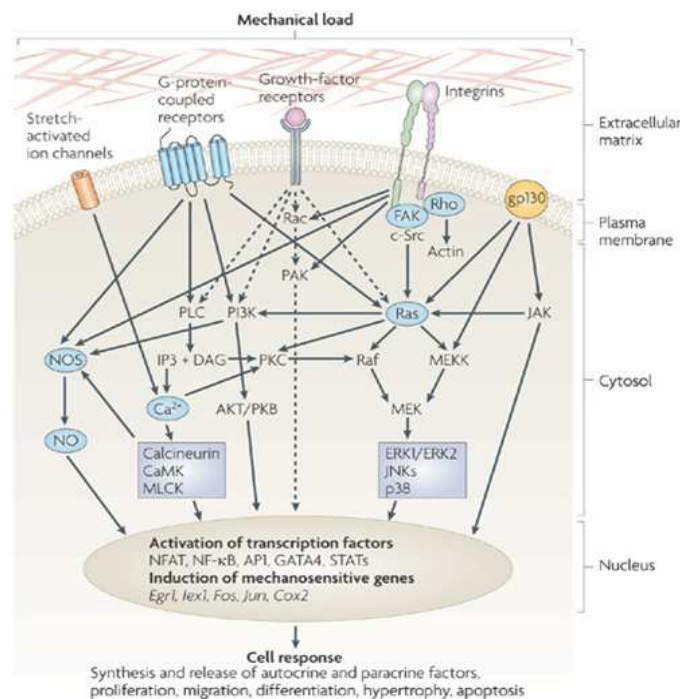


Abb.2: Schematische Darstellung der Mechanotransduktion bei Kardiomyozyten (Jaalouk and Lammerding, 2009)

Gezeigt ist der Ablauf der Mechanotransduktion bei Kardiomyozyten vom Einwirken des mechanischen Stimulus bis hin zur zellbiologischen Antwort.

1.2.2. Biologische Relevanz der Mechanotransduktion

Die Mechanotransduktion lässt sich sehr gut am Beispiel der Haarzellen (Abb.3) verdeutlichen, welche sich im Innenohr von Vertebraten und im Seitenlinienorgan von Fischen befinden.

Die Haarzellen wandeln mechanische Reize in Nervenaktivität um, weshalb sie zur Familie der Mechanorezeptoren gehören. Die mechanosensitiven Elemente der Haarzellen, sind die so genannten Haarbündel, ein Cluster von 100 Stereozilien. Die Stereozilien sind durch Tip-links verbunden, die Ionenkanäle Schließen oder Öffnen können. Bei Auslenkung in Richtung der Zilien kommt es zum Öffnen der Ionenkanäle, wobei positiv geladene Kaliumionen ins Innere gelangen und im Zellinneren zur Öffnung von Kalziumkanälen führen. Es kommt zur Depolarisation. Die Menge der ausgeschütteten Transmitter ist abhängig vom dem Grad der Auslenkung der Stereozilien. Bei Auslenkung in die entgegengesetzte Richtung, kommt es zum Schluss der Ionenkanäle (Gillespie and Muller, 2009).

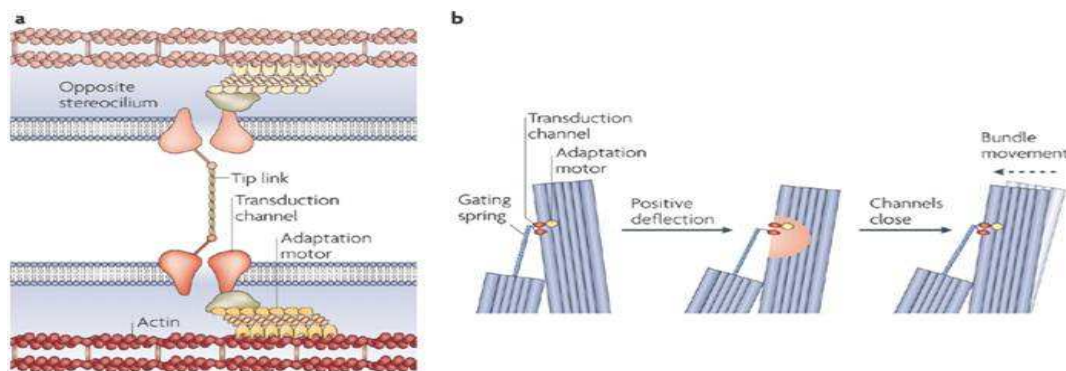


Abb.3: Schematische Darstellung der Mechanotransduktion an Haarzellen a) Kanäle bei benachbarten Stereozilien auditiver und vestibulärer Haarzellen verbunden über extrazelluläre Tip links und intrazelluläres Aktin (über Adaptationsmotor) b) Transduktion und Schnelladaptation in Stereozilien / positive Abbiegung (links) öffnet die Kanäle und führt zum Kalziumeinstrom, in die entgegengesetzte Richtung (rechts) kommt es zum Schließen des Kanals (Ernstrom and Chalfie, 2002) .

Mechanotransduktion spielt darüber hinaus eine entscheidende Rolle in der Organisation der verschiedenen Gewebe, wie Muskulatur, Knochen, Knorpel und Blutgefäßen. Mechanotransduktion steuert den Auf- und Abbau von Bindegewebe, so hängt die Art und Qualität des Bindegewebes der Sehnen vom mechanischen Reiz ab (Kjaer, 2004). Ebenfalls bestimmt sie die Vorgänge im Knochengewebe und beeinflusst den Knochenauf- und -umbau (Robling and Turner, 2009). Am Knorpelgewebe konnte Niehoff und Kollegen die mechanische Steuerung über den Signalweg Akt/PKB zeigen (Niehoff, et al., 2008). Tidball und Kollegen untersuchten 2005, die Wirkung von Mechanotransduktion auf Muskelgewebe und deren Adaptation (Tidball, 2005). Im Gefäßsystem nimmt sie in Form von Scherkräften eine entscheidende Rolle in der Gefäßreifung (Ye, et al., 2008) und Ausdifferenzierung von Endothelzellen über Aktivierung des Akt-Weges ein.

Für viele Prozesse der Regulation, Regeneration aber auch Adaptationsprozesse ist die Mechanotransduktion ein unerlässlicher Faktor. Veränderungen der Extrazellulärmatrix (ECM), der Zellstruktur und –organisation, sowie der mechanosensitiven Strukturen können die Mechanotransduktion stören und damit zu Erkrankungen führen (Jaalouk and Lammerding, 2009). Bei Krebserkrankungen sind beispielsweise die Steifheit der ECM und der damit verbundene zytoskelettäre Druck verändert. Diese Veränderungen der Strukturen führen zu Veränderungen in der Mechanotransduktion (Huang and Ingber, 2005) und letztlich zu Tumorwachstum. Weitere Krankheitsbilder, die in Zusammenhang mit funktionsbeeinträchtigter Mechanotransduktion stehen, sind Arteriosklerose (Gimbrone, et al., 2000), Taubheit (Vollrath, et al., 2007), Osteoporose (Klein-Nulend, et al., 2003), Muskeldystrophien, Kardiomyopathien (Heydemann and McNally, 2007) und Lungenprobleme (Uhlig, 2002). Die Erkenntnisse über Mechanotransduktion zeigen Ihre Bedeutung hinsichtlich einer Vielzahl physiologischer Vorgänge auf, die gleichzeitig die Möglichkeit für therapeutische Interventionen eröffnen. Eine gezielte Modifikation oder Stimulation von mechanoresponsiven Elementen der Zellen, könnte über manuelle oder instrumentelle Therapieformen ausgenutzt werden, um physiologische Prozesse in Gang zu setzen. Dabei besitzen Zellen eine Reihe von mechanoresponsiven Elementen, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.2.3. Mechanotransduktion im zellbiologischen Kontext

1.2.3.1. Mechanorezeption und -transduktion

Die Mechanorezeption, also die Aufnahme des physiologischen Reizes erfolgt durch mechanoresponsive Elemente der Zellen (Abb. 4). Dabei reagieren die Zellen auf Stressoren wie Druck oder Zug (uniaxial und equiaxial) (Park, et al., 2004) über unterschiedliche Strukturen divergent. Die Einwirkungsrichtung (horizontal und vertikal) beeinflusst die Reaktionen maßgeblich (Barakat and Davies, 1998; Kumar, et al., 2002). Signale, die über mechanotransduktive Mechanismen vermittelt werden, entfalten ihre Wirkung meistens über mehrere Effektoren, die sich entweder überlappen oder auch überkreuzen können (Jaalouk and Lammerding, 2009).

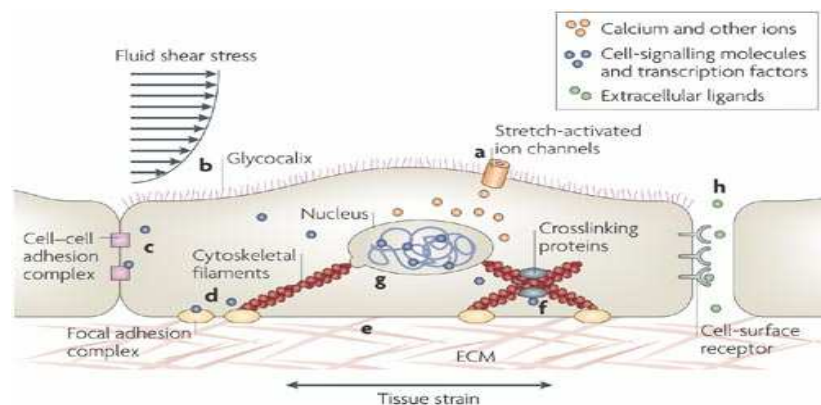


Abb.4: Schematische Darstellung von Zielstrukturen für Mechanotransduktion (Jaalouk and Lammerding, 2009) a) stretch-aktivierte Ionenkanäle bedingen den Einstrom von Kalziumionen und anderen Ionen b) Glykocalix auf der Zelloberfläche kann Scherstress über Mechanotransduktion in Signale umwandeln c) Zell-Zell-Adhäsionskomplex d) Zell-Matrix-Fokal-Adhäsionskomplex e) EZM (Extrazellulärmatrix) f) Zytoskelett (es können Bindungsaffinitäten verändert werden und spezielle Signalwege aktiviert werden) g) Zellkern (intrazelluläre Deformationen könnten zu Chromatinkonformationsänderungen führen und die Transkription beeinflussen) h) Kompression der interzellulären Flächen können die Konzentrationen von autokrinen und parakrinen Substanzen erhöhen. Darüber hinaus stellen Veränderungen in G-Proteingekoppelte Rezeptoren, Lipidfluidität und mitochondrialer Aktivität weitere Mechanosensoren dar. Die Mechanotransduktion entfaltet ihre Wirkung meistens über mehrere Zielstrukturen, die sich überlappen oder überkreuzen können.

Darüber hinaus werden die verschiedenen Effektorsysteme der Zelle nicht nur unterschiedlich aktiviert, sondern es besteht auch eine zeitliche Reihenfolge bei der Signaltransduktion (Banes, et al., 1995; Jones, et al., 1995). Ionenkanäle können bei mechanischer Stimulation über drei verschiedene Wege geöffnet werden (Abb. 5). Es gibt so genannte spannungsabhängige Ionenkanäle, die sich direkt aufgrund des horizontalen Einwirkens der Kraft auf die Lipiddoppelschicht öffnen, wenn die Spannung auf diese erhöht wird. Eine weitere Möglichkeit, wie sie bei Sinneszellen vorkommt, ist das Öffnen mechanisch gesteuerter Ionenkanäle, die Verbindungen zur Extrazellulärmatrix oder Proteinen des Zytoskeletts besitzen. Kommt es zur Veränderungen der Spannung in diesen Verbindungen, folgt die Öffnung der Ionenkanäle. Dabei kann die Kraft entweder direkt auf das Kanalprotein übertragen werden (wie in Abb.5b abgebildet) oder sie kann auf die Membran wirken und darüber spannungsabhängige Ionenkanäle öffnen. Eine dritte Möglichkeit ist das Öffnen über mechanosensitive Proteine, die in Folge des mechanischen Reizes eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen und darüber auf den Ionenkanal einwirken (Lumpkin and Caterina, 2007).

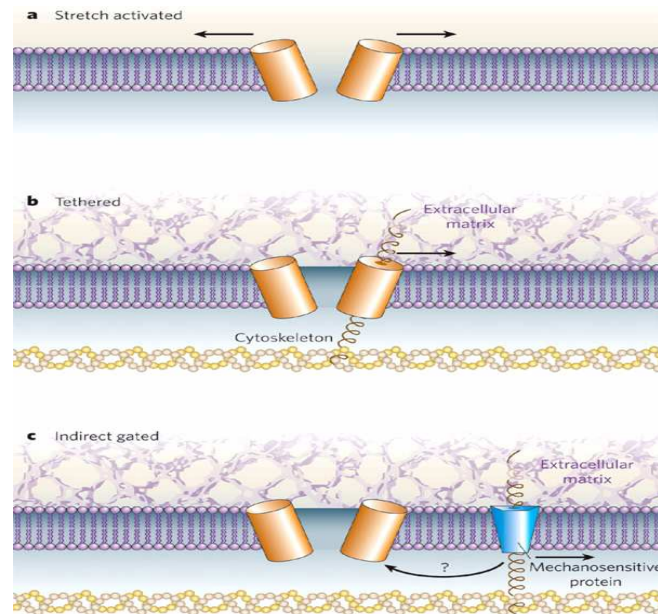


Abb. 5: Aktivierung von Ionenkanälen über Mechanotransduktion (Lumpkin and Caterina, 2007)

a Stretch-aktivierte Ionenkanäle, **b** Mechanisch gesteuerte Ionenkanäle, **c** Ionenkanäle die über mechanosensitive Proteine geöffnet werden.

Als sehr einfaches Modell lassen sich Zellreaktionen auf mechanische Reize über so genannte Kontinuummodelle untersuchen, bei denen jedoch die Mikrostrukturen der Zelle, wie zum Beispiel das Zytoskelett keine Rolle spielen. Vielmehr ist man durch dieses Modell in der Lage die Belastung („stress“) und die dadurch resultierende Verformung und Dehnung der Zelle („strain“) zu quantifizieren. Eine detailliertere Betrachtung der Mechanorezeption erfolgt über das Tensegrity-Modell, wobei sich der Begriff Tensegrity aus Tension (Spannung) und Integrity (Integrität) zusammensetzt und das mechanische Verhalten des Zytoskeletts näher beschreibt (Ingber, 1997). „Mit Tensegrity werden Strukturen beschrieben, die ihre Integrität primär durch ein Gleichgewicht des die Struktur durchziehenden Geflechtes an Spannungslinien aufrechterhalten -statt wie eine steinerne Wand an die Weitergabe von durchgängigen Kompressionskräften zu stützen. Tensegrity beschreibt ein Prinzip der strukturellen Beziehungen, wonach die strukturelle Form durch die endlich geschlossenen, umfassend fortlaufenden Verhaltensweisen des Systems in Bezug auf Spannungen garantiert ist und nicht durch die unterbrochenen und ausschließlich lokalen Verhaltensweisen der Kompressionselemente“ (Zitat: *Anatomy Trains*, Thomas W. Myers, Elsevier 2010). Es konnte gezeigt werden, dass mechanische Stressoren Umorganisationen des Zytoskeletts bewirken und dass es zu Zellformveränderungen kommt (Sims, et al., 1992).

Die Zelle erzeugt über ihr Zytoskelett eine Eigenspannung, die an die Extrazellulärmatrix weitergegeben wird. Kräfte die als mechanischer Stimulus auf die Zelle einwirken, müssen diese innere Eigenspannung der Zellen übersteigern, um eine Reaktion zu bewirken (Ingber, 2006). Der physikalische Reiz gelangt über die Eigenspannung der Zelle direkt zum Zellkern. Aktin und Aktin-Membran-Verbindungen sind maßgeblich an der Weiterleitung mechanischer Signale und somit der Gen-Expression beteiligt. Die Inhibition von Aktin Stressfasern blockiert die fluid shear-induzierte Genexpression in Osteoblasten (Pavalko, et al., 1998). Des Weiteren konnte an MSCs gezeigt werden, dass mit dem Alter der Probanden die Reaktionsfähigkeit von Aktin auf mechanische Stimuli nachlässt (Kasper, et al., 2009). Von Hirata et al. wurde die kraftübertragende und kraftfokussierende Eigenschaft von Aktin auf Integrine und mechanosensitive Kanäle gezeigt (Hirata, et al., 2007). Die Wirkung von Aktin auf mechanosensitive Ionenkanäle und auf den Ca^{2+} -Einstrom, zeigt sich in vielerlei Zellreaktionen wie Lokomotion und Zellmigration (Doyle and Lee, 2005; Munevar, et al., 2004) wieder und kann über die Aktivierung von Calpain und JNK, bei MSCs zur Apoptose führen (Kearney, et al., 2008). Das Aktinzytoskelett scheint darüber hinaus, über das proapoptotische Protein „Prostate apoptosis response-4“ (Par-4) mit dem Interaktionspartner DLK (Death Associated Protein, DAP-like kinase), einer Serin/ Threonin-Kinase, Apoptose zu vermitteln (Vetterkind, et al., 2005). Dabei wird das zelluläre Gleichgewicht zwischen Kontraktilität und Adhäsion der Zelle gestört, was letztendlich zur Apoptose führt (Kuo, et al., 2003). Ebenfalls wird die Verbindung zwischen mechanosensitiven Ionenkanälen und Zelladhäsion diskutiert (Doyle and Lee, 2005). In der Literatur wird bei der Formation von Aktin oftmals von Stressfasern gesprochen, ob diese Nomenklatur auch für sich fortbewegende Zellen übernommen werden kann, wird von Cramer in Frage gestellt (Cramer, et al., 1997). Die Aktinfilamente verfügen über eine selbstständige Polarität in einen Pluspol „barbed“, und einen Minuspol „pointed“. In motilen Zellen zeigt der Hauptteil der Fasern eine graduierte Polarität (Cramer, et al., 1997). Die Aktivierung von Rho-GTPasen führt zur Aktivierung der Aktinstressfasern (Giry, et al., 1995), so führten Mikroinjektionen von aktivierten rekombinanten RhoA in subkonfluente Fibroblasten zu einer rapiden und extensiven Stressfaserformation (Paterson, et al., 1990).

Der Hauptregulator für die Aktivierung der Faserformation scheint somit RhoA zu sein (Pellegrin and Mellor, 2007). Stressfasern sollen nach Kreis und Birchmeier die Migration der Zellen erhöhen (Kreis and Birchmeier, 1980) oder nach Rid und Kollegen, wie eine Art Ruder wirken, die die Längsachse der Zelle bestimmen und die Bewegungsrichtung vorgeben (Rid, et al., 2005). Eine exzessive RhoA-Aktivierung führte jedoch zu einer Inhibition der Zellmigration (Arthur and Burridge, 2001; Cox, et al., 2001). Von Couchman et al. wurden mehr Stressfasern bei sessilen Zellen gefunden (Couchman and Rees, 1979) und die Inhibition von Stressfasern zeigte eine verbesserte Migration (Nobes and Hall, 1999). Die Zusammenhänge von Rho-GTPasen, Aktinzytoskelett und Migrationsverhalten konnten somit wissenschaftlich noch nicht eindeutig verifiziert werden. Dosis-Wirkungsbeziehungen der einzelnen Ergebnisse scheinen jedoch in diesem Zusammenhang eine Rolle zu spielen. Totsukawa untersuchte indes die Inhibition der ROCK (Rho-associated kinase) und stellte fest, dass durch Inhibition der ROCK, die Zellen ein schnelleres und zielgerichteteres Bewegungsverhalten zeigten (Totsukawa, et al., 2004). Scherkräfte wirken über die Glykokalix als Primärsensor und können über Aktin weitergeleitet werden, das dann wiederum die mechanischen Signale über interzelluläre Verbindungen weiterleitet oder umwandelt (Tarbell, et al., 2005). Die interzellulären Verbindungen benachbarter Zellen sind für die Mechanotransduktion ein wichtiger und entscheidender Faktor (Chen, et al., 2004). Unter der Wirkung von Scherkräften wird filamentöses in „inaktives“ glomeruläres Aktin umgewandelt (Morita, et al., 1994), von anderen Gruppen konnten jedoch gegenteilige Effekte zu Gunsten des filamentösen Aktin bei Druckanstieg festgestellt werden (Cipolla, et al., 2002). Bei Endothelzellen zeigten sich zelldichteabhängige Modifikationen der Reaktion von Stressfasern auf eintretenden Scherstress (Abb.6) (Mott and Helmke, 2007). Bei Scherstress ist der Hauptmediator die Endotheliale NOS (eNOS) (Baum, et al., 2004), welche von Erk1/2 und Akt reguliert ist (Arroyo, et al.). Veränderungen des Zytoskeletts führen darüber hinaus zu Veränderungen in der Reiz-Reaktionantwort auf mechanische Stimuli (Meazzini, et al., 1998) und bedingen des Weiteren eine Veränderung der Genexpression (Ingber and Folkman, 1989).

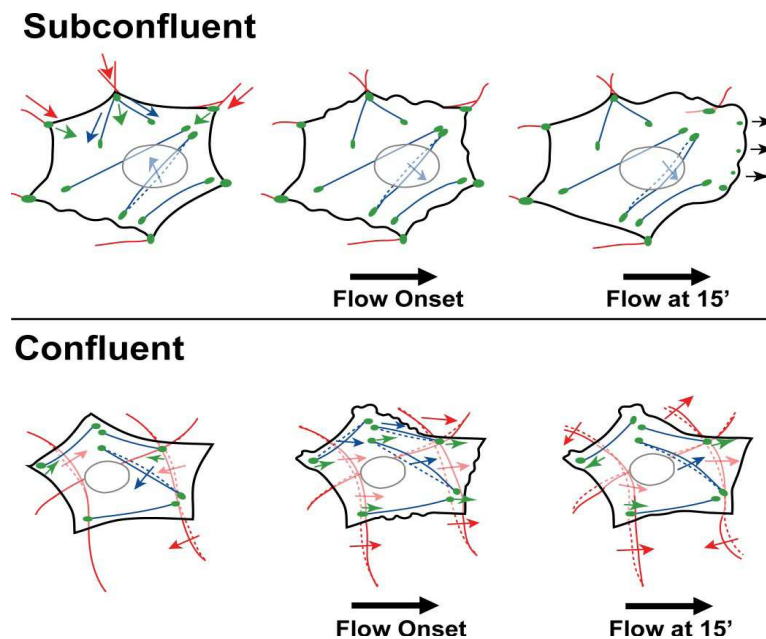


Abb. 6: Schematische Darstellung zell-dichte-abhängiger Modulation von Stressfasern (bei Scherstress)

Bei subkonfluenten Zellen (Oben) erhöht sich die Aktinpolymerisation an den Zellkanten, wo die Flüssigkeit auftritt und ändert die Richtung der lateralen Stressfasern (blau- gestrichelt). Sie führt zu Ablösungen. Zum Zentrum hin ist der Umbau der Stressfasern (blau), sowie der Adhäsionsflächen (grün) und der Entfernung zur darunter liegenden Fibronektinschicht (rot) reduziert. Später kommt es zu Polarisierung des Aktins in Richtung der Auslaufstrecke. Es entstehen neue Adhäsionsstellen. Bei konfluenten Zelle (Unten) kommt es zu einer schnellen und transienten Ausbildung von gekräuselten Kanten und zu transienten Verschiebungen subzellulärer Strukturen in Richtung der Auslaufstrecke. Im Laufe der Zeit wird das Ablösemuster heterogener (Mott and Helmke, 2007).

Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass mechanische Stimuli am Applikationsort zu erhöhten Akkumulationen von mechanosensitiven, zytoskelettassoziierten Proteinen führt (Rychly, et al., 1998). Von Ingber und Folkman wurde die Rolle der EZM in diesem Zusammenhang mit dem Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Zellen in Verbindung gebracht werden. Aktin wird über Integrine mit der EZM verbunden (dabei helfen Aktin- assoziierte Proteine: wie Tensin, Talin, Vinculin oder alpha-Aktinin) und bildet dort fokale Adhäsionen (Abb. 7). Mechanische Stimuli erhöhen die Anzahl dieser Fokalen Adhäsionen, so dass eine stärkere Bindung mit der Extrazellulärmatrrix besteht (Meazzini, et al., 1998). Fokale Adhäsionen können sich dabei aus über 50 verschiedene Proteine zusammen setzen (Zaidel-Bar, et al., 2004).

Sie dienen als Mechanosensor, bei dem durch Aktivierung des Src Signalproteins, die Kapazität von Adhäsionen vermehrt werden kann (Wang, et al., 2005).

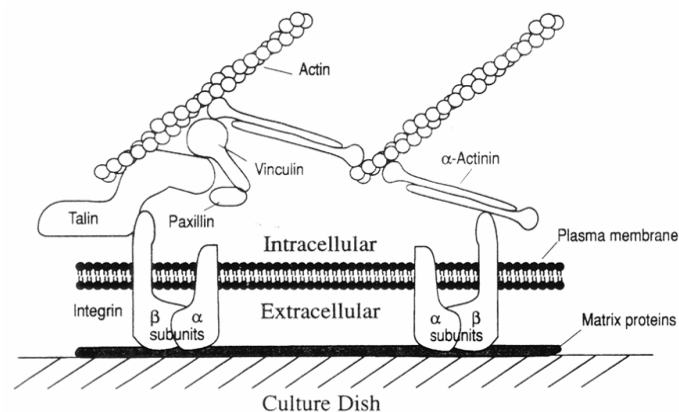


Abb. 7 : Schematische Abbildung der Verbindung „adhärenter“ Zellen mit der EZM (Extrazellulärmatrix) (Turner and Pavalko, 1998). Aktin wird mit Aktin-assoziierten Proteinen an Integrine gebunden, die sie mit der EZM (Extrazellulärmatrix) verbindet.

Neben strukturgebenden Proteinen finden sich in Fokalen Adhäsionen viele Signalübertragende Proteine, so zum Beispiel die FAK (Fokale Adhäsionskinase). Diese kann mechanisch aktiviert (über den mTOR-Komplex), die Aktivierung von Zellen bewirken (Dalla Costa, et al.). Da in der vorliegenden Arbeit die Mechanotransduktion an MSCs untersucht werden soll, sollen MSCs folgend genauer beschrieben werden.

1.3. Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs)

1.3.1. Charakterisierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs), sind fibroblastenähnliche Stammzellen, die erstmals 1976 von Friedenstein und Kollegen beschrieben wurden (Friedenstein, et al., 1976). Es handelt sich hierbei um adulte Stammzellen mesodermalen Ursprungs, die aus verschiedenen Gewebetypen isoliert werden können.

In wissenschaftlichen Veröffentlichungen sind unter anderem die Isolierung aus Fettgewebe (Lee, et al., 2004; Zuk, et al., 2002), Hautgewebe (Toma, et al., 2001) und die aus peripherem Blut (Fernandez, et al., 1997) beschrieben. Meirelles da Silva und Kollegen fassten zusammen, dass MSCs aus fast allen postnatalen Geweben gewonnen werden können (da Silva Meirelles, et al., 2006). Die Isolierung von hMSCs aus Knochenmark (Pittenger, et al., 1999) stellt eine weitere, und vor allem sehr effektive Form der Isolation dar. Obwohl mesenchymale Stammzellen nur zu einem geringen prozentualen Anteil von 0.001-0.01% der Gesamtzellen (Pittenger, et al., 1999) vorhanden sind, sind sie sehr gut und schnell *ex vivo* bis zu sehr hohen Passagen zu kultivieren (Friedenstein, et al., 1970; Pittenger, et al., 1999). Es zeigen sich ebenfalls altersabhängige Veränderungen der prozentualen Anzahl von MSCs an der Gesamtzellzahl, bei der sich die Anzahl von MSCs von Neugeborenen bis zu 50jährigen, um das vierfache verringert (Caplan, 2007). Ebenfalls konnten altersbedingte Veränderungen von MSCs in Migrationsverhalten und in der Dynamik des Zytoskeletts gezeigt werden. Die Reaktionsfähigkeit von Aktin auf biologische und mechanische Reize sinkt mit dem Alter der Probanden und die Gefahr von Seneszenz erhöht sich dabei (Kasper, et al., 2009). Die Kultivierung unter spezifischen Bedingungen lassen es zu, dass MSCs unverändert bzw. undifferenziert vermehrt werden, oder bei Bedarf durch Substitution bestimmter Reagenzien, in eine bestimmte Differenzierungsrichtung (Jackson, et al., 2007) gebracht werden können (Abb.8). Die Proliferation und Differenzierung von MSCs kann über mechanische Stimuli beeinflusst werden (Kurpinski, et al., 2006). Die Differenzierung in Knochen/-zellen (Ciapetti, et al., 2006; Kuznetsov, et al., 1997; Meinel, et al., 2004; Tondreau, et al., 2004), Knorpel/-zellen (Heng, et al., 2004; Li, et al., 2005), Bindegewebe/-zellen (Young, et al., 1998) zeigen, dass MSCs über ein breites Differenzierungspotential (Caplan and Bruder, 2001) verfügen. Sie können auch in Muskel/-zellen und Herzmuskelzellen (Toma, et al., 2002), aber auch Nervenzellen differenzieren (Jackson, et al., 2007). Die Differenzierung in Gewebe ento-/ektodermalen Ursprungs wurde von Jiang und Kollegen näher untersucht (Jiang, et al., 2002). Von Grove et al. wurden diese Erkenntnisse skeptischer gesehen, und es ergeben sich Zweifel, ob es sich in allen Fällen um eine reale Plastizität handelt (Grove, et al., 2004). Es wurde von Terada und Kollegen die Fusion mit anderen Zellen in diesem Zusammenhang diskutiert (Terada, et al., 2002).

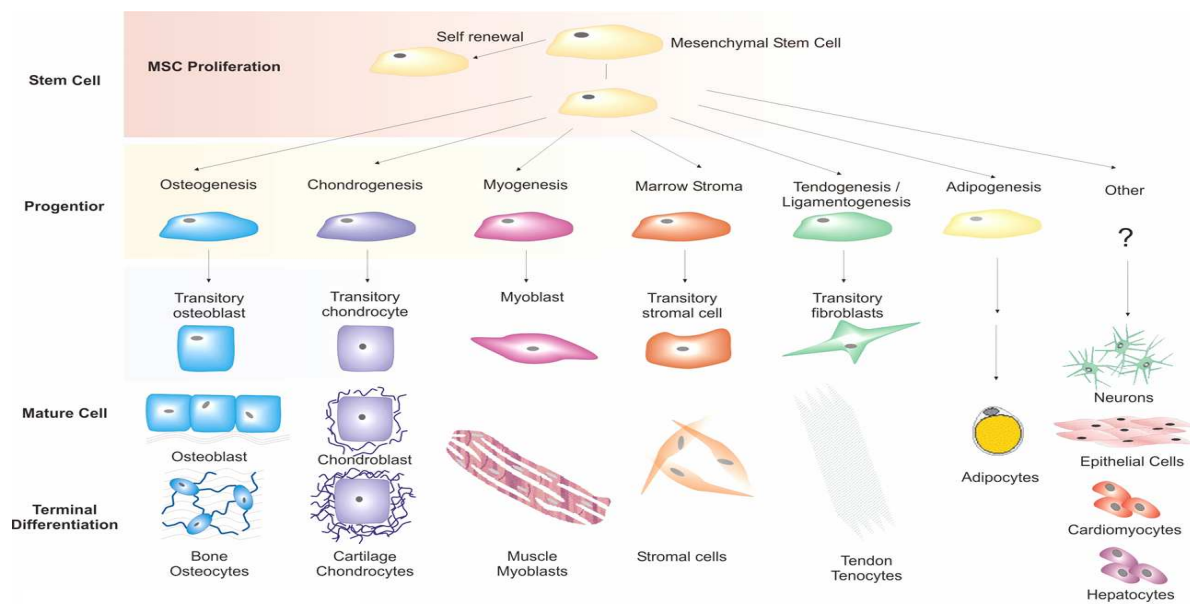


Abb. 8: Differenzierung multipotenter mesenchymaler Stammzellen (MSCs) modifiziert nach Caplan und Bruder 2001.

Die Charakterisierung der humanen MSCs nach Pittenger (Pittenger, et al., 1999) verlaufen über FACS-Analyse mittels der beschriebenen Oberflächenantigenspezifität CD 45 (negativ), CD 14 (negativ) und CD 34 (negativ) sowie der Positivmarker CD 105 (Endoglin/TGF β 1/2) und CD 106 (Vascular Cell adhesion molecule-1/ VCAM-1). Des Weiteren verfügen sie über ein ausgeprägtes plastikadhärentes Wachstum, was eine weitere Selektion, in Abgrenzung zu anderen mononukleären Zellen nach Dichtezentrifugation, erlaubt.

1.3.2 Therapeutische Anwendung mesenchymaler Stammzellen

Die Möglichkeit der *ex vivo* Kultivierung verbunden mit dem großen Differenzierungspotential von MSCs (Jiang, et al., 2002; Pittenger, et al., 1999), sowie deren allogener Reimplantationsfähigkeit ohne Immunsuppression, machen diese für den medizinischen Einsatz im Bereich der Transplantationsmedizin interessant (Krause, et al., 2007). Im Bereich des Bewegungsapparates werden sie zur Behandlung von Sehnenerkrankungen (Chong, et al., 2007; Violini, et al., 2009; Woo, et al., 1999) angewendet.

Darüber hinaus werden sie zur Behandlung der Osteogenesis imperfecta (Le Blanc, et al., 2005), Lebererkrankungen (Almeida-Porada, et al.) und zur anti-inflammatorischen und immunmodulierenden Behandlung bei grafts versus host disease und Darmerkrankungen (Gotherstrom, 2007) eingesetzt. Weitere Erkenntnisse bestätigen, dass MSCs über parakrine (Gnecchi, et al., 2008; Ladage, et al., 2007; Li, et al., 2009; Mirotsov, et al., 2007; Pittenger and Martin, 2004; Tang, et al., ; Xiang, et al., 2009; Xu, et al., 2009) und autokrine Effekte verfügen (Caplan and Dennis, 2006) und sie die T-Zellproliferation und -ausreifung hemmen (Krampera, et al., 2003; Tse, et al., 2003), welches sich wiederum positiv auf Regenerationsprozesse auswirkt. MSCs wirken zudem hemmend auf die Bildung von Kollagen Typ I und III und können somit der Entstehung von Narbengewebe entgegenwirken (Xu, et al., 2009), welches sich bei der Behandlung des Herzens nach Infarkten, positiv auf die Herzfunktion auswirkt. Dieser Aspekt macht sie im Bereich der Kardiologie sehr beliebt. Ein erstlimitierender Faktor für die Therapieerfolge der Transplantationsmedizin mit MSCs ist jedoch die geringe Anzahl von Stammzellen, die ihr Zielgewebe erreichen. Es konnte am Herzen festgestellt werden, dass nur 2-3% der Zellen an ihren Zielort gelangen (Hofmann, et al., 2005). Einer direkten Applikation der Zellen ins Zielgewebe stehen jedoch die Erkenntnisse von Breitbach und Kollegen entgegen, die 2007 bei der intramyokardialen Applikation der Stammzellen knochenmarkständiger Zellen in die Infarktregion, Ossifikationsprozesse zeigen konnten (Breitbach, et al., 2007). Eine Erhöhung der Effizienz der Stammzelltransplantationstherapie, könnte somit über die Verbesserung der transendothelialen Migration und Invasion der Zellen durch Vorkonditionierung der Transplantationsnische (Ghanem, et al., 2009) oder der Zellen selbst erfolgen.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) verfügen über ein hohes therapeutisches Potential und werden deshalb im Bereich der Transplantationsmedizin eingesetzt. Der Erfolg dieser Therapieform ist jedoch durch die geringe Anzahl von MSCs, die ihr Zielgebiet erreichen limitiert (Hofmann, et al., 2005). Die direkte Applikation von MSCs ins Zielgewebe ist jedoch aufgrund der Gefahr von Ossifikationsprozessen kontraindiziert (Breitbach, et al., 2007). Bestrebungen die Effizienz der Therapie über die Verbesserungen der transendothelialen Migration zu erreichen, bestehen im Ansatz die Transplantationsnische zu modifizieren (Ghanem, et al., 2009) oder die Zellen selbst zu konditionieren. Letzteres soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Mesenchymale Stammzellen (MSCs) besitzen eine hohe Sensitivität für mechanische Stimuli (Friedl, et al., 2007). Strukturen, die für das Migrationsverhalten von MSCs entscheidend sind (Steingen, et al., 2008), können mechanisch beeinflusst werden (Kasper, et al., 2007; Simmons, et al., 2003). Unter diesem Gesichtspunkt soll die Mechanotransduktion mit Stoß- (SW) und Druckwelle (DW) auf das Migrationsverhalten von MSCs, *in vitro*, untersucht werden. Da MSCs hinsichtlich der einwirkenden mechanischen Kräfte sehr divergent reagieren (Park, et al., 2004), sollen sowohl Druck-, als auch Stoßwelle unterschiedlicher Generierungsmechanismen (Piezoelektrisch/Elektromagnetisch) und unterschiedlichen Kombinationen von Behandlungsparametern betrachtet werden. Da die Migration und die Wirkung der Mechanotransduktion entscheidend von Aktin vermittelt wird, wird das Hauptaugenmerk auf Aktin gelegt werden. Hierzu sollen die Wirkungen der SW/DW auf Aktin selbst, auf die Zellformveränderung, die Migration und Lokomotion, Adhäsion, Proliferation, Apoptose und Seneszenz, untersucht werden. Das erste Ziel der Arbeit ist die Etablierung eines instrumentellen Versuchsaufbaus mit geeigneten Behandlungsschemata für die SW/DW-Beschallung von MSCs *in vitro*. Im Fokus stehen dabei die physikalischen Anforderungen des Versuchsaufbaus, die biologischen Ansprüche der Zellen sowie der physiologischen Aspekte der Mechanotransduktion *in vitro*.

Die Etablierung eines geeigneten Monitorsystems und geeigneter Schallungsparameter wie Temperatur, Gassättigung der Medien, Zelldichte, Reflektionen im Versuchsaufbau, Zell-Substrat-Interaktionen (Cheng, et al., 2009), Entstehung von Scherkräften (eNOS), Art der Beschallung (Intensitäten, Frequenz, Gesamtpulsanzahl) und temporaler Dosis-Wirkungsbeziehungen, sollen durch Vorversuche festgelegt werden. Das zweite, eigentliche Ziel der Arbeit ist die mechanistische Erforschung stoßwelleninduzierter Mechanotransduktion bei MSCs *in vitro*, unter dem Gesichtspunkt einer stoßwelleninduzierten Modifizierung der transendothelialen Migration. Es sollen die zellbiologischen Prozesse bei SW/DW-Behandlung dosis- und zeitabhängig untersucht werden. Die klinische Relevanz der Arbeit liegt somit in der möglichen Vorbehandlung von MSCs im Bereich der Transplantationsmedizin und einer zielgerichteten und prozessorientierten Empfehlung von Behandlungsinterventionen mit SW/DW, durch besseres Verständnis der zellbiologischen Wirkungen und Prozesse am Beispiel von MSCs . Sollte es möglich sein, das Verhalten von MSCs über mechanische Reize, im speziellen über SW oder DW, zu modifizieren, und diese bezüglich ihres Migrationsverhaltens zu aktivieren, könnte die Vorbehandlung der MSCs ein Benefit unter anderem für die Transplantationsmedizin bedeuten.

Bei den eingesetzten SW/DW-Geräten handelt es sich um:

- Piesozon 100, der Firma Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Deutschland, Applikator 100.621, einem piezoelektrischen Stoßwellensystem mit Druckbereich von 13-126 MPa, Einzel- und Dauerimpulsbetrieb (Wiederholffrequenz: 1-4 Hz), sowie Energieflussdichte von 0,04- 1,05 mJ/mm².
- Storz Medical Duolith®SD1, von Storz Medical AG, Tägerwilen, einem kombinierten Stoßwellentherapiesystem mit radialer DW- und fokussierter (elektromagnetisch) SW-Einheit. Für die Versuche mit SW wird die Vorlaufstrecke II, mit einer Fokuszzone von 0-30 mm, Einzel- und Dauerimpulsbetrieb (Wiederholffrequenz: 1-8 Hz), sowie Energieflussdichte von 0,01- 0,55 mJ/mm² (62MPa) verwendet.

Für die radiale DW der Applikator $\varnothing 15$ mm, mit einem internen Arbeitsdruck von 1-5 bar, Einzel- und Dauerimpulsbetrieb (Wiederholfrequenz: 1-21 Hz) sowie maximalem Schalldruck von 18,5 MPa.

- Swiss DolorClast® (radiale Druckwelle) von EMS (Elektro Medical Systems) Medical GmbH, Kontanz, Deutschland/ Applikator $\varnothing 15$ mm (Fokalbereich -6dB: 8 mm axial), Arbeitsdruck (Intern) 1 - 4 bar, Einzel- und Dauerimpulsbetrieb (Wiederholfrequenz: 1-15 Hz), maximaler Schalldruck 11,2 MPa sowie maximale Energiedichte 0,16 mJ/mm².

2. Material und Methoden

2.1. Stoß-/Druckwellenapplikation (SW-/DW-Applikation)

2.1.1. Stoß- / Druckwellen

Bei Stoßwellen handelt es sich um akustische Wellen. Diese sind Druck- oder Dichteschwankungen, die sich in Medien mit einer für das Medium spezifischen Geschwindigkeit ausbreiten (Abb. 9).

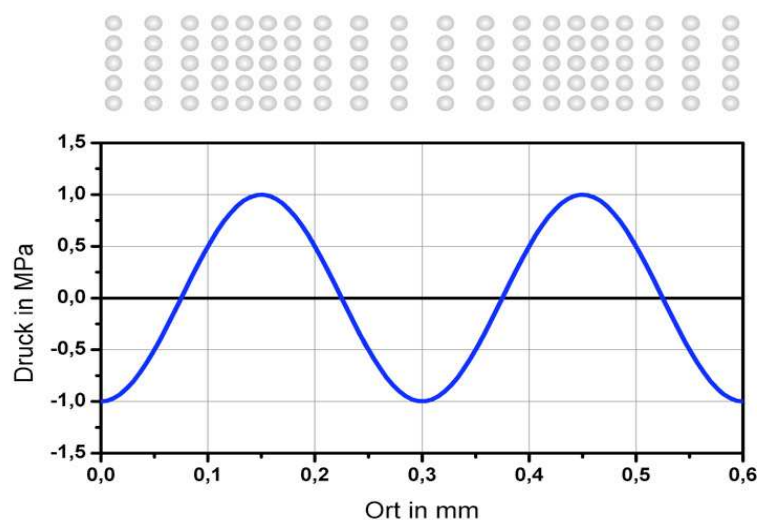


Abb. 9: Druckwelle: Sinusförmige Druckschwankung. Das Kugelmodell (oben) veranschaulicht die im Medium auftretenden Dichteschwankungen (Deutschsprachige Internationale Gesellschaft für Stoßwellentherapie- O. Wess).

Wenn die Amplituden der Druckwellen sehr hohe Werte annehmen (10-100MPa), kann es zum Phänomen der „Aufsteilung“ kommen. Verantwortlich ist hierbei die Nichtlinearität des Ausbreitungsmediums, das heißt, dass sich oben beschriebene Druckschwankungen, bei sehr hohem Druck schneller ausbreiten als bei geringem Druck. Das Aufsteilen ähnelt dem Verhalten von Meereswellen, die sich am Strand überschlagen, nur dass sich die Wellen im Gewebe nicht überschlagen können. Kommt es zu plötzlichen Veränderungen des Druckes innerhalb sehr kurzer Distanzen (deutlich kürzer als die Pulslänge), spricht man von einer Stoßwelle. Das Phänomen des Aufsteilens, ist nachfolgend in Abb. 10 schematisch dargestellt.

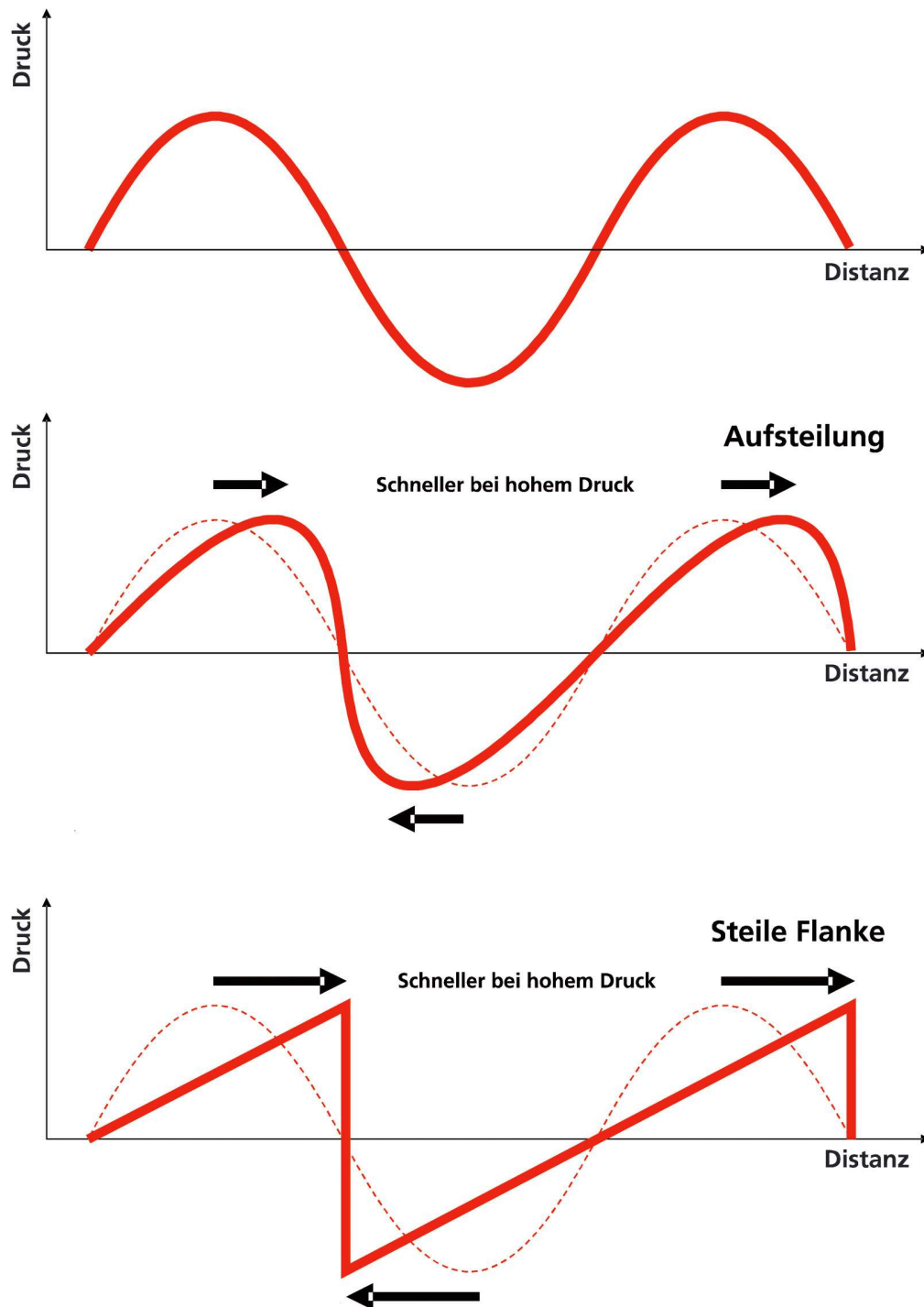


Abb. 10: Schematische Darstellung des „Aufsteilens“ einer Druckwelle zu einer Stoßwelle

Es ist das Phänomen dargestellt, wenn die Amplituden der Druckwellen sehr hohe Werte annehmen (10-100MPa) und es in Folge zum Phänomen der „Aufsteilung“ kommt (Deutschsprachige Internationale Gesellschaft für Stoßwellentherapie- O. Wess).

2.1.2. Fokussierte Stoßwellenapplikation bei MSCs (*in vitro*)

Bei der fokussierten Stoßwelle handelt es sich physikalisch gesehen um eine reale SW, die sich als dreidimensional(3D)-ausbreitende, transiente Druckschwankung darstellt. Sie ist dadurch charakterisiert, dass sie fokussiert, in kürzester Zeit Spitzendrücke von bis zu 100 MPa, mit Energieflussdichten von 0-3mJ/mm², erreicht. Sie zeigt sehr kurze Anstiegszeiten von ca. 10 ns und hohe Steilheit (die aus einer Druckwelle erst eine Stoßwelle formiert, siehe Abb.11). Sie breitet sich non-linear im Gewebe aus und verfügt über kurze Pulsdauer von ca. 0,3 µs.

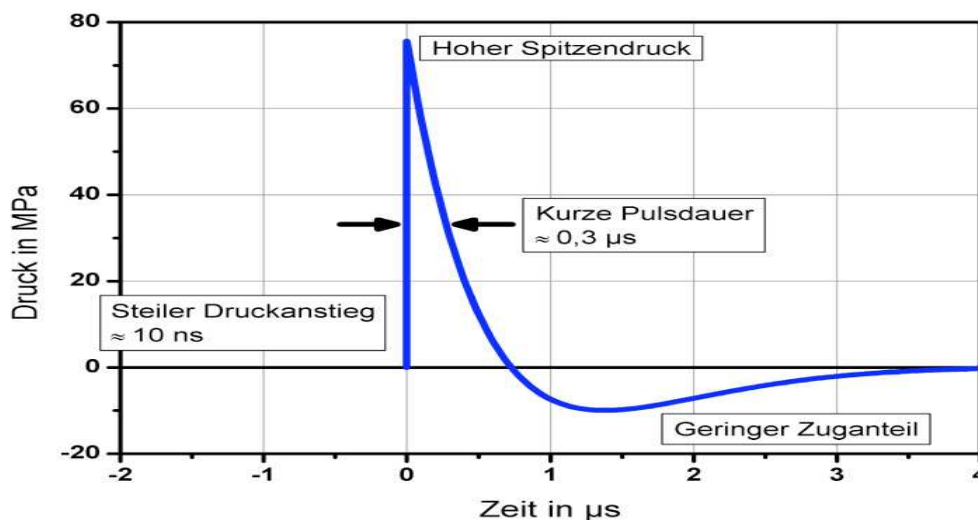


Abb. 11: Charakteristischer Verlauf einer fokussierten Stoßwelle (Druck-Zeitdarstellung ; Deutschsprachige Internationale Gesellschaft für Stoßwellentherapie - O. Wess).

Die fokussierte Stoßwelle verfügt über einen positiven Spitzendruck, sowie über eine negative Unterdruckphase, die für die Bildung von Kavitationsblasen verantwortlich ist.

Die Stoßwelle besitzt direkte Wirkungen an Grenzflächen unterschiedlichen Impedanz (akustischer Widerstand), sowie indirekte Wirkungen über so genannten Kavitationsblasen, die kurz nach der Druck-Zug-Wechselbelastung entstehen (Gerdesmeyer, et al., 2002; Ogden, et al., 2001b).

2.1.3. Kavitationsblasen

Kavitationsblasen entstehen in der Unterdruckphase der Stoßwelle in Folge der Druck-Zug-Wechselbelastung. Ein hoher Anteil dieser Kavitationsblasen wächst bis circa 100 ms an und kollabiert dann unter Aussendung sekundärer (sphärischer) Stoßwellen. In Abb.12 sind Kavitationsblasen in der Nähe von Grenzflächen dargestellt, die nur noch asymmetrisch kollabieren können und dadurch so genannte Mikrojets, mit Geschwindigkeiten von einigen Hundert Metern pro Sekunde, in Richtung der Grenzfläche, bilden.

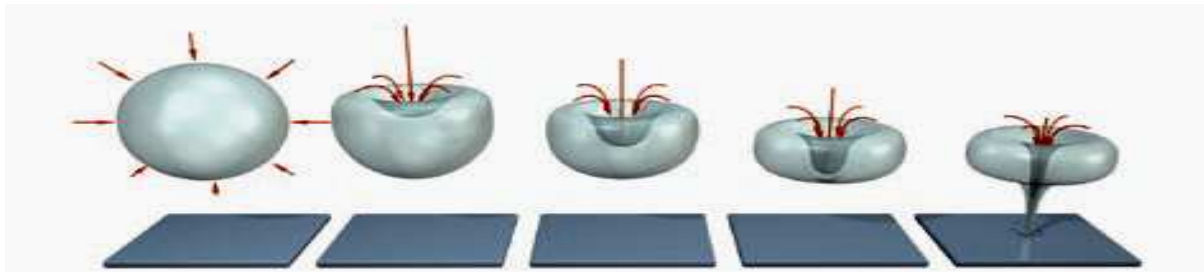


Abb. 12: Schematische Darstellung von Kavitationsblasen an Grenzflächen und Ausbildung so genannter Mikrojets (Church, 1989; Crum, 1988).

2.1.4. Generierung fokussierter Stoßwelle

Die Generierung fokussierter Stoßwellen in der Medizin findet grundsätzlich über vier verschiedene Methoden statt. Bei allen vier Methoden wird elektrische Energie in akustische Energie umgewandelt. Es entstehen reale Stoßwellen, die

- Piezoelektrisch¹
- Elektromagnetisch, Zylinderspule/Reflektor²
- Elektromagnetisch, Flachspule/Linse oder
- Elektrohydraulisch

erzeugt werden können. Nachfolgend werden die Generierungsarten der benutzten SW-Geräte näher vorgestellt. Bei der in der Medizin oft langläufig als „radiale Stoßwelle“ bezeichneten Wellen, handelt es sich physikalisch gesehen um eine Druckwelle, auf die ebenfalls noch näher eingegangen wird.

(¹, ²: Generierungsarten der von uns eingesetzten Geräte für die *in vitro*-Beschallung)

2.1.4.1. Das Piezoelektrische Prinzip

Die physikalische Grundlage zur Erzeugung von piezoelektrischen Stoßwellen beruht auf der spontanen Ausdehnung von Keramikeilchen, die durch einen kurzzeitigen Hochspannungsimpuls angeregt werden. Diese Ausdehnung der Keramik erzeugt im Wasser eine Druckwelle, die sich im Fokus zu einer Stoßwelle formiert (Abb. 13A). Die Piezoelemente sind in einer Kugelkalottenform (Abb. 13B) angeordnet, welche alle gleichzeitig durch einen Pulsgenerator angesteuert werden. Durch die kugelförmige Ausbildung mit großer aktiver Oberfläche bei entsprechender Apparatur der Kalotte, ergibt sich ein kleiner Fokusbereich mit hohem Schalldruck im Fokus.

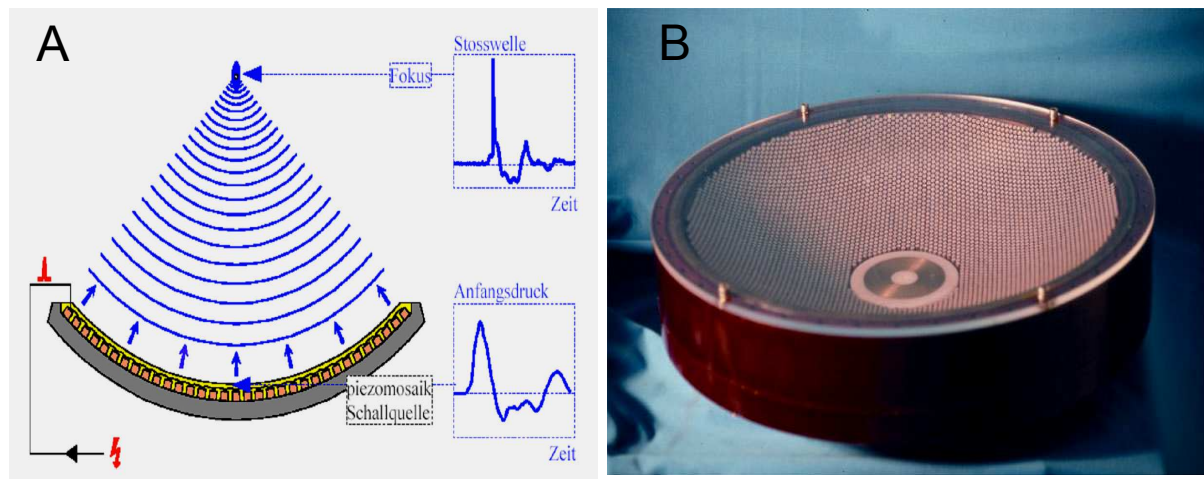


Abb. 13: Das Piezoelektrische Prinzip zur Erzeugung fokussierter Stoßwellen [(Abb. A: Stoßwellengenerierung: die Entstehung einer Druckwelle über diese Ausdehnung der Keramikeilchen, die sich im Fokus zu einer Stoßwelle formiert; Abb. B Kugelkalotte: die Keramikeilchen sind mosaikartig aufgebracht (Oberflächenvergrößerung) Wolf].

Die Piezoelektrische Stoßwelle der Firma Wolf

Bei dem SW-Gerät von Wolf (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Deutschland), handelt es sich um den Piezoson 100 / Applikator 100.621, Druckbereich von 13-126 MPa, Einzel- und Dauerimpulsbetrieb (Wiederholfrequenz: 1-4 Hz), sowie Energieflussdichte von 0,04- 1,05 mJ/mm². Die Eindringtiefe reicht von 0-40 mm, die Gesamtenergie E (5mm) liegt bei 15,7mJ.

2.1.4.2. Das Elektromagnetische Prinzip

Die elektromagnetische Druckpuls- bzw. Stoßwellenerzeugung mit Zylinderspulen arbeitet nach dem Lautsprecherprinzip (Abb.14). Es wird zuerst eine Zylinderwelle erzeugt, die dann mit einem parabolischen Reflektor fokussiert wird. Die Stoßwelle entsteht durch die Aufsteilung in der Fokuszone.

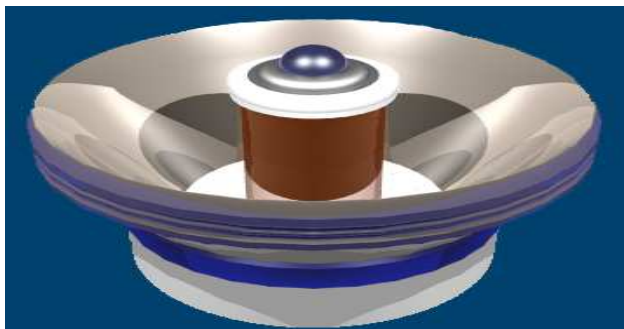


Abb.14: Das Elektromagnetische Prinzip zur Erzeugung fokussierter Stoßwellen (Die Wellen werden mit einer zylindrischen Spule erzeugt und mit Hilfe eines Reflektors fokussiert).

Die Elektromagnetische Stoßwelle der Firma Storz

Bei dem SW-Gerät von Storz Medical AG, Tägerwilen, Schweiz handelt es sich um den Storz Medical Duolith®SD1, einem kombinierten Stoßwellentherapiesystem mit radialer und fokussierter SW-Einheit. Für die Versuche wurde die Vorlaufstrecke II, mit einer Fokuszone von 0-30 mm verwendet. Einzel- und Dauerimpulsbetrieb (Wiederholfrequenz: 1-8 Hz), sowie Energieflussdichte von 0,01- 0,55 mJ/mm² (62MPa). Die Gesamtenergie wird von dem Gerät erfasst und angezeigt.

2.1.5. Radiale Stoßwellenapplikation bei MSCs (*in vitro*)

Bei radialen Stoßwellen (besser: Radiale Druckwellen, DW) handelt es sich physikalisch gesehen um Druckwellen, bei denen durch Druckluft/Pressluft ein Projektil auf eine Geschwindigkeit von einigen Metern pro Sekunde beschleunigt und dann auf einen Prallkörper (Applikator) abrupt abgebremst wird (ballistisches Prinzip- Abb.15). Die Bewegung des Prallkörpers wird am Berührungsbereich in das Gewebe übertragen, wo sie sich als Druckwelle divergent/radiär ausbreitet. Bei dem ballistischen Prinzip erfolgt keine Fokussierung.

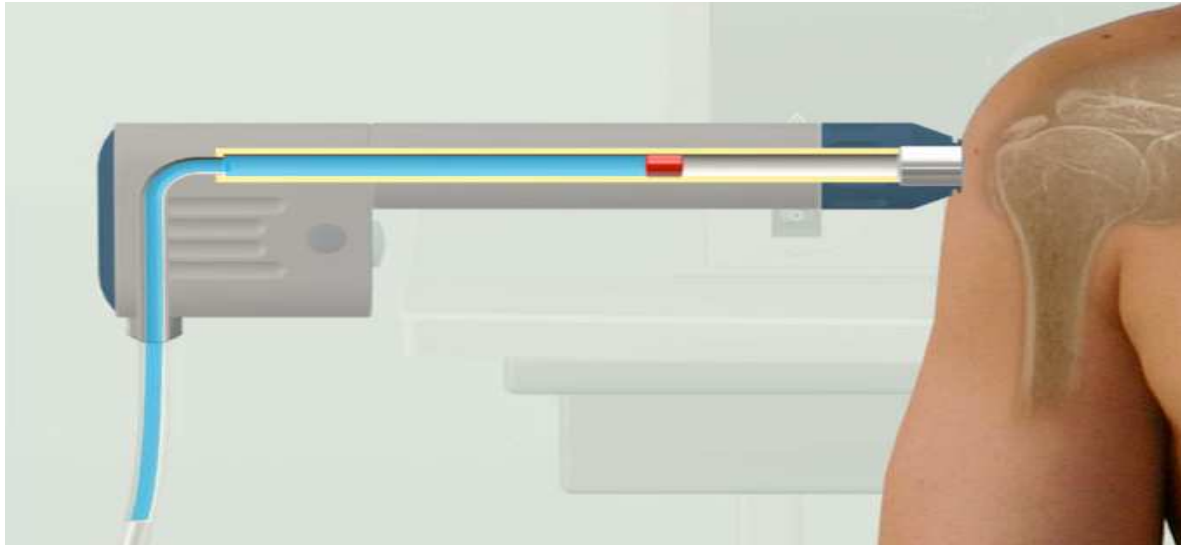


Abb.15: Schematische Darstellung des ballistischen Systems der radialen Stoßwellenapplikation
(Deutschsprachige Internationale Gesellschaft für Stoßwellentherapie- O. Wess).

Wegen der radiären Ausbreitung nehmen Druck und Energiedichte mit der dritten Potenz der Eindringtiefe in das Gewebe ab (Gerdesmeyer, et al., 2002), welches eher oberflächliche Behandlung wie bei Plantar Fasciitis mit und ohne Fersensporn (Entzündung der Aponeurose) oder Tennisellenbogen (Epicondylitis humeri radialis /Sehnenansatzreizung) nahe legt. Der Vergleich der physikalischen Parameter mit fokussierten Stoßwellen ist in Abb.17 dargestellt. Der energetische Verlauf einer radialen Stoßwelle ist in Abb.16 exemplarisch dargestellt.

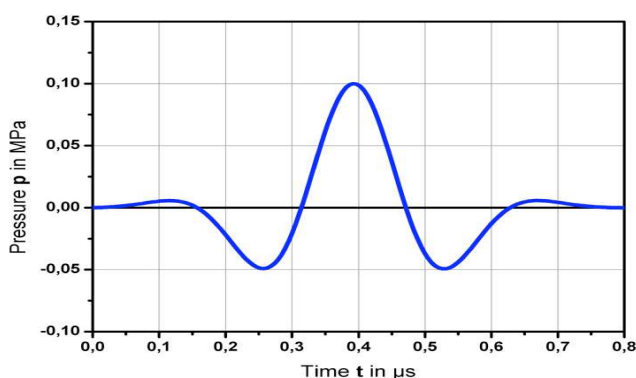


Abb.16: Druckpuls. Schematische Darstellung eines Drucks-Zeit-Signals, wie es z.B. in der Ultraschalldiagnostik Anwendung findet (Deutschsprachige Internationale Gesellschaft für Stoßwellentherapie / O. Wess).

Die Radiale Stoßwelle (DW) von EMS

Bei dem SW-Gerät von EMS (Elektro Medical Systems) Medical GmbH, Kontanz, Deutschland handelt es sich um den Swiss DolorClast® / Applikator \varnothing 15mm (Fokalbereich -6dB: 8 mm axial), Arbeitsdruck (Intern) 1 bar-4bar, Einzel- und Dauerimpulsbetrieb (Wiederholffrequenz: 1-15 Hz), maximaler Schalldruck 11,2 MPa sowie maximale Energiedichte 0,16 mJ/mm².

Die Radiale Stoßwelle (DW) von Storz

Bei dem SW-Gerät von Storz Medical AG, Tägerwilen, Schweiz handelt es sich um den Storz Medical Duolith®SD1/ Applikator \varnothing 15 mm, einem kombinierten Stoßwellentherapiesystem mit radialer und fokussierte SW-Einheit mit Arbeitsdruck (intern) 1-5 bar, Einzel- und Dauerimpulsbetrieb (Wiederholffrequenz: 1-21 Hz) sowie maximalem Schalldruck 18,5 MPa.

ANMERKUNG: Da radiale Stoßwellen im medizinischen Gebrauch unter eben diesem Namen eingesetzt werden, werden diese in der folgenden Arbeit auch weiterhin so titulierte, obwohl es sich physikalisch gesehen um eine Druckwelle handelt, und die Bezeichnung somit physikalisch gesehen unzutreffend ist.

2.1.6. Unterschied von Druck- und Stoßwelle

Wie bereits erwähnt wurde, unterscheiden sich Druck- und Stoßwellen sehr entscheidend voneinander, sowohl in der Erzeugung, als auch in ihren physikalischen Parametern. In anschließender Abbildung (Abb.17) sind die wichtigsten Unterschiede aufgelistet worden.

	Stoßwellen (fokussiert)	Druckwellen (unfokussiert)	Unterschied
Fokus	ja	nein	
Ausbreitung	nicht-linear	linear	
Aufsteilung	ja	nein	
Anstiegszeiten	0,02- 0,1 μ s	typisch 50 μ s	ca. 1:1000
Kompressionspulsdauer	Ca. 0,3 μ s	Ca. 200-2000 μ s	ca. 1:1000
positiver Spitzendruck	0-100 MPa	0-10 MPa	10:1 - 100:1
Energieflussdichte	0-3 mJ/mm²	0-0,3 mJ/mm²	ca. 10:1

Abb.17: Die wichtigsten Unterscheidungskriterien von Stoß- und Druckwellen (Deutschsprachige Internationale Gesellschaft für Stoßwellentherapie/ O. Wess).

2.1.7. Versuchsaufbau der *in vitro* Beschallung

Die Versuche werden aufgrund der hohen Sensitivität des Versuchsaufbaus unter exakt konstanten Bedingungen durchgeführt (Abb.19), da geringe Abweichungen in Temperatur (37°C), Zelldichte (je nach Assay) und unterschiedlichen Gasanteilen des Zellmediums (teilentgast), sehr divergente Ergebnisse liefern. Die Kontrollgruppen werden adäquat der Beschallungen behandelt, mit Ausnahme der Beschallung selbst. Es wird darauf geachtet, dass sich keine Gasblasen im gesamten Versuchsaufbau befinden (inklusive Ultraschallgel), da Vorgänge von Reflexion (durch Gasblasen) die Ergebnisse massiv beeinflussen können. Das Verwenden von neuem, unkonditioniertem und teilentgastem Medium ist Grundvoraussetzung für das Gelingen und die Auswertbarkeit der Versuche. In dem beschriebenen Versuchsaufbau werden ausschließlich reflektionsarme Schalen der Firma Ibidi (60 μ -Dish für Lebendzellanalyse, ibiditreat, Ibidi, Martinsried, Deutschland/ Reflexion < 1 Prozent) verwendet.

Die Ankopplung der Schallköpfe geschieht auf frisch präparierter Schweinehaut, in Anlehnung an dermatologische Forschungsmodelle. Alle Übergänge, einschließlich des Schalenuntergrunds werden mit spezifischem Schallungsgel (Heiland) gekoppelt.

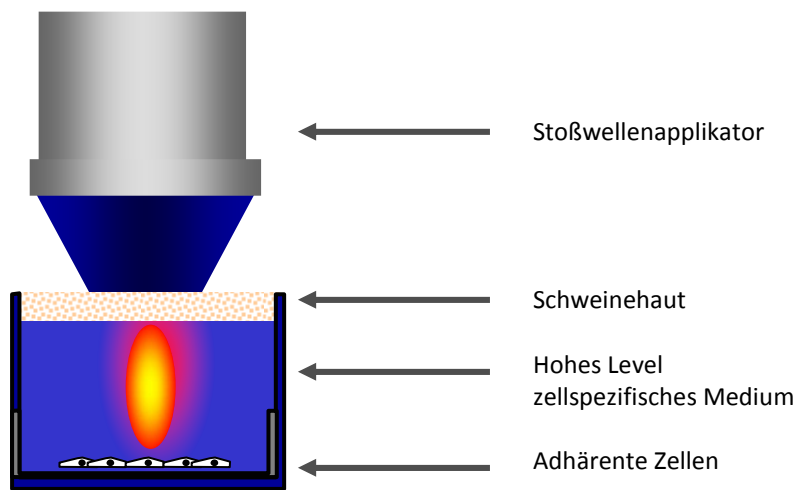


Abb.18: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (*in vitro*). In spezielle Schalen der Firma ibidi, die über eine geringe Reflexion von unter 1 Prozent verfügen, wird bis zum Schalenrand teilentgastes Medium gegeben. Das Medium wird sehr vorsichtig in die Schale gegeben, so dass keine neuen Blasen entstehen. Die Ankopplung geschieht über frisch präparierte Schweinehaut. Des Weiteren sind alle Übergänge mit blasenfreien Schallungsgel gekoppelt. Die Zellen werden in adhärentem Zustand geschallt.

Die Zellkulturschalen werden bis zum Rand mit zellspezifischen Medium (37°C) aufgefüllt, die Schweinehaut wird auf das Medium gegeben und so fixiert, dass keine Gasblasen zwischen beiden Phasen entstehen können. Die Schweinehaut wird mit Ultraschallgel beschichtet und mit entsprechendem Schallkopf angekoppelt. Um eine möglichst varianzarme Schallung in Bezug auf die Eindringtiefe des Schallkopfes und die Winkelung der Applikation zu gewährleisten, werden die Schallköpfe mit Hilfe eines Laborgerätehalters fixiert. Die Schallstöße werden im Dauerimpulsbetrieb (ohne Unterbrechung) appliziert. Danach stehen die Zellen für die spezifischen Assays zur Verfügung und können in den Ibidi Zellkulturschalen behandelt und ausgewertet werden.

2.1.8. Methode zur Intensitätenbestimmung der *in vitro* Beschallung

Aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen im lebenden Organismus (*in vivo*) und in der Zellkultur (*in vitro*) mussten die Behandlungsparameter für die SW-Applikation *in vitro* neu ermittelt werden. Zuerst wurde eine funktional-technische Bestimmung durchgeführt, in der die technischen Möglichkeiten des Versuchsaufbaus bestimmt und limitiert wurden. Darüber hinaus wurden verschiedene Versuchsbedingungen ausgetestet und schließlich standardisiert. Der nächste Schritt war eine weitere Limitation der Beschallung auf wirksspezifische Parameter. Hierbei wurden die, auf zellulärer Ebene, effektivsten Beschallungsparameter bestimmt. Aufgrund der sehr kosten- und zeitintensiven Versuche waren diese Schritte unumgänglich. Für die Bestimmung der technisch möglichen Beschallungen auf zellulärer Ebene wurden verschiedene Wiederholungsfrequenzen, Intensitäten (Energien) und Gesamtpulsanzahlen miteinander kombiniert und bei unterschiedlichen Zelldichten ausgetestet. Es wurden die Zellverluste und morphologische Kriterien der Zellen und des Monolayers nach Beschallung bestimmt. Die Versuche wurden vorerst in sechsfachen Ansätzen an Fibroblasten (J23T3) und danach in vierfachen Ansätzen an MSCs durchgeführt. Die Standardabweichungen der Versuche dienten ebenfalls zur Überprüfung der korrekten und reproduzierbaren Durchführung der Versuche. Die wirksspezifische Bestimmung schloss sich der funktional-technischen Bestimmung an. Hierbei werden die Behandlungsschemata weiter eingegrenzt. Für diese Prozedur wurden die Zellen nach SW-/DW-Behandlung mit Schnellvitalitätstest (Trypanblau) ausgewertet und im Migrationsassay (Boyden Chamber Assay) untersucht. Da für die vorliegende Arbeit das Migrationsverhalten der MSCs von entscheidender Bedeutung ist, wurde die wirksspezifische Bestimmung über die Migration bzw. Migrationsassay limitiert. Die Beschallungsparameter sind im Ergebnisteil unter 3.2.2. aufgelistet.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Humane Mesenchymale Stammzellen (hMSC)

2.2.1.1. Isolierung von humanen MSCs

Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) werden aus dem Knochenmark von Femurköpfen gewonnen, die aus dem Dreifaltigkeitskrankenhaus in Köln, aus Hüft-TEP (Total-Endo-Prothese) Operationen stammen. Die Verwendung der Hüftköpfe wurde durch die lokale Ethikkommission genehmigt. Bei den Hüftköpfen (n=114) handelt es sich um Hüftköpfe von Hüftkopfarthrosepatienten mit einem mittleren Alter von 64,5 Jahren (27-86 Jahre), die geschlechtsspezifische Verteilung lag bei 53,9% männlichen und 46,1% weiblichen Probanden. Bei der Verarbeitung der Hüftköpfe wurde darauf geachtet, dass die Patienten HIV –und Hepatitis negativ waren. Die Präparation der Hüftköpfe erfolgte noch am selben Tag der Operation. Die Hüftköpfe wurden von dem Klinikteam direkt im Anschluss an die Operation steril in spezielle Plastikbehälter verpackt, und in den Kühlschrank (4 °C) gestellt. Dies gewährleistete eine optimale Qualität an spongiösem Knochenmarkmaterial für die Isolierung mesenchymaler Stammzellen. Auf die Präparation von stark nekrotischem Material wurde aufgrund der schlechten Isolationsresultate abgesehen. Die Daten der Patienten, wie Geschlecht und Alter sowie der Tag der Operation wurden einschließlich der qualitativen Merkmale der Hüftköpfe in einem speziellen Erfassungsbogen dokumentiert und protokolliert. Die MSCs der Patienten wurden anschließend mit fortlaufenden Nummern versehen. Die Präparation der Hüftköpfe (Abb. 19) erfolgte nach folgendem Protokoll (Klinz, et al., 2007; Klinz, et al., 2005; Schmidt, et al., 2006a; Schmidt, et al., 2006b), bei dem die Präparation des spongiösen Knochenmarksmaterials mit speziellen chirurgischen Löffeln und einer Hohlmeisselzange nach *Luer* unter der Lamina (Air Flow, Model: Clean Air, Biohazard, EN 12469) erfolgte.

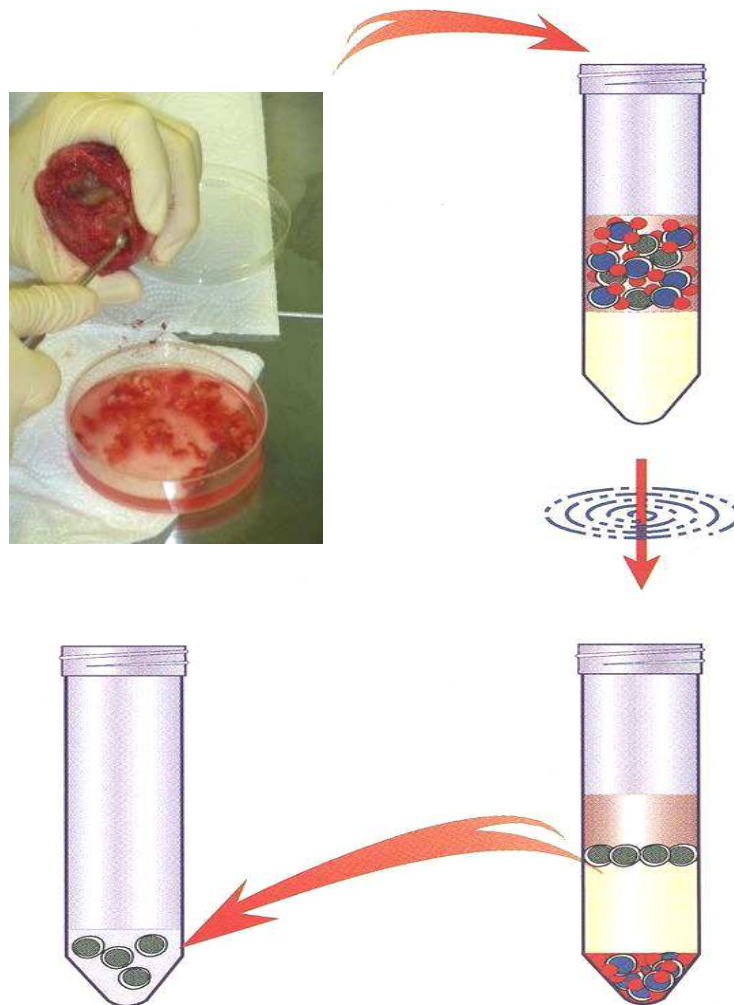


Abb. 19: Schematische Darstellung der Präparation/ Isolation von MSCs aus humanem Knochenmark (modifiziert nach Dynal Biotech GmbH, Hamburg, Deutschland).

Das extrahierte Knochenmark wird in eine 100-mm Zellkulturschale (100x20 mm, Falcon 353003, Becton Dickinson Labware, Le Pont De Claix, France) mit 35 ml 0.1M PBS (Phosphat buffered saline: 81mM disodiumhydrogenphosphate-di-hydrate, 19 mM sodium-di-hydrogenphosphate monohydrate, 150 mM sodium chlorid, pH:7,4, Gibco, invitrogen, Deutschland) ohne Magnesium (Mg^{2+}) und Kalzium (Ca^{2+}) gebracht und dort zu einer Suspension unter Zerkleinerung des Knochenmarks vorbereitet. Die Zellsuspension wird dann durch einen 70- μ m Nylonfilter (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) in ein 50 ml Falcon (Polypropylene Conical Tube, 352070, Becton Dickinson Labware).

Le Pont De Claix, France) gebracht, von hier wird die gefilterte Zellsuspension, dann auf 15ml eines Lymphozyten Separationsmedium (Ficoll-Paque TMPlus, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), für die Dichtezentrifugation, gegeben. Bei Ficoll handelt es sich um ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Ficollschicht passieren. Granulozyten dringen in die Ficollphase ein, während Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten sich in der Interphase ansammeln. Durch isopyknische Zentrifugation (Gleichgewichtszentrifugation) werden periphere mononukleäre Zellen, einschließlich MSCs, von den anderen Zellen getrennt. Dieser Schritt erfolgt mit einer 25 ml Pipette (Serological Pipet, Becton Dickinson Labware. Le Pont De Claix, Frankreich) und muss sehr vorsichtig geschehen um Vermischungen und Verwirbelungen zu verhindern. Das 50ml Falcon-Röhrchen wird nun für 30 min bei 800 g (~ 2800rpm) bei Raumtemperatur, ohne Bremswirkung, zentrifugiert (Multifuge 3L-R, Heraeus, ID-Nr: 20057820-A). Nach der Zentrifugation entsteht ein Phasengemisch, bei dem sich Erythrozyten und Zelltrümmer am Boden des Röhrchens ansammeln. In der Interphase zwischen Ficoll und Plasma, reichern sich mononukleären Zellen an, unter denen sich auch die MSCs befinden. Als oberste Phase lassen sich Fettzellen finden. Für die Separation der mononukleären Zellen, wird die Interphase nun mittels einer 25ml Pipette (Serological Pipet. Becton Dickinson Labware. Le Pont De Claix, Frankreich) vorsichtig meanderförmig abgehoben und in ein frisches 50ml Falconröhrchen gebracht. Die Suspension wird dann mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Das Zentrifugationsschema beschreibt eine Zentrifugation von 5 min bei 800 rpm bei Raumtemperatur, mit Bremseinstellung der Zentrifuge. Nach der zweiten Zentrifugation befinden sich die mononukleären Zellen am Boden des Röhrchens, als so genanntes Pellet, wieder. Dieses wird mit 1000 µl des Zellkulturmediums resuspendiert und aufgenommen und schließlich auf eine 100mm Petrischale mit 10 ml einer 20%igen alpha-MEM (Minimum Essential Medium) Nährlösung für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung und 95% Luftfeuchte (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) wird die Zellkulturschale 3-fach mit PBS gespült und nichtadhärente Zellen entfernt. Danach werden die Zellen erneut mit 10ml des 20%igen alpha-MEM inkubiert.

2.2.1.2. Kultivierung von humanen MSCs

Die humanen mesenchymalen Stammzellen werden in 20%igen alpha-MEM (Minimum Essential Medium) kultiviert. Dieses besteht aus alpha-MEM (Alpha Modification with L-Glutamine without Nucleosides, PAA, LOT E83209-1622 Pasching, Österreich) sowie 20% FCS (Fetal Bovine Serum LOT So5286S1810 Origin, South America, Biowest) ergänzt mit Penicillin/Streptomycin (Penicillin Streptomycin, GIBCO, Invitrogen, LOT 682764) und L-Glutamin (Sigma, München, Deutschland). Die Zellen erfahren zweimal wöchentlich einen Mediumswechsel mit warmem Zellkulturmedium. Bei einer Konfluenz von 70-80 Prozent werden die Zellen in die nächste Passage gebracht. Das Medium wird hierfür entfernt und die Zellen anschließend mit PBS gespült. Das Ablösen der Zellen geschieht mit Hilfe von 2 ml angewärmter Accutase (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland). Die Zellen werden dann für einige Minuten mit der Accutase im Brutschrank inkubiert. Bei vollständiger Lösung der Zellen wird die Suspension mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und 5min bei Raumtemperatur bei 800 rpm mit Bremswirkung zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand entfernt und das Zellpellet wird mit 1000µl Zellmedium resuspendiert. Für die Zellzählung mit der „Neubauer“-Zählkammer, werden 10µl in die Kammer eingebracht und ausgezählt. Das Ausplattieren der Zellen erfolgt in einer Dichte von 2000 Zellen pro cm² auf 100 er Zellkulturschalen (100x20 mm, Falcon 353003, Becton Dickinson Labware. Le Pont De Claix, France) und für die Beschallung auf speziellen reflexionsarmen ibidi- Zellkulturschalen (60µ-Dish für Lebendzellanalyse, ibiditreat, Ibidi, Martinsried, Deutschland/ Reflexion < 1%). Die Zellen werden bis zur Passage 4 in Kultur gehalten und für Versuche benutzt.

2.2.2. Fibroblasten (J23T3)

2.2.2.1. Kultivierung von Fibroblasten

Für die Etablierung der Behandlungsschemata sowie als Kontrollgruppe wurden murine Fibroblasten (J23T3) verwandt. Die unproblematische Isolierung und die einfache Kultivierung der Zellen machen sie zu einem sehr interessanten Zelltypen für die *in vitro*-Forschung. Die geringe Culture doubling time, also die Verdopplungszeit der Zellen in der Kultur, machen sie gerade für die Zellforschung interessant, da in kürzester Zeit ein Vielzahl

an Fibroblasten zur Verfügung steht (Smith and Lincoln, 1984). Die kultivierten Fibroblasten J23T3 (Abb.20) wurden uns freundlicherweise von der Uniklinik Köln zur Verfügung gestellt. J23T3 entstammen dem Präputium der Maus und werden in DMEM (Dulbecco's modified eagle Medium, Gibco 41965) ergänzt mit 10% FCS (Fetal Bovine Serum, Biowest LOT So5286S1810 Origin, South America) sowie 10 ml Penicillin-Streptomycin (Penicillin Streptomycin, GIBCO, Invitrogen, LOT 682764) und 10 ml L-Glutamin (Sigma, München, Deutschland) kultiviert (Steingen, et al., 2008). Die Zellen wurden adäquat zu MSCs kultiviert und passagiert.

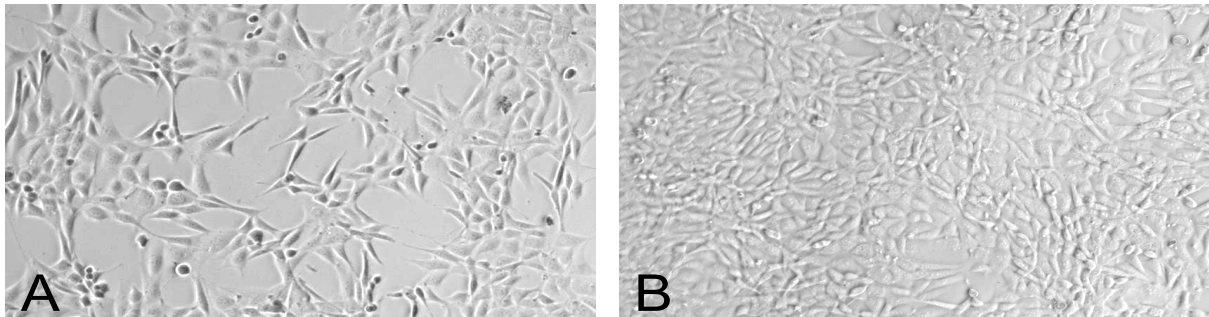


Abb. 20: Lichtmikroskopische Aufnahme mit Axio Cam MR Axiovert 200M Morphologie von murinen Fibroblasten (J23T3) bei unterschiedlicher Konfluenz (**A**: Konfluenz von circa 75 Prozent/ 5fache Vergrößerung/ Ph1; **B**: Konfluenz von > 95 Prozent/5fache Vergrößerung/Ph1).

2.3. Qualitätskontrollen

2.3.1 Morphologische Beurteilung der MSCs

Für das Monitoring der Zellkulturqualität ist die regelmäßige Observation der Zellmorphologie von entscheidender Bedeutung. Mesenchymale Stammzellen zeigen einen fibroblastenähnlichen Zelltyp (Abb.21), der durch seine spindelförmige Form und das plastikadhärente Wachstum gekennzeichnet ist (Friedenstein, et al., 1970; Friedenstein, et al., 1976; Gao, et al., 2001; Pittenger, et al., 1999; Pittenger, et al., 2000; Sekiya, et al., 2002).

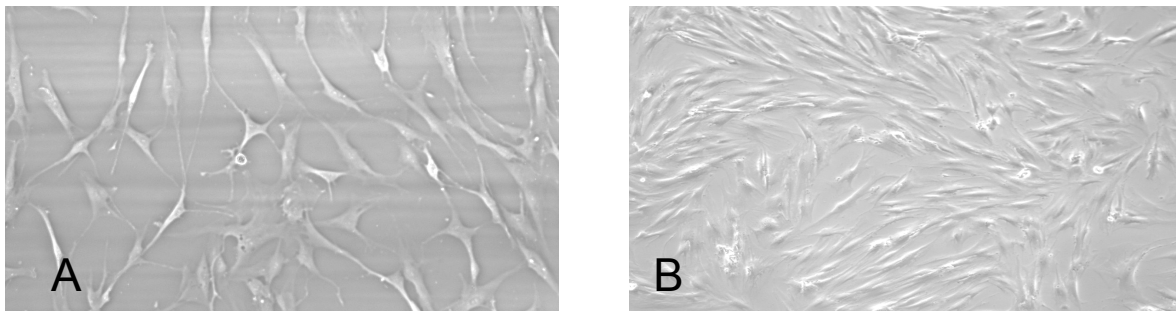


Abb.21: Lichtmikroskopische Aufnahme mit Axio Cam MR Axiovert 200M. Morphologie humaner MSCs bei unterschiedlicher Konfluenz (**A**: Konfluenz von circa 40 Prozent/ 10fache Vergrößerung/ Ph2; **B**: Konfluenz von circa 85 Prozent/5fache Vergrößerung/Ph2).

Obwohl es sich bei der Zellpopulation der MSCs um einen zahlenmäßig gering repräsentierten Zelltypus handelt, mit Gehalten von 0.001-0.01% der Gesamtzellen (Pittenger, et al., 1999), sind sie sehr gut und schnell zu kultivieren. Die Kultivierung unter bestimmten Bedingungen lassen es zu, dass MSCs unverändert bzw. undifferenziert vermehrt werden können. Bei MSCs handelt es sich um keine einheitliche Zellpopulation (Vogel, et al., 2003). Die regelmäßige mikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie ist entscheidend, um Rückschlüsse auf die Qualität der MSCs zu ziehen. Im Verlauf der Passagen können erhöhte Zellgrößen der MSCs auftreten (Baxter, et al., 2004; Mauney, et al., 2004; Stenderup, et al., 2003). Ebenfalls zeigen MSC von älteren Probanden eine erhöhte Zellgröße (Baxter, et al., 2004). Da eine erhöhte Zellgröße ein Zeichen für Seneszenz sein kann (Dimri, et al., 1995; Hayflick and Moorhead, 1961), sollte dies bei der mikroskopischen Observation berücksichtigt werden und entsprechend homogene Zellen für alle Versuche ausgewählt

werden. Dies ist vor allem bei dem breiten Altersspektrum (27-86 Jahre) und der unterschiedlichen Medikation der verwendeten Probanden bedeutend und muss für eine optimale Vergleichbarkeit der Versuche miteinbezogen werden. Ältere Patienten und fortgeschrittene MSC-Passagen zeigen ebenfalls eine weniger ausgeprägte Spindelform, als jüngere Passagen und Patienten (Baxter, et al., 2004).

2.3.2. Quantitative Bestimmung der Oberflächenmoleküle von MSCs mit Durchflusszytometrieanalyse / FACS-Analyse (=fluorescence activated cell sorting)

Die FACS-Analyse wird zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulärer Proteine genutzt. Oberflächenantigene können hierzu mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper markiert und mittels FACS-Analyse detektiert und quantifiziert werden. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die einzelnen fluoreszenzmarkierten Zellen wie eine Perlenkette an einen Laserstrahl unterschiedlicher Wellenlänge vorbei bewegt. Bei optimaler Anregung der Elektronen, abhängig von eingesetzten fluoreszenzmarkierter Antikörper, werden diese auf ein höheres Niveau gehoben. Im Anschluss fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die spezifischen Reaktionen der Zellen bzw. der fluoreszenzmarkierten Rezeptoren können nunmehr für die Analyse der Zellen genutzt werden. Die Messung erfolgt in dem FACS Beckman Coulter Epics XL/MCL und wird im Anschluss mit der Expo32 Software ausgewertet (Klinz, et al., 2005; Schmidt, et al., 2006a). Für die Durchflusszytometrie werden die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) mit Accutase (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) abgelöst und für drei Minuten bei 1300 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach werden die MSCs mit 0.1M PBS (Phosphat buffered saline: 81mM disodiumhydrogenphosphate-di-hydrate, 19 mM sodium-di-hydrogenphosphate monohydrate, 150 mM sodium chlorid, pH:7,4, Gibco, invitrogen, Deutschland) gewaschen und mit CD106-Fluorescein isothiocyanate (FITC, 1:20, Becton Dickinson), CD105-Phycoerythrin (PE, 1:50, Ancell, Bayport, USA), CD45-energy-coupled dye (ECD, 1:20, Beckman Coulter, Krefeld, Germany), CD34-Phycoerythrin-Cyanine 5 (PC5, 1:20, Beckman Coulter) und CD14 (1:20, Beckman Coulter) in 100µl PBS bei Raumtemperatur sowie im Dunkeln über einen Zeitraum von 15 Minuten eingefärbt.

CD 105	CD 106	CD 14	CD 34	CD 45
TGF- β -Rezeptor (Endoglin)	VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)	Lipopolysaccharid- rezeptor	AK gegen hämatopoetische Stammzellen	AK gegen Leukozyten
+ positiv	+ positiv	- negativ	- negativ	- negativ

Abb.22: Oberflächenantigenspezifität MSCs mittels FACS-Analyse (CD=Cluster of differentiation (nach Pittenger und Kollegen, 1999).

Die überschüssige Färbelösung wird mit PBS entfernt und die Zellen werden in 200 μ l PBS resuspendiert und analysiert. Nach Pittenger und Kollegen (1999) sind MSCs definiert als CD14, CD34, CD45 negativ und CD105 und CD106 positiv (Pittenger, et al., 1999)(Abb.22).

2.3.3. Untersuchung des Koloniebildungsverhaltens von MSCs mittels Colony forming units-Fibroblast-Assay / CFU-F-Assay

Multipotente Zellen besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung und Proliferation. Um das Proliferationspotential der fibroblastähnlichen MSCs zu quantifizieren, wird der so genannte Colonyformingunits-Fibroblast-(CFU-F)-Assay durchgeführt. Hierbei wird das Koloniebildungsverhalten der MSCs untersucht und quantifiziert (Castro-Malaspina, et al., 1980). Der CFU-F-Assay wird wie in der Literatur von Shur und Kollegen 2004 beschrieben durchgeführt (Shur, et al., 2004). Hierbei werden die MSCs (Passage 0) auf 100.000 Zellen ausgezählt und in eine 60mm (60x20 mm, Falcon 353003, Becton Dickinson Labware. Le Pont De Claix, France) Zellkulturschale ausplattiert. Die Zellen verbleiben über 2 Wochen in der 60mm Schale ohne einen Mediumswechsel. Die MSC werden im Anschluss mit PBS gewaschen und mit Cresyl-Violett (Merck, Darmstadt, Deutschland) über einen Zeitraum von 10 min gefärbt. Nach diesem Schritt folgt die mikroskopische Observation. Die blauen Kolonien werden quantifiziert.

2.3.4. Untersuchung der Plastizität von MSCs mittels Differenzierungs- Assays

Die Differenzierungs- Assays sind weitere Assays um Rückschlüsse auf die Qualität der MSC-Kultur zu ziehen. Da MSCs auch *in vitro* über eine hohe Plastizität verfügen (Dominici, et al., 2006) und in Adipozyten , Chondrozyten und Osteozyten (Goodwin, et al., 2001; Hashimoto, et al., 2006; Haynesworth, et al., 1992) differenzieren können, soll dies mit nachfolgenden Assays überprüft werden. Basierend auf den Erkenntnissen von Tondreau und Kollegen (Tondreau, et al., 2004a; Tondreau, et al., 2004b) wurden nachfolgende Differenzierungsschritte bei MSCs eingeleitet.

2.3.4.1. Nachweis der Knochenzellendifferenzierung von MSCs (Osteogene Differenzierung)

2.3.4.1.1. Osteogene Differenzierung von MSCs

Für die Differenzierung der MSCs in Osteoblasten werden die Zellen auf 32-mm Zellkulturschalen (Falcon, Becton Dickinson Labware. Le Pont De Claix, France) mit einer Zelldichte von 1000 Zellen pro cm² ausplattiert und mit einem spezifischen osteogenen Differenzierungsmedium (Abb.23) kultiviert. Vom selben Patienten wird eine Kontrolle angesetzt, bei dem die Kultivierung in 20%igen Proliferationsmedium stattfindet. Die MSCs werden bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung und 95% Luftfeuchte (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) für 2 Wochen kultiviert. Ein Mediumswechsel findet dreimal pro Woche statt.

Osteogenes Differenzierungsmedium

2mM	L-Glutamin (Sigma)
0,5%	Antibiotika-Antimykotika (Pen/Strep und Fungizone/ GIBCO, Invitrogen)
60µM	Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich)
10 mM	β-Glycerophosphate (Sigma-Aldrich)
0.1 µM	Dexamethasone (9α-Fluoro-16α-methylprednisolone/ Sigma-Aldrich)
15%	FCS (Fetales Kälberserum / Biowest LOT So5286S1810 Origin, South America)

Grundmedium: Alpha-Memm (Alpha Modification with L-Glutamine without Nucleosides, PAA, LOT E83209-1622 Pasching, Austria)

Abb. 23: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums.

2.3.4.1.2. Nachweis von Kalziumhydroxylapatit mittels Von Kossa- Färbung / Kernechtrotfärbung

Die Osteogene Differenzierung wird mittels Von Kossa Färbung analysiert. Bei der Von Kossa-Färbung handelt es sich um ein standardisiertes Nachweisverfahren für den histochemischen Nachweis von Kalziumhydroxylapatit sowie den Nachweis der Osteoblastendifferenzierung mittels Silbernitratlösung. Die Silbernitratlösung führt zu einer dunkelgrauen bis tiefschwarzen Färbung der Kalziumeinlagerungen. Hierfür werden die Zellen 5 Minuten in einem Metanol : Aceton (1:1)-Gemisch fixiert und anschließend 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Proben werden nun mit einem 5%-igen Silbernitratgemisch (Sigma-Aldrich) im Dunkeln inkubiert und danach gründlich erneut mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach der Behandlung mit 5%-igem Natriumkarbonat (Na_2CO_3) in Formaldehyd (Merck) werden die Zellen abermals mit destilliertem Wasser gespült. Als Gegenfärbung wird eine Kernechtrotfärbung durchgeführt, bei dem das Zytoplasma hellrot und die Zellkerne dunkelrot gefärbt werden. Dafür werden die Zellen 10 Minuten in 0,1% iger Färbelösung (2-methyl-4-chlorobenzendiazonium tetrachlorozincate, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit 5% Ammoniumsulfat (Sigma-Aldrich) inkubiert. Nach dem Waschen werden die Zellen in der aufsteigenden Alkoholreihe (Hoffmann, Deutschland) inkl. Xylol (Quadflieg, Deutschland) entwässert und anschließend mit Entellan (Merck) eingedeckt. Die Auswertung wird mit Zeiss Axiophot durchgeführt.

2.3.4.2. Nachweis der Knorpelzelldifferenzierung von MSCs (Chondrogene Differenzierung)

2.3.4.2.1. Chondrogene Differenzierung von MSCs

Für die chondrogene Differenzierung werden die 500.000 MSCs ausgezählt und für 5 min bei Raumtemperatur mit 800g mit Bremswirkung zentrifugiert (Multifuge 3L-R, Heraeus, ID-Nr: 20057820-A). Das dabei resultierte Pellet wird dann mit chondrogenen Differenzierungsmedium (Abb.24) inkubiert. Vom selben Patienten wird eine Kontrolle angesetzt, bei dem die Kultivierung in 20%igen Proliferationsmedium stattfindet.

Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung und 95% Luftfeuchte (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) für 3 Wochen kultiviert. Ein Mediumswechsel findet dreimal in der Woche statt. Nach den drei Wochen werden die Proben in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Chondrogenes Differenzierungsmedium

2mM	L-Glutamin (Sigma)
0,5%	Antibiotika-Antimykotika (Pen/Strep und Fungizone; GIBCO, Invitrogen)
50µM	Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich)
10ng/ml	TGF-β (Transforming growth factor-β; Sanver Tech)
1%	FCS (Fetales Kälberserum ; Biowest LOT So5286S1810 Origin, South America)
0,5µg/ml	Insulin (Sigma-Aldrich)

Grundmedium: D-MEM (Dulbecco's modified eagle Medium, Gibco 41965)

Abb. 24: Zusammensetzung des chondrogenen Differenzierungsmediums.

Das chondrogene Differenzierungspotential der MSCs soll mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR erfolgen, hierzu ist es notwendig die komplette RNA der Proben zu isolieren.

2.3.4.2.2. RNA-Isolation aus MSCs

Die gesamte RNA der Proben wird mit peq-Gold TriFast™ Reagent (Peqlab, Erlangen, Deutschland) extrahiert. Das gefrorene Probenmaterial wird in 1 ml TriFast lysiert und für 20 Sekunden mittels Ultraschall (Vibracell, Bioblock, Illkirch, Frankreich) homogenisiert. Danach wird die Probe für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend mit 200 µl Chloroform versetzt und weitere 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss wird das Gemisch für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 12000 g zentrifugiert, was zu einer Separation des Gemisches in führt. Die obere, wässrige Phase (RNA) wird in ein neues Röhrchen pipettiert. Die RNA wird nun mit 500µl Isopropanol überdeckt. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur, wurde die Probe erneut bei 12000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wird sie zweimal mit 75 % EtOH gewaschen und trocknet 30 Minuten. Das Pellet wurde mit nukleasefreien Wasser versetzt (Sigma-Aldrich). Um eine Kontamination mit DNA zu vermeiden, wurde die RNA für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit DNase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) versetzt.

Der DNase-Verdau wurde mit der Zugabe von 2 µl 25mM EDTA (Ethylene glycol tetraacetic acid/ Ethylenglycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure- Invitrogen) gestoppt. Die Proben wurden 10 min bei 65°C erhitzt und anschließend für 2 Minuten auf Eis gelagert.

2.3.4.2.3. Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung von MSCs

Für das weitere Vorgehen werden nun 2µg der Gesamt-RNA für die reverse Transkription entnommen und mit dem RT-Gemisch [10µl First-Strand-Buffer (5x, Invitrogen), 2µl DTT (100mM, invitrogen), 1 µl Oligo dT (Invitrogen), 2,5 µl dNTP-Mix (10 mM, Invitrogen), ad 50 µl RNase freies Wasser] bei 37°C im Thermocycler für 60 Minuten mit der M-MLV (Molony Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase (Invitrogen) zum komplementären DNA-Strang synthetisiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der RT-Ansatz anschließend für 5 min bei 90°C erhitzt. Die CdNA wurde nun in die PCR gegeben, dabei wurden die Zeit- und Temperaturintervalle wie folgt festgelegt: (10 Minuten bei 94°C /40 Zyklen 1 Minute bei 94°C/45 Sekunden bei 59°C/ 90 Sekunden bei 72°C/10 Minuten bei 72°C) 2µg der CdNA und des spezifischen Primers (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) für Kollagen II zur Amplifizierung des 388 bp Fragments der Kollagen II mRNA, wurden als Referenz genutzt. Als Kontrolle für die Menge der mRNA des Housekeeping Gens wurde β-Aktin (Fragment 698bp) benutzt. Der PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

4 µl	CdNA (RT-Ansatz)
5 µl	PCR-Puffer (Genecraft)
1,5 µl	d NTP-Mix
1 µl	Antisense/Sense genspezifischer Primer (25pmol/µl, Biotech/ Siehe Abb.25)
2,5 U	BioTherm DANN polymerase (Genecraft)
ad 50 µl	DEPC- Wasser

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose Gel Elektrophorese ausgewertet, hierfür werden 15 µl des PCR Produkts sowie 3µl DNA-Probe (6x, Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) auf einen 2 % iges Agarose Gel (Biozym, Oldendorf, Deutschland) mit TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, 2mM EDTA pH: 8, 90mM Tris pH:7,4, 90 mM Acetat) gegeben und aufgetrennt (5V/cm) und mit Ethidiumbromid (670 ng/ml) sichtbar gemacht.

Die verwendeten Primer sind in Abb.25 dargestellt. Die Analyse findet unter UV-Licht (302nm) statt.

Primer		Sequenzen (5'-3')	GenBank	Position	Fragment
β-Aktin-F	sense	ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG TAC G	NM_001101	449-473	698 bp
β-Aktin- R	anti- sense	CTG ATC CAC ATC TGC TGG AAG GTG G	NM_001101	1122- 1146	698 bp
Collagen II-F	sense	GAA CAT CAC CTA CCA CTG CAA G	BC116449.1	4163- 4184	388 bp
Collagen II-R	anti- sense	GCA GAG TCC TAG AGT GAC TGA G	BC116449.1	4550- 4529	388 bp

Abb.25: Übersicht über die verwendeten Primer.

2.3.4.3. Nachweis der Fettzellendifferenzierung von MSCs (Adipogene Differenzierung)

2.3.4.3.1. Adipogene Differenzierung von MSCs

Für die adipogene Differenzierung werden 1000 Zellen pro cm² in 4-Well-Schalen (Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) kultiviert und mit einem adipogenen Nährmedium kultiviert (Abb.26). Vom selben Patienten wird eine Kontrolle angesetzt, bei dem die Kultivierung in 20%igen Proliferationsmedium stattfindet. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung und 95% Luftfeuchte (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) für 2 Wochen kultiviert. Mediumswechsel finden dreimal die Woche statt.

Adipogenes Differenzierungsmedium

2mM	L-Glutamin (Sigma)
0,5%	Antibiotika-Antimykotika (Pen/Strep und Fungizone/ GIBCO, Invitrogen)
60µM	Indomethacin (Sigma-Aldrich)
5µg/ml	Insulin(Sigma-Aldrich)
1 µM	Dexamethasone (9α-Fluoro-16α-methylprednisolone/ Sigma-Aldrich)
15%	FCS (Fetales Kälberserum / Biowest LOT So5286S1810 Origin, South America)

Grundmedium: Alpha-Memm (Alpha Modification with L-Glutamine without Nucleosides, PAA, LOT E83209-1622 Pasching, Austria)

Abb. 26: Zusammensetzung des adipogenen Differenzierungsmediums.

2.3.4.3.2. Lipidvakuolennachweis mittels Oil Red O-Färbung

Die adipogene Differenzierung wird mittels Oil Red O-Färbung analysiert (Lillie, 1944), hierbei werden die Lipidvakuolen rot gefärbt und können lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Für die Färbung mit Oil Red O- Stammlösung (0,17 % Oil-Red O/ 60% Propanol) wird diese mit destilliertem Wasser versetzt (Verhältnis 3:2). Die Lösung wird gemischt und filtriert. Die nativen Zellen können direkt im Anschluss mit der fertigen Gebrauchslösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach gründlichem Waschen mit dest. Wasser kann eine Gegenfärbung mit Meyer's Hämatoxylin (Merck) erfolgen, welche die Zellkerne blau färbt. Nach 5-minütiger Einwirkzeit, können die Proben mit Kaisers Glycerin eingedeckt werden und stehen für die Auswertung zur Verfügung.

2.4. Vitalitätstests

2.4.1. Schnellvitalitätstest mit Trypanblau

Bei der Zellzählung wird ein Schnell-Vitalitätstest mit Trypanblau (Weil, et al., 2009) durchgeführt, der sehr schnell und einfach durchzuführen ist. Der saure Farbstoff Trypanblau, der auch als Benzaminblau bezeichnet wird, gehört zu der Gruppe der Azofarbstoffe, dessen Anion sich an Zellproteine haftet. Es handelt sich bei der Trypanblau-Färbung um eine Ausschlussfärbung, da der Farbstoff nur in tote Zellen bzw. Zellen deren Membran durchlässig geworden ist, eindringen kann. Aufgrund seiner Größe (M=960,8 g/mol) kann er die intakten Membranen lebender Zellen nicht passieren.

Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigt somit tiefblaue, avitale Zellen und ungefärbte, vitale Zellen. Für den Schnellvitalitätstest werden die Zellen wie gewohnt mit Accutase (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) abgelöst und zentrifugiert. Danach werden 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl der 0,5%igen Trypanblau-Lösung vorsichtig vermischt und für 2-5 Minuten bei 37°C inkubiert, hierbei ist jedoch darauf zu achten, dass der Farbstoff nicht zu lange einwirkt, da er zelltoxische Wirkungen hat. Die mit 70%igen Alkohol gereinigte Neubauer-Zählkammer wird mit 10µl der gut resuspendierten Zellsuspension befüllt, danach erfolgt die lichtmikroskopische Untersuchung mit dem 100er Objektiv. Die Gesamtzellzahl, sowie der blauen, avitalen Zellen wird meanderförmig ausgezählt (4 x 16 kleine Quadrate).

Die Zellzahl wird berechnet:

$$Z \times V \times 10^4 \times 5 = \text{Gesamtzahl der Zellen/ml}$$

Z = Mittelwert der gezählten Zellen (4 Großquadrate) V = Volumen der Zellsuspension
 10^4 = Kammerfaktor (Neubauer-Zählkammer) 5 = Verdünnungsfaktor

Abb. 27: Berechnung der Gesamtzellzahl.

Der prozentuale Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl errechnet sich wie folgt:



Abb. 28: Berechnung des prozentualen Anteils vitaler Zellen.

2.4.2. Vitalitätstest mit 7- Aminoactinomycin (7-AAD)

Der Vitalitätsfarbstoff oder besser gesagt der Avitalitätsfarbstoff 7-Aminoactinomycin (Bitekhtina and Vekshin, 2008) reagiert mit der DNA (Cytosin und Guanin) und kann somit als Zellfarbstoff eingesetzt werden. Er färbt ebenso wie Trypanblau nur Zellen mit nichtintakter Zellmembran und somit avitaler Zellen. Vitale und frühapoptotische Zellen werden nicht eingefärbt, hingegen werden spätapoptotische und nekrotische Zellen eingefärbt und können über Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

Für den Avitalitätstest mit 7-AAD werden 1µl der fertigen Gebrauchslösung (Absorption 488nm, Emission 647nm) in 300µl Trispuffer (TBS/ Tris buffered saline, 50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,6) gegeben. Die Zellen werden für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit der Färbelösung inkubiert, im Anschluss werden die Zellen mehrfach mit 0.1M PBS (Phosphat buffered saline: 81mM disodiumhydrogenphosphate-di-hydrate, 19 mM sodium-di-hydrogenphosphate monohydrate, 150 mM sodium chlorid, pH:7,4, Gibco, invitrogen, Deutschland) ohne Magnesium (Mg^{2+}) und Kalzium (Ca^{2+}) gewaschen. Die Proben können wässrig mit Aqua Polymount (Polysciences Inc, Warrington, PA, USA) eingedeckt werden. Für die Berechnung des prozentualen Anteils avitaler Zellen sollte ein weiterer Kernfarbstoff eingesetzt werden, mit dem die Gesamtzellzahl bestimmt werden kann. Hierzu bietet sich das Eindecken mit DAPI Mounting Medium (4',6-diamidino-2-phenyl-indol, Vectashield, Vector Laboratories, Absorption 360nm, Emission 461nm) an, das zur Markierung der DNA eingesetzt wird. DAPI ist in der Lage durch intakte Zellmembranen einzudringen und färbt somit alle Zellkerne in einen hellen blau an. Das prozentuale Verhältnis kann errechnet werden.

2.5. Untersuchung des Zellwachstums (Wachstumsrate)

Die MSCs werden mit Accutase (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) abgelöst, in der Neubauerzählkammer ausgezählt und mit einer Dichte von 2000 Zellen/cm² auf Ibidi-Schalen (60µ-Dish für Lebendzellanalyse, ibiditreat, Ibidi, Martinsried, Deutschland) ausplattiert. Sobald die erste Schale eine Konfluenz von 80 Prozent erreicht hat werden alle (unbehandelte und behandelte) Zellkulturschalen (n=4) desselben Ansatzes abgelöst und quantifiziert. Die Werte werden dokumentiert. Da die Wachstumsraten der Zellen, von Patient zu Patient und von Passage zu Passage variieren, kann eine vergleichende Beurteilung nur bei selben Patienten in derselben Passage durchgeführt werden. Um ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten, werden die Ansätze jeweils viermal durchgeführt. Die Daten werden zusammengeführt und die Standardabweichungen eingetragen. Die Wachstumsraten ($W=dN/dt$) geben an, wie viel Zellen pro Zeiteinheit zur Zellkultur hinzugekommen sind.

2.6. Immunhistochemische Untersuchungen von MSCs

Die mit 4% igem Paraformaldehyd (PFA, Merck) fixierten MSCs werden zuerst dreimal über einen Zeitraum von 10 Minuten in 0,05 M TBS (Tris buffered saline: 150mM Natriumchlorid, 50 mM Tris, pH 7.6) gewaschen. Um eventuell vorhandene endogene Peroxidase zu blockieren, werden die Zellen mit frisch angesetzter 3% iger Wasserstoffperoxidlösung (H_2O_2 in Metanol) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS, werden die Zellen mit 0,25% TritonX-100 (Serva) permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen (freie Aldehyde) mit 0,5M Ammoniumchlorid blockiert. Nach weiteren Waschschritten mit TBS erfolgt die Inkubation mit 5% igem BSA (Rinderalbumin, PAA, Pasching, Österreich) für 60 Minuten bei Raumtemperatur, um weitere unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Es folgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C, in 0,8 % igem BSA. Die immunhistochemische Kontrolle wird adäquat, jedoch ohne Zugabe des ersten Antikörpers behandelt. Die Verdünnungen des Antikörpers werden den spezifischen Angaben des Datenblattes bzw. den detaillierten Protokollen der technischen Assistenten entnommen. Nach 24 Stunden bei 4°C werden die Proben wie gewohnt mit TBS gewaschen. Der Zweite Antikörper wird speziesspezifisch ausgesucht und in einer Verdünnung von 1:400 für einen Zeitraum von 60 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben und kann sich an das freie Ende des primären Antikörpers binden. Nach weiteren Waschschritten mit TBS erfolgt die Markierung des zweiten Antikörpers mit Horseradish Peroxidasekomplex [(HRP, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) Tsuneshisa and Dunford, 1981] damit dieser in der weiteren DAB-(Diaminobenzidine, Merck, Darmstadt, Deutschland) Entwicklung detektiert werden kann. Nach erneutem Waschen mit TBS erfolgt die Entwicklung mit DAB.

2.6.1. Untersuchung der Proliferation mit Anti-Ki67

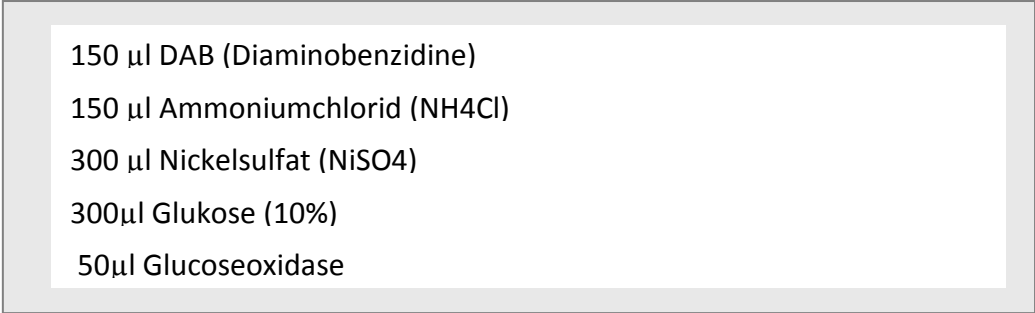
Die immunhistochemische Untersuchung der Proliferation der MSCs erfolgt mit dem Marker Anti-Ki67 (Scholzen and Gerdes, 2000) von abcam (1:200, Cambridge, England), einem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen, der mit dem Sekundärantikörper Polyclonal goat-anti rabbit (1:400, DAKO, Hamburg, Deutschland) bindet. Der Proliferationsmarker Ki67 wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert, Zellen in der Go-Phase fehlt dieser Marker (Heidebrecht, et al., 1996; Traut, et al., 1998).

2.6.2. Untersuchung der Apoptose mit Anti-Caspase3

Die immunhistochemische Untersuchung der Apoptose erfolgt mit dem Marker Anti-Caspase 3 (Patel, et al., 1996) von BD Pharmingen Biosciences (1:500, Heidelberg, Deutschland), einem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen, der mit dem Sekundärantikörper Polyclonal goat-anti rabbit (1:400, DAKO, Hamburg, Deutschland) bindet.

2.6.3. Entwicklung der Proben mit Diaminobenzidine (DAB)

Die DAB-Entwicklung der immunhistochemischen Proben beginnt mit dem Ansatz der 0.1M DAB-Lösung (Abb.29) in Phosphatpuffer (PB, 0.1M, pH 7.4).



150 µl DAB (Diaminobenzidine)
150 µl Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)
300 µl Nickelsulfat (NiSO ₄)
300µl Glukose (10%)
50µl Glucoseoxidase

Abb.29: Zusammensetzung der 0.1 M Diaminobenzidinfärbelösung für die DAB-Entwicklung.

Die Gebrauchslösung sollte kurz vor der Benutzung angesetzt werden und kann dann unter lichtmikroskopischer Kontrolle auf die Zellen einwirken und wird nach optimaler Färbung mit 0,05 M TBS (Tris buffered saline: 150mM Natriumchlorid, 50 mM Tris, pH 7.6) abgestoppt. Die Zeit wird dokumentiert und die Proben werden gründlich mit TBS gewaschen. Die Ibdid-Zellkulturschalen werden mit Aqua Polymount (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) wässrig eingedeckt.

2.7. Nachweis von Zellalterungsprozessen (Seneszenz) mittels Beta-Galaktosidase Färbung

Die Lebensdauer bzw. die Teilungsfähigkeit von Zellen ist limitiert [Hayflick-Limit (Hayflick, 1965; Hayflick and Moorhead, 1961)]. Alterungsprozesse von Zellen zeigen sich unter anderem in der Veränderung der Morphologie und in der Aktivität der Beta-Galaktosidase (Cristofalo, et al., 1998; Goldstein, 1990; Katsube, et al., 2008; Linskens, et al., 1995; Sherwood, et al., 1988; Stenderup, et al., 2003). Für die Untersuchung der Alterung oder Seneszenz von Zellen kann die Beta-Galaktosidase Färbung (Dimri, et al., 1995) durchgeführt werden, hierfür werden die Zellen vor der Färbung dreifach mit 0.1M PBS (Phosphat buffered saline: 81mM disodiumhydrogenphosphate-di-hydrate, 19 mM sodium-dihydrogenphosphate monohydrate, 150 mM sodium chlorid, pH:7,4, Gibco, invitrogen, Deutschland) ohne Magnesium (Mg^{2+}) und Kalzium (Ca^{2+}) gewaschen. Direkt im Anschluss werden die Proben für 15 min in einer spezifischen Glutaraldehyd-EGTA-Fixierlösung inkubiert [(5 mM EGTA (Ethylene glycol tetraacetic acid/ Ethylenglycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure - 25 ml aus 20mM Stock: 4.066 g/l PBS pH: 7,0) sowie 2mM $MgCl_2$ (Magnesiumchlorid- 10ml aus 20mM Stock: 7.607g/l PBS) und 0.2% Glutaraldehyd (1,5-Pentandial)]. Bei EGTA handelt es sich um einen Calciumspezifischen Chelator, der Metalloproteasen hemmt. Nach der Fixierung werden die Zellen dreimal 5 min mit einer Spezifischen Waschlösung gewaschen[(5mM EGTA- (Ethylene glycol tetraacetic acid/ Ethylenglycol bis (2-aminoethylether) -N,N,N',N'-tetraessigsäure - 25 ml aus 20mM Stock: 4.066 g/l PBS pH: 7,0) sowie 2mM $MgCl_2$ (Magnesiumchlorid- 10ml aus 20mM Stock: 7.607g/l PBS) zuzüglich 0.01% Natriumdesoxychololat (Salz der Desoxycholsäure (DCA) – anionisches Tensid zur Zelllyse und zur Solubilisierung von Membranproteinen) und 0,02% Nonident P40 (Octylphenolpoly(ethylenglycolether)-Solubilisierung von Membranproteinen)]. Für die eigentliche Färbung werden die Proben über Nacht bei 37°C in der 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranoside (98%)-Lösung gefärbt [10mM K_3FeCN_6 (0.32g/10ml spezifische Waschlösung), 10 mM K_4FeCN_6 (0.42g/ 10 ml spezifische Waschlösung) und 5-Bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranoside (X-Gal) 0.05 g/ml DMSO (Dimethylsulfoxid- organisches Lösungsmittel) pH: 5.5].

Am nächsten Tag folgen drei weitere Waschschrirte mit der spezifischen Waschlösung und das Färben und Eindecken mit DAPI Mounting Medium (4',6-diamidino-2-phenyl-indol, Vectashield, Vector Laboratories, Absorption 360nm, Emission 461nm) an, das zur Markierung der DNA eingesetzt wird. DAPI ist in der Lage durch intakte Zellmembranen einzudringen und färbt somit alle Zellkerne in einem hellen blau an. Nach der Quantifizierung der Gesamtzellzahl mit DAPI können nun die positiven Zellen über die Beta-Galaktosidase-Färbung quantifiziert und zur Gesamtzellzahl ins Verhältnis gesetzt werden. In Anwesenheit von β -Galaktosidase findet eine Umsetzung von 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) in das Zwischenprodukt 5-Brom-4-Chlor-indoxyl statt, das sich nach Oxidation und Dimerisierung in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo umwandelt und die Blaufärbung der Zellen macht (Abb.30).

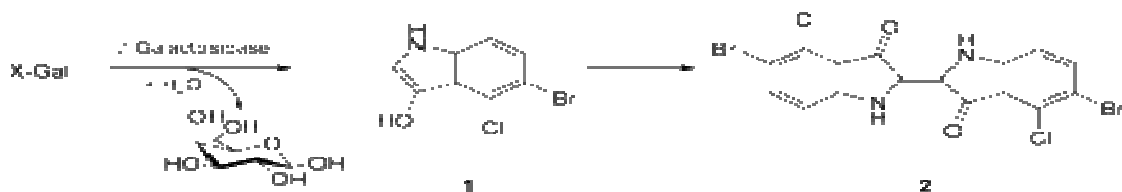


Abb. 30: Enzymatische Spaltung der 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) führt zur Bildung von 5-Brom-4-chlor-indoxyl (1). Nach der Oxidation an der Luft und Dimerisierung bildet es den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo (2).

2.8. Visualisierung des Aktinzytoskeletts von MSCs mittels Phalloidininfärbung

Für die Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts (Pellegrin and Mellor, 2007) wird das Fluoreszenzmarkierte Phalloidin (Alexa Fluor®488, Absorption: 495nm, Emission: 517nm, Molecular Probes, Invitrogen, Leiden, Niederlande) genutzt. Bei Phalloidin handelt es sich um ein cyclisches Alkaloid des weißen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*). Die MSCs werden zweimal mit 0,05 M TBS (Tris buffered saline: 150mM Natriumchlorid, 50 mM Tris, pH 7.6) gewaschen, danach werden die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,25% TritonX-100 (Serva) permeabilisiert.

Danach wird erneut mit 0.05M TBS gewaschen. Die Zellen werden anschließend mit Alexa Fluor®488 (1:40 in TBS) für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem, dreimaligen Waschen können die Proben mit DAPI Mounting Medium (4',6-diamidino-2-phenyl-indol, Vectashield, Vector Laboratories, Absorption 360nm, Emission 461nm) eingedeckt werden. Dies ermöglicht die Quantifizierung der Zellen.

2.8.1. Untersuchung der Ausrichtung der Aktinfasern

Da für dynamische Zellprozesse die Ausrichtung der Aktinfasern von entscheidender Bedeutung ist (Doyle and Lee, 2005; Munevar, et al., 2004), soll dies bei den Alexa Fluor 488-gefärbten MSCs mikroskopisch, mit Axiovert 200M (Zeiss) ausgewertet werden. Hierzu wird die Gesamtzellzahl über die DAPI-Färbung quantifiziert und die Zahl der Zellen mit gerichteten und ungerichteten F-Aktinfasern auf die Gesamtzellzahl bezogen. Die Prozentualen Werte werden statistisch ausgewertet und dokumentiert. Die beobachteten Zeiträume beziehen sich auf den Zeitpunkt t_0 , direkt nach der Schallung und Zeitpunkt t_1 , 30 min nach Beschallung.

2.8.2. Untersuchung der Depolymerisierung der Aktinfasern

Für die Bestimmung des prozentualen Wertes der depolymerisierten Aktinfasern, wird adäquat der Bestimmung des Ausrichtungsverhaltens der Aktinfasern verfahren. Die Beobachtungszeiträume sind ebenfalls direkt nach der Beschallung (t_0) und 30 min nach danach (t_1). Die Daten werden ebenfalls dokumentiert und statistisch ausgewertet.

2.9. Proteinchemische Methoden- Western Blot

2.9.1. Herstellung von Zellextrakten

Die Zellen werden mit eiskalten (4°C) PBS gewaschen und mittels 500µl RIPA-Puffer (25mM Tris/HCL pH:8, 150mM NaCl, 0,1% SDS, 0,1% Natriumdesoxycholat, 1% Nonident P-40 (IGEPAL), 10% Glycerol, 2mM EDTA) und Proteaseinhibitor (Roche) mittels Zellschaber abgelöst.

Die Zellen werden anschließend für 30 Min auf Eis gelagert und danach mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren. Die Zellen können nach der Zentrifugation mit 10000g bei 4°C (Tischzentrifuge, Eppendorf) in -80°C eingefroren und aufbewahrt werden.

2.9.2. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung findet nach der Methode von Lowry (Lowry, et al., 1951) statt. Hierbei wird der DC Protein- Assay (Bio-Rad, München, Deutschland) benutzt. Es werden 5 µl der Lysate in 96-Wellplatten inkubiert. Hinzu kommen die 25 µl der Reagenz A und 200 µl der Reagenz B. Um eine optimale Kalibrierung für die Messung des Proteinanteil zu haben, benutzt man BSA (Bovines Serum Albumin). Die Absorption wird nach 15 Minuten bei 650nm mit dem Molecular Devices kinetic microplate Reader (Sunnyvale, USA) in der Einheit µg/µl gemessen.

2.9.3. Separation der Proteine mittels SDS-PolyAcrylamid-GelElektrophorese (PAGE)

Für die Separation der Proteine werden 40µg des Zelllysats mit selben Volumen des 5x SDS-Ladepuffer (300mM Tris pH: 6.8, 5% SDS, 0,02% Bromphenolblau, 25 % Mercaptoethanol, 50% Glycerol). Die Proben werden für 5 min bei 95°C denaturiert und in die SDS-Kammern des Polyacrylamidgels hineinpipettiert, welche sich in der Criterion™ Elektrophorese Kammer (Bio-Rad) befinden. Nach der Zugabe des Laufpuffers (XT MOPS-Laufpuffer, 1 x, Bio-Rad) wird das Gel bei 200 V, 90 mA und 200W laufen gelassen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt.

2.9.4. Transfer der Proteine mittels Western Blot

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine spezielle Membran (PVDF-Polyvinylidene fluoride-Membran, Biotrance™, Bio-Rad) erfolgt in einem so genannten „Semi-dry“- Verfahren. Hierzu wird der Biometra Blotter (Göttingen, Deutschland) benutzt.

Filterpapier und spezielle Blot-Flies werden für 5 min in Transferpuffer eingelegt (25mM Tris, 10% Methanol, 150 mM Glycin). Die PVDF-Membran wird in Methanol aktiviert und in Transferpuffer equilibriert.

Die Materialien werden wie folgt aufgebaut:

Kathode -Flies- 2x Filterpapier- SDS-Gel- PVDF-Membran - 2xFilterpapier- Flies- Anode

Es wird bei 160mA für 60 min geblotet. Die Qualität des Proteintransfers kann mit der Färbung in Ponceau S-Lösung für 10-20 min (0,1% Ponceau S, 1% glacial acetic Säure) überprüft werden. Nach dem Waschen mit dest. Wasser werden die Banden sichtbar.

2.9.5. Immunfärbung der Proteine

Nach dem Proteintransfer werden unspezifische Bindungsstellen mit TBST (50mM Tris, 50mM NaCl, 0,05% Tween20, pH:7,5) mit 1% Trockenmilch (Bio-Rad) geblockt. Nach dem Waschen mit TBST wird der erste Antikörper über Nacht im Kühlschrank (4°C) in TBST inkubiert. Die Verdünnung wird dem AK-Datenblatt entnommen. Nach gründlichem Waschen (5 x 5 Minuten) in TBST wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in HRP (Horseradish peroxidase)-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Danach wird die Membran gründlich gewaschen (5x5min) und mit Chemolumineszenz Substanz (SuperSignal™ West Dura, Pierce, Rockfort, USA) beschichtet und in Folie eingepackt, mit einem X-Ray Film (BioMac Light Film, Kodak) bedeckt und je nach Probe 1 Sekunde bis 2 Stunden inkubiert. Der Film wird danach entwickelt und fixiert (Adefo, Dietzenbach, Deutschland).

Primärantikörper: → polyclonalen Antikörper Rabbit Anti-eNOS/NOS Type III (1:700, BD Transduction Laboratories™)

→ polyklonalen Antikörper Rabbit Anti-Rac1/Cdc42 (1:500, Biosource)

Sekundärantikörper: → ImmunoPure® Peroxidase conjugated Goat-anti-rabbit (1:4000, Pierce)

→ ImmunoPure® Peroxidase conjugated Goat anti-mouse (1:1500, Pierce)

2.10. Bestimmung der Migrationsrate von MSCs im Boyden Chamber Assay

Zur Überprüfung der migratorischen Eigenschaften von MSCs wird der modifizierte Boyden Chamber Assay (Boyden, 1962; Schmidt, et al., 2006a) benutzt. Dieser wurde ursprünglich für die Analyse von Chemotaxis bei Leukozyten etabliert (*Methods in Molecular Biology, vol 294: Cell migration: Developmental and Protocols, Hong-Chen Chen, Humana Press 2008*). Für den Assay werden spezielle Migrationsfilter [(8 µm, HTS Fluoro Block TM, Fluoreszenz-blockende (>99%) Polyethylen-membran im Wellenlängenbereich 490-700nm, Falcon Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich)] in 24-Well-Platten (Tissue Culture Plate, 24 Well, Falcon, Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich) gegeben (Abb.31). Die MSCs werden wie gewohnt mit Accutase (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) abgelöst. Es werden 5×10^4 Zellen, gut resuspendiert auf die Migrationsfilter gegeben und für einen Zeitraum von 8 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung und 95% Luftfeuchte (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) inkubiert. Die Zellen werden im Anschluss direkt in 4%igem Paraformaldehyd fixiert, nach 20 Minuten bei Raumtemperatur werden die Filter mit PBS (Phosphat buffered saline: 81mM disodium-hydrogenphosphate-di-hydrate, 19 mM sodium-di-hydrogenphosphate monohydrate, 150 mM sodium chlorid, pH:7,4, Gibco, invitrogen, Deutschland) dreimal gewaschen. Die Filter werden nachfolgend mit einem spitzen Skalpell herausgeschnitten und auf Objektträger (76x26 mm, Mattrand, Menzel, Braunschweig, Deutschland) gebracht und mit DAPI Mounting Medium (4',6-diamidino-2-phenyl-indol, Vectashield, Vector Laboratories, Absorp. 360nm, Emm: 461nm) eingedeckt. Dies dient der Markierung der DNA. DAPI ist in der Lage durch intakte Zellmembranen einzudringen und färbt alle Zellkerne in einen hellen blau an. Die Proben werden (nach dem Trocknen) mikroskopisch mit dem Axiovert 200M (Zeiss) ausgewertet.

Hierzu werden nur die vollständig migrierten Zellen gezählt, teilweise migrierte Zellen, die sich bereits in den Filterporen befinden, bleiben unberücksichtigt. Die Ansätze werden jeweils mit n gleich 4 durchgeführt.

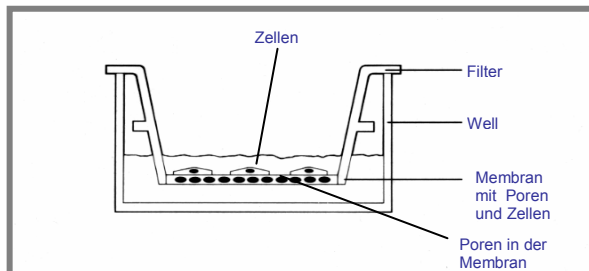


Abb.31: Schematische Darstellung des Boyden-Chamber Assays.

2.11. Vitalmikroskopie/Lebendzellanalyse

2.11.1. Untersuchung der gerichteten Migration im Wundheilungsassay / Wound and Healing Assay

Der Wundheilungsassay (Baker and Humphreys, 1971; Dulbecco, 1970; Gabbiani, et al., 1984; Selden and Schwartz, 1979) ist einer der ersten Methoden, um die gerichtete Migration von Zellen zu erforschen. Er gibt Aufschluss über Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen bei der Zellmigration (Methods in Molecular Biology, vol 294: Cell migration: Developmental and Protocols, Luis G.Rodriguez, Xiaoyang Wu, and Jun-Lin Guan, Humana Press 2008). Beim „Wound and Healing Assay“ werden die MSCs auf speziellen, reflektionsarmen ibidi-Zellkulturschalen (60µ-Dish für Lebendzellanalyse, ibiditreat, Ibidi, Martinsried, Deutschland) mit einer Dichte von 2000 Zellen pro cm² ausplattiert. Bei einer Konfluenz von circa 90% wird mit einer Pipettenspitze; ein zur Kulturschale querverlaufender Wall (Wunde/Scratch) in den Zellrasen gezogen (Abb.32).

Starke Wallbildungen an den Wundrändern, durch den Scratch, führen zum Ausschluss der Proben, da diese die Ergebnisse verfälschen können.

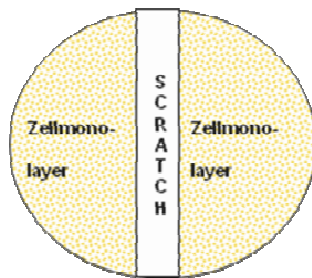


Abb.32: Schematische Darstellung der Wundsetzung beim „Wound and Healing“-Assay.

Die Proben werden nach der SW-Behandlung in das Vitalmikroskop Axiovert 200M (Zeiss) für 24 Stunden bei vorgeheizten 37°C und 5% CO₂-Sättigung und 95% Luftfeuchte (unter Brutschrankbedingungen) in 20%igen alpha-MEM (Minimum Essential Medium) inkubiert. Es werden mit der Axio Cam MR Axiovert 200M (Zeiss) alle 10 min Bilder des „Status Quo“ gemacht (Objektiv A-Plan 5x/0.12), so dass nach 24 h eine Komplettdokumentation entsteht, die den Verlauf des „Wundverschlusses“ protokolliert. Zur Auswertung des Assays gehört die Erfassung der Zeitspanne, die für den kompletten Wundverschluss nötig ist. Die Auswertung erfolgt in 4 Stunden Intervallen bis zum vollständigen Schluss der „Wunde“. Die Wundflächen werden mittels Flächenberechnung in Axiovert 200M (Zeiss) bestimmt.

2.11.2. Untersuchung der Zellbewegungen von MSCs mittels Zelltracking-Assay

Für die Beurteilung der Zellbewegung werden MSCs mit einer Dichte von 2000 Zellen/cm² auf speziellen, reflexionsarmen Schalen der Firma ibidi (60µ-Dish für Lebendzellanalyse, ibiditreat, ibidi, Martinsried, Deutschland/ Reflexion < 1%) kultiviert. Sie werden direkt nach der Behandlung, in das Vitalmikroskop Axiovert 200M (Zeiss) für 24 Stunden bei vorgeheizten 37°C und 5% CO₂-Sättigung und 95% Luftfeuchte (unter Brutschrankbedingungen) in 20%igen alpha-MEM (Minimum Essential Medium) inkubiert.

Es werden mit der Axio Cam MR Axiovert 200M (Zeiss) alle 10 min Bilder des „Status Quo“ angefertigt (Objektiv A-Plan 5x/0.12), so dass nach 24 h eine Komplettdokumentation entsteht. Die Daten werden für die weitere Auswertung aus Axiovision exportiert und mit dem Zelltracking-Tool von Metamorph bearbeitet. Zur Auswertung des Assays gehören die Erfassung der Geschwindigkeit der Zellen sowie die fortgesetzte Strecke und die Entfernung zum Ausgangspunkt der Zelle nach 24 Stunden. Das Bewegungsverhalten der MSCs kann nunmehr qualitativ (Bewegungsrichtung) und quantitativ (Schnelligkeit) ausgewertet werden. Für die Auswertung werden die Daten aus Axiovision exportiert und mit Metamorph Zelltracking Software analysiert. Die Daten können direkt in Excel übernommen und zu entsprechenden Graphen zusammengefasst werden.

2.12. Statistische Analyse der Daten

Alle Experimente wurden mindestens viermal durchgeführt und in Microsoft Excel erfasst und dokumentiert. Es folgte die Bestimmung der Mittelwerte und der Standardabweichungen in Microsoft Excel. Diese Werte wurden anschließend für die weitere statistische Analyse mit dem Programm GraphPad Prism 3.0 mit der Varianzanalyse One-Way Anova (Analysis of Variance) sowie der Bonferroni- Adjustierung des alfa- Fehlers unter Anwendung der Bonferroni- Ungleichung ausgewertet. Als statistisch signifikant wurden alle p-Werte kleiner als 0,05 ($p < 0,05$) gewertet, welche in den Graphen jeweils mit einem Sternchen gekennzeichnet wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Qualitätskontrolle der Zellkultur vor Beschallung

Zur Sicherung einer optimalen und vergleichbaren Qualität der eingesetzten humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) unterliegen diese strengen Kontrollen. Es werden ausschließlich Zellen verwendet, die über eine optimale Kondition, Morphologie und Vitalität verfügen. Stichprobenweise werden die koloniebildenden Eigenschaften sowie das Differenzierungsverhalten überprüft. Diese Kontrollen dienen der Überprüfung der Qualität der Zellen, die in Abhängigkeit der Spender sehr stark variieren können, sowie der standardisierten Kulturbedingungen. Die eingesetzten Hüftköpfe (n=114) stammen von Probanden, die sich einer Hüft-TEP (Total-Endo-Prothese)-Operation unterzogen haben. Das Geschlechterverhältnis beträgt 53,9 % zu 46,1 % der männlichen zu weiblichen Probanden. Das mittlere Alter der Patienten liegt bei 64,5 Jahren (Abb. 33).

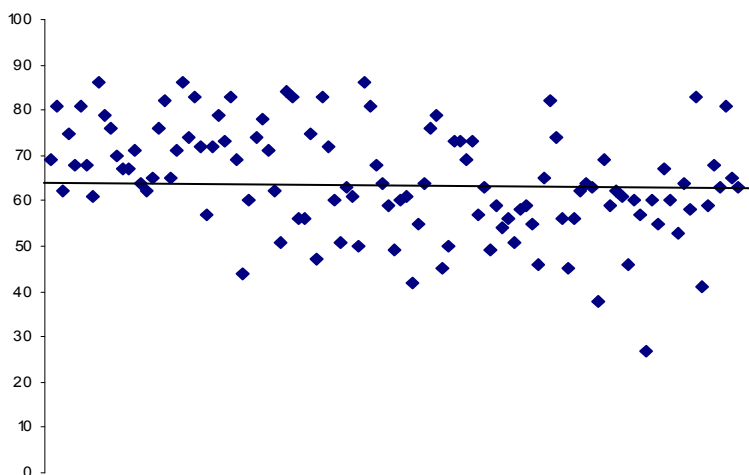


Abb.33: Graphische Darstellung der Altersverteilung der Probanden von denen die Hüftköpfe stammen.
Das mittlere Alter der Probanden liegt bei 64,5 Jahren.

3.1.1. Morphologische Beurteilung der hMSCs

Für die Qualitätssicherung der humanen mesenchymalen Stammzellen, ist eine stetige Kontrolle der Zellmorphologie und der Kulturbedingungen unerlässlich. Bei der Beurteilung der Zellmorphologie wurde darauf geachtet, dass die Zellen die charakteristische spindelförmige Gestalt (Fibroblastenähnlicher Zelltyp, Abb.34) aufzeigen (Friedenstein, et al., 1970; Friedenstein, et al., 1976; Gao, et al., 2001; Pittenger, et al., 1999; Pittenger, et al., 2000; Sekiya, et al., 2002). Zellen, die über eine ausgeprägte Hypertrophie verfügten, (Dimri, et al., 1995; Hayflick and Moorhead, 1961), wurden von den Versuchen ausgeschlossen, da eine erhöhte Zellgröße auf Seneszenz hinweisen könnte. Ebenfalls wurden Zellen mit sichtbarem intrazellulärem Granulat von den Versuchen ausgeschlossen.

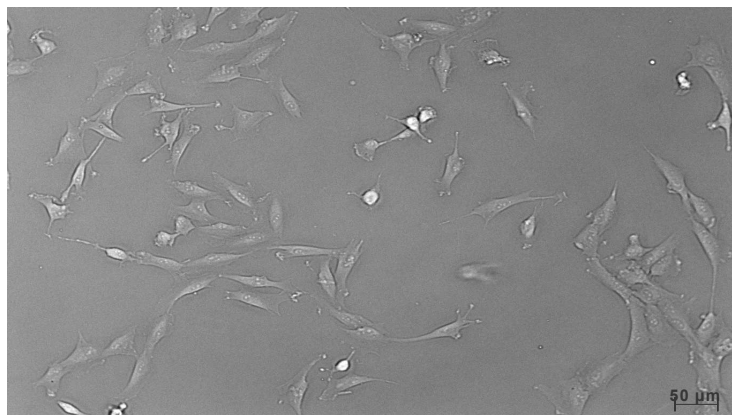


Abb. 34: Lichtmikroskopische Aufnahme mit Axio Cam MR Axiovert 200M Morphologie von humanen mesenchymalen Stammzellen bei einer Konfluenz von circa 15 Prozent, kurz nach dem Ausplattieren. 5fache Vergrößerung / Ph2.

3.1.2. Durchflusszytometrieanalyse- FACS-Analyse der MSCs

Da es sich bei der Zellpopulation der MSCs um keine einheitliche Zellpopulation (Vogel, et al., 2003) handelt, ist eine quantitative Bestimmung der charakteristischen Oberflächenantigene mittels FACS-Analyse unerlässlich. Rezeptoren können hierzu, mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper markiert und mittels FACS-Analyse detektiert und quantifiziert werden. Abb.35 zeigt exemplarisch das Resultat einer FACS Analyse humaner mesenchymaler Stammzellen in Passage II eines männlichen, 67 Jahre alten Patienten.

Die Abb. 35A zeigt einen Anteil von 84 % der Gesamtzellzahl an CD45 negativen Zellen. In Abb. 35B ist das Ergebnis der weiteren Analyse der CD45 negativen MSCs dargestellt. Ein prozentualer Anteil von 77,7% der CD45 negativen Zellen, sind ebenfalls doppelt negativ für die Oberflächenantigene CD14 und CD34. Im weiteren Verlauf Abb.35C zeigt sich, dass 98,9% der dreifach negativen (CD45-,CD34-,CD14-) MSCs doppelt positiv für die Oberflächenantigene CD105 und CD106 sind und somit definitionsgemäß (Pittenger, et al., 1999) als MSCs gelten. Der prozentuale Anteil von MSCs an der Gesamtzellzahl der isolierten mononukleären Zellen entspricht somit einem errechneten Prozentsatz von 64,5% ($0,84 \times 0,777 \times 0,989 = 0,645$).

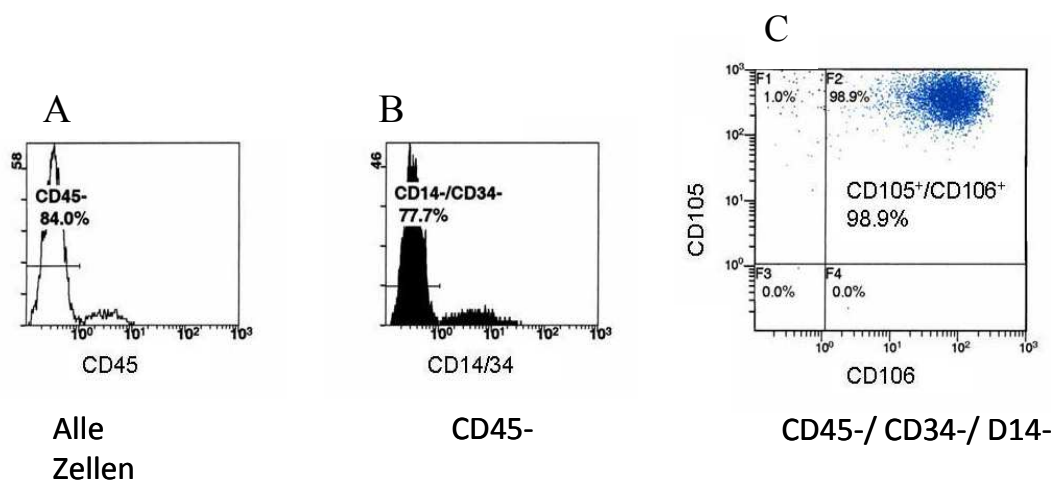


Abb.35: Durchflusszytometrie zur Detektion von Oberflächenantigenen bei humanen mesenchymalen Stammzellen in Passage 2 eines 67 Jahre alten, männlichen Patienten. (Es ergibt sich ein prozentualer Anteil humaner mesenchymaler Stammzellen von 64,5%).

3.1.3. Differenzierungsassay

Als weiteres wichtiges Qualitätskriterium werden die Zellpopulationen der humanen mesenchymalen Stammzellen auf Ihre Plastizität untersucht. Für diese Untersuchungen werden die Zellen in spezifischen Nährmedien kultiviert und auf Ihr Differenzierungspotential untersucht. Es wird dabei der Fokus auf die Differenzierung in Knochen-, Knorpel- und Fettzellen gelegt.

3.1.3.1. Knochenzellendifferenzierung

Für die qualitative Analyse der MSC-Population wurden diese, mit spezifischem osteogenem Differenzierungsmedium versetzt und über einem Zeitraum von 2 Wochen in diesem kultiviert.

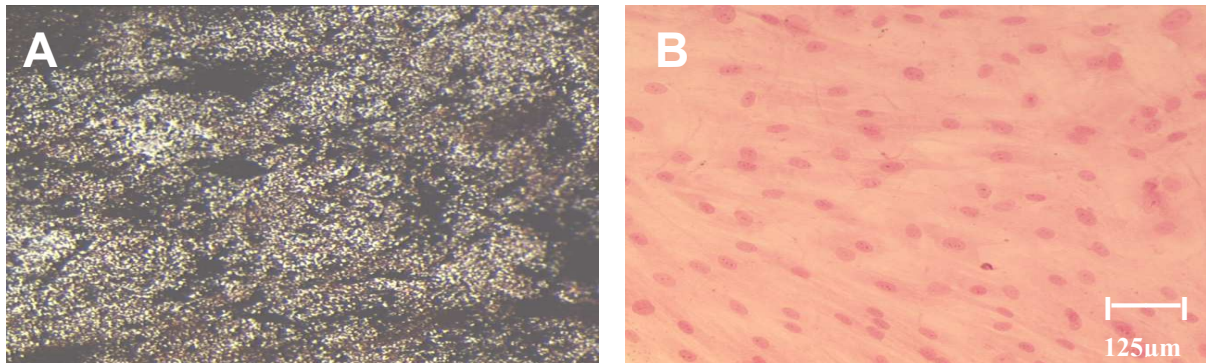


Abb. 36: Osteogene Differenzierung (A) von hMSCs sowie Kontrolle (B) (einer 65-jährigen Probandin in Passage II) dargestellt mit von Kossa-Färbung und Kernechtrot-Gegenfärbung. Die dunkelgraue bis tiefschwarze Färbung in Bild A weist auf Kalziumeinlagerungen hin. Die Kontrolle hingegen zeigt keine Kalziumeinlagerung. Die Kerne von A und B sind dunkelrot (Kernechtrot) gefärbt (40x, Zeiss Axiophot).

Nach einem Zeitraum von 2 Wochen wurde der Ansatz mittels von KOSSA-Färbung, einem standardisierten histochemischen Nachweisverfahren für Kalziumhydroxylapatit sowie den Nachweis der Osteoblastendifferenzierung mittels Silbernitratlösung, analysiert. Als Gegenfärbung wurde eine Kernechtrotfärbung durchgeführt, bei dem das Zytoplasma hellrot und die Zellkerne dunkelrot gefärbt wurden. In Abb. 36 ist die Differenzierung von hMSCs in differenzierte Osteozyten, eines 65 Jahre alten weiblichen Probanden in Passage II, exemplarisch dargestellt. Als Kontrollgruppe dienten MSCs desselben Probanden in derselben Passage, der in unspezifischem Zellkulturmedium, für ebenfalls 2 Wochen kultiviert wurden.

3.1.3.2. Knorpelzellendifferenzierung

Für die chondrogene Differenzierung wurden 500.000 MSCs ausgezählt und bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung sowie 95% Luftfeuchte (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) für 3 Wochen kultiviert. Nach der Inkubationszeit von 3 Wochen wurde die Chondrogenese mittels semi-quantitativer RT-PCR (Abb.37) ausgewertet. Als Housekeeper wurde Aktin (698 bp) verwendet. Die chondrogene Differenzierung ergab bei hMSCs, einer 65 jährigen weiblichen Probandin in der Passage II, folgendes Ergebnis:

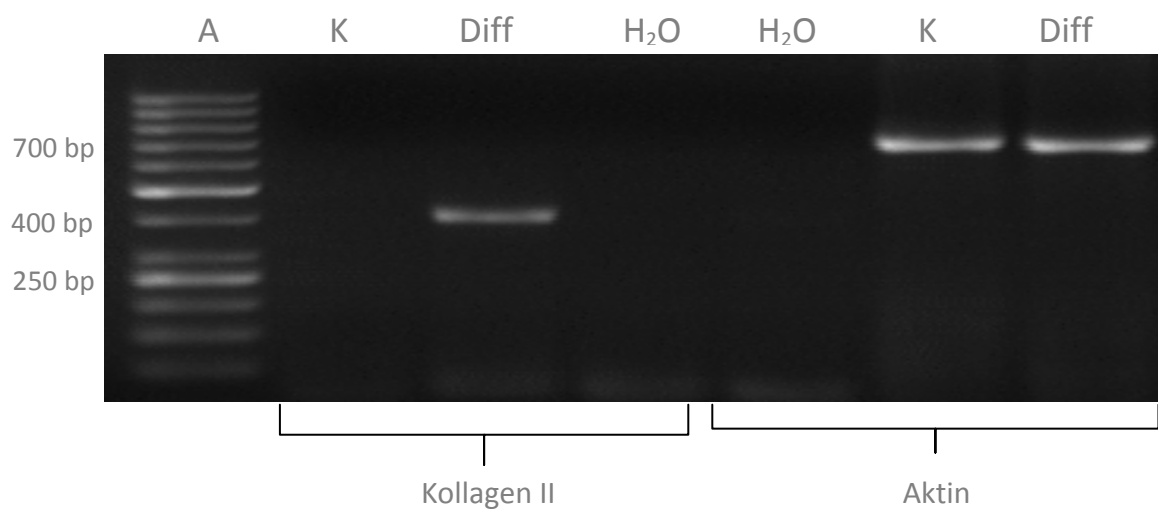


Abb.37: Semiquantitative RT-PCR für den Nachweis der chondrogenen Differenzierung. Es wurde die DNA-Leiter von Fermentas (50bp) verwendet (A), als Kontrolle (K) dienten MSCs, die in Proliferationsmedium kultiviert wurden. Wasserkontrollen (H₂O) wurden aufgetragen. Die Ansätze der Differenzierung (Diff) wurden gegen die Kontrollen sowie der Wasserkontrollen aufgetragen. Es wurden sowohl Aktin als auch Kollagen II detektiert.

Es exprimieren ausschließlich chondrogen- differenzierte MSCs Kollagen II (388bp). Wie in Abb.37 abzulesen ist, trifft dies nur bei den MSCs unter Differenzierungsbedingungen zu. Die Expression von Aktin (698bp) als interne Kontrolle, kann sowohl für die Kontrolle als auch für MSCs unter Differenzierungsbedingungen, abgelesen werden. Die Wasserkontrollen (H₂O) zeigen keinerlei Expressionsmuster.

3.1.3.3. Fettzellendifferenzierung

Für die adipogene Differenzierung werden 1000 Zellen pro cm^2 in 4-Well-Schalen (Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) kultiviert und bei 37°C und 5% CO_2 -Sättigung und 95% Luftfeuchte (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) für 2 Wochen in spezifischen Differenzierungsmedium kultiviert. Die adipogene Differenzierung wird mittels Oil Red O-Färbung analysiert (Lillie, 1944), hierbei werden die Lipidvakuolen rotgelb gefärbt und können nach Gegenfärbung mit Meyer's Hämatoxylin (Zellkernfärbung: blau) lichtmikroskopisch ausgewertet werden. In Abb.38 ist die adipogene Differenzierung der hMSCs einer 65 jährigen Probandin in der Passage II exemplarisch dargestellt.

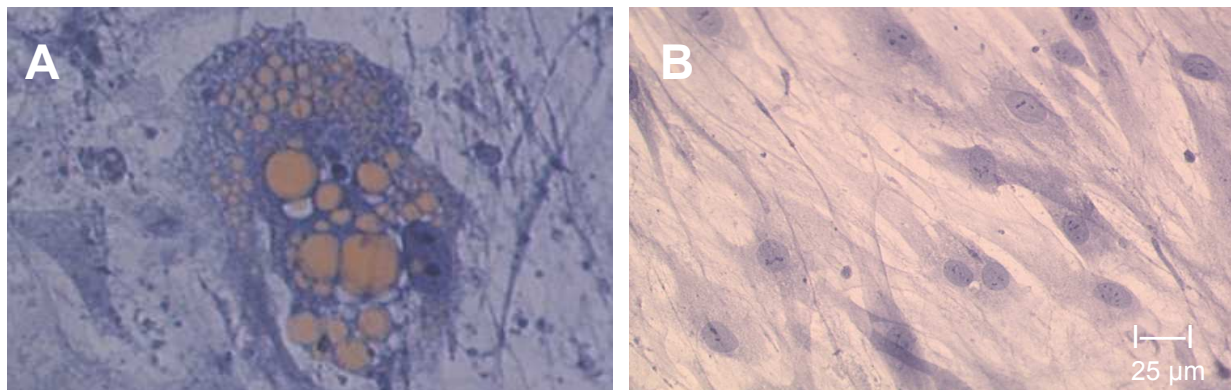


Abb.38: Adipogene Differenzierung (A) und Kontrolle (B) von hMSCs (einer 65jährigen Probandin in der Passage II) Lipidvakuolen werden Rotgelb dargestellt und finden sich nur in der Differenzierungsgruppe (A). Die Kontrolle (B) zeigt ausschließlich die Färbung mit Hämatoxylinblau (63x, Zeiss Axiophot).

3.2. Funktional-technische Bestimmung der *in vitro* Beschallung

Um ein optimales Beschallungsmuster für die *in vitro*- Versuche zu erhalten, müssen vorerst die technischen Möglichkeiten für jedes Stoßwellengerät sowie für jeden Schallkopf neu ermittelt werden. Hierbei wurde ein Augenmerk auf den zellulären Abtrag sowie auf die morphologischen Veränderungen der Zellen nach SW-Applikation gelegt. Die Beschallungsgrenzen werden mittels sehr aufwendiger Vorversuche festgelegt. Es werden große Ansätze (n gleich 6) Fibroblasten ($J_{23}T_3$) mit verschiedenen Parameterkonstellationen (siehe Gerätebeschreibungen) beschallt.

Maxima der einzelnen Parameter wie Frequenz, Gesamtimpulsanzahl und Energiedichten können dadurch festgelegt werden. Des Weiteren dienen die Ergebnisse dazu, Behandlungskonstellationen nach ihrer Wirkung zu beurteilen. Im Anschluss werden die Beschallungskonstellationen mit den besten Ergebnissen nochmals in kleineren Ansätzen mit MSCs (n gleich 4) durchgeführt, um sicher zu stellen, dass sich die funktional-technischen Ergebnisse der Vorversuche mit Fibroblasten mit denen der MSCs decken. Die Vorversuche dienen ebenfalls dazu, die Reproduzierbarkeit der Beschallungen sicher zu stellen. Nachfolgend sind die Ergebnisse dargestellt, die zur Limitierung der Beschallungsgrenzen führten. In Abb.39 sind exemplarisch die Beschallung bei MSCs und der Beschallung mit der Fokussierten Einheit des Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwilen, Schweiz) dargestellt. In Abb.40 sind exemplarische die Beschallungen bei Fibroblasten mit der radialen Einheit des Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwilen, Schweiz) dargestellt.

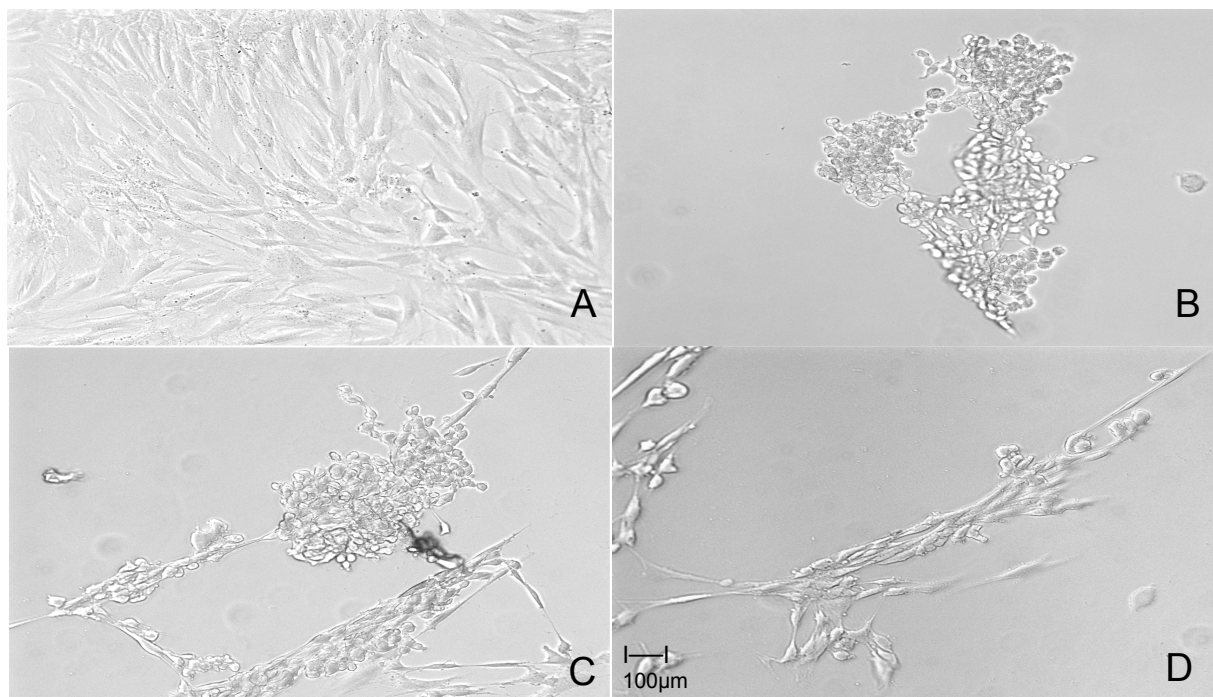


Abb.39: Lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) zur funktional-technischen Bestimmung der Beschallungsschemata. Die Kontrolle (A) zeigt einen dichten Monolayer von MSCs. Nach Beschallung mit der fokussierten SW (elektromagnetisches System- Bilder B-D) von Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwilen, Schweiz) zeigte sich ein massiver Zellabtrag und Depolymerisierungen der Faserstrukturen. Die Zellen wurden aufgefangen und konnten im Schnellvitalitätstest mit Trypanblau als vital gewertet werden. Für die Versuche wurde die Vorlaufstrecke II, mit einer Fokuszone von 0-30 mm verwendet mit Dauerimpulsbetrieb (Wiederholfrequenz: 4 Hz), sowie Energieflussdichte von 0,01- 0,55 mJ/mm² (62MPa). Die Gesamtimpulsanzahl betrug 1000 (Zeiss Axiovert 200M, A-Plan 10x, DIC).

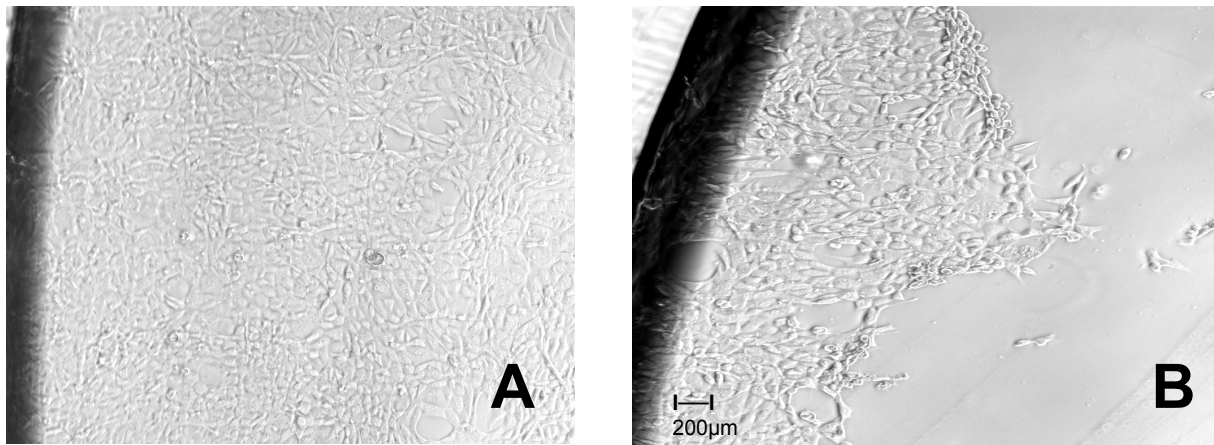


Abb. 40: Lichtmikroskopische Aufnahme von murinen Fibroblasten ($J_{23}T_3$) zur funktional-technischen Bestimmung der Behandlungsschemata und zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Beschallungen. Die Kontrolle (A) zeigt einen dichten Monolayer von murinen Fibroblasten. Nach Beschallung mit der radialen SW von Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz, Applikator $\varnothing 15$ mm, 1,75 bar) zeigte sich ein massiver Zellabtrag. Die Zellen wurden aufgefangen und konnten im Schnellvitalitätstest mit Trypanblau als vital gewertet werden. Die Versuche wurden bei Dauerimpulsbetrieb mit der Wiederholungsfrequenz von 4 Hz durchgeführt, die Gesamtpulsanzahl betrug 1000. (Zeiss Axiovert 200M, A-Plan 10x, DIC).

Aufgrund der Erkenntnisse von Wolfrum et al. (Ohl and Wolfrum, 2003) deuteten die in Abb. 41 dargestellten Ergebnisse (mit Pfeilen markiert) darauf hin, dass die kreisrunden zellfreien Flächen durch Kavitation entstanden sind. Die Zellversuche wurden daraufhin, in teilentgasten Medien durchgeführt. Es wurde damit ein optimaler Kompromiss zwischen technischen und biologischen Anforderungen an die Beschallungen gefunden.

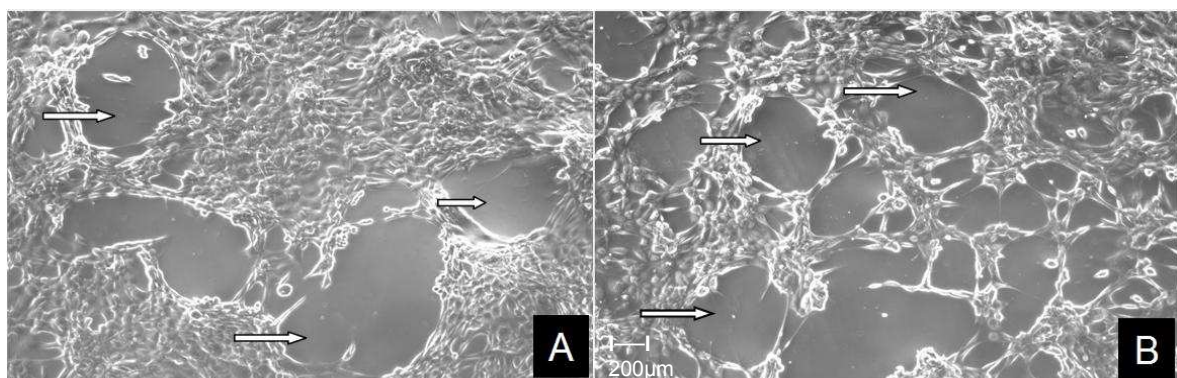


Abb.41: Lichtmikroskopische Aufnahme muriner Fibroblasten ($J_{23}T_3$) nach Beschallung mit fokussierter Stosswelle Piezoson 100/Applikator 100.621 von Wolf (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Deutschland), Druckbereich von 13-126 MPa, Dauerimpulsbetrieb, Wiederholrfrequenz: 4 Hz, sowie Energieflussdichte von $0,122$ mJ/mm² (Zeiss Axiovert 200M, A-Plan 10x, DIC).

Als weiteres Kriterium sollten Zytoskelettveränderungen (F-Aktin) Fluoreszenzmikroskopisch beurteilt werden. Für die Visualisierung des F-Aktin-Zytoskeletts (Pellegrin and Mellor, 2007) wird das Fluoreszenzmarkierte Phalloidin (Alexa Fluor®488, Absorption: 495nm, Emission: 517nm, Molecular Probes, Invitrogen, Leiden, Niederlande) genutzt. Die Zellkerne wurden mit DAPI Mounting Medium (4',6-diamidino-2-phenyl-indol, Vectashield, Vector Laboratories, Absorption 360nm, Emission 461nm) gefärbt (Abb.42).

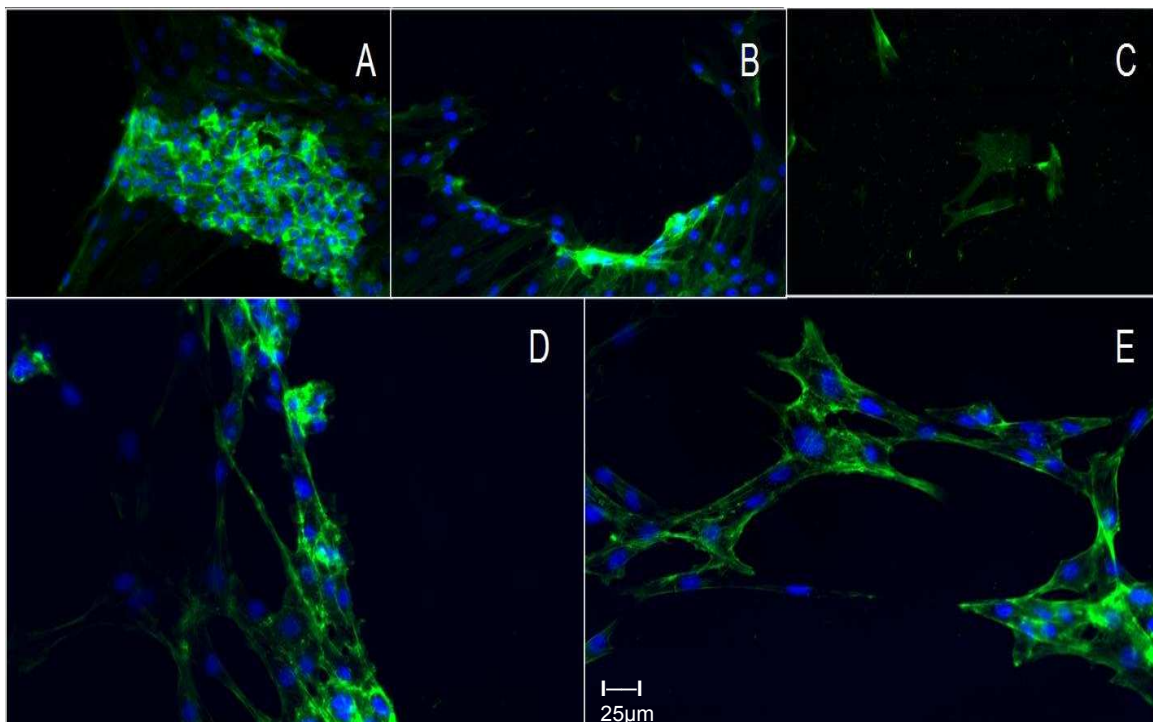


Abb. 42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme humaner mesenchymaler Stammzellen nach Beschallung mit der fokussierte Stoßwelle von Storz (Storz Medical Duolith®SD1 - Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz) Für die Versuche wurde die Vorlaufstrecke II, mit einer Fokuszone von 0-30 mm verwendet mit Dauerimpulsbetrieb, Wiederholfrequenz: 4 Hz. Die Gesamtpulsanzahl betrug 1000. Nach der Beschallung kommt es zur Ablösung der Zellen, die sich teilweise als Zellknäuel noch auf dem Schalenboden befinden (A), oder die sich größtenteils (B) oder ganz (C) von der Schale gelöst haben. Teilweise kommt es zur Depolymerisation der F-Aktinfasern (D, E). F-Aktin: Alexa Fluor 488 (grün)//Kern: DAPI (blau) (Zeiss Axiovert 200M, LD Plan-Neofluar, 20x, DAPI, FITC).

Aufgrund der Vorversuche ergaben sich für die einzelnen Geräte nachfolgend beschriebene Beschallungsschemata (A-D). Es wurde in gleichwarmen (37°C), teilentgastem Medium auf speziellen Zellkulturschalen der Firma ibidi (60µ-Dish für Lebendzellanalyse, ibiditreat, Ibidi, Martinsried, Deutschland/ Reflexion < 1 Prozent) geschallt.

Aufgrund der Schwierigkeit der Beschallung von hochkonfluenten Zellmonolayern, wurden Behandlungsschemata gewählt, die ohne Destruktion des dichten Zellrasens durchgeführt werden konnten. Die Zellabtragsrate hatte demnach einen entscheidenden Einfluss auf die Auswahl der Beschallungsparameter.

3.3. *In vitro* - Beschallungsschemata :

Alle MSC-Beschallungen wurden vierfach durchgeführt (n = 4) und im Anschluss vierfach (n = 4) mit den spezifischen Methoden untersucht.

Piezoson 100/ Wolf GmbH, Knittlingen, Deutschland

Piezoson 100
Applikator 100.621

Wolf GmbH, Knittlingen, Deutschland	Dauerimpulsbetrieb	Wiederholffrequenz: 2 Hz/ 4 Hz	Gesamtimpulsanzahl: 500/1000 Impulse
--	--------------------	-----------------------------------	---

Fokussierte Stoßwelle

0,048 mJ/mm ²	0,077 mJ/mm ²	0,122 mJ/mm ²	0,173 mJ/mm ²	0,238 mJ/mm ²
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Swiss Dolor Clast/ EMS GmbH, Konstanz, Deutschland

Swiss Dolor Clast®
Applikator 15mm

Elektro Medical Systems (EMS)GmbH, Deutschland	Dauerimpulsbetrieb	Wiederholffrequenz: 2Hz/ 4Hz	Gesamtimpulsanzahl: 500/1000 Impulse
--	--------------------	---------------------------------	---

Radiale Druckwelle

0,25 bar	0,5 bar	0,75 bar	1 bar	1,25 bar	1,5 bar
----------	---------	----------	-------	----------	---------

Storz Medical Duolith SD1, Storz AG, Tragerwilen, Schweiz

Storz Medical Duolith®SD1

Applikator 15mm

Storz, Medical AG, Tragerwilen, Schweiz	Dauerimpulsbetrieb	Wiederholffrequenz: 4 Hz	Gesamtimpulsanzahl: 1000 Impulse
---	--------------------	-----------------------------	-------------------------------------

Radiale Druckwelle

1 bar 1,2 bar 1,4 bar

Storz Medical Duolith SD1, Storz AG, Tragerwilen, Schweiz

Storz Medical Duolith®SD1

Vorlaufstrecke II

Storz, Medical AG, Tragerwilen, Schweiz	Dauerimpulsbetrieb	Wiederholffrequenz: 4 Hz	Gesamtimpulsanzahl: 1000 Impulse
---	--------------------	-----------------------------	-------------------------------------

Fokussierte Stoßwelle

0,01 mJ/mm ²	0,02 mJ/mm ²	0,07 mJ/mm ²	0,10 mJ/mm ²	0,15 mJ/mm ²	0,2 mJ/mm ²	0,25 mJ/mm ²	0,3 mJ/mm ²
----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	---------------------------	----------------------------	---------------------------

3.4. Nachweis der Zellvitalität

Die Zellvitalität wurde routinemäßig mit dem Schnell-Vitalitätstest Trypanblau (Weil, et al., 2009) durchgeführt. Sobald Anzeichen einer eingeschränkten Vitalität (Blaufärbung von Zellen) vorlagen, wurden diese sofort von den Versuchen ausgeschlossen. Für die Überprüfung der Vitalität nach den Schallungsversuchen wurde der Vitalitätsfarbstoff oder besser gesagt, der Avitalitätsfarbstoff 7-Aminoactinomycin (Bitekhtina and Vekshin, 2008), eingesetzt. Dieser reagiert mit der DNA (Cytosin und Guanin) und kann somit als Zellfarbstoff eingesetzt werden. Er färbt wie Trypanblau nur Zellen mit nichtintakter Zellmembran und somit avitaler Zellen. Vitale und frühapoptotische Zellen werden nicht eingefärbt.

Bei Energiedichten ab $0,173 \text{ mJ/mm}^2$ (Piezason 100, Wolf Knittlingen, Deutschland) konnte bei den verbliebenen Zellen vermehrt 7-AAD positive Zellen (71,5%) festgestellt werden, die jedoch aufgrund des hohen Zellabtrags (circa 85 Prozent) und der zum Teil sehr hohen Destruktion der Zellkörper, im Vergleich zur Kontrolle, nicht statistisch quantifizierbar bzw. auswertbar waren. Vergleichbare Erkenntnisse ergaben die Schallungen mit dem Storz Medical Duolith®SD1, Tragervilen, Schweiz bei Energiedichten ab $0,25 \text{ mJ/mm}^2$. Aufgrund technischer Limitationen konnten vergleichbare Effekt bei radialer DW-Applikation, hoher Energiedichten, nicht festgestellt werden. Als weiterer wichtiger Faktor für die Vitalität der Zellen sollte die Wachstumsrate von beschallten und unbeschallten MSCs überprüft werden.

3.5. Untersuchung der Wachstumsrate

Die Wachstumsraten der Zellen wurden zum einen als qualitatives Merkmal der Zellkulturbedingungen ausgewertet, aber auch die Beeinflussbarkeit der Wachstumsrate von MSCs nach SW- bzw. DW-Applikation wurde untersucht. Um eine optimale Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten, wurde jeweils derselbe Patient in derselben Passage verglichen. Für die Reproduzierbarkeit der Versuche wurde jeweils ein vierfacher Ansatz (n gleich 4) beurteilt. Die Daten wurden zusammengeführt und die Standardabweichungen eingetragen. Die Wachstumsraten ($W=dN/dt$) geben an, wie viel Zellen pro Zeiteinheit zur Zellkultur hinzugekommen sind. Bei der Wachstumsrate ergab sich nach einer Dauerimpulsbeschallung von insgesamt 1000 Impulsen und einer Energiedichte von $0,077 \text{ mJ/mm}^2$ mit dem Piezason 100 (Wolf), in der darauf folgenden Passage eine signifikant erhöhte Wachstumsrate von $452500 (\pm 9574)$ Zellen, im Vergleich zur Kontrolle (235000 ± 12909). Die SW-Applikation ($0,2 \text{ mJ/mm}^2$) mit Storz Duolith SD1, Tragervilen, Schweiz zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Wachstumsrate von $342500 (\pm 41129)$ Zellen, im Vergleich zur ungeschallten Kontrolle (217500 ± 17078).

Die Ergebnisse sind in Abb. 43 graphisch dargestellt.

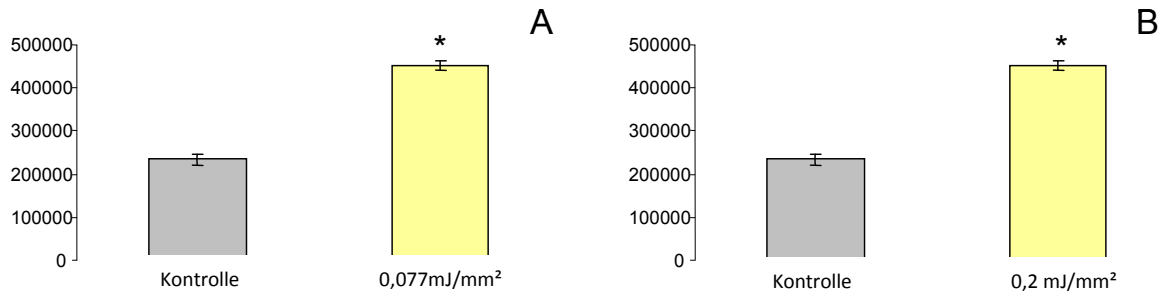


Abb. 43: Statistische Auswertung der Wachstumsraten von MSCs nach SW-Applikation mit Piezoson 100 von Wolf, Knittlingen, Deutschland (A - 0,077mJ/mm²) und dem Duolith SD1, Tragervilen, Schweiz (B- 0,2mJ/mm²). Es wurde im Dauerimpulsbetrieb und einer Wiederholfrequenz von 4 Hz sowie einer Gesamtimpulszahl von 1000 Impulsen gearbeitet.

Bei den durchgeführten radialen DW-Applikation ergaben sich keinerlei Veränderungen der Wachstumsrate von MSCs. Aufgrund der signifikanten Steigerungen der Wachstumsrate sollten immunhistochemische Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose folgen.

3.6. Immunhistochemische Untersuchung

Die humanen mesenchymalen Stammzellen wurden immunhistochemisch auf Apoptose und Proliferation untersucht und mittels DAB-Entwicklung (Abb.44) quantifiziert. Die Anzahl positiver Zellen wurde auf die Gesamtzellzahl bezogen. Die prozentualen Werte wurden anschliessend statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Die immunhistochemische Untersuchung der Proliferation der MSCs erfolgte mit dem Marker Anti-Ki67 (Scholzen and Gerdes, 2000) von abcam, einem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen, der mit dem Sekundärantikörper Polyclonal goat-anti rabbit bindet. Die immunhistochemische Untersuchung der Apoptose erfolgte mit dem Marker Anti-Caspase3 (Patel, et al., 1996) von BD Pharmingen Biosciences, einem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen, der ebenfalls mit dem Sekundärantikörper Polyclonal goat-anti rabbit bindet.

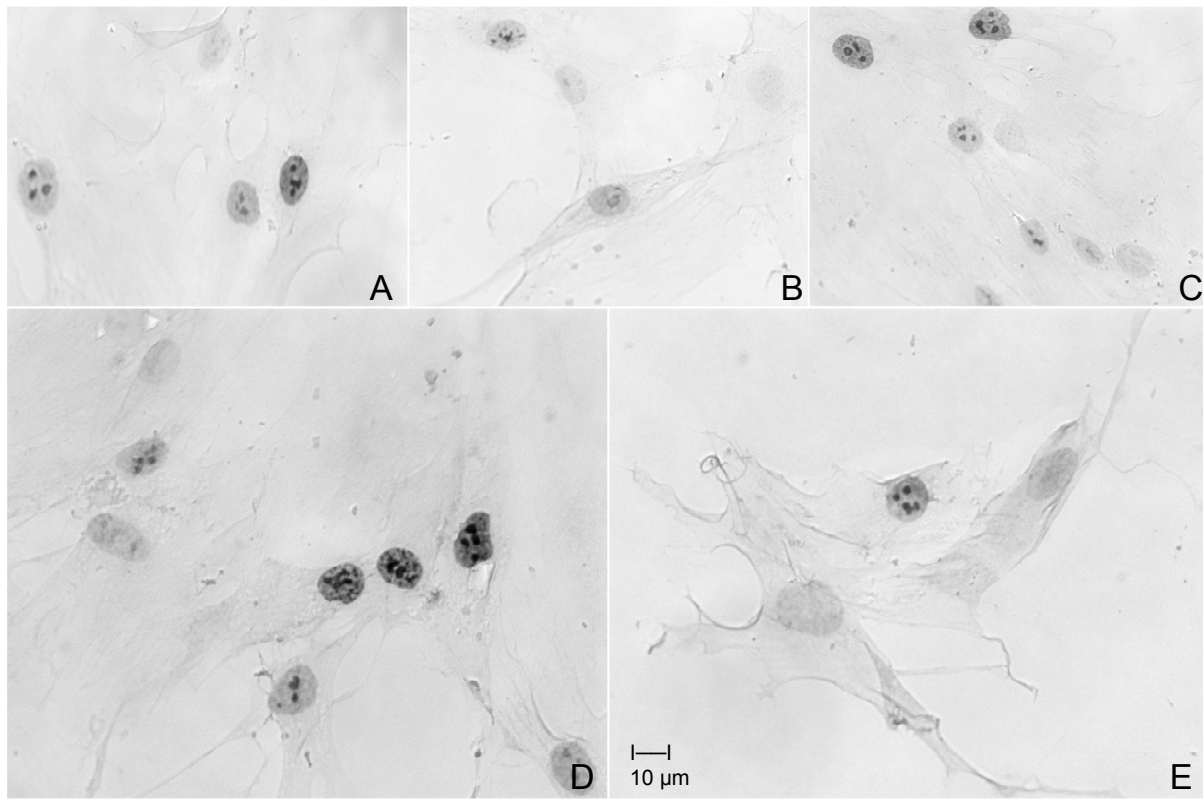


Abb. 44: Lichtmikroskopische Aufnahme humaner mesenchymaler Stammzellen nach Immunhistochemischer Färbung und DAB-Entwicklung. Die positiven Zellen weisen schwarz gefärbte Zellkerne auf, die negativen Zellen zeigen nur eine leichte Färbung auf. Die Ergebnisse für Anti-Caspase3 (BD Pharmingen Biosciences, 1:500, Heidelberg, Deutschland) sind in A, B und D dargestellt. Die Ergebnisse für Anti-Ki67 (abcam, 1:200, Cambridge, England) sind in C und E dargestellt (Zeiss Axiovert 200, LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr Ph 2).

3.6.1. Proliferationsnachweis mit Ki-67

Der Proliferationsmarker Ki-67 wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert. Zellen in der Go-Phase fehlt dieser Marker (Heidebrecht, et al., 1996; Traut, et al., 1998). Um ein optimales Zeitfenster für die Observation der Ki-67-positiven Zellen zu bestimmen, wurde eine Vielzahl von Vorversuchen durchgeführt. Einer dieser Vorversuche ist in Abb.45 graphisch dargestellt. Er zeigt die zeitabhängige Erhöhung der Proliferation, zum einen direkt nach der Beschallung, zum anderen sechs Stunden danach. Es zeigt sich direkt nach SW-Behandlung (~ 1 Minute nach Beschallung) eine signifikant erhöhte Anzahl Ki-67 positiver Zellen von 48,76% ($\pm 10,34$) im Vergleich zur Kontrolle (23,17% $\pm 10,73$).

Nach 6 Stunden waren bereits 72,94% ($\pm 10,34$) der Zellen positiv für Ki-67 und somit noch stärker erhöht. Nach weiteren Vorversuchen wurden die optimalen Zeiträume für die Observation auf jeweils sechs und zwölf Stunden nach Behandlung festgelegt.

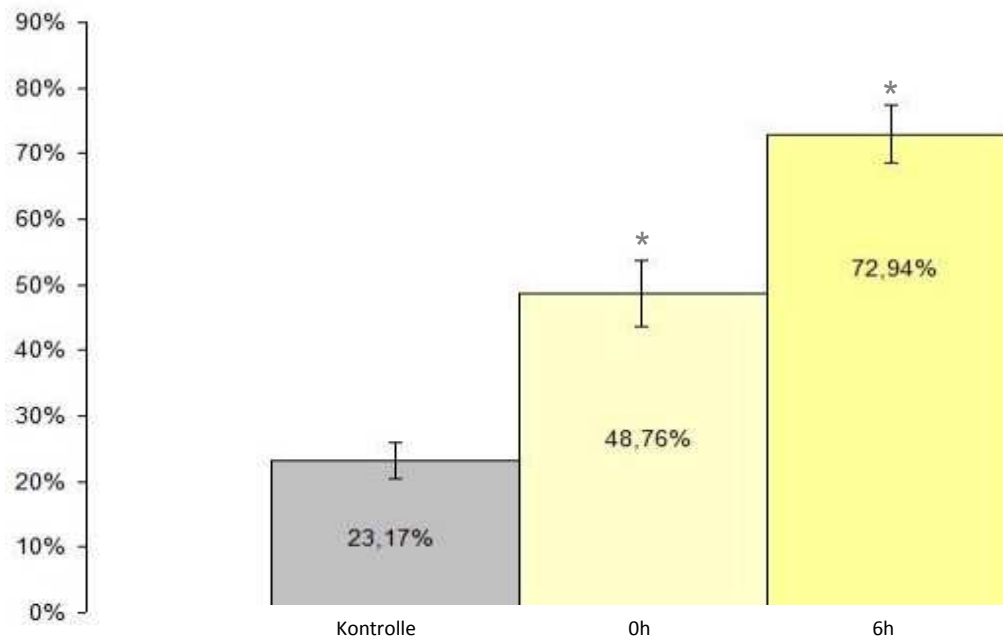


Abb. 45: Graphische Darstellung der Ki67-positiven MSCs zu unterschiedlichen Zeiten nach SW-Behandlung exemplarisch an der Beschallung mit Piezoston100 (Wolf, Knittlingen, Deutschland) im Dauerimpulsbetrieb, Wiederholungsfrequenz von 4 Hz , Energiedichte von $0,077\text{mJ}/\text{mm}^2$ und 1000 Gesamtimpulsanzahl pro Behandlung. (blau- Kontrolle; hell-gelb: 0h; gelb: 6h).

Nach Festlegung der Beobachtungszeiträume wurden weitere Versuche mit dem fokussierten Stosswellengerät der Firma Wolf (Piezoston100) sowie der radialen Stoßwelle (DW) der Firma EMS (Swiss Dolor Clast) durchgeführt (Abb. 46). Die Behandlung mit dem EMS Gerät mit 0,5 bar zeigte sechs Stunden nach Behandlung eine signifikant erniedrigte Anzahl Ki-67-positiver Zellen von 49% ($\pm 2,1$) im Vergleich zur Kontrolle 6h (59,42% $\pm 2,9$). Nach zwölf Stunden zeigt sich bei der Behandlung mit 0,5 bar (49% $\pm 3,6$) weiterhin eine Erniedrigung, im Vergleich zur Kontrolle 12h (56,79% $\pm 4,5$). Die Behandlungen mit dem Gerät Piezoston 100 von Wolf, wurden mit Energiedichten von $0,077\text{ mJ}/\text{mm}^2$ und $0,122\text{mJ}/\text{mm}^2$ durchgeführt.

Die Behandlung mit 0,077 mJ/ mm² führte sowohl sechs (83,33%±2,8) als auch zwölf Stunden (72,61% ±4,2) nach Applikation zu einer signifikanten Erhöhung der Ki-67-positiven Zellen, im Vergleich zu den unbeschallten Kontrollen (6h: 59,42% ±2,9 und 12h: 56,79% ±4,5). Die Behandlung mit 0,122mJ/mm² zeigte hingegen zu beiden Zeitpunkten eine signifikante Erniedrigung des Anteils Ki-67-positiver Zellen (6h: 45,40% ±1,5 und 12h: 17,79% ±3,4) im Vergleich zu Kontrolle 6h (59,42% ±2,9) und Kontrolle 12h (56,79% ±4,5).

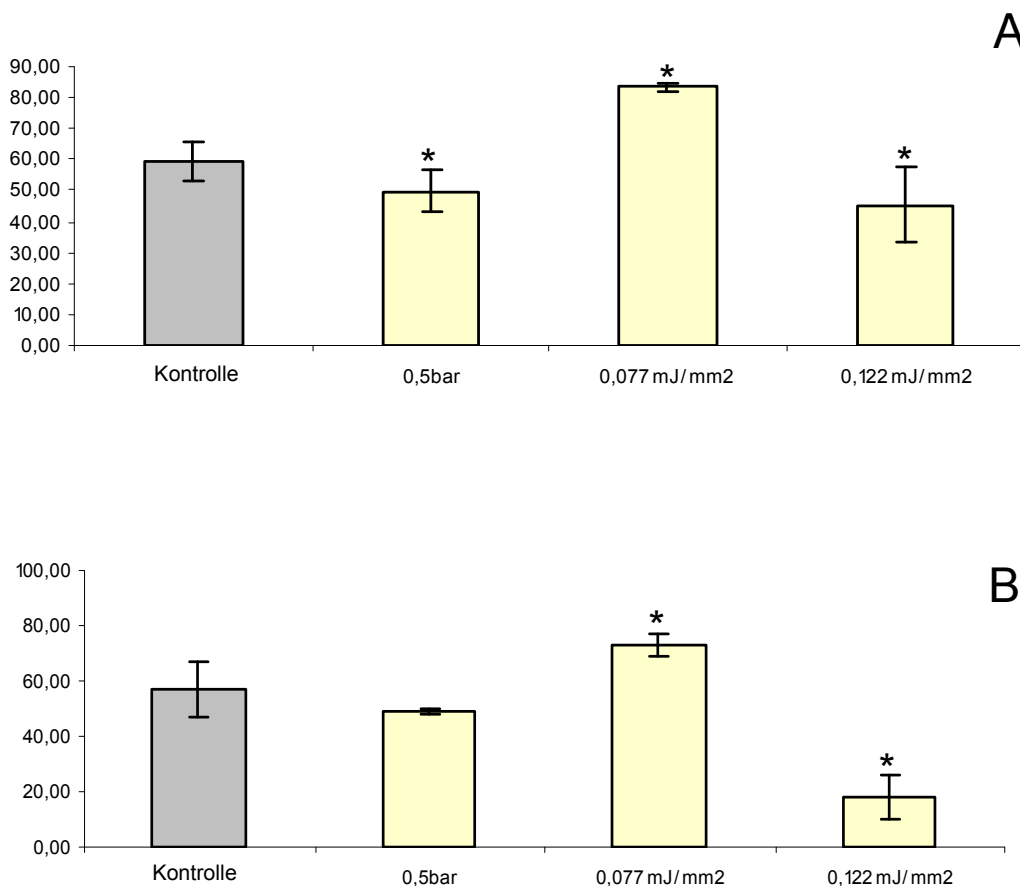


Abb. 46: Graphische Darstellung der Ki67-positiven MSCs zu unterschiedlichen Zeiten nach SW-Behandlung mit Piezoson100 (Wolf, Knittlingen, Deutschland) im Dauerimpulsbetrieb, Wiederholungsfrequenz von 4 Hz und 1000 Gesamtimpulsanzahl pro Behandlung 6 Stunden nach Beschallung (A) und 12 Stunden nach Behandlung (B) sowie adäquate Versuche mit Swiss Dolor Clast®Applikator 15mm (Elektro Medical Systems GmbH, Konstanz, Deutschland) mit 0,5 bar.

Weitere Versuche wurden mit dem Gerät Medical Duolith SD1 von Storz durchgeführt. Es zeigten sich bei Dauerimpulsbetrieb, mit einer Wiederholffrequenz von 4 Hz, sowie einer Gesamtimpulsanzahl von 1000, nachfolgende Ergebnisse (Abb. 47).

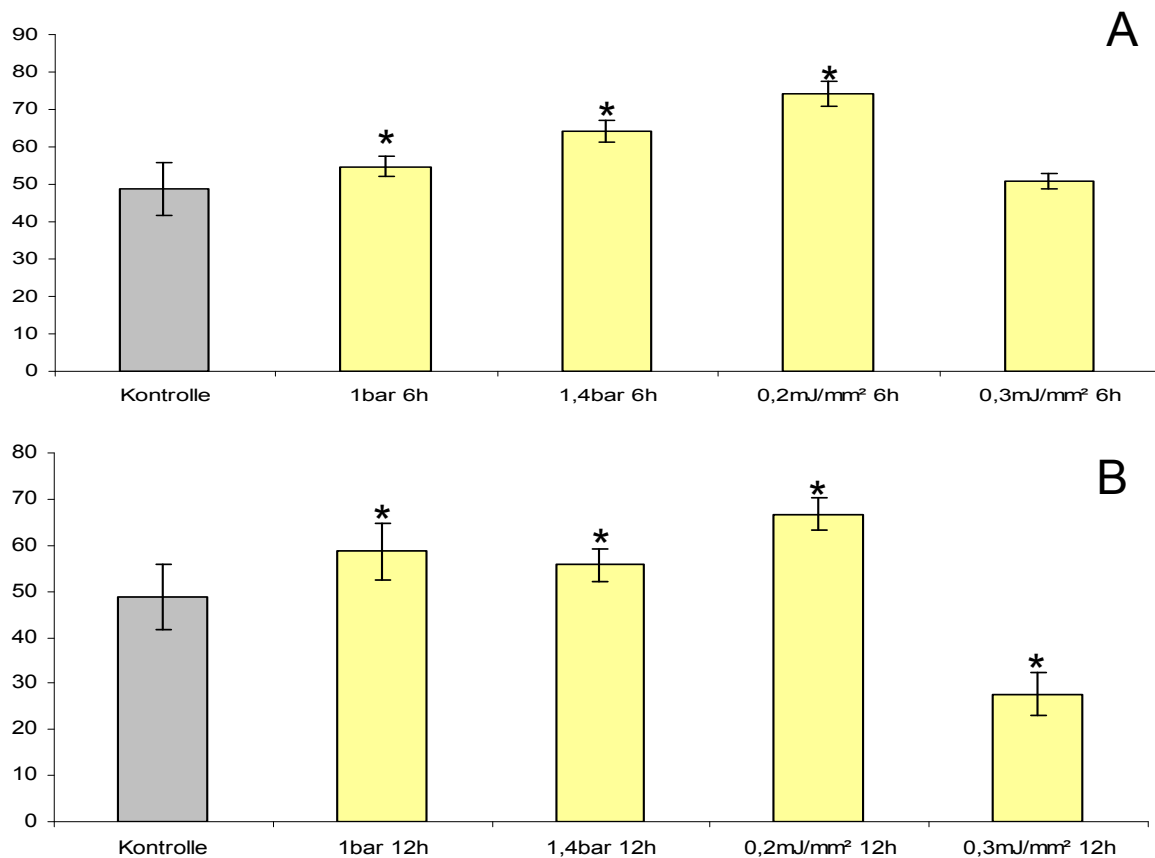


Abb. 47: Graphische Darstellung von Ki-67 positiver humaner mesenchymaler Stammzellen in Prozent nach Beschallung mit fokussierte Stoßwelle und radialer Druckwelle mit Storz Medical Duolith SD1 (Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz). Aufgetragen wurde der Zeitpunkt 6 Stunden nach Applikation (A) und 12 Std nach Applikation (B). Für die Versuche wurde mit Dauerimpulsbetrieb, Wiederholfrequenz: 4 Hz und Gesamtimpulsanzahl von 1000 gearbeitet.

Die Graphen zeigen eine signifikante Erhöhung der Ki67-positiven Zellen bei einer SW-Behandlung mit einer Energiedichte von 0,2 mJ/mm² 6 Std (74,02% ±3,37) sowie 12 Std (66,78% ±3,40) nach SW-Behandlung, im Vergleich zur unbeschallten Kontrolle (48,81% ±6,99). Die SW-Behandlung mit 0,3 mJ/mm² zeigte nach 6 Std (50,88% ±2,16), so gut wie keine Veränderungen im Vergleich zur unbeschallten Kontrolle (48,81% ±6,99). Nach 12 Std zeigte sich eine Erniedrigung der Ki67-positiven Zellen auf 27,67% (±4,72). Die DW-Behandlung mit 1 bar zeigte nach 6 Std (54,76% ±2,87) und nach 12 Std (58,69% ±6,19) eine signifikante Erhöhung der Ki67-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle (48,81% ±6,99). Ähnliche Resultate ergaben die Behandlung mit 1,4 bar sowohl 6 Std (64,06% ±2,82), als auch 12 Std (55,73% ±3,55) nach Behandlung.

3.6.2. Apoptosenachweis mit Caspase-3

Der immunhistochemische Nachweis der Apoptose bei mesenchymalen Stammzellen, wurde mit dem Apoptosemarker Caspase-3 (Patel, et al., 1996) von BD Pharmingen Biosciences (1:500, Heidelberg, Deutschland), einem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen, durchgeführt. Die positiven MSCs wurden quantifiziert, zur Gesamtzellzahl ins Verhältnis gesetzt und in folgende Diagramme (Abb.48 und Abb.49) graphisch dargestellt. Die Ergebnisse der Behandlung mit dem Gerät Piezoson 100 von Wolf und dem Swiss Dolor Clast von EMS (Abb.48), zeigen bei allen Beschallungen signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils Caspase-3-positiver humaner mesenchymaler Stammzellen, im Vergleich zur unbeschallten Kontrolle.

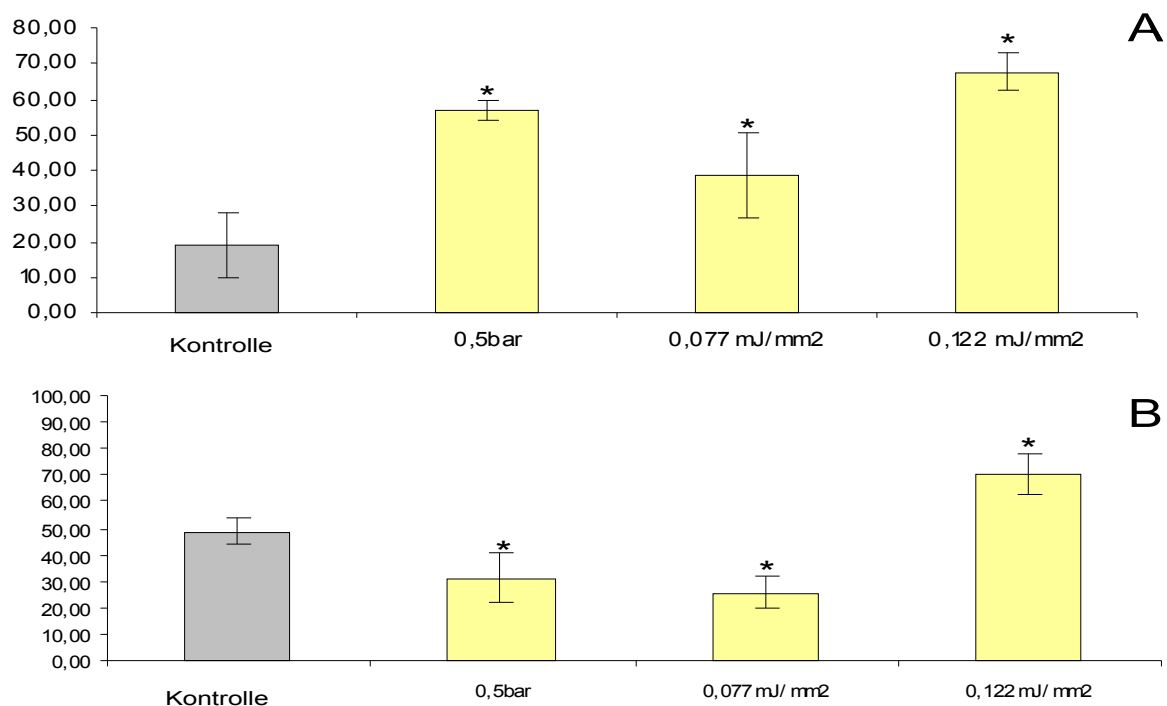


Abb. 48: Graphische Darstellung der Caspase-3-positiven MSCs zu unterschiedlichen Zeiten nach SW-Behandlung mit Piezoson100 (Wolf, Knittlingen, Deutschland) im Dauerimpulsbetrieb, Wiederholungsfrequenz von 4 Hz und 1000 Gesamtimpulsanzahl pro Behandlung 6 Stunden nach Beschallung (A) und 12 Stunden nach Behandlung (B) sowie adäquate Versuche mit Swiss Dolor Clast®, Applikator 15mm (Elektro Medical Systems GmbH, Konstanz, Deutschland) mit 0,5 bar.

Die Behandlung mit 0,5 bar (Swiss Dolor Clast) zeigte signifikant erhöhte Anteile Caspase-3-positiver Zellkerne, sowohl 6 Stunden (56,92%±9) als auch 12 Stunden (31,31%±3) nach der Behandlung, im Vergleich zu den unbeschallten Kontrollen (6h: 18,77% ±5; 12h: 48,82%±9). Die Behandlungen mit dem Gerät Piezason 100 der Firma Wolf, zeigte bei einer Behandlung mit 0,122mJ/mm² ebenfalls signifikant erhöhte Anteile von Caspase-3-positiven Zellen 6 Stunden nach Behandlung (67,67% ±8), als auch 12 Stunden nach Behandlung (70,43%±5), im Vergleich zu den Kontrollen (6h: 18,77% ±5; 12h: 48,82%±9). Die Beschallung mit 0,077 mJ/mm² (Piezason 100) bewirkte nach 6 Stunden eine signifikant erhöhten (38,74% ±6) und nach 12 Stunden eine signifikant erniedrigten (25,69%±12) Anteil Caspase-3-positiver Zellkerne, im Vergleich zu den Kontrollen (6h: 18,77% ±5; 12h: 48,82%±9). Weitere Versuche zum immunhistochemischen Nachweis der Apoptose, wurden mit dem Gerät Medical Duolith SD1 von Storz durchgeführt.

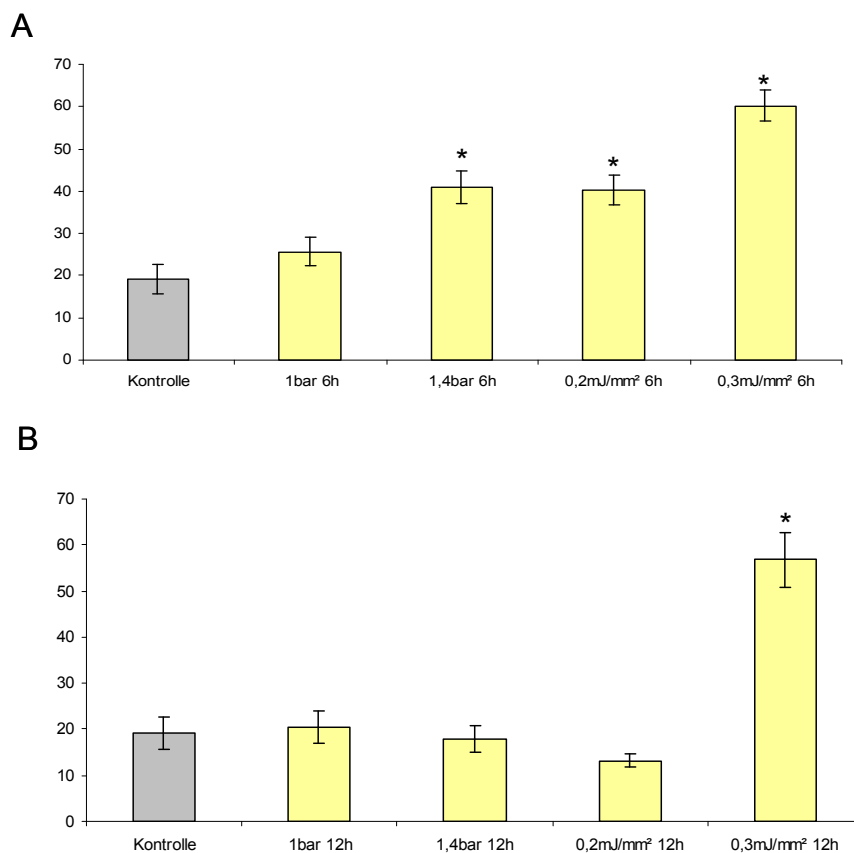


Abb. 49: Graphische Darstellung von Caspase-3-positiver MSCs in Prozent nach Beschallung mit fokussierte Stoßwelle und radialer Druckwelle mit Storz Medical Duolith SD1 (Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz). Aufgetragen wurde der Zeitpunkt 6 Stunden nach Applikation (A) und 12 Std nach Applikation (B). Für die Versuche wurde mit Dauerimpulsbetrieb, Wiederholrfrequenz: 4 Hz und Gesamtpulse von 1000.

Diese zeigten bei einem Dauerimpulsbetrieb, einer Wiederholfrequenz von 4 Hz sowie einer Gesamtimpulsanzahl von 1000, die in Abb.49 dargestellten Ergebnisse. Nach SW-Applikation mit dem Gerät Medical Duolith SD1 von Storz, zeigte sich nach 6 Stunden, bei allen durchgeführten Behandlungen, eine Erhöhung des Anteils Caspase-3-positiver MSCs im Vergleich zur unbeschallten Kontrolle von $19,18\% \pm 3,56$ (mit Ausnahme der Beschallung mit 1 bar). Es kam zu signifikanten Erhöhungen des Anteils Caspase-3-positiver MSCs bei 1,4bar ($40,93\% \pm 3,77$), bei $0,2\text{mJ}/\text{mm}^2$ ($40,21\% \pm 3,59$) und bei $0,3\text{mJ}/\text{mm}^2$ ($60,22\% \pm 3,69$). Nach 12 Stunden zeigten die Beschallungen mit 1 bar ($20,44\% \pm 3,65$) und 1,4bar ($17,91\% \pm 2,94$) nur geringe Abweichungen zur Kontrolle. Bei der SW-Behandlung mit $0,2\text{mJ}/\text{mm}^2$ kam es zu einer Erniedrigung des Anteils Caspase-3-positiver Zellen von $13,17\% \pm 1,5$. Die SW-Behandlung mit $0,3\text{mJ}/\text{mm}^2$, zeigte nach 12 Stunden eine signifikante Erhöhung des Anteils Caspase-3-positiver MSCs auf $56,75\% \pm 6,06$, im Vergleich zur unbeschallten Kontrolle ($19,18\% \pm 3,56$). Nach den vorliegenden zeit- und dosisabhängigen Untersuchungsergebnissen zum immunhistochemischen Nachweis von Apoptose und Proliferation nach SW/DW Applikation, sollten die zellulären Prozesse, durch die Untersuchung auf Zellalterung (Seneszenz) in Abhängigkeit der SW/DW-Beschallung ergänzt werden.

3.7. Nachweis von Seneszenz mit Beta-Galaktosidase-Färbung

Alterungsprozesse von Zellen spiegeln sich unter anderen in der Aktivität der Beta-Galaktosidase (Cristofalo, et al., 1998; Goldstein, 1990; Katsube, et al., 2008; Linskens, et al., 1995; Sherwood, et al., 1988; Stenderup, et al., 2003) wieder, weshalb diese für die Untersuchung der Alterung bzw. Seneszenz von Zellen benutzt werden (Dimri, et al., 1995) kann. Für die SW/DW-abhängige Veränderung der Seneszenz wurden die Zellen mit DW/SW behandelt, danach für 6 Stunden oder 12 Stunden unter Brutschrankbedingungen inkubiert und im Anschluss der Beta-Galaktosidase Färbung unterzogen. Die Auswertung erfolgte einen Tag nach der Färbung. Für die Auswertung der Daten wurden die Gesamtzellen quantifiziert und zu den Beta-Galaktosidase-positiven Zellen (Blaufärbung - Abb.50) in Bezug gesetzt. Für die Auswertung der Daten wurden die Gesamtzellen quantifiziert und zu den Beta-Galaktosidase-positiven Zellen (Blaufärbung - Abb.50) in Bezug gesetzt. Die prozentualen Werte der Beta-Galaktosidase-positiven Zellen wurden in Abbildung 51 graphisch dargestellt.



Abb. 50: Lichtmikroskopische Aufnahme von humanen mesenchymalen Stammzellen Beta-Galactosidase gefärbt. Der Pfeil zeigt eine positive (blaue) MSC (Zeiss/Micro-Dissection Observer.Z1 (20x) / AxioVision 4.6.3).

Die Ergebnisse der Beta-Galaktosidase-Färbung zeigten für die fokussierte SW-Applikation mit $0,2 \text{ mJ/mm}^2$ sowie $0,3 \text{ mJ/mm}^2$, bezogen auf die ungeschallten Kontrollen, zu beiden Zeitpunkten keinerlei Veränderungen.

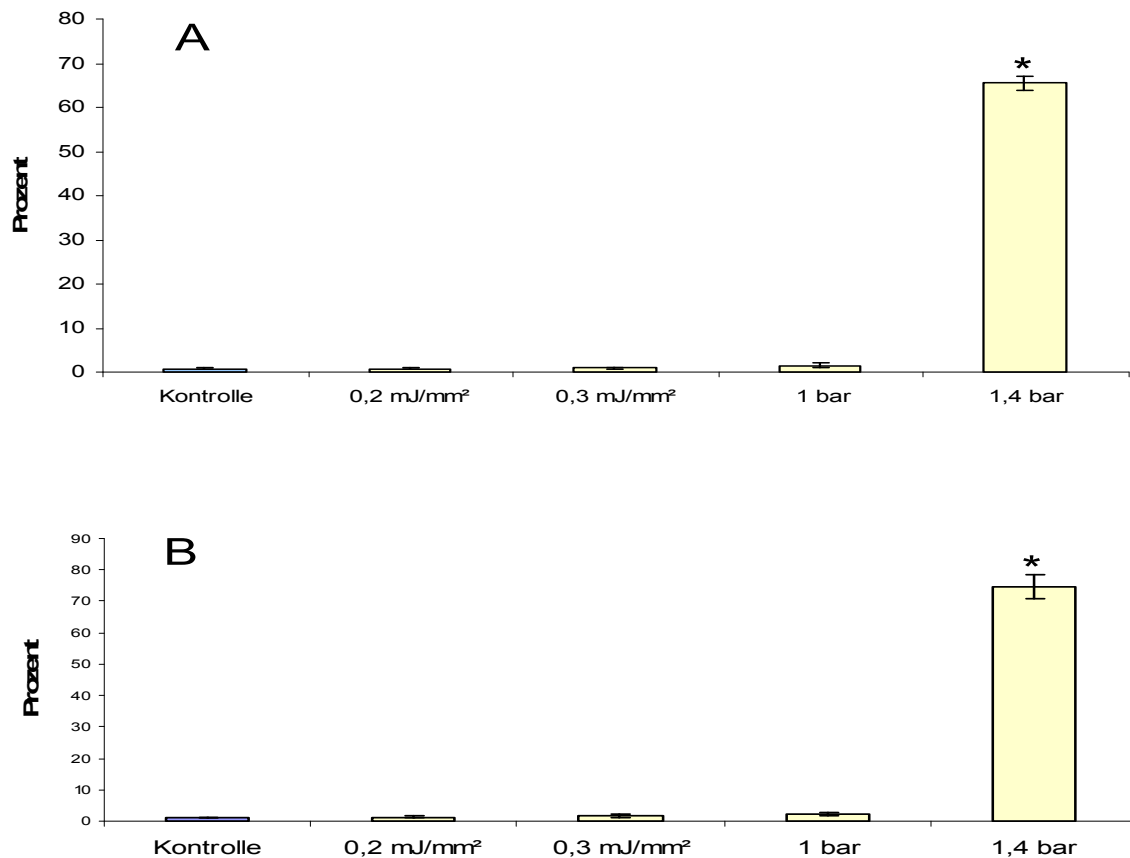


Abb. 51: Beta-Galaktosidase-Färbung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs). Dargestellt ist der prozentuale Anteil positiver MSCs 6 Stunden nach Beschallung (A) und 12 Stunden nach Beschallung (B). Es wurden Beschallungen mit Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz) durchgeführt. Für die Versuche mit fokussierter Stosswelle wurde die Vorlaufstrecke II, mit einer Fokuszone von 0-30 mm verwendet, für die radiale wurde der Applikator ø15 mm verwendet. Die Durchführung war im Dauerimpulsbetrieb mit der Wiederholffrequenz: 4 Hz. Die Gesamtimpulsanzahl betrug 1000. Es wurden die Energiestufen 0,2mJ/mm² und 0,3mJ/mm² durchgeführt. Für die Behandlung mit radialer Stosswelle wurden die Energiestufen von 1 und 1,4 bar benutzt.

Ebenfalls konnte zu beiden Zeitpunkten keine Beeinflussung der Beta-Galaktosidase Aktivität bei MSCs nach radialer DW-Applikation mit 1 bar festgestellt werden. Bei radialer DW-Applikation mit 1,4 bar, zeigte sich jedoch zu beiden Zeitpunkten ein deutlich signifikant erhöhter Anteil Beta-Galaktosidase-positiver MSCs. Der prozentuale Anteil der Beta-Galaktosidase positiven Zellen nach 6 Std lag hierbei, bei 65,13% ±1,52 sowie nach 12 Std bei 74,71% ±3,66. Die Ergebnisse sind in Abb.51 dargestellt. Da der Untersuchungsschwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf das Aktin und Migrationsverhalten von MSCs bzw. deren Beeinflussbarkeit über SW/DW-Behandlung untersucht werden soll, erfolgt die Visualisierung des Aktinzytoskeletts mittels Phalloidin-färbung.

3.8. Nachweis von Aktinzytoskelettveränderungen mittels Phalloidinfärbung

Für die Visualisierung des F-Aktin-Zytoskeletts (Pellegrin and Mellor, 2007) wird das fluoreszenzmarkierte Phalloidin (Alexa Fluor®488, Absorption: 495nm, Emission: 517nm, Molecular Probes, Invitrogen, Leiden, Niederlande) genutzt. Nachdem die Zellen SW/DW-behandelt, mit Phalloidin und DAPI eingefärbt wurden, konnten im ersten Schritt die F-Aktinfasern der hMSCs nach gerichteten und ungerichteten Fasern unterschieden werden (Abb.52).

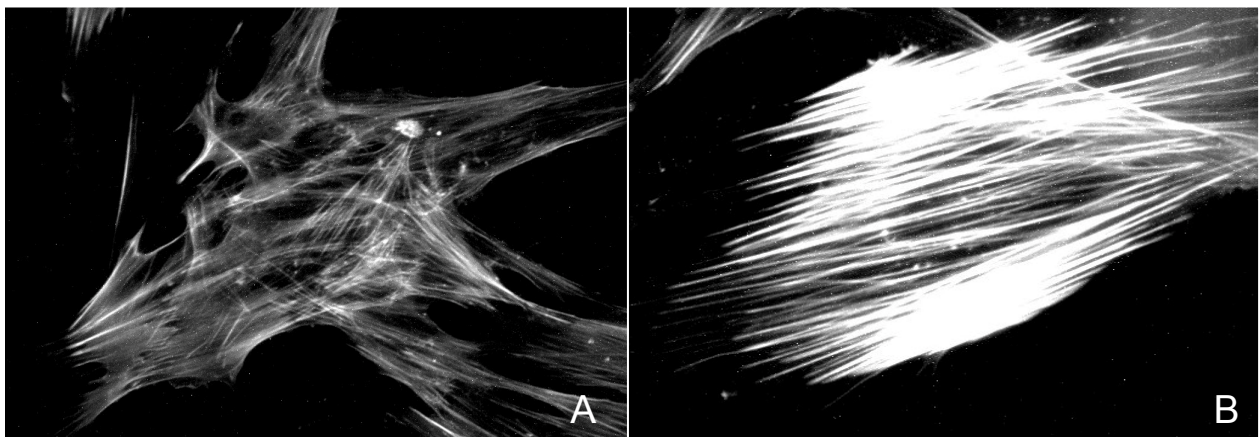


Abb. 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme humaner mesenchymaler Stammzelle (hMSC).

Die Gesamtzellzahl wird mit dem Kernfarbstoff DAPI bestimmt. Die Zellen mit gerichteten (B) und ungerichteten (A) Aktinfasern werden quantifiziert und der Gesamtzellzahl gegenübergestellt (Zeiss Axiovert 200M, LD Plan-Neofluar, DAPI, FITC).

Als erstes wurden die humanen mesenchymalen Stammzellen mit dem Piezoson 100 (Wolf, Knittlingen, Deutschland) mit Dauerimpulsbetrieb, Wiederholungsfrequenz von 4 Hz und einer Gesamtimpulsanzahl von 1000 behandelt. Um einen optimalen Zeitpunkt, für die Bestimmung der Faserqualität bezüglich des Ausrichtungsverhaltens auszuwählen, wurde eine Reihe von Vorversuchen getätigt. Exemplarisch sind in Abb. 54 die zeitabhängigen Veränderungen der F-Aktinfasern mit einer Energiedichte von $0,077\text{mJ}/\text{mm}^2$ (Piezoson 100) dargestellt. Die SW-behandelten MSCs wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach SW-Behandlung abgestoppt. Neben der Kontrolle sind im nachfolgenden Diagramm (Abb. 53), die Versuchsansätze direkt nach Schallung, 30 min nach Schallung und 60 min nach Schallung graphisch dargestellt.

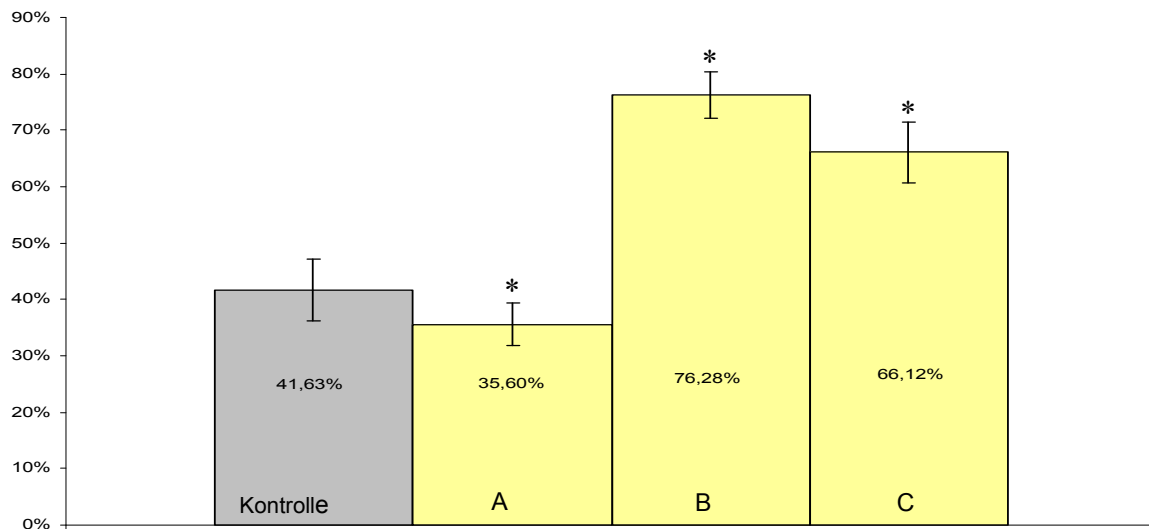


Abb. 53: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils gerichteter F-Aktinfasern zu unterschiedlichen Zeiten nach SW-Behandlung mit Piezoson100 (Wolf, Knittlingen, Deutschland) im Dauerimpulsbetrieb, Wiederholungsfrequenz von 4 Hz und 1000 Gesamtpulsanzahl pro Behandlung sowie einer Energiedichte von 0,077mJ/mm². Die Kontrolle besitzt 41,63±13,17% gerichtete F-Aktinfasern. Direkt nach Beschallung (A) sind 35,60±10,73% an gerichteten Fasern detektierbar. Nach 30 Minuten (B) zeigt sich ein prozentualer Anteil von 76,28±5,38% gerichteter Fasern, die nach 60 Minuten (C) bereits wieder auf 66,12±8,19% abgefallen sind (Alle Ergebnisse besitzen Signifikanz).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die weiteren Versuche die Zeitpunkte t_0 (direkt nach Beschallung) und t_1 (30 Minuten nach Beschallung) verwendet. Für die ersten Versuche wurden der Piezoson 100 (Wolf) und der Swiss Dolor Clast (EMS) im Dauerimpulsbetrieb, mit einer Wiederholungsfrequenz von 4 Hz und einer Gesamtpulsanzahl von 1000 Impulsen, verwendet (Abb.54).

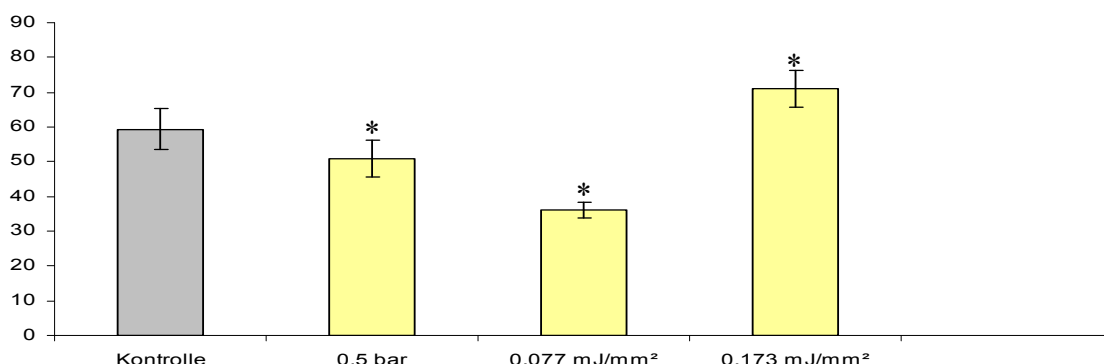


Abb. 54: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils gerichteter F-Aktinfasern zum Zeitpunkt t_0 (direkt nach der Beschallung). Es wurden mit dem mit Piezoson 100 (Wolf, Knittlingen, Deutschland) im Dauerimpulsbetrieb, Wiederholungsfrequenz von 4 Hz und 1000 Gesamtpulsanzahl pro Behandlung mit 0,077mJ/mm² und 0,173mJ/mm² sowie adäquate Versuche mit Swiss Dolor Clast®, Applikator 15mm (Elektro Medical Systems GmbH, Konstanz, Deutschland) mit 0,5 bar durchgeführt.

Die Detektion von gerichteten F-Aktinfasern zeigte direkt nach SW-DW-Applikation (t_0) signifikante Veränderungen. Die DW-Behandlung mit dem Swiss Dolor Clast mit 0,5 bar ($50,95\% \pm 5,26$) sowie die SW-Behandlung mit dem Piezozon 100 mit $0,077 \text{ mJ/mm}^2$ ($36\% \pm 2,38$), zeigten signifikante Verringerungen des prozentualen Anteils, der gerichteten Fasern im Vergleich zur Kontrolle ($59,43\% \pm 5,97$). Die SW-Behandlung mit dem Piezozon 100 mit $0,173 \text{ mJ/mm}^2$ zeigte eine signifikante Erhöhung des gerichteten Anteils auf $70,94\% \pm 5,35$ (Abb.54). Als weiterer Beobachtungszeitraum wurde der Zeitpunkt 30 min nach Behandlung vorgesehen (t_1), der in Abb. 55 graphisch dargestellt ist.

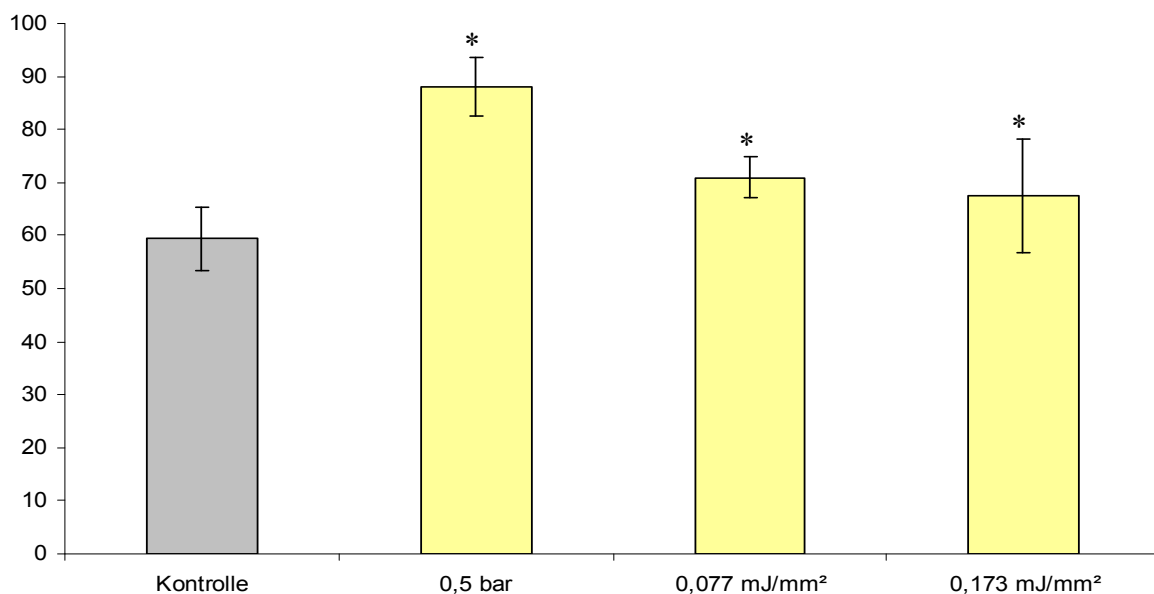


Abb. 55: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils gerichteter F-Aktinfasern zum Zeitpunkt t_1 (30 min nach der Beschallung). Es wurden mit dem mit Piezozon100 (Wolf, Knittlingen, Deutschland) im Dauerimpulsbetrieb, Wiederholungsfrequenz von 4 Hz und 1000 Gesamtpulsanzahl pro Behandlung mit $0,077 \text{ mJ/mm}^2$ und $0,173 \text{ mJ/mm}^2$ sowie adäquate Versuche mit Swiss Dolor Clast®, Applikator 15mm (Elektro Medical Systems GmbH, Konstanz, Deutschland) mit 0,5 bar durchgeführt.

Die Detektion von gerichteten F-Aktinfasern 30 min nach (t_1) SW-DW-Applikation zeigt ebenfalls signifikante Veränderungen (Abb.55). Die DW-Behandlung mit dem Swiss Dolor Clast mit 0,5 bar ($88,11\% \pm 5,56$) sowie die SW-Behandlung mit dem Piezozon 100 mit $0,077 \text{ mJ/mm}^2$ ($70,97\% \pm 3,92$) und $0,173 \text{ mJ/mm}^2$ ($67,42\% \pm 10,66$) zeigten signifikante Erhöhungen des prozentualen Anteils der gerichteten Fasern, im Vergleich zu den unbeschallten Kontrollen ($59,43\% \pm 5,97$). Weitere Versuche wurden adäquat mit dem Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwilen, Schweiz) durchgeführt (Abb.56).

Für die Versuche mit fokussierter Stosswelle wurde die Vorlaufstrecke II, mit einer Fokuszone von 0-30 mm verwendet, für die Radiale wurde der Applikator $\varnothing 15$ mm verwendet. Es wurde im Dauerimpulsbetrieb, mit einer Wiederholungsfrequenz von 4 Hz und einer Gesamtimpulsanzahl von 1000 Impulsen gearbeitet.

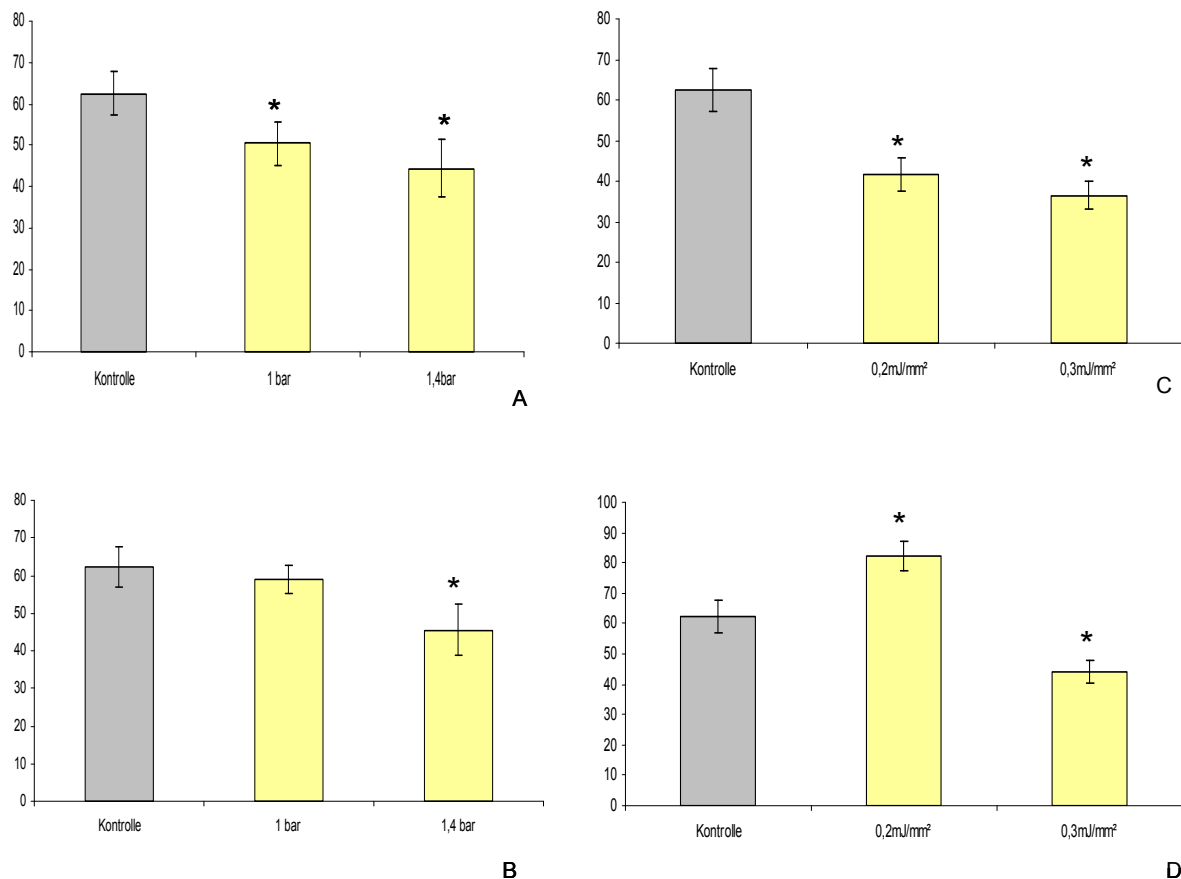


Abb. 56: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils gerichteter F-Aktinfasern zum Zeitpunkt t_0 (direkt nach der Beschallung- Abb. A/C) und zum Zeitpunkt t_1 (30 min nach der Beschallung- Abb. B/D). Die Beschallungen wurden mit Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz) durchgeführt. Für die Versuche mit fokussierter Stosswelle wurde die Vorlaufstrecke II, mit einer Fokuszone von 0-30 mm verwendet, für die radiale wurde der Applikator $\varnothing 15$ mm verwendet. Die Durchführung war im Dauerimpulsbetrieb mit der Wiederholffrequenz: 4 Hz. Die Gesamtimpulsanzahl betrug 1000. Es wurden die Energiestufen 0,2mJ/mm² und 0,3mJ/mm² durchgeführt. Für die Behandlung mit radialer Stosswelle wurden die Energiestufen von 1 und 1,4 bar benutzt.

Direkt nach SW-/DW-Behandlungen zeigten sich sowohl für die Druckwelle (1 bar: 50,38%±5,26; 1,4bar:44,4%±7,14) als auch für die für die Stosswelle (0,2mJ/mm²: 41,69%±4,08; 0,3 mJ/mm²: 36,48%±3,40) eine signifikante Reduzierung der gerichteten F-Aktinfasern im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (62,41%±5,32).

Nach 30 Minuten waren die DW-behandelten Fasern (1 bar: 59,12%±3,69; 1,4bar: 45,49%±6,89) weiterhin weniger stark ausgerichtet, als die unbehandelten Kontrollen (62,41%±5,32). Bei der fokussierten SW-Behandlung wiesen die mit 0,3mJ/mm² behandelten Zellen weiterhin eine signifikante Reduzierung (43,89%±3,77), die mit 0,2mJ/mm² eine signifikante Erhöhung der Anzahl (82,46%±4,79) gerichteter F-Aktinfasern, im Vergleich zur Kontrolle (62,41%±5,32) auf. Bei der Quantifizierung der F-Aktinfasern wurden zusätzlich die Anzahl depolymerisierter Aktinstrukturen quantifiziert und in nachfolgende Diagramme (Abb.57) graphisch dargestellt.

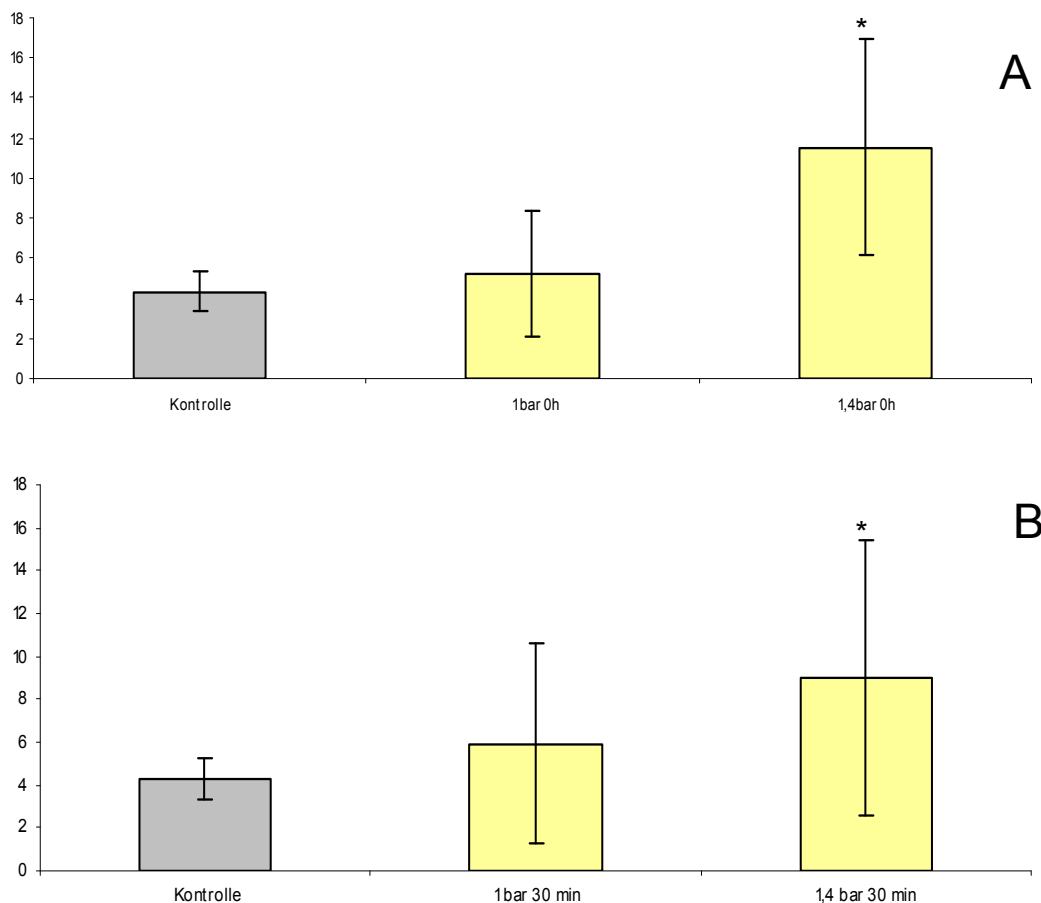


Abb. 57: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils depolymerisierter F-Aktinfasern zum Zeitpunkt t₀ (direkt nach der Beschallung- Abb. A) und zum Zeitpunkt t₁ (30 min nach der Beschallung -Abb. B). Die Beschallungen wurden mit Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz) durchgeführt. Für die Versuche mit radialer Druckwelle wurde der Applikator ø15 mm verwendet. Die Durchführung war im Dauerimpulsbetrieb mit der Wiederholfrequenz: 4 Hz. Die Gesamtimpulsanzahl betrug 1000. Es wurden die Energiestufen 1 bar und 1,4 bar benutzt.

Die Untersuchung der Faserstruktur des Aktins ergab in der Kontrollgruppe einen Anteil depolymerisierter Fasern von im Durchschnitt $4,33\% \pm 0,96$. Bei der Behandlung der MSCs mit radialer Stoßwelle (Storz), zeigte sich direkt nach der Exposition mit 1 bar, ein prozentualer Anteil von im Durchschnitt $5,2\% \pm 3,11$, bei 1,4 bar ein Anteil von im Durchschnitt $11,54\% \pm 5,38$ depolymerisierten F-Aktins (Abb. 58A). 30 min nach DW-Behandlung lag der Anteil depolymerisierter Fasern mit 1 bar bei $5,93\% \pm 4,69$ und bei 1,4bar bei $9,02\% \pm 6,40$ (Abb.58B). Somit konnte zu beiden Zeitpunkten, für die Behandlung mit 1,4 bar eine signifikante Erhöhung des Anteils depolymerisierter Fasern festgestellt werden. Adäquate Versuche wurden mit der fokussierten Einheit von Storz, mit Energien von $0,2\text{mJ}/\text{mm}^2$ und $0,3\text{mJ}/\text{mm}^2$ durchgeführt, und in den Abb. 58 graphisch dargestellt.

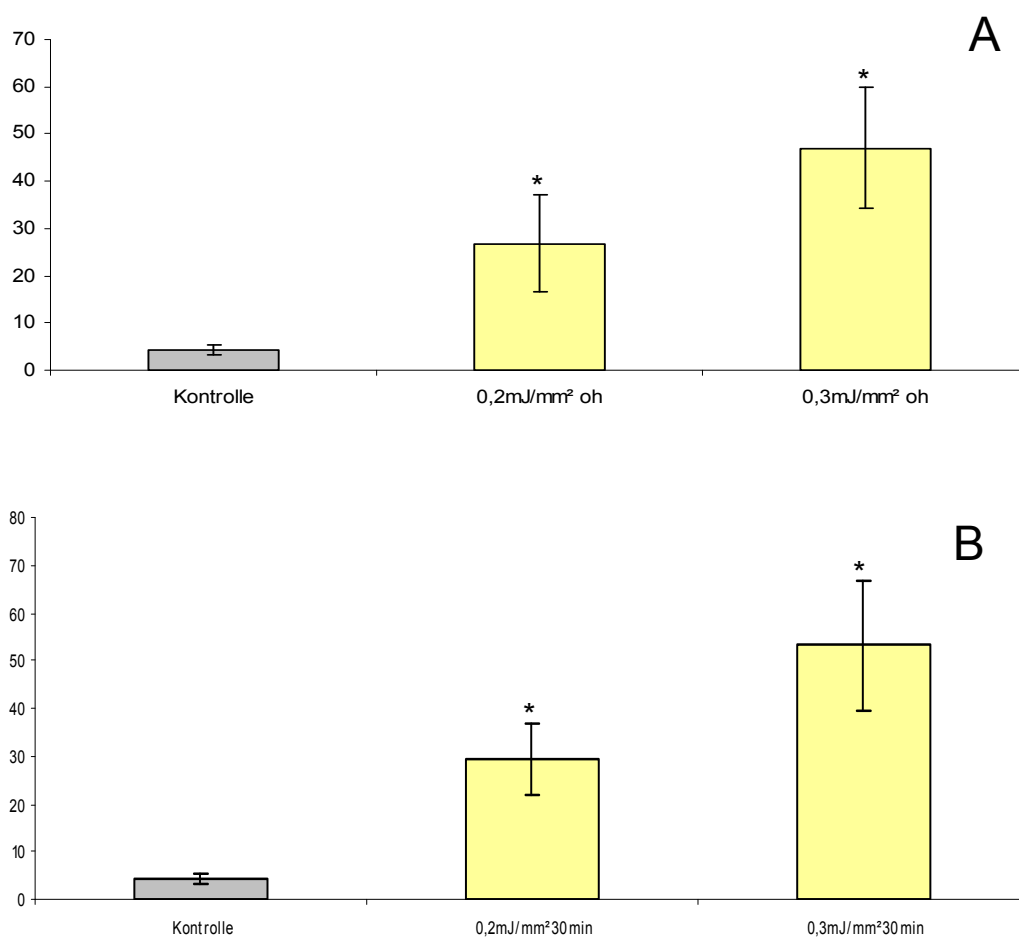


Abb. 58: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils depolymerisierter F-Aktinfasern zum Zeitpunkt t₀ (direkt nach der Beschallung- Abb. A) und zum Zeitpunkt t₁ (30 min nach der Beschallung- Abb. B). nach SW-Behandlung mit Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz). Für die Versuche mit fokussierter Stosswelle wurde die Vorlaufstrecke II, mit einer Fokuszzone von 0-30 mm verwendet. Die Durchführung war im Dauerimpulsbetrieb mit der Wiederholffrequenz: 4 Hz. Die Gesamtimpulsanzahl betrug 1000. Es wurden die Energiestufen $0,2\text{mJ}/\text{mm}^2$ und $0,3\text{mJ}/\text{mm}^2$ durchgeführt.

In Abb. 58 zeigt sich im Vergleich zur unbeschallten Kontrolle ($4,33\% \pm 0,96$), ein erhöhter Anteil depolymerisierter F-Aktinfasern von $26,88\% \pm 10,29$ bei $0,2\text{mJ}/\text{mm}^2$ und $47,08\% \pm 12,71$ bei $0,3\text{mJ}/\text{mm}^2$, direkt nach der SW-Behandlung (t_0). Nach einer Zeitspanne von 30 min (t_1), zeigt sich ein prozentualer Anteil von $29,43\% \pm 7,33$ depolymerisierten F-Aktinfasern bei einer Energie von $0,2\text{mJ}/\text{mm}^2$ und ein Anteil von $53,1\% \pm 13,72$ bei $0,3\text{mJ}/\text{mm}^2$. Beide Energiedichten führten demnach zu beiden Zeiten, zu einer signifikanten Steigerung der depolymerisierten Fasern im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse, sollte die eNOS-Aktivität in diesem Kontext untersucht werden, um Rückschlüsse auf den Einfluss von Scherkräften während der SW/DW-Applikation zu ziehen. Des Weiteren sollte im Bezug zum Ausrichtungsverhalten der Zellen, bezüglich der Polarität, ebenfalls die Aktivität von Rac1/ Cdc 42 detektiert werden. Beide Faktoren sollten via Western Blot überprüft werden.

3.9. Nachweis von eNOS und Rac1/Cdc42 mittels Western Blot

Die Western Blot Analyse mit dem monoklonalen Antikörper Mouse Anti-Aktin, clone C4 (1:500; Millipore) zeigte sowohl in der Kontrolle als auch bei den SW-/DW-behandelten Ansätzen in der Western Blot Analyse Proteinexpression von Aktin bei $\sim 43\text{kD}$ (Abb. 60). Aktin ist ein Protein des Zytoskeletts, das sich in nahezu allen Zellen befindet und dient als interne Kontrolle. Bezüglich der F-Aktinzytoskelettveränderungen nach SW/DW-Behandlung, sollte die Rolle von eNOS bzw. von Scherkräften in diesem Zusammenhang untersucht werden. Bei der Western Blot Analyse mit dem polyklonalen Antikörper Rabbit Anti-eNOS/NOS Type III (1:700, BD Transduction Laboratories™) zeigte sich bei allen Ansätzen, eine Expression des Proteins bei 140kD (Abb.59).

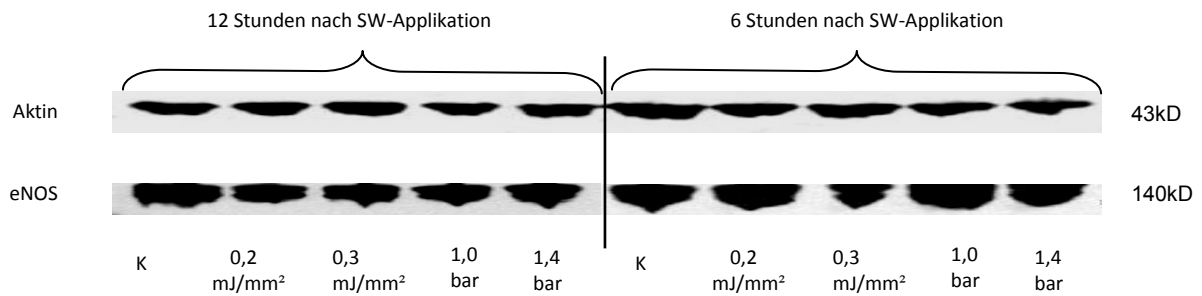


Abb.59: Western Blot Analyse von eNOS/NOS Type III humaner mesenchymaler Stammzellen

in Abhängigkeit der SW-/DW-Behandlung bei Dauerimpulsbetrieb und einer Wiederholffrequenz von 4 Hz mit Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz). Die Gesamtpulszahl betrug 1000 (n =4). Auf der linken Seite sind die Ergebnisse 12 Std nach SW-/DW-Applikation, auf der rechten Seite 6 Std nach Applikation dargestellt. Die Bandenhöhe des monoklonalen Antikörpers Mouse Anti-Actin, clone C4 (1:500; Millipore) liegt bei 43kD, die Bandenhöhe des polyklonalen Antikörpers Anti-eNOS/NOS Type III (1:700, BD Transduction Laboratories™) liegt bei 140kD.

Aufgrund der Beobachtung von Depolymerisation und der Beeinflussbarkeit des Ausrichtungsverhaltens der F-Aktinfasern, sollten in diesem Zusammenhang die Rolle von RAC1/Cdc42 untersucht werden. Bei der Western Blot Analyse des polyklonalen Antikörper Rabbit Anti-Rac1/Cdc42 (1:500, Biosource) zeigte sich bei allen Ansätzen, eine Expression des Proteins bei 140kD (Abb.60) 12 Stunden nach Applikation.

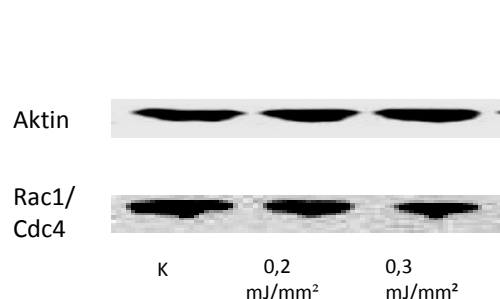


Abb. 60: Western Blot Analyse von Rac1/Cdc42 humaner mesenchymaler Stammzellen

in Abhängigkeit der SW-/DW-Behandlung bei Dauerimpulsbetrieb und einer Wiederholffrequenz von 4 Hz mit Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz). Die Gesamtpulszahl betrug 1000 (n =4). Die Bandenhöhe des monoklonalen Antikörpers Mouse Anti-Actin, clone C4 (1:500; Millipore) liegt bei 43kD, die Bandenhöhe des polyklonalen Antikörpers Anti-Rac1/Cdc42 (1:500, Biosource) liegt bei 24kD.

Aufgrund der sichtbaren Banden in Abb. 58 (~140kD) sowie in Abb. 59 (~24kD) kann festgestellt werden, dass humane MSCs 6 und 12 Stunden nach SW-/DW-Applikation (inkl. Kontrolle) eNOS exprimierten. Rac1/Cdc42 konnte 12 Std nach SW-/DW- Behandlung detektiert werden. Es kam demnach zu keiner Veränderung in der Expression von eNOS und/oder Rac1/Cdc42 über SW/DW-Applikation.

Da sich über DW/SW-Applikation ein starker Einfluss auf die Zytoskelettformation von MSCs nachweisen ließ, sollte in einem weiteren Schritt überprüft werden, ob dies ebenfalls einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der MSCs hat. Als erster Migrationsassay wurde hierfür der Boyden Chamber Assay gewählt.

3.10. Untersuchung der Migration mittels Boyden Chamber Assay

Zur Überprüfung der migratorischen Eigenschaften von MSCs wird der modifizierte Boyden Chamber Assay (Boyden, 1962; Schmidt, et al., 2006a) benutzt. Dieser wurde ursprünglich für die Analyse von Chemotaxis bei Leukozyten etabliert (*Methods in Molecular Biology, vol 294: Cell migration: Developmental and Protocols, Hong-Chen Chen, Humana Press 2008*). Bei der Auswertung des Boyden Chamber Assays wurden ausschließlich komplett migrierte Zellen quantifiziert (Abb.61). Die Untersuchungen der Migrationsleistung im Boyden Chamber Assay nach SW-Behandlung mit dem Piezoson 100 (Wolf, Knittlingen, Deutschland) im Dauerimpulsbetrieb, und einer Gesamtimpulsanzahl von 500 (A, C) im Vergleich zu 1000 (B, D) ist in Abb.62 graphisch dargestellt. Ebenfalls wurden die Behandlungen mit einer Wiederholungsfrequenz von 2Hz (A, B) und 4 Hz (C, D) gegenübergestellt. Die Schallungen zeigten bei 500 Impulsen und einer Wiederholffrequenz von 2 Hz, eine signifikante Erhöhung der Migration bei $0,077\text{mJ/mm}^2$ ($23 \pm 1,83$) und einer signifikanten Erniedrigung bei $0,238\text{mJ/mm}^2$ ($13 \pm 1,41$). Bei einer Beschallung mit 1000 Impulsen (2Hz) kommt es zu signifikanten Erhöhungen der Migration bei $0,048\text{mJ/mm}^2$ ($26,75 \pm 3,59$) sowie bei $0,077\text{mJ/mm}^2$ ($27 \pm 1,83$). Zu einer signifikanten Verringerung der Migration kommt es bei Beschallungen mit $0,122\text{mJ/mm}^2$ ($13,75 \pm 1,71$) sowie $0,238\text{mJ/mm}^2$ ($8 \pm 2,58$) im Vergleich zu Kontrolle ($19,75 \pm 1,71$).

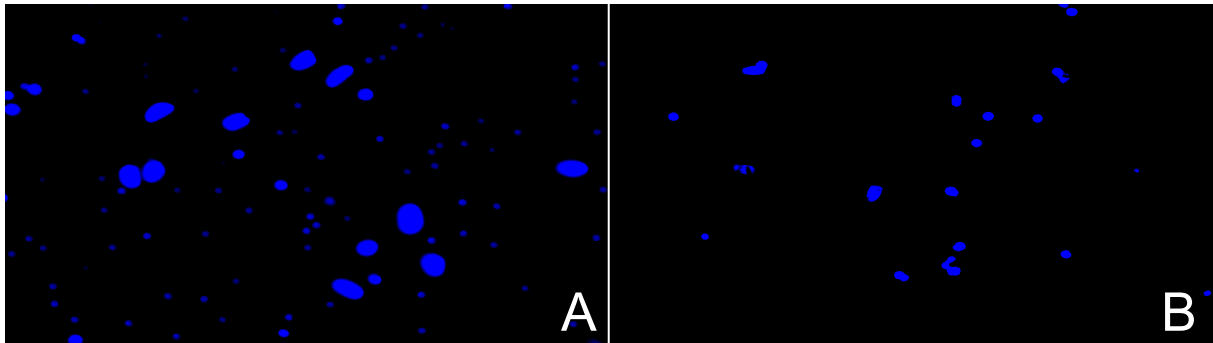


Abb.61: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von migrierten Zellen im mod. Boyden Chamber Assay

Es wurden nur vollständig migrierte Zellen (A) gezählt, die sich bereits in den Filterporen befindlichen MSCs, aber noch nicht migrierten MSCs (B), wurden nicht quantifiziert. Die vollständig migrierten Zellen sind die großen Gebilde in Bild A, die in den Filterporen steckenden MSCs, zeigen die in Bild B dargestellten kleineren fluoreszierenden Gebilde. Der Filter wurde meanderförmig untersucht, um Doppelzählungen zu vermeiden (Zeiss Axiovert 200M, LD Plan-Neofluar, 20x, DAPI).

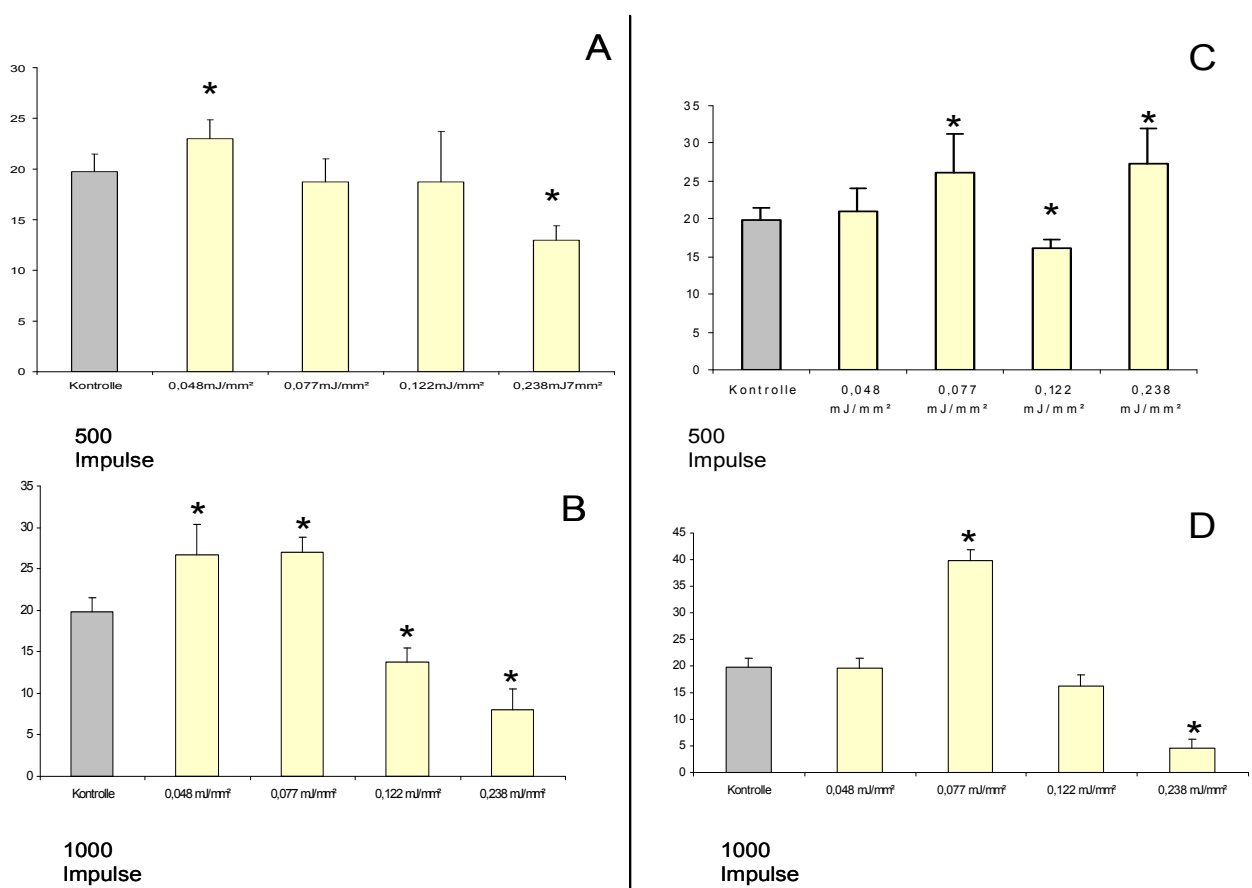


Abb. 62: Graphische Darstellung migrierter MSCs im Boyden Chamber Assay nach SW-Behandlung mit Wolf Piezoson 100 (Wolf, Knittlingen, Deutschland). Es wurden die Energiestufen (0,048 mJ/mm², 0,077 mJ/mm², 0,122 mJ/mm², 0,238 mJ/mm²) in Kombination mit 500 Impulsen (A, C) oder 1000 Impulsen (B, D) sowie einer Wiederholffrequenz von 2 Impulsen pro Sekunde (A, B) oder 4 Impulsen pro Sekunde (C, D) ausgetestet (p<0,05).

Bei einer Wiederholungsfrequenz von 4 Hz ergeben sich bei 500 Gesamtpulsen signifikante Erhöhungen der Migration bei $0,077\text{mJ/mm}^2$ ($26,25 \pm 4,99$) und $0,238\text{mJ/mm}^2$ ($27,25 \pm 4,65$) und eine signifikante Erniedrigung der Migration bei $0,122\text{mJ/mm}^2$ ($16 \pm 1,15$). Identischer Versuchsaufbau jedoch mit einer Gesamtpulsanzahl von 1000 Impulsen, zeigt eine stark signifikante Erhöhung der Migration bei $0,077\text{mJ/mm}^2$ ($39,75 \pm 2,06$) sowie einer signifikanten Erniedrigung bei $0,238\text{mJ/m}^2$ ($4,5 \pm 1,73$). Die Untersuchungen der Migrationsleistung im Boyden Chamber Assay nach DW-Behandlung mit dem EMS Dolor Clast (EMS, Konstanz, Deutschland) im Dauerimpulsbetrieb, und einer Gesamtpulsanzahl von 1000 ist in Abb.63 graphisch dargestellt. Es wurden die Wiederholffrequenz von 2 Hz (A) und 4 Hz (B) gegenübergestellt.

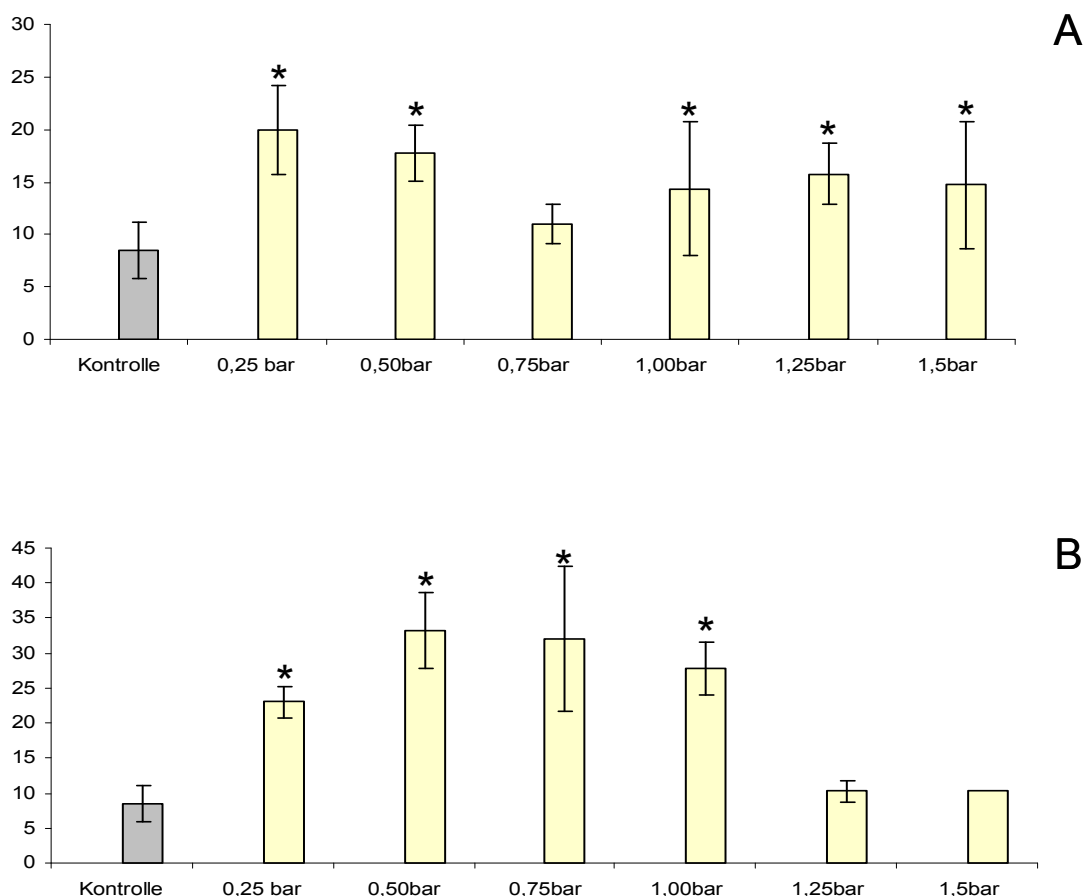


Abb.63: Graphische Darstellung migrierter Zellen im Boyden Chamber Assay nach SW-Behandlung (1000 Impulse) mit dem EMS-Gerät Dolor Clast (Elektromedical System, Konstanz, Deutschland). Es sind in (A) die Ergebnisse mit einer Wiederholffrequenz von 2 Impulsen pro Sekunde und in (B) mit 4 Impulsen pro Sekunde dargestellt. Die Gesamtpulsanzahl pro Behandlung betrug 1000 Impulse. Die Ausgetesteten Energiestufen waren 0,25 bar, 0,50bar, 0,75 bar, 1,00bar, 1,25 bar, 1,5 bar.

Die DW-Behandlungen mit einer Wiederholungsfrequenz von 2 Hz zeigten bei fast allen Beschallungen, mit Ausnahme von 0,75 bar ($32 \pm 5,35$), signifikante Erhöhungen der Migrationsrate im Vergleich zur Kontrolle ($8,5 \pm 3,65$). Es wurden Beschallungen mit 0,25 bar ($23 \pm 2,16$), 0,5 bar ($33,25 \pm 2,99$), 0,75 bar ($32 \pm 5,35$), 1,00 bar ($27,75 \pm 10,34$), 1,25 bar ($10,25 \pm 3,77$) und 1,5 bar ($10,25 \pm 1,50$) quantifiziert. Identische Versuche wurden mit einer Wiederholungsfrequenz von 4 Hz durchgeführt und ergaben signifikante Erhöhungen der Migrationsleistungen im Vergleich zur Kontrolle ($8,5 \pm 3,65$), mit Ausnahme von 1,25 bar ($15,77 \pm 2,94$) sowie 1,5 bar ($14,71 \pm 6,08$). Die graphische Darstellung zeigt einen Anstieg von 0,25 bar ($20 \pm 4,24$) auf 0,5 bar ($17,75 \pm 2,63$) und einen leichteren Abfall von 0,75 bar ($11 \pm 1,83$) auf 1 bar ($14,31 \pm 6,34$). Die Migrationsleistung von MSCs im Boyden Chamber Assay wurde ebenfalls mit dem Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz) durchgeführt. Die Behandlung erfolgte mit Dauerimpulsbetrieb und einer Wiederholungsfrequenz von 4 Hz und einer Gesamtimpulsanzahl von 1000.

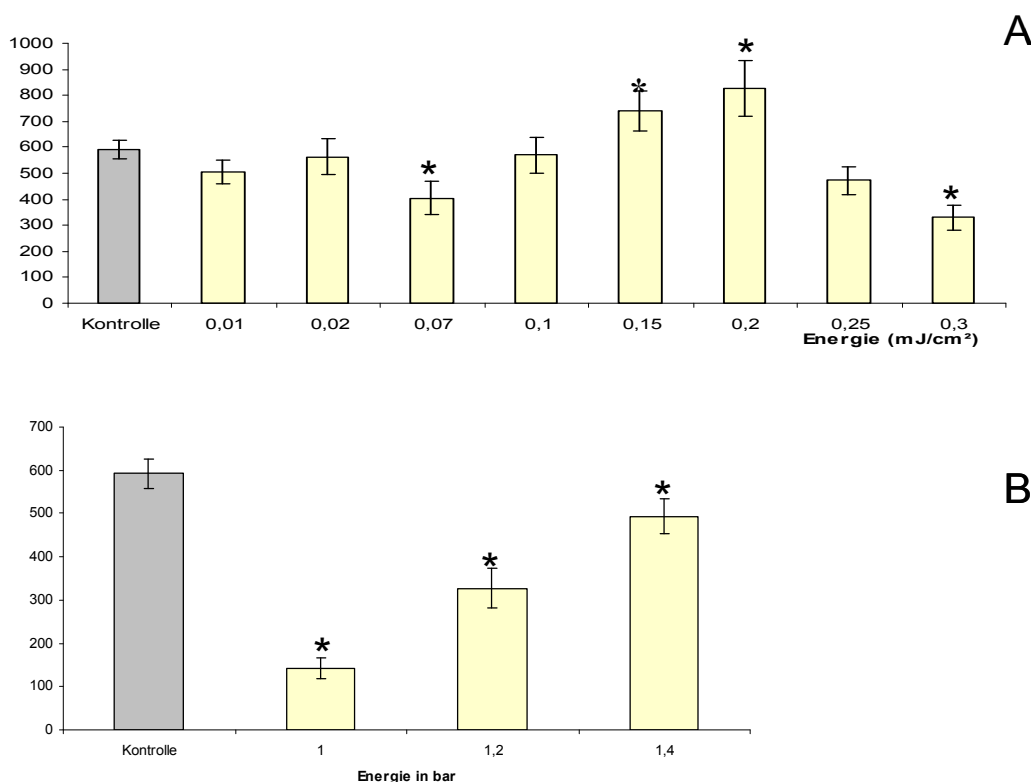


Abb. 64: Quantitative Bestimmung migrierter MSCs im Boyden Chamber Assay nach SW-Behandlung (1000 Impulse, Wiederholffrequenz 4 Impulse/Sekunde) mit Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz). Die Ergebnisse mit der fokussierten Stoßwelle (A) und der radialen Druckwelle (B) wurden zur Unbeschallten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die x-Achse weist die verschiedenen Energiestufen auf. Die Y-Achse weißt die Anzahl vollständig migrierter Zellen aus.

Die Behandlung mit der fokussierten Einheit des Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwilen, Schweiz) zeigte eine signifikante Erhöhung der Migrationsrate bei einer Behandlung mit 0,15 mJ/mm² (739,5 ±77,60) und 0,2 mJ/mm² (827,75 ±106,17), im Vergleich zur unbeschallten Kontrolle (591,75 ±35,31). Die restlichen Beschallungen mit 0,01 mJ/mm² (505 ±47,62), 0,02 mJ/mm² (561 ±68,43), 0,1 mJ/mm² (569,25±71,04), 0,25mJ/mm² (473,75 ±54,27) sowie mit 0,07 mJ/mm² (405±63,09) und 0,3mJ/mm² (330,25±49,42) zeigten eine Minimierung der Migrationsrate im Vergleich zur Kontrolle (591,75 ±35,31), die in den letzten beiden Fällen signifikant war. Die DW-Behandlung mit der radialen Einheit des Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwilen, Schweiz) zeigte eine signifikante Minimierung der Migrationsrate bei Beschallung mit 1 bar (143,25 ±23,42), 1,2bar (327,25 ±46,13), 1,4bar (493,5 ±41,03) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (591,75 ±35,31). Um diese Ergebnisse mit einem weiteren Migrationsassay zu überprüfen und abzusichern, sollten weitere Versuche mit dem Wundheilungsassay („Wound and Healing- Assay“) durchgeführt werden.

3.11. Untersuchung der Migration mittels Wundheilungsassay

Beim Wundheilungsassay (Wound and Healing-Assay) werden MSCs auf speziellen, reflektionsarmen ibidi-Zellkulturschalen (60 μ -Dish für Lebendzellanalyse, ibiditreat, Ibidi, Martinsried, Deutschland) mit einer Dichte von 2000 Zellen pro cm² ausplattiert.

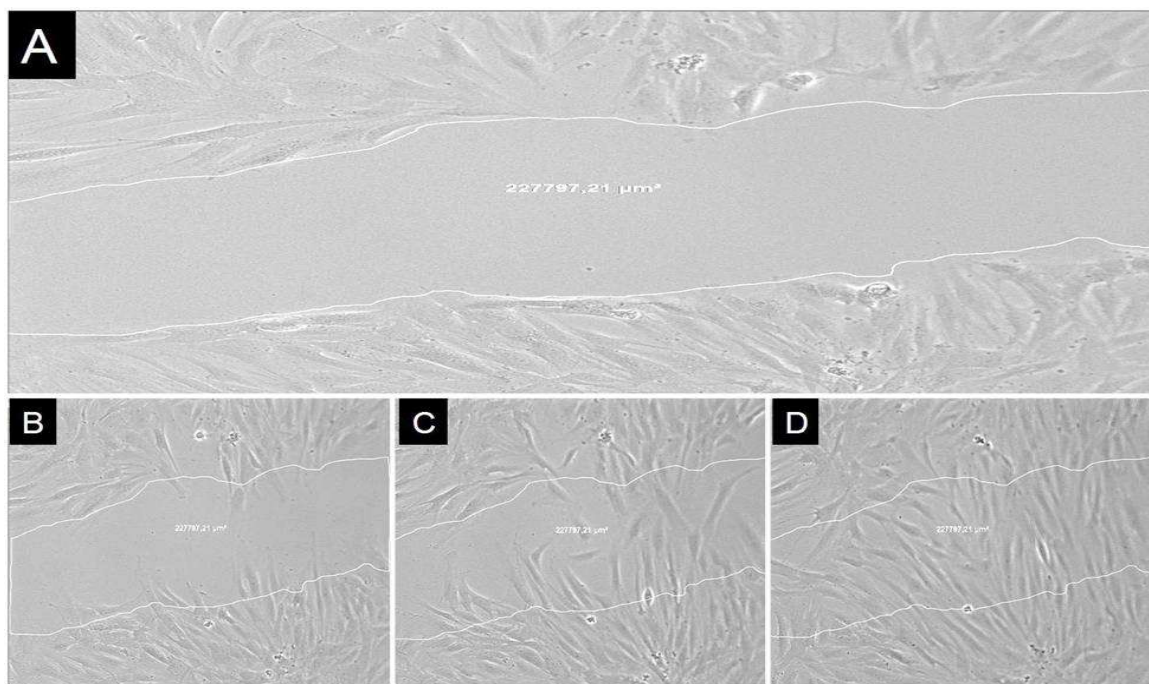


Abb. 65: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Wundheilungs-(Wound and Healing-)Assay bei MSCs. Der konfluente Monolayer wird mit Hilfe einer weißen Pipettenspitze „gescratcht“, so dass eine zellfreie „Wunde“ im Monolayer entsteht (A). Die Zellkulturschale wird in das Vitalmikroskop (Zeiss) unter Brutschrankbedingungen inkubiert. Mit Axio Cam MR Axiovert 200M (Zeiss) werden dann über 24 Std alle 10 Minuten Bilder gemacht, die den Wundverschluss (B-D) protokollieren. Die Wundheilung wird mittels der Fläche in Axiovert 200M (Zeiss) berechnet (Zeiss Axiovert 200M, A-Plan 5x/0.12).

Bei einer Konfluenz von circa 90% wird mit einer Pipettenspitze; ein zur Kulturschale Querverlaufender Wall (Wunde/Scratch) in den Zellrasen gezogen. Es werden mit der Axio Cam MR Axiovert 200M (Zeiss) alle 10 min Bilder des „Status Quo“ angefertigt (Objektiv A-Plan 5x/0.12), so dass nach 24 h eine Komplettdokumentation entsteht, die den Verlauf des „Wundverschlusses“ protokolliert. Zur Auswertung des Assays gehört die Erfassung der Zeitspanne, die für den kompletten Wundverschluss nötig ist (Abb.65).

Bei der Durchführung des „Zellrasenverwundung“, wurden möglichst gleichgroße Wunden in den Zellmonolayer appliziert, um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu haben. Die Zellwundenfläche betragen im Durchschnitt 191035,08 μm^2 , die Standardabweichung wurde dem Graph (Abb.66) beigefügt.

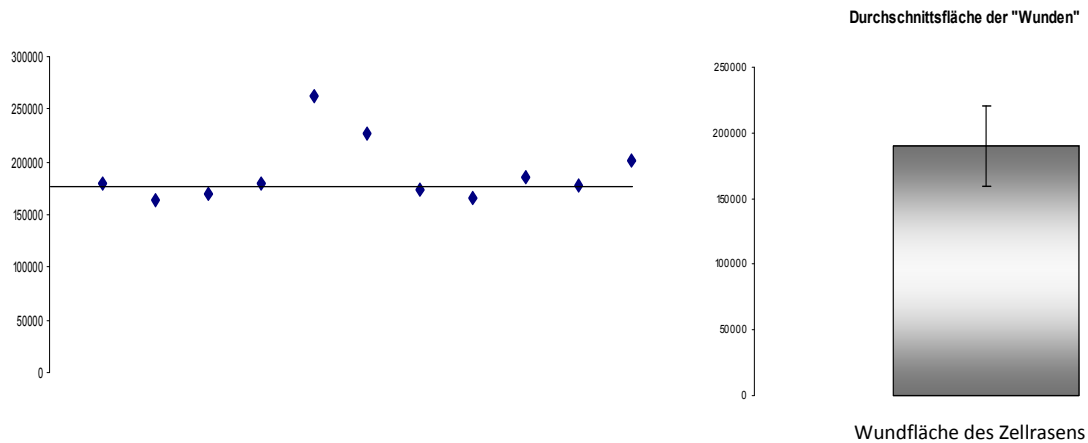


Abb. 66: Statistische Auswertung der Wundflächen beim Wundheilungsassay. Eine möglichst gleichgroße Wundfläche ist für die Vergleichbarkeit der verschiedenen Ansätze unerlässlich. Die graphische Darstellung weist die zellfreie Fläche zum Zeitpunkt 0 (t_0) in μm^2 sowie die Standardabweichung der Gesamtflächen der verschiedenen Ansätze aus.

Der Verlauf des Wundverschlusses wurden 4 und 8 Stunden nach Scratch bestimmt und ergab folgende Ergebnisse, die in Abb. 67 graphisch dargestellt sind. Nach 4 Stunden (A) konnte bei den nichtbeschallten ($n=4$) Scratch ein Wundverschluss von 32,81% ($\pm 8,76$) verzeichnet werden. Die beschallten Scratches mit 0,15mJ/mm², zeigten einen geringeren Wundverschluss von 28,94% ($\pm 2,99$) sowie einen stärkeren Wundverschluss bei 0,2mJ/mm² von 58,31% ($\pm 9,94$). Nach 8 Stunden (B) wurde bei der Kontrollgruppe ein Wundverschluss von 59,81% ($\pm 5,63$), bei 0,15mJ/mm² ein Wundverschluss von 51,42% ($\pm 6,04$) und bei 0,2mJ/mm² ein Wundverschluss von 93% ($\pm 11,22$) festgestellt. Nach 12 Stunden (nicht graphisch dargestellt), waren alle Scratch komplett geschlossen, mit Ausnahme der mit 0,15mJ/mm² beschallten Gruppe, die einen Wundverschluss von 75,15% ($\pm 5,11$) aufwies.

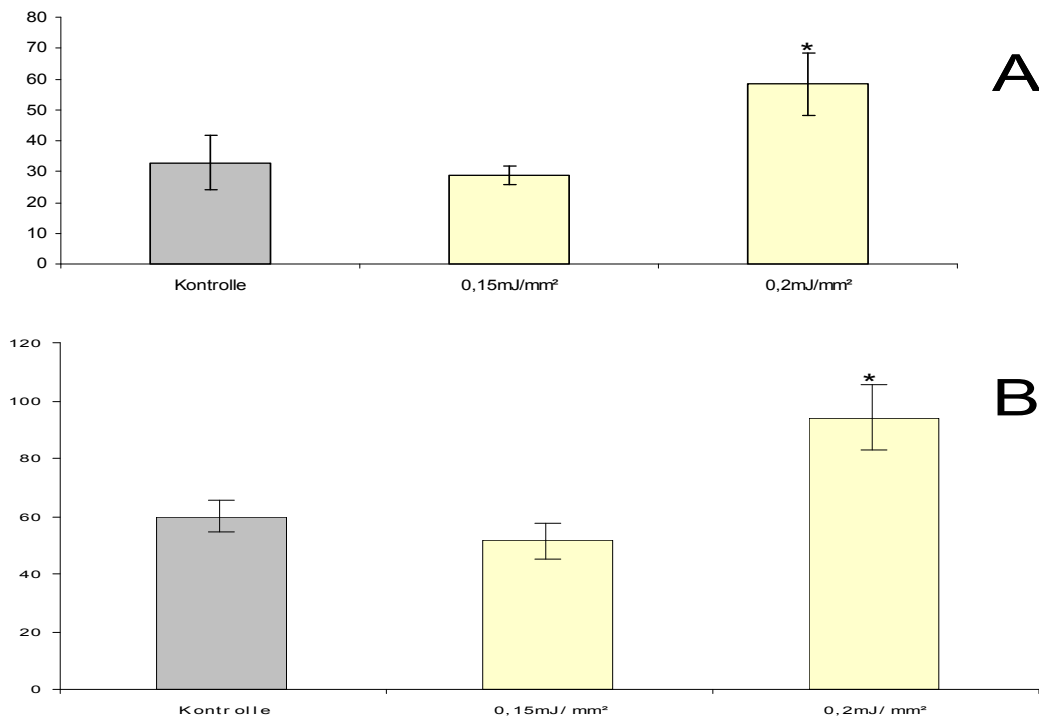


Abb. 67: Graphische Darstellung des Wundverschlusses (in Prozent) humaner mesenchymaler Stammzellen nach SW-Applikation mit der fokussierten Einheit von Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwilen, Schweiz). Die Darstellungen zeigen den Wundverschluss in Prozent 4 Std nach Scratch (A) und 8 Std nach Scratch (B). Die X-Achse zeigt die verwendeten Energiedichten in der Einheit mJ/mm^2 und die Y-Achse stellt den Wundverschluss in Prozent aus. Die Schallungen wurden mit 0,15 und 0,2 mJ/mm^2 durchgeführt.

Es wurde des Weiteren der Zeitraum graphisch dargestellt, der bis zum vollständigen Zuwachsen der Wunde des Zellrasens vergangen ist. Diese Ergebnisse wurden in Abb. 68 graphisch dargestellt.

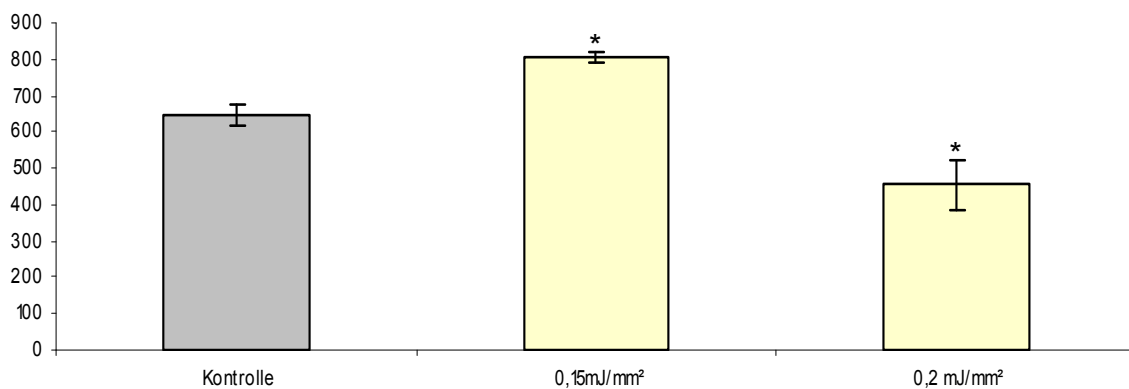


Abb. 68: Graphische Darstellung der Zeit bis zum vollständigen Wundverschluss in Minuten nach SW-Behandlung mit Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwilen, Schweiz). Die X-Achse weist die Energiedichten in mJ/mm^2 aus, die Y-Achse die Zeit in Minuten. Die Schallungen wurden mit 0,15 und 0,2 mJ/mm^2 durchgeführt.

Wie in Abb. 68 dargestellt ist, zeigt sich ein vollständiger Wundverschluss in der Kontrollgruppe nach 645min ($\pm 26,46$), in der mit $0,15\text{mJ}/\text{mm}^2$ behandelten MSCs nach 805 min ($\pm 17,32$) und bei mit $0,2\text{mJ}/\text{mm}^2$ behandelten mit 455 min ($\pm 67,58$). Die Behandlung mit $0,2\text{mJ}/\text{mm}^2$ zeigt damit eine (signifikant) erniedrigte Wundverschlusszeit. Um die Vorgänge der Migrationsassays besser deuten zu können, sollte der Einfluss von SW/DW auf die Zellbewegung mittels Zelltracking-Assays näher untersucht werden.

3.12. Untersuchung der Zellbewegungen mittels Zelltracking

Für die Auswertung der Zellbewegung werden über einen Zeitraum von 24 Std mit der Axio Cam MR Axiovert 200M (Zeiss) alle 10 min Bilder des „Status Quo“ angefertigt (Objektiv A-Plan 5x/0.12), so dass eine Komplettdokumentation entsteht, die die Zellbewegung nach Geschwindigkeit, zurückgelegte Strecke und die Distanz zum Ausgangspunkt der Zelle nach 24 Std protokolliert. Die Daten werden in Metamorph exportiert, ausgewertet und sind in nachfolgenden Abbildungen graphisch dargestellt.

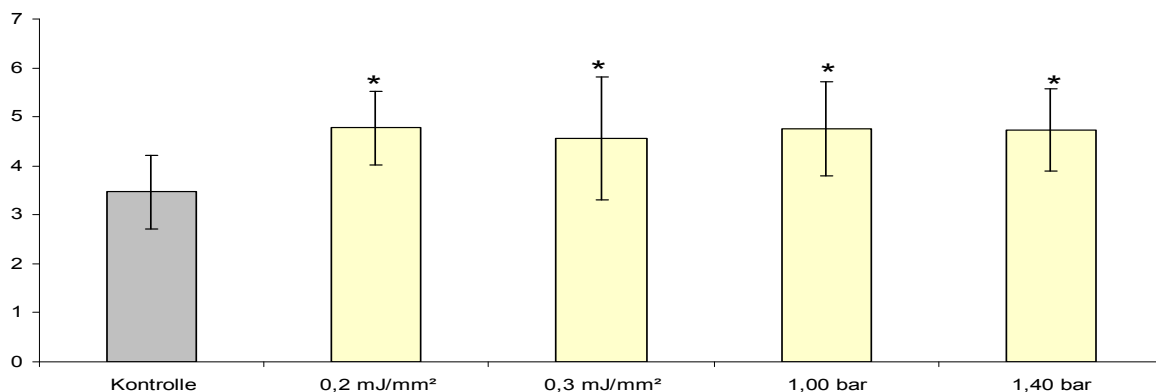


Abb. 69: Graphische Darstellung der zurückgelegten Distanz pro 10 Min nach SW/DW-Behandlung mit Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwilten, Schweiz). Die X-Achse weist die Energiedichten in mJ/mm^2 und bar aus, die Y-Achse die Strecke in Pixel.

Die Ergebnisse des Zelltracking-Assays zeigen für alle Beschallungen mit fokussierter ($0,2\text{mJ}/\text{mm}^2$ und $0,3\text{mJ}/\text{mm}^2$) sowie mit radialen Stoßwelle (1 bar und 1,4bar), signifikante Erhöhungen der zurückgelegten Distanz (Abb.69). Die zurückgelegten Distanzen der Kontroll-MSCs betragen im Mittel 3,46 Pixel ($\pm 0,74$).

Nach den Beschallungen mit der Fokussierten Einheit von Storz zeigen sich nach einer Behandlung mit $0,2\text{mJ/mm}^2$ eine zurückgelegte Distanz von $4,77\text{ Pixel } (\pm 0,76)$ und bei $0,3\text{mJ/mm}^2$ eine Distanz von $4,45\text{ Pixel } (\pm 1,25)$ und stellt somit eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle dar. Die Behandlung mit 1 und 1,4 bar (Radiale Stoßwelle) zeigen ebenfalls signifikante Erhöhungen der Zellbewegung von $4,76\text{ Pixel } (\pm 0,96)$ bei 1 bar und $4,72\text{ Pixel } (\pm 0,84)$ bei 1,4bar. Bei der Beurteilung der Geschwindigkeiten ergeben sich ebenfalls signifikante Ergebnisse mit selben Beschallungsmustern (Abb.71). Die Geschwindigkeiten betragen in den Kontrollgruppen im Mittel $0,33\text{ Pixel/Minute } (\pm 0,07)$ und erhöhen sich bei der Beschallung mit der fokussierten Einheit bei $0,2\text{mJ/mm}^2$ auf $0,47\text{ Pixel/Minute } (\pm 0,07)$ und bei $0,3\text{mJ/mm}^2$ auf $0,45\text{ Pixel/Minute } (\pm 0,13)$. Die Behandlung mit 1 bar ergibt eine Geschwindigkeit von $0,47\text{ Pixel/Minute } (\pm 0,09)$ und die mit 1,4 bar von $0,46\text{ Pixel/Min } (\pm 0,08)$ und stellen somit ebenfalls eine signifikante Erhöhung dar.

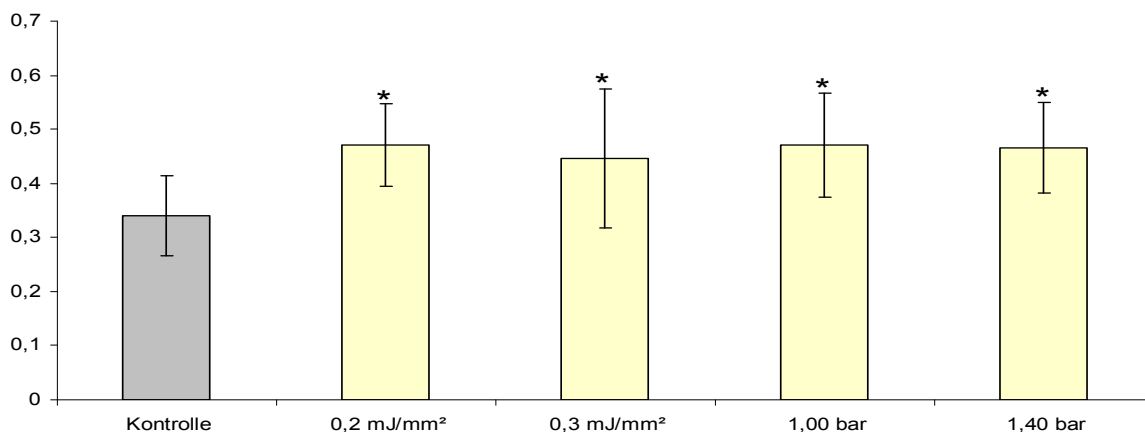


Abb. 70: Graphische Darstellung der Geschwindigkeit in pix/min nach SW/DW-Behandlung mit Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwil, Schweiz). Die X-Achse weist die Energiedichten in mJ/mm^2 und bar aus, die Y-Achse die Geschwindigkeit in Pixel pro Minute (Pix/min).

Die zurückgelegten Distanzen zum Ausgangspunkt werden ebenfalls mit Metamorph bestimmt und ergeben für die Kontrollgruppe im Mittel einen Wert von $705,44\text{ Pixel } (\pm 282,25)$, welcher von allen beschallten Zellen überschritten wurde (Abb.71). So ergeben sich für die fokussierten Behandlungen mit $0,2\text{mJ/mm}^2$ eine Distanz von $872,18\text{ Pixel } (\pm 268,79)$ und mit $0,3\text{ mJ/mm}^2$ eine Distanz von $714,34\text{ Pixel } (\pm 305,19)$, welche im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, nicht signifikant sind.

Bei der Behandlung mit 1 bar ergab sich eine durchschnittliche Distanz zum Ausgangspunkt von 844,65 Pixel ($\pm 293,63$) und bei der 1,4bar von 797,95 Pixel ($\pm 265,21$).

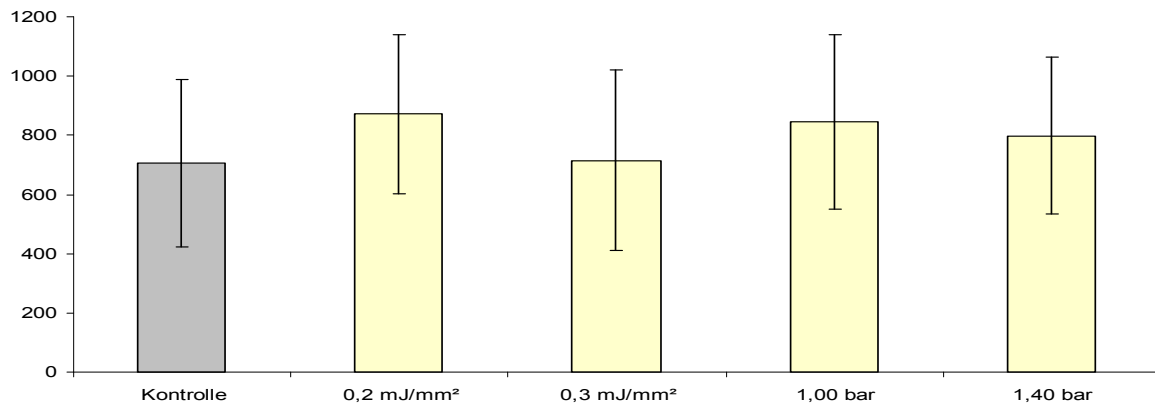


Abb. 71: Graphische Darstellung der Distanz zum Ausgangspunkt SW/DW-Behandlung mit Storz Medical Duolith®SD1 (Storz Medical AG, Tägerwilten, Schweiz). Die X-Achse weist die Energiedichten in mJ/mm² und bar aus, die Y-Achse die Strecke in Pixel.

4. Diskussion:

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) verfügen über ein hohes therapeutisches Potential und werden deshalb im Bereich der Transplantationsmedizin eingesetzt. Der Erfolg dieser Therapieform ist jedoch durch die geringe Anzahl von MSCs, die ihr Zielgebiet erreichen limitiert. Eine direkte Applikation ins Zielgewebe, ist in einigen Fällen, wie beim Herzen kontraindiziert (Breitbach, et al., 2007). Bestrebungen die Effizienz der Transplantationstherapie über die Verbesserungen der Migration zu erreichen, bestehen im Ansatz die Transplantationsnische zu modifizieren oder die Zellen zu konditionieren. Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob sich mesenchymale Stammzellen in Ihrem biologischen Verhalten und Ihren Charakteristiken über stoßwellen- bzw. druckwelleninduzierte Mechanotransduktion modifizieren lassen. Es sollen zellbiologische Adaptationsprozesse der MSCs, vor allem im Bereich des Zytoskeletts und des Migrationsverhaltens, zeit- und dosisabhängig untersucht werden. Es konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen über ein hohes mechanosensitives Potential verfügen und sie sich signifikant von SW und DW beeinflussen lassen. Die Untersuchungen *in vitro* zeigten für SW- und DW-Applikation divergente Ergebnisse. Es konnten Veränderungen der Zellreaktion in Abhängigkeit von der Gesamtimpulsanzahl, Wiederholungsfrequenz, applizierten Energiedichte und des Zeitfaktors festgestellt werden. Die Wirkmaxima *in vitro* waren von den jeweils eingesetzten Geräten abhängig und zeigten gerade im Vergleich der SW- und DW-Applikation eine unterschiedlich breite Range.

4.1. Charakterisierung und Monitoring humaner MSCs

Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich MSCs optimaler Qualität und Beschaffenheit ausgewählt. Die über Dichtezentrifugation gewonnenen, spindelförmigen und plastik-adhärenenten Zellen wurden mittels Colonie-Forming-unit- (CFU-) Assay, Differenzierungsassays (adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung) und FACS-Analyse kontrolliert.

Für die FACS-Analyse wurden die von Pittenger beschriebenen Oberflächenmoleküle CD-14 (Monozyten und Makrophagen), CD-34 (Hämatopoetische Stammzellen) und CD-45 (Leukozyten) benutzt, die als Negativmarker eingesetzt wurden (Pittenger, et al., 1999). Des Weiteren wurden der Oberflächenmarker CD 105 (Endoglin- TGF- β -Rezeptor) als Positivmarker für MSCs eingesetzt (Barry et al, 1999). Aufgrund der Oberflächenpräsenz von Cd 105 auf Endothelzellen (Gougos et al, 1988, Airas et al, 1995) wurde zusätzlich der Cd 106 (VCAM-1- Vascular cell adhesion molecule-1) (Klinz, et al., 2005; Schmidt, et al., 2006a; Schmidt, et al., 2006b) bestimmt, der im Normalfall bei Endothelzellen fehlt und nur bei entzündlichen Prozessen exprimiert wird (Osborn et al, 1989). Der verhältnismäßig geringe Anteil von MSCs an der Gesamtzellzahl (Pittenger, et al., 1999) sowie die altersabhängige Verringerung des Anteils von MSCs (Caplan, 2007), sind hinsichtlich des hohen durchschnittlichen Alters unserer Probanden von 64,5 Jahren, zu beachten. Der Nachweis der Plastizität der MSCs und die exemplarischen Ergebnisse der FACS-Analyse, mit einem durchschnittlichen Gehalt von 64,5 Prozent MSCs , deckten sich mit den Untersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Arnhold, et al., 2006; Klinz, et al., 2005). Die Heterogenität der MSC-Zellkultur wurde bereits von Vogel und Kollegen genauer betrachtet (Vogel, et al., 2003). Von vielen Arbeitsgruppen werden sie aufgrund der Heterogenität deshalb weiter gefasst, und als so genannte, stromalen Knochenmarkszellen, bezeichnet (Minguell, et al., 2001). Bezogen auf die vorliegende Arbeit müssen das Alter der Probanden und die unzureichenden Angaben der Medikation und/oder anderen Erkrankungen der Probanden, unter dem Aspekt der Mechanotransduktion, berücksichtigt werden. Mit dem Alter verändern sich Form und Größe von MSCs (Baxter, et al., 2004), welche zu einer gestörten (Jaalouk and Lammerding, 2009) oder veränderten Mechanotransduktion (Huang and Ingber, 2005; Meazzini, et al., 1998) führen kann. Des Weiteren konnte an MSC gezeigt werden, dass mit dem Alter der Probanden insbesondere die Reaktionsfähigkeit von Aktin auf mechanische Stimuli nachlässt und die Gefahr von Seneszenz erhöht wird (Kasper, et al., 2009). Dies ist ein wichtiger Punkt, der in Anbetracht des relativ hohen Durchschnittsalters der Probanden mit berücksichtigt werden muss. Da die durchgeführten Versuche von entsprechenden Kontrollen begleitet wurden, sind sie dennoch aussagekräftig.

Versuche an MSCs jüngerer Patienten, könnten aufgrund von altersspezifischen Sensitivitäten, zu abweichenden Wirkmaxima, bezogen auf die applizierten Dosen führen. Nach Kasper und Kollegen kann vermutet werden, dass MSCs jüngerer Probanden noch sensitiver auf mechanische Stimuli reagieren könnten. Aufgrund der sehr geringen Anzahl junger Probanden, können hier derzeit von uns keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Auch zeigen die Untersuchungen von Lohrer und Kollegen (Lohrer, et al.) , bei der Druck- und Stoßwellenapplikation altersabhängig unterschiedliche Ergebnisse. So zeigten sich bei den Studien von Lohrer et al. ein signifikant stärkeres Ansprechverhalten von Patienten > 50 Jahren auf die fokussierte, als auf die radiale SW. Neben den morphologischen Veränderungen der MSCs nach SW/DW-Behandlung, auf die später näher eingegangen wird, stellen der Zellabtrag und das Adhäsionsverhalten, wichtige Faktoren in der *in vitro*-Behandlung von MSCs bzw. Zellen allgemein dar.

4.2. Zellabtrag und Adhäsion (Fokale Adhäsion):

Der Zellabtrag stellt einen erstlimitierenden Faktor für alle *in vitro*-Beschallungen von Zellen dar. Es konnten dichteabhängige Zellabträge im Versuchsaufbau festgestellt werden. Wie von Mott und Helmke gezeigt wurde, sind die Reaktionen der Zellen zum Teil Konfluenzabhängig, welches sich in unseren Versuchen in dem Ausmaß der Zellabträge widerspiegelte (Mott and Helmke, 2007). Es konnten Zellverluste proportional zur Zelldichte in den durchgeführten Versuchen festgestellt werden. Es zeigten sich mikroskopisch ebenfalls, die von Mott und Helmke beschriebenen, gekräuselten Zellränder vermehrt bei dichten Zellmonolayern. Zellverluste durch Kavitation, die durch kreisrunde zellfreie Flächen charakterisiert waren (Ohl and Wolfrum, 2003), konnte über die Verwendung von teilentgastem Medium minimiert werden. Neben diesen beschriebenen Faktoren, wie zelldichteabhängige Veränderungen der einwirkenden Kräfte und kavitationsbedingter Zellabtrag, muss in diesem Zusammenhang die Adhäsion (Fokale Adhäsionen) näher betrachtet werden. Von Doyle und Lee (Doyle and Lee, 2005) wurden Veränderungen der Zelladhäsion im Kontext mit mechanosensitiven Ionenkanälen diskutiert.

Es konnten bei der Behandlung mit Piezoson 100 mit einer Energiedichte von $> 0,122 \text{ mJ/mm}^2$ ein verstärktes Adhäsionsverhalten der Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, mit dem Untergrund festgestellt werden. Die Zellen lösten sich sehr viel schlechter nach der Behandlung mit Accutase, als die unbeschallten Kontrollgruppen. Die stärker adhären Zellen, zeigten im Anschluss im Boyden Chamber Assay ein reduziertes Migrationsverhalten. Da mechanische Stimuli die Anzahl Fokaler Adhäsionen erhöhen und somit eine stärkere Bindung an die Extrazellulärmatrix bewirken können (Meazzini, et al., 1998; Wang, et al., 2005), sollte dies über GTPasen überprüft werden. Über Western Blot –Analyse auf Anti-Rac1/ Cdc42 konnten keine signifikanten Erhöhungen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden, was bedeuten könnte, dass nicht die Anzahl der Fokalen Adhäsionen entscheidend ist, sondern vielmehr deren Lokalisation, was in weiteren Untersuchungen überprüft werden sollte. Ebenfalls sollte die Aktivierung von Rac1/ Cdc42 in diesem Kontext untersucht werden. Da für das Adhäsionsverhalten der Zellen, die Zellen mit ihrem Aktin über Integrine mit der EZM verbunden sind und dort fokale Adhäsionen bilden (Meazzini, et al., 1998), wurden die Formation des Zytoskeletts in diesem Kontext näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es bei stärkerer Depolymerisierung des Aktins zu stärkeren Zellverlusten kam. Es scheint, als würde das gerichtete Aktin, eine stabilere Verbindung über Integrine mit der EZM eingehen (Turner and Pavalko, 1998). Eine sehr starke Korrelation konnte bei der DW-Behandlung verzeichnet werden. Es kam zu sehr hohen Zellverlusten bei gleichzeitig hohem Anteil depolymerisierter Aktinfasern unter DW-Behandlung. Dies wurde zuerst der rein mechanischen Wirkung der DW zugesprochen. Die aufgefangenen Zellen, sowie die verbleibenden Zellen waren jedoch im Vergleich zu den Versuchen von Gambihler (Gambihler, et al., 1990) vital. Die Rolle des Aktins soll im nachfolgenden Kapitel näher diskutiert werden. Als weiterer wichtiger Betrachtungsaspekt könnten die Erkenntnisse von Vetterkind zu unseren Ergebnissen hinzugezogen werden, der das Lösen der Zellen von ihren Fokalkontakten als erstes Zeichen des Absterbens der Zelle deutete (Vetterkind, et al., 2005). In unseren Betrachtungen haben wir neben der Apoptose auch die Zellalterung via Beta-Galaktosidase-Färbung untersucht, und konnten eine stark signifikante Erhöhung der Seneszenz über DW-Behandlung nachweisen.

Im Nachweis der Apoptose, die als das Resultat eines gestörten zellulären Gleichgewicht zwischen der Kontraktilität und Adhäsion der Zelle gedeutet werden kann (Kuo, et al., 2003), zeigten sich jedoch keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle. Bei hohen Energiedichten konnten jedoch stark erhöhte Anteile von 7-AAD-gefärbten Zellkernen, die als Avitalitätskennzeichen dienten, festgestellt werden.

4.3. DW/SW-bedingte Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts:

4.3.1. Formation des Aktinzytoskelett

Die Aktinzytoskelettformationsänderung durch Stoß- bzw. Druckwellenbehandlung wurde bereits im Kontext fokaler Adhäsionen und des Zellabtrags diskutiert. Da die Zytoskelettformation des Aktins jedoch auch maßgeblich an dem Bewegungs- und Migrationsverhalten von Zellen und an weiteren zellbiologischen Prozessen wie Apoptose beteiligt ist, sollten stoß- bzw. druckwellenabhängige Veränderung des Zytoskeletts in diesem Zusammenhang untersucht werden. Hierzu wurden zeit- und dosisabhängige Untersuchungen der Organisation der Aktinfasern einschließlich des Depolymerisierungsanteils der Fasern nach DW/SW-Applikation durchgeführt. Es zeigten sich bei den Versuchen mit Piezoson 100 (Wolf, Knittlingen, Deutschland) stark zeitabhängige Veränderungen der Organisation des Zytoskeletts bei der Behandlung mit $0,077\text{mJ/mm}^2$. Direkt nach Beschallung kam es zu einer Reduzierung des Anteils gerichteter Fasern von $41,63\pm 13,17\%$ auf $35,60\pm 10,73\%$. Nach 30 Minuten richteten sich die Fasern der identisch beschallten Zellen jedoch so stark aus, so dass ein prozentualer Anteil von $76,28\pm 5,38\%$ gerichtet war. Der Effekt war bereits nach 60 Minuten rückläufig ($66,12\pm 8,19\%$). Dies führte dazu, dass ein allgemeines Schemata festgelegt wurde, bei dem die Fasern zum Zeitpunkt t_0 , also direkt nach Beschallung, und zum Zeitpunkt t_1 , 30 min nach Beschallung, observiert wurden. Des Weiteren wurde die MSCs vor der Behandlung auf zytoskelettäre Veränderung untersucht, da Veränderungen des Zytoskeletts durch eine Veränderte Reiz-Reaktion-Antwort (Meazzini, et al., 1998) und veränderter Genexpression (Ingber and Folkman, 1989), die Versuche maßgeblich mitbeeinflussen bzw. verfälschen könnten.

Zelldichteabhängigen Veränderungen der Zellreaktionen (Mott and Helmke, 2007) wurde durch Auswahl identischer Konfluenzen ebenfalls Rechnung getragen. Die altersabhängige Verringerung der Dynamik des Zytoskeletts (Kasper, et al., 2009) konnte aufgrund der Auswahl möglichst gleichaltriger Patienten vernachlässigt werden. Die Behandlung mit 0,5 bar (Swiss Dolor Clast - EMS) sowie $0,077\text{mJ/mm}^2$ (Piezoson 100- Wolf) zeigte zum Zeitpunkt t_0 eine signifikante Erniedrigung des Anteils gerichteter Fasern im Vergleich zur Kontrolle. Einen gegenteiligen Effekt erzielte die Schallung mit $0,173\text{ mJ/mm}^2$ (Piezoson 100-Wolf). Untersuchungen zum Zeitpunkt t_1 , zeigten bei allen drei Beschallungen eine signifikante Erhöhung des Anteils gerichteter Fasern im Vergleich zur Kontrolle, mit höchstem Zuwachs bei DW-Behandlung mit 0,5 bar (Swiss Dolor Clast - EMS). Die zeit- und dosisabhängigen Beeinflussungen des Aktinzytoskeletts decken sich mit den Erkenntnissen anderer Gruppen, die zeigten, dass mechanosensitive Effektorsysteme zeitabhängig aktiviert werden (Banes, et al., 1995; Jones, et al., 1995), sie unterschiedlich sensitiv reagieren (Barakat and Davies, 1998) und sich die Wirkungen der verschiedenen Effektoren überlappen oder auch überkreuzen (Jaalouk and Lammerding, 2009) und dann zu unterschiedlichen Zellreaktionen führen können. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der mechanische Stressor „SW/DW“ zu einer Umorganisationen des Zytoskeletts führt und es in Folge zu Zellformveränderungen kommt (Sims, et al., 1992), die im Falle der Behandlung mit 0,5 bar und $0,077\text{mJ/mm}^2$ zu temporär divergenten Ergebnissen führte. Weitere Versuche wurden mit der fokussierten und radialen Einheit des Storz Duolith SD1 durchgeführt. Geschallt wurde mit 1 bar, 1,4bar sowie $0,2\text{mJ/mm}^2$ und $0,3\text{mJ/mm}^2$. Alle MSCs zeigten zum Zeitpunkt t_0 eine Reduzierung der gerichteten Fasern im Vergleich zur Kontrolle, es konnten jedoch keine temporär divergenten Ergebnisse zum Zeitpunkt t_1 , mit Ausnahme der Beschallung mit $0,2\text{mJ/mm}^2$, festgestellt werden. Veränderungen der Stressfaserformation sind also entscheidend von der applizierten Dosis sowie des Zeitpunktes der Observation abhängig. Energiedichteabhängig kann es zu einer Irreversibilität der Formation, zumindest innerhalb der ersten 30 Minuten, kommen. Untersuchungen über einen längeren Beobachtungszeitraum, wurden in den von uns durchgeführten Versuchen, nicht erfasst.

Gerichtete Fasern sollen die Migration der Zellen erhöhen (Kreis and Birchmeier, 1980) oder wie eine Art Ruder wirken, die die Längsachse der Zelle bestimmen und die Bewegungsrichtung vorgibt (Rid, et al., 2005). Da SW/DW-Applikation bei MSCs zu einer signifikanten Beeinflussung des Aktinzytoskeletts führt, sollen in diesem Zusammenhang die Lokomotion und Zellmigration von MSCs untersucht werden. Von entscheidender Bedeutung waren jedoch nicht nur der Anteil an gerichteten Aktinfasern, sondern auch der Anteil an depolymerisierten Fasern, deren Verhältnis entscheidend für die Lokomotion ist und maßgeblich von Scherkräften (Cipolla, et al., 2002; Morita, et al., 1994) mit beeinflusst wird.

4.3.2. Depolymerisierung des Aktinzytoskeletts

Alle Beschallungen zum Zeitpunkt t_0 sowie t_1 zeigten eine signifikante Erhöhung des Anteils depolymerisierter Fasern, mit Ausnahme der Beschallung mit 1 bar. Die gesamten Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen, die beschreiben, dass es unter Scherkräften zu einer Umwandlung von filamentösen in „inaktives“ glomeruläres Aktin (Morita, et al., 1994) kommen kann. Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass sich diese Dosis-Wirkungsbeziehungen lediglich auf die *in vitro* Behandlungen von MSCs beziehen und sie sich nicht auf andere Zelltypen übertragen lassen (Smits, et al., 1991) oder mit *in vivo* Bedingungen (Kochanski, et al., 2001) verglichen werden können. Des Weiteren könnte es bei der Verwendung von MSCs jüngerer (< 64,5 Jahre) Probanden zu einer Verschiebung der Effekte bei den eingesetzten Energiedichten kommen, da sich die Mechanosensibilität des Aktins altersabhängig verändert und mit dem Alter der Probanden die Reaktionsfähigkeit von Aktin auf mechanische Stimuli nachlässt (Kasper, et al., 2009). Da RHO-GTPasen maßgeblich an der Formation von Aktinstressfasern beteiligt sein sollen (Giry, et al., 1995; Paterson, et al., 1990), wurden diese Erkenntnisse im Western Blot untersucht, welche jedoch keine quantitativen Veränderungen zeigten. Eine genauere Aussage könnte jedoch die Untersuchung der Aktivitäten und der Verteilung der RHO-GTPasen ergeben.

Da Zytoskelettveränderungen des weiteren eine Veränderung der Genexpression bedingen (Ingber and Folkman, 1989) und die Wirkung von Aktin auf mechanosensitive Ionenkanäle und auf den Ca^{2+} -Einstrom bekannt sind, welche sich in vielerlei Zellreaktionen wie Lokomotion und Zellmigration (Doyle and Lee, 2005; Munevar, et al., 2004) äußern, sollte das Korrelationsverhalten zwischen der DW/SW-Applikation, Aktinformation und Migration- und Lokomotionsverhalten von MSCs untersucht werden.

4.4. Untersuchung der Lokomotion von MSCs mittels Zelltracking:

Da SW/DW-Applikationen zu signifikanten Veränderungen der zytoskelettären Strukturen von MSCs führt, und diese maßgeblich am Bewegungsverhalten von MSCs beteiligt sind, wurde die Lokomotion von MSCs unter SW/DW-Applikation näher untersucht. Die Zellbewegung ist Voraussetzung für das Migrationsverhalten von Zellen. Die Zellbewegung gliedert sich ein Prozess bei dem durch Extension die Lamellopodien in kranialer Richtung, nach vorne gestreckt werden (Ananthakrishnan and Ehrlicher, 2007). Dieser Prozess wird über die Aktinpolymerisation vermittelt (Pollard, et al., 2000). Danach kommt es zu einer neuen Adhäsion des Zellkörpers mit dem Untergrund in Bewegungsrichtung. Der Zellkörper bewegt sich nach vorne und es kommt zur anschließenden De-adhäsion des kaudalen Zellpols. Für die Fortbewegung der Zellen sind somit die Fokalen Komplexe (Nobes and Hall, 1995) bzw. die stabileren Fokalen Adhäsionen (Rottner, et al., 1999) von entscheidender Bedeutung, ebenfalls wie die Ausrichtung der Aktinfasern. Die kontraktile Kraft der Zellmigration wird über Myosin II vermittelt, welche vor allem für den letzten Schritt der Translokation von entscheidender Bedeutung ist (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Mitchison and Cramer, 1996). Die Auswertung der Lokomotion von MSCs zeigten bei allen Behandlungsparametern signifikante Veränderungen in der Zellkinetik. Schallungen unterschiedlichen Beschallungsparameter mit radialen sowohl fokussierten Einheit, führten zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit der Zellbewegung und der zurückgelegten Strecke. Die Analyse der zurückgelegten Strecke zum Ausgangspunkt wurde ebenfalls analysiert- eine qualitative Wertung der Daten ist jedoch nicht sehr aussagekräftig, da Zellen im Nativverbund anderer Zellen verwendet wurden und Aussagen über Bewegungsqualitäten dementsprechend schwierig zu treffen sind.

In weiterführenden Experimenten mit Chemo-/Zytokinen in Anlehnung an Schmidt et al. (Schmidt, et al., 2006a), könnten Aussagen über stoßwelleninduziertes Chemotaxisverhalten und qualitative Aussagen über Bewegungen getroffen werden. Die Ergebnisse des Zelltrackingassays decken sich nicht vollständig mit den Ergebnissen der Migrationsassays, auf die im folgenden noch näher eingegangen wird, und zeigen vielmehr ein undifferenziertes und konditionsunabhängiges Ansprechverhalten auf den mechanischen Reiz der Stoßwelle. Somit scheinen die zellkinetischen Aspekte des Zelltrackingassays nicht genügend detaillierte und differenzierte Aussagen über Dosis-Wirkungsbeziehungen von SW/DW zu liefern, dass die Anwendung von Migrationsassays angezeigt ist.

4.5. Migration von MSCs in Abhängigkeit der DW/SW-Behandlung und des F-Aktinzytoskeletts:

Stressfasern sollen die Migration der Zellen erhöhen (Kreis and Birchmeier, 1980) oder wie eine Art Ruder wirken, die die Längsachse der Zelle bestimmen und die Bewegungsrichtung vorgeben (Rid, et al., 2005). Die Auswirkung von DW/SW-Behandlung und/oder Aktinzytoskelettformation, sollten über Boyden Chamber Assay und Wundheilungsassay überprüft werden.

4.5.1. Nachweis der Migration mittels Boyden Chamber Assay

Um die Auswirkungen der Behandlungsparameter auf das Migrationsverhalten der Zellen besser zu verstehen, wurden Behandlungsinterventionen mit einer Gesamtimpulsanzahl von 500 oder 1000 Impulsen, einer Wiederholungsfrequenz von 2Hz oder 4Hz sowie Energiedichten von $0,048\text{mJ/mm}^2$ bis $0,238\text{mJ/mm}^2$ (Piezoson 100, Wolf) variiert. Die Migrationsrate im Boyden Chamber Assay wurde von der Energiedichte, der Gesamtimpulsanzahl und der Wiederholungsfrequenz maßgeblich beeinflusst. Es konnte sowohl erhöhte als auch erniedrigte Migrationsraten bei unterschiedlicher Parameterkonstellation festgestellt werden.

Unter diesem Aspekt sind die Gesamtenergiemengen (Energiedichte x Impulse) (Kalesar Johannes, et al., 1994), sowie die direkten und indirekten Wirkungen (Kavitation) der SW zu berücksichtigen (Gerdesmeyer, et al., 2002; Ogden, et al., 2001b), wobei bekannt ist, dass Kavitationseffekte bei höheren Frequenzen zunehmen (Huber, et al., 1998). Es konnten die Erkenntnisse von Martini und Kollegen, die der Gesamtimpulszahl eine weniger entscheidende Rolle bei den biologischen Effekten zusprachen, nicht zugestimmt werden (Martini, et al., 2003a; Martini, et al., 2003b), da die Gesamtimpulsanzahl bei den von uns durchgeführten Versuchen die Ergebnisse maßgeblich mitbestimmten und es zu stark divergenten Ergebnissen in Abhängigkeit der Gesamtimpulsanzahlen (500/1000 Impulse) kam. Ebenfalls konnte die pauschalisierte Aussage, dass geringere Impulsanzahlen zu stärkeren Wirkungen führe (Kusnierczak, et al., 2000), nicht nachvollzogen werden, da es nach unseren Ergebnissen zu einer kumulativen Wirkung aller drei Parametern kommt. Die Wirkmaxima der SW lag bei $0,048\text{mJ/mm}^2$, $0,077\text{mJ/mm}^2$ und $0,238\text{mJ/mm}^2$, welche jeweils von den beiden anderen Parametern mitbestimmt wurden (Piezoson100, Wolf). In Abhängigkeit der Gesamtimpulsanzahl und Wiederholungsfrequenz, zeigten sich sowohl signifikante Erniedrigungen als auch Erhöhungen der Migrationsrate der MSCs. Die aussagekräftigsten Ergebnisse ergaben sich bei Beschallungsintervention mit 1000 Impulsen, so dass weitere Versuche unter diesen Konditionen untersucht wurden. Die Untersuchungen der Migration nach DW Applikation mit dem EMS-Gerät mit 1000 Impulsen und einer Wiederholungsfrequenz von 2Hz und 4Hz, zeigten ein Wirkmaximum mit 4 Hz bei 0,5 bar und 0,75 bar, und sehr unspezifische signifikante Erhöhungen der Migration bei fast allen Energiestufen mit 2Hz. Vergleicht man die Ergebnisse des Piezoson 100 (Wolf) und dem Dolor Clast (EMS) mit den Ergebnissen des Medical Duolith SD1 (Storz), so sind diese sehr divergent. Die radiale DW (Storz) zeigt bei 1 bar, 1,2 bar und 1,4 bar signifikante Erniedrigungen der Migration, ebenfalls die fokussierte SW (Storz) mit $0,07\text{mJ/mm}^2$ und $0,3\text{mJ/mm}^2$. Eine signifikante Erhöhung der Migration lag bei $0,2\text{mJ/mm}^2$. Die Wirkunterschiede verschiedener SW-Geräte (Martini, et al., 2006; Smith, et al., 1992) wurde bereits belegt und die Generierungsmechanismen scheinen eine entscheidende Rolle bei biologischen Antworten zu spielen.

Das elektromagnetischen System von Storz zeigt charakteristisch für dieses System, eine stärkere Varianz in den einzelnen Impulsen bei der Generierung, als beim Piezoelektrischen System, welches die unterschiedlichen Wirkungen erklären könnte. Bei der DW-Applikation könnte der unterschiedliche Aufsatz, die Versuchsergebnisse maßgeblich beeinflusst haben. Vergleicht man die Ergebnisse des Boyden Chamber Assay mit der Zytoskelettformation, so zeigen sich Korrelationen zwischen beiden Ergebnissen. Die Schallungen, die zur signifikanten Erhöhung der gerichteten Fasern führen, zeigen ebenfalls signifikant erhöhte Migrationsraten im Boyden Chamber Assay (EMS: 0,5 bar; Wolf: 0,077mJ/mm²; Storz: 0,2mJ/mm²). Die selbe Korrelation bestand bei der signifikanten Erniedrigung des Anteils gerichteter Fasern, die zu einer signifikanten Erniedrigung der Migrationsrate führte (Storz: 1 bar; 1,4bar; 0,3mJ/mm²) und deckt sich somit mit den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen (Kreis and Birchmeier, 1980; Rid, et al., 2005). Die Depolymerisierung der Fasern hatte jedoch keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten.

4.5.2. Nachweis der Migration mittels Wundheilungsassay

Als weiterer Migrationsassay wurde der Wundheilungsassay (Wound and Healing) durchgeführt, dieser unterscheidet sich maßgeblich vom Boyden Chamber Assay. Die Unterschiede zeigen sich bei der Schallung und in der Versuchsdurchführung. Obwohl mit den selben Parametern geschallt wurde, variierte die Konfluenz der Zellenmonolayer, aufgrund der Versuchsanforderungen, maßgeblich. Nach Mott und Helmke (Mott and Helmke, 2007), zeigen sich zytoskelettäre Veränderungen zelldichteabhängig und einwirkende Reize bewirken je nach Zelldichte unterschiedlichen Effekte. Des Weiteren zeigt die Versuchsdurchführung ebenfalls einige Unterschiede, die die Versuchsergebnisse maßgeblich mit beeinflussen. Nach Jaalouk und Lammerting (Jaalouk and Lammerding, 2009) wirken sich mechanische Reize über verschiedene Zielstrukturen modifizierend auf die Zellen aus. Diese Strukturen befinden sich an den Zellen selbst oder aber werden durch Zell-Zell-Kontakte (Cell-Cell-Adhäsionskomplexe) sowie Zell-Matrix-Kontakte vermittelt. Vergleicht man nun den Versuchsaufbau des Boyden Chamber Assays mit dem des Wundheilungsassays, so zeigen sich wesentliche Unterschiede bei beiden Assays.

Beim Wundheilungsassays bestehen die Zell-Zell-Kontakte über den kompletten Versuch hindurch, ebenfalls werden die Zellen nicht vom Untergrund gelöst, auf dem sie sich befinden. Die Zellen für den Boyden Chamber Assay werden hingegen enzymatisch, sowohl vom Untergrund, als auch ihren interzellulären Kontakten gelöst. Die Accutase modifiziert dabei maßgeblich die zytoskelläre Struktur nach der SW/DW-Behandlung. Vergleicht man die Ergebnisse der Zytoskelettformation und des Boyden Chamber Assays mit denen des Wundheilungsassays, so zeigen sich für die verschiedenen Energiestufen divergente Resultate. Für den Erhalt von reproduzierbaren Ergebnissen im Wundheilungsassay wurde darauf geachtet, dass die Größe der Wundfläche möglichst identisch war und es zu keinen Wallbildungen von Zellen an der Wundrändern kam, da diese das migrieren in die Wundfläche behindern könnten. Bei SW-Applikation mit $0,2\text{mJ/mm}^2$ kommt es sowohl zu einer signifikanten Erhöhung der Faserformation, als auch der Migrationsrate im Boyden Chamber Assay und einer signifikanten Erniedrigung der Wundverschlusszeit, so dass sich die Ergebnisse an dieser Stelle decken. Bei einer Behandlung mit $0,15\text{mJ/mm}^2$ kommt es jedoch zu divergenten Ergebnissen im Boyden Chamber Assay und Wundheilungsassay. Kam es im Boyden Chamber Assay zu einer Erhöhung der Migrationsrate, so zeigte sich im Wundheilungsassay eine signifikante Verschlechterung des Wundverschlusses. Gründe hierfür liegen zum einen in den unterschiedlichen Assays und damit verbunden in den unterschiedlichen Mechanotransduktionsmechanismen, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll. Es bestehen wesentliche Unterschiede in beiden Assays, so müssen die Zellen für den Boyden Chamber Assay abgelöst werden, wodurch eine weitere Modulation des Zytoskeletts erfolgt und Zytoskelettformationen (Morita, et al., 1994) nach SW-Schallung behindert werden können oder sich störend auf die Signalweiterleitung auswirken könnte. Mechanische Stimuli erhöhen die Akkumulationen von mechanosensitiven Zytoskelettassoziierten Proteinen am Applikationsort (Rychly, et al., 1998) und die Anzahl Fokalen Adhäsionen wird erhöht, so dass eine stärkere Bindung an die Extrazellulärmatrix entsteht (Meazzini, et al., 1998).

Die Zytoskelettveränderungen bedingen des weiteren eine Veränderung der Genexpression (Ingber and Folkman, 1989). Die interzellulären Verbindungen von benachbarten Zellen sind für die Mechanotransduktion ein wichtiger Faktor (Chen, et al., 2004), über die mechanische Signale weitergeleitet oder umgewandelt werden (Tarbell, et al., 2005). Im Wound and Healing Assay bestehen die interzellulären Verbindungen im kompletten Versuchsablauf, bei Boyden Chamber Assay werden diese Verbindungen gelöst und die Einzelzellen werden auf die Migrationsfilter gegeben. Ein weiterer Einflussfaktor stellt die Proliferationsrate dar, welche aufgrund ihrer raumfordernden Prozesse die Ergebnisse des Wundheilungsassay maßgeblich beeinflusst. Aufgrund der unterschiedlichen Konfluenz bei der Beschallung der Zellen für den Boyden Chamber Assay und Wundheilungsassay, verändern sich die *in vitro* Bedingungen (Mott and Helmke, 2007) während der Schallung, obwohl ansonsten dieselben Parameter (Frequenz, Energiedichten und Gesamtimpulsanzahl) gewählt wurden. Da neben den bereits beschriebenen Faktoren unter anderem die unterschiedlichen Zeiträume der Betrachtung und Einwirkung der SW/DW eine Rolle spielen und bei der Mechanotransduktion verschiedene Effektoren zeitlich und dosisabhängig divergent beteiligt sind, könnte diese die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Ein Einfluss von durch SW/DW-induzierten Chemo-/Zytokinen kann vernachlässigt werden, da in beiden Assays die Schallungsmedien durch frisches und unkonditioniertes Medium ersetzt wurde. Da beim Boyden Chamber Assay des Weiteren die raumfordernden Prozesse durch Proliferation der Zellen die Ergebnisse entscheidend mit beeinflussen, sollten nunmehr die Effekte der DW/SW-Applikation auf die Wachstumsrate und die Proliferation der Zellen untersucht werden, um unter anderem die Ergebnisse der Wundheilungsassays besser deuten zu können.

4.6. Nachweis der Proliferation, Wachstum und Vitalität von MSCs:

Um den Einfluss der Proliferation-assozierten Effekte der SW/DW-Applikation an dem Ergebnis der Wundheilungsassays quantifizieren zu können, wurde die Proliferation und die Wachstumsrate von MSCs in Abhängigkeit der SW/DW-Behandlung bestimmt. Des Weiteren war der Einfluss der SW/DW-Applikation unter dem Gesichtspunkt der Vitalität von besonderem Interesse.

Für die Versuche wurden ausschließlich vitale Zellen (Weil, et al., 2009) verwendet, die für die Proliferation mittels des Proliferationsmarkers Ki-67 (Heidebrecht, et al., 1996; Traut, et al., 1998) untersucht wurden. Da sich zeitabhängige Veränderungen nach SW/DW-Applikation ergaben, wurden die Zeitintervalle der Observation nach einer Reihe von Vorversuchen auf 6h und 12h nach SW/DW-Behandlung festgelegt. Die Behandlung mit dem Swiss Dolor Clast von EMS zeigte 6h und 12h nach der Behandlung mit 0,5 bar Erniedrigungen der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollen, die eine Proliferationsrate von 56,79% und 59,42% aufwiesen. Die Proliferationsraten der nativen, unbehandelten MSCs deckten sich mit den Untersuchungen der Proliferationsraten anderer Arbeitsgruppen (Arnhold, et al., 2006; Schmidt, et al., 2009), die Proliferationsraten von 20-60% beschrieben. Bei der Behandlung mit dem Piezoson 100 konnten sowohl signifikante Erhöhungen der Proliferation bei Behandlung mit $0,077\text{mJ/mm}^2$, als auch signifikant entgegengesetzte Wirkungen bei der Behandlung mit $0,122\text{mJ/mm}^2$ zu beiden Zeitpunkten festgestellt werden. Dies weist auf eine eindeutige Dosiswirkungsbeziehung bei Zellen hin, die bezogen auf therapeutische Intervention in jedem Fall berücksichtigt werden sollte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden weitere Untersuchungen mit der radialen Einheit des Kombinationsgerätes von Storz durchgeführt, deren Beschallung mit 1 bar und 1,4bar zu beiden Zeitpunkten eine signifikant erhöhte Proliferationsrate zeigte. Die fokussierte SW-Behandlung zeigte energiedichte- und zeitabhängig divergente Ergebnisse. Die Proliferationsrate erhöhte sich signifikant bei SW Behandlung mit $0,2\text{mJ/mm}^2$ zu beiden Zeitpunkten, wohingegen die SW Behandlung mit $0,3\text{mJ/mm}^2$ temporär divergente Ergebnisse bei 6h und 12h ergab. Die Proliferation war nach 6 h erhöht, nach weiteren 6 h kam es zu einer signifikanten Erniedrigung der Proliferationsrate auf 27,67%. Die Ergebnisse von Storz verdeutlichen somit des Weiteren, dass zu der Dosis-Wirkungsbeziehung ebenfalls der gewählte Zeitfaktor der Observation, die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen. Der Zeitfaktor, aber auch die entscheidende Rolle der Extrazellulärmatrix für das Proliferationsverhalten (Ingber and Folkman, 1989) und somit auch der Matrix *in vitro*, die in den verschiedenen Versuchsaufbauten anderer Arbeitsgruppen (Jones, et al., 1992; Renz and Rupp, 2009) variieren, stellt ein Problem für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Arbeitsgruppen dar.

Da die Extrazellulärmatrix sowie die Zell-Matrix-Verbindung bei der Mechanotransduktion eine entscheidende Rolle spielt, und die Bedingungen beim Wundheilungsassay und Boyden Chamber Assay sich diesbezüglich unterscheiden, könnte diese für die divergenten Ergebnisse verantwortlich gemacht werden. Unter diesem Aspekt soll auch auf Arbeiten von Guilak verwiesen werden, die zeigten, dass es bei Versuchen mit Knorpelzellen durch mechanische Reize zu einer verminderten Synthese der Komponenten der Extrazellulärmatrix kam (Guilak, et al., 2004). Sollte es zu Veränderungen der Extrazellulärmatrix kommen, könnte dies bei einer Repetition der Schallung ebenfalls zu einer Änderung der Versuchsergebnisse führen. Dies sollte unter dem Aspekt, dass therapeutische Interventionen *in vivo* normalerweise repetitiv erfolgen, berücksichtigt werden. Die Ergebnisse der Wachstumassays deckten sich mit den Ergebnissen der Proliferationsassays. Da für die Beurteilung der Zellpopulation jedoch auch der Anteil der apoptotischen Zellen eine entscheidende Rolle spielt, wurde auch dieser Prozentsatz quantifiziert.

4.7. Nachweis der Apoptose von MSCs:

Unter dem Gesichtspunkt der mechanotransduzierenden Wirkung auf und über das Aktin-Zytoskelett sowie die Proliferation, welches in vorliegender Arbeit bereits beschrieben wurde, wurde ebenfalls den mechanotransduzierenden Effekt der SW/DW auf die Apoptose untersucht. Die mechanisch induzierte Apoptose wurde bereits von Kearney und Kollegen (Kearney, et al., 2008) untersucht, ebenfalls sind die proapoptotischen Wirkungen von SW auf Tumorzellen bekannt (Kato, et al., 2000). Das Zytoskelett spielt eine aktive Rolle in der Apoptose (Mills, et al., 1999), markante Umorganisationen des Aktins, mit dem Lösen der Zellen von ihren Fokalkontakten und anschließenden Zusammenziehen, kann ein erstes Anzeichen für ein beginnendes Absterben der Zellen sein (Vetterkind, et al., 2005). Die Rolle des Aktins bei der Apoptose ist durch das Gift Jasplakinolide hinreichend bekannt (Celeste Morley, et al., 2003; White, et al., 2001) bei dem es durch Inhibition der Aktin-Dynamik zur Auslösung der Apoptose kommt.

Des Weiteren führt die Inhibition der Aktin-Polymerisierung durch Cytochalasin D zu einer Verringerung der Apoptose (Ailenberg and Silverman, 2003; Suarez-Huerta, et al., 2000), kann aber bei irreversiblen Schädigung durch Cytochalasin auch zur Apoptose führen (White, et al., 2001; Yamazaki, et al., 2000). Die Rolle bzw. Aktivierung der Fas-Rezeptoren konnte bei Cytochalasin beobachtet werden (Kulms, et al., 2002) und scheint somit im Zusammenhang mit der Apoptose zu stehen. Die zytoskelettassoziierte Apoptose ist weitestgehend unklar, die Rolle des Proteins Bcl-2 modifying factor (Bmf) ist in diesem Zusammenhang von Puthalakath et al. untersucht und bestätigt worden (Puthalakath, et al., 2001). Ein möglicher Transmitter zwischen dem Aktinfilamentsystem und dem apoptotischen Geschehen stellt das „Prostate apoptosis response-4“ (Kurz: Par-4) dar (Abb. 72) (Vetterkind, et al., 2005).

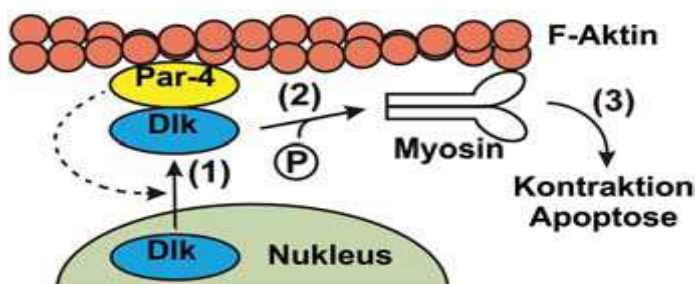


Abb.72: Modell der Par-4/DLK-induzierten Apoptose

Par-4 dirigiert DLK zum Aktin-Zytoskelett. Für die apoptotische Wirkung von DLK ist eine Translokation in das Zytoplasma (gestrichelte Linie) und eine Par-4 vermittelte Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett (1) Voraussetzung. Es kommt zur DLK-vermittelten Phosphorylierung (2) von zum Beispiel MLC, welches über eine Aktomyosin-Kontraktion zur Apoptose führt (3). (Preuss, Biospektrum, 2005).

Par-4 wurde von Sells und Kollegen bei der Untersuchung von Prostatakarzinomzellen gefunden, die bei der Induktion der Apoptose hochreguliert waren (Sells, et al., 1994). Die Verbindung von Par-4 mit dem Aktin Zytoskelett, ist für die Par-4/ Dlk-vermittelte Apoptose von entscheidender Bedeutung (Vetterkind, et al., 2005). Die genauen Wirkweisen der Par-4 vermittelten Apoptose sind weitgehend unklar, es werden aber proliferationsfördernde und antiapoptotische Signale unterdrückt (Diaz-Meco, et al., 1996) und die Zellen werden über Par-4 für apoptotische Stimuli sensibilisiert (Boehrer, et al., 2002a; Boehrer, et al., 2002b; Camandola and Mattson, 2000; Sells, et al., 1994).

Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen signifikant veränderte Apoptoseraten, bei der Behandlung mit dem Wolf Piezoson 100 und dem EMS Swiss Dolor Clast. Bei der Applikation von $0,077\text{mJ/mm}^2$ und $0,5\text{ bar}$ zeigte sich nach 6h eine signifikante Erhöhung der Apoptose und nach 12 h eine signifikante Erniedrigung der Apoptose im Vergleich zur Kontrolle. Die Applikation von $0,122\text{mJ/mm}^2$ zeigte sowohl nach 6h, als auch nach 12h eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der F-Aktinzytoskelettformation, so zeigt sich bei der ersten Messung des F-Aktinzytoskellets ein signifikant erniedrigter Anteil gerichteten Fasern bei $0,5\text{ bar}$ und $0,077\text{mJ/mm}^2$, sowie eine erhöhter Anteil mit einer Energiedichte $> 0,122\text{mJ/mm}^2$. Die zweite Messung zeigte bei allen Beschallungen eine signifikant stärkere Ausrichtung der F-Aktinfasern, so dass hier eine Korrelation zwischen der Dynamik der Faserformation und der Apoptose bestehen könnte, welche sich mit den Beobachtungen anderer Gruppen deckt (Vetterkind, et al., 2005). Untersuchungen mit der radialen Einheit des Storz Medical Duolith zeigen zu beiden Zeitpunkten, eine signifikante Erniedrigung des Ausrichtungsverhalten der F-Aktinfasern, im Gegensatz zu Beschallung mit der fokussierten Einheit, bei er es bei beiden Energiedichten ($0,2$ und $0,3\text{ mJ/mm}^2$) zum Zeitpunkt t_0 zu einem signifikant reduzierten Anteils gerichteter Fasern kommt, welcher bei $0,3\text{ mJ/mm}^2$ bis zum Zeitpunkt t_1 reicht und sich bei $0,2\text{ mJ/mm}^2$ zum Zeitpunkt t_1 zu einer signifikanten Erniedrigung der Formation wandelt. Auch hier korreliert die Formation mit der Apoptoserate der Zellen und zeigt bei stärkerer Formation eine geringere Apoptoserate. Selbiges Verhalten konnte auch bei der Beschallung mit 1 bar und $1,4\text{ bar}$ festgehalten werden, bei denen die Veränderungen bei 1 bar jedoch nicht signifikant waren. Weitere Untersuchungen, der zytoskelettassoziierten Apoptose und deren beschriebenen Signalwege in diesem Kontext, könnten helfen die mechanistischen Zusammenhänge zu klären. Um eine genauere Beurteilung der zellbiologischen Prozesse nach SW/DW-Applikation treffen zu können, sollten neben der Apoptose auch die Beeinflussung der Zellalterung von MSCs in Abhängigkeit der Behandlungen untersucht werden.

4.8. Nachweis der Seneszenz von MSCs

Da sich Alterungsprozesse sowohl in der Morphologie der Zellen, aber auch in der Aktivität der Beta-Galaktosidase zeigen, (Cristofalo, et al., 1998; Goldstein, 1990; Katsube, et al., 2008; Linskens, et al., 1995; Sherwood, et al., 1988; Stenderup, et al., 2003), wurde die Beta-Galaktosidase unter diesem Gesichtspunkt via Beta-Galaktosidase Färbung (Dimri, et al., 1995) untersucht. Die Ergebnisse der Beta-Galaktosidase Färbung weisen ausschließlich signifikant erhöhte Aktivitäten der Beta-Galaktosidase über DW-Applikation mit 1,4bar auf. Höhere Energiedichten waren aufgrund des sehr hohen Zellabtrages technisch gesehen leider nicht möglich. Die Applikation mit 1,4bar senkte des Weiteren signifikant die Migrationsrate im Boyden Chamber Assay und war verbunden mit einer signifikant erhöhten Anteils depolymerisierter F-Aktinfasern. Sie führte ebenfalls zu sehr starken Zellverlusten, die Wundheilungsassays unmöglich machte. Nach derzeitigen Erkenntnissen könnte das Lösen der Zellen von ihren Fokalkontakten mit anschließendem Zusammenziehen der Zellen, auf eine in Gang gesetzte Apoptose (Vetterkind, et al., 2005), oder aber vielleicht auch auf Seneszenz schließen lassen. Diese Effekte könnten therapeutisch in der Krebszelltherapie ausgenutzt werden. Um abschließende Aussagen über das Seneszenzverhalten von DW-behandelten Zellen treffen zu können, scheint es unerlässlich die Telomere bzw. Telomerlängen in diesem Zusammenhang zu untersuchen. Des Weiteren konnte durch die Durchführung der Beta-Galaktosidase-Färbung, die Qualität der (Kontroll-) MSCs nochmals belegt werden, bei denen so gut wie keine seneszenten Zellen detektierbar waren und somit durch das Behandlungsprozedere nicht in Mitleidenschaft gezogen wurden.

4.9. Ergebnisse radiale DW versus fokussierte SW

Humane mesenchymale Stammzellen (MSCs) verhalten sich mechanosensitiv für SW/DW-Applikation. Hinsichtlich der Art und Weise der einwirkenden mechanischen Kräfte reagieren MSCs sehr divergent (Park, et al., 2004). Dies konnte ebenfalls mit den vorliegenden Versuchsergebnissen unterstrichen werden. Es wurden unterschiedliche Ergebnisse zwischen allen vier Beschallungsquellen festgestellt, was auch bereits von anderen Arbeitsgruppen festgestellt werden konnte (Lohrer, et al., ; Martini, et al., 2006; Smith, et al., 1992). Ebenfalls wurden zeit- und dosisabhängige Veränderungen von MSCs in Abhängigkeit der SW/DW-Applikation festgestellt. Die dosisabhängigen Ergebnisse lassen sich zum Teil über Wirkmaxima erklären, die beim Überschreiten zu einem gegenteiligen Effekt führen. Es muss auch berücksichtigt werden, dass die mechanischen Stimuli verschiedene Effektorsysteme der Zelle aktivieren, und dass eine zeitliche Reihenfolge bei der Signaltransduktion besteht (Banes, et al., 1995; Jones, et al., 1995). Mechanotransduktion entfaltet Ihre Wirkung meistens über mehrere Effektoren, die sich überlappen oder auch überkreuzen können (Jaalouk and Lammerding, 2009), was die unterschiedlichen Effekte erklären könnte, die bei den verschiedenen Energiestufen zu beobachten waren. Es sind ebenfalls Dosis-Wirkungsbeziehungen zu erkennen, die genauso eine Minimaldosis (Initialdosis) für zelluläre Effekte aufzeigen (Ingber, 2006). Sehr auffällig waren die sehr hohen Zellverluste bei der Applikation von radialer DW, die die Versuchsdurchführung sehr schwierig gestalteten. Diese Beobachtungen könnten eine beginnende Seneszenz andeuten, die durch die Untersuchung der Beta-Galaktosidase in vorliegender Arbeit unterstrichen werden konnte. Die Zytoskelettvermittelte Apoptose wurde bereits von Vetterkind und Kollegen beschrieben und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls eine Korrelation zwischen der Aktinzytoskelettformation und des Apoptoseverhaltens, so dass eine Untersuchung auf Par-4 erfolgen sollte (Vetterkind, et al., 2005). Zusammengefasst zeigen sich bei der radialen DW ein weiteres Wirkspektrum mit geringeren Amplituden verglichen mit den Ergebnissen der fokussierten SW.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Studien von Lohrer (Lohrer, et al.), bei denen Patienten über 50 Jahre sensitiver auf die fokussierte als auf radiale SW ansprechen, können hier auch eine Korrelation bestehen, da unsere Probanden aus Hüft-TEP (Total-Endo-Prothese) Operationen stammen und sich deshalb mit einem Durchschnittsalter von 64,5 Jahren in der zweiten Lebenshälfte befanden.

4.10. Klinische Relevanz der vorliegenden Arbeit

Die klinische Relevanz der Arbeit zeigt sich in der nachweislichen Beeinflussung von hMSCs über SW/DW-Applikation *ex vivo* sowie der Reimplantierbarkeit der vorkonditionierten hMSCs. Die *ex vivo*- Kultivierung und Vermehrung ermöglicht eine möglichst hohe Anzahl an MSCs, die mit optimalen Konditionen beschallt werden können, ohne andere Zellen zu beeinflussen. So können zum Beispiel Fibrosen vorgebeugt werden, die durch SW/DW-Applikation induzierte Proliferationserhöhung von Fibroblasten resultieren. Es können sowohl optimale zeit- als auch dosisabhängige Konditionen gewählt werden und somit die Therapieerfolge in der Transplantationsmedizin verbessert werden. Die Beeinflussung der Lokomotion, der Migration und der Proliferation über SW/DW, weisen auf die Möglichkeit hin, die Transplantationsergebnisse *in vivo* positiv zu beeinflussen. Die Ergebnisse zeigen sowohl die Möglichkeiten der Beeinflussung von MSCs über Stoß-, als auch über Druckwelle auf. Ebenfalls zeigen die Ergebnisse, dass die Behandlungserfolge der MSCs von allen drei Parametern wie Gesamtpulszahl, Frequenz und Energiedichte abhängig sind. Neben der dosisabhängigen Wirkung müssen nach unseren Erkenntnissen, auch die zeitabhängigen Komponenten für eine erfolgreiche Behandlung ausgewählt und beachtet werden. Ebenfalls konnte die Arbeit zeigen, dass es Wirkmaxima gibt, deren Überschreitung auch zu gegenteiligen Effekten bei MSCs führen kann. Die unterschiedlichen Effekte auf Apoptose und Seneszenz bei SW/DW weisen daraufhin, dass bei MSCs unterschiedliche Strukturen angesprochen werden. Die physikalischen Unterschiede des mechanischen Reizes, zeigen unterschiedliche zellbiologische Antworten, die durch weitere Untersuchungen noch präzisiert werden müssen. Des Weiteren weist die vorliegende Arbeit auf eine Vielzahl physikalischer Modifikationen der SW/DW hin, die bei der Applikation beachtet werden müssen. Gleichermaßen zeigt sie somit auf, dass auch *in vivo*, je nachdem wo sie appliziert wird, eine Modifizierung in Abhängigkeit der Reflexionsbedingungen erfolgt.

Gleichermaßen zeigte sich, dass der Winkel der Applikation entscheidend ist, welches in der therapeutischen Anwendung ggf. zu wenig Beachtung findet und auch *in vivo* eine entscheidende Bedeutung für die therapeutische Wirkung zu haben scheint. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Barakat und Davies sowie Kumar (Barakat and Davies, 1998; Kumar, et al., 2002), die der einwirkenden Richtung von mechanischen Stimuli eine entscheidende Bedeutung bei der Wirkung zusprechen. Aufgrund dessen, dass der Versuchsaufbau maßgeblich an den Ergebnissen beteiligt ist, soll dieser nun kritisch diskutiert werden.

4.11. Experimenteller Versuchsaufbau- Versuchsapparatur und Applikationsschema

Der Versuchsaufbau ist ein entscheidender Faktor für den Ausgang der Ergebnisse, da dieser sehr sensitiv auf Veränderungen reagiert und maßgeblich an der Modulation von SW/DW beteiligt ist. Er muss physikalische und biologische Interaktionen berücksichtigen und deren Anforderungen gerecht werden. Reflexionen wurden kontrolliert und berechnet. Die verwendeten Beschallungsschalen der Firma ibidi (Martinsried, Deutschland) zeigten eine Reflexion von < 1 Prozent. Des Weiteren wurde nur in Medien derselben Zusammensetzung geschallt, da sich unterschiedliche Medienzusammensetzungen direkt auf die Ergebnisse *in vitro* auswirkten (Renz and Rupp, 2009). Der Schallweg der DW/SW wurde komplett durch Ultraschallgel (blasenfrei) gekoppelt und die Apparatur stand auf speziellen reflexionsarmen Matten, die von der Firma Storz zur Verfügung gestellt wurden. Um schädigende Kavitationseffekte (Lifshitz, et al., 1997) zu minimieren wurde in teilentgastem und unkonditionierten sowie temperierten Zellmedium geschallt. Die Wiederholungsfrequenz wurde so gewählt, dass Kavitationseffekte möglichst gering gehalten wurden (Huber, et al., 1998), welches ebenfalls half die Zellabträge zu minimieren (Junge, et al., 2003). Sie entsprach im Regelfall 4 Hz. Die Gesamtimpulsanzahlen wurden auf 500 und 1000 Impulse festgelegt, da mit dieser Impulsanzahl bei niedrigen und auch höheren Energiedichten gute Erfolge erzielt werden konnten, auf höhere Gesamtimpulsanzahlen wurde nach Vorversuchen verzichtet (Kusnierczak, et al., 2000).

Es wurden die Zellen jeweils unter adhärennten Kulturbedingungen geschallt, da der Beschallungszustand der Zellen einen starken Effekt auf das Verhalten der Zellen hat (Smits, et al., 1991) und interzelluläre Kontakte (Tarbell, et al., 2005) ebenso wie Zell-Substrat-Interaktionen (Cheng, et al., 2009) für die Mechanotransduktion entscheidend sind. Es wurde für jeden Schallkopf und Gerät ein eigenes Behandlungsschemata gewählt. Die vorerst geplanten Beschallungen, die den *in vivo* Bedingungen entsprachen, mussten verworfen werden, da es zu starken Destruktionen der Zellen kam. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erfahrungen von Kochanski et al. (Kochanski, et al., 2001), die bei der *in vitro* SW-Applikation bei Zellen, massive Destruktionen der Zellen mit *in vivo* – Behandlungsschemata zeigen konnten. Auf die exakte Positionierung des Schallkopfes bei der Versuchsdurchführung wurden größte Aufmerksamkeit gelegt (Barakat and Davies, 1998), so dass Abstand und Winkelungen der DW/SW-Applikation immer identisch waren. Da zelldichteabhängige Veränderungen auf Scherkräfte beschrieben wurden, wurde dies in den Versuchen Rechnung getragen, indem nur identische Konfluenzen verglichen wurden (Mott and Helmke, 2007). Die optimale Konfluenz für die jeweiligen Assays wurde in einer Reihe von Vorversuchen ausgetestet. Aufgrund der temporären Reihenfolge bei der Signaltransduktion (Banes, et al., 1995; Jones, et al., 1995) fanden Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeiten nach der Beschallung statt. Die Zeitpunkte der Untersuchung wurden durch Vorversuche limitiert. Der vorliegende Versuchsaufbau lässt keine differenzierte Wirkbetrachtung von direkter Stoßwellenwirkung und der „indirekten“ Kavitationseffekte (Gerdesmeyer, et al., 2002; Ogden, et al., 2001b) zu und zeigt in Abhängigkeit der Zelldichte, immer noch sehr hohe Zellverluste (Gambihler, et al., 1990) auf. Beschallungen der Zellen in einer dreidimensionalen Matrix, unter anderem Matrigel, misslangen bisweilen, da sich das Matrigel durch die mechanische Belastung der Beschallung zersetzte. Die Versuche mit radialer Druckwelle gestalteten sich sehr schwierig, da sich sehr hohe Zellabtragsraten, vor allem bei Beschallung dichter Zellmonolayer, zeigten. Da verschiedene Zelltypen über sehr divergente Sensitivitäten bezüglich der Beschallungsparameter verfügen (Smits, et al., 1991), können somit nur spezifische Aussagen über das Verhalten von MSCs, bei den durchgeführten Beschallungen getroffen werden. Die Ergebnisse gelten nur für *in vitro* - Beschallungen und können nicht direkt auf *in vivo*- Behandlungsinterventionen übertragen werden.

4.12. Ausblick

Um in Zukunft allgemeingültige Ergebnisse für die *in vitro* Erforschung der SW/DW zu erhalten, sollte die Bestrebung aller Forschergruppen in diesem Bereich sein, einen einheitlichen Versuchsaufbau zu etablieren, der SW/DW Modulationen im selben Maße vollzieht. Die Vergleichbarkeit der Versuche *in vitro* mit anderen Arbeitsgruppen ist zur Zeit sehr schwierig, da Versuchsaapparaturen und Versuchsaufbauten der einzelnen Gruppen sehr stark variieren und somit SW/DW einer Vielzahl unterschiedlicher Modulationen unterliegen. Aus diesen Gründen aber auch wegen zukunftsrelevanter Themen wie Gewebe-Zellinteraktionsuntersuchungen und Reimplantationen der beschallten Zellen, sind Überlegungen für einen modifizierten und angepassten Versuchsaufbau aufgekommen (Abb.73).

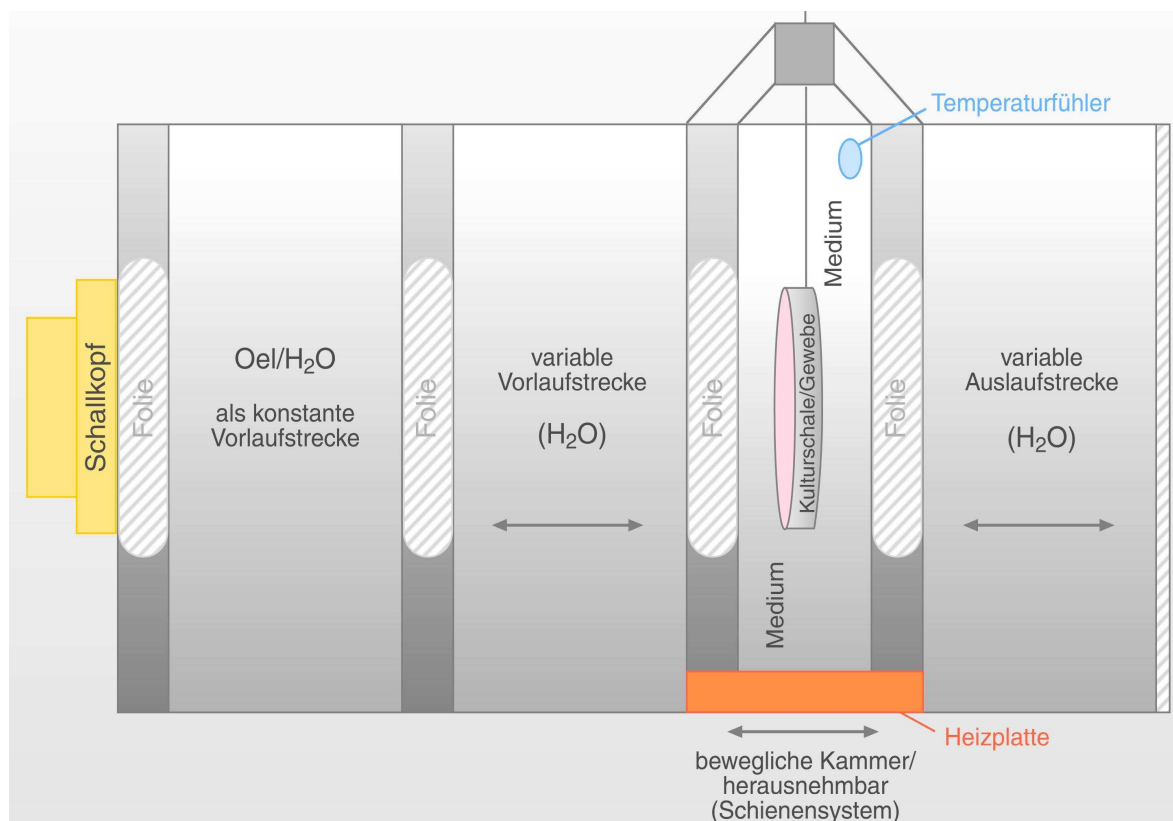


Abb. 73 : Eigenentwurf – Versuchsaufbau für sterile SW-/DW-Applikation *in vitro*. Abgebildet ist ein Versuchsaufbau, der durch Ankopplung an eine spezielle Folie für jede Form des Schallkopfes kompatibel ist. Die Vorlaufstrecke kann variabel gewählt werden, so dass sowohl im Fokus als auch davor und dahinter geschallt werden kann. Die bewegliche Kammer ermöglicht eine sterile und kostengünstige Schallung, da das Mediumvolumen gering gehalten wird. Die Auslaufstrecke kann ebenfalls variiert werden, so dass die Effekte über Reflexionen ebenfalls genauer betrachtet werden können. Eine Heizplatte unterhalb der Kammer gewährleistet einfache temperaturstabile Bedingungen und das Thermostat optimiert das Monitor-System. Der vorliegende Versuchsaufbau kann ebenfalls für die Beschallung von Gewebe genutzt werden.

Dieser Versuchsaufbau verfügt über einige Vorteile, so dass Zellen steril geschallt werden können und damit reimplantierbar wären. Die aufwendige Präparation der Schweinehaut würde entfallen und es könnten die Schallungsbereiche variiert werden. Die Schallungsergebnissen in der Fokuszone könnten durch Beschallungen vor und hinter der Fokuszone, durch variable Vorlaufstrecken ergänzt werden. Die Reflexionsverhältnisse könnten des Weiteren über die variable Auslaufstrecke und/oder die Rückenwand der Apparatur variiert werden. Wie gezeigt wurde, haben Zelldichte (Mott and Helmke, 2007) und Zustand der Zellen (Kasper, et al., 2009; Meazzini, et al., 1998) sowie Schallungsmedium (Lifshitz, et al., 1997; Ohl and Wolfrum, 2003) und das zellspezifische (Adhäsions-)Verhalten der Zellen (Smits, et al., 1991) eine Auswirkung auf die Modulation von DW/SW *in vitro*, wobei diese Faktoren aufgrund der unterschiedlicher biologischen Anforderungen der verschiedenen Zelltypen sehr variieren und zumindest für die Vergleichbarkeit innerhalb verschiedener Zellsysteme ein Problem darstellen könnten. Die Auswirkungen der Schallungen im Fokusbereich sollten genauso untersucht werden, wie die Bereich außerhalb dieser Zone, da auch hier aufgrund der Erkenntnisse *in vivo* mit divergenten Ergebnissen zu rechnen ist. Um weitere Erkenntnisse über das Migrationsverhalten zu erlangen sollten Ko-Kultivierungsexperimente mit verschiedenen Endothelzellen erfolgen, die leider in der vorliegenden Arbeit bisweilen misslangen. Der weitere Schritt der Reimplantation von SW/DW-behandelten Zellen im Tierversuchsmodell setzt voraus, dass Schallungen unter sterilen Bedingungen durchzuführen sind, so wie es in der Entwurfskizze des modifizierten Versuchsaufbau bereits geschildert wurde. Um eine Beurteilung für eine kombinierte Therapie von Stammzelltransplantation und SW/DW-Applikation der Zellen abzugeben, sollte des Weiteren Untersuchungen zur Beeinflussung der autokrinen/parakrinen Effekte und Differenzierungsverhalten von MSCs nach Behandlung erfolgen. Ob sich das chemotaktische Verhalten bzw. die Chemosensitivität der Zellen ggf. über SW/DW beeinflussen lässt, wäre ein weiterer interessanter Untersuchungsfaktor.

Ein weiterer interessanter Punkt, wäre die bessere Erforschung der zytoskelettassoziierten Apoptose sowie das altersabhängige Ansprechverhalten auf SW/DW, die bei Lohrer (Lohrer, et al.) festgestellt werden konnte und durch Schallung MSCs jüngerer Probanden überprüft werden könnte. Aufgrund der Fülle von Behandlungsparametern und der großen Zahl der hier eingesetzten Geräte, konnten nur Teilaspekte erforscht werden, deren Ergebnisse Inspiration für eine Vielzahl weiterer Untersuchungen sein kann.

5.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Schallausbreitung bei fokussierten und unfokussierten Systemen 01

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mechanotransduktion bei Kardiomyozyten08

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mechanotransduktion an Haarzellen.....09

Abbildung 4: Schematische Darstellung von Zielstrukturen für Mechanotransduktion 11

Abbildung 5: Aktivierung von Ionenkanäle über Mechanotransduktion.....12

Abbildung 6: Schematische Darstellung zelldichteabhängiger Modulation von Stressfasern 15

Abbildung 7: Schematische Abbildung der Verbindung „adhärenten“ Zellen mit der EZM 16

Abbildung 8: Differenzierung multipotenter mesenchymaler Stammzellen (MSCs) 18

Abbildung 9: Druckwelle: Sinusförmige Druckschwankung..... 23

Abbildung 10: Aufsteilen einer Druckwelle zu einer Stoßwelle24

Abbildung 11: Charakteristischer Verlauf einer fokussierten Stoßwelle 25

Abbildung 12: Schematische Darstellung von Kavitationsblasen an Grenzflächen und Ausbildung so genannter Mikrojets 26

Abbildung 13: Das Piezoelektrische Prinzip zur Erzeugung fokussierter Stoßwelle27

Abbildung 14: Das Elektromagnetische Prinzip zur Erzeugung fokussierter Stoßwellen28

Abbildung 15: Schematische Darstellung des ballistischen Systems der radialen Stoßwellenapplikation 29

Abbildung 16: Druckpuls..... 29

Abbildung 17: Die wichtigsten Unterscheidungskriterien von Stoß- und Druckwellen 30

	Seite
Abbildung 18: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (<i>in vitro</i>)	32
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Präparation/ Isolation von MSCs aus humanem Knochenmark	35
Abbildung 20: Lichtmikroskopische Aufnahme	38
Abbildung 21: Lichtmikroskopische Aufnahme	39
Abbildung 22: Oberflächenantigenspezifität MSCs mittels FACS-Analyse	41
Abbildung 23: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums	42
Abbildung 24: Zusammensetzung des chondrogenen Differenzierungsmediums	44
Abbildung 25: Übersicht über verwendeten Primer	46
Abbildung 26: Zusammensetzung des adipogenen Differenzierungsmediums	47
Abbildung 27: Berechnung der Gesamtzellzahl	48
Abbildung 28: Berechnung des prozentualen Anteils vitaler Zellen	48
Abbildung 29: Zusammensetzung der 0.1 M Diaminobenzidinfärbelösung	51
Abbildung 30: Enzymatische Spaltung der 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal)	53
Abbildung 31: Schematische Darstellung des Boyden-Chamber Assays.....	58
Abbildung 32: Schematische Darstellung der Wundsetzung beim „Wound and Healing“-Assay	59
Abbildung 33: Graphische Darstellung der Altersverteilung der Probanden.....	61
Abbildung 34: Lichtmikroskopische Aufnahme.....	62
Abbildung 35: Durchflusszytometrie zur Detektion von Oberflächenantigenen.....	63
Abbildung 36: Osteogene Differenzierung von hMSCs sowie Kontrolle	64
Abbildung 37: Semiquantitative RT-PCR für den Nachweis der chondrogenen Differenzierung	65

	Seite
Abbildung 38: Adipogene Differenzierung (A) und Kontrolle (B) von hMSCs	66
Abbildung 39: Lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs).....	67
Abbildung 40: Lichtmikroskopische Aufnahme von murinen Fibroblasten	68
Abbildung 41: Lichtmikroskopische Aufnahme muriner Fibroblasten nach Beschallung	68
Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme humaner mesenchymaler Stammzellen nach Beschallung	69
Abbildung 43: Statistische Auswertung der Wachstumsraten von MSCs nach SW-Applikation.....	73
Abbildung 44: Lichtmikroskopische Aufnahme humaner mesenchymaler Stammzellen nach Immunhistochemische Färbung und DAB- Entwicklung	74
Abbildung 45: Graphische Darstellung der Ki-67-positiven MSCs zu unterschiedlichen Zeiten nach SW-Behandlung.....	75
Abbildung 46: Graphische Darstellung der Ki-67-positiver MSCs zu unterschiedlichen Zeiten nach SW Behandlung.....	76
Abbildung 47: Graphische Darstellung von Ki-67 positiver humaner mesenchymaler Stammzellen in Prozent	77
Abbildung 48: Graphische Darstellung der Caspase-3-positiver humaner mesenchymaler Stammzellen in Prozent.....	78
Abbildung 49: Graphische Darstellung der Caspase-3-positiven MSCs zu unterschiedlichen Zeiten nach SW- Behandlung	79
Abbildung 50: Lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen mesenchymalen Stammzellen Beta-Galactosidase gefärbt.....	81
Abbildung 51: Beta-Galaktosidase-Färbung von humanen mesenchymalen Stammzellen	82
Abbildung 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC).....	83

	Seite
Abbildung 53: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils gerichteter F-Aktinfasern zu unterschiedlichen Zeiten nach SW-Behandlung	84
Abbildung 54: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils gerichteter F-Aktinfasern zum Zeitpunkt t_0	84
Abbildung 55: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils gerichteter F-Aktinfasern zum Zeitpunkt t_1	85
Abbildung 56: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils gerichteter F-Aktinfasern.....	86
Abbildung 57: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils depolymerisierter F-Aktinfasern.....	87
Abbildung 58: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils depolymerisierter F-Aktinfasern.....	88
Abbildung 59: Western Blot Analyse von eNOS/NOS Type III humaner mesenchymaler Stammzellen	90
Abbildung 60: Western Blot Analyse von Rac1/Cdc42 humaner mesenchymaler Stammzellen	90
Abbildung 61: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von migrierten Zellen im mod. Boyden Chamber Assay	92
Abbildung 62: Graphische Darstellung migrierter MSCs im Boyden Chamber Assay nach SW-Behandlung	92
Abbildung 63: Graphische Darstellung migrierter Zellen im Boyden Chamber Assay nach SW-Behandlung	93
Abbildung 64: Quantitative Bestimmung migrierter MSCs im Boyden Chamber Assay nach SW-Behandlung	94
Abbildung 65: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines Wundheilungs- (Wound and Healing-) Assay bei MSCs	96
Abbildung 66: Statistische Auswertung der Wundflächen beim Wundheilungsassay	97
Abbildung 67: Graphische Darstellung des Wundverschlusses (in Prozent) humaner mesenchymaler Stammzellen nach SW-Applikation	98

	Seite
Abbildung 68: Graphische Darstellung der Zeit bis zum vollständigen Wundverschluss in Minuten nach SW-Behandlung	98
Abbildung 69: Graphische Darstellung der zurückgelegten Distanz pro 10 min	99
Abbildung 70: Graphische Darstellung der Geschwindigkeit in pix/min.....	100
Abbildung 71: Graphische Darstellung der Distanz zum Ausgangspunkt.....	101
Abbildung 72: Modell der Par-4/DLK-induzierten Apoptose.....	117
Abbildung 73: Eigenentwurf- Versuchsaufbau für sterile SW/DW-Applikation <i>in vitro</i>	124

5.2. Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
7-AAD	7-Aminoactinomycin
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ATF3	activating transcription factor-3
bFGF	basic fibroblast growth factor
CA2	Kalzium
CD	Cluster of differentiation
CFU-Assay	Colony forming units-Fibroblast-Assay
CO2	Kohlenstoffdioxid
Cytosin/ Guanin	Nukleinbasen
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	6-diamedino-2phenyl-indol
DLK	Death Associated Protein
DMEM	Dulbecco's modified eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DW	Druckwelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Elektro Medical Systems
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ESWL	Extrakorporalen Stosswellenlithotrypsie
et al	et alii
EtOH	Etanol
EZM	Extrazellularmatrix
F-SW	Fokussierte Stoßwelle
F-SWStorz	Elektromagnetisches Gerät der Firma Storz
F-SWWolf	Piezelektrische Stoßwelle der Firma Wolf
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAK	Fokale-Adhäsionskinasen
FCS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GAP-43	growth-associated phosphoprotein-43
HCL	Salzsäure
hMSCs	Humane mesenchymale Stammzellen
Hz	Hertz
ICH	Immunhistochemie
MEM	Minimum Essential Medium
MG2+	Magnesium
MPa	Megapascal

MSCs	Mesenchymale Stammzellen
Na ₂ CO ₃	Natriumkarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Par-4	Prostate apoptosis response-4
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
pix	pixel (Bildpunkt)
R-DW	radiale Stoßwelle
R-DWems	Radiale Druckwelle von EMS
R-DWStorz	Radiale Druckwelle von Storz
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SW	Stoßwelle
Tab	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TGF-β1	transforming growth factor β1
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

6. Literaturliste

Abrahams, C., Lipson, S. and Ross, L., (1988). 'Pathologic changes in the kidneys and other organs of dogs undergoing extracorporeal shock wave lithotripsy with a tubless lithotripter'. *J Urol*, 140 (2):391-394.

Abt, T., Hopfenmuller, W. and Mellerowicz, H., (2002). '[Shock wave therapy for recalcitrant plantar fasciitis with heel spur: a prospective randomized placebo-controlled double-blind study]'. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 140 (5):548-554.

Adams, L.G., Williams, J.C., Jr., McAteer, J.A., Hatt, E.K., Lingeman, J.E. and Osborne, C.A., (2005). 'In vitro evaluation of canine and feline calcium oxalate urolith fragility via shock wave lithotripsy'. *Am J Vet Res*, 66 (9):1651-1654.

Aicher, A., Heeschen, C., Sasaki, K., Urbich, C., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S., (2006). 'Low-energy shock wave for enhancing recruitment of endothelial progenitor cells: a new modality to increase efficacy of cell therapy in chronic hind limb ischemia'. *Circulation*, 114 (25):2823-2830.

Ailenberg, M. and Silverman, M., (2003). 'Cytochalasin D disruption of actin filaments in 3T3 cells produces an anti-apoptotic response by activating gelatinase A extracellularly and initiating intracellular survival signals'. *Biochim Biophys Acta*, 1593 (2-3):249-258.

Almeida-Porada, G., Zanjani, E.D. and Porada, C.D., 'Bone marrow stem cells and liver regeneration'. *Exp Hematol*, 38 (7):574-580.

Ananthakrishnan, R. and Ehrlicher, A., (2007). 'The forces behind cell movement'. *Int J Biol Sci*, 3 (5):303-317.

Angehrn, F., Kuhn, C. and Voss, A., (2007). 'Can cellulite be treated with low-energy extracorporeal shock wave therapy?' *Clin Interv Aging*, 2 (4):623-630.

Arnhold, S., Klein, H., Klinz, F.J., Absenger, Y., Schmidt, A., Schinkothe, T., Brixius, K., Kozlowski, J., Desai, B., Bloch, W. and Addicks, K., (2006). 'Human bone marrow stroma cells display certain neural characteristics and integrate in the subventricular compartment after injection into the liquor system'. *Eur J Cell Biol*, 85 (6):551-565.

Arroyo, J.A., Anthony, R.V., Parker, T.A. and Galan, H.L., 'eNOS, NO, and the activation of ERK and AKT signaling at mid-gestation and near-term in an ovine model of intrauterine growth restriction'. *Syst Biol Reprod Med*, 56 (1):62-73.

Arthur, W.T. and Burridge, K., (2001). 'RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity'. *Mol Biol Cell*, 12 (9):2711-2720.

Baker, J.B. and Humphreys, T., (1971). 'Serum-stimulated release of cell contacts and the initiation of growth in contact-inhibited chick fibroblasts'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68 (9):2161-2164

Banes, A.J., Tsuzaki, M., Yamamoto, J., Fischer, T., Brigman, B., Brown, T. and Miller, L., (1995). 'Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals'. *Biochem Cell Biol*, 73 (7-8):349-365.

Barakat, A.I. and Davies, P.F., (1998). 'Mechanisms of shear stress transmission and transduction in endothelial cells'. *Chest*, 114 (1 Suppl):58S-63S.

Baum, O., Da Silva-Azevedo, L., Willerding, G., Wockel, A., Planitzer, G., Gossrau, R., Pries, A.R. and Zakrzewicz, A., (2004). 'Endothelial NOS is main mediator for shear stress-dependent angiogenesis in skeletal muscle after prazosin administration'. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287 (5):H2300-2308.

Baumgartner, B.R., Dickey, K.W., Ambrose, S.S., Walton, K.N., Nelson, R.C. and Bernardino, M.E., (1987). 'Kidney changes after extracorporeal shock wave lithotripsy: appearance on MR imaging'. *Radiology*, 163 (2):531-534.

Baxter, M.A., Wynn, R.F., Jowitt, S.N., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J. and Bellantuono, I., (2004). 'Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion'. *Stem Cells*, 22 (5):675-682.

Bitekhtina, M.A. and Vekshin, N.L., (2008). '[7-aminoactinomycin as a fluorescent probe for DNA unwinding and denaturation]'. *Bioorg Khim*, 34 (6):781-785.

Boehrer, S., Chow, K.U., Beske, F., Kukoc-Zivojnov, N., Puccetti, E., Ruthardt, M., Baum, C., Rangnekar, V.M., Hoelzer, D., Mitrou, P.S. and Weidmann, E., (2002a). 'In lymphatic cells par-4 sensitizes to apoptosis by down-regulating bcl-2 and promoting disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation'. *Cancer Res*, 62 (6):1768-1775.

Boehrer, S., Chow, K.U., Ruthardt, M., Hoelzer, D., Mitrou, P.S. and Weidmann, E., (2002b). 'Expression and function of prostate-apoptosis-response-gene-4 in lymphatic cells'. *Leuk Lymphoma*, 43 (9):1737-1741.

Boyden, S., (1962). 'The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes'. *J Exp Med*, 115:453-466.

Breitbach, M., Bostani, T., Roell, W., Xia, Y., Dewald, O., Nygren, J.M., Fries, J.W., Tiemann, K., Bohlen, H., Hescheler, J., Welz, A., Bloch, W., Jacobsen, S.E. and Fleischmann, B.K., (2007). 'Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts'. *Blood*, 110 (4):1362-1369.

Brendel, W., (1986). '[Shock wave lithotripsy of the kidney and gallbladder]'. *Verh Dtsch Ges Inn Med*, 92:168-174.

Buchbinder, R., Green, S., White, M., Barnsley, L., Smidt, N. and Assendelft, W.J., (2002). 'Shock wave therapy for lateral elbow pain'. *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD003524.

Bush, W.H., Gibbons, R.P., Lewis, G.P. and Brannen, G.E., (1986). 'Impact of extracorporeal shock wave lithotripsy on percutaneous stone procedures'. *AJR Am J Roentgenol*, 147 (1):89-93.

Camandola, S. and Mattson, M.P., (2000). 'Pro-apoptotic action of PAR-4 involves inhibition of NF-kappaB activity and suppression of BCL-2 expression'. *J Neurosci Res*, 61 (2):134-139.

Caplan, A.I., (2007). 'Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine'. *J Cell Physiol*, 213 (2):341-347.

Caplan, A.I. and Bruder, S.P., (2001). 'Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century'. *Trends Mol Med*, 7 (6):259-264.

Caplan, A.I. and Dennis, J.E., (2006). 'Mesenchymal stem cells as trophic mediators'. *J Cell Biochem*, 98 (5):1076-1084.

Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H.E. and Moore, M.A., (1980). 'Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny'. *Blood*, 56 (2):289-301.

Celeste Morley, S., Sun, G.P. and Bierer, B.E., (2003). 'Inhibition of actin polymerization enhances commitment to and execution of apoptosis induced by withdrawal of trophic support'. *J Cell Biochem*, 88 (5):1066-1076.

Chaussy, C., Brendel, W. and Schmiedt, E., (1980). 'Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves'. *Lancet*, 2 (8207):1265-1268.

Chaussy, C. and Schmiedt, E., (1983). 'Shock wave treatment for stones in the upper urinary tract'. *Urol Clin North Am*, 10 (4):743-750

Chaussy, C. and Schmiedt, E., (1984). 'Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) for kidney stones. An alternative to surgery?' *Urol Radiol*, 6 (2):80-87.

Chaussy, C., Schmiedt, E., Jocham, D., Brendel, W., Forssmann, B. and Walther, V., (1982). 'First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves'. *J Urol*, 127 (3):417-420.

Chaussy, C., Schuller, J., Schmiedt, E., Brandl, H., Jocham, D. and Liedl, B., (1984). 'Extracorporeal shock-wave lithotripsy (ESWL) for treatment of urolithiasis'. *Urology*, 23 (5 Spec No):59-66.

Chen, C.S., Tan, J. and Tien, J., (2004). 'Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts'. *Annu Rev Biomed Eng*, 6:275-302.

- Chen, H.S.**, Chen, L.M. and Huang, T.W., (2001). 'Treatment of painful heel syndrome with shock waves'. *Clin Orthop Relat Res* (387):41-46.
- Cheng, C.M.**, Steward, R.L., Jr. and LeDuc, P.R., (2009). 'Probing cell structure by controlling the mechanical environment with cell-substrate interactions'. *J Biomech*, 42 (2):187-192.
- Chong, A.K.**, Ang, A.D., Goh, J.C., Hui, J.H., Lim, A.Y., Lee, E.H. and Lim, B.H., (2007). 'Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model'. *J Bone Joint Surg Am*, 89 (1):74-81.
- Christ, C.**, Brenke, R., Sattler, G., Siems, W., Novak, P. and Daser, A., (2008). 'Improvement in skin elasticity in the treatment of cellulite and connective tissue weakness by means of extracorporeal pulse activation therapy'. *Aesthet Surg J*, 28 (5):538-544.
- Church, C.C.**, (1989). 'A theoretical study of cavitation generated by an extracorporeal shock wave lithotripter'. *J Acoust Soc Am*, 86 (1):215-227.
- Ciapetti, G.**, Ambrosio, L., Marletta, G., Baldini, N. and Giunti, A., (2006). 'Human bone marrow stromal cells: In vitro expansion and differentiation for bone engineering'. *Biomaterials*, 27 (36):6150-6160.
- Cipolla, M.J.**, Gokina, N.I. and Osol, G., (2002). 'Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior'. *Faseb J*, 16 (1):72-76.
- Cole, C.**, Seto, C. and Gazewood, J., (2005). 'Plantar fasciitis: evidence-based review of diagnosis and therapy'. *Am Fam Physician*, 72 (11):2237-2242.
- Couchman, J.R.** and Rees, D.A., (1979). 'The behaviour of fibroblasts migrating from chick heart explants: changes in adhesion, locomotion and growth, and in the distribution of actomyosin and fibronectin'. *J Cell Sci*, 39:149-165.
- Cox, E.A.**, Sastry, S.K. and Huttenlocher, A., (2001). 'Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases'. *Mol Biol Cell*, 12 (2):265-277.
- Cramer, L.P.**, Siebert, M. and Mitchison, T.J., (1997). 'Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force'. *J Cell Biol*, 136 (6):1287-1305.
- Cristofalo, V.J.**, Volker, C., Francis, M.K. and Tresini, M., (1998). 'Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts'. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 8 (1):43-80.

Crum, L.A., (1988). 'Cavitation microjets as a contributory mechanism for renal calculi disintegration in ESWL'. *J Urol*, 140 (6):1587-1590.

da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C. and Nardi, N.B., (2006). 'Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues'. *J Cell Sci*, 119 (Pt 11):2204-2213.

Dalla Costa, A.P., Clemente, C.F., Carvalho, H.F., Carvalheira, J.B., Nadruz, W., Jr. and Franchini, K.G., 'FAK mediates the activation of cardiac fibroblasts induced by mechanical stress through regulation of the mTOR complex'. *Cardiovasc Res*, 86 (3):421-431.

Delhaye, M., Vandermeeren, A., Baize, M. and Cremer, M., (1992). 'Extracorporeal shock-wave lithotripsy of pancreatic calculi'. *Gastroenterology*, 102 (2):610-620.

Delius, M., Enders, G., Xuan, Z.R., Liebich, H.G. and Brendel, W., (1988). 'Biological effects of shock waves: kidney damage by shock waves in dogs--dose dependence'. *Ultrasound Med Biol*, 14 (2):117-122.

Di Silverio, F., Gallucci, M., Gambardella, P., Alpi, G., Benedetti, R., La Mancusa, R., Pulcinelli, F.M., Romiti, R. and Gazzaniga, P.P., (1990). 'Blood cellular and biochemical changes after extracorporeal shock wave lithotripsy'. *Urol Res*, 18 (1):49-51.

Diaz-Meco, M.T., Municio, M.M., Frutos, S., Sanchez, P., Lozano, J., Sanz, L. and Moscat, J., (1996). 'The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C'. *Cell*, 86 (5):777-786

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. and et al., (1995). 'A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (20):9363-9367.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. and Horwitz, E., (2006). 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement'. *Cytotherapy*, 8 (4):315-317.

Doyle, A.D. and Lee, J., (2005). 'Cyclic changes in keratocyte speed and traction stress arise from Ca²⁺-dependent regulation of cell adhesiveness'. *J Cell Sci*, 118 (Pt 2):369-379.

Dulbecco, R., (1970). 'Behavior of tissue culture cells infected with polyoma virus'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 67 (3):1214-1220.

Dumfarth, J., Zimpfer, D., Vogele-Kadletz, M., Holfeld, J., Sihorsch, F., Schaden, W., Czerny, M., Aharinejad, S., Wolner, E. and Grimm, M., (2008). 'Prophylactic low-energy shock wave therapy improves wound healing after vein harvesting for coronary artery bypass graft surgery: a prospective, randomized trial'. *Ann Thorac Surg*, 86 (6):1909-1913.

Endl, E., Steinbach, P. and Hofstadter, F., (1995). 'Flow cytometric analysis of cell suspensions exposed to shock waves in the presence of the radical sensitive dye hydroethidine'. *Ultrasound Med Biol*, 21 (4):569-577.

Ernstrom, G.G. and Chalfie, M., (2002). 'Genetics of sensory mechanotransduction'. *Annu. Rev. Genet.*, 36:411-453.

Fernandez, M., Simon, V., Herrera, G., Cao, C., Del Favero, H. and Minguell, J.J., (1997). 'Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients'. *Bone Marrow Transplant*, 20 (4):265-271.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K. and Lalykina, K.S., (1970). 'The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells'. *Cell Tissue Kinet*, 3 (4):393-403.

Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F. and Kulagina, N.N., (1976). 'Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs'. *Exp Hematol*, 4 (5):267-274.

Friedl, G., Schmidt, H., Rehak, I., Kostner, G., Schauenstein, K. and Windhager, R., (2007). 'Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain: transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro'. *Osteoarthritis Cartilage*, 15 (11):1293-1300.

Fuchs, G., Miller, K., Rassweiler, J. and Eisenberger, F., (1985). 'Extracorporeal shock-wave lithotripsy: one-year experience with the Dornier lithotripter'. *Eur Urol*, 11 (3):145-149.

Furia, J.P., (2005). 'The safety and efficacy of high energy extracorporeal shock wave therapy in active, moderately active, and sedentary patients with chronic plantar fasciitis'. *Orthopedics*, 28 (7):685-692.

Gabbiani, G., Gabbiani, F., Heimark, R.L. and Schwartz, S.M., (1984). 'Organization of actin cytoskeleton during early endothelial regeneration in vitro'. *J Cell Sci*, 66:39-50.

Gambihler, S., Delius, M. and Brendel, W., (1990). 'Biological effects of shock waves: cell disruption, viability, and proliferation of L1210 cells exposed to shock waves in vitro'. *Ultrasound Med Biol*, 16 (6):587-594.

Gambihler, S., Delius, M. and Ellwart, J.W., (1994). 'Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves'. *J Membr Biol*, 141 (3):267-275.

Gao, J., Dennis, J.E., Muzic, R.F., Lundberg, M. and Caplan, A.I., (2001). 'The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion'. *Cells Tissues Organs*, 169 (1):12-20.

Gasser, T.C. and Frei, R., (1993). 'Risk of bacteraemia during extracorporeal shock wave lithotripsy'. *Br J Urol*, 71 (1):17-20.

Gerdesmeyer, L., Frey, C., Vester, J., Maier, M., Weil, L., Jr., Weil, L., Sr., Russlies, M., Stienstra, J., Scurran, B., Fedder, K., Diehl, P., Lohrer, H., Henne, M. and Gollwitzer, H., (2008). 'Radial extracorporeal shock wave therapy is safe and effective in the treatment of chronic recalcitrant plantar fasciitis: results of a confirmatory randomized placebo-controlled multicenter study'. *Am J Sports Med*, 36 (11):2100-2109.

Gerdesmeyer, L., Maier, M., Haake, M. and Schmitz, C., (2002). '[Physical-technical principles of extracorporeal shockwave therapy (ESWT)]'. *Orthopade*, 31 (7):610-617.

Gerdesmeyer, L., von Eiff, C., Horn, C., Henne, M., Roessner, M., Diehl, P. and Gollwitzer, H., (2005). 'Antibacterial effects of extracorporeal shock waves'. *Ultrasound Med Biol*, 31 (1):115-119.

Gerdesmeyer, L., Wagenpfeil, S., Haake, M., Maier, M., Loew, M., Wortler, K., Lampe, R., Seil, R., Handle, G., Gassel, S. and Rompe, J.D., (2003). 'Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of chronic calcifying tendonitis of the rotator cuff: a randomized controlled trial'. *Jama*, 290 (19):2573-2580.

Ghanem, A., Steingen, C., Brenig, F., Funcke, F., Bai, Z.Y., Hall, C., Chin, C.T., Nickenig, G., Bloch, W. and Tiemann, K., (2009). 'Focused ultrasound-induced stimulation of microbubbles augments site-targeted engraftment of mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction'. *J Mol Cell Cardiol*, 47 (3):411-418.

Gillespie, P.G. and Muller, U., (2009). 'Mechanotransduction by hair cells: models, molecules, and mechanisms'. *Cell*, 139 (1):33-44.

Gimbrone, M.A., Jr., Topper, J.N., Nagel, T., Anderson, K.R. and Garcia-Cardena, G., (2000). 'Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis'. *Ann N Y Acad Sci*, 902:230-239; discussion 239-240.

Giry, M., Popoff, M.R., von Eichel-Streiber, C. and Boquet, P., (1995). 'Transient expression of RhoA, -B, and -C GTPases in HeLa cells potentiates resistance to Clostridium difficile toxins A and B but not to Clostridium sordellii lethal toxin'. *Infect Immun*, 63 (10):4063-4071.

Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A. and Dzau, V.J., (2008). 'Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy'. *Circ Res*, 103 (11):1204-1219.

Goldstein, S., (1990). 'Replicative senescence: the human fibroblast comes of age'. *Science*, 249 (4973):1129-1133.

Gollwitzer, H., Roessner, M., Langer, R., Gloeck, T., Diehl, P., Horn, C., Stemberger, A., von Eiff, C. and Gerdesmeyer, L., (2009). 'Safety and effectiveness of extracorporeal shockwave therapy: results of a rabbit model of chronic osteomyelitis'. *Ultrasound Med Biol*, 35 (4):595-602.

Goodwin, H.S., Bicknese, A.R., Chien, S.N., Bogucki, B.D., Quinn, C.O. and Wall, D.A., (2001). 'Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers'. *Biol Blood Marrow Transplant*, 7 (11):581-588.

Gotherstrom, C., (2007). 'Immunomodulation by multipotent mesenchymal stromal cells'. *Transplantation*, 84 (1 Suppl):S35-37.

Grove, J.E., Bruscia, E. and Krause, D.S., (2004). 'Plasticity of bone marrow-derived stem cells'. *Stem Cells*, 22 (4):487-500.

Guilak, F., Awad, H.A., Fermor, B., Leddy, H.A. and Gimple, J.M., (2004). 'Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering'. *Biorheology*, 41 (3-4):389-399.

Haake, M., Buch, M., Schoellner, C., Goebel, F., Vogel, M., Mueller, I., Hausdorf, J., Zamzow, K., Schade-Brittinger, C. and Mueller, H.H., (2003). 'Extracorporeal shock wave therapy for plantar fasciitis: randomised controlled multicentre trial'. *Bmj*, 327 (7406):75.

Haake, M., Hunerkopf, M., Gerdesmeyer, L. and Konig, I.R., (2002). '[Extracorporeal shockwave therapy (ESWT) in epicondylitis humeri radialis. A review of the literature]'. *Orthopade*, 31 (7):623-632.

Ham, P.S. and Strayer, S., (2002). 'Shock wave therapy ineffective for plantar fasciitis'. *J Fam Pract*, 51 (12):1017.

Hammer, D.S., Rupp, S., Ensslin, S., Kohn, D. and Seil, R., (2000). 'Extracorporeal shock wave therapy in patients with tennis elbow and painful heel'. *Arch Orthop Trauma Surg*, 120 (5-6):304-307.

Hashimoto, J., Kariya, Y. and Miyazaki, K., (2006). 'Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332)'. *Stem Cells*, 24 (11):2346-2354.

Hausdorf, J., Lemmens, M.A., Heck, K.D., Grolms, N., Korr, H., Kertschanska, S., Steinbusch, H.W., Schmitz, C. and Maier, M., (2008a). 'Selective loss of unmyelinated nerve fibers after extracorporeal shockwave application to the musculoskeletal system'. *Neuroscience*, 155 (1):138-144.

- Hausdorf, J.,** Lemmens, M.A., Kaplan, S., Marangoz, C., Milz, S., Odaci, E., Korr, H., Schmitz, C. and Maier, M., (2008b). 'Extracorporeal shockwave application to the distal femur of rabbits diminishes the number of neurons immunoreactive for substance P in dorsal root ganglia L5'. *Brain Res*, 1207:96-101.
- Hayflick, L.,** (1965). 'The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains'. *Exp Cell Res*, 37:614-636.
- Hayflick, L.** and Moorhead, P.S., (1961). 'The serial cultivation of human diploid cell strains'. *Exp Cell Res*, 25:585-621.
- Haynesworth, S.E.,** Goshima, J., Goldberg, V.M. and Caplan, A.I., (1992). 'Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow'. *Bone*, 13 (1):81-88.
- Heidebrecht, H.J.,** Buck, F., Haas, K., Wacker, H.H. and Parwaresch, R., (1996). 'Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins'. *Cell Prolif*, 29 (7):413-425.
- Heng, B.C.,** Cao, T. and Lee, E.H., (2004). 'Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro'. *Stem Cells*, 22 (7):1152-1167.
- Heydemann, A.** and McNally, E.M., (2007). 'Consequences of disrupting the dystrophin-sarcoglycan complex in cardiac and skeletal myopathy'. *Trends Cardiovasc Med*, 17 (2):55-59.
- Hirata, H.,** Tatsumi, H. and Sokabe, M., (2007). 'Dynamics of actin filaments during tension-dependent formation of actin bundles'. *Biochim Biophys Acta*, 1770 (8):1115-1127.
- Hofmann, M.,** Wollert, K.C., Meyer, G.P., Menke, A., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A., Knapp, W.H. and Drexler, H., (2005). 'Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium'. *Circulation*, 111 (17):2198-2202.
- Holfeld, J.,** Zimpfer, D., Schaden, W. and Grimm, M., (2009). 'Reply to Sergej V. Jargin: Shock wave therapy of ischemic heart disease in the light of general pathology'. *Int J Cardiol*.
- Horn, C.,** Mengele, K., Gerdesmeyer, L., Gradinger, R. and Gollwitzer, H., (2009). 'The effect of antibacterial acting extracorporeal shockwaves on bacterial cell integrity'. *Med Sci Monit*, 15 (12):BR364-369.
- Huang, S.** and Ingber, D.E., (2005). 'Cell tension, matrix mechanics, and cancer development'. *Cancer Cell*, 8 (3):175-176.
- Huber, P.,** Jochle, K. and Debus, J., (1998). 'Influence of shock wave pressure amplitude and pulse repetition frequency on the lifespan, size and number of transient cavities in the field of an electromagnetic lithotripter'. *Phys Med Biol*, 43 (10):3113-3128.

- Huemer, G.M.**, Meirer, R., Gurunluoglu, R., Kamelger, F.S., Dunst, K.M., Wanner, S. and Piza-Katzer, H., (2005). 'Comparison of the effectiveness of gene therapy with transforming growth factor-beta or extracorporeal shock wave therapy to reduce ischemic necrosis in an epigastric skin flap model in rats'. *Wound Repair Regen*, 13 (3):262-268.
- Ingber, D.E.**, (1997). 'Integrins, tensegrity, and mechanotransduction'. *Gravit Space Biol Bull*, 10 (2):49-55.
- Ingber, D.E.**, (2006). 'Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again'. *Faseb J*, 20 (7):811-827.
- Ingber, D.E.** and Folkman, J., (1989). 'Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix'. *J Cell Biol*, 109 (1):317-330.
- Iro, H.**, Nitsche, N., Waitz, G., Schneider, T., Benninger, J. and Ell, C., (1992). 'Extracorporeal piezoelectric shock wave lithotripsy of salivary gland stones: first clinical experiences'. *J Stone Dis*, 4 (1):8-12.
- Jaalouk, D.E.** and Lammerding, J., (2009). 'Mechanotransduction gone awry'. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (1):63-73.
- Jackson, L.**, Jones, D.R., Scotting, P. and Sottile, V., (2007). 'Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications'. *J Postgrad Med*, 53 (2):121-127.
- Jargin, S.V.**, (2009). 'Shock wave therapy of ischemic heart disease in the light of general pathology'. *Int J Cardiol*.
- Jiang, Y.**, Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A. and Verfaillie, C.M., (2002). 'Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow'. *Nature*, 418 (6893):41-49.
- Jones, B.J.**, McHale, A.P. and Butler, M.R., (1992). 'Effect of high-energy shock wave frequency on viability of malignant cell lines in vitro'. *Eur Urol*, 22 (1):70-73.
- Jones, D.**, Leivseth, G. and Tenbosch, J., (1995). 'Mechano-reception in osteoblast-like cells'. *Biochem Cell Biol*, 73 (7-8):525-534.
- Jung, K.**, Kirschner, P., Wille, A. and Brien, G., (1993). 'Excretion of urinary enzymes after extracorporeal shock wave lithotripsy: a critical reevaluation'. *J Urol*, 149 (6):1409-1413.

Junge, L., Ohl, C.D., Wolfrum, B., Arora, M. and Iking, R., (2003). 'Cell detachment method using shock-wave-induced cavitation'. *Ultrasound Med Biol*, 29 (12):1769-1776.

Karpman, R.R., Magee, F.P., Gruen, T.W. and Mobley, T., (1987). 'Work-in-progress #1. The lithotripter and its potential use in the revision of total hip arthroplasty'. *Orthop Rev*, 16 (1):38-42.

Kasper, G., Glaeser, J.D., Geissler, S., Ode, A., Tuischer, J., Matziolis, G., Perka, C. and Duda, G.N., (2007). 'Matrix metalloprotease activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior'. *Stem Cells*, 25 (8):1985-1994.

Kasper, G., Mao, L., Geissler, S., Draycheva, A., Trippens, J., Kuhnisch, J., Tschirschmann, M., Kaspar, K., Perka, C., Duda, G.N. and Klose, J., (2009). 'Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton'. *Stem Cells*, 27 (6):1288-1297.

Kater, W., Meyer, W.W., Wehrmann, T., Hurst, A., Buhne, P. and Schlick, R., (1994). 'Efficacy, risks, and limits of extracorporeal shock wave lithotripsy for salivary gland stones'. *J Endourol*, 8 (1):21-24.

Kato, M., Ioritani, N., Suzuki, T., Kambe, M., Inaba, Y., Watanabe, R., Sasano, H. and Orikasa, S., (2000). 'Mechanism of anti-tumor effect of combination of bleomycin and shock waves'. *Jpn J Cancer Res*, 91 (10):1065-1072.

Katsube, Y., Hirose, M., Nakamura, C. and Ohgushi, H., (2008). 'Correlation between proliferative activity and cellular thickness of human mesenchymal stem cells'. *Biochem Biophys Res Commun*, 368 (2):256-260.

Kattan, S., Husain, I., el-Faqih, S.R. and Atassi, R., (1993). 'Incidence of bacteremia and bacteriuria in patients with non-infection-related urinary stones undergoing extracorporeal shock wave lithotripsy'. *J Endourol*, 7 (6):449-451.

Kaulesar Johannes, E.J., Sukul, D.M., Bijma, A.M. and Mulder, P.G., (1994). 'Effects of high-energy shockwaves on normal human fibroblasts in suspension'. *J Surg Res*, 57 (6):677-681.

Kearney, E.M., Prendergast, P.J. and Campbell, V.A., (2008). 'Mechanisms of strain-mediated mesenchymal stem cell apoptosis'. *J Biomech Eng*, 130 (6):061004.

Kishimoto, T., Yamamoto, K., Sugimoto, T., Yoshihara, H. and Maekawa, M., (1986). 'Side effects of extracorporeal shock-wave exposure in patients treated by extracorporeal shock-wave lithotripsy for upper urinary tract stone'. *Eur Urol*, 12 (5):308-313.

- Kjaer, M.**, (2004). 'Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading'. *Physiol Rev*, 84 (2):649-698.
- Klein-Nulend, J.**, Bacabac, R.G., Veldhuijzen, J.P. and Van Loon, J.J., (2003). 'Microgravity and bone cell mechanosensitivity'. *Adv Space Res*, 32 (8):1551-1559.
- Klinz, F.J.**, Herberg, N., Arnhold, S., Addicks, K. and Bloch, W., (2007). 'Phospho-eNOS Ser-1176 is associated with the nucleoli and the Golgi complex in C6 rat glioma cells'. *Neurosci Lett*, 421 (3):224-228.
- Klinz, F.J.**, Schmidt, A., Schinkothe, T., Arnhold, S., Desai, B., Popken, F., Brixius, K., Schwinger, R., Mehlhorn, U., Staib, P., Addicks, K. and Bloch, W., (2005). 'Phospho-eNOS Ser-114 in human mesenchymal stem cells: constitutive phosphorylation, nuclear localization and upregulation during mitosis'. *Eur J Cell Biol*, 84 (10):809-818.
- Knapp, R.**, Frauscher, F., Helweg, G., zur Nedden, D., Strasser, H., Janetschek, G. and Bartsch, G., (1995). 'Age-related changes in resistive index following extracorporeal shock wave lithotripsy'. *J Urol*, 154 (3):955-958.
- Ko, J.Y.**, Chen, H.S. and Chen, L.M., (2001). 'Treatment of lateral epicondylitis of the elbow with shock waves'. *Clin Orthop Relat Res* (387):60-67.
- Kochanski, A.M.**, Mejnartowicz, J.P., Latos-Bielenska, A., Etienne, J. and Filipczynski, L., (2001). 'DNA damage induced by lithotripter generated shock waves: short report'. *Int Urol Nephrol*, 32 (3):419-422.
- Kodama, T.**, Doukas, A.G. and Hamblin, M.R., (2002). 'Shock wave-mediated molecular delivery into cells'. *Biochim Biophys Acta*, 1542 (1-3):186-194.
- Krampera, M.**, Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E. and Dazzi, F., (2003). 'Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide'. *Blood*, 101 (9):3722-3729.
- Krause, U.**, Harter, C., Seckinger, A., Wolf, D., Reinhard, A., Bea, F., Dengler, T., Hardt, S., Ho, A., Katus, H.A., Kuecherer, H. and Hansen, A., (2007). 'Intravenous delivery of autologous mesenchymal stem cells limits infarct size and improves left ventricular function in the infarcted porcine heart'. *Stem Cells Dev*, 16 (1):31-37.
- Kreis, T.E.** and Birchmeier, W., (1980). 'Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile'. *Cell*, 22 (2 Pt 2):555-561.
- Kuan, T.S.**, (2009). 'Current studies on myofascial pain syndrome'. *Curr Pain Headache Rep*, 13 (5):365-369.

- Kulms, D.**, Dussmann, H., Poppelmann, B., Stander, S., Schwarz, A. and Schwarz, T., (2002). 'Apoptosis induced by disruption of the actin cytoskeleton is mediated via activation of CD95 (Fas/APO-1)'. *Cell Death Differ*, 9 (6):598-608.
- Kumar, A.**, Chaudhry, I., Reid, M.B. and Boriek, A.M., (2002). 'Distinct signaling pathways are activated in response to mechanical stress applied axially and transversely to skeletal muscle fibers'. *J Biol Chem*, 277 (48):46493-46503.
- Kuo, J.C.**, Lin, J.R., Staddon, J.M., Hosoya, H. and Chen, R.H., (2003). 'Uncoordinated regulation of stress fibers and focal adhesions by DAP kinase'. *J Cell Sci*, 116 (Pt 23):4777-4790.
- Kuo, Y.R.**, Wang, C.T., Wang, F.S., Chiang, Y.C. and Wang, C.J., (2009). 'Extracorporeal shock-wave therapy enhanced wound healing via increasing topical blood perfusion and tissue regeneration in a rat model of STZ-induced diabetes'. *Wound Repair Regen*, 17 (4):522-530.
- Kurpinski, K.**, Chu, J., Hashi, C. and Li, S., (2006). 'Anisotropic mechanosensing by mesenchymal stem cells'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (44):16095-16100.
- Kusnierczak, D.**, Brocai, D.R., Vettel, U. and Loew, M., (2000). '[Effect of extracorporeal shockwave administration on biological behavior of bone cells in vitro]'. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 138 (1):29-33.
- Kuznetsov, S.A.**, Friedenstein, A.J. and Robey, P.G., (1997). 'Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro'. *Br J Haematol*, 97 (3):561-570.
- Ladage, D.**, Brixius, K., Steingen, C., Mehlhorn, U., Schwinger, R.H., Bloch, W. and Schmidt, A., (2007). 'Mesenchymal stem cells induce endothelial activation via paracrine mechanisms'. *Endothelium*, 14 (2):53-63.
- Lauffenburger, D.A.** and Horwitz, A.F., (1996). 'Cell migration: a physically integrated molecular process'. *Cell*, 84 (3):359-369.
- Le Blanc, K.**, Gotherstrom, C., Ringden, O., Hassan, M., McMahon, R., Horwitz, E., Anneren, G., Axelsson, O., Nunn, J., Ewald, U., Norden-Lindeberg, S., Jansson, M., Dalton, A., Astrom, E. and Westgren, M., (2005). 'Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta'. *Transplantation*, 79 (11):1607-1614.
- Lee, R.H.**, Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H.S., Suh, K., Bae, Y.C. and Jung, J.S., (2004). 'Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue'. *Cell Physiol Biochem*, 14 (4-6):311-324.
- Li, X.**, Lee, J.P., Balian, G. and Greg Anderson, D., (2005). 'Modulation of chondrocytic properties of fat-derived mesenchymal cells in co-cultures with nucleus pulposus'. *Connect Tissue Res*, 46 (2):75-82.

Li, Z., Guo, J., Chang, Q. and Zhang, A., (2009). 'Paracrine role for mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction'. *Biol Pharm Bull*, 32 (8):1343-1346.

Lifshitz, D.A., Williams, J.C., Jr., Sturtevant, B., Connors, B.A., Evan, A.P. and McAteer, J.A., (1997). 'Quantitation of shock wave cavitation damage in vitro'. *Ultrasound Med Biol*, 23 (3):461-471.

Lillie, R.D., (1944). 'Studies on the Decalcification of Bone'. *Am J Pathol*, 20 (2):291-296.

Lingeman, J.E., Woods, J.R. and Toth, P.D., (1990). 'Blood pressure changes following extracorporeal shock wave lithotripsy and other forms of treatment for nephrolithiasis'. *Jama*, 263 (13):1789-1794.

Linskens, M.H., Feng, J., Andrews, W.H., Enlow, B.E., Saati, S.M., Tonkin, L.A., Funk, W.D. and Villeponteau, B., (1995). 'Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display'. *Nucleic Acids Res*, 23 (16):3244-3251.

Lohrer, H., Nauck, T., Dorn-Lange, N.V., Scholl, J. and Vester, J.C., 'Comparison of radial versus focused extracorporeal shock waves in plantar fasciitis using functional measures'. *Foot Ankle Int*, 31 (1):1-9.

Lokhandwalla, M., McAteer, J.A., Williams, J.C., Jr. and Sturtevant, B., (2001). 'Mechanical haemolysis in shock wave lithotripsy (SWL): II. In vitro cell lysis due to shear'. *Phys Med Biol*, 46 (4):1245-1264.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., (1951). 'Protein measurement with the Folin phenol reagent'. *J Biol Chem*, 193 (1):265-275.

Lumpkin, E.A. and Caterina, M.J., (2007). 'Mechanisms of sensory transduction in the skin'. *Nature*, 445 (7130):858-865.

Martini, L., Fini, M., Giavaresi, G., Torricelli, P., de Pretto, M., Rimondini, L. and Giardino, R., (2003a). 'Primary osteoblasts response to shock wave therapy using different parameters'. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 31 (4):449-466.

Martini, L., Giavaresi, G., Fini, M., Borsari, V., Torricelli, P. and Giardino, R., (2006). 'Early effects of extracorporeal shock wave treatment on osteoblast-like cells: a comparative study between electromagnetic and electrohydraulic devices'. *J Trauma*, 61 (5):1198-1206.

Martini, L., Giavaresi, G., Fini, M., Torricelli, P., Borsari, V., Giardino, R., De Pretto, M., Remondini, D. and Castellani, G.C., (2005). 'Shock wave therapy as an innovative technology in skeletal disorders: study on transmembrane current in stimulated osteoblast-like cells'. *Int J Artif Organs*, 28 (8):841-847.

Martini, L., Giavaresi, G., Fini, M., Torricelli, P., de Pretto, M., Schaden, W. and Giardino, R., (2003b). 'Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblastlike cells'. *Clin Orthop Relat Res* (413):269-280.

Mauney, J.R., Sjostrom, S., Blumberg, J., Horan, R., O'Leary, J.P., Vunjak-Novakovic, G., Volloch, V. and Kaplan, D.L., (2004). 'Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro'. *Calcif Tissue Int*, 74 (5):458-468.

McCullough, D.L., Yeaman, L.D., Bo, W.J., Assimos, D.G., Kroovand, R.L., Griffin, A.S. and Furr, E.G., (1989). 'Effects of shock waves on the rat ovary'. *J Urol*, 141 (3):666-669.

Meazzini, M.C., Toma, C.D., Schaffer, J.L., Gray, M.L. and Gerstenfeld, L.C., (1998). 'Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain in vitro'. *J Orthop Res*, 16 (2):170-180.

Meinel, L., Karageorgiou, V., Hofmann, S., Fajardo, R., Snyder, B., Li, C., Zichner, L., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G. and Kaplan, D.L., (2004). 'Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds'. *J Biomed Mater Res A*, 71 (1):25-34.

Mills, J.C., Stone, N.L. and Pittman, R.N., (1999). 'Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase'. *J Cell Biol*, 146 (4):703-708.

Minguell, J.J., Erices, A. and Conget, P., (2001). 'Mesenchymal stem cells'. *Exp Biol Med (Maywood)*, 226 (6):507-520.

Mirotsov, M., Zhang, Z., Deb, A., Zhang, L., Gneccchi, M., Noiseux, N., Mu, H., Pachori, A. and Dzau, V., (2007). 'Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (5):1643-1648.

Mitchison, T.J. and Cramer, L.P., (1996). 'Actin-based cell motility and cell locomotion'. *Cell*, 84 (3):371-379.

Moretti, B., Garofalo, R., Patella, V., Sisti, G.L., Corrado, M. and Mouhsine, E., (2006). 'Extracorporeal shock wave therapy in runners with a symptomatic heel spur'. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 14 (10):1029-1032.

Morita, T., Kurihara, H., Maemura, K., Yoshizumi, M., Nagai, R. and Yazaki, Y., (1994). 'Role of Ca²⁺ and protein kinase C in shear stress-induced actin depolymerization and endothelin 1 gene expression'. *Circ Res*, 75 (4):630-636.

Morris, J.S., Husmann, D.A., Wilson, W.T. and Preminger, G.M., (1991). 'Temporal effects of shock wave lithotripsy'. *J Urol*, 145 (4):881-883.

- Mott, R.E.** and Helmke, B.P., (2007). 'Mapping the dynamics of shear stress-induced structural changes in endothelial cells'. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293 (5):C1616-1626.
- Muller-Mattheis, V.G.**, Schmale, D., Seewald, M., Rosin, H. and Ackermann, R., (1991). 'Bacteremia during extracorporeal shock wave lithotripsy of renal calculi'. *J Urol*, 146 (3):733-736.
- Munevar, S.**, Wang, Y.L. and Dembo, M., (2004). 'Regulation of mechanical interactions between fibroblasts and the substratum by stretch-activated Ca²⁺ entry'. *J Cell Sci*, 117 (Pt 1):85-92.
- Murata, R.**, Ohtori, S., Ochiai, N., Takahashi, N., Saisu, T., Moriya, H., Takahashi, K. and Wada, Y., (2006). 'Extracorporeal shockwaves induce the expression of ATF3 and GAP-43 in rat dorsal root ganglion neurons'. *Auton Neurosci*, 128 (1-2):96-100.
- Newman, R.**, Hackett, R., Senior, D., Brock, K., Feldman, J., Sosnowski, J. and Finlayson, B., (1987). 'Pathologic effects of ESWL on canine renal tissue'. *Urology*, 29 (2):194-200.
- Niehoff, A.**, Offermann, M., Dargel, J., Schmidt, A., Bruggemann, G.P. and Bloch, W., (2008). 'Dynamic and static mechanical compression affects Akt phosphorylation in porcine patellofemoral joint cartilage'. *J Orthop Res*, 26 (5):616-623.
- Nishida, T.**, Shimokawa, H., Oi, K., Tatewaki, H., Uwatoku, T., Abe, K., Matsumoto, Y., Kajihara, N., Eto, M., Matsuda, T., Yasui, H., Takeshita, A. and Sunagawa, K., (2004). 'Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo'. *Circulation*, 110 (19):3055-3061.
- Nobes, C.D.** and Hall, A., (1995). 'Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility'. *Biochem Soc Trans*, 23 (3):456-459.
- Nobes, C.D.** and Hall, A., (1999). 'Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement'. *J Cell Biol*, 144 (6):1235-1244.
- Novak, K.F.**, Govindaswami, M., Ebersole, J.L., Schaden, W., House, N. and Novak, M.J., (2008). 'Effects of low-energy shock waves on oral bacteria'. *J Dent Res*, 87 (10):928-931.
- Ogden, J.A.**, Alvarez, R., Levitt, R., Cross, G.L. and Marlow, M., (2001a). 'Shock wave therapy for chronic proximal plantar fasciitis'. *Clin Orthop Relat Res* (387):47-59.
- Ogden, J.A.**, Toth-Kischkat, A. and Schultheiss, R., (2001b). 'Principles of shock wave therapy'. *Clin Orthop Relat Res* (387):8-17.
- Ohl, C.D.** and Ikink, R., (2003). 'Shock-wave-induced jetting of micron-size bubbles'. *Phys Rev Lett*, 90 (21):214502.

- Ohl, C.D.** and Wolfrum, B., (2003). 'Detachment and sonoporation of adherent HeLa-cells by shock wave-induced cavitation'. *Biochim Biophys Acta*, 1624 (1-3):131-138.
- Park, J.S.**, Chu, J.S., Cheng, C., Chen, F., Chen, D. and Li, S., (2004). 'Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells'. *Biotechnol Bioeng*, 88 (3):359-368.
- Patel, T.**, Gores, G.J. and Kaufmann, S.H., (1996). 'The role of proteases during apoptosis'. *Faseb J*, 10 (5):587-597.
- Paterson, H.F.**, Self, A.J., Garrett, M.D., Just, I., Aktories, K. and Hall, A., (1990). 'Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology'. *J Cell Biol*, 111 (3):1001-1007.
- Pavalko, F.M.**, Chen, N.X., Turner, C.H., Burr, D.B., Atkinson, S., Hsieh, Y.F., Qiu, J. and Duncan, R.L., (1998). 'Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions'. *Am J Physiol*, 275 (6 Pt 1):C1591-1601.
- Pellegrin, S.** and Mellor, H., (2007). 'Actin stress fibres'. *J Cell Sci*, 120 (Pt 20):3491-3499.
- Peters, J.**, Luboldt, W., Schwarz, W., Jacobi, V., Herzog, C. and Vogl, T.J., (2004). 'Extracorporeal shock wave therapy in calcific tendinitis of the shoulder'. *Skeletal Radiol*, 33 (12):712-718.
- 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. and Marshak, D.R., (1999). 'Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells'. *Science*, 284 (5411):143-147.
- Pittenger, M.F.** and Martin, B.J., (2004). 'Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics'. *Circ Res*, 95 (1):9-20.
- Pittenger, M.F.**, Mosca, J.D. and McIntosh, K.R., (2000). 'Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma'. *Curr Top Microbiol Immunol*, 251:3-11.
- Pollard, T.D.**, Blanchoin, L. and Mullins, R.D., (2000). 'Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells'. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29:545-576.
- Puthalakath, H.**, Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C. and Strasser, A., (2001). 'Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis'. *Science*, 293 (5536):1829-1832.
- Qin, L.**, Wang, L., Wong, M.W., Wen, C., Wang, G., Zhang, G., Chan, K.M., Cheung, W.H. and Leung, K.S., 'Osteogenesis induced by extracorporeal shockwave in treatment of delayed osteotendinous junction healing'. *J Orthop Res*, 28 (1):70-76.

Randazzo, R.F., Chaussy, C.G., Fuchs, G.J., Bhuta, S.M., Lovrekovich, H. and deKernion, J.B., (1988). 'The in vitro and in vivo effects of extracorporeal shock waves on malignant cells'. *Urol Res*, 16 (6):419-426.

Renner, C. and Rassweiler, J., (1999). 'Treatment of renal stones by extracorporeal shock wave lithotripsy'. *Nephron*, 81 Suppl 1:71-81.

Renz, H. and Rupp, S., (2009). 'Effects of shock waves on chondrocytes and their relevance in clinical practice'. *Arch Orthop Trauma Surg*, 129 (5):641-647.

Rid, R., Schiefermeier, N., Grigoriev, I., Small, J.V. and Kaverina, I., (2005). 'The last but not the least: the origin and significance of trailing adhesions in fibroblastic cells'. *Cell Motil Cytoskeleton*, 61 (3):161-171.

Robling, A.G. and Turner, C.H., (2009). 'Mechanical signaling for bone modeling and remodeling'. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 19 (4):319-338.

Rompe, J.D., Decking, J., Schoellner, C. and Nafe, B., (2003). 'Shock wave application for chronic plantar fasciitis in running athletes. A prospective, randomized, placebo-controlled trial'. *Am J Sports Med*, 31 (2):268-275.

Rompe, J.D., Hope, C., Kullmer, K., Heine, J. and Burger, R., (1996). 'Analgesic effect of extracorporeal shock-wave therapy on chronic tennis elbow'. *J Bone Joint Surg Br*, 78 (2):233-237.

Rompe, J.D., Krischek, O., Eysel, P., Hopf, C. and Jage, J., (1998). '[Results of extracorporeal shock-wave application in lateral elbow tendopathy]'. *Schmerz*, 12 (2):105-111.

Rompe, J.D., Schoellner, C. and Nafe, B., (2002). 'Evaluation of low-energy extracorporeal shock-wave application for treatment of chronic plantar fasciitis'. *J Bone Joint Surg Am*, 84-A (3):335-341.

Rottner, K., Hall, A. and Small, J.V., (1999). 'Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics'. *Curr Biol*, 9 (12):640-648.

Rychly, J., Pommerenke, H., Durr, F., Schreiber, E. and Nebe, B., (1998). 'Analysis of spatial distributions of cellular molecules during mechanical stressing of cell surface receptors using confocal microscopy'. *Cell Biol Int*, 22 (1):7-12.

Sauerbruch, T., Delius, M., Paumgartner, G., Holl, J., Wess, O., Weber, W., Hepp, W. and Brendel, W., (1986). 'Fragmentation of gallstones by extracorporeal shock waves'. *N Engl J Med*, 314 (13):818-822.

Schaaf, A., Langbein, S., Knoll, T., Alken, P. and Michel, M.S., (2003). 'In vitro transfection of human bladder cancer cells by acoustic energy'. *Anticancer Res*, 23 (6C):4871-4875.

Schaden, W., Thiele, R., Kolpl, C., Pusch, M., Nissan, A., Attinger, C.E., Maniscalco-Theberge, M.E., Peoples, G.E., Elster, E.A. and Stojadinovic, A., (2007). 'Shock wave therapy for acute and chronic soft tissue wounds: a feasibility study'. *J Surg Res*, 143 (1):1-12.

Schleberger, R. and Senge, T., (1992). 'Non-invasive treatment of long-bone pseudarthrosis by shock waves (ESWL)'. *Arch Orthop Trauma Surg*, 111 (4):224-227.

Schmeller, N.T., Kersting, H., Schuller, J., Chaussy, C. and Schmiedt, E., (1984). 'Combination of chemolysis and shock wave lithotripsy in the treatment of cystine renal calculi'. *J Urol*, 131 (3):434-438.

Schmidt, A., Bierwirth, S., Weber, S., Platen, P., Schinkothe, T. and Bloch, W., (2009). 'Short intensive exercise increases the migratory activity of mesenchymal stem cells'. *Br J Sports Med*, 43 (3):195-198.

Schmidt, A., Ladage, D., Schinkothe, T., Klausmann, U., Ulrichs, C., Klinz, F.J., Brixius, K., Arnhold, S., Desai, B., Mehlhorn, U., Schwinger, R.H., Staib, P., Addicks, K. and Bloch, W., (2006a). 'Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells'. *Stem Cells*, 24 (7):1750-1758.

Schmidt, A., Ladage, D., Steingen, C., Brixius, K., Schinkothe, T., Klinz, F.J., Schwinger, R.H., Mehlhorn, U. and Bloch, W., (2006b). 'Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier'. *Eur J Cell Biol*, 85 (11):1179-1188.

Schmiedt, E. and Chaussy, C., (1984). 'Extracorporeal shock-wave lithotripsy of kidney and ureteric stones'. *Urol Int*, 39 (4):193-198.

Schmitt, J., Haake, M., Tosch, A., Hildebrand, R., Deike, B. and Griss, P., (2001). 'Low-energy extracorporeal shock-wave treatment (ESWT) for tendinitis of the supraspinatus. A prospective, randomised study'. *J Bone Joint Surg Br*, 83 (6):873-876.

Scholzen, T. and Gerdes, J., (2000). 'The Ki-67 protein: from the known and the unknown'. *J Cell Physiol*, 182 (3):311-322.

Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., Pochampally, R., Cui, J.G. and Prockop, D.J., (2002). 'Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality'. *Stem Cells*, 20 (6):530-541.

Selden, S.C., 3rd and Schwartz, S.M., (1979). 'Cytochalasin B inhibition of endothelial proliferation at wound edges in vitro'. *J Cell Biol*, 81 (2):348-354.

Sells, S.F., Wood, D.P., Jr., Joshi-Barve, S.S., Muthukumar, S., Jacob, R.J., Crist, S.A., Humphreys, S. and Rangnekar, V.M., (1994). 'Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells'. *Cell Growth Differ*, 5 (4):457-466.

- Sherwood, S.W.**, Rush, D., Ellsworth, J.L. and Schimke, R.T., (1988). 'Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (23):9086-9090.
- Shur, I.**, Reish, O., Ezra, E. and Benayahu, D., (2004). 'Analysis of mesenchymal cells derived from an chondrodysplasia punctuate patient and donors'. *J Cell Biochem*, 93 (1):112-119.
- Siems, W.**, Grune, T., Voss, P. and Brenke, R., (2005). 'Anti-fibrosclerotic effects of shock wave therapy in lipedema and cellulite'. *Biofactors*, 24 (1-4):275-282.
- Simmons, C.A.**, Matlis, S., Thornton, A.J., Chen, S., Wang, C.Y. and Mooney, D.J., (2003). 'Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway'. *J Biomech*, 36 (8):1087-1096.
- Sims, J.R.**, Karp, S. and Ingber, D.E., (1992). 'Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape'. *J Cell Sci*, 103 (Pt 4):1215-1222.
- Smith, F.L.**, Carper, S.W., Hall, J.S., Gilligan, B.J., Madsen, E.L. and Storm, F.K., (1992). 'Cellular effects of piezoelectric versus electrohydraulic high energy shock waves'. *J Urol*, 147 (2):486-490.
- Smith, J.R.** and Lincoln, D.W., 2nd, (1984). 'Aging of cells in culture'. *Int Rev Cytol*, 89:151-177.
- Smits, G.A.**, Oosterhof, G.O., de Ruyter, A.E., Schalken, J.A. and Debruyne, F.M., (1991). 'Cytotoxic effects of high energy shock waves in different in vitro models: influence of the experimental set-up'. *J Urol*, 145 (1):171-175.
- Steingen, C.**, Brenig, F., Baumgartner, L., Schmidt, J., Schmidt, A. and Bloch, W., (2008). 'Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells'. *J Mol Cell Cardiol*, 44 (6):1072-1084.
- Stenderup, K.**, Justesen, J., Clausen, C. and Kassem, M., (2003). 'Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells'. *Bone*, 33 (6):919-926.
- Straub, M.**, Gschwend, J. and Zorn, C., 'Pediatric urolithiasis: the current surgical management'. *Pediatr Nephrol*, 25 (7):1239-1244.
- Suarez-Huerta, N.**, Mosselmans, R., Dumont, J.E. and Robaye, B., (2000). 'Actin depolymerization and polymerization are required during apoptosis in endothelial cells'. *J Cell Physiol*, 184 (2):239-245.

Takahashi, K., Yamazaki, M., Saisu, T., Nakajima, A., Shimizu, S., Mitsuhashi, S. and Moriya, H., (2004). 'Gene expression for extracellular matrix proteins in shockwave-induced osteogenesis in rats'. *Calcif Tissue Int*, 74 (2):187-193.

Tam, K.F., Cheung, W.H., Lee, K.M., Qin, L. and Leung, K.S., (2005). 'Delayed stimulatory effect of low-intensity shockwaves on human periosteal cells'. *Clin Orthop Relat Res*, 438:260-265.

Tam, K.F., Cheung, W.H., Lee, K.M., Qin, L. and Leung, K.S., (2009). 'Shockwave exerts osteogenic effect on osteoporotic bone in an ovariectomized goat model'. *Ultrasound Med Biol*, 35 (7):1109-1118.

Tamma, R., dell'Endice, S., Notarnicola, A., Moretti, L., Patella, S., Patella, V., Zallone, A. and Moretti, B., (2009). 'Extracorporeal shock waves stimulate osteoblast activities'. *Ultrasound Med Biol*, 35 (12):2093-2100.

Tang, J., Wang, J., Guo, L., Kong, X., Yang, J., Zheng, F., Zhang, L. and Huang, Y., 'Mesenchymal stem cells modified with stromal cell-derived factor 1 alpha improve cardiac remodeling via paracrine activation of hepatocyte growth factor in a rat model of myocardial infarction'. *Mol Cells*, 29 (1):9-19.

Tarbell, J.M., Weinbaum, S. and Kamm, R.D., (2005). 'Cellular fluid mechanics and mechanotransduction'. *Ann Biomed Eng*, 33 (12):1719-1723.

Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E. and Scott, E.W., (2002). 'Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion'. *Nature*, 416 (6880):542-545.

Thiel, M., Nieswand, M. and Dorffel, M., (2000). 'The use of shock waves in medicine--a tool of the modern OR: an overview of basic physical principles, history and research'. *Minim Invasive Ther Allied Technol*, 9 (3-4):247-253.

Tidball, J.G., (2005). 'Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation'. *J Appl Physiol*, 98 (5):1900-1908.

Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J. and Kessler, P.D., (2002). 'Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart'. *Circulation*, 105 (1):93-98.

Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R. and Miller, F.D., (2001). 'Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin'. *Nat Cell Biol*, 3 (9):778-784.

Tondreau, T., Lagneaux, L., Dejeneffe, M., Delforge, A., Massy, M., Mortier, C. and Bron, D., (2004a). 'Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential'. *Cytotherapy*, 6 (4):372-379.

Tondreau, T., Lagneaux, L., Dejeneffe, M., Massy, M., Mortier, C., Delforge, A. and Bron, D., (2004b). 'Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation'. *Differentiation*, 72 (7):319-326.

Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D.J., Yamakita, Y., Yamashiro, S. and Matsumura, F., (2004). 'Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts'. *J Cell Biol*, 164 (3):427-439.

Traut, W., Scholzen, T., Winking, H., Kubbutat, M.H. and Gerdes, J., (1998). 'Assignment1 of the murine Ki-67 gene (Mki67) to chromosome band 7F3-F5 by in situ hybridization'. *Cytogenet Cell Genet*, 83 (1-2):12-13.

Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C. and Guinan, E.C., (2003). 'Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation'. *Transplantation*, 75 (3):389-397.

Turner, C.H. and Pavalko, F.M., (1998). 'Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation'. *J Orthop Sci*, 3 (6):346-355.

Uhlig, S., (2002). 'Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: stretching it too far?' *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282 (5):L892-896.

Uwatoku, T., Ito, K., Abe, K., Oi, K., Hizume, T., Sunagawa, K. and Shimokawa, H., (2007). 'Extracorporeal cardiac shock wave therapy improves left ventricular remodeling after acute myocardial infarction in pigs'. *Coron Artery Dis*, 18 (5):397-404.

Vetterkind, S., Illenberger, S., Kubicek, J., Boosen, M., Appel, S., Naim, H.Y., Scheidtmann, K.H. and Preuss, U., (2005). 'Binding of Par-4 to the actin cytoskeleton is essential for Par-4/Dlk-mediated apoptosis'. *Exp Cell Res*, 305 (2):392-408.

Violini, S., Ramelli, P., Pisani, L.F., Gorni, C. and Mariani, P., (2009). 'Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12'. *BMC Cell Biol*, 10:29.

Vogel, W., Grunebach, F., Messam, C.A., Kanz, L., Brugger, W. and Buhning, H.J., (2003). 'Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells'. *Haematologica*, 88 (2):126-133.

Vollrath, M.A., Kwan, K.Y. and Corey, D.P., (2007). 'The micromachinery of mechanotransduction in hair cells'. *Annu Rev Neurosci*, 30:339-365.

- Waddington, G.**, (2003). 'Extracorporeal shock wave therapy no better than placebo in the treatment of plantar fasciitis'. *Aust J Physiother*, 49 (1):69.
- Wang, C.J.** and Chen, H.S., (2002). 'Shock wave therapy for patients with lateral epicondylitis of the elbow: a one- to two-year follow-up study'. *Am J Sports Med*, 30 (3):422-425.
- Wang, C.J.**, Chen, H.S., Chen, W.S. and Chen, L.M., (2000). 'Treatment of painful heels using extracorporeal shock wave'. *J Formos Med Assoc*, 99 (7):580-583.
- Wang, C.J.**, Ko, J.Y. and Chen, H.S., (2001). 'Treatment of calcifying tendinitis of the shoulder with shock wave therapy'. *Clin Orthop Relat Res* (387):83-89.
- Wang, C.J.**, Wang, F.S., Yang, K.D., Weng, L.H., Hsu, C.C., Huang, C.S. and Yang, L.C., (2003a). 'Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits'. *J Orthop Res*, 21 (6):984-989.
- Wang, C.J.**, Yang, K.D., Wang, F.S., Chen, H.H. and Wang, J.W., (2003b). 'Shock wave therapy for calcific tendinitis of the shoulder: a prospective clinical study with two-year follow-up'. *Am J Sports Med*, 31 (3):425-430.
- Wang, F.S.**, Yang, K.D., Wang, C.J., Huang, H.C., Chio, C.C., Hsu, T.Y. and Ou, C.Y., (2004). 'Shockwave stimulates oxygen radical-mediated osteogenesis of the mesenchymal cells from human umbilical cord blood'. *J Bone Miner Res*, 19 (6):973-982.
- Wang, Y.**, Botvinick, E.L., Zhao, Y., Berns, M.W., Usami, S., Tsien, R.Y. and Chien, S., (2005). 'Visualizing the mechanical activation of Src'. *Nature*, 434 (7036):1040-1045.
- Weil, B.R.**, Markel, T.A., Herrmann, J.L., Abarbanell, A.M. and Meldrum, D.R., (2009). 'Mesenchymal stem cells enhance the viability and proliferation of human fetal intestinal epithelial cells following hypoxic injury via paracrine mechanisms'. *Surgery*, 146 (2):190-197.
- Weil, L.S., Jr.**, Roukis, T.S., Weil, L.S. and Borrelli, A.H., (2002). 'Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of chronic plantar fasciitis: indications, protocol, intermediate results, and a comparison of results to fasciotomy'. *J Foot Ankle Surg*, 41 (3):166-172.
- White, S.R.**, Williams, P., Wojcik, K.R., Sun, S., Hiemstra, P.S., Rabe, K.F. and Dorscheid, D.R., (2001). 'Initiation of apoptosis by actin cytoskeletal derangement in human airway epithelial cells'. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24 (3):282-294.
- Wickham, J.E.**, Webb, D.R., Payne, S.R., Kellet, M.J., Watkinson, G. and Whitfield, H.N., (1985). 'Extracorporeal shock wave lithotripsy: the first 50 patients treated in Britain'. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 290 (6476):1188-1189.
- Williams, J.C., Jr.**, Woodward, J.F., Stonehill, M.A., Evan, A.P. and McAteer, J.A., (1999). 'Cell damage by lithotripter shock waves at high pressure to preclude cavitation'. *Ultrasound Med Biol*, 25 (9):1445-1449.

- Woo, S.L.**, Hildebrand, K., Watanabe, N., Fenwick, J.A., Papageorgiou, C.D. and Wang, J.H., (1999). 'Tissue engineering of ligament and tendon healing'. *Clin Orthop Relat Res* (367 Suppl):S312-323.
- Wu, Y.H.**, Liang, H.W., Chen, W.S., Lai, J.S., Luh, J.J. and Chong, F.C., (2008). 'Electrophysiological and functional effects of shock waves on the sciatic nerve of rats'. *Ultrasound Med Biol*, 34 (10):1688-1696.
- Xiang, M.X.**, He, A.N., Wang, J.A. and Gui, C., (2009). 'Protective paracrine effect of mesenchymal stem cells on cardiomyocytes'. *J Zhejiang Univ Sci B*, 10 (8):619-624.
- Xu, R.X.**, Chen, X., Chen, J.H., Han, Y. and Han, B.M., (2009). 'Mesenchymal stem cells promote cardiomyocyte hypertrophy in vitro through hypoxia-induced paracrine mechanisms'. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 36 (2):176-180.
- Yamazaki, Y.**, Tsuruga, M., Zhou, D., Fujita, Y., Shang, X., Dang, Y., Kawasaki, K. and Oka, S., (2000). 'Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis'. *Exp Cell Res*, 259 (1):64-78.
- Yan, X.**, Zeng, B., Chai, Y., Luo, C. and Li, X., (2008). 'Improvement of blood flow, expression of nitric oxide, and vascular endothelial growth factor by low-energy shockwave therapy in random-pattern skin flap model'. *Ann Plast Surg*, 61 (6):646-653.
- Ye, C.**, Bai, L., Yan, Z.Q., Wang, Y.H. and Jiang, Z.L., (2008). 'Shear stress and vascular smooth muscle cells promote endothelial differentiation of endothelial progenitor cells via activation of Akt'. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 23 Suppl 1:S118-124.
- Young, R.G.**, Butler, D.L., Weber, W., Caplan, A.I., Gordon, S.L. and Fink, D.J., (1998). 'Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair'. *J Orthop Res*, 16 (4):406-413.
- Zaidel-Bar, R.**, Cohen, M., Addadi, L. and Geiger, B., (2004). 'Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes'. *Biochem Soc Trans*, 32 (Pt3):416-420.
- Zhong, P.**, Lin, H., Xi, X., Zhu, S. and Bhogte, E.S., (1999). 'Shock wave-inertial microbubble interaction: methodology, physical characterization, and bioeffect study'. *J Acoust Soc Am*, 105 (3):1997-2009.
- Zimpfer, D.**, Aharinejad, S., Holfeld, J., Thomas, A., Dumfarth, J., Rosenhek, R., Czerny, M., Schaden, W., Gmeiner, M., Wolner, E. and Grimm, M., (2009). 'Direct epicardial shock wave therapy improves ventricular function and induces angiogenesis in ischemic heart failure'. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 137 (4):963-970.
- Zuk, P.A.**, Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. and Hedrick, M.H., (2002). 'Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells'. *Mol Biol Cell*, 13 (12):4279-4295.